

病原性細菌に対する
バクテリオファージの応用に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

古澤 貴章

獣医生化学ユニット

指導教員 教授 岩野 英知

2016 年度

目次

緒論	1
第 I 章 緑膿菌ファージの分離とその特性の評価	
1. 序文	4
2. 材料と方法	4
3. 結果	8
4. 考察	14
5. 小括	16
第 II 章 緑膿菌性角膜炎モデルマウスに対する緑膿菌ファージの有効性	
1. 序文	17
2. 材料と方法	18
3. 結果	22
4. 考察	31
5. 小括	33
第 III 章 緑膿菌ファージの全ゲノムシーケンスとその溶菌酵素遺伝子の決定	
1. 序文	35
2. 材料と方法	35
3. 結果	37
4. 考察	52
5. 小括	53
第 IV 章 緑膿菌ファージの溶菌酵素の発現と精製	
1. 序文	54
2. 材料と方法	55
3. 結果	62
4. 考察	66
5. 小括	68
第 V 章 総括	69

謝辭	71
参考文献	72

緒論

現在、抗生物質の効かない細菌である薬剤耐性菌が世界中で問題になっている。1928年に世界最初の抗生物質であるペニシリンが発見された。1945年に臨床応用され、一度は感染症との戦いは終わったと宣言されたが現代に至るまで抗生物質とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌をはじめとする薬剤耐性菌とのいたちごっこが続いている[3, 16, 29]。2015年にWHOから世界の薬剤耐性に関する状況のファクトシート

(<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>)が報告された。2016年5月に開催されたG7伊勢志摩サミットでも議題に上げられた。日本国内でも今年5月に「国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議」より薬剤耐性(AMR)対策アクションプラン

(<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000120172.html>)が決定され、世界中で薬剤耐性菌を警戒している。それを受け、研究者たちは抗生物質に代わる新たな治療戦略の開発に向けて研究を進めている。

そのような現状で、薬剤耐性菌に対する新たな対抗手段の一つとしてファージセラピーが注目を集めている。ファージセラピーは1915年にFelix d'Herelleによって発見されたバクテリオファージ(ファージ)を利用した細菌感染症治療法である[8]。ファージは細菌に特異的に感染するウイルスで、細菌表面構造や鞭毛などを認識して感染し、DNAを注入すると細菌の代謝を利用して増殖する。最終的にエンドライシンと呼ばれるペプチドグリカン切断酵素によって細菌を溶解させて娘ファージが放出される[12]。細菌特異的に感染し、動物細胞には感染しないため副作用が少ないこと、菌種特異性も高いことから常在細菌叢が保護されること、溶菌機序が抗生物質と異なるため薬剤耐性菌も溶菌可能であることなどファージセラピーには利点が多い。しかし、ファージ耐性菌の出現、宿主免疫誘導によるファージ中和抗体の出現、ファージ遺伝子

の自律的变化など欠点も多く、臨床応用には課題が残る[10, 14, 28, 37]。一方でアメリカ合衆国では Intralytix 社が開発したファージスプレーがアメリカ食品医薬品局(FDA)より認可され、すでに応用されている

(<http://www.intralytix.com>)。標的となる細菌は *Listeria monocytogenes* や *E. coli* O157:H7、*Salmonella* spp. であり、食品加工段階におけるこれらの細菌によるコンタミネーションを防ぐことを目的としている[2]。

緑膿菌は運動性のグラム陰性好気性桿菌で[62]、ヒトでは創傷感染や尿路感染、敗血症などの主な原因菌であり[60]、犬では外耳炎、慢性の深部膿瘍、創傷感染、尿路感染症などを引き起こすため[21, 33]、人医療領域及び獣医療領域ともに問題になりやすい。また、緑膿菌は多くの抗生物質に対して耐性を持ちやすい。その理由として、外膜によるバリアや薬剤の排出ポンプ、薬剤の不活化、バイオフィーム産生などがある[45]。近年ではフルオロキノロン系薬剤に対して耐性を持つ緑膿菌も多数分離されており、これは排出ポンプの発現増加と DNA ジャイレースのサブユニット A をコードする *gyrA* 遺伝子とトポイソメラーゼ IV のサブユニット A をコードする *parC* 遺伝子の点突然変異によるものとされている[20, 25, 30, 33, 48, 50, 59]。以上から緑膿菌は公衆衛生上重要な細菌の一つと捉えられている。

本研究ではこの緑膿菌に対するファージを野外から複数株分離し、その基礎的な特性を明らかにするために緑膿菌に対する宿主域を検討し、電子顕微鏡下での形態観察を行った(第 I 章)。次に競走馬の細菌性角膜炎に対する効果を評価するために馬の病巣から分離された緑膿菌に対する宿主域の検討及び吸着効率の検討を行い、及び緑膿菌性角膜炎モデルマウスを用いた点眼治療実験を行った(第 II 章)。最後に実験に用いたファージの安全性を確認し、さらにその溶菌酵素(エンドライシン)遺伝子を特定するために全ゲノムシーケンスを実施した(第 III 章)。特定された配列をもとに大腸菌内でエンドライシンを発現さ

せ、精製、その溶菌活性を検討した(第 IV 章)。

以上、バクテリオファージの治療的可能性について検討する目的で研究を展開した。

第 I 章 緑膿菌ファージの分離とその特性の評価

1. 序文

1928 年のペニシリンの発見により西洋諸国では抗生物質による感染症治療が主流となった一方で、東西冷戦の壁により旧ソ連やジョージア(旧グルジア)といった東欧諸国では抗生物質に頼ることができず、ファージが治療に用いられてきた[10, 12]。その後、世界中で抗生物質が利用できるようになってからもこれら東欧の国々ではファージに関する研究が続けられ、ポーランドでは人に対する臨床応用まで行われている[27, 31, 65]。現代では薬剤耐性菌が世界規模で問題になったことでファージセラピーが細菌に対する抗生物質以外の新たな手段として注目されている[10, 17, 46]。

そこで我々は世界的に薬剤耐性で問題となっている通称「ESKAPE」と呼ばれる 6 種の菌(*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* 及び *Enterobacter* spp.) [43, 54]から緑膿菌 *P. aeruginosa* に着目した。緑膿菌は獣医療領域でもその耐性化が問題になっている[20, 25, 30, 33, 48, 59]。コンパニオンアニマルが保有する薬剤耐性菌はそのオーナーや治療する獣医師に移行する可能性がある。そこで我々は緑膿菌に対するファージを分離し、抗生物質に代わる治療的応用を視野にその特性を明らかにした。

2. 材料と方法

1) 培地及び試薬

<培地>

LB (Luria – Bertani)培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™))

LB 寒天培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast

extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、 1.5% agar (和光純薬工業))

LB 軟寒天培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、 0.5% アガロース ME(東京 岩井化学薬品))

2) 菌株、バクテリオファージ

<菌株>

本研究では、酪農学園大学食品衛生学ユニットから供与いただいたイヌ病巣由来緑膿菌 39 株を使用した。この菌株は原田らの報告[20]のイヌ病巣由来緑膿菌株 39 株と同じ菌である。各菌株を LB 培地に接種、1 昼夜 37°C で振盪しながら増菌培養した培養液を 50%グリセロールと等量混合してグリセリンストックとした。グリセリンストックは-80°Cにて保存した。

<バクテリオファージ>

江別市、及び札幌市の下水処理場内の汚水から分離されたファージ(ΦR12、ΦS12-1、ΦS12-3、ΦR18、ΦR26 及び ΦS50)を用いた。分離方法に関しては 3) に記した。

3) バクテリオファージの分離

<プラークアッセイ>

緑膿菌のグリセリンストック菌液 100 μL を LB 培地 3 mL に接種し、37°C で振盪しながら 12 時間培養した。LB 培地で培養した菌液 110 μL とファージ液 110 μL をエッペンチューブに分注し、10 分間の吸着時間を置き、45°C のヒートブロックで温めておいた LB 軟寒天培地に菌・ファージ混合液を 200 μL 接種、混合したのち素早く LB 寒天培地に重層した。37°C で 12 時間静置培養後ファージの単離、あるいはプラーク形成単位(PFU)測定を行った。

<バクテリオファージの単離>

プラークアッセイで形成されたプラークのうちサイズの大きなものを2個、中程度及び小さいもの1個ずつをそれぞれLB培地2 mLに接種し、37°Cで振盪しながら2時間培養し、溶出させた。1/20量のクロロホルムを添加、混合した後、10,000 × g、5分間、4°Cで遠心分離し、上清を回収した。このサンプルでプラークアッセイを実施し、複数回プラークアッセイを行い均一なプラークを形成したサンプルを純化ファージサンプルとした。

4) イヌ病巣由来緑膿菌に対するファージの溶菌活性測定

<スポットテスト>

緑膿菌のグリセリンストック菌液100 µLをLB培地3 mLに接種し、37°Cで振盪しながら12時間培養した。45°Cのヒートブロックで温めておいたLB軟寒天培地に、LB培地で培養した菌液100 µLを接種、混合したのち素早くLB寒天培地に重層した。固まった軟寒天培地上にファージ液(10^{10} PFU/mL)を10 µL滴下し、37°Cで24時間培養し、プラークの形成を観察して溶菌活性の判定を行った。

5) 緑膿菌に対するニューキノロン系抗菌薬の最小発育阻止濃度(MIC)判定

エンロフロキサシン(ERFX)及びオルビフロキサシン(OBFX)をLB培地で125~0.125 µg/mLまで段階希釈し、100 µLずつ96ウェルマイクロタイタープレートへ分注した。一晚培養した緑膿菌液を 10^7 コロニー形成単位(CFU)になるよう希釈し、10 µLずつ上述の96ウェルマイクロタイタープレートへ分注し35°Cで16~18時間培養した。MICは各ウェルで濁りが確認されなかった最小の抗菌薬濃度とした。

6) バクテリオファージの電子顕微鏡写真撮影

<プレートライセート法>

プラークアッセイによって得られた純化ファージサンプルをプレートライセート法により増幅させた。緑膿菌のグリセリンストック菌液 100 μL を LB 培地 3 mL に接種し、37°C で振盪しながら 12 時間培養した。LB 培地で培養した菌液 110 μL とファージ液($10^6\sim 10^7$ PFU/mL)110 μL をエッペンチューブに分注し、10 分間の吸着時間を置き、45°C のヒートブロックで温めておいた LB 軟寒天培地に菌-ファージ混合液を 200 μL 接種、混合したのち素早く LB 寒天培地に重層した。37°C で 12 時間静置培養後レース模様状に多数のプラークを形成させた LB 寒天培地上に SM buffer を 3mL 加え 1~2 時間室温静置した。その後滅菌したコンラージ棒で LB 軟寒天培地をかきとり、ホモジナイズした。SM buffer を含んだ LB 軟寒天培地を 10,000 \times g、4°C、15 分間遠心分離し上清を新しいチューブに移してクロロホルムを 1 滴添加し 4°C で保管した。

<塩化セシウム密度勾配遠心法によるバクテリオファージの精製>

増幅させたファージサンプルを CsCl 溶液によって 1.46~1.63 の密度勾配に従って遠心分離を行った (RCF (relative centrifuge force); Rmax 111,000 \times g, Rav 81,900 \times g、4°C、1 時間(Accel:9、Decel:2))。密度 1.50 付近にあるファージ層を慎重に採取し、SM buffer で 12 時間透析を行った。

<透過型電子顕微鏡によるファージの形状観察>

400 メッシュのグリッドを使用し、以下の方法を用いてグリッドにコロジオン膜を圧着させた。すなわち、グリッド上に 0.5% ネオプレン溶液を滴下して乾燥させた。一方、直径 12 cm のガラスシャーレに蒸留水を張り白熱灯にて暖めて、2% コロジオン溶液を滴下して水面に薄膜を作成した。薄膜上に乾燥後のグリッドを載せ、コロジオン膜をグリッドに圧着させた。その後、真空蒸着器 (Hitachi、HUS-5GB) を用いてコロジオン膜表面にカーボンを蒸着した。

カーボン蒸着したグリットはイオンスパッター (JEOL、JFC-1100) にて 2 mA で 30 秒間グロー放電して親水化処理を行った。

親水化処理後のグリットにファージ溶液を 10 μ L 載せて 2~3 分間静置した。その後、溶液をろ紙で吸い取り。PBS を滴下して洗浄し、同様にろ紙で吸い取った。次いで 2% 酢酸ウランを一滴載せて 10 秒程静置した後に、ろ紙で吸い取りグリットを乾燥させて電子顕微鏡観察に供した。

透過型電子顕微鏡は Hitachi 製 H-800 を使用し、加速電圧 75 kV で観察を行った。

3. 結果

1) バクテリオファージの分離

まず、緑膿菌株 Pa12 から Φ R12、 Φ S12-1 および Φ S12-3 を分離した。これらのファージ 3 株で緑膿菌株に対してスポットテスト(後述)を行った。次にスポットテストで溶菌が見られなかった菌株を標的として新たにファージの分離を行った。こうして緑膿菌株 Pa18 から Φ R18 を、Pa26 から Φ R26 を、Pa50 から Φ S50 を分離した。

2) イヌ病巣由来緑膿菌に対するファージの溶菌活性測定

イヌの病巣から分離された緑膿菌株に対するそれぞれのファージの宿主域を判定するためにスポットテストを行った(表 1)。形成されたプラークを溶菌活性の高い順に明瞭なプラーク(C ; Clear plaque)、不明瞭なプラーク(T ; Turbid plaque)、かすかなプラーク(F ; Faint plaque)、プラーク形成なし(N ; Negative)の 4 段階に分けて判定した(図 1A-C)。全 6 株のファージの宿主域を重ねると緑膿菌 39 株中 30 株(76.9%)に明瞭なプラークを形成し、32 株(82.1%)に明瞭または不明瞭なプラークを形成した。

次いで、この 39 株に対してニューキノロン系抗菌薬である ERFX と OBFX の MIC を判定したところ Pa17、Pa22、Pa53、Pa60、Pa61 および Pa63 が両抗菌薬に対して高度な耐性を持っていた(>128 µg/mL)。また、ERFX の MIC₅₀(全菌株の 50%の発育を阻止する MIC)は 2 µg/mL、MIC₉₀(同様に 90%の発育を阻止する MIC)は>128 µg/mL だった。同様に OBFX の MIC₅₀ と MIC₉₀ はそれぞれ 8 µg/mL と >128 µg/mL だった。我々が分離したファージは ERFX 及び OBFX に対して高度耐性を持つ緑膿菌 6 株のうち 5 株(Pa22、Pa53、Pa60、Pa61 および Pa63)を溶菌することが可能だった。

表 1 イヌ病巣由来緑膿菌に対するファージの宿主域^a

bacterial strains	MIC		spot test					
	ERFX (µg/ml)	OBFX (µg/ml)	ΦR12	ΦS12-1	ΦS12-3	ΦR18	ΦR26	ΦS50
Pa1	1	4	C	C	C	N	T	C
Pa4	1	4	T	T	T	C	N	T
Pa7	1	4	C	C	C	N	T	T
Pa8	1	4	N	N	N	N	N	N
Pa11	2	8	C	C	F	F	N	C
Pa12	2	8	C	C	F	C	C	C
Pa14	1	4	C	C	C	C	C	C
Pa16	4	16	F	N	N	N	N	F
Pa17	>128	>128	F	N	N	N	N	N
Pa18	0.5	2	N	N	N	C	N	N
Pa22	>128	>128	T	N	N	N	N	N
Pa25	4	16	C	T	T	F	N	T
Pa26	4	16	N	N	N	F	C	T
Pa27	4	32	T	T	T	T	N	N
Pa29	2	8	N	N	N	N	N	N
Pa34	8	16	F	N	N	N	N	N
Pa38	1	4	N	N	N	N	N	N
Pa42	2	4	C	C	C	F	C	C
Pa43	8	32	C	T	F	N	C	N
Pa44	0.5	2	F	N	N	N	N	N
Pa49	8	>128	N	N	N	F	T	C
Pa50	8	>128	N	N	N	T	C	C
Pa51	1	4	C	C	C	N	N	N
Pa52	2	8	N	N	N	T	C	C
Pa53	>128	>128	F	N	N	T	C	C
Pa54	2	8	N	T	T	C	N	N
Pa56	2	8	C	C	C	F	C	C
Pa57	2	8	C	C	C	N	T	T
Pa58	2	2	N	N	N	C	N	N
Pa59	0.5	4	T	T	C	N	N	C
Pa60	>128	>128	F	N	N	C	C	C
Pa61	>128	>128	C	C	T	C	C	C
Pa63	>128	>128	F	N	N	C	C	C
Pa64	0.5	2	T	C	C	T	C	C
Pa65			F	N	N	T	C	C
Pa66	4	8	T	F	F	C	F	C
Pa67	0.5	8	T	T	C	N	C	T
Pa68	0.5	2	T	F	C	N	N	F
Pa70			F	N	N	C	T	N

^a 縦軸は左から菌株名、エンロフロキサシン(ERFX)に対する MIC、オルビフロキサシン(OBFX)に対する MIC、ファージの溶菌活性が示されている

溶菌活性は高い順に黄色(C ; Clear)、オレンジ(T ; Turbid)、紺(F ; Faint)、白(N ; Negative)で表した

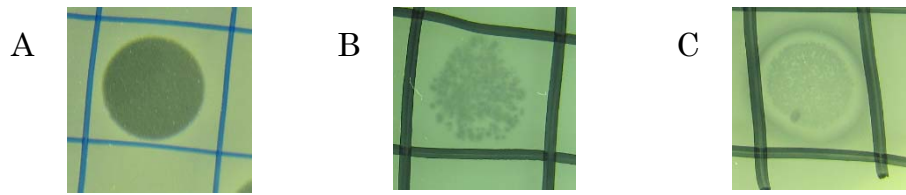


図 1A-C 形成されたプラークの典型像

A-C : C、T および F のプラークの典型的な像を示した。

3) バクテリオファージの電子顕微鏡写真

6 株のファージのうち $\Phi R12$ 、 $\Phi S12-1$ 、 $\Phi S12-3$ 及び $\Phi R18$ を電子顕微鏡下で観察(図 2)し、Ackermann らの報告[1](表 2)に従って形態学的に分類した。

$\Phi R12$ 、 $\Phi S12-1$ 及び $\Phi S12-3$ は多面体の頭部(それぞれ直径 78.8 ± 2.0 nm、 91.7 ± 0.8 nm、 84.0 ± 1.3 nm)と収縮性の尾部(それぞれ 147.5 ± 2.3 nm、 154.2 ± 0.8 nm、 148.3 ± 1.3 nm)を持つことから *Myoviridae* に属することがわかった。一方 $\Phi R18$ は同様の頭部(直径 78.5 ± 2.3 nm)と非常に短い尾部(29.8 ± 1.6 nm)を持つことから *Podoviridae* に分類された。

