

次世代シーケンサーを用いた乳酸菌・腸内細菌研究

下村 有美*

(協同乳業株式会社 研究所, 〒190-0182 東京都西多摩郡日の出町平井20-1)

Overview of studies using next generation sequencer about lactic acid bacteria and intestinal microbiome.

Yumi Shimomura

(Kyodo Milk Industry Co., Ltd. 20-1 Hirai, Hinode-cho, Nishitama-gun, Tokyo 190-0182, Japan)

要旨

次世代シーケンサーはこれまでのキャピラリーシーケンサーとは異なる測定原理を持ち、ショートリードではあるが(50~400 bp)キャピラリーシーケンサーの数万~数千万倍もの配列データを出力できるハイスループットのものや、リード数は数百~数千倍であるがリード長が約10倍~15倍(10~150 kb)に達するロングリードのものが存在する。本稿では現在良く使用されている次世代シーケンサーの概要と、その使用により得られた乳業技術に関連する乳酸菌や腸内細菌研究について述べる。

1. 次世代シーケンサーと測定原理の概要

最初の次世代シーケンサーは2005年にアメリカの当時の454 Life Sciences社(現在はRoche Diagnostics社)によってGenome Sequencer 20 system(GS20)が発売され、大変な衝撃を与えた。従来のキャピラリーを用いたシーケンスでは、同時に決定できる配列数は最大でも96配列であったが、GS20の解析能は、取得配列長が100 bpではあるものの、1回のランで20万配列(総塩基数20 Mb)の取得が可能であった。これまでのシーケンス技術との違いは、まず測定原理にある。従来のキャピラリーを用いたシーケンスの方法はジデオキシン法(サンガー法)と言われ、1977年にサンガーらによって発表された方法を応用したものであ

る¹⁾。シーケンス反応液中に塩基ごとに異なる波長の蛍光色素で標識されたジデオキシヌクレオチドを添加してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うと、ジデオキシヌクレオチドが合成で取り込まれた際にその塩基からの伸長が止まり、最終的に1塩基ずつ長さの違う3'末端が蛍光標識されたDNA断片ができる。それらをキャピラリー内で電気泳動して配列長別に分離し、検出器の前を通過するDNA断片の蛍光を検出してその蛍光派長より塩基配列を決定する。1つの配列のシーケンスにつき1本のキャピラリーが必要となることから、一度にシーケンスできるサンプル数は物理的に限られていた。次世代シーケンサーのGS20による塩基配列決定方法は、Mostafa RonaghiとPal Nyrenによって開発されたパイロシーケンス法(pyrosequencing)を利用している²⁾。これはsequencing by synthesis(SBS)法というDNAを合成しながら配列決定を行う方法の一つで、鋳型となる一本鎖DNAに対し、

* Tel : 042-597-5911

DNA ポリメラーゼと4つの塩基 (A, T, G, C) を1種類ずつ添加して合成が起こった際に発生するピロリン酸塩 (pyrophosphate) を ATP に変換し、ルシフェラーゼ発光反応を検出することで塩基配列の決定を行う方法である。鋳型となる DNA は、エマルジョン PCR によって1つのマイクロビーズ上に1種類の配列のみ増幅され、増幅後のビーズはビーズが1つ入る大きさのウェルが莫大な数含まれるプレート (Pico TiterPlate) に固定されて、各ビーズの発光は CCD カメラによって検出される。現在の代表的な次世代シーケンサーを表1に示す。各次世代シーケンサーの測定原理は GS20 とは異なっている。illumina 社製のシーケンサーについては、まずフローセル表面上に1本鎖 DNA を結合させ、ブリッジ PCR 法を用いて増幅し、局所的に1000分子程度のクラスターを形成させることで DNA を検出可能な量まで増幅させる。配列決定方法には SBS 法を使用しており、1反応ごとに3'末端に保護基のついた蛍光標識ジデオキシヌクレオチドを加え、合成に使用された塩基の蛍光を測定した後、取りこまれた塩基の蛍光標識と保護基を除去して次の反応へと進む。この反応は1塩基ずつ進むため、ホモポリマー領域 (同じ塩基が複数個続く領域) も正確に解析できるといわれている。Thermo Fisher Scientific 社の SOLiD, Ion Proton と Ion

