

日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

逆転写酵素の強いtailing活性と活性増強物質、および解析ソフトTraceViewer

大坪 嘉行（東北大学・大学院生命科学研究科）

DNAの加工技術はバイオテクノロジーの基礎である。これまで平滑二本鎖DNA末端に対して、突出3'端を形成させるtailing反応にTaq polymeraseなどが用いられてきたが、実用となるのは1つのAの付加に限られてきた。我々は、各社より発売されている汎用の逆転写酵素が、 Mn^{2+} の存在下でA、C、G、Tのいずれも付加可能な強いtailing活性を有していることを見出した(Ohtsubo et al. Scientific Reports 2017)。さらにはC、G、Tの付加反応について、付加しようとする塩基とワトソンクリック対合可能な塩基を含む化合物が付加反応を促進することを見出した。これにより4塩基程度のG、3塩基程度のCあるいはTをtailingさせることができるようになった(Ohtsubo et al. Scientific Reports in press)。この技術から、様々なテクニックがスピノフすることが期待される。これら技術については特許を出願するとともに、連携企業を探しているところである(特願2016-212620)。また本研究を遂行するに当たって、ソフトウェア「TraceViewer」を作成した。TraceViewerは、従来変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(変性PAGE)で実施していたような手間のかかる実験を、使用が簡便なABIキャピラリーシーケンサーを用いて実施して、得られたデータを解析するためのソフトウェアである。あらかじめサンプルと混ぜておいたサイズスタンダードラダーを利用して、ソフトウェア上で泳動度の差異をキャリブレーションする仕様であり、フットプリンティング等の変性PAGEによる解析を、より簡便なキャピラリーシーケンサーによる解析への移行を可能にするソフトウェアである。TraceViewerについてはMac版が「GenomeMatcherホームページ」よりダウンロードできるほか、インシリコバイオロジー社よりMac/Windowsで動作する第1バージョンが6月中にもリリースされる予定である。



モロニー白血病ウイルス由来の逆転写酵素によるG-tailingとTraceViewerによる解析

(A) 解析に用いた二本鎖DNA。FAMラベルされたストランドの3'端(赤丸)がtailing標的。(B-1) 反応前、(B-2)反応2分後、(B-3) 促進化合物(デオキシチジン)存在下で反応2分後、のサンプルを市販のLIZ 500サイズスタンダード(橙)と混ぜて変性条件でABIシーケンサーで解析し、得られたdataをTraceViewerにて解析した。泳動のキャリブレーションに用いたシグナルを矢印で示した。ピークは選択/編集でき、面積を出力できる。また選択したピークの見かけ上の面積が同じになるように表示倍率を自動変更する機能、パネルのマージ機能、編集可能なベクターグラフィックス出力機能など「痒いところに手が届く」ようになっている。なお同じ長さでも塩基配列組成によって泳動速度が異なるため、サイズスタンダードからは必ずしも正確なサイズを算出できないので注意が必要である。

第11回年会を振り返って

板谷 光泰

慶応大学大学

日本ゲノム微生物学会第11回年会を、2017年3月2日（木）～4日（土）の3日間、慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス（神奈川県藤沢市）にて開催しました。事前登録者（262名）、当日参加者（133名）合わせて395名という参加者を得て、盛況のうちに終えることが出来ました。



