

P17-3

サンプルの前処理方法が新型シーケンサーを用いた微生物叢解析結果に及ぼす影響○沼田 充¹、三浦 隆匡¹、Sumpavapol Punnanee²、山副 敦司¹、藤田 信之¹¹NITE・NBRC、²Prince of Songkla University

近年、微生物菌叢解析において新型シーケンサーを用いた方法が一般的になっている。より正確な解析を行う上で、前処理過程が重要だと考えられるが、サンプル調製方法の違いがシーケンス結果に及ぼす影響を調査した知見は多くない。そこで、我々はシーケンサーの機種やPCRに使用する16S rRNA遺伝子プライマーの違いなどが解析結果に与える影響を調査した。

土壌、海水、原油による集積を行った海水など7種類のサンプルを使用し、土壌DNA抽出キットを用いて破碎抽出を行った。得られたゲノムDNAより16S rRNA遺伝子のV4領域（292 bp）をPCR増幅し、Roche 454 GS FLX及びIllumina MiSeqでシーケンスを行い、QIIMEを用いて菌叢を解析し結果を比較した。主座標解析の結果では顕著な差は見られず、phylumレベルで比較した菌叢にも大きな違いはなかった。このことから、シーケンサーの違いが結果に与える影響は少ないことが示された。

次いで、解析に用いる16S rRNA遺伝子領域がシーケンス結果に及ぼす影響を調査するため、V4 領域とV3-4 領域（465 bp）に対し設計されたプライマーを用いてPCRを行い、MiSeqを使用して解析した。それぞれのシーケンス結果を比較した結果、主座標解析では差は見られず、phylumレベルで比較した菌叢にも大きな違いはなかった。しかし、OTU (operational taxonomic unit)数がV4領域のみに比べて、V3-4領域では減少することが示された。このことから、サンプル調製時のプライマー選択は特に重要であることが示唆された。

P17-4

次世代シーケンス解析の解析領域が様々なサンプルの帰属分類群の推定に及ぼす影響○富田 順子¹¹ (株) テクノスルガ・ラボ

【目的】次世代シーケンサーを用いた解析では、近年、解析できる塩基長が伸びている（現在、イルミナMiSeq では600bp）。解析に使用できる領域の選択肢が増えることで、「微生物群集構造解析においてどの解析領域を使用するのが目的のサンプルに適しているのか？」という疑問を多くの人が持つであろう。そこで、本研究ではMiSeqを用いて、解析領域が様々なサンプルの帰属分類群の推定に及ぼす影響を検討した。【方法】5種類のサンプル（糞便、唾液、土壌、活性汚泥、河川水）からDNAを抽出し、一般細菌16SrDNA対象のユニバーサルプライマーセット27F-534R（V1-V3）、27F mod-534R（V1-V3）、341F-806R（V3-V4）、341F-926R（V3-V5）、515F-1064（V4-V6）を用いてPCRを行いMiSeqによる解析を行った。得られたリードについて、RDPによる帰属分類群の推定およびアポロン基準株データベースによる種レベルの推定を行い、各種サンプルについて解析領域における帰属分類群の推定結果を検証した。【結果および考察】RDP解析およびアポロン基準株データベースによる解析の結果、検討したいずれのサンプルにおいても、解析領域によって帰属分類群の構成比に変化が認められた。特に、アポロン基準株データベースによる種レベルの推定においては、解析領域によって種レベルに推定されるリードの割合に大きな差が認められた。また、サンプルの種類によっても、その結果に多少の違いが認められたことから、サンプルの種類によっても適する解析領域が異なると考えられた。