

新世代のファージ研究



研究ノート

米崎哲朗^{*}, 大塚裕一^{**}

Phage research in a new generation

Key Words : phage therapy, gene evolution,
lateral transfer of genes, T4 phage

1. はじめに

細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ(ファージ)の研究は、デレルが赤痢菌感染患者を自然治癒させる作用をもった赤痢菌ファージを発見したことから、感染症治療のために原因細菌をファージで殺すことを目的として開始した(第1世代: 1917~1940年頃)。

第1世代の研究¹⁾では、当初ファージ療法の輝かしい将来が予言されたものの、宿主特異性(第2項で詳述)等ファージに関する基礎知識もなく、ファージの純度や濃度に対する認識も不十分なままに使用したため、効果は大きくばらついた。なによりも、1939年にルスカが電子顕微鏡によって実体を明らかにするまでファージの正体は不明であったため、ウイルスという前提を欠いた実験であったり、対照実験の不備、不純な標品であったために混入してい

るエンドトキシンによる副作用、など欠陥があまりにも多く、肯定・否定いずれも結論を下せるようなものではなかった。また、製薬会社などの誇大宣伝も信頼をそこねる一因となった。一方、1928年にフレミングのペニシリン発見が発端となって1940年代に抗生物質が市販されるようになるとファージ療法は忘れ去られるようになった。抗生物質による治療では当初から耐性菌の出現が問題視されていたが、次々と新薬を開発することによりこの問題を克服してきた。その結果、1969年に米国公衆衛生局長官が「細菌との戦いは終了した」と宣言するほど絶大な効果を発揮した。

しかし、2000年以降になると耐性菌の出現を新しい抗生物質の開発によって対抗する手段は限界にきたと認識されるようになってきた。夢の抗生物質と呼ばれた vancomycin でさえ耐性となったブドウ球菌、腸球菌、肺炎桿菌、緑膿菌、などが猛威をふるい始めたからである。これらの耐性病原菌が深刻なのは、同時に多くの抗生物質に耐性すなわち多剤耐性を獲得していることである。しかも、この多剤耐性は種を超えて他の病原菌にも極めて早い速度で伝播されることが明らかとなってきた。これに対して、莫大な費用・労力・時間のかかる新薬の開発は採算があわなくなり、製薬会社も手をこまねくような状態に陥っている。

デルブリュックを中心として分子生物学を誕生させたファージ研究の第2世代は1930年代後半から始まり、DNAが遺伝物質であることの証明、遺伝子の実体論的理解、遺伝暗号の解読、制限酵素の発見、DNA複製の機構、遺伝子発現の仕組み、蛋白質集合の機構等、生物学の基礎となる輝かしい成果を次々と収めてきた。その後も、現在にいたるまでT4ファージを中心としたファージ研究は止むことなく継続しており、感染の成立と増殖のしくみにお



* Tetsuro YONESAKI

1950年9月生
大阪大学大学院・理学研究科・生物科学専攻(1978年)
現在、大阪大学大学院・理学研究科・生物科学専攻 教授 理学博士 分子遺伝学
TEL : 06-6850-5813
FAX : 06-6850-6769
E-mail : yonesaki@bio.sci.osaka-u.ac.jp



** Yuichi OTSUKA

1975年3月生
大阪大学大学院・理学研究科・生物科学専攻(2003年)
現在、大阪大学大学院・理学研究科・生物科学専攻 助教 理学博士 分子生物学
TEL : 06-6850-5810
FAX : 06-6850-6769
E-mail : otsukay@bio.sci.osaka-u.ac.jp

いて、宿主とファージの相互作用、宿主の防御機構やファージの打破機構、などに関する詳細な知見が蓄積してきた²⁾。

抗生物質が登場するまでは病気といえば感染症を指しており、一旦は克服したかに見えた感染症が多剤耐性菌の出現により再び人類の脅威となりつつある。また、養殖・畜産・農業における生物の保護、加工食品の生産や管理、等様々な分野においても抗生物質に頼らない細菌対策が求められるようになってきた。そのため、改めてファージ療法に注目が寄せられるようになってきた。

