

〇〇 株式会社 御中

菌叢解析

報告書

SAMPLE

2026年4月

中外テクノス株式会社
関東環境技術センター

目次

| | |
|---|---|
| 1. 概要 | 1 |
| 2. 方法 | 1 |
| 2.1. 試料 | 1 |
| 2.2. 次世代シーケンス解析概要 | 2 |
| 2.3. 次世代シーケンス解析 | 4 |
| 3. 結果 | 6 |
| 3.1. 次世代シーケンス解析により得られたリード数および ASV 数 | 6 |
| 3.2. 菌叢解析結果 | 6 |

SAMPLE

1. 概要

次世代シーケンス解析により微生物製剤試料6検体の菌叢解析（真正細菌・古細菌）を実施した。

2. 方法

2.1. 試料

以下、6種の微生物製剤（表1）を検体として次世代シーケンス解析を実施した。

表1 微生物製剤試料

| 試料番号 | 性状 | 対象魚 | 含有種（一部） |
|------|-------|--------|-----------|
| ① | 液体 | 指定なし | 納豆菌、乳酸菌など |
| ② | 液体 | 淡水・海水用 | 硝化菌 |
| ③ | 液体 | メダカ用 | 硝化菌 |
| ④ | カプセル | 不明 | 硝化菌 |
| ⑤ | 液体 | 淡水用 | 硝化菌 |
| ⑥ | タブレット | 淡水用 | 納豆菌 |

