

微生物シングルセルゲノム解析技術bit-MAP[®]を利用し、未培養の土壌細菌から高品質ゲノムを獲得

High-Quality Draft Single-Cell Genome Sequences of Two *Gammaproteobacteria* Strains Sampled from Soil in a Strawberry Farm” *Microbiology Resource Announcement* (2020)¹

DOI: 10.1128/MRA.00743-20

ハイライト

- ✓ bit-MAP[®]を利用して、イチゴ栽培土壌から未培養の土壌細菌の高品質ゲノムを複数獲得
- ✓ 細菌だけでなく、アーキアのドラフトゲノムも獲得可能
- ✓ シングルゲノム調製からデータ解析まで、全てサービスとして提供中

Introduction

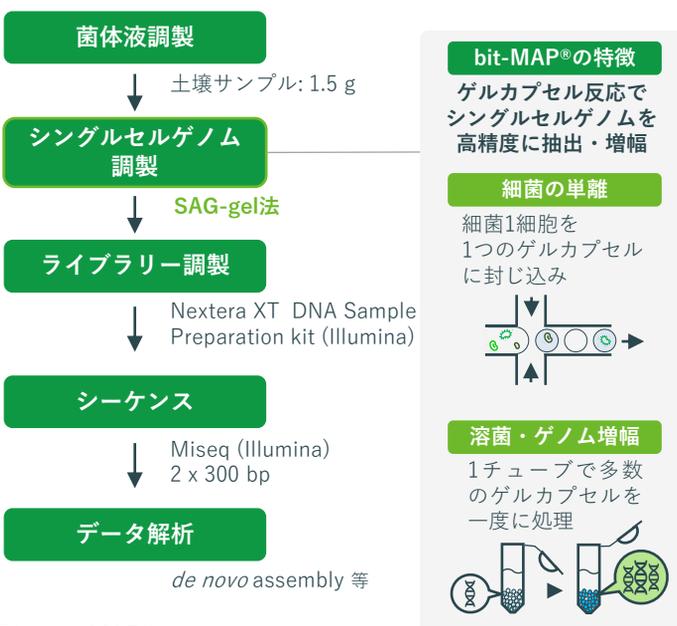
土壌1 g中には数億個もの多種多様な細菌が存在します。土壌細菌には、抗生物質などの有用物質を産生するものが存在し、生物資源として注目されています。農業分野では、土壌細菌が植物に共生して成長促進作用や病原菌耐性をもたらすことが報告されています。

土壌細菌の多くは難培養性であるため、ゲノム解析には未培養状態からの直接的な分析法であるショットガンメタゲノミクスがよく用いられています。しかし、ショットガンメタゲノミクスでは多様な土壌微生物の個々のゲノム情報を正しく再構築することは困難でした。また、一部の研究ではシングルセルゲノム解析が用いられていますが、シングルセルゲノム反応が進行するのは1割程度であり、高品質なゲノム情報を獲得することが非常に困難でした²。

本研究では、bitBiome社の新しいシングルセルゲノム解析プラットフォームbit-MAP[®]を応用して、高品質な土壌細菌のシングルセルゲノム情報を獲得することを目的としました。



Method



• 土壌サンプルの調製

イチゴ栽培土壌サンプル1.5 gに3 mLのDPBSを添加し、攪拌・静置した後に、上清をフィルター濾過し、遠心分離によって細菌懸濁液を準備しました。

• シングルセルゲノム調製

bit-MAP[®]ではSAG-gel法³を用い、微生物をシングルセルレベルに単離、溶菌及びゲノム増幅を行います。調製したシングルセルゲノムから24個を選抜してシーケンスライブラリーを調製しました。

• シーケンスとデータ解析

Miseqを用いてシーケンスリード(平均データサイズ: 263.8 Mb)を取得しました。SPAdes⁴を用いて *de novo* assemblyを行いドラフトゲノムを構築し、CheckM⁵で品質評価を行いました。

図1 bit-MAP[®]のワークフロー

Results

本結果の一部はMicrobiology Resource Announcementにて公開されています。

de novo assemblyによって獲得した土壌細菌シングルセルゲノムについて、品質の高い上位10個を表1に示しました。ゲノム品質基準⁶における高品質ゲノム^{※1}を2個、中品質ゲノム^{※2}を17個獲得しました。bit-MAP[®]の結果レポートでは、以下の内容がドラフトゲノムの品質として評価されます。完全性、汚染度、Contig数、N₅₀、GC含量、タンパク質コード遺伝子（CDS）数、rRNA配列検出数、16S rRNA配列相同性検索結果、GTDB-Tkでの系統アノテーション(図2)