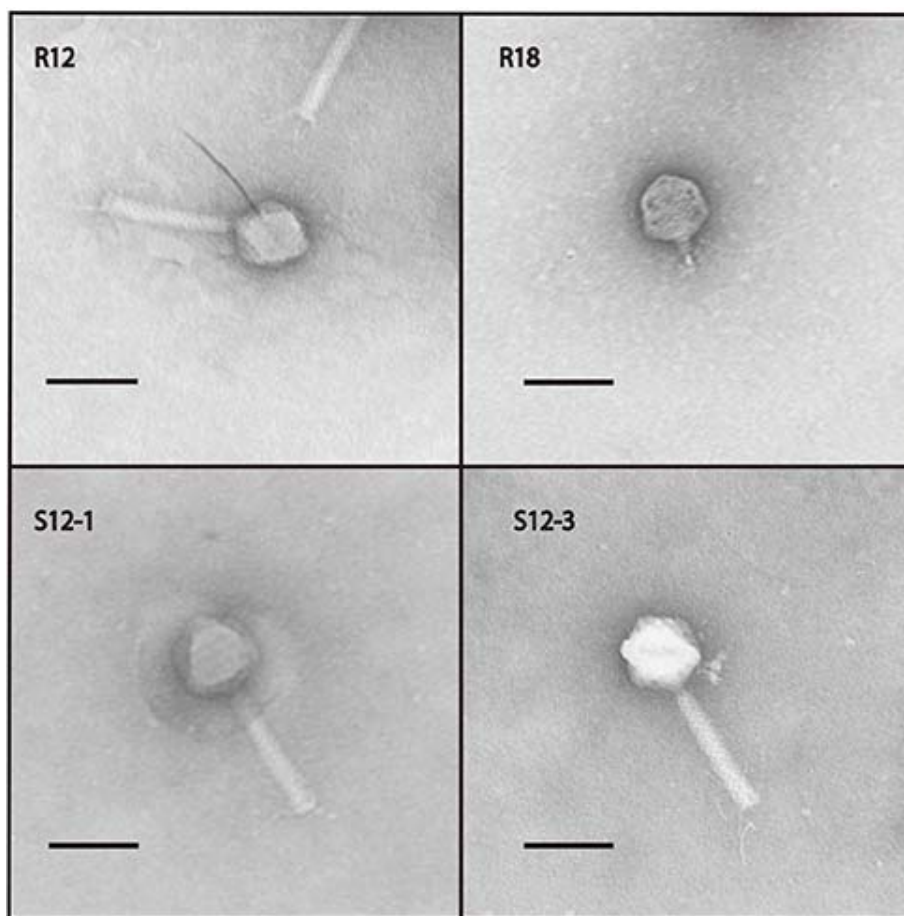



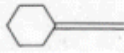

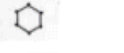






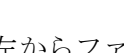
図 2 ファージの電子顕微鏡写真

スケールバーは 100nm。

ΦR12、ΦS12-1、ΦS12-3 は *Myoviridae*、ΦR18 は *Podoviridae* に分類された。

表 2 ファージの形態と所属するウイルス科

Table 1. Overview of bacteriophage families

Shape	Order or family	Nucleic acid, particulars, size	Member	Number
	Caudovirales	dsDNA (L), no envelope		
	<i>Myoviridae</i>	Tail contractile	T4	1312
	<i>Siphoviridae</i>	Tail long, noncontractile	λ	3262
	<i>Podoviridae</i>	Tail short	T7	771
	<i>Microviridae</i>	ssDNA (C), 27 nm, 12 knoblike capsomers	ϕ X174	38
	<i>Corticoviridae</i>	dsDNA (C), complex capsid, lipids, 63 nm	PM2	3?
	<i>Tectiviridae</i>	dsDNA (L), inner lipid vesicle, pseudo-tail, 60 nm	PRD1	19
	<i>Leviviridae</i>	ssRNA (L), 23 nm, like poliovirus	MS2	38
	<i>Cystoviridae</i>	dsRNA (L), segmented, lipidic envelope, 70–80 nm	ϕ 6	3
	<i>Inoviridae</i>	ssDNA (C), filaments or rods, 85–1950 x 7 nm	fd	66
	<i>Plasmaviridae</i>	dsDNA (C), lipidic envelope, no capsid, 80 nm	MVL2	5

From: Ackermann, 2007. C, circular. L, linear

左からファージの形態、所属するウイルス科、特徴、代表的なファージ、観察された数が示されている。(Ackermann、2007[1]改変、<http://www.dairyscience.info/morphology-of-bacteriophages-for-lactic-acid-bacteria.html> より引用した)

4. 考察

バクテリオファージが病原性細菌を溶菌できるかを確認、その性状を明らかにすることを目的としてスポットテストによるファージの宿主域の判定及び電子顕微鏡下での形態学的分類を行った。

まず、6株のファージが分離され、これらのファージは宿主域が異なる。ファージは細菌表面のペプチドグリカンや糖鎖、LPS、鞭毛などを認識する[10, 12, 37]。ファージが認識する構造が異なることがファージの宿主域の違いにつながるため、ΦR12、ΦS12-1及びΦS12-3は同じ菌株を宿主菌とするが、異なるファージであるということがわかる。宿主域がかなり似ていることからΦR12、ΦS12-1及びΦS12-3のターゲット部位は共通して保有していることが多いと考えられる。しかし、スポットテストの結果はファージの感染サイクルが正常であることを示すということとファージ耐性の原因は表面構造の違いだけではない[28, 52]ということから、スポットテストの判定がClearではない菌株もファージの吸着が起こっている事も考えられる(図3)。ファージが溶菌できなくてもファージが保有する溶菌酵素エンドライシンを用いることで溶菌できる可能性がある。エンドライシンはファージの感染サイクルの最後に生成され、ペプチドグリカンを酵素的に切断することで溶菌を引き起こす。つまり、ファージ耐性機構によりファージが感染サイクルを完遂できなくても溶菌させることが可能である。ファージの問題点として頻繁にあげられるのがファージ耐性菌の問題だが、これは複数種のファージをカクテル化することで克服することができると考えられている[55]。これは、菌があるファージに対して耐性を獲得しても別のファージによって溶菌される可能性があるからである。したがって、今後は表1に示された菌株の全てに対して1種類以上のファージが溶菌できるように新たなファージを分離していく必要がある。

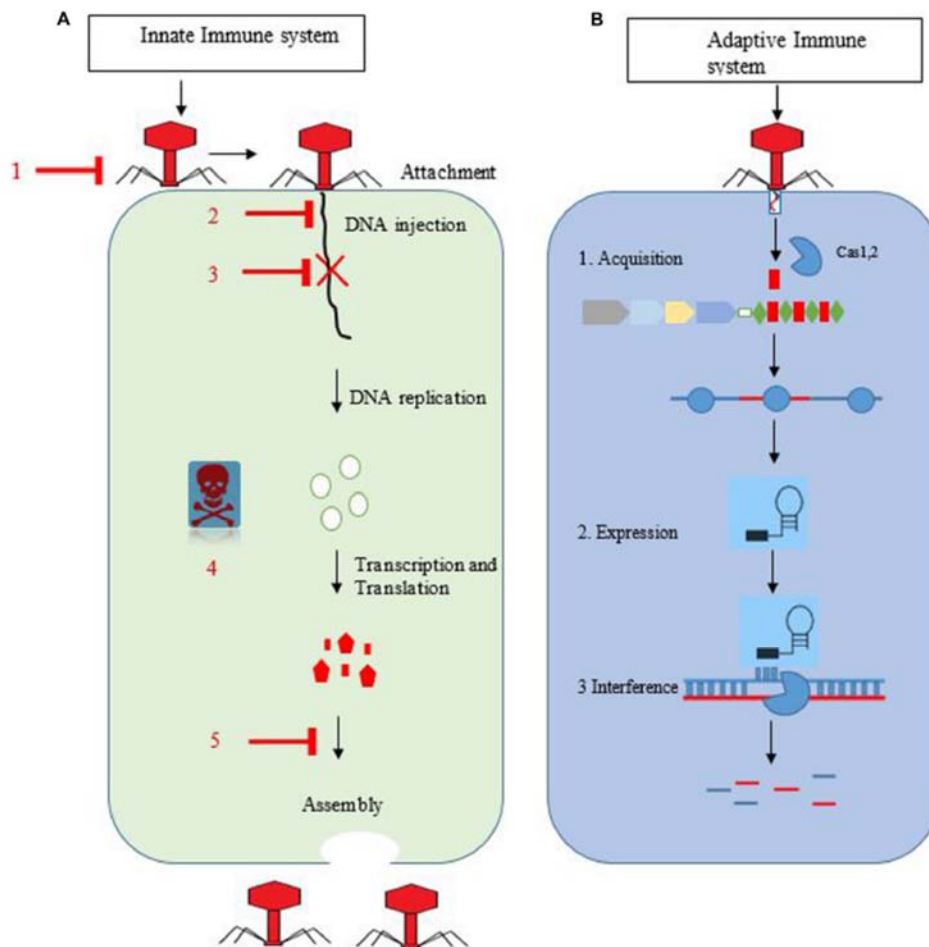


図3 細菌のファージ耐性メカニズムの概略図

細菌の自然(A)及び獲得(B)免疫の概略図。(A)細菌の自然免疫によるファージ耐性機構を1~5で示した。1;吸着阻止、2;DNA注入阻止、3;制限修飾系、4;不稔感染、5;組立阻止。(B)CRISPR/Casシステムによる獲得免疫。

Shabbirら、2016[52]より引用

電子顕微鏡下でのファージの観察によってΦR12、ΦS12-1、ΦS12-3及びΦR18が所属するウイルス科が明らかになった。4株ともに尾部を持つファージで、ΦR12、ΦS12-1及びΦS12-3が*Myoviridae*、ΦR18が*Podoviridae*に分類された。Ackermannによると1995年から2000年までに分離・報告されたファージのうち96%を超えるファージが尾部を有するウイルス科である*Myoviridae*、*Siphoviridae*または*Podoviridae*に分類された[1]。つまり今回

観察した 4 株はメジャーなグループに属していた。また、ファージは尾部で細菌表面の構造を認識することからその構造の違いは宿主域の違いに関連することが考えられる。さらに、構造の違いはアミノ酸配列の違いにつながることから抗体認識の違いになり、体内動態や免疫刺激性に影響があることも予測される。

5. 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) 札幌市内及び江別市内の下水処理場の汚水から緑膿菌に対して広く有効なファージが 6 株分離でき、それらは緑膿菌 39 株中 30 株を溶菌した。
- 2) これらのファージはフルオロキノロン系薬剤に対して高度に耐性を持つ緑膿菌 6 株のうち 5 株に対しても有効だった。
- 3) 分離されたファージのうち $\Phi R12$ 、 $\Phi S12-1$ 及び $\Phi S12-3$ が *Myoviridae*、 $\Phi R18$ が *Podoviridae* に分類された。

第 II 章 緑膿菌性角膜炎モデルマウスに対する緑膿菌ファージの有効性

1. 序文

緑膿菌は様々な急性および慢性感染症の原因であり[62]、その1つとして細菌性角膜炎があげられる[15, 49]。ヒトではコンタクトレンズ関連性角膜炎の原因であり、動物では創傷性の角膜炎を引き起こすことが知られている[53]。緑膿菌はエラスターゼ[57]やプロテアーゼ IV[7]など様々なタンパク分解酵素を分泌するため、角膜実質を構成するコラーゲン線維を分解しながら深層へ移行してしまう[15, 53, 58]。典型的な症状は角膜の白濁、輪状膿瘍の形成、角膜の潰瘍や進行すると角膜穿孔を起こして失明することもある[15]。

潰瘍性角膜炎は競走馬でも問題になっている。ウマは眼球が大きく顔の側面にあることに加え、レース中は頭を激しく上下させているため微生物にさらされる機会が多い[63, 66]。地域によって差はあるが原因となる微生物は緑膿菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌で90%ほどが占められ、レース後には眼球の水洗いと抗生物質の点眼が行われている。これによって発症率は0.3%ほどに抑えられているが、一部のウマは角膜炎を発症してしまう。更に予防的な抗生物質の投与は薬剤耐性菌の増加の原因になるが、他に対処法がないのも事実である[63]。起因菌が薬剤耐性菌の場合、上述のように進行して角膜穿孔、失明する。もし回復しても肉芽組織の形成によって視野は制限されてしまう。日本中央競馬会(JRA)では片目の失明は登録することができず、登録後の両目の失明は登録抹消となる(<http://www.jra.go.jp/>)。このように競走馬の潰瘍性角膜炎は治療費やレースの獲得賞金の損失など厩舎関係者に大きな経済的打撃を与えることになる。そこで我々はレース後の抗生物質の点眼に代わる新たな方法としてバクテリオファージの点眼を提案し、その可能性を検討した。

2. 材料と方法

1) 培地及び試薬

<培地>

LB (Luria – Bertani)培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™))

LB 寒天培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、 1.5% agar (大阪 和光純薬工業))

LB 軟寒天培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、 0.5% アガロース ME(東京 岩井化学薬品)

<試薬>

・緑膿菌に対するバクテリオファージの宿主域判定では吸光光度計 (UV-1600 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER, 京都 SHIMADZU)、滅菌スピッツ (東京 栄研化学)を用いた。

・マウスを用いた動物実験ではミダゾラム (ドルミカム、東京 アステラス製薬)、メデトミジン (ドルベネ、東京 共立製薬)、ブトルファノール (ベトルファール、東京 Meiji seika ファルマ)、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、東京 共立製薬)、タングステンカーバイドビーズ (ドイツ QIAGEN)を用いた。

その他試薬類は全て生化学実験用、または最も純度の高いものを使用した。

2) 菌株、バクテリオファージ、供試動物

<菌株>

本章では、JRA 競走馬総合研究所より提供していただいたウマ病巣由来緑膿菌 29 株を使用し、マウスを用いた動物実験ではウマ角膜炎由来緑膿菌 2 菌株 (NE-126 及び NE-149) を使用した。各菌株を LB 培地に接種、1 昼夜 37°C で振盪しながら増菌培養した培養液を 50% グリセロールと等量混合してグリセリンストックとした。グリセリンストックは -80°C にて保存した。

< バクテリオファージ >

江別市、及び札幌市の下水処理場内の汚水から分離されたファージ (ΦR12、ΦS12-1、ΦS12-3、ΦR18、ΦR26、ΦS50) を用いた。マウスを用いた治療効果検証実験では ΦR18 及び ΦR26 を用いた。

< 供試動物 >

角膜炎モデルマウスを用いた実験には C57BL/6 系の 8-10 週齢雄マウス (東京 三協ラボサービス会社) を使用し、自由採食 (飼料: CE-2、東京 日本クレア)、自由飲水で温度 22±2°C、湿度 50±5%、12 時間明 (7~19 時)、12 時間暗 (19 時~7 時) の条件下で飼育した。感染動物実験は酪農学園大学の感染実験委員会、動物実験委員会の審査、承認を受け、行った (2013 年 8 月 21 日承認、承認番号 VH25A3)。

3) ウマ病巣由来緑膿菌に対するファージの溶菌活性測定

< スポットテスト >

ウマの病巣から分離された緑膿菌に対して第 I 章と同様の方法で溶菌活性の判定を行った。

4) 緑膿菌に対するファージの吸着率測定

ウマ角膜炎由来緑膿菌(NE-126)のグリセリンストック菌液 100 μL を LB 培地 3 mL に接種し、37°C で振盪しながら 12 時間培養した。菌液(4.0×10^9 CFU/mL) 100 μL とファージ液(ΦR18 、 1.1×10^7 PFU/mL) 100 μL を混和し、0 秒、15 秒、30 秒、1 分、3 分、5 分の吸着時間を取り、100 倍に希釈した後 9,800 $\times g$ 、10 分間で遠心分離した。その上清を用いて、通常のプラークアッセイを行い、PFU 測定を行った。この時得られる PFU は遊離したファージの PFU なので初期 PFU から減ずることで吸着したファージの PFU を求め、その吸着率を算出した。

5) 角膜炎モデルマウスを用いたファージセラピーの検証

菌株はウマ角膜炎由来緑膿菌(NE-126 および NE-149)を用いた。

ファージは ΦR18 及び ΦR26 を用いた。

<緑膿菌性角膜炎モデルマウスに対するファージセラピーの効果判定>

【ファージ液調整】

塩化セシウム密度勾配遠心法によって精製し、0.45 μm ポアサイズの DISMIC (東京 ADVANTEC) で濾過滅菌したファージ液を適切な濃度になるよう PBS で調節した。時間別の検証では 2×10^{11} PFU/mL、感染多重度(Multiplicity Of Infection, MOI)の検証では 2×10^3 PFU/mL (MOI=0.01)、 2×10^5 PFU/mL (MOI=1.0) 及び 2×10^7 PFU/mL (MOI=100) になるように PBS で調節した。ファージのカクテル化の検証では ΦR18 及び ΦR26 をそれぞれ 1×10^{11} PFU/mL、合計 2×10^{11} PFU/mL になるよう調整した。角膜への滴下には 5 μL のファージ液を用いた。

【マウスへの緑膿菌投与、ファージ投与方法】

マウスは 6 mg/kg ミダゾラム、0.45 mg/kg メデトミジン及び 7.5 mg/kg ブトルファノールの合剤[24]を腹腔内投与し全身麻酔をかけた。実体顕微鏡下で 27 G 針を用いて角膜に 1 mm の傷を 3 本付け、菌液 2×10^6 CFU/mL を 5 μ L (10^4 CFU)滴下した。ファージの投与は時間別の検証では菌液の滴下の 30 分後、1 時間後、3 時間後、6 時間後及び 12 時間後のいずれかにファージ液 5 μ L を 1 回滴下した(図 4)。MOI 及びカクテル化の検証では菌液滴下の 30 分後にファージ液を滴下した。24 時間後に経過観察、48 時間後にサンプリングを行った。

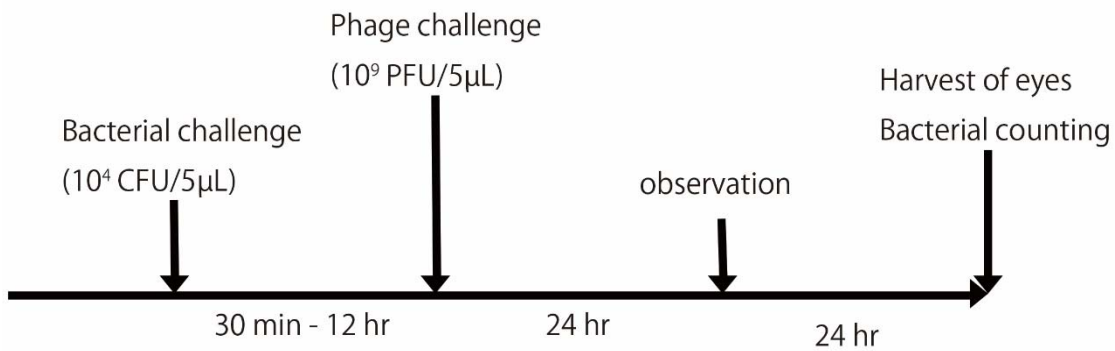


図 4 フェージの治療効果検証実験のスケジュール
菌液滴下から一定時間後にファージ液を一回滴下した。

【眼球サンプルの採取】

マウスにペントバルビタールナトリウムを 50 μ L 腹腔内投与して全身麻酔を施す。麻酔下で頸椎脱臼により死亡させた後、滅菌したピンセット及び眼科剪刀を用いて両眼球とも摘出した。タングステンカーバイドビーズと 1 mL PBS を加えたエッペンチューブに採取した眼球を入れ、Retsch (MM300, ドイツ QIAGEN) で 30/s、5 分間眼球をホモジナイズし上清を眼球サンプルとした。

【LB 寒天培地による緑膿菌生菌数の定量】

眼球サンプルを 10 倍ごとの階段希釈を行い、LB 寒天培地に 100 μ L 塗布し、37°C で 1 昼夜培養後コロニー数を測定して菌数を算出した。

6) ファージと緑膿菌の共培養実験

緑膿菌のファージ耐性発生を確認するためにファージと緑膿菌を共培養した。大まかな流れは Synnott らの方法[55]に従って行った。LB 液体培地 4 mL 中に緑膿菌株 NE-149 を 10^7 CFU/mL、ファージは Φ R18 及び Φ R26 をそれぞれ 10^9 PFU/mL、および両ファージのカクテルを 10^9 PFU/mL (各 5×10^8 PFU/mL) に調整し、L 字チューブにそれぞれ分注した。この緑膿菌-ファージ混合液 4 mL をバイオフィトレコーダー (TVS062CA、東京 ADVANTEC) にて 37°C、40 rpm で 24 時間振盪培養し、30 分毎に OD₆₆₀ を測定した。これを 3 回繰り返し行った。

