

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04471

研究課題名(和文) PCB分解土壌細菌の総合理解と微生物機能高度利用のための技術開発

研究課題名(英文) Understanding of PCB-degrading soil bacterium and development of experimental methods for applied microbiology

研究代表者

大坪 嘉行 (Ohtsubo, Yoshiyuki)

東北大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：40342761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：PCB分解細菌Acidovorax sp.KKS102株を解析するのにあたりqTnSeq法を開発した。この過程において汎用の逆転写酵素が強いtailing活性を有していること、またこの活性を増強する促進化合物を発見した。またあらかじめ形成させた3'突出に対して一本鎖DNAを高効率で取り込ませる方法を開発した。様々な特質を備えたTnカセットをデザイン、人工合成しこのTnカセットを使用しておよそ6万クローンよりなるTn変異株ライブラリーを作製し、構築したqTnSeq法にて十分な効率で解析可能であることを示した。他方、本株のカタボライト調節およびICE転移について、基礎学問的に重要な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：To investigate a PCB degrader Acidovorax sp. KKS102, a method named qTnSeq was developed. We revealed strong 3' tailing activity of a reverse transcriptase, and a series of tailing enhancers. We also optimized an unique reaction named CIS reaction. In the CIS reaction, a single strand DNA with 3' end sequence complementary to the tail is incorporated with concomitant DNA polymerization starting from the 3' tail. We designed and created transposon cassette for qTnSeq, and constructed a Tn mutant library consisting of about 60,000 clones, and we demonstrated the usefulness of the qTnSeq method. In addition, we investigated Acidovorax sp. KKS102 with respect to its catabolite control mechanism and a mobile genetic element that carries PCB-degrading genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：MMLV-RT tailing activity tailing enhancers adaptor ligation catabolite control protein acetylation TCRS

## 1. 研究開始当初の背景

人為起源の難分解性化合物を分解可能な細菌は、国際的に精力的に研究対象とされてきた。その結果、様々な化合物について、分解代謝経路と関与する酵素遺伝子が見いだされるとともに、酵素遺伝子の発現調節、分解関連遺伝子の水平伝達、複数種の細菌による協調的代謝などについて、様々な観点から基礎学問的に興味深く、また実際にバイオレメディエーションを行う際に極めて重要となる基礎知見が得られてきた。分解関連遺伝子の多くは、プラスミド上に存在するものが多く知られてきたが、近年 ICE (integrative and conjugative element) が注目を集めている。ICE は染色体から切り出されてプラスミド状になり接合によって他菌株に伝達され、再度ゲノムへとインテグレートされて安定に保持される特異的な可動性遺伝子である。

土壌に純粋培養した菌を散布しても速やかに死滅してしまい期待した機能を発揮できないことが明らかとなってきたが、これまでの ICE 研究から、ICE を利用することで、土着細菌群集に任意の遺伝子を分配 (distribute) して安定に保持させ、機能させることができるとの着想に至った。ただし、ICE の高度利用には、さらなる解析により基礎学問的観点より詳細を明らかにすること、接合伝達頻度を向上させる必要がある。

多くの難分解性化合物の分解遺伝子は多くの場合様々なレベルの制御を受けていることが明らかになっている。細菌に特定の微生物機能を十分発揮させるには、その発現制御機構の詳細の解明が必要である。なかでもより好ましい炭素源が存在するときに、難分解性化合物の分解遺伝子の発現を抑制するカタボライト調節は、最適な増殖環境下で望む機能の発現を抑制する機構であり、その詳細の解明が望まれる。

これらの観点から、難分解性物質分解細菌についてさらに理解を深める必要があるが、特に、次世代シーケンサーの登場によって、全ゲノム配列が完全決定された分解菌の数も飛躍的に増加しつつあり、全ゲノム情報に基づいて分解細菌を総合的に解析することが主流となってきている。また登場してまだ日が浅い次世代シーケンサーに関しては、これを利用した様々な解析手法が登場する段階にあり、新規技術の開発と適用によって、新規性の高い知見の提示が可能であると期待される。

