

PCR 法による細菌群集構造解析に用いられるユニバーサルプライマーの比較

Comparison of universal primer sets for bacterial community structure analyses by PCR

学籍番号 66840

氏名 田崎 彩 (Tazaki Aya)

指導教官 佐藤 弘泰 准教授

1. はじめに

現在、活性汚泥中の細菌群集構造解析は分子生物学的な方法で行なわれることが多い。分子生物学的手法は PCR 法の出現により DNA を人工的に操作・増幅することが可能となったことで可能となった。

しかし、従来の分離に基づいた手法に比べると分子生物学的手法が利用されるようになってからさほど時間は経っていない。分子生物学的手法には完璧といえるような方法は今のところ存在せず、様々な方法がならびたち、それぞれに利点や欠点がある。そこで、可能であればそれらを比較検討し、もっとも適切な手法を選ぶことが必要である。特に、PCR 法におけるバイアスは大きな影響を与える。PCR におけるバイアスの要因は複数ありうるが、なかでも環境中の全細菌を対象とした群集構造解析ではプライマーセットの違いが解析結果に違いをもたらしている可能性が高い。

全細菌を対象とした群集構造解析では、全ての細菌に存在し解析に適した長さで構造をしている 16S rRNA 遺伝子を解析対象とすることが多い。現在行われている研究では、試料から全 DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーで 16S rRNA 遺伝子を特異的に PCR 増幅したものを様々な解析へと用

いる方法が最も主流な手法となっている。ユニバーサルプライマーは環境中の全細菌の 16S rRNA を対象とするプライマーであるが、何種類も存在し、全細菌を対象にしても厳密にはそれぞれ検出可能な細菌群に相違があることが予想される。そのため、異なるユニバーサルプライマーで細菌群集構造の解析を行うと結果に偏りがでると考えられる。

そこで、本研究は活性汚泥中の細菌群集構造解析を解析する際のユニバーサルプライマー間の種特異性の比較を試みた。

解析手法としては、様々な解析技術の中から、T-RFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) 法、単一 DNA を抽出し系統分類を行えるクローニング法およびウェブ上データベースで解析を行う *in silico* 解析を組み合わせて行うこととした。

本研究で主たる解析手法とした T-RFLP 法は、末端に蛍光標識したプライマーを用いて PCR 反応を行ない、得られた増幅産物を制限酵素で処理し、標識された側の断片の長さによって分離する手法である。細菌種によって異なる制限酵素切断断片長 (T-RFs) を与えることで、群集構造を解析することが可能となる。Liu *et al.* (1997) によって環境微生物の群集解析を目的として

開発され、微生物種の差異を簡単に識別する方法として用いられる。この手法を用いれば、例えば次のようなことが可能となる。フォワードプライマーA を標識し、トリバースプライマーB および B'は標識しないとする。A, B, B'が全て理想的に全細菌を捉えるものとする、AB を用いたときと AB' を用いたときでは同じ結果が得られるはずである。しかし、B の方が B'よりも広く捉えたとすると、B の方が多くの断片を得ることができるであろう。

2. 実験方法

(1) 活性汚泥試料採取

国内4箇所 (M、N、S、O) の下水処理場と北京工業大学で運転されている実下水を用いたリアクター7種類 (SBR-1、SBR-2、STEP-AO、MUCT、CD、A2N、AnO) から汚泥を採取し実験に供した。

(2) PCR

試料から抽出した DNA を鋳型に真正細菌を増幅対象としているユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅させた。本研究で用いたユニバーサルプライマーを表1に示した。

表1. ユニバーサルプライマー

Name	Sequence (5'→3')
27f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
357f	CTCCTACGGGAGGCAGCAG
530f	GTGCCAGCMGCCGCGG
519r	GWATTACCGCGGCKGCTG
907r	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT
1100r	GGGTTGCGCTCGTTG
1392r	ACGGGCGGTGTGTRC
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT

(3) T-RFLP 法

フォワードプライマーを FAM で蛍光標識した。PCR 増幅産物を制限酵素 (*HhaI*、

MspI および *RsaI*) で消化し長さの分布を調べた。得られた T-RFs (terminal restriction fragments) のデータから、異なるプライマーセットで分析した結果を比較するためにピアソン相関係数を計算し、MEGA4 で UPGMA 法によりクラスター解析した。

(4) Cloning/Sequencing

T-RFLP 解析の結果、プライマーセットにより T-RFs の高さが異なっていたものを中心にクローニングを行い、得られたクローンの塩基配列をシーケンスにより決定した。決定した塩基配列は BLAST により同源性検索を行なった。

