



次世代シーケンシングが切り拓く 野生動物ゲノム・メタゲノム研究

京都大学
霊長類研究所
ワイルドライフサイエンス（名古屋鉄道）寄附研究部門

早川 卓志

次世代シーケンシング(NGS)技術はあらゆる生物学分野の研究手法を大きく変化させた。従来のキャピラリー電気泳動ベースのシーケンシング技術(サンガー法)では、一本のキャピラリーあたり数百塩基程度の配列しか一度に読むことができない。一方で、多くのNGS技術は、サンガー法で使われていた電気泳動という制約を取り外し、超極小スケールのウェルプレートやフローセル中で数万から数千万という規模で独立に反応を行うことで、ギガ(10億)からテラ(1兆)塩基規模の配列を一度に得ることを可能にした。例えば哺乳類ゲノムは約30億塩基対から構成されるので、NGSをたった1回運用することで、哺乳類の全ゲノム配列の各領域を少なくとも平均して1回は読むことができる計算になる。一度に大量の配列を読むことができるので、鋳型とするDNAサンプル量も節約できる。NGS技術の進歩とともに、情報解析の開発も進んだ。NGSから得られた膨大なショートリードセットから、高速にリファレンスゲノム配列にマッピングして塩基変異や構造変異を検出したり、リファレンス配列なしに染色体レベルでつながった塩基配列を作成したりする(de novoアセンブリ)ことも、容易になった。

- ★ 数ギガ規模の配列を一度に決定することができる
- ★ 鋳型とするDNAサンプルも微量で済む
- ★ 必ずしもリファレンス配列を必要としない

NGSがもたらした、以上の3つのブレイクスルーは、野外での野生動物研究にも、大きな変革をもたらしている。筆者は、野生霊長類の生態研究を、NGSを用いたゲノミクス・メタゲノミクスの観点から実践している。NGSを用いた野生動物研究の現状と展望について、紹介したい。

霊長類比較ゲノミクス

一個体の全てのゲノム配列を、染色体レベルで一本に配列に繋げた状態でデータ化したものを、全ゲノムアセンブリと呼ぶ。最初の霊長類ゲノムアセンブリとして、2001年にヒトゲノム配列が発表された。当時はまだNGSが登場していないので、数百塩基ずつ、ひとつひとつクローニングベクターをサンガー法で決定し、繋ぎ合わせるという作業をしており、国際コンソーシアムが投じた費用は30億ドルにのぼる。その後、ヒトに最も近縁な動物であるチンパンジーのゲノムが2005年に、ニホンザルでお馴染みのマカク属の1種であるアカゲザルのゲノムが2007年に発表された。こうした非ヒト霊長類ゲノム配列の決定は、ヒトがなぜヒトになったかという進化の過程を塩基変異という枠組みで説明するとともに、医療モデルとしての非ヒト霊長類研究の分野にも貢献している。2010年代に入り、非ヒト霊長類ゲノムの発表が加速化した。2011年から2012年の間に、オランウータン、ゴリラ、ボノボの3種の類人猿や、ガラゴなどの3種の原猿類が発表されている。2015年5月現在、こうしたゲノムアセンブリをデータベース化したWebサイトであるEnsemblでは、12種類の霊長類ゲノムが登録されている。2010年代の全ゲノム配列の発表はNGSベースによるものが多い。必ずしもいわゆるモデル生物とは呼ばれない動物種のゲノムが次々と発表されるのは、まさにNGSが高速に大量の塩基配列を決定できる驚異的なツールだからである(霊長類比較ゲノミクスの現状については[文献1]に詳しい)。

野生動物遺伝学から野生動物ゲノミクスへ

多くの霊長類種で全ゲノム配列が利用できるようになったことは、動物の野外研究の現場にも大きな変化を与えた。動物の世界にも、私たちヒトと同様に「社会」がある。例えばチンパンジーは、数十から百個体程度で構成される複雑な群れ(単

位集団)を形成し、メスは性成熟をむかえると生まれた集団を離れ、別の集団に移籍する。こうすることで、遺伝的多様性が保たれている。野外研究者は、例えばチンパンジーが生息する森に入り、人馴れをさせながら一頭一頭を個体識別し、行動や個体の移籍などを記録している(図1)。しかし、チンパンジーはヒトのような配偶関係を持たず、自由に交尾関係を持つため、生まれてくるコドモの父親が集団の誰であるかは、行動を観察しているだけではわからない。そこでDNAによる父子判定が、チンパンジーの社会を知る強力なツールとなっている。野生動物を安易に捕獲するわけにはいかないのに、DNAの素材はもっぱら地面に落とされた排泄物に頼る。糞は「食べかす」と「腸内細菌」と「腸壁の死細胞」の塊である。糞からDNAを抽出することで、腸壁細胞由来の個体のゲノムを得ることができる。糞DNAからマイクロサテライトなどの変異の高い領域をPCRすることで、父子判定を実行することができる。こうした結果、例えばチンパンジーの社会では、集団の中で順位の高いオスが多くの子孫を残しているということなどが、明らかになっている。

糞から抽出したDNAは、その多くが「食べかす」と「腸内細菌」由来のDNAであり、「腸壁細胞」由来のDNAはごく微量である。筆者の経験では、どんなに腸壁細胞由来のDNAの抽出効率が上がるような実験的な工夫をしても、抽出DNAの数パーセントぐらいしか、腸壁細胞由来DNAは含ま



図1: 野生チンパンジーの観察の様子。直接観察により「顔かたち」から個体識別をする。森の中の終日追跡することで、行動を記録するとともに排泄物などを収集することができる。

