

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15675

研究課題名(和文) CRISPRを用いたDNA記憶装置開発への基盤構築

研究課題名(英文) Development of DNA memory device using spacers in CRISPR

研究代表者

丸山 史人 (Maruyama, Fumito)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30423122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細菌ゲノム上の非遺伝子領域に存在する外来DNAの記憶領域である Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) に含まれる断片情報(スペーサー配列)の解析で新規細菌記憶装置開発への基盤を築くことを目的とした。特にA群レンサ球菌とブタレンサ球菌の本CRISPR領域を精査したところ、記憶装置開発は難しいが、これらの細菌種においてCRISPRは高精度タイピングや、CRISPRも可動性因子であるかもしれないという新しい基礎生物学的な新知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyze fragment information (spacer sequence) contained in Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) which is a memory region of foreign DNA existing in a non-gene region on the bacterial genome, and found a basis for development of a novel bacterial memory device. Especially when we examined the CRISPR region of group A streptococci and *Streptococcus suis*, although it is difficult to develop memory devices, CRISPR is highly accurate for strain typing and CRISPR also appears to be a mobile element in these bacterial species, which open new insights into this CRISPR research field.

研究分野：環境遺伝生態学

キーワード：CRISPR

## 1. 研究開始当初の背景

細菌を長期記憶媒体として有効活用する技術の総称を「バクテリア記憶媒体」と呼び、日本が世界をリードしている (Biotech. Prog., 2007, Syst. Synthetic Biol., 2009)。細菌は生命誕生の初期から存在し、その DNA は数億年に渡り保存されてきたことから、長期の保存能に疑いようはない。しかし、DNA の変異が生じて、改変してしまうことが課題である。さらに、DNA データの組込み効率、挿入箇所のコントロールが煩雑であり、データのバックアップとして複数コピーをゲノムに取込ませる必要がある。

レンサ球菌属の細菌には、乳酸菌として産業上有用な *Streptococcus thermophilus* 等を含め、多数の種が存在する。中でも、A 群レンサ球菌 (*S. pyogenes*) は、原核生物の獲得免疫機構である CRISPR/Cas (cas: CRISPR-associated) が簡易な真核生物のゲノム編集に応用できることから注目を集めている (化学と生物, 2014)。申請者らは、本菌種のゲノム解析を含め (Genome Res., 2003)、他のレンサ球菌種 (*S. mutans*, *S. suis*) とその CRISPR/Cas について研究してきた (ISME J., 2014; Genome Biol. Evol., 2013; Appl. Environ. Microbiol., 2013; J. Biol. Chem., 2011; BMC Genomics, 2009; PLoS One, 2011; Cell. Microbiol., 2009 等)。これらの解析を通じて、レンサ球菌の CRISPR/Cas は 30-35 bp の記憶領域であるスペーサー配列を平均 5.4 個しか保有していなかった。しかし、他の細菌種では最大 587 個を保有していること、レンサ球菌 259 株の独自ゲノム情報データから、従来の細菌記憶媒体の欠点を補うことができると考えた。つまり、CRISPR/Cas を記憶装置への応用研究は、多くの課題を解決する必要がある。しかし、CRISPR は遺伝子間領域であることから進化的な特定の変異圧がなく、恒常的な高発現をさせることで変異および記憶の脱落を起こさせない (予備解析では、変異は無い)、同一部位に必ず取込まれるため配列の導入が簡易である、という利点を有すると考えた。そこで、レンサ球菌属種の CRISPR/Cas に着目し、新規細菌記憶装置開発の基盤構築に着手することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、CRISPR への遺伝子取込みを高効率で可能とする細菌株の構築により、細菌記憶装置開発への基盤を築くことを目的として、2 年間で次の研究を企図した。1) *S. pyogenes*、*S. suis* 1,000 株以上の CRISPR/Cas の配列情報を取得する、2) CRISPR に含まれる外来因子情報から、過去に取込まれた外来因子の全貌を明らかにし、CRISPR のタイプ分け、配列取込みに必要な PAM 配列の決定 (取込配列隣のモチーフ)、3) CRISPR/Cas に恒常的に発現可能なプロモーターを挿入し、取込み制限が緩慢な (現状では最低 2 塩基が必