一方、ファージ研究の第2世代では生物を理解するために普遍的な法則を発見することが主たる研究目的であったが、1990年代から新しい潮流も湧き起こってきた。それは生物多様性の枠組みにおけるファージの理解であり、主に生態学的/進化学的観点に立脚した研究である。以下に、新しい時代のファージ研究として、ファージ療法への新しいチャレンジや地球生態に重要な位置を占めるファージの研究を紹介する。

2. ファージ療法への新しいチャレンジ

現代におけるファージ療法は、抗生物質に代わる治療薬として貢献できる医学のみならず、味覚を落とす高熱殺菌に代わる腐敗菌増殖防止法として、あるいは養殖魚や植物の感染症治療など産業界での貢献も期待されている。抗生物質は目的細菌以外に、人にとって有用な常在細菌も殺してしまう可能性がある。抗生物質に比べて、ファージ療法は標的細菌のみに感染するため患者への副作用や環境破壊の効果が低いという利点をもつ。また比較的安価に調製できることも利点である。しかし、応用研究への試みは、新たに解決されなければならない問題を提示することになった。バクテリアはファージに対する様々な防御機構を備えているため、その防御機構を破って増殖できるファージは限定される。また、ファージが増殖するためには特有の宿主との特異的な生物学的相互作用が必須であることから、応用に有効なファージを得るのは簡単ではない。現状では、天然から得られるファージを手当たり次第に試してみるしかないのである。偶然にまかせるこのやり方は、多大な時間と労力を要するため非効率といわざるを得ない。また、結果として有効なファージが手

に入るとい保証もない。仮に、手に入ったとしても未知といえるファージを人体に用いるためには入念な安全性チェックが要求される。

ファージの中で最も良く調べられてきたのはT4ファージである。T4ファージは図1のような構造をとっており、DNAを収納する頭部、それに結合した尾部(尾鞘+尾部基盤)、尾部基盤に接続した尾線維からなる。感染時には、頭部に収められていたDNA分子は尾部の内部にある管を通して細菌に注入される。これが子ファージ生産過程の開始となる。T4のDNAは171 kbであり、約300個の遺伝子をもつが、ファージの増殖に必須の遺伝子は60余りにすぎない。残りの遺伝子は、ファージ増殖効率を高めるために貢献しており、そのおかげで大型のファージであるにも関わらず30分で100~200個の子ファージを放出するという、他のファージに類をみないほど高い増殖能を示す。また、これまでに発見されている制限酵素等による宿主の防御機構をT4ファージはことごとく無力化する仕組みをもっている。このような優れた性質から、T4ファージはファージ療法には最適なツールとなり得ると考えられるが、それを阻むのが宿主特異性である。

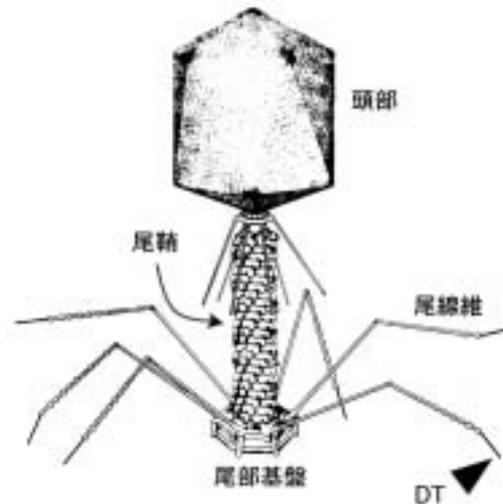


図1 T4ファージの構造(文献3より改変)

細菌表層に存在し、ファージ吸着のリセプターとなる分子は、膜蛋白質あるいはLPS(リン脂質と多糖類の高分子複合体)である。細菌とファージの攻防は30億年前から始まったと推測されており、細菌はファージの感染を免れるためにリセプター分子を頻繁に変異させてきたようである。細菌への吸

