

# 博士論文

ボツリヌス菌における蛍光タンパク質発現系の構築

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科

(指導教員 細菌学 藤永由佳子教授)

1928062017

齋藤 和輝

# 目 次

要旨 .....	3
1. 諸言 .....	4
2. 材料と方法 .....	4
3. 結果 .....	6
4. 考察 .....	8
5. 結語 .....	8
6. 謝辞 .....	8
7. 引用文献 .....	9
8. 図表 .....	10

## 1. 要旨(1,000字以上)

ボツリヌス菌における蛍光タンパク質発現系の構築

研究分野 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 医学専攻細菌学

氏名 齋藤 和輝

(主任教員 藤永 由佳子 教授)

ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) は、ボツリヌス神経毒素 (botulinum neurotoxin: BoNT) を産生してボツリヌス症を引き起こす。ボツリヌス症は全身に神経麻痺を生じ、高い致死率を示す。ヒトにおけるボツリヌス症の主な病型の一つとして、乳児ボツリヌス症を含む腸管ボツリヌス症がある。ボツリヌス菌芽胞が経口的に摂取され、腸管内で発芽増殖したのちに、産生された神経毒素が腸管ボツリヌス症を引き起こす。健康な成人の成熟した腸内細菌叢は、ボツリヌス菌の定着・増殖に対して防御的に働き感染を阻止することが知られている。一方で、腸内細菌叢が未熟な乳児または抗生物質により細菌叢を攪乱したマウスでは、ボツリヌス菌が感染し、盲腸や大腸でボツリヌス菌が増殖・定着することが知られている。しかしながら、ボツリヌス症の発症において、腸管内におけるボツリヌス菌の動態および発芽・増殖機構は不明である。これらを明らかにするためには、ボツリヌス菌感染時から発症までにおける腸管内での局在を明らかにする必要があるが、ボツリヌス菌を可視化する技術は未だ確立されていない。そこで本研究では、ボツリヌス菌 62A 株に mCherry 発現プラスミドを遺伝子導入し、可視化のツールとして蛍光タンパク質発現株を作製した。Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法では芽胞が可視化し難い一方で、mCherry タンパク質発現株は、芽胞および栄養菌体どちらの状態においても赤色蛍光を呈した。そして、発芽途中の状態にある芽胞と栄養菌体の中間体も同様に赤色蛍光を呈した。mCherry タンパク質発現株は、ボツリヌス菌の生活環における様々な状態を可視化できることが考えられた。さらに、mCherry タンパク質発現株は、FISH 法を組み合わせることで芽胞および発芽した栄養菌体を判別できることが示された。また、*in vitro* での培養条件において、mCherry タンパク質発現はボツリヌス菌の増殖および毒素産生に影響を与えないことを明らかにした。ボツリヌス菌に適したレプリコンを有する発現ベクターを利用することで、抗生物質による選択圧がない *in vitro* における培養条件でも、少なくとも3回の継代では、プラスミドは安定的に保持されることを明らかにした。

以上より、本研究はボツリヌス菌の感染動態を解明するための有用なツールを提供する。

## 1 諸言

ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)は、グラム陽性の偏性嫌気性桿菌であり、ボツリヌス神経毒素(botulinum neurotoxin, BoNT)を産生する。BoNTは、抗原性の違いからA-G型の7種類の血清型に分類される[1]。このうち、主に血清型A、B、EおよびF型がヒトにおいて全身性の麻痺症状を呈するボツリヌス症を引き起こし、CおよびD型は家畜などの動物にボツリヌス症を引き起こす。G型BoNTとボツリヌス症の関連は不明である[1]。また、*Clostridium butyricum*および*Clostridium baratii*はそれぞれE型およびF型BoNTを産生することが知られており、これらもボツリヌス症を引き起こす原因となる[1]。ヒトにおけるボツリヌス症の主な病型の一つとして乳児ボツリヌス症を含む腸管ボツリヌス症がある。腸管ボツリヌス症では、経口的に摂取された本菌芽胞が腸管内で発芽し増殖・定着する。腸管内で産生されたBoNTにより弛緩性麻痺が引き起こされる。健康な成人の成熟した腸内細菌叢はボツリヌス菌の定着・増殖に対して防御的に働き感染を阻止することが知られている[2]。一方で、腸内細菌叢が未熟な乳児または抗生物質により細菌叢を攪乱したマウスではボツリヌス菌が感染し、盲腸や大腸で菌が増殖・定着することが知られている[2,3]。

*Bacillus*属や*Clostridium*属細菌は、増殖に必要な栄養素が枯渇した培養条件の悪い環境において芽胞とよばれる休眠型細胞を形成する。芽胞は、熱、乾燥、化学物質等の環境ストレスに強い耐性を示す。生育に適した環境になると芽胞は発芽し、栄養型細胞(栄養菌体)として増殖を始める(図1)。腸管ボツリヌス症では、ボツリヌス菌芽胞は盲腸または大腸で増殖すると考えられている[4]。発芽はボツリヌス菌の感染において必須であるが、腸管内におけるボツリヌス菌の動態および発芽・増殖機構は不明である。腸管内のボツリヌス菌を可視化し、感染時から発症までにおける腸管局在を明らかにすることが重要であるが、ボツリヌス菌芽胞を可視化する技術は未だ確立されていない。本研究では、ボツリヌス菌の蛍光タンパク質発現株を作製することによって芽胞の簡易的な検出を可能にした。また、蛍光タンパク質発現株と *fluorescent in situ hybridization* (FISH)法を組み合わせることで芽胞、発芽途中の菌体および栄養菌体のそれぞれの状態を判別することが可能であることを示した。

