

## 〔実験プロトコール〕

## 次世代シーケンサーによる16S rRNA口腔細菌叢解析の概要

植原 治<sup>1,2)</sup>, 高井 理衣<sup>3)</sup>, 原田 文也<sup>4)</sup>, 大西 綾<sup>4)</sup>, 虎谷 斉子<sup>1,5)</sup>, 平木 大地<sup>4)</sup>, 森川 哲郎<sup>4)</sup>, 倉重 圭史<sup>6)</sup>,  
梶 美奈子<sup>5)</sup>, 北市 伸義<sup>7)</sup>, 齊藤 正人<sup>6)</sup>, 安彦 善裕<sup>4)</sup>, 千葉 逸朗<sup>1)</sup>

- 1) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系保健衛生学分野
- 2) 北海道医療大学がん予防研究所
- 3) 北海道医療大学健康科学研究所
- 4) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野
- 5) 北海道医療大学病院歯科衛生部
- 6) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野
- 7) 北海道医療大学予防医療科学センター医学部門眼科学系

## Analysis of 16S rRNA oral bacterial flora using next-generation sequencer: A tutorial paper

Osamu UEHARA<sup>1,2)</sup>, Rie TAKAI<sup>3)</sup>, Fumiya HARADA<sup>4)</sup>, Aya ONISHI<sup>4)</sup>, Seiko TORAYA<sup>1,5)</sup>, Daichi HIRAKI<sup>4)</sup>,  
Tetsuro MORIKAWA<sup>4)</sup>, Yoshihito KURASHIGE<sup>6)</sup>, Minako KAJI<sup>5)</sup>, Nobuyoshi KITAICHI<sup>7)</sup>, Masato SAITOH<sup>6)</sup>,  
Yoshihiro ABIKO<sup>4)</sup>, Itsuo CHIBA<sup>1)</sup>

- 1) Division of Disease Control and Molecular Epidemiology, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido
- 2) Research Institute of Cancer Prevention, Health Sciences University of Hokkaido
- 3) Research Institute of Health Sciences, Health Sciences University of Hokkaido
- 4) Division of Oral Medicine and Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido
- 5) Department of Dental Hygiene, Health Sciences University of Hokkaido Hospital
- 6) Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido
- 7) Department of Ophthalmology, Institute of Preventive Medical Science, Health Sciences University of Hokkaido

**Key words** : Oral bacterial flora, 16S rRNA, Next-Generation Sequencing (NGS)

### Abstract

Traditionally, oral bacteria have been identified mainly in laboratory cultures. However, numerous difficult-to-cultivate bacteria are required with these methods, and the associated long culture time is a disadvantage. In addition, a limited number of bacteria can be targeted using the polymerase chain reaction (PCR) method, and since only the anticipated bacterial species is detected, the analysis is limited. In contrast to the conventional Sanger sequence method, the next-generation sequence (NGS) enables whole genome se-

quencing without cloning in *Escherichia coli* or host cells. Therefore, analysis using NGS is a novel approach to directly elucidating bacterial species using bioinformatics, which directly determines the genomic base sequence of the oral flora without culturing.

In this tutorial paper, we introduce a DNA preparation method for oral bacteria and the workflow of 16S rRNA bacterial flora analysis using a next-generation sequencer, MiSeq.

### はじめに

従来、口腔細菌は、実験室での嫌気グローブボックスなどを用いた主に培養を要する手法により同定されてき

た。しかし、これらの方法では、培養が困難な細菌が多く、培養に長時間かかることも欠点であった。また、PCR法ではターゲットにできる細菌数が限られており、既知の菌種のみが検出されるため解析に限界があった。

一方、次世代シーケンス (NGS) は、従来行われてきたサンガーシーケンスと比較して、プラスミドなどのベクターにクローニングすることなく全ゲノムの配列を決定することができる。NGSを用いた解析は、培養を行わないで口腔細菌叢のゲノム塩基配列を直接決定し、バイオインフォマティクスによりその細菌種を明らかにする新たなアプローチである。

口腔細菌叢の構成を解析する方法として、細菌の必須遺伝子である16SリボソームRNA (16S rRNA) 遺伝子を指標とした16S rRNA細菌叢解析がある。これにより、従来は解析困難であった難培養性細菌が大部分を占める口腔細菌叢を包括的に解析することが可能になった。最近のNGSを用いた16S rRNA細菌叢解析の報告では、歯周炎やう蝕に関連する局所的な口腔細菌叢の構成が、以前の培養法やPCR法を用いた報告よりもはるかに複雑であることが示されてきている (Costalonga M & Herzberg, 2014; Sato Y et al., 2015)。

本解説では、口腔細菌のDNA調製法、本学に導入された次世代シーケンサーMiSeq (Illumina, 図1) を用いた16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフローを紹介する。

### 1. 16S rRNAとは

rRNAとは、リボソームを構成するRNAである。細菌では、5S rRNA、16S rRNAおよび23S rRNAに分類されている。それらをコードするのがrRNA遺伝子 (rDNA) である。rRNAは全生物に存在し (ウイルス除く)、タンパク質合成に関わる。16S rRNAは点変異の蓄積という観点から進化速度が遅く、種のレベルにおいて高い相同性を示すことが知られている (Palys T et al., 1997)。

Small subunit rRNA (原核生物では16S rRNA、真核生物では18S rRNA) 遺伝子配列を用いた全生物の系統分



図1 本学に導入された次世代シーケンサーMiSeq

類法が提案され、細菌の系統分類には、1,542塩基長の16S rDNA配列が用いられている (Woese CR et al., 1990)。現在では200万配列以上の16S rDNA配列が決定され、GreenGene ([http://http://greengenes.lbl.gov](http://greengenes.lbl.gov)), DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>), GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) およびEMBL (<http://www.embl.org>) などの公共データベースに登録されている。

