

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651183

研究課題名(和文)細菌進化におけるリコンビネーションの頻度と特性に関する研究

研究課題名(英文)Studies on features and frequencies of recombination in bacterial evolution

研究代表者

大坪 嘉行(Ohtsubo, Yoshiyuki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40342761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の進化におけるリコンビネーションの特性と頻度を明らかにするため、近縁の2株の土壌細菌を混合して滅菌土壌に接種した。およそ1年間のインキュベーション後に、細菌株を回収し、イルミナシーケンサーにより解析し、多数のリードデータを得た。リードデータを作成したソフトウェア(<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gf/index.php>にて公開)により解析したが、リコンビネーションが起きたことを示すデータは得られなかった。当該サンプルについては将来の解析のためインキュベーションを継続している。他方、マルチジーンファミリー遺伝子の協奏進化を示す結果を得た。

研究成果の概要(英文)：To clarify features and frequencies of bacterial recombinational events, two closely related bacterial strains were mixed and incubated in a sterile soil sample. After a long period of incubation cells were recovered on a solid medium, and subjected to illumina sequencing. The illumina sequencing reads were analyzed by developing and using a computational tool named 'ShortReadManager', which is now released at <http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gf/index.php>, and I found no evidence that indicates recombination between the two strains.

On the other hand, mutated DNA fragment of 16S ribosomal RNA gene was inserted into a genome of a soil bacteria, in which 5 copies of rRNA gene are present. The mutated fragment was expected to be replaced by the wild-type copy. By quantitative PCR analysis, we found a evidence that suggests concerted evolution of multi gene family.

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：ゲノム生物学

キーワード：recombination ShortReadManager illumina

## 1. 研究開始当初の背景

近年微生物のゲノム情報が急速に蓄積しつつあり、微生物進化についての重要な知見が比較ゲノム解析により得られつつある。比較的近縁関係にある細菌ゲノムにコードされた複数の遺伝子について個別に系統樹を作成すると、得られた系統樹形がお互いに一致せず大多数によって支持される樹形は存在しないことはよく知られている。系統樹形の不一致問題は、保存されたシクエンサー内に存在する遺伝子に着目して解析を行った場合も同様に観察されることから、従来考えられていたような外来遺伝子獲得様式、すなわちプラスミドにより遺伝子がゲノムにもたらされる様式、あるいは、遺伝子を載せたアイランド様 DNA がゲノムに挿入されることによりゲノムにもたらされる様式、では説明が付かない。系統樹形の不一致問題をうまく説明する説として、recombination 説がある。この説では、微生物ゲノムは数 kb 程度の比較的小さい DNA 断片を、細胞内に取り込んだ後に、その DNA 断片と相同なゲノム中の部位を相同組み換えによって置換すると説明する。この置換現象の頻度に関して、既知のゲノム配列に基づいて配列の相同性が低下すると指数関数的に減少することが提唱されている。しかしながら recombination が実際にどの程度の頻度で生じうるかは、細菌の種を定義する上でも極めて重要な問題であるにも関わらず、実験的検証はなされていなかった。この頻度およびこの現象の特性を明らかにすることで、微生物の進化、微生物の種の概念について極めて重要な知見をもたらすと期待された。

## 2. 研究の目的

細菌の「種」の構成原理については未解明な点が多い。近年、細菌は数 kb 程度の比較的小さい外来の DNA を細胞内に取り込み、その DNA 断片と相同なゲノム中の部位を相同組み換えによって置換する活性を持ち (recombination 現象) この活性が「種」の形成に強く関与しているとする説が提唱されている。本研究では、全ゲノム配列が明らかで、類縁性の高い複数の *Burkholderia* 属細菌株を混合培養し、これら細菌株のゲノム配列の動態を詳細に追跡することで、recombination 現象が細菌の「種」の形成にどの程度寄与しているかを実験的に検証することを目的とする。またこれに付随して必要となるソフトウェアの開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

全ゲノム配列が既知の 2 種の細菌種 (*Burkholderia multivorans* ATCC 17616、*Burkholderia* sp. 383) それぞれに、後に別々に回収が可能ないように薬剤選択マーカーを

付与した。これらを培養後、一定の割合で混合し、滅菌した土壌に接種した。接種後、長期間の incubation を経た後に、土壌から菌体画分を得て個体寒天培地に塗布した。付与しておいた選択マーカーによりこれら株を選別した後に、全 DNA を回収し、次世代シーケンサーによる配列決定に供した。得られた配列データを、混合した 2 種細菌株の配列と比較することで recombination の頻度と特性について検討した。またこの解析のためのソフトウェアを作成した。またこれらと平行して、リコンビネーションを理解する上で重要であるゲノム内の遺伝子配列の均質化の程度を検討するためのモデル実験系を作成した。