これら知見・理解をふまえて開発される新たな方法論と技術は、バイオレメディエーションだけでなく、幅広い技術分野、産業分野へ応用されることが期待される。

## 2. 研究の目的

- プロテオバクテリアに属し、PCB/ピフェニル分解遺伝子群 (bph 遺伝子群) を ICE 上に保持する土壌細菌 *Acidovorax* sp. KKS102

株を主な解析対象として、以下の解析を実施する。

特異的タグ配列を用いることにより、現行法では PCR バイアスによって失われる定量性を維持するところに特色がある 2 つの新規手法を構築する。

qTnSeq 法 (quantitative Tn insertion site Sequencing 法) はトランスポゾン (Tn) 変異株ライブラリー中の Tn カセット挿入箇所を一括して定量的に同定する新規解析手法である。カセットの一端に外向きに向かう構成的なプロモーターを配置したカセットを用いた Tn 変異株ライブラリーをも作製し、併せて定量的に解析すれば、任意の現象に関わる遺伝子を網羅的に同定することが可能であると期待される。一方、qTSS 法 (Quantitative Transcriptional Start Site 法) は細菌の転写開始点を網羅的かつ定量的に明らかにできる新規解析手法である。

また本株のカタボライト調節機構を明らかにすること、本株の ICE の接合伝達頻度が向上した株を得ること、および、ICE 接合伝達に付いて知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

以下に述べるように、キャピラリーシーケンサーを活用することで、qTnSeq 法を確立するとともに、分子生物学的手法、遺伝学的手法により、各種の解析を行なった。

## 4. 研究成果

### 4-1 qTnSeq 法の開発

#### 4-1-1 qTnSeq 法について

Tn 変異株ライブラリーを一括して解析する手法として次世代シーケンサー (NGS) を利用した方法 (TnSeq 法) が近年利用されるようになってきている。TnSeq 法では、Tn 変異株ライブラリー DNA を断片化処理後、DNA 末端をポリッシングと呼ばれる過程により平滑化し、NGS 解析に必要なアダプター DNA 配列を連結し、ついで PCR 増幅によって NGS シーケンズライブラリーを調整し、NGS 解析によってリードを得る。しかしながら、TnSeq 法では PCR 増幅を行うため十分な定量性が得られないという欠点がある。

本研究では、十分な定量性をもって解析が可能な qTnSeq 法を開発した。qTnSeq 法では、断片化した Tn ライブラリー DNA に、ランダムな配列よりなる識別タグ配列部分 (Unique Molecular Identifier : UMI と称する) と NGS アダプター配列よりなる DNA 配列を連結したのちに、PCR 増幅を行う。NGS 解析によって得られたリードについて、識別タグ配列を利用することで、同じ DNA 分子に由来するリードについて重複カウントを防ぐことができるため、高い定量性が担保される。

#### 4-1-2 高効率アダプター DNA 連結方法の構築

qTnSeq 法の核心部分は、ランダムな配列を含むアダプター DNA を、断片化した Tn ライブラリー DNA に連結する段階である。当初、様々な既知の方法を試したが、効率良く連結させ

ることはできなかった。そこでモデル平滑 DNA 末端を用いて、この末端に効率良く UMI 含有アダプターDNA を連結させる方法を模索することとした。

#### 4-1-3 キャピラリーシーケンサーを用いた実験系の構築

当初ポリアクリルアミドゲル、あるいは変性ポリアクリルアミドゲルを用いた解析を行っていたが、解析が非効率的であった。そこで使用が簡便なキャピラリーシーケンサーを用いた解析系を構築することとした。キャピラリーシーケンサーでは変性条件下で、1000塩基程度の幅広いレンジでの解析が1塩基の解像度でのデータ取得が簡便に実施可能である。ただし、キャピラリーごとに、あるいは泳動ごとに、泳動度が異なるため、得られたデータを相互に比較することは簡便に実施できる状態になかった。そこで本研究では、キャピラリーシーケンサー由来のデータを解析するためのソフトウェア TraceViewer を作成した。TraceViewer の詳細については本報告書の別の節で述べ、ここでは解析方法についてのみ簡単に触れる。実際のサンプルの解析においてはサンプルにサイズスタンダード(サーモフィッシュサイエンティフィック社のLIZ 500サイズスタンダードを通常用いた)を混ぜてキャピラリーシーケンサーでデータを取得し、得られたデータについて、サイズスタンダードを2つ選択し、このサイズスタンダードを用いて泳動度を補正することでデータが相互に比較可能になる。なお蛍光基であるLIZは別の蛍光基であるFAMとは、お互いに全く干渉せず、またデータは異なるチャンネルとして得ることができる。