16S rRNA細菌叢解析では、16S rRNAの保存領域間に存在する9つの可変領域 (V1~V9領域) を利用し、細菌叢を形成する微生物の属や種レベルまでの系統分類ができる (Scannapieco FA & Cantos A, 2016; Vogtmann E & Goedert JJ, 2016)。本解析法は、1回のシーケンスで多くのサンプルを組み合わせたことが可能な方法である。

### 2. メタゲノム研究分野を開拓した大規模プロジェクトと多様なヒト試料を用いたメタゲノム研究

ヒトは自身の細胞数と同じかそれ以上に相当する数の微生物を体内や体表に有しているといわれている。これら微生物がヒトの健康に及ぼす影響は非常に大きい。宿主の遺伝子と微生物との相互作用は、慢性疾患の発症に関わる主要な環境因子となっている。これまでに消化管の細菌叢が大きな注目を集めているが、口腔細菌叢、膈微生物叢および皮膚微生物叢など、その他の部位のヒト微生物叢に関する研究の数も近年増加してきている (Belizário JE & Napolitano M, 2015)。表1に示すように大規模なHuman Microbiome Project (HMP) では、人体の複数の異なる部位として、口腔、咽頭、皮膚、鼻孔、消化管および膈などからサンプルを採取している。これらのプロジェクトにより、ヒトの健康におけるメタゲノム解析の複雑性および重要性に対する認識が近年高まってきている。さらにHMPで蓄積された健常者と患者の

表1 メタゲノム研究分野を開拓した大規模プロジェクト

プロジェクト	期間	内容
MetaHIT	2008-2012	健常者、肥満者、炎症性腸炎患者の糞便を解析
NIH Human Microbiome Project (HMP)	2008-2013	健康な242名 (米国) の様々な組織からサンプリングし、細菌叢ゲノムリファレンスを構築
Earth Microbiome Project (EMP)	2010-現在	地球上の様々な環境サンプルを集積し、約200,000サンプルを解析
NIH The Integrate Human Microbiome Project (iHMP)	2013-現在	早産、炎症性腸疾患、2型糖尿病を対象とした疾患コホートの立ち上げ

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

データベースを用いて、早産、炎症性腸疾患および2型糖尿病を対象とした解析を行っている (iHMP, 表1, Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2014). iHMPでは、腸内細菌叢とホストの相互反応を解析するために、複数の組織からサンプリングし、16S rRNA, Lipidomic, Metatranscriptome, ProteomicsおよびMetabolicを解析している。また、これらの大規模プロジェクトでは、細菌叢解析に関する詳細なプロトコールも公開している。HMPでは、口腔由来の検体も分析しており、その詳細なプロトコールが公開されている。他にもThe Microbiome Quality Control Project (<http://www.mbqc.org/>)により、サンプル採取、16S rRNA増幅、シーケンスおよびバイオインフォマティクスに関する標準プロトコールが作成されている。

### 3. 16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフロー

#### 1) サンプリングおよびDNAの抽出

唾液は0.5 ml程度あれば、16S rRNA解析による細菌叢解析を行うのに十分なDNAが抽出できると言われている。唾液細菌叢は、時間帯や食事などの影響を受けやすいため、サンプリングを行う時間帯を同時刻にする必要がある。

サンプルの保存は、糞便サンプルを室温で保存すると、DNAの分解が進むとの報告 (Cardona S et al., 2012) や、細菌叢に変化がみられたとの報告 (Gorzalak MA et al., 2015) があることから、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存するのが望ましい。我々は、海外でも唾液を採取している。輸送等を考慮し、OMNIgene・ORAL (DNA Genotek) のキット

(図2)を用いてサンプリングと保存を同時に行っている。このキットには、DNAの保存液が付属しており、常温保存であっても $-80^{\circ}\text{C}$ で保存するサンプルと概ね同様の結果が得られる (Nishimoto Y et al., 2016)。

DNA抽出キットの違いにより、糞便サンプルやデンタルプラークの細菌叢に検出差が認められた報告もある (Kennedy NA et al., 2014)。種々のDNA抽出キットが販売されているが (表2)、解析するサンプルに最適なキットを選択することが重要となる。

#### 2) 16S解析用ライブラリー調製

16S rRNA細菌叢解析の増幅用プライマーは種々の領域で設計されている (表3)。V1およびV2領域を含むF27-R338プライマーのセットは、細菌への特異性が高い一方で、腸内細菌叢の主要コミュニティである*Bifidobacterium*属の検出感度が低い。また、V4領域を含むF515-R806プライマーセットは細菌や古細菌など多様

表2 主なDNA抽出キット

キット名
・ Dneasy PowerSoli Kit (QIAGEN) Human Microbiome Projectに採用
・ MagAttract PowerSoil DNA Kit (QIAGEN) Earth Microbiome Projectに採用
・ Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
・ GNOME DNA Isolation Kit (MP Biomedicals)
・ QIAamp DNA Stool mini Kit (QIAGEN)
・ FastDNA SPIN Kit (MP Biomedicals)
・ QIAasympphony DSP Virus/Pathogen Kit (QIAGEN)

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

#### サンプリングおよびDNAの抽出 (図2 唾液採取, DNA抽出)

##### 【準備】

##### 試薬

- ・ OMNIgene・ORAL (ORAL OM-501, DNA Genotek)
- ・ Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
- ・ Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

##### 消耗品

- ・ Qubit assay tubes (Thermo Fisher Scientific)
- ・ 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ および1000  $\mu\text{l}$ フィルター付きピペットチップ
- ・ 1.5 ml遠心チューブ

##### 機器

- ・ 遠心機 (1.5 ml遠心チューブに対応)
- ・ Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific)
- ・ ヒートブロック (1.5 ml遠心チューブに対応)

##### 【プロトコール】

1. OMNIgene・ORALのプロトコールに従って処理し、保存したサンプルを1.5 mlの遠心チューブに200  $\mu\text{l}$ 入れる。
2.  $75^{\circ}\text{C}$ で15分間、水浴または恒温槽でインキュベートする。
3. Dneasy Blood & Tissue Kitのプロトコールのステップ3 (Buffer ALの添加) から操作を行う。
4. 抽出したDNAの濃度をQubit 3.0で測定する。

