

プレスリリース



自治医科大学
Jichi Medical University

報道関係者各位

2024 年 11 月 11 日
自治医科大学
国立感染症研究所

ファージ tRNA による細菌の抗ウイルス防御を打破する新たな殺菌メカニズムの発見
-新たな抗菌治療法への可能性-

1. 概要

自治医科大学医学部感染免疫学講座細菌学部門の崔龍洙教授、国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センターの Aa Haeruman Azam 研究員、国立感染症研究所治療薬・ワクチン開発研究センター（自治医科大学医学部感染免疫学講座細菌学部門 客員教授）の氣駕恒太朗室長らによる共同研究グループは、ファージが tRNA を巧みに利用して殺菌効果を発揮する新たなメカニズムを解明しました。この発見は、ファージ療法のさらなる展開を促し、従来の抗菌薬が効きにくい多剤耐性菌に対する革新的な治療法の実現につながる可能性があります。

本研究の成果は、科学雑誌『Nature Communications』（日本時間 11 月 11 日 19 : 00 時; DOI : 10.1038/S41467-024-53789-Y）に掲載されます。

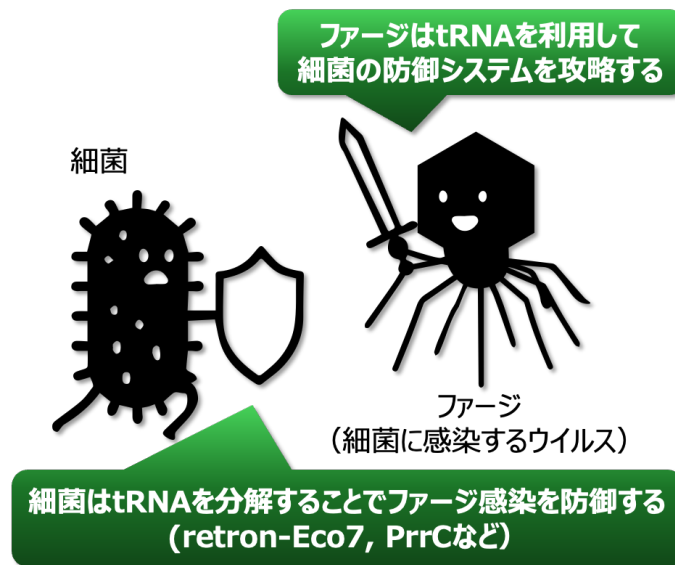
2. 論文名

論文タイトル: Evasion of antiviral bacterial immunity by phage tRNAs

著者: Aa Haeruman Azam, Kohei Kondo, Kotaro Chihara, Tomohiro Nakamura, Shinjiro Ojima, Wenhan Nie, Azumi Tamura, Wakana Yamashita, Yo Sugawara, Motoyuki Sugai, Longzhu Cui, Yoshimasa Takahashi, Koichi Watashi, and Kotaro Kiga

掲載誌: Nature Communications

リンク先: <https://www.nature.com/articles/s41467-024-53789-y>



3. 研究背景

抗菌薬耐性菌の問題は深刻化しています。2022 年の Lancet による報告によれば、耐性菌による年間死者数は 127 万人を超え、関連する死者数は 495 万人にも達しています。2050 年までに 4000 万人が耐性菌によって死亡すると見積もられています。特に多剤耐性菌による感染症は、従来の抗菌薬が効かず治療が困難であり、新しい治療法の開発が急務です。このような状況に対し、バクテリオファージ（ファージ）^[1]を利用するファージ療法^[2]が注目されています。

しかし、細菌はファージによる殺菌を回避するために、防御システム^[3]と呼ばれる抗ファージ免疫機構を進化させており、ファージ療法が抑制されることがあります。これらのシステムは多くの場合、その働きが十分に解明されていません。ファージ療法の効果を最大化するためには、これら防御システムの仕組みを理解し、それを回避する対策を講じることが重要です。

