

氏名(本籍)	小方 雅也(神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第 83 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	細菌検査および食品加工におけるバクテリオファージエンドライシンの有用性の検討
論文審査委員	(主査) 田原口 智 士 (副査) 竹 田 志 郎 紙 透 伸 治

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

バクテリオファージ(以下、ファージ)とは、細菌特異的に感染するウイルスの総称である。ファージの感染は、宿主となる細菌表面にファージが吸着し、ファージゲノムが細菌体内に注入される。次に、菌体内ではファージゲノムの複製や構造タンパク質の合成が生じ、細菌体内で子ファージが形成される。同時期に、ファージゲノムにコードされる非構造タンパク質であるエンドライシンが発現する。エンドライシンは、細菌の細胞壁を構築するペプチドグリカンへ作用する。その結果、ペプチドグリカンが内側から分解することで溶菌し、菌体内に形成された子ファージは菌体外に放出される。エンドライシンは、細菌に対して直接添加した場合に、細菌属および種に特異的な溶菌作用することが知られており、微生物制御の分野において新規抗菌剤として使用できる可能性が期待されている。本研究では、特定の雑菌の増殖を抑制するために、エンドライシンを選択的抗菌剤として利用できる可能性に着目した。

しかしながら、エンドライシンの使用に関しては、治療薬に特化しており、それ以外の応用に関する検討は殆ど行われていない。他の分野においてエンドライシンを使用するためには、エンドライシンを使用した概念実証(Proof of Concept)が必要である。

そこで、本研究では組み換えエンドライシンの実現化の可能性を裏付けるために、組み換えエンドライシンを使用した臨床検査および食品衛生への応用を目指した研究を行った。

第一章：B群連鎖球菌検査で問題となる偽陰性を改善する

新規選択的抗菌剤の開発

B群連鎖球菌（Group B *Streptococcus*；以下 GBS）は、妊婦から新生児に産道感染した場合、新生児に重篤な GBS 感染症を引き起こす。現状の GBS 検査では、採取した膣スワブを直接 GBS 増菌培地に接種し、培養を行う。GBS 増菌培地は種々の選択的抗菌剤を添加し、GBS の選択性を持たしている。しかしながら、膣スワブ中の抗菌性状が似ている *Enterococcus faecalis*（以下、*E. faecalis*）の過剰増殖によって、本来であれば GBS 陽性になる検体の検査結果が偽陰性と判定され、GBS の保菌状況が正確に検査できないという問題がある。この偽陰性になる問題に対して、エンドライシンを GBS 増菌培地へ応用できる可能性があるとして着想した。本章では、*E. faecalis* に特異的な組み換えエンドライシンの GBS 選択培地への応用を目指して研究を行った。

まず、組み換えエンドライシン EG-LYS の作製を行った。下水流入水から *E. faecalis* に特異的な溶菌活性のあるファージΦM1EF2 を分離した。ファージΦM1EF2 のゲノムからエンドライシン遺伝子を同定し、大腸菌タンパク質発現システムに組み込み、エンドライシン EG-LYS を作製した。

次に、細菌種ごとのペプチドグリカンおよび細菌細胞に対する EG-LYS の活性効果を検討した。EG-LYS は *E. faecalis* の多くの菌株を溶菌し、GBS 株や他の *Enterococcus spp.* の菌株は溶菌しなかった。次に、Granada 液体培地に EG-LYS 添加群・PBS 添加群を作製し、そこに GBS 株と *E. faecalis* 株を同時に植菌し、生菌数を測定した。EG-LYS 添加群では、GBS 株は増殖し、*E. faecalis* 株は増殖が抑制された。一方、対照群として使用した PBS 添加群では、*E. faecalis* 株は増殖し、GBS 株は増殖が抑制された。次に、GBS 株（ 10^2 CFU/mL）および *E. faecalis* 株（ 10^4 CFU/mL）を同時に植菌した偽陰性モデルにおける、EG-LYS の活性効果を検討した。*E. faecalis* 30 株と GBS 7 株を 1 株ずつ植菌し、210 通りの偽陰性モデルを作製した。作製した偽陰性モデルに 0.1 mg/mL および 0.01 mg/mL の EG-LYS を添加し、生菌数を測定を行った。GBS は 99.0%（208 検体/210 検体）および 59.0%（124 検体/210 検体）で検出された。

さらに臨床応用可能であるかを、548 検体のヒト膣スワブを使用し調査した。EG-LYS なしの GBS 検出率は 15.7%（86 検体/548 検体）であった。一方、EG-LYS 処理による GBS 検出率は 17.9%（98 検体/548 検体）に増加した。また統計的解析の結果、EG-LYS 処理をすることで GBS 検査の偽陰性を有意に改善したことが明らかとなった。

