

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19558

研究課題名（和文）in situゲノム解析法の方法論構築

研究課題名（英文）Development of methodology for in situ genomic analysis

研究代表者

飯田 哲也（Tetsuya, Iida）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：90221746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、電子顕微鏡により観察される微生物の遺伝情報を獲得するための方法論を構築することを目的とした。具体的には、微生物様構造の存在を確認した電子顕微鏡観察用の超薄切片から核酸を抽出し、そのドラフトゲノム配列を決定するまでのプロトコルの開発を目指した。本研究によりin situゲノム解析法の方法論構築という目標の各段階をおおよそ達成することができた。今後は本研究で構築された方法論を用いて、さまざまな環境由来試料および臨床由来試料を検討していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、電子顕微鏡による細胞構造解析と次世代シーケンサーによるゲノム解析を同時に行う新たな方法論「in situゲノム解析法」を構築し、これまでアプローチの難しかった微生物の遺伝情報の入手を行うものである。本研究の成果により、これまで知られていなかったさまざまな生物が見出される可能性があり、生物学、特に分類学や生物多様性の分野に大きなインパクトを与えるとともに、これまで病原的意義が不明であった微生物の実体や性状が明らかになり、医学や獣医学の領域への大きな貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish a methodology for obtaining genetic information of microorganisms observed by electron microscopy. Specifically, we aimed to develop a protocol for extracting nucleic acids from ultrathin sections for electron microscope observation that confirmed the presence of microbial-like structures and determining their draft genome sequences. Through this research, we were mostly able to achieve each step of the goal of methodological construction of in situ genomic analysis method. We are planning to analyze various environmental and clinical samples using the methodology constructed in this study.

研究分野：細菌学

キーワード：微生物ゲノム メタゲノム 生物多様性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

深海を含む地球環境には、いまだ同定されていない微生物が無数存在している。また、ヒト臨床検体において、形態学的には微生物らしきものが組織中に観察されるが培養や核酸の検出ができず正体が不明なケースがある。

2012年に研究協力者の山口らは、伊豆諸島の深海から得たサンプルを電子顕微鏡観察することにより、原核生物と真核生物の中間の細胞構造をもった微生物様構造を発見し、「パラカリオン・ミョウジネンシス」と命名した(J Electron Microsc 61:423-431,2012)。この微生物様構造の発見は、原核生物から真核生物への進化の謎を解く重要な知見と考えられる。また、同様の深海調査により、形態学的に新規生物と考えられる数多くの微生物様構造を見出している(JSM Mycotoxins 65:81-99,2015)。このような発見は、山口が長年の経験により培ってきた凍結置換/連続超薄切片法(70nm 毎の連続超薄切片の作製が可能)という職人技なしにはありえなかった。しかしながら、これら微生物様構造のリボソーム DNA の塩基配列はわかっておらず、それらの進化的位置は不明のままであった。この点について明らかにするためには、電子顕微鏡で観察した個体そのものの核酸を解析する新規技術が不可欠である。

飯田はこれまでに腸炎ピブリオのゲノム解析(Lancet 361:743-749,2003)をはじめ多くの微生物ゲノム解析を行ってきたのに加え、さまざまなメタゲノム解析(Emerg Infect Dis 14:1784-1786,2008, ISME J 8:52-62,2014,Nat Commun 5:3704,2014, Nature 532:117-121,2016, 他)にも取り組んできている。本研究で飯田と山口のこれまでの経験、技術、知識を駆使することにより、これまでアプローチの難しかった微生物の遺伝情報の入手が可能となり、生物学に新たな展開がもたらされることが期待でき、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

深海を含む地球環境には、いまだ同定されていない微生物が無数存在している。また、ヒト臨床検体において、形態学的には微生物らしきものが組織中に観察されるが培養や核酸の検出ができず正体が不明なケースがある。本研究では、電子顕微鏡により観察される微生物の遺伝情報を獲得するための方法論を構築することを目的とした。具体的には、微生物様構造の存在を確認した電子顕微鏡観察用の超薄切片から核酸を抽出し、そのドラフトゲノム配列を決定するまでのプロトコールの開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 電子顕微鏡観察用包埋樹脂からの微生物ゲノム回収法の確立

まず、電子顕微鏡観察用に微生物を包埋した樹脂からの、微生物ゲノム回収のための条件検討を酵母をモデル生物として行った。通常、透過型電子顕微鏡による観察にはサンプルをオスミウムアセトン液等で固定するが、微生物核酸(DNA および RNA)への影響を考慮し、エタノール、メタノール、アセトン等での固定を試み、核酸回収効率を調べ最適な方法を検討した。また通常、透過型電子顕微鏡による観察のための包埋にはエポキシ樹脂が用いられることが多いが、エポキシ樹脂を用いて包埋した場合、その後の可溶化が困難である。そこでかわりにアセトンでの可溶化が可能なアクリル樹脂を用いた包埋を行った。これらの方法により得た酵母包埋樹脂からの微生物核酸の抽出条件を、化学的手法(アセトン処理等)および物理的手法(包埋樹脂の物理的破壊等)を用いて最適条件を検討した。回収効率の検討は、酵母の ITS(internal transcribed spacer)領域および rRNA 遺伝子領域に対する定量 PCR により行った。