PGM は、GS20 と同様にエマルジョン PCR を用いてビーズ上に DNA 分子を増幅させるが、シーケンス方法は SOLiD と他の2機種で異なっている。SOLiD では、ビーズはフローセルに固定される。ビーズ上の一本鎖 DNA に異なる蛍光色素で標識されたプローブ (一部の配列が既知) をプライミングし、ライゲーションを行う。ライゲーションされたプローブの蛍光を読み取った後はプローブの蛍光標識部分を取り除いて次のプローブのプライミングとライゲーション反応へと進む。一連の伸長反応が終了した後は伸長した配列は取り除かれ、読み枠をずらした形で同様の反応が複数回繰り返される。最終的に、伸長に使用されたプローブの蛍光色素の組み合わせから配列が決定される。Ion Proton と Ion PGM では半導体チップにビーズを固定する。配列の決定は SBS 法で、塩基が取りこまれる際に放出される水素イオンによる pH の変化を検出して配列を決定している。Pacific Biosciences 社の PacBio は1分子リアルタイム (SMRT ; Single-Molecule, Real-Time) DNA シーケンサーである。DNA1分子とポリメラーゼの複合体を SMRT セル上に存在するウェルの底に固定し、リン酸塩鎖に各塩基で異なる蛍光色素が付加したヌクレオチドを添加してウェル上でシーケンス反応を行い、合成で取り込まれた塩基の蛍光を検出することで配列を決定す

表1 代表的な次世代シーケンサー

会社名	次世代シーケンサー名	最大リード長	最大リード数	最大総塩基数
illumina	HiSeq X	2×150 bp	60億	1.8 Tb
	HiSeq	2×150 bp	50億	1.5 Tb
	NextSeq	2×150 bp	4億	120 Gb
	MiSeq	2×300 bp	2,500万	15 Gb
	MiniSeq	2×150 bp	2,500万	8 Gb
Thermo Fisher Scientific	SOLiD 5500 W	1×75 bp, 2×50 bp	16億	120 Gb, 160 Gb
	Ion Proton	200 bp	8,000万	10 Gb
	Ion PGM	400 bp	550万	2 Gb
Pacific Biosciences	PacBio RS II	40 kb (平均 約10 kb)	5 万/cell	550 Mb/cell
	PacBio Sequel System	40 kb (平均 約10 kb)	PacBio RS II の約7倍	PacBio RS II の約7倍
Oxford Nanopore Technologies	MinION	150 kb 以上 (平均 約10 kb)	10万 ³	10 Gb

る。蛍光色素は DNA 合成に伴うリン酸塩鎖の切断と共に取り除かれ、次の DNA 合成へと反応が進む。Oxford Nanopore Technologies 社の MinION は約 100 g のポータブル型次世代シーケンサーで、パソコンに USB 接続してサンプルをアプライし、シーケンスを開始するとリアルタイムでクラウドサービスによる解析が行われる。本機器の塩基配列の決定は、電流の通ったナノポアと呼ばれるタンパク質の孔を一本鎖の DNA が通過する際に生じる電流の変化の度合いを検出することによって行われる。MinION ではナノポア数が約 500 の 1 フローセルでシーケンスを行うが、上位機種 PromethION ではナノポア数が約 3000 のフローセル 48 個を用いて同時、もしくは個別にシーケンスできる。本機種は早期利用プログラムが開始されている。このように最初の次世代シーケンサーが発売されてから 10 年間のシーケンス技術の進歩は非常に目覚ましい。

2. 次世代シーケンサーを用いた研究の概要

次世代シーケンサーは多くの研究分野で利用されている。ゲノム解析への利用が最も良く知られているが、ヒトに対する研究分野では、ゲノム変異解析やエピゲノム解析 (DNA メチル化部位の解析など)、遺伝子発現解析などにも利用される。微生物に対する研究分野では、ゲノム解析はもちろんのこと、培養が不可能な生物に対するアプローチとして、環境から微生物集合の DNA を直接抽出し、そのゲノムを解析するというメタゲノミクス³⁾の手段³⁾としても利用される。本稿では、乳酸菌のゲノム解析とそこから得られる情報例や、腸内細菌と乳業に関するメタゲノミクス解析の応用例を紹介する。

