

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

今号のポイント: ライブラリー調製キット「ThruPLEX® DNA-Seq Kit」「SMARTer® Stranded RNA-Seq Kit」を使うことで、超微量DNA・RNAサンプルからでもマイクロバイーム解析が可能になりました。

【キーワード】 マイクロバイーム、メタゲノム解析、メタトランスクリプトーム解析、微量検体

細菌叢のシーケンス解析:メタゲノミクスとメタトランスクリプトミクス

私たちが住んでいるこの大きな世界では、私たちの生活に直接影響を与えなければ、身近にある目に見えないものの存在を見落としがちです。例えば、年間多くの方が亡くなる抗生物質耐性菌(ARB)の株は、臨床および非臨床において細菌叢(マイクロバイーム)を理解するために多くの研究が進んでいます。しかし、すべての微生物が悪影響を与えるわけではありません。バクテリアは木材などの乾燥植物を分解するのに優れており、この特徴を利用してより効率的なバイオ燃料合成方法を開発することができます。マイクロバイームは多様かつ複雑であり、研究を行うには特別な方法が必要です。近年、高感度でハイスループットなシーケンス方法が登場し、多様性の高い微生物集団のDNA-Seq(メタゲノミクス)およびRNA-Seq(メタトランスクリプトミクス)が可能になりました。ここでは、微生物の世界を調べるために、ThruPLEX® DNA-Seq KitおよびSMARTer® Stranded RNA-Seq Kitの特徴を利用した研究グループをご紹介します。



■メタゲノミクスと抗生物質耐性の増加

私たちの健康は私たちが生活している環境と密接に関連していますが、特に微生物との関わりはとても重要です。「out of sight, out of mind(見えないものは忘れてしまう)」という考えを人の排泄物に当てはめると、それは私たちの周囲の細菌叢に影響を与え、それらの環境は伝播性のある抗生物質耐性の原因になりえます。ノルウェー環境庁から委託された報告では、研究者たちは環境中の抗生物質耐性菌(ARB)と抗生物質耐性遺伝子(ARG)について解明しようとしました。この目的のために、彼らはノルウェー全土の6つの廃水処理施設を分析し、非臨床環境におけるARBおよびARGの同定とモニターを行いました。高収量のDNAを抽出することは複雑で困難なため、各施設から集めた未処理の廃水サンプルの10レプリケートを使用して、DNA抽出を行いました。その後、ThruPLEX® DNA-Seq Kitを使用してメタゲノムライブラリーを作製しました。シーケンス後、研究者らは110個のARGを同定し、99個が*mex*遺伝子ファミリーの薬剤排出ポンプに該当していることがわかりました。これらの遺伝子のいくつかは、臨床に関連するARBであることが以前の研究で証明されており、*mex*遺伝子ファミリーの薬剤排出ポンプは宿主内での細菌の持続性を高め、病原性を促進する可能性があることを示唆しました(Piddock 2006)。

なぜこれが大事か?

メタゲノミクスにより、微生物集団の大規模なゲノミクス解析が可能になり、環境サンプル中のARGをスクリーニングすることができます。環境は伝播性のある抗生物質耐性の貯蔵庫として機能できるため、このレポートでは非臨床環境でARGをモニタリングすることの重要性を強調しています。ただし、これらの分析はスタートサンプルの複雑さ、少ないサンプル量、スループットが低いワークフローから、難しいと思われることがあります。このレポートでは、環境から採取した微生物サンプルから複雑性の高いメタゲノミクスライブラリーを作製するために、シングルチューブ・簡便操作のThruPLEX® DNA-Seq Kitが有用であることを示しました。