7) 統計学解析

すべての統計学的解析は R software version 3.2.3 (<http://www.R-project.org/>) を用いて行った。得られたデータは Dunnett's test または Tukey multiple-comparison test で解析した。

3. 結果

1) ウマ病巣由来緑膿菌に対するファージの溶菌活性測定

イヌ病巣由来緑膿菌から分離されたファージがウマ病巣由来緑膿菌に応用可能化を判断するために同様にスポットテストを行い、宿主域を判定した(表 3)。形成されたプラークは第 I 章と同様に 4 段階に分けて判定した。各ファージの宿主域を統合することで緑膿菌 29 株中 24 株(82.8%)に明瞭なプラークが形成され、26 株(89.7%)に明瞭または不明瞭なプラークが形成された。血清型

に関してはファージの溶菌活性と関連はなかった。表 3 より、 $\Phi R18$ の宿主域が広がったため、このあとの吸着率測定実験、モデルマウスを用いた治療効果検証実験、共培養実験で $\Phi R18$ を用いた。

表3 ウマ病巣由来緑膿菌に対するファージの宿主域^a

菌株名	血清型	由来	R12	S12-1	S12-3	R18	R26	S50
NE-12	A	角膜	C	C	C	C	C	C
NE-15	G	角膜	N	N	F	C	C	F
NE-16	G	角膜	C	C	C	C	C	C
NE-69	G	角膜	C	C	C	C	C	C
NE-94	D	角膜	N	T	T	T	N	N
NE-95	G	角膜	N	F	F	C	N	N
NE-126	-	角膜	C	C	C	C	C	C
NE-149	A	角膜	C	C	C	F	C	T
NE-150	D	角膜	F	T	C	F	C	T
NE-153	H	角膜	N	N	N	N	N	N
NE-167	G	角膜	T	F	F	T	C	C
NE-193	-	角膜	F	F	N	C	N	N
NE-85	G	肺炎	C	C	C	C	C	C
NE-98	I	BALF	N	F	F	T	F	F
NE-100	G	BALF	C	C	C	C	C	C
NE-102	G	BALF	C	C	C	T	C	C
NE-112	D	BALF	N	T	C	C	C	C
NE-117	C	副鼻腔炎	C	F	F	N	F	C
NE-120	G	BALF	C	C	C	C	C	C
NE-121	G	BALF	C	C	C	C	C	C
NE-124	H	喉嚢炎	N	N	N	N	N	N
NE-125	B	BALF	N	C	C	C	C	C
NE-129	C	蓄膿症	C	C	T	C	T	T
NE-132	G	肺実質	T	C	C	C	C	C
NE-137	-	肺膿瘍	C	T	T	C	T	T
NE-138	B	BALF	N	N	N	N	N	N
NE-158	-	皮膚炎(繫部腫脹)	N	T	F	T	C	T
NE-169	-	BALF	N	F	F	C	C	T
NE-188	-	副鼻腔炎	T	C	C	C	C	C

^a縦軸は左から菌株名、分離された病名、血清型、ファージの溶菌活性が示されている。

溶菌活性は高い順に黄色(C ; Clear)、オレンジ(T ; Turbid)、紺(F ; Faint)、白(N ; Negative)で表した

2) 緑膿菌に対するファージの吸着率測定

抗生物質の点眼は一般的に涙で流れやすく、有効な濃度を維持することが難しい[41]。ファージを点眼薬として利用することを考えるとファージ液が流れ落ちる前に細菌に吸着していなければならない。つまりファージの吸着率が重要になるためウマ角膜炎由来緑膿菌株 NE-126 に対する $\Phi R18$ の吸着率を測定した(図 5)。 $\Phi R18$ は 30 秒で 80%以上が緑膿菌に吸着した。このことは非常に効率よく菌に吸着することを示し、ファージの点眼治療に期待できる。

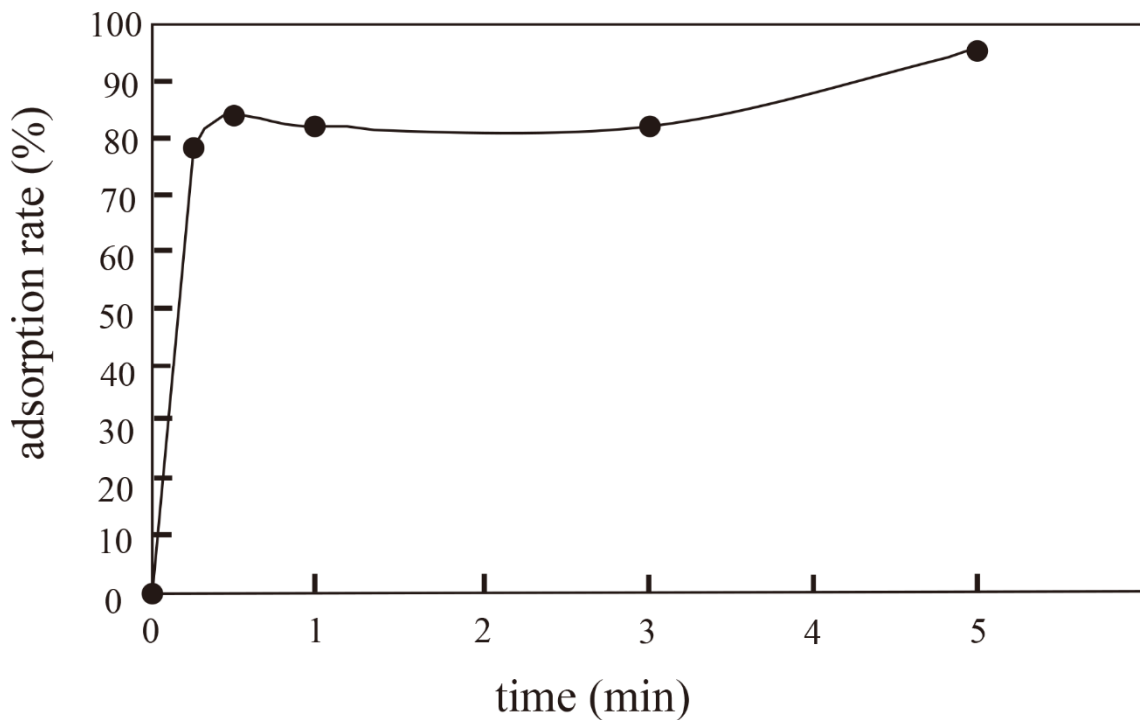


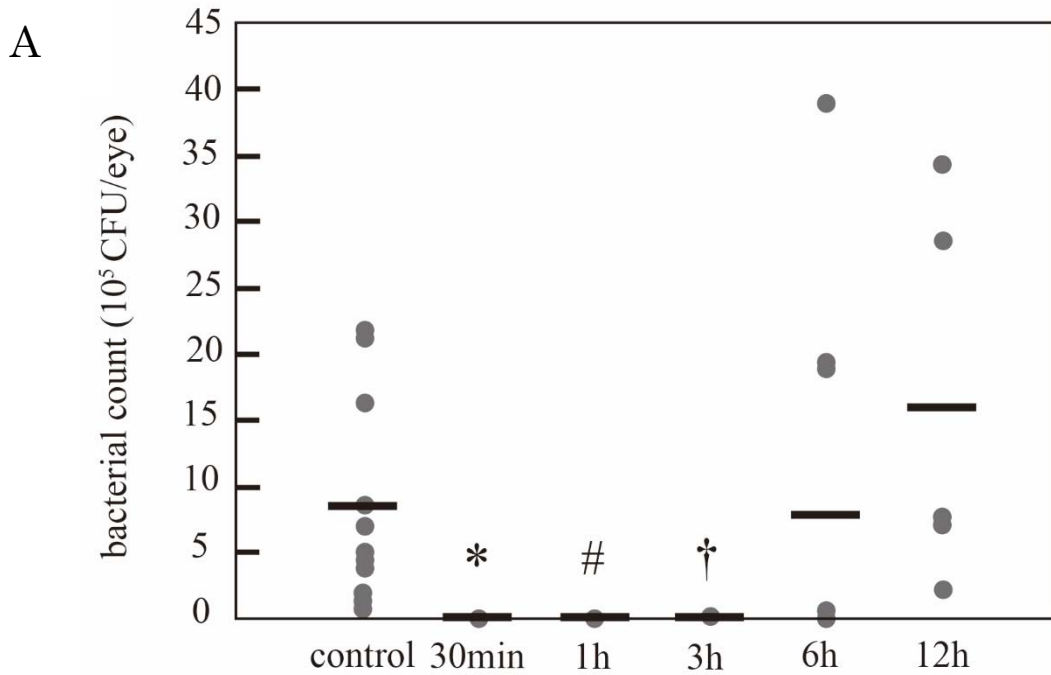
図 5 ウマ角膜炎由来緑膿菌に対する $\Phi R18$ の吸着率
縦軸に吸着率、横軸に吸着時間を示した。

3) 角膜炎モデルマウスを用いたファージセラピーの検証

実際にファージセラピーの効果を検証するために緑膿菌性角膜炎モデルマウスを用いて 3 種類の実験系を構築し、その有効性を検討した。

i) 時間別治療効果検証

菌投与からファージ投与までの時間を調節し、ファージセラピーが有効である範囲を検討した。その結果を図 6 に示した。図 6A より菌投与から 3 時間以内にファージを投与した場合に菌数が劇的に減少した。図 6B に菌投与から 30 分後にファージを投与した群では角膜炎の症状を完全に防ぐことができた。これらの結果から、ファージ処置は競走馬のレース後の点眼使用が十分可能であることが示された。



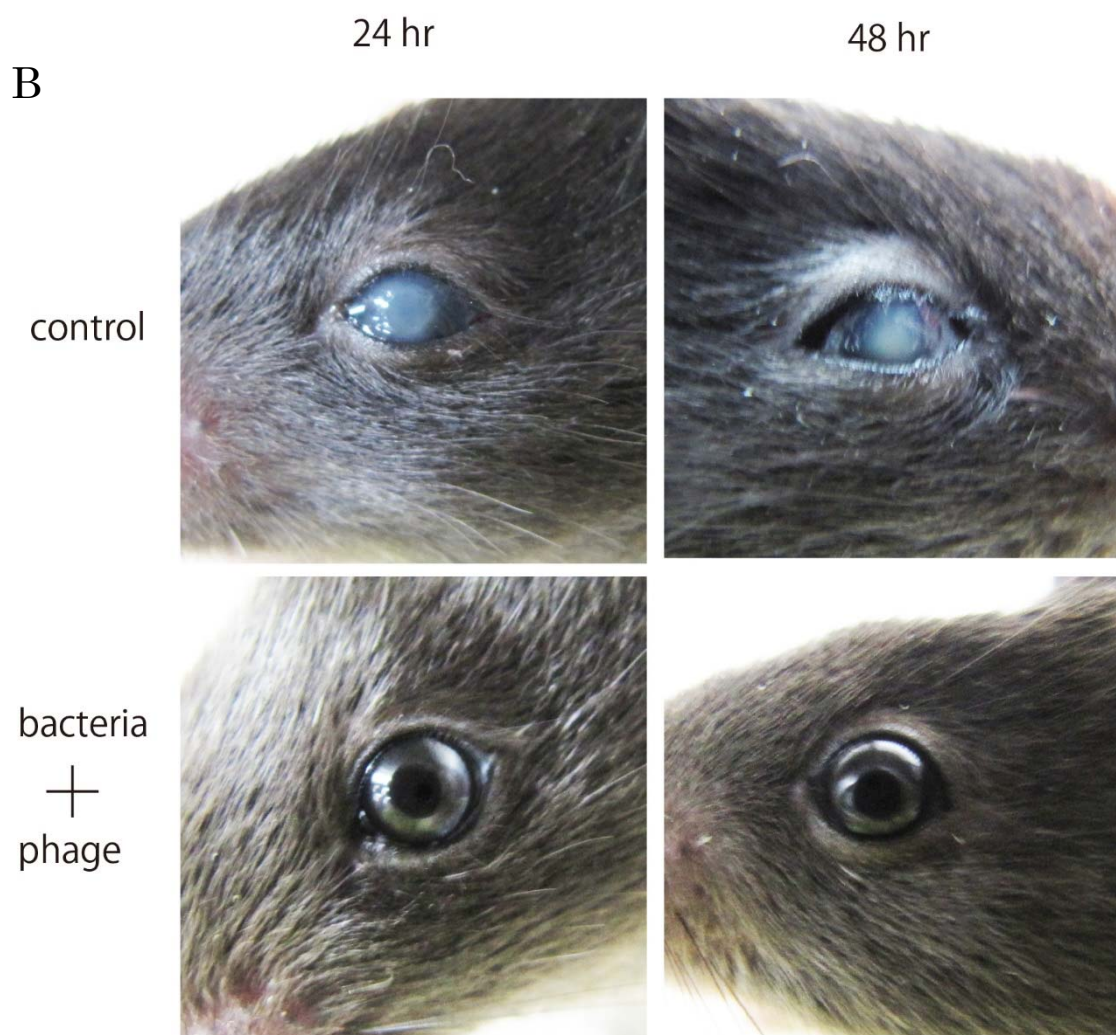


図 6 ファージ投与によるマウスの菌数と角膜像の変化

A ; ファージ投与による眼球一個あたりの菌数

縦軸に菌数、横軸に菌液滴下からのファージ投与の時間を示した。

コントロールとの統計学的有意差の有無を記号で示した：*, $P < 0.05$; #, $P = 0.054$;

†, $P = 0.068$ (Dunnett's test を用いた)。バーは各群の平均値を示す

B ; 菌液のみのコントロールと 30 分後ファージ投与群の菌液接種 24 時間後と 48 時間後の典型的な角膜像を示した。

ii) MOI 別治療効果検証

ファージの効果が、細菌に対してどれだけのファージが存在すると発揮されるのかを調べるためにファージと細菌の比率 (MOI) を調節して実験を行った

(図 7)。菌数はファージの PFU が増えるのに従って減少した。MOI = 100 のとき十分な効果を示し、コントロール群と比較して菌数を 99.78%抑制した。

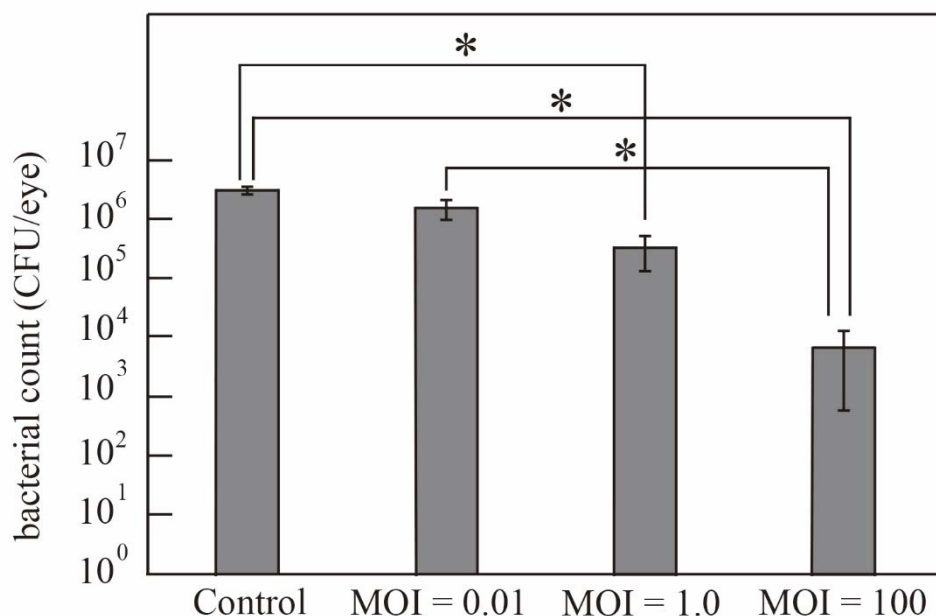


図 7 MOI の違いによる治療効果の変化

眼球一個あたりの菌数を対数值で示した。左からコントロール(ファージなし)、MOI = 0.01 (10² PFU)、MOI = 1.0 (10⁴ PFU)、MOI = 100 (10⁶ PFU)。菌数はそれぞれ 10⁴ CFU。コントロールとの統計学的有意差の有無を記号で示した：*、P < 0.05 (Tukey's multiple-comparison test を用いた)

バーは標準誤差を示す。

iii) カクテル化ファージの治療効果検証

複数のファージを混合したファージカクテルにはいくつか利点がある[18]。

第一は、ファージはそれぞれ宿主域が異なるためカクテル化することで様々な菌株に有効であること。次にカクテル化されたファージ同士で相乗効果を示すこと。第三は、ファージを混合して使用することでファージ耐性菌の出現を防ぐことができること。本研究で分離されたファージでもカクテル化することで

上述の利点を確認できるかを調査した。この実験系ではファージ 2 株(ΦR18 及び ΦR26) と角膜炎由来緑膿菌株 NE-149 を用いた。ΦR18 単独ではかすかなプラーク(Faint)を形成するが、ΦR26 は明瞭なプラーク(Clear)を形成する。結果は図 8 に示した。コントロールに比較して ΦR18 は菌数を 20.1%まで抑制し、ΦR26 は 0.22%まで抑制した。2 株のファージをカクテル化することで 0.004%まで抑制した。

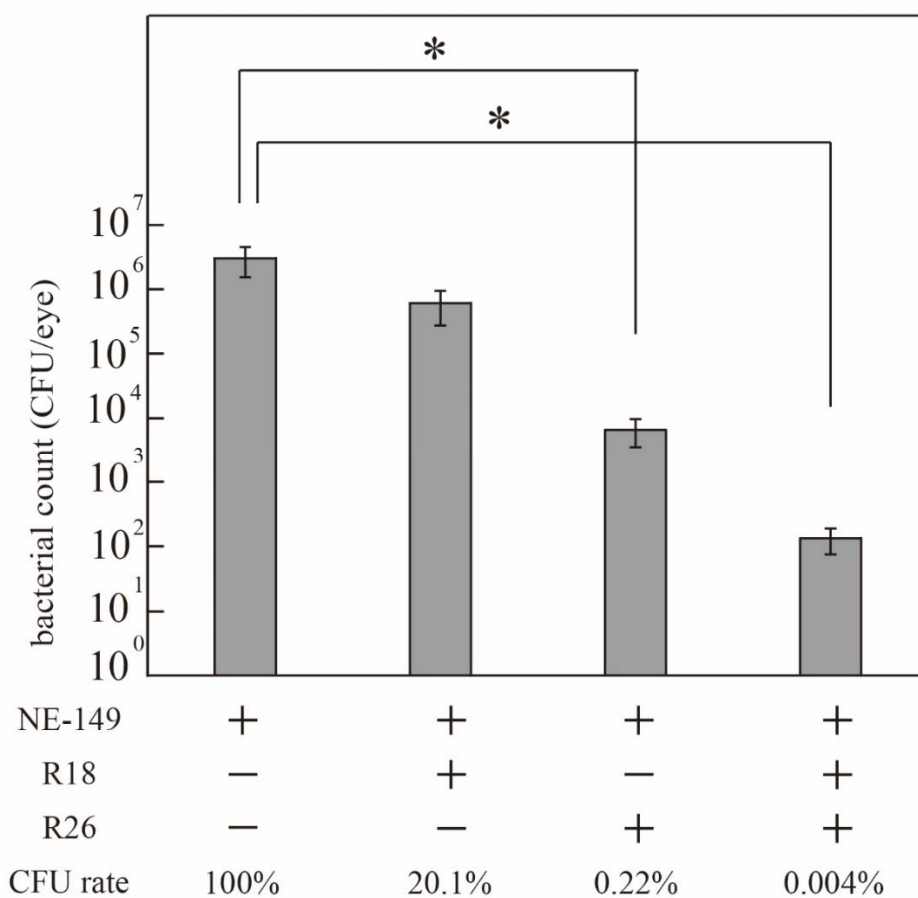


図 8 ファージカクテルの治療効果

眼球一個あたりの菌数を対数値で示した。左からコントロール(ファージなし)、菌と ΦR18、菌と ΦR26、菌と ΦR18 及び ΦR26。横軸の最下段にはコントロールに対する菌数の割合を百分率で示した。コントロールとの統計学的有意差の有無を記号で示した：*, $P < 0.05$ (Tukey's multiple-comparison test を用いた) バーは標準誤差を示す。