2-1 ゲノム情報から何がわかるか

現在、乳酸菌は Firmicutes 門の Bacilli 綱, Lactobacillales 目に属する細菌と考えられており⁴⁾, List of prokaryotic names with standing in nomenclature⁵⁾ (<http://www.bacterio.net/>) によ

ると、現在 Lactobacillales 目には、6 科 42 属 560 菌種 68 亜種が登録されている (2016 年 10 月現在) (表 2)。Lactobacillales 目に属する細菌で完全ゲノム配列が登録されている株は 464 株、ショットガンシーケンスによりゲノムの一部が登録されているドラフトゲノムが存在する株は実に約 1 万 3 千にも上る (表 2)。完全ゲノム登録数の約半数とドラフトゲノムの約 80% は *Streptococcus* 属細菌が占めているが、これはこの属に *S. pyogenes* や *S. agalactiae* (共に溶血性レンサ球菌), *S. pneumoniae* (肺炎球菌) などに代表されるヒトや動物に対する病原性細菌種を多く含み、研究が盛んであることに起因する。工業的に利用される乳酸菌の *S. thermophilus* もこの属に含まれており、本種の完全ゲノムが決定された株は 15 株、ゲノムの一部が登録されている株は 20 株存在する。

乳酸菌の分類は、歴史的には菌の形態や発酵形式によって行われてきた⁶⁾。*Lactobacillus* 属細菌は乳製品の発酵やプロバイオティクスとして工業的に広く利用されている菌種を多く含む属であるが、その分類は 16S rRNA 遺伝子配列やゲノム情報が明らかになるにつれ、これまでの分類方法との不一致が生じ、再分類の必要性があった^{7,8)}。Sun らはゲノム情報からこの問題を解決しようと試み、*Lactobacillus* 属細菌 175 株と関連する 8 属 (*Atopobium* 属, *Carnobacterium* 属, *Fructobacillus* 属, *Kandleria* 属, *Lactococcus* 属, *Olsenella* 属, *Pediococcus* 属, *Weissella* 属) に含まれる 26 株の次世代シーケンサーによるゲノム配列決定と、すでにゲノム情報の公開されている 2 属 (*Leuconostoc* 属, *Oenococcus* 属) の 12 株と合わせて、合計 11 属 213 株のゲノム解析を行った⁸⁾。解析の結果、*Lactobacillus* 属の細菌間には、同じ目であるが異なる科に属する細菌間で一般的に見られる遺伝的な差異よりも大きな差異が存在することが明らかになった⁸⁾。さらに、Sun らは 213 株に共通する 73 遺伝子のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成し、それらの系統的な位置付けを確認したところ、解析に用いた 175 株の *Lactobacillus* 属細菌はすべて共通の祖先から分岐しているが、

