

2022年度NITE講座

マイクロバイオーーム解析の基礎技術 とNBRC微生物カクテルの活用

2022年11月15日

独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）
バイオテクノロジーセンター（NBRC）
産業連携推進課 三浦 隆匡

微生物やその遺伝資源を利用する方法

マイクロバイーム:ある特定の生態系に存在する微生物(集合体)、それらの遺伝子および代謝産物すべてを指す

●分離培養法



微生物数
土壌: 数億匹(数百万種)以上/g
糞便: 数兆匹(数千種)以上/g

培養

分離



(90%以上の微生物は培養困難)
Amann, R.I., et al, Microbiol Rev, 59, 143-169 (1995)

- 発酵食品や物質生産への利用
- 遺伝子組換え宿主としての利用

●メタゲノム解析



次世代シーケンサーによる網羅的解析

➤ DNAを読む = メタゲノム解析

- 微生物ゲノムの仮構築(MAG等)
- 誰が**いる**か
- どんな遺伝子**がある**か

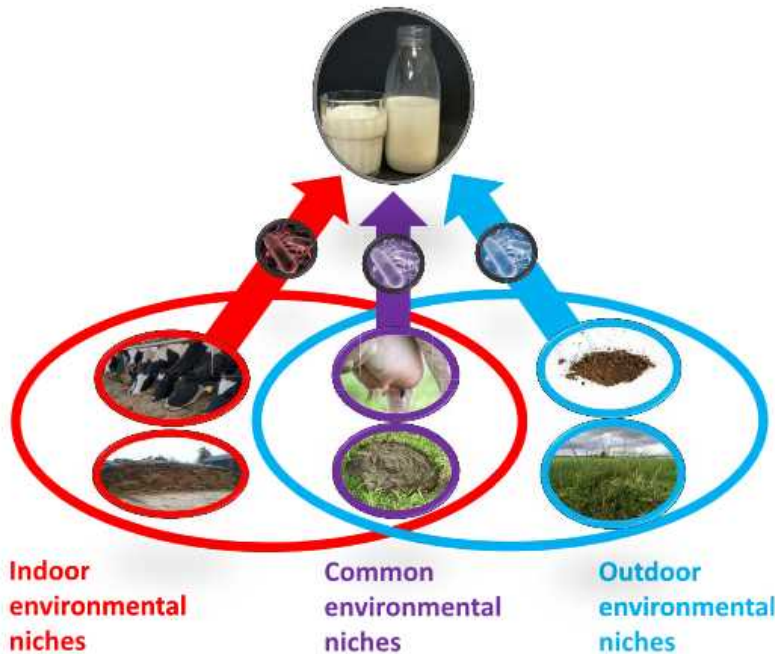
➤ RNAを読む = トランスクリプトーム解析

- 発現している遺伝子を捉える
- 誰が**元気**か
- どんな代謝経路が**動**いているか

- 新規酵素の探索や遺伝子合成等による酵素の利用
- 環境モニタリングや生態系サービスの予測

微生物やその遺伝資源を利用する方法

From Farm to Table



Doyle, C.J., et al Environ Microbiol. 19(11), 4382-4391 (2017)

品質や安全確保の観点においても
メタゲノム解析に注目が集まっている

environmental
microbiology



Environmental Microbiology (2017) 19(11), 4382–4391

doi:10.1111/1462-2920.13859

Minireview

Metagenome-based surveillance and diagnostic approaches to studying the microbial ecology of food production and processing environments

frontiers
in Microbiology

REVIEW
published: 04 July 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.01009

Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer

Jessica D. Forbes^{1,2†}, Natalie C. Knox^{1†}, Jennifer Ronholm^{3,4}, Franco Pagotto^{5,6} and Aleisha Reimer^{1*}

frontiers
in Microbiology

Insights Into the Bovine Milk Microbiota in Dairy Farms With Different Incidence Rates of Subclinical Mastitis

Maoda Pang¹, Xing Xie¹, Hongduo Bao¹, Lichang Sun¹, Tao He¹, Hang Zhao¹, Yan Zhou¹, Lili Zhang¹, Hui Zhang¹, Ruitong Wei¹, Kaizhou Xie² and Ran Wang^{1*}



Applied and Environmental
Microbiology®

FOOD MICROBIOLOGY

Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study

Conor J. Doyle^{1,2}, David Gleeson³, Paul W. O'Toole^{1,4}, Paul D. Cotter^{1,4}

