

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：35313

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08455

研究課題名(和文) 薬剤耐性プラスミドの接合伝達系を標的とした新規抗菌法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel antimicrobial method targeting conjugation systems of drug-resistant plasmid

研究代表者

川野 光興 (Kawano, Mitsuoki)

中国学園大学・私立大学の部局等・准教授(移行)

研究者番号：00455338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンチセンスRNA (asRNA) を発現するファージを用いて、薬剤耐性の性質を付与する接合伝達プラスミドを保有する細菌のみを標的とする新規抗菌法の開発を行った。まず、細菌の生存に必要な遺伝子を標的とするasRNAの発現により細菌の生育を阻害できる遺伝子発現系の構築を行った。次に、それらasRNAによる遺伝子サイレンシングシステムをM13ファージミドに組み込み、感染作用を用いて宿主細菌に導入して生育阻害効果を調べた。その結果、99.99%以上の殺菌効果のある抗菌RNA配列を複数取得できた。ファージ療法研究において初めてasRNAを用いた抗菌作用を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

畜産現場における抗菌薬の乱用が薬剤耐性菌を産生する主要な原因になっているが、ファージを用いた新規抗菌法は、代替法として畜産分野での実用化が期待できる。また、性線毛を産生するサルモネラ属菌や腸管出血性大腸菌O157などの食中毒菌を人に感染する前に食品や環境中から除菌する方法の開発につながる。さらに、水平伝播による薬剤耐性遺伝子の拡散防止や、新規薬剤耐性遺伝子による薬剤耐性菌の出現を遅らせることができ公衆衛生的な問題に貢献できる。これらは、医療費を含む社会的・経済的負担の大幅な軽減にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I carried out basic technology development of a novel phage therapy using a M13 phage-based genetic engineered phagemid, which combines characteristics of both phage and plasmid, to specifically target F-pili producing bacteria. This approach suppresses expression of essential genes in bacteria by antisense RNAs transcribed from the phagemid. Growth inhibited phenotypes were facilitated in hfq- conditions. Phage lysates were prepared from cells harboring phagemids as a lethal-agent delivery tool. Targeting the rpsM ribosome protein coding gene by phagemid-derived M13 phage infection of E. coli containing a carbapenem-producing F-plasmid and multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae containing an F plasmid resulted in the death of over 99.99% of infected bacteria. This study provides a possible strategy for treating bacterial infection and can be applied to any F-pilus producing bacterial species.

研究分野：細菌感染症学

キーワード：薬剤耐性菌 感染制御法 バクテリオファージ ファージセラピー アンチセンスRNA 遺伝子発現制御法 抗菌法 性線毛

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

抗菌薬の濫用により、従来の抗菌薬が効かない薬剤耐性細菌が世界中で増えている。さらに、複数の抗菌薬に耐性をもつ様々な「多剤耐性菌」が確認されている。特に「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)」は、細菌感染症治療において最後の切り札とされるカルバペネム系抗菌薬に対しても耐性を示し、臨床医療の現場での脅威となっている。このため、感染症の治療が困難になるケースが増加しており、その拡散伝播防止対策が臨床的にも公衆衛生学的にも最重要課題となっている。薬剤耐性菌の問題は国内だけの問題ではなく全世界的な問題となっており、このまま対策が取られなければ、全世界における死者数は 2050 年までに 1000 万人にのぼり、1000 兆ドルの国内総生産が失われるとの試算もある。しかし、製薬企業による新薬開発の重点はより多くの収益が見込める慢性病治療薬へと移り、抗菌薬の開発は激減している。耐性菌に対して抗菌薬以外の方法で制御可能な治療法を見出すことは重要かつ急務である。薬剤耐性菌の急速な増加による諸問題が明らかとなったことで、世界では薬剤耐性菌に対する代替治療法を模索している。そのなかで研究者に注目されている治療法の一つがファージ療法である。抗菌薬と比較した場合のファージ療法の利点は、その宿主特異性の高さにある。一般的にファージはある特定の細菌種(株)にのみ感染し宿主菌を殺す。標的細菌以外には一切影響を与えず、それ以外の生体内の常在菌といった良性的細胞を殺すことはない。ただ、現在のファージ療法には大きな欠点があり、現在治療に使われているバクテリオファージは自身の増殖のために宿主細菌の細胞を破裂させるため、それと同時に細胞内のエンドトキシンも外部に放出され、最悪の場合は患者の死につながるという望ましくない副作用をもたらす可能性がある。また、利点として述べたファージの高い宿主特異性であるがこれは同時に欠点でもあり、患者にファージを薬として処方する際には感染症とその原因菌を正確に診断し、それに厳密に対応したファージを処方しなければいけない。ただ、この点に関しては複数種のファージを混合した「ファージカクテル」を処方することでも対応でき、この手法によってファージ耐性菌の出現を抑えることもできる。

