

五條堀 孝

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所
生命情報・DDBJ 研究センター・教授

Digital DNA chip による生物多様性評価と環境予測法の開発

§1. 研究実施体制

(1)「五條堀」グループ

- ① 研究代表者:五條堀 孝 (国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ 研究センター、教授)
- ② 研究項目
 - ・メタゲノムデータベースの構築、改良
 - ・Digital DNA chip システムを用いたデータ解析

(2)「浅川」グループ

- ① 主たる共同研究者:浅川 修一 (東京大学大学院 農学生命科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・次世代シーケンサーを用いた海洋微生物 DNA データの解析

(3)「石野」グループ

- ① 主たる共同研究者:石野 良純(九州大学大学院 農学研究院、教授)
- ② 研究項目
 - ・海洋環境水からの微生物採取機器開発
 - ・海洋環境水からの DNA 抽出

(4)「桑田」グループ

- ① 主たる共同研究者:桑田 晃 (水産総合研究センター 東北区水産研究所、主任研究員)
- ② 研究項目
 - ・海洋環境のモニタリングおよび海洋環境水の採取
 - ・微小プランクトン群集の変動機構の解析

(5)「河地」グループ

① 主たる共同研究者：河地 正伸（国立環境研究所 生物・生態系環境研究センター、主任
研究員）

② 研究項目

・フローサイトメトリを用いたピコ植物プランクトンの多様性解析

§ 2. 研究実施内容

(A. 五條堀グループ)

(1) 研究の狙い

本研究では、先の大規模震災で海洋環境の変化が顕著と予想される東北沿岸域の養殖漁場を中心に定点を定め、経時的なメタゲノム解析と物理化学環境の観測を行い、震災により激変した海洋環境の現在状況、沿岸海域の漁場環境の修復動態と遷移方向の予測を目的としている。本研究では、経時的にモニタリングを行い、海洋環境中の微生物叢の動態の把握を行う。

具体的には、海水に生息する微生物を混在した状態で一括して採取し、微生物から DNA を抽出、シーケンシングしてデータ化し、特定の場所を定めてモニタリングすることで基礎情報を収集する。このシステムを用いることで、震災後や温暖化などの環境変化に相関する特異的 DNA を抽出することができるようになり、DNA の変化で環境変異を予測可能とし、さらに、その DNA がどの種に属する生物であるかなどを研究することで、環境の改善などの研究へ応用するものである。

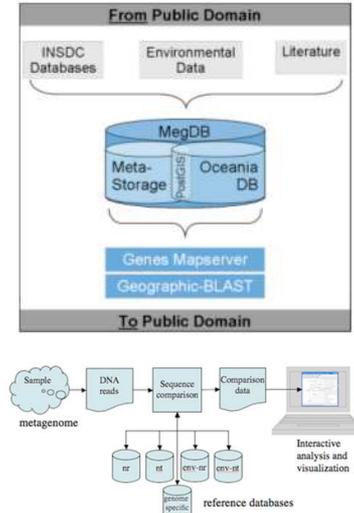
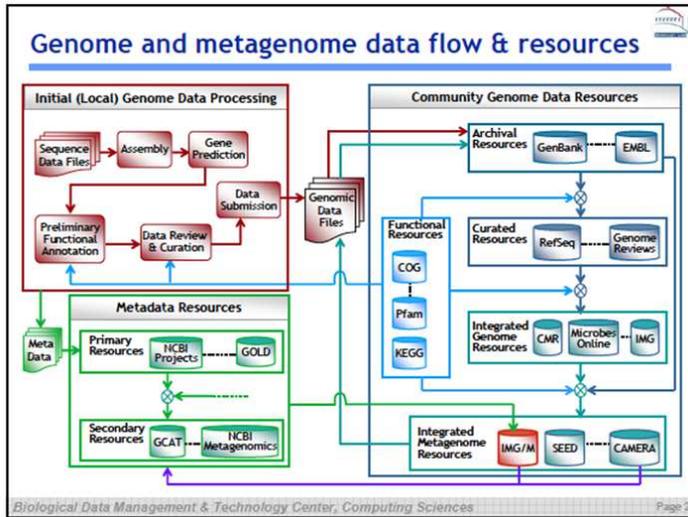
(2) 研究進捗状況、研究成果