4. 研究手法と成果

本研究では、レトロロン^[4]という細菌の防御システムに着目し、その詳細な機能を解析しました。その結果、レトロロンが細菌の tRNA^[5]を分解することで、ファージの感染から自身を保護していること、そしてファージが自身の tRNA を産生することでレトロロンの働きを阻害し、細菌への感染を成立させていることが明らかになりました。

1) レトロロン機能を阻害するファージ由来 tRNA

私たちはこれまでに、広い感染宿主範囲を持つ大腸菌^[6]ファージ ΦSP15 を単離し、これが自治医科大学のファージコレクションにある野生型 T5 ファージ (T5j) と高い類似性を持つことを確認しました。T5 様ファージの異なる株を用いた実験の結果、特に NBRC から入手した T5 (T5n) や SP15 の自然変異株 (SP15m) において、約 8 kb の大規模なゲノム欠失が見られました (図 1A)。この領域には複数の tRNA をコードする遺伝子が含まれており、「tRNA リッチ領域 (TRR)」と命名しました。さらなる解析により、T5 様ファージのゲノムに TRR が広く存在することが明らかとなりました。

これらのファージが、異なる抗ファージ防御システムを持つ細菌株に感染する能力を評価したところ、T5n および SP15m は、対応する野生型ファージ (T5j および SP15) に比べ、レトロロン Eco7 (レトロロン Ec78) を持つ細菌に対して感染力が著しく低下していることが確認されました (図 1B)。次に、ΦSP15 の TRR を 9 つの断片に分割し、それぞれを pBAD 誘導プロモーターを持つプラスミドにクローニングして大腸菌 DH10B 株に導入しました (図 1C)。その結果、断片 6 (F6 TRR) がレトロロン Eco7 からファージを救済できることが確認されました。詳細な解析の結果、F6 TRR に含まれる tRNA^{Tyr} が Eco7 からのファージ救済に関与していることが明らかとなりました (図 1D, E, F)。