4) 共培養実験

ファージ耐性菌が出現するかを確認するためにファージと菌の共培養試験を行った。競走馬に角膜炎を起こした緑膿菌とそれを溶菌させるファージである $\Phi R18$ 、 $\Phi R26$ 及びそのカクテルを LB 液体培地中で 24 時間 OD_{660} 値の変化を観察した(図 9)。細菌のみのコントロールでは培養開始後直ちに増加し、 $\Phi R18$ の OD_{660} 値が続いて増加した。 $\Phi R18$ の OD_{660} 値はコントロールより僅かにゆっくりと上昇し、10 時間でピークを迎えて減少した。 $\Phi R26$ とカクテルの OD_{660} 値は 8 時間まで緑膿菌の増加を抑制した。

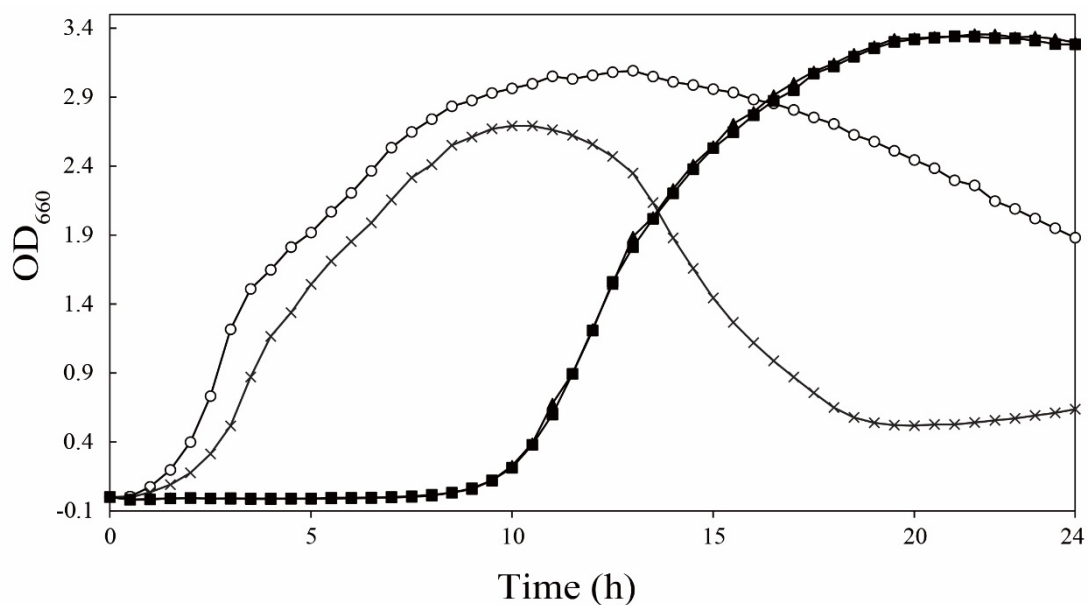


図 9 緑膿菌とファージの共培養

緑膿菌株は NE-149 を使用した。縦軸に OD_{660} の値を、横軸に培養開始からの時間を示した。○がコントロール(ファージなし)、×が菌と $\Phi R18$ 、▲が菌と $\Phi S12-1$ 、■が菌と $\Phi R18$ 及び $\Phi S12-1$ を示す。

4. 考察

細菌性角膜炎は視野を脅かす疾病であり、競走馬にとって視野は非常に重要である[49, 63]。緑膿菌は細菌性角膜炎の主要な原因菌の一種でありその薬剤耐性化は日本だけでなく世界的な問題になっている[35, 45]。こういった薬剤耐性菌の感染症に対する新たな治療戦略が求められている。そこで我々は競走馬の角膜炎に対するファージセラピーの有効性を評価した。本研究で、ファージは緑膿菌性角膜炎に対して劇的な有効性を示した。

ウマの病巣から分離された緑膿菌は、分離された疾病にかかわらずファージに感受性を持っていた。一方ファージはイヌ病巣由来緑膿菌を宿主として分離されたものであるが、ウマ病巣由来緑膿菌にも広く有効だった。本研究で分離されたファージは動物種、疾病を問わず応用可能であることがわかった。また、すべてのファージに対して耐性をもっていた株も存在したため、こういった緑膿菌を宿主菌として新たにファージを分離する必要がある。

JRAの競走馬にはレース後にエリスロマイシンとコリスチンの合剤が眼軟膏として予防的に使われている。一般的に点眼薬や眼軟膏では抗生物質の有効濃度を維持することは難しい[41]。本研究で分離されたファージは吸着速度が非常に早く、細菌に感染・溶菌することで増殖することからファージセラピーは現行の予防的抗生物質投与の代わりを果たすことができるだろう。

角膜炎モデルマウスを使った動物実験ではファージ投与によって劇的な改善が見られた。高濃度のファージ(10^9 PFU)を投与する場合、菌投与から3時間以内のファージ投与により、ほとんどの菌を除去することができた。つまりレース直後の競走馬の眼洗浄に抗生物質の代わりに利用することが可能である。一方で菌投与から6時間後及び12時間後にファージを投与した群では菌の増殖を防ぐことができなかった。これは緑膿菌が角膜実質の深部に侵入しファージがそこまで浸潤することができなかったと推察できる。緑膿菌は運動性を持

つほか、様々なたんぱく質分解酵素を産生する[32]。代表的なものはエラスターゼ A 及び B、アルカリ性メタロプロテアーゼ[32, 56]、プロテアーゼ IV[7]、*P. aeruginosa* small protein[58]、III 型分泌システム[53]などがある。これらの酵素によって、緑膿菌が引き起こす角膜炎は急速に進行し、菌は角膜の奥深くに侵入する。また、本研究で緑膿菌性角膜炎モデルマウスが確立し、競走馬の角膜炎と類似した病態の発生を確認した。

上述の動物実験は 10^9 PFU/5 μ L のファージと 10^4 CFU/5 μ L の菌で行ったが、MOI を変えて行った実験によって十分な有効性が見られるには菌の 100 倍のファージが必要だと言うことが明らかになった。臨床現場では 10^4 CFU も緑膿菌が初期に一斉に感染する可能性は殆ど無いため、角膜炎予防にファージを利用する場合にはもっと少ないファージでも十分効果が得られるだろう。

2 株のファージを混合したファージカクテルでも非常によく細菌の増殖を抑制した。明瞭な(Clear)プラークを形成したファージと微かな(Faint)プラークを形成したファージは干渉し合うことはなかった。ファージをカクテル化することはそれぞれの宿主域が組み合わせられることによって単独で運用するよりも広く効果が得られる。

緑膿菌と Φ R18 を共培養したところ、直ちに Φ R18 に対する耐性を示した。しかし、コントロールと比較すると菌の増殖は僅かに抑制されていた(図 9)。一方、 Φ R26 とファージカクテルでは Φ R18 よりも長い時間、耐性が出現するのを抑制した。これらの結果はスポットテストで得られたそれぞれの宿主特異性(図 4)と角膜炎モデルマウスの実験の結果(図 8)と一致していた。しかし、 Φ R26 とファージカクテルの間の溶菌活性の差は明らかではなかった。*in vitro* 条件は生体と比べて栄養が豊富であり、抑制因子なども存在しないため菌の増殖スピードが非常に早くなる。そのため、*in vitro* 条件下でのファージカクテ

ルの明確な溶菌効果が見られなかったと考えられる。これらのメカニズムに関しては今後も調査を続けていく必要がある。

多くの研究者がファージとファージがコードしている溶菌酵素であるエンドライシンについて精力的に研究している[42]。エンドライシンはファージの溶菌サイクルの最後に産生される酵素で、細菌細胞壁のペプチドグリカンを切断し、浸透圧的に細菌を溶菌させる。さらには、現在までエンドライシン耐性菌の報告もない。それゆえ、エンドライシンの治療的応用は非常に魅力的である[36, 42]。一部の研究者はリコンビナントエンドライシンや人工設計エンドライシンについても研究を進めており[42, 69]、我々もファージの応用からエンドライシンの応用まで研究を進めなければならない。

ファージセラピーが細菌性角膜炎の予防策として採用された場合の最大の利点は薬剤耐性菌を減らすことができ、更にその発生を防ぐことができるということである。ファージは薬剤耐性菌を溶菌することができ、抗生物質の使用量を減らす事ができるためである。またそれに伴い、獣医師の耐性菌保菌率の減少が見込めるため、院内感染などの獣医師を介した耐性菌の広がりを阻止することが期待できる。今後もファージライブラリーの充実化や他の原因菌に対するファージの分離など研究を続けていく必要がある。

5. 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) イヌ病巣由来緑膿菌を宿主菌として分離されたファージ 6 株はウマ病巣由来緑膿菌 29 株中 26 株に対しても広く有効性を示した。
- 2) 緑膿菌性角膜炎モデルマウスを確立した。
- 3) 菌投与から 3 時間以内のファージ投与によって菌の増殖が強く抑制され、病気発症に対して予防的応用が期待できる。

4) フェージ単独での運用よりもフェージをカクテル化したほうがより強く菌の増殖抑制効果が発揮された。

第 III 章 緑膿菌ファージの全ゲノムシーケンスとその溶菌酵素遺伝子の決定

1. 序文

ファージを治療や予防に使うにあたって、そのファージの安全性に関しては精製による毒性物質の除去だけでなくファージが毒性因子をコードしているかどうかなども重要になる[17, 26, 67]。また、細菌ゲノムに入り込むファージである溶原性ファージが毒素産生性大腸菌の志賀毒素を水平伝播させたという報告もされている[68]ため、完全な溶菌ファージであること、つまり溶原性ファージのマーカートをコードしていないことを確認する必要がある。

そこで我々は分離されたファージのうち比較的宿主域の広い Φ S12-1 と Φ R18 に関して全ゲノム解析を実施し、毒性因子の有無、溶原性のマーカートの有無を確認するとともに溶菌酵素エンドライシン遺伝子の特定を行った。

2. 材料と方法

1) バクテリオファージ

イヌ病巣由来緑膿菌を宿主菌とするファージ Φ S12-1 と Φ R18 を使用した。

2) DNA の抽出

<プレートライセート法>

第 I 章と同様に行った。

<塩化セシウム密度勾配遠心法によるバクテリオファージの精製>

増幅させたファージサンプル 3 mL を CsCl 溶液によって 1.46~1.63 の密度勾配に従って遠心分離を行った (RCF (relative centrifuge force); Rmax 111,000 \times g, Rav 81,900 \times g、4°C、1 時間(Accel:9、Decel:2))。密度 1.50 付近

にあるファージ層を慎重に採取し SM buffer で 4 mL にメスアップし、SM buffer で 12 時間透析を行った。

この精製を 2 回行った。2 回目はファージサンプル 1.5 mL を用いて同様な操作を実施した。

<ポリエチレングリコール(PEG)沈殿法によるファージ DNA の抽出>

精製されたファージ液 1 mL に PEG#6000(京都 ナカライテスク株式会社)を 0.1 g、NaCl を 0.04 g 加え、完全に溶解したら 4□で一昼夜静置した。その後 PEG-ファージ混合液を 15,600 × g, 4°C, 90 分間遠心分離し、上清を完全に除去した。形成されたペレットに SNET(20mM Tris-HCl(pH 8.0)、400mM NaCl、1% SDS、5mM EDTA、400 µg/mL proteinase K)を 500 µL 加え、55□で一昼夜静置した。フェノールとクロロホルムを 1 : 1 としてサンプルと等量添加し、転倒混和した。最大回転数で 5 分間遠心分離し、慎重に水層を回収、等量のイソプロパノールを加えて 15,000 × g で 4□、15 分遠心分離して上清を完全に除去した。そこに 70%エタノールを加え、ペレットを洗浄し、5 分間最大回転数で遠心分離した。エタノールを除去し、15~20 分間乾燥させ、100 µL の純水で溶解させた。これをファージ DNA サンプルとした。

3) ファージ DNA の全ゲノムシーケンス

DNA サンプルの濃度を 40 ng/µL に調整し、北海道システム・サイエンス株式会社に解析を依頼した。

4) ゲノム解析

DNA サンプルは Illumina Hiseq 2500(アメリカ合衆国 Illumina, Inc.)でペアエンド法を用いて解析され、ΦR18 は 1,129,756 リードが、ΦS12-1 は 1,116,928 リードが得られた。それぞれの長さの平均は 100 bp だった。得られ

たリードは Velvet(version 1.2.8) [70]を利用して *de novo* アセンブリを行い、Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) server (<http://rast.nmpdr.org/>) [40]を利用してアノテーション情報を得た。

得られた完全長ゲノムシーケンスは DNA Data Bank of Japan (DDBJ)に登録した。承認番号は Φ R18 が LC102729、 Φ S12-1 が LC102730 である。

3. 結果

1) 全ゲノム解析

Φ R18 と Φ S12-1 のゲノムマップを図 10 と図 12 に示した。どちらの DNA もオーバーラップしている部分が認められ、環状 DNA だということがわかった。 Φ R18 の DNA は全長 63,560 bp で GC 含有量は 60.35%だった。CDS (coding DNA sequences)は 86 個検出され、緑膿菌ファージ KPP25 (GenBank accession no. AB910393) [34]と 97%の相同性を示した(図 11)。 Φ R18 は約 150 bp と 400 bp の特有の配列を持っていたが、そのたんぱく質は機能不明であった。 Φ S12-1 は全長 66,257 bp の DNA を保有し、その GC 含有量は 55.58%だった。検出された CDS は 94 で、緑膿菌ファージ vB_PaeM_PAO1_Ab27 (GenBank accession no. LN610579) [13]と 97%の相同性を示した(図 13)。 Φ S12-1 は 3,000 bp ほどの特有の配列をもち、その配列内にテール蛋白、内部蛋白および 4 種類の機能不明の蛋白をコードすることが予測された。 Φ R18 と Φ S12-1 がコードする遺伝子群を表 2 と表 3 に示した。RAST による Φ R18 のアノテーションでは CDS19 は D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase と同定されたが、このアミノ酸配列を InterPro でドメイン検索したところ Integrase, N-terminal と同定された。どちらの結果が正確なのかはわかっていない。また、LLNL Virulence Database(<http://mvirdb.llnl.gov/>) [71]で両ファージの毒性遺伝子を検索したと

ころ、どちらのファージも溶原性のマーカーや既知の毒性因子を保有していなかった。

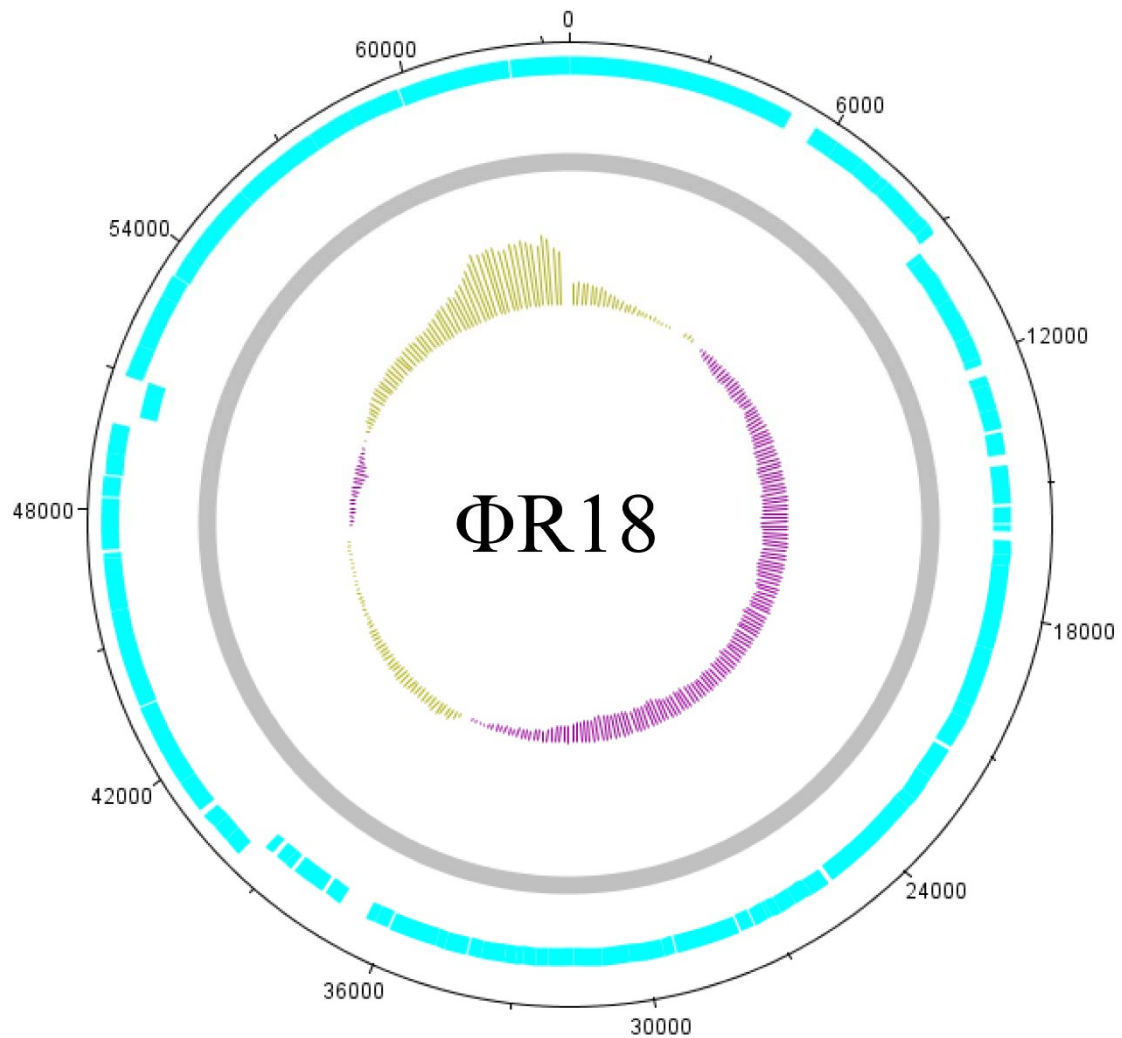


図 10 ΦR18 のゲノムマップ

内側から GC 含有量(黄色が全体の平均 GC 含有量より高い領域、紫が低い領域)、全長の DNA、CDS を示した。CDS は+鎖と-鎖のどちらにコードされているかで 2 列に分かれている。

