



総説：微生物ゲノム研究

イルミナテクノロジーを使用した研究論文の概要

目次

目次.....	2
はじめに	2
モザイク現象.....	3
適応度.....	5
コアゲノム	6
研究室における進化.....	7
抗生物質耐性および病原性.....	7
伝染病および感染	9
微生物同定	11
指向進化とバイオエンジニアリング.....	12
生物燃料およびバイオレメディエーション	13
ウイルス	14
ウイルスの検出および同定.....	15
ワクチン生産	16
酵母.....	17
良く研究されている微生物.....	19
大腸菌	19
黄色ブドウ球菌	19
連鎖球菌	20
マイコバクテリア	21
サルモネラ菌	22
参考文献一覧.....	23

はじめに

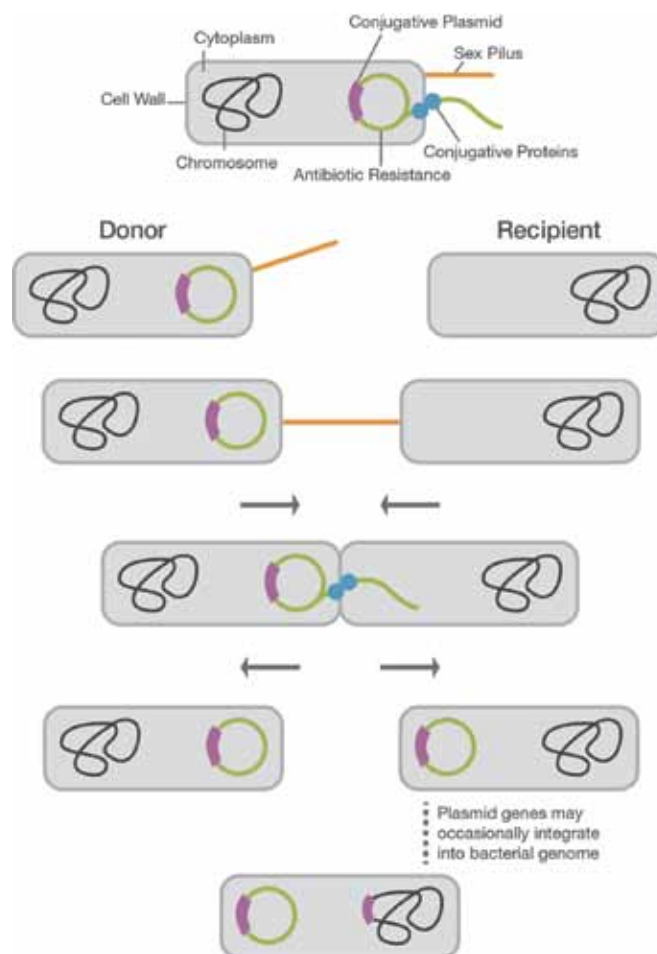
小さなサイズのゲノムを取り扱い、比較的シンプルなデータ解析を行う微生物研究室において、次世代シーケンサーは特に有用です。シーケンスでは結果をゲノム遺伝子座およびその生物学的影響の潜在的解釈に直接関連付けることが可能であり、このためシーケンスは他のすべての実験室的測定とは異なる魅力的な方法となっています。これは、シーケンスにより、実験結果の解釈および生物学的システムに関する理解が飛躍的に前進することを意味しています。シーケンスの第二の利点は、ゲノムのすべての位置において、一塩基の差を、予備知識なしで測定することが可能なことです。一塩基レベルの分解能の達成により、研究室および環境中のいずれにおいても短期間の微生物適応性の追跡が可能となります。このように、シーケンスの有用性は極めて大きいため、シーケンサーを装備しない生物学研究室というものは、近い将来考えられなくなるでしょう。

最近の研究において、生物学的システムのゲノムが研究室環境および臨床環境に極めて積極的に適応していることが示されています。歴史的に、地球規模での伝染病の蔓延については長い年月をかけてその追跡が行われてきました。次世代シーケンサーによる細菌ゲノムの一塩基の分解能での解析により¹、地域内、病院内または家族内での伝染病を数週間で迅速に追跡することが可能です。

本書では、イルミナシーケンス技術を使用して、自然界、研究室内および臨床現場における迅速な遺伝子適応を追跡した最近の研究例をクローズアップしています。

モザイク現象

遺伝子水平伝播は、親から子への移動を除く、細菌間での遺伝物質の移動のことを指します²。遺伝子水平伝播は数種類の異なる機序により起こり得ますが、最終結果としてはいずれもモザイク現象を生じます。モザイク現象においては、生物の大部分は祖先から受け継いだ配列から構成されますが、一部は環境中に存在する他の生物由来のDNAフラグメントから構成されます。この遺伝物質の交換は親から子への移動ではないため、予想が困難で局所的で、このため微生物のゲノムの解析は特に困難となっています。モザイクゲノムを正確にマッピングできるツールは、シーケンス以外には存在しません。



機能性遺伝子の水平伝播、または大きなゲノム再配列でさえ、ゲノムのごく一部のみをマーカーとする解析では検出されません。

¹ Next Generation Sequencing (NGS) and Massively Parallel Sequencing MPS are often used interchangeably to refer to high throughput sequencing technologies. Sequencing by Synthesis (SBS) refers specifically to Illumina sequencing technology.

² Maiden, M. C. (1998) Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. Clin Infect Dis 27 Suppl 1: S12-20

総説：

Joseph, S. J. and Read T. D. (2012) Genome-wide recombination in *Chlamydia trachomatis*. *Nat Genet* 44: 364-366

Rajendhran, J. and Gunasekaran P. (2011) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* 166: 99-110

参考文献：

Harris, S. R., Clarke I. N., Seth-Smith H. M., Solomon A. W., Cutcliffe L. T., et al. (2012) Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 44: 413-419, S411

この文献では、トラコーマおよび鼠径リンパ肉芽腫 (LGV) 由来の *C. trachomatis* 次亜種の代表株の全ゲノムシーケンスに基づいた、系統発生論の詳細について紹介しています。クラジミア属の分類のために従来から使用されている *ompA* を用いて系統発生論的構造を予測すると、この領域の広範な遺伝子組換えが真の関係を隠蔽してしまうために、誤解を招く恐れがあるとの報告では指摘しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Wang, D., Wang H., Zhou Y., Zhang Q., Zhang F., et al. (2011) Genome sequencing reveals unique mutations in characteristic metabolic pathways and the transfer of virulence genes between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *PLoS ONE* 6: e21299

コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) に最も類似した種であるビブリオ・ミミカス (*V. mimicus*) は、自然環境中に生息する微生物です。ビブリオ・ミミカスは、通常特に病原性ではありませんが、ヒトにおいて下痢および体内感染を引き起こす場合もあります。*V. cholerae* の稀有なクローンからの病原性関連遺伝子の水平伝播により、コレラ毒遺伝子を持つ病原性 *V. mimicus* が生じます。これは、遺伝子の水平伝播 (モザイク現象) および全ゲノムシーケンスの顕著な一例です。

イルミナ技術：Genome Analyzerによる130x カバレッジ解析

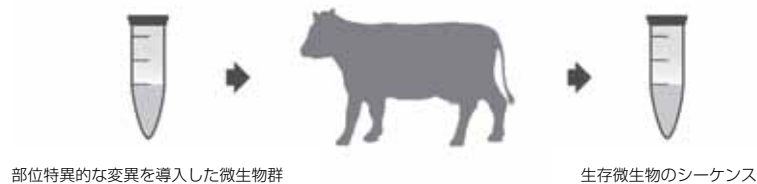
Gonzalez-Escalona, N., Strain E. A., De Jesus A. J., Jones J. L. and Depaola A. (2011) Genome sequence of the clinical O4:K12 serotype *Vibrio parahaemolyticus* strain 10329. *J Bacteriol* 193: 3405-3406

Izumiya, H., Sekizuka T., Nakaya H., Taguchi M., Oguchi A., et al. (2011) Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 623-630

適応度

微生物群においては、均一な微生物群の最適化された適応度と、最適ではないが条件の変化を生き延びることができる変異種の維持の間にトレードオフが存在します^{3,4}。例えば、抗生物質による攻撃を受けている微生物群において、当該抗生物質に耐性のある微生物は、成長が遅く適応度が低いように見受けられても生き延びることが可能です^{5,6}。適応度地形は、適応度の低い領域に存在する遺伝子型から適応度の高い遺伝子型へと系統が段階的に進化していく変異の軌跡を描写したものです⁷。

より系統的な方法としては、培養または動物による継代を行う前の微生物群に部位特異的な変異を導入し、培養または継代後に生存している微生物中に存在する変異をハイスループットシーケンスによって検出する方法が使用されています。この方法は、ハイスループットシーケンスの長所を利用した、非常に効率的な方法です^{8,9}。



培養または動物による継代を行う前の微生物群に部位特異的な変異を導入し、生存している微生物中に存在する変異をハイスループットシーケンスによって検出します¹⁰。

Goodman, A. L., Wu M. and Gordon J. I. (2011) Identifying microbial fitness determinants by insertion sequencing using genome-wide transposon mutant libraries. *Nat Protoc* 6: 1969-1980

ここでは、導入シーケンス (INSeq; Insertion Sequencing) を詳細に記載しています。導入シーケンスは、シーケンスを行った微生物の同質遺伝子変異体の混合集団に関して、導入部位および数の多いトランスポゾン変異体の相対存在量を同定する方法です。プロトコールは容易にスケールアップすることが可能で、自動化に適しており、様々なサンプルの解析に利用できます。

GA/HiSeq

Coffey, L. L., Beeharry Y., Borderia A. V., Blanc H. and Vignuzzi M. (2011) Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16038-16043

この研究では、ウイルスゲノムにおける適応度と多様性間のトレードオフが示されています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{ix}

³ Gerstein, A. C. and Otto, S. P. (2011) Cryptic Fitness Advantage: Diploids Invade Haploid Populations Despite Lacking Any Apparent Advantage as Measured by Standard Fitness Assays. *PLoS ONE* 6:

⁴ Bachmann, H., Starrenburg, M. J., Molenaar, D., Kleerebezem, M. and van Hylckama Vlieg, J. E. (2012) Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Res* 22: 115-124⁵ Comas, I., Borrell, S., Roetzer, A., Rose, G., Malla, B., et al. (2011) Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet* 44: 106-110

⁶ Casali, N., Nikolayevskyy, V., Balabanova, Y., Ignatyeva, O., Kontsevaya, I., et al. (2012) Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res* 22: 735-745

⁷ Kvitek, D. J. and Sherlock, G. (2011) Reciprocal sign epistasis between frequently experimentally evolved adaptive mutations causes a rugged fitness landscape. *PLoS Genet* 7: e1002056

⁸ Moses, A. M. and Davidson, A. R. (2011) In vitro evolution goes deep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8071-8072

⁹ Han, T. X., Xu, X. Y., Zhang, M. J., Peng, X. and Du, L. L. (2010) Global fitness profiling of fission yeast deletion strains by barcode sequencing. *Genome Biol* 11: R60

¹⁰ Eckert, S. E., Dziva, F., Chaudhuri, R. R., Langridge, G. C., Turner, D. J., et al. (2011) Retrospective application of transposon-directed insertion site sequencing to a library of signature-tagged mini-Tn5Km2 mutants of *Escherichia coli* O157:H7 screened in cattle. *J Bacteriol* 193: 1771-1776

Eckert, S. E., Dziva F., Chaudhuri R. R., Langridge G. C., Turner D. J., et al. (2011) Retrospective application of transposon-directed insertion site sequencing to a library of signature-tagged mini-Tn5Km2 mutants of *Escherichia coli* O157:H7 screened in cattle. *J Bacteriol* 193: 1771-1776

Lee, C. Y., Kam Y. W., Fric J., Malleret B., Koh E. G. L., et al. (2011) Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. *PLoS Pathog* 7:

Hietpas, R. T., Jensen J. D. and Bolon D. N. (2011) From the Cover: Experimental illumination of a fitness landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 7896-7901

Nair, D., Memmi G., Hernandez D., Bard J., Beaume M., et al. (2011) Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* Strain RN4220, a Key Laboratory Strain Used in Virulence Research, Identifies Mutations That Affect Not Only Virulence Factors but Also the Fitness of the Strain. *J Bacteriol* 193: 2332-2335

コアゲノム

同一の分類群においては、群内のすべての生物に共通する、進化的に保存された一連のコア遺伝子が存在します。このコアゲノムは、生物の生存に不可欠です。微生物群の各生物はさらに、それぞれ病原性および薬剤耐性などのニッチ特異的な表現型に寄与するアクセサリ遺伝子を有しています。微生物を分類または改変するためには、このコア遺伝子とアクセサリ遺伝子を区別することが重要です。保存遺伝子のコアゲノムは、分類群の生物を比較することにより同定することが可能です。コアゲノムは、無作為に変異を導入した後、変異体の生存能力を解析することにより、実験的に同定することも可能です。必要不可欠な遺伝子が機能しなくなった場合、微生物は培養条件下で生存することができなくなります。この方法は非常に柔軟性が高く、極めて多くの情報が得られます。

レビュー：

Laing, C. R., Zhang Y., Thomas J. E. and Gannon V. P. (2011) Everything at once: comparative analysis of the genomes of bacterial pathogens. *Vet Microbiol* 153: 13-26

参考文献：

Laing, C., Villegas A., Taboada E. N., Kropinski A., Thomas J. E., et al. (2011) Identification of *Salmonella enterica* species- and subgroup-specific genomic regions using PanSeq 2.0. *Infect Genet Evol* 11: 2151-2161

この研究において著者らは、39のサルモネラ菌ゲノム（16のクローズドおよび23のドラフト）の解析にPanSeq 2.0を使用しています。サルモネラ種には、腸チフス熱を引き起こす2種類のヒト特異的な血清型が存在し、さらにヒトの胃腸炎の原因となる動物由来感染症性の血清型も多数存在します。著者らは、最も近接に関連したチフス菌株間においても高度な分離に成功しています。この情報はさらに、種のコアゲノムの決定に使用することが可能です。

研究室における進化

研究室において、モデル生物のゲノムは時間経過とともに変異を蓄積します^{11,12}。そのため同一のモデル生物でも研究室により異なるゲノムを有する可能性が生じ、実験を再現することが徐々に困難になります。全ゲノムリシーケンスは、ゲノムを日常的にモニターするための強力なツールとなっており、記録および制御が必要な他のすべての実験変数と同様にゲノムを取り扱うことを可能としています。

中立進化モデルに基づくと、細菌は安定した研究室環境下においては時間経過とともに一定の速度で中立変異を蓄積すると考えられます。しかし実際には適応進化と中立進化の相互作用ははるかに複雑です。研究室細菌群から生成された4万世代以上の大腸菌に関する長期間にわたる研究から、変異の大部分は有益であること、安定であると思われる研究室細菌群において、時間経過とともに中立変異に急激な変化が生じ得ることが示されています¹³。さらに、4万世代以上の継代後においても蓄積される変異の数に上限が見られないことは、幾分奇異ではあるが注目し得る事実です¹⁴。

Lee, D. H., Feist A. M., Barrett C. L. and Palsson B. O. (2011) Cumulative number of cell divisions as a meaningful timescale for adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 6: e26172

著者らは、短期ALE（最高40日～50日）において、成長速度に選択圧がかかった状態の大腸菌は、2～8回の変異により生じる安定成長表現型を生成するために、細胞群全体で合計約1011.2回の積算細胞分裂を行うことが判明したと報告しています。低濃度の変異原に継続的に曝露することで、このタイムスケールを短縮することが可能です。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}による36bpリード解析

Kashiwagi, A. and Yomo T. (2011) Ongoing phenotypic and genomic changes in experimental coevolution of RNA bacteriophage Qbeta and *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 7: e1002188

この文献では、細菌とファージを同時繁殖させた場合の両者間の「せめぎあい」について報告しています。はじめに大腸菌は、感染への部分的耐性を確立し、比増殖速度を高めることにより適応します。これに対応してファージは、宿主特異性の変化および病原性の低下により放出効率を向上させて適応し、大腸菌に対抗します。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}による51bpシングルリード解析

抗生物質耐性および病原性

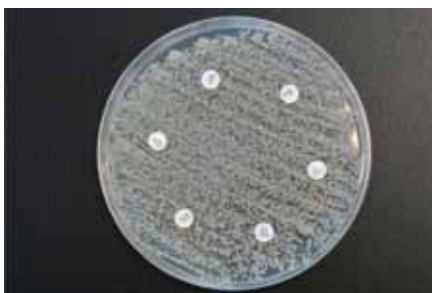
抗生物質耐性の発現は指向進化の特別な例であると考えられます。抗生物質耐性株の伝染病が増加してきているため、抗生物質耐性の発現に関して精力的に研究が行われています。

¹¹ Conrad, T. M., Joyce, A. R., Applebee, M. K., Barrett, C. L., Xie, B., et al. (2009) Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations. *Genome Biol* 10: R118

¹² Charusanti, P., Conrad, T. M., Knight, E. M., Venkataraman, K., Fong, N. L., et al. (2010) Genetic basis of growth adaptation of *Escherichia coli* after deletion of *pgi*, a major metabolic gene. *PLoS Genet* 6: e1001186

¹³ Barrick, J. E. and Lenski, R. E. (2009) Genome-wide mutational diversity in an evolving population of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 74: 119-129

¹⁴ Harris, D. R., Pollock, S. V., Wood, E. A., Goiffon, R. J., Klingele, A. J., et al. (2009) Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191: 5240-5252



多剤耐性菌の培養物。この病原菌においては、抗生物質として、バンコマイシン (VA)、リファンピシン (RD)、シプロフロキサシン (CIP)、コトリモキサゾール (STX)、クリンダマイシン (MY) およびエリスロマイシン (E) に関する試験が行われています。

9004039

細菌ゲノムにはモザイク現象が存在するため、抗生物質耐性遺伝子または病原性関連遺伝子を迅速に環境から獲得することができます。これらの遺伝子の獲得は、血清型または遺伝子マーカーとは関連していないことが多くあります。全ゲノムを対象とした次世代シーケンサーは、抗生物質耐性遺伝子および病原性関連遺伝子の包括的で明確な追跡のための理想的なツールであることが明らかとされています。

抗生物質耐性および病原性の変化の従来の研究では、集団発生や伝染病から単離された菌を比較する方法が採用されています^{15,16}。新しい研究方法では、研究室における持続的な抗生物質の影響に対する細菌の適応を追跡します。この方法では、次世代シーケンサーの持つ、迅速かつ費用効率の高い単一塩基変化の検出能力が有効に活用されています。この方法の優れた点として、すべての変数を研究室環境内で注意深く制御することが可能なこと、および結果を生物学的機能に直接関連付けることが可能なことが挙げられます¹⁷。

Toprak, E., Veres A., Michel J. B., Chait R., Hartl D. L., et al. (2011) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet* 44: 101-105

著者らは、クロラムフェニコール、ドキシサイクリンおよびトリメトプリンなどの単一薬剤による選択条件下における、大腸菌の耐性進化について解析しています。約20日間にわたり、並行群において耐性レベルは劇的に上昇し、表現型は類似した進化の軌跡を示しました。進化した株の全ゲノムシーケンスにより、特定の薬剤に対する耐性に特異的な変異と複数の薬剤への耐性に共通した変異の両方が同定されました。これはルーチンなシーケンスが微生物学研究室にもたらすことのできる能力を示す一例です。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix} による75bpシングルエンドリード解析