平成 23 年度は期間も 3 ヶ月程度と短いため、来年度の前工程と位置づけ、研究に必要な具体的な施策方法の検討を主体とした研究を進めた。具体的には、メタゲノム解析による海洋生態の動態把握を効果的に行うために、メタゲノムデータベースに inputs するデータの品質管理のあり方を検討した。特に、本プロジェクトからの実際の塩基配列データが産生されてくるまで、データベースへのデータ登録に先立つサンプル収集・DNA 抽出・シーケンシングのプロトコルが感度や精度に鋭く影響することから、公共データベースなどから利用可能な海洋微生物の配列データが産生されている文献情報の検索により、過去に用いられたプロトコルと得られた塩基配列データの品質の関係を調べた。

海洋多様性モニタリングに利用できる微生物 DNA 配列の解析システムについては、既存のデータベースやアノテーションフローの調査結果に基づき、サルガッソー海の微生物 DNA 配列情報をモデルに用いて、デジタル DNA チップのために必要なデータ作成の条件検討を試験的に行った。

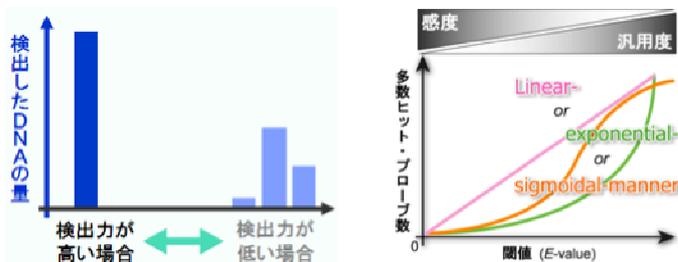
国際 DNA データベースから入手したサルガッソー海 (アクセッション番号 SRX000202; 2005 年 6 月採水) のメタゲノムデータを用いてクラスタリング解析を行うことで、海水を代表する配列群を生成し、この一連のテストを実施したことによって、配列類似性の検出閾値 [E-value] が e^{-50} ~ e^{-30} の範囲において良好な結果が得られ、方法論としての基礎的な部分の確認ができた。また、この作業に併せて、公共データベース等から海洋生物多様性評価に役立つ DNA 配列情報のスク립ト・パイプラインの設計試作を行った。

図 配列解析フロー調査結果例



Biological Data Management & Technology Center
LawrenceBerkeleyNationalLab
(<http://metagenomics.calit2.net/2007/talks07/victorm.pdf>)

図 検出条件の検討



(3) 今後の見通し

24年度以降は、より精度の高い環境指標となるようなDNA配列プローブの設計を進めるとともに、実データに基づき、地域、時間軸等、より詳細なデータを集め評価の精度をあげる。また、同時に、予測を実現する為のプローブセットの設計を進める。更に、得られたプローブセットをデジタルDNAチップの試験に使い、チップの精度向上に努めるとともに、実際のデータに適応し更なる開発を進める予定である。本年度の予備的開発により、方法論としての基礎的な部分の確認ができたと考えており、今後は、より具体的なシステムの開発を行う事により、目標達成に向けて努力する。

(B. 浅川グループ)

(1) 研究の狙い

本課題では、解読能力が高く、解読コストの安い最新の次世代シーケンサーを用いてメタゲノム解析を推進、海水中の微生物叢の多様性の動態を解析し、微生物生態系の変化からの環境変化の予測を目的とする。メタゲノム解析に用いる次世代シーケンサーは、検出反応系の違い、リード数、リード長など機種により特長が異なるため、海洋メタゲノム解析に最適な機種選定と試料DNAのライブラリー調製が必要である。本課題では、まず海洋メタゲノム解析に適した次世代シーケンサーを選定して、安定的、低コストでメタゲノム情報を得るための解析系を確立する。それらを用いて東北沿岸の定点の微生物叢をDNAレベルでモニタリングし、微生物叢のメタゲノム基礎情報を収集する。震災等による汚染状態や環境変化など種々の海洋環境の海域に生息する微生物の種類やゲノムを調べ、病原菌を含む系統的微生物集団と遺伝的変異や微生物の割合等を解析し、東北沿岸の環境状態の変化を予測する基礎知見を得る。

