

2023年5月29日

## 擬似的なヒト腸内細菌群集を作製し様々な解析手法を評価

### ■ 概要

腸内細菌群集はヒトの健康に重要なので研究が活発におこなわれています。これらの研究では、DNA抽出や配列データの情報解析などさまざまな解析手法が開発されています。こういった研究の活用で特に問題となるのが「腸内細菌群集の個人差」です。個人差のある研究対象について、個々の研究成果からより一般性の高い結論を得るためには、複数の研究から得られたデータを統合的に解析する「メタ解析<sup>(1)</sup>」が重要になります。メタ解析をおこなう上で一番の課題は、異なる研究成果間の実験上のバイアスの存在であり、バイアスを定量するためには、群集を構成する細菌のメンバーリストや各メンバーの混合割合があらかじめわかったヒト腸内細菌群集の「模擬群集」が必要不可欠です。

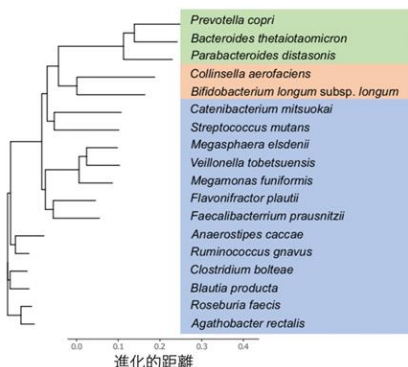
今回、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所の森宙史准教授、理化学研究所の大野博司チームリーダーが率いる研究チームは、ヒト腸内細菌群集の模擬群集を作製し、その模擬群集を用いて様々な解析手法を評価しました。

本研究チームは、ヒト腸内細菌群集中で最も多く存在する細菌の種の中から、代表的な18種18株を選び等量混合して模擬群集を作成しました。この18株のDNAを定量するために、信頼性の高いqPCR法<sup>(2)</sup>を開発しました。この模擬群集とqPCR法によるDNA定量法を用いて実際の各菌株の混合割合を定量した上で、ヒト腸内細菌群集の研究で広く用いられている10種類のDNA抽出法、7種類の16S rRNA遺伝子<sup>(3)</sup>のプライマーセット、ショットガンメタゲノム<sup>(4)</sup>の4種類の情報解析手法のそれぞれについて、菌株組成の推定結果に与える実験上のバイアスを評価しました。

本研究成果は、異なる解析方法で得られたヒト腸内細菌群集の系統組成データを比較解析するための重要な基盤データを提供し、新たな解析手法の開発を促進することが期待できます。

健康な日本人の腸内細菌群集中で多く存在する種のうち

- ・ 培養可能
- ・ ゲノム配列が既に読済み
- ・ バイオセーフティレベル1の細菌から18種（株）を選択した



日本人腸内の主要な細菌から菌株を選定

↓  
細菌の培養

↓  
各細菌の計数

↓  
18菌株を等量混合し模擬群集を作製

図 1: ヒト腸内細菌群集の模擬群集の作製方法。

系統樹の色枠は各系統が属する門を表しており、それぞれ緑枠が *Bacteroidota*、橙枠が *Actinomycetota*、青枠が *Bacillota* になります。

## ■ 成果掲載誌

本研究成果は、国際科学雑誌「DNA Research」に 2023 年 5 月 31 日(日本時間)に掲載されます。

論文タイトル: Assessment of metagenomic workflows using a newly constructed human gut microbiome mock community

(擬似的なヒト腸内細菌群集を用いた様々なメタゲノム解析手法の評価)

著者: Hiroshi Mori\*, Tamotsu Kato\*, Hiroaki Ozawa, Mitsuo Sakamoto, Takumi Murakami, Todd D. Taylor, Atsushi Toyoda, Moriya Ohkuma, Ken Kurokawa, Hiroshi Ohno

\*equal contribution

(森宙史\*、加藤完\*、小澤弘明、坂本光央、村上匠、Todd D. Taylor、豊田敦、大熊盛也、黒川顕、大野博司)

