

ヒトマイクロバイオームの 解析手法論

須田 互



理化学研究所
生命医科学研究センター
マイクロバイオーム研究チーム
副チームリーダー

2018年7月3日
大阪医科大学 研究ブランディング事業「健康寿命をのばす たかつきモデル」学内シンポジウム

Human microbiome

ヒト常在細菌叢

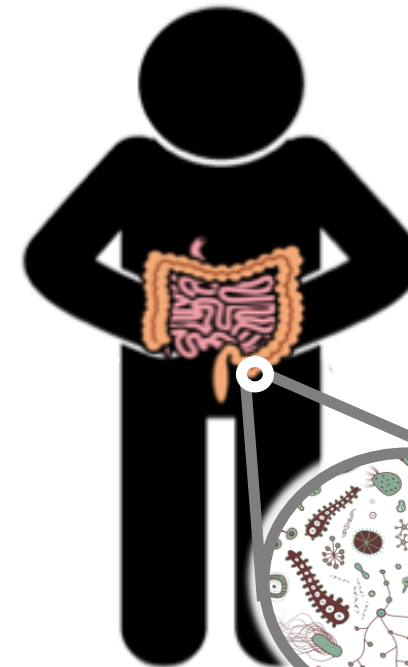
体の部位	細菌数／g, ml またはcm ²	菌種数
鼻腔	10^3 - 10^4	
口腔(合計)	10^{10}	>700
唾液	10^8 - 10^9	>600
歯肉	10^{12}	
歯表面	10^{11}	
消化器系(合計)	10^{14}	>1000
胃	10^1 - 10^4	
小腸	10^4 - 10^7	
大腸(糞便)	10^{11} - 10^{12}	>1000
皮膚(合計)	10^{12}	
皮膚表面	10^5	>150
泌尿生殖器系(合計)	10^{12}	
膣	10^9	

