

B-16 PCR法による活性汚泥細菌群集構造解析 において用いられるさまざまな ユニバーサルプライマーの比較

○田崎 彩^{1*}・小貫 元治²・佐藤 弘泰¹・味埜 俊¹

¹東京大学大学院新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻（〒277-8563千葉県柏市柏の葉5-1-5）

²東京大学大学院サステイナビリティ連携学機構（〒277-8563 千葉県柏市柏の葉5-1-5）

* E-mail: tazaki@mw.k.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

細菌群集構造解析は微生物の多くが人為的に培養できないことから解析が遅れていたが、分子生物学的手法の発展により大幅に進歩した。特に 1985 年に開発された PCR 法は、それに伴う様々な解析手法を出現させ水環境工学分野においてもその技術が注目されるようになってきた。

PCR 法を用いた細菌群集構造解析は全ての細菌に存在する 16S rRNA 遺伝子を対象としている。16S rRNA は比較的保存性が高く基本的な構造が保持されている保存領域と進化の過程で少しずつ変化した可変領域を有している約 1600 塩基の遺伝子である。試料から全 DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーで 16S rRNA 遺伝子の特異的に PCR 増幅したものを様々な解析へと用いる。

ユニバーサルプライマーは 16S rRNA を増幅させるときに使用するプライマーであるが 1 種類でなく何種類も存在する。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きることも考えられる。そこで、異なるユニバーサルプライマ

ーを用いて群集構造解析を行い、解析結果の違いを比較することを目的に研究を行った。

16S rRNA を鋳型とした PCR 増幅産物の解析に用いられる手法には DGGE（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法）、T-RFLP（末端制限酵素断片長多型）、SSCP（一本鎖 DNA 高次構造多型）、ARDRA（増幅 rDNA 制限酵素断片解析法）など様々なフィンガープリントの解析技術が存在する。本研究では、その中でも PCR 増幅産物を制限酵素によって切断したとき、塩基配列の違いにより異なる末端切断断片長で解析する T-RFLP 法を用いた。また、この方法は一番簡便であり多くのサンプルを解析したいときに有利である。

2. 実験方法

(1) 汚泥採取とDNA抽出

本研究で使用した活性汚泥試料は、標準活性汚泥法の処理場から採取した。-80℃で保存した汚泥から FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbio gene) を用いて DNA を抽出した。方法は同社のプロトコルに従った。

表 1. ユニバーサルプライマー¹⁾

Name	Position	Sequence (5'→3')	Target
27f	8-27	AGAGTTTGATCTMIGGCTCAG	PCR and sequencing, most eubacteria
357f	339-357	CTCTACGGGAGGCAGCAG	Most eubacteria
530f	515-530	GTGCCAGCAGCGGCGG	Most eubacteria, eukaryotes, archaeobacteria
519r	536-519	GWATTACCGCGGCKGCTG	Most eubacteria, eukaryotes, archaeobacteria
907r	926-907	CCGTCGAATTCMTTTRAGTTT	Most eubacteria, eukaryotes, archaeobacteria
1100r	1114-1100	GGGTTGCGCTCGTTG	Most eubacteria
1392r	1406-1392	ACGGGCGGTGTGTRC	Most eubacteria, eukaryotes, archaeobacteria
1492r	1513-1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	PCR and sequencing, most eubacteria, archaeobacteria

(2) ユニバーサルプライマー

活性汚泥などの複合微生物系の解析に用いられるユニバーサルプライマーは同じ文献 (1) を参考にしていることが多い。本研究では、ターゲットは若干異なるが全て真正細菌を対象としていて、よく用いられているものを使用した (表 1)。

(3) PCRと精製

抽出したDNA 10ng/μLを鋳型に表 1 のユニバーサルプライマーを組み合わせた13種類のプライマーセット (表 2) を用いた。フォワードプライマーをFAMで蛍光標識させ、AmpliTaQ Gold® & 10×PCR Buffer and dNTP (ABI) でPCRを行った。アニーリング温度と伸長時間 (表 2) 以外のPCR条件は、プレヒーティング (95°C、10分) 後、変性 (94°C、30秒)、アニーリング (30秒)、伸長 (72°C) を25 サイクル行ない、最後に72°C、10分であった。増幅したPCR産物はQIAquick PCR purification Kit (QIAGEN) で精製して余計な夾雑物を取り除いた。

