



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（感染症学）

氏名：豊間根 耕地

審査委員	主査	教授	東 秀明
	副査	教授	鈴木 定彦
	副査	特任教授	大橋 和彦
	副査	准教授	中尾 亮

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い、ヒトの体表環境には、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、その微生物集団をヒト皮膚マイクロバイオームと呼ぶ。法科学領域においてはマイクロバイオームの構造が環境によって異なることを応用して、マイクロバイオーム情報を利用した個人識別法の開発を目指す研究が進められてきた。これまでにヒト皮膚マイクロバイオーム解析には、一般的な 16S rRNA アンプリコンシーケンス解析やショットガンメタゲノム解析といった手法が用いられている。しかし、技術的課題から皮膚マイクロバイオーム情報から個人を正確に識別するには、従来法よりも高い解像度で微生物の群集構造を捉えることが可能なマーカー遺伝子の発見ならびに、そのマーカーを利用した新規解析法の開発が必要と考えられていた。そこで、本学位論文の提出者豊間根耕地氏は、個々の細菌が固有の CRISPR 配列を保持し、その多様性は細菌が暴露された環境を反映していることに着目し、CRISPR 配列をマーカーとする新規アンプリコンシーケンス解析法、ならびに法科学領域における CRISPR 多様性に基づく個人識別手法の開発を進めた。

第 1 章では、個人識別マーカーとして利用可能な CRISPR 配列を同定するため、公開データベースに登録された皮膚マイクロバイオームデータセットを利用し、複数の皮膚検体で共通する CRISPR 配列の同定を行った。その結果、メタゲノムデータセットを再構築することにより 24 個の CRISPR アレイを同定することに成功した。これらの CRISPR アレイは、少なくとも 2 検体から検出されたことから、見出した CRISPR 配列が皮膚マイクロバイオーム間で保存されていることを明らかにした。さらに、各 CRISPR アレイのスペーサー配列はいずれも、これまでに報告され

ていない固有の配列であり、今回同定された CRISPR アレイは個人のマイクロバイオーム特性を解析することに有用なマーカーである可能性を示した。

第 2 章では、複数の被験者から得た皮膚試料を対象として、第 1 章で同定した CRISPR 配列のうち 3 つ (STEQ、STTH 及び MILU) を利用し、同定した CRISPR 配列が個人識別に有用であるかを検討した。各 CRISPR のスペーサー配列と従来法で利用されている 16S rRNA についてアンプリコンシーケンスを行い、比較解析を行った。その結果、個人間のスペーサー配列の多様性は 16S rRNA 配列の多様性に較べて大きく、CRISPR タイピングでは 95.2%の精度で個人を識別可能であったのに対し、16S rRNA シーケンスでは 52.6%にとどまった。このことから、CRISPR の配列解析が 16S rRNA の配列解析に比べ、個人識別能に優れることを明らかにした。

第 3 章では、CRISPR 配列を利用した個人識別法の感度ならびに精度を向上させることを目的として、2 つの DNA 抽出方法を比較し、皮膚スワブサンプルからの DNA 抽出法の最適化を進めた。2 つの方法を用いて調製された試料について、CRISPR アレルの多様性ならびに 16S rRNA 遺伝子コピー数の評価を行ったところ、方法によらず DNA 抽出効率も同等であり、加えて CRISPR の多様性にも違いは見られなかった。

豊間根耕地氏が本研究で得た知見は、個人識別法に新たな手法を提唱し、法科学領域の技術向上を大きく推し進めるものであり、法科学的個人識別の感度ならびに精度の向上を考えていく上で、重要な情報を提供し社会的意義の高い内容である。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者豊間根耕地氏が博士 (感染症学) の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。