ヒト1人のヒト細胞数: 約37兆個

ヒト1人の常在細菌の数: 数十～百兆個

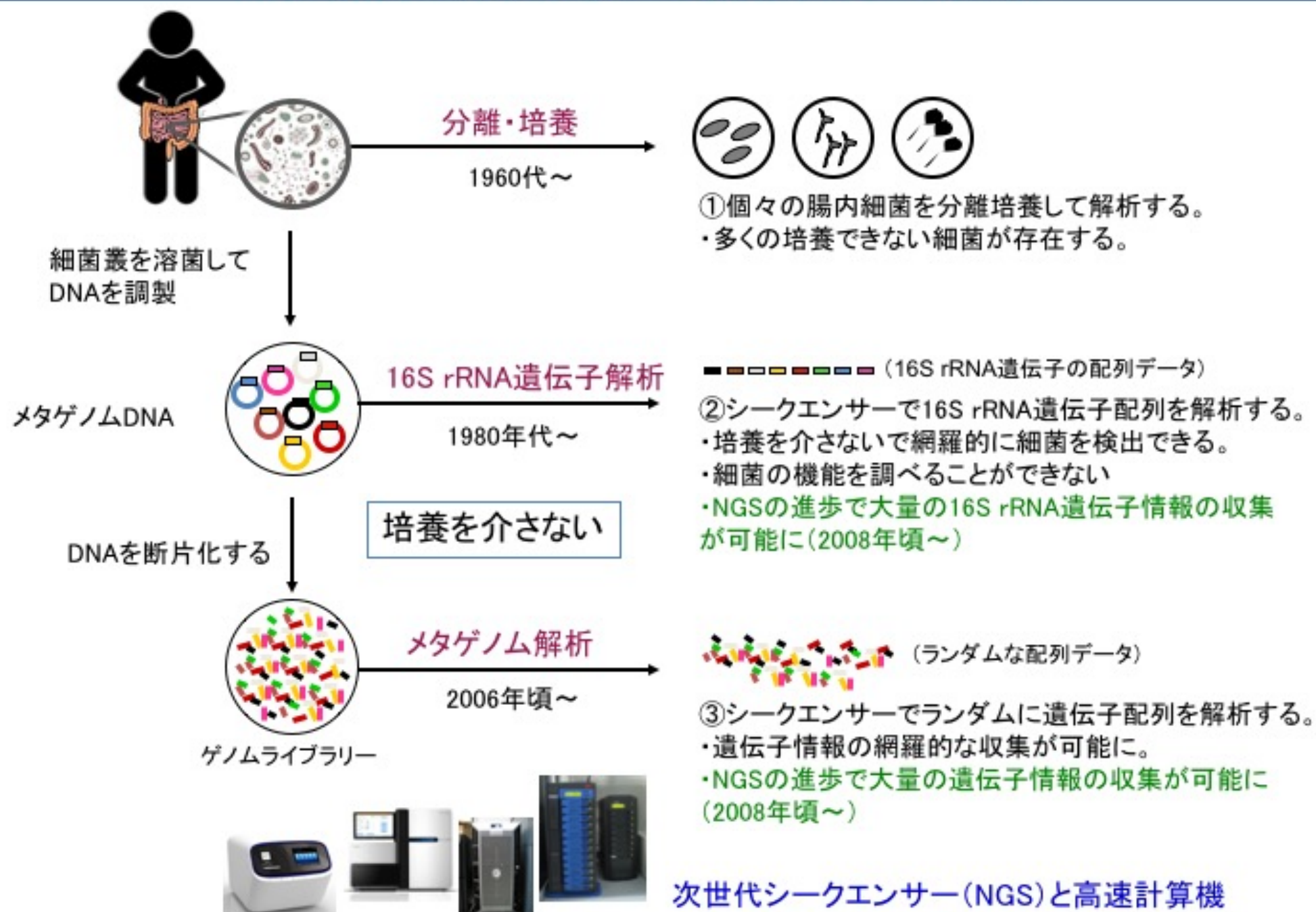
ヒト1人のもつ遺伝子数: 約2.2万

ヒト1人の常在菌(腸内細菌)
の持つ遺伝子: 50万以上



腸内細菌
>1,000菌種
数百兆個
重さ: ~1kg

ヒト腸内細菌叢の解析法の推移



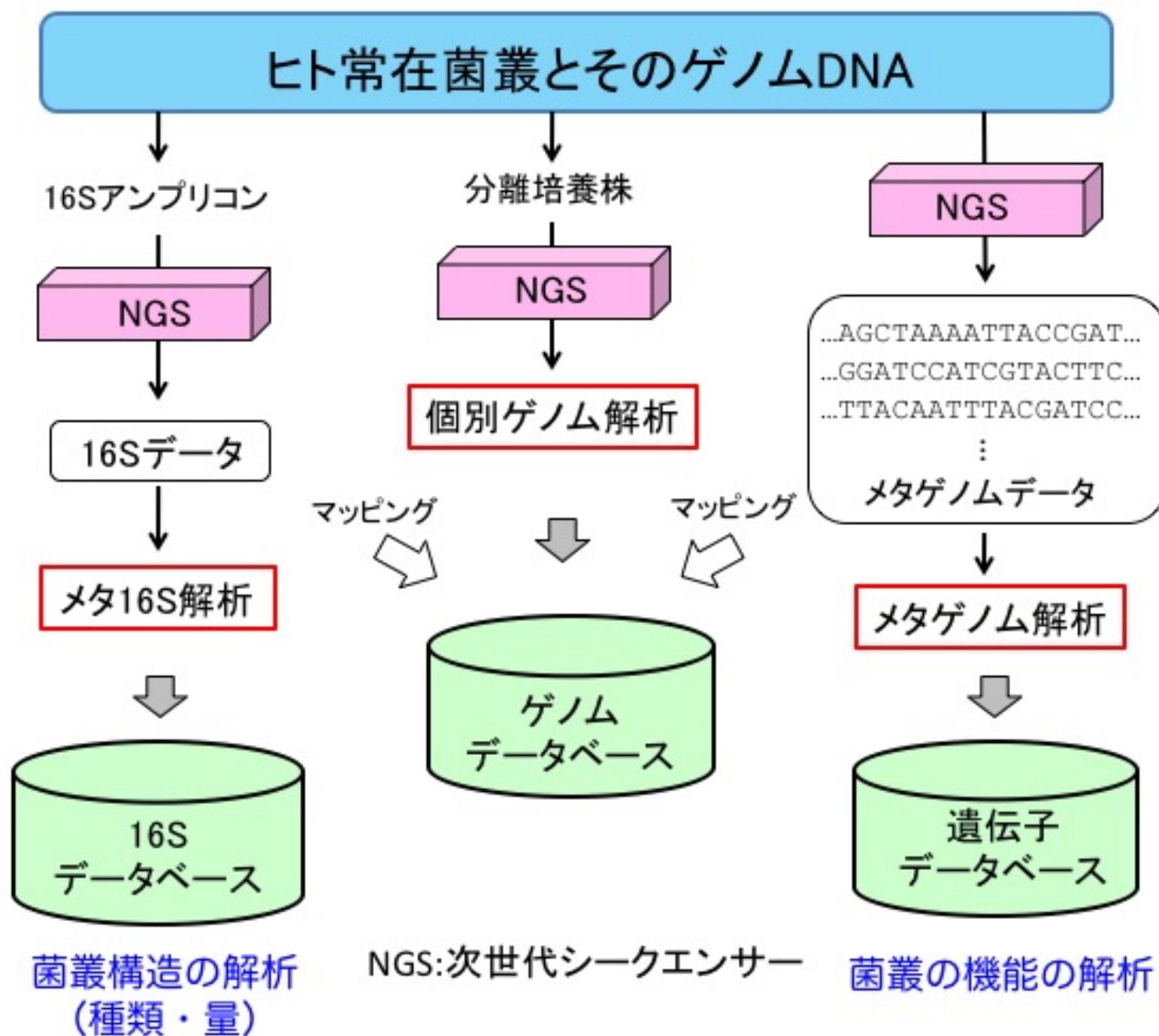
次世代シーケンサーとは・・・

\$1,000 Human Genome Projectをモチベーションとして開発された技術を使用した超並列処理型DNAシーケンサー

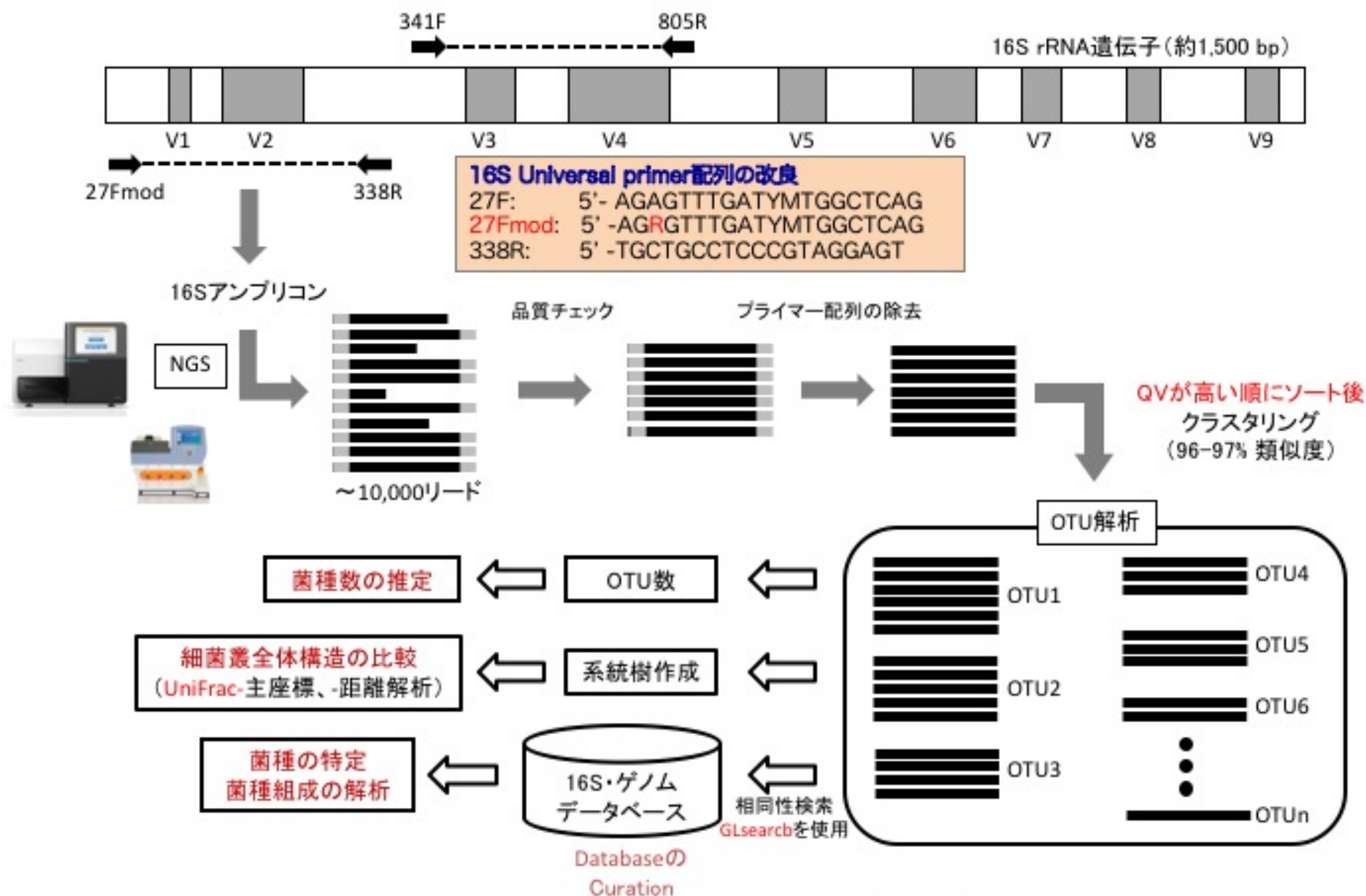
2005年に454 GS20が市場に投入され、現在進行形でバージョンアップや新機種が開発されている。



ヒト常在菌叢の解析方法



メタ16S解析



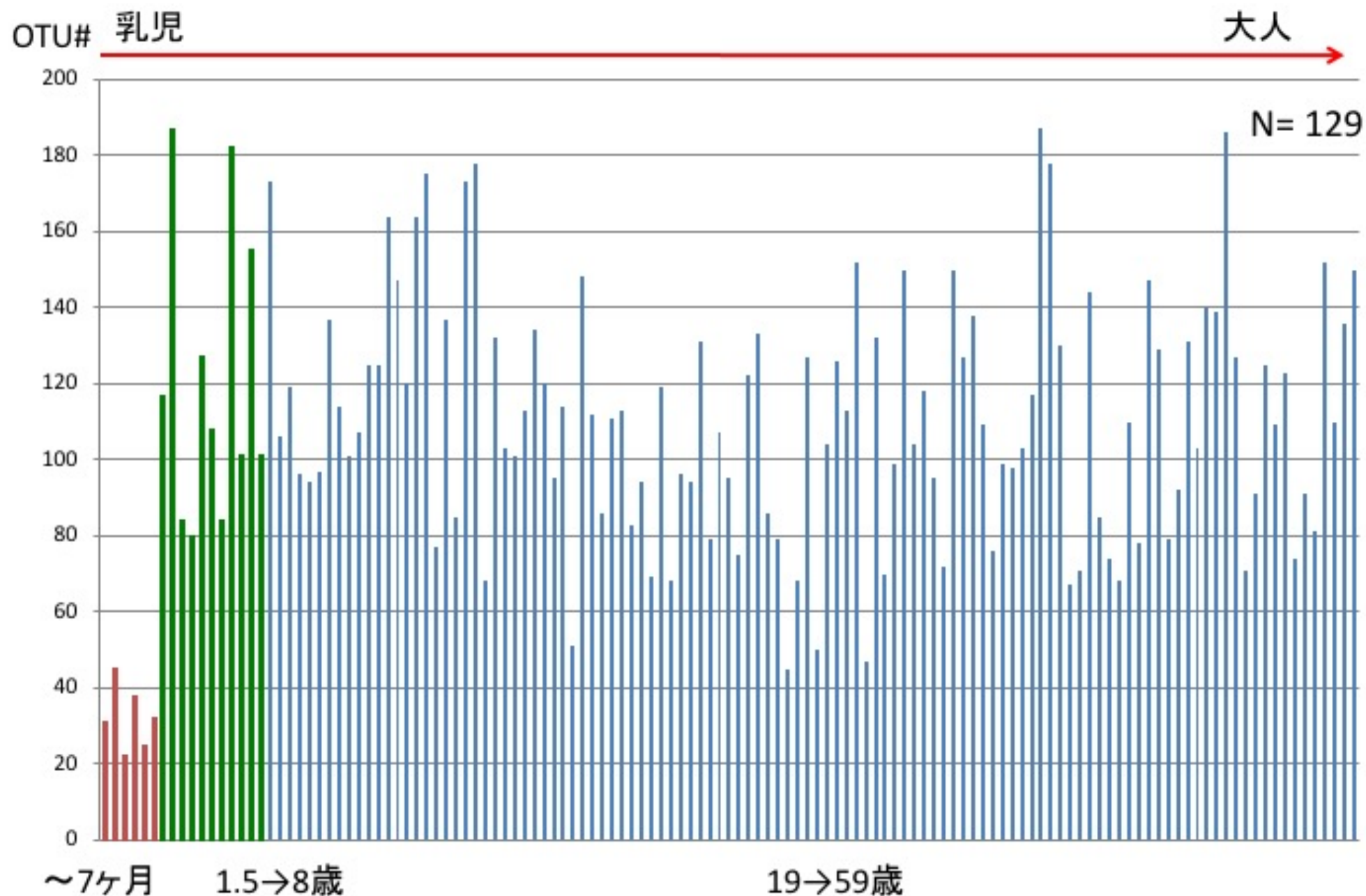
16SデータのOTU (Operational Taxonomic Unit) 解析

Database類似度検索によるOTU菌種帰属の例:

ヒト腸内細菌叢 3000readを用いた場合

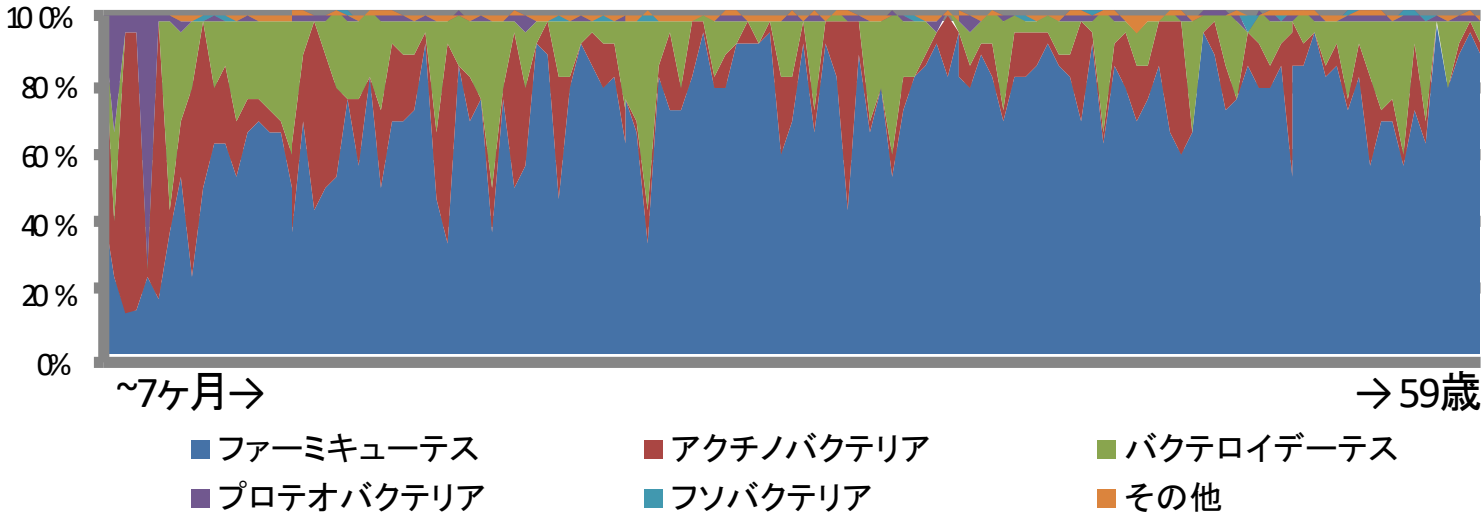
	A	B	C	D	E	F	G
1	OTU name	Read number	Phylum	Genus	Species	Identity	Length coverage %
2	OTU00001	469	Actinobacteria	Bifidobacterium	Bifidobacterium adolescentis	100	100
3	OTU00002	24	Firmicutes	Eubacterium	Eubacterium hallii	98.45	100
4	OTU00003	15	Firmicutes	Eubacterium	Eubacterium ventriosum	99.69	99
5	OTU00004	254	Bacteroidetes	Bacteroides	Bacteroides sp. D8	99.68	100
6	OTU00005	121	Firmicutes	Clostridium	Clostridium sp. CE6	99.36	96.90
7	OTU00006	149	Firmicutes	Clostridium	Clostridium clostridioforme	99.07	100
8	OTU00007	23	Firmicutes	Streptococcus	Streptococcus parasanguinis	100	100
9	OTU00008	331	Firmicutes	Faecalibacterium	Faecalibacterium prausnitzii	99.68	100
10	OTU00009	84	Actinobacteria	Bifidobacterium	Bifidobacterium longum	99.35	100
11	OTU00010	6	Firmicutes	Ruminococcus	Clostridiales bacterium 80/3	99.35	100
12	OTU00011	25	Firmicutes	Roseburia	butyrate-producing bacterium M104/1	99.69	100
13	OTU00012	103	Actinobacteria	Coriobacterium	Coriobacterium sp. CCUG 33918	99.34	100
14	OTU00013	9	Firmicutes	Butyrivibrio	butyrate-producing bacterium A2-207	94.77	100
15	OTU00014	7	Bacteroidetes	Bacteroides	Bacteroides uniformis	98.73	100
16	OTU00015	13	Actinobacteria	Bifidobacterium	Bifidobacterium adolescentis	98.06	100
17	OTU00016	45	Firmicutes	Dorea	Dorea longicatena	99.38	100
18	OTU00017	85	Firmicutes	Anaerostipes	butyrate-producing bacterium SSC/2	99.39	100
19	OTU00018	66	Firmicutes	Ruminococcus	Ruminococcus sp. K-1	99.69	100
20	OTU00019	329	Actinobacteria	Bifidobacterium	Bifidobacterium sp. 126	100	100
21	OTU00020	38	Proteobacteria	Haemophilus	Haemophilus parainfluenzae	99.35	100
22	OTU00021	47	Firmicutes	Eubacterium	Eubacterium hadrum	99.69	100
23	OTU00022	40	Firmicutes	Lachnospira	Lachnospira pectinoschiza	96.86	98
24	OTU00023	3	Firmicutes	Turicibacter	Turicibacter sanguinis	98.61	100
25	OTU00024	18	Firmicutes	Dialister	Dialister invisus	99.7	100
26	OTU00025	69	Firmicutes	Clostridium	Clostridium clostridioforme	97.22	100
27	OTU00026	40	Firmicutes	Streptococcus	Streptococcus salivarius	100	100
28	OTU00027	4	Firmicutes	Streptococcus	Streptococcus pneumoniae	98.09	100
29	OTU00028	1	Firmicutes	Ruminococcus	Ruminococcus sp. M-1	92.07	100
30	OTU00029	50	Firmicutes	Ruminococcus	Ruminococcus obeum	95.67	100

