

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24246133

研究課題名(和文) 進化工学的手法により分子構築した宿主可変ファージによる感染症の制御

研究課題名(英文) Control of pathogen by bacteriophage carrying variable host range constructed by molecular evolution engineering

研究代表者

丹治 保典(Tanji, Yasunori)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：00282848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳房炎罹患牛から分離した黄色ブドウ球菌SA003と宿主域が広く溶菌活性が高いファージSA012を選定し解析を行った。45回の回分培養を通じファージと宿主が共存し続け、各培養で生存したファージの全ゲノムを解析したところ、ORF(Open Reading Frame)103に変異の蓄積が見られ、宿主のレセプターを認識するリガンドであると特定された。同様の方法により大腸菌T2ファージのリガンドを特定することができた。CRISPR/Casシステムを用いリガンド(gp38)をコードする超可変領域にランダムな変異を導入することでファージ耐性大腸菌に感染性を示す変異ファージを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The emergence of antibiotic-resistant bacteria has increased the attention to the therapeutic use of bacteriophages. In order to improve the usability of phages, it is required to understand the mechanism underlying host recognition, especially receptor-binding proteins (RBPs) which determine the host range. In this study, we demonstrate staphylococcal phages SA012 possesses at least two RBPs. A polyclonal antibody against ORF103 inhibited infection of SA012 in the presence of  $\alpha$ -GlcNAc, suggesting that ORF103 (ligand) binds to  $\alpha$ -GlcNAc (Receptor). Phage-resistant *E. coli* isolated from co-culture with phage T2 was used. As the target of modification, Hyper Variable Region (HVR) was selected. This region is part of gene38, which encodes the tip of the long tail fiber. CRISPR/Cas system facilitated homologous recombination between wild type phage and plasmid which encoded random mutation in the HVR. Artificially modified phage showed infectivity to the phage resistant *E. coli*.

研究分野：生物化学工学

キーワード：バクテリオファージ ファージセラピー 黄色ブドウ球菌 薬剤耐性菌 乳房炎 大腸菌

### 1. 研究開始当初の背景

Frederic Twort は 1915 年、バクテリアを溶かしてしまうウイルスを偶然発見した。バクテリオファージ(ファージ)はバクテリアに感染するウイルスでバクテリアが存在する環境には普遍に存在する。その後多くの科学者がファージを抗菌剤として用いようと試みた。いわゆるファージセラピー(ファージによる感染症治療)の始まりである。しかし Alexander Fleming がペニシリンを発見(1929年)してから、その座は完全に抗生物質に奪われてしまった。多剤耐性菌の出現に代表される抗生物質の問題点がクローズアップされた昨今、再びファージセラピーが注目されている。

### 2. 研究の目的

本研究は抗生物質に代わり、ファージセラピーによる感染症の制御を目指した。着目したのは家畜の感染症の中でも特に問題視されている牛乳房炎起因黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*、以下 *S. aureus*) のファージセラピーである。*S. aureus* は、グラム陽性菌でありペプチドグリカンで構成された強固な細胞壁を持っている。その細胞骨格はブドウの房のような形をしており、乳房炎においては乳成分と反応して凝集体を作る。ファージセラピーを実施する上で大きな障害の一つとなるのが、宿主のファージに対する耐性化である。*S. aureus* とファージの共培養においては、ファージ投与により宿主が完全溶菌された後でも、数時間~数十時間後にファージ耐性株の増殖による濁度の上昇が生じることが確認される。宿主のファージ耐性化機構は主にファージレセプターの欠損や変異である。宿主のファージに対する耐性化に加え、ファージも耐性株に対し共培養条件下で再感染性を獲得する。このような現象は、宿主とファージの共進化と呼ばれる。共進化では、宿主とファージの間で適応(adaptation)とそれに対する再適応(counter-adaptation)のプロセスを繰り返すことが、両者の長期に渡る安定的な共存を可能にする。この共進化が *S. aureus* とその特異的ファージの間でも生じるのであれば、牛乳房炎のファージセラピーの結果を左右する要因の一つとなる。

ファージセラピーを具現化するために、ファージの宿主認識に関わる分子メカニズムを解析し、進化工学的手法を用いてファージの宿主認識を人為的に改変する手法を確立することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