表 2. PCR 条件

Primer set	Annealing temp.	Extension time
27f_FAM	519r 55°C	30sec
	907r 50°C	1min
	1100r 55°C	1min
	1392r 55°C	1.5min
	1492r 55°C	1.5min
357f_FAM	907r 55°C	30sec
	1100r 60°C	1min
	1392r 60°C	1min
	1492r 60°C	1min
530f_FAM	907r 55°C	30sec
	1100r 60°C	30sec
	1392r 60°C	1min
	1492r 60°C	1min

(4) T-RFLP

精製済みDNAをHhaI、MspI、RsaI (TOYOBO)の制限酵素1.6Uで、それぞれ37°C、3時間酵素処理した後、65°C、15分で失活させた(2)。酵素処理産物にHiDiホルムアミドとマーカーGeneScan™ 500 ROX Size Standard (ABI) を混合し95°Cで2分間熱処理した後5分間急冷させた。その後、ABI PRISM® 310 Genetic AnalyzerのGeneScanで解析し、結果はGeneMapper™ ソフトウェアv3.0で確認した。

(5) データベース解析

本研究で用いたのはMicrobial Community Analysis 3 (MiCA 3 : <http://mica.ibest.uidaho.edu/>) というT-RFLPを用いた細菌群集構造解析用のウェブ上解析ツールである。MiCA3に様々なツールがあるが、本研究ではRibosomal

Database Project II (RDP II) などの16S rRNAのデータベースをもとに、プライマーと制限酵素の情報からT-RFsを予測する機能を持つISPaR (in silico PCR amplification and restriction of 16S rRNA gene sequences found in public database) を使用した。

3. 結果と考察

HhaIで制限酵素処理した結果を図1から3までに示した。同一のフォワードプライマーではリバースプライマーが異なってもピーク図は似通っていたことから、どのプライマーセットを用いてもあまり偏りなく細菌群集構造を解析できることがわかった。しかし、目で図1のA、図2のB、C、図3のEのように、わずかに違いがあることも同時にわかった。A~C、Eのピークは他のリバースプライマーより1492rを使用したときのほうが小さかった。なお、図3のDで530f_FAM-1392rにのみ存在するピークは制限酵素処理せずにT-RFLP解析したものと他の制限酵素で処理したものにも見られたため、このプライマーセットで特異的に増幅されてしまう短い配列