年齢順に並べた腸内細菌叢のOTU(菌種)数

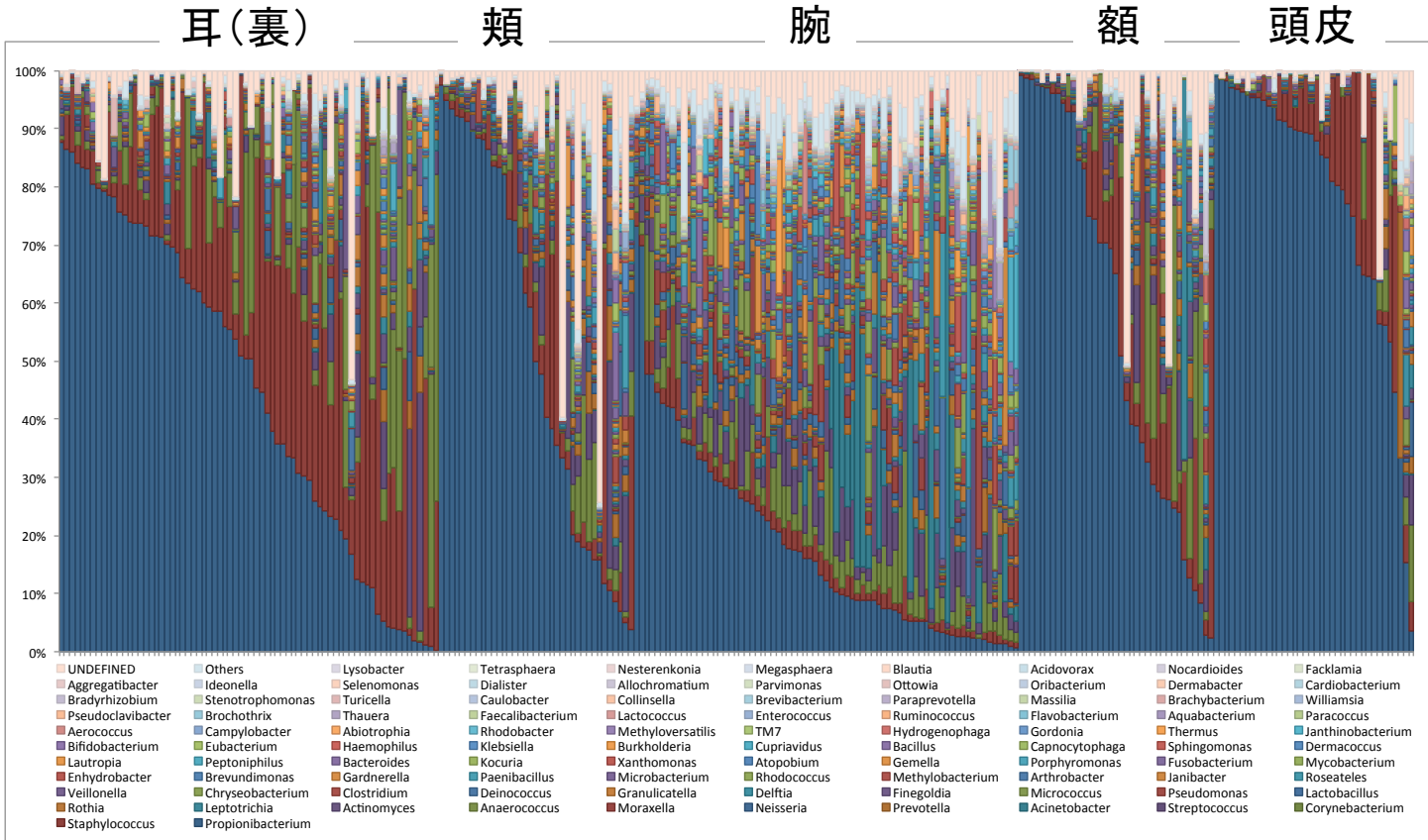


ヒト腸内及び他の細菌叢の菌種組成解析例

ヒト腸内細菌叢
Phylumレベル



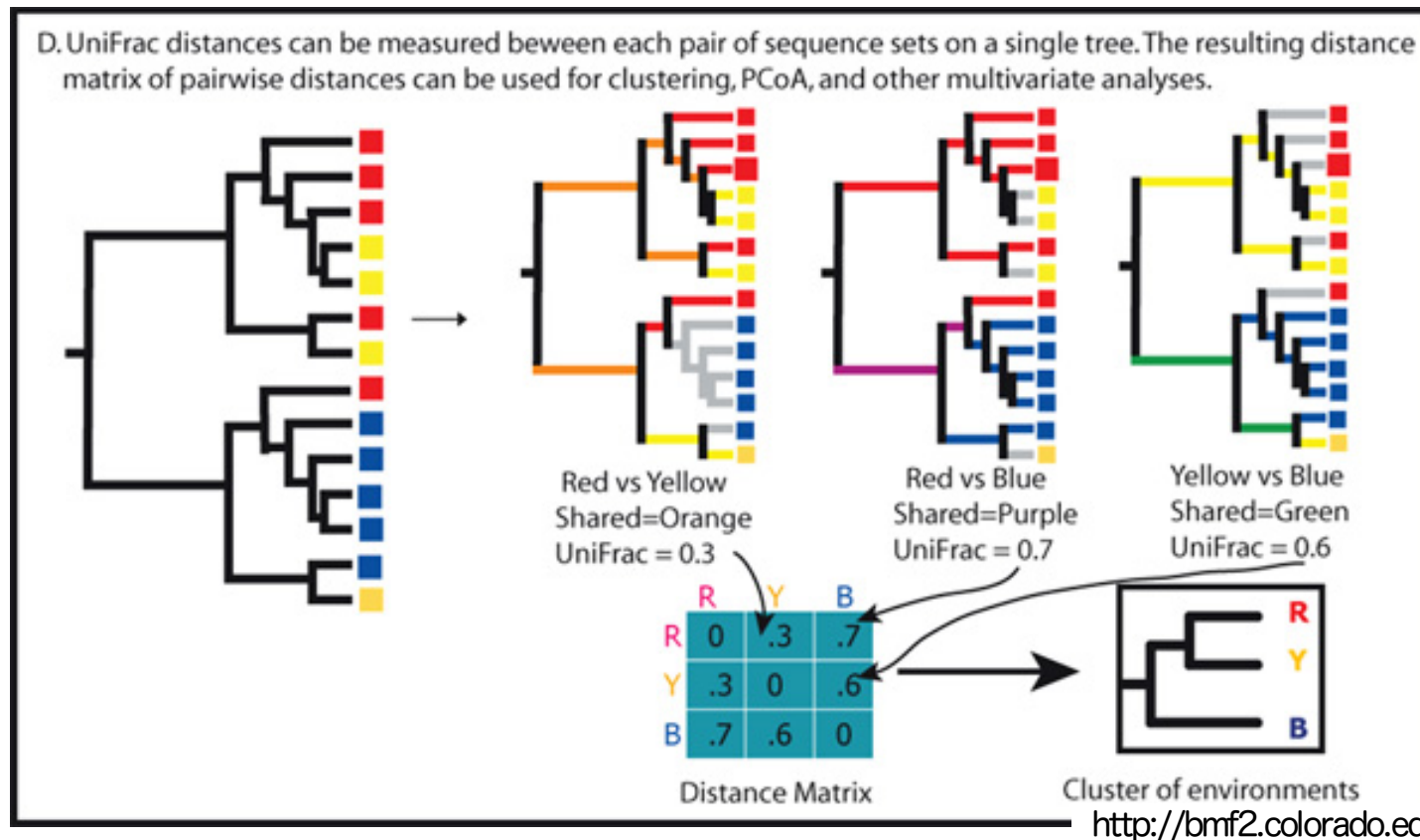
ヒト表皮細菌叢
Genusレベル



UniFrac 解析

Lozupone C & Knight R. Appl Environ Microbiol. (2005)

比較する全菌叢サンプルのOTU(菌種)の代表配列を用いた系統樹を作成し、比較する2検体間の菌叢構造全体の違いを距離(UniFrac distance)として計算する手法



各サンプル (■, ■, ■) で形成されたOTU (菌種) の代表配列でTreeを描く。

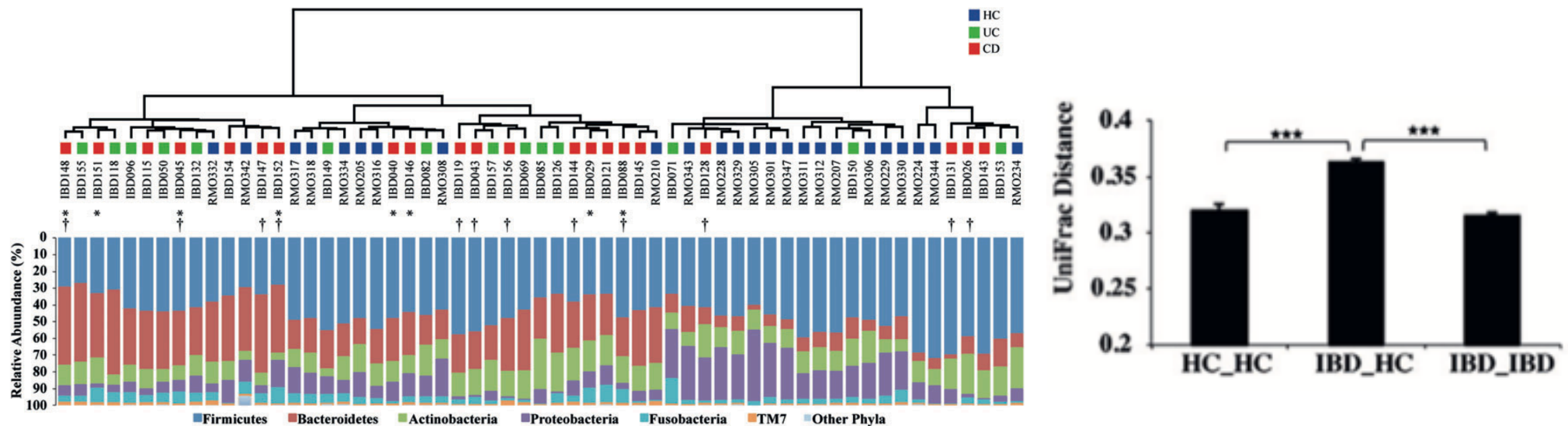
■と■の間の距離の計算は以下

Unifrac distance = (2サンプルで固有の枝長[赤+黄色]) / (共通な枝を含む枝長の和[赤+黄+オレンジ])