Chua, K. Y. L., Seemann T., Harrison P. F., Monagle S., Korman T. M., et al. (2011) The Dominant Australian Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone ST93-IV [2B] Is Highly Virulent and Genetically Distinct. *PLoS ONE* 6:

地理的および遺伝的に多様なCA-MRSAゲノム間の比較から、CA-MRSAの明らかな収束進化は、高度に保存されたアクセサリーゲノムの共通源からの迅速な伝播により説明することができる可能性があることが示唆されます。これは、臨床的および疫学的プロファイルがいかに誤解を招くものであり得るかということ、そして伝染病を追跡する場合には細菌の全ゲノムシーケンスがいかに重要であるかを示す良い一例です。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix} による36bpペアエンドリード解析

¹⁵ Chua, K. Y. L., Seemann, T., Harrison, P. F., Monagle, S., Korman, T. M., et al. (2011) The Dominant Australian Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone ST93-IV [2B] Is Highly Virulent and Genetically Distinct. *PLoS ONE* 6:

¹⁶ Howden, B. P., McEvoy, C. R. E., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., et al. (2011) Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLoS Pathog* 7: e1002359

¹⁷ Toprak, E., Veres, A., Michel, J. B., Chait, R., Hartl, D. L., et al. (2011) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet* 44: 101-105

Howden, B. P., McEvoy C. R. E., Allen D. L., Chua K., Gao W., et al. (2011) Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLoS Pathog* 7: e1002359

Peleg, A. Y., Miyakis S., Ward D. V., Earl A. M., Rubio A., et al. (2012) Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7: e28316

Lieberman, T. D., Michel J. B., Aingaran M., Potter-Bynoe G., Roux D., et al. (2011) Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. *Nat Genet* 43: 1275-1280

Thomas, J. C., Figueira M., Fennie K. P., Laufer A. S., Kong Y., et al. (2011) *Streptococcus pneumoniae* clonal complex 199: genetic diversity and tissue-specific virulence. *PLoS ONE* 6: e18649

Harvey, R. M., Stroehner U. H., Ogunniyi A. D., Smith-Vaughan H. C., Leach A. J., et al. (2011) A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence. *PLoS ONE* 6: e19650

伝染病および感染

伝染病および微生物感染は、従来は血清学的マーカーまたは他のマーカーを用いて追跡していましたが、これらの方法では微生物ゲノムのほんの一部の任意部分のみをモニターしています。微生物ゲノムにはモザイク現象が存在するため、ゲノムの一部のみをモニターする方法はいずれも比較的信頼性が低く、低感度です。これとは対照的に、次世代シーケンサーではゲノム中のすべての塩基を追跡することが可能で、伝染病および感染の過程の知見に革新がもたらされています¹⁸。今や感染は比較的短期間に、家族内¹⁹または病院内²⁰で追跡が可能となっており、発生源を確定することが可能です^{21,22,23}。このため、伝染病および感染の発生に対するより迅速でターゲットを絞った対策を講じることが可能となりました。さらに、発生期間中に蓄積された変異から、抗生物質耐性発現の可能性および病原性の変化に関する情報を得ることができるという利点もあります²⁴。

¹⁸ Croucher, N. J. (2009) From small reads do mighty genomes grow. *Nat Rev Microbiol* 7: 621

¹⁹ Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907

²⁰ Harris, S. R., Feil, E. J., Holden, M. T., Quail, M. A., Nickerson, E. K., et al. (2010) Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 327: 469-474

²¹ Hendriksen, R. S., Price, L. B., Schupp, J. M., Gillece, J. D., Kaas, R. S., et al. (2011) Population Genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: Evidence on the Origin of the Haitian Outbreak. *MBio* 2:

²² Mutreja, A., Kim, D. W., Thomson, N. R., Connor, T. R., Lee, J. H., et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477: 462-465

²³ Grad, Y. H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H. M., Cerqueira, G. C., et al. (2012) Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3065-3070

²⁴ Howden, B. P., McEvoy, C. R. E., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., et al. (2011) Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLoS Pathog* 7: e1002359

レビュー：

Lenski, R. E. (2011) Chance and necessity in the evolution of a bacterial pathogen. *Nat Genet* 43: 1174-1176

Editorial, N. B. (2011) Outbreak genomics. *Nat Biotechnol* 29: 769

参考文献：

Harris, S. R., Clarke I. N., Seth-Smith H. M., Solomon A. W., Cutcliffe L. T., et al. (2012) Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 44: 413-419, S411

この文献では、トラコーマおよび鼠径リンパ肉芽腫（LGV）由来の*C. trachomatis*次亜種の代表株の全ゲノムシーケンスに基づいた、系統発生論の詳細について紹介しています。クラジミア属の分類のために従来から使用されているompAを用いて系統発生論的構造を予測すると、この領域の広範な遺伝子組換えが真の関係を隠蔽してしまうために、誤解を招く恐れがあるとこの報告では指摘しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Reeves, P. R., Liu B., Zhou Z., Li D., Guo D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907

著者らは、イヌを含めた一家族内に3年間存在し続けていた尿路病原性大腸菌クローンの14の分離株のゲノムシーケンスを報告しています。宿主データからは、3年の間に少なくとも6回の宿主伝播イベントが発生し、その期間を通して2つの系統が存在していたことが示唆されています。従来の型による分類技術を使用した研究では伝播を解明することは不可能でした²⁵。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}



Reevesら²⁶は、イヌを含めた一家族内に3年間存在し続けていた尿路病原性大腸菌クローンの感染を報告しています。そのデータからは、少なくとも6宿主への伝播のイベントの存在が示唆されていました。

Hendriksen, R. S., Price L. B., Schupp J. M., Gillece J. D., Kaas R. S., et al. (2011) Population Genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: Evidence on the Origin of the Haitian Outbreak. *MBio* 2:

ハイチおよびネパールからのコレラ菌の分離株の比較により、ネパールからの24のコレラ菌分離株が、バングラデシュおよびハイチからの分離株も含めた、1つの単系統性集団に属することが示されました。1つのクラスターには3つのネパール分離株と3つのハイチ分離株が含まれ、これらの株には1bpまたは2bpの相違が存在するのみで、お互いにほぼ同一でした。この研究結果は、ネパールがハイチにおける集団発生の起源であるという事実を裏付けています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}による76bpペアエンドリード解析

²⁵ Johnson, J. R., Clabots, C. and Kuskowski, M. A. (2008) Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *J Clin Microbiol* 46: 4078-4082

²⁶ Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907

Omer, H., Rose G., Jolley K. A., Frapy E., Zahar J. R., et al. (2011) Genotypic and phenotypic modifications of *Neisseria meningitidis* after an accidental human passage. PLoS ONE 6: e17145

この報告は、髄膜炎菌のセログループA株であるZ5463を用いた実験中に研究室において偶然発生した感染に関する興味深い研究に関するものです。著者らは、ヒトの体内において約25回の細菌性細胞分裂が起こっていると推定しています。生体内で継代するため、細胞分裂の回数が少なくても数多くのゲノム修飾の選択が可能で、そのためにこの細胞株のまん延能力が非常に高くなっている可能性があります。

イルミナ技術：Genome Analyzer を使い、78x、84x、154xのカバレッジ

Fittipaldi, N., Beres S. B., Olsen R. J., Kapur V., Shea P. R., et al. (2012) Full-Genome Dissection of an Epidemic of Severe Invasive Disease Caused by a Hypervirulent, Recently Emerged Clone of Group A *Streptococcus*. Am J Pathol

Grad, Y. H., Lipsitch M., Feldgarden M., Arachchi H. M., Cerqueira G. C., et al. (2012) Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 3065-3070

Mutreja, A., Kim D. W., Thomson N. R., Connor T. R., Lee J. H., et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. Nature 477: 462-465

Gardy, J. L., Johnston J. C., Ho Sui S. J., Cook V. J., Shah L., et al. (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. N Engl J Med 364: 730-739

微生物同定

従来の微生物同定法では、臨床症状およびある程度の微生物同定のための予備知識に依存していました。しかし一部のケースは特殊で同定が非常に困難です。微生物同定および次世代シーケンサーによるシーケンスの不可知論的性質のため、次世代シーケンサーはこれら特殊なケースにおいても非常に有用なツールとなっています。



シーケンスにおいては、微生物を同定するために予備知識を必要としません。

Engelthaler, D. M., Bowers J., Schupp J. A., Pearson T., Ginther J., et al. (2011) Molecular investigations of a locally acquired case of melioidosis in Southern AZ, USA. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1347

アリゾナ州の風土病のない地域において最近発生した類鼻疽症例は、患者に風土病の存在する地域への旅行歴および類鼻疽症の既往歴がないことから、現地において発症した感染症であると確定しました。症例の診断は、複数の微生物学的技術および分子的技術により確定されました。これは、シーケンスを病原菌の同定に使用した好例です。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}による50bpペアエンドリード解析

Avasthi, T. S., Devi S. H., Taylor T. D., Kumar N., Baddam R., et al. (2011) Genomes of two chronological isolates (*Helicobacter pylori* 2017 and 2018) of the West African *Helicobacter pylori* strain 908 obtained from a single patient. *J Bacteriol* 193: 3385-3386

指向進化とバイオエンジニアリング

指向進化は、標準的なバイオエンジニアリング技術を補完する有望な新技術として頭角を現してきています。微生物は環境の変化に対して極めて迅速に適応します。研究室において環境を系統的に変化させることにより、遺伝子発現の変化および、好ましい特性を達成するために生物によって組み込まれた変異、例えばガラクトース上で成長するための適応進化などを追跡することができます。異なる経路を修飾することにより、反復実験において生物が同一の好ましい特性を達成する可能性も存在します。この方法により、さまざまなバイオエンジニアリング法の可能性が生み出されます。

