

ランダム DNA バーコードを用いた血液感染症のゲノム診断技術の開発

今西 規

東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学

【研究の背景】

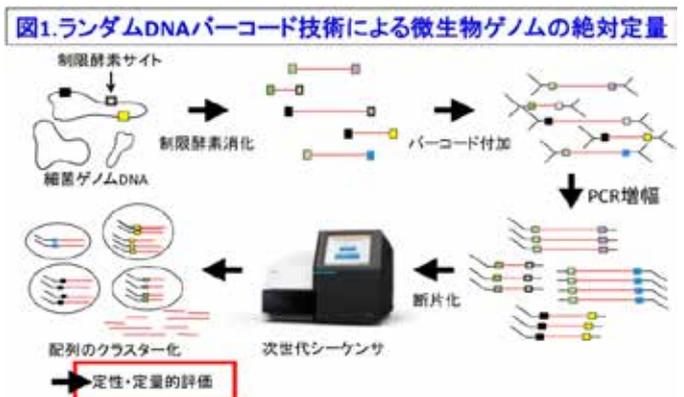
申請者は、2015 年から AMED JGRID プロジェクトの課題「迅速・正確な感染症診断を可能にする病原微生物同定システムの開発」を実施し、感染症の病原微生物のゲノム診断法の開発に取り組んでいる。これまでに、敗血症患者の血液や重症肺炎患者の胸水などの試料に対し、次世代シーケンサーを使って 16S rRNA 遺伝子配列を解析し、細菌組成を明らかにするとともに疾患原因菌の推定を行ってきた。このゲノム解析は細菌感染症の正確な診断を行う上で極めて有効であるが、一方で、(1)異なる実験の結果を比較・検討することが困難である、(2)細菌以外の微生物に適用することが困難である、などの課題があることも明らかになった。そこで、これらの問題点を克服するため、感染微生物の絶対定量を行うための新たな技術開発が必要と考えられた。

【目 的】

一般に感染症の原因菌の判定には 16S rRNA 遺伝子を対象としたゲノム解析が有効であるが、その解析方法はまだ標準化されておらず、検査間での結果の比較が困難である。最大の問題は測定の定量性が欠如していることであり、そのため病原菌と常在菌の区別すら難しいのが現状である。そこで本研究では、ランダム DNA バーコードを用いたゲノム DNA 分子の絶対定量技術を開発し、菌量を正確に測定することによって感染症診断の精度を飛躍的に高める。最終的には本技術を血液感染症の診断に応用し、その実用性を証明することをめざす。

【方 法】

ランダム DNA バーコード法は、サンプル中の DNA のコピー数を厳密に整数値で求める画期的な分子定量法である (Shiroguchi, PNAS 2012)。本方法を改良し、微生物ゲノムの絶対定量を行う。まず、プライマー相補配列、A,C,G,T がランダムな順序で並ぶ 10 から 20-mer のバーコード配列 (最大約 1 兆通り)、複数の制限酵素認識配列を持つ Y 字型アダプターをアニーリングにより作成し、複数の制限酵素で消化しておく。これを、同じ制限酵素で消化し数千 bp の断片となった微生物ゲノム DNA にライゲーションにより付加する。アダプターの持つ配列に相補的なプライマーを用いて PCR 増幅後、断片化し、次世代シーケンサーで大量の配列決定を行う。この配列データを集計し、異なるバーコードを持つ配列数を計測することで、元のサンプル中に存在したゲノム DNA の分子数を正確に求めることができる (解析の流れを図 1 に示す)。健常者および感染症患者生体試料 (敗血症血液・肺炎胸水) 中の微生物ゲノムを絶対定量し、常在菌と感染原因菌の判別を試みる。



