

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670775

研究課題名(和文) Genome Editing法を応用した遺伝子破壊導入による細菌感染制御法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapeutic method by genome-editing

研究代表者

中川 一路 (Nakagawa, Ichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年注目されているゲノム編集(Genome Editing)法と、細菌の持つバクテリオファージに対する獲得免疫機構であるCRISPRのスペーサー配列情報に基づいて、特定の菌のみの遺伝子破壊を誘導できる人工ファージを創出するための技術を開発することを目的とした。A群レンサ球菌の遺伝子と相同のスペーサー配列を持つ菌では、菌体の増殖が完全に抑制された。また、TALENやZFNでは菌体の増殖抑制効果は不十分であった。この結果から、CRISPR/Cas9システムは、外来性遺伝子の排除だけでなく、自身の染色体も破壊することで、増殖抑制効果があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to apply the Genome Editing method on the basis of the spacer sequence information of CRISPR. The Cas9 / CRISPR system of the group A streptococci (GAS) with various spacer sequences of the chromosomal DNA were constructed, and chromosomal fragments with homologous sequence were also introduced in another compatible plasmid. CRISPR/Cas system could clearly inhibit the growth of E. coli strain with matched pair of spacer sequence and the chromosomal fragment. However, the TALEN system and ZFN system could not inhibit the growth of E. coli completely. We also construct the CRISPR/Cas9 expression plasmid for GAS. The growth of bacteria is completely inhibited by introducing the plasmid with spacer sequence of the homologous sequence of the its chromosome. These observations indicated that the CRISPR/Cas9 system can be used not only for the destruction of foreign DNA but also its chromosome.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 CRISPR TALEN ZFN 増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

レンサ球菌感染症は、日本では、A群レンサ球菌で年間患者数が30万人、また、肺炎球菌感染症では、高齢化による肺炎の死亡数が、全死亡原因の上位であり、社会的に大きな問題となっている(厚生労働省感染症情報センター、<http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html>)。肺炎球菌では耐性株が増えているだけでなく、乳幼児の髄膜炎での患者が増加していることから、莢膜抗原に対するワクチンが日本でも接種が勧められている。ところが、2000年からPCV7ワクチンが導入された米国では、肺炎球菌が新たな形質を獲得してワクチンが奏功しない株が急速に流布したことがゲノムレベルで解明された(Golubchik et al, Nature Genetics 2012)。そのため、従来とは異なる視点での新規治療法が望まれている。また、phage therapy(ファージ療法)は、従来から「溶菌」を利用した新規感染症への応用が期待されながら、「溶原化」した場合には効果が期待できないことから実用化には至っていない。申請者は、これまでA群レンサ球菌やブタレンサ球菌(*S. suis*)などのレンサ球菌属の多株比較ゲノム解析を行ってきた(Nozawa et al, PLoS One, 2011, Eguchi et al, Appl Environ Microbiol, 2012)。その中で、i)レンサ球菌属の病原性の伝播には、外来性遺伝子が重要であること、ii)外来性遺伝子の伝播はCRISPRを介して制限がかけられていること、などを明らかとしてきた。その中で、ゲノム比較解析から、それぞれの菌株の特性とゲノム情報を応用した菌株特異的な制御が可能であることが判明したことから、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、近年注目されているゲノム編集(Genome Editing)法と、細菌の持つバクテリオファージに対する獲得免疫機構であるCRISPRのスペーサー配列情報に基づいて、特定の菌のみの遺伝子破壊を誘導できる人

工ファージを創出するための技術を開発することを目的とした。ゲノム編集法とは、人工ヌクレアーゼのZinc Finger Nucleases(ZFNs)やTranscription Activator-Like Effector Nucleases(TALENs)を用いてゲノム上の標的遺伝子の破壊やレポーター遺伝子のノックインなどを可能にする技術であり、原理的には全ての生物種に応用可能なことから、次世代の遺伝子改変技術として注目されている(Urnov et al., Nat. Rev. Gen., 2010)。そこで、このZFNsやTALENsをファージ遺伝子内に組み込むことにより、特定の菌のみの排除が可能であることを示す。

