

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16557

研究課題名(和文) 遺伝子標的型殺菌キメラファージを用いた遺伝子変異の簡易検出法の開発

研究課題名(英文) Development of a Simple Detection Method for Genetic Mutations Using Gene-Targeted Bactericidal Chimeric Phages

研究代表者

相羽 由詞 (Aiba, Yoshifumi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：60783694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸の増幅を必要としない細菌遺伝子変異の簡易検査法の確立を目指した。モデル遺伝子にカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌が持つIMP-1とIMP-6の1塩基相違を用いた。合計56種類のガイドRNAを合成し、CRISPR-Cas13aの配列特異的な認識による殺菌効果を評価した。最も感度が高いガイドRNA配列は10の-6乗以上の増殖を有意に抑制した。しかし、抑制効果がない配列も存在した。そのため、ガイドRNAを慎重に設計することで、僅か1塩基の相違を認識できることを見出した。本研究は、臨床現場で鑑別が困難な耐性遺伝子の検出のみならず、毒素遺伝子検出や感染症対策の分子疫学ツールとして応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、核酸の増幅を必要としない細菌遺伝子変異の簡易検出法の確立である。本研究を通じて、CRISPR Cas13aの設計を工夫することで、標的遺伝子が持つ1塩基の相違を感度良く鑑別できることを明らかにした。しかし、設計したCRISPR Cas13aをファージに搭載技術には、回収量を向上させるためのさらなる検討が必要である。本課題の技術は、検体細菌と構築した殺菌キメラファージを共培養後に細菌の生死を目視確認のみで鑑別ができる。薬剤耐性菌の克服に向けて、細菌感染症の治療に資する薬剤耐性菌の早期検出や感染制御対策の日常的な環境調査に実装することができる簡易検査法になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We establish a simple method to detect bacterial gene mutations that does not necessitate nucleic acid amplification. We utilized a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) between IMP-1 and IMP-6 of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae as a model system. A total of 56 guide RNAs were synthesized and assessed for CRISPR-Cas13a's sequence-specific recognition of the model gene's SNP. A significant bactericidal activity (ten power to six) was seen in the best of the guide RNA. Conversely, a certain number of guide RNA showed no bactericidal effects. This indicates the requisite for optimized guide RNA designs. By using meticulously optimized guide RNA, we were able to distinguish the SNP at a specific position in the target gene. This method is not just suitable for detecting resistance genes that are difficult to detect in the present clinical setting, yet it can also be extended to detect toxin genes as well as a suitable molecular epidemiology tool for infectious disease control.

研究分野：細菌学

キーワード：簡易検査法 薬剤耐性菌 CRISPR-Cas13a バクテリオファージ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌を克服するためには、迅速かつ正確な耐性菌の検出が必要不可欠である。耐性菌の抗菌薬耐性化は外来性耐性遺伝子の獲得や自己遺伝子の変異により発生する。さらに、臨床現場では、耐性遺伝子を保有しながらも薬剤感受性試験において感性を示す『ステルス型耐性菌』が存在する。臨床検査室において、獲得性耐性遺伝子の検査は核酸の増幅を伴うPCR法などで実施可能であるが、遺伝子変異の検出は塩基配列の決定を必須とするため、日常的な検査での実施は現実的ではない。また、従来の遺伝子検査は、熟練した技術や導入のために高額な費用が必要となる<sup>1</sup>。そのため、遺伝子検査の重要性を理解しつつも、日本国内において耐性遺伝子の検出を実装している医療施設は20%程度である<sup>2</sup>。

申請者が所属する研究室では、核酸の増幅を必要としない簡便な細菌遺伝子の検査法を開発している。この技術は、RNA 標的型 CRISPR-Cas13a が持つ、配列特異的な認識により Cas13a 酵素が宿主細菌内の RNA を分解する機能を応用した<sup>3,4</sup>。申請者らは本法を用いた耐性遺伝子の鑑別に成功している<sup>5,6</sup>。さらに、CRISPR-Cas13a は標的遺伝子の塩基配列に対して極めて完璧な配列相同性を要求するため、1塩基の相違(SNP)を識別する能力があると考え、本研究に着手した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、薬剤耐性菌問題の解決に資する簡易かつ高精度な細菌遺伝子変異検出法の確立である。申請者らは、これまでに本技術が高感度に耐性遺伝子を検出できることを見出している。この鑑別能力を生かして、細菌遺伝子の1塩基の相違を鑑別できる細菌の遺伝子変異の簡易検出法の確立を目指した。本法は、検体細菌と CRISPR-Cas13a を搭載したバクテリオファージを混合して増殖の有無を目視判定するだけである。そのため、遺伝子導入に関わる煩雑な操作や高額な導入費の負担を取り除ける、簡易遺伝子検出法の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 変異検出モデル遺伝子