#### 4-1-4 モデル平滑 DNA 末端

モデル平滑 DNA 末端としては、300 bp の DNA 断片を断片中にある PvuII サイトで切断した 70 bp のものを用いることとした。300 bp の DNA 断片は、片方の PCR primer に 5' 端に FAM 蛍光基を付加したものをを用いることで調整した。得られた 70 bp の DNA 断片は、片方の 5' 端が FAM ラベルされており、同一分子の反対側の 3' 端にアダプターDNA などが付加された場合に、これを FAM ラベルされたストランドの長さの変化として捉えることができる。

#### 4-1-5 逆転写酵素による tailing 活性の同定

本研究では、マロニーマウス白血病ウイルス由来の逆転写酵素(以下 MMLV-RT)が強い tailing 活性を有していることを見出し、4 mM の  $Mn^{2+}$  が活性を強く促進すること、基質として与える dATP、dCTP、dGTP、dTTP についても 4 mM 程度が至適であるなどの最適条件を見出した。ここで tailing 活性とは、DNA polymerase が鋳型非依存的に DNA の 3' 端にヌクレオチドを付加させて 3' 突出末端を形成する活性を言う。従来実用的なレベルで付加可能なのは 1 塩基の A だけであり、TA クローニングや NGS ライブラリー調製などに利用されている。MMLV-RT は強い tailing 活性を

有しており、A だけでなく C、G、T も付加可能であった。末端の塩基組成によって付加活性に若干の差異が認められたが、DNA の長さによらず付加活性が認められた。また C と G と T の付加を dGMP、dCMP、dAMP が促進することを見出した(Scientific Reports 2017a)。

#### 4-1-6 逆転写酵素による tailing 活性の促進剤の同定

記述が前後するが、後述する CIS 反応は、突出された塩基が長いほど効率が良い。CIS 反応を効率良く実施するには、突出塩基数がより長い方が良い。そこで、dGMP、dCMP、dAMP よりも良い促進剤の探索を行った。dGMP が C-tailing を、dCMP が G-tailing を、dAMP が T-tailing を促進したことから、促進剤はワトソククリック対合によって付加を促進することが示唆され、また、ワトソククリック対合可能な塩基であれば、促進剤として働く可能性が考えられた。そこで市販されているヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基の各種について促進剤として働くかどうかと、至適濃度の決定を行った。その結果として、G-tailing を 200 mM のデオキシシチジンが最も促進することなどを見出し、G については 4 つ程度、C と T については 3 つ程度を突出できるようになった(見出された促進剤の中には、とめどない付加を誘導するものもあるが、利用上好ましい性質ではないと考えられる)。A については促進剤は見出されていないが、促進剤なしで 4 つ程度の突出を形成可能である。また各促進剤が別の塩基の付加に影響を与えるか検討した結果、促進剤の効果はほぼ特異的であった(Scientific Reports 2017b)。

#### 4-1-7 CIS 反応の最適化

3' 端からヌクレオチドを突出させた二本鎖 DNA に、その突出末端と相補的な 3' 端を有する一本鎖 DNA(以下 guide adaptor oligonucleotide; GAO とする)を加え、MMLV-RT を作用させると、3' の突出末端から GAO の相補鎖が合成させることがすでに報告されていた。ただし、この報告では、突出させたヌクレオチド数は 1 から 2 程度と短く、十分な効率で反応を起こさせることは不可能であり、実際、実用的な反応であるとはみなされてこなかった(本反応には名前がつけられていなかったことから CIS 反応と命名した)。本研究で、上記の通り十分な数のヌクレオチドを 3' から突出させることができるようになったことから、様々な視点から検討を行った。その結果、反応効率については、あらかじめ G を突出させておき、ついで 3' 端が C の連続である GAO を作用させた時に最も反応効率が高く、ついで C 突出に 3' が G である GAO を作用させる効率が良いことを見出された。またあらかじめ突出させたヌクレオチドの長さや反応効率について調べたところ、G の突出数 1 から 4 では 4 が最も良く、また C-突出についても、長く突出させた方が良いことを見出された。また GAO について、