SAMPLE

2.2. 次世代シーケンス解析概要

図1に菌叢解析の概要を示した。図2に次世代シーケンス解析の手順概要を示した。

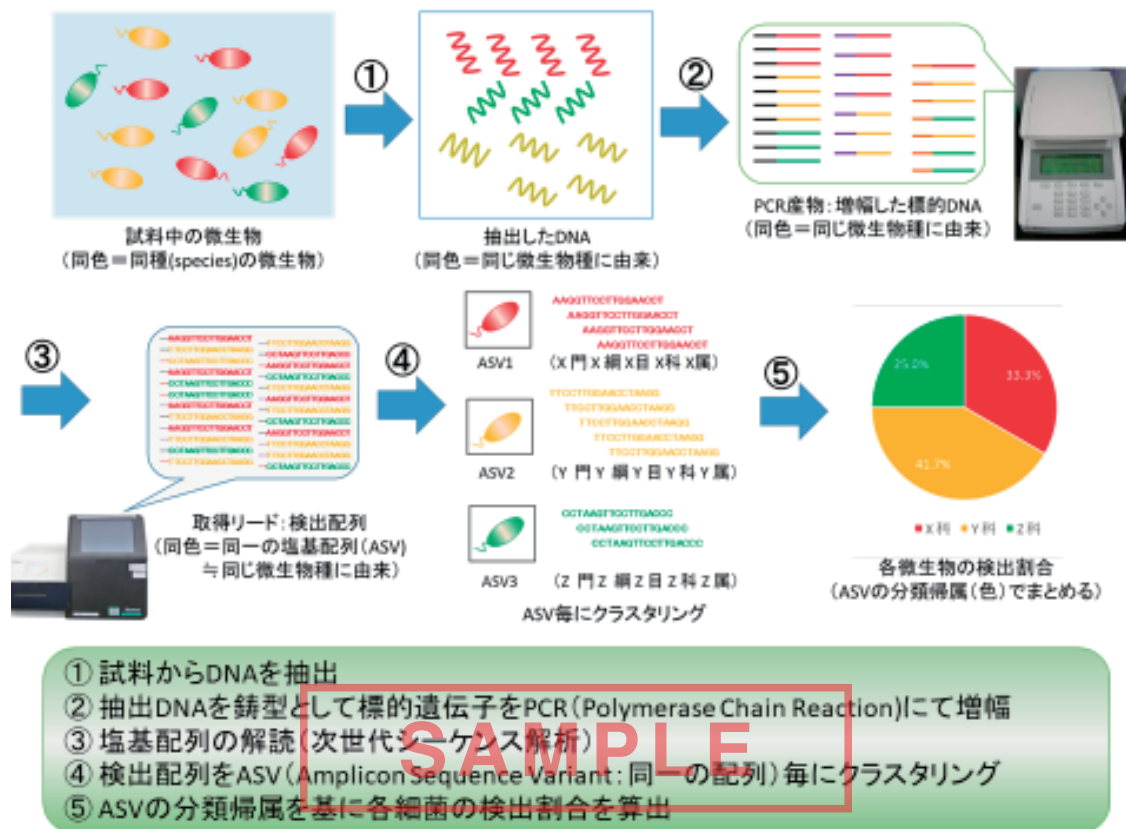


図1 菌叢解析の概要

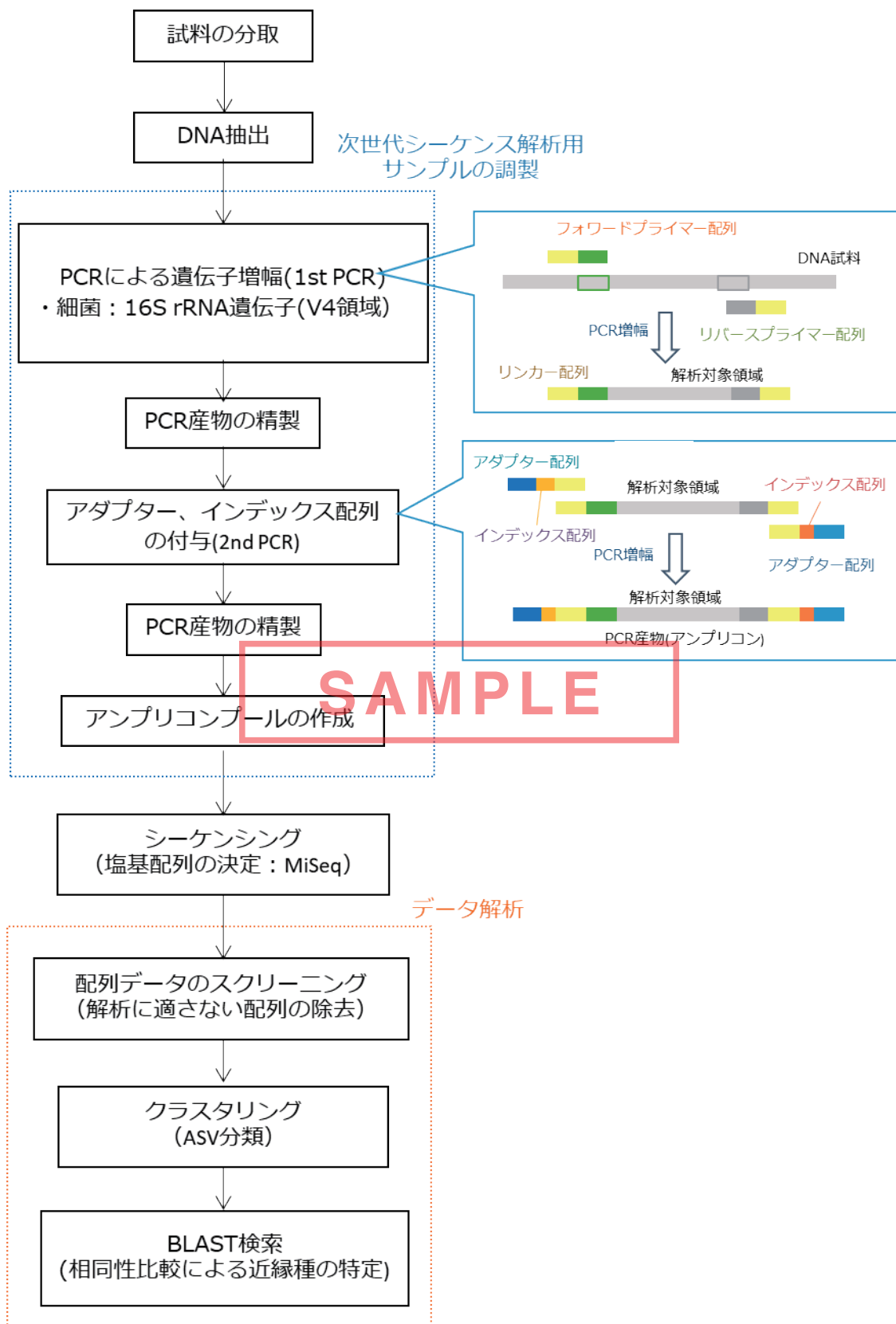


図2 次世代シーケンス解析の手順概要

2.3. 次世代シーケンス解析

① DNA 抽出

試料から DNA を抽出した。液体試料 (①、②、③、⑤) は 0.4 mL、カプセル試料 (④) はカプセル内部の粉末 約 0.4 g から DNA を抽出した。タブレット試料 (⑥) は滅菌生理食塩水 40 mL にタブレット 1 個を溶解させ、メンブレンフィルター (GSWP02500、Merck) に全量をろ過し、フィルターから DNA を抽出した。DNA 抽出は、Extrap Soil DNA Kit plus ver.2 (バイオダイナミクス研究所) を用いた。

② PCR 法による遺伝子の増幅 (1st PCR)

真正細菌・古細菌全体、あるいは、古細菌のみを対象とした遺伝子解読を行うため、系統分類に広く使用されている 16S rRNA 遺伝子 (V4 領域) の増幅を PCR により行った。使用したプライマーセットを表 2 に示した。目的の遺伝子領域の増幅を確認後、MonoFASDNA 精製キット (アニモス) にて PCR 産物の精製を行った。