作図には DNA plotter[6]を用いた。

表 4 ΦR18 がコードする遺伝子群

CDS	start	stop	strand	function
1	5619	6212	+	hypothetical protein
2	6209	6886	+	hypothetical protein
3	6888	7403	+	hypothetical protein
4	7412	7618	+	hypothetical protein
5	7611	8567	+	hypothetical protein
6	8567	8869	+	hypothetical protein
7	8866	9093	+	hypothetical protein
8	9394	9254	-	hypothetical protein
9	9783	9391	-	hypothetical protein
10	10484	9780	-	hypothetical protein
11	11457	10477	-	hypothetical protein
12	11996	11454	-	hypothetical protein
13	12170	12000	-	hypothetical protein
14	12661	12419	-	hypothetical protein
15	13197	12658	-	hypothetical protein
16	13703	13197	-	hypothetical protein
17	14291	13761	-	hypothetical protein
18	15409	14531	-	hypothetical protein
19	15882	15478	-	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
20	16090	15905	-	hypothetical protein
21	16637	16272	-	hypothetical protein
22	16855	16634	-	hypothetical protein
23	18829	16865	-	hypothetical protein
24	20202	18841	-	hypothetical protein
25	20515	20213	-	hypothetical protein
26	21240	20512	-	hypothetical protein
27	22088	21327	-	hypothetical protein
28	22370	22098	-	hypothetical protein
29	22689	22351	-	hypothetical protein
30	22913	22686	-	hypothetical protein
31	25315	22910	-	hypothetical protein
32	25906	25457	-	hypothetical protein
33	26121	25909	-	hypothetical protein

34	26339	26118	-	hypothetical protein
35	26717	26361	-	hypothetical protein
36	26937	26725	-	hypothetical protein
37	27039	26947	-	hypothetical protein
38	27371	27036	-	hypothetical protein
39	27732	27400	-	hypothetical protein
40	29264	27789	-	Cell division protein FtsH
41	29588	29322	-	hypothetical protein
42	29995	29585	-	hypothetical protein
43	30374	29976	-	hypothetical protein
44	30994	30386	-	hypothetical protein
45	31691	31026	-	hypothetical protein
46	32261	31695	-	Cysteine desulfurase, SufS subfamily
47	32556	32254	-	hypothetical protein
48	32827	32546	-	hypothetical protein
49	33018	32830	-	hypothetical protein
50	33266	33015	-	hypothetical protein
51	33811	33269	-	hypothetical protein
52	34129	33824	-	hypothetical protein
53	34674	34141	-	hypothetical protein
54	34900	34679	-	hypothetical protein
55	35980	34904	-	hypothetical protein
56	36374	36048	-	hypothetical protein
57	36588	36385	-	hypothetical protein
58	37670	37266	-	hypothetical protein
59	38550	37759	-	hypothetical protein
60	38824	38627	-	hypothetical protein
61	39102	38821	-	hypothetical protein
62	39401	39171	-	hypothetical protein
63	39707	40138	+	hypothetical protein
64	40143	40502	+	hypothetical protein
65	40508	40855	+	hypothetical protein
66	41003	41713	+	hypothetical protein
67	41694	43565	+	Phage terminase, large subunit
68	43579	45765	+	hypothetical protein
69	45758	46918	+	hypothetical protein
70	46918	47037	+	hypothetical protein

71	47100	48230	+	hypothetical protein
72	48267	48698	+	hypothetical protein
73	48776	49225	+	hypothetical protein
74	49230	49889	+	hypothetical protein
75	50937	50122	-	hypothetical protein
76	50921	51046	+	hypothetical protein
77	51033	51656	+	Lytic enzyme
78	51653	52849	+	hypothetical protein
79	52839	53354	+	hypothetical protein
80	53365	53808	+	hypothetical protein
81	53808	55670	+	hypothetical protein
82	55670	57619	+	hypothetical protein
83	57622	58578	+	hypothetical protein
84	58578	59750	+	hypothetical protein
85	59765	62233	+	hypothetical protein
86	62291	5054	+	hypothetical protein

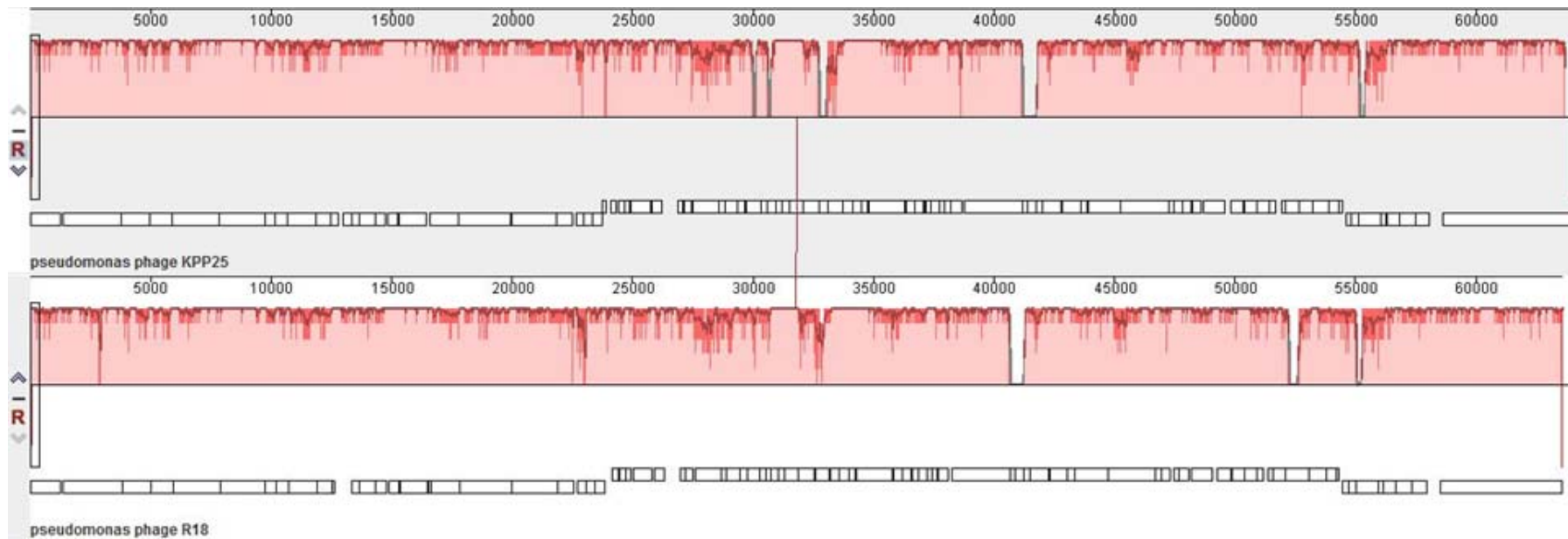


図 11 緑膿菌ファージ Φ R18 と KPP25 のゲノムの比較

上部が KPP25、下部が Φ R18 のゲノムを示した。赤い帯状の部分は相同性が高い部分を示しており、隙間になっている部分は相同性が低く、それぞれに固有の配列を持つことを示す。白い箱状の部分は CDS が示されている。

作図には Mauve[9]を用いた。

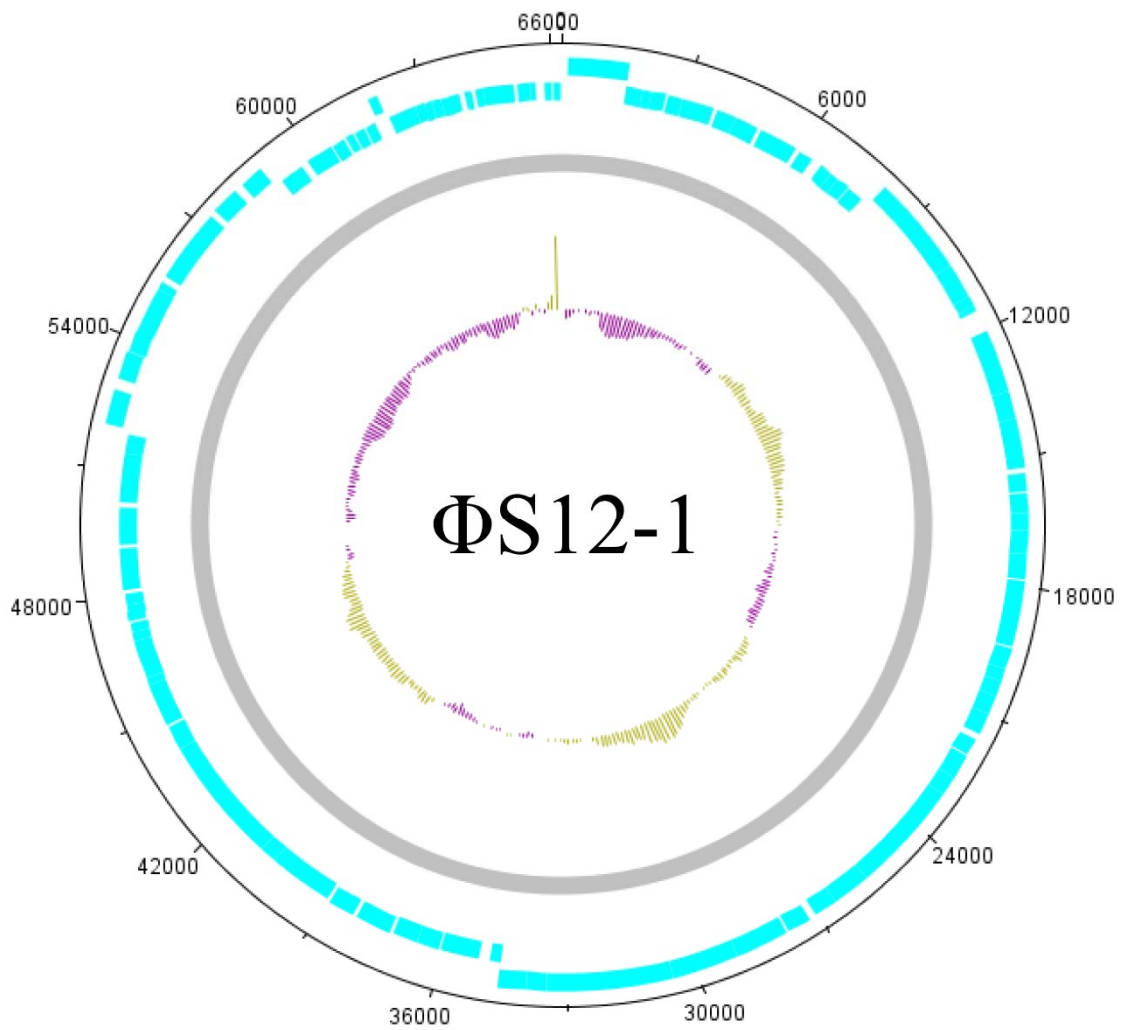


図 12 ΦS12-1 のゲノムマップ

内側から GC 含有量(黄色が全体の平均 GC 含有量より高い領域、紫が低い領域)、全長の DNA、CDS を示した。CDS は+鎖と-鎖のどちらにコードされているかで 2 列に分かれている。

作図には DNA plotter[6]を用いた。

表 5 Φ S12-1 がコードする遺伝子群

CDS	start	stop	strand	function
1	149	1531	+	Phage terminase large subunit
2	1951	1568	-	hypothetical protein
3	2166	1948	-	hypothetical protein
4	2498	2166	-	hypothetical protein
5	2940	2542	-	hypothetical protein
6	3722	2943	-	hypothetical protein
7	4246	3809	-	hypothetical protein
8	4850	4263	-	hypothetical protein
9	4955	4860	-	hypothetical protein
10	5884	4952	-	hypothetical protein
11	6335	5988	-	hypothetical protein
12	7129	6584	-	hypothetical protein
13	7424	7101	-	hypothetical protein
14	7857	7456	-	hypothetical protein
15	8038	10335	+	Phage-related protein
16	10335	11171	+	Phage minor capsid protein
17	11190	11396	+	hypothetical protein
18	11393	11533	+	hypothetical protein
19	12046	13479	+	hypothetical protein
20	13483	14118	+	hypothetical protein
21	14128	15276	+	Phage capsid and scaffold
22	15378	15815	+	hypothetical protein
23	15830	16297	+	hypothetical protein
24	16294	16692	+	hypothetical protein
25	16700	17251	+	hypothetical protein
26	17248	17829	+	hypothetical protein
27	17845	19359	+	hypothetical protein
28	19418	19870	+	Phage tail fiber protein
29	19870	20193	+	hypothetical protein
30	20190	20540	+	hypothetical protein
31	20542	20973	+	hypothetical protein
32	20983	21486	+	hypothetical protein
33	21486	22025	+	hypothetical protein
34	22034	22627	+	Phage tail fiber protein
35	22637	23065	+	hypothetical protein
36	23069	25645	+	Phage internal (core) protein
37	25645	26508	+	hypothetical protein

38	26508	27041	+	hypothetical protein
39	27097	27762	+	Phage baseplate
40	27820	29073	+	hypothetical protein
41	29070	30584	+	hypothetical protein
42	30589	33483	+	hypothetical protein
43	33485	33913	+	hypothetical protein
44	33913	34575	+	Lytic enzyme
45	34852	34601	-	hypothetical protein
46	36042	35131	-	DNA ligase, phage-associated
47	36666	36097	-	hypothetical protein
48	37268	36663	-	hypothetical protein
49	38221	37322	-	hypothetical protein
50	38930	38310	-	hypothetical protein
51	40584	39025	-	DNA helicase, phage-associated
52	40991	40581	-	hypothetical protein
53	44091	40984	-	DNA polymerase III alpha subunit
54	44645	44091	-	hypothetical protein
55	45761	44721	-	3'-phosphatase, 5'-polynucleotide kinase, phage-associated
56	45955	45764	-	hypothetical protein
57	46874	45957	-	hypothetical protein
58	47080	46874	-	hypothetical protein
59	47312	47088	-	hypothetical protein
60	47565	47347	-	Phage tail assembly protein
61	47767	47549	-	hypothetical protein
62	47997	47767	-	hypothetical protein
63	49086	48085	-	hypothetical protein
64	50084	49191	-	hypothetical protein
65	51429	50242	-	Exodeoxyribonuclease V alpha chain
66	51838	51416	-	hypothetical protein
67	52007	52792	+	hypothetical protein
68	53060	53704	+	Phage protein
69	53728	54186	+	hypothetical protein
70	54183	55259	+	hypothetical protein
71	55265	55450	+	hypothetical protein
72	55598	57328	+	DNA primase, phage associated
73	57457	58098	+	hypothetical protein
74	58289	58858	+	hypothetical protein
75	59640	59026	-	hypothetical protein
76	60502	59831	-	hypothetical protein
77	60825	60514	-	hypothetical protein
78	61099	60878	-	hypothetical protein

79	61366	61109	-	hypothetical protein
80	61645	61421	-	hypothetical protein
81	61752	61955	+	hypothetical protein
82	62687	62037	-	hypothetical protein
83	62931	62719	-	hypothetical protein
84	63128	62928	-	hypothetical protein
85	63340	63125	-	hypothetical protein
86	63537	63337	-	hypothetical protein
87	63785	63534	-	hypothetical protein
88	64100	63915	-	hypothetical protein
89	64373	64185	-	hypothetical protein
90	65125	64376	-	Phage capsid and scaffold
91	65482	65180	-	hypothetical protein
92	65640	65494	-	hypothetical protein
93	65998	65837	-	hypothetical protein
94	66238	66044	-	hypothetical protein

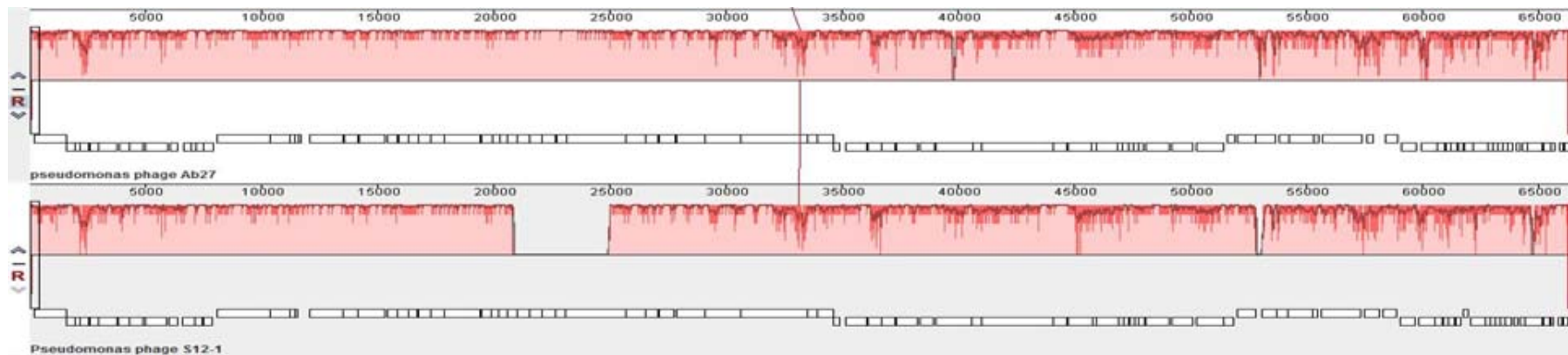


図 13 緑膿菌ファージ ΦS12-1 と vB_PaeM_PAO1_Ab27 のゲノムの比較

上部が vB_PaeM_PAO1_Ab27、下部が ΦS12-1 のゲノムを示した。赤い帯状の部分は相同性が高い部分を示しており、隙間になっている部分は相同性が低く、それぞれに固有の配列を持つことを示す。白い箱状の部分は CDS が示されている。作図には Mauve[9]を用いた。

2) エンドライシン遺伝子の特定

エンドライシンはどちらのファージもコードしており、ΦR18はCDS77に、ΦS12-1はCDS44にコードされていた(表 2,3)。そのアミノ酸配列を図 14に示した。両エンドライシンの相同性は43%と低かった。InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)[23]でドメイン検索をしたところどちらのエンドライシンもリゾチーム様ドメインを2箇所保有していた(図 15)。リゾチーム様ドメインはムラミダーゼ活性を持ち N-アセチルムラミン酸(MurNAc)と N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)の間の結合を切断する[42](図 16)。

R18_endolysin	1	MVTSKQQF---EALFPDAPDEVFEPLVRSMVRYDITSTARAAAYLAQIGHESGLTRFEE	57
S12_1_endolysin	1	MKITKDILITGTGCTTDRAIKWLDDVCAAMDKFHIESPRAIAAYLANIGVESGGLVSLVE	60
R18_endolysin	58	NLNYSAAARLAAVWPSRY----KAHSGGPNALATQIARNPQAIANNITYANRMGNGDVLSGD	113
S12_1_endolysin	61	NLNYSAAQGLANTWPRRYAVDPRVPRPYVFNALANRLARNPVVAIANNVYADRMGNGCEQDGD	120
R18_endolysin	114	GWRYRGRGPLEQVTGKDGYPRAQVMTGRPFVDDPDMMATYDGG-LEAAAATWRDKGNTLIA	172
S12_1_endolysin	121	GWKYRGRGLIQLTGKSNYTLFAEDSGMDVLEKPELLETIPAGASMSSAWFFWRNR-CIPMA	179
R18_endolysin	173	DQGRFSEITRRINGG----MNGAEDRENWQKAKKVIQA--	207
S12_1_endolysin	180	ESNNEFMSVVKTINGAAPNDANHGQLRINRYMKTIAAINQGS	220

図 14 ΦR18 と ΦS12-1 がコードするエンドライシンのアミノ酸配列

上段に ΦR18、下段に ΦS12-1 がコードするエンドライシンのアミノ酸配列を示した。オレンジと青で囲まれている部分がそれぞれリゾチーム様ドメインを示し、黒い四角で囲まれている部分が両ファージに共通している部分を示す。