## 4. 研究成果

*Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株と *Burkholderia* sp. 383 を滅菌土壌中で混合して 1 年間培養したサンプルについて、17616 株由来である株を選択培地で選択することで回収した。そのうち 5 株についてイルミナシーケンサーによりリードデータを取得し、ゲノム情報が混ざり合っているかどうかについて解析を行った。またこの解析を効率良くすすめるため、あらたなソフトウェアの機能の作成を行った。本機能は、ゲノム配列情報、あるいはリードデータから、k-mer (k は 31 以下の整数) のレパートリーと登場回数を調べる機能をその主たる機能とし、特徴的な点は、2 つのそのようなデータセット間の相互比較を可能 (一方のみに含まれる k-mer、両方に含まれる k-mer) を抽出できる。すなわち、17616 株のゲノムデータから作成した k-mer データと、383 株のゲノムデータから作成した k-mer について、383 株に特異的な k-mer を算出し、ついで、これを次世代シーケンサー由来のリードデータから作成した k-mer データと比較を行い、共通するものを見出し出した。すなわち、このアルゴリズムによりゲノム情報が混ざり合わなければ検出されるはずのない k-mer を調べ出すことができる。本機能を使用し、回収した株から 383 株に特徴的な k-mer を抽出し、アセンブルを行ったところ、383 株に特徴的な配列を見出した。しかしながらイルミナシーケンサーによる配列の読み取りエラーによって 383 株由来のように見えているにすぎないという可能性について、関連するリードを抽出し、アセンブルすることで検討したところ、383 株型の配列はいずれも読み取りエラーによるものであると結論された。リコンビネーションが起こるにはさらなる時間経過が必要である可能性もあり、現在モインキュベーションを継続している。

一方、17616 株由来の 16S ribosomal RNA 遺伝子の一部について、383 株中の対応する配列 (3 塩基の違いを含む) を 17616 株ゲノムに 1 コピーで導入して滅菌土壌に接種し、一定

期間後、DNA を回収して、383 株型の配列が 17616 株型の配列に変化しているかどうかについて定量 PCR により解析を行った。その結果、ごく僅かではあるが、17616 株型の配列への変化を検出した。この現象については、細胞間の現象であるリコンビネーションによるものである可能性と、細胞内の遺伝子置換によるものである可能性の両方が考えられる。今後、この現象を追求 suppression することで、細菌進化についての重要な知見につながることを期待される。今回作成したソフトウェアは、2 つのリードデータを比較する機能も付与しており、今後細菌の遺伝子の発現解析、真核生物であればテロメア長、セントロメア長の変化などを解析するための有用なツールとなることも期待される。

#### 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 14 件 全て査読あり)

1. **Ohtsubo Y, Kishida K, Sato T, Tabata M, Kawasumi T, Ogura Y, Hayashi T, Tsuda M, Nagata Y.** 2014. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain TKP, Isolated from a gamma-Hexachlorocyclohexane-Degrading Mixed Culture. *Genome announcements* **2**:e01241-13. doi: 10.1128/genomeA.01241-13
2. **Shintani M, Ohtsubo Y, Fukuda K, Hosoyama A, Ohji S, Yamazoe A, Fujita N, Nagata Y, Tsuda M, Hatta T, Kimbara K.** 2014. Complete Genome Sequence of the Thermophilic Polychlorinated Biphenyl Degrader *Geobacillus* sp. Strain JF8 (NBRC 109937). *Genome announcements* **2**:e01213-13. doi: 10.1128/genomeA.01213-13
3. **Ohtsubo Y, Sato T, Kishida K, Tabata M, Ogura Y, Hayashi T, Tsuda M, Nagata Y.** 2014. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* MTB-1, Isolated from a Microbial Community Enriched by the Technical Formulation of Hexachlorocyclohexane. *Genome announcements* **2**:e01130-13. doi: 10.1128/genomeA.01130-13
4. **Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, Kurokawa K.** 2014. Design and Experimental Application of a Novel Non-Degenerate Universal Primer Set that Amplifies Prokaryotic 16S rRNA Genes with a Low Possibility to Amplify Eukaryotic rRNA Genes. *DNA Res* **21**:217-227. doi: 10.1093/dnares/dst052
5. **Ohtsubo Y, Fujita N, Nagata Y, Tsuda M, Iwasaki T, Hatta T.** 2013. Complete Genome Sequence of *Ralstonia pickettii* DTP0602, a 2,4,6-Trichlorophenol Degrader. *Genome announcements* **1**:e00903-13. doi: 10.1128/genomeA.00903-13
6. **Inoue K, Miyazaki R, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M.** 2013. Inhibitory effect of *Pseudomonas putida* nitrogen-related phosphotransferase system on conjugative transfer of IncP-9 plasmid from *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* **345**:102-109. doi: 10.1111/1574-6968.12188
7. **Tabata, M., Y. Ohtsubo, S. Ohhata, M. Tsuda, and, Y. Nagata.** Complete genome sequence of the  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingomonas* sp. strain MM-1. *Genome Announcements*. **1** (3): e00247-13 (2013) doi: 10.1128/genomeA.00247-13
8. 永山浩史、菅原智詞、遠藤諒、加藤広海、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝 機能相補による芳香族化合物複合汚染土壌からの新規分解酵素遺伝子の検索 *Journal of Environmental Biotechnology* **13**(1): 51-56 (2013)
9. **Yano, H., H. Genka, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, E.M. Top, M. Tsuda:** Coincidence-resolution of toluene-catabolic transposon Tn4651. *Plasmid*. **69**: 24-35 (2013) doi: 10.1016/j.plasmid.2012.07.004
10. **Ohtsubo Y, Maruyama F, Mitsui H, Nagata Y, Tsuda M:** Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. KKS102, a polychlorinated biphenyl-degrading strain. *J Bacteriol* **194**: 6970-6971 (2012) doi: 10.1128/JB.01848-12
11. **Ohtsubo, Y., F. Maruyama, H. Mitsui, Y. Nagata, M. Tsuda:** Complete genome sequence of *Acidovorax* sp. KKS102, a polychlorinated biphenyl-degrading strain. *J Bacteriol* **194**: 6970-6971 (2012) doi: 10.1128/JB.01848-12
12. **Ohtsubo Y., Y. Ishibashi, H. Naganawa, S. Hirokawa, S. Atobe, Y. Nagata, M. Tsuda:** Conjugal transfer of polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation genes in *Acidovorax* sp. strain KKS102, which are located on an integrative and conjugative element. *J Bacteriol* **194**:4237-4248. (2012) doi: 10.1128/JB.00352-12
13. **Kimura A, Yuhara S, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M:** Suppression of pleiotropic phenotypes of a *Burkholderia multivorans* fur mutant by *oxyR* mutation. *Microbiology* **158**: 1284-1293. (2012) 10.1099/mic.0.057372-0
14. **Nagata, Y., S. Natsui, R. Endo, Y. Ohtsubo, N. Ichikawa, A. Ankai, A. Oguchi, S. Fukui, N. Fujita, and M. Tsuda:** Genomic organization and genomic structural rearrangements of *Sphingobium japonicum* UT26, an archetypal gamma-hexachlorocyclohexane-degrading bacterium. *Enzyme and Microbial Technology* **49**: 499-508. (2011)

