

# 細菌の獲得免疫機構CRISPR/Casシステムを利用した 高度ファージ耐性乳酸菌の開発

丸 山 史 人

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 准教授

(現 京都大学大学院医学研究科 准教授)

## 緒 言

ヨーグルトやチーズといった乳酸菌を利用した発酵乳製品の製造において、乳酸菌へのバクテリオファージ(細菌のウイルス、以下、ファージと呼ぶ)感染は、酸生成の低下や発酵の遅延、発酵乳製品生産の品質低下を引き起こす。こうした発酵不良を防止する目的で、ファージ耐性遺伝子の導入やこの増殖を妨害する様々な遺伝子を用いてファージの被害を最小限に抑える試みも行われてきた。しかしながら、ファージに関する情報、知見は極めて限られており、無数に存在する未知のファージへの対応は困難であるのが現状である。

近年、約半数の真正細菌や90%以上の古細菌が有する Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats (CRISPR) と呼ばれるゲノム上の反復配列と、CRISPR 関連遺伝子群 (CRISPR-associated genes: Cas 遺伝子群) が、乳酸菌に分類される *Streptococcus thermophilus* において、ファージに対する獲得免疫機構として機能していることが明らかになった<sup>1)</sup>。2006年、このCRISPR が、*Clostridium difficile* のゲノム内のプロファージ(感染したファージDNAがバクテリアゲノム内に組み込まれた状態のもの)内に発見され<sup>2)</sup>、その後、segmented filamentous bacteria のゲノムにおいても報告されている<sup>3)</sup>。これは、CRISPRが細菌ゲノム上だけでなく、ファージゲノム上においても機能することを示唆している。そこで、このCRISPRを持つファージを人工合成し、乳酸菌に感染させることで、安全かつ高効率で高度ファージ耐性の乳酸菌を作製できるのではないかと考え、本課題の起案に至った。すなわち、本研究では、乳酸菌と同一環境中のファージゲノム配列データベースを構築、利用することで、未知の乳酸菌ファージへの耐性菌の作製の基盤構築を目指した。

## 実験方法

CRISPRの特徴として、約30 bpの反復配列の間に、免疫対象となる外来DNAの短い配列(約30 bp、スペーサーとよぶ)を持ち、このスペーサーと同一配列を持つファージを排除する。つまり、排除したいファージの任意の一部配列をスペーサーとしてCRISPRに組み込むだけで、そのファージに対する耐性菌を創出することができる。スペーサー数も数個から数100個と任意で、乳酸菌の生息環境中の全てのファージ(メタゲノム)データの配列のうち保存性の高い配列をスペーサーとすることで、乳酸菌ファージとしてデータベースに登録されていない、未知のファージもカバーできる。加えて、CRISPRのベクターとしてファージを使用しているため、同じ環境中にある近縁種の乳酸菌にもファージ感染を介して免疫を付与できる点で大きな利点となり得る。また、特別な遺伝子発現を利用せず、菌本来が持っているCas遺伝子とファージ由来のCRISPR配列を利用するため、開放系での組換え体の安全性も確保できる。

そこで、どのようなプロファージ、ファージ上にCRISPRが存在するのかを同定し、配列の特徴、周辺領域を解析し、データベース化を行った。

## 結 果

まず図1に示すように、遺伝子データベース(GenBank)より、原核生物の全ゲノム、全ドラフトゲノム、プラスミドゲノム情報を取得、さらにHuman Microbiome Project, MetaHITより、ヒトメタゲノムデータを取得し、Pophage Finderにより、プロファージ領域の予測を行い、CRTにより、CRISPRの予測を行った。さらに、CRISPRfinderマニュアルでの確認をすることで、26個のプロファージ上に43個のCRISPRを同定することができた。

