

メガウイルス科の DNA ポリメラーゼ遺伝子を標的とするアンプリコン解析

Amplicon analysis of Megaviridae DNA polymerase gene

京都大学 化学研究所 バイオインフォマティクスセンター 化学生命科学領域 李岩沢

研究成果概要

本研究では、京都大学化学研究所スーパーコンピュータシステムを利用し、京都大学農学研究科との共同でメガウイルス科の DNA ポリメラーゼ遺伝子を標的とするプライマーを用いて、アンプリコン解析を行いました。

メガウイルス科は、核細胞質性大型 DNA ウイルス(Nucleocytoplasmic Large DNA Virus, NCLDV)と称するウイルス群内の一系統群である。一般的には、粒子径が 0.2 マイクロメートル以上、ゲノム長 30 万塩基対以上で、真核生物を宿主として海洋に大量に存在することが先行研究により明らかにされている。海洋藻類への感染による物質循環への大規模な影響も予想されている。海洋微生物の多くが実験室で培養することが困難であり、その結果、海洋ウイルスの多くがやはり難培養である。その障壁を乗り越える技術が「次世代配列解析技術(NGS)による環境ゲノム解析」である。特に、NGS による「アンプリコン配列解析」は、特定のゲノム領域にみられる遺伝的変異を解析する解析手法である。アンプリコン配列解析を行うためには、標的遺伝子を増幅するための PCR プライマーが必要であるが、ウイルスは共通遺伝子 (e.g. 16 rRNA) を欠くことから、適切なプライマーが不足している。メガウイルスの生態的な理解は進んでいない。本研究では、新規設計したメガウイルス特異的高度縮退プライマーによるアンプリコン解析を行った。

大阪湾の細菌画分 DNA をテンプレートに、メガウイルスプライマー82 セットを用いて PCR を行った。82 個のメガプライマー対は DNA ポリメラーゼ C-末端の同一の領域を標的とする。しかし、プライマーの位置に多少の相違があるため、メガプライマーアンプリコン配列解析のための新規解析パイプラインを確立する必要がある。具体的には、プライマーの除去などの通常の操作に加えて、翻訳フレームの同定、末端整形処理、BLAST と PPLACER ソフトウェアを利用した非特異的増幅産物の除去等からパイプラインは構成される。そして、核酸配列レベル、タンパク質配列レベルで複数の配列類似度閾値を設けて CD-HIT により OTU (操作的分類単位) 化を行った。希釈曲線(Rarefaction curve)法を利用し、OTU 化のための適切な閾値を確定し、サンプルの α 多様性解析を行った。引き続き、サンプル間の β 多様性解析を進めていく予定である。

発表論文(謝辞あり)

発表論文(謝辞なし)

本年度は共になし。