

研究助成 2020 – 感染症領域 –
研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター
氏 名	氣駕 恒太郎
研 究 テーマ	高い殺菌活性を有する CRISPR-Cas13a を利用した細菌感染制御法の開発

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
 （図表、写真などの貼付を含む）

【研究目的】

耐性菌による年間死者数は 127 万人、耐性菌関連による年間死者数は 495 万人となっており、マラリアやエイズによる死者数をすでに超えている。その一方で、近年は新しい抗菌薬開発が進んでおらず、薬剤耐性菌に起因する感染症の治療はますます困難になっている。この状況を放置しておくと、2050 年には年間 1000 万人の死者が出ると予測されており、早急な対策が必要である。そこで着目したのが CRISPR-Cas13a（後述）である。CRISPR-Cas13a は 2016 年に機能が解明された RNA 分解酵素で、標的 RNA を認識すると RNA 分解酵素の活性部位が露出し、宿主細菌の RNA を無差別に切断することで細菌の増殖を抑制する(図 1 A, Abudayyeh O. O. et al., 2016, Science)。我々が Cas13a の標的認識配列を最適化したところ、**Cas13a は増殖抑制だけでなく殺菌活性も示すことがわかった (Kiga K et al., 2020, Nat Commun)**。さらに Cas13a が抗菌剤として使用できるのではないかと考え、耐性遺伝子を標的に設計した Cas13a をファージの殻に搭載（抗菌カプシドと命名）した。このファージは標的細菌を選択的に殺菌できるため、臨床で問題となっている薬剤耐性菌や毒素産生菌を狙って殺菌できる（特許 6923862 号、PCT/JP2019/16801）。しかし、これらの研究で用いられた LshCas13a (*Leptotrichia shahii* という細菌由来の Cas13a) の殺菌力は既存の溶菌酵素よりも劣っていたため、抗菌剤として開発するには十分でなかった。そこで本研究では Cas13a の殺菌活性を上げることを目指した。

【研究手法・成果】

これまで、CRISPR-Cas13a は、ゲノム編集（RNA 編集）、COVID-19 の検出、siRNA に代わる遺伝子のノックダウン、ウイルスや細菌の殺菌などへの応用が試されてきた。これらの研究で主に用いられてきたのは LshCas13a である。本研究では① *Leptotrichia trevisanii* 由来の Cas13a (LtrCas13a) の殺菌活性が著しく高いことを発見した。特に② in vitro における LtrCas13a の RNase 活性は LshCas13a の 1000 倍程度であった。また本研究では、③ LtrCas13a と LshCas13a の構造解析をクライオ電子顕微鏡にて行い、表面アミノ酸に違いが見られることを確認した。LtrCas13a の殺菌活性をさらに上げるため、④ crRNA (CRISPR-Cas13a 複合体に含まれる小さな RNA) の最適な配列を探索した。最後に、⑤ Cas13a によるファージ防御能を確認した。**LtrCas13a は殺菌力も高いため、ファージに搭載する抗菌遺伝子として非常に有望である**。すでに LtrCas13a は COVID-19 の検出にも応用しており (Shinoda H et al., Commun Biol 2022)、今後さらに応用が拡大していくことが期待される。現在、LtrCas13a を利用した抗菌剤開発、遺伝子検出キットの開発も行っている。

研究助成 2020 – 感染症領域 –

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター
氏	名	氣駕 恒太郎

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引く。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入、投稿中の論文はその旨を記載すること。なお学会のアブストラクトは含めない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。
1	<p>Biological properties of Staphylococcus virus ΦSA012 for phage therapy. Jumpei Fujiki, Tomohiro Nakamura, Keisuke Nakamura, Keita Nishida, Yurika Amano, Yusaku Watanabe, Satoshi Gondaira, Masaru Usui, Masaru Shimizu, Kazuhiko Miyanaga, Shinya Watanabe, Tomohito Iwasaki, <u>Kotaro Kiga</u>, Tomoko Hanawa, Hidetoshi Higuchi, Teiji Sawa, Yasunori Tanji, Yutaka Tamura, Longzhu Cui, Hidetomo Iwano. Sci Rep. 2022 Dec 9;12(1):21297.</p>
2	<p>Automated amplification-free digital RNA detection platform for rapid and sensitive SARS-CoV-2 diagnosis. Hajime Shinoda, Tatsuya Iida, Asami Makino, Mami Yoshimura, Junichiro Ishikawa, Jun Ando, Kazue Murai, Katsumi Sugiyama, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, <u>Kotaro Kiga</u>, Longzhu Cui, Osamu Nureki, Hiroaki Takeuchi, Takeshi Noda, Hiroshi Nishimasu, Rikiya Watanabe Commun Biol. 2022 May 26;5(1):473.</p>
3	<p>The Association Between Onset of Staphylococcal Non-menstrual Toxic Shock Syndrome With Inducibility of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 Production. Yusuke Taki, Shinya Watanabe, Yusuke Sato'o, Xin-Ee Tan, Hisaya K Ono, <u>Kotaro Kiga</u>, Yoshifumi Aiba, Teppei Sasahara, Aa Haeruman Azam, Kanate Thitiananpakorn, Srivani Veerananarayanan, Feng-Yu Li, Yuancheng Zhang, Tomofumi Kawaguchi, Sarah Hossain, Maniruzzaman, Dong-Liang Hu, Longzhu Cui. Front Microbiol. 2022 Mar 14;13:765317.</p>
4	<p>Distribution of Extended-Spectrum β-Lactamase Genes and Antimicrobial Susceptibility among Residents in Geriatric Long-Term Care Facilities in Japan. Dai Akine, Teppei Sasahara, <u>Kotaro Kiga</u>, Ryusuke Ae, Koki Kosami, Akio Yoshimura, Yoshinari Kubota, Kazumasa Sasaki, Yumiko Kimura, Masanori Ogawa, Shinya Watanabe, Yuji Morisawa, Longzhu Cui Antibiotics (Basel). 2021 Dec 29;11(1):36.</p>
	<p>Bacteriophages as Solid Tumor Theragnostic Agents. Srivani Veerananarayanan, Aa Haeruman Azam, <u>Kotaro Kiga</u>, Shinya Watanabe, Longzhu Cui Int J Mol Sci. 2021 Dec 30;23(1):402.</p>
	<p>Bacteriophage Technology and Modern Medicine. Aa Haeruman Azam, Xin-Ee Tan, Srivani Veerananarayanan, <u>Kotaro Kiga</u>, Longzhu Cui Antibiotics (Basel). 2021 Aug 18;10(8):999.</p>