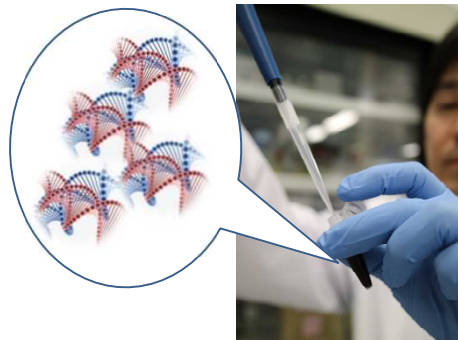
酵素等の情報を取得できるショットガンシーケンス

① サンプルを手に入れる

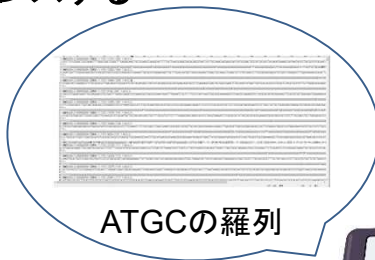


② サンプルからDNAを抽出する

サンプル中に存在していた微生物のDNAが混在している状態

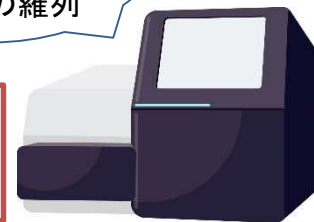


③ 次世代シーケンサーでまとめてシーケンスする

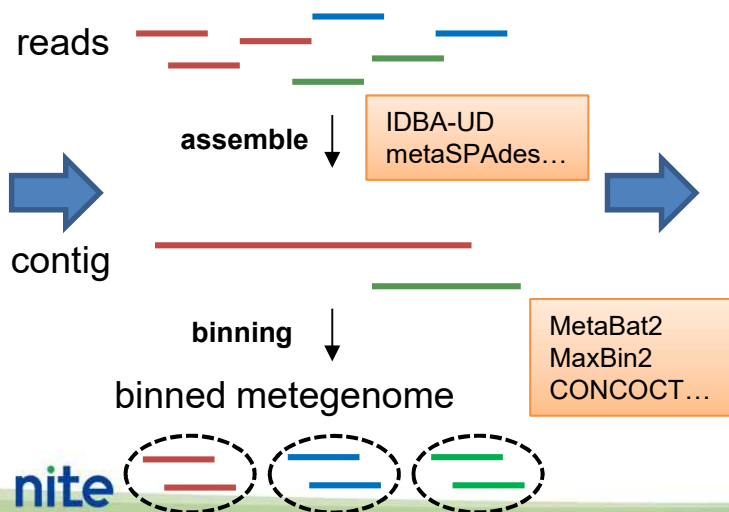


ATGCの羅列

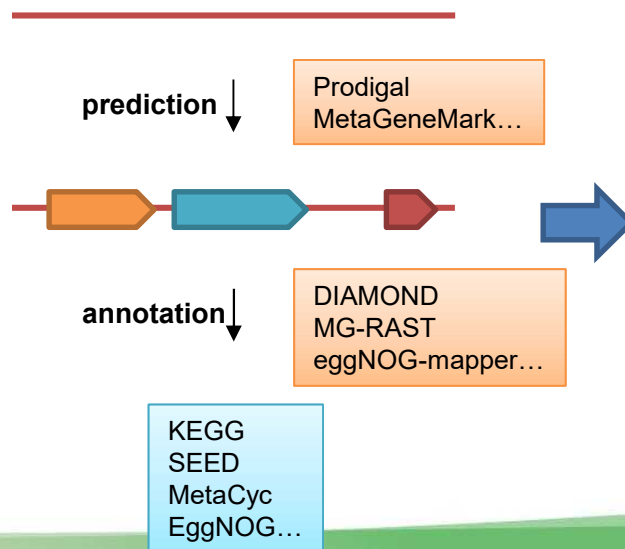
各サンプルあたり
数百万～数千万配列
取得



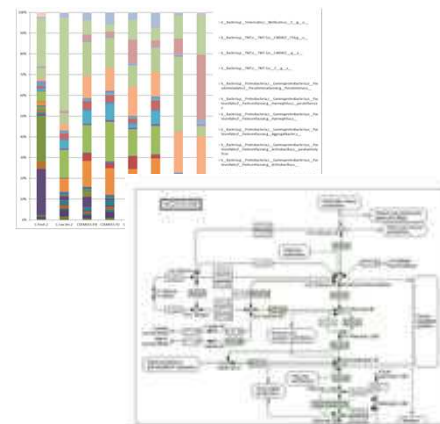
④ 配列をできるかぎりつなぎ(アセンブル)、必要な場合はbinningを行う



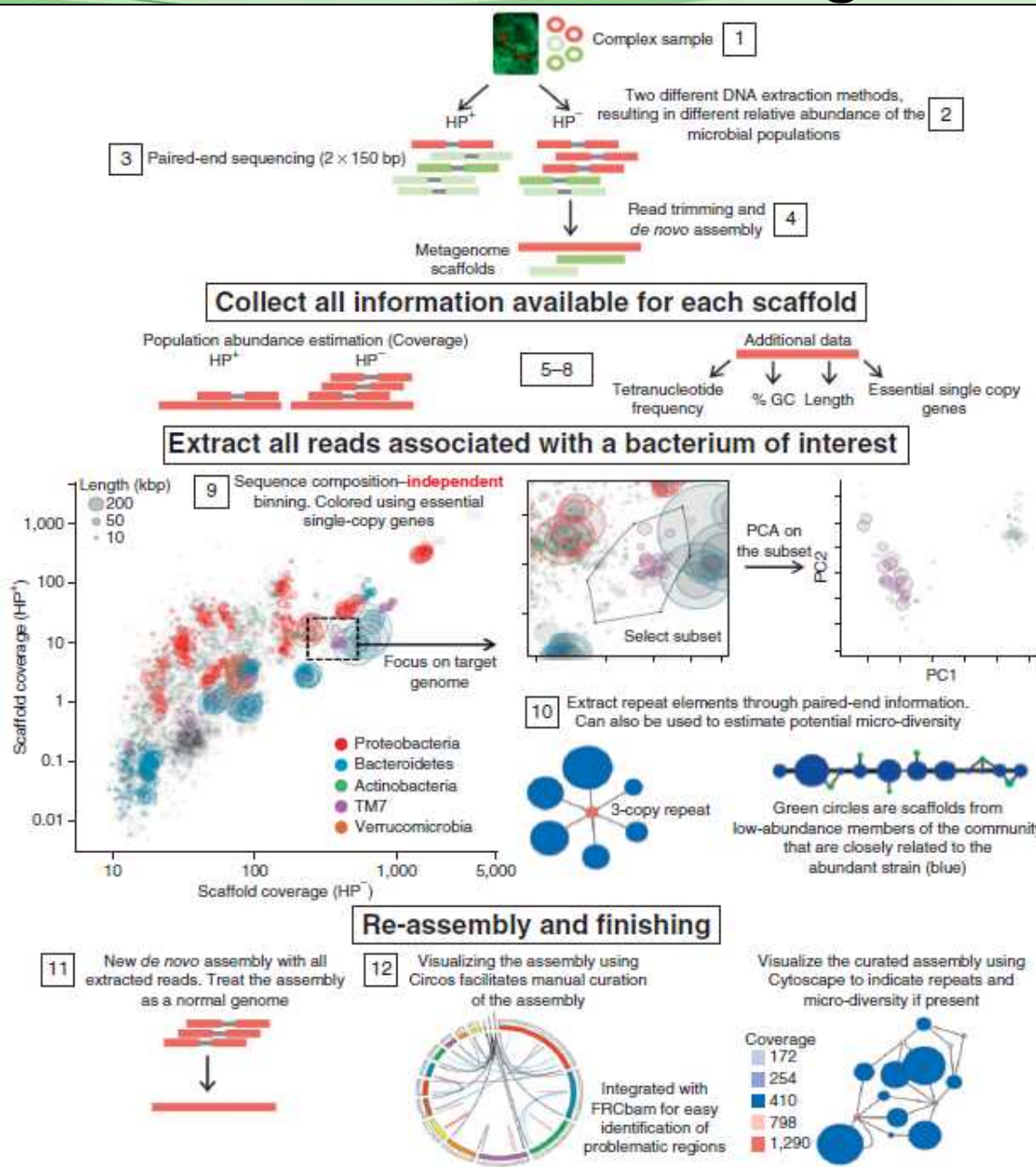
⑤ 遺伝子の予測とアノテーションを行う



⑥ 予測された遺伝子の構成や代謝経路の比較など、目的にあった解析を行う



ゲノムビンニング (genome binning)



本手法により、近年多くの未培養微生物群のゲノム情報が報告されている。中には完全長ゲノムもある。優先度の低い(1%以下)微生物群のゲノム解読も可能となっており、近年では大流行しているメタゲノム解析手法である。



未分離菌やマイクロバイオーム解析において、代謝のブラックボックス部分の予測に向けて非常に強力な手法となる。

Step1-4. ショットガンシーケンスによる複数の試料からメタゲノム配列を取得し、単独または複数のメタゲノム配列を用いて(co-)assemblyしてコンティグを得る。

Step5-8. 上記のコンティグをリファレンスとして、各試料由来のメタゲノム配列(リード)をマッピングし、試料ごとに各コンティグのcoverageを算出。また、GC含量等の情報を取得する。

Step9. 試料間でのコンティグの重複解読率の違い(differential coverage)を主な指標にコンティグのビンニングを行う。

Step10. マルチコピーのコンティグについての品質管理。

Step11-12. 得られたポピュレーションゲノムのフィニッシングと品質管理。

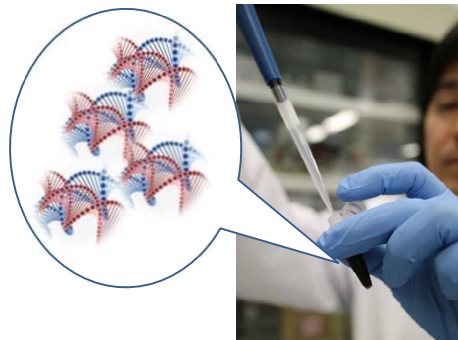
存在する微生物種を探るアンプリコンシーケンス

① サンプルを手に入れる



② サンプルからDNAを抽出する

サンプル中に存在していた微生物のDNAが混在している状態

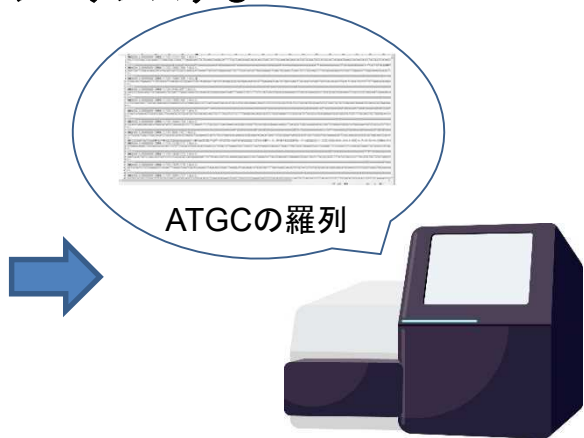


③ 細菌を識別するための遺伝子 (16S rRNA遺伝子)をPCR増幅する

16S rRNA遺伝子はどんな細菌でも持っている遺伝子種間でよく保存されている部分と、種によって少しずつ違う部分がある ← ここを増幅する



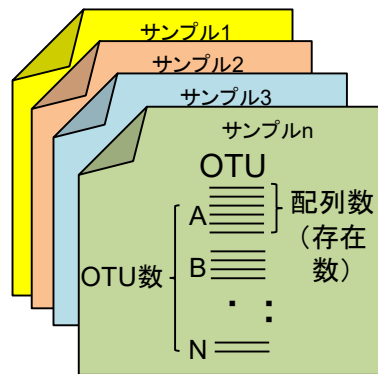
④ 次世代シーケンサーでまとめてシーケンスする



ATGCの羅列

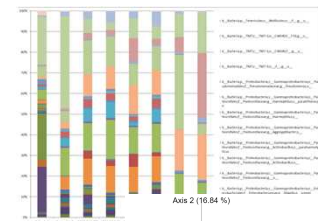
各サンプルあたり
数万～十万配列取得

⑤ 似ている配列をまとめ、各サンプル中におけるOTUの検出割合を算出

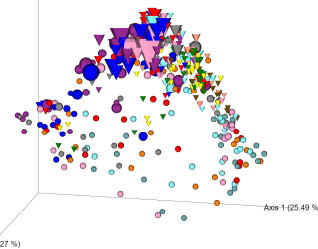


OTU:Operational Taxonomic Unit
あるいはASV:Amplicon Sequence Variant
(OTU/ASV数≒細菌の種類)

