

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670200

研究課題名(和文) 寄生体ゲノム情報獲得に向けたサブトラクションシーケンス法の開発

研究課題名(英文) Development of a Subtraction Sequencing method for obtaining genomic information of parasites

研究代表者

松崎 素道 (Matsuzaki, Motomichi)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00511396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は寄生性原虫のゲノム情報を効率的に取得できるサブトラクションシーケンス法を開発することを目的とした。ゲノム配列既知の大腸菌および出芽酵母を用い、大腸菌DNAを非感染宿主由来DNA、これに少量の出芽酵母DNAを混ぜた物を感染宿主由来DNAのモデルとした。具体的には、後者のライブラリにビオチン化した前者のライブラリをハイブリダイズさせ、ストレプトアビジン磁気ビーズで大腸菌DNAを除去することで濃縮された出芽酵母DNAを得た。出芽酵母DNAの濃縮は定量PCRにより確認した。原理的な実現性は実証できたと考えるが、実用化のための技術的検証を進めていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：The objective of the present study was to develop a subtraction sequencing method for obtaining genomic information of unicellular parasites. *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* DNAs were used as models for a host and parasite genome, respectively. The latter DNA was concentrated by subtracting the former DNA from the DNA mixture with biotinated *E. coli* library and streptavidin magnetic beads. The concentration was verified with quantitative PCR. Now this method is proven as feasible, but further elaboration will be required for practical use.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：ゲノム 超並列シーケンシング

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者の研究経緯

研究代表者はこれまでヴァージニアガキに感染する寄生性原虫パーキンサス (*Perkinsus marinus*) を用い、進化学的な観点から共生由来オルガネラである色素体およびミトコンドリアの研究を進めてきた。その結果パーキンサスには独自の DNA を完全に失った色素体 (Matsuzaki et al. 2008 Mol Biol Evol) と、異常なまでに高頻度のフレームシフトを要求するミトコンドリア (Masuda et al. 2010 Nucleic Acids Res) が存在しており、いずれもオルガネラ DNA の存在意義もしくは生存戦略を明らかにするのに好適な材料であることを示してきた。これらがどのような経緯により進化してきたのかを明らかにするためには、パーキンサスだけでなく近縁な生物との比較解析が必要である。

Perkinsus qugwadi は、日本から種苗として持ち込まれたホタテに大量斃死を引き起こす病原体として、1990年代にカナダ・ブリティッシュコロンビア州で見出された (Blackburn et al. 1998 Can J Zool)。今のところ本邦からは見出されていないが、万一移入すると養殖産業に甚大な被害を引き起こす恐れがあるとして警戒される種である。他の *Perkinsus* 属原虫と感染様式や微細構造が類似しているが、分子系統解析では最も祖先的な位置から分岐し、*Perkinsus* 属の検出法として用いられている嫌気培養後のルゴール染色に陰性であるなど生理が大きく異なっており、*Perkinsus* 属が嫌気条件へ適応する過程を知る上できわめて興味深い種だといえる。オルガネラ DNA について言えば、この種に色素体 DNA が存在するのか、ミトコンドリア遺伝子はフレームシフトを要求するのかを知る必要がある。

超並列シーケンシング技術の低廉化により、非モデル生物のそれぞれに特徴的な生物現象を遺伝子レベルで追究することが可能になりつつある。*P. qugwadi* についても前述の数々の興味に対する回答を得るためにゲノム情報の解読が望まれるが、現状では *P. qugwadi* の培養系は報告がなく、かつての蔓延地において発病抵抗性ホタテが普及したことから感染宿主からの大量調製は非現実的である。この問題は、次のように寄生性生物に一般化して考えることができる。

(2) 一般化した学術的背景

地球上には多種多様の寄生性生物が存在しているが、具体的な研究の俎上にある寄生性生物は医学・獣医学的関心の対象となる生物を中心にごく一部に留まっている。生命科学が飛躍的な進歩を遂げた現在でも、寄生性生物は一般に維持培養が困難であり、また宿主によく適応した病原性の低い種では感染

密度も高くないことから、生化学的・分子生物学的な研究手法に馴染みにくい。こうしたことから、寄生現象の詳細なメカニズムの解明は立ち後れているのが現状である。

近年低廉化著しい超並列シーケンシング技術により、寄生性生物のゲノム情報を解読しそれを手がかりに各々特徴的な生物現象に迫ることが可能になっていることは光明と言えるだろう。しかしとりわけ寄生性原虫の場合には、それに必要な DNA 試料の獲得自体が困難である。現在ではたとえ 1 細胞からでも全ゲノム増幅を経てゲノム情報を獲得することができるようになっているが、一般に寄生性原虫のゲノムサイズは 100 Mbp に満たず、わずかに宿主細胞 (ゲノムサイズ 1 Gbp を超える場合も多い) が混入するだけでも、得られる配列情報の大部分が宿主に由来することになるためである。このように、寄生性生物のゲノム情報を得るためには、相対的大量に存在する宿主 DNA の影響を抑え込む工夫が求められる。

すでに確立された手法としては、セルソーター、光ピンセット、顕微操作などによって寄生体細胞のみを集めることができるが、これは生鮮試料が充分入手できる場合に限られる。また組織ブロックからレーザーマイクロダイセクションで寄生体細胞のみを切り出すことも可能だが、必要量を集めるのに労力を要するにも関わらず宿主細胞の混入を排除することが難しい。いずれの方法も、高額な機器と熟練を必要とし、普遍的に利用可能とはいいがたい。