3. 研究の方法

1) ゲノム情報から各菌種・菌株に特異的なTALEN認識配列の候補を取り上げ、ターゲット配列を決定し、in vivoで最も効率よく切断される配列を情報的に解析した。A群レンサ球菌、肺炎球菌、ブタレンサ球菌などのゲノム情報から、TALEN targeter(<https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen>)などを用いて、レンサ球菌の各属に特異的な配列を抽出し、TALENのターゲットとなる配列を決定した。で選択した配列情報をもとに、TALEN発現プラスミドの構築を行った。TALEN発現プラスミドは、Voytas(ミネソタ大学)らが開発したGolden Gate Assembly法を用いてTALベクターを作製した。(Cermak et al., NAR 2012)。pCAG-T7-TALEN(Sangamo)-Dentinationベクター(Dr. Pelczarから分与)にクローニングを行い、in vitroでのタンパク質翻訳系を用いてTALENを作製した。各菌株のターゲットとなる配列を、あらかじめプラスミドとして用意しておき、リコンビナントTALENを反応させることで、どの程度遺伝子欠損が起きるのかについて確認する。欠失が確実に誘導できるクローンを選択し、レンサ球菌用のhomologous recombination用の遺伝子導入ベクター

pSET-4S(Takamatsu et al, Plasmid, 2001)に導入した。また、CRISPR/Cas9の発現ベクターも同時に作成し、同じターゲットを指向するベクターを作成した。本研究では、導入されたファージによる形質が、遺伝子破壊の効果であるのかどうか判定が難しいため、抗生物質耐性遺伝子(pSET4SにコードされているスペクチノマイシンあるいはpSET-Kmにコードされているカナマイシン耐性遺伝子)をマーカーにして、レシピエント株での導入効率、増殖抑制効果について解析を行った。

4. 研究成果

A群レンサ球菌の染色体上にコードされている病原因子からターゲット領域の選定を行った。A群レンサ球菌は、GC含量が低い(39%前後)ため、その遺伝子破壊のターゲット候補となる領域の推定は極めて困難であった。そのため、病原性が比較的明らかである Streptolysin O 遺伝子の領域について、まず TALEN, CRISPR/Cas9 のターゲット領域を選定して、それぞれ4領域ずつターゲット領域を選定して、それぞれ大腸菌での発現プラスミドを構築した。また、ターゲットとなる領域の全長を、別の ori を持つ大腸菌のプラスミドにクローニングを行い、上記の遺伝子破壊プラスミドと同一菌体へ形質転換を行った。このターゲット領域のプラスミドは、カナマイシン耐性となるため、カナマイシン含有プレート上で選択することで、ターゲット領域の破壊が確認できる。

その結果、大腸菌内では、SL0 遺伝子をターゲットとした遺伝子破壊では、TALEN では効果が認められなかった。TALEN の発現そのものは、ウェスタンブロットを用いて確認ができていたが、配列の特異性あるいは認識が不十分な結果なのかについては明らかではないが、TALEN を用いた遺伝子破壊法は、細菌内での遺伝子破壊は困難であると考えられた。

一方、同様のターゲット領域を対象にした CRISPR/Cas システムでは、選定した4領域のうち、3領域をターゲットにしたベクターで完全に大腸菌の生育を阻害することができた。このことは、CRISPR/Cas のシステムによって目的とするターゲット領域が切断されたためと推察される。そのため、CRISPR/Cas システムを染色体内での組み込みに用いることができるのか否かについて検討をおこなった。

レンサ球菌の遺伝子破壊プラスミドとして用いられる pSET4S に、CRISPR/Cas のカセットを組み込んだプラスミドを構築した。このプラスミドは、28 ではレンサ球菌内でプラスミドとして保持されるが、37 にシフトアップを行うことで、染色体内に組み込まれる。その特性を利用して、pSET-Cas および pSET-Cas/SL01-3 の4種類のベクターをレンサ球菌内に遺伝子導入を行った。その結果、上記大腸菌での生育阻害が明確に示された3種類のターゲットについては、A群レンサ球菌でも同様に、生育の完全な阻害が認められたことから、CRISPR/Cas システムを用いることで、細菌の染色体をターゲットとした遺伝子破壊が起きることが示された。

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)

〔雑誌論文〕(計10件)

1. N. Maruyama, F. Maruyama, Y. Takeuchi, C. Aikawa, Y. Izumi, I. Nakagawa. Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis. Sci. Rep. 4, 6602. 2014..
2. A. Endo, T. Watanabe, N. Ogata, T. Nozawa, C. Aikawa, S. Arakawa, F. Maruyama, Y. Izumi, I. Nakagawa. A polymicrobial disease caused by competitive and cooperative microbial interactions from comparative genome analysis. ISME J. doi:

- 10.1038/ismej.2014.155. 2014.
3. K. Okada, M. Na Ubol, W. Natakathung, A. Roobthaisong, F. Maruyama, I. Nakagawa, S. Chantaroj, S. Hamada. □ "Comparative genomic characterization of a Thailand-Myanmar isolate, MS6, of *Vibrio cholerae* O1 El Tor, which is phylogenetically related to a "US Gulf Coast" clone." □ PLoS One 9:e98120. 2014
 4. Okura M, Lachance C, Osaki M, Sekizaki T, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Hamada S, Rossignol C, Gottschalk M, Takamatsu D □ "Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*" □ Journal of Clinical Microbiology J. Clin. Microbiol. 52:1714-1719. 2014.
 5. Nakagawa I. □ "Streptococcus pyogenes Escapes from Autophagy" Cell Host Microbe 14 : 604-606. 2013.
 6. Ito C., Saito, Y, Nozawa, T., Fujii, S., Inoue, H., Matsunaga, T., Khan, S., Aikawa, C., Takahashi, E., Sawa, T., Komatsu, M., Tanaka, K., Akaike, T, Nakagawa I, Arimoto, H., "Endogenous nitrated nucleotide is a key mediator of autophagy and innate defense against bacteria. Mol. Cell 52: 794-804. 2013. (IF=15.280)
 7. Goda A, Michi Y, Maruyama F, Nakagawa I, Harada K □ "Analysis of the factors affecting the formation of the microbiome associated with chronic osteomyelitis of the jaw" Clinical Microbiology and Infection 10.1111/1469-0 2013 (IF=4.578)
 8. Watanabe T, Nozawa T, Aikawa C, Amano A, Maruyama F, Nakagawa I. □ "CRISPR regulation of intraspecies diversification by limiting IS transposition and intercellular recombination." Genome Biol. Evo.. 5:1099-1111. 2013.
 9. Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, Nozawa T, Nakagawa I, Osaki M, Sekizaki T, Gottschalk M, Kumagai Y, Hamada S. □ "Genetic Analysis of Capsular Polysaccharide Synthesis Gene Clusters from All Serotypes of *Streptococcus suis*: Potential Mechanisms for the Generation of Capsular Variation." Appl Environ Microbiol. 79(8):2796-806. 2013.
 10. Minegishi K, Aikawa C, Furukawa A, Watanabe T, Nakano T, Ogura Y, Ohtubo Y, Kurokawa K, Hayashi T, Maruyama F, Nakagawa I, Eishi Y. □ "Complete Genome Sequence of *Propionibacterium acnes* Isolate from sarcoidosis patient." Genome Announc. 1(1). pii: e00016-12. 2013.
- [学会発表](計26件)
1. 第88回 日本感染症学会学術講演会, 2014年6月18-20日, ヒルトン福岡シーホーク(福岡) 丸山史人 "細菌の競合・協調的相互作用がもたらす恒常性破綻機構解析"
 2. 丸山史人 "口腔病原細菌ゲノム情報から紐解く恒常性破綻機構解析"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
 3. 相川知宏, Amonrattana Roobthaisong, 野澤孝志, 渡辺孝康, 丸山史人, 中川一路 "発現解析に基づいた選択的オートファジーに対抗するA群連鎖球菌遺伝子の同定"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
 4. 郷田瑛, 加地博一, 丸山史人, 中川一路 "複合細菌感染症に関わるキーストーン種と病原性因子ネットワーク"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)