Bachmann, H., Starrenburg M. J., Molenaar D., Kleerebezem M. and van Hylckama Vlieg J. E. (2012) Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Res* 22: 115-124

この文献では、植物から単離した*Lactococcus lactis*株を牛乳中で1000世代にわたり増殖させることによる*Lactococcus lactis*株の乳製品ニッチへの適応が示されています。独立して進化した3種類の株のうち2種類の株では、酸性化速度および牛乳中のバイオマス生産量の著しい増加が観察されました。実験的進化を使用して植物から乳製品ニッチへの移行を再現することにより、いずれかのニッチから単離された株に見られるのと類似した数種類のゲノム、トランスクリプトームおよび表現型シグナチャーが明らかとされました。これは、適応進化および遺伝子工学に関与する経路を理解するために、NGSを効率的に利用した興味深い実験です。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Hong, K. K., Vongsangnak W., Vemuri G. N. and Nielsen J. (2011) Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 12179-12184

この文献では、酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、ガラクトース上で成長するための適応進化の結果生じる代謝の変化を追跡しています。この研究は、適応進化がバイオエンジニアリングにおける改良株の合理的デザインに代わる価値ある方法であり、進化した株から同定した変異を過去にない代謝工学的ターゲットとして活用することにより生物燃料および化学物質の生産用に微生物株を改良する可能性を示しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix}による38bpペアエンドリード解析

Gibbons, H. S., Broomall S. M., McNew L. A., Daligault H., Chapman C., et al. (2011) Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant. PLoS ONE 6: e17836

Kvitek, D. J. and Sherlock G. (2011) Reciprocal sign epistasis between frequently experimentally evolved adaptive mutations causes a rugged fitness landscape. PLoS Genet 7: e1002056

生物燃料およびバイオレメディエーション

生物燃料およびバイオレメディエーション生成のための新しい微生物の探求は、一般的にメタゲノム手法を用いて実施されます。しかし、研究室内で進化に圧力および操作を加えることにより、新たに発見された候補微生物を非常に効率よく改良することが可能です。



下水処理プラント

Summers, Z. M., Ueki T., Ismail W., Haveman S. A. and Lovley D. R. (2011) Laboratory evolution of *Geobacter sulfurreducens* for enhanced growth on lactate via a single-base-pair substitution in a transcriptional regulator. *ISME J*

著者らによれば、転写制御因子における単一塩基対の変異は、基質を利用する能力に大きな影響を与える可能性があり、適応進化はバイオレメディエーションにおいて生じる環境的变化に対する微生物の潜在的応答として考えるべきだと提言しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Minty, J. J., Lesnefsky A. A., Lin F., Chen Y., Zaroff T. A., et al. (2011) Evolution combined with genomic study elucidates genetic bases of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 10: 18

著者らは、イソブタノールによる外因性ストレスへの適応の遺伝的基盤を解明するために、実験的進化に続き、ゲノムリシーケンスおよび遺伝子発現実験を行いました。進化した系統は、細胞外皮のリモデリングだけでなくストレス反応の減衰により、イソブタノールストレスへの適応を獲得していました。

イルミナ技術：Genome Analyzerによる、36bpシングルエンドシーケンス（125xカバレッジ）、および36bpペアエンドシーケンス（500xカバレッジ）

Radakovits, R., Jinkerson R. E., Fuerstenberg S. I., Tae H., Settlage R. E., et al. (2012) Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat Commun* 3: 686

Tremblay, P. L., Summers Z. M., Glaven R. H., Nevin K. P., Zengler K., et al. (2011) A c-type cytochrome and a transcriptional regulator responsible for enhanced extracellular electron transfer in *Geobacter sulfurreducens* revealed by adaptive evolution. *Environ Microbiol* 13: 13-23

ウイルス

ウイルスは独自の複製機序を利用しているため、研究室においてウイルスの進化を追跡することは特に困難な課題です。大部分の生存細胞では取り込みエラーが10億塩基当たり1塩基の割合で生じますが、一部のウイルスでは1,000塩基の複製当たり1塩基の割合でエラーが生じることもあり得ます。これは、ウイルスが校正活性のない酵素（RdRpまたはRT）を使用していること、またはウイルスの修復活性が限られていることに起因する²⁷。ウイルスでは変異がより頻繁に発生するのみならず、多数のコピーが非常に迅速に生成されます。1回の細胞周期において2個の子孫細胞が生成されるのと比較して、1個のウイルスは1回のライフサイクルにおいて数百回あるいは数千回コピーされることが可能です²⁸。

²⁷ Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A., Li, K., Venter, E., et al. (2010) Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 6: e1000896

²⁸ Murray, C. L., Oh, T. S. and Rice, C. M. (2011) Keeping Track of Viruses. *Microbial Forensics (Second Edition)* 137-153

ウイルスの検出および同定

ウイルス感染の症状は不明確であるため、その診断は困難です。さらにウイルスの遺伝的変化の速さは、その同定をより困難にしています。Yozwiak氏らの最近の研究により、標準的な技術で検出されなかったウイルスを、次世代シーケンサーによって検出および同定することが可能であることが示されています²⁹。この次世代シーケンサーの機能により、腫瘍³⁰および慢性疾患³¹におけるウイルス感染の可能性を探求することが新たに注目されています。感度が高くしかも予備的情報を必要としない次世代シーケンサーは、ウイルスの検出および同定のための主要なツールとなると考えられています。

Yozwiak, N. L., Skewes-Cox P., Stenglein M. D., Balmaseda A., Harris E., et al. (2012) Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1485

著者らは、ディープシーケンスを使用して、以前に陰性と判断された症例の37%（123例中45例）においてウイルスシーケンスを検出しました。これには、ヒトヘルペスウイルスの6つのシーケンスを有する13例が含まれています。他の試料には、ヘルペスウイルス科、フラビウイルス科、サーコウイルス科、アネロウイルス科、アスファウイルス科およびパルボウイルス科に属するウイルスからのシーケンスと類似したシーケンスが含まれていました。いくつかの例ではウイルス由来のシーケンスと推定されるシーケンスが実質的に既知のウイルスと同一である一方、他の例では分岐しており、それらは新規のウイルスに由来する可能性があることが示唆されます。これとは対照的に、Virochip解析では、以前に陰性と判断された123例のうち10例（8%）において、ウイルスの存在が推定されています。これらの結果は熱帯性熱病の研究における、既知および分岐進化したウイルスの検出への不偏的な方法の実用性を示しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II} およびHiSeq 2000。RNAおよびDNAを共精製するためのQIAamp Viral RNA Isolation Kit（Qiagen）を使用して、140mLの血清から全核酸を抽出しました。

Conway, C., Chalkley R., High A., Maclennan K., Berri S., et al. (2012) Next-generation sequencing for simultaneous determination of human papillomavirus load, subtype, and associated genomic copy number changes in tumors. *J Mol Diagn* 14: 104-111

この研究では、FFPE試料として保存されている様々な異なるタイプの腫瘍におけるウイルス感染に関して、NGSを使用して検討しています。著者らは、従来の方法では検出されなかったと思われる、HPVサブタイプの検出に成功しており、この方法がすべての腫瘍およびウイルスに適応可能であることが示されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer

²⁹ Yozwiak, N. L., Skewes-Cox, P., Stenglein, M. D., Balmaseda, A., Harris, E., et al. (2012) Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1485

³⁰ Jiang, Z., Jhunjunwala, S., Liu, J., Haverty, P. M., Kennemer, M. I., et al. (2012) The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res* 22: 593-601

³¹ Kriesel, J. D., Hobbs, M. R., Jones, B. B., Milash, B., Nagra, R. M., et al. (2012) Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. *PLoS ONE* 7: e31886

Nishijima, N., Marusawa H., Ueda Y., Takahashi K., Nasu A., et al. (2012) Dynamics of Hepatitis B Virus Quasispecies in Association with Nucleos(t)ide Analogue Treatment Determined by Ultra-Deep Sequencing. PLoS ONE 7: e35052

抗ウイルス治療に関連するB型肝炎ウイルス（HBV）の遺伝的不均一性を明らかにするために、著者らは19人のウイルス慢性肝炎患者の肝臓および血清に存在するHBVの全ゲノムに関する超ディープシーケンスを行いました。抗ウイルス薬治療に耐性のクローンが初回治療患者の肝臓および血清に広く見出されたことから、薬剤耐性を発症するリスクの可能性が示唆されています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II}

Blasdell, K. R., Voysey R., Bulach D., Joubert D. A., Tesh R. B., et al. (2012) Kotonkan and Obodhiang viruses: African ephemeroviruses with large and complex genomes. Virology 425: 143-153

Dunowska, M., Biggs P. J., Zheng T. and Perrott M. R. (2012) Identification of a novel nidovirus associated with a neurological disease of the Australian brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). Vet Microbiol 156: 418-424

Flaherty, P., Natsoulis G., Muralidharan O., Winters M., Buenrostro J., et al. (2012) Ultrasensitive detection of rare mutations using next-generation targeted resequencing. Nucleic Acids Res 40: e2

Jiang, Z., Jhunjhunwala S., Liu J., Haverty P. M., Kenemer M. I., et al. (2012) The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. Genome Res 22: 593-601

Kriesel, J. D., Hobbs M. R., Jones B. B., Milash B., Nagra R. M., et al. (2012) Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. PLoS ONE 7: e31886

Tapparel, C., Cordey S., Junier T., Farinelli L., Van Belle S., et al. (2011) Rhinovirus genome variation during chronic upper and lower respiratory tract infections. PLoS ONE 6: e21163

ワクチン生産

生ウイルスワクチンの製造には、ワクチンの安全性を保証するための厳格な品質管理が必要です。主要リスクの一つとして、RNAウイルスが本来持つ遺伝的不安定性により製造過程において病原性の復帰突然変異株が蓄積される可能性が挙げられます。