以上から、GBS 増菌培地に EG-LYS を添加すると、偽陰性モデルならびに臨床検体の GBS 検査の精度が向上することが示された。

第二章：食肉製品の腐敗性乳酸菌に対する

ファージエンドライシンの抗菌効果

食肉製品の製造過程において、衛生管理などの要因による腐敗性細菌の混入が問題となっている。乳酸菌 *E. faecalis* は耐熱性が高い特徴を有し、食肉製品加工製造中に混入した場合、加熱や燻煙作業

でも生残することで汚染された製品は腐敗変敗を引き起こす。この問題に対して、エンドライシンを選択的防腐剤として食品衛生分野へ応用できる可能性があるかと着想した。本章では、第一章で報告したエンドライシン EG-LYS で *E. faecalis* の増殖を抑制し、食肉製品の品質を維持する可能性を探ることを目的に研究を行った。

まず、食肉製品中の細菌群集を調査した。食肉製品における属レベルでの分類学的分析を行い、*Enterococcus* 属が 0.1~1.0 %含まれており、食肉製品中に存在していた。従って、*Enterococcus* 属は食肉製品の腐敗変敗の原因になる可能性が認められた。

次に、細菌種ごとのペプチドグリカンおよび細菌細胞に対する EG-LYS の活性効果を検討した。EG-LYS で処理した場合、*E. faecalis* 株のみ増殖を抑制し、対照群の腐敗した食肉由来の *Enterococcus malodoratus* 株や他の細菌種には活性を示さなかった。次に、*E. faecalis* 株および EG-LYS を MRS 培地に同時に添加し、生菌数を測定した。EG-LYS を添加した培地では *E. faecalis* 株の増殖は抑制され、対照群の PBS を添加した培地では *E. faecalis* 株は増殖した。

最後に、食肉加工では燻煙や加熱殺菌等の高温での工程があるため、EG-LYS の耐熱性試験を行った。加熱処理された EG-LYS のタンパク質濃度は、50 °C以上の加熱処理によって低下した。また、加熱処理された EG-LYS を使用し、*E. faecalis* に対する活性効果を調べた。EG-LYS の活性効果は、55 °C 以上の加熱処理によって低下した。以上から、EG-LYS は高温工程前の使用は難しく、高温工程後の二次殺菌として使用できる可能性があると考えられた。

第三章：実験計画法を使用したエンドライシンの大量調製法の検討

第一章、第二章を実現可能にするには、エンドライシンの大量調製が必要不可欠である。しかしながら、大量調製に関する報告はない。これに対して、実験計画法 (Design of Experiment, DOE) の一つである決定的スクリーニング計画 (Definitive Screening Design, DSD) に着目した。この手法は、少ない実験 (シミュレーション) 回数から多数の因子および各因子の変数を同時に調査し、性能に大きな影響を与える因子および各因子の変数 (パラメーター) を絞り込み、培養条件をモデル化することができると考えた。第三章では DSD を活用し、組み換えエンドライシン大量調製のための大腸菌培養条件およびタンパク質発現の最適化を行った。

まず、大腸菌培養における因子およびパラメーターを検討した。大腸菌培養条件の因子およびパラメーターの決定では、異なる培地組成、pH、培養時間、培養温度、酸素供給量などの因子がエンドライシンの発現量に影響を及ぼすと考えた。先行研究に基づいて、エンドライシンの発現量を最大化するために前培養濁度、発現誘導温度、発現誘導時間、IPTG 濃度の 4 因子を最適な培養条件の因子として選択した。

各因子の変化がエンドライシンの発現量にどのように影響するかを解析した。その結果、各因子におけるパラメーターいわゆる連続変数の間隔が広くなるにつれて因子で有意差が示された。その因子の中でも、前培養濁度、発現誘導温度、IPTG 濃度の 3 因子はエンドライシンの発現量に大きく関与し

ていた。

上記で得られたデータを基に、大腸菌によるエンドライシンの最適培養モデルを構築した。その結果、最適培養条件は前培養濁度=0.2、発現誘導温度=15°C、発現誘導時間=24 時間、IPTG 濃度=1 mM と示された。このモデルを活用することで、エンドライシンの大量調製が実現可能な培養条件であることを明確にした。