表2 Lactobacillales 目細菌の種類と登録ゲノム数

科	属	種	亜種	完全ゲノム	ドラフトゲノム
Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i>	4	0	0	2
	<i>Aerococcus</i>	8	0	8	17
	<i>Dolosicoccus</i>	1	0	0	1
	<i>Eremococcus</i>	1	0	0	2
	<i>Facklamia</i>	6	0	0	7
	<i>Globicatella</i>	2	0	0	2
	<i>Ignavigranum</i>	1	0	0	1
	Carnobacteriaceae	<i>Agitococcus</i>	1	0	0
<i>Alkalibacterium</i>		10	0	0	7
<i>Allofustis</i>		1	0	0	1
<i>Alloiococcus</i>		1	0	0	1
<i>Atopobacter</i>		1	0	0	1
<i>Atopococcus</i>		1	0	0	1
<i>Atopostipes</i>		1	0	0	1
<i>Carnobacterium</i>		12	2	4	23
<i>Desemzia</i>		1	0	0	1
<i>Dolosigranulum</i>		1	0	0	1
<i>Granulicatella</i>		3	0	0	6
<i>Isobaculum</i>		1	0	0	1
<i>Jeotgalibaca</i>		1	0	0	1
<i>Lacticigenium</i>		1	0	0	1
<i>Marinilactibacillus</i>		2	0	0	2
<i>Pisciglobus</i>		1	0	0	1
<i>Trichococcus</i>		5	0	0	12
Enterococcaceae	<i>Bavariococcus</i>	1	0	0	1
	<i>Catelicoccus</i>	1	0	0	1
	<i>Enterococcus</i>	55	2	33	1398
	<i>Melissococcus</i>	1	0	3	11
	<i>Pilibacter</i>	1	0	0	0
	<i>Tetragenococcus</i>	5	2	2	5
	<i>Vagococcus</i>	9	0	1	1
Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	221	29	138	806
	<i>Pediococcus</i>	15	0	12	37
	<i>Sharpea</i>	1	0	0	4
Leuconostocaceae	<i>Convivina</i>	1	0	0	0
	<i>Fructobacillus</i>	5	0	0	7
	<i>Leuconostoc</i>	24	7	13	43
	<i>Oenococcus</i>	3	0	1	200
	<i>Weissella</i>	21	0	5	23
Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	12	4	17	94
	<i>Lactovum</i>	1	0	0	0
	<i>Streptococcus</i>	116	22	227	約1万
合 計		560	68	464	約1万3千

Pediococcus 属 , *Weissella* 属 , *Leuconostoc* 属 , *Oenococcus* 属 , *Fructobacillus* 属細菌についても , この *Lactobacillus* 属内で分岐していることが明らかとなった⁸。また, Sun らは乳酸菌の工業的利用

という観点から, 有用な機能を持つ可能性のある細菌グループについて考察している。乳業に関連する有用な機能の1つとして, 細胞外皮 (cell envelope) のプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) が挙げられ

る。この酵素は牛乳中のカゼインの分解や⁹⁾、発酵乳製品の官能特性に寄与している¹⁰⁾。また、*Lactococcus* 属や *Lactobacillus* 属の *prtP* 遺伝子にコードされている細胞外プロテアーゼのラクトセピンは、ケモカインの一種であるインターフェロン γ 誘導タンパク (IP-10) を分解することで T 細胞を介した炎症を減少させるものがあり、炎症性腸疾患 (IBD) のようなケモカインを介する病気に対して治療効果が期待されている¹¹⁾。Sun らが解析した213株のうち、細胞外皮プロテアーゼとみられる遺伝子は60個みづかり、細胞へのアンカリングメカニズムと、基質特異性に影響を与えるとみられるドメイン構造は系統により異なっていた⁸⁾。このようなゲノム情報の網羅的な解析は、分類法確立のための知見となると同時に、工業的な利用目的での菌種の選択に役立つ可能性がある。

工業的に利用される乳酸菌へのファージ感染は、時に深刻な損害を与える。このような乳業におけるトラブルシューティングの一手段となりうる細菌の機能として、CRISPR-Cas システム (CRISPR ; Clustered regularly interspaced short palindromic repeats と Cas ; CRISPR 関連タンパク質) が挙げられる。CRISPR-Cas システムは近年、ゲノム編集ツールとして非常に注目を浴びているシステムであるが、本来は細菌や古細菌のファージやプラスミドなどの外因性の侵襲性核酸に対する感染抵抗性に関与するシステムである¹²⁾。CRISPR が媒介する感染抵抗性は、細菌がプラスミドやファージなどの侵襲性核酸から DNA を獲得し、それを CRISPR 部位に取り込むことで生じる。CRISPR 部位は転写され、Cas によってプロセッシングされて低分子の crRNA (CRISPR RNA) となり、それがヌクレアーゼ (核酸分解酵素) のガイドとなって侵襲性核酸の切断部位が特定され、侵襲性核酸は切断される¹³⁾。本システムの詳細は Barrangou らのレビューを参照されたい¹³⁾。Barrangou らは乳酸菌のカルチャーコレクション株の1つである *S. thermophilus* DGCC7710株に4種類のファージの耐性を持たせることを試みた¹⁴⁾。まず、次世代シーク

