

機器分析が支える、豊かな暮らしと産業のフロンティア

次世代シーケンサー・質量分析計を用いた腸内細菌叢の解析

No.13

国立研究開発法人理化学研究所 生命医科学研究センター 粘膜システム研究チーム
宮内栄治 / 中西裕美子

1. はじめに

われわれの体には自身の細胞数より多い約 40 兆個の細菌が生息している。特に腸管には内容物 1 グラムあたり 100 億～1 兆個にも及ぶ細菌が存在し、腸内細菌叢を形成している。細菌との共生関係は出生と同時に始まり、われわれの成長に伴い腸内細菌叢を構成する菌の種類も変化する。成人では約 1,000 種類の腸内細菌が一定のバランスを保ちながら共生しており、その種類や存在比は個人間で大きく異なる。

腸内細菌叢を構成する細菌の多くは偏性嫌気性で培養が困難なものが多く、分離培養を介した手法では網羅的な細菌の特定は難しかった。1980 年代ごろから培養を介さない解析が行われるようになり、2000 年頃には定量的 PCR やターミナル RFLP など分子生物学的手法で菌叢構成の解析が進められた。その後、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer, NGS) の普及により腸内細菌叢を網羅的にかつ低コストで解析することが可能となった。これにより腸内細菌叢の研究が飛躍的に加速し、腸管の疾患だけでなく、肥満やが

ん、自閉症スペクトラム障害などあらゆる疾患において腸内細菌叢の乱れが関与していることが示唆されてきた。さらに、糞便中の代謝産物を解析するメタボローム解析により、腸内細菌が産生する代謝産物が宿主に大きな影響を与えることも明らかになってきた。本稿では、NGS を用いた腸内細菌叢構成菌の解析や質量分析計を用いた代謝産物の解析について、そのサンプル調整方法や解析手法を概説する。

2. NGS を用いた腸内細菌叢解析

NGS を用いた腸内細菌叢の解析は、全ゲノム配列を網羅的に解読するメタゲノム解析と、ゲノム中の 16S rRNA 遺伝子配列のみを解読するメタ 16S 解析に分けられる。メタ 16S 解析では菌の機能に関する情報は得られないものの、必要とするデータ量が少ないため、安価に大量のサンプルを解析することが可能である。メタ 16S 解析には Illumina 社の NGS (MiSeq や HiSeq) が使われることが多く、一度のランで最大 384 サンプルの解析が可能である。実際のメタ 16S 解析手順を以下で解説する (図 1)。



図 1. 一般的なメタ 16S 解析の概要

糞便などから抽出した菌由来ゲノム DNA から 16S rRNA 遺伝子領域を PCR で増幅する。Illumina 社の MiSeq など PCR 産物の塩基配列を解読する。アウトプットファイル (FASTQ ファイル) からの一連の解析は全てオープンソースプログラムで行うことができる。

2-1. DNA 抽出

NGS を用いた解析では、糞便などから抽出した腸内細菌由来の DNA を用いる。多様な腸内細菌から偏りなく DNA を抽出するため、ビーズを用いた物理的な菌体破碎やリゾチームなどによる溶菌が用いられる¹。現在では、あらゆるメーカーから糞便サンプルに特化した DNA 抽出キットも販売されている。一方、DNA 抽出法によって菌体からの DNA 抽出効率が異なり、手法の違いが解析結果に大きく影響することも明白である¹。このことから、異なるデータセットを比較する場合などは、DNA 抽出法の違いによる影響を考慮する必要がある。

2-2. ライブラリ調製

上記のように、メタ 16S 解析ではゲノム中の 16S rRNA 遺伝子の配列のみを解読する。16S rRNA は細菌種間で配列が保存された保存領域と、細菌種により特異的な配列を含む可変領域 (V1-V9 の 9 箇所) で構成される (図 2)。各菌の 16S rRNA 遺伝子配列はデータベースとして公開されており、これを用いることにより NGS で解読した配列から菌種を特定することができる。メタ 16S 解析では可変領域を含む 16S rRNA 遺伝子の一部 (~500bp) を PCR で増幅し、その配列を NGS で解析する。この際、サンプルごとにバーコード配列を付加することで、最大 384 サンプルを混合し同時にシーケンシングすることができる (図 2)。

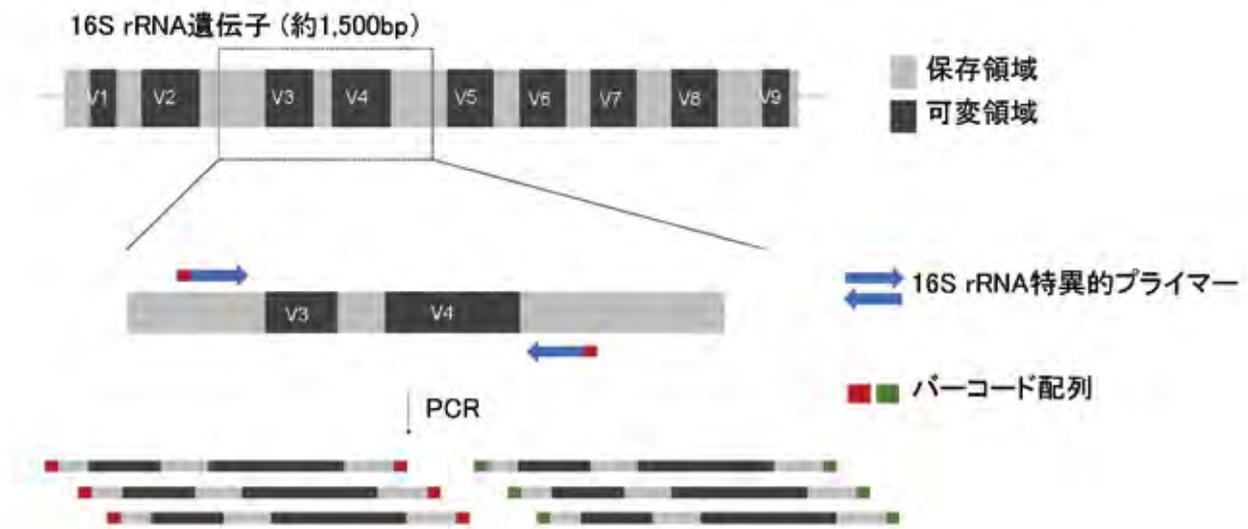


図 2. メタ 16S 解析のライブラリ調製

16S rRNA 遺伝子の可変領域 (V1-V2 や V3-V4 領域など) を PCR で増幅する。この際、サンプルごとに異なるバーコード配列をプライマーに付加することで複数サンプルを一度にシーケンシングできる。

2-3. シーケンシング・データ解析

Illumina MiSeq を用いたシーケンシングでは、一般的にライブラリの両端から 250bp または 300bp を並列処理で解読する。一度のランは 40 ~ 50 時間ほどで完了し、最大で 3000 ~ 5000 万リードのデータを取得することができる。解読後はバーコード配列に従ってサンプルごとに FASTQ フォーマットのデータが出力される。FASTQ ファイルには DNA の塩基配列とそのク

オリティスコアが含まれ、クオリティの低い配列を除去することで正確なデータのみを抽出することができる。

腸内細菌叢のデータ解析には、一般的に QIIME2² や R (DADA2 や Phyloseq パッケージ) などオープンソースのプログラムが用いられる。また、SILVA や RDP といった公共の 16S rRNA データベースを用いることで得られたリードの菌種を特定することができる。QIIME2 や R を用

いた解析方法も公開されており、これらに従って解析を進めることで腸内細菌叢の構成を知ることができる。

既述のとおり、ヒトの腸内細菌叢は約 1000 種類ほどの菌で構成されており、そのデータは複雑なものとなる。そこで、サンプル間の腸内細菌叢構造の類似度を 2～3 次元で可視化する主座標分析などの多変量解析が多用される。また、グループ間で有意差のある個々の菌を検出する場合は LEfSe³ などのオープンソースコードが用いられる (図 1)。

3. ポータブルシーケンサーによる菌叢解析

現在、メタゲノム解析もメタ 16S 解析も Illumina 社の NGS を用いるのが主流である。一方、ポータブル型のシーケンサーの登場により、菌叢解析研究の幅が広がりつつある。Oxford Nanopore Technologies 社が開発した手のひらサイズのシーケンサー MinION は、USB でノート PC に接続して使用する。また、サンプル調製に複雑な実験機器も必要としないことから、研究室外での on-site シーケンシングが可能である。実際、エボラウイルスや亜熱帯マラリア原虫など持ち運びが困難な検体を現地で解析するのに活用された例が報告されている^{4,5}。

MinION は腸内細菌叢のような複雑なサンプルのシーケンシングも可能である。新生児の糞便サンプルを用いた研究では、抽出した DNA のメタゲノム解析を MinION で行っている⁶。その結果、Klebsiella や Enterobacter といった病原菌だけでなく、抗生物質耐性遺伝子の検出に成功している⁶。特筆すべきは、これらのデータを 1 時間のシーケンシングで取得できている点である。MinION はシーケンシングと同時にリアルタイムで解析を行うことができる。そのため、目的のデータ量を取得できた時点でシーケンシングを終了できるという柔軟性を有する。このことは、迅速な診断や治療選択が求められる新生児の壊死性腸炎において非常に有益であると考えられる。

4. メタボローム解析

メタボローム (metabolome) とは代謝物の総体 (metabolites+ome) を意味し、代謝物は酵素タンパク質により産生される分子量 1000 以下の低分子化合物を指す。これら代謝物を網羅的に計測することをメタボローム解析と呼ぶ。近年、腸内細菌研究においてメタボローム解析が多数行われ、腸内細菌が産生する代謝物や腸内細菌が関わる代謝反応は宿主の疾患等の原因となりうる場合や、もしくは、宿主の恒常性の維持に重要であるという報告があり、腸内細菌研究においてメタボローム解析は必須の解析項目となりつつある。

4-1. メタボローム計測の手法

メタボローム解析には大きくターゲット分析とノンターゲット分析があり、ターゲットとする代謝物や代謝経路が決まっている場合はターゲット分析を行い、バイオマーカー探索などターゲットが決まっていない場合はノンターゲット分析を行い、データ比較から差がある代謝物をスクリーニングする。

メタボローム解析に用いる機器には核磁気共鳴装置 (NMR)、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GCMS)、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LCMS)、キャピラリー電気泳動質量分析計 (CEMS)、イメージング質量分析計 (IMS) 等がある。目的とする代謝物が親水性か疎水性等により、適切な抽出法と計測法を選択する必要がある。図 3 では代謝物の属性と計測可能な分析を示しているが、このように代謝物の性質に対して適した測定法を選択する必要がある。

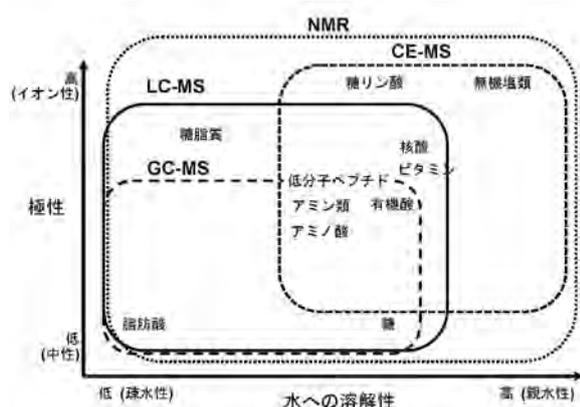


図3. 代謝物の物性と分析可能な計測装置

NMR法は親水性代謝物、もしくは疎水性代謝物を広く計測することが可能であり、ノンターゲット分析にも活用できるが、質量分析計と比較し感度が低いという問題がある。質量分析計の高感度化は進んでいるものの、性質の違う多数の化合物を同時に計測することは難しい。LCMSを使用した測定では、分析カラムにより保持・分離できる化合物が異なるため、性質ごとにカラムを選択し測定を構築する必要がある。GCMSは比較的分離能が高く多成分の分析が可能であるが、不揮発性の化合物に対して誘導体化処理を行う必要があり前処理がやや煩雑になる。CEMSは他の測定系では難しいイオン性の高い化合物や幅広い親水性代謝物の測定が可能であるが、装置の操作がやや煩雑であり、生体サンプルなどの高塩濃度のサンプルでは計測が不安定になることもある。また、近年の新しい計測法であるIMSは生体組織の切片など平面状の試料における各微小測定点のマススペクトルを測定することで代謝物の局在を可視化できることが利点である。

LCMS、GCMS、CEMSの用途の違いは主に化合物を分離するクロマトグラフィーに依存するが、質量分析計自体も近年急速に発展しメタボローム解析の用途が拡大している。ノンターゲット分析においては、ハイブリッド型四重極-飛行時間型質量分析計(Q-TOFMS)や四重極オービトラップ型質量分析計(Q-Orbitrap MS)を用いて、検出成分の精密質量とフラグメント情報をベースとした解析を行うことが可能である。また、ターゲット分析においては、高速三連四重極

質量分析計(TQMS)を使用することで多数の化合物に対しMulti Reaction Monitoring(MRM)を組むことができ、数百成分の一斉分析が可能になったことから、多成分を対象としたワイドターゲット分析に活用されている。

4-2. メタボロームデータの統計解析

分析結果から得られた代謝物のデータマトリクスを作成後、多変量解析や代謝マップに落とし込んで解析を行う。多変量解析の手法には、重回帰分析、判別分析(PLS)、主成分分析(PCA)、因子分析、相関分析などがある。これらの解析を行うにあたり、最近では有償・無償のプログラムが提供されており、無償のものとしてはRのパッケージから多数のツールが公開されている。また、MetaboAnalyst(<https://www.metaboanalyst.ca/faces/home.xhtml>)はMcGill大学のXia研究室が無償提供しているツールであり直感的に使用でき初心者でも比較的使用しやすいツールである。近年ではメタボローム解析から得られるデータが膨大になりつつあるため、代謝物の変動パターンを階層的クラスタリング(HCA)等でクラスタリングし、Co-abundance group(CAG)を作成し、CAGの代表値としてPCAのスコアを使用し、CAGを比較する手法も用いられている⁷。

4-3. 腸内細菌研究におけるメタボローム解析

腸内細菌はさまざまな代謝物を産生することで、宿主の代謝に深く関与しているという報告が多数ある。下記に代表的な腸内細菌由来の代謝物についての機能を紹介したい。

腸内細菌の代謝物のうち、短鎖脂肪酸(SCFA)である酢酸、プロピオン酸、酪酸の効果についてはこれまでに多数報告されている。われわれのグループも酢酸が病原菌感染を抑制すること、酪酸が免疫応答の抑制に寄与する制御性T細胞の分化促進することを報告してきた⁸。SCFAの受容体はGタンパク質共役受容体(GPR)41と43であり、これらを介してエネルギー恒常性を維持している。腸管内においては、SCFAは腸管内分

泌細胞上の GPR41 と GPR43 に結合しインクレチンである glucagon like peptide -1 の分泌を促進し宿主のインスリン感受性を制御する⁹。脂肪組織では、SCFA による GPR43 の活性化が脂肪細胞におけるインスリンシグナル伝達を抑制し脂肪蓄積を抑制する⁹。このように、SCFA は免疫、代謝において重要な役割を担っており、生体の恒常性維持において重要な腸内細菌由来の代謝物である。

アミノ酸は通常食事から摂取されるが、腸内細菌もタンパク質を分解してアミノ酸を産生、または、新生することができる。腸管内で産生されたアミノ酸やアミノ酸由来の代謝物が宿主に吸収され、生活習慣病と関わるという研究が多数報告されている。Pedersen らは前糖尿病状態の被験者の糞便のメタゲノム解析および血中メタボローム解析を行い、インスリン抵抗性を示す被験者では腸内細菌の分岐鎖アミノ酸産生に関する遺伝子が増加し、血中分岐鎖アミノ酸がインスリン抵抗性と相関していることを報告した¹⁰。また、肥満者の腸内細菌叢と血中メタボローム解析を調べた研究では、代謝異常のパラメーターと血清グルタミン酸濃度が負の相関を示していた¹¹。このように、アミノ酸代謝が血中濃度に反映されることで肥満や糖尿病などの代謝異常に関わることが報告されているが、アミノ酸がもたらす作用のメカニズムについては未だ明らかとなっていない。

胆汁酸は肝臓で産生され十二指腸乳頭部から分泌されて脂質の吸収に寄与する。大部分は回腸末端にて再吸収されるが、一部の胆汁酸は大腸に移行し腸内細菌の代謝を受け二次胆汁酸として存在する。この腸内細菌が産生する二次胆汁酸が肝臓がんを誘発することが報告されている¹²。また、二次胆汁酸である 3-oxo-lithocholic acid (LCA) が炎症を誘導する Th17 細胞の分化を抑制し、isoalloLCA が Treg の分化促進活性があることが報告されており、二次胆汁酸が宿主免疫系へも影響することが明らかとなってきた¹³。

5. おわりに

NGS の普及に伴い腸内細菌叢の重要性が明らかになり、メタボローム解析により腸内細菌と宿主との相互作用の詳細も明らかになりつつある。MinION のような次世代の NGS も登場し、さらにはスマートフォンで稼働するタイプの NGS も開発が行われている。また、腸内細菌だけでなく腸内真菌やバクテリオファージの網羅的解析も行われ、これらの重要性も示されている。このように、分析装置の進歩や解析対象の拡大により、腸内細菌叢の理解が今後さらに深まると期待される。

●参考文献

- 1 Costea, P. I. et al. *Nat Biotechnol* 35, 1069-1076, (2017).
- 2 Bolyen, E. et al. *Nature Biotechnology* 37, 852-857, (2019).
- 3 Segata, N. et al. *Genome Biology* 12, R60, (2011).
- 4 Quick, J. et al. *Nature* 530, 228-232, (2016).
- 5 Runtuwene, L. R. et al. *Sci Rep* 8, 8286, (2018).
- 6 Leggett, R. M. et al. *Nat Microbiol* 5, 430-442, (2020).
- 7 Langfelder, P. & Horvath, S. *BMC Bioinformatics* 9, 559, (2008).
- 8 Furusawa, Y. et al. *Nature* 504, 446-450, (2013).
- 9 Kimura, I. et al. *Nat Commun* 4, 1829, (2013).
- 10 Pedersen, H. K. et al. *Nature* 535, 376-381, (2016).
- 11 Liu, R. et al. *Nat Med* 23, 859-868, (2017).
- 12 Yoshimoto, S. et al. *Nature* 499, 97-101, (2013).
- 13 Hang, S. et al. *Nature* 576, 143-148, (2019).