

微生物ゲノムシーケンシング体制の活用による微生物システム解明への基盤構築

●服部 正平¹⁾ ◇藤 英博²⁾ ◇高見 英人³⁾

1) 東京大学大学院新領域創成科学研究科 2) (独) 理化学研究所 3) (独) 海洋研究開発機構

<研究の目的と進め方>

本研究は、「比較ゲノム」および「応用ゲノム」領域との連携等により、シーケンシング解析体制を駆使して、自然環境下での微生物集団を含めた微生物ゲノム解析を実行し、微生物ゲノム解析支援及び微生物システム解明のための新たな研究基盤の構築を目的とする。

基本的に2つのタイプの研究を進める。ひとつは「比較ゲノム」及び「応用ゲノム」領域から取り上げられるさまざまな微生物を対象とした解析支援である。これに関しては高速廉価なゲノム解析システムを駆使して当該テーマの推進を計る。ふたつ目は自然環境下の微生物集団のゲノム解析（メタゲノム解析）である。本研究では、ヒトの健康と病気/感染症と密接に関係するヒト腸内フローラのメタゲノム解析をおもなテーマとする。数百種類の細菌から構成される複雑かつ多様なヒト腸内フローラを解明するため、まずフローラサンプルの収集法、細菌叢の溶菌法、ゲノムDNAの純化法/ライブラリー作成法、シーケンスの情報学的解析法等の基本的なメタゲノム解析法を確立する。ついで、確立した解析手法を用いて、腸内フローラをはじめとしたさまざまな環境細菌叢のメタゲノム解析を進める。本研究によって、環境棲息細菌叢の実体や細菌-細菌-宿主間相互作用等の包括的な微生物生命システムの解明をめざす。また、得られる新規遺伝子や代謝物等は学術及び産業上有用なバイオ資源発掘の基盤になると期待される。

<2008年度の研究の当初計画>

〔研究支援〕前年度にひきつづき、「応用ゲノム」および「比較ゲノム」領域との連携ならびに他機関との共同研究として、ヒト常在菌を含めた種々の個別細菌ゲノムのゲノムシーケンスを進める。今年度対象とする細菌種は*Bifidobacterium*属に近縁の口腔と腔に棲息する*Gardnerella*株と*Scardovia*株、ガン抑制効果を示すエクオールを生産するヒト腸内常在菌株、ヘリコバクターピロリ菌、黄色ブドウ球菌などである。

今年度導入した次世代シーケンサー 454FLX については、細菌ゲノムのシーケンス決定の中で、配列データの評価を含めた技術確立を進める。

〔細菌叢メタゲノム解析〕前年度までに、3ヶ月から45歳の成人、子供、離乳前乳児を含む健康な13名の日本人の腸内フローラの解析（遺伝子予測、個々遺伝子の相同性検索による遺伝子 annotation と組成解析、クラスタリングによるCOG解析、個人間や各種環境間における遺伝子相同性解析とCOG頻度比較等の解析など）を通して、腸内フローラの多様性、個人間相違、動的变化等に関して研究してきた（2007年度に論文発表）。

今年度においては、13名のサンプルの16S配列情報の取得とその解析を開始し、16S解析とメタゲノム解析で得られた菌種組

成との比較や各サンプル間の類似性、皮膚や口腔細菌叢などとの組成比較などを行う。

アンモニアを嫌氣的に酸化して窒素に変換するアナモックス細菌叢のメタゲノム解析を進める。このプロジェクトはアナモックス能を有する主要細菌ゲノムの再構築にある。

<2008年度の成果>

〔研究支援〕「比較ゲノム」および「応用ゲノム」領域との連携ならびに独自の計画・共同研究によって、健康な日本人より分離した常在性大腸菌SE11（1株）、2種類のシロアリ腸内共生細菌、病原細菌オリエンチアツツガムシ、ヒト口腔病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 株、2種類のプロバイオティクスであるラクトバチラス属株と近縁の同属株などのゲノム解析の論文を発表した。シロアリ共生細菌のゲノム解析では、わずかに数十ピコグラムのゲノムDNAを改良した全ゲノム増幅法で増幅できたことによってゲノムシーケンスが可能になった。また、これらの解析から、シロアリ腸内では宿主による木質の分解からの炭素源・エネルギー源の獲得と共生細菌の働きによる空気中からの必要な窒素素分の獲得（アミノ酸などの供給）を同時に行なう生態系であることが明らかになった。エコール生産ヒト常在菌（2株）、ヘリコバクターピロリ菌（4株）、黄色ブドウ球菌（4株）のゲノムシーケンスを行い、一部は完成データとして遺伝子組成などの解析を進めている。