以上から、エンドライシンの大量調製を実現するための基盤が構築され、生産性を向上させるための重要な条件が特定された。

【総括】

本研究では、*E. faecalis* に対するエンドライシン EG-LYS を選択的抗菌剤として使用し、細菌検査や食品衛生を改善できると期待された。特に、第一章での研究は細菌検査で組み換えエンドライシンを使用して、検査の精度が向上するという概念実証を示した世界で初めての報告である。一般的に、エンドライシンは、グラム陽性菌に対して有効な抗菌剤として取り扱われてきた。しかしながら、近年、エンドライシンは、グラム陽性菌のみならず、グラム陰性菌に対しても有効であるように開発されており、応用できる可能性が非常に高い。将来、医学や獣医学におけるエンドライシンの研究が活性化し、エンドライシンの応用を拡大すると期待される。

【参考論文】

1. Masaya Ogata, Jumpei Uchiyama, Abdulatef M Ahhmed, Seiichi Sakuraoka, Satoshi Taharaguchi, Ryoichi Sakata, Wataru Mizunoya, Shiro Takeda*. Effects of Inherent Lactic Acid Bacteria on Inhibition of Angiotensin I-Converting Enzyme and Antioxidant Activities in Dry-Cured Meat Products. *Foods*, 11(14), 2123, 2022.
2. Hidehito Matsui#, Jumpei Uchiyama*#, Masaya Ogata#, Tadahiro Nasukawa, Iyo Takemura-Uchiyama, Shin-ichiro Kato, Hironobu Murakami, Masato Higashide, Hideaki Hanaki. Use of Recombinant Endolysin to Improve Accuracy of Group B Streptococcus Tests. *Microbiol Spectrum*, 9(1), e00077-21, 2021. # Hidehito Matsui, Jumpei Uchiyama, and Masaya Ogata contributed equally to this article. Author order was determined by drawing straws.

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

バクテリオファージ（以下、ファージ）とは、細菌に感染するウイルスの総称である。ファージは、宿主となる細菌に感染した後、菌体内ではファージゲノムの複製や構造タンパク質の合成が生じ、子ファージが形成される。同時期に、ファージゲノムにコードされる非構造タンパク質であるエンドライシンが発現する。これが細胞壁を構築するペプチドグリカン分解することで溶菌し、菌体内に形成された子ファージは菌体外に放出される。エンドライシンは、細菌に対して直接添加した場合でも、細菌属および種に特異的な溶菌作用することが知られており、微生物制御の分野において新規抗菌剤として使用できる可能性が期待されている。

本研究では、*Enterococcus faecalis*（以下、*E. faecalis*）の増殖を抑制するために、エンドライシンを選択的抗菌剤として利用できる可能性に着目した。本研究では組み換えエンドライシンの実現化の可能性を裏付けるために、組み換えエンドライシンを使用した臨床検査および食品衛生への応用を目指した研究を行った。

本論文は、三章から構成されている。第一章では、妊婦のB群連鎖球菌（GBS）検査で問題となる偽陰性を改善する新規選択的抗菌剤の開発を行った。下水流入水から *E. faecalis* に特異的な溶菌活性のあるファージΦM1EF2を分離した。ファージΦM1EF2のゲノムからエンドライシン遺伝子を同定し、大腸菌タンパク質発現システムに組み込み、組み換えエンドライシン EG-LYS を作製した。ラボモデルおよび女性から採取した膣スワブを使用した臨床サンプルにおいて、EG-LYSは *E. faecalis* の増殖を抑制し、GBSが増殖したことからGBS検査精度を上げることを確認した。第二章では、食肉製品の腐敗性乳酸菌に対するEG-LYSの抗菌効果を検討した。まず、食肉製品中の細菌群集の調査から、その中に含まれる菌の属レベルでの分類学的分析を行った。その中には、*Enterococcus* 属が含まれており、食肉製品での腐敗変敗の原因になる可能性が認められた。また食肉由来 *E. faecalis* に対してのEG-LYSの有効性を明らかにした。第三章は、EG-LYSの大量調製に向けて、実験計画法の一つである決定的スクリーニング計画（DSD）を使用し、菌の最適培養条件を決定した。

本研究では、*E. faecalis* に対するエンドライシン EG-LYS を選択的抗菌剤として使用し、細菌検査や食品衛生を改善できると期待された。

本研究の一部は、以下の学術論文に公表済みである。

1. Masaya Ogata, Jumpei Uchiyama, Abdulatef M Ahhmed, Seiichi Sakuraoka, Satoshi Taharaguchi, Ryoichi Sakata, Wataru Mizunoya, Shiro Takeda*. Effects of Inherent Lactic Acid Bacteria on Inhibition of Angiotensin I-Converting Enzyme and Antioxidant Activities in Dry-Cured Meat Products. *Foods*, 11(14), 2123, 2022.