研究室において直面する困難な課題の一例として、ヒトサイトメガロウイルスが挙げられます。一般に使用されているヒトサイトメガロウイルス（HCMV）の変異株であるTowneおよびAD169は広く普及し、ワクチン候補として開発されています。しかし年月を重ねるにつれて、これらの株の詳細な経歴が不明瞭になってきており、これらの株の生物学的特性が、ストック間で保存されていないことが明らかとなってきました。これらの遺伝子間の差は、実験的研究の結果解釈に影響を及ぼす可能性があり、ワクチン開発におけるこれらの株の使用に大きな影響を与えることは明白です³²。

³² Bradley, A. J., Lurain, N. S., Ghazal, P., Trivedi, U., Cunningham, C., et al. (2009) High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. J Gen Virol 90: 2375-2380

Neverov, A. and Chumakov K. (2010) Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20063-20068

米国食品医薬品局の生物製剤評価研究センターにおいて最近おこなわれたMPSプラットフォームの評価において、著者らは、MPSにはワクチン製造において標準的品質管理ツールに比べてはるかに大きな利点があることを見出しました。著者らは、MPSには「生ウイルスワクチンの遺伝的一貫性をモニターするための究極のツールになる可能性がある」と述べています。現在使用されている、PCRによる変異体解析および制限酵素による切断（MAPREC）法は、ウイルスゲノムの5′末端非翻訳領域（UTR）における神経毒性変異の頻度を測定します。この領域はサル神経毒性試験により決定された神経毒性のレベルと関連しています。しかし、MAPRECは数箇所の遺伝子座における変異のみをモニターし、ワクチンの品質に悪影響を与え得る他の部位における変異を見逃してしまう可能性があります。MPSがMAPRECと比較してはるかに優れている点として、MPSでは一回の解析で完全なウイルスゲノムにおけるすべてのヌクレオチドの位置をスクリーニングすることができ、このため未知の遺伝子座における変異が存在するにもかかわらず検出されずワクチンの品質を低下させるという懸念を軽減させられることが挙げられます。この評価において、MPS結果とMAPREC結果は完全に一致していました。著者らは特定の種ウイルスに特異的な変異パターンをMPSデータ中に識別することができるという予期せぬ利点も見出しています。これにより、種ウイルスにおける変異パターンに基づいたワクチンのロットの追跡が可能となると考えられます。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

Szpara, M. L., Tafuri Y. R., Parsons L., Shamim S. R., Verstrepen K. J., et al. (2011) A wide extent of inter-strain diversity in virulent and vaccine strains of alphaherpesviruses. *PLoS Pathog* 7: e1002282

著者らは、PRV ワクチン株Bartha、および2種類の病原性PRV単離株であるKaplanおよびBeckerの全ゲノムシーケンスの比較を行っています。これらのデータは、安定なDNAウイルスのプラーク精製されたストックにおいても若干のシーケンス不均一性が見られ、これが株の進化のきっかけとなるという、確立されつつあるエビデンスを裏付けています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{II} による38bpリード解析

Checkley, A. M., Wyllie D. H., Scriba T. J., Golubchik T., Hill A. V., et al. (2011) Identification of antigens specific to non-tuberculous mycobacteria: the Mce family of proteins as a target of T cell immune responses. *PLoS ONE* 6: e26434

酵母

酵母ゲノムは、環境的圧力下に置かれると非常に複雑な遺伝子変化を起こす場合があります。硫酸制限条件下で *S. cerevisiae* の DBY10147 株を約188世代にわたり連続培養した後に単離した株に関して、MPSによるシーケンスが行われました。この研究報告の著者らは、以前に行ったアレイベースの研究では検出されなかった一塩基多型およびコピー数増幅のいずれも検出しています³³。

³³ Araya, C. L., Payen, C., Dunham, M. J. and Fields, S. (2010) Whole-genome sequencing of a laboratory-evolved yeast strain. *BMC Genomics* 11: 88

シーケンスはレファレンスゲノムに依存しませんが、これはレファレンスゲノムが入手不可能か不正確である多くのケースにおいて利点となっています。例えば、酵母のS288C株（12倍カバレッジ）およびRM11株（15倍カバレッジ）の2種類の株のシーケンスを行った研究では、一般シーケンス中にそれぞれ803および1104箇所のエラーが見つかっています³⁴。レファレンスゲノムにおけるすべてのエラーと欠失は、これらのゲノムをベースとするマイクロアレイやタイリングアレイのデザインに組み込まれてしまいます。

Ma, X., Rogacheva Maria V., Nishant K. T., Zanders S., Bustamante Carlos D., et al. (2012) Mutation Hot Spots in Yeast Caused by Long-Range Clustering of Homopolymeric Sequences. *Cell Reports* 1: 36-42

著者らは、160世代にわたる増殖後に蓄積した変異を同定するために、二倍体酵母の条件付きミスマッチ修復変異株の高カバレッジ全ゲノムシーケンスを使用しています。変異の大部分は、ホモポリマー（ポリ（dA:dT））およびDNA反復領域における挿入欠失（インデル）として蓄積していました。驚いたことに、特定のポリ（dA:dT）領域においてインデル変異が起こる確率は、その領域の中心から1,000 bp以内の領域にポリ（dA:dT）領域が隣接すると上昇します。

イルミナ技術：Genome Analyzerによる101bpリード解析

Hong, K. K., Vongsangnak W., Vemuri G. N. and Nielsen J. (2011) Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12179-12184

この文献では、酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、ガラクトース上での成長速度を上昇させるための適応進化の結果生じる代謝の変化を追跡し、その変化を獲得表現型特性と関連付けています。この研究は、適応進化がバイオエンジニアリングにおける改良株の合理的デザインに代わる価値ある方法であり、生物燃料および化学物質の生産用に微生物株を改良するための予期せぬ代謝工学の標的となり得るような変異を、進化した株から同定することが可能であることを示しています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{ix}による38bpペアエンドリード解析

Berry, D. B., Guan Q., Hose J., Haroon S., Gebbia M., et al. (2011) Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS Genet* 7: e1002353

Libkind, D., Hittinger C. T., Valerio E., Goncalves C., Dover J., et al. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14539-14544

Parts, L., Cubillos F. A., Warringer J., Jain K., Salinas F., et al. (2011) Revealing the genetic structure of a trait by sequencing a population under selection. *Genome Res* 21: 1131-1138

Warringer, J., Zorgo E., Cubillos F. A., Zia A., Gjuvsland A., et al. (2011) Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genet* 7: e1002111

³⁴ Qi, J., Wijeratne, A. J., Tomsho, L. P., Hu, Y., Schuster, S. C., et al. (2009) Characterization of meiotic crossovers and gene conversion by whole-genome sequencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 10: 475

良く研究されている微生物

大腸菌

一部の細菌感染からの単離菌には、同一種内における多様性が観察されています。このマイクロ多様性が、複数の単離菌による感染ではなく感染過程での多様化に起因するものであることを示唆するエビデンスがいくつか得られています。観察される多様性は、実験的進化研究から得られる結果と類似しています。多様性に至る機序がいかなるものであるにせよ、この結果は抗生物質治療に先立ってさらに詳細な単離菌検査を行う必要性を強調するものです。

Grad, Y. H., Lipsitch M., Feldgarden M., Arachchi H. M., Cerqueira G. C., et al. (2012) Genomic epidemiology of the Escherichia coli O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3065-3070

Loman, N. J., Misra R. V., Dallman T. J., Constantinidou C., Gharbia S. E., et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*

Benson, R. W., Norton M. D., Lin I., Du Comb W. S. and Godoy V. G. (2011) An active site aromatic triad in Escherichia coli DNA Pol IV coordinates cell survival and mutagenesis in different DNA damaging agents. *PLoS ONE* 6: e19944

Sahl, J. W., Steinsland H., Redman J. C., Angjuoli S. V., Nataro J. P., et al. (2011) A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic Escherichia coli reveals pathovar-specific conservation. *Infect Immun* 79: 950-960

黄色ブドウ球菌

抗生物質耐性の蔓延は、通常長期間にわたり追跡されます。例えば、時間の経過にともない連続的に採取したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）（ST225）のDNAシーケンスから、ST225は1990年前後（1987年～1994年）から分岐し始め、欧州クレードは新しいクローンが認識される数年前の1995年（1991年～1999年）あたりから拡大し始めたと推定されるに至っています³⁵。

水平遺伝子伝播の可能性もまた、抗生物質耐性の蔓延を複雑化しています。臨床的MRSA株の一部においては、タイプIII様の制限エンドヌクレアーゼ系が欠如しており、そのため大腸菌などの他の種からのDNAの水平伝播に過度の感受性を示します。例えば、水平伝播に感受性を示す黄色ブドウ球菌株は、腸球菌から容易にバンコマイシン耐性遺伝子を獲得します³⁶。

ホストジャンプは、最も劇的な遺伝的適応の一例です。ブロイラー鶏から単離される黄色ブドウ球菌の大半は、約38年前（30年前～63年前の範囲）に発生した、世界的ヒトST5クローン系統のポーランド特有なサブタイプによるヒトから家禽への1回のホストジャンプにより生じた株の子孫です。これは、迅速なトリの宿主適応と大陸間伝播により進化した主要な新動物病原体の歴史を反映するものであり、ヒトの活動が動物病原体の発生および拡散に及ぼす影響に関する研究の新しいパラダイムです³⁷。

³⁵ Nubel, U., Dordel, J., Kurt, K., Strommenger, B., Westh, H., et al. (2010) A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *PLoS Pathog* 6: e1000855

³⁶ Corvaglia, A. R., Francois, P., Hernandez, D., Perron, K., Linder, P., et al. (2010) A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical Staphylococcus aureus strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11954-11958