要) PAM を保有菌株の作製を行う。細菌記憶装置を扱う研究分野自体が、前述の課題により存在していない。また、CRISPR/Cas についても、ゲノム編集 (切断) に焦点があてられており、取込みに着目したアプリケーションは皆無である。そのため、本研究目的が達成できれば、記憶装置開発という生物学以外の科学分野に影響を与えるだけでなく、新しい産業の創出を通じて、社会的にも大きな反響を呼ぶと考えられる。

## 3. 研究の方法

実験開始時の研究予定を以下に示す。

*S. pyogenes* では、独自に取得したゲノム配列として、高病原性株由来の 90 株、乳幼児咽頭炎由来株の 151 株がある。さらに、遺伝子データベースのドラフトゲノム配列の 601 株、181 株、そして、完全ゲノム配列が既知の 18 株を合わせた 1,000 株の配列について、CRISPR/Cas の予測を行う。既に、259 株での予備検討を終了しているため、円滑な実施が可能である。また、どのような外来因子や、取込まれる配列に偏りがあるかを調べるために、CRISPR 内の外来因子全長の再構築を目指す (予備的知見では、バクテリオファージが大半で、取込み配列に偏りは無い)。また、新型シーケンサー登場時と同程度の取込み配列長 (30~35 bp) であるため、この構築 (アセンブル) 方法については、当時の手法を利用する。

これまでに実施した動物衛生研究所との共同研究から *S. suis* では全ての serotype において (35 株)、本菌の CRISPR はゲノム上の決まった一箇所にあることがわかっている (投稿中)。さらに、独自のプライマーを用いてさらに 70 株を追加してみたところ、予備的知見が正しいことを確認している。そこで、動物衛生研究所が保有する *S. suis* 1,200 株全てについて、CRISPR/Cas 領域の配列を決定する。培養、DNA 抽出、クローニング、プラスミド抽出、illumina 社の MiSeq により配列を決定する。

*S. pyogenes* および *S. suis* に含まれている CRISPR/Cas タイプ別に分類する (cas 群の構成に基づく)。これらの細菌種では、タイプ I とタイプ II であることを確認しているため、分類後に含まれる外来因子の取込み認識配列である PAM の種類に注意を払う。また、PAM の配列と外来因子の取込みに必須である cas1, 2 配列について、マルチプルアライメント (多重整列) から保存領域、可変領域の関係性に特に注意を払い、PAM に影響を与える配列候補を同定する。

上記の A、C と同様にして、*S. suis* の取込み配列における法則性や PAM 配列に影響を与える cas 1, 2 の配列を決定する。また、*S. pyogenes* と本菌が保有する CRISPR/Cas は同じタイプ (I と II) であること、同じ属の細菌種であることから、二種分のデータ (1,000+1,200 株) を合わせることで、より高

精度な、cas1, 2 の PAM 配列に影響を与える配列を導く。

27 年度に、十分な精度で配列決定できなかった株について、MiSeq および従来の Sanger シーケンサーを用いて、配列決定を行う。

既に申請者らは、レンサ球菌で恒常的に発現するプロモーターを保有しているため、これを CRISPR/Cas 領域に組込む (CRISPR と cas は別々に転写されるため、両者に挿入する)。これにより、効率よく cas が外来因子を効率的に取込ませる。また、同様に、CRISPR についても恒常的に発現させることで、取込まれたスペーサー配列の脱落を抑える。

上記の予測された cas1, 2 配列のうち PAM 配列に影響を与えると考えられた配列にランダムな配列を組込む。で作製した菌株を用いることで、効率的に PAM 配列が変わった、特に 1 塩基の PAM 配列で取込む株を完成させる (A, T, G, C の各 1 塩基、4 株)。また、取込み配列の偏りたないことを確認する。これにより、本研究目的は達成できたものと判定する。

上述したような研究計画を実施する予定であったが、*S. pyogenes* および *S. suis* の CRISPR を中心としたゲノム情報解析を精査することで、基礎生物学において興味深い予備データが得たことから、その集中解析を実施することとした。