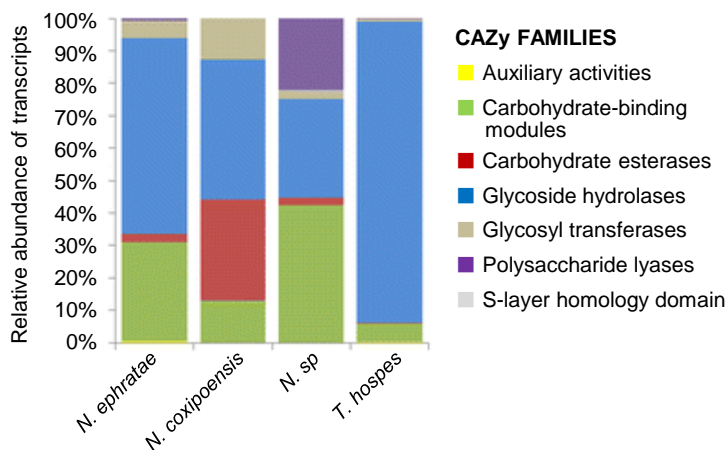
裏面につづく ➡

■ メタトランスクリプトミクス：繊維から燃料へ

シロアリは木材を食べる能力があることで有名であり、シロアリの腸内細菌は複雑な糖質を消化することができません。したがって、シロアリの腸には、リグノセルロース系バイオマス（植物乾燥物質）を処理するための新規酵素が存在する可能性が示されます。しかしながら、シロアリの腸からのシーケンスライブラリー調製は困難であると言われてきました。この課題を克服するため、カリフォルニア大学アーバイン校のグループは、我々のRNA-Seqテクノロジーを利用して、シロアリの腸のメタトランスクリプトーム解析のための新しい方法を開発しました (Marynowska et al. 2017)。研究者らは、SMARTer® Stranded RNA-Seq Kitを用いて、4種のシロアリの腸からライブラリーを作製しました。イルミナ社MiSeqでシーケンス後、情報解析により、すべてのmRNAリードの約14%が糖代謝とトランスポーター遺伝子に関連することが分かりました。そして、研究者らはこのデータを用いて、116ファミリーにまたがる1,643個の酵素を同定することができました（下図参照）。

★ シロアリの糖質関連酵素の同定とプロファイリング

4種それぞれのシロアリの腸内細菌メタトランスクリプトーム解析により、糖質関連酵素 (Carbohydrate-Active enZymes: CAZy) のプロファイリングはそれぞれ異なるパターンを示した。



なぜこれが大事か？

リグノセルロース系バイオマスは、バイオ燃料を生産するための原料としては最も豊富な供給源ですが、現在の処理方法では依然として費用がかかりすぎます。バイオ燃料の高効率な触媒作用を可能にする酵素を同定することで、安価で再生可能なエネルギー源を提供できるようになります。また、シロアリの腸内細菌叢の複雑性と得られるスタートサンプルが微量であるため、新規酵素を同定するためのRNA-Seqは困難な場合があります。

しかし、タカラバイオのSMARTer® Stranded RNA-Seq Kitを使えば、この困難に対応することができます。

■ マイクロバイオーム解析の展望

最近の大規模なDNAおよびRNAシーケンス法の技術革新により、メタゲノムおよびメタトランスクリプトミクスを高い解像度で行うことが可能になりましたが、それでもまだ課題があります。サンプルの複雑性が高く、サンプル量が少なく、サンプル数が多いことはすべて克服すべき重要な課題ですが、タカラバイオのThruPLEX® DNA-Seq KitおよびSMARTer® Stranded RNA-Seq Kitを使用すれば、ごく微量なサンプルからでも有効なデータを取得することができます。

◆ 参考文献

Marynowska, M. et al. Optimization of a metatranscriptomic approach to study the lignocellulolytic potential of the higher termite gut microbiome. *BMC Genomics* 18, 681 (2017).

Piddock, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 629–636 (2006).

◆ 微量DNA/RNAサンプルからマイクロバイオーム解析が可能なライブラリー調製キット

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
ThruPLEX® DNA-Seq Kit	24回	R400674	¥104,000
SMARTer® Stranded RNA-Seq Kit	12回	634836	¥180,000

・本チラシで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
 ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
 ・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。
 ・本チラシに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
 ・本チラシ記載の価格は2019年11月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2019年11月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店