

腸内細菌叢の解析

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 渡辺 純

【はじめに】

ヒトをはじめ哺乳動物の消化管内、とりわけ下部消化管には多くの細菌が生息している。我々の消化管内に生息する細菌の数は、我々の細胞の数をはるかに上回るといわれている。ビフィズス菌や乳酸菌を代表とするプロバイオティクス、難消化性オリゴ糖などのプレバイオティクスは、腸内環境を整える効果を有する特定保健用食品として数多く市販されている。また、メタボリックシンドロームなど多く疾病・生活習慣病に腸内細菌が関与することが数多く報告されている¹⁾。腸内細菌を培養する試みが古くからなされているが、未だに腸内細菌のかなりの部分は培養されていない。腸内細菌叢を解析する分子生物学的手法が複数報告されているが、それらの多くは 16S rRNA 遺伝子の配列に基づくものである。本稿では、16S rRNA 遺伝子に対するユニバーサルプライマーで遺伝子断片を網羅的に増幅し、その PCR 産物を変性剤濃度勾配ゲルで塩基配列の組成に基づいて分離し、得られるゲル上のバンドパターンを解析することで腸内細菌叢を解析する PCR-DGGE 法について紹介する。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- DCode ユニバーサルミュレーション検出システム (バイオラッド)
- 電気泳動用パワーサプライ
- サーマルサイクラー
- 核酸用電気泳動装置 (例えば、Mupid-2 plus)
- ペリスタポンプ (5 mL/min 程度で総液可能なもの) およびチューブ
- グラジエントミキサー (15 mL ずつの 2 液が混合可能なもの、例えば GE ヘルスケア SG-50)
- マグネティックスターラーおよびスターラーバー (グラジエントミキサー内のゲル溶液を混合可能なもの)
- マイクロピペット
- メンブレンフィルター (0%, 100% 変性剤溶液の濾過に使用する)
- OHP シート
- ソフトウェア Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html> よりダウンロード可能)

2. 試薬

- DNA 抽出キット (糞便・盲腸内容物サンプルから PCR に用いることができる DNA を抽出可能なもの、例えば PowerFecal DNA Isolation Kit (MO Bio), FastDNA SPIN Kit for Feces (MP Biomedicals))
- 40% アクリルアミド/ビス (19:1) 溶液
- ホルムアミド (生化学用)
- 尿素 (生化学用)

- 過硫酸アンモニウム (分子生物学用)
- N,N,N'N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED, 電気泳動用)
- DNA ポリメラーゼ (例えば、Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ))
- アガロース (電気泳動用)
- 50× TAE 緩衝液
- DGGE 用マーカー (ニッポンジーン DGGE marker II)
- SYBR Green I (例えば、タカラバイオ #5760A)
- 水飽和ブタノール (ブタノールと水を混合した上層を用いる)
- 銀染色キット (例えば、バイオラッド シルバーステインプラスキット #1610449)
- 高真空グリース
- 水: JIS 規格 (JIS K0557:1998) で規定されているクラス A3 以上のもの
- PCR プライマー²⁾
 - HDA1-GC (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3')
 - HDA2 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3')

3. 調合・調整

1) 0%変性剤溶液

- 40%アクリルアミド/ビス溶液 (50 mL)、50× TAE 緩衝液 (5 mL)、水 (195 mL) を混合する。
- メンブレンフィルターを通し、不溶物を除去する。
- 使用まで冷蔵保存する。

2) 100%変性剤溶液

- ビーカーに尿素 (105 g)、40%アクリルアミド/ビス溶液 (50 mL)、50× TAE 緩衝液 (5 mL)、ホルムアミド (100 mL)と少量の水を加える。
- 40°Cで加温しながら攪拌して尿素を溶解する。
- 水で 250 mL に定容する。
- メンブレンフィルターを通し、不溶物を除去する。
- 使用まで冷蔵保存する。
- 保存中に尿素が析出するので、40°Cで加温しながら攪拌して尿素を溶解してから使用する。