乳房炎罹患牛からスクリーニングした黄色ブドウ球菌(SA003)と下水流入水からスクリーニングしたファージ(SA012)を用い感染実験を行った。LB 液体培地に対数増殖期に入った SA003 を植菌し、SA012 を感染多重度(MOI)1.0 で添加し、37 °C、40 rpm で 2 日間共培養を行った。その後、培養液 1% を

新鮮な LB 培地に継代し、再び 2-10 日間の共培養を行った。共培養中、OD<sub>660</sub> の値と培養液上清中のファージ濃度の経時変化を測定した。このような回分培養を独立した 5 つの系で何度も繰り返した。ファージの変異が宿主の変異に追いつかないとファージが Wash-out する。一つの系では 45 回の回分培養を通じファージと宿主が共存し続け、46 回目の回分培養でファージが Wash-out した。1, 2, 11, 20, 38 回目の共培養後に単離したファージのゲノムを抽出し、全ゲノムをロッシユの GS FLX+を用いて解析した。解読後の配列を SA012 の塩基配列と比較することで、共培養による SA012 のゲノム中の変異の蓄積の確認、及びファージと宿主の相互作用に関与する ORF (Open Reading Frame) の推定を行った。

同様の方法により大腸菌特異的 T2 ファージと宿主大腸菌を用い、繰り返し回分培養を行った。ファージ耐性化大腸菌に感染性を示す変異 T2 ファージ(M4)のゲノム解析により宿主レセプターを認識するファージリガンドを特定することができた。変異ファージに認められた超可変領域(HVR)の 2 変異が耐性菌に感染するために重要であることが示された。進化工学的手法によりファージ耐性菌に感染性を示す変異ファージを分子構築するために、CRISPR/Cas システムを用いた。M4 の変異箇所であった gp38 の 161aa と 231aa にランダムな変異が入るインサートを作製し、相同領域と CRISPR/Cas による DNA 切断を免れるための点変異を導入したベクターにライゲーションし大腸菌を形質転換した。形質転換大腸菌に野生型の T2 ファージを感染させ相同組み換えを行いファージ耐性大腸菌に感染性を示す変異ファージを人為的に作成した。

### 4. 研究成果

#### 4-1 ファージ耐性株に対する感染性獲得の分子メカニズム

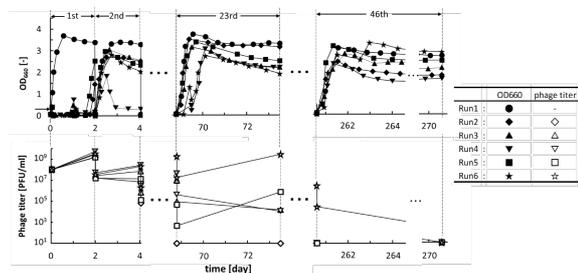


図1 継代を伴う SA003 と SA012 の共培養

SA003 と SA012 の共進化現象を解析するために、両者の共培養を継代により計 46 回繰り返し行った。OD<sub>660</sub> とファージタイターの変化を全結果から抜粋したものを図1に示す。液体 LB 培地に SA003 を 1% 植菌した後、OD<sub>660</sub> の値が 0.1 となった時点で SA012 を終濃度 10<sup>8</sup> PFU/mL (MOI 1.0) で感染させた。

その後 SA003 は直ちに溶菌し、濁度の値は 0 付近を推移した。培養中盤に Run3, 4 において耐性菌の出現と思われる濁度の上昇が見られたが、その後溶菌し再び宿主の増殖は抑えられた。培養終盤には Run2, 5 において耐性菌が出現し、これらは 1st の終了時点までに溶菌されることはなかった。このことから Run2, 5 においては、比較的ファージ耐性能の強い変異株が出現したと考えられた。継代を伴う共培養によって SA003 と SA012 の共存性を確認した。同条件下で行った 5 つの Run 全てで両者は共存性を示した。その中でも Run6 においてはファージと宿主が安定的に、最も長期に渡って共存を果たした。そこで Run6 より単離されたファージの全ゲノム解析を行った。