解析例

炎症性腸疾患と唾液細菌叢の関連

- 唾液細菌叢は腸疾患である炎症性腸疾患(IBD)と関連する
- IBD患者と健常者の唾液細菌叢が有意に異なる

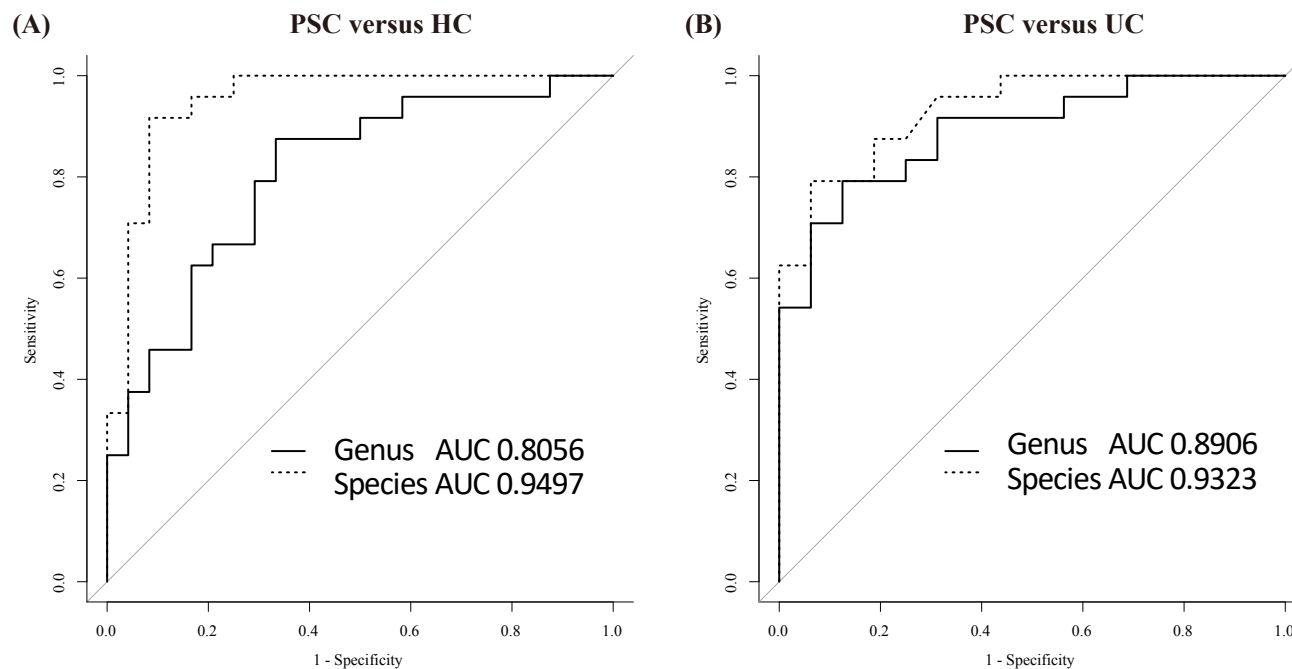


Said HS, Suda W, Nakagome S, Chinen H, Oshima K,
Kim S, Kimura R, Iraha A, Ishida H, Fujita J, Mano S,
Morita H, Dohi T, Oota H, Hattori M.
DNA Res. (2014) 21:15-25.

解析例

PSC患者の唾液細菌叢変化

- PSC=原発性硬化性胆管炎
- UCとPSCを見分けられる（腸内細菌叢より有効）



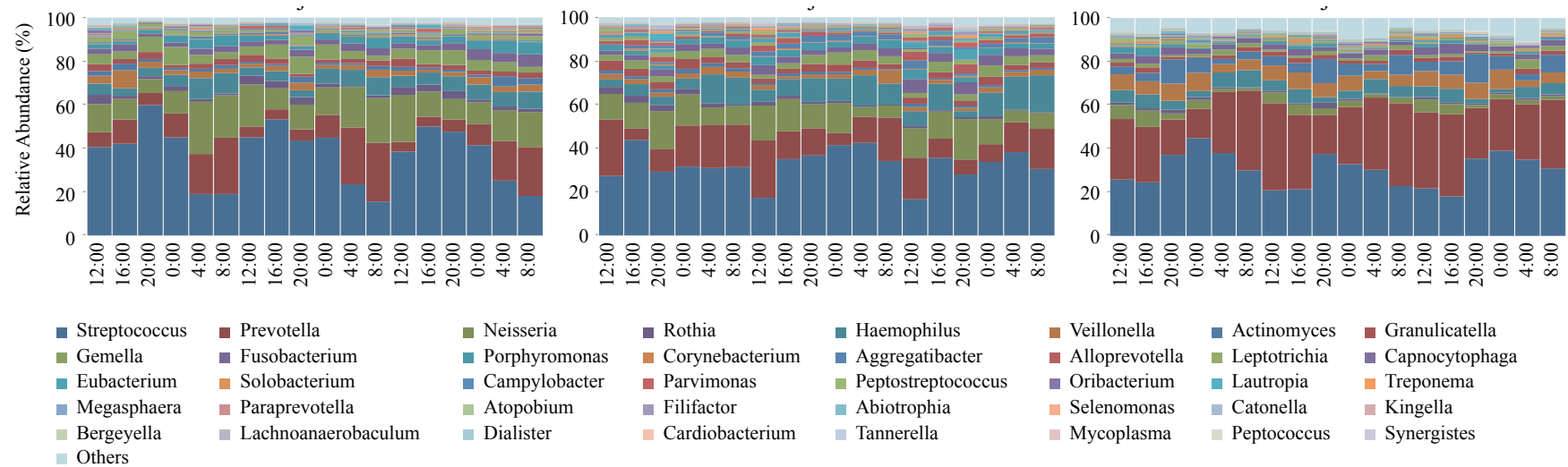
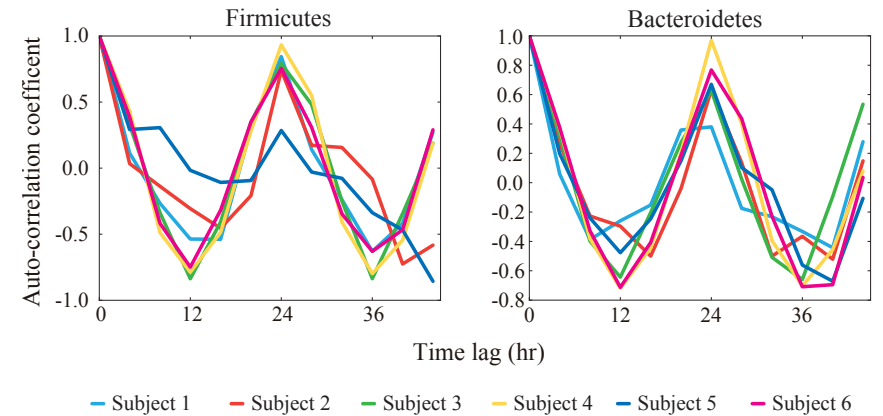
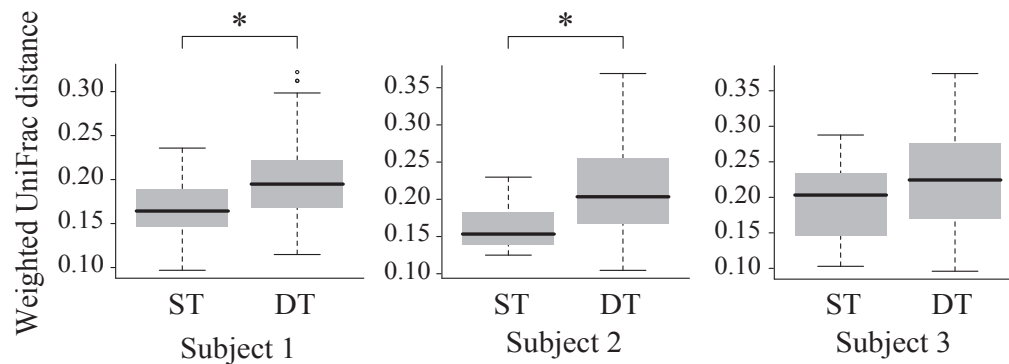
Iwasawa K, Suda W, Tsunoda T, Oikawa-Kawamoto M,
Umetsu S, Takayasu L, Inui A, Fujisawa T, Morita H, Sogo T,
Hattori M.

Sci Rep. 2018 8:5480.

Category	No. of subjects	Weighted UniFrac		
		R ²	p-value	Adjusted p-value
PSC vs. UC	PSC:24 UC:16	0.04912	0.04496	0.04496
PSC vs. HC	PSC:24 HC:24	0.04403	0.03097	0.04496
UC vs. HC	UC:16 HC:24	0.0638	0.01800	0.04496

解析例

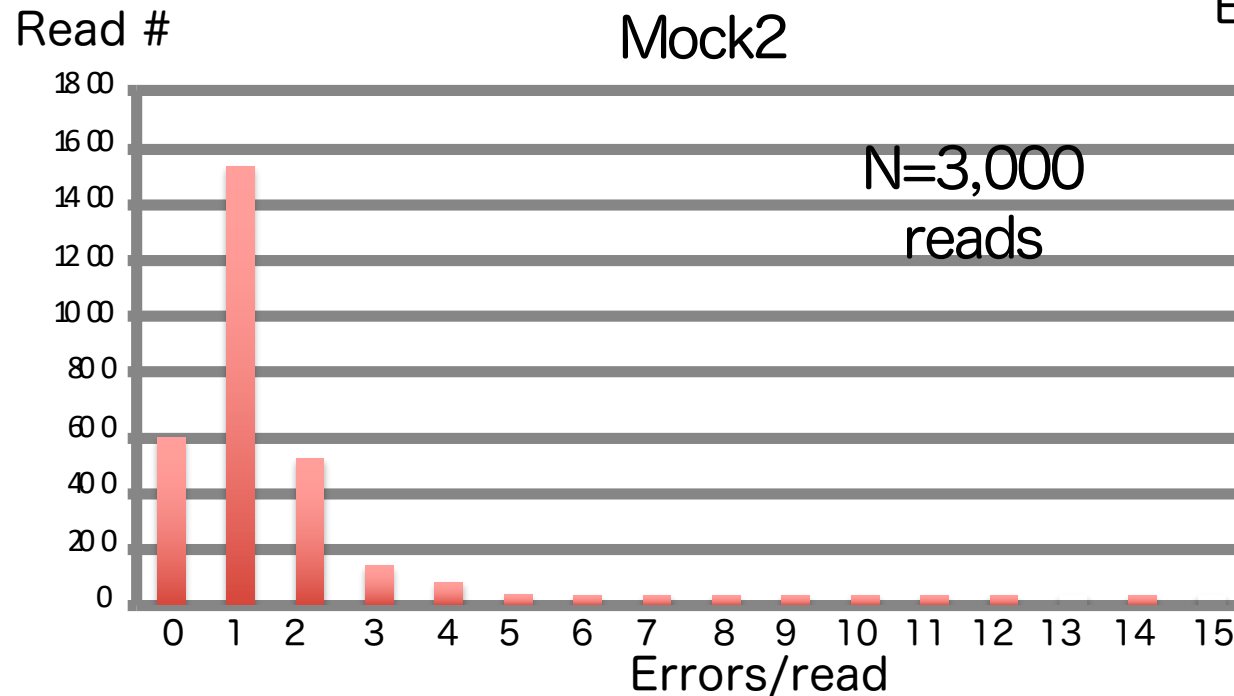
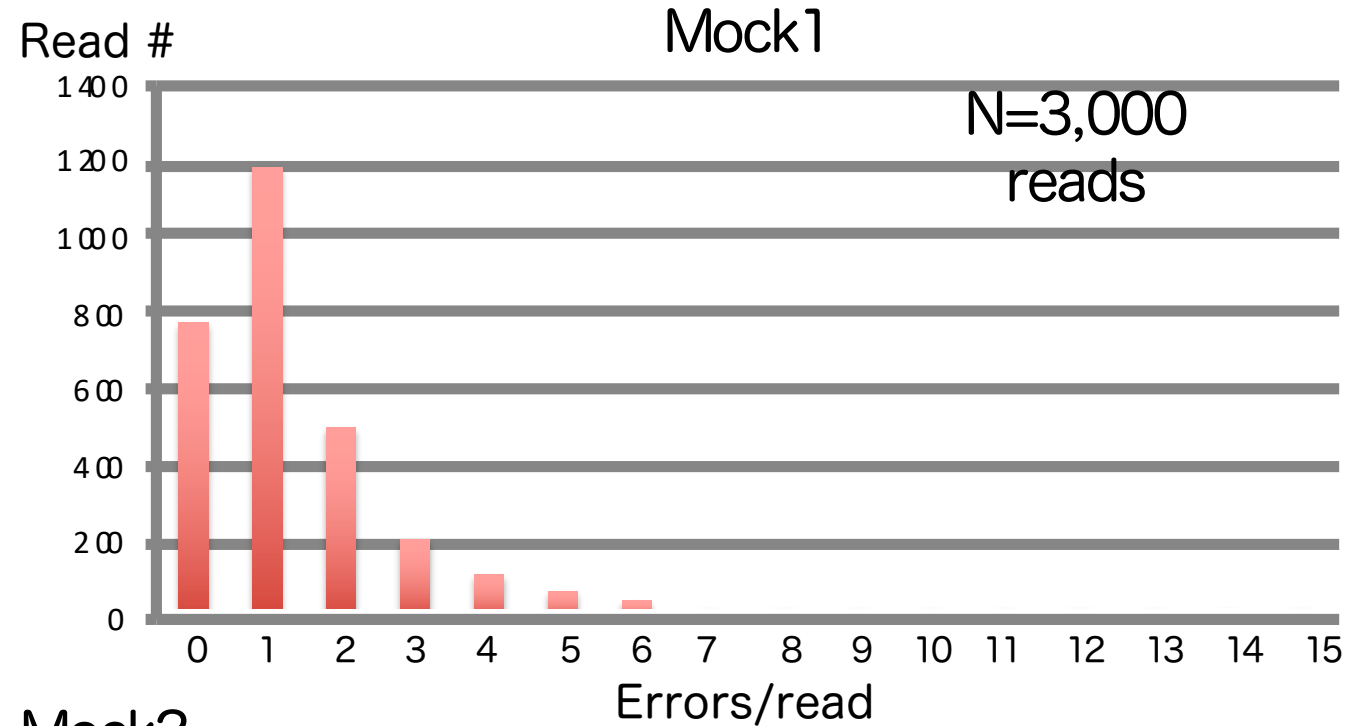
ヒト唾液細菌叢の時系列変動



