

## 【ウェブ講座⑩】 統合オミックス解析のはなし

生命現象が分子のことで解釈されるようになってから60年になることは前講座で述べました。この間、組換え DNA 技術から始まった分子生物学的技術の発展には目を見張るものがあります。なかでも、今から 10 年前に創出された超高速の「次世代型シーケンサー」は“生命をシステムとして捉える”という新しい生命科学をブレイクスルーしたのです。

微生物学分野の研究者である筆者も、その次世代型シーケンサーの奔りのインパクトに痺れたものです。“検体から菌を分離培養しないで、検体丸ごとから DNA を抽出して菌種を同定する”ことが可能になり、それまでほとんどが培養不可能であった腸内細菌の全菌種(細菌叢)が明らかになりました。このことは、サイエンスばかりでなく、医療の診断・治療・検査部門にまで大変革を与えたのです。

**オミックス(omics)**は、**総体を調べる技**を表すことばで、生体内分子を網羅的に調べることを**オミックス解析**といいます。対象が遺伝子 DNA の場合を**ゲノミクス**、転写物 mRNA の場合を**トランスクリプトミクス**、タンパク質の場合を**プロテオミクス**、代謝産物の場合を**メタボロミクス**と呼んでいます。**統合オミックス解析**は、これらの個々のオミックス解析を統合し、これに生体の表現型の解析を組み合わせて個体の生命現象を包括的に調べるという新しい解析法です(図1)。この解析を支えたのが次世代型シーケンサーです。

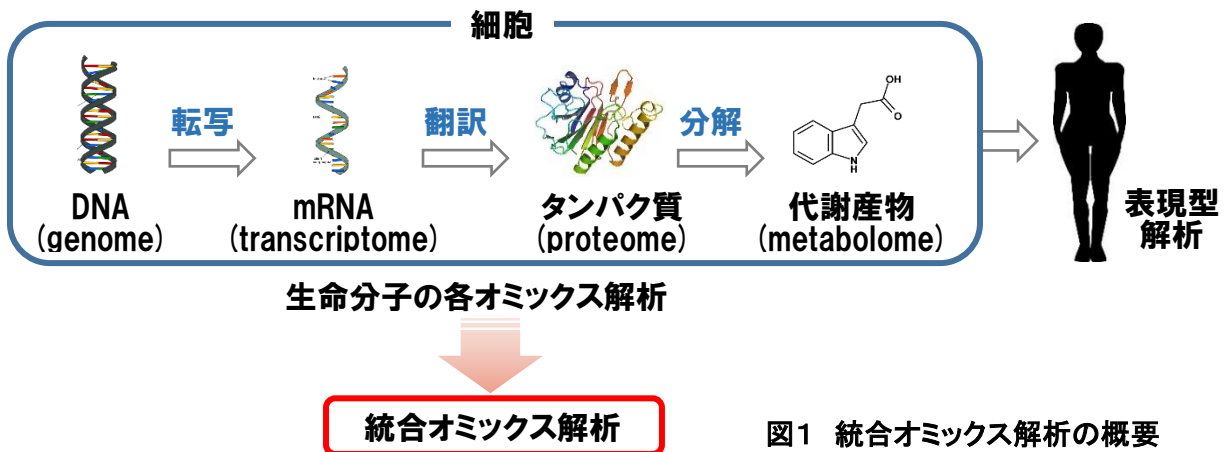


図1 統合オミックス解析の概要

### ●ゲノム解析

細胞内にある DNA がもつ4種類の塩基(A, T, G, C, の略号で示される)の文字配列を遺伝情報とよび、この遺伝情報の総体を**ゲノム(genome)**といいます。ゲノム解析はゲノムの塩基配列を解読することです。

「**サンガー法**」<sup>1)</sup>と呼ばれる解析法が最も一般的で、その原理の概要を図で説明します(図2)。反応液中に含まれる酵素(DNA ポリメラーゼ)は、解読したい DNA を鋳型とし、4種

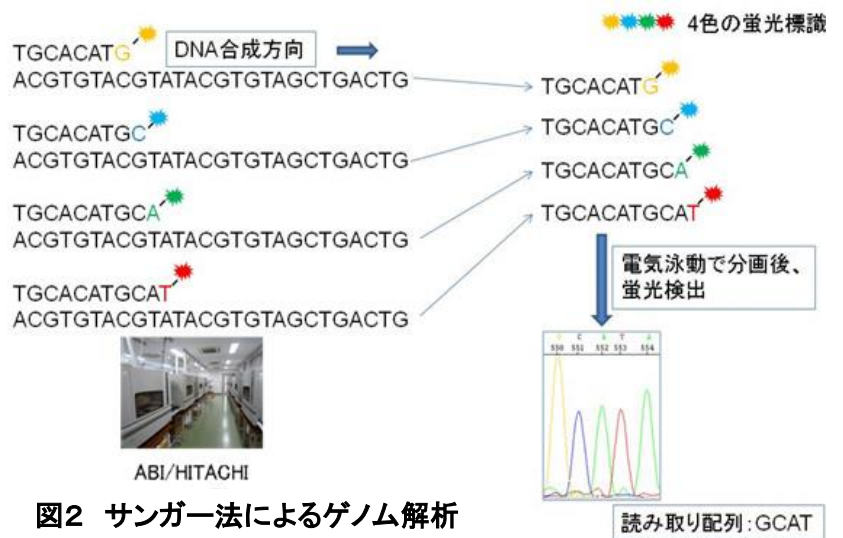


図2 サンガー法によるゲノム解析 (ネット画像より転載)

類の単量体(ヌクレオチド)を結合させることにより、それと同じ配列の DNA を合成します。このとき、その反応液中に異なった蛍光色素で標識した4種類の単量体アナログを少量加えておきます。この色素付きアナログが結合すると、そこで反応が停止して様々な長さの色素付き DNA 断片の混合物が得られます。混合物は第1世代 DNA シーケンサー(従来型)を用いて解析します。本装置は、DNA のもつ荷電を利用した分離法である電気泳動、蛍光色素の検出器、読み取り配列を処理するための情報技術が一体化されています。DNA は短いほど早く色素検出器に到達するので、この色素の順番から塩基の配列が解ります。

### ●トランスクリプトーム解析

**トランスクリプトーム(transcriptome)**は、細胞内で DNA から転写された mRNA の総体のことです。ゲノムは生物のすべての細胞で均一なのですが、転写 mRNA は組織、異なった環境や時間で発現する数や量に違いがあります。そこで、調べたい状態の細胞の全 mRNA とコントロール細胞の全 mRNA をそれぞれ異なる

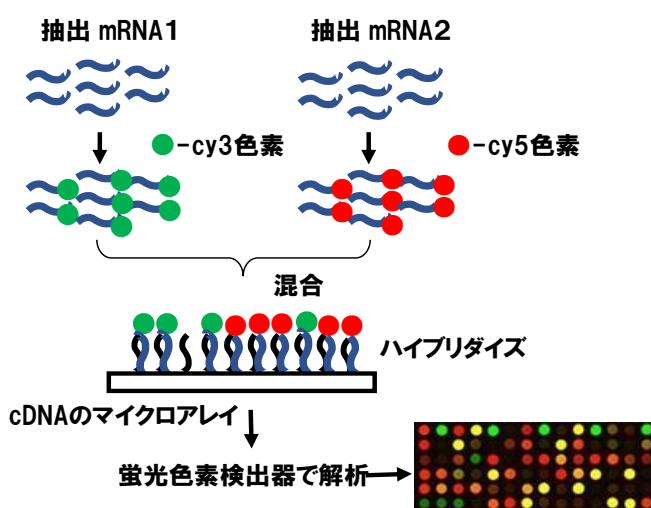


図3 DNA マイクロアレイ解析 解析例

な蛍光色素(cy3: 緑色、cy5: 赤色)で標識し、一緒にしてスライドガラス上に貼った全遺伝子の1本鎖相補 DNA (cDNA)(DNA マイクロアレイとよぶ)に結合させます(DNA の性質で相補性のある配列と結合することをハイブリダイズという)。このハイブリダイズしたアレイの蛍光色素の強さを検出器で検出します。発現した mRNA の数や量の増減を網羅的に比較することができます(図3)。この解析法を DNA マイクロアレイ解析といい、同一個体であっても組織ごと、または環境変化に対応した細胞の働きが解るのです。

### ●プロテオーム解析

**プロテオーム(proteome)**は、細胞内にあるすべてのタンパク質の総体のことで、その瞬間に発現しているすべてのタンパク質を意味します。多くのタンパク質は、いろいろな修飾を受けて複数の働きをしたり、一種が複数個で働いたり、他のタンパク質と複合体を作って働いたり、というように多様性をもち、栄養素を代謝する酵素として生物の生命現象の中心的な役割を担っています。

細胞内の総タンパク質の発現を調べるには、まず二段階の電気泳動による二次元電気泳動法でタンパク質を分離します。この手法は、一次元目はタンパク質の等電点(荷電が見かけ上ゼロになるときの溶液の pH)、二次元目は分子量によりタンパク質を分離します。泳動後のゲルは、銀染色や蛍光染色で染めてタン

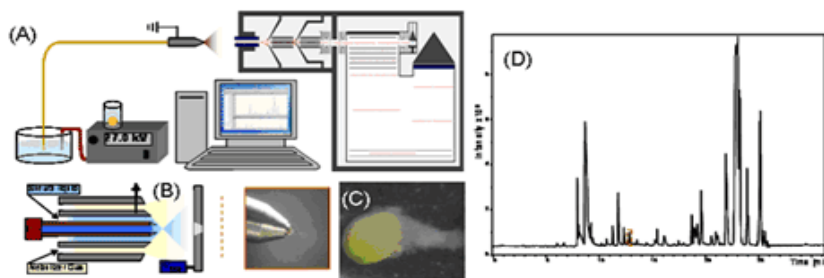


図4 精密質量分析装置 EC-MS (ネット画像より転載)  
二次元電気泳動で分離した試料(A)は質量分析(B, C)され、各クロマトピーク(D)は内蔵標準データから同定される。

タンパク質のスポットを検出します。現在は再現性と解像度に優れた固定化 pH 勾配(Immobilized pH Gradient, IPG)法を一次元目の泳動に用いることが多くなっています。これは分離能が非常に高いので、細胞の全タンパク質を数千以上にもおよぶスポットに分離することができます。回収したスポットは、一体化されている質量分析法(MS:mass spectrometry)(EC-MS)にて質量(重さ)を測定し、内臓データからタンパク質を同定します(図4)。また、試料を分離するための液体クロマトグラフ(LC)と、分子の質量(重さ)を測定するマスキロマトグラフ(MS)から構成されるオンライン化された精密質量分析装置(LC-MS)もよく利用されています。

### ●メタボローム解析

生体内に存在する代謝によって作り出される糖や有機酸、アミノ酸、脂肪酸などの低分子化合物の数千種類におよぶ総体を網羅的に解析することがメタボローム解析です。代謝物の動態はもともと生体の表現型に近い状態を表しています。従って、未知の代謝産物の同定はとても重要です。プロテオーム解析と同様に、代謝産物は物質の種類により各種の分離法(ガスクロマトグラフ、高速液体クロマトグラフ、電気泳動など)で分けられた後、高感度な質量分析法(GC-MS:ガスクロマトグラフ質量分析、LC-MS:高速液体クロマトグラフ質量分析、MS-MS:タンデム質量分析、EC-MS:キャピラリー電気泳動質量分析など)で解析されます。解析ソフトとバイオインフォマティクス技術が必要となるため、外部機関と連携した受託分析も行われています。

### ●マイクロバイオーム解析

多くの微生物群が培養できないため、その全容が不明であった環境や動物の消化管や皮膚などに生息する微生物叢(マイクロバイオーム)の遺伝子情報を網羅的に解析することをマイクロバイオーム解析といいます。その方法はメタゲノム解析、16S 系統解析<sup>2)</sup>とも呼んでいます(図5)。本法は、細菌だけがもつ16SリボソームRNAは種により可変する領域(v1-v9)があることを利用して、菌叢DNAから16S遺伝子を増幅してその配列を解読し、コンピューターによるBLAST(DNAの塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列プログラム)検索で菌種を同定します。

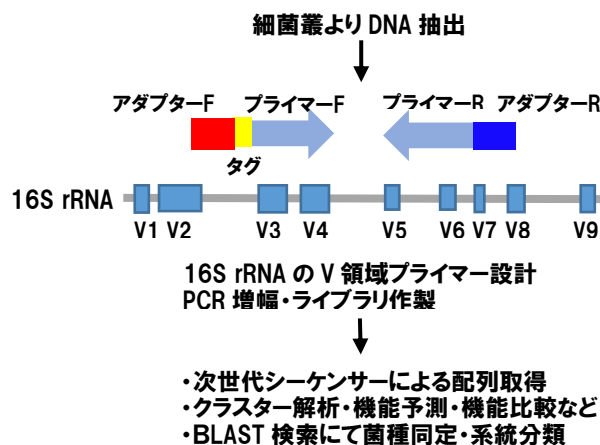


図5 16S 系統解析のスキーム

### ●個々の網羅的解析を統合したオミックス解析

上記の個別オミックス解析は、どれも分離技術と検出器と情報処理が一体化されており、データがデジタル化(カタログ化)されています。このことから、本法では「ロボット技術」や「情報技術」の発展が大きく寄与していることが分かります。本法は、全分子ごとに分子間、機能間のデータを統合・比較し、そのネットワークを構築することや未知のネットワークを見出すことを可能

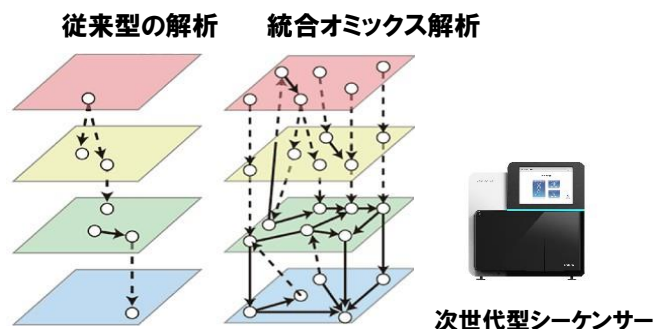


図6 統合オミックス解析のスキーム  
(ネット画像参考)

にしました(図6)。これを「**統合オミックス(トランスオミックス)解析**」<sup>3)</sup>といいます。

解析に用いられる次世代シーケンサーは塩基配列のみを解析する従来型サンガー法 DNA シーケンサー(第1世代シーケンサー)が進化を遂げ、新たなコンセプトにより超高速で塩基配列を解読する装置のみならず、トランスクリプトームやメタゲノムのオミックス解析装置を合体させた**次世代型シーケンサー**<sup>4)</sup>として開発され、現在、第5世代型まで進化が進んでいます(表1)。人類の叡知は止まることはありません。

表1 次世代型シーケンサーの進化とその特徴

世代	製品	特徴	解読できる鎖長	処理能力(1日当り)
第1世代	ABI など	サンガー法による塩基配列解読技術を4色の蛍光色素で標識したジデオキシヌクレオチドを用いて、ロボット技術によるキャピラリー電気泳動と蛍光検出と情報技術による塩基同定までを自動化した装置で解析する。読み取り精度が高く読み取り長も長いという利点があるが、大腸菌にDNA断片をクローニングする必要があるため、人的・時間的コストを要する。	500-700 塩基	920-3.4K 塩基
第2世代	ロッシュ イルミナ ABI	短いDNA断片を増幅し、これを鋳型にポリメラーゼで合成する際の光シグナルを検出する。	400 塩基 75×2 塩基 35×50 塩基	80M-300M 塩基
第3世代	ヘリコスなど	1分子の短いDNA断片を鋳型にポリメラーゼで合成する際の光シグナルを、リアルタイムに検出する。	35×50 塩基	1.4G 塩基
第4世代	パシフィック バイオサイエ ンスなど	1分子のDNAを鋳型にポリメラーゼで合成する際の光シグナルを、時間または位置の分解能を利用して高速に検出する。	5K-12K 塩基	2.4G 塩基
第5世代	ナノポアなど	1分子のDNAを物理的方法で直接検出する。	10K-1M 塩基 ∞	800G 塩基以上

(科学 2009,79(2):240-244 参考)

以上、現在進んでいる JAXA/東京大学/女子栄養大学の共同研究、通称“大野テーマ(免疫)”において行われているオミックス解析を中心にやさしく解説しました。

【参考文献と参考図書】

- 1) Sanger F. and Coulson AR. 1975, A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 94(3):441-448.
- 2) Shendure J. and Ji H. 2008, Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.*, 26:1135-1145.
- 3) Yugi K. *et al.* 2016, Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple 'Omic' Layers. *Trends Biotechnol.*, 34(4):276-290.
- 4) 五條堀孝ら. 2009, 「日本は次世代シーケンサーにどう取り組むか」科学 79(2):240-244.

(執筆: 太田敏子)