3) 濃縮ゲル用 0%変性剤溶液

- 40%アクリルアミド/ビス溶液 (25 mL)、50× TAE 緩衝液 (2 mL)、水 (73 mL) を混合する。
- メンブレンフィルターを通し、不溶物を除去する。
- 使用まで冷蔵保存する。

4) 10%過硫酸アンモニウム溶液

- 過硫酸アンモニウム (1 g) を水 (10 mL) で溶解する。

- 1 回使用する分量ずつ分注する。
 - 使用まで冷凍保存する。
- 5) ゲル溶液（低変性剤濃度、160 × 180 × 1 mm サイズのゲル作成用）
- 0%変性剤溶液（7.2 mL）、100%変性剤溶液（4.8 mL）、10%過塩素酸アンモニウム溶液（100 μL）、TEMED（5 μL）を 50 mL コニカルチューブに入れ、転倒混和する。
 - ゲル作成まで氷上に置く。
- 6) ゲル溶液（高変性剤濃度、160 × 180 × 1 mm サイズのゲル作成用）
- 0%変性剤溶液（5.4 mL）、100%変性剤溶液（6.6 mL）、変性剤勾配確認用色素液（0.1 % プロモフェノールブルーの TAE 溶液, 70 μL）、10%過塩素酸アンモニウム溶液（100 μL）、TEMED（5 μL）を 50 mL コニカルチューブに入れ、転倒混和する。
 - ゲル作成まで氷上に置く。
- 7) 濃縮ゲル溶液
- 濃縮ゲル用 0%変性剤溶液（5 mL）、10%過塩素酸アンモニウム溶液（40 μL）、TEMED（4 μL）を 15 mL コニカルチューブに入れ、転倒混和する。
 - 濃縮ゲル溶液をガラス板のサンドイッチに注ぎ入れる直前に調製する。
- 8) DGGE loading buffer
- 10 mM Tris-塩酸緩衝液 pH 8.0、20mM EDTA pH 8.0、0.05% プロモフェノールブルー、70% グリセロール
 - 市販品（ニッポンジーン、#316-90341）も使用可能

【プロトコール】

1. 糞便・盲腸内容物サンプルからの DNA 抽出と 16S rRNA 遺伝子断片の増幅
 - DNA 抽出キットを用いて、実験動物の盲腸内容物や糞便、ヒト糞便等のサンプルから DNA を抽出する。
 - 糞便・盲腸内容物由来 DNA 溶液（DNA としておおよそ 10 ng）、10 μM プライマー溶液（1 μL ずつ）を用い、DNA ポリメラーゼのプロトコールに従い、総量を 25 μL とした反応液を調製する。
 - 94 °C 4 min、94 °C 30 sec, 56 °C 30 sec, 72 °C 2 min 35 サイクル、72 °C 10 min のサーマルプログラムでサーマルサイクラーを用いて PCR を行う。
 - 1.5 %アガロースゲルを用いて、増幅を確認する。（おおよそ 200 bp の PCR 産物となる）
2. DGGE 用グラジエントゲルの作成
 - エタノールを染ませたキムワイプで大小のガラス板、スペーサー、コームを拭く。
 - スペーサーの端の両面に高真空グリースを塗布して伸ばす（用いるグリースの