5. 中島慎太郎, 今村拓郎, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 "細菌感染特異的オートファジーを制御する細胞制御因子の同定と機能解析"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
6. 野澤孝志, 野澤敦子, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 "Atg5-independent/Rab9a-dependent target of intracellular group A streptococcus"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
7. Bijaya Haobam, 野澤孝志, 野澤敦子, 尾田誠一郎, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 "Contribution of recycling endosome in Group A Streptococcus induced autophagosome formation"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
8. 尾田誠一郎, 野澤孝志, 野澤敦子, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 "The Small GTPase Rab30 regulates anti-bacterial autophagy"
9. 野澤敦子, 野澤孝志, Bijaya Haobam, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 "Atg5-independent/Rab9a-dependent target of intracellular group A streptococcus"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
10. 芝多佳彦, 丸山史人, 竹内康雄, 渡辺孝康, 小柳達郎, 和泉雄一, 中川一路 "インプラント周囲炎および歯周炎罹患部位の細菌群集比較を通じた周囲炎原因候補種と機能遺伝子の選定"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
11. 渡辺孝康, 野澤孝志, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 "歯周病原細菌におけるCRISPRのゲノム進化制御"第87回 日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船堀(東京)
12. 渡辺孝康, 野澤孝志, 相川知宏, 丸山史人, 中川一路 "歯周病原細菌におけるCRISPRのゲノム進化制御"第8回 日本ゲノム微生物学会年会, 2014年3月7-9日, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京)
13. 山田俊介, 柴崎真樹, 渡辺孝康, 丸山史人, 中川一路 "細胞内寄生を介したA群連鎖球菌の多様化・進化機構の解明"第8回 日本ゲノム微生物学会年会, 2014年3月7-9日, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京)
14. 丸山史人, 遠藤亜希子, 和泉雄一, 中川一路 "種間の競争・協力がもたらす複合感染症成立機構"第8回 日本ゲノム微生物学会年会, 2014年3月7-9日, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京)
15. Maruyama F "Polymicrobial Disease Caused by Novel Competitive and Cooperative Microbial Interactions" asm2014(アメリカ微生物学会総会), 2014年5月16日-22日, (アメリカ・ボストン)
16. 芝多佳彦, 竹内康雄, 中川一路, 和泉雄一 "インプラント周囲炎・歯周炎罹患部位で活性を有する細菌群集比較を通じた周囲炎原因候補種の選定"第78回国腔病学会学術大会, 2013年12月6-7日, 東京医科歯科大学(東京)
17. 遠藤亜希子, 渡辺孝康, 丸山史人, 和泉雄一, 中川一路 "歯周病原細菌ゲノム情報から紐解く種の共生機構"第29回日本微生物生体学大会, 2013年11月22-25日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島)
18. 中川一路 メインシンポジウム オーミクスから彫塑する疾患像 "CRISPRによる病原性細菌生存と進化侵略"第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013年9月

- 20-22日,岡山コンベンションセンター
(岡山県)
19. 丸山史人, 渡辺孝康, 野澤孝志, 中川一
路 "Porphyromonas gingivalisにおける
遺伝的組換えとCRISPRによる相反的な種
内多様性制御" 第55回歯科基礎医学会学
術大会・総会, 2013年9月20-22日, 岡山
コンベンションセンター(岡山県)
20. 遠藤亜希子, 渡辺孝志, 丸山史人, 和泉
雄一, 中川一路 "Red-complex構成細菌間
での異なる進化機構" 第55回歯科基礎医
学会学術大会・総会, 2013年9月20-22日,
岡山コンベンションセンター(岡山県)
21. 渡辺孝康, 野澤孝志, 相川知宏, 遠藤亜
希子, 丸山史人, 中川一路 "多株ゲノム
情報から見出された歯周病原細菌CRISPR
の新機能" 第7回日本ゲノム微生物学会
若手の会, 2013年9月19-20日, ろうきん
研修所富士センター(静岡県)
22. 丸山史人, 渡辺孝康, 野澤孝志, 相川知
宏, 中川一路 "遺伝的組換えとCRISPRに
よる相反的な細菌種内多様性制御" NGS
現場の会 第三回研究会, 2013年9月4-5
日, 神戸ポートピアホテル(兵庫県)
23. 渡辺孝康, 遠藤亜希子, 丸山史人, 和泉
雄一, 中川一路 "CRISPRとゲノム構造か
らみた歯周病原細菌の共存機構" NGS現
場の会 第三回研究会, 2013年9月4-5日,
神戸ポートピアホテル(兵庫県)
24. 丸山史人 "細菌感染および免疫システム
オートファジーに関わる遺伝子発現ネッ
トワークの解明" 新学術領域「ゲノム支
援」拡大班会議, 2013年8月28-29日, 神
戸ポートピアホテル(兵庫県)
25. 郷田瑛, 丸山史人, 道泰之, 加地博一,
中川一路, 原田清 "顎骨髄炎の細菌創
を規定する因子とコア・マイクロバイオ
ーム" 第7回若手コロッセウム, 2013年8
月7-9日, フォレストヒルズガーデン/広
島エアポートホテル(広島県)

26. 丸山史人 "A群レンサ球菌の宿主寄生を
介した新規病原因子獲得機構の時空間的
解析" マトリョーシカ生物の世界, 2013
年7月24-26日, 京都ガーデンパレス(京
都府)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 一路 (NAKAGAWA, Ichiro)
京都大学大学院医学研究科微生物感染症
学分野・教授
研究者番号: 70294113

(2) 研究分担者

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)
京都大学大学院医学研究科微生物感染症
学分野・准教授
研究者番号: 30423122