ミニシンポジウム記録 水産物の生産・加工・流通段階を保障するリスク管理研究の最新動向

3. 次世代シーケンサーを用いた養殖環境の微生物叢 DNA の網羅的解析

服部正平¹, 須田 亙¹, 小鳥遊景泰², 笹平 俊²¹東京大学大学院新領域創成科学研究科,²(株)松本微生物研究所

3. Microbial community analysis of aquaculture habitat using next generation sequencer

MASAHIRA HATTORI,¹ WATARU SUDA,¹ KAGEYASU TAKANASHI² AND TAKASHI SASAHIRA²¹Center for Omics and Bioinformatics, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, Kashiwa, Chiba 277-8564, ²Matsumoto Institute of Microorganisms, Co. Ltd., Matsumoto Nagano, 390-1241, Japan

1. はじめに

今日における DNA シーケンス技術 (NGS: Next-Generation Sequencing) の革新的な進歩は生命科学分野のみならず環境生態系の研究分野にも大きなインパクトを与えつつある。¹⁾ NGS を用いることにより、これまでとは桁違いの網羅性と定量性をもった微生物生態系の解析が可能となった。例えば、ヒトの常在菌叢マイクロバイオーム (常在菌叢を構成する細菌種の全ゲノム) の解析からは、約 1,000 万の細菌遺伝子や細菌叢の代謝系の全貌等の解明が迅速かつ低コストに行われている。²⁾ 本研究では、NGS を活用したクルマエビ養殖池における細菌叢の解析について紹介する。

2. 解析手法

ビブリオ病の発症率が異なる 2 つの養殖池の養殖池海水と底質泥を経時的に採取し、菌叢 DNA を抽出した。また、比較として養殖池外の海洋水 (外海水) 検体の解析も行った。菌叢の構成菌種や構造の解析には、16S rRNA 遺伝子 (16S) 配列多様性を指標としたメタ 16S 解析を用いた。³⁾ 本手法では、定量性を改善したプライマー 27Fmod-338R を用いて 16S V1-2 領域を PCR 増幅した後、得られた 16S アンプリコンを 454 GS FLX プラットフォームによるシーケンシングに供した。1 検体当たり 4,000 リードの高品質 16S 配列を 96% の配列相同性によってクラスタリングし、OTU (Operational taxonomic units) を作成した。各 OTU の

代表配列を既知菌種 16S 配列データベースに照会することで、菌種の推定を行った。さらに、UniFrac distance 解析により、各菌叢間の菌叢構造 (系統樹) の類似度を解析した。

Ion PGM を用いたメタゲノムシーケンシングにより細菌叢の遺伝子解析を行った。約 1 Gb/検体のメタゲノムデータを取得した。これら配列データを機能遺伝子データベースである KEGG および COG に対してアサインすることで、各菌叢の遺伝子組成を得た。

上記の菌叢データと、養殖池の環境メタデータ (水温, pH, 窒素量, リン量, COD, 病害によるエビの死亡数等) の相関解析を行った。

3. 養殖池の菌叢

メタ 16S 解析の結果、養殖池海水は外海水と比較し細菌叢を構成する菌種数 (OTU 数) が有意に低かった。得られた 16S 配列のデータベースへの照会の結果、養殖池海水および底質泥には、既知菌種と相同性の低い細菌種が多く存在することが示された。菌叢構造の解析から、養殖池海水と外海水の菌組成は大きく異なり、それぞれに特徴的な菌種が存在することが示唆された。さらに、各環境データの経時変動と有意に相関する菌種を特定した。メタゲノムデータからは、養殖池の海水・底質泥および外海水に特徴的な機能プロファイルを得た。現在、各機能と環境データの相関解析を進めている。

本研究の一部は平成 23 年度持続的養殖生産・供給推進事業のうち革新的養殖システム開発促進事業 (水産庁) によって行われた。

文 献

- 1) 服部正平. 概論: 超高速シーケンサーがもたらす生命科学の大展開. 「実験医学 “特集 超高速シーケンスが開く次世代の生命科学”」(服部正平企画) 羊土社, 東京. 2009; 27: 2-7.
- 2) 服部正平. 第 1 章 総論 1 メタゲノム解析とは何か. 「メタゲノム解析技術の最前線」(服部正平監修) シーエムシー出版, 東京. 2010; 3-12.
- 3) Kim SW, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, Morita H, Hattori M. Robustness of gut microbiota of healthy adult in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.* 2013; 20: 241-253.