量は可能な限り少なめにする、グリースを塗布した面がガラス板の外側にくるように配置する)。

- 大小のガラス板でスペーサーをサンドし、クランプでとめてゲル作成用スタンドに立てる (図 1)。
- ガラス板のサンドイッチの上部から水を加え、漏れがないことを確認したのち、ろ紙で内部の水分を取り除く。
- グラジエントミキサー、ペリスタポンプを接続し、グラジエントミキサーの出口に近い側のシリンダーにスターラーバーを入れる (図 2)。グラジエントミキサーのコックは閉じておく。
- グラジエントミキサーの出口に近いシリンダーにゲル溶液 (高変性剤濃度) を入れ、コックを静かに開けてシリンダー間の流路を満たした後、コックを閉める。
- 逆側のシリンダーにゲル溶液 (低変性剤濃度) を入れる。
- スターラーを回転させ、グラジエントミキサーのコックを開け、ペリスタポンプで 5 mL/分程度で送液する (図 2)。
- ゲル溶液がなくなったら、ペリスタポンプ・スターラーを停止する。ゲル溶液に水飽和ブタノール (約 1 mL) を静かに重層し、室温で 1 時間以上静置してゲルを固化させる。
- 水飽和ブタノールを水で洗い流し、サンドイッチ内の水分をろ紙を使って取り除く。
- コームをセットし、濃縮ゲル溶液をガラス板上端まで注ぐ。
- 室温で 1 時間以上静置して、ゲルを固化させる。

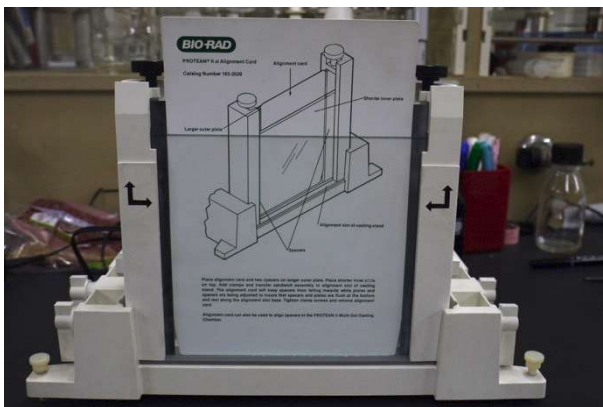


図 1 ガラス板サンドイッチの設置



図 2 グラジエントゲルの作成方法

3. 16S rRNA 遺伝子断片の電気泳動

- 泳動槽に 1× TAE 緩衝液 (7 L) を入れ、あらかじめ 65 °C で加温しておく。
- DGGE 用グラジエントゲルをスタンドから外し、コームを抜く。
- ウェルを 1× TAE 緩衝液で洗浄し、ゲルキャストにセットする。
- 16S rRNA 遺伝子断片の PCR 産物を等量の DGGE loading buffer と混合し、全量をウェルにアプライする。

- ウェルに DGGE 用マーカー (5 μ L) をアプライする。
- 泳動槽から 1 \times TAE 緩衝液 (約 300 mL) をビーカーで取り、ゲルを泳動槽にセットする。
- ビーカーに取った 1 \times TAE 緩衝液をゲルの上面のタンクに戻す。
- ヒーターを 60 $^{\circ}$ C に戻し、ポンプのスイッチを入れ、80V で 16 時間電気泳動する。

4. ゲルの染色

- ヒーターのスイッチを切り、1 分間以上おいてからゲルを取り出す。
- ゲルを SYBR Green I の 1 \times TAE 緩衝液溶液中で 30 分間、振とうしながら染色する。
- バンドの分離を確認したのち、キット等を用いてゲルを銀染色する。

【プロトコールのポイント・注意点】

1. ゲルバンドパターン解析例

- ゲルを OHP シートに挟んで、スキャナーでゲルイメージを取り込む。
- Image J を用いてウェルごとに plot profile を読み取り、データをエクスポートする (図 3)。
- ウェルごとの plot profile をエクセル上で連結して 1 つのファイルにする。
- 4~10 行ごとの平均をとりデータを圧縮する。さらに、ウェルごとに全行の総和で各行の値を割って標準化する。
- ゲルイメージを主成分分析、クラスター分析により、ウェルごとにバンドパターンを比較する (図 4、統計解析用のソフトウェアを使用するか、<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/BlackBox.html> も利用可能)

