

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03723

研究課題名(和文) ファージの単離を経ない次世代ファージバイオロジクスの創出

研究課題名(英文) Creation of next-generation phage biologics without phage isolation

研究代表者

安藤 弘樹 (Ando, Hiroki)

岐阜大学・大学院医学系研究科・特任准教授

研究者番号：70462786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：ファージそのものを単離せずに、ファージが持つ溶菌遺伝子を選別単離し、これを改変してファージセラピーに応用することを目指した。これは標的細菌上でプラークを作る(単離できる)ファージが必ずしも強い溶菌酵素をコードしているわけではないという仮説に基づくものである。データベースから188のファージ由来抗菌遺伝子を抽出し、合成、クローニング、発現、殺菌性評価を実施した。複数のリード溶菌遺伝子を選抜し、ファージセラピーへの応用を目指した研究を展開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬開発研究において、機能的な抗菌遺伝子を取得するための新しい手法を示すものである。本手法が真に有用なのか、汎用性があるのかを判断することは現時点ではできず、研究の進展と第三者による実施検討を待たねばならない。得られた有用抗菌遺伝子は、薬剤耐性細菌感染症や有効な抗菌薬がない難治性細菌感染症を治療・予防できる可能性がある。世界的な薬剤耐性感染症問題の解決にも資するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to select phages' anti-bacterial lysins without isolating the phage itself, engineer, and use for the phage therapy. This is based on the hypothesis that phages that form plaques on target bacteria (and can be isolated) do not necessarily encode a strong lysin gene(s). Sequence information of 188 lysin-like genes was extracted from the database and gene synthesis, subcloning, expression, and lytic activity evaluation were performed. Several lead lysin genes were selected and conducted research aimed at applying them to phage therapy.

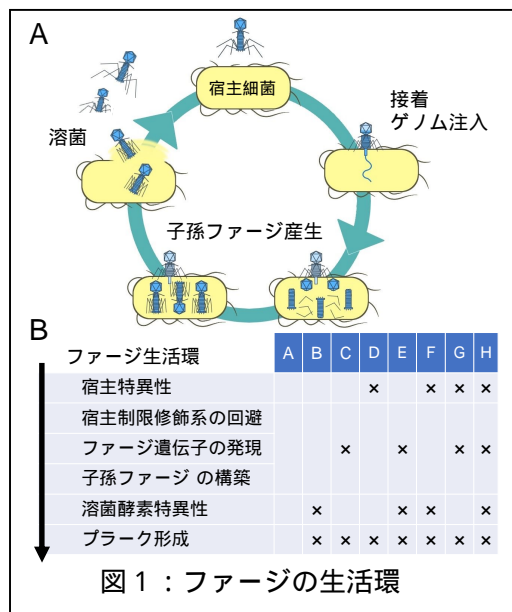
研究分野：合成生物学、分子遺伝学、細菌学

キーワード：バクテリオファージ 合成生物学 ファージセラピー ファージ療法 薬剤耐性細菌感染症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性細菌感染症に対する新しい治療法として、ファージセラピーが注目されている。実用化に向けた基礎研究・応用研究が世界的に盛り上がりを見せている。ファージセラピーのアプローチは三つに大別できる。一つ目は、標的細菌を効率的に殺菌できるファージを自然環境からスクリーニングし、ファージそのものを利用するというもの。二つ目は、こうして単離されたファージが持つ溶菌酵素を精製して利用するというもの。三つ目は比較的新しいアプローチで、遺伝子組換え型ファージを利用するというものである。これらの三アプローチには標的細菌を殺菌できるファージを単離しなければならないという共通点がある。ファージを単離するためには、寒天培地上に生育させた標的細菌の上でプラーク（溶菌斑）を形成させる必要があり、図 1A に示すように生活環を回すことのできるファージしか単離することができない。言い換えると、仮に接着効率、子孫ファージ産生効率が高くても、溶菌活性を十分に発揮できなければファージはプラークを形成することができない。これは生活環におけるあらゆる段階で言えることである（図 1B）。本研究では、前述の三アプローチにおける二つ目、溶菌酵素を使うアプローチに着目した。ファージとしての活性の強さとそのファージが持つ溶菌酵素の強さは必ずしも一致せず、ファージの単離を経ることによって、より活性の強い有用な溶菌酵素を逃している可能性がある（図 1B の CDG）。この問題を解決する新しいアプローチとして、ファージの単離を経ずに有用な溶菌酵素を取得・改変・評価できるプラットフォームを確立したい。