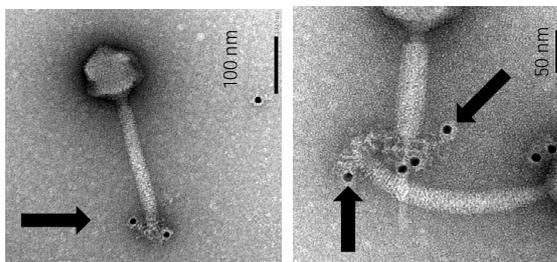


図2 SA012 の TEM 像

矢印：金コロイドで修飾した二次抗体の結合部位

全ゲノム解析により変異ファージの ORF103 に遺伝子変異の蓄積が見られた。ORF103 は構造タンパク質であることは判明しているもののその機能は未知であった。しかし、宿主認識に関わるリガンドをコードすることが示唆されたので、gp103 抗体を作成し、金コロイドで修飾した二次抗体で gp103 の発現部位を同定した(図2)。結合部位がテールファイバー先端であることから gp103 は宿主レセプターの結合タンパク質(リガンド)であると判断した。

#### 4-2 ファージの人為的宿主域改変

進化工学的手法によりファージのリガンドに変異を導入する方法を検討した。宿主認識特異性を人為的にスイッチングするためには高効率でファージゲノムに変異を導入する手法の開発が必要である。遺伝子組換えのシステムが整っている大腸菌を用い、変異導入システムの検討を行った。T2 ファージと大腸菌の共培養から単離された耐性菌 R1 と R2 に対し、変異ファージ M4 が超可変領域(HVR)を変異させることで感染能を獲得した。また、同様に継代培養を行って取得した他のサンプルにもこの位置に変異が含まれていた。これらの位置は、吸着能を変化させるためのいわばホットスポットとなっていることが推測された。進化工学的手法によりファージ耐性菌に感染性を示す変異ファージを分子構築するために、CRISPR/Cas システムを用いた。M4 の変異箇所であった gp38 の 161aa と 231aa にランダムな変異が入るイ

ンサートを作製し、相同領域と CRISPR/Cas による DNA 切断を免れるための点変異を導入したベクターにライゲーションし大腸菌を形質転換した。形質転換大腸菌に野生型の T2 ファージを感染させ相同組み換えを行ったところ、ファージ耐性大腸菌に感染性を示す変異ファージを得ることができた。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 12 件)

- 1 J. Hu, K. Miyanaga, Y. Tanji. Diffusion of bacteriophages through an artificial biofilm model. *Biotechnol. Prog.*, 28(2):319-326, (2012) 査読あり
- 2 S. Ohno, H. Okano, Y. Tanji, A. Ohashi, K. Watanabe, K. Takai, H. Imachi. A method for evaluating the host range of bacteriophages using phages fluorescently labeled with 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95(3),777-788 (2012) 査読あり
- 3 Ting Wei, Jun Hu, Kazuhiko Miyanaga and Yasunori Tanji, Comparative analysis of bacterial community and antibiotic-resistant strains in different developmental stages of the housefly (*Musca domestica*), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(4):1775-1783. (2013) 査読あり
- 4 Hao Zheng, Dylan Bodington, Chong Zhang, Kazuhiko Miyanaga, Yasunori Tanji, Yuichi Hongoh, and Xin-Hui Xing. Comprehensive Phylogenetic Diversity of [FeFe]-Hydrogenase Genes in Termite Gut Microbiota. *Microbes and Environments*. 28 (4), 491-494 (2013) 査読あり
- 5 T. Wei, R. Ishida, K. Miyanaga, Y. Tanji. Seasonal variations in bacterial communities and antibiotic-resistant strains associated with green bottle flies (Diptera: Calliphoridae) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(9), 4197-4208(2014) 査読あり
- 6 T. Wei, K. Miyanaga, Y. Tanji. Persistence of antibiotic-resistant and -sensitive *Proteus mirabilis* strains in the digestive tract of the housefly (*Musca domestica*) and green bottle flies (Calliphoridae) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(19), 8357-8366 (2014) 査読あり
- 7 Y. Tanji, A. Tanaka, K. Tani, M. Kurimoto, K. Miyanaga. IgG-dependent aggregation of *Staphylococcus aureus* inhibits bacteriophage attack. *Biochem. Eng. J.*, 97, 17-24 (2015) 査読あり
- 8 H. Sasaki, R. Awais, J. Takahashi, Y. Tanji, C. Tada, S. Ogura, S. Sato, Y. Nakai, The Effect of Grazing on Fecal Shedding of Pathogenic *Escherichia coli* in Beef Cattle, *Journal of Integrated Field Science*, 12: 39-42 (2015)