エンサーを用いて DGCC7710株のゲノム配列を取得し、ゲノム中に存在する4箇所の CRISPR-Cas システムを同定した。そしてファージを種類ごとく DGCC7710株に添加し、ファージ耐性株の取得と CRISPR 部位のシーケンスを行った。この操作を4回繰り返して、最終的に4種類のファージに対する耐性株の取得と、機能していると見られる一部の CRISPR 部位に、感染させた各ファージのゲノム配列の一部が挿入されていることを確認した¹⁴⁾。このことは、乳酸菌が機能する CRISPR-Cas を持つ場合、人為的に複数のファージに対する耐性を持たせることが可能であることを示す。また、CRISPR 部位の配列は、その菌株が過去に感染したファージの履歴部分であるため、株ごとに配列や長さが異なることから¹⁵⁾、株のジェノタイプング (遺伝子型判定) にも利用されている^{16,17)}。

2-2 次世代シークエンサーを用いた腸内細菌のメタゲノム解析

2-2-1 トータル DNA を用いたメタゲノム解析

次世代シークエンサーを用いた腸内細菌研究には大きく分けて2つの手法が存在する。1つはある生態系 (腸内細菌研究では糞便など) より抽出した集合体のトータル DNA を、ゲノムシーケンスと同様に配列決定する方法で、サンプル中に含まれる微生物の遺伝子情報を網羅的に取得し、その生態系における微生物組成と微生物機能を推定する目的などで使用される。西嶋らは、健康な日本人106名の糞便中の微生物 DNA を次世代シークエンサーで網羅的に解析し、得られた DNA 配列から約490万の重複の無い遺伝子を同定し、さらに遺伝子機能の推定を行った¹⁸⁾。また、デンマーク、スペイン、中国、スウェーデン、ロシア、オーストリア、フランス、ペルー、アメリカ、ベネズエラ、マラウイの健康人861人分のメタゲノムデータを同様に解析して、日本と他の国の菌叢と遺伝子機能の比較を行った¹⁸⁾。菌叢は国ごとに有意に異なっており、日本人の腸内細菌叢では *Bifidobacterium* 属と *Blautia* 属などの細菌が12カ国中最も多く、逆に *Clostridium*

属細菌や *Methanobrevibacter smithii* (メタン産生古細菌) などが少なかった¹⁸⁾。日本人で *Bifidobacterium* 属細菌が多いという結果は、後述の中山らの日本人の菌叢解析結果とも一致する¹⁹⁾。日本人の腸内細菌叢の機能的な特徴としては、炭水化物代謝やアミノ酸代謝、膜輸送に関わる機能が他の11カ国と比較して高く、エネルギー代謝、翻訳、複製・修復機能や細胞運動性(鞭毛など)が低かった¹⁸⁾。日本人の腸内細菌叢は、腸内で発生する水素をメタンへと変換する *M. smithii* が少ないと同時に、水素を酢酸へと変換する *Blautia* 属が多く、かつ短鎖脂肪酸を代謝産物とする炭水化物代謝機能を多く有することから、予測される日本人の腸内環境として、酢酸を含む短鎖脂肪酸の生成量が他の11国よりも高い可能性が示唆された¹⁸⁾。このように、微生物集合体のトータルDNAを用いたメタゲノム解析は、菌叢の持つ機能と代謝産物の予測を可能にする。メタボローム解析と併用すれば、細菌叢のもつ機能についてさらに明確な情報が得られる可能性がある。

2-2-2 16S rRNA 遺伝子を対象にしたメタゲノム解析

メタゲノム解析手法の2つ目として、原核生物(細菌・古細菌)が必ず有する16S リボソームRNA(rRNA) 遺伝子を対象とした16S rRNA 解析がある。本手法は環境・ヒト・動物由来の菌叢解析において汎用されている。本遺伝子の転写産物である16S rRNA は、菌体内で他のrRNAである5S rRNA や23S rRNA, ならびにリボソームタンパク質と共にリボソームという複合体を形成する。このリボソームは、DNAの遺伝子情報の写しであるメッセンジャーRNA(mRNA)の配列を読み取って対応するアミノ酸を付加し、タンパク質の合成を行うという自己複製に関わる極めて重要なコンポーネントの1つである。16S rRNA 遺伝子配列は進化と共にゆっくりと変化しているものとして、細菌の系統や分類学的な分類に適応されている^{20,21)}。16S rRNA 遺伝子は約1600塩基対で、その配列中には