着に必須なファージ尾線維の先端 (DT、図1) もそのようなリセプター分子に親和性をもつように変異を重ねてきた結果、ファージの感染可能な宿主域は極めて狭い、言い換えれば宿主特異性は極めて高い。例えば、T4ファージは大腸菌 K12 型や B 型には感染できるが O 型には感染できない。また、同じ腸内細菌科に属する近縁種の中では志賀赤痢菌のいくつかの亜株に感染可能であるが、他の亜株や種の異なるサルモネラやペスト菌には感染できない。

宿主域を決定する第一要因は尾線維の先端 (DT) である。DT は細菌の細胞表層にあるリセプター分子と結合することにより感染の第 1 段階である吸着を開始するのである。DT は 1026 アミノ酸から成る遺伝子 37 蛋白質の C 末側 140 アミノ酸に対応している。宿主域の異なる T4 ファージファミリーの解析から、宿主域の変化は DT のアミノ酸配列の変化に由来することが判明しているため、筆者等はこの領域をランダムに変異させたライブラリーを作成して T4 ファージにもたせることを計画している (図 2)。様々な変異をもった遺伝子 37 を有する T4 ファージのライブラリーを作成しておき、退治したい細菌を標的にできる変異型 T4 ファージをそのライブラリーから選び出して治療に用いることができれば、天然から探索する手間を省き、なおかつ安全性が保証できるツールとなり得ると期待している。

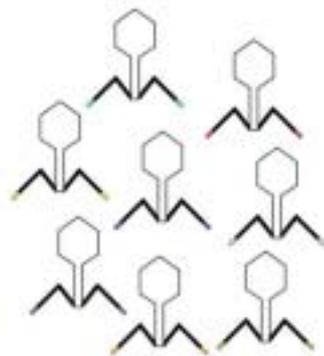


図2 DTのアミノ酸配列を様々に変化させた T4 ファージライブラリー (便宜上、尾線維は2本のみ表示した)

3. 地球上最大のバイオマスとしてのファージ、 遺伝子水平伝搬役としてのファージ⁴⁾

食物連鎖の最下位に位置する細菌の個体密度を測定すると、栄養、温度、塩濃度などの環境要因から推定される値の 1/100 程度しか存在しないことが明

らかとなり、その原因としてファージの感染が疑われるようになった。自然界に存在するファージ濃度を測定したところ、想像を超えた莫大な個体数が見積もられる結果となった (海水圏では $10^7 \sim 10^8$ /ml、総数で 10^{31})。この結果が意味するものは、天文学的数字 (地球上で 10^{25} 回 / 秒) で表わされるほどの混合感染の機会があること、そのために極めて低頻度でしか起きないが故に他の生き物では現実には起こりえないと考えられる非相同組換えがファージのゲノム再編には貢献することである。非相同組換えは関連性のない塩基配列を繋げることになるため、ファージの世界では新しい遺伝子の創出が可能となっている。

ファージには、宿主を必ず殺して増殖するビルテントファージとファージとしては増殖せずに DNA を宿主の DNA に挿入して共存 (溶原化) を図ることも可能なテンプレートファージが存在する (図 3)。溶原化したファージ (プロファージ) は何らかのきっかけがあれば宿主 DNA から飛び出して、ファージとして増殖する過程に入る (誘発) ことも可能であるが、宿主と共存する時間が長くなるにつれ、突然変異が蓄積してもはやファージとして増殖する能力を失い、残された遺伝子は宿主に新しい遺伝子源を供給することになる。

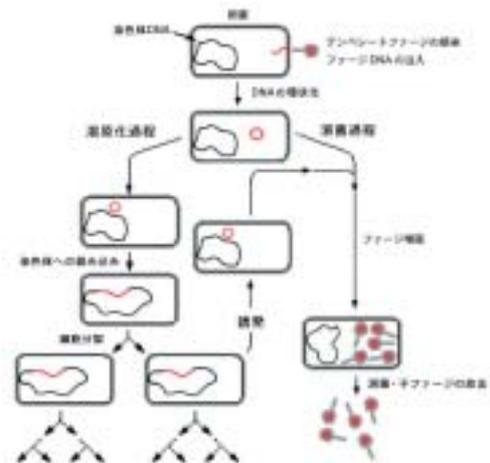


図3 テンプレートファージの溶原化と溶菌過程 (文献 4 より改変)