※1 完全性 >90%、汚染度 <5%で、23S、16S、5S rRNA配列、tRNAが18個以上が含まれているゲノムデータ

※2 完全性 >50%、汚染度 <10%のゲノムデータ

表1 土壌細菌シングルセルゲノムの概要

品質	完全性 (%)	汚染度 (%)	コンテ ィグ数	N50	GC%	CDS数	rRNA配列数			16S BLAST searchによる相同性検索結果	配列類似度 (%)
							5S	16S	23S		
High	92.7	0.6	147	39,139	39.4	1,890	1	1	1	<i>Legionella dresdenensis</i> strain W03-356	88.4
High	91.5	1.1	229	41,260	37.5	1,964	1	1	1	<i>Aquicella siphonis</i> strain SGT-108	94.6
Mid	89.2	1.1	278	12,379	40.8	1,690	1	1	1	<i>Coxiella burnetii</i> strain ATCC VR-615	91.0
Mid	88.0	9.9	241	22,425	40.7	2,084	0	1	1	<i>Nesterenkonia jeotgali</i> strain JG-241	78.7
Mid	86.7	0.3	274	13,730	39.4	1,672	1	1	1	<i>Legionella dresdenensis</i> strain W03-356	88.4
Mid	86.5	1.4	120	26,444	40.8	1,673	1	0	0	-	0.0
Mid	83.0	1.9	122	24,393	41.1	1,442	0	1	1	<i>Nesterenkonia jeotgali</i> strain JG-241	78.7
Mid	80.7	0.5	341	20,258	40.9	2,209	1	1	1	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> strain DSM 1100	83.6
Mid	70.6	0.1	84	49,523	40.5	1,576	1	1	1	<i>Thermocrinis minervae</i> strain CR11	76.4
Mid	70.3	4.3	95	26,916	33.7	801	1	1	1	<i>Altererythrobacter xixiisoli</i> strain S36	77.4

◆ 高品質なゲノムデータ
ゲノム品質基準における
高～中品質なゲノムを獲得

◆ 遺伝子配列の抽出
rRNA配列を含む
ゲノム上の遺伝子を獲得

◆ 新規細菌ゲノムの獲得
データベース上に登録のない
細菌ゲノムを一挙に取得

◆ 多様な生物種のゲノムデータ

グラム陽性/陰性細菌に加え、アーキアゲノムも取得

GTDBTk_Taxonomy

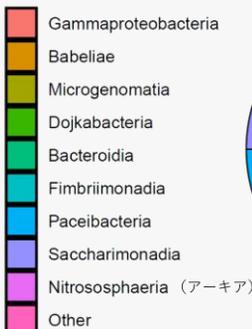


図2 GTDB-Tkによる生物種推定（網レベル）

◆ こんな用途にも

bit-MAP[®]は、土壌細菌のみならず、根圏、海洋・河川などの環境細菌から、動物腸内・口腔内などの常在細菌まで幅広く対応可能です。

Conclusions

bit-MAP[®]を利用して、土壌から複数の細菌の高品質なシングルセルゲノム情報を獲得しました。bit-MAP[®]は培養を介さずに1細胞から全ゲノム情報を獲得できるため、培養が困難だと考えられてきた細菌に対しても新規ゲノム情報を獲得することができます。高出力シーケンサーを用いることで一度に大量のシングルセルゲノムデータを獲得でき、これまで謎に包まれていた土壌細菌の実態をゲノム情報から明らかにできます。また、従来のメタゲノム解析と組み合わせることで、コミュニティの機能解析やネットワーク解析にも応用可能です。

Reference

1. T. Yoda, *et al.*, High-Quality Draft Single-Cell Genome Sequences of Two *Gammaproteobacteria* Strains Sampled from Soil in a Strawberry Farm. *Microbiology Resource Announcement* (2020)
2. C. Rinke, *et al.*, Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics. *Nature Protocols* (2014)
3. R. Chijiwa, *et al.*, Single-cell genomics of uncultured bacteria reveals dietary fiber responders in the mouse gut microbiota. *Microbiome* (2019)
4. A. Bankevich, *et al.*, SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* (2012)
5. D. Parks, *et al.*, CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research* (2015)
6. R. Bowers, *et al.*, Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea. *Nature Biotechnology* (2017)

bitBiome株式会社



bitBiome

bitBiome株式会社は、微生物を対象としたシングルセルゲノム解析サービスを提供しています。

ヒト常在菌や環境細菌など幅広い微生物から高品質なゲノム情報を取得できます。

解析サービス等のお問い合わせはinfo@bitbiome.co.jpより承ります。