唾液細菌叢は概日周期を持って変動している

NGSによる16Sアンプリコンシーケンスのエラー率

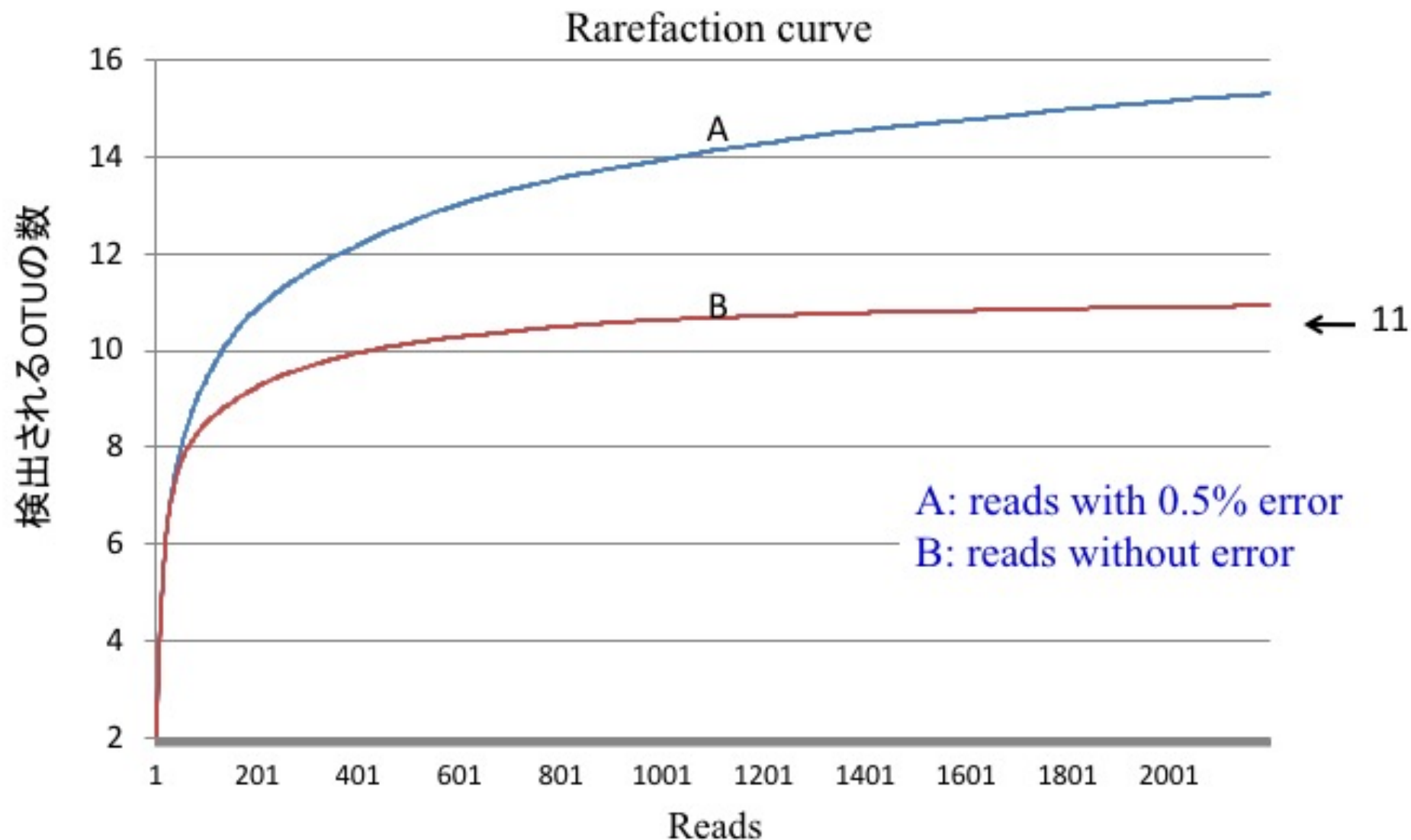
Mock:
既知細菌種~10菌種を
混合した合成細菌叢



エラー率は0.5%程度

Roche社454を用いたデータ

16S シークエンスエラーによる菌種(OTU)数のOverestimation



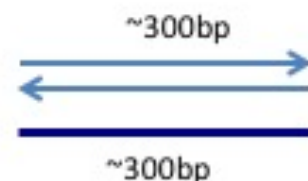
シーケンシングエラーはOTU数≒Species数を
Overestimationする原因となる

V1-V2とV1-V3のシーケンスqualityの比較 (MiSeq)