最長 72 ヌクレオチドのものを試し、およそ 98%程度の高効率で反応が起こることを示した。また、識別タグ部分を含む GAO について、一定の DNA 濃度範囲において、同様の高効率で反応が進行することを示した。なおこの際の GAO の配列は GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTNNNNN NNNNDCCCCC である (DNA Research in press)。一本鎖 DNA を高効率で相補鎖合成を伴いながら取り込む反応は、UMI の導入を考える上で非常に望ましい反応である。

なお当初 UMI とする部分の配列として NNNNN を用いていたが、NNNNN では NGS で読み取った場合に 1 塩基あるいは 2 塩基について、読み誤りを起こすことが頻繁にあることが観察された。このことから比較的長いタグを用いることにして、カウント数が多い UMI と 3 塩基違うものまでは、当該 UMI の読み取りエラーによって生じたものとして処理することが有効であると考えられた。

#### 4-1-8 qTnSeq に用いる Tn カセットのデザイン

qTnSeq 法では、Tn 変異株ライブラリーから調製した DNA を、超音波処理などによって断片化する。この後末端ポリッシング、G-tailing、CIS 反応による UMI 含有アダプター-DNA の連結、PCR による増幅と NGS 解析、データ解析を行うが、リードを多数取得できることを特徴とするイルミナシーケンサーの使用を考えると、Tn カセットの末端から、アダプター-DNA までの長さは数百塩基が最大である。何の工夫もなく Tn 変異株ライブラリーから調製した DNA をこの条件に合うように断片化すると、Tn カセット部分で断片化されたものがかなりの割合で生じてしまうことが懸念された。このことなどから、Tn カセットの配列を全て人工的にデザインしたものを作製した。このカセットは以下の特徴を有する。(1)カセットの末端は"read 1 領域"であり、この領域のうちカセット末端部分は Tn5 の transposase が効率良く認識するとされる ME 配列である。(2) read1 領域の隣には、イルミナシーケンシングに必要な P5 領域が配置されている。(3)P5 領域の隣にはレアカッピングな制限酵素である I-CeuI の認識部位が配置してある。(4)外側に向かうプロモーターを配置したものと、配置しないものの 2 種類を作製した。プロモーターを配置しないもの場合、外向きの転写をストップするための転写終結配列を配置した。(5)薬剤耐性遺伝子として、カナマイシン、ゲンタマイシン、トリメソプリム、テトラサイクリン耐性遺伝子を乗せたものを作製した。これらは容易に置換可能なようにユニークな制限酵素部位間にクローニングした。デザインした Tn カセットを用いて作製した Tn 変異株ライブラリーの解析については、(1)あらかじめライブラリー-DNA を I-CeuI で消化することにより、続く超音波による断片化処理の時に、重要な部分が断片化することを抑制することができる。(2) P5 配列が Tn カセット中に存在しているため、NGS ライブラリー調製時の PCR 効率が高いことが期待できる。

#### 4-1-9 Acidovorax sp. KKS102 株由来の Tn 変

#### 異株ライブラリーの作製

作製した Tn カセットのうち Gm 耐性遺伝子と外側に向かうプロモーターを配置したカセットを KKS102 株由来の SA17 株に導入し、およそ 6 万株よりなるライブラリーを作製した。

#### 4-1-10 Tn 変異株ライブラリー-DNA 解析の要点

上記で作製したライブラリーについて、コバリス社のアコースティックソルビライザーにより断片化後、市販の kit による末端修復を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、およそ 50 bp 程度の幅で DNA をゲルから切り出して精製した。これは G-tailing と CIS 法がの効率について確認するためである。この結果、CIS の産物を、反応前後でポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析したところ、ほとんど反応していないことが見出された。これらのことから上記モデル DNA に対して非常に高効率での反応が可能であった G-tailing 反応と CIS 反応が、実際の Tn 変異株ライブラリー-DNA を断片化したものに対してなぜ進行しないのかを解析することとした。可能性としては、(1) KKS102 株の DNA の配列組成がモデル DNA と異なっている可能性、(2) 細菌から調製した DNA が高度に修飾されるなどして、モデル DNA と異なっている可能性、などが考えられた。そこで FAM を片側の 5' 端についた DNA を PCR で調製し、これをコバリス処理により断片化し、さらにポリアクリルアミドゲル電気泳動により泳動し、短い幅で切り出すことで、モデルコバリス処理 DNA とした。これに対して、末端ポリッシング、G-tailing、および CIS 反応を行ったところ、ほとんど反応が進行しなかった。このことから、変異株ライブラリー-DNA でほとんど反応が進行しないのは、KKS102 株ゲノム DNA 特有の問題ではなく、当該モデルコバリス処理 DNA を用いて、問題を解決できることが示唆された。