### 2. 研究の目的

ファージを単離することなく、有用なファージ由来溶菌酵素を取得し、必要に応じて改変し、その溶菌性を評価できる実験系を構築すること。

### 3. 研究の方法

ここには本研究開始時の計画を記した。

#### (1) 概念実証実験

##### (1)-1 条件設定

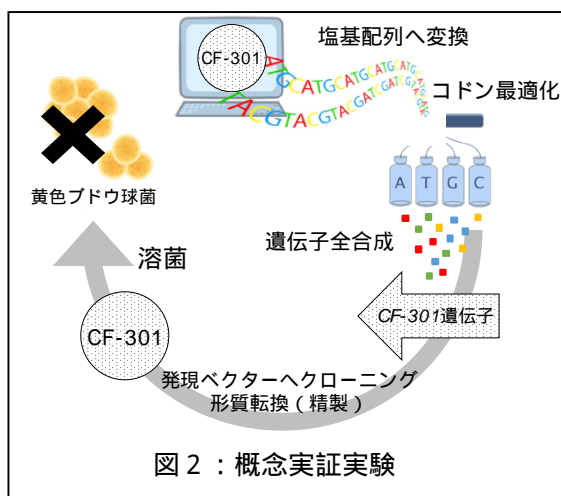
概念実証実験の対象として、溶菌酵素 CF-301 と黄色ブドウ球菌標準株 (RN4220 株) を選定した。これらを選んだ理由は、以下のように本研究の概念を実証するのに適した条件が揃っているからである。

- ・ CF-301 遺伝子または CF-301 遺伝子をコードするファージを保有していない。
- ・ CF-301 は豚レンサ球菌の溶原ファージに由来するものであり、標的である黄色ブドウ球菌に感染するファージに由来するものではない。
- ・ CF-301 は 2018 年現在で臨床試験第 2 相 (フェーズ 2) へ進んでいる唯一の溶菌酵素であり、標的となる菌株が同定されている (RN4220 株が含まれる)。
- ・ CF-301 遺伝子の塩基配列は公開されていないが、アミノ酸配列は公開されている。

##### (1)-2 実証実験

CF-301 は 245 アミノ酸残基からなる溶菌酵素である。塩基配列は公開されていない。そこで、

CF-301 遺伝子を得るために公開されているアミノ酸配列を適切な塩基配列へ変換する。CF-301 遺伝子が大腸菌内で発現させるため、コドンを最適化する。一連の作業は、Geneious ( Biomatters ) と GeneArt GeneOptimizer ( Thermo Fisher Scientific ) を用いて行う。コドン最適化 CF-301 遺伝子を化学合成する。次に、合成 CF-301 遺伝子を誘導型発現ベクターへクローニングする。これを適切な大腸菌へ導入し、適切な条件下で過剰発現させる。大腸菌を超音波等で破碎し、CF-301 を含む上清を寒天培地上に生育させた黄色ブドウ球菌 RN4220 株へ滴下し、溶菌活性を観察する(図2)。これをもって概念実証実験としたいと考えているが、必要に応じてCF-301 遺伝子の上流もしくは下流にHisタグ等を付加し、精製 CF-301 の溶菌性評価を実施することも検討する。



## (2) ファージバイオロジクス創出プラットフォームの確立

### (2)-1 標的細菌の選定

メチシリン耐性株、バンコマイシン耐性株を含む黄色ブドウ球菌を選んだ。グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌は溶菌酵素の影響を観察しやすく、また、メチシリン耐性株とバンコマイシン耐性株はWHOが指定する「深刻な脅威」であり、標的として魅力的である。

### (2)-2 溶菌遺伝子情報の抽出とハイスループットスクリーニング

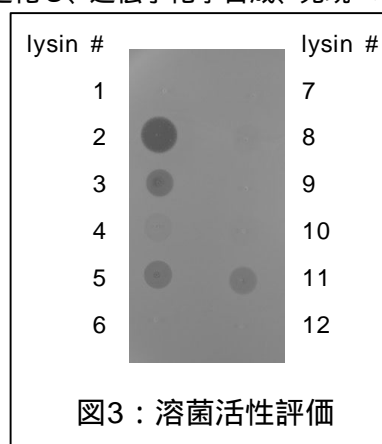
国際塩基配列データベース(DDBJ, GenBank, EMBL)に登録されているファージゲノムや溶菌酵素遺伝子の数は膨大である(2019年10月16日現在、GenBankにおける「endolysin」の検索で84,168 CDSs)。本研究では、データベースの中からグラム陽性菌ファージの配列を検索・抽出し、アミノ酸配列もしくは高次構造の相同性において系統的に離れているものをできる限り多く選出する。解析にはPhyreや前出のGeneious等を用いる。選出した遺伝子は(1)-2と同様に大腸菌内発現用にコドンの最適化を行ったうえで化学合成する。以下の作業は基本的に(1)-2と同じであるが、形質転換後のプレージングを除き、一連の作業は全て96ウェルプレートを用いてハイスループットに行う。溶菌酵素を含む大腸菌破碎液上清を寒天培地上に生育させた標的細菌へ滴下し、溶菌活性を観察する。

申請時の計画ではこのあと溶菌遺伝子の改変及びファージセラピー実験を予定していたが、後述の通り遅延が生じたため実施することができなかった。

以上の研究から、溶菌遺伝子の化学合成から *in vitro* での殺菌性評価までをハイスループットに実施できる系を確立し、ファージの単離を経ずに有用な溶菌酵素を得られることを実証する。

## 4. 研究成果

概念実証実験の対象及びその後の陽性対照としてCF-301 遺伝子を選択し、データベースに登録されているアミノ酸配列を塩基配列へ変換した。コドンを最適化し、遺伝子化学合成、発現ベクターへのクローニング、大腸菌株への導入までは順調に進んだ。しかし、当初想定したような溶菌性を確認することができなかった。CF-301が黄色ブドウ球菌RN4220株を溶菌することは実証されているため、発現ベクターを変え、条件検討を実施した。最終的に溶菌活性を確認できたものの時間を要し、以後の実験計画を変更した。データベースから溶菌遺伝子候補として188 ORFを抽出し、CF-301と同様の流れで大腸菌株へ導入した。最終的にRN4220株と25株の臨床分離株(薬剤耐性株を含む)計26株に対する溶菌性評価を実施した(図3:黄色ブドウ球菌臨床分離株に対して溶菌酵素を含む細胞粗抽出液を滴下した。丸く抜けているのは溶菌酵素によって殺菌されていることを示している)。その結果、3遺伝子産物が25株に対して溶菌性を示した。用いた臨床分離株



は系統的に離れたものであり、これらの遺伝子産物は広域殺菌性を持つ可能性が示唆された。特異性については精査が必要であるが、調べた限りにおいて、複数他種のグラム陰性菌、グラム陽性菌、抗酸菌に対して溶菌性を示さなかった。溶菌性評価は細胞粗抽出液を用いて実施したため、薬効を厳密に知るためには精製リコンビナント溶菌酵素を用いる必要がある。不溶性画分への移行による精製の難しさがあったが解消されつつあり、精製物を用いた溶菌性評価とファージセラピー実験を計画している。本研究を継続し、当該手法の有用性の証明と溶菌酵素を用いたファージセラピーの実用化を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------