

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14378

研究課題名(和文) LLBファージという新たな食中毒細菌制御法の確立

研究課題名(英文) LLB Phage: Novel approach to eliminate food poisoning bacteria

研究代表者

益田 時光(Masuda, Yoshimitsu)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：90778060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、リーダレスバクテリオシン(LLB)を産生するバクテリオファージ(ファージ)、LLBファージを構築し、食中毒細菌の制御における新しい手法を創出することを目的とした。また、ファージの遺伝子改変のための新たなプラットフォームの構築についても検討を行った。その結果、大腸菌を標的とするInqQ-T7、大腸菌O157H7株を標的とする5種類のLLB-ECP52、多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を標的としたInqQ-vPSARaといったLLBファージの作成に成功した。さらに、大腸菌や黄色ブドウ球菌内におけるCRISPR-Casを利用した溶原ファージゲノム編集システムの構築にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、細菌にのみ感染し、薬剤耐性菌に対しても強い抗菌活性を有するバクテリオファージと抗菌ペプチドの一種であるリーダレスバクテリオシンを遺伝的手法を駆使して組み合わせることで、LLBファージという新規抗菌素材を生み出し、食中毒細菌の制御等に利用することを目的とした。その結果、大腸菌O157H7株や多剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対して非常に高い抗菌活性を有する優れたLLBファージを複数作成することに成功した。また、今回構築したファージゲノム編集システムによって、ファージ利用で問題となる溶原化に関連する遺伝子を欠損させ、溶菌ファージ化させることにも成功した。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to construct a novel antimicrobial agent, LLB-producing phage (LLB-phage) against pathogenic bacteria. As a result of this study, the first LLB-phage InqQ-T7, LLB-ECP52s targeting enterohemorrhagic Escherichia coli, and InqQ-vPSARa targeting multi-drug resistant Staphylococcus aureus were constructed. InqQ-T7 was constructed by trx-dependent homologous recombination system and LLB-ECP52s were constructed by genome editing system with CRISPR-Cas9. They could control the growth of not only E. coli host strain but neighboring gram-positive bacteria by enhanced lytic activity and LLB production. InqQ-vPSARa could also inhibit an emergence of phage resistant population. MRSA targeting LLB phage InqQ-vPSARa was constructed by editing system with CRISPR-Cas10, in which we could transform temperate phage PSARa into virulent phage by deleting 4 putative lysogenic genes. This study demonstrated the great possibility that we can design various types of LLB-phages on demand.

研究分野：分子微生物

キーワード：bacteriophage bacteriocin leaderless bacteriocin CRISPR-Cas EHEC MRSA

## 1. 研究開始当初の背景

発展途上国、先進国を問わず、食の安全は常に社会において最重要課題で有り続けている。日本の食品衛生環境は世界的に最高水準にあるといえるが、未だに毎年、大腸菌 O157:H7 やサルモネラ、カンピロバクターなどの食中毒細菌による被害が後を絶たない。抗生物質などの薬剤に対する耐性菌の出現などによって、細菌の制御がより難しくなっている現在、有効な新規抗菌技術が求められている。

本研究で用いたファージは細菌のみに感染するウィルスであり、宿主としての菌種特異性が非常に高く、人や動物に対しては感染しない。菌体の表面構造を認識部位として宿主特異的に感染し、宿主菌体内で自己のゲノム DNA/RNA、骨格タンパクさらにエンドライシンなどの溶菌酵素を合成する。菌体内で増殖したファージはエンドライシンなどの溶菌効果で菌体を内側から破壊し、近傍の宿主に感染を拡大していく (図 1-a)。抗生物質耐性菌などにも活性を示す一方で、耐性菌の出現が比較的起こり易いという課題があり、単独のファージ利用ではなく、ファージカクテルとしての利用が主流である。加熱殺菌が好ましくない生野菜などの生鮮食品において特に有用であり、欧米などにおいてはすでにファージカクテルスプレーなどとして、食中毒細菌汚染防止に用いられている。

リーダーレスバクテリオシン (LLB) は主にグラム陽性菌によって生産され、細菌が生産する抗菌性ペプチド、バクテリオシンの中では非常に特殊なグループである。ナイシンに代表される一般的なバクテリオシンには転写翻訳後、N 末端にリーダー配列が付随しており、このリーダー配列が認識部位となり、その後の成熟化が進行し、最終的に菌体外にてリーダー配列の切断が起こることで活性型となる。LLB はこのリーダー配列を有しておらず、翻訳後直ちに菌体内で活性型となることが明らかとなっており、生産菌における排出機構や菌体内の耐性機構など不明な点が多い (図 2)。また、その単純な構造にも関わらず、特にグラム陽性菌に対して抗生物質よりも優れた抗菌効果を有するもの (lacticin Q, aureocin A53 等) も報告されているが、応用に関する報告は非常に少なく、その可能性に注目が集まり始めている。

## 2. 研究の目的

本研究は、ファージが産生するエンドライシンなどの溶菌酵素とともに、細菌の細胞膜等を攻撃する抗菌ペプチド、LLB を生産させることで、抗菌力を向上させた LLB ファージを構築し、食中毒細菌の制御における新しい手法を創出することを目的とした (図 1)。LLB は主にグラム陽性菌に効果を持つものが多いため、陰性菌に感染するファージと組み合わせた LLB ファージは、グラム陰性、陽性に関係なく、すべての細菌に有効である。また、ファージの遺伝子改変のために、CRISPR-Cas システムを用いた新たな組み換えプラットフォームについても検討を行なった。

## 3. 研究の方法

本研究は下記の通り大きく 3 つのパートに分かれる。

### 1) 大腸菌ファージ T7 を用いて、*trx* 依存的な相同組換え法による *InqQ*-T7 の作製 (図 2)

まず大腸菌を宿主とする既知の溶菌ファージである T7 ファージと、すでに構造や抗菌スペクトルが解明されている LLB である lacticinQ (*LnqQ*) を用いて *InqQ*-T7 ファージの作製を行った。相同組換えにより *InqQ* 遺伝子をファージ DNA に組み込んだ後、T7 ファージが菌体内で自己複製を行えない大腸菌 *trxA* 欠損株を用いて、*InqQ*-T7 ファージの単離を行った。ここでは、相同組み替えの際に、*InqQ* 下流に *trxA* 遺伝子も同時に *InqQ*-T7 ファージに導入されるため、*InqQ*-T7 ファージのみ *trxA* 欠損株でも感染、自己複製が行えることになる。

### 2) CRISPR-Cas9 ゲノム編集システムによる腸管出血性大腸菌 LLB ファージの作製 (図 3)

*trxA* 欠損株を利用した組み換え方法は T7 ファージに特化した手法であり、その他のファージのゲノム編集には、より汎用性の高い手法が必要となる。そこで、CRISPR-Cas9 システムを利用して腸管出血性大腸菌 O157:H7 株に感染するファージ ECP52 に *LnqQ* と aureocin A53 (*AucA*) の構造遺伝子の導入をおこなった。また、構造遺伝子だけでなく、その上流にファージ由来のプロモーター配列を配置することで、プロモーターの種類によって LLB 産生、溶菌活性がどのように変化するかなどについても検討を行った。

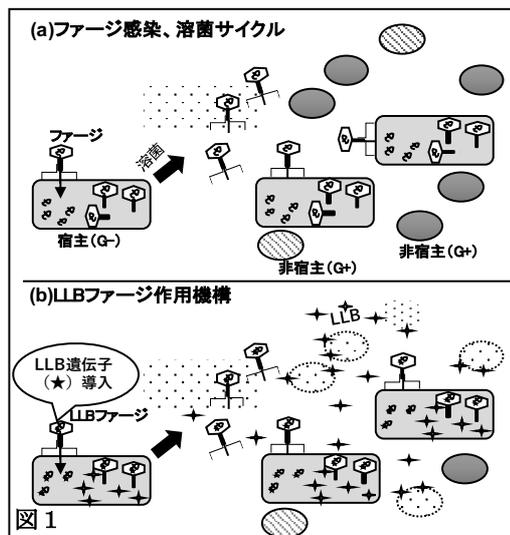


図 1

3) CRISPR-Cas10 ゲノム編集システムによる多剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) LLB ファージの作製 (図4)

MRSA を標的とした LLB ファージの作成を目的として、CRISPR-Cas10 ゲノム編集システムを *Staphylococcus aureus* RN4220 株を用いて構築し、MRSA 溶原ファージである PSARa に InqQ の導入をおこなった。また、構築できた編集システムを利用して、PSARa ゲノム内に存在する推定溶原関連遺伝子を除去することで溶菌ファージへと変換させるという試みも行った。

