

**研究者：渡辺 孝康**（所属：日本大学歯学部基礎自然科学分野（化学））

**研究題目：歯周炎局所の細菌叢データにおける歯周病原細菌の未知なる免疫記憶領域探索**

**目的：**

医療分野でゲノム編集への応用が近年注目される clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) は、細菌においてファージ等の侵入に対し獲得免疫機能を有するゲノム上の領域である。申請者は、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の CRISPR が通常の獲得免疫とは異なり、種内の非自己 DNA を標的としてゲノム組換えの抑制に関わっている可能性を示してきた。しかし、免疫対象を検索できる培養株由来データは不足しており機能解明を妨げている。そこで、実際の炎症病変に存在する細菌叢データを検索対象として用いれば、*P. gingivalis* の CRISPR の機能解明に役立つと考え、インプラント周囲炎病変の細菌叢由来のデータを用いて解析を行った。

**対象および方法：**

*P. gingivalis* 51 株、*Porphyromonas* 属細菌 14 種 46 株、および種レベルで未分類の *Porphyromonas* 属 10 株において先行研究にて同定した 30.1 型 CRISPR のスペーサー（免疫対象の記憶部位）1,561 個を、免疫対象を検索するクエリとした。一方、検索対象として、DNA Data Bank of Japan よりインプラント周囲炎病変の細菌叢由来 RNA データ（アクセス番号 DRR033605）を取得し、ソフトウェア Trimmomatic にて前処理として MiSeq read のトリミング・フィルタリングを行った。前述のスペーサーを、前処理済みの read データに対して BLASTN 検索にかけ、クエリ・対象配列ともに 20-bp 以上の一致を示した検索結果のみ抽出した。さらに、一致を示した read データについては、*P. gingivalis* のゲノムデータに対する BLASTN 検索にて E-value  $\leq 1e^{-5}$  を閾値として、*P. gingivalis* 由来の配列か否かを推定した。以上の解析は東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータを利用して行った。

**結果および考察：**

1,561 個中 250 個のスペーサーが、99,360 本の RNA 配列のうち 452 本と一致を示した。この 452 本のうち、*P. gingivalis* のゲノムと類似性を示した配列は 15 本のみであり、制限修飾系関連遺伝子や機能未知遺伝子などが含まれていた。当初、*P. gingivalis* に由来する RNA 配列を免疫対象とするであろうスペーサーが大半であると予想していたのに反して、*P. gingivalis* 由来ではないと推定される RNA 配列が主たる免疫対象と考えられたことから、*P. gingivalis* の CRISPR は炎症局所において、種内における組換え制御とは異なる何らかの機能を、他の細菌種由来の RNA に対して有しているのかもしれない。

**成果発表：**

1. 第92回日本細菌学会総会（2019年4月、北海道、予定）
2. データ数の増量や解析条件を検討の上、国際誌に投稿予定