『1塩基』の相違を検出できるガイド RNA の作製するために、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌が持つ IMP-1 と IMP-6 遺伝子をモデル遺伝子として用いた。両者の遺伝子配列の違いは、640番目の A が G に変わる『1塩基』の相違である(図1)。

#### (2) ガイド RNA の探索と選定

モデル遺伝子の塩基の違いを鑑別するために、標的の変異位置が異なる様々な特異的配列を合計56種類設計した。また、ガイド RNA の最適な塩基数を検証するために、12-32 nt のガイド RNA を作製した(図2)。

#### (3) ガイド RNA の特異的配列の認識による殺菌効果の評価

作製したガイド RNA の殺菌効果の評価するために、標的遺伝子である IMP-1 と IMP-6 遺伝子を持つ大腸菌を構築した。また、作製したガイド RNA 配列を持つプラスミドを導入し、生菌数を測定することで評価した(図3)。

#### (4) 殺菌キメラファージの作製

モデル遺伝子である IMP-1 と IMP-6 の1塩基の相違を識別できる殺菌キメラファージを作製するために、Cas13a とパッケージ機能を結合させ、ファージミドを持つ菌を作製した。そこに、ファージの合成に必要なヘルパーファージを感染させることで、特異的配列を識別する CRISPR-Cas13a 搭載した殺菌キメラファージを作製した。

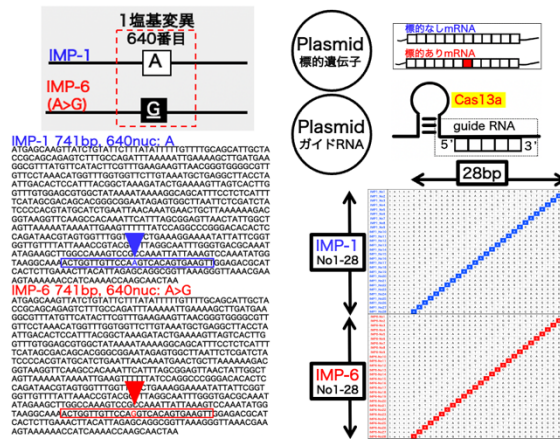


図1: 変異検出モデル遺伝子

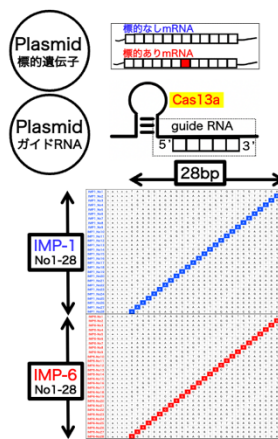


図2: ガイドRNA配列の探索と特定

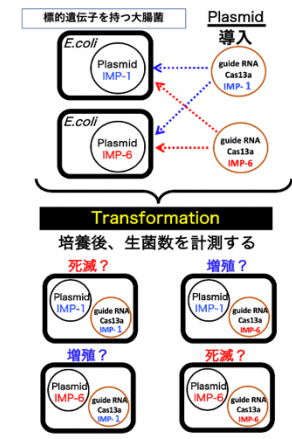
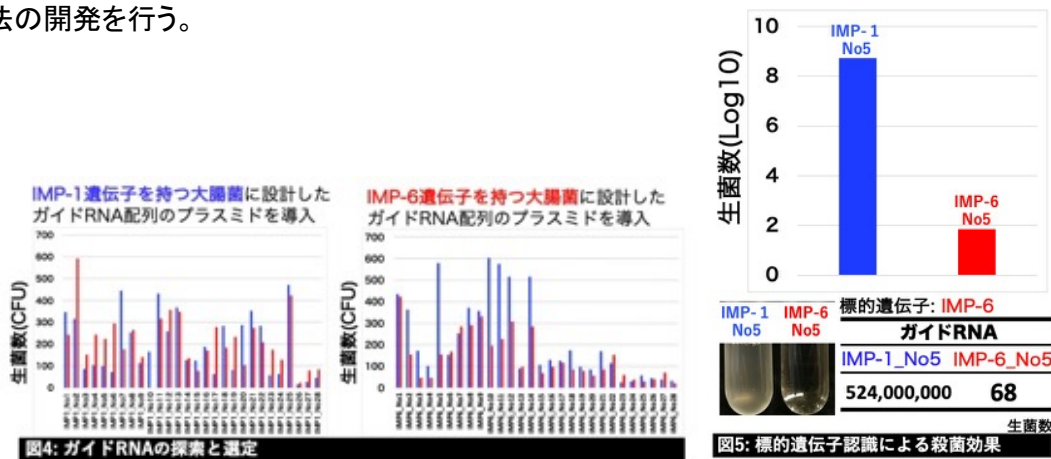


図3: ガイドRNAの殺菌効果の評価

#### 4. 研究成果

- (1) 申請者が所属する研究室では、配列特異的に認識して殺菌することができる CRISPR-Cas13a と細菌を宿主とするウイルスであるバクテリオファージを組み合わせた新しい抗菌薬治療法の開発研究を進めている。既に、本システムを用いて、薬剤耐性遺伝子を認識することに成功したが、標的遺伝子が1塩基の変異の場合、本システムが特異的配列を認識することができるか不明であった。
- (2) そこで申請者は、カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌が持つ IMP-1 と IMP-6 遺伝子をモデル遺伝子として1塩基の相違を認識することができるか検証した。1塩基相違の配列 28 nt について合計 56 種類ガイド RNA 配列を作製した。
- (3) 設計したガイド RNA は、標的遺伝子を持つ大腸菌に対して CRISPR-Cas13a とそれぞれのガイド RNA を持つプラスミドを導入し、培養後の生菌数を測定することで評価した。その結果、殺菌効果の差異が認められない配列も多数存在していたが、工夫して設計することにより 56 種類のガイド RNA 配列の中で、IMP1\_No5 と IMP6\_No5 が最も高感度に1塩基の違いを識別することを明らかにした(図4)。
- (4) さらに、ガイド RNA の最適化を図るために、塩基数を 12-32 nt に設計し、どの塩基数がより高精度に特異的配列を認識することができるか検証した。ガイド RNA の塩基数が 12-18 nt では標的配列を認識することができず、殺菌効果はめられなかった。その一方で、28 nt に設計したガイド RNA がより高精度に特異的配列を認識する、高感度に1塩基の相違を検出できるガイド RNA を選定できた(図5)。
- (5) 本研究の今後の展開として、上記4)で選定した高感度ガイド RNA を持つ CRISPR-Cas13a を適したバクテリオファージに搭載し、IMP-1 と IMP-6 遺伝型を鑑別する遺伝子検査方法を開発する。更には、本技術を利用して細菌の様々な遺伝子変異を検出する検査方法の開発を行う。



#### <引用文献>

- ① Baron, E.J *et al.*, A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. (2013) 57, 4, e22-e121.
- ② 柳原 克紀ら., 遺伝子検査の導入による新しい感染症診療, 日本化学療法学会雑誌. (2018) 66, 6, 729-737.
- ③ Shmakov S *et al.*, Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. Mol Cell. (2015) 60, 3, 385-97.
- ④ Abudayyeh O *et al.*, RNA targeting with CRISPR-Cas13. Nature. (2017) 550, 7675, 280-284.
- ⑤ K Kiga *et al.*, Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. Nat Commun. (2020) 11, 1, 2934. doi: 10.1038/s41467-020-16731-6.
- ⑥ S Watanabe *et al.*, Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a systems in the genus Leptotrichia. Front Microbiol. (2019) doi:10.3389/fmicb.

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 0件）

1. 著者名 Kotaro Kiga, Xin-Ee Tan, Rodrigo Ibarra-Chavez, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Yusuke Sato'o, Feng-Yu Li, Teppei Sasahara, Bintao Cui, Moriyuki Kawauchi, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, Yusuke Taki, Aa Haeruman Azam, Masato Suzuki, Jose R Penadess, Longzhu Cui	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2934 - 2944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16731-6.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相羽由詞, Kanate Thitianapakorn, 相羽由詞 氣駕恒太郎, 渡邊真弥, 佐藤祐介, XinEe Tan, Tanit Boonsiri, 李峰宇, 崔 龍洙
2. 発表標題 CRISPR-Cas13a 搭載ファージを用いた細菌ゲノム変異の検出
3. 学会等名 第93回日本細菌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李 峰宇, 氣駕 恒太郎, Xin-Ee Tan, 渡邊 真弥, 佐藤 祐介, 相羽 由詞, Kanate Thitianapakorn, 瀧 雄介, 笹原 鉄平, 崔 龍洙
2. 発表標題 Generation of phagemid- based CRISPR- Cas13 antimicrobials against MRSA
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会（岡山_オンライン）
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
---------------------------	-----------------------	----

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