ファージ感染により生育阻害を引き起こす方法はいくつかあり、毒性タンパク質発現遺伝子を細胞内で発現させて殺菌作用を発揮する方法や、抗菌薬を無力化するタンパク質発現遺伝子の mRNA に結合し、翻訳を阻害することのできる小分子 RNA を発現させることで抗菌薬への感受性を高める方法などが報告されている。我々は、大腸菌の生育必須遺伝子や **Toxin-Antitoxin system (TA system、毒素-抗毒素システム)** の **antitoxin (抗毒素)** を標的としたアンチセンス RNA (**asRNA**) を利用して細菌を殺す方法を考案した。この方法の利点は、大腸菌の生育に必須なタンパク質の翻訳阻害や、大腸菌に元々備わっている **TA system** における毒素タンパク質の発現を阻害する抗毒素タンパク質の翻訳阻害が小分子の **asRNA** のみによって行われるため、大腸菌にとって有害となる **asRNA** が何らかの形で細胞外に放出されても副作用が起こりにくいという点である。さらに、大腸菌やサルモネラ菌の生育を抑制する塩基配列をスクリーニングにより取得することを目指して研究を行った。そして、これらの生育阻害 RNA を含む配列をファージミド (**M13** ファージの複製開始配列を含むプラスミドでファージ粒子に入る) の系に組み込み、このシステムが導入された人工ファージミド保持ファージの感染により、薬剤耐性菌を殺菌できるか検討を行った。

2. 研究の目的

近年、**MRSA** や基質拡張型 β -ラクタマーゼ (**ESBL**)、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌などの多剤耐性菌が増加し、既存の抗菌薬に依存しない新規抗菌薬の開発が求められている。最近私達は、24 塩基からなるアンチセンス RNA を用いて遺伝子発現を制御する方法を確立し、バクテリオファージの感染性を利用してこの制御遺伝子配列を宿主細菌に導入できるシステムを構築した。本研究では、多剤耐性菌に対する予防・治療手段を確保することを目指し、薬剤耐性遺伝子をコードする接合伝達性プラスミド保有菌にのみ感染するファージを用いて新規抗菌薬の開発を行い、臨床応用に向けた研究基盤を構築することを目的とする。そのために、多剤耐性の性質を付与する接合伝達性プラスミドを保有する細菌に「特異的」に感染するファージを用いて抗菌 RNA を細菌内で発現できるシステムを開発する。

3. 研究の方法

(1) pMKN104 (Kawano et al. 2020; Fujita et al. 2021)

クロラムフェニコール耐性遺伝子を持つ **pAZ3** プラスミドを改変し、アラビノース誘導プロモーターの下流にマルチクローニングサイトを持たせた **5192 bp** のファージミドである。1 細胞あたり約 **20** のコピー数を保持する。アンチセンス RNA を産生しないコントロールとして使用した。以下、**pMKN104-no insert** とする。

(2) pMKN104-ArplNU

pMKN104 の **P_{BAD}** プロモーターにより、アラビノース存在下において **50S** リボソームを構成する **L14** タンパク質をコードする **rpL14 mRNA** の翻訳を阻害する **ArplNU RNA (asRNA)** を発現するファージミドである。

(3) pMKN104-ArelBU

pMKN104のP_{BAD}プロモーターにより、アラビノース存在下において抗毒素タンパク質を産生する *relB* mRNA の翻訳を阻害する ArelBU RNA (asRNA) を発現するファージミドである。

(4) LB+Cm(25)+ara(0.2%) プレート

LB プレートと同じ組成で混合液を作製し、121°C で 20 分間オートクレーブにより高圧蒸気滅菌した。溶液の温度が下がった後、クロラムフェニコール溶液 (25 mg/ml) を終濃度 25 µg/ml、20% L-アラビノースを終濃度 0.2%となるように入れ、固まる前にディッシュ 1 枚あたり約 23 ml の培地を入れ、固まるまで静置し、4°C で保管した。