## 2 材料と方法

### 2.1 菌株,培地および培養条件

*Clostridium botulinum* 62A (A型BoNT産生菌)[5]を全ての実験に用いた。62Aの培養にはTPGY (tryptone peptone glucose yeast) 5% Difco™ Tryptone Peptone (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)、0.5% Bacto™ Peptone (Thermo Fisher Scientific)、0.5% Yeast Extract (Merck, Darmstadt, DEU)、0.1% グルコース (富士フィルム和光純薬)、0.1%チオグリコール酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬)液体培地、またはTPGY寒天培地 (1.5% Agar (富士フィルム和光純薬))を用いた。嫌気チャンバー (BAKER, Sanford, USA)を用いて、37°Cにて嫌気培養した。全ての実験は、厚生労働省および金沢大学微生物等安全管理委員会の承認を得て実施した。

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ およびCA434[6]は、それぞれプラスミド増幅および接合伝達に用いた。LB液体または寒天培地 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)を用いて37°C、好気条件下で培養した。

### 2.2 プラスミド構築

ボツリヌス菌におけるタンパク質発現に対してコドン最適化した*mCherry-opt*配列を合成した(ジェンスクリプトジャパン、東京)。合成した*mCherry-opt*遺伝子をテンプレートとして、5'側に*Nde*I認識配列、3'側に*Xho*I認識配列をそれぞれ付与するよう設計した*mCherry-opt*配列特異的なプライマーを用いてPCRを行った。増幅した*mCherry-opt*遺伝子は制限酵素*Nde*Iと*Xho*Iで処理したpMTL82153[7]およびGibson Assembly Master Mix (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, USA)と混合し、50°C、30分静置してpMTL82153に*mCherry-opt*配列を挿入した。同様に、制限酵素*Bam*HI/*Xho*Iで処理したpMTL83353[11]に

*mCherry-opt* 配列を挿入した。作製したプラスミドはサンガーシーケンスで塩基配列を確認した。

## 2.3 接合伝達による 62A への遺伝子導入

標準プロトコールに準じて遺伝子導入を行った[6][8]。CA434 コンピテントセルと作製し、pMTL82153-*mCherry-opt* および pMTL83353-*mCherry-opt* をそれぞれ混合して 42°C、50 秒静置し、CA434 に pMTL82153-*mCherry-opt* および pMTL83353-*mCherry-opt* をそれぞれ遺伝子導入した。CA434 pMTL82153-*mCherry-opt* および CA434 pMTL83353-*mCherry-opt* をそれぞれ LB 液体培地 [クロラムフェニコール (chloramphenicol, Cm) 30 µg/ml または スペクチノマイシン (spectinomycin, Sp) 600 µg/ml] にて一晩培養した。この培養液 1 ml と、62A を TPGY 液体培地にて一晩培養した培養液 200 µl をそれぞれ混合し、TPGY 寒天培地 [チアンフェニコール (thiamphenicol, Tm) 15 µg/ml または Sp 600 µg/ml、サイクロセリン (cycloserine, Cs) 250 µg/ml] に塗布した。これを 37°C、2 日間嫌気条件下で静置培養した。

## 2.4 FISH

芽胞と栄養菌体を含む 62A 野生型 (wild type, WT) および 62A pMTL82153-*mCherry-opt* を、PBS(-) pH 7.4 で洗浄し、4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA) (Thermo Fisher Scientific) に菌体を懸濁して室温、15 分静置した。菌体を PBS(-) pH 7.4 で 3 回洗浄し、lysozyme (終濃度 2 mg/ml) と混合して室温、30 分静置した。菌体を PBS(-) pH 7.4 で 3 回洗浄し、hybridization buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, 20% HiDi formamide (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), Eub338-FITC (GCTGCCTCCCGTAGGAGT-FITC) または *C. botulinum* 16S rRNA specific-TAMRA (CCCTATCTCTAGGCTATGCAAGGG-TAMRA)) と混合して 46°C、6 時間静置した。菌体を wash buffer (20 mM Tris [pH 7.5], 215 mM NaCl, 5 mM EDTA) で洗浄し、Frame-Seal™ Incubation Chambers (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) スライドガラスに滴下した。オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X810 (キーエンス、大阪) を用いて、油浸レンズにて蛍光観察した。取得した画像は、BZ-X800 analyzer を用いて解析した。

## 2.5 *mCherry* タンパク質の蛍光観察

62A WT および 62A pMTL82153-*mCherry-opt* をそれぞれ TPGY 液体培地 (Tm: 15 µg/ml, WT は Tm なし) にて 37°C、一晩嫌気条件下で静置培養した。8,000×g、5 分、4°C 遠心し、上清を除去した。PBS(-) pH 7.4 で菌体を洗浄し、4% PFA に菌体を懸濁して室温、15 分静置した。菌体を PBS(-) pH 7.4 で 3 回洗浄し、室温、2 時間遮光条件下で静置した。菌液と蛍光染色用封入剤 (vectashield mounting medium with DAPI) (Vector Laboratory, Newark, USA) を混合し、Frame-Seal™ Incubation Chambers スライドガラスに滴下した。FISH と同様の操作方法で蛍光観察および解析を行った。

## 2.6 増殖試験

62A WT および 62A pMTL82153-*mCherry-opt* をそれぞれ TPGY 液体培地 3 ml に植菌し、37°C、一晩嫌気条件下で静置培養した。新たな TPGY 液体培地 4 ml に 600 nm の濁度 (OD<sub>600</sub>) が 0.01 となるよう前培養液を添加し、37°C、嫌気条件下で静置培養した。培養開始から 2、4、6、12 および 24 時間後の菌液を回収し、TPGY 液体培地で 2 倍希釈して超微量紫外可視分光光度計 (Nano Drop) (Thermo Fisher Scientific) を用いて OD<sub>600</sub> を測定した。

62A WT および 62A pMTL82153-*mCherry-opt* 芽胞をそれぞれ TPGY 液体培地 4 ml に 10<sup>6</sup> spores となるよう添加し、37°C、嫌気条件下で静置培養した。培養開始から 2、4、6、12 および 24 時間の菌液を回収し、TPGY 液体培地で 2 倍希釈して Nano Drop を用いて OD<sub>600</sub> を測定した。

## 2.7 ウェスタンブロット解析

62A WT および 62A pMTL82153-*mCherry-opt* をそれぞれ TPGY 液体培地に植菌し、37°C、一晩嫌気条件下で静置培養した。前培養液をそれぞれ新たな TPGY 液体培地に OD<sub>600</sub> が 0.01 となるよう添加し、37°C、24 時間嫌気条件下で静置培養した。8,000×g、5 分間、4°C 遠心し、上清を除去した。残った菌

体を B-PER 試薬 (Complete Bacterial Protein Extraction Reagent) (Thermo Fisher Scientific) に懸濁して室温、30 分静置した。95°C、5 分静置したのち、電気泳動して poly vinylidene dene fluoride (PVDF) メンブレンに転写した (Bio-Rad Laboratories)。5% スキムミルク (雪印メグミルク、東京) でブロッキングしたのち、抗 BoNT ポリクローナル抗体または抗 mCherry ポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, UK) と反応させた。次いで、HRP 標識抗ウサギ IgG と反応させ、ECL-select (Cytiva, San Francisco) および LAS4000 mini (Cytiva, San Francisco) を用いてメンブレンの化学発光を検出した。

## 2.8 液体培養時におけるプラスミド保持率

Umeda らの実験手法 [9] に準じて操作を行った。継代数は、以下の通り P0-P3 とそれぞれ示した。62A pMTL82153-mCherry-opt または 62A pMTL83353-mCherry-opt を TPGY 液体培地 (Tm または Sp) に植菌し、37°C、一晚嫌気条件下で静置培養した (P0)。TPGY 液体培地または Cooked Meat 液体培地 (OXOID, Hampshire, UK) に前培養液 1.0 µl をそれぞれ添加し、37°C、24 時間嫌気条件下で静置培養した (P1)。P1 培養液を希釈し、TPGY 寒天培地に塗布して 37°C、一晚嫌気条件下で静置培養した。生育したコロニーを用いてコロニー PCR を行った。この一連の工程を、P3 となるまで繰り返した。

## 2.9 芽胞の精製

62A pMTL82153-mCherry-opt を TPGY 液体培地 (Tm: 15 µg/ml) 3 ml に植菌し、37°C、一晚嫌気条件下で静置培養した。変法 gifu anaerobic medium (GAM) 寒天培地 (日水製薬, 東京) (Tm: 15 µg/ml) に前培養液を塗布し、37°C、一週間嫌気条件下で静置培養した。寒天培地に生育したコロニーを氷冷した滅菌水で懸濁して回収し、8,000×g、5 分、4°C 遠心して上清を除去した。新たな滅菌水 10 ml を添加して 4°C、一晚好気条件下で静置した。8,000×g、6,000×g、4,000×g、3,000×g および 2,000×g にてそれぞれ 10 分、4°C 遠心し、菌体を洗浄した。3,000×g および 2,000×g においては、それぞれ 3 回ずつ遠心した。20% gastrografin (バイエル薬品、大阪) 5 ml を懸濁し、50% gastrografin 15 ml を下層して 10,000×g、30 分、4°C 遠心した。上清を除去し、2,000×g、10 分、4°C で 3 回遠心した。滅菌水 2 ml に菌体を懸濁し、80°C、20 分加熱した。芽胞懸濁液の一部を TPGY 寒天培地に塗布して 37°C、2 日間嫌気条件下で静置培養した。生育したコロニーについて mCherry-opt 遺伝子を検出する PCR を行い、生育したコロニーの pMTL82153-mCherry-opt 保有率を調べた。

# 3 結果

## 3.1 FISH によるボツリヌス菌 62A 栄養菌体および芽胞の検出

蛍光プローブ Eub338-FITC および 16S rRNA-specific-TAMRA を用いた染色により、probe(-) との差分から、栄養菌体において緑色蛍光および赤色蛍光がそれぞれ検出された (図2)。一方、芽胞においては、Eub338-FITC においてのみわずかに緑色蛍光が検出された (図2)。芽胞は、リゾチーム処理のみでは透過処理されないため標準プロトコールの FISH 法では可視化し難いと考えられる。

## 3.2 自家蛍光と蛍光タンパク質の選択

62A WT 菌体では緑色および青色フィルターにおいて自家蛍光が検出された (図3A)。一方で、赤色フィルターではほとんど自家蛍光が検出されなかったことから (図3A)、赤色蛍光を呈する mCherry が使用する蛍光タンパク質として適していると考えられる。

## 3.3 mCherry タンパク質の発現

pMTL82153-mCherry-opt 導入株 (62A pMTL82153-mCherry-opt) は栄養菌体および芽胞のどちらも赤色蛍光を呈し (図3B)、ウェスタンブロット解析で mCherry の分子量である 27 kDa 付近にバンドが検出された (図3C)。以上より、62A pMTL82153-mCherry-opt は mCherry タンパク質を適切に発現していることが

示された。

#### 3.4 mCherry タンパク質発現株の発芽・増殖および毒素産生

62A WT および 62A pMTL82153-mCherry-opt は、栄養菌体を植菌した後に培養 2、4、12 および 24 時間で同等の OD<sub>600</sub> であった(図4A)。また、精製芽胞を植菌した場合も同様の結果であった(図4B)。また、62A WT および 62A pMTL82153-mCherry-opt の培養液をウェスタンブロット解析した結果、同様に BoNT タンパク質が検出された(図4C)。以上より、mCherry 発現は、少なくとも *in vitro* における培養において、ボツリヌス菌の増殖および BoNT タンパク質産生に影響を与えないことが示された。

#### 3.5 栄養菌体のプラスミド保持

TPGY 液体培地を用いた継代培養では、pMTL82153-mCherry-opt は P0、P1、P2 および P3 においてコロニーの 100%±0% (平均値±標準偏差, 3回の独立した実験から取得したデータより算出した) (P0、P1、P2 および P3 それぞれにおいて 1 回目 100%、2 回目 100%、3 回目 100%) で、pMTL83353-mCherry-opt は P0、P1、P2 および P3 においてコロニーのそれぞれ 100%±0% (1 回目 100%、2 回目 100%、3 回目 100%)、36.7%±12.6% (1 回目 25.0%、2 回目 35.0%、3 回目 50.0%)、26.7%±16.1% (1 回目 15.0%、2 回目 45.0%、3 回目 20.0%) および 20.0%±15.0% (1 回目 5.0%、2 回目 20.0%、3 回目 35.0%) で mCherry-opt 遺伝子が検出された(図5A、B)。Cooked Meat 液体培地を用いた継代培養では、pMTL82153-mCherry-opt は P1、P2 および P3 においてコロニーのそれぞれ 98.3%±2.9% (1 回目 100%、2 回目 95.0%、3 回目 100%)、100%±0% (1 回目 100%、2 回目 100%、3 回目 100%) および 100%±0% (1 回目 100%、2 回目 100%、3 回目 100%) で、pMTL83353-mCherry-opt は P1、P2 および P3 においてコロニーのそれぞれ 60.0%±5.0% (1 回目 60.0%、2 回目 55.0%、3 回目 65.0%)、53.3±15.3% (1 回目 70.0%、2 回目 50.0%、3 回目 40.0%) および 36.7%±15.3% (1 回目 50.0%、2 回目 40.0%、3 回目 20.0%) で mCherry-opt 遺伝子が検出された(図5C、D)。以上より、pMTL82153 は抗生物質による選択圧がない条件下でも 62A 菌体内で安定的に保持される一方で、pMTL83353 は脱落しやすいことが明らかになった。

#### 3.6 芽胞のプラスミド保持

腸管ボツリヌス症では、ボツリヌス菌芽胞が腸管で発芽し増殖・定着する。芽胞形成および発芽がプラスミド保持に与える影響を調べた。62A pMTL82153-mCherry-opt の精製芽胞を TPGY 寒天培地で培養した結果、生育したコロニーの 98.3%±2.9% (平均値±標準偏差, 3回の独立した実験から取得したデータより算出した) (1 回目 95.0%、2 回目 100%、3 回目 100%) で mCherry-opt 遺伝子が検出された(図5E、F)。栄養菌体の増殖時と同様に、芽胞の形成および発芽においても pMTL82153 は安定的に保持されることが明らかになった。

#### 3.7 mCherry と FISH 法を用いた芽胞と栄養菌体の染色

mCherry 発現株では芽胞と発芽した栄養菌体のどちらも赤色蛍光を呈する(図3B、図6)。一方で、FISH 法では栄養菌体は染色されるが芽胞はほとんど染色されない(図2)。これらの結果から、mCherry 発現株と FISH 法を組み合わせることにより芽胞と栄養菌体を判別できると考えた。この考えを検証するため、62A pMTL82153-mCherry-opt の精製芽胞と栄養菌体の混合液を調製し、FITC 標識プローブを用いた FISH 法で染色した。その結果、芽胞は赤色蛍光のみを呈した一方で、栄養菌体は赤色蛍光と緑色蛍光を呈した(図7)。本手法を用いることで、感染時の腸管のような条件下でもボツリヌス菌が芽胞または栄養菌体のどちらの状態が存在しているのかを可視化できることが示唆された。

## 4 考察

本蛍光タンパク質発現系の構築には、*Clostridium-E. coli* シャトルベクター[11]を用いた。レプリコンと宿主の親和性を検討することで、栄養菌体および芽胞いずれの状態においても、*in vitro*における培養条件において高いプラスミド保持率を示す mCherry タンパク質発現株を取得した(図5)。pMIL82153 は *C. botulinum* NCTC 2916 株が保有する pBP1 プラスミド由来のレプリコンを有し、pMIL83353 は *Clostridium butyricum* が保有する pCB102 プラスミド由来のレプリコンを有する[7]。62A における pMIL82153 の高いプラスミド保持率はレプリコンの高い親和性に起因すると考えられる。これまでは、安定的な蛍光タンパク質発現のため、蛍光タンパク質をコードした遺伝子を染色体上に挿入し、蛍光タンパク質発現株を作製する手法が報告されてきた[10-12]。本研究において、発現プラスミドが安定的に保持されたことから、より簡便な方法でボツリヌス菌の可視化が可能となった。

FISH 法は、蛍光標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いて細胞中の標的遺伝子を検出する手法であり、迅速で特異性に優れるため動物細胞の遺伝子発現解析や微生物群集構造解析などで広く利用される[13,14]。細菌に対する FISH 法は、リゾチームなどの細胞壁分解酵素で透過処理し FISH プローブを菌細胞内に浸透させる。芽胞は芽胞原形質(Core)が皮層(Cortex)および芽胞殻(Coat)によって覆われており、栄養菌体とは異なる構造をもつ。そのため、リゾチーム処理だけでは芽胞は透過処理されないため FISH 法により検出されない(図2)[15]。本研究では、ボツリヌス菌の蛍光タンパク質発現株を作製し、栄養菌体および芽胞のどちらも mCherry の赤色蛍光を呈することを示した(図3B)。*Bacillus anthracis* では、栄養菌体の細胞質に発現した緑色蛍光タンパク質(green fluorescent protein, GFP)が芽胞形成時に Core 内に取り込まれることが知られている[16]。ボツリヌス菌でも同様に栄養菌体の細胞質内に発現した mCherry が芽胞形成時に芽胞内へ取り込まれていると考えられる。加えて、mCherry 発現株を栄養菌体のみを染色する FISH 法と組み合わせることによってボツリヌス菌芽胞と栄養菌体をそれぞれ検出可能であることを示した(図7)。今後、マウス感染モデルにおいて本手法を用いることで、ボツリヌス菌芽胞の腸管内の動態および発芽・増殖の過程を可視化し、腸管ボツリヌス症における感染機構を解明するための一助になることが期待される。

## 5 結語

本研究では、ボツリヌス菌の mCherry 発現株を作製し FISH 法と組み合わせることで栄養菌体、芽胞および発芽途中の菌体を別々に検出可能であることを示した。また、ボツリヌス菌において mCherry 発現プラスミド(pMIL82153-mCherry-opt)は安定的に保持され、増殖および毒素産生に影響を与えないことを明らかにした。本研究はボツリヌス菌の感染動態を解明するための有用なツールを提供する。

## 6 謝辞

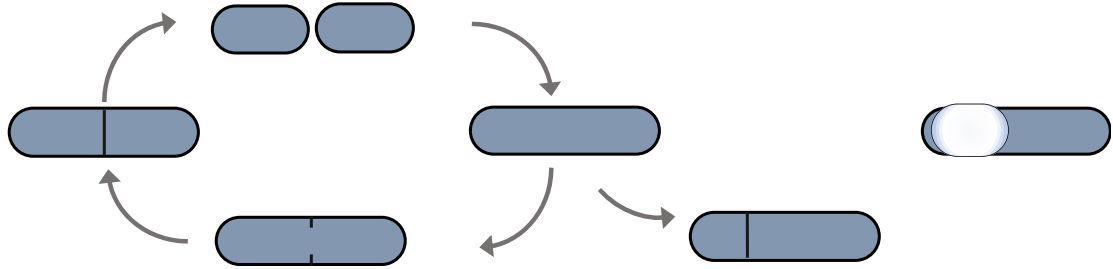
稿を終えるに臨み、御指導と御校閲賜りました細菌学教室藤永由佳子教授に深甚の謝意を捧げるとともに、終始直接のご助言と多大なるご指導をいただきました阿松翔助教に深謝いたします。さらに、本研究の遂行に際し、多大なる御協力と御助言をいただきました細菌学教室の皆様へ深く御礼を申し上げます。



## 7 引用文献

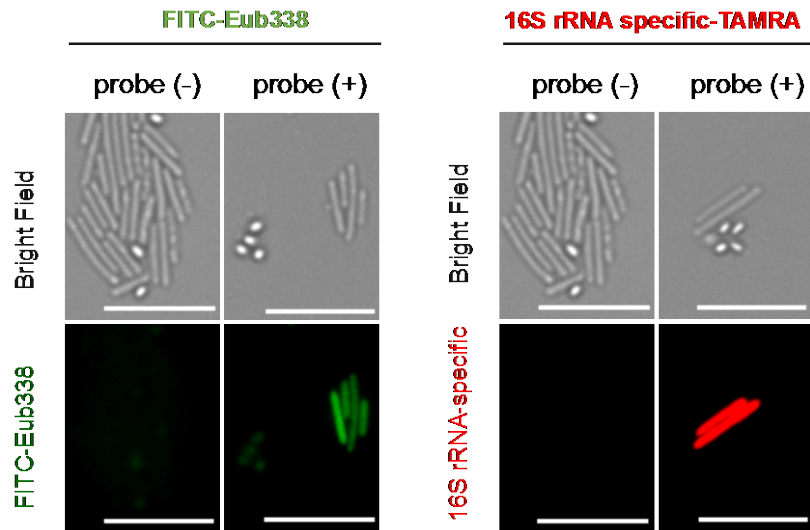
- [1] Collins MD, East AK. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J Appl Microbiol* 84(1):5-17, 1998
- [2] Wang Y, Sugiyama H. Botulism in metronidazole- treated conventional adult mice challenged orogastrically with spores of *Clostridium botulinum* type A or B. *Infect Immun* 46(3):715-719, 1984
- [3] Mills DC, Amon SS. The large intestine as the site of *Clostridium botulinum* colonization in human infant botulism. *J Infect Dis* 156(6):997-998, 1987
- [4] Burr DH and Sugiyama H. Susceptibility to enteric botulinum colonization of antibiotic-treated adult mice. *Infect Immun* 36(1):103-106, 1982
- [5] Wentz TG, Yao K, Schill KM, Rukma Reddy N, Skinner GE, Morrissey TR, Wang Y, Muruvanda T, Manickam G, Pillai CA, Thirunavukkarasu N, Hoffmann M, Hammack TS, Brown EW, Allard MW, Sharm SK. Closed genome sequence of *Clostridium botulinum* strain CFSAN064329 (62A). *Genome Announc* 6(26): e00528-18, 2018
- [6] Purdy D, O'Keefe TA, Elmore M, Herbert M, McLeod A, Bokori-Brown M, Ostrowski A, Minton NP. Conjugative transfer of clostridial shuttle vectors from *Escherichia coli* to *Clostridium difficile* through circumvention of the restriction barrier. *Mol Microbiol* 46(2):439-452, 2002
- [7] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for *Clostridium* shuttle plasmids. *J Microbiol Methods*, 78(1):79-85, 2009
- [8] Woods C, Humphreys CM, Rodrigues RM, Ingle P, Rowe P, Henstra AM, Köpke M, Simpson SD, Winzer K, Minton NP. A novel conjugal donor strain for improved DNA transfer into *Clostridium* spp. *Anaerobe* 59:184-191, 2019
- [9] Umeda K, Seto Y, Kohda T, Mukamoto M, Kozaki S. Stability of toxigenicity in proteolytic *Clostridium botulinum* type B upon serial passage. *Microbiol Immunol* 56(5):338-341, 2012
- [10] Noonan AJC, Qiu Y, Ho JCH, Ocampo J, Vreugdenhil KA, Marr RA, Zhao Z, Yoshikuni Y, Hallam SJ. CRAGE-mediated insertion of fluorescent chromosomal markers for accurate and scalable measurement of co-culture dynamics in *Escherichia coli*. *Synth Biol (Oxf)* 5(1):ysaa015, 2020
- [11] Passaris I, Ghosh A, Cenens W, Michiels CW, Lammertyn J, Aertsen A. Isolation and validation of an endogenous fluorescent nucleoid reporter in *Salmonella Typhimurium*. *PloS One* 9(4):e93785, 2014
- [12] de Jong NW, van der Horst T, van Strijp JA, Nijland R. Fluorescent reporters for markerless genomic integration in *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 7:43889, 2017
- [13] Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Curr Opin Biotechnol* 12(3):231-236, 2001
- [14] Amann R, Fuchs BM. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* 6(5):339-348, 2008
- [15] Filion G, Laflamme C, Turgeon N, Ho J, Duchaine C. Permeabilization and hybridization protocols for rapid detection of *Bacillus* spores using fluorescence in situ hybridization. *J Microbiol Methods* 77(1):29-36, 2009
- [16] Brittingham KC, Ruthel G, Panchal RG, Fuller CL, Ribot WJ, Hoover TA, Young HA, Anderson AO, Bavari S. Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. *J Immunol* 174(9):5545-5552, 2005

8 図表



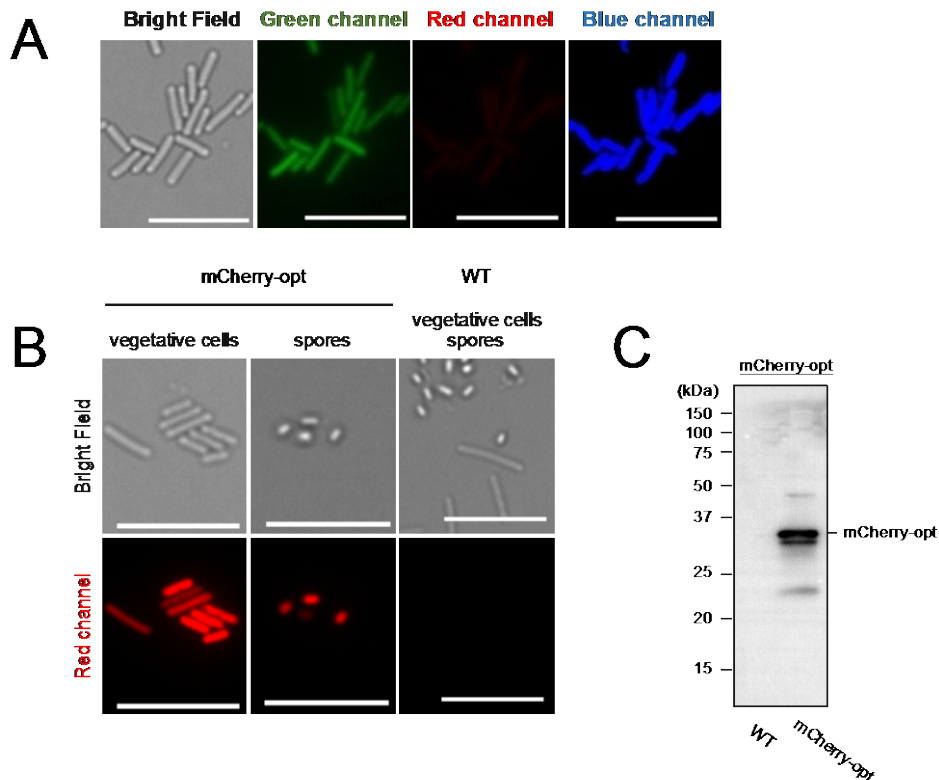
**Figure 1. 芽胞形成細菌 *C. botulinum* の生活環**

栄養菌体の状態においては、二分裂によって増殖する。悪い生育環境において芽胞を形成し、環境ストレスに対して耐える。生育に適した環境になると芽胞は発芽し、発芽後成育を経て栄養菌体として増殖を始める。



**Figure 2. FISH 法による栄養菌体および芽胞の検出**

上段は明視野観察の画像、下段は蛍光観察の画像をそれぞれ示す。3回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。スケール：10 $\mu$ m