⑥ 各OTUの代表配列がどんな細菌であるか決定し、サンプル内の多様性やサンプル間の検出割合の違いを算出する



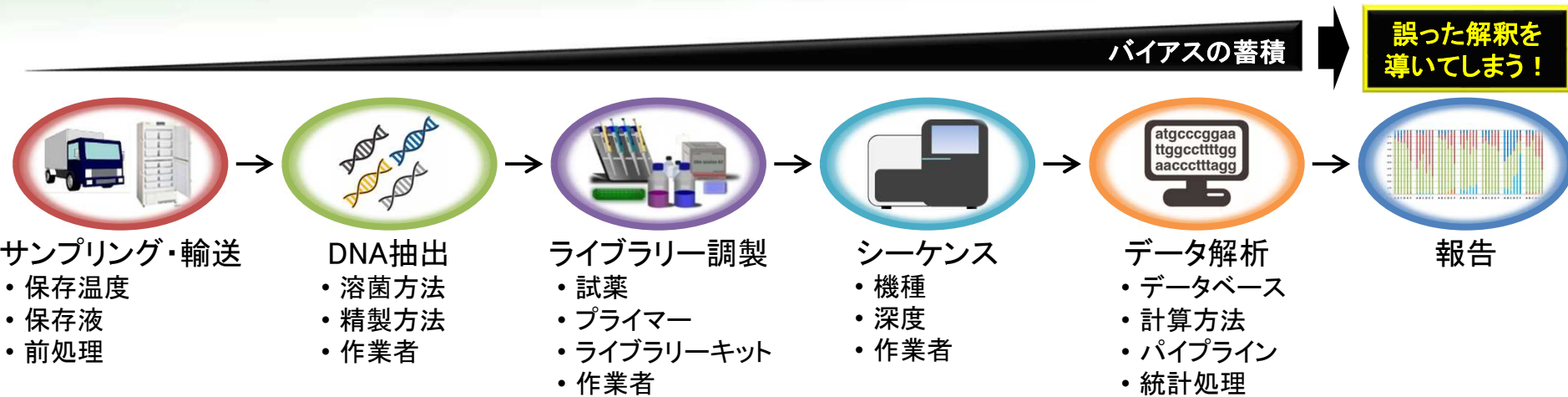
QIIME2
Claident...



その結果、本当に正しいですか、、、？

マイクロバイーム解析における課題

◎マイクロバイーム解析の作業工程

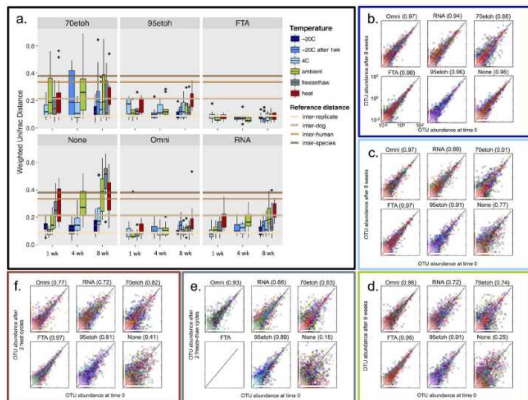


Preservation Methods Differ in Fecal Microbiome Stability, Affecting Suitability for Field Studies

Se Jin Song,^{a,b} Amnon Amir,^a Jessica L. Metcalf,^{a,b} Katherine R. Amato,^c Zhenjiang Zech Xu,^a Greg Humphrey,^a Rob Knight^{a,d}
mSystems (2016) 1(3):e00021-16.

サンプル保存液によるバイアス

保存液によっては、採取直後と一定期間保存後の評価結果が大きく変動する。

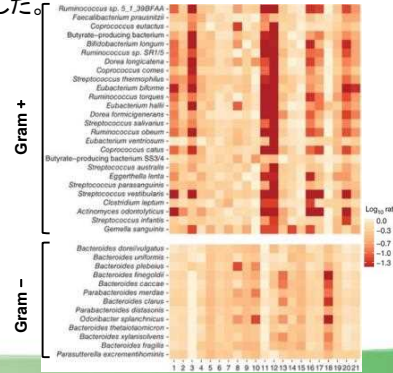


Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies

Paul I Costea¹, Georg Zeller¹, Shinichi Sunagawa^{1,2}, Eric Pelletier^{3,5}, Adriana Alberti¹, Florence Levenez⁶, Melanie Tramontano¹, Marja Driessen¹, Rajna Herczeg¹, Ferris-Elias Jung¹, Jens Roat Kultima¹, Matthew R Hayward¹, Luis Pedro Coelho⁴, Emma Allen-Vercos¹, Laurie Bertrand⁴, Michael Blaut¹, Jillian R M Brown¹, Thomas Carton¹, Stéphanie Cools-Tortier¹, Michelle Daigneault¹, Mariel Derrien¹, Anne Druessen¹, Willem M de Vos^{1,13,14}, B Brett Finlay¹¹, Harry J Flint¹⁵, Francisco Guarner¹⁶, Masahira Hattori^{17,18}, Hans Helwig¹², Ruth Ann Luna¹⁹, Johan van Hylkema Vlieg¹¹, Jana Junick⁸, Ingeborg Klymiuk²⁰, Philippe Langella⁶, Emmanuelle Le Chatelier⁶, Volker Mai²¹, Chaysavanh Manichanh¹⁶, Jennifer C Martin¹⁵, Clémentine Mery¹⁶, Hidetoshi Morita²², Paul W O'Toole⁹, Céline Orvain¹, Kiran Raosahab Patil¹, John Penders²³, Soren Persson²⁴, Nicolas Pons¹, Milena Popova¹¹, Anne Salonen¹¹, Delphine Saulnier⁶, Karen P Scott¹⁵, Bhargath Singh²⁵, Kathleen Slezak⁶, Patrick Veiga¹¹, James Versalovic¹⁹, Liping Zhao²⁶, Erwin G Zoetendal¹⁵, S Dusko Ehrlich²⁷, Joel Dore⁶ & Peer Bork¹
Nature biotechnology (2017), 35(11): 1069-1075.

DNA抽出方法によるバイアス

366の対象種のうち、90種はDNA抽出方法により大きく結果が変動した。

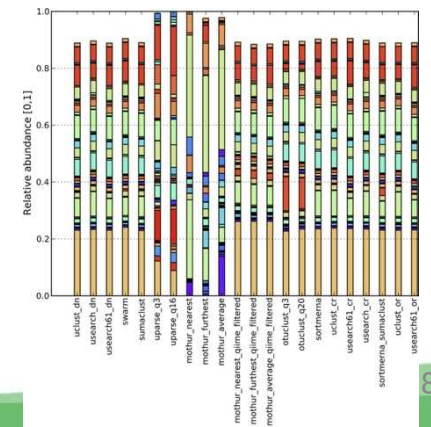


Open-Source Sequence Clustering Methods Improve the State Of the Art

Evguenia Kopylova,² Jose A. Navas-Molina,^{a,b} Céline Mercier,³ Zhenjiang Zech Xu,^a Frédéric Mahe,^a Yan He,^a Hong-Wei Zhou,^a Torbjorn Rognes,¹⁹ J. Gregory Caporaso,^b Rob Knight^{a,2}
mSystems (2016) 1(1):e00003-15.

データ解析方法違いによるバイアス

同一リードデータでもデータ解析アルゴリズム等の違いで結果が異なる。



実験手法を評価するための計測用レファレンス

- 微生物叢解析の信頼性向上には、実験手法を評価するために、**計測レファレンス(計量時の基準となる参照物質)**を利用することが有効です。
- NBRCでは、2019年5月に国産初の計測レファレンスとなる「NBRC微生物カクテル」の提供を開始しました。
- **2022年7月より「改良版NBRC微生物カクテル」を提供しています。**
- 「改良版NBRC微生物カクテル」は、15種類のNBRC株の菌体を等量混合した「**菌体カクテル**」と、ゲノムDNAを等量混合した「**DNAカクテル**」の2種類あります。



改良版

NBRC微生物カクテル

マイクロバイオーム(微生物叢)研究開発をサポート
 国産初の「NBRC 微生物カクテル」が改良され、新しくなりました。
 改良版の菌体カクテル(Cell-Mock-002)では、微生物細胞の混合方法を改良したことにより、従来品(Cell-Mock-001)と比べて均一性が大きく改善されています。
 微生物叢解析手法の評価やデータの品質管理などに是非ご活用ください。

NBRC微生物カクテルを使用したマイクロバイオーム解析工程

菌体カクテルの適用範囲: 検体の採取/保存, DNA抽出, ライブラリー調製, シーケンス解析, データ解析

DNAカクテルの適用範囲: 検体の採取/保存, DNA抽出, ライブラリー調製, シーケンス解析, データ解析

NBRC微生物カクテルのラインナップ

NBRCから提供する微生物カクテルには、15種のNBRC株の菌体(細胞)から構成された菌体カクテルと、ゲノムDNAから構成されたDNAカクテルの2種類があります。

菌体カクテル Cell-Mock-002	DNAカクテル DNA-Mock-002
菌体カクテルは15種のNBRC株を均等に混合し、それぞれの細胞数が等量となるよう混合したものです。 DNA抽出効率の異なるグラム陰性/陽性菌を混合しているため、DNA抽出における66kDaのバンドや一部の菌種を漏らしたアロトコントロールの検出などにおよぼす可能性があります。	DNAカクテルは、菌体カクテルの作製に使用した15種の菌株培養物からDNAを抽出し、それぞれのゲノムDNAのコピ数を等量となるよう混合したものです。 サイズやGC含量が異なるゲノムを混合しているため、シーケンスバイアスによる偏りやデータ解析方法の検証などにおよぼす可能性があります。
内容量 100 μL × 5本	内容量 30 μL × 1本
手数料 (税別) ¥23,650	手数料 (税別) ¥26,840
保存溶媒 15% glycerol in PBS (pH7.4)	保存溶媒 10mM Tris-HCl (pH8.5)
濃度 4 × 10 ⁹ cells/100 μL	濃度 50 ng/μL
保存形態 凍結 (-80°C)*	保存形態 凍結 (-80°C)*

*入手後は-80°Cのフリーザーで、凍結保存を行ってください。

お問い合わせ・資料窓口は裏面をご覧ください。

菌体カクテル Cell-Mock-002

内容量	100 μL × 5本
手数料 (税抜・送料別)	¥23,650
保存溶媒	15% glycerol in PBS (pH7.4)
濃度	4 x 10 ⁹ cells/100 μL
保存形態	凍結 (-80°C)

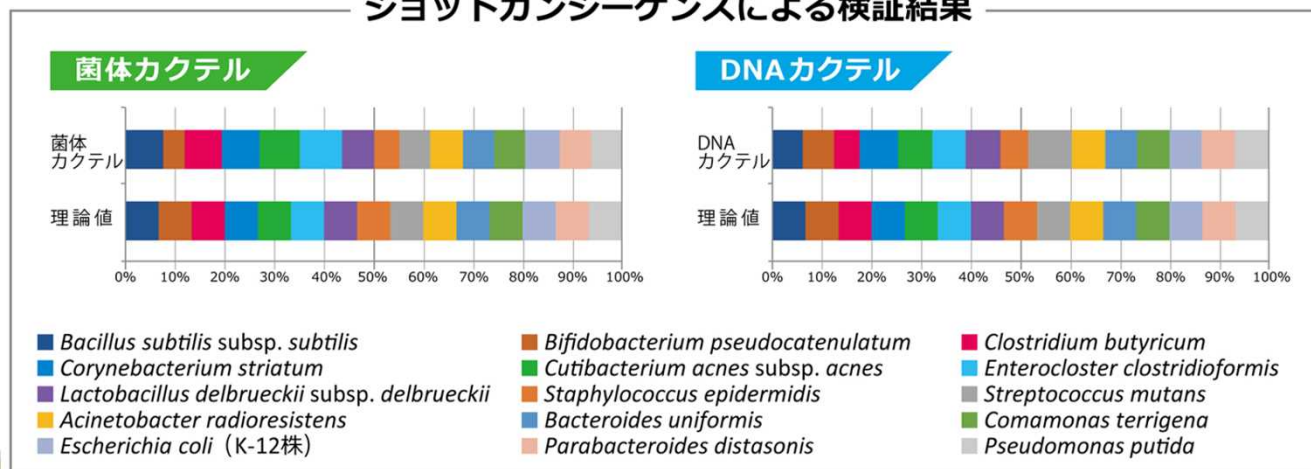
DNAカクテル DNA-Mock-002

内容量	30 μL
手数料 (税抜・送料別)	¥26,840
保存溶媒	10mM Tris-HCl (pH8.5)
濃度	50 ng/μL
保存形態	凍結 (-80°C)

NBRC微生物カクテルに含まれる15種の微生物

学名	NBRC 番号	グラム染色	ゲノムサイズ (Mbp)	GC含量 (%)	16S rRNA コピー数	バイオセーフティレベル
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	13719 ^T	陽性	4.3	43.3	10	1
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	113353	陽性	2.3	56.4	5	1
<i>Clostridium butyricum</i>	13949 ^T	陽性	4.7	28.8	11	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	陽性	3.1	59.1	4	1*
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	陽性	2.6	60.0	3	1*
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	陽性	5.7	48.9	5	1*
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	3202 ^T	陽性	1.9	50.1	8	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	陽性	2.5	32.0	6	1*
<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	陽性	2.0	36.9	5	1*
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	陰性	3.4	41.4	6	1*
<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	陰性	5.0	46.2	4	1*
<i>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	陰性	4.7	65.0	7	1*
<i>Escherichia coli</i> (K-12株)	3301	陰性	4.8	50.7	7	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	陰性	5.2	45.0	7	1*
<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	陰性	6.2	62.3	7	1*

ショットガンシーケンスによる検証結果



実験手法を評価するための計測用レファレンス

●NBRC微生物カクテルの特徴



幅広い分類群を
カバーした
15種の細菌株を使用



様々な環境
(腸内、口腔内、皮膚、
自然環境)から
検出される種を使用



DNA抽出が困難な
グラム陽性菌と
抽出が容易な陰性菌を
バランス良く混合



16S rRNA 遺伝子の
コピー数、
ゲノムサイズ、
GC 含量が多様



カクテル構成株は
NBRC株として
入手可能



カクテル構成株の
全ゲノム配列が
入手可能

●NBRC微生物カクテルの適用範囲



菌体カクテルの適用範囲




DNA カクテルの適用範囲

- 菌体カクテルは、DNA抽出効率が異なるグラム陽性/陰性菌を混合しているため、**DNA抽出における試薬の検討や実験プロトコルの検証などに適しています。**
- DNAカクテルは、サイズやGC含量が異なるゲノムを幅広く混合しているため、**シーケンスライブラリーの調製方法やデータ解析方法の確認などに適しています。**

1 菌叢解析におけるコントロール

ゲノムを用いた菌叢解析を行う際、毎回もしくは定期的に「NBRC微生物カクテル」をコントロールとして加え、菌叢解析データの信頼性を評価する。(精度管理)


予備実験



コントロールサンプル (NBRC 微生物カクテル)

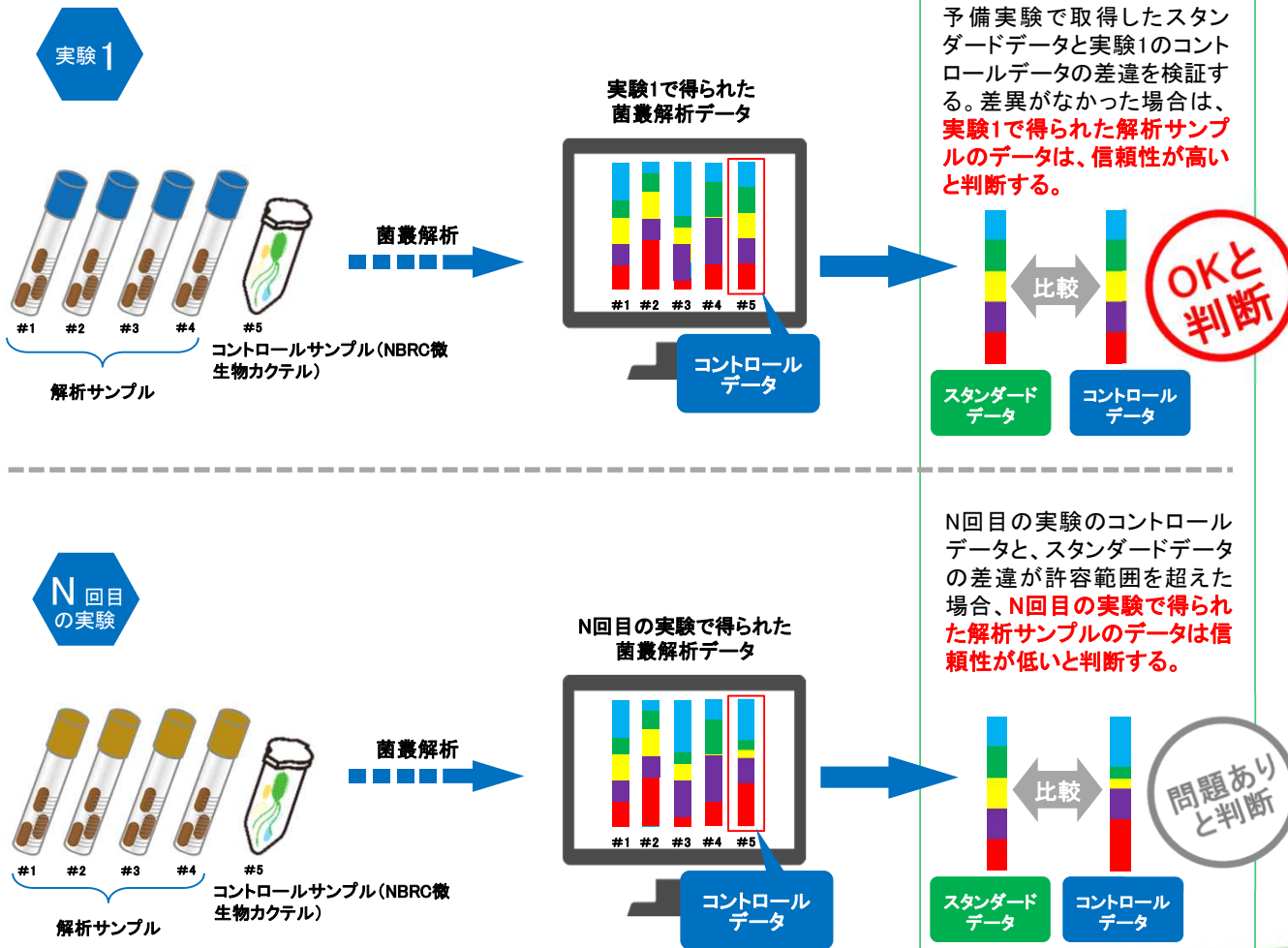
↓

菌叢解析



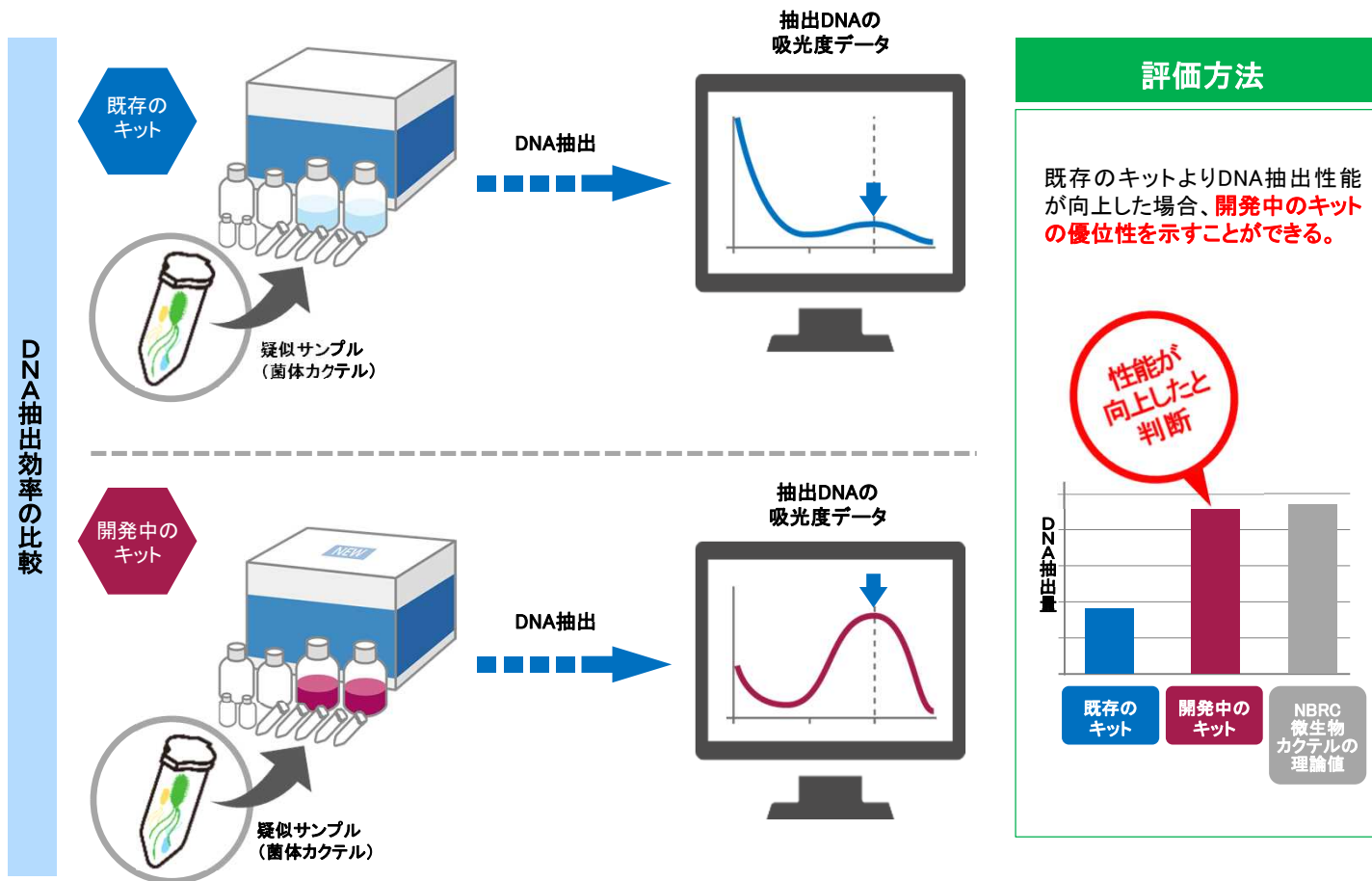
スタンダードデータ※

※コントロールサンプル (NBRC 微生物カクテル) を複数用いて、正しく実験を行った時に得られるデータを、スタンダードデータとして定めておく。



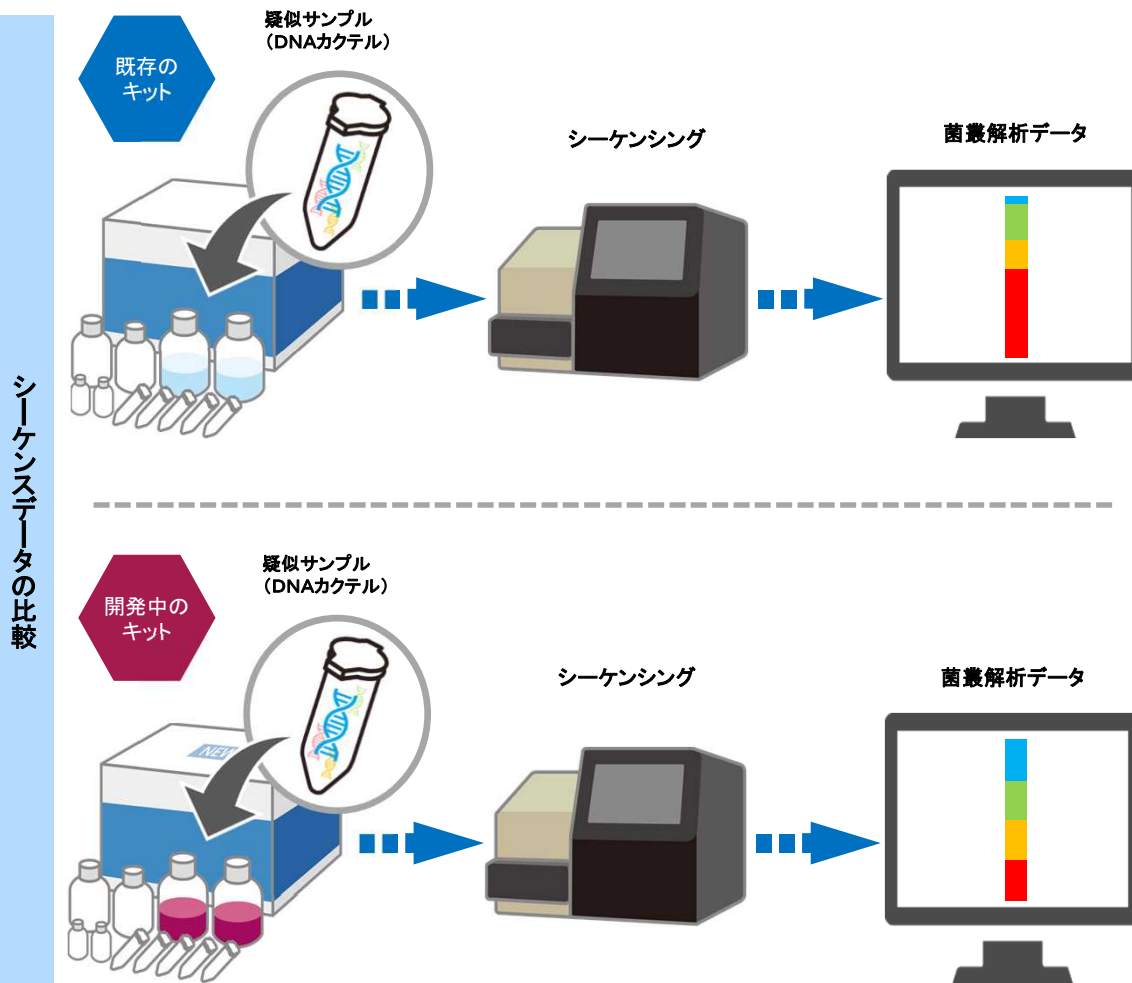
2 試薬・キットの開発における疑似サンプル

DNA抽出キットやシーケンシング試薬の開発をする際、疑似サンプルとして「NBRC微生物カクテル」を使用する。あらかじめ構成内容が明らかな「NBRC微生物カクテル」を用いることで、DNA抽出効率の性能やシーケンスデータの偏りを検証することができる。



2 試薬・キットの開発における疑似サンプル

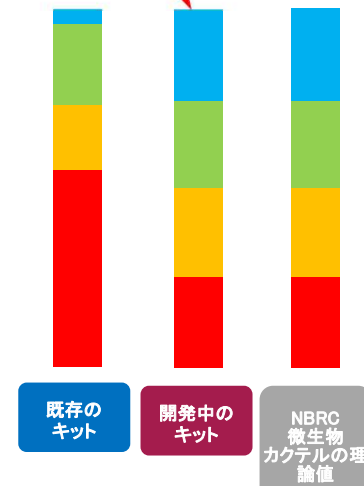
DNA抽出キットやシーケンシング試薬の開発をする際、疑似サンプルとして「NBRC微生物カクテル」を使用する。あらかじめ構成内容が明らかな「NBRC微生物カクテル」を用いることで、DNA抽出効率の性能やシーケンスデータの偏りを検証することができる。



評価方法

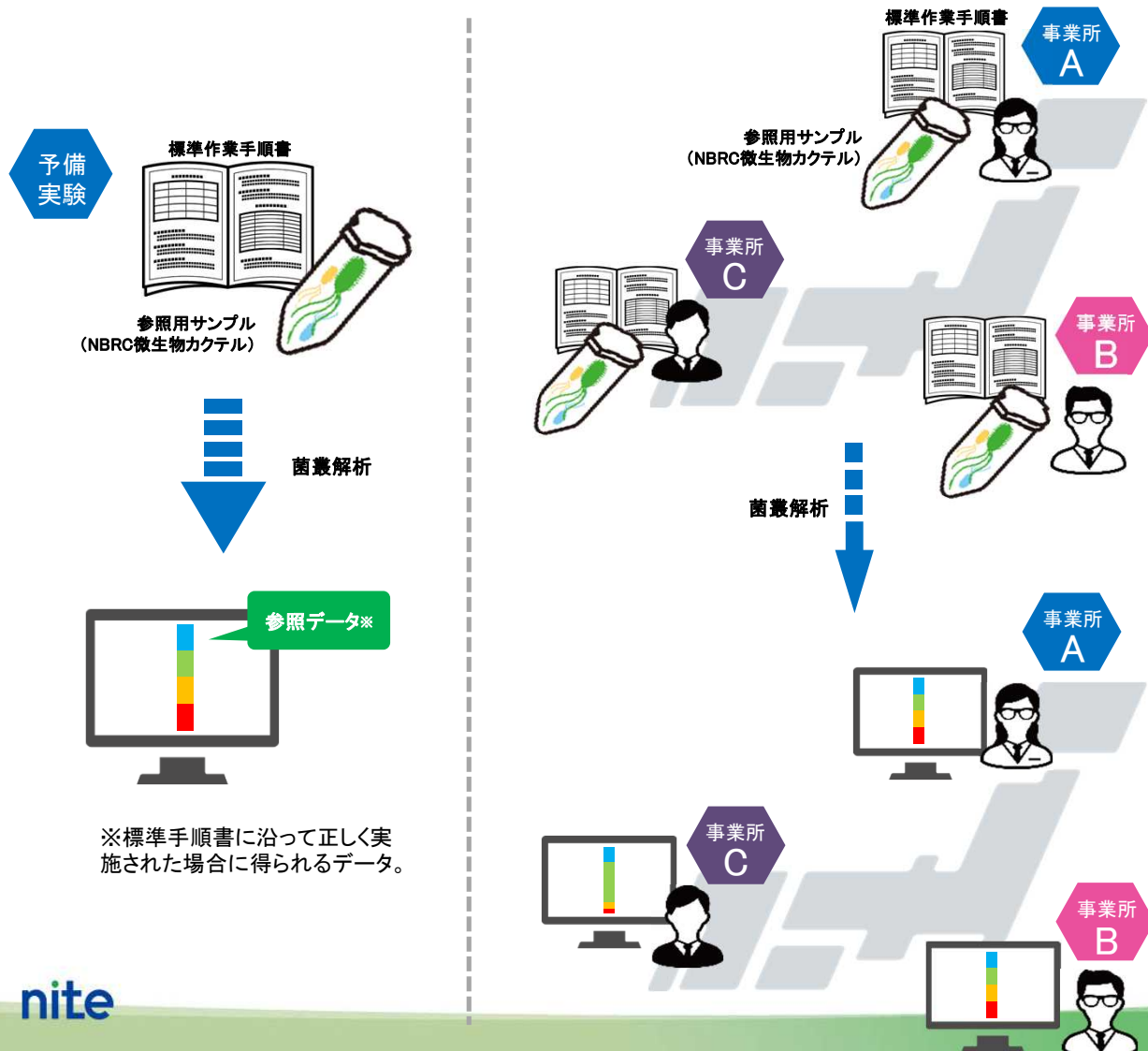
既存のキットより菌叢解析データが、理論値に近づいた場合、**開発中のキットの優位性を示すことができる。**

性能が向上したと判断



事業所・作業者ごとの精度管理用サンプル

異なる事業所・作業者において、標準作業手順書等に沿った作業が正しく実施されているかを確認する際に使用する。バイアル間差がほとんどない「NBRC微生物カクテル」を参照用サンプルとして使用することで、事業所・作業者間ごとのデータの精度管理を行うことができる。

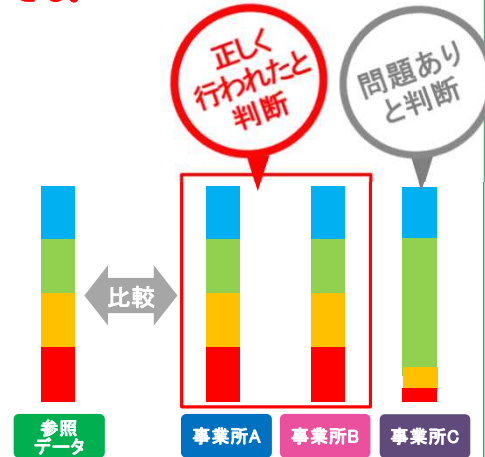


評価方法

予備実験で取得した参照データと、各事業所で得られたデータの差異を検証する。

事業所Aと事業所Bは参照データと取得されたデータに差異がないので作業が正しく行われていたと判断できる。

一方、事業所Cで取得されたデータには差異が生じているため、一連の作業中に問題があったと判断できる。



実際の利用実績例：DNA抽出キットの性能評価

ニッポン・ジーン | ホーム | 製品情報

遺伝子工学研究用試薬トップ

Winter Campaign

キャンペーンに関する注意事項

ISOSPIN Soil DNA

スピニングカラムを用いた土壌からのDNA抽出・精製キット

核酸抽出/精製

品名
ISOSPIN Soil DNA
Lysis Solution BB SP1

製造元 (株) ニッポン・ジーン

製品説明 | 製品内容 | 使用法

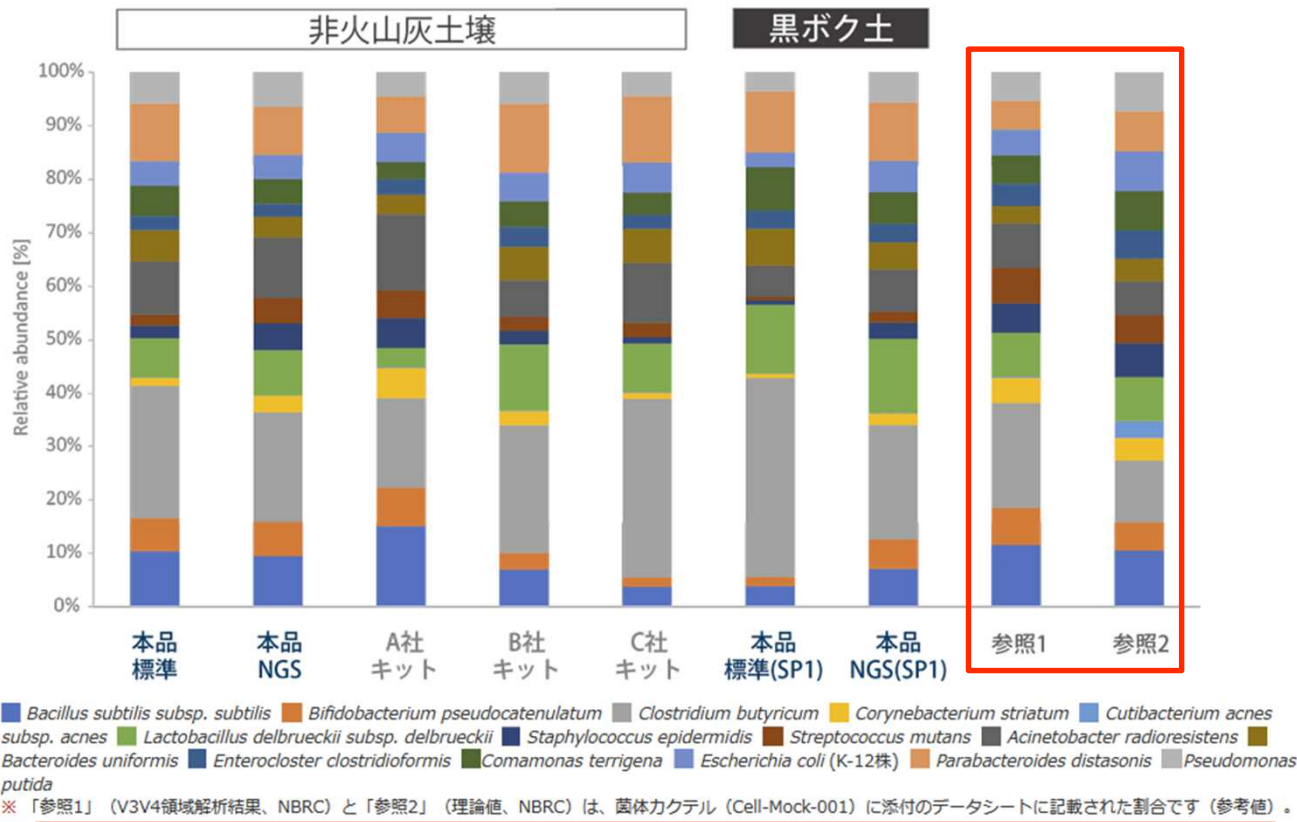
製品説明

ISOSPIN Soil DNA
ISOSPIN Soil DNA (アイソスピニング ソイル DNA) は、土壌からDNAを抽出・精製するためのキットです。

本キットでは、土壌に至適化した抽出液とビーズビーズの併用によって、非火山灰土壌だけでなく黒ボク土も効率よくDNAを抽出することが可能です。また、精製工程に特化したスピニングカラムを採用しており、フェノールやクロロホルムを使用することなく、迅速・簡便にDNAを精製することが可能です。

Data 3 NGSを用いた土壌細菌叢解析

オートクレーブ処理した土壌サンプル（非火山灰土壌、黒ボク土）に製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター（NBRC）の菌体カクテル（Cell-Mock-001）を添加し、本キットの各プロトコルでDNAを抽出し、16S rRNA遺伝子（V3V4領域）をNGS解析して比較しました。



結果

NGS用プロトコルで抽出したDNAの解析データは、NBRCが示す参考値と近い結果が得られました。また、黒ボク土においては、他社キット(A, B, C)で抽出したDNAでV3V4領域がPCRで増幅できなかったのに対して、本キットのNGSプロトコルでオプションのLysis Solution BB SP1（別売）を使用することで非火山灰土壌とほぼ同様の結果が得られました。

実験手法を評価するための計測用レファレンス

- 日本人のヒトマイクロバイオームを模したカクテル
- NEDO「新産業創出新技術先導研究プログラム」ヒトマイクロバイオームの産業利用に向けた解析技術および革新的制御技術の開発(2018~2020年)において、日本マイクロバイオームコンソーシアム(JMBC)から公開されている**日本人のヒトマイクロバイオーム解析の推奨プロトコル**^{1,2)}策定のために開発されました。
- 本カクテルは、**推奨プロトコルの検証に最適な参照用サンプル**です³⁾。

- 1) Tourlousse, D.M., et al., Microbiome, 9, 95 (2021).
- 2) <https://jmbc.life/news/images/SOPv1.2.pdf>
- 3) Tourlousse, D.M., et al., Microbiology Spectrum, 10(2): e01915-21 (2022).

2022年1月13日 提供開始
ヒトマイクロバイオーム研究開発をサポート
NBRCヒト常在微生物カクテル
糞便・口腔・皮膚などの常在菌を中心とした20種類の微生物で構成

菌名	学名	NBRC番号	形状	サイズ(μm)	培養性	検出率	検出部位
細菌	Anaerostipes coccus	114412	球形	3.3	44.5	4	1
	Bifidobacterium longum	114370	桿状	2.6	60.1	5	1
	Bifidobacterium longum subsp. longum	114404	桿状	2.5	60.1	4	1
	Blautia sp.	113351	桿状	6.2	46.7	5	1*
	Callineella aerofaciens	114304	桿状	2.3	60.3	5	1*
	Enterococcus clostridioformis	113352	桿状	5.7	48.9	5	1*
	Filimonaxactor plautii	113405	桿状	4.3	60.4	3	1
真菌	Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii	3202†	桿状	1.9	50.1	8	1
	Ruminococcus gnavus	114413	桿状	3.8	42.5	5	1
	Akkermansia muciniphila	114322	桿状	2.8	55.7	3	1
	Bacteroides uniformis	113350	桿状	5.0	46.2	4	1*
	Escherichia coli (Ec-1210)	3381	桿状	4.8	50.8	7	1
	Megamonas funiformis (DNA-Mock-003 7/3)	114415	桿状	2.5	31.5	6	1
	Megamonas massiliensis (DNA-Mock-003 0/3)	114414	桿状	2.6	50.6	7	1
	Parabacteroides distasonis	113366	桿状	5.2	45.0	7	1*
口腔	Streptococcus mutans	13953†	桿状	2.0	36.9	5	1*
皮膚	Cutibacterium acnes subsp. acnes	113369	桿状	2.6	60.0	3	1*
皮膚	Staphylococcus epidermidis	113346	桿状	2.5	32.2	6	1*
皮膚	Bacillus subtilis subsp. subtilis	13719†	桿状	4.3	43.3	10	1
皮膚	Pseudomonas putida	14164†	桿状	6.2	62.3	7	1*

※同世代・交付前口は裏面をご覧ください

菌体カクテル Cell-Mock-003

内容量	500 μL
手数料 (税抜・送料別)	¥ 16,390
保存溶媒	15% glycerol in PBS (pH7.4)
濃度	2 x 10 ¹⁰ cells/500 μL
保存形態	凍結 (-80°C)

DNAカクテル DNA-Mock-003

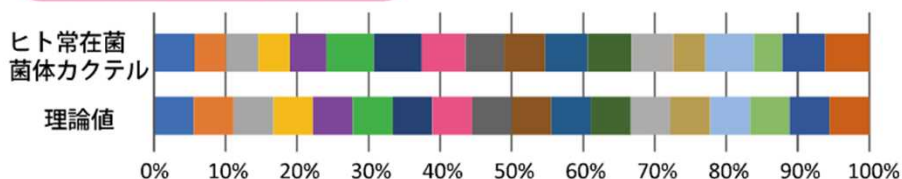
内容量	30 μL
手数料 (税抜・送料別)	¥ 28,270
保存溶媒	10mM Tris-HCl (pH8.5)
濃度	50 ng/μL
保存形態	凍結 (-80°C)

NBRCヒト常在微生物カクテルに含まれる20種の微生物

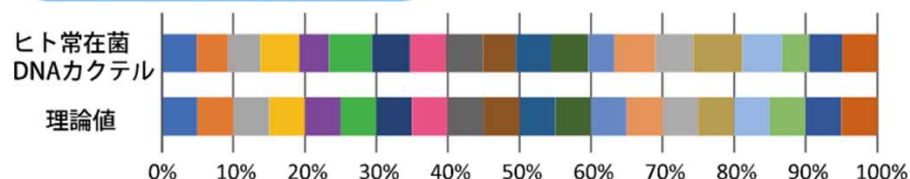
由来部位	学名	NBRC番号	グラム染色	ゲノムサイズ (Mbp)	GC含量 (%)	16S rRNA コピー数	バイオセーフティレベル
糞便	<i>Anaerostipes caccae</i>	114412	陽性	3.3	44.5	4	1
	<i>Bifidobacterium longum</i>	114370	陽性	2.6	60.1	5	1
	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	114494	陽性	2.5	60.1	4	1
	<i>Blautia</i> sp.	113351	陽性	6.2	46.7	5	1*
	<i>Collinsella aerofaciens</i>	114504	陽性	2.3	60.3	5	1*
	<i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	陽性	5.7	48.9	5	1*
	<i>Flavonifractor plautii</i>	113805	陽性	4.3	60.4	3	1
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	3202 ^T	陽性	1.9	50.1	8	1
	<i>Ruminococcus gnavus</i>	114413	陽性	3.8	42.5	5	1
	<i>Akkermansia muciniphila</i>	114322	陰性	2.8	55.7	3	1
	<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	陰性	5.0	46.2	4	1*
	<i>Escherichia coli</i> (K-12株)	3301	陰性	4.8	50.8	7	1
	<i>Megamonas funiformis</i> (DNA-Mock-003のみ)	114415	陰性	2.5	31.5	6	1
	<i>Megasphaera massiliensis</i> (DNA-Mock-003のみ)	114414	陰性	2.6	50.6	7	1
	<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	陰性	5.2	45.0	7	1*
口腔	<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	陽性	2.0	36.9	5	1*
皮膚	<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	陽性	2.6	60.0	3	1*
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	陽性	2.5	32.2	6	1*
その他	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	13719 ^T	陽性	4.3	43.3	10	1
	<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	陰性	6.2	62.3	7	1*

ショットガンシーケンスによる検証結果

ヒト常在菌菌体カクテル



ヒト常在菌 DNA カクテル



グラフの色は、カクテルに混合されているヒト常在微生物の検出割合を示しています。

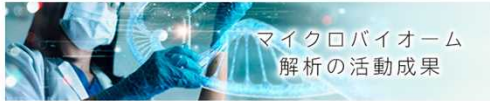
日本人のヒトマイクロバイオーム解析の推奨プロトコル



English お問い合わせ
JMBCとは 活動成果 JMBC組織 情報公開 活動スケジュール 入会案内



ヒト微生物叢の素顔を捉え、
医療と健康の未来を共創する



マイクロバイオーム
解析の活動成果

TOPICS

<https://jmbc.life/>

- NBRCヒト常在微生物カクテルと同時に開発されました。
- 先行研究で開発されたprotocol Q¹)と同等のDNA抽出効率で、より短時間で簡便な方法です。
- 誰でも利用することができます。
- 各種NBRC微生物カクテルの品質検証にも利用しています。

1) Costea, P.I., et al., Nat Biotechnol. 35(11):1069–76 (2017).