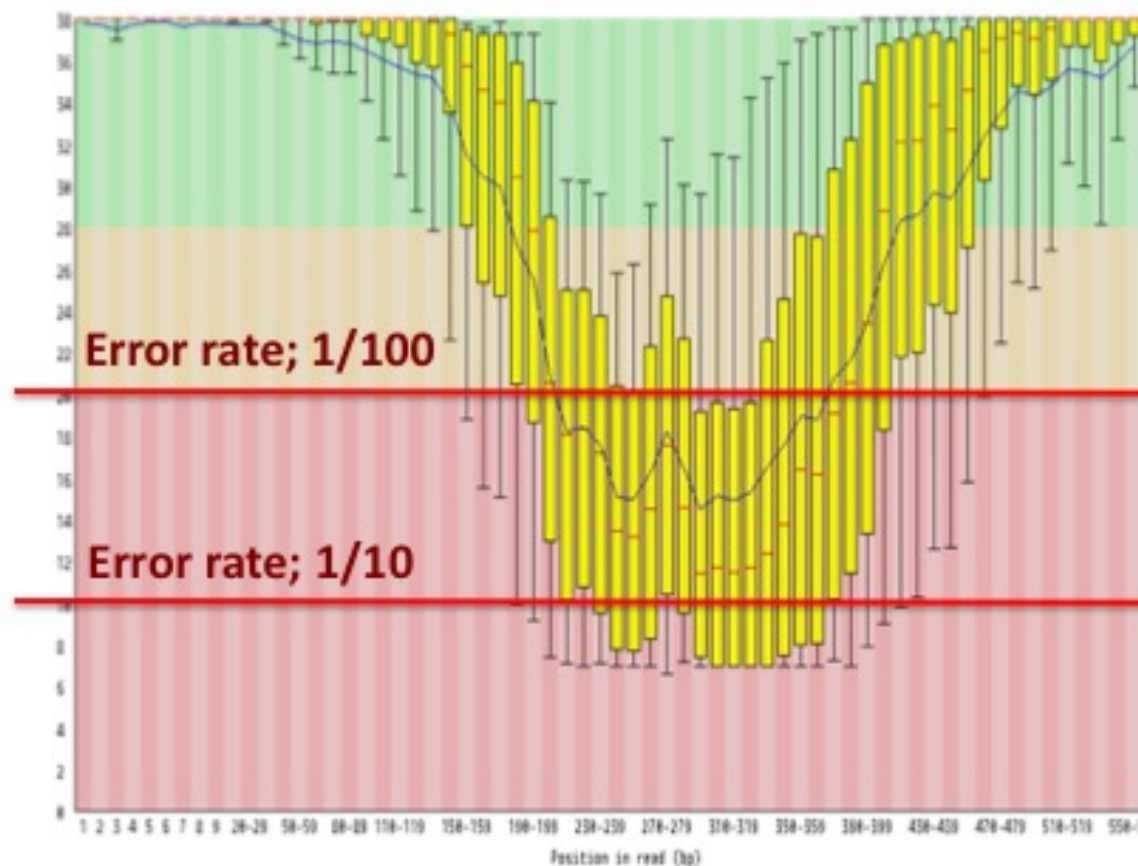
Quality valuesのリード中での分布



V1-V3 領域

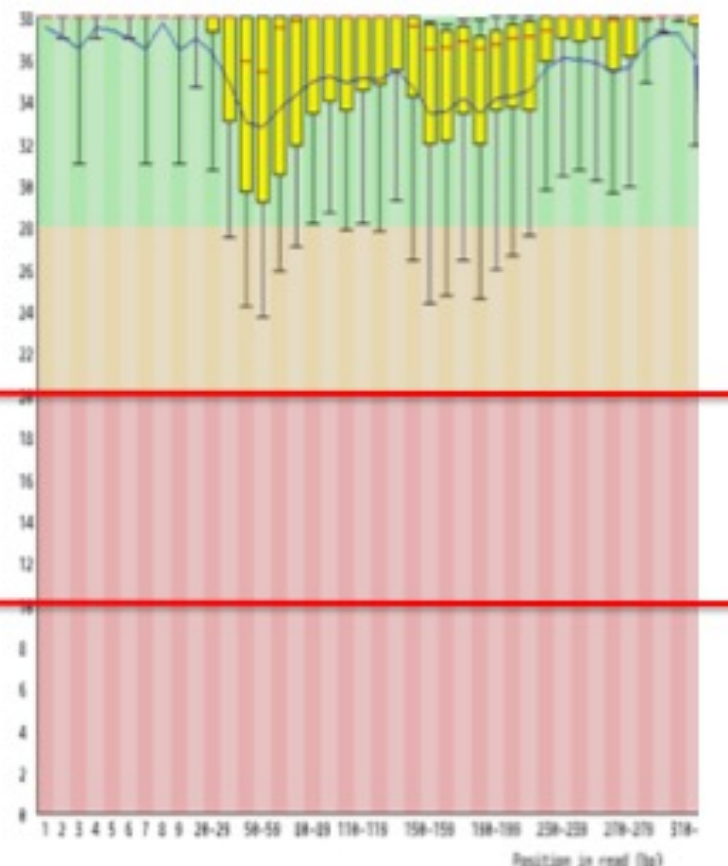


V1-V2 領域



1

510



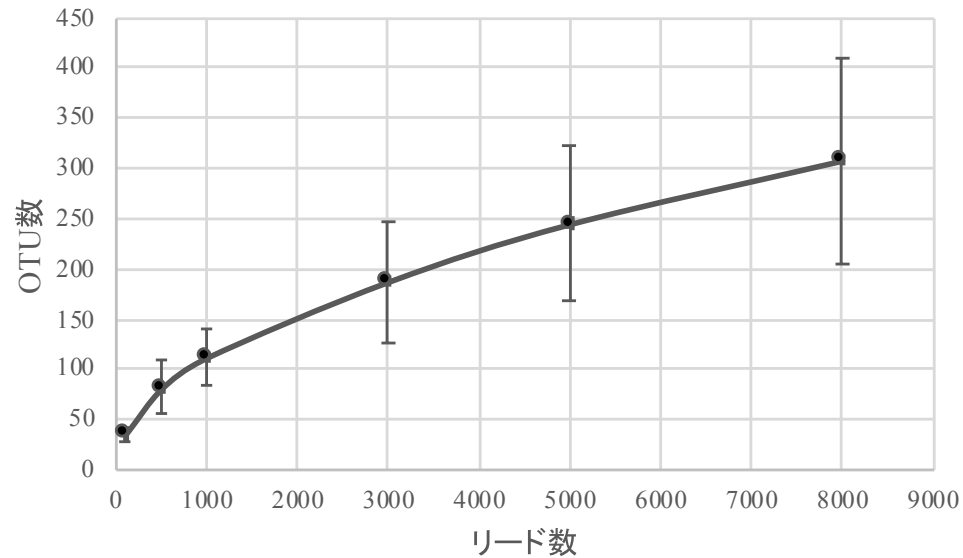
1

310

*V1-V3のリード長は長いが配列qualityが低いためblastによるspecies assignmentの精度は低くなる？

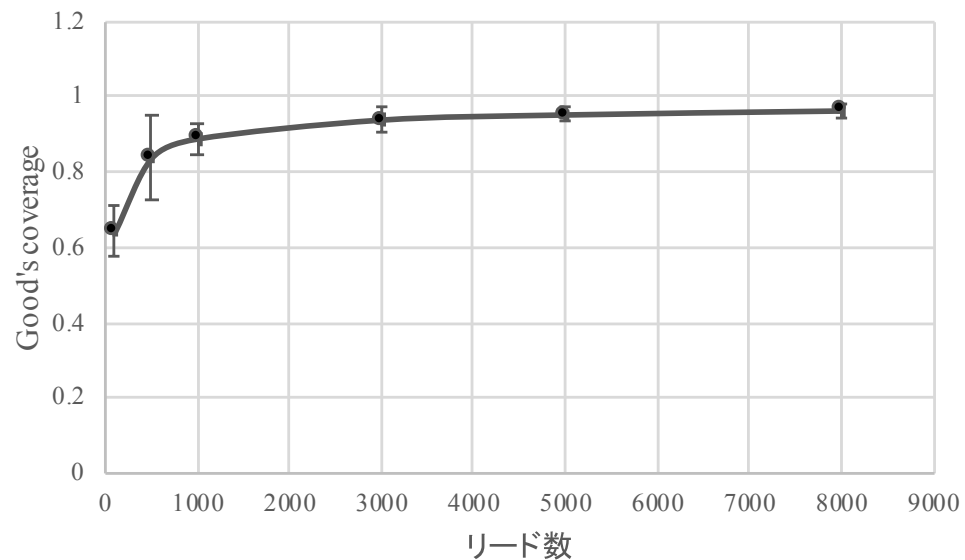
16S シークエンスエラーによる菌種(OTU)数のOverestimation

検出されるOTU数



日本人104名の腸内細菌叢の16Sデータ

Good'sのcoverage指数



Good's coverage index:

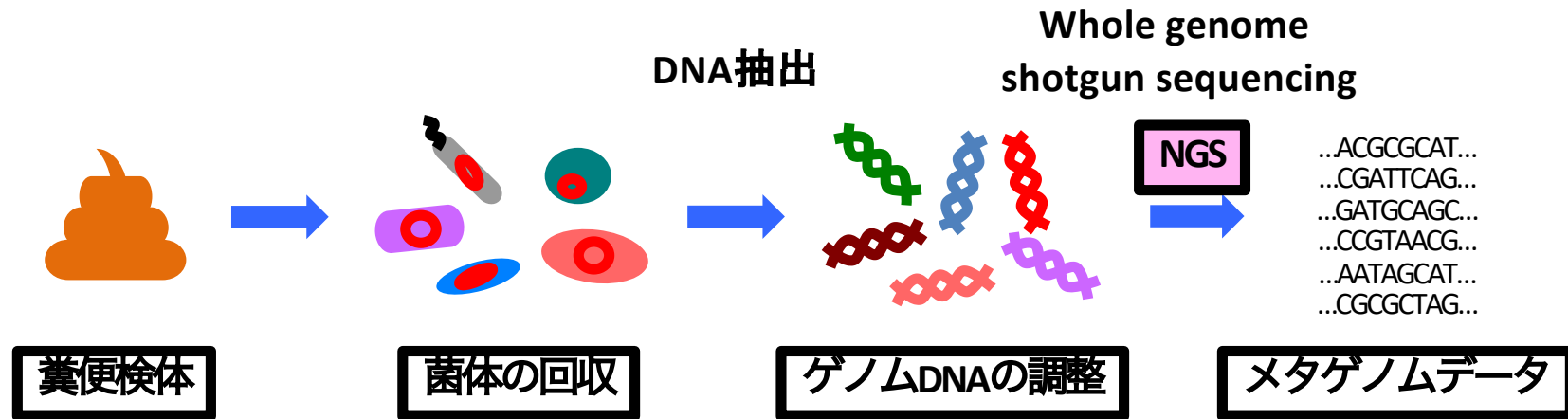
$1 - (F1 / N)$

F1 : the number of singleton OTUs

N : sum of abundances for all OTUs

メタゲノム解析

Wet 実験工程



情報解析工程

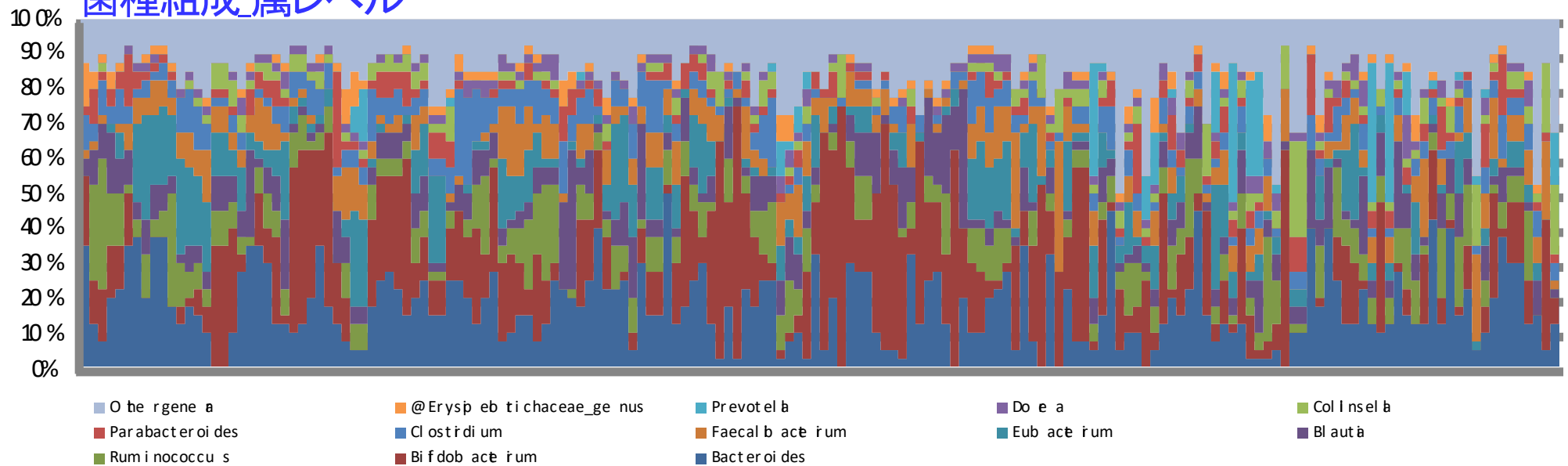


Ref genome DB (6,200 genomes; 2,373 clusters)

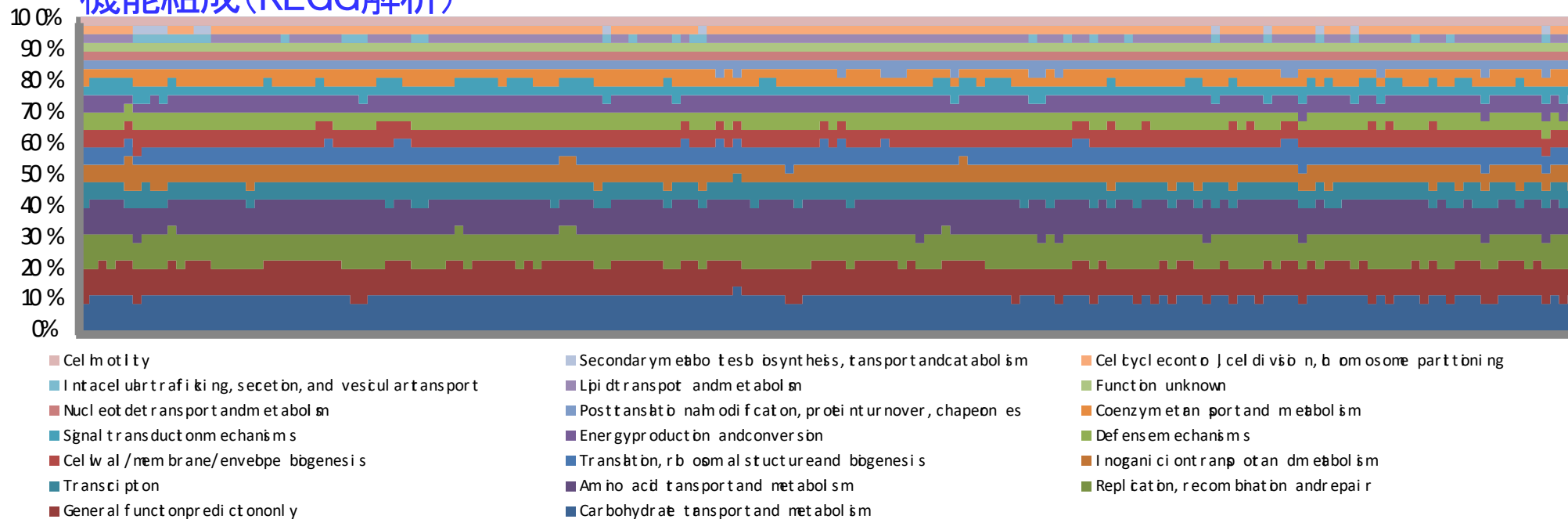
Functional gene DB (KEGG/COG)

日本人腸内細菌叢メタゲノム解析例

菌種組成_属レベル

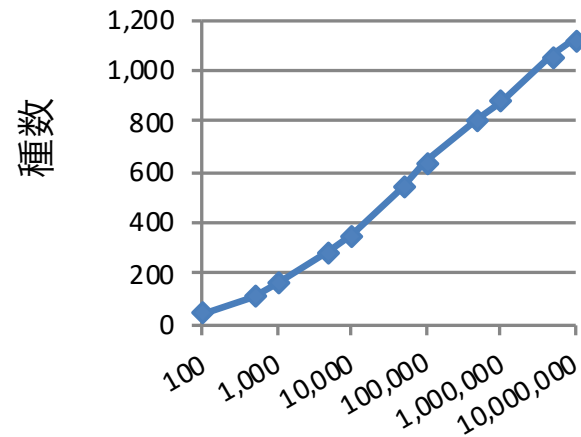


機能組成(KEGG解析)