³⁷ Lowder, B. V., Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Weinert, L. A., Conway-Morris, A., et al. (2009) Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of Staphylococcus aureus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19545-19550

Lama, A., Pane-Farre J., Chon T., Wiersma A. M., Sit C. S., et al. (2012) Response of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Amicoumacin A. PLoS ONE 7: e34037

Peleg, A. Y., Miyakis S., Ward D. V., Earl A. M., Rubio A., et al. (2012) Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 7: e28316

Pozzi, C., Waters E. M., Rudkin J. K., Schaeffer C. R., Lohan A. J., et al. (2012) Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in *Staphylococcus aureus* Device-Associated Infections. PLoS Pathog 8:

Price, L. B., Stegger M., Hasman H., Aziz M., Larsen J., et al. (2012) *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. MBio 3:

Young, B. C., Golubchik T., Batty E. M., Fung R., Lerner-Svensson H., et al. (2012) Evolutionary dynamics of *Staphylococcus aureus* during progression from carriage to disease. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 4550-4555

McAdam, P. R., Holmes A., Templeton K. E. and Fitzgerald J. R. (2011) Adaptive evolution of *Staphylococcus aureus* during chronic endobronchial infection of a cystic fibrosis patient. PLoS ONE 6: e24301

Harris, S. R., Feil E. J., Holden M. T., Quail M. A., Nickerson E. K., et al. (2010) Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. Science 327: 469-474

連鎖球菌

連鎖球菌は、Firmicutes門に属するグラム陽性細菌であり、約200万塩基のゲノムサイズを有しています³⁸。

Thomas, J. C., Figueira M., Fennie K. P., Laufer A. S., Kong Y., et al. (2011) *Streptococcus pneumoniae* clonal complex 199: genetic diversity and tissue-specific virulence. PLoS ONE 6: e18649

Harvey, R. M., Stroehrer U. H., Ogunniyi A. D., Smith-Vaughan H. C., Leach A. J., et al. (2011) A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence. PLoS ONE 6: e19650

Shea, P. R., Beres S. B., Flores A. R., Ewbank A. L., Gonzalez-Lugo J. H., et al. (2011) Distinct signatures of diversifying selection revealed by genome analysis of respiratory tract and invasive bacterial populations. Proc Natl Acad Sci U S A 108: 5039-5044

³⁸ Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., et al. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". Proc Natl Acad Sci U S A 102: 13950-13955

真菌に似たマイコバクテリアは、結核からハンセン病に至る幅広い疾患の原因菌です。3959個の遺伝子を含む400万塩基対のゲノムサイズを有し、次世代シーケンサーにより容易にシーケンスされます。

Gardy, J. L., Johnston J. C., Ho Sui S. J., Cook V. J., Shah L., et al. (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364: 730-739

2006年ブリティッシュコロンビア州における結核菌の集団発生は、複雑な流行病の発生をシーケンスによって解明することが可能であることを示す例です。マイコバクテリア分散型繰り返しユニット反復配列多型 (MIRU-VNTR) 遺伝子型解析および従来の接触者追跡調査の結果により結核菌の流行起源が同定されなかったため、著者らは流行の動態をより高い分解能で解析するために、全ゲノムシーケンスおよびソーシャルネットワーク解析を使用しました。この解析のために著者らは合計36の結核菌株 (37の集団発生分子株のうちの32の株、および同一のMIRU-VNTRパターンを有する過去の4種類の分離株) のシーケンスを行いました。このシーケンスにより、少なくとも1つの50bpリードにより、平均99.21%のレファレンスゲノムがカバーされました。全ゲノムシーケンスにより得られるより高い分解能のSNPパターンにより、この集団発生がそれぞれ異なる結核菌株を原因菌とする2つの集団発生の癒合であることが明らかとされました。2種類の現存する株が同時に再出現していることから、生物における遺伝的変化ではなく社会的または環境的因子が集団発生の引き金となった可能性が示唆されます。流行病の集団発生時にピークに達していた、地域内におけるクラックコカインの使用がこの集団発生の引き金となった可能性があります。

イルミナ技術 : Genome Analyzer_{II}

Ghosh, P., Hsu C., Alyamani E. J., Shehata M. M., Al-Dubaib M. A., et al. (2012) Genome-wide analysis of the emerging infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the Arabian camels (*Camelus dromedarius*). *PLoS ONE* 7: e31947

Koser, C. U., Niemann S., Summers D. K. and Archer J. A. (2012) Overview of errors in the reference sequence and annotation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and variation amongst its isolates. *Infect Genet Evol* 12: 807-810

Checkley, A. M., Wyllie D. H., Scriba T. J., Golubchik T., Hill A. V., et al. (2011) Identification of antigens specific to non-tuberculous mycobacteria: the Mce family of proteins as a target of T cell immune responses. *PLoS ONE* 6: e26434

Comas, I., Borrell S., Roetzer A., Rose G., Malla B., et al. (2011) Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet* 44: 106-110

Ford, C. B., Lin P. L., Chase M. R., Shah R. R., Iartchouk O., et al. (2011) Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet* 43: 482-486

Gardy, J. L., Johnston J. C., Ho Sui S. J., Cook V. J., Shah L., et al. (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364: 730-739

Griffin, J. E., Gawronski J. D., DeJesus M. A., Joerger T. R., Akerley B. J., et al. (2011) High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for *Mycobacterial* Growth and Cholesterol Catabolism. *PLoS Pathog* 7:

Saunders, N. J., Trivedi U. H., Thomson M. L., Doig C., Laurenson I. F., et al. (2011) Deep resequencing of serial sputum isolates of *Mycobacterium tuberculosis* during therapeutic failure due to poor compliance reveals stepwise mutation of key resistance genes on an otherwise stable genetic background. *J Infect* 62: 212-217

サルモネラ菌

サルモネラエンテリカ血清型のシーケンスにより、全ゲノムシーケンスの利点の多くが実証されています^{39,40,41}。サルモネラエンテリカ血清型のシーケンスはまた、血清型およびファージ型など、現在使用されている表現型の特徴がいかに紛らわしいものであるかを示す、一つの訓話ともなっています。突然変異変化に基づくと、ファージ型 DT104は、不均質性で複数の異なるシーケンスタイプが存在しますが、このことは驚くべきことではありません。血清型は、薬剤耐性および病原性の表現型を決定する遺伝子とは極めて異なる選択圧をかけられているゲノムのわずかな部分によりコードされています。病原性または他の特性の代理マーカーとしての血清型の使用は非常に制限されています。DT104の多剤耐性変異体が世界中の多くの地域での伝染病の原因となっていることから、この制限は重大な問題です。シーケンスはゲノムを直接的に観察することであり、これらの型を分類することのできる唯一の確定的な方法です。

Deng, X., Li Z. and Zhang W. (2012) Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiol* 30: 311-315

Okoro, C. K., Kingsley R. A., Quail M. A., Kankwatira A. M., Feasey N. A., et al. (2012) High-resolution single nucleotide polymorphism analysis distinguishes recrudescence and reinfection in recurrent invasive nontyphoidal salmonella typhimurium disease. *Clin Infect Dis* 54: 955-963

Izumiya, H., Sekizuka T., Nakaya H., Taguchi M., Oguchi A., et al. (2011) Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 623-630

Jansen, A. M., Hall L. J., Clare S., Goulding D., Holt K. E., et al. (2011) A *Salmonella* Typhimurium-Typhi Genomic Chimera: A Model to Study Vi Polysaccharide Capsule Function In Vivo. *PLoS Pathog* 7:

Leschner, S., Deyneko I. V., Lienenklaus S., Wolf K., Bloecker H., et al. (2011) Identification of tumor-specific *Salmonella* Typhimurium promoters and their regulatory logic. *Nucleic Acids Res*

³⁹ Holt, K. E., Parkhill, J., Mazzoni, C. J., Roumagnac, P., Weill, F. X., et al. (2008) High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat Genet* 40: 987-993

⁴⁰ Holt, K. E., Thomson, N. R., Wain, J., Langridge, G. C., Hasan, R., et al. (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* 10: 36

⁴¹ Lan, R., Reeves, P. R. and Octavia, S. (2009) Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol* 9: 996-1005