(2) 研究進捗状況、研究成果

九州大学の石野グループより、水深0-10メートルでサンプリングした5検体の試料海水から抽出したDNAの提供を受けた。それらのDNAを出発材料にして、長さ約100bpのsingle-endのメタゲノムDNAライブラリーを構築した。次に次世代半導体シーケンサー Ion Torrent PGMを用いて、構築したメタゲノムDNAライブラリーのシーケンシングを行ない、半導体チップ314を用いて平均長さ117bp、のべ約61Mbのシーケンスデータを得ることができた(図1)。得られたシーケンスの中Quality Score 17以上の塩基は約54Mb、Quality Score 20以上の塩基は約51Mbであった。今回のIon Torrent PGMのカタログ値(10Mb)と比べて、約6倍のスループットを得られた。現在はこのシーケンスデータを用いて、NCBI homology searchをかけて海洋微生物叢のDNA同定と解読を進めている。

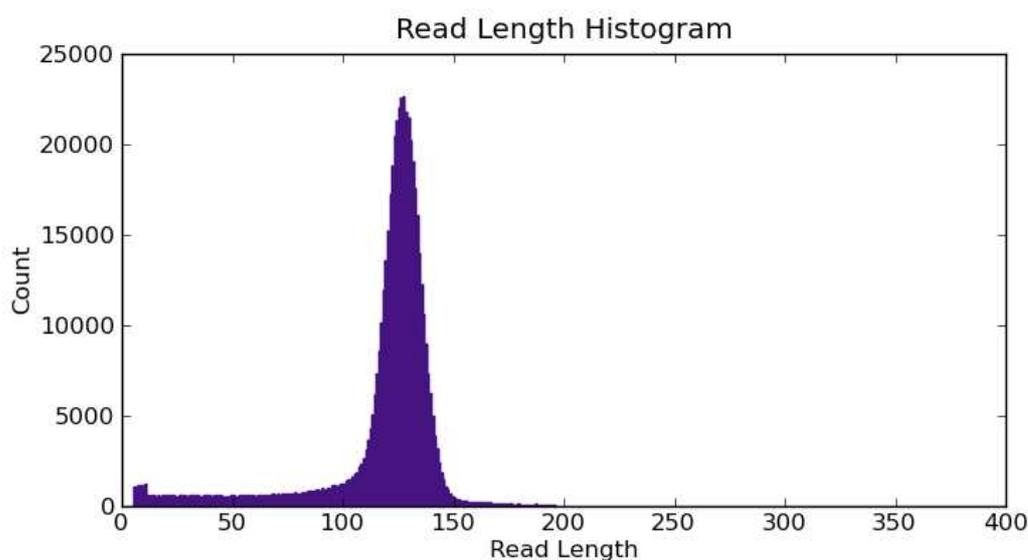


図 1. Ion Torrent PGM から得られた DNA 配列の長さ分布

(3) 今後の見通し

今回の実験により、本研究で最も有力視している次世代半導体シーケンサー Ion Torrent PGM から、低コスト、短時間で大量なメタゲノム配列を得られることが確認できた。本報告までにテストしたサンプルは1検体であるが、現在さらに残りの4検体のシーケンシングを進めている。また、今回用いたのは半導体チップ 314 であるが、今後は 314 の実質 10 倍(カタログ上は 50 倍)の解読能力をもつ 318 チップを用いて解読を行なう。

今後、引き続き Ion Torrent PGM が用いてメタゲノムサンプルの塩基配列を解読、提供し、東北沿岸を中心に微生物の構成を把握し、経時変化、環境変化を把握するとともに、Illumina 社等、他のシーケンサーによる解読も行なって、データの照合を行ない、それぞれの特性を把握する。最終的には東北沿岸微生物叢の多様性評価、環境状態の変化と微生物叢の構成を関連づけて、環境、生態系保全に資する基盤データを得ていきたい。

(C. 石野グループ)

(1) 研究の狙い

海洋の微生物から効率良く無傷の核酸を抽出することは、メタゲノム解析にとっては欠く事のできない実験過程であり、調製されたDNAの質と量は、メタゲノム配列解析の精度に大きく影響する。本研究グループでは、海水試料から効率良くメタゲノム解析に必要なDNA試料の調製を行うための技術開発を担当する。海水のろ過法や濃縮法を試みながら、海水中の微生物細胞数を測定することと平行してDNA調製を行い、どのくらいの収率で DNA が得られているかを見極めながら、実用的な方法論を確立させる。