#### 4-1-11 モデルコバリス処理 DNA のポリッシング

モデルコバリス処理 DNA をキャピラリーシーケンサーで解析すると、ピーク間の谷が浅く、また 1 塩基の幅と思われる幅に 2 つ以上のピークが存在するなど、超音波で剪断した DNA の末端は、通常は酵素的に構成された末端と異なり、通常は構成されないような"異常な"様々な形状の混合状態にあり、これに市販のポリッシングキットが作用できないことが考えられた。実際、これら kit だけでなく、T4 DNA polymerase などを作用させても、異常な形状には変化は見られなかった。この異常末端にある処理を行ったところ、異常なピーク形状に変化が見られ、およそ 70%程度の効率で CIS 反応が進行するようになった。

#### 4-1-12 Tn 変異株ライブラリーの解析

実際に Tn 変異株ライブラリーの解析を行った。その結果約 6 万カ所の Tn 挿入箇所を定量的に明らかにすることができた。なおこの際、同定したのは 97 万分子、用いた DNA の量から計算される検出効率は 35%であった。

#### 4-1-13 qTnSeq 法の構築(まとめ)

qTnSeq 法について、本研究では、

- (1) Tn カセットをデザイン、作製した。
- (2) 末端平滑化が効率上問題であることを明らかにし、末端修復への糸口を見出した。
- (3) MMLV-RT による強い tailing 活性を見出した。
- (4) tailing の促進剤を発見した。
- (5) CIS 反応を見出した。CIS 法は qTnSeq 法だけでなく、様々な解析に利用可能であると期待される。
- (6) 実際に qTnSeq 法が実施可能であることを実証した。

#### 4-2 TraceViewer の開発

変性ポリアクリルアミドゲルを用いた解析は、シーケンシング以外にも、DNA が関連する諸反応、たとえばフットプリンティング法、primer extension 法だけでなく、様々なアイデアに基づく解析に用いられてきた。しかしながら巨大なゲルを作製しなくてはならないこと、ゲルが非常に取り扱いにくいこと、泳動や検出に時間がかかること、解析できるサンプル数が多くないことなど、効率的な解析には向かない実験系である。

一方で、キャピラリーシーケンサーによる泳動は変性条件下での泳動であるものの、ゲル調製が不要で変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動よりもずっと簡便に、十数塩基から 1000 塩基程度の範囲で 1 塩基の解像度の解析が可能であること、1 fmol 程度のごく微量の DNA 分子でシグナルが振り切れるほどの高感度であること、など非常に望ましい特性がある。しかしながら現在でも多くの解析が、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動でなされている。これは、キャピラリーごとに電気泳動度が異なるために、サンプル間を比較することが困難であることに起因すると考えられた。

本研究では、あらかじめサンプルに混ぜておいたサイズスタンダード(最低 2 種類のサイズの DNA 分子を含む)の泳動度を用いて、泳動度を補正して表示可能なソフトウェア TraceViewer を作成した。なお本研究では解析対象として FAM ラベルを、サイズスタンダードとしては LIZ ラベルを使用した。この 2 つの蛍光基は、蛍光特性上お互いに干渉し合うことがなく、蛍光シグナルは別々の数値列として出力される。

本ソフトウェアは macOS で動作し、ABIF 形式のデータであれば読み込むことができる。本ソフトウェアでは、ピークの選択やピーク面積の出力といった基本的な機能だけでなく、選択したピークの画面上の面積を揃えて表示する機能、データとデータを重ね合わせて表示する機能、グラフィックスソフトウェアで編集可能な pdf 形式でデータを出力する機能など、キャピラリーシーケンサーより得られたデータを解析する上で望ましい機能を多数実装している。