れていない(図2)。更に、混入している腸内細菌ゲノムの塩基配列を鋳型にして非特異な配列がPCRで増幅されてしまったり、胆汁酸などが十分に精製されずにPCRの酵素反応を阻害してしまったりすることがある。そのため、野生動物遺伝学研究は、『DNAが微量である』、『腸内細菌や食べかすのDNA(環境DNA)が混入している』、『阻害物質が含まれている』といった特異な問題に悩まされてきた。しかし、こうした問題はNGSによってクリアすることができる。NGSは微量のDNAから大量の塩基配列を決定することができるので、微量であることが大きな問題にはならない。また、特異配列に基づいたプライマーによるPCRを必要としないので、混入している環境DNAが非特異な影響を与えるということがほとんどない。更に、既に多くの動物種でリファレンスゲノム配列が決定されているので、それに基づいたプローブを作成し、キャプチャーによるターゲットシーケンスを行えば、環境DNAを取り除くこともできる[文献2]。スタートが微量で構わないので、精製しきれない阻害物質が大きく問題になることもない。

こうしたNGSによる糞DNA解析が動物生態学の現場でも主流になれば、従来の父子判定・血縁判定という社会構造の理解にとどまらず、コーディング領域の個体差に基づく行動の個体変異・地域変異などの遺伝基盤の解明など、野生動物の表現型研究にまで、踏み込んでいけることになるだろう。



図2: 野生チンパンジーの糞。アブラヤシやイチジク(左)や、ニクスク(右)の未消化の種子が含まれている。糞からDNAを抽出すると、チンパンジー個体自身の腸壁細胞由来のDNAが数パーセントほど得られる。

野生動物メタゲノミクス

NGSはゲノミクスだけでなく、メタゲノミクスの分野にも大きな変革をもたらした。例えば私たちの大腸には、1000種、数百兆個を超える細菌が共生しており、食べ物の消化や代謝に貢献している。そのため、腸内細菌叢の研究は、食生活、生理、病気などの理解に直結する。しかし、以前までの細菌の研究には単離と培養というプロセスが必要で、培養ができない細菌についての情報は手がかりがほとんど得られなかった。そこでNGSである。前節で、糞DNAの90%以上は個体のDNAでないもの——つまり腸内細菌や食べかすのDNA——から構成されていると述べた。個体ゲノム研究では邪魔者でしかなかったこれらは、逆にメタゲノム研究では大活躍することになる。

細菌の系統解析には、16S rRNA配列が最もよく使われている。16S rRNAをコードするDNA配列には、種間で非常に変異に富む領域(可変領域)と、



種間で非常に保存されている領域(保存領域)がある。保存領域に相補的なプライマーで、糞DNAからダイレクトにPCRを行い、PCR産物の塩基配列をまとめてNGSで決定することで、糞に含まれているほぼ全ての腸内細菌の16S rRNA可変配列を決めることができる。このデータセットに系統解析を行うことで、その個体の腸内細菌叢を明らかにできる。

PCR産物そのままシーケンスライブラリになるという簡便性から、野生霊長類研究でも既に多くのNGSベースの腸内細菌叢研究が発表されている。例えば、ヒトと類人猿の間にも進化的に共通の腸内細菌叢が存在することや、採食食物の年変化により腸内細菌叢がホエザルで変化していることなどが発見されている[文献3,4]。更に、PCRベースではなく、全糞DNAをショットガンシーケンスしたメタゲノム解析により、個体間の社会関係と腸内細菌叢の間に相関が存在するということがヒビで報告されている[文献5]。また、PCR対象を16S rRNAではなく、

植物や昆虫のバーコード配列に変えることで、糞に含まれている食べかす、どんな食べ物に由来するのかということも網羅的に明らかにすることができる。こうして、観察では把握しきれない代謝や生理、採食品目についても、手がかりを得ることができる。

今後の野生動物ゲノム・メタゲノム研究

野外研究者が対象とする動物の多くはいわゆるモデル生物ではないし、質の良いDNAを収集する統制を取ること容易ではない。そういった制約に縛られないNGSの登場は、野生動物のゲノム・メタゲノム研究とも非常に親和性が高い。冷蔵庫や冷凍庫のない森の中でどのように糞DNAを安定的に保存するか、野外研究者がラボワークやインフォマティクスをどのように習得するかなど、まだ多くの課題が残されているが、この先のNGS技術の更なる発展と簡便性の向上とともに、解決していくことだろう。今後の展開としては、キャプチャーやアンプリコンではない全DNAショットガン解析や、トランスクリプトームやメチローム解析なども、野生動物研究の現場にも入ってくるものと思われる。しかし特筆しておきたいことは、野生動物研究の基本はあくまで野外で動物の行動や生態をよく観察することである。日々進歩するNGSの技術に振り回されることなく、野生動物の行動・生態の解明にNGSの結果が直結するような研究を進めることが肝要である。

- 文献
[1] Rogers J & Gibbs RA. Nat. Rev. Genet. 15:347-359 (2014).
[2] Perry GH et al. Mol. Ecol. 19:5332-5344 (2010).
[3] Moeller et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111:16431-16435 (2014).
[4] Amato et al. Microb. Ecol. 69:434-443.
[5] Tung et al. eLife 4:e05224 (2015).

著者:早川卓志 Takashi Hayakawa

- 京都大学霊長類研究所 ワイルドライフサイエンス(名古屋鉄道)寄附研究部門 特定助教
- 公益財団法人日本モンキーセンター 学術部 研究教育室 キュレーター
- 専門:分子生態学・比較集団ゲノミクス
2010年3月 京都大学理学部 卒業
2012年3月 京都大学大学院 理学研究科 修士課程 修了
2015年3月 京都大学大学院 理学研究科 博士後期課程 修了、博士(理学)
2015年4月より現職