そのプロファージの宿主は、図2の通りである。

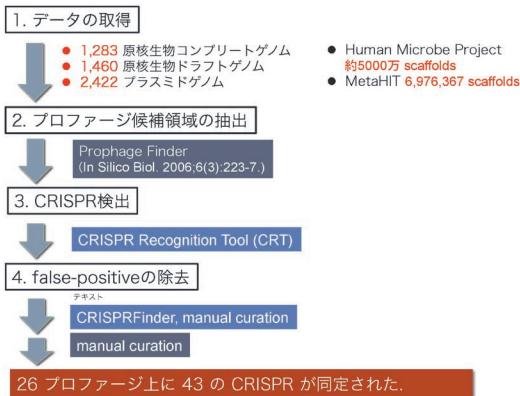


図1 CRISPRを持つプロファージの探索

宿主	プロファージ上 CRISPR 数の由来
bacteria complete genome	
Candidatus Arthromitus sp. SFB-mouse-Japan DNA	2 Mouse
Clostridium botulinum A2 str. Kyoto	3 Human
Clostridium botulinum B1 str. Okra	1 Human
Clostridium difficile 2007855	2 Bos taurus
Clostridium difficile 630	5 Human
Clostridium difficile B11	2 Human
Clostridium difficile CD196	2 Human
Clostridium difficile CF5	3 Human
Clostridium difficile M68	2 Human
Clostridium difficile R20291	2 Human
Methanobrevibacter ruminantium M1	1 Bovine (rumen)
Xanthomonas albilineans GPE PC73	2 Sugarcane
bacteria draft genome	
Clostridium botulinum Bf	2 Human
Clostridium difficile QCD-66c26	2 Human
Clostridium difficile QCD-76v55	2 Human
Clostridium difficile QCD-97b34	2 Human
Clostridium difficile QCD-37x79	2 Human
Clostridium difficile CIP 107932	2 Human
metagenome	
Streptococcus	2 様々な菌種のゲノムで見つかった。
Streptococcus	2 C. difficile に多数見つかった。
Bacillus	2

図2 CRISPRを持つプロファージの宿主

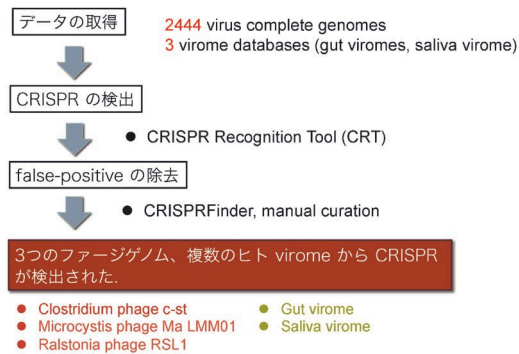


図3 CRISPRを持つファージゲノムの探索

Clostridium、Xanthomonas、Streptococcusといった細菌属に加え、Methanobrevibacterといった古細菌からもCRISPRを持つプロファージを検出することができた。

さらに、粒子形成能を持つことがわかっているファージやファージのメタゲノム中からのCRISPRの検出を図3のように実施した。その結果として、ゲノムから切り出されるか不明であるプロファージに加えて、粒子形成能を有するファージ、ファージのみが含まれるメタゲノ

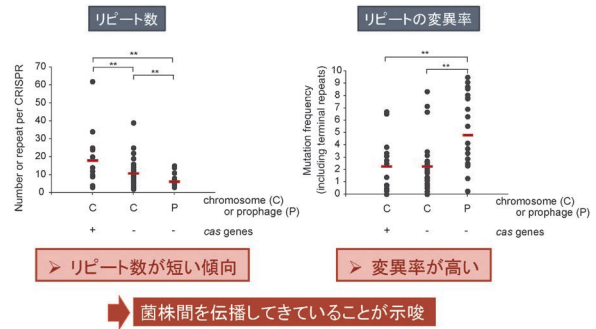


図4 プロファージ上のCRISPRのリピート配列の特徴

Host of spacer	Host of proto-spacer
Clostridium botulinum A2 Kyoto	Clostridium botulinum Ba4 str. 657 (prophage)
Clostridium botulinum A1 Okra	Clostridium botulinum A str. ATCC 19397 (prophage)
Clostridium difficile 630	Clostridium phage phiCD27
	Clostridium phage phiC2
	Clostridium phage phiCD38-2
	Clostridium phage phiCD27
	Clostridium phage phiC2
	Clostridium phage phiCD38-2
	Clostridium difficile R20291, Clostridium difficile CD196 (prophage)
	Clostridium difficile B11 putative phage or plasmid sequence
	Clostridium difficile R20291, CD196, 2007855, B11, M68, 630 (prophage)
	Clostridium difficile CF5
	Clostridium difficile R20291, Clostridium difficile CD196 (prophage)
	Clostridium difficile CD196 (prophage)
	Clostridium phage phiCD38-2
	Clostridium phage phiCD6356
	Clostridium phage phiCD6356
	Clostridium difficile 630 (prophage)
	Clostridium phage phiC2
Xanthomonas albilineans GPE PC73	Xanthomonas albilineans GPE PC73 (prophage)
Xanthomonas citri plasmid pXcB	Xanthomonas citri plasmid pXcB

図5 プロファージ上のCRISPRのスペーサーの由来

ムからもCRISPRの存在が確認され、また、Microcystis、Ralstoniaといった水圏、土壌に存在する細菌種のファージ、唾液や腸管のファージといった幅広い環境中のファージがCRISPRを保有することが明らかとなった。

そこで、さらに細菌ゲノム上のプロファージが粒子形成能を持つ可能性を探るためにCRISPRのリピート配列の特徴を図4のように調べた。その結果、プロファージ上のCRISPRに含まれるリピートの変異率は、CRISPR関連遺伝子の有無に関わらず、その他のゲノム領域にあるCRISPRリピートよりも、有意に高いことがわかった。

さらに、プロファージ上のCRISPRのスペーサーについて、その免疫対象を調べた。その結果、図5にまとめられたように、プロファージ上のスペーサーは他のファージ、プラスミドなどの外来因子を免疫対象としており、宿主染色体やCRISPRを保有するファージ自身を対象とするものは検出されなかった。

考察

本研究により、はじめて、幅広い細菌種、古細菌、メ

タゲノム中に CRISPR を保有するプロファージの存在が示された。さらに、粒子形成能を持つことがわかっているファージ、ファージのメタゲノム中にも CRISPR が存在することが示された。プロファージ上の CRISPR リピートが宿主のリピートよりも変異が蓄積していること、スパーサーが他の外来因子を標的としていることから、これらの CRISPR を持つプロファージは、菌株間を移動すること、さらに、他の複数のファージに対する免疫を宿主にもたすことが情報的に確認することができた。また、CRISPR の挿入位置から、ファージ形成に影響を与えない場所を同定することができた。これらのデータベースを用いることで、効率的な CRISPR を持つファージ作製の道を開くことができた。今後の展開として、乳酸菌ファージに普遍的な配列を見出すことが必須となる。さらに、粒子産生性を有しない乳酸菌ファージを作製できれば、ファージ耐性を持つ乳酸菌の創出が可能となる。

## 要 約

「食の科学」には、食品の機能科学や栄養学、バイオテクノロジーを利用した製造、加工方法の開発など、幅広い分野が含まれるが、本研究内容は特に、乳酸菌を利用した発酵食品製造分野への貢献が期待できる。また、乳酸菌を用いたプロバイオティクスにも貢献するものと考えている。乳酸菌は多くの発酵食品製造に関わり、健康効果を有することから、我々に最も身近な有用細菌として知られている。乳酸菌の産業利用のための改良は古くから行われてきたが、近年発達したバイオテクノロジーを駆使することによって、より高効率で合理的な乳酸菌の育種が可能になると期待されている。実際、一部の乳酸菌では遺伝子操作が可能となり、形質転換効率の向上が進み、NICE システムのような、強力なプロモーターを用いた目的遺伝子の大量発現系も確立された。しかし一方で、特にチーズの生産においては、開放系で発酵を行うため、バクテリオファージ（ファージ）感染による溶菌が酸生成の低下や発酵の遅延、発酵乳製品の品質低下を引き起こすことが知られている。こうした発酵不良を防止する目的で、ファージ耐性遺伝子の導入やファージの増殖を妨害する様々な遺伝子を用いてファージの被害を最小限に抑える試みも行われてきた。しかしながら、ファージに関する情報、知見は限られており、未知のファージへの対応は困難であった。

本研究では、細菌のファージに対する獲得免疫機構

CRISPR/Cas システムを利用することで、既知のファージだけでなく、未知のファージに対しても耐性を示す乳酸菌を作製するための情報基盤を築いた。すなわち、本研究結果をもとに作製された高度ファージ耐性乳酸菌を利用することで、乳酸菌を利用した食品製造過程で生じる、ファージ感染に伴う様々な品質低下を予防できると考えられる。時間の制限から、本研究では、安心・安全かつ安定的な乳製品の生産に貢献すると考えられる乳酸菌 (*Streptococcus thermophilus*) の構築原理までしか達成することはできていない。しかし、実際に構築できれば食の科学への大きな貢献が可能であると考えている。乳酸菌は、日本のみならず、世界中でプロバイオティクス研究の中心に位置づけられる重要な細菌である。本菌の有用性、定着性、病原細菌に対する影響など数多くの研究が実施されているだけではなく、多くの食品メーカーが新たな乳酸菌の単離、有用菌の選定を行っている。プロバイオティクスにおける大きな問題の一つに定着性の低さが挙げられる。すなわち、乳酸菌を経口摂取しても、定着せず、効能が持続しない。この原因として、様々な説がある。これまでに挙げられていない原因として、筆者らはファージの存在が大きいと考えている。最近の網羅的な腸内メタゲノム解析、特にファージのメタゲノム解析が実施されている。このデータから、乳酸菌のファージを含む、未知のファージが細菌よりも多数存在していることが明らかとなっている。このことから、乳酸菌を用いたプロバイオティクスの安定的な定着を阻害している因子として、ファージを考慮する必要があるということを発表した。つまり、本研究成果により乳酸菌のファージ抵抗株の作製や理論基盤の構築ができたならば、プロバイオティクスにおいても大きなブレイクスルーとなることは疑いようがない。本研究成果を用いた多くの学術的な「食の科学」に関する研究が進むだけではなく、実際の乳製品の改良が行われ、持続性の高いプロバイオティクスを可能となるものと確信している。

## 謝 辞

本研究に対して助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) R. Barrangou, et al.: *Science*, **315**, 1709-1712, 2007.
- 2) M. Sebaihia, et al.: *Nat. Genet.*, **38**, 779-786, 2006.
- 3) A. Sczesnak, et al.: *Cell Host Microbe*, **10**, 260-272, 2011.