

## 塩基配列レベルの獲得免疫：CRISPR-Cas system

「サンドイッチ反復配列：CRISPR」では、CRISPR という特殊な反復配列が Cas タンパク質群と協調して原核生物の免疫系として働いている可能性があることを紹介した。ここでは、CRISPR と Cas タンパク質が獲得免疫として機能していることを実際に示した Barrangou らの研究を紹介する (Barrangou et al. 2007)。

*Streptococcus thermophilus* はヨーグルトやチーズの生産に利用されるなど人間活動に重要な細菌である。ヨーグルトやチーズの大量生産では、単一の細菌の密度が非常に高くなるため、この細菌に感染するファージにとっては理想的な環境である。よってファージの感染が起こりやすく、対策としてファージ耐性株も多数得られている。Barrangou らはこれらをの CRISPR 座位を比較し、親株に比べてファージ耐性株では、leader 配列側に spacer の追加があることを発見した。これは、自然条件下でファージに被曝した中で、spacer の挿入によってファージ耐性を獲得したことを示唆している。そこで、彼らは実験的にファージ感受性株 DGCC7710 に近縁な 2 種類のファージ 858 と 2972 を感染させ、9 種類の耐性株を得た。やはり CRISPR 座位に変化が生じており、1 つから 4 つの spacer の追加が観察された。また、これらの spacer の配列はファージの配列と高い相同性を示した。spacer の配列はファージゲノムにまんべんなく分布しており、コード領域にも非コード領域にも偏りなく存在していた。一部の耐性株は両方のファージに対して耐性を示し、別の耐性株は片方のファージにのみ耐性を示した。これは、2 種類のファージで配列が保存されている部分に対応する spacer を持っている耐性株では両方のファージに耐性を示しているためであった。858 特有の配列を spacer に持っているものは 2972 には感受性であり、逆に 2972 特有の配列を spacer に持っているものは 858 には感受性であった。spacer の長さは 30bp で、1 塩基でも配列が異なっていると耐性は得られない。

続いて CRISPR の spacer を人為的に除去、付加する実験を行い、spacer が本当にファージ耐性に寄与しているのかを確認した。ファージ 858 に耐性な株で新規に挿入された 2 つの spacer を除去すると 858 に感受性に変化した。逆に 858 に感受性の株にこの 2 つの spacer を挿入すると耐性に変化した。さらに、cas5 と cas7 を破壊した細菌を作成し、感受性を調べたところ、cas5 を破壊するとファージ耐性が失われたが、cas7 の場合には感受性に変化は認められなかった。この原因は cas5 がファージ耐性に直接的に関わっているのに対して、cas7 は spacer の新規挿入に寄与しているためと想定される。cas5 は HNH タイプのヌクレアーゼのモチーフを持つため、ファージの分解に nuclease として働いていると考えられる。著者らは、cas7 破壊株ではファージ耐性変異株を新たに得ることができなかったことを記し、その傍証としている。

ところで、ファージ被曝の実験中に著者らは、ファージ858に耐性となる spacer、S1 と S2 を手に入れた細菌に感染できるファージがいることを見つけた。このファージの配列を調べたところ、S1 に相当する配列に 1 塩基置換が起きており、これによって CRISPR-Cas system による阻害をかいくぐって感染することが出来るようになっていたことがわかった。ここから、spacer の 30 塩基の内、1 塩基でも異なっていると免疫が付与されないことがわかる。ちなみに S2 は 858 に対しても 2972 に対しても 1 塩基異なっており、感染防御には寄与していないと考えられる。

Barrangou らの解析結果は、ファージに被曝することでファージ由来の配列を spacer とする耐性株が出現することを明瞭に示している。ファージに被曝しないと得られないので、これは間違いなく獲得免疫である。また、塩基配列の 100% match が要求されるという非常に厳密な条件の感染防御系であることも明らかになった。これまでほとんど配列レベルでの解析しかなされてこなかった CRISPR において実験がなされた意義は大きい。しかも実験そのものは非常に簡単なものである。この獲得免疫系がどのようにしてファージの感染を阻害するのかも早晚明らかになることであろう。

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P.

CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.

Science. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.

2007/06/22

小島 健司 著  
禁 無断複写転載