細菌の染色体に組み込まれたプロファージは多くの遺伝子について発現を停止することによって増殖過程 (溶菌過程) には入らず、宿主の分裂に伴って数を増やす。

細菌ゲノムに認められる著しい多様化は外来性遺伝子の水平伝播に由来する。溶原化は細菌の病原性

アイランド、共生窒素固定能、難分解化合物分解能に関わる遺伝子などを水平伝搬する立役者であり、細菌の多様化を促進する大きな要因である。例えば、大腸菌 K12 株と O157 株のゲノムサイズはそれぞれ 4.6 Mb と 5.5 Mb であり、その内 4.1 Mb の配列については高い相同性を示すが、残りはそれぞれの株に特異的な配列としてゲノム上の様々な領域に散在している。O157 株特異的配列の内 0.9 Mb は 24 個の

溶原化したファージ DNA が占めている。これらのファージ DNA にはベロ毒素遺伝子など病原性に関わるものが多数含まれている。ファージ関連の遺伝子には変異を重ねた結果、異なる機能をコードする遺伝子に変化してしまい元の遺伝子が推定しにくくなったものが多いと考えられている。最近、このようなケースでも元の遺伝子と対応できる興味深い例が報告された⁵⁾。病原菌が毒素等を細胞外に輸送するためには、T1SS ~ T6SS と呼ばれるタンパク輸送系が使われている。その内、T6SS について図 4 に示したように、ファージの尾部とそっくりな構造をとっていることから進化上共通な祖先に由来すると考えられている。ファージによる遺伝子の水平伝搬の後、細菌が進化によって新しい機能を獲得したことが推定できる例である。

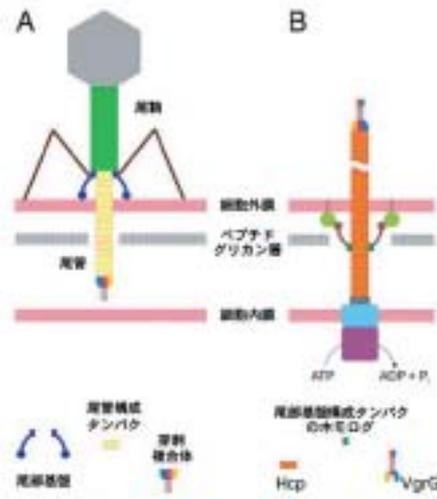


図4 T4 ファージ尾管と T6SS の構造的類似性 (文献 5 より改変)

T4 ファージの尾部は 2 重の管となっており、感染時には外側に存在する尾鞘が縮むことにより内側の尾管が露出する。尾管の先端に位置する穿刺複合体が細胞内膜やペプチドグリカン層を突き破る。VgrG と穿刺複合体のアミノ酸配列相同性は 13% と低いものの VgrG の N 末側の立体構造は穿刺複合体のそれと酷似している。また、Hcp の六量体リング構造は穿刺複合体を構成する T4 の遺伝子 27 タンパク質の三量体リング構造と酷似している上に、T4 とは異なったタイプのファージである の尾部構成タンパク質に立体構造が酷似している。さらに、T6SS の構成成分の 2 つは T4 の尾部基盤や尾管を構成するタンパク質に高いアミノ酸配列相同性を示す。

参考文献

- 1) トーマス・ホイラー (長野敬・太田英彦 訳)「ファージ療法とは何か」青土社 (2008)
- 2) 皆川貞一「T 系ファージ」東京大学出版会 (1991)
- 3) Karam, J.D.(editor-in-chief) “Molecular biology of bacteriophage T4” American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1994)
- 4) 米崎哲朗「原核生物の遺伝要素：バクテリオファージ」分子生物学イラストレイテッド改訂第 3 版、p.83-86、羊土社 (2009)
- 5) Shuji Kanamaru “Structural similarity of tailed phages and pathogenic bacterial secretion systems” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 4067 - 4068 (2009)