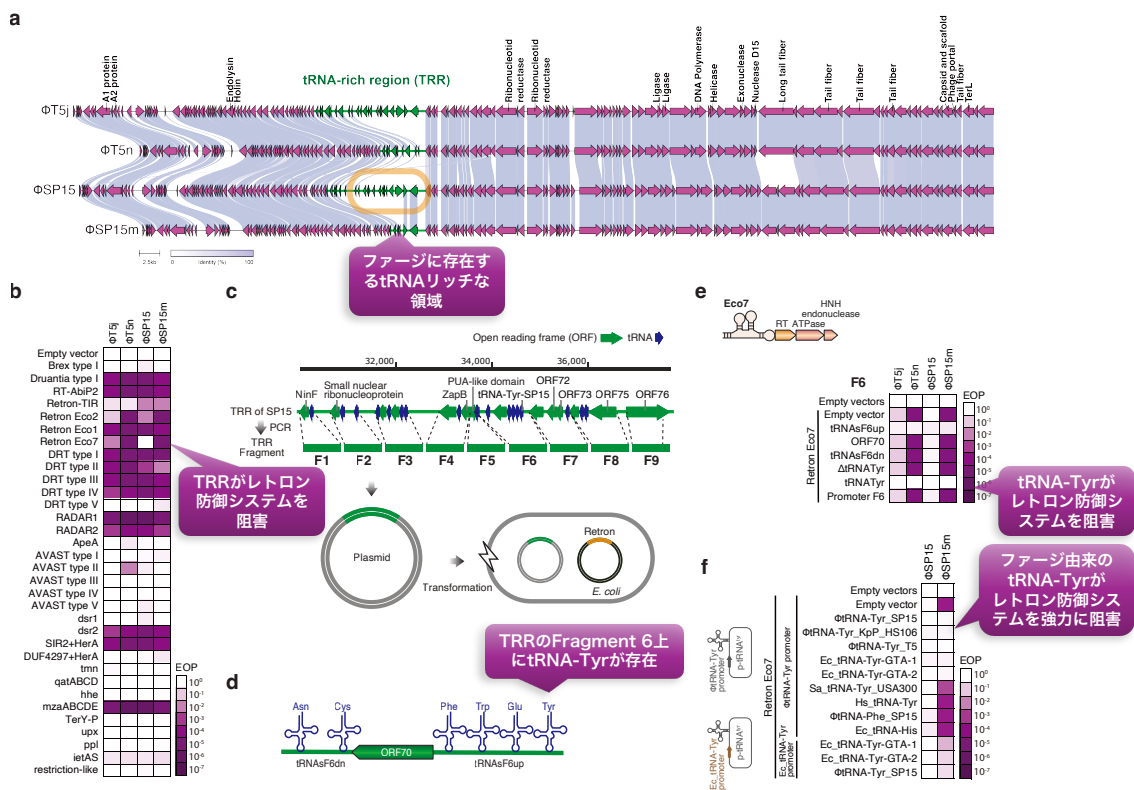


図 1. レトロン機能を阻害するファージ由来 tRNA

A) T5 ファージと T5 様ファージ SP15 のゲノム比較。T5j および SP15 に存在する tRNA リッチ領域 (TRR; 約 8 kb のゲノム領域) は、T5n および SP15m には欠損している。

B) 防御システムを持つ細菌に対するファージアッセイのプラーク効率 (EOP) の変化を示すヒートマップ。空ベクターを持つ細菌 (pLG001) はネガティブコントロールとして使用した。EOP は、防御システムを持つ細菌上のファージプラーク数を空ベクターを持つ細菌上のファージプラーク数で割った値である。

C) SP15 由来 TRR の断片化。オープンリーディングフレーム (ORF) は緑色で、tRNA は青色で示した。TRR の合成断片は PCR によって生成し、pBAD 誘導プロモーターの下でプラスミドに挿入した。その後、レトロンを有する細菌に導入した。

D) TRR 断片 6 (F6) の遺伝子構成。

E) レトロン Eco7 を有する細菌に対するファージの EOP を示したヒートマップ。tRNA-Tyr を発現させた細菌では、レトロン Eco7 の抗ファージ防御活性が減弱した。

F) レトロン Eco7 を有する細菌に対するファージの EOP を示したヒートマップ。ファージや大腸菌由来 tRNA-Tyr を発現させた細菌では、レトロン Eco7 の抗ファージ防御活性が減弱した。

2) レトロコン Eco7 は tRNA-Tyr を特異的に分解する

レトロコン Eco7 はレトロコン I-A 型に属し、ATPase ドメインを持つ PtuA と HNH エンドヌクレアーゼである PtuB という 2 つのエフェクタータンパク質を有しています。我々は、pBAD 誘導プロモーターの下で、PtuA、PtuB、または PtuAB を大腸菌に発現させ、その機能を解析しました。その結果、PtuAB を共発現させた場合にのみ、細菌の生育が阻害されることが明らかとなり、PtuA と PtuB がレトロコン Eco7 の毒素（トキシニン—アンチトキシン (TA) システム^[7]における毒素）であることが示唆されました（図 2A、B、C）。

RNA ハイブリダイゼーションアッセイの結果、レトロコン Eco7 の PtuAB を過剰発現させると、細菌細胞内のチロシン tRNA (tRNA-Tyr) の量が大幅に減少することが示されました。さらに、tRNA シーケンス解析の結果から、PtuAB を発現させた細菌では、tRNA-Tyr が特異的に減少していることが明らかになりました（図 2D）。