A bacterial small RNA regulates the adaptation of *Helicobacter pylori* to the host environment.

Ryo Kinoshita-Daitoku, Kotaro Kiga, Masatoshi Miyakoshi, Ryota Otsubo, Yoshitoshi Ogura, Takahito Sanada, Zhu Bo, Tuan Vo Phuoc, Tokuju Okano, Tamako Iida, Rui Yokomori, Eisuke Kuroda, Sayaka Hirukawa, Mototsugu Tanaka, Arpana Sood, Phawinee Subsomwong, Hiroshi Ashida, Tran Thanh Binh, Lam Tung Nguyen, Khien Vu Van, Dang Quy Dung Ho, Kenta Nakai, Toshihiko Suzuki, Yoshio Yamaoka, Tetsuya Hayashi, Hitomi Mimuro. *Nat Commun*. 2021 Apr 9;12(1):2085.

1. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ● アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ● 国内外を問わない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2022 年 10 月	Construction of a killer phage capable to eradicate MRSA USA300. Haeruman Azam, Kohei Kondo, Tomohiro Nakamura, Shinjiro Ojima, Longzhu Cui, <u>Kotaro Kiga</u> 第 66 回 日本ブドウ球菌研究会, オンライン
2	2022 年 9 月	「Exploring the applications of engineered bacteriophages for the prevention of bacterial infections」(口頭) <u>Kotaro Kiga</u> 20 回あわじ感染と免疫国際フォーラム, 大阪, 2022 年 9 月 7 日-9 日
3	2022 年 7 月	「ファージを制して感染症を制す」(口頭) <u>氣鷲恒太郎</u> 酪農学園大学 獣医学セミナー 2022 年 7 月 20 日
4	2022 年 4 月	「細菌を翻弄するバクテリオファージ —薬剤耐性菌問題の救世主になり得るのか—」(口頭) <u>氣鷲恒太郎</u> 千葉大学真菌医学研究センター-Monthly セミナー 2022 年 4 月 19 日
5	2021 年 12 月	「バクテリオファージを利用した細菌感染症の治療」(口頭) <u>氣鷲 恒太郎</u> 第 461 回 北里大学獣医学科セミナー <Cutting Edge>, 2021 年 12 月 14 日
6	2021 年 11 月	「クロストーク法による Klebsiella pneumoniae に対する広感染宿主域ファージの分離」(口頭 11、ポスター P11) 佐藤祐介、 <u>氣鷲恒太郎</u> 、渡邊真弥、Tanit Boonsiri、李峰宇、相羽由詞、李俊傑、Azam Haeruman、笹原鉄平、崔龍洙 日本ファージセラピー研究会 第 1 回研究集会, オンライン, 2021 年 11 月 13 日
7	2021 年 11 月	「抗菌カプシドの殺菌活性向上に向けた CRISPR-Cas13a の最適化」(ポスター P15) 西川裕太郎、 <u>氣鷲恒太郎</u> 、渡邊真弥、鈴木貴子、下條誉幸、崔龍洙 日本ファージセラピー研究会 第 1 回研究集会, オンライン, 2021 年 11 月 13 日
8	2021 年 6 月	「バクテリオファージを利用した次世代創薬研究」(口頭) <u>氣鷲 恒太郎</u> iSeminar, オンライン, 2021 年 6 月 23 日

9	2021年5月	「バクテリオファージを用いた疾患治療法の開発」(口頭) 氣駕 恒太朗 千里ライフサイエンスセミナー, オンライン, 2021年5月21日
10	2021年5月	「細菌遺伝子検査用 CRISPR-Cas13 抗菌カプシドの作製条件の最適化」(口頭 O-048) 西川 裕太郎, 氣駕 恒太朗, 渡邊 真弥, 須藤 貴子, 下條 誉幸, 崔 龍洙 第69回 日本化学療法学会総会, オンライン, 2021年5月7日-9日
11	2021年5月	「オキサシリン感性 mecA 陽性黄色ブドウ球菌のオキサシリン耐性化に関わる変異遺伝子の同定と評価」(口頭 O-009) 渡邊 真弥, Kanate Thitiananpakorn, 相羽 由詞, 氣駕 恒太朗, 笹原 鉄平, 崔 龍洙 第69回 日本化学療法学会総会, オンライン, 2021年5月7日-9日
2. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2022年3月発表予定	Haeruman Azam, Kohei Kondo, Tomohiro Nakamura, Shinjiro Ojima, Longzhu Cui, <u>Kotaro Kiga</u> 第96回 日本細菌学会総会, 姫路