- Araya, C. L., Payen, C., Dunham, M. J. and Fields, S. (2010) Whole-genome sequencing of a laboratory-evolved yeast strain. *BMC Genomics* 11: 88
- Avasthi, T. S., Devi, S. H., Taylor, T. D., Kumar, N., Baddam, R., et al. (2011) Genomes of two chronological isolates (*Helicobacter pylori* 2017 and 2018) of the West African *Helicobacter pylori* strain 908 obtained from a single patient. *J Bacteriol* 193: 3385-3386
- Bachmann, H., Starrenburg, M. J., Molenaar, D., Kleerebezem, M. and van Hylckama Vlieg, J. E. (2012) Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Res* 22: 115-124
- Barrick, J. E. and Lenski, R. E. (2009) Genome-wide mutational diversity in an evolving population of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 74: 119-129
- Benson, R. W., Norton, M. D., Lin, I., Du Comb, W. S. and Godoy, V. G. (2011) An active site aromatic triad in *Escherichia coli* DNA Pol IV coordinates cell survival and mutagenesis in different DNA damaging agents. *PLoS ONE* 6: e19944
- Berry, D. B., Guan, Q., Hose, J., Haroon, S., Gebbia, M., et al. (2011) Multiple means to the same end: the genetic basis of acquired stress resistance in yeast. *PLoS Genet* 7: e1002353
- Blasdell, K. R., Voysey, R., Bulach, D., Joubert, D. A., Tesh, R. B., et al. (2012) Kotonkan and Obodhiang viruses: African ephemeroviruses with large and complex genomes. *Virology* 425: 143-153
- Bradley, A. J., Lurain, N. S., Ghazal, P., Trivedi, U., Cunningham, C., et al. (2009) High-throughput sequence analysis of variants of human cytomegalovirus strains Towne and AD169. *J Gen Virol* 90: 2375-2380
- Casali, N., Nikolayevskyy, V., Balabanova, Y., Ignatyeva, O., Kontsevaya, I., et al. (2012) Microevolution of extensively drug-resistant tuberculosis in Russia. *Genome Res* 22: 735-745
- Charusanti, P., Conrad, T. M., Knight, E. M., Venkataraman, K., Fong, N. L., et al. (2010) Genetic basis of growth adaptation of *Escherichia coli* after deletion of *pgi*, a major metabolic gene. *PLoS Genet* 6: e1001186
- Checkley, A. M., Wyllie, D. H., Scriba, T. J., Golubchik, T., Hill, A. V., et al. (2011) Identification of antigens specific to non-tuberculous mycobacteria: the Mce family of proteins as a target of T cell immune responses. *PLoS ONE* 6: e26434
- Chua, K. Y. L., Seemann, T., Harrison, P. F., Monagle, S., Korman, T. M., et al. (2011) The Dominant Australian Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone ST93-IV [2B] Is Highly Virulent and Genetically Distinct. *PLoS ONE* 6: Coffey, L. L., Beeharry, Y., Borderia, A. V., Blanc, H. and Vignuzzi, M. (2011) Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16038-16043
- Comas, I., Borrell, S., Roetzer, A., Rose, G., Malla, B., et al. (2011) Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. *Nat Genet* 44: 106-110
- Conrad, T. M., Joyce, A. R., Applebee, M. K., Barrett, C. L., Xie, B., et al. (2009) Whole-genome resequencing of *Escherichia coli* K-12 MG1655 undergoing short-term laboratory evolution in lactate minimal media reveals flexible selection of adaptive mutations. *Genome Biol* 10: R118
- Conway, C., Chalkley, R., High, A., Maclennan, K., Berri, S., et al. (2012) Next-generation sequencing for simultaneous determination of human papillomavirus load, subtype, and associated genomic copy number changes in tumors. *J Mol Diagn* 14: 104-111
- Corvaglia, A. R., Francois, P., Hernandez, D., Perron, K., Linder, P., et al. (2010) A type III-like restriction endonuclease functions as a major barrier to horizontal gene transfer in clinical *Staphylococcus aureus* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11954-11958
- Croucher, N. J. (2009) From small reads do mighty genomes grow. *Nat Rev Microbiol* 7: 621
- Deng, X., Li, Z. and Zhang, W. (2012) Transcriptome sequencing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiol* 30: 311-315
- Dunowska, M., Biggs, P. J., Zheng, T. and Perrott, M. R. (2012) Identification of a novel nidovirus associated with a neurological disease of the Australian brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Vet Microbiol* 156: 418-424
- Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A., Li, K., Venter, E., et al. (2010) Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 6: e1000896
- Eckert, S. E., Dziva, F., Chaudhuri, R. R., Langridge, G. C., Turner, D. J., et al. (2011) Retrospective application of transposon-directed insertion site sequencing to a library of signature-tagged mini-Tn5Km2 mutants of *Escherichia coli* O157:H7 screened in cattle. *J Bacteriol* 193: 1771-1776
- Editorial, N. B. (2011) Outbreak genomics. *Nat Biotechnol* 29: 769
- Engelthaler, D. M., Bowers, J., Schupp, J. A., Pearson, T., Ginther, J., et al. (2011) Molecular investigations of a locally acquired case of melioidosis in Southern AZ, USA. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1347
- Fittipaldi, N., Beres, S. B., Olsen, R. J., Kapur, V., Shea, P. R., et al. (2012) Full-Genome Dissection of an Epidemic of Severe Invasive Disease Caused by a Hypervirulent, Recently Emerged Clone of Group A *Streptococcus*. *Am J Pathol*
- Flaherty, P., Natsoulis, G., Muralidharan, O., Winters, M., Buenrostro, J.,

- et al. (2012) Ultrasensitive detection of rare mutations using next-generation targeted resequencing. *Nucleic Acids Res* 40: e2
- Ford, C. B., Lin, P. L., Chase, M. R., Shah, R. R., Iartchouk, O., et al. (2011) Use of whole genome sequencing to estimate the mutation rate of *Mycobacterium tuberculosis* during latent infection. *Nat Genet* 43: 482-486
- Gardy, J. L., Johnston, J. C., Ho Sui, S. J., Cook, V. J., Shah, L., et al. (2011) Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak. *N Engl J Med* 364: 730-739
- Gerstein, A. C. and Otto, S. P. (2011) Cryptic Fitness Advantage: Diploids Invade Haploid Populations Despite Lacking Any Apparent Advantage as Measured by Standard Fitness Assays. *PLoS ONE* 6:
- Ghosh, P., Hsu, C., Alyamani, E. J., Shehata, M. M., Al-Dubaib, M. A., et al. (2012) Genome-wide analysis of the emerging infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in the Arabian camels (*Camelus dromedarius*). *PLoS ONE* 7: e31947
- Gibbons, H. S., Broomall, S. M., McNew, L. A., Daligault, H., Chapman, C., et al. (2011) Genomic signatures of strain selection and enhancement in *Bacillus atrophaeus* var. *globigii*, a historical biowarfare simulant. *PLoS ONE* 6: e17836
- Gonzalez-Escalona, N., Strain, E. A., De Jesus, A. J., Jones, J. L. and Depaola, A. (2011) Genome sequence of the clinical O4:K12 serotype *Vibrio parahaemolyticus* strain 10329. *J Bacteriol* 193: 3405-3406
- Goodman, A. L., Wu, M. and Gordon, J. I. (2011) Identifying microbial fitness determinants by insertion sequencing using genome-wide transposon mutant libraries. *Nat Protoc* 6: 1969-1980
- Grad, Y. H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H. M., Cerqueira, G. C., et al. (2012) Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3065-3070
- Griffin, J. E., Gawronski, J. D., DeJesus, M. A., Iorger, T. R., Akerley, B. J., et al. (2011) High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for *Mycobacterial* Growth and Cholesterol Catabolism. *PLoS Pathog* 7:
- Han, T. X., Xu, X. Y., Zhang, M. J., Peng, X. and Du, L. L. (2010) Global fitness profiling of fission yeast deletion strains by barcode sequencing. *Genome Biol* 11: R60
- Harris, D. R., Pollock, S. V., Wood, E. A., Goiffon, R. J., Klingele, A. J., et al. (2009) Directed evolution of ionizing radiation resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191: 5240-5252
- Harris, S. R., Feil, E. J., Holden, M. T., Quail, M. A., Nickerson, E. K., et al. (2010) Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 327: 469-474
- Harris, S. R., Clarke, I. N., Seth-Smith, H. M., Solomon, A. W., Cutcliffe, L. T., et al. (2012) Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. *Nat Genet* 44: 413-419, S411
- Harvey, R. M., Stroehrer, U. H., Ogunniyi, A. D., Smith-Vaughan, H. C., Leach, A. J., et al. (2011) A variable region within the genome of *Streptococcus pneumoniae* contributes to strain-strain variation in virulence. *PLoS ONE* 6: e19650
- Hendriksen, R. S., Price, L. B., Schupp, J. M., Gillette, J. D., Kaas, R. S., et al. (2011) Population Genetics of *Vibrio cholerae* from Nepal in 2010: Evidence on the Origin of the Haitian Outbreak. *MBio* 2:
- Hietpas, R. T., Jensen, J. D. and Bolon, D. N. (2011) From the Cover: Experimental illumination of a fitness landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 7896-7901
- Holt, K. E., Parkhill, J., Mazzoni, C. J., Roumagnac, P., Weill, F. X., et al. (2008) High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. *Nat Genet* 40: 987-993
- Holt, K. E., Thomson, N. R., Wain, J., Langridge, G. C., Hasan, R., et al. (2009) Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. *BMC Genomics* 10: 36
- Hong, K. K., Vongsangnak, W., Vemuri, G. N. and Nielsen, J. (2011) Unravelling evolutionary strategies of yeast for improving galactose utilization through integrated systems level analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12179-12184
- Howden, B. P., McEvoy, C. R. E., Allen, D. L., Chua, K., Gao, W., et al. (2011) Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalkR. *PLoS Pathog* 7: e1002359
- Izumiya, H., Sekizuka, T., Nakaya, H., Taguchi, M., Oguchi, A., et al. (2011) Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 623-630
- Jansen, A. M., Hall, L. J., Clare, S., Goulding, D., Holt, K. E., et al. (2011) A *Salmonella* Typhimurium-Typhi Genomic Chimera: A Model to Study Vi Polysaccharide Capsule Function In Vivo. *PLoS Pathog* 7:
- Jiang, Z., Jhunjhunwala, S., Liu, J., Haverty, P. M., Kennemer, M. I., et al. (2012) The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients. *Genome Res* 22: 593-601
- Johnson, J. R., Clabots, C. and Kuskowski, M. A. (2008) Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *J Clin Microbiol* 46: 4078-4082
- Joseph, S. J. and Read, T. D. (2012) Genome-wide recombination in *Chlamydia trachomatis*. *Nat Genet* 44: 364-366
- Kashiwagi, A. and Yomo, T. (2011) Ongoing phenotypic and genomic changes in experimental coevolution of RNA bacteriophage Qbeta and *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 7: e1002188
- Koser, C. U., Niemann, S., Summers, D. K. and Archer, J. A. (2012) Overview of errors in the reference se-