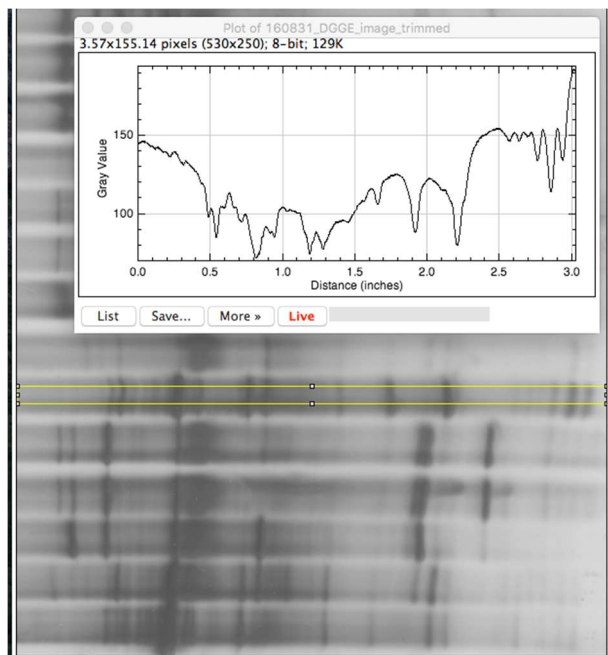


図 3 Image J によるウェルごとの plot profile の取得

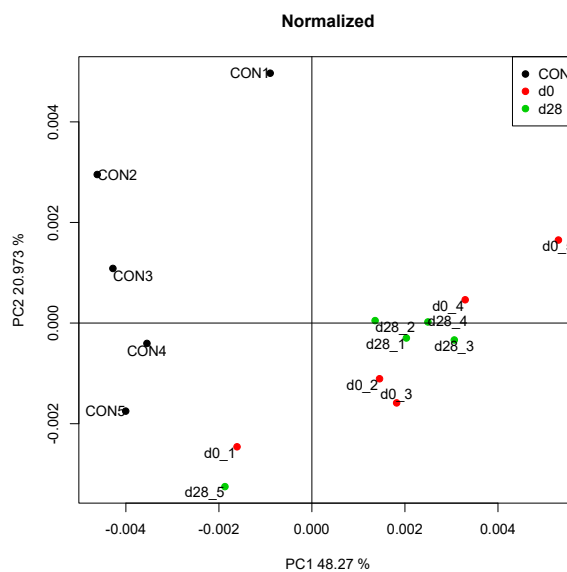


図 4 バンドパターンデータの主成分分析例

- 操作の際には基本的に手袋を着用する。特にアクリルアミドを取り扱うゲル作成時、SYBR green 染色の際は注意すること。

【おわりに】

SYBR green 染色後のゲルからバンドを切り出し、HDA1-GC および HDA2 を用いた同一の条件の PCR で増幅した産物を鋳型としてシーケンス反応を行い、塩基配列をデータベースと比較することにより、切り出したバンドがどの細菌由来のものか推定することも可能である。次世代シーケンサーによる腸内細菌の解析が広く行われるようになってきたが、PCR-DGGE 法はバンドパターンの解析による腸内細菌の構成に関する情報を得るための比較的簡便な方法として現在でも用いられている。筆者らは PCR-DGGE 法を用いて、妊娠・授乳期の難消化性オリゴ糖摂取により、母の腸内細菌叢改変を介して仔の腸内細菌叢も変化することを実験動物を用いて明らかにしている³⁾。

【参考文献】

- 1) VK, Ridaura et al., Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice, *Science*, **341**, 1241214 (2013).
- 2) MI, Queipo-Ortuno, et al., Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers, *Am. J. Clin. Nutr.*, **95**, 1323 (2012).
- 3) R, Fujiwara, et al., Maternal consumption of fructo-oligosaccharide diminishes the severity of skin inflammation in offspring of NC/Nga mice, *Br. J. Nutr.*, **103**, 530 (2010).