(2) 研究進捗状況、研究成果

当研究グループでは、これまでに日本各地の温泉土壌や珊瑚礁の多い沖縄近海から DNA を抽出してメタゲノム解析を行ってきた実績を有している。

本年度は、予備試験として福岡県沿岸から採取された海水試料を用いて効率良く微生物を分離、採取および DNA を採取する方法の検討を行った。海水をフィルターろ過し、フィルター上から DNA を回収する手法をとることにし、個々の条件検討を開始した。

海水試料のろ過は 8 μm (プランクトンの捕捉)、1 μm (プランクトンや浮遊物に付着した微生物の捕捉)、0.2 μm (微生物、潰れたプランクトンの捕捉) のポアサイズのフィルターメンブレンを用いることにした。フィルターはろ過速度や入手のし易さなどから 8 μm および 1 μm フィルターは Whatman 社製 Nuclepore、0.2 μm フィルターは ADVANTEC 社の混合セルロースエステルを使用することにした。また、目に見えるゴミが含まれる場合には、8 μm フィルターの前に Filter Paper1 (Whatman 社製) でろ過(自然落下)を行うことにした。DNA の抽出方法については、自家製試薬によるマニュアル法と共に、MOBIO 社製 Ultra Clean Water DNA Isolation Kit の使用を検討した。

① 海洋環境水からの微生物の分離および採取方法の確立

ろ過行程において各フィルターにどのくらい細菌が捕捉されているのかを、大腸菌を用いて検討を行った。生理食塩水 2 L に大腸菌培養液 10 OD 分を添加して模擬液を調製した。これには大腸菌細胞が 8×10^9 個含まれる。この模擬液を 8 μm 、1 μm 、0.2 μm フィルターで逐次ろ過し、それぞれのフィルターから、Ultra Clean Water DNA Isolation Kit を使用して DNA 抽出を行った。その結果、8 μm フィルターから 120 ng、1 μm フィルターから 481 ng、また、0.2 μm フィルターから 1820 ng の DNA が得られた。大腸菌培養液から直接 DNA 調製した場合には 1840 ng 採れたので、模擬試料中の大腸菌の DNA の大部分が 0.2 μm フィルターから採取出来ることが分かった。

また、フローサイトメトリーにより福岡近海海水試料中の細菌数の測定を行うため、海水試料 8 L を 2 L ずつ 4 つに分注後、8 μm 、1 μm 、0.2 μm フィルターでろ過し、各ろ液をフローサイトメトリーにより細菌数の測定を行った結果を表 1 に示す。

Sample name	Cell / μl
A-8 μm ろ過後	1329
A-1 μm ろ過後	547
A-0.2 μm ろ過後	123
B-8 μm ろ過後	1216
B-1 μm ろ過後	558
B-0.2 μm ろ過後	115
C-ろ過前	1501
C-8 μm ろ過後	1383
C-1 μm ろ過後	503
C-0.2 μm ろ過後	149
D-ろ過前	1560
D-8 μm ろ過後	1522
D-1 μm ろ過後	561
D-0.2 μm ろ過後	121

表 1 フローサイトメトリーにより測定された海水中の細菌数

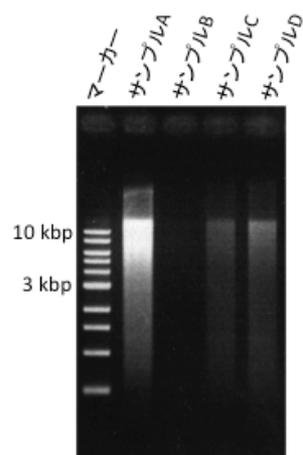


図1 0.8% アガロースゲル電気泳動

この結果、0.2 μm フィルターには約 400 cell/ μl の細菌が捕捉されているという計算になる。従って、海水試料 2 L をろ過した場合には、0.2 μm フィルターには約 8×10^8 個の細菌が捉えられるということになる。

② DNA 抽出法の確立

DNA の抽出方法については MOBIO 社製 Ultra Clean Water DNA Isolation Kit を用いて検討を行った。海水試料 4 種類 (A-D) を 8 μm 、1 μm 、0.2 μm フィルターでろ過を行った後、上記キットを用いて DNA の抽出を行った。結果、各サンプルの DNA 収量は A 1600 ng、B 315 ng、C 380 ng、D 860 ng となった。得られた DNA をアガロースゲル電気泳動で分析した結果を図 1 示す。