種間で配列が異なる9か所の可変領域(V1~V9)²²⁾と、他種間においても配列が類似もしくは保存されている保存領域と呼ばれる領域が存在する。16S rRNA 菌叢解析では、解析対象とする可変領域の両側にある保存領域内にて、より多くの細菌種を検出できるように設計されたユニバーサルプライマーと呼ばれるプライマー配列を使用する。次世代シーケンス用のプライマーは、このユニバーサルプライマー配列の他に、サンプルを区別するためのバーコードの役割をする配列や、次世代シーケンスのために必要な配列が付加されている。これらのプライマーを用いてトータルDNA中の16S rRNA 遺伝子を対象にしてPCR増幅し、次世代シーケンサーによるPCR増幅断片の配列決定を行う。出力されたデータはQIIME²³⁾などのバイオインフォマティクスパイプラインを用いて菌叢解析を行う事ができる。菌叢解析のターゲットとする16S rRNA 遺伝子の可変領域やユニバーサルプライマーについては統一されておらず、Illuminaの公式プロトコル²⁴⁾では、解析領域はV3-V4を対象とし、プライマーはKlindworthら²⁵⁾が選定したS-D-Bact-0341-b-S-17(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')²⁶⁾とS-D-Bact-0785-a-A-21(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')²⁶⁾を指定しているが、実際は研究目的と使用する次世代シーケンサーのリード長(表1)に適するプライマーが選択されている。服部らのグループ²⁷⁾はV1-V2の約350塩基対の可変領域を対象とし、従来の27Fユニバーサルプライマー(5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3')²⁸⁾ではほとんど増幅できなかったビフィズス菌も増幅できるように一部改変したプライマー27Fmod(5'-AGRGTGTTGATYMTGGCTCAG-3')を設計し、リバースプライマーには338R(5'-TGC TGCCTCCCGTAGGAGT-3')を用いて健常者における市販のプロバイオティクスの摂取時と摂取前後の腸内細菌叢について評価した。被験者の腸内菌叢は、一部の細菌群では変動がみられるが、菌叢構造全体はプロバイオティクスにより変化せず、安定的であると結論付けている²⁷⁾。中山らのグループ

は、V6-V8 領域 (約440塩基対) を対象とし、A-967F (5'-gctcctcgccatcag-CAACGCGAAGA ACCTTACC-3' (大文字の部分ユニバーサルプライマー配列領域))²⁹⁾と1390r (5'-ATGGTACCG TGTGACGGGCGGTGTGTA-3')²⁸⁾を改変して腸内細菌の解析に適したプライマーのQ-968F-# (5'-CWSWSWWSHTWACGCGARGAACCTTACC -3')とQ-1390R-# (5'-CWSWSWWSHTTGACGGCGGTGWGTAC-3')を設計した^{30,31)}。中山らが本プライマーセットを用いてアジアの7~10歳の学齢期児童の腸内細菌叢を調査したところ、細菌叢は *Prevotellaceae* 科 (P-type) もしくは *Bifidobacteriaceae* 科と *Bacteroidaceae* 科 (BB-type) に属する細菌の存在量の多さによって特徴付けられる2つのエンテロタイプ様クラスターを示した¹⁹⁾。それぞれの細菌叢が持つ機能的な構成をPICRUST³²⁾を用いてシミュレーションしたところ、P-typeでは腸内細菌の多糖類の分解活性が高く、胆汁酸の合成活性が低いのにに対し、BB-typeではオリゴ糖の分解活性と胆汁酸の合成活性が高いことが予想された¹⁹⁾。このように、これまではその複雑さから解析の規模や解像度に制限のあった腸内細菌叢に対しても、次世代シーケンサーの利用によって細菌叢の変動の検出や比較が高い解像度で容易に行えるようになった。