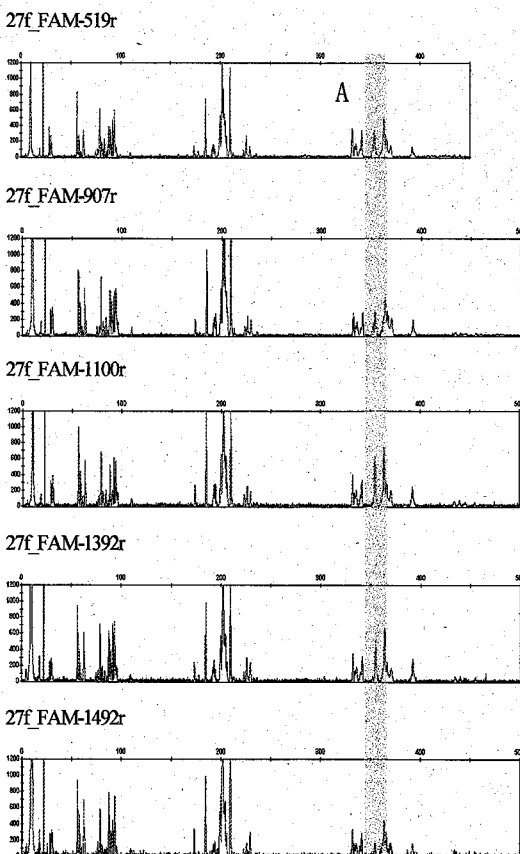


図 1. 27f を用いて HhaI で制限酵素処理したもの

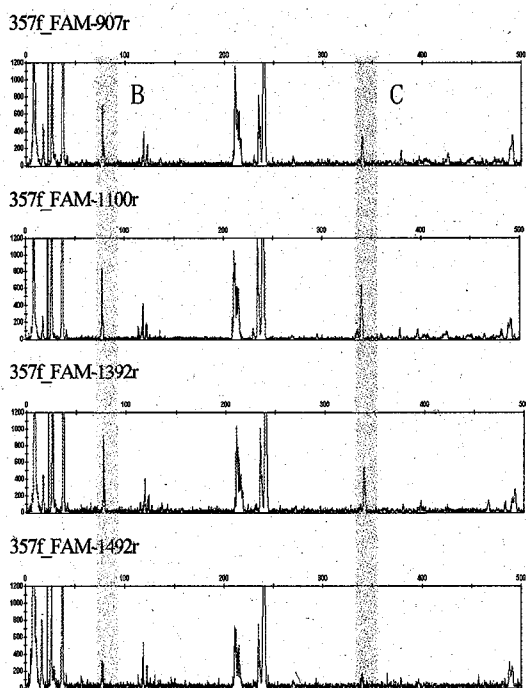


図2. 357f を用いて *HhaI* で制限酵素処理したもの

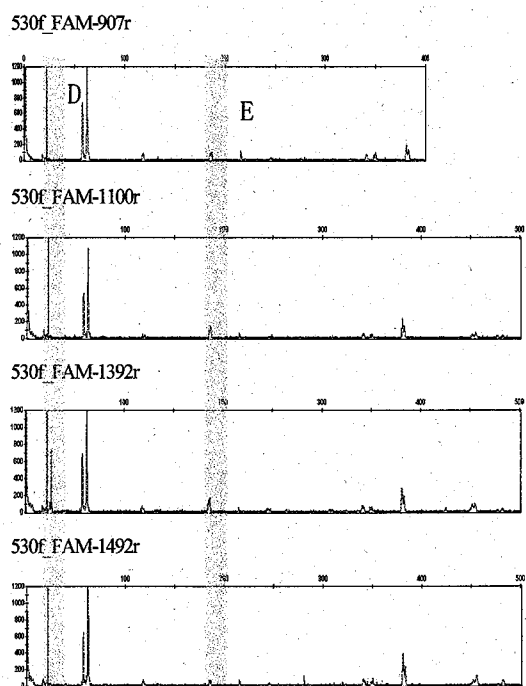


図3. 530f を用いて *HhaI* で制限酵素処理したもの

が存在した可能性がある。

Aのピークについて相当する細菌種を調べるために、MiCA3で*in silico*で解析を行った。RDP IIのデータベースに登録されている配列のうちフォワードプライマーが

27f (0 mismatch)、制限酵素*HhaI* (図1) という条件のもとで5'側の長さ25~500bpの末端断片を与える細菌を調べたところ、Alphaproteobacteria、Actinobacteria、Acidobacteriaなどに属する細菌があげられた。1492rプライマーではAのピークは弱くしか検出されておらず、これらの細菌は1492rをリバースプライマーとして用いるとうまく増幅できない可能性がある。

全体的に、A~C、E全てに関して1492rでは他のリバースプライマーに比べてピークが明らかに小さい傾向が見られた。フォワードプライマーの違いに関係なくピークが低いことから1492rでは捉えられない細菌がいると示唆された。よって、1492rはユニバーサルプライマーとして群集構造解析以外にも多くの研究で用いられているが、より多くの細菌種を捉えることを目的とした細菌群集構造解析には適さないと推測された。519rや907rも530f以外ではピークが小さめであったことに加え、A~C付近以外にも細かな違いが確認できた。そのため、MiCA3などを用いたさらに詳細な解析を行いリバースプライマーの比較をする必要がある。

ついで、フォワードプライマー別に、検出されたピーク数を比較した。530fを用いた場合、*HhaI*だけでなく*MspI*、*RsaI* (データ不記載) のいずれの制限酵素で処理した場合でも、ピーク数が27fや357fの半分以下であった。MiCA3で*in silico*で解析したところ、*HhaI*、*MspI*、*RsaI*で制限酵素処理された断片長の数が27fや357fに比べてかなり少なく、少数のピークに多くの細菌種が重複して該当していることがわかった。これでは群集構造を解析するときに細菌による違いを明確にできない。また、制限酵素処理された全断片のうち、使用したサイズマーカーの対象内に入る種数の割合を*in silico*で解析したところ、27fや357fとほとんど変わらなかった。こうしたことから530fはT-RFLPを用いた群集構造解析には不適であるとわかった。

今後は、異なる処理方法の活性汚泥サンプルでユニバーサルプライマーを比較し、より多くのデータからT-RFLPを用いた活性汚泥細菌群集構造解析に最適なプライマーセットを決定したい。

参考文献

- 1) Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing, p.115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfello (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Jhon Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- 2) Blackwood, C. B., T. Marsh, S. H. Kim, and E. A. Paul. 2003. Appl. Environ. Microbiol. 69:926-932.