以上の研究成果から、レトロコンが細菌の tRNA を分解することで、ファージの感染から自身を保護していること、またファージが自身の tRNA を産生することでレトロコンの働きを阻害し、感染を成立させていることが明らかになりました（図 3）。さらに、ファージが tRNA を利用して細菌の防御システムを回避する戦術は、レトロコン以外のシステム（PrrC 防御システム）でも確認されました。このことから、ファージが細菌の防御システムを打破するために tRNA を活用していることが示唆されます。

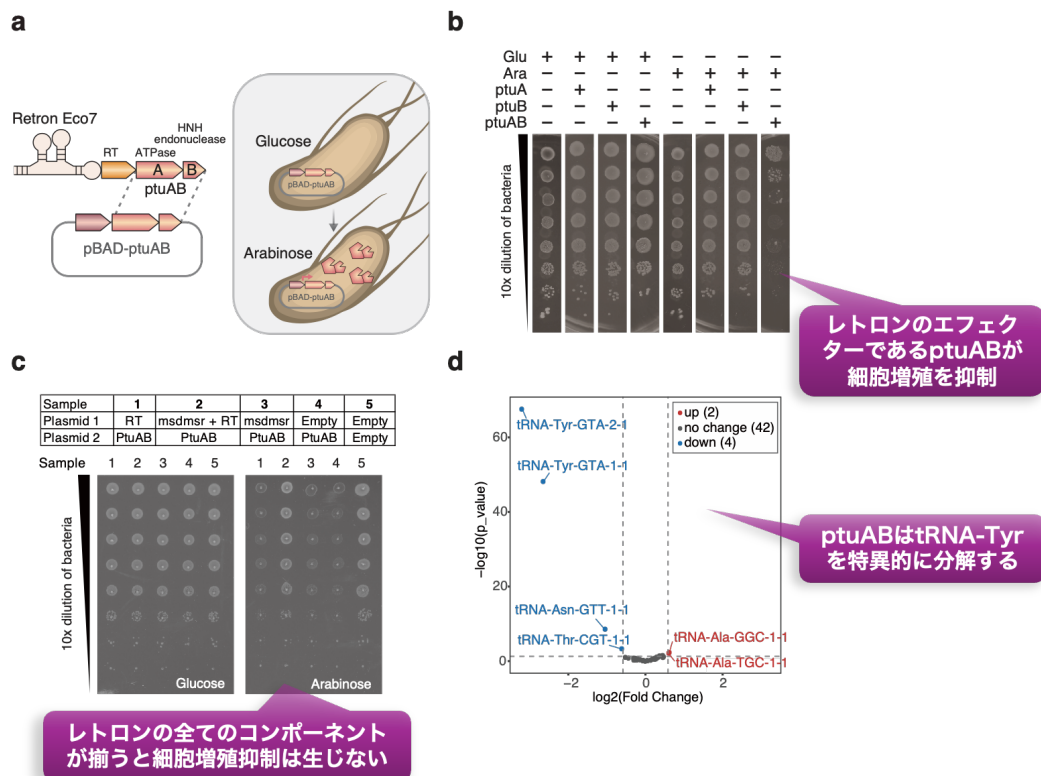


図 2. tRNA-Tyr は retron Eco7 エフェクタープロテイン PtuAB の標的である。

A) Eco7 の PtuAB の細胞内標的を評価するための実験系概略図。エフェクタータンパク質 PtuAB

- は、pBAD プロモーター（アラビノースによる発現誘導型プロモーター）の下で発現させた。
- B) PtuAB の過剰発現による細菌の生育阻害。PtuA または PtuB を単独で過剰発現しても生育阻害は観察されなかった。PtuA、PtuB、PtuAB の発現は、0.2%アラビノース（Ara）添加で誘導し、0.2%グルコース（Glu）添加で抑制した。
- C) レトロン Eco7 における抗毒素成分の同定。毒素 PtuAB をコードするプラスミドと、抗毒素候補をコードするプラスミドを共発現させることで、抗毒素活性を評価した。毒素成分 PtuAB は pBAD プラスミド（アラビノースで発現誘導するプラスミド）で発現させ、抗毒素候補（msrmsd、RT、または msrmsd-RT）は retron-Eco7 のネイティブプロモーター下で恒常的に発現させた。
- D) PtuAB 過剰発現時の細菌における tRNA シーケンス解析。PtuAB を誘導した細菌では、2 種類の tRNA^{Tyr}（tRNA-GTA-1 および tRNA-GTA-2）が、PtuAB を抑制したときと比較して有意に減少していた。Fold Change は、誘導条件（アラビノース添加）と抑制条件（グルコース添加）における細菌の tRNA 総発現量に基づいて算出した。