#### 4. 研究成果

*S. pyogenes* の CRISPR を詳細に調べた結果、次のような知見が得られた。

*S. pyogenes* は、多様な疾患を引き起こす主要な病原細菌の一つであるが、特に劇症型の疾患では、致死率が極めて高いことが問題となっている。この原因解明のため、多くの研究がなされてきたが、未だの原因は明らかとなっていない。劇症型と非劇症型疾患由来の本菌を調べてみると、CRISPR の有無により、バクテリオファージ数と種類にバイアスがあること、そして、CRISPR を保有しない菌株は、コアゲノムサイズが CRISPR を保有する菌株よりも小さいこと、しかし、パンゲノムサイズが逆に大きいことが判明した。興味深いことに、CRISPR がない菌株で有意に多く劇症型由来株が存在していた。このコアゲノムが小さい菌株ほど劇症型の原因になっているという知見は、*S. suis* でも報告されていることから、普遍的な現象である可能性が考えられる。さらに、CRISPR を保有することがレンサ球菌属では一般的であるが、CRISPR を保有しない菌株が多く見られた。そこで、詳細に配列レベルでの解析を実施した結果、CRISPR はまずスペーサーがすべて脱落し、cas 遺伝子のプロモーターが脱落し、repeat 配列にファージが侵入し、ファージ脱落時に cas 遺伝子を巻き込むということが配列解析から明らかとなった。

スペーサー自体の数、種類といった多様性を調べたところ、予想以上にスペーサーの反

復回数がすくなく、CRISPR を保有しない株が多く見られた。CRISPR をクラスタリングして、ゲノム系統関係を調べたところ、CRISPR を保有する範囲では、系統関係を反映しており、従来タイピングに用いられている M タンパク質でのタイピングと同等の解像度を示すことがわかった。

また、*S. suis* の CRISPR に着目して解析を行ったところ、本菌においても CRISPR の有無がゲノム系統によって別れていた。しかしながら、*S. pyogenes* と異なる機構で CRISPR の脱落が起きていることが推測された。これまでの多くのゲノム解析がなされてきた結果、CRISPR を含む多くの免疫システムは、共生アイランド、病原性アイランドといったものと同じようにゲノム内で近接して存在することが明らかとなっており、防御アイランドと名付けられている。今回発見した CRISPR が存在部位は、他の防御因子とアイランドを形成せず、独立して存在することがわかった。すなわち、RM, TA, Abi, BREX などの外来 DNA 排除システムとゲノムの特定部位を取り合うともみえる状況でシャッフルしていることがわかった。さらに CRISPR であっても異なる CRISPR のタイプ同士で同じゲノム部位を取り合っているように観察された。さらに興味深いことに、異なる防御システムの存在で、ゲノム系統が予測できること、すなわち、防御システムが駆動する種分化、多様化が起きているという仮説を提案することができた。

このように2つの細菌種で、全く異なる、予想もしていなかった基礎生物学的な知見が得られたことは驚くべきことであったが、これらが下記 URL のようにゲノム科学専門誌に掲載されたことから本研究課題は新しい研究を萌芽することができたという意味で十分な進捗であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

**発表論文** (° 筆頭著者、\* 責任著者)

1. \*T. Takemura, \*K. Murase, \*F. Maruyama, \*T.T. Luong\*, N.D. Tu, N.T. Cuong, N.T. Hang, N. Dihn PMC, A. Tokizawa, M. Morita, M. Ohnishi, N.B. Minh, T. Yamashiro. Genetic diversity of environmental *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Northern Vietnam. *Infect. Genet. Evol.* in press (査読有)
2. °M. Okura, T. Nozawa, T. Watanabe, K. Murase, I. Nakagawa, D. Takamatsu, M. Osaki, T. Sekizaki, M. Gottschalk, S. Hamada, \*F. Maruyama. A locus encoding variable defence systems against invading DNA identified in *Streptococcus suis*. *Genome Biol. Evol.* doi: 10.1093/gbe/evx062. 2017. (査読有)
3. °A. Roobthaisong, C. Aikawa, T. Nozawa, F. Maruyama, \*I. Nakagawa. YvqC/CovRS of