\*等しい貢献をした著者

## ■ 研究の詳細

### ● 研究の背景

難培養性の細菌を多く含むヒト腸内細菌群集の細菌のメンバー組成を調べるために、ショットガンメタゲノム解析および 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス解析<sup>(5)</sup>が広く用いられています。細菌群集の解析手法はまだ発展途上であり、新しい実験手法や情報解析手法が毎年いくつも開発されていますが、細菌群集の正しいメンバー組成がわからないため各解析手法の性能評価は容易ではありません。特にヒト腸内細菌群集の研究では複数研究のデータを統合したメタ解析が頻繁におこなわれるため、解析手法が与える実験上のバイアスを定量的に評価することが重要です。解析手法の評価のためには、培養可能な既知の菌種を何種類か一定の割合で混ぜることによって作製した、菌種のメンバー組成がわかっている擬似的な細菌群集(模擬群集)が必要不可欠です。細菌群集の組成は多様であるため、模擬群集も異なる組成の群集が何通りも必要になります。既にいくつかの模擬群集が作製され製品化されていますが、多様な細菌群集に対応するためにはまだまだ模擬群集の種類が足りず、「系統の多様性」を確保しつつ「近縁すぎる系統」は入っていないシンプルな組成で使いやすいヒト腸内細菌群集の模擬群集は存在しませんでした。

### ● 本研究の成果

本研究では、ヒト腸内細菌群集中で最も多く存在する細菌の種の中から代表的な 18 種 18 株を選び、それぞれ等量の細菌を混ぜたヒト腸内細菌群集の模擬群集を作製しました(図 1)。この 18 株の DNA を定量するために、18 種にそれぞれ特異的な qPCR プライマーペアを設計しました。この qPCR を用いた DNA 定量法を用いて実際の模擬群集の各菌種の混合割合を定量し、その定量結果を真の系統組成データとして参照しました。

ヒト腸内細菌群集の研究で広く用いられている 10 種類の DNA 抽出法でこの模擬群集の DNA を抽出し、qPCR で系統組成を明らかにしました。DNA の収量が多かった 6 種類の DNA 抽出法についてショットガンメタゲノムシーケンシングを行い、4 種類の情報解析手法を用いて系統組成の推定をおこなった結果を比較し、各解析手法が系統組成に与える実験上のバイアスを評価しました(図 2)。その結果、近年広く使用されている DNA 抽出法や情報解析法の多くは今回の模擬群集について大きな系統的な実験バイアスは生じない一方

で、HMP 法などの一部の DNA 抽出法はビフィズス菌などの系統に実験バイアスがあることがわかりました。

さらに、18 株の DNA を等量混ぜた溶液について qPCR で系統組成を明らかにしたのちに、7 種類の 16S rRNA 遺伝子のプライマーセットを用いてそれぞれ PCR 増幅をおこないました。PCR の増幅産物からアンプリコンシーケンス解析によって系統組成の推定をおこなった結果を比較し、各プライマーが系統組成に与える実験上のバイアスを評価しました。その結果、近年広く使用されている 16S rRNA 遺伝子プライマーセットのほとんどは今回の模擬群集について大きな系統的な実験バイアスは与えないことがわかりました。

