

## 【助成 40-49】

### 殺菌レーザーとバクテリオファージを融合した狙撃分子の創成

研究者 徳島文理大学薬学部 准教授 阪口 義彦  
共同研究者 北里大学医学部 助教 武 晃  
岡山大学学術研究院保健学域 准教授 後藤和義  
岡山大学学術研究院医歯薬学域 教授 阪口政清  
藤田医科大学 教授 大宮直木  
東京慈恵会医科大学医学部 教授 岩瀬忠行  
東京慈恵会医科大学医学部 准教授 光永真人  
京都産業大学総合生命科学部 教授 津下英明

#### 〔研究の概要〕

*Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) は、*C. difficile* が原因で引き起こされる難治性の下痢症・腸炎である。我々は、*C. difficile* を特異的に殺菌する手法として、バクテリオファージ(ファージ)および蛍光プローブ IR700 に着目した。ファージは、特定の細菌にのみ結合する特徴を有する。一方、IR700 は、近赤外光を殺菌レーザーに変換することで、様々な病原体に強い殺菌活性を示す。そこで、我々は、これらの分子を融合させた新しい狙撃分子を考案した。本研究において、まずは、推定したファージ由来結合分子 (CDPX、CDPY) を発現・精製した。これらの分子は、*C. difficile* に対して結合が認められたが、菌株間の特異性が認められなかった。その特異性には、複数のタンパク質が関わっていることが示唆された。

#### 〔研究経過および成果〕

*Clostridioides difficile* 感染症 (CDI) は、*C. difficile* が原因で引き起こされる難治性の下痢症・腸炎である<sup>1</sup>。CDI の治療には抗菌薬が用いられるが、再発を繰り返し治療が難渋することがある。抗菌薬では、*C. difficile* のみを特異的に死滅させることは困難であり、腸内の有益な細菌までも死滅させる。そこで、我々は、*C. difficile* のみ特異的に殺菌する手法を開発するために、バクテリオファージ(ファージ)に着目した。ファージは、特定の細菌にのみ結合する特徴を有する。その特異性は、菌株を認識することができるファージ尾部が重要な役割を担っている。一方で、申

請者らが着目した蛍光プローブ IR700 は、近赤外光を殺菌レーザーに変換することで、様々な病原体に強い殺菌活性を示す。そこで、我々は、これらを融合させた新しい狙撃分子を考案した。本研究テーマでは、まずは、*C. difficile* に特異的な結合分子を同定することとした。

*C. difficile* に特異的に感染するファージ A のゲノム解析から、他のファージのゲノム上の遺伝子との相同性およびタンパク質機能予測解析により<sup>2,3</sup>、2 個の遺伝子 (*cdpX* および *cdpY*) がファージ尾部の結合分子をコードしていると推察した。そこで、これらの遺伝子を人工合成し、大腸菌に組換えタンパク質として

発現し、アフィニティーカラムにより可溶性タンパク質として精製することができた。

精製 His-CDPX と His-CDPY について、*C. difficile* または粗細胞壁に対する結合性を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) およびウエスタンブロット法により解析した。両タンパク質ともに *C. difficile* PCR-リボタイプ (RT) 027 株に対して濃度依存のおよび時間依存的に結合が認められた。また、ウエスタンブロット法による解析では、His-CDPX は、*C. difficile* RT 027 またはその粗細胞壁に対して結合することが判明した。一方で His-CDPY は、*C. difficile* RT 027 に対して結合性を示したが、粗細胞壁においては、上清および沈渣ともにシグナルが検出されなかった。同様に、2 種類の結合タンパク質について *C. difficile* の他の菌株 (RT 001、RT 017、RT 018、RT 027、RT 060) に対する結合性も調べたが、いずれも株間に対する結合の有意差が認められなかった (図 1)。このことは、*Bacillus subtilis* ファージおよび *Lactococcus lactis* ファージで報告されている尾部の 3 次元構造解析から、ファージの尾部先端は複数のタンパク質で構成することで特異性を示すことが予想され、1 種類のタンパク質では特異性が低いことが推察される<sup>5,6</sup>。そこで、さらに *C. difficile*

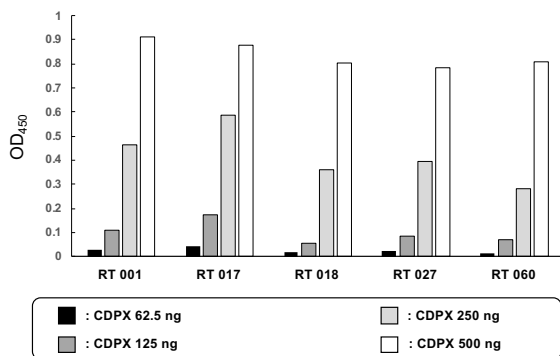


図 1 ELISA による結合分子の *C. difficile* に対する結合性

に特異的な結合分子を同定するため、隠れマルコフモデルを用いた遺伝子機能予測解析を行うと、*C. difficile* ファージ A のゲノム上には、新たに細菌の結合に関与する遺伝子群が推定された。今後、これらの遺伝子を個々に発現・精製し、*C. difficile* への結合性を調べる必要がある。*C. difficile* に対して特異的な結合分子を同定した後、本結合分子との IR700 の連結を検討し、近赤外光による *C. difficile* への殺菌活性を検証する。今回実施した研究成果から得られた問題点を解決することにより、*C. difficile* 感染症の原因となる *C. difficile* を特異的に殺菌する狙撃分子の創出が期待される。

#### 〔参考文献〕

- Gotoh, K., Sakaguchi, Y., Kato, H., Osaki, H., Jodai, Y., Wakuda, M., Také, A., Hayashi, S., Morita, E., Sugie, T., Ito, Y., Ohmiya, N., Fecal microbiota transplantation as therapy for recurrent *Clostridioides difficile* infection is associated with amelioration of delirium and accompanied by changes in fecal microbiota and the metabolome. *Anaerobe*, 73, 102502, 2022.
- Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., Andreu, J. M., Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(20), 7711–7716, 2012.
- Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., Ogma, K., The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(48), 17472–17477, 2005.
- Farley, M. M., Tu J, Kearns, D. B., Molineux, I. J., Liu, J., Ultrastructural analysis of bacteriophage Φ29 during infection of *Bacillus subtilis*, *J. Struct. Biol.*, 197(2), 163–171, 2017.
- Spinelli, S., Veessler, D., Bebeacua, C., Cambillau, C., Structures and host-adhesion mechanisms of lactococcal siphophages, *Front. Microbiol.*, 5(3), 1–13, 2014.