次世代シーケンサーによる16S rRNA解析は、解析ターゲットを16S rRNA 遺伝子に絞っている関係で、トータルDNAを用いたメタゲノム解析よりも各サンプルの解析部位の冗長度を増やすことが容易なためにより多くのサンプルを解析でき、かつデータの処理もより簡便なことから菌叢解析のツールとして汎用されている。このように、本法は強力なメタゲノム解析ツールであるが、問題点も存在する。それは、プライマーの配列によっては検出できない微生物群が存在することや、PCRによる増幅バイアスなどが生じるため、異なる条件 (特に異なるプライマー) で行われた菌叢解析結果は、正式には比較することができない。そのため、新規に菌叢解析を計画する場合には、そうした点を踏まえなが

ら目的に応じた解析条件の選択が今後も必要になると考えられる。

2-3 乳業分野における次世代シーケンサーの利用

乳業分野の菌叢解析事例を紹介する。Ercoliniらはイタリアの伝統的なチーズで、最高品質の水牛モッツァレラチーズの製造過程における菌叢の変化を解析した³³⁾。イタリアのサレルノとカゼルタにある二か所の生産所で、原料の水牛の乳、スターターとなる前日のバッチからのナチュラルホエイカルチャー (NWC)、初期と熟成の終わりのカード (凝乳)、そして成形後のチーズの菌叢を解析した³³⁾。原料の乳には乳酸菌以外に *Acinetobacter* sp. や *Pseudomonas fragi* の優占が見られたが、スターターのNWC添加後はそれらが優占することはなく、NWCに含まれる乳酸菌の *S. thermophilus*, *L. lactis*, *L. delbruenkii*, *L. helveticus* (サレルノのみ) がチーズの製造過程を通して優占していた。このことから、主にNWCに含まれる乳酸菌が発酵に寄与していることが示唆された³³⁾。

Stellatoらは、同一工場内で作られるタイプの異なるチーズ製品ごとに環境 (使用器具のスワブ) とチーズの両方について細菌と真菌の菌叢を解析し、環境中の微生物がチーズ製品に与える影響の評価を行った³⁴⁾。チーズと器具の菌叢は、細菌・真菌共に双方ではっきりと異なっており、細菌については全体的にチーズよりも器具の方が細菌叢の多様性が高かった。*S. thermophilus* や腐敗性細菌の *Pseudomonas* 属細菌、*Acinetobacter* spp., *Acinetobacter johnsonii* と *Psychrobacter* spp. については器具とチーズを含むほぼすべてのサンプルで検出されたが、その存在率は双方で異なっていた。*Pseudomonas* 属細菌は器具では平均で30%の存在率を占めており、高いものでは50%にも上ったが、チーズにおける本属細菌の存在率は5%以下であった。*S. thermophilus* についてはリコッタ以外のチーズでは平均で70% (リコッタチーズは約25%)、器具では3%~43%の存在率を占めていた。真菌について

も、器具に多く存在する真菌の大部分はチーズにも存在していたが、それらが優占種となることは無かった。乳酸菌と腐敗性細菌の存在率は負の相関が見られることから、腐敗性細菌は乳酸菌によって排除されていることが示唆された³⁴⁾。これらの解析例のように、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析技術は、乳製品の品質管理に応用することができると考えられる。

3. おわりに

腸内細菌叢や環境微生物の網羅的な解析は、次世代シーケンサーが普及するまでは得られる情報が限られていた。微生物ゲノムについても同様で、ある目的遺伝子のゲノム上の位置（遺伝子座）がわからない場合には、サザンハイブリダイゼーションなどで目的遺伝子を検索し、さらにクローニング操作を行ってシーケンスを行うといった労力と時間を要する作業が必要であった。現在では、次世代シーケンサーでドラフトゲノムを簡単に取得できるため、ゲノム中の目的遺伝子も数日程度あれば見つけることができる。完全ゲノムの取得については、現在でもやや労力を要するが、今後、ロングリードの次世代シーケンサーの精度がますます上がれば、完全ゲノムの解読も容易になることが予想される。また、現在はすでにポータブル型の次世代シーケンサーが存在している。今後、簡便性や価格がさらに追及されれば、乳製品の製造現場でのモニタリングや微生物関連のトラブルに対する原因解明手段としても次世代シーケンサーが汎用される可能性がある。