- Group A Streptococcus Play a Pivotal Role in Viability and Phenotypic Adaptations to Multiple Environmental Stresses.  
**PLoS One.** 12:e0170612. 2017. (査読有)
4. °H. Kachi, °N. Maruyama, \*F. Maruyama, T. Shiba, T. Watanabe, A. Goda, K. Murase, Y. Michi, Y. Takeuchi, Y. Izumi, S. Yamaguchi and I. Nakagawa. Active microbiota show specific correlations in peri-implantitis and periodontitis  
**J Stomatol Soc.** 84: 25-35. 2017. (査読有)
  5. °F. Maruyama, \*S. Ueki. Evolution and phylogeny of large DNA viruses, Mimiviridae and Phycodnaviridae including newly characterized Heterosigma akashiwo virus.  
**Front. Microbiol.** 7:1942. 2016. (査読有)
  6. °T. Kulkarni, C. Aikawa, T. Nozawa, K. Murase, \*F. Maruyama, I. Nakagawa. DNA-based culture-independent analysis detects the presence of Group A Streptococcus in throat samples from healthy adults in Japan.  
**BMC Microbiol.** 16:237. 2016. (査読有)
  7. °T. Shiba, °T. Watanabe, H. Kachi, T. Koyanagi, N. Maruyama, K. Murase, \*Y. Takeuchi, \*F. Maruyama, Y. Izumi, I. Nakagawa. Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms. \* press release あり  
**Sci. Rep.** 6:30997. 2016. (査読有)
  8. °M. Tohya, T. Watanabe, \*F. Maruyama, S. Arai, A. Ota, T. B. T. Athey, N. Fittipaldi, I. Nakagawa, \*T. Sekizaki. Comparative genome analyses of *Streptococcus suis* isolates from endocarditis demonstrate persistence of dual phenotypic clones.  
**PLoS One** 11:e0159558. 2016. (査読有)
  9. °\*Jorquera, F. Maruyama, A. Ogram, O. Navarrete, L. Lagos, N. Inostroza, J. Acuña, J. Rilling, M. Mora. Rhizobacterial community structures associated with native plants grown in Chilean extreme environments.  
**Microb. Ecol.** 72:633-646. 2016. (査読有)
  10. °L. Lagos, J. J. Acuña, F. Maruyama, A. Ogram, M. de la Luz Mora, \*M. A. Jorquera. Effect of phosphorus addition on the total bacterial communities and alkaline phosphomonoesterase-harboring bacterial populations in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* var. Nui)  
**Biol. Fertil. Soils.** 52:1007-1019. 2016. (査読有)
  11. °\*N. Tajima, K. Saito, S. Sato, F. Maruyama, M. Ichinomiya, S. Yoshikawa, K. Kurokawa, H. Ohta, S. Tabata, A. Kuwata, N. Sato. Sequencing and analysis of the complete organellar genomes of Parmales, a closely related group to Bacillariophyta (diatoms).  
**Curr. Genet.** 62:887-896. 2016. (査読有)
  12. °\*T. Kubota, T. Kobayashi, T. Nunoura, F. Maruyama, S. Deguchi. Enantioselective utilization of D-amino acids by deep-sea microorganisms. \* press release あり  
**Front. Microbiol.** 7:511. 2016. (査読有)
  13. °T. Furusawa, \*H. Iwano, H. Higuchi, M. Usui, F. Maruyama, I. Nakagawa, H. Yokota, Y. Tamura. Complete genome sequencing of the broad-host-range *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ΦR18 and ΦS12-1.  
**Genome Announc.** 4:e00041-16. 2016. (査読有)
  14. °T. Wada, °F. Maruyama, T. Iwamoto, S. Maeda, T. Yamamoto, I. Nakagawa, S. Yamamoto, \*N. Ohara. Deep sequencing analysis of the heterogeneity of seed and commercial lots of the bacillus Calmette-Guérin (BCG) tuberculosis vaccine. °Equal contribution \* press release あり  
**Sci. Rep.** 5:17827. 2015. (査読有)
  15. °H. Kato, °H. Mori, F. Maruyama, A. Toyoda, K. Ohshima, R. Endo, G. Fuchu, M. Miyakoshi, A. Dozono, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Hattori, A. Fujiyama, K. Kurokawa, and \*M. Tsuda. Time Series Metagenomic Analysis Reveals Robustness of Soil Microbiome against Chemical Disturbance.  
**DNA Res.** pii: dsv023. 2015. (査読有)
  16. °\*K. Ushida, S. Tsuchida, Y. Ogura, A. Toyoda and F. Maruyama. Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of Suidae.  
**Anim. Sci. J.** doi: 10.1111/asj.12492. 2015. (査読有)
  17. °Y. Matsumura, H. Al-saari, K. Kuga, Y. Inohara, S. Mino, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabee, \*T. Sawabe. Identification of a gene cluster responsible for hydrogen evolution in *Vibrio tritonius* strain AM2 with transcriptional analyses.  
**Int. J. Hydrogen Energy** 40:9137-9146. 2015. (査読有)
  18. °\*K. Okada, W. Natakaathung, M. Na-Ubol, A. Roobthaisong, F. Maruyama, I. Nakagawa, S. Chantaroj, S. Hamada. *Vibrio cholerae* O1 TSY216 consists of three megabase-sized circular replicons.  
**Emerg. Infect. Dis.** doi: 10.3201/eid2107.141055. 2015. (査読有)

19. °K. Minegishi, °T. Watanabe, A. Furukawa, K. Uchida, Y. Suzuki, T. Akashi, \*F. Maruyama, I. Nakagawa, \*Y. Eishi. Genetic profiles of *Propionibacterium acnes* and identification of a unique transposon with novel insertion sequences in sarcoid and non-sarcoid isolates.