**Figure 3. mCherry タンパク質発現による栄養菌体および芽胞の可視化**

(A) 62A WT の自家蛍光

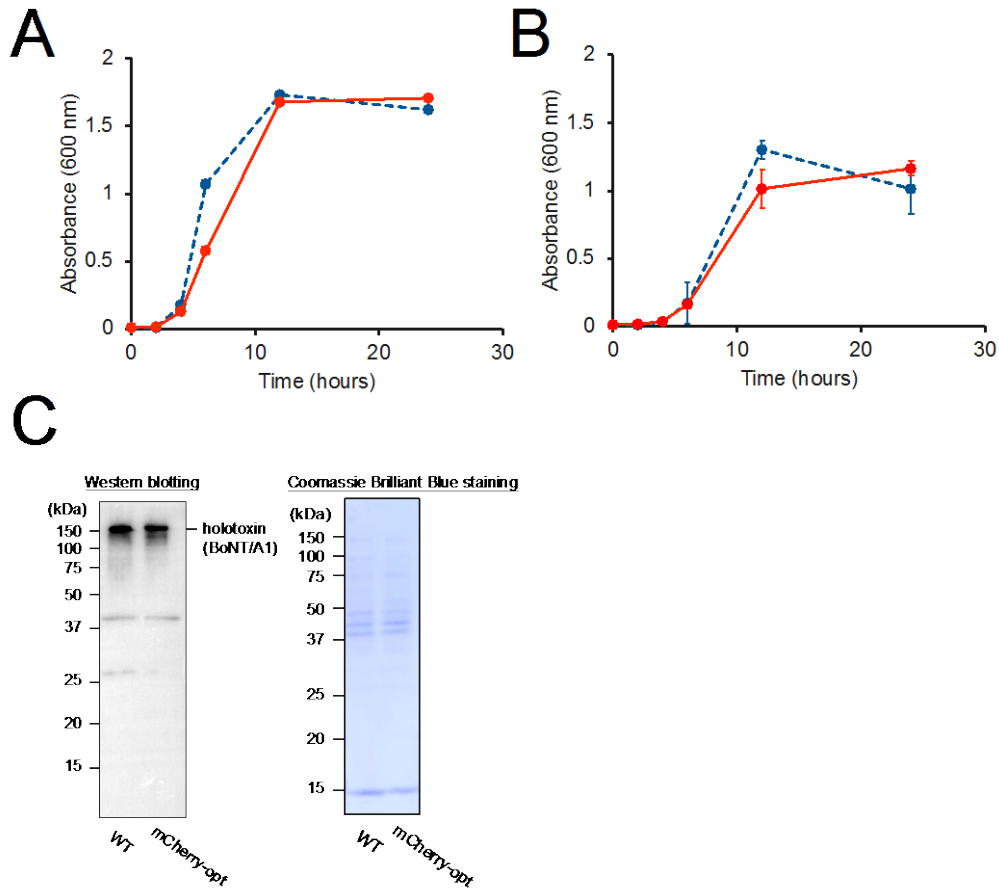
左端は明視野観察の画像であり、蛍光観察の画像と対応している。その他の画像はそれぞれ、緑色フィルター、赤色フィルターおよび青色フィルターを用いて蛍光観察を行った結果を示している。3回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。スケール：10 $\mu$ m

(B) 62A pMTL82153-mCherry-opt の蛍光観察

上段は明視野観察の画像、下段は蛍光観察の画像をそれぞれ示す。3回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。スケール：10 $\mu$ m

(C) mCherry タンパク質検出のウエスタンブロット

ウエスタンブロットには mCherry-opt 特異的なポリクローナル抗体を用いた。3回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。スケール：10 $\mu$ m



**Figure 4. mCherry タンパク質発現は、発現宿主の増殖およびBoNT/A1 タンパク質発現に影響を与えない**

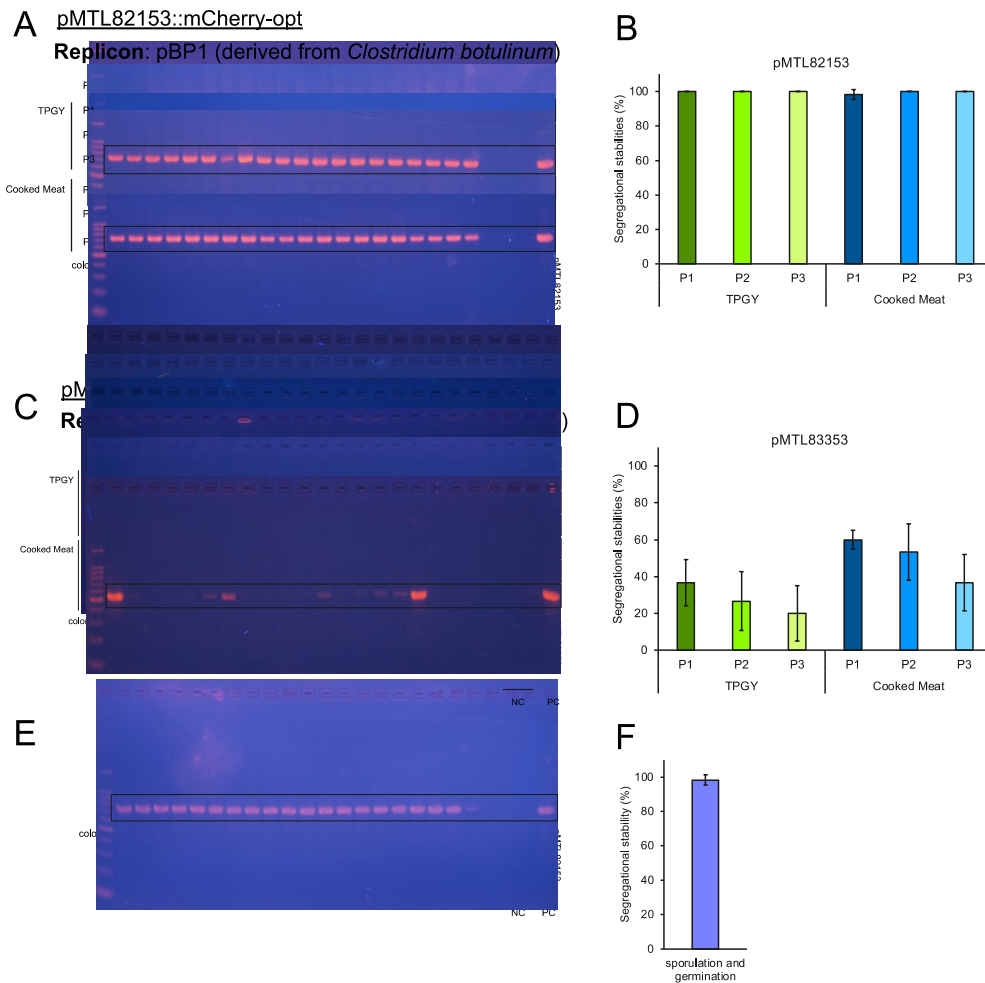
(A) 62A WT および 62A pMTL82153-mCherry-opt の増殖曲線