- 査読あり
- 9 T. Furusawa<sup>1</sup>, H. Iwano<sup>1</sup>, Y. Hiyashimizu<sup>1</sup>, K. Matsubara<sup>1</sup>, H. Higuchi, H. Nagahata, H. Niwa, Y. Katayama, Y. Kinoshita, K. Hagiwara, T. Iwasaki, Y. Tanji, H. Yokota<sup>1</sup>, Y. Tamura. Phage therapy is effective in a mouse model of bacterial equine keratitis. *Appl. Env. Microbiol.*, 82, doi: 10.1128/AEM.01166-16 (2016) 査読あり
  - 10 I. Takeuchi, K. Osada, A.H. Azam, H. Asakawa, K. Miyanaga, Y. Tanji The presence of two receptor-binding proteins contributes to the wide host range of staphylococcal Twort-like phages. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 82, No. 19, 5763-5774 (2016) 査読あり
  - 11 Y. Tanji, Control of pathogen by bacteriophage, *Biocontrol science*, 42, 191-197 (2017) 査読なし
  - 12 Y. Tanji, Prospective and problems of phage therapy, *Antibiotics & Thermoerapy*, 33, 1050-1060 (2017) 査読なし
- 〔学会発表〕(計 26 件)
- 1 Y. Tanji, Diffusion of bacteriophages through artificial biofilm model, Virus of Microbes, Brussels Belgium, 16-20 July 2012.
  - 2 Y. Tanji, Control of pathogens in the biofilm by bacteriophage, 2012 international symposium on advanced biology, Guilin China, 25-29 October, 2012.
  - 3 高尾信方、宮永一彦、丹治保典、T2 ファージにおける Tailfiber の相同組み換えと宿主吸着に与える影響の解析、第 4 回ファージ研究会、群馬県高崎市群馬大学、2012 年 9 月 19-20 日
  - 4 田中愛里、宮永一彦、丹治保典、IgG による黄色ブドウ球菌凝集のファージ耐性化、第 4 回ファージ研究会、群馬県高崎市群馬大学、2012 年 9 月 19-20 日
  - 5 竹内一平、宮永一彦、丹治保典、ファージセラピーに向けたファージ大量精製条件の最適化、第 4 回ファージ研究会、群馬県高崎市群馬大学、2012 年 9 月 19-20 日
  - 6 竹内一平、宮永一彦、丹治保典、黄色ブドウ球菌とその特異的ファージ  $\phi$ SA012 の共進化、第 15 回化学工学会学生発表会、山形大学(米沢)、2013 年 3 月 2 日
  - 7 星賀史也、宮永一彦、丹治保典、ファージと宿主の共培養における宿主のファージ耐性化、第 15 回化学工学会学生発表会、山形大学(米沢)、2013 年 3 月 2 日
  - 8 長田啓太、宮永一彦、丹治保典、ファージ耐性化黄色ブドウ球菌に対する再感性感性ファージの解析、化学工学会第 78 回年会、大阪大学(豊中市)、2013 年 3 月 17-19 日
  - 9 Y. Tanji, K. Tani, M. Kurimoto, K. Miyanaga, Aggregation of *Staphylococcus aureus* which causes bobine mastitis in crude milk, The 20<sup>th</sup> Biennial International Phage Biology Meeting, Seattle (USA), 4-9 August 2013.
  - 10 K. Miyanaga, N. Takao, Y. Tanji, Comparison and gene analysis of T-even phage genomes, The 20<sup>th</sup> Biennial International Phage Biology Meeting, Seattle (USA), 4-9 August 2013.
  - 11 宮永一彦、丹治保典、T 偶数系バクテリオファージにおける尾繊維タンパク質をコードする遺伝子の解析、化学工学会第 45 回秋期大会、岡山大学(岡山)、2013 年 9 月 16-18 日。
  - 12 Aa Haeruman Azam. K. Osada, K. Miyanaga, Y. Tanji. The study on the adsorption inhibition of phage-resistant *Staphylococcus aureus* strain SA003 against  $\phi$ SA012 phage. 第 5 回ファージ研究会、三重大学(三重)、2014 年 9 月 4-5 日
  - 13 吉崎恭平、星賀史也、宮永一彦、丹治保典、大腸菌ファージ T2 の宿主認識機構の解析、第 5 回ファージ研究会、三重大学(三重)、2014 年 9 月 4-5 日
  - 14 町田桂、田中愛里、長田啓太、宮永一彦、丹治保典、黄色ブドウ球菌の IgG 依存的凝集とファージ耐性化、第 5 回ファージ研究会、三重大学(三重)、2014 年 9 月 4-5 日
  - 15 星賀史也、高尾信方、嶋本順明、鈴木沙依、宮永一彦、丹治保典、CRISPR/Cas システムを用いた T2 ファージのゲノム改変法の開発、第 5 回ファージ研究会、三重大学(三重)、2014 年 9 月 4-5 日
  - 16 鈴木沙依、星賀史也、竹内一平、宮永一彦、丹治保典、黄色ブドウ球菌特異的ファージ  $\phi$ SA012 の宿主認識機構、第 17 回化学工学会学生発表会、八戸高専(八戸)、2015 年 3 月 7 日
  - 17 Yasunori Tanji, Coevolution between *Staphylococcus aureus* and its lytic bacteriophage  $\phi$ SA012 in batch co-culturer with serial transfer, 21<sup>st</sup> Biennial Evergreen International Phage Meeting, The evergreen state college, Seattle (USA), 2-7 August 2015.
  - 18 丹治保典、ファージ研究の試行錯誤とその展望、第 2 回ファージセラピー臨床応用検討会、東工大(横浜)、2015 年 7 月 31 日
  - 19 星賀史也、丹治保典、CRISPR/Cas システムによるファージゲノム編集、第 2 回ファージセラピー臨床応用検討会、東工大(横浜)、2015 年 7 月 31 日
  - 20 丹治保典、田中愛里、谷夏織、栗本実希、宮永一彦、IgG-dependent aggregation

