

## 活性汚泥内に存在する *Candidatus Saccharibacteria*(TM7)に対するプライマーの特異性の検証

広島大学	大学院工学研究科	非会員	○竹中	亮太
広島大学	大学院工学研究科	正会員	金田一	智規
広島大学	大学院工学研究科	正会員	大橋	晶良
広島大学	大学院工学研究科	正会員	尾崎	則篤
広島大学	大学院先端物質科学研究科	正会員	青井	議輝

### 1. はじめに

*Candidatus Saccharibacteria* (TM7) は代表的な未分類細菌門の1つである。多様な環境下で確認されており、東広島下水処理場の活性汚泥内には他細菌と比べ高割合で存在している。高割合で存在するという事は下水処理において大きな役割を担っている可能性がある。つまり、TM7の挙動や基質利用特性は処理場内の様々な問題を解決し処理を安定化させることに繋がるのではないかと考えられる。また人の体内の様々な疾患部位でも確認されており、医学の面からも注目されている細菌群である。近年2例のTM7の分離培養成功例が報告された<sup>(1)(2)</sup>。しかし、今までTM7に特異性を有するとされてきたプライマーとFISHプローブの特異性を疑問視する報告がされた<sup>(3)</sup>。プライマーとは、前述のPCRの際に1本鎖DNAに結合する短い塩基配列を持つ核酸の断片である。特異性を有するプライマーとは、特定の細菌のDNAにだけ結合するように設計されたプライマーであり、そのプライマーを使用することで特定のDNAのみをPCRで増幅させることができる。2例の培養研究では実際に分離培養されたかどうかをPCRによるDNA増幅または特異的プローブを用いたFISH法により判断しているが、プライマーとプローブの特異性に問題がある場合、分離培養成功の報告が疑われる。未培養細菌群の集積培養系からの分離培養においては、確実に増殖していることをモニタリングすることが重要であり、特異性の高いプライマーやプローブを使用することが不可欠である。

そこで、既存のTM7を標的としたプライマーのうち、特異性が高いプライマーを選定し、定量PCR法で用いることで環境中のTM7のみを確実に定量する手法の確立を目的とする。

### 2. 実験方法

まず初めに、東広島下水処理場の活性汚泥(FISH法でのTM7存在比13%)を採取し、DNA抽出を行った。次に本研究で使用するTM7に特異性を有するとされるプライマーを過去のTM7に関する論文とARBプログラムのTM7の検出割合を参考に4つ選定した。ARBプログラムは微生物塩基配列のデータベースを基にプライマーやプローブを設計でき、解析した塩基配列の照合・分類・同定が行えるソフトウェアである。各プライマーの情報をTable 1に示す。

次に活性汚泥抽出液と選定したプライマーセットを用いてPCRを行った。PCRを行う際、アニーリング温度が高いと1本鎖DNAとプライマーがアニーリングしにくくなる。逆に、低いと目的以外のDNAにもアニーリングしてしまう。そこで、まずは最適アニーリング温度の決定を行った(Table 2)。決定方法はアニーリング温度勾配をつけPCRをした後、アガロースゲル電気泳動・核酸濃度測定を行い判断した。アニーリング温度以外のPCR条件は、DNA合成酵素のEmerald Amp PCR Master Mixの基本条件(タカラバイオ)を参考にした。

それぞれのプライマーセットの最適アニーリング温度でPCRを行った。そのPCR産物と大腸菌を用いてクローニングを行い、4つのクローンライブラリを作成した。各クローンライブラリから96クローンをそれぞれ選択し、塩基配列解析した。解析できたクローンを97%以上の相同性に基づきOTUごとに分けた。さらに

キーワード TM7、定量PCR、アニーリング温度

連絡先 〒739-8527 東広島市鏡山1-4-1 広島大学大学院工学研究科 社会基盤環境工学専攻 事務室

TEL : 082-424-7819・7828

得られた有効塩基配列のうち、TM7 門由来の塩基配列数の割合から特異性を評価した(Table 2)。また、前述の ARB プログラムを用いて活性汚泥から得られた TM7 の OTU の系統樹を作成した(Fig. 1)。

最後に、4 種類のプライマーセットをそれぞれ用いて定量 PCR を行った。得られた増幅効率の比較し、集積培養系からの分離培養の研究に最も適したプライマーセットを判断した(Table 3)。