1. Hidehito Matsui#, Jumpei Uchiyama*#, Masaya Ogata#, Tadahiro Nasukawa, Iyo Takemura-Uchiyama, Shin-ichiro Kato, Hironobu Murakami, Masato Higashide, Hideaki Hanaki. Use of Recombinant Endolysin to Improve Accuracy of Group B Streptococcus Tests. *Microbiol Spectrum*, 9(1), e00077-21, 2021. # Hidehito Matsui, Jumpei Uchiyama, and Masaya Ogata contributed equally to this article. Author order was determined by drawing straws.

2. 論文審査

1) テーマの立て方

申請者は、*E. faecalis*に対するエンドライシンの適用可能性を裏付けるために組み換えエンドライシンを使用した技術開発を実施している。この研究は、エンドライシンの治療薬以外での応用に関する概念実証および産業化に向けたエンドライシンの調製法を課題としている。これらの目的と課題は、エンドライシンの実用化に向けた技術開発を目標に基づいて定められた。本研究は、明確に設定されたテーマに基づき整理された課題と目的を持つものである。

2) 研究の背景

ファージが細菌に感染し、菌体内でエンドライシンが発現しペプチドグリカンを分解することで溶菌する。活性のあるファージを利用した方法では、活性の保持、汚染や培養に問題が生じる。そのため、組み換えエンドライシンに注目した。本研究では、特定の *E. faecalis* の増殖を抑制するために、組み換えエンドライシンを選択的抗菌剤として利用できる可能性に着目し、研究目的を設定し、研究遂行している。

3) 研究の方法

エンドライシンの分離・精製が必要なことから遺伝子組み換え大腸菌が用いた。そのうえで、各章の研究における細菌細胞に対するエンドライシンの有効性や実用性を証明するために詳細な研究を行った。また、エンドライシンの大量調製では実験計画法の一つである“決定的スクリーニング計画 (DSD)”を使用し、大腸菌のタンパク質発現に関わる要因を検討した。研究の信頼性を確保するために、評価試験では関連のガイドラインへの適合性を確認した。このように、目的達成に適う方法が選択されている。

4) 研究の結果

第一章では、*E. faecalis*に特異的な溶菌活性のあるファージΦM1EF2からエンドライシン遺伝子を同定し、大腸菌タンパク質発現システムに組み込み、エンドライシン EG-LYS を作製した。EG-LYS は *E. faecalis* の多くの菌株を溶菌し、GBS 株や他の *Enterococcus spp.*の菌株は溶菌しなかった。*E. faecalis* 30 株と GBS 7 株から作製した 210 通りの偽陰性モデルでは、GBS は 99.0% (208 検体/210 検体) で検出された。さらに臨床応用では、EG-LYS による GBS 検出率は 12.2% (12 検体/98 検体) に増加した。

第二章では、食肉製品に *Enterococcus* 属が 0.1~1.0%含まれており、食肉製品の腐敗変敗の原因にな

る可能性を明らかにした。EG-LYS は腐敗性 *E. faecalis* に対する活性効果が認められた。

第三章では、まず、大腸菌培養における因子およびパラメーターを先行研究に基づいて、前培養濁度、発現誘導温度、発現誘導時間、IPTG 濃度の 4 因子を最適な培養条件の因子として選択した。解析ソフト JMP で統計解析を行った。その結果、大腸菌による EG-LYS の発現は前培養濁度、発現誘導温度、IPTG 濃度が重要な因子であることを明らかにしている。各章で得られた結果は、簡潔で適切な図表を用いて示されており、重要な点が理解しやすいように工夫されている。

5) 考察と結論

本研究では、*E. faecalis* に対するエンドライシン EG-LYS を選択的抗菌剤として使用し、細菌検査や食品衛生を改善できることが期待される。特に、第一章での研究は細菌検査で組み換えエンドライシンを使用して、検査の精度が向上するという概念実証を示した世界で初めての報告である。研究内のデータ群が結論を強固に支える研究となっている。またファージエンドライシンおよび各分野における適切なガイドラインを考慮して研究を行い、結論を下している。これらの考察と結論は、論理的に著述されている。

6) 参考論文

研究の背景、材料および方法、考察の展開において、適切な参考文献が必要な数だけ引用されている。

3. 審査結果

本論文の内容と発表会での質疑応答に対する的確な解答から、微生物学ならびに食品衛生学と衛生検査に関する十分な理解がある。学位論文発表会においてのコメントに的確に対応し、学位論文が加筆・修正されている。発表会後に口頭試問を行い、質疑応答にも的確な回答を考慮すると、博士としての素養を十分に有していると認められることから、博士（学術）の学位を授与するのに相応しいと判定した。