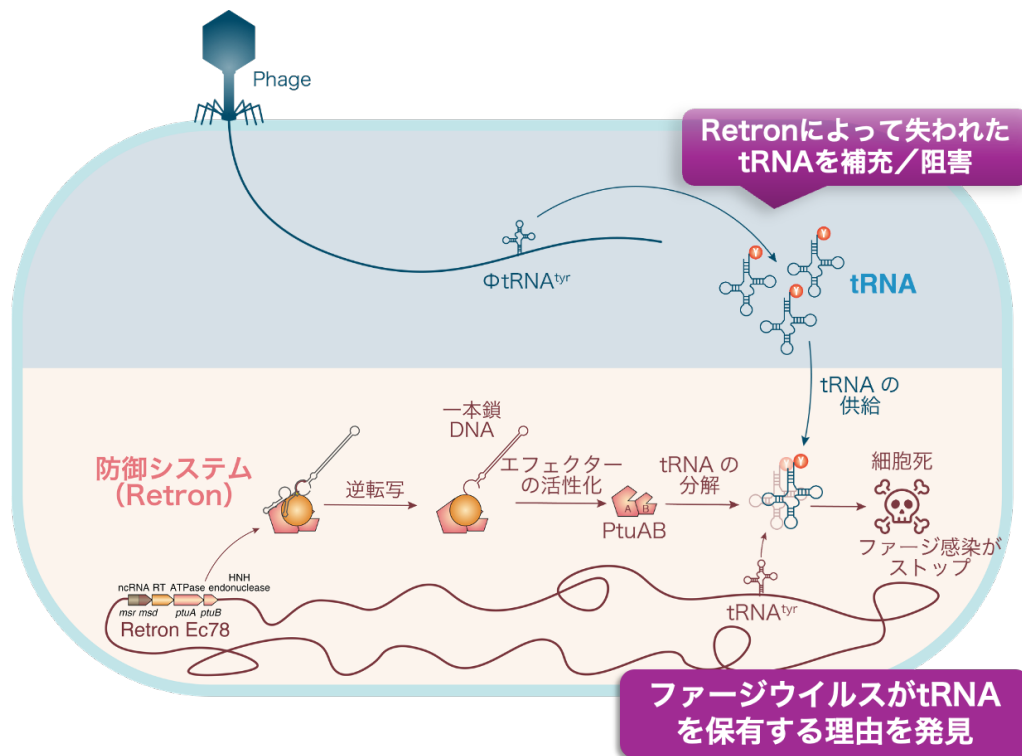


図 3. ファージが retron-Eco7 抗ファージ防御システムを回避するメカニズム

レトロン Eco7 防御システムは、PtuAB を毒素、retron msDNA と RT タンパク質を抗毒素とする三成分からなる毒素-抗毒素複合体として機能する。ファージ感染時には、不明なメカニズムによりレトロン Eco7 が活性化され、PtuAB が放出・活性化されると考えられる。活性化した PtuAB は、細菌の tRNA-Tyr を分解し、細菌の増殖を阻害することで、不稔感染 (Abortive infection) を引き起こし、ファージの増殖を抑制する。しかし、T5 ファージは強力なプロモーターを用いて自らの tRNA-Tyr を大量に産生することで、レトロン Eco7 の作用を回避し、効率的な増殖を達成する。