③ 次世代シーケンス解析用試料の調製 (2nd PCR)

精製処理を実施した PCR 増幅産物に対し、次世代シーケンス解析に必要なアダプター配列および試料判別用のインデックス配列を含むプライマーを用いた PCR を行った。その後、NucleoMag NGS Clean-up and Size Select (MACHEREY-NAGEL) および E-Gel SizeSelect (invitrogen) 用いて PCR 産物の精製を実施した。解析対象以外の遺伝子断片が含まれていないことは 4200 TapeStation (Agilent Technologies) により確認した。最終的に精製した PCR 産物を等モルとなるように混合した。

④ 塩基配列の決定

次世代シーケンス解析装置 MiSeq (Illumina) を用いたペアエンドシーケンスを行い、塩基配列を決定した。ペアエンドシーケンスは、目的遺伝子の両末端から解読する方法である。1 試料につき 2 つの配列群データ (R1 配列、R2 配列) が得られ、これらを結合することで解析対象配列の全長を解読する。試料中に存在する種を網羅できる解読配列 (リード) 数は 1 試料あたり数万~数十万である。1 試料のリード数が 1 万であった場合、理論的には 1 万分の 1 (0.01%) の存在割合の微生物を検出、分類することが可能である。

⑤ 塩基配列の解析

得られた塩基配列 (リード) のうち、解読精度の低い配列や配列長が不適切な配列を除去した後、R1 配列と R2 配列を結合し、プライマーおよびインデックス配列を削除した。配列が同一なリード (ASV (amplicon sequence variant)) をクラスタリングし、各 ASV の配列数を得た。各 ASV の塩基配列と既存データベース (細菌: SILVA database, SSU_v138.2) との比較により、ASV の分類群を決定した。ASV 数は試料中の生物種数と概ね等しいと見なすことができる。配列の分類および解析は、菌叢解析用ソフトウェアである QIIME2-amplicon (ver.2025.7) を用いた。

⑥ 検出した細菌の検出割合の算出

各 ASV の分類帰属をもとに、試料における各属の検出割合を決定した。検出割合は下記の式に従って算出した。

$$\text{検出割合 (\%)} = (\text{各属のリード数の合計} / \text{試料の総リード数}) \times 100$$

⑦ 最近縁種の同定

各 ASV 配列の最近縁種は、相同性検索プログラム NCBI blast+ (2.17.0+) を用いて特定した。参照データベースには、16S_ribosomal_RNA (v5)、ならびに nt database のうち、原核生物の配列のみが集約された nt_prok (v5) を使用した。16S_ribosomal_RNA (v5) は、細菌の 16S rRNA 遺伝子の登録塩基配列から、NCBI (National Center for Biotechnology Information) により、重複がなくデータの信頼性が高いと判断されたリファレンス配列が抽出されたものである。nt_prok は、すべての生物を対象として解読された配列 (標本個体、分離株由来の配列) および環境から分離された配列 (未培養・未分類の配列) が登録された nt データベースから原核生物の登録配列を抽出したものである。解析結果は、別添データファイルにまとめた。

なお、細菌の分類においては 16S rRNA 遺伝子の相同性が 98.7% 以上の場合に同種、95% 以上の場合に同属と見なす。したがって、学名登録された細菌種との相同性が 98.7% 未満の場合は未分離の細菌種である可能性が高いと考えられる。

SAMPLE

表2 PCR に使用したプライマー

| 標的微生物 | 標的遺伝子 | プライマー名 | 配列(5'-3') |
|----------|--------------|----------------|---|
| 真正細菌・古細菌 | 16S rRNA 遺伝子 | 515F (Parada) | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG <u>GTGYCAGCMGCCGCGGTAA</u> |
| | | 806R (Apprill) | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG <u>GGACTACNVTGGTWTCTAAT</u> |
| | V4 領域 | | |
| | | | |

※下線部分は解析対象領域に特異的なプライマー配列を示し、他はアダプター配列等の遺伝子解読に必要となる配列

3. 結果

3.1. 次世代シーケンス解析により得られたリード数および ASV 数

真正細菌および古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とした次世代シーケンス解析により得られたリード数および ASV 数を表 3 に示した。

表 3 検出リード数と ASV 数 (対象：真正細菌・古細菌)

| 試料名 | 検出リード数 | | ASV 数 | |
|-----|---------|--------|-------|-----|
| | 真正細菌 | 古細菌 | 真正細菌 | 古細菌 |
| ① | 156,989 | 11 | 50 | 2 |
| ② | 263,360 | 2,126 | 287 | 2 |
| ③ | 359,553 | 84,394 | 1,046 | 17 |
| ④ | 152,400 | 125 | 222 | 11 |
| ⑤ | 277,162 | 2 | 66 | 1 |
| ⑥ | 210,351 | 10 | 126 | 1 |