今年度導入した次世代シーケンサー 454FLX については、配列データの評価を含めた技術確立を進めた。基本的な技術習得は完了し、本特定領域研究での技術支援を開始した。

〔細菌叢メタゲノム解析〕ヒト腸内細菌叢のメタゲノム解析については引き続き、応用ゲノムの班員ならびに国内研究機関との間でいくつかの病患者からの病態腸内フローラサンプルの収集を進めた。また、メタゲノム解析に使用した13名の健康サンプルの16S配列データの収集を終えて、これらのデータ情報学的解析を進めている。

アナモックス細菌叢のメタゲノム解析では、優占する1種類の細菌ゲノム構造の輪郭が見えてきた。このゲノム配列を調べたところ、アナモックス能を有すると推定された。今後、この主要細菌のゲノムシーケンスの完成を進める。

連携研究者の高見は下北沖の海底地層の細菌叢の垂直分布（最深部は海底下348m）の解析を16Sとメタゲノム解析で進めている。一部の解析結果を今年度米国サンディエゴで開催され国際ワークショップ Metagenomics 2008 の招待講演者として発表した。

<国内外での成果の位置づけ>

ヒト常在菌の個別ゲノム解析は今年正式に発足した国際ヒトマ

イクロバイオームコンソーシアム (IHMC: 米、EU、中国、日本などが参加) の計画する主要テーマの一つであり、これまでに本特定で解析してきた *Bifidobacterium*、*Lactobacillus*、*Bacteroides*、常在性大腸菌などのヒト常在細菌のゲノム情報は、ヒト常在菌叢メタゲノムデータの解析に有用であり、この国際計画の推進におおきく貢献できる。なお、本計画研究の代表者である服部は IHMC の運営委員の一人に選ばれた。

シロアリ腸内共生細菌の完全ゲノム解析は世界で初めてであり、日本をはじめ多くの国々の一般紙の記事として取り上げられた。一昨年度のカルソネラの 160kb 最小ゲノム (Science, 2006) の発見に続いて、この昆虫共生細菌のゲノム研究分野は日本が抜きん出ている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ゲノム解析が完了した細菌種の論文作成が全体として遅れ気味ではあるが、今年度はおおむね計画通りに研究を進めることができたと考える。

<今後の課題>

IHMC の正式な発足により、ヒト常在菌叢のメタゲノム解析ならびに常在菌の個別ゲノム解析は今後、著しく加速すると予想される。とくに、次世代型シーケンサーを使った解析が主流になってきており、本計画研究においては次世代型シーケンサー 454FLX の特徴をうまく取り入れた解析法の高度化や技術導入 (たとえば、バーコード法) が必要になる。来年度では、454FLX の性能が約 5 倍にアップされた Titanium タイプとなり、その平均リード長は ~ 500 塩基、リード数も 1 ラン (10 時間) あたり 100 万となる。細菌ゲノムやその他の大量シーケンス解析などの研究支援、ならびに収集している病態サンプルのメタゲノム解析にこの 454FLXTi をフル活用し、現行のキャピラリー式に代わってより安価かつ高速なゲノム解析システムを班員に提供したい。

<成果公開・共同研究の状況>

1. 0805032052

Hongoh, Y *et al.*: Complete genome of the uncultured ‘Termite Group 1’ bacteria in a single host protist cell. Proc Natl. Acad. Sci. USA., 105 (14), 5555-5560 (2008) .

2. 0901140104

Hongoh, Y *et al.*: Genome of an endosymbiont coupling N2 fixation to cellulolysis within protist cells in termite gut. Science, 322(5904), 1108-1109 (2008) .

3. 0901142348

Morita, H *et al.*: Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. DNA Res, 15(3), 151-161 (2008) .

4. 0901142352

Oshima, K *et al.*: Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. DNA Res., 15 (6), 375-386 (2008) .

5. 0901150042

Kumagai, H *et al.*: Large-scale microfabricated channel plates

for high-throughput, fully automated DNA sequencing. Electrophoresis, 29(23), 4723-4732 (2008) .

班員間共同研究

- (1) メタゲノムの情報学的解析手法の開発
- (2) ヒト常在菌、病原菌、土壌細菌ゲノムの解析
- (3) コウジ菌のゲノム解析
- (4) 魚類のゲノム解析
- (5) 堆積物中の脊椎動物化石 DNA の解析