表3 プロトコール比較

プロジェクト	試料	ターゲット	プライマー	システム
EMP	土壌	V 4	515F/806R	MiSeq/HiSeq2000
HMP	鼻腔, 口腔, 皮膚, 糞便, 膣	V 1 - V 3 V 3 - V 5	27F/534R 357F/926R	Roche454FLX Titanium
iHMP	鼻腔, 糞便, 膣, 尿	V 1 - V 3, V 3 - V 5	27F/534R 357F/926R	MiSeq (250 bp x 2)
IHMS SOP	糞便	V 4	515F/806R	HiSeq2000
Illumina Protocol		V 3 - V 4	341F/805R	MiSeq (300 bp x 2)

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

性の高いコミュニティを感度良く検出することができる。一方、F515-R806プライマーセットは、皮膚常在菌の*Propionibacterium*属の増幅が困難である (Kuczynski J et al., 2011)。我々は、Illuminaプロトコール ([http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)) のV3およびV4領域を含むF341-R805プライマーセットを採用している (図2 Amplicon Primers)。

PCRプライマーセットを用いて行う1回目のPCR反応 (Amplicon PCR) とサンプルインデックスを組み込むための2回目のPCR反応 (Index PCR) で行うことでAmpliconライブラリー調製を行う。MiSeqを用いた16S

### 16S解析用ライブラリー調製 (図2 Amplicon PCR, Index PCR, ライブラリーの調製)

#### 【準備】

##### 消耗品

- ・ 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 200  $\mu$ lおよび1000  $\mu$ lフィルター付きピペットチップ
- ・ 15 mlコニカルチューブ
- ・ 8連PCRチューブ
- ・ Qubit assay tubes (Thermo Fisher Scientific)

##### 試薬

- ・ PCRグレードの滅菌水
- ・ 16S rRNA PCRプライマー
- ・ KAPA HiFi HS ReadyMix (KAPA)
- ・ Agencourt AMPure XP kit (Beckman CoulterGenomic)
- ・ 80%エタノール
- ・ 0.2 nM水酸化ナトリウム溶液
- ・ EBバッファー (Qiagen)
- ・ Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 Indices, 384 Samples, illumina)
- ・ MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles, illumina)
- ・ Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

##### 機器

- ・ サーマルサイクラー (96ウェルプレート対応)
- ・ ヒートブロック (1.5 ml遠心チューブに対応)
- ・ 遠心機 (8連PCRチューブ対応)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ NGS MagnaStand (日本ジェネティクス)
- ・ Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific)

#### 【プロトコール】 ※Illuminaプロトコールを改変

##### Amplicon PCRおよびClean up

1. 8連PCRチューブ中で細菌叢から抽出したDNA, HiFi HotStart ReadyMixおよびPCRプライマーを図2の分量で混合し, 図2のプログラムを実行する。
2. PCR反応後のDNA溶液をアガロースゲルまたはバイオアナライザ電気泳動システムで, 産物を確認する。
3. Index PCRの工程を終えた8連PCRチューブを280 $\times$ g, 20 $^{\circ}$ Cで1分間遠心する。
4. AMPure XPビーズを30秒間ボルテックスで攪拌し, 完全に懸濁させる。
5. Index PCRの工程を終えたサンプルDNA溶液に, 56  $\mu$ lのAMPure XPビーズを加える。
6. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
7. 8連PCRチューブを室温で5分間静置する。
8. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置き, 2分間静置する。
9. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま, マイクロピペットで上清を完全に取出し, 廃棄する。サンプル間でピペットチップは交換する。
10. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま, 新しく調製した80%エタノールで以下のようにビーズを洗浄する:
  - A) 8連PCRチューブを用いて, 200  $\mu$ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
  - B) チューブをマグネットスタンドの上で30秒間静置する。

- C) 注意深く上清を取り出し、廃棄する。
11. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、以下のように2回目のエタノール洗浄を実施する：
    - A) マイクロピペットを用いて、200  $\mu$ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
    - B) プレートにマグネットスタンドの上で30秒間静置する。
    - C) 上清を注意深く取り出し、廃棄する。P20のマイクロピペットを用いて、プレートに残ったエタノールを完全に除去する。
  12. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置いたまま、10分間静置してビーズを風乾させる。
  13. 8連PCRチューブをマグネットスタンドから下ろし、サンプルを含む各ウェルに27.5  $\mu$ lのEBバッファーを加える。
  14. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
  15. 8連PCRチューブを室温で2分間静置する。
  16. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置き、室温で2分間静置する。
  17. 8連PCRチューブからマイクロピペットで注意深く上清25  $\mu$ lを取り出し、新しい8連PCRチューブの対応するウェルに移し替える。コンタミを防ぐため、サンプル間でピペットチップは交換する。

#### Index PCRおよびClean up

1. マイクロピペットを用いて、Amplicon PCR後のサンプルDNA 5  $\mu$ lを取り出し、新しい8連PCRチューブに分注する。
2. Index 1および2のプライマーチューブをラック (TruSeq Index Plate Fixture) に以下のように並べる。
  - A) Index 2プライマーチューブ (白キャップ) を縦方向 (row A~H) に並べる。
  - B) Index 1プライマーチューブ (オレンジキャップ) を横方向 (column 1~12) に並べる。
3. 1st PCR後のサンプルDNA (5  $\mu$ l) が入ったPCRプレートをラック (TruSeq Index Plate Fixture) に置く。
4. 図2のように、DNA, Index 1および2プライマー, HiFi HotStart ReadyMixおよびPCRグレードの滅菌水を加える。
5. マイクロピペットで10回穏やかにピペッティングする。
6. 8連PCRチューブの蓋を閉め、1,000 $\times$ g, 20 $^{\circ}$ Cで1分間遠心する。
7. 8連PCRチューブをPCR装置にセットし、図2のプログラムを実行する。
8. Index PCRの工程を終えたPCRプレートを280 $\times$ g, 20 $^{\circ}$ Cで1分間遠心する。
9. AMPure XPビーズを30秒間ボルテックスで攪拌し、完全に懸濁させる。
10. Index PCRの工程を終えたサンプルDNA溶液に、56  $\mu$ lのAMPure XPビーズを加える。
11. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
12. 8連PCRチューブを室温で5分間静置する。
13. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置き、2分間静置する。
14. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、マイクロピペットで上清を完全に除去し、廃棄する。サンプル間でピペットチップは交換する。
15. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、新しく調製した80%エタノールで以下のようにビーズを洗浄する：
  - A) マイクロピペットを用いて、200  $\mu$ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
  - B) プレートにマグネットスタンドの上で30秒間静置する。
  - C) 注意深く上清を取り出し、廃棄する。
16. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、以下のように2回目のエタノール洗浄を実施する：
  - A) マイクロピペットを用いて、200  $\mu$ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
  - B) チューブをマグネットスタンドの上で30秒間静置する。
  - C) 上清を注意深く取り出し、廃棄する。
  - D) P20のマイクロピペットを用いて、プレートに残ったエタノールを完全に除去する。
17. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置いたまま、10分間静置してビーズを風乾させる。
18. 8連PCRチューブをマグネットスタンドから下ろし、サンプルを含む各ウェルに27.5  $\mu$ lのEBバッファーを加える。
19. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
20. 8連PCRチューブを室温で2分間静置する。
21. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置き、室温で2分間静置する。
22. 8連PCRチューブからマイクロピペットで注意深く上清25  $\mu$ lを取り出し、新しい8連PCRチューブに移し替える。コンタミを防ぐため、サンプル間でピペットチップは交換する。

#### ライブラリーの調製

1. 作製したライブラリーは、Qubit 3.0で濃度を測定する。
2. 測定したDNA濃度は、前工程でチェックした平均ライブラリーサイズ [PCR産物 (2段階目) の平均サイズ] を基にnM単位に換算する：

- $$\frac{\text{concentration in ng/}\mu\text{l}}{660 \text{ g/mol} \times \text{平均ライブラリーサイズ}} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$
3. 測定値を基に、ライブラリー濃度をEBバッファーで4 nMに調整する。
  4. 複数サンプルをMiSeq 1 ランで同時に解析する場合は、4 nMに合わせたライブラリー溶液を5  $\mu\text{l}$ ずつ取り出し、新しい1.5 mlチューブ中で混合する。
  5. ヒートブロックを96°Cに予熱する。
  6. MiSeqReagent Cartridgeを-20°Cの冷凍庫から取り出し、室温で溶解させる。
  7. 約1時間前、Reagent Cartridgeを水に浸したまま室温で置いておく。
  8. 1.5 ml遠心チューブ中で、以下の分量で4 nMライブラリー溶液と、新しく調製した0.2 nM NaOH溶液を混合する：
    - 4 nMライブラリー溶液 (5  $\mu\text{l}$ )
    - 0.2 nM NaOH (5  $\mu\text{l}$ )
  9. サンプル溶液をボルテックスで攪拌し、280  $\times$  g, 20°Cで1分間遠心する。
  10. 室温で5分間インキュベートし、ライブラリーを一本鎖DNAに変性する。
  11. 変性後のライブラリー溶液に、氷冷したHT 1 バッファーを以下の分量で加える：
    - 変性後のライブラリー溶液 (10  $\mu\text{l}$ )
    - 氷冷したHT 1 (990  $\mu\text{l}$ )
  12. 最終希釈の準備が整うまで、20 pM変性済みライブラリーは氷上に静置しておく。
  13. 20 pMの変性済みライブラリーを以下の分量で8 pMに追加希釈する。
    - 20 pMの変性済みライブラリー (240  $\mu\text{l}$ )
    - 氷冷したHT 1 (360  $\mu\text{l}$ )
  14. HT 1 バッファーを追加したら、チューブを4～5回転倒攪拌する。
  15. 最終希釈を終えたライブラリー溶液を氷上に静置する。
  16. 10 nM PhiXを以下の分量で混合し、4 nMまで希釈する：
    - 10 nM PhiX library (2  $\mu\text{l}$ )
    - 10 mM Tris pH 8.5 (3  $\mu\text{l}$ )
  17. 4 nM PhiX溶液と0.2 nM NaOHを以下のように混合する。
    - 4 nM PhiX library (5  $\mu\text{l}$ )
    - 0.2 nM NaOH (5  $\mu\text{l}$ )
  18. 混合後のPhiX溶液をボルテックスで軽く攪拌する。
  19. 室温で5分間インキュベートし、PhiXライブラリーを一本鎖DNAに変性する。
  20. 変性後のPhiX溶液に氷冷したHT 1 バッファーを以下のように加え、20 pMの変性済みPhiX溶液を得る：
    - 変性済みPhiXライブラリー-library (10  $\mu\text{l}$ )
    - 氷冷したHT 1 (990  $\mu\text{l}$ )
  21. 変性後の20 pM PhiX溶液を以下の分量で8 pMに追加希釈する。
    - 20 pMの変性済みPhiX (240  $\mu\text{l}$ )
    - 氷冷したHT 1 (360  $\mu\text{l}$ )
  22. HT 1 バッファーを追加したら、チューブを4～5回転倒攪拌する。
  23. 最終希釈を終えたPhiX溶液を氷上に静置する。
  24. 新しい1.5 ml遠心チューブ中で、以下のように変性・濃度調整済みのライブラリーおよびPhiX溶液を混合する。
    - 変性・濃度調整済みPhiX (30  $\mu\text{l}$ )
    - 変性・濃度調整済みライブラリー (570  $\mu\text{l}$ )
  25. MiSeqReagent Cartridgeとライブラリーの熱変性の準備が整うまで、ライブラリー混合液は氷上に置いておく。
  26. ライブラリー混合液を96°Cに予熱したヒートブロックで2分間インキュベートし、熱変性する。
  27. インキュベート後のライブラリー混合液を1～2回転倒攪拌してから氷上に置く。
  28. ライブラリーの入ったチューブを氷上で5分間静置する。5分経ったら、600  $\mu\text{l}$ 全量をReagent Cartridgeに分注する。
  29. Reagent Cartridgeを水浴から取り出し、実験機の上でペーパータオルの上にたたきつけて水を落とす。
  30. 溶解した試薬を混ぜるために、Reagent Cartridgeを10回上下反転させ、目視ですべての個所の試薬が溶けていることを確認する。
  31. 試薬チューブから気泡を取り除くために、カートリッジを実験台に軽く叩きつける。
  32. サンプルロードする準備ができるまで、Reagent Cartridgeを氷上あるいは2～8°Cの冷蔵庫で保管する。
  33. きれいな新しい空の1 mLピペットチップを用いて、「Load Samples」(17番)とラベルがあるチューブのホールに穴をあける。
  34. 600  $\mu\text{l}$ のサンプルライブラリーを「Load Samples」のチューブに移す。
  35. Reagent Cartridgeを机などに軽く叩きつけてライブラリーのチューブ底の気泡を取り除く。

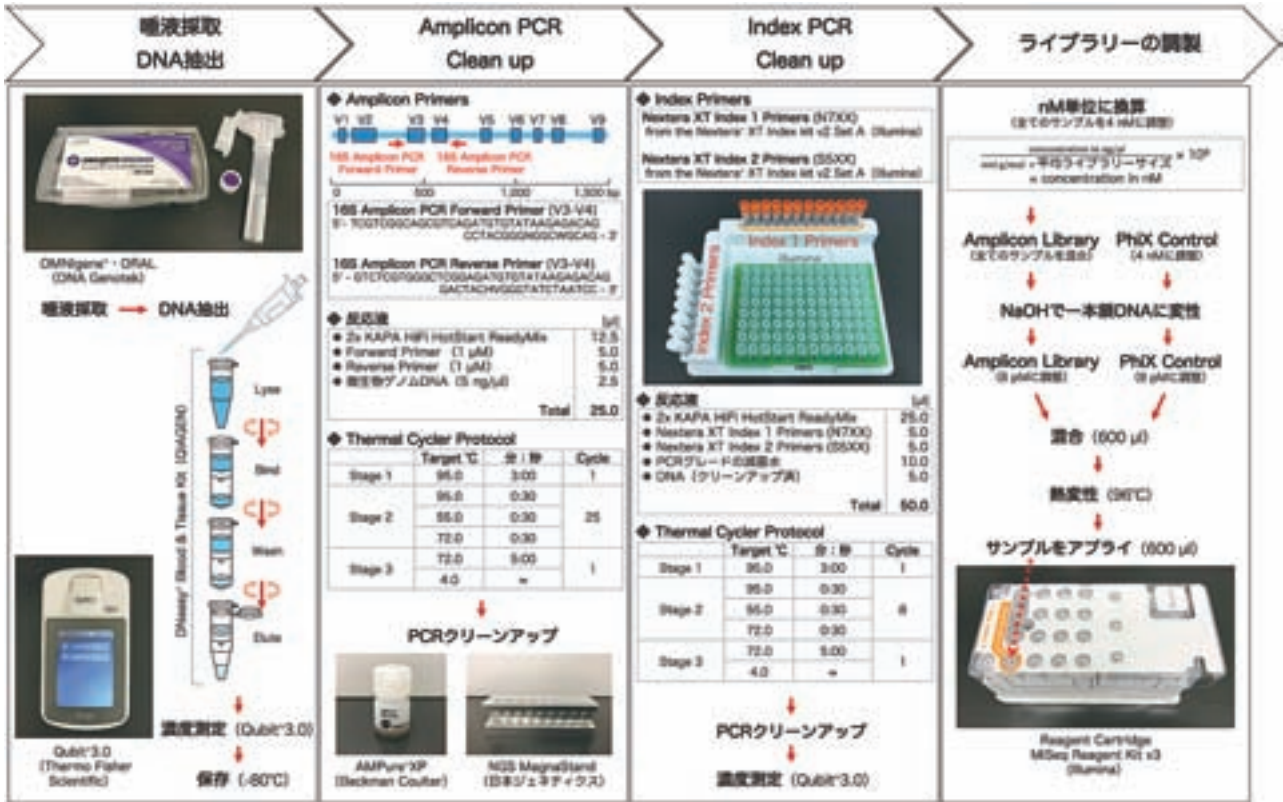


図2 16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフロー (1)

rRNA口腔細菌叢解析でのAmpliconライブラリー調製は、前述のF341-R805プライマーセットでAmplicon PCRを行った後、Nextera XT Index kit v2 Set A (Illumina)を用いてサンプルDNAにilluminaシーケンサー用アダプターおよびインデックス配列を付加する(図2)。AMPure XPビーズ(Beckman Coulter)を用いてライブラリーを精製した後、二重鎖DNA特異的な検出が可能なQubit 3.0(Thermo Fisher Scientific)で濃度を確認する。測定したDNA濃度は、MiSeqの最終入力濃度(pM)に調製するために、平均ライブラリーサイズ(PCR産物(Index PCR)の平均サイズ)を基にnM単位に換算する必要がある。平均ライブラリーサイズが500 bpで、Qubit 3.0で測定した濃度が4.0 ng/μlの場合、約12 nMに相当する。

ライブラリー調製後、AmpliconライブラリーとPhiX Control(Illumina)を混合する。MiSeqでのクラスター形成およびシーケンスにあたり、NaOHで変性、ハイブ

リダイゼーションバッファーでの希釈が必要となる。Ampliconライブラリーは塩基の多様性が低いので、MiSeqでシーケンスする際には15%のPhiX Controlを混合してMiSeq Reagent Cartridgeにアプライする。

### 3) シーケンシング

シーケンスランのセットアップは、MiSeq装置上のMiSeq Control Software(MCS)で行う(図3)。MCSの表示に従い、Flow Cell、Reagent CartridgeおよびPR 2 bottleをセットする。シーケンシングをスタートさせるとMiSeq Reporter(MSR)での2次解析までが約55時間で自動的に実行される。シーケンシング終了後、Sequence Analysis Viewer(SAV)で得られたデータのクオリティーチェックを行う。V3試薬利用時の標準的なサンプル(PhiX)では、クオリティー値30以上の割合が、70%以上となるのが好ましい(図3)。

### シーケンシング (図3 シーケンシング)

#### 【準備】

#### 消耗品

- ・パウダーフリーグローブ
- ・プラスチック製のピンセット
- ・MilliQ水
- ・0.5% Tween20
- ・レンズ紙

## 【プロトコール】

1. MiSeqのIllumina Experiment Manager (IEM) を起動し、Create Sample Sheetをクリックする。
2. MiSeqを選択後、Metagenomics16S rRNAを選択する。
3. Reagent Cartridge Barcodeを入力する。
4. サンプル調製に使用したキットを選択する (Nextera XT Index Kit v2 Set A)。
5. Index Readsを指定する (2)。
6. Read Typeを指定する (Paired End)。
7. Cycle Readsを指定する (301)。
8. Sample Sheetを作成する。
9. MiSeqのMiSeq Control Software (MCS) を起動し、SEQUENCEをクリックする。
10. Use BaseSpace for storage and analysisのボックスを空欄にしたままNextをクリックする。
11. 新しいパウダーフリーグローブを着ける。
12. プラスチック製のピンセットを使って、Flow Cellを取り出す。
13. 塩を残さないように注意しながらMilliQ水でFlow Cellを軽くすすぐ。
14. Flow Cellポートのガスケットに気をつけながら、レンズ紙でFlow Cellとカートリッジの水分を除く。ガスケットとガラスの境界部位は軽くたたいて乾かす。
15. アルコールを湿らせたレンズ紙を使い、Flow Cellのガラス部分をきれいにする。Flow Cellのガスケット部分にはレンズ紙を使わない。
16. Flow Cell区画のドアを開け、Flow Cellステージに埃などがいないか確認する。
17. Flow Cellをステージに載せ、区画のドアを閉める。
18. PR 2 bottleをセットし、廃液bottleを空にする。
19. Reagent Cartridgeをセットし、区画のドアを閉める。
20. 設置確認後、ランをスタートさせる。
21. ランの終了後、0.5% Tween 20で洗浄する。
22. Sequence Analysis Viewer (SAV) でシーケンスデータのクオリティー値30以上の塩基の割合をチェックする。

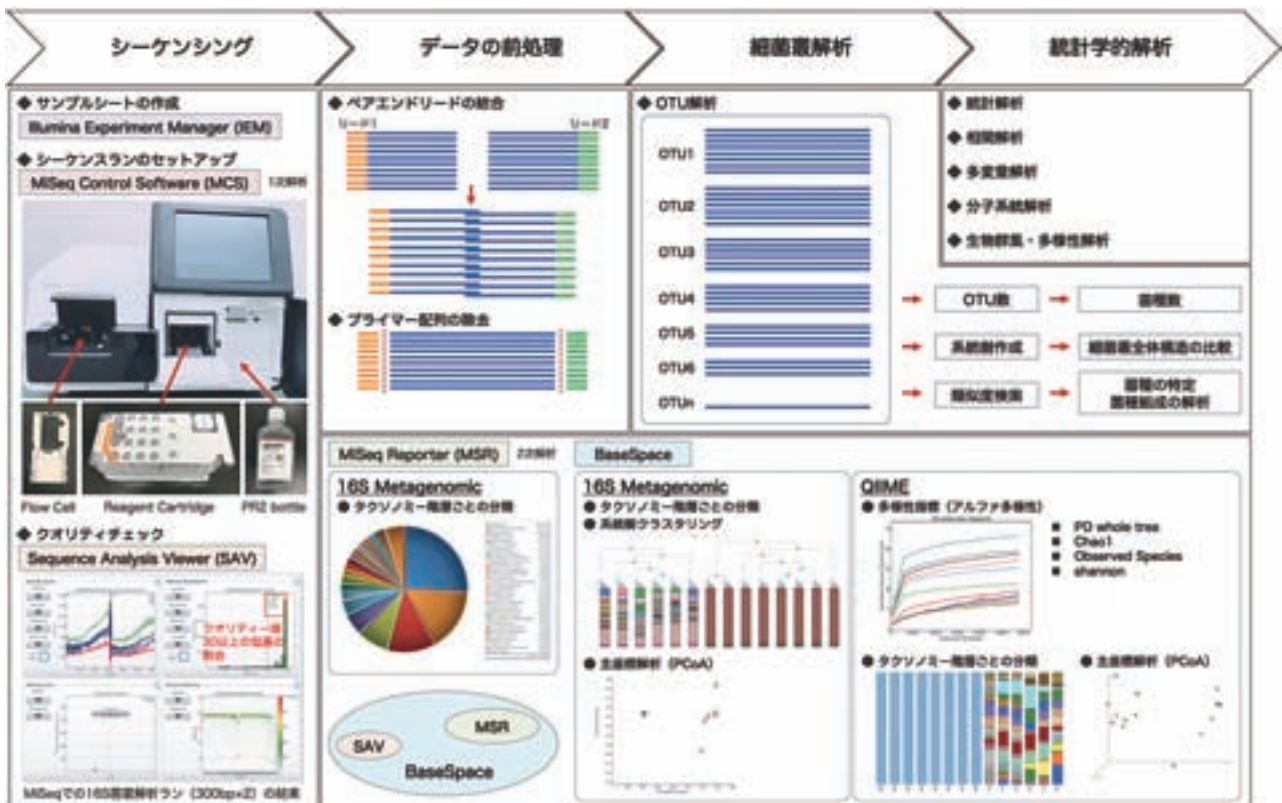


図3 16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフロー (2)

