

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15740

研究課題名(和文) ゲノム人工合成技術による標的狙撃型殺菌キメラファージの開発

研究課題名(英文) Development of target-specific bactericidal chimeric phages using a synthetic genome

研究代表者

河内 護之 (Kawauchi, Moriyuki)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：70771294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性遺伝子を標的とするCRISPR-Cas13をファージに搭載した、殺菌キメラファージの開発を目指し、大腸菌を例に、ファージの宿主域拡張、CRISPR/Cas13をファージゲノムに搭載する技術の開発を行った。T7ファージをモデルとして、酵母用いたゲノム人工合成によりCRISPR/Cas13搭載ファージの試作に成功した。また、宿主感染域の広いファージとしてT6ファージを選抜した。最終的にT6ファージの合成及びCRISPR/Cas13搭載ファージの合成を目指したが完成には至らなかった。しかしながら、酵母を用いたゲノム人工合成法の大幅な改良には成功し、近い将来この目標は達成可能と考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤耐性菌の急速な拡大により、抗菌薬とは作用機序の異なる抗菌療法の開発が急務となっている。その一つに、バクテリアに感染後宿主を溶菌し殺す性質を持つ「ファージ」を用いた、ファージセラピー法が考えられる。しかし、一般的にファージの感染宿主域は狭く、溶菌し殺菌する性質も不安定である。近年、標的配列特異的殺菌活性を持つCRISPR/Cas13が発見された。このCRISPR/Cas13を搭載したファージの開発、並びに感染宿主域の広いファージの単離に成功した。本成果を進展させることで、ファージを用いた標的配列特異的殺菌が実現できると考えている。本研究は、ファージセラピーの実用化に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop target-specific bactericidal chimeric phages with a broad host range and CRISPR/Cas13 targeted the antibiotic resistance gene. In this study, E. coli phages were used for chimeric phage development. Using genome synthesized by the yeast-stitching method, a prototype T7 bacteriophage with CRISPR/Cas13 was successfully rebooted. Additionally, the T6 phage was selected for its broad range of hosts from our bacteriophage library. By using the improved yeast-stitching method developed by this research term, T6 phages with CRISPR/Cas13 may be produced for next-generation phage therapy near future.

研究分野：応用微生物学

キーワード：バクテリオファージ ファージ 人工合成 酵母 CRISPR/Cas13

1. 研究開始当初の背景

人類は細菌感染症の克服や農作物の安全且つ効率的生産を目指し、抗菌薬を次々に開発し、有害細菌の殺菌を達成してきた。しかし抗菌薬への過度な依存が、抗菌薬の効かない細菌(耐性菌)の誕生と急速な蔓延という新たな悲劇を生み出した。このような危機的状況下でありながら、抗菌薬開発は限界に達し、抗菌薬とは作用機序の異なる新たな方法の確立が急務である。

ファージを用いた殺菌法は、ファージが細菌に感染し宿主を最終的に殺す性質を利用した方法論である。1915年のファージ発見以降、医療分野では抗菌療法(ファージセラピー)として、農業では作物細菌防除に利用が試行された。しかし、顕著な効果が得られず、医療では1928年にペニシリン、農業では1961年にプラストサイジン S の開発を契機に次々と抗菌薬が生み出され、今日まで先進国ではほぼ忘れ去られていた。しかしながら、医療においては耐性菌の蔓延と抗菌薬開発の行き詰まり、そして農業では同様の耐性菌問題と環境に配慮した持続可能な農業の重要性から、再びファージを用いた殺菌法が注目された。

しかしながら、現状ファージによる殺菌は以下のような問題から不安定である。まず、多くのファージはファージごとに特有の攻撃対象を持つ(感染宿主域)為、感染宿主域の異なるファージを混ぜて使用する。その為、狙った病原細菌の特異的殺菌が難しく、非特異的な溶菌も発生し、抗菌薬と同様耐性菌を生み出すリスクが高い。さらに、感染宿主域が狭いことから、病原菌の些細な変化により感染できなくなり、殺菌効果が不安定化する。またファージが感染後、宿主を殺さず染色体の中に入り込む(溶原化)こともあり、これもまた殺菌効果の不安定化につながる。このファージによる殺菌の問題点を解決する為、申請者は下記2つの技術開発に取り組んできた。まず、ファージによる特異的殺菌を実現すべく、CRISPR/Cas13による遺伝子標的殺菌システムを開発した(特願2018-97751)。CRISPR/Cas13は、他のCRISPR/Casと同じく外来のファージの侵入から自身を守るために備えられたシステムである(Abudayyeh *et al.*, *Science* 2016)。現在メジャーなCas9と異なる点は、1. DNAではなくRNAを標的とする、2. 標的RNAを発見すると速やかに周囲のRNAを分解し、保有菌を死に導くという2点である。この特徴を活かし、大腸菌を標的遺伝子特異的に殺菌することに成功した。本技術は、以下の4つの理由からファージに確実な殺菌力を付与できる：1) RNAを標的とした殺菌法であるため、染色体やプラスミドなど標的遺伝子の所在を問わず、遺伝子が発現すれば殺菌可能；2) DNAを標的とした切断の場合、DNA修復に伴う予期せぬ進化を引き起すが、RNAが標的の為そのリスクはない；3) 遺伝子切断と無関係に、非特異的RNAの分解により殺菌を誘導するため、ファージ耐性化のリスクも低い；4) 設計の工夫で溶原化しても機能できる。この技術をファージに搭載することで、上述したファージによる殺菌の問題点に関し、その多くを解決できるものと考えられる。この技術をファージに搭載する手段の一つにゲノムの人工合成が挙げられる。ゲノムの人工合成技術は、Craig Venter や Daniel Gibson らによる研究先例がある。彼らは、酵母の持つ、高い相同組換え活性を利用することで、ゲノムサイズが1.08Mbpである *Mycoplasma mycoides* の人工ゲノム作製に成功した(Gibson *et al.*, *Science* 2010; Hutchison *et al.*, *Science* 2016)。申請者もこの技術を応用し、まずゲノムサイズの小さいT7ファージのゲノムを人工合成し、ファージを得ることに成功した。この技術は、ファージの自由な組換えも可能としている為、種々細菌宿主由来のファージの胴体、胴体、足などを自由に組み合わせた「キメラファージ」を設計し、感染宿主域を改変できる。

