



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on identification and evaluation of CRISPR diversity on human skin microbiome for development of a new personal identification method [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	豊間根, 耕地
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(感染症学)
Dissertation Number	乙第7170号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88077
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kochi_Toyomane_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（感染症学）

氏名：豊間根 耕地

学位論文題名

Studies on identification and evaluation of CRISPR diversity on human skin microbiome for development of a new personal identification method (新規個人識別法の開発を目的としたヒト皮膚マイクロバイオーームにおける CRISPR の探索と多様性解析)

近年の DNA 配列解析技術の革新に伴ってマイクロバイオーーム研究が急速に進展し、ヒトの体表を含めた環境中には、環境毎にその系統や組成が異なった微生物の集団が生存していることが明らかにされてきている。法科学領域においてはマイクロバイオーームの構造が環境によって異なることを応用して、ヒト皮膚マイクロバイオーーム解析による個人識別法の開発を目指す研究が各国で進められている。近年のマイクロバイオーーム研究は大きく二つの手法によって実施されており、一つがアンプリコンシーケンス解析、他方がショットガンメタゲノム解析である。従来用いられることが多かったアンプリコンシーケンス解析は、PCR により 16S rRNA 配列などのマーカー遺伝子を増幅し、網羅的に解読する手法である。しかしながら 16S rRNA 配列は近縁種では類似しており、しばしば属単位までの系統情報しか得られないことがある。そのため、個人識別においては解像度が低いと言われてきた。他方、ショットガンメタゲノム解析は試料中の DNA を断片化し、これを網羅的に解読する手法で、高い解像度でマイクロバイオーームの構造を把握することができる。しかし、解析にかかるコストが高く、PCR による増幅を経ないために多量の DNA が必要となるといった難点を抱える。このような背景から、ヒト皮膚マイクロバイオーーム解析による個人識別法の実現には、16S rRNA 配列よりも高い解像度で微生物の群集構造を捉えるマーカー遺伝子を利用した、新規アンプリコンシーケンス解析法を開発する必要があると考えられる。

CRISPR は原核生物の持つリピート配列で、Cas タンパク質と共に原核生物における「獲得免疫系」を担う。CRISPR はその機能を果たす上で、細胞内へ侵入してきたファージを中心とする可動性遺伝因子の DNA 配列を、リピート配列中にスペーサーと呼ばれる配列として取り込む性質を持つ。このような性質から CRISPR 配列の多様性は環境中のウイルス叢の構造を反映している。ヒトの皮膚におけるウイルス叢は細菌叢に比べて個人間の多様性が大きいことが知られており、本研究では CRISPR をマーカーとする新規アンプリコンシーケンス解析法を開発し、CRISPR の多様性に基づいた個人識別の法科学領域における有用性を検討することを目的とした。

第 I 章では、公開データベースに登録されたデータセットを利用して、皮膚マイクロバイオーーム中に存在する CRISPR を再構築し、複数人の間で共有される CRISPR のリピート配列を同定した。また、再構築された CRISPR について、その配列をリファレンスとなる CRISPR と比較したところ、再構築された CRISPR のスペーサー配列はいずれもリファレンス CRISPR には存在しない独自の配列であり、マーカーとしての有用性が示唆された。

第 II 章では、3 種類の候補 CRISPR について、スペーサー配列をアンプリコンシーケンスにより解析した。性能評価のために 16S rRNA 配列と比較したところ、スペーサー配列の多様性は 16S rRNA 配列の多様性より個人間の多様性が大きく、高い正答率で個人を識別可能であった。このことは CRISPR の配列解析が 16S rRNA の配列解析に比べ、個人識別用途に優れる可能性を示唆するものである。

第 III 章では、解析系の DNA 抽出法を最適化するために、第 II 章で使用した細菌叢解析に使用される DNA 抽出法と、自動抽出装置を用いた法科学領域で使用される DNA 抽出法の、2 種類の DNA 抽出法を比較した。16S rRNA 配列のコピー数の定量と CRISPR の多様性評価の結果、2 種類の DNA 抽出法は細菌 DNA の抽出効率について同等であり、CRISPR の多様性は DNA 抽出法によらず安定していると考えられた。また、試料の識別精度も同等であり、法科学領域で使用される自動抽出装置によって抽出された DNA が CRISPR の多様性評価にも使用可能であることが示された。

メタゲノムデータセットから同定された CRISPR のアンプリコンシーケンス解析により、皮膚上の連鎖球菌に由来する CRISPR の多様性が個人特異的であることが明らかになった。本研究は概念実証ではあるが、開発した CRISPR 解析法は従来の DNA 型検査法を補完する手法として、法科学領域において応用可能であると考えられる。今後もさらなる解析系の最適化と法科学的評価を進めることで、実用化に向けた課題の解決を目指し、さらなる解析系の最適化と法科学的評価が必要である。