・ ASV (Amplicon sequence variant) 数：塩基配列が同一の配列 (ASV) を 1 つのグループとした場合の検出グループ数を示した。

SAMPLE

3.2. 菌叢解析結果

真正細菌・古細菌および古細菌のみを対象とした解析において、主要な細菌目 (検出割合 1%以上) を図 3 に示した。

検出された全 ASV の分類、検出数 (検出割合)、最近縁種ならびに各分類階級における細菌叢は、添付資料として Excel ファイルにて提出した。

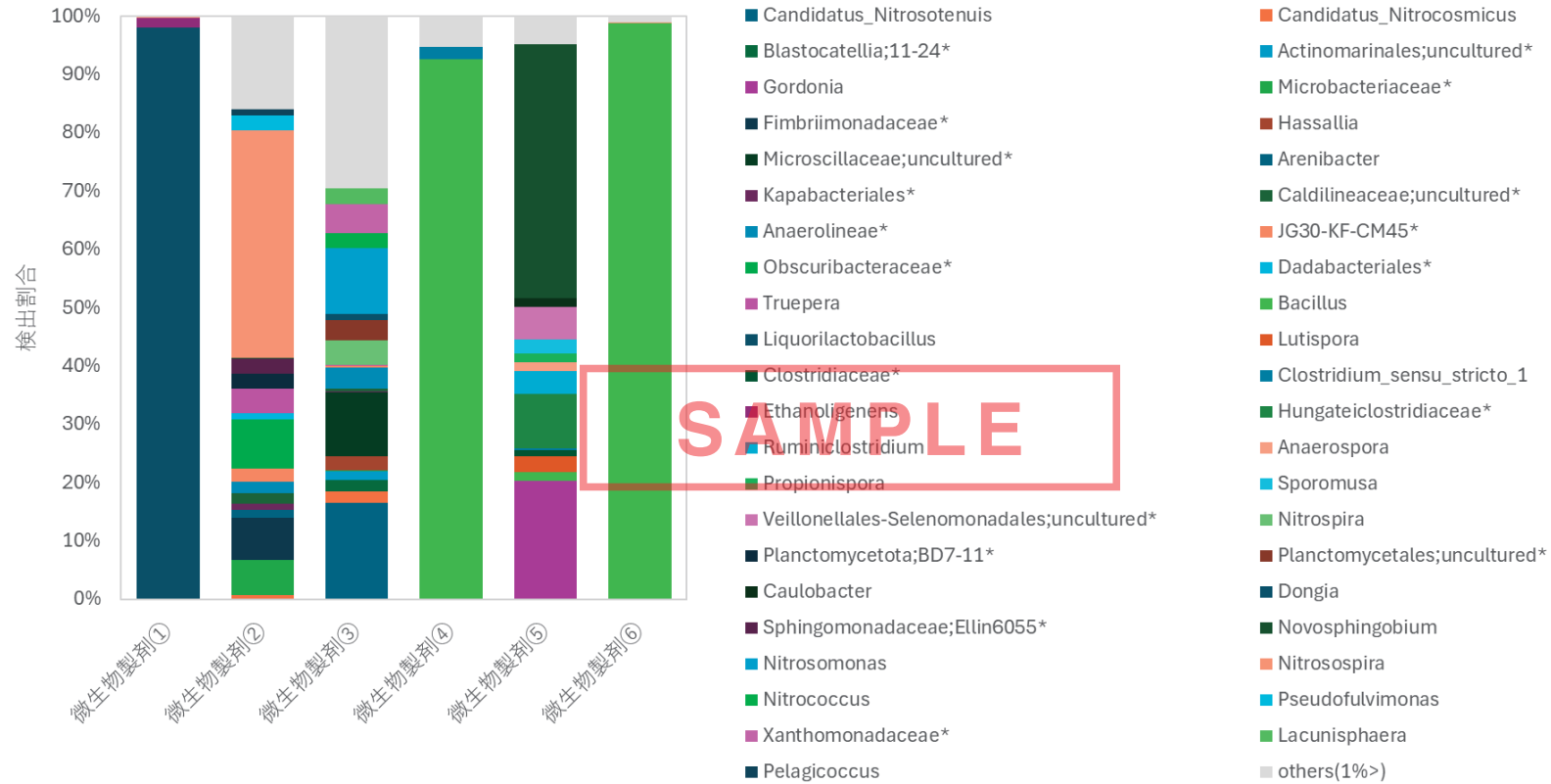


図3 各試料の属レベルの細菌叢（真正細菌・古細菌）

・ others (1%>) : すべての試料で検出割合が1%未満の細菌目をまとめた。

*属分類が不明/学名が登録されていない細菌群は上位階級の分類を記載した。