作図は Blast を利用した。

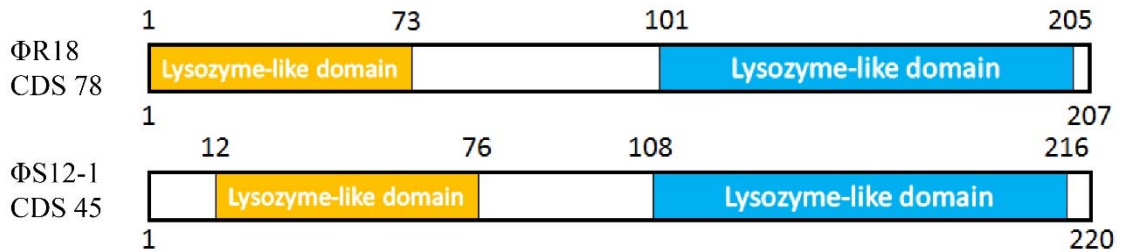


図 15 ΦR18 と ΦS12-1 がコードするエンドライシンの模式図

上段に ΦR18、下段に ΦS12-1 がコードするエンドライシンとそのドメインの模式図を示し、その上部にアミノ酸配列上の位置を示した。オレンジと青で囲まれている部分がそれぞれリゾチーム様ドメインを示した。

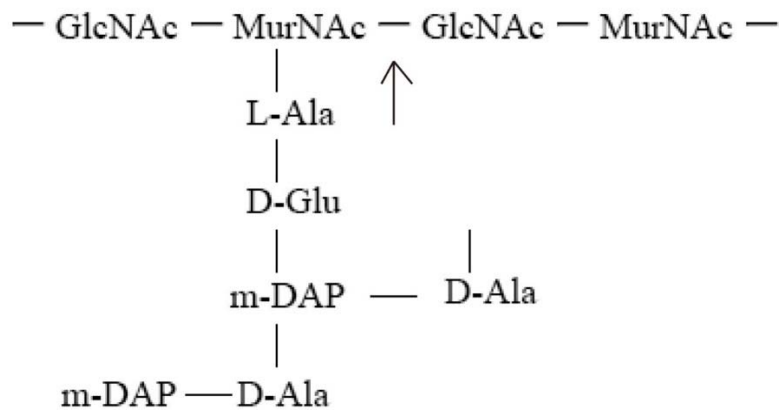


図 16 グラム陰性菌のペプチドグリカンの構造

グラム陰性菌のペプチドグリカンの構造を模式的に示した。矢印はリゾチーム様ドメイン(ムラミダーゼ活性)が切断する部位。

4. 考察

ファージセラピーに $\Phi R18$ 及び $\Phi S12-1$ を応用するに当たって、その安全性をゲノム上から推測するために全ゲノム解析を行った。ファージはその増殖様式から大きく 2 種類にわけられる。すなわち、感染すると常に溶菌をもたらす溶菌性ファージと宿主のゲノムに自分のゲノムを組み込む溶原性ファージである。溶原性ファージは宿主の栄養状態などが悪化すると宿主ゲノムから遊離し、複製を経て溶菌する[12]。この際宿主ゲノムが一部取り込まれることがあり、細菌性毒素の水平伝播に関わることが知られている[68]。このような事態を避けるためにファージゲノム上に溶原性ファージのマーカ―や毒性因子がコードされていないかを確認することが安全性担保に必要である。

BLAST 検索の結果、 $\Phi R18$ は KPP25 以外に相同性の高いファージは検出されなかったことからこの 2 株は既存のグループに属さない新たなグループである可能性がある。一方 $\Phi S12-1$ は複数のファージと相同性が高いという結果が得られた。アノテーション情報はどちらのファージでも機能不明の蛋白という結果が多く、今回使用した RAST でのアノテーションだけではこれらのファージが安全であると言い切ることはできない。しかしながら、ファージがコードしている蛋白は依然調べられていない部分が多く RAST 以外の方法でアノテーションを行っても正確な蛋白の機能は得られないと考えられる。

2 株のファージのエンドライシンはどちらも同じドメインを持っていた。一般にグラム陽性菌のエンドライシンは触媒ドメインと細胞壁結合ドメインを持つが、グラム陰性菌では 1 種類のドメインしか持たないこともある[42, 44]。コードされていたのはリゾチーム様ドメインであり、そのターゲット部位はペプチドグリカンの本幹部分の MurNAc と GlcNAc の間の結合である。しかしながらエンドライシンを細胞外から作用させる場合、グラム陽性菌では直接ペプチドグリカンに到達できるが、グラム陰性菌の場合は細胞壁の構造上、外膜やワックス成分、脂質などが存在するため簡単には溶菌が見られないためグラム陰性菌に対するエンドライシンの応用はあまり研究が進んでいない[42]。それでも近年では組み換えエンドライシンの開発[47]や、EDTA を添加することでグラム陰性菌に作用させた例も報告されている[5]。グラム陰性菌へのエンド

ライシンの応用、すなわち細菌外膜を克服する方法についてはまだまだ研究の余地が多く残されている。

ΦR18 及び ΦS12-1 のエンドライシンは同じドメインを持ちながらその相同性はかなり低かった。これは ΦR18 が *Podoviridae* に所属し、ΦS12-1 は *Myoviridae* に所属すること、つまり所属するウイルス化が異なることに起因すると考えられる。それぞれがゲノム全体で相同性が高かった ΦR18 と KPP25 ファージや ΦS12-1 と vB_PaeM_PA01_Ab27 ファージでエンドライシンの相同性は蛋白の比較でどちらも 99% だったことから近縁のファージ同士ではそれが持つ蛋白も相同性が高いことがわかる。また、2 個のドメインが、どちらも活性があるのかを片方のドメインのみを発現させて活性を確認する必要もある。

5. 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) ΦR18 及び ΦS12-1 の全ゲノムを得ることができ、どちらも既知の毒性因子を持っていなかった
- 2) 両ファージのエンドライシン遺伝子を特定し、それがリゾチーム様ドメインを保有していることがわかった

第 IV 章 緑膿菌ファージの溶菌酵素の発現と精製

1.序文

ファージが持つ溶菌酵素エンドライシンはファージの溶菌サイクルの最後に働く酵素であり(図 17)、細菌細胞壁のペプチドグリカンを経絡的に切断する機能を持つ。一般にエンドライシンの N 末端側に触媒ドメインを、C 末端側に細胞壁認識ドメインを持ち菌種レベルの特異性がある。細菌体内で作られたエンドライシンはホリンなどの膜貫通蛋白を利用してペプチドグリカンへ到達する。グラム陽性菌では細菌体外からエンドライシンを作用させても溶菌が確認されている。また、亜致死量のエンドライシン存在下で継代をした細菌も溶菌することができ、これまでエンドライシン耐性菌の報告もない[42, 51, 61]。細菌が形成するバイオフィルムやバイオフィルム下に存在する休眠細菌にも有効だという報告[19]もある。以上よりエンドライシンは細菌寄生性細菌、抗菌性ペプチド、ファージなど[46]と並び抗生物質に代わる次世代の抗菌性物質として注目を集めている[22]。

本章では第 III 章で特定した $\Phi R18$ のエンドライシン遺伝子を大腸菌内で発現させその溶菌活性を確認した。

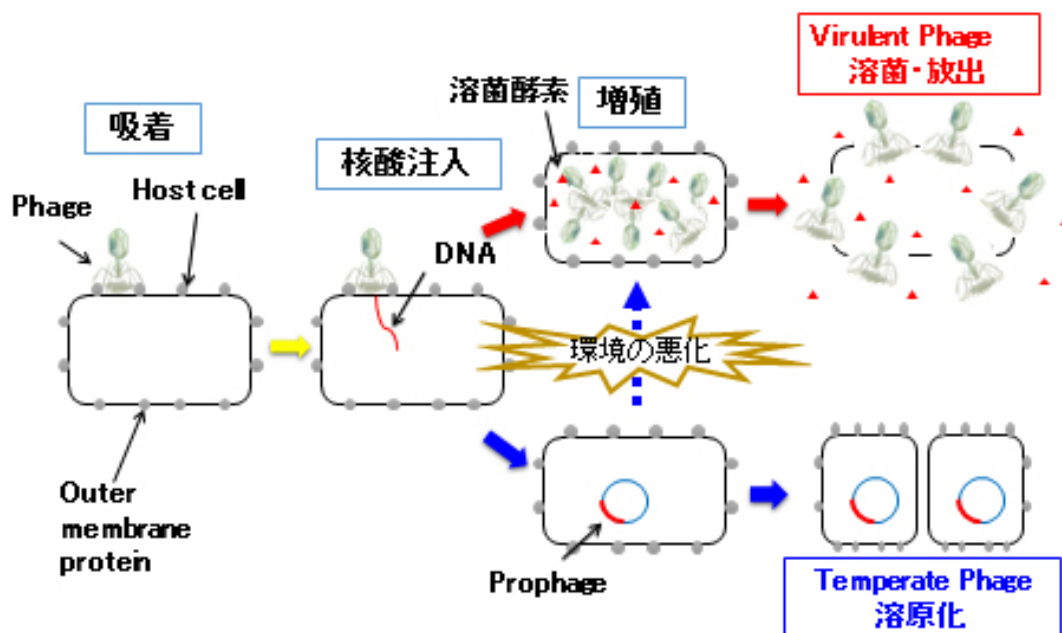


図 17 ファージの生活環

ファージは宿主細菌表面構造を認識して吸着し、DNA を菌体内に注入する。溶菌性ファージ(ヴィルレントファージ)では直後にファージの増殖が始まり、溶菌酵素によって細菌細胞壁を分解して娘ファージが放出される。一方溶原性ファージ(テンプレートファージ)は細菌ゲノムにファージゲノムを溶原化してプロファージの状態に細菌の細胞分裂に伴いゲノムを増幅させる。貧栄養状態など環境の悪化により娘ファージが作られ、溶菌性ファージと同様にして娘ファージを菌体外に放出させる。

2. 材料と方法

<培地>

LB (Luria – Bertani)培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™))

LB 寒天培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、 1.5% agar (大阪 和光純薬工業))

LB 軟寒天培地 (1% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% yeast extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、 0.5% アガロース ME(東京 岩井

化学薬品)

SOC 培地：2% Triptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、0.5% Yeast Extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、10mM NaCl、2.5mM KCl

2×YT 培地：0.5% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、1.6% Yeast Extract (アメリカ合衆国 Bacto™)

2×YT+Amp 寒天培地：0.5% NaCl、1% Tryptone (アメリカ合衆国 Bacto™)、1.6% Yeast Extract (アメリカ合衆国 Bacto™)、1.5% Agar (アメリカ合衆国 Bacto™)、高圧蒸気滅菌後、アンピシリンナトリウム塩 (アメリカ合衆国 Sigma-Aldrich) を加えた (50mg/L)。

2) 菌株、バクテリオファージ、供試動物

<菌株> 緑膿菌株 Pa18、Pa17、Pa61、NE-126、黄色ブドウ球菌

Staphylococcus aureus (SA) 03 株

<バクテリオファージ>

江別市、及び札幌市の下水処理場内の汚水から分離されたファージ ΦR18 を用いた。

3) 使用した器具及びキット類

<ファージの増幅と精製>

アルミブロック恒温槽 MG-2200 (東京 東京理化器械)

<PCR 反応と PCR 産物の精製>

C1000™ Thermal Cycler (アメリカ合衆国 Bio-Rad)

FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (東京 日本ジェネティクス)

<In-Fusion クローニング>

BioSpec-nano (京都 島津製作所)

FAS3 ゲル撮影装置 (大阪 東洋紡)

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (アメリカ合衆国 Sigma-Aldrich)

In-Fusion® HD Cloning Kit (滋賀 タカラバイオ)

アルミブロック恒温槽 MG-2200

<タンパク質発現・精製>

密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor UCD-200 (東京 コスモ・バイオ)

ローテーターRT-5 (埼玉 タイテック)

<SDS-PAGE>

CS Analyzer Version 3.00.1008 ソフト (東京 アトー)

<溶菌活性の評価>

小型振盪培養装置 TVS062CA (東京 アドバンテック東洋)

※その他試薬類は全て生化学実験用、または最も純度の高いものを使用した。

4) ΦR18 由来エンドライシンの遺伝子検索

ΦR18 のゲノム情報は DNA Data Bank of Japan (DDBJ)にて取得し、エンドライシンのドメイン検索を InterPro にて行った。

5) PCR 反応によるエンドライシン遺伝子の増幅

エンドライシン遺伝子を増幅させるために LysR18-F (5' - TCCCCAGGAA TTCCCATGGTCATCAGTAAGCAGCAG - 3') と LysR18-R (5' - CGCTCGA GTCGACCCTCATTGCGCCAGTACCTTCTTG - 3') をプライマーとして用いた。プライマーの 5'側 15 塩基はプラスミドベクター pGEX-6P-2 の遺伝子挿入部位両末端と相同な配列を付加したものである。

PCR 反応は 1 チューブにつき、ΦR18 由来ゲノム DNA 1 μL、PfuUltra™ HF DNA Polymerase (東京 アジレント・テクノロジー) 0.5 μL、10×Pfu Ultra™ HF Reaction Buffer (東京 アジレント・テクノロジー) 5 μL、各

プライマー2 μL 、dNTP Mixture (滋賀 タカラバイオ) 1 μL 、分子生物学用水 38.5 μL を混和して行った。反応には C1000™ Thermal Cycler (アメリカ合衆国 Bio-Rad) を使用して 94°C 2 分間の反応後、35 サイクル (94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 2 分) 行い、最後に 72°C 2 分間の伸長反応を行った。増幅したエンドライシン遺伝子は FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (東京 日本ジェネティクス) を用いて精製を行った。

6) エンドライシン遺伝子のクローニング

遺伝子クローニングについては、本学の遺伝子組換え実験安全委員会にて審査承認を得て行った (承認番号 145)。以下方法を記す。

<プラスミドベクターの線状化>

環状プラスミドベクター pGEX-6P-2 (東京 GE ヘルスケア・ジャパン) Glutathione S-transferase (GST) 遺伝子下流の *Sma* I 部位を制限酵素処理によって線状化した。制限酵素処理はアルミブロック恒温槽 MG-2200 で 30°C、一晩かけて制限酵素処理を行った。この反応液に、液量と等量のフェノール/クロロホルムをよく混和させ、遠心分離 (20,000 \times g、20°C、4 分) し、上清部分を新しいチューブに移し替えた。これに、2.5 倍量の 100%エタノールと 1/10 量 3 M NaOAc を混和させ、遠心分離 (20,000 \times g、20°C、4 分) を行い、上清を捨て、DNA を沈殿化させた。これに 70%エタノールを 1mL 加え、遠心分離 (20,000 \times g、20°C、4 分) を行い、上清を捨てた。最後に 50 μL の超純水で混和し、BioSpec-nano (京都 島津製作所) での吸光値を測定し、回収した線状化プラスミドベクターの濃度を求めた。

<In-Fusion クローニング>

今回の実験では In-Fusion® HD Cloning Kit (滋賀 タカラバイオ) を用いてエンドライシン遺伝子をプラスミドベクター pGEX-6P-2 の GST 遺伝子下流にある *Sma* I 切断部位に挿入した。5 \times In-Fusion® HD Enzyme 2 μL 、線状化プラスミドベクター pGEX-6P-2 1 μL (約 70ng)、精製済みエンドライシン遺伝

子 PCR 産物 6 μ L (約 75 ng)、超純水 1 μ L を混和させ、アルミブロック恒温槽 MG-2200 で 50°C、15 分反応させ、その後氷上に静置した。

<大腸菌への形質導入>

In-Fusion クローニング産物を *E. coli* Competent high DH5 α (大阪 東洋紡) 菌液に加え、30 分間氷上で静置した。その後アルミブロック恒温槽 MG-2200 で 42°C、30 秒間のヒートショックを与え、再び氷上で 2 分間静置した。ここに SOC 培地を 900 μ L 加え、37°C、1 時間振とう培養した。培養後、2 \times YT + Amp 寒天培地に適量まき、37°Cで一晩培養した。

<コロニーPCR とプラスミドのシーケンス解析によるインサートチェック>

前項目で得られたいくつかの単一コロニーを PCR にかけるとともに、そのコロニーを別の 2 \times YT + Amp 寒天培地へ植え替えてマスタープレートを作製し、コロニーごとにラベリングした。コロニーPCR には 1 サンプル当たり Taq DNA Polymerase (アメリカ合衆国 New England BioLabs Inc.) 0.1 μ L、10 \times ThermoPol™ Reaction Buffer 1 μ L (アメリカ合衆国 New England BioLabs Inc.)、dNTP Mixture 0.2 μ L、各プライマー (LysR18-F、LysR18-R) 0.4 μ L、超純水 7.9 μ L を混和したものに滅菌つまようじで単一コロニーを釣菌したものを加えた。PCR 反応は C1000™ Thermal Cycler を使用し、前述の PCR 反応と同じ条件で行った。PCR 産物を 2% アガロースゲルにアプライし、電気泳動を行った。その後ゲルのエチジウムブロマイド染色と FAS3 ゲル撮影装置 (大阪 東洋紡)での紫外線照射によってバンドが検出されたコロニーをマスタープレートから釣菌し、2 \times YT 培地 (100 μ g/mL のアンピシリンを含む) へ入れ、37°Cで一晩培養した。その後 GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (アメリカ合衆国 Sigma-Aldrich) を用いて大腸菌からプラスミドを回収した。エンドライシン遺伝子の PCR 反応が正確、かつプラスミドベクター pGEX-6P-2 の正確な位置に遺伝子挿入されたかを確認するために、北海道システム・サイエンス株式会社に DNA シーケンスを依頼した。DNA シーケンスではプライマーとして LysR18-F、LysR18-R を使用した。

<タンパク質発現用大腸菌への形質導入>

DNA シーケンスによってエンドライシン遺伝子の正確な遺伝子挿入が確認できたプラスミドベクター-pGEX-6P-2 をタンパク質発現用 *E.coli* BL21

(DE3) (滋賀 タカラバイオ) へ形質導入した。形質導入の手法は前述の方法と同じに行った。2×YT+Amp 寒天培地にできた単一コロニーを釣菌し、2×YT 培地 (100µg/mL のアンピシリンを含む) へ入れ、37°Cで一晩培養した。培養した菌液と等量の 50% グリセリンをよく混和させ、-80°Cで保存した。

7) タンパク質発現・精製

LB 培地 (100µg/mL のアンピシリンを含む) 10mL に形質転換済み *E. coli* のグリセリンストック菌液 100 µL を加え、一晩振とう培養した。3 L バッフル付き三角フラスコに LB 培地 (100 µg/mL のアンピシリンを含む) 1 L と培養液 10 mL を加え、30°Cで 3~4 時間振とう培養した。菌液を V-530 UV-Vis spectrophotometer (東京 日本分光) で波長 600 nm における吸光値を測定し、0.4 ~ 0.6 の範囲にあるときに 0.1 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (京都 ナカライテスク) を 1 mL (終濃度 0.1mM) 加え、25°Cで一晩振とう培養した。培養液を 200 mL ずつ(50 mL プラスチックチューブ 4 本)分注し、遠心分離 (2,300×g、4°C、5 分) して上清を除き、10 mL の binding buffer (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄、10 mM SH 基還元防止用(±)-ジチオトレイトール(大阪 和光純薬工業)) に懸濁し、さらに 10% NP-40 (大阪 和光純薬工業) 500 µL と 1 M MgCl₂ 50 µL を加えて攪拌した。これを密閉式超音波細胞破碎装置 Bioruptor UCD-200 (東京 コスモ・バイオ) にて 30 秒間隔で 5 分間、超音波処理を行った。超音波処理中は発熱するので氷で冷やしながら行った。その後、遠心分離 (16,000×g、4°C、30 分) を行い、未破碎細菌を沈殿させ、大腸菌可溶化上清を得た。上清の一部は粗タンパク分画として SDS-PAGE 用に回収し、残りは Glutathione Sepharose 4B (東京 GE ヘルスケア・ジャパン) を充填してある Econo-Pac® Disposable Chromatography