したがって、特別な機器を必要とせず、容易に入手可能な試料を用いて寄生性生物のゲノム情報を効率的に得る、普遍的に利用可能な手法は未だにない。これを満たす手法を開発することができれば、地球上に数多ある寄生現象を理解する上で極めて強力なツールになると考えられる。

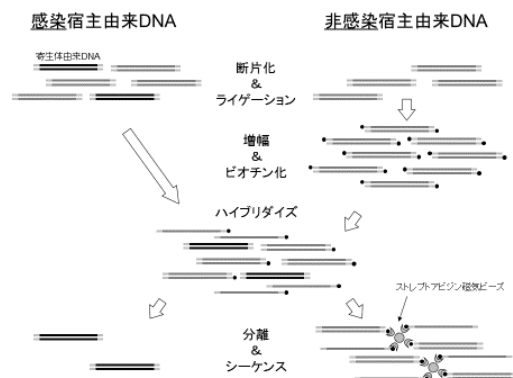
2. 研究の目的

本研究では培養や単離精製が困難な寄生性生物のゲノム情報を効率的に取得するために、感染宿主由来 DNA から非感染宿主由来 DNA を差し引き、その差分を超並列シーケンシングに供するサブトラクションシーケンシング法を開発することを目的とした。

これが実現すれば、感染個体と非感染個体、感染組織と非感染組織、宿主の混入した寄生体試料と純粋な宿主試料、といった準備が比較的容易な試料を用いて、寄生体のゲノム情報を獲得することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究で開発したサブトラクションシーケンス法は、従来用いられてきたサブトラクション cDNA ライブラリ調製法を応用したものである。すなわち、ビオチンを付加した非感染宿主由来ライブラリを感染宿主由来ライブラリとハイブリダイズさせ、ストレプトアビジン磁気ビーズにより共通部分を取り除くことで寄生体由来の DNA 断片のみを超並列シーケンシングに供する（下図）。



本研究では、ゲノム配列既知である出芽酵母 DNA を寄生体ゲノム、大腸菌 DNA を宿主ゲノムのモデルとして用い、サブトラクションの成否を定量 PCR で評価することで原理の検証を行った。具体的には以下の通り実施した。

(1) 定量 PCR 用標準試料の調製

出芽酵母と大腸菌のそれぞれで、ゲノム中にシングルコピー存在し定量 PCR に用いられた実績のある遺伝子（大腸菌: dxs, Lee et al. 2008 Appl Microbiol Biotechnol; 出芽酵母: rps3, Wilhelm et al. 2003 Nucleic Acids Res）をプラスミドにクローニングして標準試料とした。

(2) ライブラリの調製

大腸菌 (*Escherichia coli* W3110 株) DNA に出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* S288C 株) DNA を 1% 添加した試料を感染宿主由来 DNA とみなして超並列シーケンサー Ion PGM (Life Technologies 社) 用のライブラリ (ターゲットライブラリ) を通常通り調製した。

一方、出芽酵母 DNA を添加しない大腸菌 DNA を非感染宿主由来 DNA とみなし、New England Biolabs 社が Illumina 社システム用に提供しているキット (NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set) を用いてサブトラクタライブラリを調製した。サブトラクタライブラリのインサート長はハイブリダイズ条件と密接な関係があり、過去の研究を参考におよそ 100 bp とした。このキ

ットで用いられているアダプタ配列と、Ion PGM 用のアダプタ配列は互換性がなく、超並列シーケンシングの結果には影響しないと考えられる。このとき最終段階の PCR にビオチン修飾プライマーを用いることで、サブトラクタライブラリのビオチン化を行った。

(3) サブトラクションの実施

ターゲットライブラリ 0.5 μ g に対し、非特異的な吸着を防止するブロッキング用 DNA として Human Cot-1 DNA およびライブラリ調製に用いたアダプタ配列を過剰量加えて加熱変性した後、ビオチン化したサブトラクタライブラリを一定量加えて一晩 47 $^{\circ}$ C に置いてハイブリダイズさせた。液温を 47 $^{\circ}$ C に保ったままストレプトアビジン磁気ビーズを充分量加えたのち、磁石を用いてビオチン化サブトラクタライブラリを除去した。上清にはブロッキング用に加えたアダプタ配列が多量に含まれているので、サイズ分画によりこれを除き、PCR によって差し引きされた寄生体 DNA 由来ライブラリを増幅した。

4. 研究成果

定量 PCR によって、目的とする寄生体 DNA 由来ライブラリ (実際には出芽酵母由来) が数倍程度濃縮されていることを確認した。今回得られた程度の濃縮では、超並列シーケンシングによって得られる配列情報の大部分は依然として宿主由来 DNA となることが予想されるが、この実験操作を繰り返すことでさらに濃縮度を上げることが可能だと考えられる。またサブトラクションのストリンジェンシーを引き続き最適化することで、より高い濃縮度を得ることが期待できると考えられる。

本研究により、サブトラクションシーケンシング法の原理的な実現性は実証できたが、実用化にあたってはサブトラクションを繰り返すことによるライブラリの冗長度の低下や、宿主集団の遺伝的多様性の影響を評価する必要がある。今後引き続き技術的検証を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松崎 素道 (MATSUZAKI, Motomichi)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00511396

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし