

次世代シーケンサー解析による未培養の膜透過性細菌の探索 ～ 未知の微小細菌群集の解明 ～

New-generation sequencing reveals microbial community of unculturable and filtrable bacteria

水環境工学研究室

浅見 鷹志, 周 帥

指導教員 浦瀬 太郎, 後藤 早希

東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科

活性汚泥の精密ろ過により得られた膜透過性細菌の群集解析を行った。培養法では、Alpha-proteobacteria 綱に属する細菌が多く単離されたのに対し、次世代シーケンシングでは、微小細菌が多く含まれると考えられる OD1、OP3、TM7 の各分類群の細菌が多く膜透過水に含まれることがわかった。

キーワード：精密ろ過、微小細菌、膜透過性細菌、活性汚泥法、次世代シーケンサー

1. 緒言

遺伝情報を網羅的に解析することで、その場所に存在する生物群集を網羅的にあきらかにする次世代シーケンシングの技術が確立してきた。この方法によれば、顕微鏡観察や培養による方法では検出や同定が難しい細菌の情報を得ることができる。一方、細菌は一定の大きさを有するため、精密ろ過膜によりほとんど阻止できると考えられてきたが、近年、膜を通過しやすい微小細菌が微生物学で注目されている¹⁾。本研究では、環境分野や食品分野などで注目されている膜透過性の細菌にどのようなものが存在するのかを次世代シーケンシングの技術によって明らかにすることを目指した。

2. 方法

2-1. 精密ろ過による膜透過性細菌試料の取得

水槽(10L)に精密ろ過膜 4 枚(孔径 0.2 μ m、0.4 μ m のシリンダー状の孔の開いたポリカーボネート膜)を貼ったボードを作製し、水密のため、周囲をエポキシ接着剤で固定した。精密ろ過膜を含む装置全体(図 1)を次亜塩素酸ナトリウム溶液で 18 時間消毒した。その後、水槽内の残存塩素を除去するため、チオ硫酸ナトリウムで中和したのち、東京工科大学の排水処理施設の活性汚泥に水槽内の水を入れ替えて、24 時間の吸引ろ過を行った。

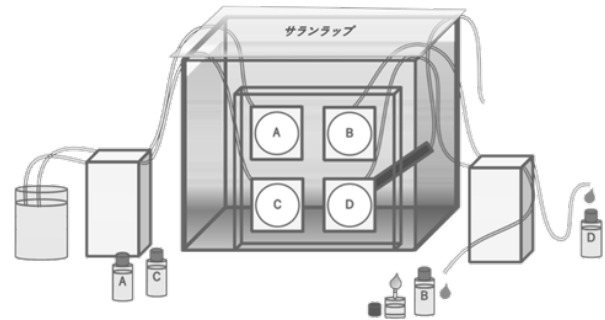


図 1：使用した精密ろ過装置

2-2. R2A 培地による培養・単離

培地した R2A 培地に膜透過水を 50 μ L ずつ、コンラージ棒で塗布した。1 週間培養し、生じたコロニーをランダムに選択し、R2A 培地を再度使用して単離した。

2-3. 単離株からの DNA 抽出および菌種同定

単離株のコロニーから DNA をアルカリ熱抽出し、16S rRNA 遺伝子に対応する 27F、1492R のプライマーで増幅し、増幅産物の有無を電気泳動で確認し、増幅の確認できた試料に対して、Monofas DNA 精製キット I (ANIMOS Inc.) を用いて DNA を精製した。精製した試料の塩基配列を 518F と 800R のシーケンスプライマーを用いてサンガーシーケンスした((株)マクロジェン・ジャパンに委託)。得られた塩基配列情報約 1,500 BP に対して BLSAT 検索し、微生物(属レベル)を同定した。

2-4. 次世代シーケンシングによる群集解析

精密ろ過開始後 30 分から 2 時間の間に得られた透過液の全量をステリベクスフィルター(0.22 μm , Merck Millipore Corp.)に通水し、膜透過性細菌を捕捉し、DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen GmbH)を用いて DNA を回収した。16S rRNA の V3-V4 領域に対応する 318F - 800R のプライマーを用いて遺伝子を PCR 増幅し、得られた DNA を生物技研(株)に委託し、次世代シーケンサーで分析し、菌叢解析用パイプライン Qiime を用いて解析した。