English お問い合わせ
JMBCとは 活動成果 JMBC組織 情報公開 活動スケジュール 入会案内



活動成果

マイクロバイオーム解析のための推奨プロトコルを公開しました

JMBCは、国立研究開発法人 産業技術総合研究所（産総研）、独立行政法人 製品評価技術基盤機構（NITE）、および国立研究開発法人 理化学研究所（理研）と共同で、マイクロバイオームを次世代シーケンサーで解析するための推奨プロトコルを開発し、下記URLにて公開いたしました。

推奨プロトコルURL：[JMBC糞便メタゲノム解析推奨プロトコルver.2.1](https://jmbc.life/sop/index.html)

本プロトコルは、国立研究開発法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構の「NEDO 先導研究プログラム/新産業創出新技術先導研究プログラム/ヒトマイクロバイオームの産業利用に向けた、解析技術および革新的制御技術の開発」（2018年度～2020年度）による支援を受けて開発されました。
本プロトコルの開発にあたり、様々な条件検討などの詳細については、下記論文に詳細なデータと共に掲載されています。本プロトコルを利用した研究成果の学会・論文発表等を行う場合は、以下の論文を引用くださいますようお願いいたします。

Tourlousse D. M., Narita K., Miura T., Sakamoto M., Ohashi A., Shiina K., Matsuda M., Miura D., Shimamura M., Ohyama Y., Yamazoe A., Uchino Y., Kameyama K., Arioka S., Kataoka J., Hisada T., Fujii K., Takahashi S., Kuroiwa M., Rokushima M., Nishiyama M., Tanaka Y., Fuchikami T., Aoki H., Kira S., Koyanagi R., Naito T., Nishiwaki M., Kumagai H., Konda M., Kasahara K., Ohkuma M., Kawasaki H., Sekiguchi Y., Terauchi J. Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for metagenomics-based human fecal microbiome measurements. Microbiome 9:95 (2021).

論文URL：<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-021-01048-3>
関連TOPICS：<http://www.jmbc.life/news/images/2021.04.29.pdf>

2021/6/30

<https://jmbc.life/sop/index.html>

NBRC微生物カクテルは検証値を公表しています

データシート

NBRC微生物菌体カクテル (NBRC Microbial Cell Cocktail)

製品名 Cell-Mock-002

ロット番号 210701KC



抽出効率が証明されている方法 (JMBCのSOP) を用いています

1. 仕様

- ・ 内容量 100 μ L \times 5本
- ・ 細胞数 3.7×10^9 cells/100 μ L
- ・ 保存溶媒 15% glycerol in PBS (pH7.4)
- ・ 保存形態 -80°C
- ・ 構成 本製品は、NBRCが保有する微生物株のうち、15株を使用し、それぞれの細胞数が等量となるよう混合したものです。

表1 Cell-Mock-002の作製に使用した微生物株^{※1}の情報

学名	NBRC番号	グラム染色	ゲノムサイズ (Mbp)	GC含量 (%)	16S rRNA コピー数	バイオセーフティレベル
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	13719 ^T	陽性	4.3	43.3	10	1
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	113353	陽性	2.3	56.4	5	1
<i>Clostridium butyricum</i>	13949 ^T	陽性	4.7	28.8	11	1
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	陽性	3.1	59.1	4	1*
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	陽性	2.6	60.0	3	1*
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	陽性	5.7	48.9	5	1*
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	3202 ^T	陽性	1.9	50.1	8	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	陽性	2.5	32.0	6	1*
<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	陽性	2.0	36.9	5	1*
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	陰性	3.4	41.4	6	1*
<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	陰性	5.0	46.2	4	1*
<i>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	陰性	4.7	65.0	7	1*
<i>Escherichia coli</i>	3301	陰性	4.8	50.7	7	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	陰性	5.2	45.0	7	1*
<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	陰性	6.2	62.3	7	1*

※1: 本製品に使用した微生物はNBRCにおいて品質確認されたもので、個別に購入できます。

2. 検証結果 (ロット)

2-1. DNA抽出結果

- ・ 日本マイクロバイオームコンソーシアム (JMBC) から公開されているSOP^{※2}に従い、本ロット内の6サンプルからビーズ法 (ISOSPIN Fecal DNA (ニッポンジーン社)) によるDNA抽出を行いました。
- ・ Quant-iTTM PicoGreenTM dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific社) を用いて濃度を測定しました。

表2 210701KCのDNA抽出量

DNA抽出量	
理論DNA量 ^{※3}	ビーズ法 ^{※4}
16.0 μ g	4.98 \pm 0.13 μ g

※2: <https://jmbc.life/news/images/2021.06.30.pdf>

※3: チューブ1本 (3.7×10^9 cells/100 μ L) に含まれるDNA量の理論値。

※4: ビーズ法にて抽出されたDNA量

2-2. 各株の検出割合

2-1.で抽出したDNA溶液を用いて、JMBCのを行い、MiSeqシステム (Illumina社) による。

ロット毎に検証値を公表しています

表3 ショットガンシーケンス解析による15株の検出割合

学名	NBRC番号	理論値 (%)	各株の検出割合 (%) ^{※5}
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	13719 ^T	6.7	7.6 \pm 0.0
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	113353	6.7	4.3 \pm 0.1
<i>Clostridium butyricum</i>	13949 ^T	6.7	7.5 \pm 0.1
<i>Corynebacterium striatum</i>	15291 ^T	6.7	7.6 \pm 0.1
<i>Cutibacterium acnes</i> subsp. <i>acnes</i>	113869	6.7	8.1 \pm 0.0
<i>Enterocloster clostridioformis</i>	113352	6.7	8.5 \pm 0.0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	3202 ^T	6.7	6.5 \pm 0.2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	113846	6.7	5.1 \pm 0.0
<i>Streptococcus mutans</i>	13955 ^T	6.7	6.2 \pm 0.0
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	102413 ^T	6.7	6.6 \pm 0.0
<i>Bacteroides uniformis</i>	113350	6.7	6.3 \pm 0.1
<i>Comamonas terrigena</i>	13299 ^T	6.7	6.2 \pm 0.1
<i>Escherichia coli</i>	3301	6.7	7.0 \pm 0.0
<i>Parabacteroides distasonis</i>	113806	6.7	6.3 \pm 0.0
<i>Pseudomonas putida</i>	14164 ^T	6.7	6.2 \pm 0.0

※5: ショットガンシーケンス解析による各株の検出割合の平均と標準偏差 (n=3)。

謝辞

NITE/NBRC

Hiroko Kawasaki
Yoshihito Uchino
Atsushi Yamazoe
Masataka Furukawa
Yoshifumi Ohyama
Mamiko Shimamura

RIKEN-JCM

Moriya Ohkuma
Mitsuo Sakamoto

東北大学

Ritsuko Shimizu
Sakae Saito
Maki Goto

NITE/NBRC

生物資源利用促進課 分譲室のみなさま

産業技術総合研究所

Yuji Sekiguchi
Dieter M. Turlousse
Akiko Ohashi
Keita Shiina
Masami Matsuda
Daisuke Miura

九州大学

Jiro Nakayama
Riko Mishima

医薬基盤・健康・栄養研究所

Jun Kunisawa
Koji Hosomi

日本マイクロバイオーームコンソーシアム

Jun Terauchi,
Koji Narita
Ken Kasahara,
Keishi Kameyama
Shingo Arioka
Jiro Kataoka
Takayoshi Hisada
Kazuyuki Fujii
Shunsuke Takahashi
Miho Kuroiwa
Masatomo Rokushima

Mitsue Nishiyama
Yoshiki Tanaka
Takuya Fuchikami
Hitomi Aoki
Ryo Koyanagi
Takeshi Naito
Morie Nishiwaki
Hirotaka Kumagai
Mikiko Konda

ご清聴ありがとうございました

ご不明な点がありましたらお気軽にご連絡ください。

〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8
独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)
バイオテクノロジーセンター(NBRC)

(技術/内容に関するお問い合わせはこちら)
産業連携推進課

E-mail: bio-sangyo-inquiry@nite.go.jp

TEL: 0438-20-5764

URL:

<https://www.nite.go.jp/nbrc/industry/microbiome/index.html>

(提供/依頼に関するお問い合わせはこちら)
生物利用資源促進課

E-mail: mock@nite.go.jp

TEL: 0438-20-5763

URL: <https://www.nite.go.jp/nbrc/cultures/cocktail/index.html>