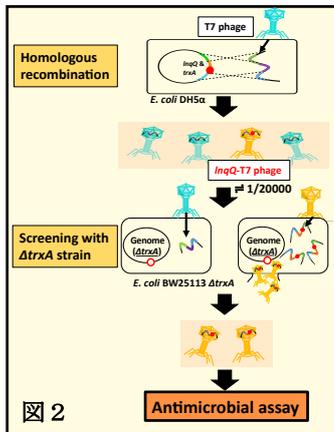


図 2

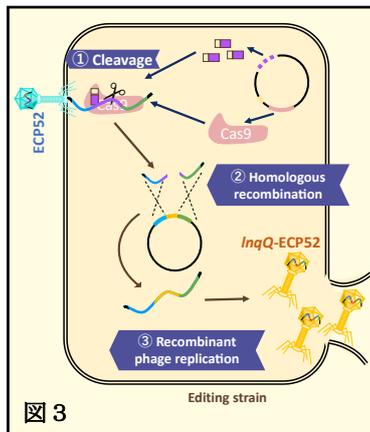


図 3

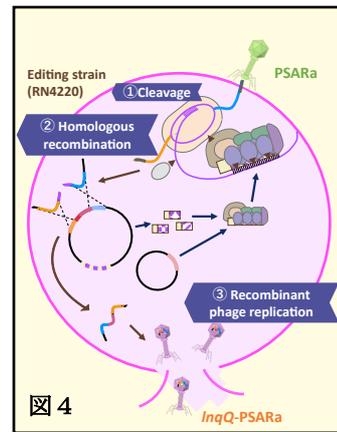


図 4

4. 研究成果

1) *InqQ-T7*

*trxA* 欠損株を用いたファージゲノム組換え手法を駆使して世界初の LLB ファージとなる *InqQ-T7* の作製に成功した。ファージ宿主菌である *E. coli* BW25113 と、*InqQ* 感受性菌である *B. coagulans* NBRC 12714 を共培養し、*InqQ-T7* を感染させプラーク形性能を評価したところ、T7 のプラーク内に確認された *B. coagulans* の生育も阻害されてクリアな阻止円が形成されており、*InqQ* の産生が確認できた (図 5)。また、ファージと宿主菌を感染させ、0~24 時間の間で経時的に生菌数測定を行ったところ、T7 ファージでは 24 時間後に  $10^4$  CFU/mL の菌の増殖、即ち耐性化が確認された。一方、*InqQ-T7* ファージでは菌の増殖は確認できなかったため、*InqQ* 産生による溶菌力の向上が、宿主細菌の耐性化を抑えることが示された (図 6)。これらの内容に関しては 2021 年に *Microbiology Spectrum* に掲載された。

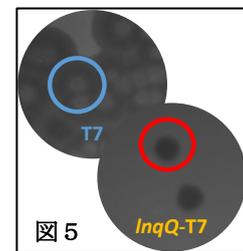


図 5

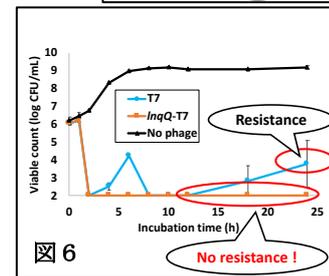


図 6

2) LLB-ECP52s

ECP52 ゲノムを標的とし切断する CRISPR-Cas9 発現用のプラスミドと、切断されたゲノムが修復される際に起こる相同組換えのドナー用に、5 種類の LLB フラグメントを組み込んだドナープラスミドを構築し、組換えと同時に LLB-ECP52 のスクリーニングを行った結果、*InqQ-ECP52* (*L-ECP52*)、*P<sub>hol</sub>-InqQ-ECP52* (*P<sub>hol</sub>-L*)、*P<sub>hol</sub>-InqQ-*aucA*-ECP52* (*P<sub>hol</sub>-LA*)、*P<sub>end</sub>-InqQ-ECP52* (*P<sub>end</sub>-L*)、*P<sub>end</sub>-InqQ-*aucA*-ECP52* (*P<sub>end</sub>-LA*) の 5 種類の LLB-ECP52 の作製に成功した。2 検定菌プラークアッセイの結果、*L-ECP52* と *holin* プロモーターを含む *P<sub>hol</sub>-L* では明瞭な阻止円が確認できず、*InqQ* の産生が不十分であることが示された。一方、*endolysin* プロモーターを含む *P<sub>end</sub>-L* では *InqQ* 産生能が向上していた。さらに、両プロモーター下流に 2 種類の LLB を導入した *P<sub>hol</sub>-LA* と *P<sub>end</sub>-LA* では非常に明瞭な阻止円が確認されたことから、プレート上での十分な LLB 産生によるグラム陽性菌への抗菌活性が確認された。さらに、宿主である O157:H7 株に対するそれぞれの抗菌活性を調べたところ、*P<sub>hol</sub>-L*、*P<sub>hol</sub>-LA* および *P<sub>end</sub>-L* において元の ECP 52 と比較して 100 倍ほどの抗菌活性の向上が確認された。これらの研究結果については R4 年 4 月現在で投稿論文を執筆中である。