**Sci. Rep.** 5:9832. 2015. (査読有)

20. °\*L. Nonaka, F. Maruyama, S. Suzuki, M. Masuda. Novel macrolide resistance genes, *mef* (C) and *mph* (G), carried by plasmids from *Vibrio* and *Photobacterium* isolated from sediment and seawater of a coastal aquaculture site.

\*editors choice

**Let. Appl. Microbiol.** doi: 10.1111/lam.12414. 2015. (査読有)

21. °A. Endo, T. Watanabe, N. Ogata, T. Nozawa, C. Aikawa, S. Arakawa, \*F. Maruyama, Y. Izumi, I. Nakagawa. Comparative genome analysis and identification of competitive and cooperative interactions in a polymicrobial disease

**ISME J.** 9:629-642. 2015. (査読有)

#### 総説

22. 芝多佳彦、竹内康雄、渡辺孝康、小柳達郎、丸山緑子、加地博一、村瀬一典、丸山史人、中川一路、和泉雄一. インプラント周囲炎と歯周炎の違いを科学する～口腔細菌生態系の解明へ、メタトランスクリプトーム解析からのアプローチ～.

**歯界展望** in press. (査読無)

23. °\*Y. Nishiuchi, T. Iwamoto, \*F. Maruyama. Infection sources of a common nontuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* complex.

**Front. Med.** doi: 10.3389/fmed.2017.00027 2017. (査読有)

24. °藤吉 奏、村瀬 一典、\*丸山 史人. マイクロバイオーム研究からホロバイオーム研究への新展開.

**生体の科学** 68:97-101. 2017. (査読無)

25. °渡辺孝康, 村瀬一典, 中川一路, \*丸山史人. 原核生物の獲得免疫に見られる新機構から紐解かれてきたゲノム進化.

**化学療法の領域** 31:118-128. 2015. (査読無)

26. °L. Lagos, F. Maruyama, P. Nannipieri, M. Luz Mora, A. Ogram, \*M.A. Jorquera. Current overview on the study of bacteria in the rhizosphere by modern molecular techniques: a mini-review.

**J. Soil Sci. Plant Nutr.** 15:504-523. 2015. (査読有)

27. °相川知宏、丸山史人、\*中川一路. 2015. CRISPR/Cas システム：微生物における新規機能とゲノム編集適用例

**乳酸菌学会誌** 26:14-21. 2015. (査読有)

28. °\*F. Maruyama, T. Watanabe, \*I. Nakagawa. *Streptococcus pyogenes*, Basic Biology to Clinical Manifestations".

**NIH NCBI Bookshelf,**

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK333426/>. 2016. (査読有)

[その他]

ホームページ

Researchgate (業績)

[https://www.researchgate.net/profile/Fumito\\_Maruyama/publications](https://www.researchgate.net/profile/Fumito_Maruyama/publications)

PubMed (業績)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=maruyama+fumito+or+maruyama+f+and+nonaka+l+or+maruyama+f+and+nakagawa+i>

GoogleScholar (業績)

<https://scholar.google.co.jp/citations?user=HeDrKa4AAAAJ&hl=ja>

Frontiers (業績)

<http://loop.frontiersin.org/people/20823/overview>

FaceBook (研究紹介)

<https://www.facebook.com/Microbial-Genomics-and-Ecology-135689926563239/?ref=bookmarks>

受賞

2017年：第11回 ゲノム微生物学会奨励賞  
受賞 “獲得免疫機構に着目した病原細菌のゲノム進化に関する研究”

2016年：第2回 日本微生物生態学会奨励賞  
受賞 “医科微生物生態学の創成に関する研究”

2015年：平成26年度 手島精一記念研究賞  
受賞 “*Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation”

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30423122

(2)研究分担者

中川 一路 (NAKAGAWA, Ichiro)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70294113