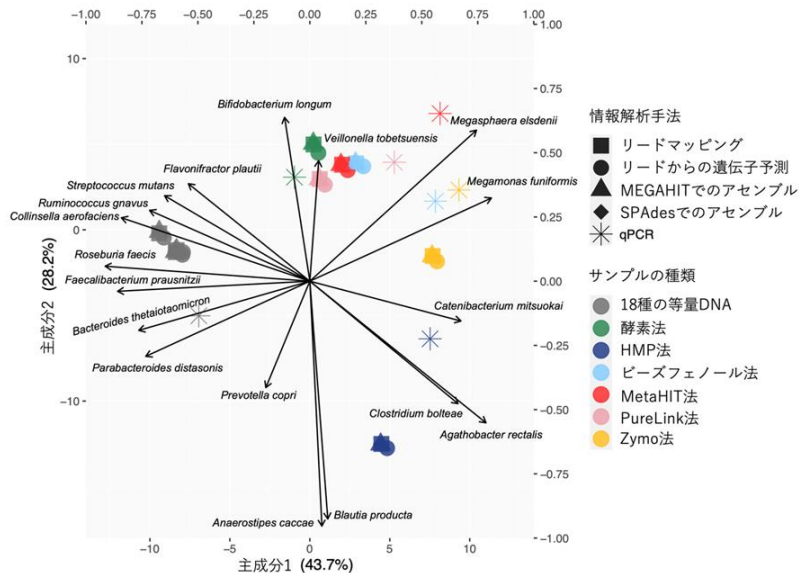


図 2: ショットガンメタゲノムシーケンシングによる 6 種類の DNA 抽出法と 4 種類の情報解析手法の系統組成の主成分分析結果。

寄与率 43.7%の主成分 1 と寄与率 28.2%の主成分 2 の主成分得点の二次元散布図であり、色が DNA 抽出法、点の形が情報解析手法の種類を表しています。矢印は各系統の存在量の傾向を表しており、矢印の方向にいくほどその系統の存在量が多くなる傾向を意味しています。

## ● 今後の期待

本研究成果は、異なる解析手法で得られたヒト腸内細菌群集の系統組成データを比較解析するための重要な基盤データを提供します。また、本研究で得られた配列データを用いることで新たな解析手法の開発が加速することが期待されます。

## ■ 用語解説

### (1) メタ解析

独立して行われた複数の類似した研究のデータをあわせて、より一般的な結論を得るために統計的手法を用いて解析を行う研究手法。

### (2) qPCR

quantitative PCR(定量 PCR)の略であり、DNA サンプル中に存在する特定の配列の DNA の存在量を定量する PCR 法。本研究では全ての細菌のゲノム中に 1 コピーのみ存在する遺伝子をターゲットとした qPCR を行っているため、遺伝子の存在量を各系統の存在量と置き換えて考えることができる。

### (3) 16S rRNA 遺伝子

細菌が持つリボソーム RNA の一つである 16S リボソーム RNA をコードする遺伝子のことであり、約 1500 塩基の DNA 配列の中に保存されている領域と多様な領域がモザイク状に存在するため、細菌群集の系統組成を解析する上で広く用いられている遺伝子である。

### (4) ショットガンメタゲノム

環境サンプルから DNA を抽出し DNA 断片をランダムに大量にシーケンスすることでそのサンプル中に存在する微生物の系統組成や遺伝子機能組成を推定することが可能な解析手法。

### (5) アンプリコンシーケンス解析

PCR で増幅した増幅産物をシーケンスする解析手法。

## ■ 研究体制と支援

本研究は、情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 情報研究系 ゲノム多様性研究室 森宙史 准教授、村上匠 特任研究員、国立遺伝学研究所 ゲノム・進化研究系 比較ゲノム研究室 豊田敦 特任教授、国立遺伝学研究所 情報研究系 ゲノム進化研究室 黒川顕 教授、理化学研究所 生命医科学研究センター 粘膜システム研究チーム 大野博司 チームリーダー(横浜市立大学 大学院生命医科学研究科 客員教授)、加藤完 研究員、小澤弘明 元大学院生、理化学研究所 バイオリソース研究センター 微生物材料開発室 大熊盛也 室長、坂本光央 専任研究員、理化学研究所 生命医科学研究センター Todd D. Taylor 博士の共同研究成果です。

本研究は、日本医療研究開発機構 革新的先端研究開発支援事業(AMED-CREST) (JP19gm1010006)、革新的先端研究開発支援事業(PRIME) (JP19gm6010007)の支援を受けておこなわれました。

## ■ 問い合わせ先

<研究に関すること>

- 国立遺伝学研究所 ゲノム多様性研究室  
准教授 森 宙史 (もり ひろし)  
ホームページ: <https://www.genome.id/>
- 理化学研究所 生命医科学研究センター  
チームリーダー 大野 博司 (おおの ひろし)

<報道担当>

- 国立遺伝学研究所 リサーチ・アドミニストレーター室 広報チーム
- 理化学研究所 広報室 報道担当

※Zoom 会議での取材にも対応できますので、Zoom 会議をご希望の場合には、その旨お知らせください。