(5) *in silico* 解析

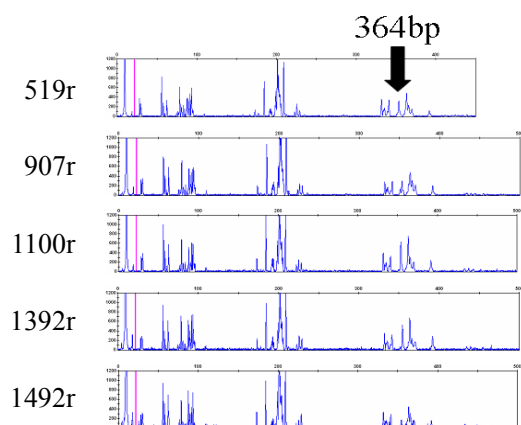
RDP II (Ribosomal Database Project II : <http://rdp.cme.msu.edu/>) に登録されている rRNA の塩基配列のデータベースや MiCA3 (Microbial Community Analysis 3 : <http://mica.ibest.uidaho.edu/>) の Virtual Digest (ISPaR) という機能を用いて *in silico* 解析を行った。これにより、T-RFs に該当する細菌種を推測した。

3. 実験結果と考察

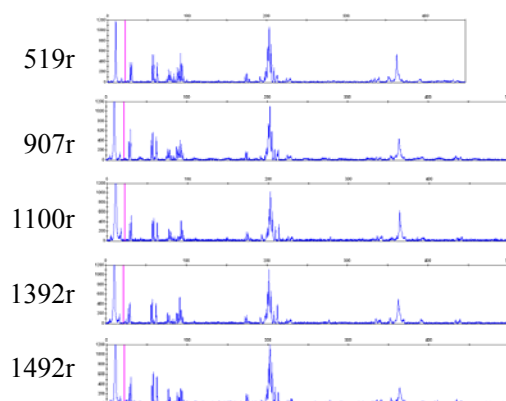
T-RFLP 解析の結果、同一試料、同一フォワードプライマーならばリバースプライマーが異なっても似通った結果が得られた。その結果の例を図1に示す。図1に示した結果は制限酵素として *HhaI* を用いたものである。なかには、M 下水処理場でフォワードプライマー27f、357f や北京工業大学 STEP-AO、27f、357f を用いた場合のように特定のピークの大きさがリバースプライマーにより異なる結果も少数だが得られた。