(5) ファージアッセイ

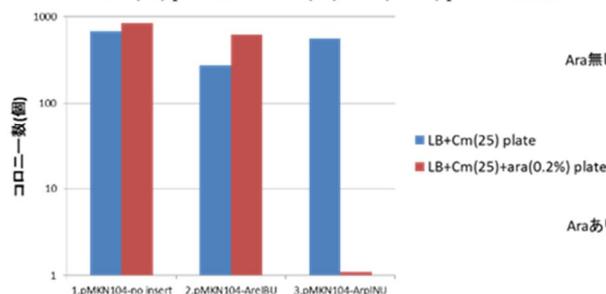
ファージミド保持ファージを標的菌に感染させ、菌体内に侵入したファージミドによってアラビノース入りプレート上で生育阻害がみられるかを確認するために行った。大腸菌 MV1184 を 2 ml の 1×M9 グルコース培地で一晩振とう培養した菌液 100 µl を 10 ml の 2×YT 培地に加え、50 ml チューブを用いて 37°C で振とう培養した。OD₆₀₀ が 0.8 のときに振とう培養を止め、培養液 1 ml とファージミド保持ファージ溶液 1 ml を混合し、37°C で 2 時間インキュベートした。2500×g で 15 分間遠心分離した後上清を除き、200 µl の 2×YT 培地を加えて菌体を懸濁した。懸濁液を 100 µl ずつ、LB+Cm(25)プレートと LB+Cm(25)+ara(0.2%)プレートの組み合わせで、または LB プレートと LB+ara(0.2%)プレートの組み合わせで塗布し、37°C で一晩培養した。翌日、コロニー数を測定した。

4. 研究成果

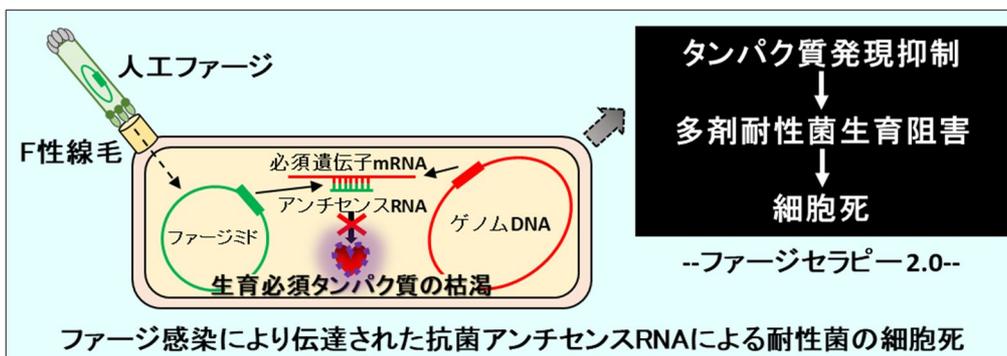
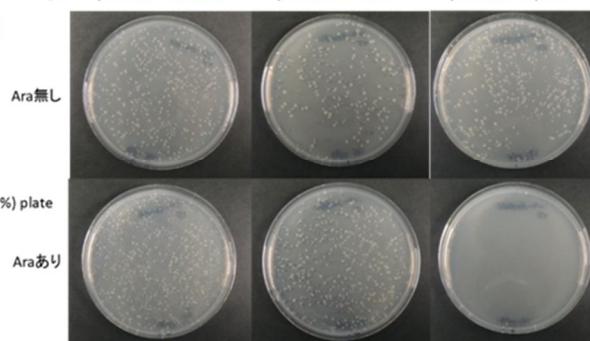
(1) asRNA 発現ファージ感染実験