2. 研究の目的

本研究では、上記の選択的殺菌技術とゲノムの人工合成技術を軸に、ファージに「標的的特異的殺菌能」と「広い感染宿主域」の2つの能力を付与した「標的狙撃型殺菌キメラファージ」を開発する。本研究により、ファージの殺菌能力に正確性と選択性を付与し、その実用性を飛躍させることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、大腸菌をモデルにCRISPR/Cas13搭載キメラファージ作製と殺菌試験並びにその生産方法を研究する為、以下の項目を実施した。

(A) CRISPR/Cas13を搭載した殺菌ファージ試作

既に、合成に成功しているT7ファージをモデルにCRISPR/Cas13のファージゲノムへの組み込みを行った

(B)広感染域ファージの探索とゲノム解析

下水道施設等からサンプリングしファージの単離を実施する。単離したファージ及び既に保有している T 系ファージを用いて研究室で保有する 297 株の臨床分離の大腸菌ライブラリーに対し感染試験を行う。

(C)人工ゲノム合成技術の改良

多断片かつ大型のファージを効率的に合成できるよう、Gibson らの報告を参考に手法を改良する(Gibson DG et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2008)。

4. 研究成果

まず、自治医科大学及び下野市下水処理施設で下水を採取し、ファージの単離を行った。単離されたファージ並びに T 系ファージを用いて、研究室の所有する臨床分離の大腸菌ライブラリーに対する感染試験を行った。その結果、意外なことに T6 ファージの宿主感染域が非常に広く、297 株中 262 株に対し溶菌活性が確認された。したがって、T6 ファージが大腸菌に対する標的狙撃型殺菌キメラファージの合成に適していることが明らかとなった。T6 ファージは現在ゲノムデータベースの閉鎖により配列の入手が不可能になってしまった為、次世代シーケンサーによるリシーケンスを実施した。その結果、以前の報告とおよそ一致しゲノムサイズが 168.37kb と同定された。したがって、本研究で目指す標的狙撃型ファージ合成の為に、酵母で大型のゲノム合成を達成する必要があることが明らかとなった。

そこで酵母を用いたゲノムの人工合成については、以下の改良を行った。まず、少しでも相同組換え活性を高める為、非相同組換えに参与する DNL4 破壊株を取得した。つづいて、大腸菌内での複製及び転写効率向上を目指し、YAC 配列と BAC 配列を組み合わせた YAC-BAC ベクターを作成した。これらの技術を組み合わせて T7 ファージの合成を行ったところ、T7 ファージのリポートがほぼ確実にできるようになった。この方法を用いて T6 ファージの合成にトライしたが残念ながら本研究期間中に合成を達成することはできなかった。

最後に CRISPR/Cas13 搭載ファージの試作について、すでに合成に成功している T7 ファージをモデルに着手した。しかしながら、一度合成に成功した CRISPR/Cas13 搭載 T7 ファージから CRISPR/Cas13 が脱落する現象が見られた。現在理由は不明の為、今後明らかにする必要がある。

以上の結果から、本研究ではファージへの CRISPR/Cas13 の搭載、広い感染宿主域を持つファージの同定、酵母によるファージゲノム人工合成技術の向上に成功した。今後ファージゲノムでの CRISPR/Cas13 の安定化と T6 ファージの合成を達成することで、本研究で目指す標的狙撃型殺菌キメラファージの合成は達成できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinya Watanabe, Bintao Cui, Kotaro Kiga, Yoshifumi Aiba, Xin Ee Tan, Yusuke Sato 'o, Moriyuki Kawauchi, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, Yusuke Taki, Fen Yu Li, Aa Haeruman Azam, Yumi Nakada, Teppei Sasahara, Longzhu Cui	4. 巻 10
2. 論文標題 Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a Systems in the Genus Leptotrichia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 Article 2838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.02838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kotaro Kiga, Xin-Ee Tan, Rodrigo Ibarra-Chavez, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Yusuke Sato'o, Feng-Yu Li, Teppei Sasahara, Bintao Cui, Moriyuki Kawauchi, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, Yusuke Taki, Aa Haeruman Azam, Masato Suzuki, Jose R Penades, Longzhu Cui	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 Article 2934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16731-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河内 護之, 氣駕 恒太郎, 李 峰宇, Tanit Boonsiri, Xin Ee Tan, 佐藤 祐介, 相羽 由詞, Kanate Thitianapakorn, 渡邊 真弥, 崔 龍 洙
2. 発表標題 殺菌キメラファージの開発（4） 酵母を利用したキメラファージ 合成技術の開発
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University of Glasgow			