#### 4-3 Acidovorax sp. KKS102 株のカタボライト調節機構の解明

KKS102 株が保持する PCB 分解遺伝子群の pE

プロモーターは二成分調節系のレスポンスレギュレーター BphQ によってカタボライト調節されることが見出されているが BphQ の直上流に同じ向きでコードされているセンサーカインース BphP がどのようにカタボライト調節に関与しているかは不明であった。

#### 4-3-1 BphP の C 末端ドメインは BphQ を in vitro でリン酸化する

BphP の C 末端ドメイン(自己リン酸化ドメインとリン酸化ドメインを有する。以下 BphPc とする)を大腸菌で発現させ精製した。BphPc を  $^{32}\text{P}$ -ATP とインキュベートしたところ、リン酸化することが観察された。またリン酸化 BphPc を BphQ とインキュベートすると、BphQ がリン酸化されることが観察された。一方、 $^{32}\text{P}$ -ATP と BphQ のインキュベートでは、BphQ はリン酸化されなかった。

#### 4-3-2 in vivo で BphPc は BphQ 依存的に pE を強く活性化する

BphPc と BphQ を大腸菌中で発現させたところ、pE プロモーターを強く活性化することが見出された。このことから、BphQ は大腸菌の RNA polymerase と協調して pE プロモーターを活性化できると考えられた。

#### 4-3-3 BphQ のリジン残基は、in vitro でアセチル化される。

近年タンパク質リジンアセチル化が、タンパク質の機能調節に関することが、原核生物において報告されるようになってきている。精製した BphQ をアセチルリン酸、あるいはアセチル CoA とインキュベーションし、抗アセチルリジン抗体をもちいたウエスタンブロットティングを行ったところ、BphQ がアセチル化したと考えられるシグナルが検出された。またさらに、精製 BphQ に対してアセチル化処理をしたのちに、トリプシン処理後に MALDI-TOFMS にて解析したところ、108 番目のリジン残基がアセチル化されたと考えられる結果を得た。

#### 4-3-4 推定立体構造に基づく解釈

BphQ の推定 3 次元立体構造モデルを作成した。推定モデル上では K108 は、推定リン酸化部位のごく近傍に位置しており、この部位のアセチル化が、リン酸化に影響を与えると考えても無理が無いと考えられた。

#### 4-3-5 Acidovorax KKS102 株のカタボライト調節機構

栄養条件が良い場合、細胞内のアセチルリン酸あるいはアセチル CoA といった分子の濃度が上昇し、これによって BphQ が翻訳後修飾されると、BphP によってリン酸化されなくなり、プロモーターを活性化できなくなることが、カタボライト調節の主要メカニズムであると示唆される。このような機構がカタボライト調節に関与していることは知られておらず新規性の高い知見である。今後さらなる解析が必要である。

#### 4-4 Integrative and Conjugative element に関する解析

KKS102 株由来の SA17 株が、野生型株と比較

して 1000 倍程度高い接合伝達頻度を有していることを見出した。本株は *bph* 遺伝子群の下流にある *traR* 遺伝子を破壊した株であるが、破壊に伴って *traR* 下流にある接合伝達装置をコードする遺伝子群が非意図的に高発現するに至ったと推定される株である。本株染色体のランダムな位置に、ゲンタマイシン耐性遺伝子を含むトランスポゾンカセットを挿入したライブラリーを作製した。本ライブラリーを、同じく KKS102 株に派生する株であり、カナマイシン耐性を付与した株と 30 分間、接合させることで、ゲンタマイシンとカナマイシン両方に耐性となった接合体株を複数得た。この接合体株 37 株についてカセット挿入位置を決定したところ、KKS 株の染色体全体に散在していた。このことから、接合によって ICE 部分だけでなく染色体全体が、供与菌から需要菌へと伝達したことが示唆された。おそらく染色体に潜り込んだままの状態が ICE が水平伝達することがあると考えていたが、その接合開始点がゲノム状に複数存在していることを示唆している。