ファージミド pMKN104-no insert、pMKN104-ArplNU、pMKN104-ArelBU のうち、pMKN104-ArplNU、pMKN104-ArelBU は、事前に形質転換にて大腸菌 TOP10 に導入し、アラビノースを添加した LB+Cm(25)液体培地を用いて、asRNA 発現による生育阻害が起きることを確認し、ファージ感染実験でこれらのサンプルが同様の生育阻害効果を発揮するかを調べた。次に、大腸菌 TG1 をこれらファージミドで形質転換して各種 pMKN104 ファージミドを大腸菌に導入した。そして、M13 ヘルパーファージを感染させて、F 型性線毛を感染の受容体とする M13 ファージに各種 pMKN104 ファージミドをパッケージングし、各種 pMKN104 ファージミドを保持するファージ液を調整した。これらファージミド保持ファージのタイターを測定したところ、 $1.0 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^9$ pfu/ml であった。これらファージを用いてファージアッセイを行ったところ、pMKN104-ArelBU ファージミド感染ではコロニー形成能の低下はみられなかったが、アラビノース存在下において、pMKN104-ArplNU ファージミド感染によりコロニーの形成を 0.1%程度に減少することができた (図 A, B)。これらの結果から、生育必須遺伝子を標的とする asRNA を発現するファージを用いて世界で初めて抗菌作用を得ることができた。今回開発した方法は、耐性遺伝子の種類に依存せず、薬剤耐性プラスミド保有菌に特異的な抗菌作用をもたらす方法であるため、新規の薬剤耐性菌においても応用可能である。最近の臨床分離カルバペネム耐性腸内細菌科細菌を用いた実験では、99.99%以上の抗菌効果を示す asRNA を同定することもできた (Suzuki et al. 2020)。今後は感染モデル動物実験を行い、この実験系を用いた治療効果の検証を行う予定である。

A LB+Cm(25) plateとLB+Cm(25)+ara(0.2%) plateの比較



B pMKN104-no insert pMKN104-ArelBU pMKN104-ArplNU



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maggi Stefano, Yabre Korotoum, Ferrari Alberto, Lazzi Camilla, Kawano Mitsuoki, Rivetti Claudio, Folli Claudia	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional characterization of the type I toxin Lpt from <i>Lactobacillus rhamnosus</i> by fluorescence?and atomic force microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-51523-z	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
1. 著者名 Kawano Mitsuoki, Morohashi Shota, Oda Kohei, Ishikawa Masataka, Fujita Shouta, Saito Mineki	4. 巻 521
2. 論文標題 Artificial small RNA-mediated growth inhibition in <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 577 ~ 583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yuya, Ishimoto Takumi, Fujita Shouta, Kiryu Sachie, Wada Mamoru, Akatsuka Takahiro, Saito Mineki, Kawano Mitsuoki	4. 巻 530
2. 論文標題 Antimicrobial antisense RNA delivery to F-pili producing multidrug-resistant bacteria via a genetically engineered bacteriophage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 533 ~ 540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.06.088	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 Fujita Shouta, Tsumori Yutaka, Makino Yuko, Saito Mineki, Kawano Mitsuoki	4. 巻 556
2. 論文標題 Development of multiplexing gene silencing system using conditionally induced polycistronic synthetic antisense RNAs in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 163 ~ 170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.152	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogura Yoshitoshi, Ueda Takuya, Nukazawa Kei, Hiroki Hayate, Xie Hui, Arimizu Yoko, Hayashi Tetsuya, Suzuki Yoshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 The level of antimicrobial resistance of sewage isolates is higher than that of river isolates in different Escherichia coli lineages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75065-x	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川野光興、諸橋祥太、石川雅峻、小田幸平、藤田翔太、齊藤峰輝
2. 発表標題 連続グアニンRNA配列による大腸菌の生育阻害効果
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場)2019年12月3日、ポスター発表
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川野光興
2. 発表標題 カルバペナム耐性腸内細菌に感染するファージの探索とファージバンクの設立に向けて
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会シンポジウム(ウインクあいち)2020年2月21日、シンポジウムコンピーナ・座長・口頭発表(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野光興
2. 発表標題 Phage-delivered antimicrobial antisense RNAs kill multidrug-resistant bacteria
3. 学会等名 The 17th Young Scientist Seminar "Establishment of International Research Network for Bioresources and Their Utilization" (オンライン開催)2020年11月29日、口頭発表(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川野光興
2. 発表標題 抗菌アンチセンスRNA発現ファージを用いた薬剤耐性菌の殺菌法
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会（オンライン開催）2021年3月6日、口頭発表
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p><Researchmapの研究者詳細ページへのリンク> https://researchmap.jp/mitsuokikawano</p> <p><メディア報道> (1) 「オス菌を限定攻撃 薬剤耐性菌を退治」科学新聞、2020年8月28日 (2) 「オス菌を限定的に攻撃することで薬剤耐性菌を退治する方法を開発」TOKYO MXテレビ、2020年8月19日</p>

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
研究分担者	小椋 義俊 (Ogura Yoshitoshi) (40363585)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	2020年6月に九州大学から移動

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
---------	---------