

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19866

研究課題名（和文）ポピュレーションダイナミクスを利用した環境保全微生物の新規解析技術の創成

研究課題名（英文）Development of microbial analytical techniques for environmental conservation using population dynamics

研究代表者

松浦 哲久（Norihisa, Matsuura）

金沢大学・地球社会基盤学系・准教授

研究者番号：90771585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：微生物の種類と機能をリンクづけて解析する技術の開発を行うことを目標に、本研究では環境中に存在する微生物の系統解析と定量を同時に行うことを目的とした。まず、16S rRNA遺伝子と機能遺伝子が定量可能な標準核酸を開発した。次にmockサンプルを用いた実験で、定量シーケンス解析を実施し、その精度を評価した。最終的に環境サンプルを用いて、環境中の温室効果ガス・メタンを酸化分解する微生物の定量を行うことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微生物は環境保全のために物質循環を行っているが、どのような微生物が何を行っているか不明である。そこで、環境中の物質循環の理解のためには、微生物の種類・機能・量を明らかにする技術開発が必要不可欠である。本研究では、定量シーケンス解析用の標準核酸を開発し、環境保全微生物の種類と量の解析を行った。本研究成果は、微生物の生態や物質循環を明らかにし、環境保全の発展に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed internal standard genes to quantify both the 16S rRNA gene and functional genes. The quantitative sequencing using these developed internal standards was evaluated through a mock community experiment. We subsequently applied this technique to environmental samples, enabling the quantification and phylogenetic analysis of methanotrophs.

研究分野：環境微生物工学

キーワード：16S rRNA遺伝子 機能遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

排水や廃棄物などの処理を目的とした環境保全バイオリアクターは、低環境負荷や資源回収などの社会ニーズを兼ね備えた技術開発が行われている。そのバイオリアクターの中身は様々な種類の微生物で構成されており、微生物は環境保全のための物質循環の中核を担っている。しかしながら、中核となる微生物の多くは、機能が不明な微生物群で構成されている。そのため、処理メカニズムの解明がボトルネックとなっており、環境保全バイオリアクターの発展を妨げる要因のひとつとなっている。

処理メカニズム解明のための解析手法は、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析が古くから用いられてきた。この解析では、どのような種類の微生物が存在するのか把握することができる。しかし、解析した多くのサンプルでは、未培養微生物で構成されているため、培養・ゲノム解析された近縁種との相同性を元に、同じような機能を保有しているだろうと推測している状況である。多くの研究がこの推定方法を取っているが、この推測方法は科学的バイアスがある。なぜなら、16S rRNA 遺伝子レベルでは全く同種だが、全く異なる機能を保有している微生物も存在しているからである。したがって、現在ボトルネックとなっている処理メカニズムの解明には、微生物の 16S rRNA 遺伝子 (分子系統分類) と生理学的機能をリンクさせて解析することが重要な課題の一つである。

### 2. 研究の目的

本研究では、環境保全バイオリアクターの処理メカニズム解明を支援するために、存在する微生物の 16S rRNA 遺伝子 (分子系統分類) と生理学的機能をリンクさせて解析する新しい技術の開発を行う。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 標準核酸

*pmoA* 遺伝子, *amoA* 遺伝子, および 16S rRNA 遺伝子をターゲットとするプライマー配列で構成された内部核酸を設計した。プライマー間のスペーサーには、人為的に設計された配列を使用した。プライマーがギャップ配列と一致しないように、ClustalW v2.1 (Thompson et al., 1994) を用いてアラインメントを行った。GC 含量は約 50% に維持し、二次構造を確認した。内部核酸を化学合成し、特定のプライマー配列を使用して増幅した。AMPure XP (Beckman, USA) で精製され 2100 バイオアナライザー (Agilent Technologies, USA) を使用して濃度を測定した。4 段階の濃度に希釈したものを標準核酸とした。

#### 3.2 mock サンプルおよび環境サンプル

定量精度を確かめるために、メタン酸化細菌, アンモニア酸化細菌, 大腸菌を購入し、これらの微生物からゲノム DNA を抽出した。DNA 濃度を Eppendorf BioPhotometer D30 (Eppendorf, Germany) を使用して測定し、それぞれのゲノムを混合させ mock コミュニティを準備した。

環境サンプルにおける解析を実施するために、バイオリアクター, 河川, 土壌からサンプルを採取し、DNA を抽出した (FastDNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals, USA)。

#### 3.3 アンプリコンシーケンス解析

*pmoA*, *amoA* および 16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンス用の DNA ライブラリーは、2step PCR を用いた。mock サンプルまたは環境サンプルに、標準核酸を 1:3 の割合で追加した。すべての PCR 増幅は、T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad, USA) を使用して行った。最初の PCR ラウンドでは、50 $\mu$ L の反応液に 1 $\times$ PCR バッファー, 各 200nM のフォワードおよびリバースプライマー, 各 200 $\mu$ M の dNTP 混合物, 0.5unit の HotStarTaq DNA ポリメラーゼ, および 2.5 $\mu$ L の DNA テンプレート (濃度 2ng/ $\mu$ L) を混合させた。PCR は、表 1 に示すサーマルサイクル条件で実施した。次に Agencourt AMPure XP を使用して、PCR アンプリコンを精製した。その後、2 回目の PCR ラウンドは、1 $\times$ KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, Switzerland), 各 300nM のインデックス 1 (i7) およびインデックス 2 (i5) Nextera XT インデックスアダプター (Illumina, USA), および 2 $\mu$ L の精製された 1 回目の PCR 産物を含む 25 $\mu$ L の反応液で実施した。PCR は 95 $^{\circ}$ C : 3 分を行った後、98 $^{\circ}$ C : 20 秒, 60 $^{\circ}$ C : 15 秒, 72 $^{\circ}$ C で 1 分のサイクルを 8 回, 72 $^{\circ}$ C で 1 分の条件で実施した。2 回目の PCR 産物も同様に Agencourt AMPure XP を使用して PCR アンプリコンを精製した。精製したアンプリコンを DNA 1000 アッセイおよび 2100 バイオアナライザーを使用して定量し、2nM に希釈した。最後に、準備したライブラリーは MiSeq によって配列解析を実施した。

読み取られた配列の生データは、Trimmomatic でクオリティコントロールを行い (Bolger et al., 2014), Cutadapt でプライマー配列を除去した (<https://omictools.com/cutadapt-tool>)。DADA2 パイプラインを用いて、リード 1 とリード 2 のマージを行い、配列の ASV を作成した (Edgar, 2013)。各 ASV は SILVA 138 SSU Ref NR 99 を用いて種の同定を行った (Caporaso et al., 2010)。

## 4. 研究成果

### 4.1 標準核酸の評価

合成した標準核酸を用いて、各プライマーで PCR を行った結果、増幅した各遺伝子領域の長さは設計した長さとも一致していた (図 1)。qPCR を行い、検量線を作成したところ、良好な決定係数を示した。それぞれ 341F/805R は  $R^2 = 0.9633$ 、515F/805R は  $R^2 = 0.9906$ 、*pmoA* 189f/682r は  $R^2 = 0.9987$ 、*pmoA* 189f/650r は  $R^2 = 0.9864$ 、*amoA* 1F/2R は  $R^2 = 0.9945$  であった。全てのプライマーセットにおいて高い精度であることがわかった。

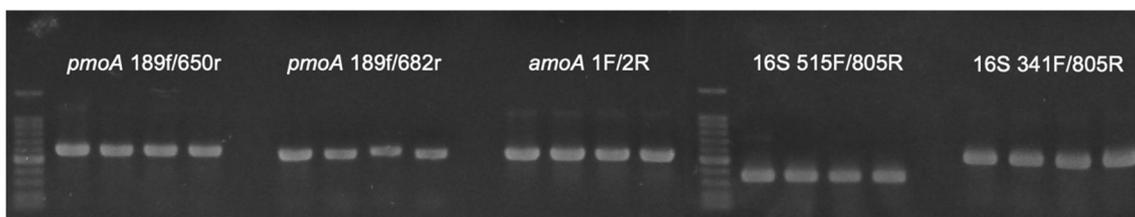


図 1 各プライマーでの標準核酸の PCR 増幅結果

### 4.2 定量値の評価

Mock サンプルの定量結果と Real-Time PCR による定量結果と比較した。その結果、標準核酸での定量値は、Real-Time PCR の値と比べて、104% (341F/805R)、136% (515F/805R)、7.1% (*pmoA* 189f/682r)、4.4% (*pmoA* 189f/650r)、24.3% (*amoA* 1F/2R) であった。リード 2 のクオリティ結果が低かったことから、リード 1 のみで再解析したところ、標準核酸での定量値は 97.5% (341F/805R)、135% (515F/805R)、73.9% (*pmoA* 189f/682r)、164% (*pmoA* 189f/650r)、21.0% (*amoA* 1F/2R) と改善された。

### 4.3 環境サンプルへの適用

16S 341F/805R と *pmoA* 189f/650r のプライマーセットを用いた環境サンプルにおける定量と系統解析を実施した。16SrRNA 遺伝子に基づく結果、環境サンプルで最も豊富なメタン酸化細菌は、16S ASV58 ( $3.1 \times 10^8$  コピー  $L^{-1}$ )、16S ASV10 ( $2.9 \times 10^7$  コピー  $g^{-1}$ )、および 16S ASV5 ( $3.8 \times 10^9$  コピー  $g^{-1}$ ) であった。これらはすべて Type II メタン酸化細菌の *Methylocystis* 属グループであった。Type Ia メタン酸化細菌は、土壌およびリアクターサンプルで検出され、Type Ib メタン酸化細菌は河川で検出された。

*pmoA* 遺伝子に基づく結果、河川サンプルには Type Ib、Type II メタン酸化細菌、土壌およびリアクターサンプルには Type II メタン酸化細菌が多く存在していた。最も豊富なメタン酸化細菌は、これらの環境で、それぞれ PmoA ASV11、15、16、16、20、21、23 グループ ( $1.4 \times 10^8$  コピー  $L^{-1}$ )、PmoA ASV12 ( $1.6 \times 10^6$  コピー  $g^{-1}$ )、および PmoA ASV4 ( $2.3 \times 10^9$  コピー  $g^{-1}$ ) であった。

## 参考文献

- Edgar RC (2013) UPARSE: Highly Accurate OTU Sequences from Microbial Amplicon Reads. *Nat. Methods*, 10 (10): 996–998.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R (2010) QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data. *Nat. Methods* 7: 335–336.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koike Kazuyoshi, Honda Ryo, Aoki Masataka, Yamamoto Ikemoto Ryoko, Syutsubo Kazuaki, Matsuura Norihisa	4. 巻 15
2. 論文標題 A quantitative sequencing method using synthetic internal standards including functional and phylogenetic marker genes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology Reports	6. 最初と最後の頁 497 ~ 511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1758-2229.13189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------