(B) 62A WT および 62A pMTL82153-mCherry-opt 芽胞の発芽後成育

破線は 62A WT、実線は 62A pMTL82153-mCherry-opt の増殖曲線をそれぞれ示す。実験は triplicate で行い、1 回の実験における平均 ± 標準偏差を示す。3 回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。

(C) BoNT/A1 タンパク質検出のウエスタンブロット

SDS-PAGE により細胞溶解液を分離し、CBB 染色するとともに PVDF メンブレンに転写した。ウエスタンブロットには、BoNT/A1 タンパク質に特異的なポリクローナル抗体を用いた。3 回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。



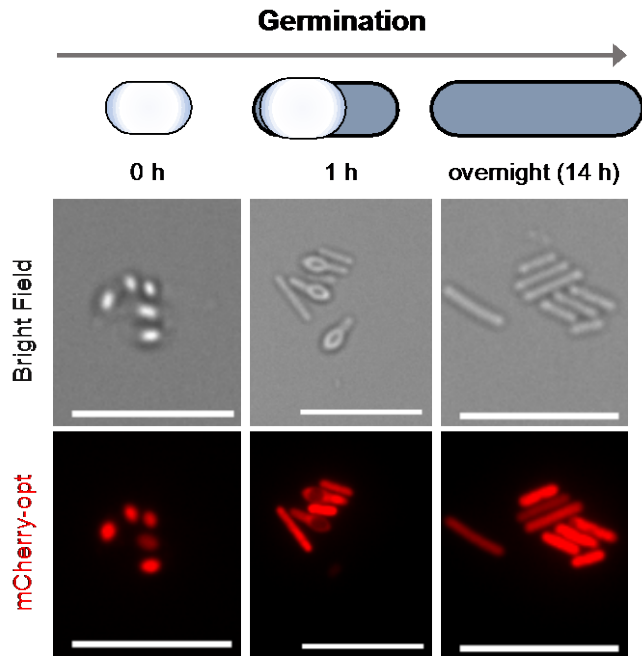
**Figure 5. pMTL82153-mCherry-opt は in vitro における培養において高頻度で保持される**

(A, B) 栄養菌体における pMTL82153-mCherry-opt の保持率

(C, D) 栄養菌体における pMTL83353-mCherry-opt の保持率

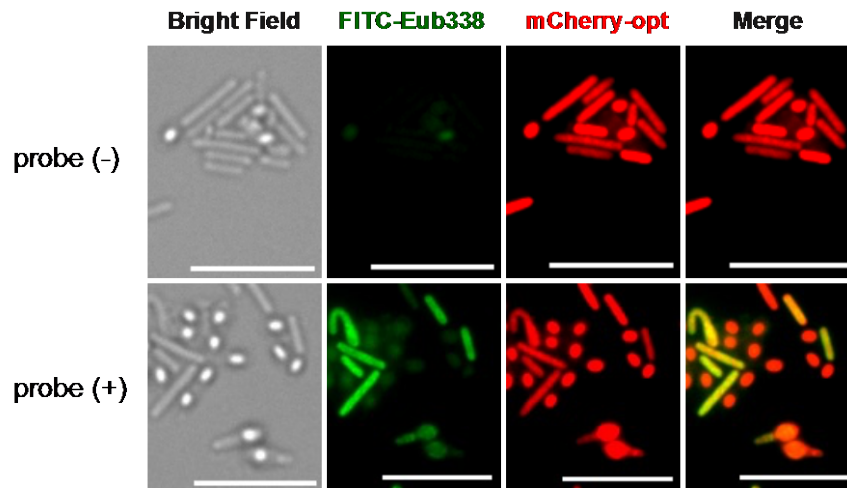
(E, F) 芽胞における pMTL82153-mCherry-opt の保持率

*mCherry-opt* 遺伝子検出の PCR において、ネガティブコントロールとして 62A WT ゲノム DNA をテンプレートに、またはテンプレートを含まない PCR を行った。ポジティブコントロールとして pMTL82153-mCherry-opt または pMTL83353-mCherry-opt をテンプレートに PCR を行った。(A, C および E) 1 回の実験における結果を示した。(B, D および F) 3 回の独立した実験から得られたデータより平均値 ± 標準偏差を算出して示した。  
P0-3 : 継代数



**Figure 6. 栄養菌体および芽胞の中間体の可視化**

芽胞の発芽の過程を蛍光観察した結果を示す。上段は明視野観察の画像、下段は蛍光観察の画像をそれぞれ示す。3回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。スケール：10 $\mu$ m



**Figure 7. mCherry と FISH 法を用いた栄養菌体および芽胞の検出**

左端は明視野観察の画像であり、その他の蛍光観察の画像に対応している。3回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示す。スケール：10 $\mu$ m