【結 果】

(1) ランダム DNA バーコードを含む Y 字型アダプター DNA のデザイン最適化

DNA 分子の絶対定量を実現する上で、実験上の制約が 2 点ある。第一に、使用する次世代 DNA シークエンサーが 1 回の実験で出力できる配列の本数(リード数)、第二に、配列の長さ(リード長)である。本研究で使用するイルミナ社の MiSeq では得られるリード数が 5000 万本程度であるが、測定対象の微生物ゲノム DNA の分子数は、リード数よりも 1-2 桁ほど少ない数であることが必要である。そのため、測定可能な分子数はおよそ 100 万分子以下であり、これが測定限界となる。また、MiSeq で得られる配列のリード長は 300-400 塩基程度であるが、リード中の微生物ゲノム配列部分が最低でも 100 塩基以上ないと微生物の種の正確な判別が困難になる。そのため、バーコードを含む Y 字型アダプターの長さはできるだけ短くすることが必要である。以上の制約条件を考慮し、ランダム DNA バーコードの長さを 11 または 13 塩基に変更した。これは、最大で 400 万または 6400 万分子を識別できることに相当する。また、Y 字型アダプターの末端にはイルミナ社のシークエンシング用プライマー配列を組み込むことに変更した。これにより、アダプター DNA を短くすると同時に、一度の反応によって配列決定のためのライブラリ作成が可能になる。以上のように、Y 字型アダプター DNA にデザインの最適化を施した(図 2)。



(2) Y 字型アダプター DNA を使った定量実験

デザインを最適化した Y 字型アダプター DNA について、バーコード部分の長さを 11 および 13 塩基、末端の制限酵素サイトを Hind III および Mlu I に変更したものを設計し、合計 4 種類を合成した。これを使って、細菌ゲノム由来 DNA の増幅を試みた。実験は、2 種類のバクテリア由来 DNA の PCR 増幅産物を定量し、片方が 10 倍量になるように調整した混合物に対して実施した。混合物を 2 種類の制限酵素で切断し、Y 字型アダプターをライゲーションにより連結して、Y 字部分に相補的なプライマーを用いて PCR 増幅を行った。実験の各ステップについて条件検討を行い、プロトコルの最適化を行った。今後、この増幅産物に対して MiSeq による配列決定を行い、配列データの解析による分子定量を行う計画である。また、本実験と並行して配列データ解析のためのソフトウェア開発を行い、完成させた¹⁾。

【考 察】

本研究では、現在の DNA シークエンサーの性能限界を考慮しつつ、実験方法の最適化を図った。これにより、方法上の課題はほぼ克服できたと考えている。今後、さらに実験の各ステップを最適化していくことで、ランダム DNA バーコード法の完成をめざしたい。一般に分子定量法としては qPCR やデジタル PCR などの方法が広く使われているが、われわれの手法は不特定多数の細菌種を対象とした絶対定量ができる点が優れていると考えられる。今後、これらの方法による測定精度を客観的に比較することにより、ランダム DNA バーコードを使った方法の優位性を証明したい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

細菌感染症の原因菌を正確に判定するためには、次世代シークエンサーを用いた高感度のゲノム解析技術の導入が有望と考えられる。しかし、ゲノム解析では常在菌を含む多種多様な細菌が同定されるため、その中から疾患の原因菌を特定することが必要である。実際にわれわれが解析した敗血症患者の血液試料の場合でも、培養検査で特定された原因菌だけでなく、さまざまな常在菌が検出された。われわれが開発しているランダム DNA バーコード法は細菌由来 DNA の絶対定量法であり、この技術が確立されれば、細菌感染症の診断精度の向上につながると期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Ogawa T, Kryukov K, Imanishi T, and Shiroguchi K (2017) The efficacy and further functional advantages of random-base molecular barcodes for absolute and digital quantification of nucleic acid molecules. *Scientific Reports* 7: 13576.
- 2) Mitsuhashi S, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Shiraishi Y, Asano K, and Imanishi T (2017) A portable system for metagenomic analyses using nanopore-based sequencer and laptop computers can realize rapid on-site determination of bacterial compositions. *Scientific Reports* 7: 5657.