

# 16S メタゲノム解析 より高精度に スピーディーに



## 元岡 大祐 先生

大阪大学微生物病研究所  
感染症メタゲノム研究分野 助教

### 先生のご研究内容を教えてください。

感染症メタゲノム研究分野では、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析、メタゲノム解析や遺伝子発現解析による病原体と感染症の理解を目指し研究を展開しています。

感染症発症の分子メカニズムの解明をするため、病原体のゲノム解析により病原性に関する遺伝子の同定を行っています。またメタゲノム解析により、原因不明感染症疑いの臨床検体中から病原体を検出したり、常在微生物叢(細菌叢・真菌叢)と健康の関係について明らかにしたりしています。これらの病原微生物、常在微生物側の情報と宿主側の遺伝子発現解析情報などを統合的に解析することでヒトと腸内細菌、病原体の3者間の関係を研究しています。また、共同利用・共同研究拠点として、次世代シーケンサーを使った共同研究・共同利用、受託解析サービスを行い、国内外の研究者の研究支援を行っております。

### Fluidigmの製品をどのように使われていますか？

16Sメタゲノム解析を中心としたアンプリコンシーケンスのライブラリー作製の過程において、Fluidigmの自動化されたライブラリー作製装置であるJuno Systemを使用しています。また、このJuno Systemは、3' mRNA-Seqのライブラリー作製においても使用しています。

### Fluidigm製品を選択された理由は？ どのところに利点、魅力がありますか？

フリューダイムのJuno Systemは、全自動でイルミナシーケンサーに対応するアンプリコンシーケンスライブラリーの作製ができることが最大の魅力です。サンプルアプライからインデックスやアダプターなど付加することが可能であり、技術者が立ち会う必要は無くオーバーナイト処理も可能なので作業効率は格段に向上しました。また、装置の必要スペースが少ないことや導入コストも魅力的なポイントでした。全自動可能な一般的な分注口ロボットでPCRステップの自動化も入れると、Juno Systemと比べて約30倍の面積が必要で、導入費用も大きな負担でした。また、Juno Systemは、フリューダイムのqPCR装置(Biomark HD System)の前処理や、RNA-Seqのためのライブラリー作製など他のアプリケーションへの汎用性もあり、今後の研究において活用の幅が広がります。

### 今後の研究ビジョンを教えてください。

現在は、腸内細菌叢の16Sメタゲノム解析が中心ですが、真菌叢をターゲットにしたアンプリコンシーケンスやメタゲノムショットガン解析も広く実施していきます。免疫疾患などには細菌だけではなく真菌との関与も報告されており、細菌と真菌が共存し共生していることから、両方をターゲットにすることが重要視されています。今後、疾患のバイオマーカーとなる細菌や真菌の探索をさらに発展させ、特定の細菌のみにフォーカスしたqPCRに移行し、測定や解析のスピードを上げることも検討しています。

### 同分野の研究者へのアドバイスをお願いします。

研究プロジェクトにおいて、毎回の実験精度を上げること、均質にすることは、確かな研究結果を出すために重要です。そのためには、実験作業を出来る限り自動化し、同時に多検体解析できる体制を整えることが近道と言えます。また、研究結果をより信頼あるものにするためには、毎度のクオリティと再現性を確認しながら進めることが、基本的ですが重要と考えています。

大阪大学・微生物病研究所・遺伝情報実験センター  
次世代シーケンス受託解析サービスについてはこちら。  
<http://ngs-service.biken.osaka-u.ac.jp/>

## CUSTOMER FOCUS | June 2021

### アプリケーション

ターゲットDNAシーケンス  
(16Sメタゲノムライブラリー作製)

### フリューダイムテクノロジー

Juno™ System

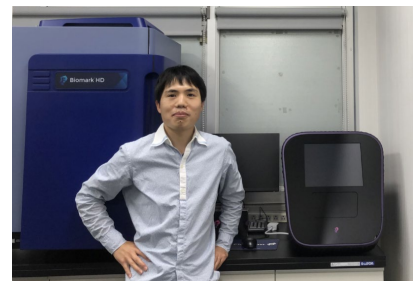


Figure 1. 元岡先生とBiomark HD SystemとJuno System.

### References

- Ojima M, et al. Gut Dysbiosis Associated with Antibiotics and Disease Severity and Its Relation to Mortality in Critically Ill Patients. *Dig Dis Sci*. 2021 May 31:1-13.
- Pareek S, et al. Comparison of Japanese and Indian intestinal microbiota shows diet-dependent interaction between bacteria and fungi. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2019 Dec 20;5(1):37.
- Motooka D, et al. Fungal ITS1 Deep-Sequencing Strategies to Reconstruct the Composition of a 26-Species Community and Evaluation of the Gut Mycobiota of Healthy Japanese Individuals. *Front Microbiol*. 2017 Feb 15;8:238.

## Workflow

### Targeted library preparation for 16S sequencing

#### 16S メタゲノム解析

自動化されたJuno™ Systemで、アンプリコンシーケンスのためのライブラリー調製をナノリットアスケールで行います。そのため、ランニングコストとハンズオンタイムを大幅に軽減できます。今回、LP 192.24 IFCを使用し、192サンプルに対し、16S rRNA標的領域のアンプリコンライブラリー作製を行いました。作製したアンプリコンライブラリーは、イルミナ社シーケンサーに対応しています。今回は、MiSeqでシーケンスを実施しました。Junoから回収したPCR反応物は、サンプル毎にバーコード配列が付加されているため、ビーズ精製やアダプターPCRは、シングルチューブで実施可能となり、ハンドリングの軽減ができます。

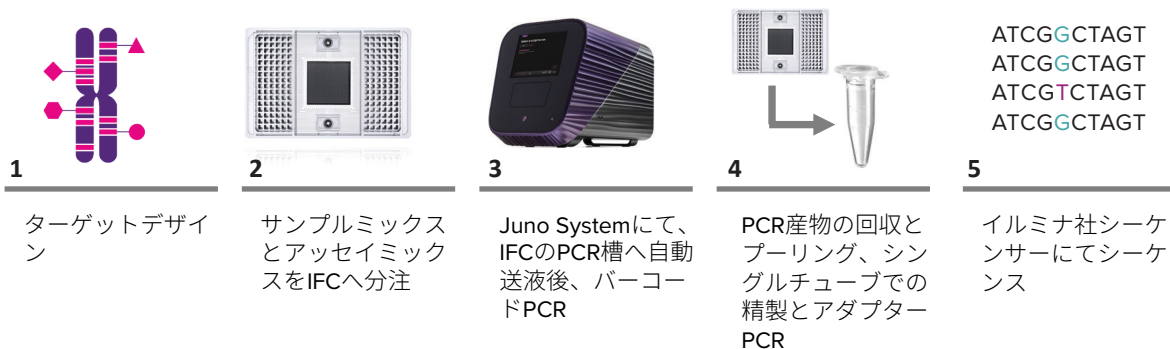


Figure 2. Juno SystemとNGSを使用した16S メタゲノム解析のワークフロー

Juno System は、マイクロフリューディクスを利用し、NGSで使用するライブラリー作製を行います。アンプリコンライブラリーの調製は2段階のPCRで行います。1段階目のPCRはJunoで行い、LP 192.24 IFCでは最大192サンプルについて最大2,400領域のPCRをそれぞれ行います。Junoから回収した反応産物には、サンプルごとにバーコード配列が付加されているため、2段階目のPCRは回収サンプルを1本のチューブにまとめて反応することが可能で、ライブラリーに必要なイルミナシーケンサー対応のアダプター配列を付加します。全ワークフローに掛かる所要時間は約10時間です。

## Juno System

イルミナ社の次世代シーケンサーに対応するアンプリコンシーケンスやmRNA-Seqのライブラリーを自動調製します。この装置は、ナノリットアスケールでの反応の自動化により、費用対効果の高い生産性と効率を向上させます。また、コンパクトなサイズで一般的な自動分注機と比較すると省スペースにて利用できます。

製品名	製品コード
Juno System	101-6455

Learn more at  
[fluidigm.com/juno](https://fluidigm.com/juno)

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Information in this publication is subject to change without notice. Patent and license information: [fluidigm.com/legalnotices](https://fluidigm.com/legalnotices). Fluidigm, the Fluidigm logo, Biomark, and Juno are trademarks and/or registered trademarks of Fluidigm Corporation in the United States and/or other countries. All other trademarks are the sole property of their respective owners.

© 2021 Fluidigm Corporation. All rights reserved. 06/2021

FKK-0006 Rev 01