

次世代シーケンサーと環境調査

環境部 自然環境課 主席研究員 大井 和之

要 旨

九環協では2019年2月に次世代シーケンサー「iSeq100」を導入し、環境調査における様々な生物分析での利活用の可能性を探っている。急速に広まってきている魚類などの水生生物を対象とした「環境 DNA」分析のほか、バクテリアや原生生物、ウイルスも含む微生物を対象とした環境調査にも使えることがわかってきた。DNA分析の発展の歴史と現状、次世代シーケンサーを活用した環境調査の展望をとりまとめた。

1. DNA 分析発展の歴史

1990年代前半は、DNA分析機器の最初の発展期であった。最初期の塩基配列解析(DNAシーケンシング)は、1977年に開発された塩基配列解析法「サンガー法」により、RI標識された反応生成物を大きなポリアクリルアミドゲル板で電気泳動し、X線フィルムで標識分子を検出した「ラダー」を目でたどりながら、4種類の塩基(A、C、G、T)の並びを読み取っていた。1990年ごろにRIの代わりに蛍光色素でDNAを標識することでラダーの読み取りを機械化し、自動塩基配列解析装置(DNAシーケンサー)が実用化した。筆者が1992年にはじめて使ったDNAシーケンサーはスウェーデンのファルマシア社製で、蛍光色素が1種類のため、1サンプルをA、C、G、Tの4本に分けて反応させ、アクリルアミドゲル4レーン使って泳動していた。その後、4種類の蛍光色素を使ってターミネーター(ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP)を標識し、1本のチューブでシーケンス反応が完了するキットが登場し、世界中の分子生物学研究室を席卷した(図1)。さらに専用のキャピラリーと高分子ポリマーの採用で機器の操作性が向上し、以来20年にわたって同じ原理のDNAシーケンサーが使われている。

1983年のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の発明で、クローニング(DNA断片で形質転換した大腸菌を培養する方法)を使わなくても特定の遺伝子領域を取り出して分析できるようになった。PCRでは、プライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチドの塩基配列によって、任意の領域のDNAだけを増幅して分析することが可能である。PCR

法の発達によって夾雑物を含む微量のDNAでも分析が可能になり、純度の高いDNAを得にくい野生生物でも遺伝子分析が容易になった。1990年代にはショウジョウバエやゼブラフィッシュなど実験生物のミトコンドリア塩基配列データを複数比較して保存的な塩基配列を探索し、多様な生物に適用可能なユニバーサルプライマーを設計して野生生物のミトコンドリア塩基配列が解析可能になった(ユニバーサルプライマーについては研究報告¹⁾参照)。いろいろな生物からシトクロムオキシダーゼなど特定の遺伝子領域の塩基配列を比較することでその分類群の系統関係を明らかにできることから、2000年代の初めごろには、DNAデータバンクに様々な野生生物の遺伝子情報が蓄積されてきた。リファレンスとなる塩基配列情報の蓄積により、未知試料の塩基配列をリファレンスと照合して試料の生物種名を判定することが可能となった。これがDNAバーコードの始まりである。(DNAバーコードについては研究報告²⁾参照)

ところで、サンガー法のDNAシーケンサーは、1種類のDNA分子が十分な量に増えていないと解析できない。大型の動植物であれば、標本を採ってその一部からDNAを抽出すれば、対象種以外のDNAはほとんど含まれていないか、微生物のDNAが含まれていたとしてもPCRのプライマーがマッチせずに増幅されないため、塩基配列解析が可能である。ところが細菌など微生物の場合は、単離培養を行って1種類ずつに分けて分析しないと、PCR反応産物が複数の塩基配列のものが混じった状態になり、DNAシーケンサーにかけても塩基配列を読み取ることができない。環境中の微生物は

培養可能なものばかりではないし、仮に単離培養が可能であってもそれにはコストと時間がかかる。このため、1990年代から2010年ごろまで、環境中の微生物の分析では、PCR反応産物をプラスミドベクターに結合し大腸菌にクローニングし、そのコロニーを数十個拾ってそれぞれの塩基配列を解析する方法が用いられてきた。

2000年代の後半になって、光学センサーを備えた微小な基盤(フローセル)上で化学修飾した基質を利用してDNA分子の合成反応を1塩基ごとに進め、その反応時の蛍光を観測することで大量の塩基配列情報を取得できる新たなDNAシーケンサー(超並列DNAシーケンサー)が開発された(図2)。「次世代シーケンサー(NGS)」と呼びならわされているこの機器は、数千万個の光学センサー上で数百サイクルの反応を行い、数十億バイト(GB)にもなる塩基配列情報を1日で取得できる。1つのフローセルに1分子のDNAが入るよう設計されていて、サンガー法のように1種類のDNA分子を増やす必要はない。大量のDNA断片の塩基配列情報が

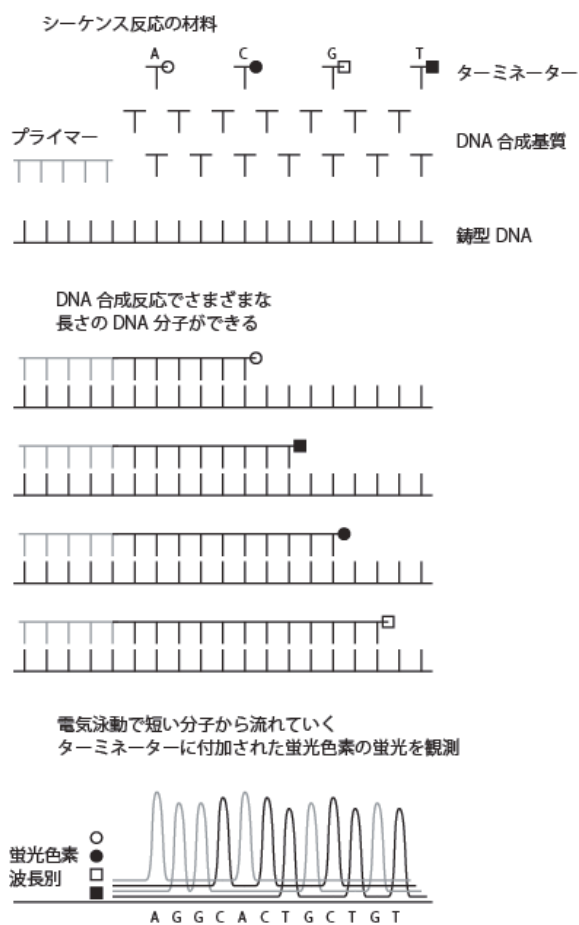


図1 サンガー法の原理

得られるため、ゲノムDNAを断片化して一気に全ゲノム配列を取得したり、特定の細胞で発現しているmRNAを全部cDNA化して解析したりできる。この次世代シーケンサーを用いて、特定の遺伝子領域を増幅するプライマーに解析に必要なアダプター配列を付加し、そのPCR産物をライブラリーとする次世代シーケンサーによる解析をアンプリコン解析という。アンプリコン解析の中でも、複数種のDNAが混じった微生物試料や環境試料について、DNAバーコード領域を対象としたPCR産物を解析するものを「メタバーコーディング解析」と呼んでいる。

2. 次世代シーケンサーの導入

九環協で2010年から行ってきたDNA分析では、複数の生物種のDNAが混合した状態の試料を分析した

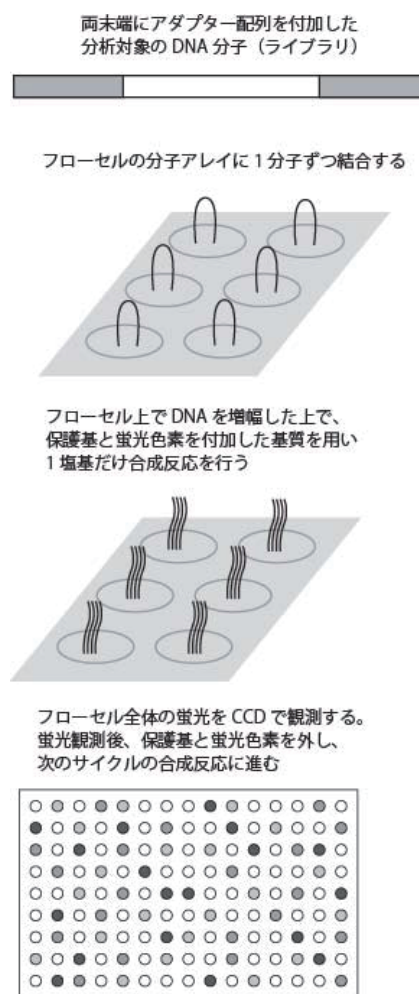


図2 次世代シーケンサーの原理

例(動物の糞、植物プランクトン、バクテリア等)がいくつかあるが、基本的にはPCR産物をクローニングしてシーケンスしており、次世代シーケンサーを使用した例はなかった。特に、環境水中の懸濁物に含まれる大型生物由来のDNAを分析する「環境DNA」については、2013年からリアルタイムPCRによる種特異的解析に取り組んでいたが、次世代シーケンサーによるメタバーコーディング解析である MiFish³⁾の発表以来、環境調査への導入を前提に情報収集を進めてきた。

イルミナは、現在最も普及している次世代シーケンサーのメーカーで、MiSeq、HiSeq、NovaSeqといった機種がラインナップされている。2018年の6月に発表されたiSeq100は、普及型機種MiSeqに比べて1回の分析で得られるデータ量が1/5程度の最もコンパクトな機種である。ただ小型化しただけでなく、専用のカートリッジを使用してほぼメンテナンスフリーとなるなど、独自の改良も加えられた新機種となっている。この新機種の発売を記念して2018年秋にイルミナ日本法人が開催した「ジャパンアグリ iSeq グラント 2018」によって、九環協にiSeq100(図3)が設置できることになった。

3. 次世代シーケンサーを活用した環境調査の展望

環境DNAのメタバーコーディング解析は、魚類を対象としたMiFishが先鞭をつけて、無脊椎動物などほかの生物群の分析方法も開発が進んできている段階である(表1)。魚類については、リファレンスデータが充実し、検出されにくい分類群をカバーするプライマーの改良

なども進んで、採捕調査に遜色ないデータが得られることがわかってきた。2018年度から環境省や国土交通省(土木研究所)の取り組みも始まり、近い将来に環境調査に広く取り入れられていくものと考えられる。昆虫やエビ・カニ類では、標準的なプライマーが提案されており、現状ではリファレンスデータの整備など課題も多いが、今後データの蓄積により有効性が増していき、魚類に続くものと思われる。貝類などほかの生物群でもプライマー開発などの研究が進んできている。

微生物については、環境DNAという言葉が広まる以前の2010年ごろから、次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディングが行われている。例えば腸内細菌叢の検査などがこれにあたる。また、MiFishのデータ解析に用いられるUSEARCHなどのコンピュータプログラムも元々はバクテリア16SrRNA遺伝子領域のメタバーコーディング解析のために開発されたものである。環境中の微生物叢調査も行われているが、多様な細菌が検出されるため群集生物学的な解析が難しく、データの意味付けができるようになるまでは使いどころが難しい。

微生物全体を網羅的に解析するのではなく、対象を絞って解析することでデータの意味付けが可能になる場合がある。植物プランクトンの中で、バクテリアに含まれる1グループであるラン藻類(シアノバクテリア)には、カビ臭のもととなる2-Methylisoborneol(2-MIB)やジオスミン、毒素であるミクロキスチンを産生する有害なものが存在する。形態的には区別が難しい種に有害なものと無害なものがある場合もあり、DNAバーコードによる識別が有効と考えられている。しかし、一般的に用いられる細菌用プライマーでは、広く原核生物の各門に属す

表1 環境DNAメタバーコーディング分析の代表的な手法

対象生物	名称	分析領域	出典
魚類	MiFish	12SrRNA	Miya et al. (2015) ³⁾
哺乳類	MiMammal	12SrRNA	Ushio et al. (2017) ⁴⁾
鳥類	MiBird	12SrRNA	Ushio et al. (2018) ⁵⁾
エビ・カニ類	MiDeca	16SrRNA	Komai et al. (2019) ⁶⁾
昆虫類(底生生物)	BF3 + BR2	COI	Elbrecht et al. (2019) ⁷⁾
菌類	(fungalITS)	ITS	Toju et al. (2012) ⁸⁾
植物	(PLANiTS)	ITS	Omelchenco et al. (2019) ⁹⁾
バクテリア	16SV4	16SrRNA	Caporaso et al. (2012) ¹⁰⁾