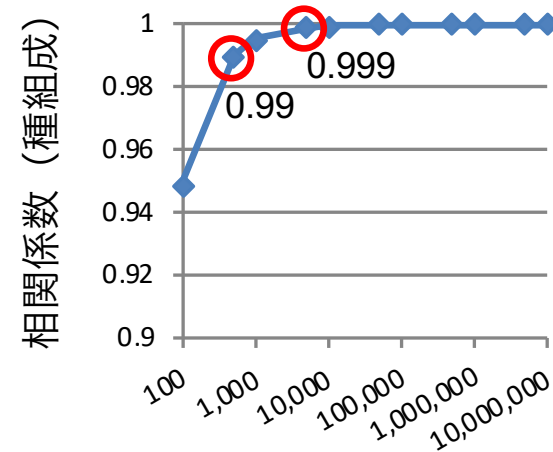


メタゲノムデータ量と菌種/機能組成との関連

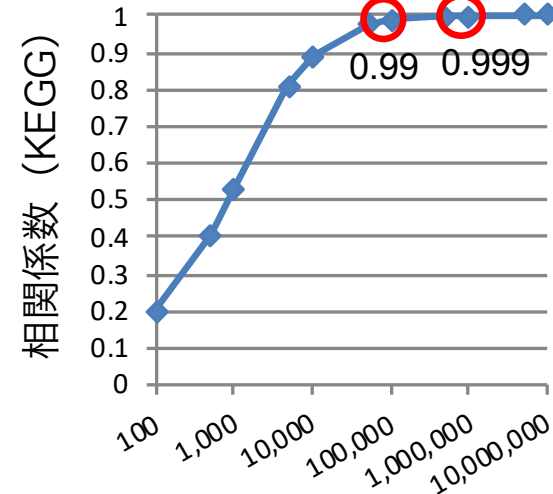
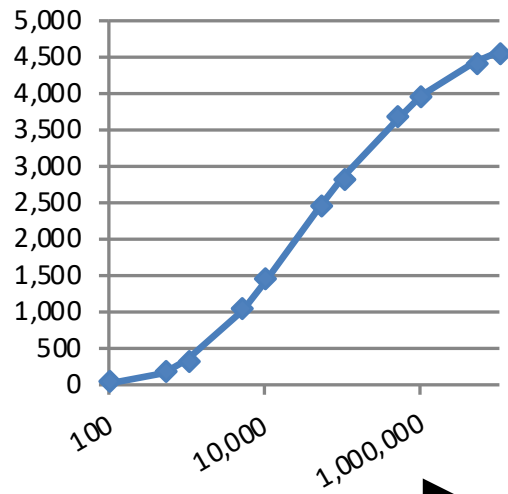
検出される菌種/遺伝子機能の数



10Mリードを基準とした相関係数 (person)



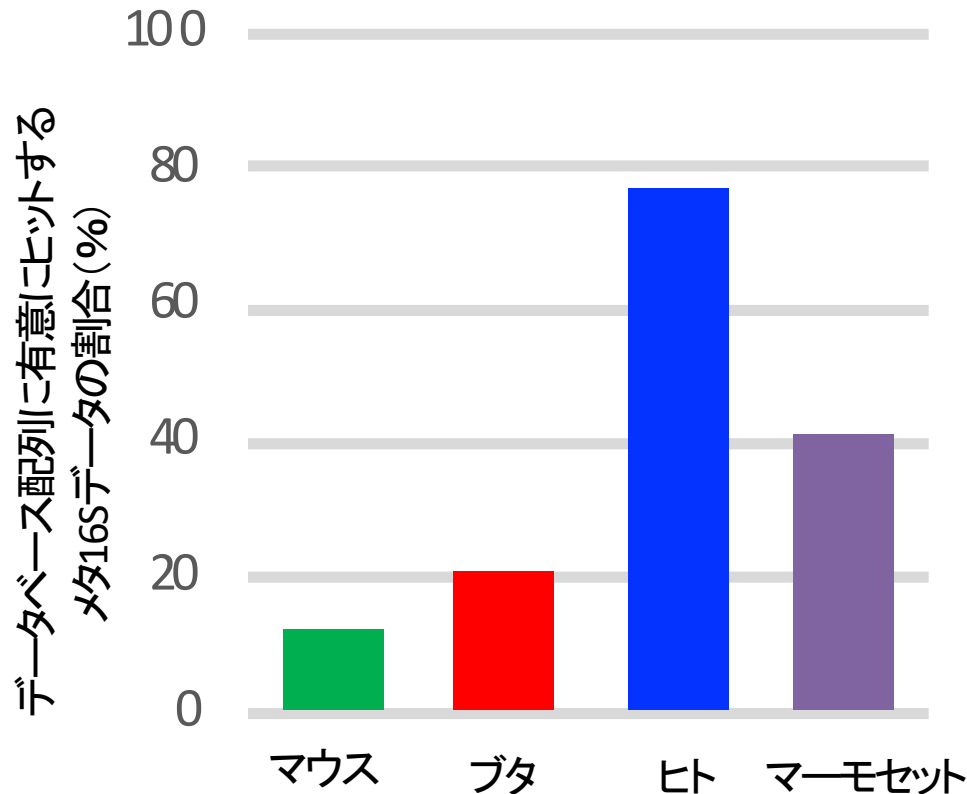
遺伝子機能数 (KEGG)



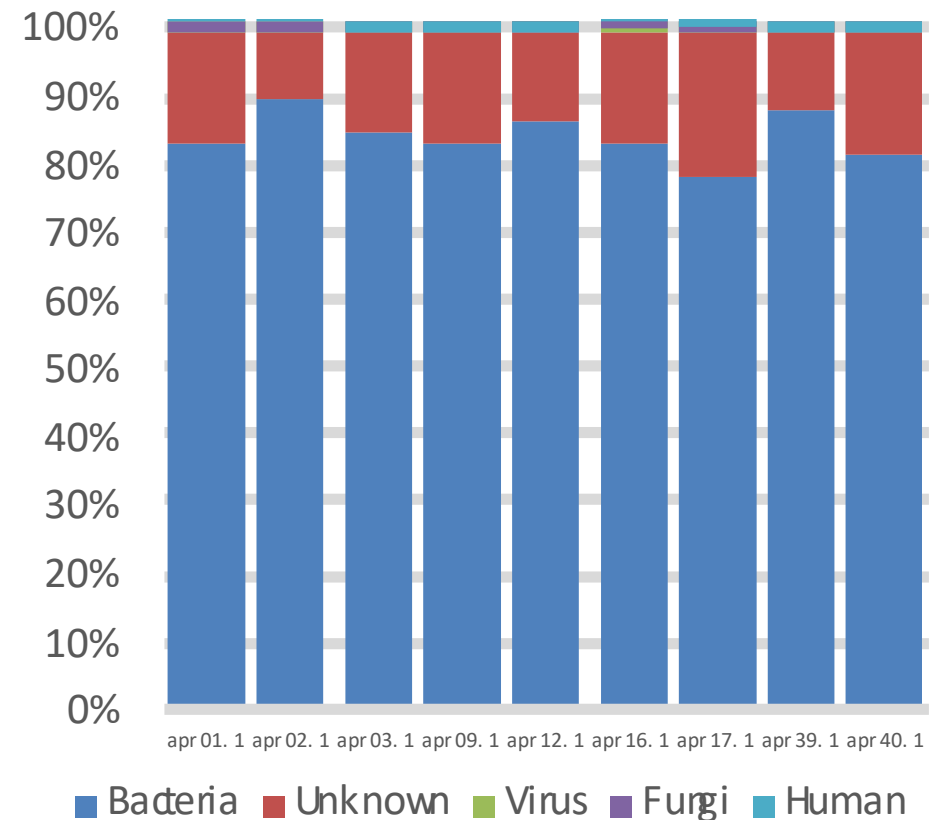
メタゲノムデータ量(リード数)

データベースの重要性

様々な動物の腸内細菌叢のメタ16S解析結果



日本人9名のメタゲノムデータの内訳



ヒト常在細菌では2007年に国際コンソーシアムであるInternational Human Microbiome Consortium (IHMC)が発足して以降、世界規模でリファレンスゲノム配列の充実を進めた。その結果、今日では、大半のデータがリファレンスデータベースにhitする

Wet プロトコルの評価

- DNA抽出手法

ビーズ破砕法、熱処理(市販Kit)、酵素溶菌法

- 糞便採取・保存法

凍結保存(-80°C)、室温、冷蔵保存(固定液*)

*糞便の固定保存液として使われる試薬

RNAlater、グアニジンチオシアネート、etc,,,

酵素法及びビーズ法のプロトコール比較

	IHMC Protocols (ビーズ法)	熱処理 (Qiagen kit)	酵素法
Beads破碎	●		
酵素反応			●
SDS	●	●	●
フェノクロ処理			●
カラム精製	●	●	
PEG処理			●

* SDSが共通⇒Gram-菌の溶菌は同程度

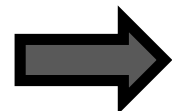
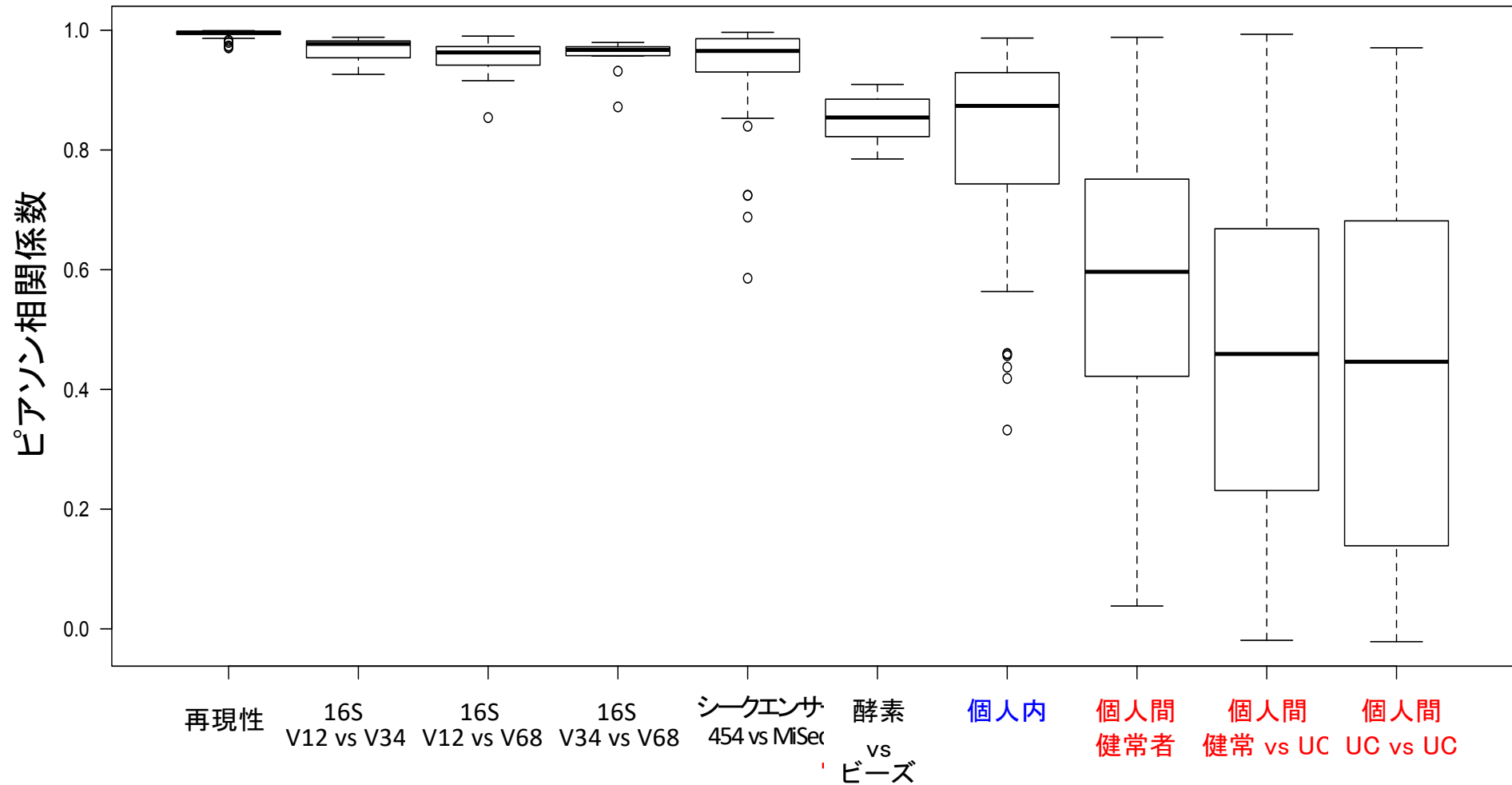
* よって、酵素とビーズ法の差はGram+菌の溶菌効率