## 4) 情報解析

16S rRNAの特定領域をシーケンス解析し、その配列データから細菌叢を明らかにしている。膨大な数の菌種が検出されるが、門 (phylum) および属 (genus) レベル

で分類されることが多い。配列同士の類似性がある配列をグループ化するための分類単位をOTU (operational taxonomic unit) という (図3, 服部ら, 2014)。16S rRNA遺伝子の場合、96%以上の類似性を持つグループ



## 情報解析 (QIIME) (図3 細菌叢の解析, 統計学的解析)

## 【準備】

## 機器

- ・ポータブルHDD (USB接続)
- ・PC (インターネット環境)

## 【プロトコール】

1. MiSeqのシーケンスデータをHDDにコピーする。
2. Google chromeを起動し, BaseSpace (basespace.illumina.com) にログインする。
3. BaseSpace Sequence Hubをクリック後, PROJECTタブをクリックし, HDDのシーケンスデータをアップロードする。
4. APPSタブをクリックし, QIIME Preprocessingを選択する。
5. Launchを選択し, 結果の保存先および解析サンプルを選択する。
6. Continueをクリックし, 解析をスタートさせる。
7. 解析終了後, データの確認を行う。この時, 最少リード数 (Min) をメモしておく。
8. Google Spreadsheetでウェブ上にサンプル名記載のリストを作成 (一列目のタイトルに# SampleID, 二列目以降にサンプル情報などを記入), ウェブに公開する。
9. Mapping FileのURLをコピーする。
10. APPSタブをクリックし, QIIME Visualizationsを選択する。
11. Google key where your mapping file is locatedにMapping FileのIDを入力する。
12. Even rarefaction depthに使用リード数を指定するため7. でメモした値 (Min) を入力する。
13. QIIME Preprocessing Resultsに出力データを選択する。
14. Save Results Toに保存先を指定する。
15. 解析終了後, 解析結果をダウンロードする (Download Analysisをクリック)。

表4 16S rRNA細菌叢解析アプリ

MiSeq Reporter 16S Metagenomic	BaseSpace 16S Metagenomic	BaseSpace QIIME
<ul style="list-style-type: none"> <li>・MiSeqに内蔵されているため, データの移動不要</li> <li>・各サンプルの菌種割合のみ解析</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・クラウドプラットフォーム上で解析</li> <li>・各サンプルの菌種割合およびサンプル間比較が可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・クラウドプラットフォーム上で解析</li> <li>・各サンプルの菌種割合およびサンプル間比較が可能</li> <li>・16S解析で実績</li> </ul>

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

を1つのOTUとして定義する場合が多い。NGSを用いた解析において, 全配列を解析するには膨大な時間を要するため, あらかじめOTUに分類し, 各OTUから代表配列を1つずつ選び, その後の解析を行っている。

OTUの代表的な配列を用いて, 比較するサンプルの系統樹解析を行い, OTUの枝長と各サンプル固有な枝長の割合から, 距離として構造類似度を解析する手法をUniFrac解析という。UniFrac解析で算出された距離を用いて, 主座標分析 (PCoA) によるクラスタリング解析を行うことで, サンプル間の相違度を2次元または3次元の座標軸に配置することで視覚化できる。これらの配置は, 類似したサンプルは近く, 類似していないものは遠くに配置される (図3)。サンプル中に存在する細菌種の数を推定する解析のことを多様性解析という。1つのサンプル中における細菌の多様性を $\alpha$ 多様性, また, 複数のサンプル間における種構成の類似度を $\beta$ 多様性という (図3)。

前述した一部の解析を行うためのソフトウェアMiSeq Reporter (Illumina) が, 装置に搭載されている。また, インターネット環境では, クラウドサービスBaseSpace (Illumina) に接続することで16S MetagenomicsおよびQIIMEなどを利用して解析することができる (表4, 図3)。16S MetagenomicsおよびQIIMEは, データベースを利用して, 図式化して表示できる。我々は, 16S解析で実績のあるQIIMEを用いて解析を行っている (表4, 図3)。

## おわりに

口腔細菌叢は, う蝕, 歯周病および口腔がんなど種々の口腔疾患に関与していることが知られている。さらに, 肺炎, 心疾患, 膵臓がんおよび肝硬変などの全身的な疾患にも口腔細菌叢が関連していることも近年報告されている (Scannapieco FA & Cantos A, 2016; Vogtmann E & Goedert JJ, 2016)。しかし, 全身的な疾患と口腔細菌叢に関する報告は少数であり, 健康との関連性に十分な知見があるとはいえない。NGSを用いた口腔細菌叢の解析データの蓄積によって, 全身的な疾患の高リスク群を明らかにできれば, 高リスク群を対象に適切な口腔保健管理を行うことができる。すなわち, 1次予防や2次予防対策を講じることが可能となり, 疾病予防や早期発見も可能になると考えられる。