4-4-2 ICE 上の接合伝達開始点(*oriT*)の同定 ICE 上に存在する relaxase 遺伝子の同定配列を解析したところ、非コーディング領域であるに於いて塩基レベルでの保存性が高いことが見出された。この領域について、プラスミドにクローニングして KKS102 株から他株へと伝達するか検討したところ、伝達されることが見出された。このことから、ICE 上の *oriT* として機能できる部分を同定できたと考えている。

#### 4-5 転写開始点の同定手法の構築

template switching と呼ばれる反応により、逆転写により合成された cDNA の末端に、UMI をつけた上で PCR 増幅して NGS シーケンズライブラリーを作製する方法を考案した。二本鎖 DNA に対する tailing 反応や、CIS 反応の特性を利用して反応効率の上昇を狙ったが、3'末端が U であるような RNA に対する反応がほとんど起こらないという欠点が見出されており、これを改善する方策が見出されていない。一方で、新生 RNA 5'端(リン酸基を 3 つ有する)に対しても、当該反応が起こるといった操作上の有用な特性も見出されている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- 1 \*Ohtsubo Y, Sasaki H, Nagata Y, and Tsuda M. Optimization of single strand DNA incorporation reaction by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. DNA Research (in press).
- 2 \*Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M. (2017) Compounds that enhance the tailing activity of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Scientific Reports 7(1):6520.
- 3 \*Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M. (2017) Efficient N-tailing of blunt DNA ends by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Scientific Reports 2017 Feb 2;7:41769.

[学会発表](計 11 件)

- 1 日本農芸化学会 2018 年度大会 PCB 分解細菌 Acidovorax sp. KKS102 株のカタボライト調

- 2 節に関わる二成分調節系因子 BphPQ の解析 佐々木春菜、永田裕二、津田雅孝、大坪嘉行 日本農芸化学会 2018 年度大会 デアミナーゼと融合した新規デハロゲナーゼの特徴 中鉢千尋、佐藤優花里、大坪嘉行、津田雅孝、永田裕二
- 3 日本農芸化学会 2018 年度大会 逆転写酵素の tailing 活性と新規 TSLR 反応を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの定量的解析 大坪嘉行、佐々木春菜、永田裕二、津田雅孝
- 4 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会 2018 逆転写酵素を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの定量的解析法の確立 大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝
- 5 第 12 回日本ゲノム微生物学会年会 2018 PCB/ビフェニル分解菌 Acidovorax sp. KKS102 株が有する ICE の接合伝達域規定因子の同定 川原昌太郎、岸田康平、永田裕二、大坪嘉行、津田雅孝
- 6 第 2 回環境微生物系学会合同大会 2017 定量的 TnSeq 解析法の構築と PCB 分解細菌 Acidovorax sp. KKS102 株の全必須遺伝子の同定 大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝
- 7 第 2 回環境微生物系学会合同大会 2017 PCB 分解細菌 Acidovorax sp. KKS102 株のカタボライト調節に関わる二成分調節系制御因子についての解析 佐々木春菜、永田裕二、津田雅孝、大坪嘉行
- 8 15th International Union of Microbiological Societies (IUMS2017) Strong N-tailing activity and specific enhancers of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase toward blunt DNA ends. Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda
- 9 第 11 回日本ゲノム微生物学会年会 2017 逆転写酵素の強い tailing 活性と解析ソフト TraceViewer 大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝
- 10 日本農芸化学会 2017 年度大会 マウス白血病ウイルス由来逆転写酵素の N-tailing 活性と解析ツール TraceViewer 大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝
- 11 第 10 回日本ゲノム微生物学会年会 2016 次世代シーケンサーを用いた qTnSeq 法の構築 阿部史歩 大坪嘉行 永田裕二 津田雅孝

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 二本鎖 DNA 末端の加工方法  
 発明者: 大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝  
 権利者: 東北大学  
 種類: 国内および PCT  
 番号: 特願 2016-212620 および PCT/JP2017/21913  
 出願年月日: 2016 年 6 月 14 日  
 国内外の別: 内外

[その他]

TraceViewer 公開ページ  
<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmdownloadJP.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 大坪嘉行 (Ohtsubo, Yoshiyuki)  
 東北大学・大学院生命科学研究所・准教授  
 研究者番号: 40342761