- of *Staphylococcus aureus* inhibits bacteriophage attack, 第 89 回日本細菌学会、大阪国際交流センター(大阪)、2016 年 3 月 23-25 日
- 21 竹内一平、長田 啓太、宮永一彦、丹治保典、The host-recognition mechanism of Twort-like *Staphylococcus aureus* phage  $\phi$ SA012, 第 89 回日本細菌学会、大阪国際交流センター(大阪)、2016 年 3 月 23-25 日
- 22 嶋本順明、星賀史也、宮永一彦、丹治保典、Genetic modification of bacteriophage by CRISPR/Cas system, 第 89 回日本細菌学会、大阪国際交流センター(大阪)、2016 年 3 月 23-25 日
- 23 丹治保典、ファージセラピーの可能性と問題点(牛乳房炎を例に)、ファージ・環境ウイルス研究会合同シンポジウム、JAMSTEC 横須賀本部(横須賀)、2016 年 10 月 21-22 日
- 24 嶋本順明、宮永一彦、丹治保典、Genetic modification of bacteriophage by CRISPR/Cas system, ファージ・環境ウイルス研究会合同シンポジウム、JAMSTEC 横須賀本部(横須賀)、2016 年 10 月 21-22 日
- 25 Aa Haeruman Azam, 宮永一彦、丹治保典、Study on phage-resistant mechanism of *Staphylococcus aureus* SA003 against phage  $\phi$ SA012, ファージ・環境ウイルス研究会合同シンポジウム、JAMSTEC 横須賀本部(横須賀)、2016 年 10 月 21-22 日
- 26 Yasunori Tanji、Application of bacteriophage and its function for controlling pathogens and expression of foreign genes on its capsid protein, 23<sup>rd</sup> Regional symposium on Chemical Engineering, Vung Tau City (Vietnam), 27-28 October, 2016.

〔産業財産権〕

○取得状況(計 1 件)

名称:スタフィロкокカス・アウレウス溶菌性バクテリオファージ

発明者:丹治保典、宮永一彦

権利者:国立大学法人東京工業大学  
学校法人酪農学園

種類:特許

番号:特許第 5720045 号

取得年月日:平成 27 年 4 月 3 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.biochemeng.bio.titech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者:丹治 保典 (Yasunori Tanji)

東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号:00282848

(2)研究分担者:宮永 一彦 (Kazuhiko Miyanaga) 東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号:40323810

(3)連携研究者:( )

研究者番号:

(4)研究協力者:岩野 英知 (Hidetomo Iwano) 酪農学園大学 教授