

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20894

研究課題名（和文）Establishment of a novel identification system for Enterotoxigenic Bacteroides fragilis using CRISPR-Cas13 and bacteriophage technology

研究課題名（英文）Establishment of a novel identification system for Enterotoxigenic Bacteroides fragilis using CRISPR-Cas13 and bacteriophage technology

研究代表者

Nguyen・Minh・Thuy（Nguyen, Thuy）

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：20964191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本申請では、配列特異的な殺菌活性を持つ抗菌カプシドを用いて、標的遺伝子である bft 遺伝子陽性のエンテロトキシン産生 Bacteroides fragilis (ETBF) の簡易検出法の確立を目指した。臨床分離 B. fragilis 310 株からマイトマイシンを用いた溶原性ファージ誘発した。臨床分離 B. fragilis 73 株に対して 1.36 から 5.47% の宿主感染域を示すファージ 5 個を分離した。ファージ同定は、TEM による形態観察と全ゲノム配列により実施した。また、bft 遺伝子を標的とした合計 39 個のガイド RNA を設計した。現在、抗菌カプシド構築法と標的細菌の鑑別法の最適化を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、配列特異的な抗菌カプシドを用いて標的遺伝子である bft 遺伝子を持つ ETBF のみを、迅速かつ安価に鑑別できる簡易検出法の確立である。申請者は、配列特異的な抗菌カプシドを構築するために、臨床分離 Bacteroides fragilis の細菌ゲノム上から効率的にプロファージ（溶原性ファージ）の誘発法を確立した。本技術は、核酸の増幅を必要としない検体細菌に構築した抗菌カプシドを共培養することで細菌の生死を黙示確認するのみで鑑別できる。この技術は、特別な装置や煩雑な手技が不要であるため、技術導入の負担が少なく幅広い医療機関で導入できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a simple method for detecting enterotoxin-producing Bacteroides fragilis (ETBF) positive for the target gene bft gene by using an antibacterial capsid with sequence-specific bactericidal activity. We performed a lysogenic phage induction test using mitomycin C on 310 clinically isolated B. fragilis strains. We isolated five strains with a host infection range of 1.36% to 5.47% against 73 clinically isolated B. fragilis strains. To identify the phages obtained, we performed morphological observation by TEM and determined the whole genome sequence. In addition, we designed a total of 39 guide RNAs targeting the bft gene and compared their bactericidal activities. We are currently working on optimizing the antibacterial capsid construction method and the evaluation method for distinguishing the target bacteria.

研究分野：細菌学

キーワード：CRISPR-Cas13a Bacteriophage gut microbe Bacteroides fragilis Identification

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

当研究室では、細菌に感染するバクテリオファージ(ファージ)と標的遺伝子を認識し、殺菌できるCRISPR-casシステムを組み合わせた、新しい抗菌剤の開発を進めている。そこで申請者は、新しい抗菌剤である配列特異的抗菌カプシドを用いて薬剤耐性遺伝子を迅速かつ容易に検出できる検査法が確立できると考えた。この技術は、非常に高精度に遺伝子配列を認識できるため、迅速かつ簡便な標的細菌の検出法を書き立てできると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸の炎症性下痢および大腸がんへの関与が知られているエンテロトキシン産生 *Bacteroides fragilis* (ETBF) の迅速かつ簡易な検出法の確立である。申請者は、新しい抗菌剤である AB カプシドが非常に高精度に遺伝子配列を認識して殺菌する技術を応用している。本申請の技術は、核酸増幅が不要であり、通常の細菌培養設備のみで実施できる簡易遺伝子検出法の確立を目指している。

3. 研究の方法

1) *Bacteroides fragilis*に感染するプロファージの分離:

臨床分離 *Bacteroides fragilis* 131株に、マイトマイシン Cを用いて細菌ゲノムからプロファージ(溶原性ファージ)の誘発試験を実施した。得られた粗ファージ溶液はクロロホルムで精製し、残存する細菌を除去した。

2) *Bacteroides fragilis* の同定と特性の解明:

臨床分離 *Bacteroides fragilis* 73株を用いて、粗ファージ溶液の宿主感染率を測定した。また、取得したプロファージを同定するために、形態学的同定として透過型電子顕微鏡(TEM)による分離ファージの形態観察を行った。また、ファージの全ゲノム解読により同定した。

3) 標的遺伝子を認識するガイドRNA配列の探索と最適化:

エンテロトキシン産生 *Bacteroides fragilis* (ETBF) には、*bft1*, 2および3の3種類の *bft* 遺伝子がある。*bft* 遺伝子を認識するガイドRNAを設計するために、3種類の *bft* 遺伝子配列をマルチアラインメントし、共通配列を持つ15~30 bpの塩基配列を選択した。

4) *Bacteroides fragilis*を簡易検出できる抗菌カプシドの構築:

研究室で確立したABmカプシド構築方法を応用することで、*Bacteroides fragilis*を簡易検出できる抗菌カプシドを構築した。細菌ゲノムに組み込まれた配列を相同組み換えにより削除し、Cas13a配列と最適化されたガイドRNA配列をプラスミドに挿入して置き換えた。さらに、マイトマイシンCを用いて抗菌カプシドの誘導を行い、目的のプラスミドをファージカプシドに搭載した。

5) 抗菌カプシドの殺菌活性評価系の開発：

臨床分離株ETBFを用いて構築した抗菌カプシドの殺菌活性評価法を構築した。まず、マウスの糞便に既知量の臨床分離株ETBFを混合し、ETBF感染モデル糞便を作製した。次に、試験するファージを添加し、培養系およびPCRを用いて生存するETBFの数を測定した。さらに、ETBFをマウスに経口投与してETBF感染モデルマウスを作製した。ETBFの定着を調査した後、試験する抗菌カプシドを複数回経口投与した。選択培地を用いて糞便サンプル中の生菌数を測定し、PCRを用いて生存菌数を評価することで殺菌効果を評価した。

4．研究成果

(1) 抗生物質が効かない薬剤耐性菌の出現と蔓延は世界的な医療問題である。この課題を解決するために、臨床現場では薬剤耐性菌を早期かつ簡易法により検出する技術が求められる。現在、当研究室では、CRISPR-Cas13aシステムを搭載したバクテリオファージを用いて薬剤耐性菌の原因遺伝子を特定できる簡易検査法の開発に取り組んでいる。

(2) 申請者は、臨床的に分離された*Bacteroides fragilis*131株を収集し、マイトマイシンCを用いたプロファージの誘導試験を実施した。

(3) 得られた粗ファージ溶液131試料を用いて、39株のETBF株を含む臨床分離*Bacteroides fragilis*173株を用いて宿主感染範囲を調べた。その結果、宿主感染範囲が1.36%~5.47%のプロファージが5個を獲得した。

(4) 選択された5個のプロファージの同定試験は、透過型電子顕微鏡(TEM)を使用した形態学的観察と、全ゲノム解読により決定した。

(5) 標的遺伝子を認識するCRISPR-casシステムを構築するため、標的遺伝子を認識するガイドRNAを設計し最適化した。ETBF陽性39株の*bft*遺伝子をマルチアラインメントすることで、15個の共通特異的ガイドRNAを設計し、それらの殺菌活性を評価した。

(6) 抗菌カプシドの殺菌活性を評価するために、マウスの糞便にETBFを添加し、さらに分離ファージを加え生菌数を測定した。また、マウスに経口投与する評価系のモデルを構築し、ETBFに感染するファージを用いて添加したETBFの生菌数が減少することを確認した。

(7) 今後の方向性は、最適化したガイドRNAと標的遺伝子を認識するCRISPR-casをファージカプシドに搭載する最適法を確立し、構築した抗菌カプシドの殺菌活性を構築したモデル評価系を用いて比較することで、ETBFの迅速かつ簡便な細菌検出法の確立を目指す。

<引用文献>

1. 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.
2. Watanabe S, ..., Sasahara T, Cui L. Composition and diversity of CRISPR-Cas13a systems. in the genus *Leptotrichia*. *Frontiers in Microbiology* 10, 2838-2850, 2019.
3. Wexler HM. *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Oct;20(4):593-621. doi: 10.1128/CMR.00008-07. PMID: 17934076; PMCID: PMC2176045.
4. Zamani S, Hesam Shariati S, Zali MR, Asadzadeh Aghdai H, Sarabi Asiabar A, Bokaie S, Nomanpour B, Sechi LA, Feizabadi MM. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in patients with ulcerative colitis. *Gut Pathog.* 2017 Sep 15;9:53. doi: 10.1186/s13099-017-0202-0. PMID: 28924454; PMCID: PMC5599888.

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