〔学会発表〕(計 85 件)

(招待講演、シンポジウム、国際学会等、主な発表 10 件のみを記載)

1. 大坪 嘉行 「環境細菌の PCB 分解能を司る遺伝因子の解析と各種ゲノム解析ソフトウェアの開発」日本農芸化学会 2014 年大会 2014 年 3 月 27-30 日, 東京 (農芸化学会奨励賞受賞講演)
2. 大坪 嘉行, 永田 裕二、津田 雅孝 「FinishChecker: 完全決定したつもりのゲノム配列のチェック機能」日本農芸化学会 2014 年大会 2014 年 3 月 27-30 日, 東京 (口頭発表)
3. 大坪 嘉行, 永田 裕二、津田 雅孝 「Finish したゲノム配列のチェックツール: FinishChecker」第 8 回日本ゲノム微生物学会 2014 年 3 月 7-10 日, 東京(口頭発表およびポスター発表)
4. 大坪 嘉行, 永田 裕二、津田 雅孝 「フィニッシング支援ツール GenoFinisher と AceFileViewer」農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 27-28 日, 仙台(口頭発表)
5. 大坪 嘉行 「GenomeMatcher 等ウェット研究者向けツール」第 7 回日本ゲノム微生物学会 2013 年 3 月 8-10 日長浜バイオ大学 (長浜) 奨励賞受賞講演
6. 大坪 嘉行, 永田 裕二、津田 雅孝 「Finishing 関連の 3 つのツール: GenoFinisher、AceFileViewer、ShortReadManager」第 7 回日本ゲノム微生物学会 2013 年 3 月 8-10 日長浜バイオ大学 (長浜) ポスター発表
7. 大坪 嘉行 「フィニッシング用のツール GenoFinisher の開発」2012 年 3 月 27-29 日第 85 回日本細菌学会 長崎
8. 大坪 嘉行, 奥野 周、永田 裕二、津田 雅孝 「フィニッシング用のツール GenoFinisher の開発」農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 23-26 日 京都
9. 大坪 嘉行, 奥野 周、永田 裕二、津田 雅孝 「微生物ドラフトゲノムのフィニッシングツール GenoFinisher」第 6 回日本ゲノム微生物学会 2012 年 3 月 10-12 日 東京
10. Yoshiyuki Ohtsubo et al. Development of a computational tool for finishing of draft genomic sequence International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 6- 10, 2011, Sapporo, Japan (国際学会)

〔図書〕(計 2 件)

1. **Tsuda, M., Y. Ohtsubo, and H. Yano:** Mobile catabolic genetic elements in pseudomonads. *In:* Nojiri, H., M. Tsuda, M. Fukuda, and Y. Kamagata (eds), Biodegradative Bacteria: How Bacteria Degrade, Survive, Adapt, and Evolve. Springer, Tokyo. pp. 83-103 (2014)

2. **Ohtsubo Y, Nishiyama E, Ishibashi Y, Nagata Y, Tsuda M:** Strategies to reveal genomic function in natural soil systems. *In:* Nojiri H, Tsuda M, Fukuda M, Kamagata Y (eds) Biodegradative Bacteria. Springer Verlag, Tokyo, pp 279-291 (2014)  
doi: 10.1007/978-4-431-54520-0\_14

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gf/index.php>

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科・助教

研究者番号: 40342761

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし