

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19570

研究課題名(和文) RNA標的型CRISPRシステム搭載ファージを用いた新規抗菌療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel antibacterial using bacteriophage and RNA targeting CRISPR system

研究代表者

崔 龍洙 (Cui, Longzhu)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：50306932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性遺伝子mecAを標的とするCRISPR-Cas13aを設計し、ブドウ球菌ファージに搭載した。それをMRSA、MSSA株を撒いた重層寒天培地上に添加して殺菌斑を確認したところ、合成ファージはMRSA株のみを殺菌するものの、MSSA株は殺菌しないことが確認された。また、mecAを欠損させたMRSA(mecA)を作製し、同様の実験を行なったが、mecAを欠損させた黄色ブドウ球菌への殺菌力は失われていた。以上の結果は、mecAを保有する菌を遺伝子特異的に殺菌する殺菌キメラファージの合成に成功したことを意味する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、我々は薬剤耐性遺伝子を標的とするCRISPR-Cas13aをバクテリオファージに搭載させ、初めに狙った細菌を選択できに殺菌する新規殺菌技術を開発した。本技術は、薬剤耐性菌の蔓延が人類の健康を脅かす現代医療問題に対して、有効な解決策となりうる。

研究成果の概要(英文)：A CRISPR-Cas targeting the methicillin resistance gene mecA of MRSA was designed and loaded onto staphylococcal phage. It was tested by dropping it to MRSA and MSSA agar plates to confirm bactericidal plaques. Results showed that the generated chimericphage only killed MRSA strain, but not killed MSSA strain. Moreover, mecA deleted mutants of MRSA was not killed by this chimericphage, demonstrating its gene-specific killing activity. The above results indicate that the synthesis of a bactericidal chimericphage that specifically kills mecA-carrying bacteria has succeed.

研究分野：微生物

キーワード：薬剤耐性菌 MRSA mecA CRISPR-Cas

研究結果報告書

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬が細菌感染症の治療において最も重要な役割を果たしてきたことに疑いの余地はない。しかし、近年抗菌薬の効かない細菌(耐性菌)の出現と急速な蔓延は、既存の抗菌薬を無力化し、細菌感染症は再び人類を脅かしている。2014年に発表されたイギリス政府のレポートでは、このまま現状が続けると2050年には耐性菌感染症による死者数のがん患者の死亡数を上回り、耐性菌感染症が最大の死因になると予測している (Arias CA. et al., 2015, N Engl J Med.)。このように深刻な耐性菌問題の危機に直面していながら、現状は有効な解決策がなく、新規抗菌薬の開発も「限界に達している」状態であり、これまでと異なる新たな抗菌治療戦略の組み立てが求められている。

こうしたなか、我々は CRISPR-Cas13a (発見当時の名称は CRISPR-C2c2) をバクテリオファージに搭載させ、これまでの抗菌薬と全く異なる新規抗菌剤の創出を提案し、本研究を遂行した。Cas13a は、一度標的 RNA を認識すると、非特異的な RNase 活性を持つようになる。その結果、Cas13a は、CRISPR のガイド RNA が薬剤体制遺伝子の mRNA を配列特異的に識別して、その後は細菌内在性の様々な RNA を分解して殺菌もしくは細菌を休止期に移行させる。このような特徴を利用して、申請者らはこの配列特異的認識と非特異的 RNA 分解活性のある CRISPR-Cas13a を薬剤耐性菌の治療に用いることができると考え本研究に着手した。

抗菌薬が細菌感染症の治療において最も重要な役割を果たしてきたことに疑いの余地はない。しかしながら、近年の抗菌薬の効かない細菌(耐性菌)の出現とその蔓延が既存の抗菌薬を無力化し、細菌感染症は再び人類を脅かしている。2014年に発表されたイギリス政府のレポートによると、このまま抗菌薬に依存し続けると2050年までに3億人が細菌感染症により死亡し、それに伴う経済損失も約1京円になると見積もられている (Arias CA. et al., 2015, N Engl J Med.)。また、2050年には耐性菌感染症による死者数のがん患者の死亡数を上回り、耐性菌感染症が最大の死因になると予測されている。このように深刻な耐性菌の問題に直面していながらも新たな抗菌薬の開発は「限界に達している」状態であり、これまでとは異なる細菌感染症治療戦略の組み立ての必要が迫ってきた。

2. 研究の目的

抗菌薬が細菌に効かなくなる「薬剤耐性」の問題に立ち向かうための注目すべき手法として、従来のファージセラピー(細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージを用いる抗菌療法)技術の再生がある。バクテリオファージ(ファージ)は、細菌に感染すると宿主細菌内に自身の核酸を注入し、宿主の複製機構を利用して増殖しながら細菌を殺す。近年ファージセラピーが注目され始めているが、その理由として、抗菌薬の開発が行き詰まったこと以外に、ゲノム編集技術や遺伝子工学技術の飛躍的な発展に伴い、自在にファージの作製が可能になったことが挙げられる。本研究では、ファージの遺伝子改変技術を用いて、CRISPR-Cas (Cas による DNA 配列特異的切断酵素活性を利用したシステム) をファージに搭載し、それを用いた画期的な抗菌治療法の開発を目指した。

3. 研究の方法

黄色ブドウ球菌の β -ラクタム剤耐性遺伝子 *mecA* の伝写産物(*mecA*-mRNA)を標的とする

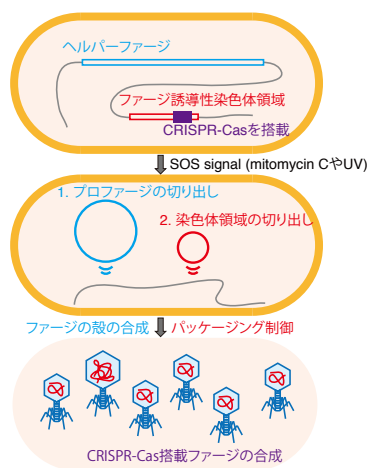
CRISPR-Cas をファージに搭載させ、耐性菌を選択的に殺菌する抗菌治療法を開発した。

(1) 多剤耐性黄色ブドウ球菌の耐性遺伝子を認識する crRNA の選定

黄色ブドウ球菌の薬剤耐性遺伝子である *mecA* に着目した。*mecA* 遺伝子を標的とするように設計した CRISPR-Cas 発現ベクターを 20 種類作製し、*mecA* を発現させた大腸菌に形質転換した。

(2) CRISPR-Cas を搭載したファージの作製

CRISPR-Cas をバクテリオファージに搭載するために黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子塊 (SaPIs) を利用した (右図)。SaPI は、黄色ブドウ球菌染色体上に存在するファージ様の構成因子を持つ移動性遺伝子領域である。SaPI は、特定のファージ (ここでは、SaPI を誘発するファージなのでヘルパーファージと呼ぶ) の存在下で染色体上から切り出され、合成されたヘルパーファージ内に入り込むことができる。まず初めに、ヘルパーファージ配列を有する黄色ブドウ球菌株の SaPI 領域に CRISPR-Cas を組み込んだ。その後、SOS 応答 (マイトマイシン C) によってヘルパーファージを誘発し、宿主染色体からヘルパーファージの切り出しを行なった。ヘルパーファージは、娘ファージを次々と合成していくが、その最中に CRISPR-Cas が組み込まれた SaPI 配列を搭載させた。



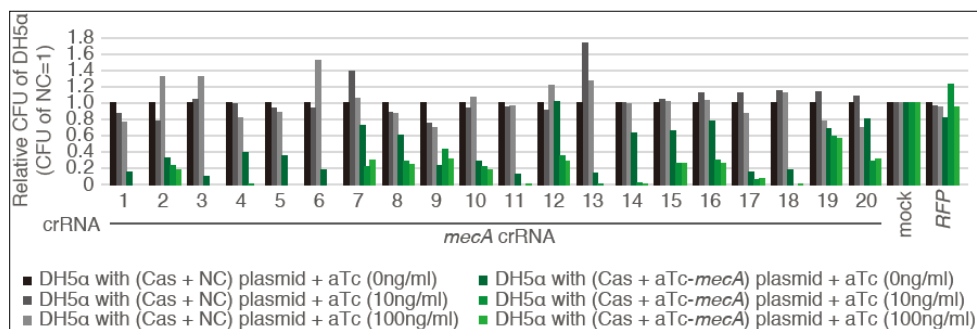
(3) CRISPR-Cas 搭載ファージによる薬剤耐性黄色ブドウ球菌の殺菌効果の検討

メチシリン感性黄色ブドウ球菌 (MSSA) と、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する、CRISPR-Cas 搭載ファージの殺菌効果を調べた。CRISPR-Cas 搭載ファージが耐性遺伝子 (*mecA*) を標的としていることを確かめるために、*mecA* を欠損させた MRSA を作製し、実験に用いた。

4. 研究成果

(1) 多剤耐性黄色ブドウ球菌の耐性遺伝子を認識する crRNA の選定

mecA を標的とする CRISPR-Cas は、*mecA* を発現させた大腸菌の増殖を抑制した。この増殖抑制は、*mecA* の発現量依存的であった。また、*mecA* 遺伝子配列の 20 箇所を標的とする CRISPR-Cas を別々に合成し、殺菌活性を調べたが、それぞれの殺菌活性は大きく異なっていた (下図)。その一方で、*mecA* を標的としない CRISPR-Cas は、大腸菌の増殖にほとんど影響を及ぼさなかった。



(2) CRISPR-Cas を搭載したファージの作製

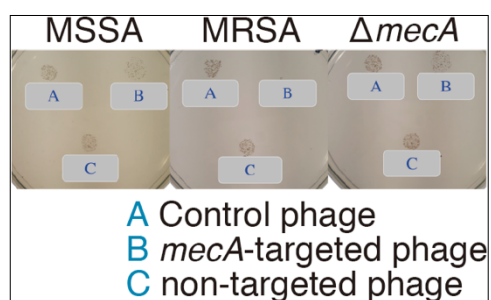
グラスゴー大学との共同研究により、病原性遺伝子塊 (SaPIs) を利用したファージ合成を行なった。CRISPR-Cas は 4kb ほどあり長いため、SaPI にそのままコードさせると、ファージのキャパシティをオーバーしてしまう。そこで SaPIs 上の不必要な遺伝子を削除し、CRISPR-Cas

を挿入した。合成ファージは全て黄色ブドウ球菌 RN4220 株上で行い、およそ 10^8 PFU/ml の CRISPR-Cas 搭載ファージを得ることができた。

(3) CRISPR-Cas 搭載ファージによる薬剤耐性黄色ブドウ球菌の殺菌効果の検討

メチシリン感性黄色ブドウ球菌 (MSSA) と、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対する、CRISPR-Cas 搭載ファージの殺菌効果を調べた。合成したファージは *mecA* 遺伝子を保有する菌を選択的に殺菌するように設計したため、*mecA* を保有する MRSA を殺菌し、*mecA* を保有しない MSSA は殺菌しないはずである。重層寒天培地上に MRSA、MSSA を撒き、その上から抗菌キメラファージを添加、殺菌斑を確認することで、抗菌キメラファージの殺菌力を調べたところ、合成ファージは MRSA を殺菌するものの、MSSA は殺菌しないことが確認された。また、CRISPR-Cas 搭載ファージが耐性遺伝子 (*mecA*) を標的としていることを確かめるために、*mecA* を欠損させた MRSA (Δ *mecA*) を作製し、同様の実験を行なった。その結果、*mecA* を欠損させた黄色ブドウ球菌への殺菌力は失われていた (下図)。この結果は、*mecA* を保有する菌を特異的に殺菌するファージの合成が成功していることを示唆している。

MRSA の選択的殺菌を *in vitro* で確認できたため、現在ガレリア・メロネラ (*Galleria mellonella*) という蛾の幼虫への感染モデルを用いて合成ファージの効果をj確認している。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Watanabe, S., Y. Aiba, X. E. Tan, F. Y. Li, T. Boonsiri, K. Thititanapakorn, B. Cui, Y. Sato'o, K. Kiga, T. Sasahara, and L. Cui. 2018. Complete genome sequencing of three human clinical isolates of *Staphylococcus caprae* reveals virulence factors similar to those of *S. epidermidis* and *S. capitis*. *BMC Genomics* 19:810. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 狙った細菌を選択的に殺菌する殺菌技術の開発
Development of a novel gene-targeted bactericidal technology using bacteriophage 氣駕 恒太朗、李峰宇、XinEe Tan、佐藤 祐介、渡邊 真弥、相羽 由詞、V́ctor Rodrigo Ibarra Ch́avez、Joś R Penad́s、鈴木 仁人、崔 龍洙
第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日
- ② レプトトリキア科細菌由来の CRISPR-Cas13 システムの機能解析
Characterization of CRISPR-Cas13 system from Leptotrichiaceae
Bintao Cui、渡邊 真弥、氣駕 恒太朗、相羽 由詞、河内 護之、Tanit Boonsiri、Kanate Thititanapakorn、佐藤 祐介、XinEe Tan、崔 龍洙
第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日
- ③ 黄色ブドウ球菌の SaPI-phage システムを利用した殺菌キメラファージの合成
Generation of bactericidal chimeric phages using SaPI-phage system of *Staphylococcus aureus*

XinEe Tan、氣駕 恒太朗、渡邊 真弥、佐藤 祐介、相羽 由詞、河内 護之、Kanate Thitiananpakorn、Víctor Rodrigo Ibarra Chávez、José R Penadés、崔 龍洙
第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日

④ 酵母を利用したキメラファージ合成技術の開発

Development of phage genome assembly system using yeast

河内 護之、氣駕恒太朗、李峰宇、Boonsiri Tanit、Tan XinEe、佐藤祐介、相羽由詞、Kanate Thitiananpakorn、渡邊真弥、崔龍洙

第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日

⑤ 緑膿菌に広く感染するファージの分離・同定

Isolation of the broad-host range phages from lysogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains

渡邊真弥、李峰宇、氣駕恒太朗、相羽由詞、佐藤祐介、Xin-Ee Tan、河内護之、Tanit Boonsiri、Kanate Thitiananpakorn、崔龍洙

第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日

⑥ 大腸菌に広く感染するファージの分離・同定

Isolation and characterization of the broad-host range phage from lysogenic *E.coli* and sewage

李 峰宇、氣駕 恒太朗、渡邊 真弥、佐藤 祐介、相羽 由詞、河内 護之、XinEe Tan、Tanit Boonsiri、Kanate Thitiananpakorn、崔 龍洙

第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日

⑦ ファージによる細菌感染症治療モデルの確立

Establishment of the bacterial infection models of *Galleria mellonella* and mouse for phage therapy

佐藤 祐介、李 峰宇、氣駕 恒太朗、渡邊 真弥、相羽 由詞、河内 護之、XinEe Tan、Tanit Boonsiri、Kanate Thitiananpakorn、崔 龍洙

第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日

⑧ 抗菌ファージの開発に資する耐性菌の収集と MRSA ファージの分離および同定

AMR bacteria collection and isolation and identification of MRSA phage

相羽由詞、Xin-Ee Tan、Kanate Thitiananpakorn、渡邊真弥、氣駕恒太朗、佐藤祐介、Tanit Boonsiri、河内護之、李峰宇、崔龍洙

第 92 回 日本細菌学会総会 札幌 2019 年 4 月 23 日～25 日

〔図書〕（計 1 件）

- ① 氣駕 恒太朗、崔 龍洙. ファージと現代医学. 狙った細菌を選択的に殺菌する殺菌キメラファージの開発. Precision Medicine 2019. Vol.2(4) P297-300.

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 2 件）

国内出願

発明者：崔龍洙、氣駕恒太朗
権利者：学校法人自治医科大学
出願番号：特願 2018-097751
出願年：2018 年 5 月 22 日

国際出願

PCT 国際出願

発明者：崔龍洙、氣駕恒太朗
権利者：学校法人自治医科大学
国際出願番号：PCT/JP2019/16801
出願年：2019 年 4 月 19 日

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/bacteriology/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：氣駕恒太朗

ローマ字氏名：KOTARO KIGA

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：90738246