る菌株の DNA が増幅可能とするため、シアノバクテリアの DNA は増幅されづらく、またシアノバクテリアの属、種レベルの塩基配列の違いが小さくて種判別が困難という問題があった。オーストラリアの Lee ら¹¹⁾は 2017 年に、シアノバクテリアのメタバーコーディングに適した、16SrRNA 遺伝子 V6 領域の新たなプライマーを発表した。この方法をダム湖水の植物プランクトン調査に試験的に使用して、顕微鏡観察で識別が困難なカビ臭産生シアノバクテリアの判別に有効であることを確認している(投稿準備中)。なお、植物プランクトンの中で真核生物である珪藻類などについても、ITS などメタバーコーディングに適した遺伝子領域の研究が進んできており、近いうちに分析手法が固まっていくものと思われる。

植物病原体を含む真菌類では、樹木の根圏の菌類叢の研究等に ITS 領域のメタバーコーディングが使われている。農業分野の植物病原体の検出や同定の場合、ユニバーサルな ITS ではなく対象菌に特化した遺伝子配列を用いる必要が出てくると考えられる。また、植物のジェミニウイルス¹²⁾は、野生植物のヒヨドリバナやスイカズラのほかにトマトにも感染して被害を与えることが知られているが、ウイルスの塩基配列を次世代シーケンサーで解析することで、圃場周辺の野生植物から栽培植物への伝播を追跡できるのではないかと考えている。このジェミニウイルスのメタバーコーディング解析は試験的に実施して、重複感染の確認を含む有効なデー

タを得ている。

このように、次世代シーケンサーを用いたメタバーコーディング解析により、環境水、土壌、胃内容物や糞などを試料とし、バクテリアやウイルスを含む微生物から魚類、哺乳類などの大型生物までさまざまな生物を対象とした、試料中の生物相を網羅的に検出することが可能となってきた。今後、プライマーの開発・評価とデータベースの整備が進めば、環境調査における利活用が広まっていくものと考えられる。

参考文献

- 1) 大井 (2015) 環境管理 44: 60-66.
- 2) 大井 (2019) 環境管理 48: 56-60.
- 3) Miya, M. et al. (2015) R. Soc. open sci. 2: 150088.
- 4) Ushio, M. et al. (2017) Mol Ecol Resour. 17(6):e63-e75.
- 5) Ushio, M. et al. (2018) Sci. Rep. 8: 4493.
- 6) Komai, T. et al. (2019) MBMG 3:e33835.
- 7) Elbrecht, V. et al. (2019) PeerJ. 7:e7745.
- 8) Omelchenko, DO. et al. (2019) Genes 10:122.
- 9) Toju, H. et al. (2012) PLoS ONE 7(7): e40863.
- 10) Caporaso, JG. et al. ISME J. 6(8):1621-1624.
- 11) Lee, E. et al. (2017) PLoS ONE 12(1): e0170008.
- 12) Ooi, K. & Yahara, T. (1999) Mol. Ecol. 8:89-97.

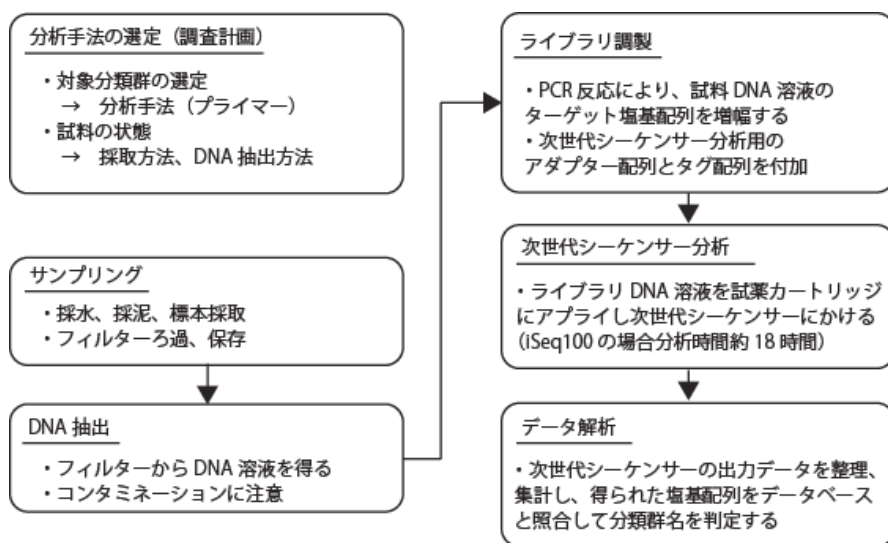


図 3 次世代シーケンサー分析の流れ



iSeq100