### 3. 結果および考察

Table 1 より、ARB の検出数は 580F-910R の組み合わせが最も高い結果となった。Table 2 より、4 つのプライマーセットによる TM7 の検出割合はすべて 100%となった。つまり今回検証したプライマーセットはすべて活性汚泥内の TM7 に対してかなりの特異性を有すると考えられる。また Fig. 1 より、今回検証した 4 つのプライマーセットはいずれも、東広島下水処理場の活性汚泥内の細菌 (Fig. 1 中の HHS)付近に位置している。つまり今回検証したプライマーセットは東広島下水処理場の活性汚泥内の細菌を多く網羅していると考えられる。Table 3 より、580F-910R の増幅効率(Eff.%)が最も高い結果となった。また、活性汚泥内の TM7 の定量値も 4 つすべて近い値となった。

Table 1 本研究で用いたプライマー情報

Primer	シーケンス (5'-3')	ARB での検出数 (outgroup)
314F	GAGAGGATGATCAGCCAG	650 (217)
580F	AYTGGGCGTAAAGAGTTGC	792 (9)
910R	GTCCCCGTC AATTCCTTTATG	829 (6)
1177R	GACCTGACATCATCCCCTCCTTCC	781 (86)

Table 2 最適アニーリング温度と検出割合と OTU 数

Primer set	アニーリング	TM7 由来塩基配列数/ 有効塩基配列数	OTU 数
	温度(°C)		
314F-910R	64	95/95 (100%)	8
314F-1177R	64	96/96 (100%)	8
580F-910R	66	94/94 (100%)	7
580F-1177R	63	94/94 (100%)	7

Table 3 定量 PCR 結果

Primer set	R <sup>2</sup>	Eff.(%)	定量値(TM7copies/mg-SS)
314F-910R	0.998	77.0	8.7×10 <sup>6</sup>
314F-1177R	0.999	84.0	3.7×10 <sup>4</sup>
580F-910R	1.000	87.2	6.0×10 <sup>6</sup>
580F-1177R	0.999	85.9	7.4×10 <sup>6</sup>

### 4. まとめ

本研究では主に TM7 を対象とするプライマーの特異性の検証を行った。活性汚泥内の TM7 に対する特異性は今回検証したプライマーすべて高いといえる。その中でも、定量 PCR のプライマーセットとして最も優れているものは 580F-910R と判断できた。将来的に活性汚泥内の TM7 の集積培養系からの分離培養を試みたい。

### 参考文献

(1) Soro et al. (2014) Appl. Env. Micro., (2) He et al. (2015) PNAS, (3) Sizova et al. (2015) J. Micro. Methods

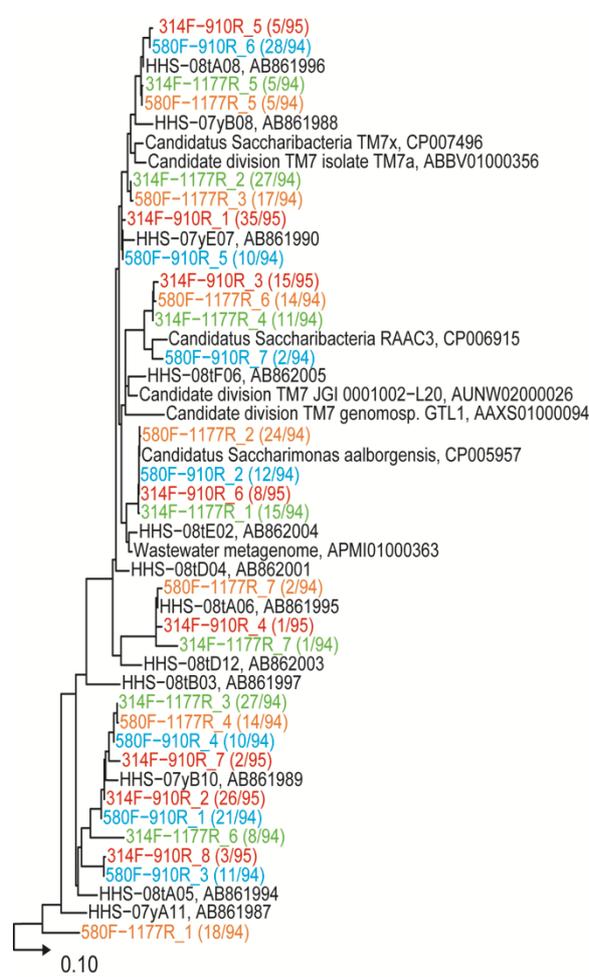


Fig. 1 本研究で得られた TM7 の系統樹