本解説の公表に当たって, 開示すべき利益相反はない。

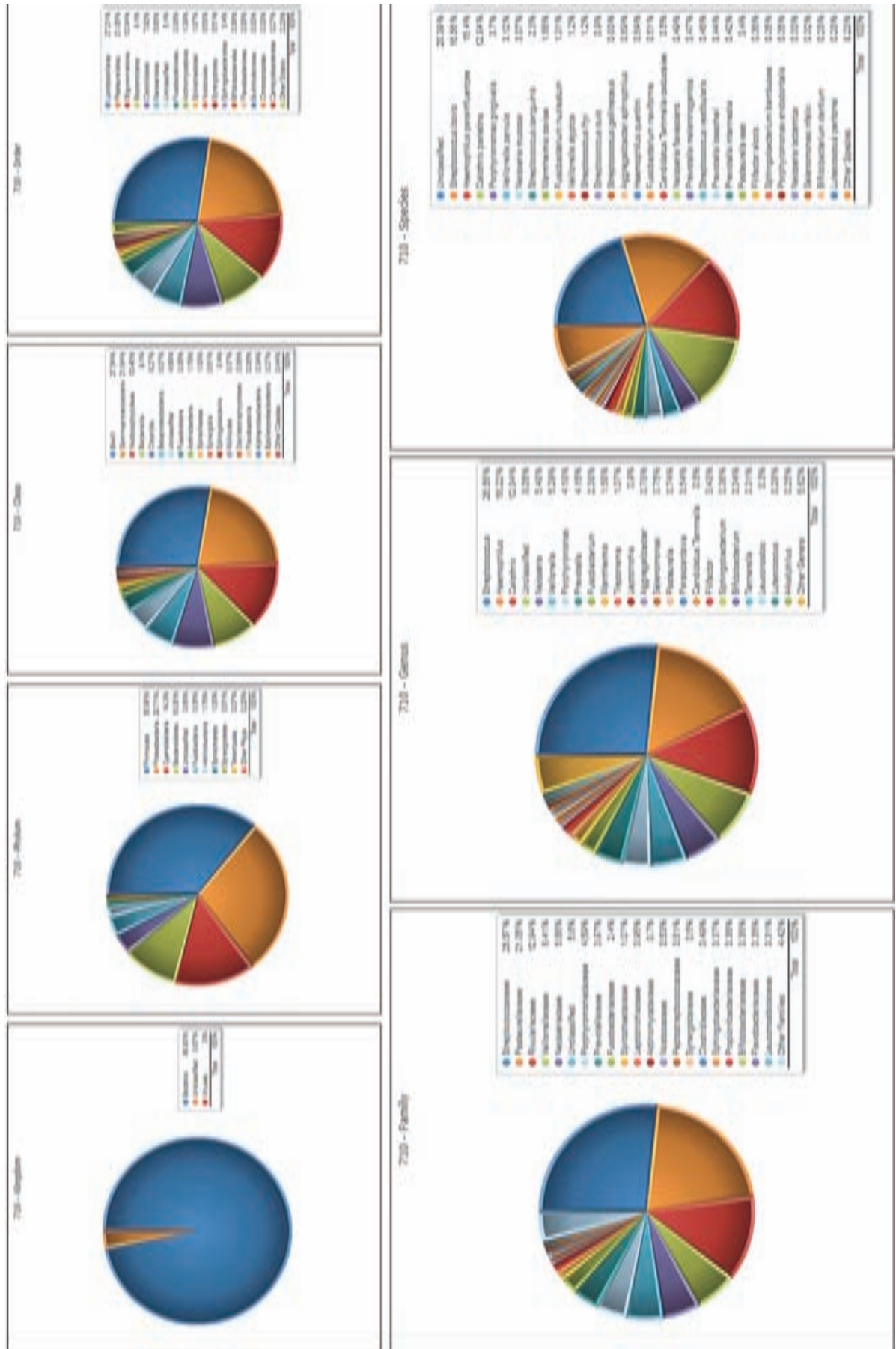


図 4 16S rRNA口腔細菌叢解析例 (16S Metagenomics)

## 謝 辞

本実験プロトコルのデータの取得にあたり、北海道医療大学がん予防研究所の次世代シーケンサーMiSeqを使用させて頂きました。浅香正博学長をはじめとする関係者の皆様にこの場を借りて深く御礼申し上げます。

## 文 献

- Belizário JE & Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol* 6 : 1050, 2015.
- Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, Azpiroz F, Roca J, Guarner F & Manichanh C. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol* 12 : 158, 2012.
- Costalonga M & Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett* 162 : 22–38, 2014.
- Gorzalak MA, Gill SK, Tasnim N, Ahmadi-Vand Z, Jay M & Gibson DL. Methods for Improving Human Gut Microbiome Data by Reducing Variability through Sample Processing and Storage of Stool. *PLoS One* 10 : e0134802, 2015.
- 服部正平：NGSアプリケーション今すぐ始める！メタゲノム解析実験プロトコル～ヒト常在細菌叢から環境メタゲノムまでサンプル調製と解析のコツ（実験医学別冊），羊土社，2014，p28–38.
- Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project : dynamic analysis of microbiome–host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host Microbe* 16 : 276–289, 2014.
- Kennedy NA, Walker AW, Berry SH, Duncan SH, Farquarson FM, Louis P, Thomson JM ; UK IBD Genetics Consortium, Satsangi J, Flint HJ, Parkhill J, Lees CW & Hold GL. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One* 9 : e88982, 2014.
- Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D & Knight R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* 13 : 47–58, 2011.
- Nishimoto Y, Mizutani S, Nakajima T, Hosoda F, Watanabe H, Saito Y, Shibata T, Yachida S & Yamada T. High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy. *Gut* 65 : 1574–1575, 2016.
- Palys T, Nakamura LK & Cohan FM. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world : the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* 47 : 1145–1156, 1997.
- Sato Y, Yamagishi J, Yamashita R, Shinozaki N, Ye B, Yamada T, Yamamoto M, Nagasaki M & Tsuboi A. Inter–Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra–Day Fluctuations in Individuals. *PLoS One* 10 : e0131607, 2015.
- Scannapieco FA & Cantos A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases : implications for the elderly. *Periodontol* 2000 72 : 153–175, 2016.
- Vogtmann E & Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer* 114 : 237–242, 2016.
- Woese CR, Kandler O & Wheelis ML. Towards a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 4576–4579, 1990.



植原 治

平成20年3月 北海道医療大学歯学部 卒業  
 平成20年4月 北海道医療大学病院 研修歯科医  
 平成21年4月 北海道医療大学病院 臨床助手  
 平成25年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了  
 平成25年4月 北海道医療大学歯学部口腔機能・発育学系保健衛生学分野 助教  
 平成29年10月 北海道医療大学がん予防研究所 兼務