Gram - :細胞壁が薄く容易に溶菌する

Gram + :細胞壁が厚く溶菌しにくい

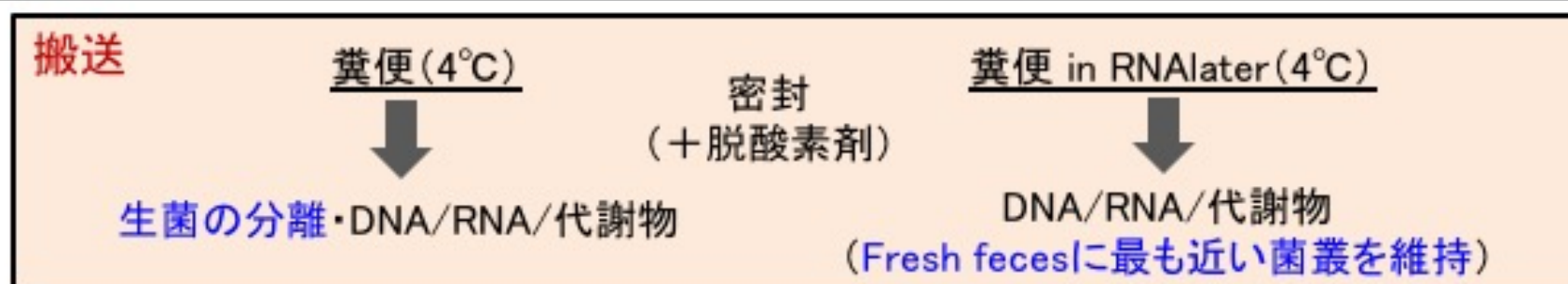
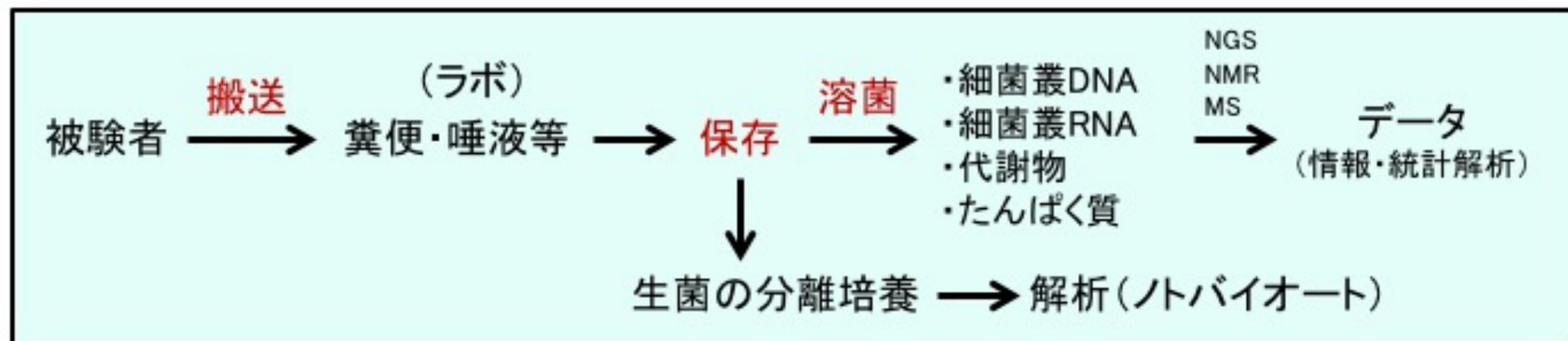
各種プロトコール間バラツキと個人内・個人間バラツキの比較

メタ16S解析



プロトコールの違いは個人間比較に影響しない

糞便等ヒト試料の搬送法・保存法・溶菌法のまとめ



保存@ラボ

糞便 → 瞬間凍結(液体窒素) →
-80°C 冷凍庫(特にPBS-グリセロール → 長期での生菌生存率大)

DNA抽出

- * **ビーズ法** → 操作簡便 → DNA断片化・低収率 → 短鎖型NGS → ~300bp/リード
- * **酵素法** → 操作煩雑 → 高分子DNA・高収率 → 短鎖型・長鎖型NGS → 10kb/リード
- * **熱処理**
Gram(+) → 溶菌しにくい
Gram(-) → 溶菌しやすい → 均一に溶菌させる必要あり

* 両溶菌法により得られるデータ間には互換性有り

サンプル採取

唾液

5mlチューブに直接口を寄せ、
唾液採取



2ml程度採取



漏れ防止のため、
ジップ付きビニル袋にいれる



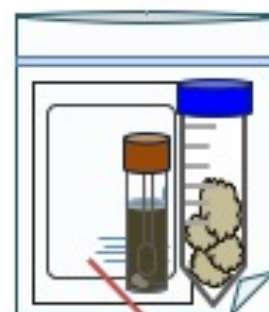
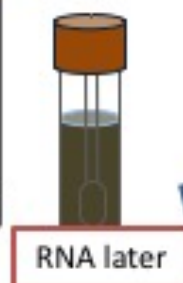
糞便



採便シート上に排便し、
RNAlater浸チューブにすりきり一杯
残りをできるだけチューブに詰める



生便はそのまま、
RNA laterは中身が均一に
なるようによく振っておく



アネロパックと共に
酸素不透過ビニル袋にいれ
きっちりとジップを締める

アネロパック

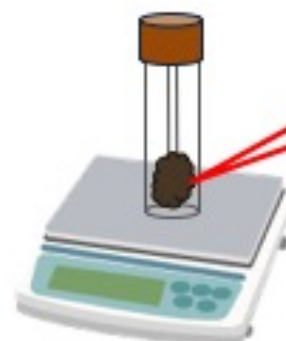
冷蔵で輸送

定量分注

唾液 500 μ l



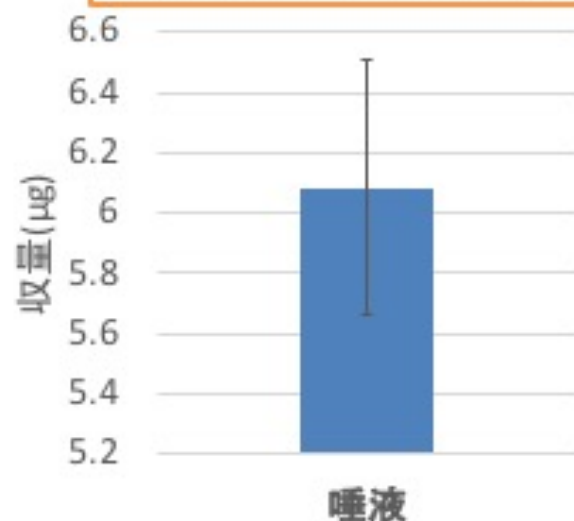
糞便 0.2g



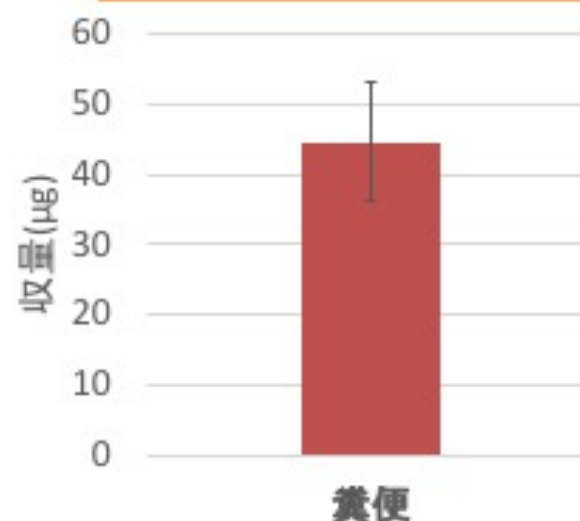
唾液: 500 μ l, 糞便: 0.2gをDNA抽出用に計り取る

DNA抽出

唾液500 μ lからの平均DNA収量



糞便0.2gからの平均DNA収量



解析に必要なDNA量: メタ16S (~ 50ng)、メタゲノム (~ 500ng)、long read メタゲノム (5 μ g)



実験医学別冊

NGSアプリケーション

今すぐ始める！ メタゲノム解析 実験プロトコール

ヒト常在細菌叢から環境メタゲノムまでサンプル調製と解析のコツ

服部正平／編

2016年12月01日発行 A4変型判 231ページ ISBN 978-4-7581-0197-4

定価：8,200円＋税

在庫：あり

 カートに入れる

□本書は電子専門書店でも購入できます

世界各国の主要な腸内細菌叢メタゲノム解析の報告

Year	Subject#	Country	NGS	Reference
2010	124	Denmark, Spain	Illumina	Qin J. et al., Nature
2012	345	China	Illumina	Qin J. et al., Nature
2013	96	Russia	SOLiD	Tyakht AV. et al., Nature Com.
	145	Sweden	Illumina	Karlsson FH. et al., Nature
2014	237	China	Illumina	Qin N. et al., Nature
	196	France, Germany	Illumina	Zeller G. et al., Mol. Sys. Biol.
2015	156	Austria	Illumina	Feng Q. et al, Nature Com.
	212	China	Illumina	Zhang X. et al., Nature Med.
	900	Israel	Illumina	Zeevi D. et al., Cell
2016	106	Japan	454, IonPGM, Illumina	Nishijima S. et al., DNA Res.
	1,179	Netherlands	Illumina	Zhernakova A. et al., Science



Short-read NGS data with ≤ 150 bp read-length

- 大きな個体間
- 国レベルでの多様性
- 疾患との関連
- 10 M以上の遺伝子

主なヒト常在細菌叢メタゲノム解析報告は
ショートリードNGS (読み取り塩基長150base以下)を用いている

ロングリードシーケンサーを用いたメタゲノム解析

- * PacBio RS II (SMRT sequencing) → 平均リード長 **~10 kb**.
- * 長いリード長を用いることでアセンブルの精度が上がり、長いコンティグが得られる
- * ヒト常在細菌叢へ応用した解析例は2例のみ

1. Leonard, M. T. *et al.* human gut microbiome in *Front. Microbiol.* **5**, 361 (2014).
2. Tsai, Y. C. *et al.* human skin microbiome in *mBio* **7**, e01948-01915 (2016).



* これらの報告では 平均リード長が **~3kb**