Columns (アメリカ合衆国 Bio-Rad) に静かに加えた (カラムの下にキャップをしておく)。このカラムは事前に Glutathione Sepharose 4B 担体を 1 mL 充填し、binding buffer 100 mL で洗浄して平衡化した後に binding buffer を 1 mL 加えて 50%Glutathione Sepharose 4B の状態にしておいた。カラムに大腸菌可溶化上清を加えた後、ローテーターRT-5 (埼玉 タイテック) で1時間、4°Cで混合した。カラム下のキャップを外して廃液し、binding buffer 100 mL でカラムを洗浄した。廃液の一部はカラム素通り分画として SDS-PAGE 用に回収した。カラムの下にキャップをし、PreScission Protease (東京 GEヘルスケア・ジャパン) 40 μ L (80U) と PreScission cleavage buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) 960 μ L の混合液をカラムに加え、4時間、4°Cで静置した。キャップを外し、精製エンドライシンを回収した。回収したエンドライシンは一部 SDS-PAGE 用に分注し、残りは-30°Cで保存した。

8) SDS-PAGE によるタンパク質発現とタンパク定量

精製エンドライシン 16 μ L に 5×サンプル緩衝液 (250 mM Tris-HCl, 25% Glycerol, 0.01% BPB, 10% SDS, 20 mM DTT) を 4 μ L 加え、100°Cで3分間煮沸した。また、既知濃度の牛血清アルブミン (BSA) (アメリカ合衆国 Sigma-Aldrich) の希釈系列を 10 μ g/mL~2mg/mL の範囲で作製しておき、BSA 16 μ L に対して 5×サンプル緩衝液を 4 μ L 加え、同様に煮沸した。泳動槽に SDS-PAGE 用電極液 (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) を満たし、マーカー、煮沸したエンドライシン、BSA をそれぞれ 10 μ L ずつゲルへアプライした。濃縮ゲル (4.5%アクリルアミド) は 10 mA、分離ゲル (12.5%アクリルアミド) は 20 mA でそれぞれ 1時間ずつ電気泳動し、クマシーブリリアントブルー染色 (CBB) を行った。タンパク定量は CS Analyzer Version 3.00.1008 (東京 アトー) を用いて濃度既知の BSA のバンド発色強度を数値化して検量線を作成し、エンドライシン濃度を測定した。

9) 濁度測定法を用いた液体培地中での溶菌活性の評価

Briers らの方法[5]を参考にして実験を行った。バイオフィトレコーダー (TVS062CA、東京 ADVANTEC)を用いて溶菌活性を測定した。LB 培地にて 37°C、一晩前培養した緑膿菌株 Pa18 の菌液 40 μ L と新しい LB 培地 3.5 mL を L 字チューブに入れ、これを 4 本用意した。L 字チューブをバイオフィトレコーダーにセットし、波長 660 nm での吸光値を毎分測定しながら 37°C、40 rpm で振とう培養した。OD₆₆₀ = 1.0 になったところでコントロール 1 に 500 μ L の PBS を添加し、コントロール 2 に 0.5 mM になるよう EDTA を加えた PBS を 500 μ L を添加した。さらに、エンドライシンを 500 μ L と終濃度 0.5 mM になるよう EDTA を加えたものとエンドライシンのみを 500 μ L 加えたものの 4 種で引き続き毎分吸光値を測定し、溶菌活性を評価した。

このあとは緑膿菌株 Pa17、Pa61、NE-126 およびグラム陽性菌として SA03 株を使用して上記のコントロール 2 と EDTA-エンドライシンで同様に溶菌活性を確認した。

3. 結果

1) SDS-PAGE によるエンドライシンの発現確認とタンパク定量

エンドライシンの発現と発現量を確認するために、SDS-PAGE とゲルの CBB 染色を行った。精製前の大腸菌の可溶化上清では、エンドライシンは GST と結合した融合タンパク質の状態にあり、約 42 kDa の位置にバンドを確認することができた(図 18A)。一方、精製後のエンドライシンは約 23 kDa の位置に単一のバンドが確認でき(図 18B)、発現と精製が成功していることを確認することができた。また、濃度既知の BSA 希釈系列をサンプルと同じゲルで SDS-PAGE を行うことで、CBB 染色の発色強度から検量線を作成し、精製されたエンドライシンの濃度を定量した。菌液 1 L を 4 本のチューブに分けて精製を行ったところ、図 18B では左から 256.54、304.33、213.9、254.31 μ g/mL のエンドライシンを回収することができた。

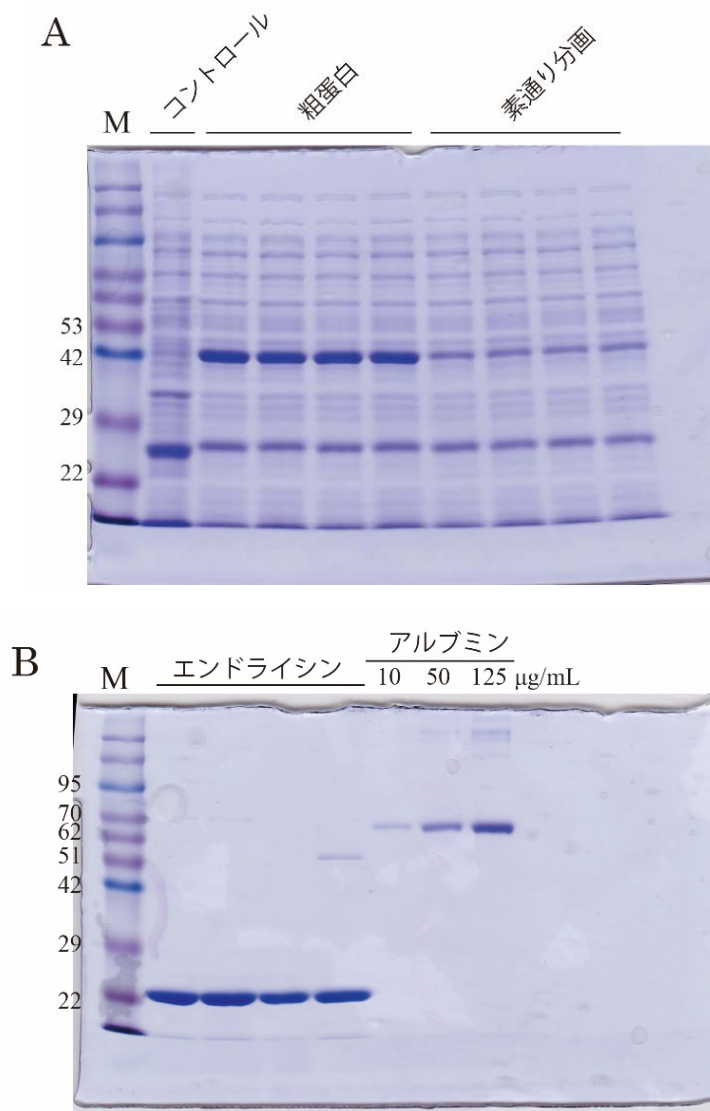


図 18 SDS-PAGE によるエンドライシン発現の確認

A: 左からマーカ、コントロールプラスミドを保有した大腸菌の可溶化上清、エンドライシン遺伝子を組み込んだプラスミドを保有した大腸菌の可溶化上清及びカラムから素通りした分画を泳動した。

B: 左からマーカ、精製されたエンドライシン、濃度既知のアルブミン溶液を泳動した。

M はマーカを示す。

2) 溶菌活性の評価

回収されたエンドライシンが溶菌活性を持っているかを評価するためにバイオフィトレコーダーを用いて $OD_{660} = 1.0$ からの溶菌を確認した(図 19)。使用

したエンドライシンの濃度は 280.4 $\mu\text{g/mL}$ だった。すべてのチューブで OD_{660} が 1.0 を超えたところで実験を実施したところエンドライシンに終濃度 0.5 mM EDTA を加えたサンプルのみ OD_{660} 値が低下、すなわち溶菌が起こった。

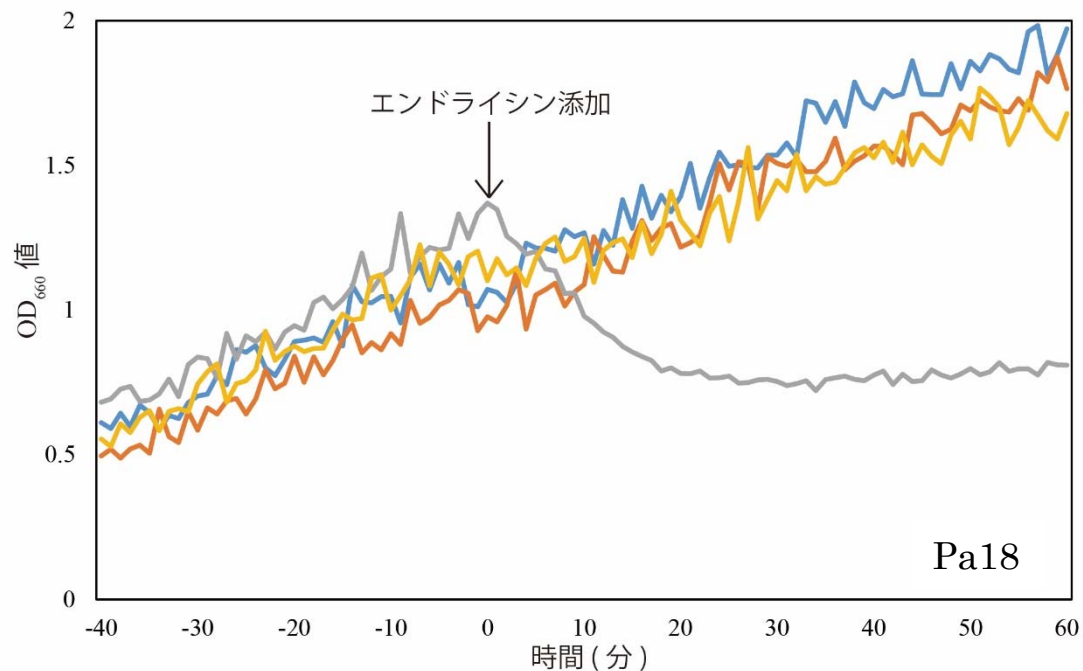


図 19 エンドライシンによる経時的な OD 値の変化

縦軸に OD_{660} 値を、横軸に時間を示した。青が PBS を加えたコントロール 1、黄色が PBS に終濃度 0.5 mM になるよう EDTA を加えたコントロール 2、オレンジがエンドライシンのみを加えたもの、灰色がエンドライシンに終濃度 0.5 mM になるよう EDTA を加えたものを示す。(n=1)

次に緑膿菌株 Pa17、Pa61、NE-126 で同様の試験を行った結果を示す(図 20A-C)。この時使用したエンドライシン濃度は 212.5 $\mu\text{g/mL}$ だった。Pa17 及び NE-126 ではコントロールと比較して増殖が遅くなり、Pa61 では OD 値の低下が見られ、明らかな溶菌が認められた。

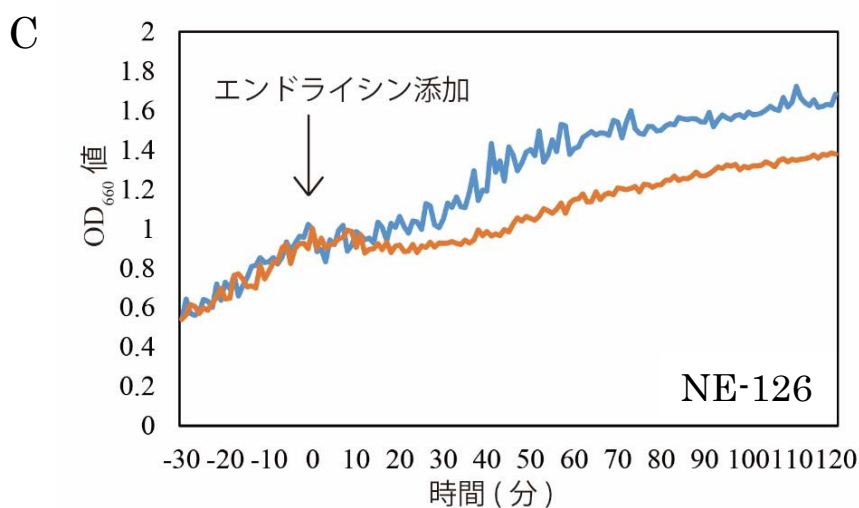
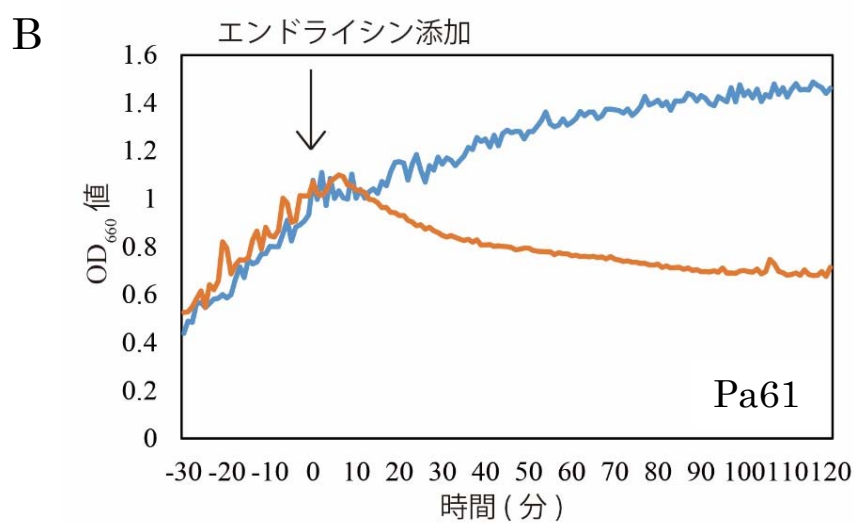
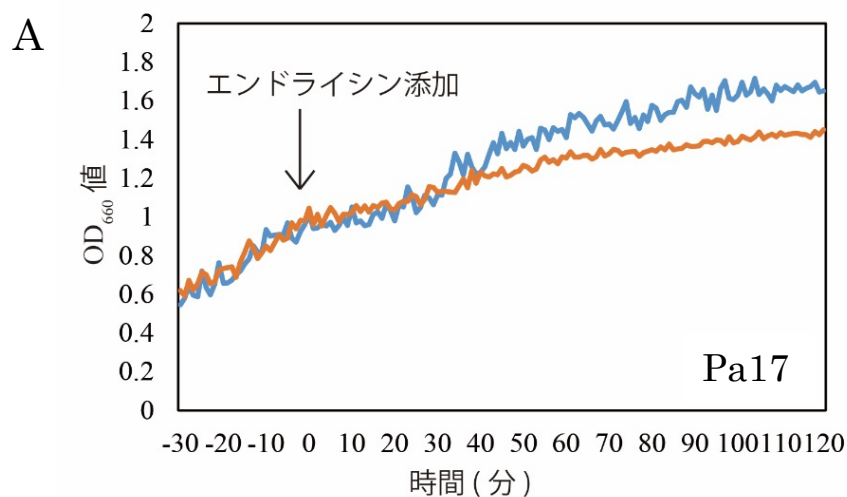


図 20 エンドライシンによる経時的な OD 値の変化

縦軸に OD₆₆₀ 値を、横軸に時間を示した。青が菌液に 0.5 mM EDTA+PBS を加えたもの、オレンジが菌液に 0.5 mM EDTA+エンドライシンを加えたものを示す。(各 n=1)

最後にグラム陽性菌への効果の検討で SA03 株を用いて同様の試験を行った (図 21)。この時使用したエンドライシン濃度は 225.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ だった。SA03 株に対して溶菌効果は認められなかった。

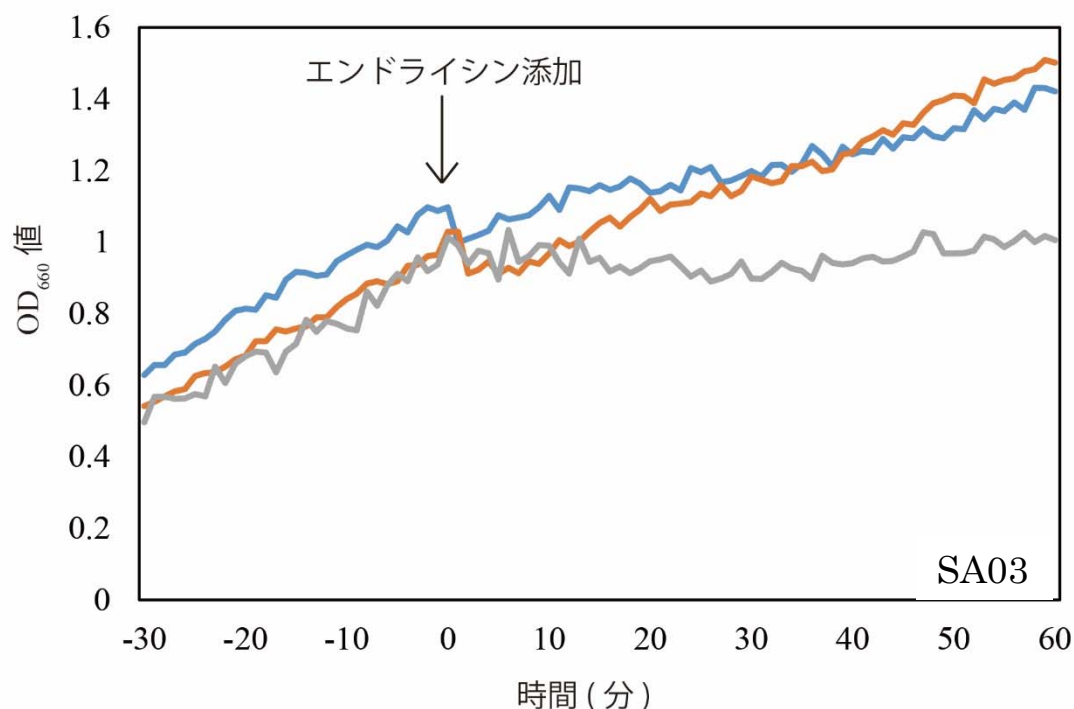


図 21 エンドライシンによる経時的な OD 値の変化

縦軸に OD₆₆₀ 値を、横軸に時間を示した。青が SA の菌液に 0.5 mM EDTA+PBS を加えたもの、オレンジが SA の菌液に 0.5 mM EDTA+エンドライシンを加えたもの、灰色がコントロールとして Pa18 の菌液に 0.5 mM EDTA+エンドライシンを加えたものを示す。(n=1)

4. 考察

エンドライシンはファージの溶菌サイクルの最終段階で作用するペプチドグリカン切断酵素である。グラム陽性菌に対して外部から作用させて溶菌が確認されており、エンドライシン耐性菌の報告もない[42]。一方でグラム陰性菌に対しては細胞壁に存在する外膜によって外部からペプチドグリカンにエンドライシンが到達することが難しく、様々な検討がなされている[4, 47]。我々は第 III 章で得られた $\Phi R18$ のゲノム情報をもとにそのエンドライシンを発現・精

