

長年課題であった「細菌叢 DNA 抽出」方法の最適化で、
信頼性の高い細菌叢解析を支援するアカデミア向けサービスを開始

2024/07/03

複合・発酵性食物繊維（ルミナコイド）栄養補助食品ルルミルク（Lulumilk）を販売する株式会社 Smart Gut（本社：東京都千代田区、代表取締役：酒井康光）は、7月3日より、大学や公的研究機関向けに、当社取締役 CTO 服部 正平博士責任監修による「細菌叢 DNA 抽出サービス」を開始しました。

■ 当社の細菌叢 DNA 抽出の特徴

当社が開始した細菌叢 DNA 抽出の受託事業は、Illumina 社、PacBio 社、Oxford Nanopore Technologies 社の各 NGS による DNA 配列シーケンシングに高い成功率と実績をもつ LA 法（酵素的溶菌法）をベースに独自開発した技術で運用します。近年の研究から、LA 法（酵素的溶菌法）は、N 及び P 法（いずれも機械的溶菌法）と高い互換性のあるヒト腸内細菌叢の DNA 抽出法であることがわかりました（後述）。注目すべきは、酵素的溶菌と機械的溶菌という溶菌メカニズムが異なる抽出法が有意に高い類似性をもつ菌種組成を互いに与えた点です。

このことは LA、N、P 法から得られる菌種組成が真実の菌種組成に極めて近いことを意味します。よって、当社が開発した DNA 抽出法によって得られる細菌叢 DNA からは、他方法よりも格段に正確で信頼性の高いさまざまな細菌叢解析を可能にします。

「細菌叢 DNA 抽出サービス」詳細：<https://www.smart-gut.com/services>

■ 細菌叢 DNA 抽出法技術について

マイクロバイオームを解析する第 1 ステップは、試料(糞便や唾液、皮膚など)からの細菌叢 DNA の抽出です。

次ぐ第 2 ステップは、抽出された DNA を次世代シーケンサー(NGS)に供して、細菌叢がもつ DNA 配列データの取得。

そして第 3 ステップでは、得られた DNA 配列を情報学的に解析し、菌種や菌種の遺伝子組成など一連の細菌叢データを得るに至ります(図 1)。

第 2 ステップで得られる細菌叢の DNA 配列データには 2 種類あり、それぞれ 16S リボソーム RNA 遺伝子(16S)データとメタゲノムデータとなります(図 2)。



図1. 細菌叢解析の基本プロセス

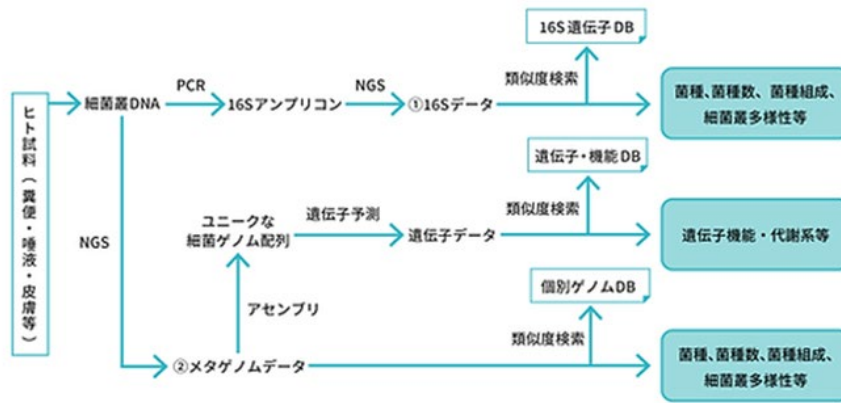


図2. NGSを用いた16S解析とメタゲノム解析の工程

このように、長年の試行錯誤で確立された解析工程ですが、今なお技術的な改良点がいくつも残されています。そのひとつは、第1ステップの細菌叢 DNA 抽出法です。

これまでに様々な細菌叢 DNA の抽出法が報告され、いくつものキットが販売されてきました。しかし、それぞれのキットや抽出法で抽出された細菌叢 DNA の解析から得られる細菌叢データ(菌種や菌種組成など)が、用いた DNA 抽出法間で無視できないほど異なる報告がいくつもされています。

この DNA 抽出法の課題の解決なくしては、解析データとデータから導かれる解釈の信頼性が担保できません。

現在も新たな DNA 抽出法の論文が発表され、新製品のキットが販売されていることそのものが、細菌叢 DNA 抽出法の課題が解決されていない証左とも言えます。求められているのは、腸内に存在する様々な菌種が完全に溶菌する DNA 抽出法なのです。

最近、細菌叢 DNA 抽出法の改良に極めてヒントになる2つの論文が報告されました。ともに日本のグループによるもので、一つはビーズを用いた機械的溶菌法を評価した論文(Microbiome, 2021)で、もう一つは酵素を用いた溶菌法を含むいくつかの既存の溶菌法・市販キットを評価した論文(DNA Res, 2023)です。ともに、モック・コミュニティ(20種類ほどの既知菌種からなる人工細菌叢)を用いて、モック・コミュニティの菌種組成(正解)にもっとも類似した菌種組成となる抽出法について調べています。結果として、前者からは機械的溶菌法の N 法、P 法、Q 法の3つが、後者では酵素法の LA 法が優位であるという結論が導かれています。以下の図3では、2つの論文のデータを合わせて、4つの方法を含めた様々な既知法からの菌種組成とモック・コミュニティの菌種組成間の類似性及び違いを比較しました。LA、N、P、Q法は、他のいずれの方法よりもモック・コミュニティの菌種組成(正解)と有意に高い類似性をもつことが分かります。

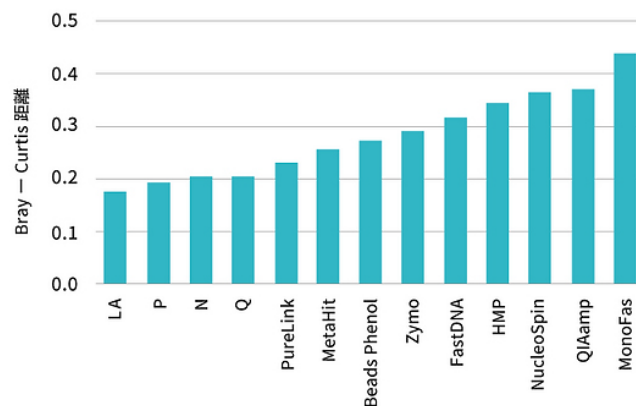


図3. 様々な細菌叢DNA抽出法の比較

さらに、当社取締役 CTO 服部正平らは、実際の人糞便を用いて上記 N、P、Q、LA 法の4つを比較しました。その結果、LA、N、P法は互換性のある高精度なヒト腸内細菌叢の DNA 抽出法であることが確認されました(図4A)。一方、Q法(Nature Biotechnology, 2017)は、今回の解析では、同じ機械的溶菌法のN法とP法よりも低い類似度を示しました(図4A)。また、LA法がもっとも高いDNA収量をもつことも判明しました(図4B)。これらの人糞便を用いた結果から、LA

法（酵素的溶菌法）と N 及び P 法（いずれも機械的溶菌法）は真実の菌種組成に極めて近い菌種組成を与えることがわかりました。

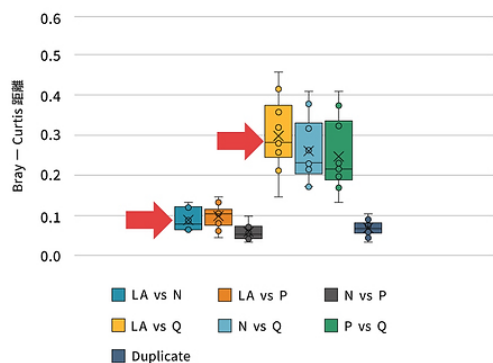


図4A. 4つの細菌叢DNA抽出法(LA, N, P, Q)から得た菌種組成間の類似度比較

4つの抽出法を用いて同一サンプル(10名の糞便)から得られた菌種組成間の類似度を Bray-Curtis 距離で評価しました。LA-N, LA-P, N-P 間の菌種組成の類似度は、繰り返し実験 (duplicate) と同程度の高い類似度を示しました。一方、Q法は、LA, N, P法との間で相対的に低い菌種組成の類似度を示しました。

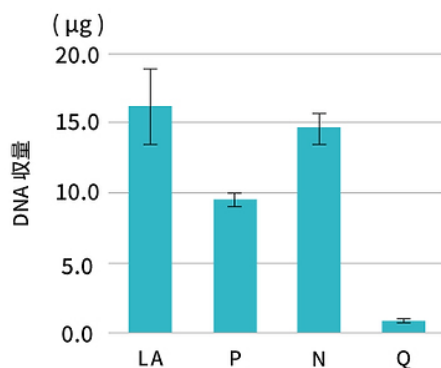


図4B. 4つの細菌叢DNA抽出法(LA, N, P, Q)からのDNA収量比較

異なる10名の人糞便(約40mg)を4つの抽出法(LA, N, P, Q)でDNAを抽出し、その重量をQubitで測定しました。このデータから、4つの方法の中でLA法がもっとも高いDNA収量をもつことが示されました。

LA法をベースにした細菌叢DNA抽出プロトコルは2013年の発表以来、すでに多くの研究プロジェクトに採用されています。例えば、我が国初のNGSを用いた腸内細菌叢メタゲノム解析(DNA Res, 2016)や、日本最大規模の4,198名の腸内細菌叢を解析した研究(Gastroenterology, 2022)などが挙げられます。このほか、酵素法の利点である高分子量DNAの抽出を生かしたロングリードメタゲノム解析(Microbiome, 2019)や、高いDNA収量を生かした唾液細菌叢(Nature Commun, 2021)、皮膚細菌叢(Sci Rep, 2023)などの菌数/細菌叢DNAが極めて少ないサンプルの解析にも活用されています。

■ 当社細菌叢DNA抽出プロトコルの特徴

- ・細菌種への偏りが小さい溶菌特性と高範囲な溶菌スペクトル
 - ・高いDNA収量(数十mgの糞便、0.1mlの唾液からのNGS対応DNAの抽出)
 - ・高分子量DNA(10kb以上の平均リード長)
 - ・高品質DNA(NGSシーケンシングや定量PCRでの高い成功率)
 - ・相対菌数の定量 (DNA収量/糞便重量 = 相対菌数*)
- (* 当社プロトコルでは、用いた糞便量と得られるDNA収量の間にはほぼ1:1の比例関係があり、個々サンプルの相対菌数の算出が可能です)

■ 採用事例

- ・日本初のNGSを用いた腸内細菌叢メタゲノム解析 (DNA Res, 2016)
- ・日本最大規模の4,198名の腸内細菌叢を解析 (Gastroenterology, 2022)
- ・ロングリードメタゲノム解析 (Microbiome, 2019)
- ・唾液細菌叢 (Nature Commun, 2021)
- ・皮膚細菌叢 (Sci Rep, 2023)

「細菌叢 DNA 抽出サービス」見積もり依頼/問合せ : <https://www.smart-gut.com/services>

今後、細菌叢解析事業として 16S 解析やメタゲノム解析など、主に観察研究や臨床研究での被験薬や被験品及びサービスの効果や機能の科学的な検証・解析支援サービスも計画しています。また、当社「ルミナコイド（発酵性食物繊維）事業」と連携を図った総合的な腸内改善サービスも予定しています。

当社は、「細菌叢解析事業」と「ルミナコイド（発酵性食物繊維）事業」を通じて、今後もガット・マイクロバイーム(腸内細菌叢)で人々の生活の質を高め、社会に必要とされる企業、人々の笑顔を作る事業を目指し、邁進していきます。

細菌叢 DNA 抽出サービス・責任監修

株式会社 Smart Gut 取締役 CTO 服部 正平

大阪市立大学大学院工学研究科博士課程修了（工学博士）、東亜合成株式会社勤務後、九州大学遺伝情報実験施設（助手）、米国スクリプス研究所及びカリフォルニア大学サンディエゴ校（リサーチアソシエイト）、東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンター（助教授）、理化学研究所ゲノム科学総合研究センター（チームリーダー）、北里大学北里生命科学研究所（教授）、東京大学大学院新領域創成科学研究科(教授（現 名誉教授)), 早稲田大学理工学術院（教授）、理化学研究所生命医科学研究センター（チームリーダー）を経て、現在に至る。この間、東京農工大学、麻布大学（客員教授）、慶應義塾大学医学部（特別招聘教授）、法政大学、金沢大学、九州大学（非常勤講師）、日本学術会議連携会員、日本学術振興会産学協力研究委員会委員、France-Génomique 海外委員、国際ヒトマイクロバイームコンソーシアム(IHMC)2022(第 9 回 IHMC 国際会議主催)(組織委員長)などを兼務。研究分野はゲノム科学(ヒトゲノム、微生物ゲノム、ヒトマイクロバイーム研究)。

主な著書・監修書は、『ヒトゲノム完全解読から「ヒト」理解へ』(東洋書店 2005)、『メタゲノム解析実験プロトコル』(羊土社 2016)、『ヒトマイクロバイーム研究最前線 Vol. 1, Vol. 2』(エヌ・ティイー・エス 2016, 2020)など。そのほか、NHK サイエンスゼロ「おなかの中の小宇宙 腸内細菌に迫る」(2008)、NHK スペシャル「腸内フローラ」(2015)、NHK スペシャル「人体」万病撃退！“腸”が免疫の鍵だった」(2018)に出演。

学術論文リンク先 : Google Scholar : <https://scholar.google.co.jp/citations?hl=ja&user=EGWDDZIAAAAJ>

Clarivate : <https://www.webofscience.com/wos/author/record/1886809?SID=EUW1ED0CB4HRHngdZKPL3octP4Z4S>

本件に関する問合せは



ガット・マイクロバイーム(腸内細菌叢)で人々の生活の質を高める

株式会社 Smart Gut

SmartGut 東京都千代田区九段南 1 丁目 5 番 6 号りそな九段ビル 5 階

E-mail : pr@smart-gut.jp

当社は大学や医療機関との科学研究成果の社会実装を進めています。

HP : <https://www.smart-gut.com/>

Lulumilk : <https://lulumilk.com/>

Instagram : https://www.instagram.com/lulumilk_official/

YouTube : <https://www.youtube.com/@onakanochikara>