参考文献

- 1) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463–5467 (1977).
- 2) Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, **281**, 363–365 (1998).
- 3) Pieter De Maayer, A. V., Don A. Cowan. メタゲノミクス解析の現状. ゲノム情報解析—次世代シーケンサーの最新の方法と応用—. [編集] Poptsova, M. S., [監訳] 石井一夫, 富田因則, 丹生谷博, 大藤道衛, 株式会社 エヌ・ティー・エス, 233–268 (2016).
- 4) 平山洋佑, 遠藤明仁. 乳酸菌分類の現在とビフィズス菌・乳酸菌分類小委員会が提言した新規乳酸菌種提唱のための最少基準. *腸内細菌学雑誌*, **30**, 17–28 (2016).
- 5) Parte, A. C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research*, (Database issue): D613–D616 (2014).
- 6) 辨野義己. *Lactobacillus* 属の分類と同定. *食品と微生物*, **8**, 65–74 (1991).
- 7) Salvetti, E., Torriani, S. and Felis, G. E. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*, **4**, 217–226 (2012).
- 8) Sun, Z. et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun*, **6**, 8322 (2015).
- 9) Agyei, D., Tambimuttu, S., Kasargod, B., Gao, Y. and He, L. Quick and low cost immobilization of proteinases on polyesters: Comparison of lactobacilli cell-envelope proteinase and trypsin for protein degradation. *Journal of biotechnology*, **188**, 53–60 (2014).
- 10) Fox, P. and Wallace, J. Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in applied microbiology*, **45**, 17–86 (1997).
- 11) von Schillde, M.-A. et al. Lactocepine secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell host and microbe*, **11**, 387–396 (2012).
- 12) Barrangou, R. et al. CRISPR provides ac-

- quired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712 (2007).
- 13) Barrangou, R. and Marraffini, L. A. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell*, **54**, 234–244 (2014).
 - 14) Barrangou, R. et al. Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochem Soc Trans*, **41**, 1383–1391 (2013).
 - 15) Shimomura, Y. et al. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics*, **12**, 17 (2011).
 - 16) Kamerbeek, J. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* **35**, 907–914 (1997).
 - 17) Briner, A. E. and Barrangou, R. *Lactobacillus buchneri* genotyping on the basis of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) locus diversity. *Applied and environmental microbiology*, **80**, 994–1001 (2014).
 - 18) Nishijima, S. et al. The gut microbiome of healthy Japanese and its microbial and functional uniqueness. *DNA Res*, **23**, 125–133 (2016).
 - 19) Nakayama, J. et al. Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci Rep*, **5**, 8397 (2015).
 - 20) FOX, G. E., Pechman, K. R. and Woese, C. R. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **27**, 44–57 (1977).
 - 21) Woese, C. R. and Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5088–5090 (1977).
 - 22) Neefs, J. M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S. and De Wachter, R. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3025–3049 (1993).
 - 23) Caporaso, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, **7**, 335–336 (2010).
 - 24) 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf).
 - 25) Klindworth, A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* **41**, 1–11 (2013).
 - 26) Herlemann, D. P. et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *The ISME journal*, **5**, 1571–1579 (2011).
 - 27) Kim, S. W. et al. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res*, **20**, 241–253 (2013).
 - 28) Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. [ed.] Stackebrandt, E and Goodfellow, M., John Wiley and Sons, 125–175 (1991).
 - 29) Sogin, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 12115–12120 (2006).
 - 30) Nakayama, J. Pyrosequence-based 16S rRNA profiling of gastro-intestinal microbiota.

- Bioscience and microflora*, **29**, 83–96 (2010).
- 31) 是則有希, Jiahui, J., 中山二郎. 16S rRNA 遺伝子の大量シーケンシングによる菌叢解析の現状と問題点. *日本乳酸菌学会誌*, **23**, 24–34 (2012).
- 32) Langille, M. G. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology* **31**, 814–821 (2013).
- 33) Ercolini, D., De Filippis, F., La Stora, A. and Iacono, M. “Remake” by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 8142–8145 (2012).
- 34) Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A. and Ercolini, D. Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Appl Environ Microbiol*, **81**, 7893–7904 (2015).