製し、その有効性を評価した。

通常エンドライシンはファージが感染した菌体内で生成され、ホリンによって細胞膜に形成された孔を通じてペプチドグリカンに到達する。大腸菌内で発現させた際はホリンを発現できないため溶菌が起こらず精製できたものと考えられる。一方で緑膿菌株に対しては終濃度 0.5 mM の EDTA を加えることで溶菌活性が認められた(図 19)。これは EDTA が膜を安定化させている二価の陽イオンをキレートすることでエンドライシンがその結合部位に到達することができるためと推察される。外膜を通過させる方法としては EDTA のようなキレート剤を利用する他、ポリカチオン化合物の利用が検討されている。ポリカチオンは陰イオン性の LPS に隣接して結合している二価の陽イオンを除去する作用がある[4]。今後、EDTA の最適濃度を検討する必要がある。また、エンドライシンと EDTA を混合したものを治療として投与する場合はその濃度に注意が必要となる。しかし、EDTA は競走馬の角膜炎の際にはマトリクス・メタロプロテイナーゼやセリンプロテアーゼなどのタンパク質分解酵素を阻害する目的で使われており[39]、エンドライシン製剤として期待できる。

本エンドライシンは ΦR18 の宿主菌である緑膿菌株 Pa18 だけでなくキノロン系薬剤に高度耐性を示した Pa61 を強く溶菌し、同じくキノロン系薬剤に耐性を持ち、ΦR18 が溶菌できなかった Pa17、角膜炎由来緑膿菌 NE-126 に対して弱いものの増殖抑制効果を発揮した。これらの結果はファージの宿主域とエンドライシンの有効範囲が一致していない可能性を示唆する。今後保有している緑膿菌株全体に対してエンドライシンの有効範囲がどう変化しているかを検討していきたい。

本エンドライシンの標的部位は MurNAc と GlcNAc の結合であるが、この部分は細菌細胞壁ペプチドグリカンの本幹部分であり、この構造はグラム陰性菌及び陽性菌のどちらでも保有している。このことからグラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌 *S. aureus* に対して溶菌活性の有無を検討したが溶菌は認められなかった(図 22)。本エンドライシンには細胞壁結合ドメインが認められなかった。しかし、ΦR18 は新種の可能性があるため、まだ同定されていない細胞壁結合ドメインがあり、緑膿菌を認識していることも考えられる。

これまでの報告からグラム陰性菌に対するエンドライシンは由来菌種以外の菌に対しても溶菌活性が認められることが多いことが知られている[11, 38, 64]。これはグラム陰性菌のペプチドグリカンの構造がよく保存されているためだと考えられる。ファージやエンドライシンを抗菌性物質として扱うことを考えれば菌種特異性が高いほうが好ましい。今後、本研究で得られたエンドライシンがグラム陰性菌に対しての溶菌範囲を検討するとともに他のエンドライシンの細胞壁結合ドメインを組み込み、溶菌範囲を狭める、または全く変えることができないかを検討する必要がある。当研究室では黄色ブドウ球菌に特異的で有効なファージ Φ SA012 [55]を保有しており、すでにそのエンドライシンの発現及び溶菌活性を確認している。このエンドライシンは細胞壁結合ドメインである Bacterial src homology 3 (SH3b)ドメインを内包している。本研究で得られた Φ R18 のエンドライシンと Φ SA012 のエンドライシンの組換えエンドライシンを作り、溶菌範囲の変化や可溶性、活性等を調べたい。また、グラム陰性菌に対して効果を上げるための新たな方策を検討したい。

5. 小括

本章において以下のことが明らかとなった。

- 1) Φ R18 がコードするエンドライシンを発現・精製することに成功した。
- 2) そのエンドライシンは由来となる緑膿菌 Pa18 株だけでなく Φ R18 が溶菌できなかった Pa17 株やキノロン系薬剤高度耐性菌である Pa61 株、競走馬の角膜炎由来菌 NE-126 株に効果を示し、グラム陽性菌である SA03 株には効果を示さなかった。

第 V 章 総括

本研究はバクテリオファージの治療的可能性について検討することを目的とし、*in vitro* および *in vivo* でのファージ全体の治療効果の他、ファージから溶菌酵素であるエンドライシンを発現・精製してその有効性を評価し、以下の結果を得た。

1. 野外サンプルから緑膿菌ファージを分離した

札幌市及び江別市内の下水道処理施設から得た汚水から病原性を持つ緑膿菌に対するファージを 6 株分離し、その特性を明らかにした。スポットテストの結果から、それらは宿主域を統合することでイヌ病巣由来緑膿菌 39 株中 30 株を溶菌し、フルオロキノロン系薬剤に対して高度に耐性を持つ緑膿菌株 6 株のうち 5 株に対して溶菌活性を発揮した。また、分離されたファージのうち $\Phi R12$ 、 $\Phi S12-1$ 、 $\Phi S12-3$ 及び $\Phi R18$ に対して電子顕微鏡下での観察を行ったところそのヘッドとテールの構造から $\Phi R12$ 、 $\Phi S12-1$ 及び $\Phi S12-3$ が *Myoviridae*、 $\Phi R18$ が *Podoviridae* に分類されることが明らかになった。

2. ファージは細菌性角膜炎モデルマウスに対して発症予防効果を示した

イヌ病巣由来緑膿菌を宿主菌として分離されたファージはウマ病巣由来緑膿菌に対しても有効性を示した。ウマ由来緑膿菌 29 株中 26 株に対して溶菌活性を示した。6 株のファージのうち $\Phi R18$ は 30 秒で 80%以上が細菌に吸着でき、角膜炎の点眼薬としての使用が期待できた。実際に角膜炎モデルマウスを作成し、その予防効果を試験したところ 3 時間以内でのファージ適用により緑膿菌の増殖を強く抑制することができた。菌投与から 30 分以内にファージを投与する場合は菌に対して 100 倍のファージがあれば増殖抑制効果を発揮すること、ファージをカクテル化することで単独で使用するよりも非常に強く増殖抑制効果を示すことが明らかになった。以上の結果から競走馬のレース後の予防的点眼使用にファージを応用することが可能であることが示唆された。

3. $\Phi S12-1$ 及び $\Phi R18$ のゲノム上に既知の毒性因子はコードされていなかった

ΦS12-1 及び ΦR18 に対して次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施した。どちらも既知の毒性因子をコードしておらず、また、溶原性ファージのマーカ―も保有していなかった。さらに両ファージの溶菌酵素であるエンドライシン遺伝子を特定した。ドメイン検索によるとどちらもリゾチーム様ドメインを持っていたが、ΦS12-1 と ΦR18 の間の相同性は 43% と低かった。

4. ΦR18 のエンドライシンは緑膿菌に対して溶菌活性を示した。

大腸菌を用いて ΦR18 のエンドライシンを発現・精製した。このエンドライシンは宿主菌だった Pa18 の他、フルオロキノロン系薬剤高度耐性菌である Pa17 及び Pa61、角膜炎由来緑膿菌である NE-126 に対して溶菌活性または増殖抑制効果を示し、グラム陽性菌である SA03 株に対しては効果を示さなかった。

以上の研究からバクテリオファージの治療及び予防的使用の可能性、エンドライシンの抗菌活性の一部を明らかにした。世界的な薬剤耐性菌の危機を克服するためにも抗生物質以外の抗菌性物質の開発が急務となっている。本研究はその可能性を示すのに有用な成果を示したと考える。

謝辞

本論文の作成に当たり、終始親身にご指導くださり、適切な助言を賜りました獣医生化学ユニット岩野英知教授に心から感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたりご協力いただきました、獣医生化学ユニット横田博教授、食品衛生学ユニット田村豊教授、臼井優准教授、東京工業大学大学院生命理工学研究科生物プロセス専攻丹治保典教授、獣医ウイルス学ユニット桐澤力雄教授、萩原克郎教授、食と健康学類応用生化学教室岩崎智仁准教授、獣医衛生学ユニット樋口豪紀教授、京都大学大学院医学研究科感染・免疫学講座微生物感染症学分野中川一路教授、丸山史人准教授、JRA 競走馬総合研究所栃木支所微生物研究室丹羽秀和氏、および獣医生化学教室員各位に心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. Ackermann, H.W. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol.* **152**: 227-243.
2. Anany, H., Chen, W., Pelton, R. and Griffiths, M.W. 2011. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl Environ Microbiol.* **77**: 6379-6387.
3. Bassetti, M. and Righi, E. 2013. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? *Hematol. -Am Soc Hematol Educ Program.* **2013**: 428-432.
4. Briers, Y. and Lavigne, R. 2015. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol.* **10**: 377-390.
5. Briers, Y., Walmagh, M. and Lavigne, R. 2011. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* **110**: 778-785.
6. Carver, T., Thomson, N., Bleasby, A., Berriman, M. and Parkhill, J. 2009. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics.* **25**: 119-120.
7. Conibear, T.C., Willcox, M.D., Flanagan, J.L. and Zhu, H. 2012. Characterization of protease IV expression in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Med Microbiol.* **61**: 180-190.
8. d'Herelle, F. 1931. Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. *Bull N Y Acad Med.* **7**: 329-348.
9. Darling, A.C., Mau, B., Blattner, F.R. and Perna, N.T. 2004. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* **14**: 1394-1403.
10. Deresinski, S. 2009. Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas. *Clin Infect Dis.* **48**: 1096-1101.
11. Dong, H., Zhu, C., Chen, J., Ye, X. and Huang, Y.P. 2015. Antibacterial Activity of *Stenotrophomonas maltophilia* Endolysin P28 against both Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *Front Microbiol.* **6**: 1299.
12. Dublanchet, A. and Fruciano, E. 2008. A short history of phage therapy. *Med*

- Mal Infect.* **38**: 415-420.
13. Essoh, C., Latino, L., Midoux, C., Blouin, Y., Loukou, G., Nguetta, S.P., Lathro, S., Cablanmian, A., Kouassi, A.K., Vergnaud, G. and Pourcel, C. 2015. Investigation of a Large Collection of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages Collected from a Single Environmental Source in Abidjan, Cote d'Ivoire. *PLoS One.* **10**: e0130548.
 14. Fernebro, J. 2011. Fighting bacterial infections-future treatment options. *Drug Resist Updat.* **14**: 125-139.
 15. Fleiszig, S.M. and Evans, D.J. 2002. The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Optom.* **85**: 271-278.
 16. Gold, H.S. and Moellering, R.C., Jr. 1996. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med.* **335**: 1445-1453.
 17. Golkar, Z., Bagasra, O. and Pace, D.G. 2014. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries.* **8**: 129-136.
 18. Gu, J., Liu, X., Li, Y., Han, W., Lei, L., Yang, Y., Zhao, H., Gao, Y., Song, J., Lu, R., Sun, C. and Feng, X. 2012. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One.* **7**: e31698.
 19. Gutierrez, D., Ruas-Madiedo, P., Martinez, B., Rodriguez, A. and Garcia, P. 2014. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS One.* **9**: e107307.
 20. Harada, K., Arima, S., Niina, A., Kataoka, Y. and Takahashi, T. 2012. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs and cats in Japan: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanisms. *Microbiol Immunol.* **56**: 123-127.
 21. Hariharan, H., Coles, M., Poole, D., Lund, L. and Page, R. 2006. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J.* **47**: 253-255.
 22. Herpers, B.L. and Leeson, N. 2015. Endolysins: redefining antibacterial therapy. *Future Microbiol.* **10**: 309-311.
 23. Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., Nuka, G., Pesseat, S., Quinn, A.F., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Yong, S.Y., Lopez, R. and Hunter, S. 2014.

- InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. **30**: 1236-1240.
24. Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. and Kurosawa, T. 2011. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim*. **60**: 481-487.
 25. Kroemer, S., El Garch, F., Galland, D., Petit, J.L., Woehrle, F. and Boulouis, H.J. 2014. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from infections in cats and dogs throughout Europe (2002-2009). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. **37**: 97-108.
 26. Krylov, V., Shaburova, O., Krylov, S. and Pleteneva, E. 2013. A genetic approach to the development of new therapeutic phages to fight *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections. *Viruses*. **5**: 15-53.
 27. Kutter, E.M., Kuhl, S.J. and Abedon, S.T. 2015. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine. *Future Microbiol*. **10**: 685-688.
 28. Labrie, S.J., Samson, J.E. and Moineau, S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. **8**: 317-327.
 29. Levy, S.B. and Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med*. **10**: S122-129.
 30. Lin, D., Foley, S.L., Qi, Y., Han, J., Ji, C., Li, R., Wu, C., Shen, J. and Wang, Y. 2012. Characterization of antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *J Appl Microbiol*. **113**: 16-23.
 31. Lusiak-Szelachowska, M., Zaczek, M., Weber-Dabrowska, B., Miedzybrodzki, R., Klak, M., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Rogoz, P., Szufnarowski, K., Jonczyk-Matysiak, E., Owczarek, B. and Gorski, A. 2014. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunol*. **27**: 295-304.
 32. Marquart, M.E. and O'Callaghan, R.J. 2013. Infectious keratitis: secreted bacterial proteins that mediate corneal damage. *J Ophthalmol*. **2013**: 369094.
 33. Mekic, S., Matanovic, K. and Seol, B. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet Rec*. **169**: 125.
 34. Miyata, R., Yamaguchi, K., Uchiyama, J., Shigehisa, R., Takemura-Uchiyama, I., Kato, S., Ujihara, T., Sakaguchi, Y., Daibata, M. and Matsuzaki, S. 2014.

- Characterization of a novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, KPP25, of the family Podoviridae. *Virus Res.* **189**: 43-46.
35. Morita, Y., Tomida, J. and Kawamura, Y. 2014. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Front Microbiol.* **4**: 422.
 36. Nakonieczna, A., Cooper, C.J. and Gryko, R. 2015. Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. *J Appl Microbiol.* **119**: 620-631.
 37. Nobrega, F.L., Costa, A.R., Kluskens, L.D. and Azeredo, J. 2015. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends Microbiol.* **23**(4): 185-191.
 38. Oliveira, H., Vilas Boas, D., Mesnage, S., Kluskens, L.D., Lavigne, R., Sillankorva, S., Secundo, F. and Azeredo, J. 2016. Structural and Enzymatic Characterization of ABgp46, a Novel Phage Endolysin with Broad Anti-Gram-Negative Bacterial Activity. *Front Microbiol.* **7**: 208.
 39. Ollivier, F.J., Gilger, B.C., Barrie, K.P., Kallberg, M.E., Plummer, C.E., O'Reilly, S., Gelatt, K.N. and Brooks, D.E. 2007. Proteinases of the cornea and preocular tear film. *Vet Ophthalmol.* **10**: 199-206.
 40. Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F. and Stevens, R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* **42**: D206-214.
 41. Owen, G.R., Brooks, A.C., James, O. and Robertson, S.M. 2007. A novel in vivo rabbit model that mimics human dosing to determine the distribution of antibiotics in ocular tissues. *J Ocul Pharmacol Ther.* **23**: 335-342.
 42. Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V.A. and Huang, D.B. 2013. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol.* **62**: 1506-1516.
 43. Pendleton, J.N., Gorman, S.P. and Gilmore, B.F. 2013. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **11**: 297-308.
 44. Pohane, A.A., Joshi, H. and Jain, V. 2014. Molecular dissection of phage endolysin: an interdomain interaction confers host specificity in Lysin A of Mycobacterium phage D29. *J Biol Chem.* **289**: 12085-12095.

45. Poole, K. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* **2**: 65.
46. Reardon, S. 2015. Bacterial arms race revs up. *Nature.* **521**: 402-403.
47. Rodriguez-Rubio, L., Chang, W.L., Gutierrez, D., Lavigne, R., Martinez, B., Rodriguez, A., Govers, S.K., Aertsen, A., Hirl, C., Biebl, M., Briers, Y. and Garcia, P. 2016. 'Artilylation' of endolysin lambdaSa2lys strongly improves its enzymatic and antibacterial activity against streptococci. *Sci Rep.* **6**: 35382.
48. Rubin, J., Walker, R.D., Blickenstaff, K., Bodeis-Jones, S. and Zhao, S. 2008. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet Microbiol.* **131**: 164-172.
49. Schaefer, F., Bruttin, O., Zografos, L. and Guex-Crosier, Y. 2001. Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Br J Ophthalmol.* **85**: 842-7.
50. Schink, A.K., Kadlec, K., Hauschild, T., Brenner Michael, G., Dorner, J.C., Ludwig, C., Werckenthin, C., Hehnen, H.R., Stephan, B. and Schwarz, S. 2013. Susceptibility of canine and feline bacterial pathogens to pradofloxacin and comparison with other fluoroquinolones approved for companion animals. *Vet Microbiol.* **162**: 119-126.
51. Schmelcher, M., Donovan, D.M. and Loessner, M.J. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* **7**: 1147-1171.
52. Shabbir, M.A., Hao, H., Shabbir, M.Z., Wu, Q., Sattar, A. and Yuan, Z. 2016. Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenal. *Front Microbiol.* **7**: 1292.
53. Shen, E.P., Tsay, R.Y., Chia, J.S., Wu, S., Lee, J.W. and Hu, F.R. 2012. The role of type III secretion system and lens material on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to contact lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **53**: 6416-6426.
54. Sheppard, J.G. and Long, T.E. 2016. Allicin-inspired thiolated fluoroquinolones as antibacterials against ESKAPE pathogens. *Bioorg Med Chem Lett.* **26**(22): 5545-5549
55. Synnott, A.J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H. and Tanji, Y. 2009. Isolation from sewage influent and characterization of novel

- Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 4483-4490.
56. Tamura, Y., Suzuki, S., Kijima, M., Takahashi, T. and Nakamura, M. 1992. Effect of proteolytic enzyme on experimental infection of mice with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Vet Med Sci.* **54**: 597-599.
 57. Tamura, Y., Suzuki, S. and Sawada, T. 1992. Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Microb Pathog.* **12**: 237-244.
 58. Tang, A., Caballero, A.R., Marquart, M.E. and O'Callaghan, R.J. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* small protease (PASP), a keratitis virulence factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **54**: 2821-2828.
 59. Teresa Tejedor, M. 2003. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Vet Microbiol.* **94**: 295-301.
 60. Trautmann, M., Lepper, P.M. and Haller, M. 2005. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Control.* **33**: S41-49.
 61. Trudil, D. 2015. Phage lytic enzymes: a history. *Viol Sin.* **30**: 26-32.
 62. Tummler, B., Wiehlmann, L., Klockgether, J. and Cramer, N. 2014. Advances in understanding *Pseudomonas*. *F1000Prime Rep.* **6**: 9.
 63. Wada, S., Hobo, S. and Niwa, H. 2010. Ulcerative keratitis in thoroughbred racehorses in Japan from 1997 to 2008. *Vet Ophthalmol.* **13**: 99-105.
 64. Walmagh, M., Briers, Y., dos Santos, S.B., Azeredo, J. and Lavigne, R. 2012. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201phi2-1 and PVP-SE1. *PLoS One.* **7**: e36991.
 65. Wei, H. 2015. Bacteriophages, revitalized after 100 years in the shadow of antibiotics. *Viol Sin.* **30**: 1-2.
 66. Williams, L.B. and Pinard, C.L. 2013. Corneal ulcers in horses. *Compend Contin Educ Vet.* **35**: E4.
 67. Wittebole, X., De Roock, S. and Opal, S.M. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence.* **5**: 226-35.

68. Yan, X., Fratamico, P.M., Bono, J.L., Baranzoni, G.M. and Chen, C.Y. 2015. Genome sequencing and comparative genomics provides insights on the evolutionary dynamics and pathogenic potential of different H-serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104. *BMC Microbiol.* **15**: 83.
69. Yang, H., Yu, J. and Wei, H. 2014. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Front Microbiol.* **5**: 542.
70. Zerbino, D.R. and Birney, E. 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* **18**: 821-829.
71. Zhou, C.E., Smith, J., Lam, M., Zemla, A., Dyer, M.D. and Slezak, T. 2007. MvirDB—a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res.* **35**: D391-D394.