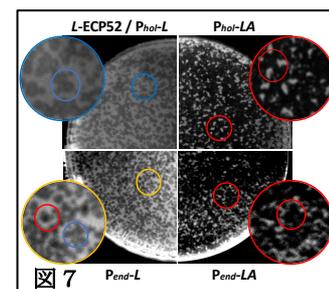


図 7

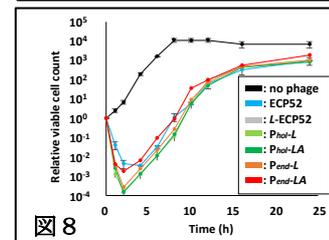


図 8

### 3) *InqQ*-PSARa と *InqQ*-vPSARa

黄色ブドウ球菌 RN4220 株を用い、CRISPR-Cas10 を利用したファージゲノム編集システムの構築及び、これを用いて、LLB ファージである *InqQ*-PSARa の構築を行った。さらに、CRISPR-Cas10 システムを利用し、PSARa 及び *InqQ*-PSARa の溶原化関連遺伝子を欠損させた。結果、*InqQ*-PSARa 及び、溶原化関連遺伝子欠損株 4 株 (PSARa-v 'mCherry、*InqQ*-PSARa-v 'mCherry、PSARa-v 'InqQ、*InqQ*-vPSARa) の構築に成功した。構築した *InqQ*-PSARa 等については、スポット法によって、宿主ではない *Bacillus coagulans* に対する明らかな抗菌活性も確認されたことから、*InqQ* 産生が確認された (図 9)。一方で、宿主ゲノム内に溶原化してしまい、抗菌効果がなくなってしまうことについては依然解決できていなかった。そこで、溶原化関連遺伝子欠損株を 4 株作成し液体培地中での抗菌活性評価を行ったところ、*lexA*、*intQ* を含む 4 つの推定溶原化関連遺伝子を欠損させた株 *InqQ*-vPSARa について、溶原化の抑制が確認され、MRSA 株に対しても抗菌活性が向上していることが確認された (図 10)。



図 9

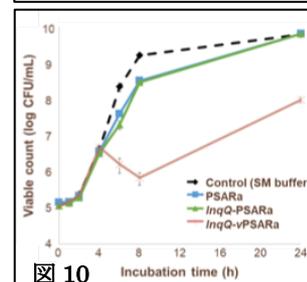


図 10

本研究にて構築した CRISPR-Cas9 や CRISPR-Cas10 システムを利用すれば、容易にファージゲノムへの目的遺伝子の導入、及びファージゲノム上の様々な遺伝子を欠損させることが可能である。また、本システムはゲノム編集箇所となる標的配列に制限が少なく、比較的自由にファージゲノムをデザインすることができるため、上記のような LLB ファージの構築や改良、あるいはファージゲノム上の遺伝子の機能解明等、幅広い目的での利用が期待される。また、本研究にて、それぞれ異なる細菌種を宿主とする LLB ファージの作製に成功したが、今後はさらに宿主や、産生させる LLB の異なる多様な LLB ファージを作製されていくことが期待され、これらを組み合わせることで使用することにより、さまざまな用途に応じた LLB ファージカクテルの利用も可能になり、薬剤耐性菌を含めた食中毒細菌に対する優れた制御法として、今後大いに期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masuda Yoshimitsu, Kawabata Shun, Uedoi Tatsuya, Honjoh Ken-ichi, Miyamoto Takahisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Construction of Leaderless-Bacteriocin-Producing Bacteriophage Targeting E. coli and Neighboring Gram-Positive Pathogens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e00141-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/Spectrum.00141-21	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshimitsu Masuda, Shun Kawabata, Hen-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Construction of leaderless bacteriocin producing phage
3. 学会等名 FEMS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川畑諄、益田時光、本城賢一、宮本敬久
2. 発表標題 リーダーレスバクテリオシン産生ファージの構築
3. 学会等名 （公社）日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshimitsu Masuda, Shun Kawabata, Tatsuya Uedoi, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Construction Of Leaderless-bacteriocin-producing Phage To Control Both Gram-negative And -positive Pathogenic Bacteria
3. 学会等名 WORLD MICROBE FORUM（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 益田時光、川畑淳、上土井達哉、本城賢一、宮本敬久
2. 発表標題 リーダーレスバクテリオシン産生バクテリオファージの構築
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下慧斗、井門さら、上土井達哉、益田時光、本城賢一、宮本敬久
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌を標的宿主とするaureocin A53 産生ファージの構築
3. 学会等名 (公社)日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井門さら、木下慧斗、益田時光、本城賢一、宮本敬久
2. 発表標題 CRISPR -Cas10 システムによる、黄色ブドウ球菌を標的宿主としたLLB ファージの構築とその利用
3. 学会等名 (公社)日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上土井達哉、川畑淳、益田時光、本城賢一、宮本敬久
2. 発表標題 病原性大腸菌を標的宿主としたリーダーレスバクテリオシン産生ファージの構築とその利用に関する研究
3. 学会等名 (公社)日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	宮本 敬久  (Miyamoto Takahisa)	九州大学・農学研究院・教授  (17102)	
研究協力者	本城 賢一  (Honjoh Ken-ichi)	九州大学・農学研究院・准教授  (17102)	

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