また、得られたピーク数は 27f が一番多く、530f はピーク数が最も少なかった。細

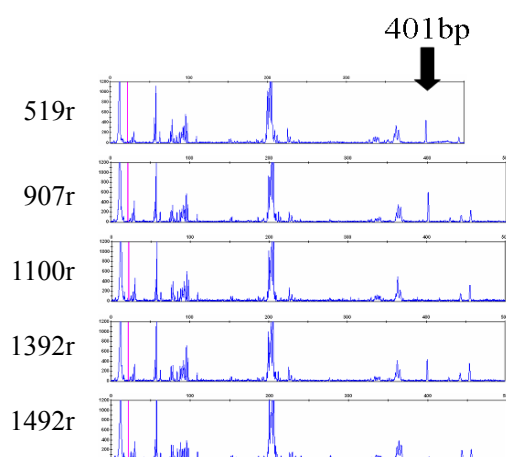
菌種を分ける能力は 27f を用いた方が高いことがわかった。



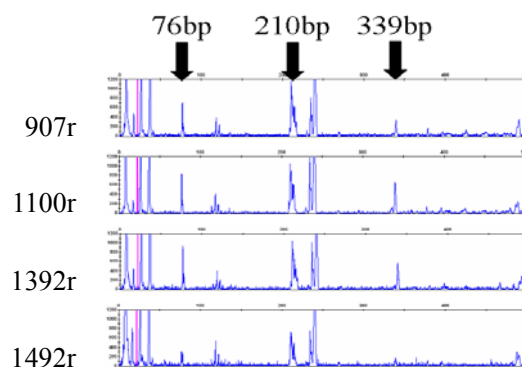
(a) M 下水処理場、27f



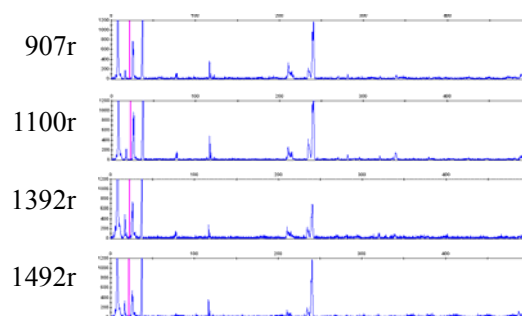
(b) O 下水処理場、27f



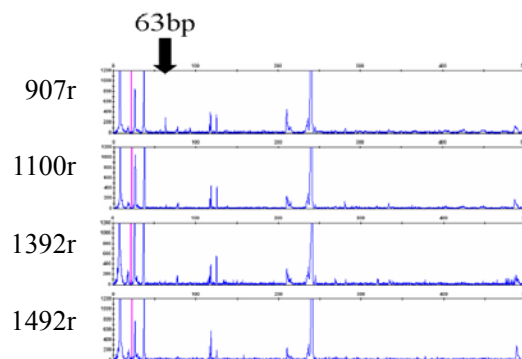
(c) 北京工業大学 STEP-AO、27f



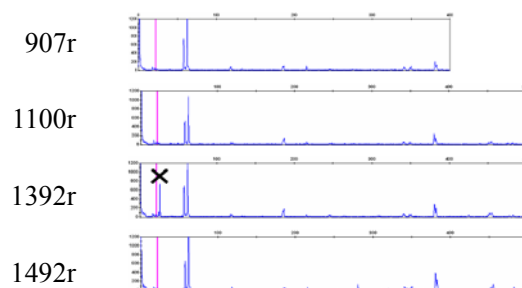
(d) M 下水処理場、357f



(e) O 下水処理場、357f



(f) 北京工業大学 STEP-AO、357f



(g) M 下水処理場、530f (×は制限酵素で未処理の T-RFLP でも得られたピーク)

図 1. T-RFLP 解析結果 (制限酵素 *HhaI*)

M 下水処理場、制限酵素 *HhaI*、フォワードプライマー-27f を用いたときにピーク高さの違いが確認できた 364bp の T-RFs に該当する細菌種を *in silico* で解析したところ、以下のような結果になった (表 1)。これにより、フォワードプライマー-27f、制限酵素 *HhaI* を用いて得られた 364bp の T-RFs にはこれらの近縁種が該当する可能性があること示唆された。これ以外にもピーク高さの違いが確認できた T-RFs について解析を行ったが、該当した細菌種は複数の系統にまたがっていることが多く、様々な細菌種が同一 T-RFs を与えていることがわかった。

表 1. 27f、制限酵素 *HhaI* を用いた場合の 364bp の T-RFs の *in silico* 解析結果

phylum and class	1	2	3	4	5
Deinococcus-Thermus					
<i>Deinococci</i>	X				
Chloroflexi					
<i>Anaerolineae</i>		X			
Nitrospira					
<i>Nitrospira</i>	X				
Proteobacteria					
<i>Betaproteobacteria</i>	X		X	X	
<i>Gammaproteobacteria</i>	X	X	X	X	X
<i>Deltaproteobacteria</i>	X	X	X		
<i>unclassified_Proteobacteria</i>	X	X	X		
Firmicutes					
<i>Mollicutes</i>	X		X	X	
<i>Bacilli</i>	X	X	X	X	X
Actinobacteria					
<i>Actinobacteria</i>	X	X	X	X	
<i>unclassified_Actinobacteria</i>	X	X	X	X	
Planctomycetes					
<i>Planctomycetacia</i>	X	X		X	X
Acidobacteria					
<i>Acidobacteria</i>	X				
Bacteroidetes					
<i>Sphingobacteria</i>	X	X	X	X	
<i>unclassified_Bacteria</i>	X	X	X	X	X

※1 : 519r, 2 : 907r, 3 : 1100r, 4 : 1392r, 5 : 1492r

cloning 解析の結果、処理方法に関わらず活性汚泥中には *Betaproteobacteria* 綱 (class)、*Gammaproteobacteria* 綱及び *Sphingobacteria*

綱の細菌種の存在が多く存在することがわかった。プライマーセットによる違いは多少確認でき、プライマーセットごとの特異性が存在する可能性が示唆された。例として、表 2 に北京工業大学 SBR-1 をプライマーセット 357f-1392r および 530f-1392r で解析した結果を示す。

表 2. SBR-1 のクローニング結果

phylum and class	357f-1392r	530f-1392r
<i>Anaerolineae</i>	2	
Nitrospira		
<i>Nitrospira</i>	1	1
Proteobacteria		
<i>Alphaproteobacteria</i>	5	6
<i>Betaproteobacteria</i>	9	25
<i>Gammaproteobacteria</i>	14	6
<i>Deltaproteobacteria</i>	1	2
<i>unclassified_Proteobacteria</i>	1	1
Firmicutes		
<i>Clostridia</i>	1	1
Actinobacteria		
<i>Actinobacteria</i>	2	3
<i>unclassified_Actinobacteria</i>	6	3
Acidobacteria		
<i>Acidobacteria</i>		1
Bacteroidetes		
<i>Bacteroidetes</i>		1
<i>Flavobacteria</i>	8	3
<i>Sphingobacteria</i>	10	10
<i>unclassified_Bacteroidetes</i>	12	6
Verrucomicrobia		
<i>Verrucomicrobiae</i>		2
Gemmatimonadetes		
<i>Gemmatimonadetes</i>	1	3
TM7	1	
<i>unclassified_Bacteria</i>	1	2

4. まとめ

ユニバーサルプライマーの特異性に大きな相違はないが、細かな点では違いがあることが確認できた。

参考文献

Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. and Forney, L. J. (1997) *Appl Environ Microbiol* **63**:4516-4522