また、同一海水からの DNA 収量の比較検討を行った。まず海水試料 8 L を 2 L ずつ 4 つに分注する。8 μm 、1 μm 、0.2 μm フィルターでろ過を行った後、0.2 μm フィルターを 4 等分し(A ~D とする)、サンプル名ごとにまとめて(4 枚を 1 セットとする)MOBIO 社製 Ultra Clean Water DNA Isolation Kit で DNA 抽出を行った。結果 A 156 ng、B 144 ng、C 162ng、D 165 ng となり、均一に DNA を抽出することが可能であることが分かった。

(3) 今後の見通し

海水試料から DNA を調製する方法の確立を目指して、研究を開始したが、今年度の、大腸菌を用いた模擬液からの DNA 回収実験と、福岡近海から得た海水試料を用いた DNA 調製実験の結果は、極めて良好であり、2 L の海水試料から得られる DNA 量は、次世代シーケンサーを用いて配列解析を行うことが可能なものであることが分かった。今年度は本研究目標の基盤作りができたので、今後この基礎データを基に、量と質の両方の観点から、より効率のよい DNA 調製法の開発を目指す。さらに、自動海水サンプリング装置の開発にも繋げて行く。

(D. 桑田グループ)

(1) 研究の狙い

本課題では、東北海域における海水中の微小生物群集の変動要因を明らかにする。震災被害を受けた仙台湾と、水産総合研究センターが定める東北沖合域の観測定線 A ラインにおいて、海洋環境と植物プランクトン群集、細菌群集組成をモニタリングし、微小プランクトン群集の構造・多様性と海洋環境との関係を解析する。さらに、メタゲノム解析で不可欠な現場サンプルを採取するとともに実際の生態系動態を左右する植物プランクトン優占種の発現遺伝子データを収集提供する。

(2) 研究進捗状況、研究成果

初年度である本年度は、東北海域の海洋モニタリングにおける観測方法の検討・観測器材の整備を中心に行い、来年度からスムーズにモニタリング研究を実施するための体制を整備した。

1) 仙台湾定線及び東北沿岸・沖合域の観測定線(A-line)の海洋環境モニタリングの観測方法の検討

これまでの観測結果を検討し、仙台湾定線及び東北沿岸・沖合域の観測定線(A-line)海洋観測の観測項目、試料の採取法、代表点の選定等、モニタリングデザインを検討した。

2) メタゲノム解析用サンプル採取法(採水、ろ過、フィルター保存等)の検討

EU 現行の海洋のメタゲノムプロジェクト(BioMarks)のプロトコル等を参考に、メタゲノム解析用 DNA サンプル採取法の検討を行い、プロトコルの作成及び採集機材の検討を行った。その結果、送液ポンプと 142mm フィルター用ステンレスフィルターフォルダーで構成される、船内でも作業可能なメタゲノム解析用 DNA サンプル採取システムを構築した。(図1)

3) 3月東北水産研究所調査船若鷹丸による仙台湾定線および沖合域の観測定線(A-line)の海洋環境モニタリング調査

1)で検討した観測方法及び2)のメタゲノム解析用 DNA サンプル採取システムのチェックを主な目的とし、3月より2週間、東北海域の海洋モニタリングを試験的に開始した。



図1 メタゲノム解析用 DNA サンプル採取システム

(3)今後の見通し

本年度で、東北海域の海洋モニタリングにおける観測計画・方法の検討・観測器材の整備がほぼでき、来年度4月中旬(予定)より仙台湾定線の調査を初めとして、仙台湾定線及び東北沿岸・沖合域の観測定線(A-line)の海洋環境モニタリングとそれに伴うメタゲノム解析用 DNA サンプル採取を開始する。

(E. 河内グループ)

(1) 研究の狙い

本研究で対象とするピコサイズの植物プランクトンは海洋環境の基礎生産者としての重要性に加えて、進化系統的に極めて多様性が高く、未知未培養性の種を多く含むことが知られる。海洋微生物の動態解析を行う上で、ピコ植物プランクトンは、重要なターゲットの一つとして位置づけることができる。優占種を培養株として確立して、その多様性解析を行うことは、当該海域の生物多様性の実体を明らかにする上で、必要な研究と言える。確立した培養株は、研究手法開発や技術開発のための材料として他の共同研究グループでも利用可能にするとともに、メタゲノム情報を補完する上でのレファレンスゲノムとしての利用も期待できる。また収集した環境試料について凍結保存を行うことにより、培養株の確立や再現性の高い DNA 解析を繰り返し行う事が可能であり、より詳細な研究を展開することが期待できる。