回収される微生物核酸は微量であることが想定されたので、ドラフトゲノム解析にまでもっていくためには、回収核酸の増幅が必要である。これまで飯田らがゲノム解析において行って来たいくつかの全ゲノム増幅法を検討することにより、回収核酸を次世代シーケンス解析にまでもっていくために最適な増幅法を検討した。

超薄切片からの微生物核酸の回収方法について検討を行った。本研究では電子顕微鏡観察用の包埋樹脂から連続超薄切片を作成し、互いに隣接した一方の切片を用いて電子顕微鏡で微生物構造の存在を確認し、もう一方の切片から微生物核酸の抽出を試みた。連続超薄切片の作製は、山口のもつ高度な切片作製技術であり、これにより電子顕微鏡で観察している細胞そのものからの核酸の回収を試みた。

#### (2) 環境由来およびヒト臨床由来試料を用いた微生物ゲノム解析法の検討

上記により検討した微生物ゲノム回収法を、環境由来およびヒト臨床由来試料に応用することで、本法の有効性について検討した。

### 4. 研究成果

(1) 電子顕微鏡観察用に微生物を包埋した樹脂からの微生物ゲノム回収のための条件検討を、まず酵母をモデル生物として行った。通常、透過型電子顕微鏡による観察にはサンプルをオスミウムアセトン液等で固定するが、微生物核酸への影響を考慮し、エタノール、アセトン等での固定を試み、核酸回収効率を検討し最適な方法を決定した。回収効率の検討は、酵母の ITS 領域および rRNA 遺伝子領域に対する定量 PCR により行った。いくつかの全ゲノム増幅法を検討することにより、回収核酸を次世代シーケンス解析にまでもっていくために最適なゲノム増幅法を決定した。また、超薄切片からの微生物核酸の回収方法について検討を行った。以上により、酵母をモデル生物として用い、電子顕微鏡観察用に微生物を包埋した樹脂からの微生物ゲノムの回収について、ほぼ条件を確定できた。また全ゲノム増幅法のプロトコールも決定した。

(2)(1)で検討された微生物ゲノム回収法を環境由来およびヒト臨床由来試料に用いることで、本法の有効性について検討した。その結果、モデル生物としての酵母に加え、環境から採集した微生物およびヒト臨床検体由来検体からの微生物ゲノム回収について知見を得ることができた。ゲノム増幅に関しては、増幅を行うことにより非特異な配列の増幅がみられたものの、ドラフトゲノムを得ることが可能であった。以上のように、本研究により *in situ* ゲノム解析法の方法論構築という目標の各段階をおおよそ達成することができた。ただし、当初の計画であった海洋由来試料の解析については、平成 29 年度に海洋由来試料の入手はでき検討を開始したが、入手できた試料が少量であり、十分な検討を完了する前に試料を使い切ってしまうゲノム解析を行うに至らなかった。さらなる検討には追加の試料の入手が必要であったが、本研究期間中に新たな試料の入手に至らなかった。これについては本研究において達成できなかった点であり、今後、継続研究が必要である。

今後は本研究で構築された方法論を用いて、さまざまな環境由来試料および臨床由来試料を検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshizawa H, Motooka D, Katada R, Matsumoto Y, Nakamura S, Morii E, Iida T, Matsumoto H	4. 巻 5
2. 論文標題 Whole-Genome Sequence of Streptococcus tigurinus Strain osk_001, Isolated from Postmortem Material.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genome Announc	6. 最初と最後の頁 e00878-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/genomeA.00878-17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizawa H, Motooka D, Matsumoto Y, Katada R, Nakamura S, Morii E, Iida T, Matsumoto H	4. 巻 68
2. 論文標題 A case of severe soft tissue infection due to Streptococcus tigurinus diagnosed by necropsy in which genomic analysis was useful for clarifying its pathogenicity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 301-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12656. Epub 2018 Mar 23.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Y, Kinjo T, Motooka D, Nabeya D, Jung N, Uechi K, Horii T, Iida T, Fujita J, Nakamura S	4. 巻 8
2. 論文標題 Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Emerg Microbes Infect	6. 最初と最後の頁 1043-1053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/22221751.2019.1637702.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯田哲也
2. 発表標題 ゲノミクス・メタゲノミクスを用いた微生物研究
3. 学会等名 第29回微生物シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田哲也
2. 発表標題 ゲノミクス・メタゲノミクスを用いた微生物研究
3. 学会等名 第50回レンサ球菌研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田哲也
2. 発表標題 ゲノミクス・メタゲノミクスからのアプローチ
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 飯田哲也（分担）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 624
3. 書名 ヒトマイクロバイオーム Vol.2	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山口 正視  (Yamaguchi Masashi)		