研究成果の意義と今後の期待

- **tRNA 搭載ファージによるファージ療法**：tRNA ファージは、より広範な細菌に感染し、増殖できる可能性があり、薬剤耐性菌に対しても有効な治療法となることが期待されます。
- **防御システムの解明と新たなツール開発**：本研究で注目したレトロンシステムをはじめ、CRISPR-Cas システムや制限酵素など、細菌が持つ様々な防御システムは、遺伝子工学の強力なツールとして利用されています。レトロンシステムの仕組みを解明することで、より効率的な遺伝子編集ツールが開発できる可能性があります。
- **tRNA 生物学の新たな展開**：tRNA は、タンパク質合成に必須の分子として知られていますが、本研究のように、細菌とバクテリオファージの相互作用において重要な役割を果たしていることが明らかになりました。例えば、HIV などのレトロウイルスは、宿主細胞の tRNA を利用して複製を開始することが知られています。このように、tRNA の機能に関する理解を深めることは、様々なウイルス感染症の治療法開発につながる可能性があります。

本研究への支援

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）（研究開発代表者 崔龍洙）、新興・再興感染症研究基盤創生事業（多分野融合研究領域）（研究開発代表者 氣賀恒太郎）、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業（研究開発代表者 氣賀恒太郎）、日本学術振興会（JSPS）科学研究費補助金 基盤（B）（研究開発代表者 氣賀恒太郎）による支援を受けて行ったものです。

用語解説

- [1] **バクテリオファージ（ファージ）**：細菌に感染し、内部で増殖するウイルス。ヒトには感染しない。
- [2] **ファージ療法**：ファージは特定の細菌を攻撃するウイルスで、薬剤耐性菌にも有効である可能性があり、抗菌薬の代替的な治療法として期待されている。最近では米国や欧州、豪州などで実験的に臨床使用されている。
- [3] **防御システム**：細菌がファージの感染から身を守るために進化させてきた様々な防御機構の総称。制限修飾系や CRISPR-Cas システムが有名だが、近年多くの防御システムが発見されている。
- [4] **レトロン（Retron）**：ファージに対する防御システムの一つ。逆転写酵素をコードし、小さな一本鎖 DNA を合成する。
- [5] **tRNA**：トランスファーRNA。細胞内でタンパク質合成のためにアミノ酸を運搬する RNA 分子。
- [6] **大腸菌**：大腸菌はグラム陰性の細菌で、ヒトの腸内にも常在している。尿路感染症の主な原因菌である。また、O157 などの一部の腸菌は下痢症を引き起こす。

[7] トキシン—アンチトキシン(TA)システム: TA システムは、トキシン (毒素) とアンチトキシン (抗毒素) の構成される細菌のシステムである。細菌が何かしらのストレスを受けると、アンチトキシンの働きが抑えられ、トキシンが活性化する。その結果、細胞の増殖を停止させる。TA システムはファージ感染防御にも使用されている。

研究者プロフィール

自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 細菌学部門 教授
崔 龍洙 (さい りゅうしゅ)

国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター 研究員
Aa Haeruman Azam (ああ はえるまん あざむ)

国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター 室長
自治医科大学医学部 感染・免疫学講座 細菌学部門 客員教授
氣駕 恒太朗 (きが こうたろう)

お問い合わせ先

【本発表資料のお問い合わせ先】

国立感染症研究所 治療薬・ワクチン開発研究センター
室長 氣駕 恒太朗 (きが こうたろう)

TEL: 03-5285-1111, FAX: 03-5285-1150

E-mail: k-kiga@niid.go.jp

<https://researchmap.jp/kotarokiga>

【本リリースの発信元】

自治医科大学・大学事務部・研究推進課

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

TEL. 0285-58-7550 FAX. 0285-40-8303

E-mail: shien@jichi.ac.jp <https://www.jichi.ac.jp/>