(2) 研究進捗状況、研究成果

東北沿岸海域のピコ植物プランクトンの多様性解明とメタゲノム情報を補完するためのレファレンスゲノムとして利用可能な培養株の確立を目的として、初年度は、試料収集およびフローサイトメトリ(FCM)による細胞分取の条件検討と18SrDNAのクローンライブラリによる多様性解析を行うとともに、T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis)法による簡便な多様性解析の有効性について検討した。

2011年3月に親潮海域で採取、凍結保存した環境試料について、FCMによる群集解析を行い、ピコからナノサイズで、クロロフィル蛍光をもつ細胞を選択的に分取した(図1. 左、Aリジョン)。約1,000細胞の分取細胞について、全ゲノム増幅を行い、18S rDNAのクローンライブラリを作成した。その結果、約40種からなる182配列のうち173配列(約95%)は植物プランクトン由来の配列であり、FCMを用いて細胞を分取することで、効率よく植物プランクトンの多様性を解析できることが明らかになった。またT-RFLP解析(約1700bpの18SrDNA断片、制限酵素としてHhaとMnlを使用)を行うことで、種の多様性に対応するDNA断片ピークパターンを得ることができた(図1右)。各ピークは優占種に対応すると考えられ、再現性の高さも確認できた。更に2012年2月に東北沿岸域で収集した海水試料について、培養処理および凍結保存を行った。現在、レファレンスゲノムに資するピコサイズ植物プランクトンの培養株確立と多様性解析に取り組んでいる。

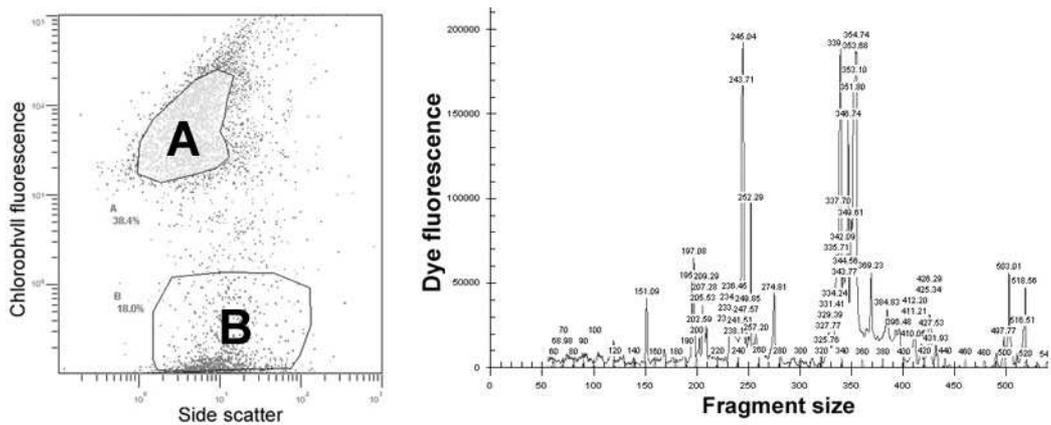


図 1. FCM による解析像(左)と T-RFLP による DNA 断片ピークパターンの解析結果(右)

(3) 今後の見通し

FCM で植物プランクトンを選択的に分取することで、効率よく多様性を解析できることが明らかになった。今後は FCM のリジョン設定を細分化することで、特定の細胞集団、すなわち特定種のゲノム解析を可能とする分取条件について検討を行う必要がある。また T-RFLP 解析は、種レベルの多様性を簡便に把握する上で有用であり、クローンライブラリを作成する前に、T-RFLP で多様性を確認することで、簡便かつ低コストで優占種の多様性を把握できると考えられた。

現在、レファレンスゲノムとして利用可能な培養株の確立に取り組んでいるが、東北沿岸域に優占的に存在する重要種を選別する際には、クローンライブラリや T-RFLP を用いた環境試料中の多様性解析結果と培養株の DNA 情報を相互に比較することが必要と言える。検討すべき課題は残されているが、東北沿岸域における試料収集とモニタリング調査を実施するための主要な研究方法および研究体制を整備することができた。