3. 結果

3-1. 膜透過細菌の単離株の同定

メンブレンフィルター(0.2 μm)を透過した細菌群集を培養法により培養し、得られたコロニー(92 株)の菌種同定を行った。BLAST 検索で 98.65%以上の一致が得られた 32 属 39 種を門レベルで図 2 に示す。膜を透過する細菌種は 5 門に分類され、多い順で Pseudomonadota 門、Actinomycetota 門、Bacillota 門、Deinococcota 門、Bacteroidota 門であった。とくに、92 株中の *Methylobacterium* spp. (21 株)、*Sphingomonas* spp. (7 株)、*Methylobacterium* spp. (7 株) など Alpha-proteobacteria 綱に属する細菌が多く単離された。

3-2. 次世代シーケンシングによる細菌群集の解析

孔径 0.4 μm の膜を透過した細菌 DNA を次世代シーケンシングにより群集解析し、門レベルで集計した結果を図 3 に示す。多いものから順に Pseudomonadota 門、OD1、OP3、Planctomycetota 門、Bacteroidota 門、Verrucomicrobiota 門、TM7(Saccharibacteria 門)、Chloroflexota 門、Nitrospirota 門、Actinomycetota 門の遺伝子が確認された。このうち、OD1、OP3、TM7 などは寒天培地上に生育しづらく、微小細菌が多く含まれる分類門とされている。サンガーシーケンスの結果と比較し、寒天上でコロニーを形成し易い Proteobacteria 門の割合が次世代シーケンシングでは大きく低下した。

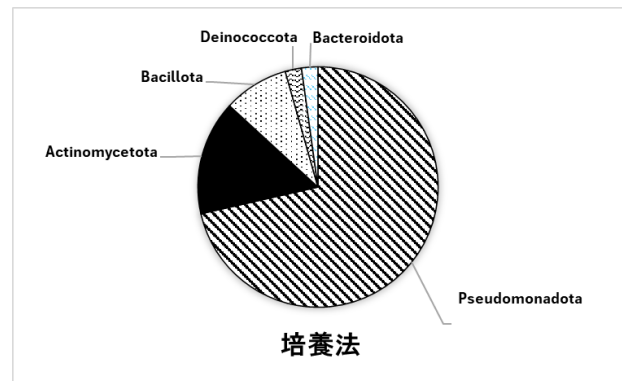


図 2: 膜透過水(0.2 μm)の培養によって得られた 32 属 39 種の門レベルの内訳

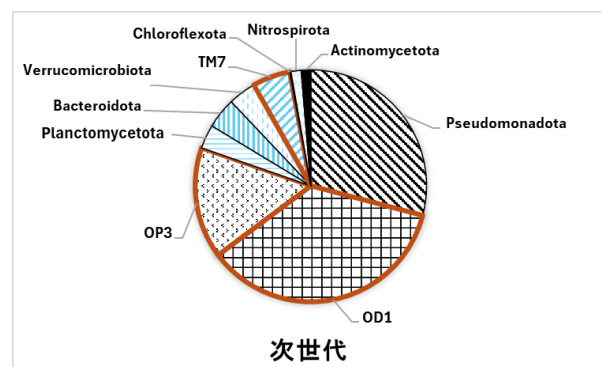


図 3: 膜透過水(0.4 μm)中の DNA の次世代シーケンシング解析結果を門レベルで整理した結果

4. 結論と今後の展望

環境分野や食品分野などで注目されている膜透過性の細菌にどのようなものが存在するのかを調べた。培養法で多く検出された Alpha-proteobacteria 綱に属する細菌の割合が、次世代シーケンシングでは低下し、培養が困難で微小細菌が多く含まれると考えられる OD1、OP3、TM7 の各分類群の遺伝子が膜透過水に多く含まれることが明らかになった。こうした培養が困難なグループの微生物に関する情報は極めて少なく、微小細菌研究のフロンティアに貢献する研究を今後も目指したい。

5. 参考文献

- 1) Ghuneim, L.A.J.; Jones, D.L.; Golyshin, P.N.; Golyshina, O.V. Nano-sized and filterable bacteria and archaea: Biodiversity and function. *Front. Microbiol.* (2018), 9, 1971.