- quence and annotation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and variation amongst its isolates. *Infect Genet Evol* 12: 807-810
- Kriesel, J. D., Hobbs, M. R., Jones, B. B., Milash, B., Nagra, R. M., et al. (2012) Deep sequencing for the detection of virus-like sequences in the brains of patients with multiple sclerosis: detection of GBV-C in human brain. *PLoS ONE* 7: e31886
- Kvitek, D. J. and Sherlock, G. (2011) Reciprocal sign epistasis between frequently experimentally evolved adaptive mutations causes a rugged fitness landscape. *PLoS Genet* 7: e1002056
- Laing, C., Villegas, A., Taboada, E. N., Kropinski, A., Thomas, J. E., et al. (2011) Identification of *Salmonella enterica* species- and subgroup-specific genomic regions using Panseq 2.0. *Infect Genet Evol* 11: 2151-2161
- Laing, C. R., Zhang, Y., Thomas, J. E. and Gannon, V. P. (2011) Everything at once: comparative analysis of the genomes of bacterial pathogens. *Vet Microbiol* 153: 13-26
- Lama, A., Pane-Farre, J., Chon, T., Wiersma, A. M., Sit, C. S., et al. (2012) Response of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Amicoumacin A. *PLoS ONE* 7: e34037
- Lan, R., Reeves, P. R. and Octavia, S. (2009) Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol* 9: 996-1005
- Lee, C. Y., Kam, Y. W., Fric, J., Malleret, B., Koh, E. G. L., et al. (2011) Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. *PLoS Pathog* 7:
- Lee, D. H., Feist, A. M., Barrett, C. L. and Palsson, B. O. (2011) Cumulative number of cell divisions as a meaningful timescale for adaptive laboratory evolution of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 6: e26172
- Lenski, R. E. (2011) Chance and necessity in the evolution of a bacterial pathogen. *Nat Genet* 43: 1174-1176
- Leschner, S., Deyneko, I. V., Lienenklaus, S., Wolf, K., Bloecker, H., et al. (2011) Identification of tumor-specific *Salmonella Typhimurium* promoters and their regulatory logic. *Nucleic Acids Res*
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valerio, E., Goncalves, C., Dover, J., et al. (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14539-14544
- Lieberman, T. D., Michel, J. B., Aingaran, M., Potter-Bynoe, G., Roux, D., et al. (2011) Parallel bacterial evolution within multiple patients identifies candidate pathogenicity genes. *Nat Genet* 43: 1275-1280
- Loman, N. J., Misra, R. V., Dallman, T. J., Constantinidou, C., Gharbia, S. E., et al. (2012) Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol*
- Lowder, B. V., Guinane, C. M., Ben Zakour, N. L., Weinert, L. A., Conway-Morris, A., et al. (2009) Recent human-to-poultry host jump, adaptation, and pandemic spread of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19545-19550
- Ma, X., Rogacheva, Maria V., Nishant, K. T., Zanders, S., Bustamante, Carlos D., et al. (2012) Mutation Hot Spots in Yeast Caused by Long-Range Clustering of Homopolymeric Sequences. *Cell Reports* 1: 36-42
- Maiden, M. C. (1998) Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1: S12-20
- McAdam, P. R., Holmes, A., Templeton, K. E. and Fitzgerald, J. R. (2011) Adaptive evolution of *Staphylococcus aureus* during chronic endobronchial infection of a cystic fibrosis patient. *PLoS ONE* 6: e24301
- Minty, J. J., Lesnefsky, A. A., Lin, F., Chen, Y., Zaroff, T. A., et al. (2011) Evolution combined with genomic study elucidates genetic bases of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 10: 18
- Moses, A. M. and Davidson, A. R. (2011) In vitro evolution goes deep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 8071-8072
- Murray, C. L., Oh, T. S. and Rice, C. M. (2011) Keeping Track of Viruses. *Microbial Forensics (Second Edition)* 137-153
- Mutreja, A., Kim, D. W., Thomson, N. R., Connor, T. R., Lee, J. H., et al. (2011) Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature* 477: 462-465
- Nair, D., Memmi, G., Hernandez, D., Bard, J., Beaume, M., et al. (2011) Whole-Genome Sequencing of *Staphylococcus aureus* Strain RN4220, a Key Laboratory Strain Used in Virulence Research, Identifies Mutations That Affect Not Only Virulence Factors but Also the Fitness of the Strain. *J Bacteriol* 193: 2332-2335
- Neverov, A. and Chumakov, K. (2010) Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20063-20068
- Nishijima, N., Marusawa, H., Ueda, Y., Takahashi, K., Nasu, A., et al. (2012) Dynamics of Hepatitis B Virus Quasi-species in Association with Nucleos(t)ide Analogue Treatment Determined by Ultra-Deep Sequencing. *PLoS ONE* 7: e35052
- Nubel, U., Dordel, J., Kurt, K., Strommenger, B., Westh, H., et al. (2010) A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 6: e1000855
- Okoro, C. K., Kingsley, R. A., Quail, M. A., Kankwatira, A. M., Feasey, N. A., et al. (2012) High-resolution single nucleotide polymorphism analysis distinguishes recrudescence and reinfection in recurrent invasive nontyphoidal salmonella typhimurium disease. *Clin Infect Dis* 54: 955-963
- Omer, H., Rose, G., Jolley, K. A., Frapy, E., Zahar, J. R., et al. (2011) Genotypic and phenotypic modifications of *Neisseria meningitidis* after an accidental human passage. *PLoS ONE* 6: e17145
- Parts, L., Cubillos, F. A., Warringer, J., Jain, K., Salinas, F., et al. (2011) Revealing the genetic structure of a trait by sequencing a population under selection. *Genome Res* 21: 1131-1138

- Peleg, A. Y., Miyakis, S., Ward, D. V., Earl, A. M., Rubio, A., et al. (2012) Whole genome characterization of the mechanisms of daptomycin resistance in clinical and laboratory derived isolates of *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7: e28316
- Pozzi, C., Waters, E. M., Rudkin, J. K., Schaeffer, C. R., Lohan, A. J., et al. (2012) Methicillin Resistance Alters the Biofilm Phenotype and Attenuates Virulence in *Staphylococcus aureus* Device-Associated Infections. *PLoS Pathog* 8: Price, L. B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., et al. (2012) *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. *MBio* 3: Qi, J., Wijeratne, A. J., Tomsho, L. P., Hu, Y., Schuster, S. C., et al. (2009) Characterization of meiotic crossovers and gene conversion by whole-genome sequencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 10: 475
- Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Fuerstenberg, S. I., Tae, H., Settlege, R. E., et al. (2012) Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nat Commun* 3: 686
- Rajendhran, J. and Gunasekaran, P. (2011) Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol Res* 166: 99-110
- Reeves, P. R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., et al. (2011) Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS ONE* 6: e26907
- Sahl, J. W., Steinsland, H., Redman, J. C., Angiuoli, S. V., Nataro, J. P., et al. (2011) A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals pathovar-specific conservation. *Infect Immun* 79: 950-960
- Saunders, N. J., Trivedi, U. H., Thomson, M. L., Doig, C., Laurenson, I. F., et al. (2011) Deep resequencing of serial sputum isolates of *Mycobacterium tuberculosis* during therapeutic failure due to poor compliance reveals step-wise mutation of key resistance genes on an otherwise stable genetic background. *J Infect* 62: 212-217
- Shea, P. R., Beres, S. B., Flores, A. R., Ewbank, A. L., Gonzalez-Lugo, J. H., et al. (2011) Distinct signatures of diversifying selection revealed by genome analysis of respiratory tract and invasive bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 5039-5044
- Summers, Z. M., Ueki, T., Ismail, W., Haveman, S. A. and Lovley, D. R. (2011) Laboratory evolution of *Geobacter sulfurreducens* for enhanced growth on lactate via a single-base-pair substitution in a transcriptional regulator. *ISME J*
- Szpara, M. L., Tafuri, Y. R., Parsons, L., Shamim, S. R., Verstrepen, K. J., et al. (2011) A wide extent of inter-strain diversity in virulent and vaccine strains of alphaherpesviruses. *PLoS Pathog* 7: e1002282
- Tapparel, C., Cordey, S., Junier, T., Farinelli, L., Van Belle, S., et al. (2011) Rhinovirus genome variation during chronic upper and lower respiratory tract infections. *PLoS ONE* 6: e21163
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., et al. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome". *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13950-13955
- Thomas, J. C., Figueira, M., Fennie, K. P., Laufer, A. S., Kong, Y., et al. (2011) *Streptococcus pneumoniae* clonal complex 199: genetic diversity and tissue-specific virulence. *PLoS ONE* 6: e18649
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J. B., Chait, R., Hartl, D. L., et al. (2011) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet* 44: 101-105
- Tremblay, P. L., Summers, Z. M., Glaven, R. H., Nevin, K. P., Zengler, K., et al. (2011) A c-type cytochrome and a transcriptional regulator responsible for enhanced extracellular electron transfer in *Geobacter sulfurreducens* revealed by adaptive evolution. *Environ Microbiol* 13: 13-23
- Wang, D., Wang, H., Zhou, Y., Zhang, Q., Zhang, F., et al. (2011) Genome sequencing reveals unique mutations in characteristic metabolic pathways and the transfer of virulence genes between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *PLoS ONE* 6: e21299
- Warringer, J., Zorgo, E., Cubillos, F. A., Zia, A., Gjuvsland, A., et al. (2011) Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genet* 7: e1002111
- Young, B. C., Golubchik, T., Batty, E. M., Fung, R., Lerner-Svensson, H., et al. (2012) Evolutionary dynamics of *Staphylococcus aureus* during progression from carriage to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 4550-4555
- Yozwiak, N. L., Skewes-Cox, P., Stenglein, M. D., Balmaseda, A., Harris, E., et al. (2012) Virus identification in unknown tropical febrile illness cases using deep sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1485

イルミナ株式会社

www.illumina.co.jp

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2013 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, illumina*Dx*, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPRO, DASL, DesignStudio, Eco, G*AI*lx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は Illumina, Inc の商標または登録商標です。その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。予告なしに仕様を変更する場合があります。

Pub. No. publication_microbiology-j 24JUN2013

illumina[®]