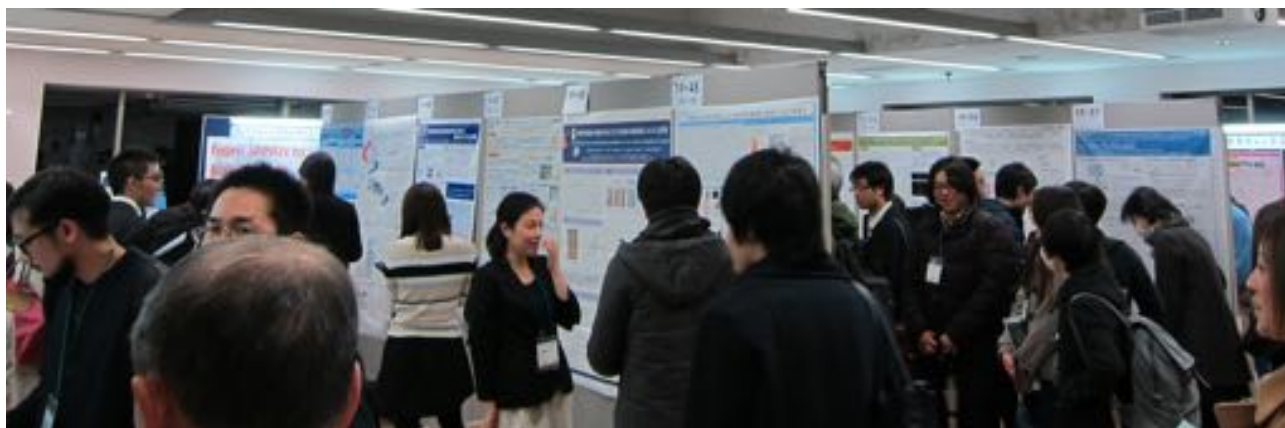
年会も昨年で10年一区切りの節目を終え、新たな10年に踏み込む最初の会になるこの第11回年会では、今後の10年を見据えた私なりのビジョンを擦り込んでみたいと考えました。ゲノム全塩基配列が判明していることを前提とした今後の微生物研究の取り組みを、年会長企画として2つのシンポジウム「微生物での合成生物学」、「微生物および代謝のフロンティア研究」をそれぞれ関連するランチョンセミナーと一体化させ開催していただきました。どちらも多数の参加をいただきありがとうございました。一般演題、ポスター企画は昨年度の項目、運営を基本的に継承しました。一般講演はメイン会場（θ館）で行われるのですべて

を聴くことができるのもこの学会の良い点です。今回は一般演題の申し込み数が想定数とピッタリ一致して、講演時間は十分確保されたことを特記しておきます。ポスターは3日間貼りっぱなしが理想なのですが、広い会場が確保できなかったことから今回は前半、後半に分けそれぞれショートトークを設定する方式に落ち着きました。ポスター賞選考にも工夫が必要になり、有料登録参加者全員に投票用紙を配布し、ご自分が所属する研究室の関係者への投票はご遠慮くださいとの条件で判断、投票いただきました。結果は組織委員会で承認されHPにも掲載されています。

学部学生（高校生も）の参加費無料は残しました。会計的にはつらいところですが、高校生の参加までも実現できたことから、ゲノム微生物学分野での将来の活躍、並びに学会を牽引する新しい若い力が育つことを期待したいと思います。

また男女共同参画幹事からの要請で、昨年同様学会からの補助で託児所を設置しました。利用は1件のみでしたが、今後も重要な企画だと考えています。

組織委員は年会長の指名で9名の方をお願いしました。全員快諾していただきご尽力のおかげで事前、および当日の運営を滞りなく行うことができました。天気も雨模様の初日以外は快晴で、会場の慶應大学湘南藤沢キャンパスには初めて訪れる方が大変多かったようで、静か、広い、きれい、などの好印象を持っていただき、主催者冥利につきました。休憩時間が全体として少なく、スケジュールが多少きつかったかもしれませんが、私だけの杞憂に終わっているとよいのですが。最後に、運営をアシストしていただいた、アルバイト学生、BI研究会秘書、大学キャンパス管財部の方々にこの場を借りて御礼申し上げます。



ゲノム微生物学分野の研究動向

「メタ16S解析」から 「機能メタゲノミクス」へ

生理・代謝機能ポテンシャル評価システム：

MAPLE

高見 英人

海洋研究開発機構・海底資源研究開発センター

はじめに

4月19日東大の山上会館でゲノムテクノロジー第164委員会の第54回研究会が開催された。シーケンシングやシングルセルゲノム増幅などの最先端技術が複数の企業から紹介され、その技術革新の早さに驚嘆させられた。実際、long-readの配列決定技術の飛躍的向上により、筆者がゲノム解析研究を始めた1997年当時、数億円を要した4Mサイズのバクテリアのゲノム解読が、わずか20年の間に、専門業者に委託すれば30万円程度で解読できるまでになった。これら次世代シーケンシング技術(NGS)の登場により、個別生物種のゲノム解読のみならず、様々な環境に生息する微生物叢のゲノムをまるごと解析するメタゲノム解析も盛んに行われ、安価に莫大な量の配列データが得られるようになった。これにより、微生物やゲノム研究を題材としたjournalはもちろんのこと、総合科学誌でも“メタゲノム”という言葉を日々当たり前のように目にするようになった。

メタゲノム解析の主たる目的の一つは、微生物叢を構成する“だれが”、“どのぐらいの割合で存在し”、“どんな機能を”、“どのぐらいもっているか”を知ることにあるが、実際には、主に16S rRNA遺伝子のPCR産物に基づく菌叢解析や特定の機能に關与する一部の鍵遺伝子の多様性解析が行われてきたにすぎない。これは、メタゲノム配列から詳細な生理・代謝機能を簡便に調べる術がなく、微生物叢が有する網羅的機能ポテンシャル

解析が困難だったからである。しかし、ゲノム中の16S rRNA遺伝子のコピー数は生物種によって大きく異なることや、PCRに用いるプライマー設計にも限界があるため、未培養菌を多く含む菌叢の実態をどこまで正確に捉えているかは、はなはだ疑問である。そこで、筆者らは、これらの問題を解決すべく、KEGGに登録された機能モジュールを用いた生理・代謝機能評価法を考案し¹⁾、webインターフェースを介して解析可能な Metabolic And Physiological Potential Evaluator (MAPLE) システムを開発した。京大・バイオインフォマティクスセンターの協力を得て2013年12月にMAPLE-1.0.0をゲノムネット (<http://www.genome.jp/tools/maple>) から公開した²⁾。その後改良を加えたMAPLE-2.1.0を公開し^{3, 4)}、本年1月には解析を高速化したMAPLE-2.3.0を公開した。本稿ではMAPLEの概念について紹介する。

MAPLEシステムでわかること

KEGGデータベースには、代謝パスウェイから各反応単位(解糖系、TCAサイクル、硝化など)で切り出された小さなパスウェイとして定義された730種 (pathway: 255種、structural complex: 285種、functional set: 150種、signature: 40種)の機能モジュールが登録されている (平成28年11月1日現在)。KEGGデータベースを用いたMAPLEシステムによって得られる情報は、主に以下の4項目で、これらの情報を環境間、生物種間で比較することで、微生物叢や生物種間の機能ポテンシャルの特徴を見出すことができる。

1. KEGGに登録された機能モジュールに基づく生理・代謝機能の有無
2. 生理・代謝機能を有する場合の機能アバundance
3. 機能を担う生物種の割合
4. リボソームタンパクに基づく微生物叢(メタゲノム)を構成する生物種の割合

モジュール機能の充足率 (MCR)

MAPLEシステムでは、まず、メタゲノム配列から予測された遺伝子領域のアミノ酸配列をクエリーとして、

(1) データの投入

Job title (optional)

Description (optional)

Query ?

Annotation method

KEGG GENES

KEGG MODULE

Organism list

E-mail (optional)

submit

データのフォーマット (multi-FASTA ファイル)

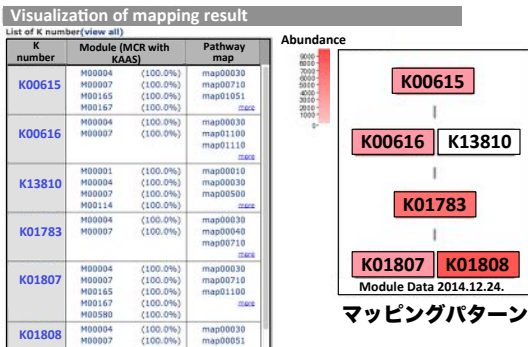
>TEST_PEP_1105131774695
MVVYAPASSANMSVGFVLAATVPDVGALLGDVVTEAAETFSNNLGRFADKLPSEPR
ENIVQCWERFCQELGKQIPVAMTLEKNMPIGSGSACSVAALMAMNEHCGLPNDT
RLALMGELEGRISGSIHYDNVAPCFLLGGMQLMIEENDIISQVPGFDEWLWVLAYPEGIKVS
TAEARILPAQYRRQDCIAHGRHLAGFIHACYRSRQPELAALKMDVIAEYPRERLLPGFRQAR
QVAEIGAVASGISGSGPTLFALCDKPEAQRVADWLGNVQNGQEGFVHCRLDTAG

>TEST_PEP_1105151036387
MKLYNLKDHNEQVSAQAVTQGLGKNQGLFFPHDLPEFSLTEIDEMKLDVTRSAKLSAF
IGDEIPQILEERVRAAFAPAPVANVESDVGCLEFHFPTLAFKDFGGRFMAQMLTHIAGD
KPVILTATSGDGTAAVAHAFYGLPNVKVILYPRGKISPLQEKLFCTLGGNIETVAIDGDFD
ACQALVKQAFDDEELKVALGNSANSINISRLAQICYFEEVAQPLQETRNQLVSVSPGN
FGDLTAGLLAKSLGLPVKRFAATNVNDVPRFLHDGQWSPKATQATLSNAMDVSPNN
WPRVEELFRKIWQLKELGYAADDDETTQTMRELKELGYTSEPHAAVAYRALRDLQNLPG
EYGLFLGTAHPAKFKESVEAILGETLDLPKELAEARADLPSSHNLPAADFAALRLKMMNHQ

(2) KAASによるクエリー配列へのKO (KEGG Orthology) IDの割り振り

遺伝子 ID	K番号	種コード	門レベルの分類	スコア
TEST_PEP_1105131774695	K_NA	ali	Alphaproteobacteria	197
TEST_PEP_1105151036387	K03782	rsi	Bacteroidetes	358
TEST_PEP_1105163266563	K_NA	cgl	Actinobacteria	98.6
TEST_PEP_1105114439847	K00355	pub	Alphaproteobacteria	124
TEST_PEP_1105079638195	K_NA	eca	Gammaproteobacteria	69.7
TEST_PEP_1105129253479	K01924	aeH	Gammaproteobacteria	279
TEST_PEP_1105105095943	K01951	caq	Alphaproteobacteria	92.8
TEST_PEP_1105079102577	K06941	hoh	Deltaproteobacteria	241

(3) クエリー配列のモジュールへのマッピング



(4)-1 モジュールの充足率 (MCR) の計算

(4)-2 KOアブundanceに基づくモジュールアブDundansの計算

(4)-3 Q値の計算

MAPLEによる計算結果

ID	Type	Name	Components #	No. of ITR	MCR % (ITR)	MCR % (WC)	Q-value (ITR)	Q-value (WC)	Module Abundance (ITR)	Module Abundance (WC)
Energy metabolism										
Carbon fixation										
M00165	Pathway	RPP (Calvin) cycle	11	1	100.0	100.0	0.000	0.000	0.006	0.035
M00166	Pathway	Calvin cycle ribulose-5P >	4	3	100.0	100.0	0.000	0.000	0.013	0.035
M00167	Pathway	Calvin cycle glyceraldehyde-5P=>	7	2	100.0	100.0	0.000	0.000	0.006	0.172

図1. MAPLEでの解析の流れ

MAPLEによる解析では、アミノ酸に変換されたmulti-FASTAファイルをクエリー配列として選択し、ジョブリクエスト画面から投入する (ステップ1)。ファイルサイズは、現在160 M byte (100万配列) までとなっている。ファイルを投入するとホモロジー検索の後、KAASによるクエリー配列へのK番号の割り振りが行われる (ステップ2)。K_NAは、オーソログではあるが、K番号が割り振られなかった配列。次に、K番号が割り振られたクエリー配列が各KEGGモジュールにマッピングされる (ステップ3)。その後、モジュールの充足率 (MCR)、KOのアブDundansに基づく各モジュールアブDundans、MCRの信頼性を評価するQ値の計算を順次行い、それらの結果を表示する (ステップ4)。ITR (個別の生物分類カテゴリー)、WC (複数の生物分類からなるコミュニティ)

KEGGゲノムデータベースに登録された完成ゲノム配列(1種1ゲノム)に対しホモロジー検索を行う。ホモロジー検索の検索エンジンは、BLASTとGHOSTX⁵⁾(<http://www.bi.cs.titech.ac.jp/ghostx/>)が選択できるが、公開版MAPLEでは、GHOSTXの方が、約2倍計算時間が短縮できる。現公開版では、一度に100万配列を供試することができ、GHOSTXを選択すれば約45時間で終了する。その一方で、両者のホモロジーサーチの結果には若干の違いがあるので、異なる検索エンジンの結果を単純に比較することはできない。次に、有意に既知遺伝子にヒットした配列にKAAS⁶⁾を用いてKEGG Orthology (KO) ID (K番号)を割り振り、K番号が割り振られたクエリー配列をKEGG機能モジュールにマッピングすることで各モジュールの充足率(MCR)を計算する(図1)。KEGG代謝マップから各反応単位で切り出された小さなパスウェイであるKEGG機能モジュールの

一例として、図2に10ステップの反応からなる解糖系を示した。各ステップの反応を触媒する酵素は、生物種によって異なるオーソロググループに分類されるため、類似の機能を持つこれらの酵素(アイソザイム)には個別のK番号が割り振られている(図2)。したがって、各反応ステップで並列に示された酵素に対応するK番号にクエリー配列がマッピングされれば反応ポテンシャルありとなり、全反応ステップで同様にマッピングされれば解糖系機能ありと結論付けられる。つまり、10ステップからなる解糖系の全ステップにクエリー配列がマッピングされればMCRは100%、5ステップのみであれば50%ということになる。

MCRはモジュール機能を評価する分かりやすい指標で、一般にMCR値の高さとモジュール機能を有する可能性は相関する。しかし、KEGGモジュールの定義や構造上の問題(例えば、同じK番号のKOが複数のモ

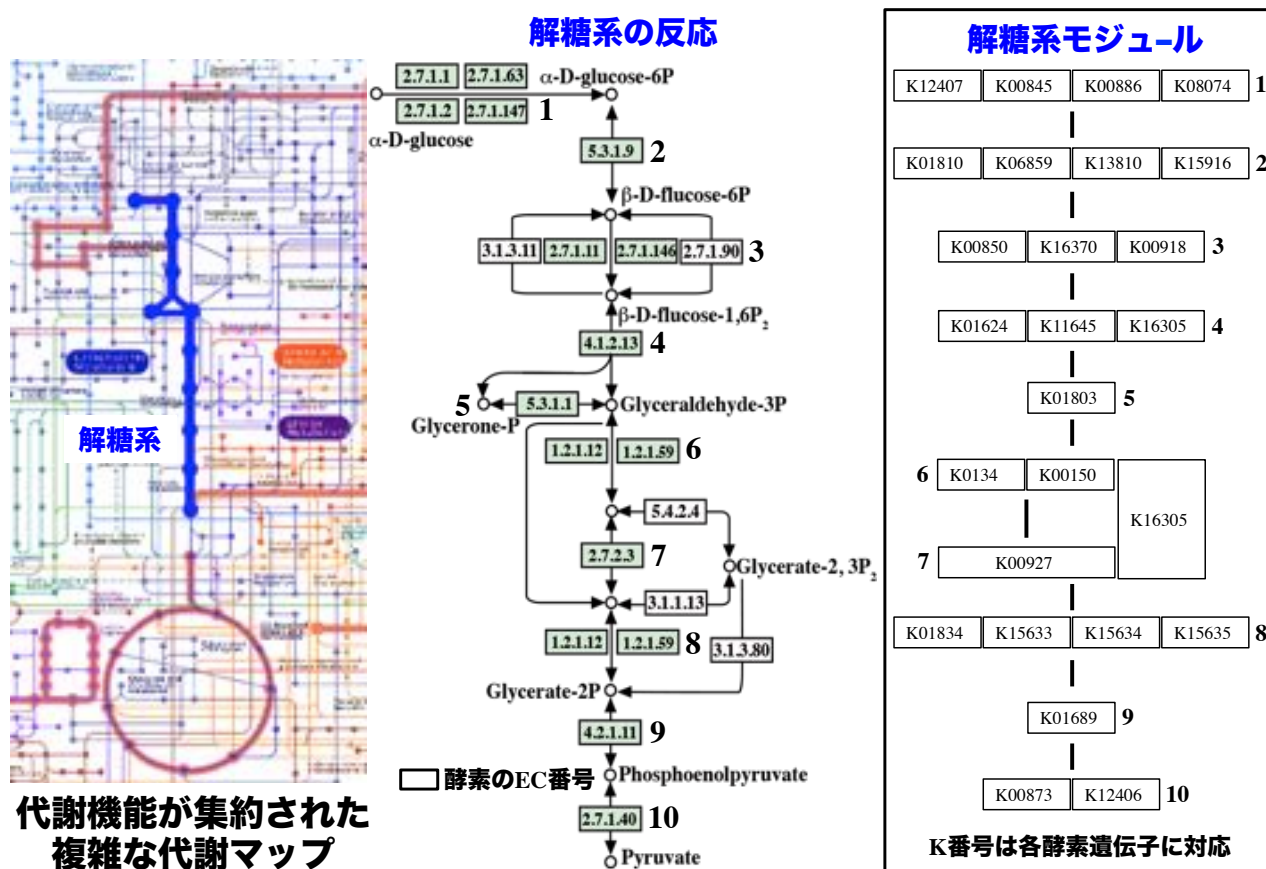


図2. KEGG代謝マップとモジュールの概念図

KEGG代謝マップは、動物、植物、微生物が持つ様々な生理・代謝反応が集約されたもので、モジュールは、代謝マップから反応ごとに切り出された小さな反応経路である。解糖系の反応は中央に示した10ステップからなり、各反応を触媒する酵素が示されている。右は、解糖系のモジュールで、各ステップの反応を触媒する酵素(アイソザイム)に対応する遺伝子のKEGG Orthology (KO) ID (K番号)が示されている。

ジュールで使われている)からMCRが100%に満たない場合の評価が難しい場合がある。MAPLEにはMCRに基づく機能有無の確率を統計的に示唆する Q 値の計算機能があるので、 Q 値を参考にモジュール機能进行评估することができる。図3に、実際にサルガッソー海のメタゲノムから得られた120万遺伝子配列をMAPLEで解析した結果のMCRと Q 値の関係を示した³⁾。 Q 値はモジュールの構造やメタゲノム配列中のKOアバンダンスやマッピングパターンなどにに基づき計算され、一般にMCRが100%の場合、 Q 値は限りなく0に近くなるが、MCRが90%を超えていても Q 値が0.5以上の場合がある。したがって、 Q 値が大きい場合は、モジュール機能を有する確率が低いと判断され、逆にMCRが80%以下でも Q 値が0.5よりも明らかに低く0に近い場合は、モジュール機能を有する可能性が高くなる。このようなモジュール機能については、再度ホモロジー検索や文献情報などを調べマニュアルで詳細に検討することが推奨される。

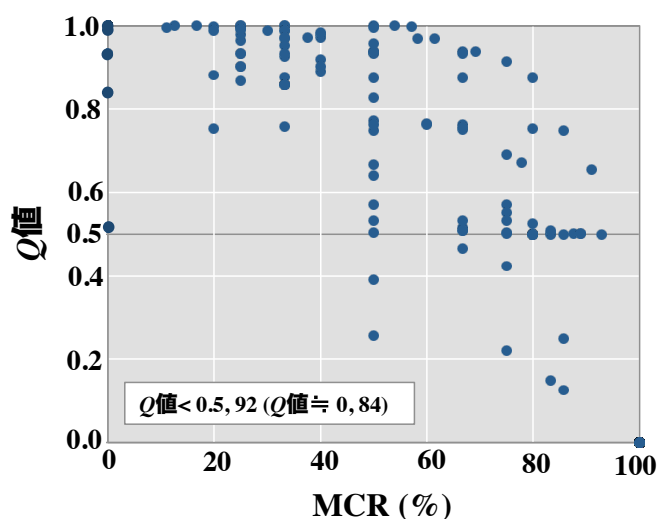


図3. 環境サンプルでのMCRパターンと Q 値の関係

一般にMCRの値の高さとモジュール機能を有する可能性は相関するが、KEGGモジュールの定義や構造上の問題からMCRが100%に満たない場合の評価が難しい場合もある。 Q 値は、MCRの値を統計的に再評価した値で、MCRの値が例えば90%でも Q 値が0.5以上の場合、モジュール機能を有する可能性が低いことを示唆する。□内の数値は0.5未満とほぼ0の Q 値を持つモジュールの数

モジュール機能のアバンダンス

MAPLEには、メタゲノム中に割り振られたKOのアバンダンスに基づきモジュールアバンダンスを計

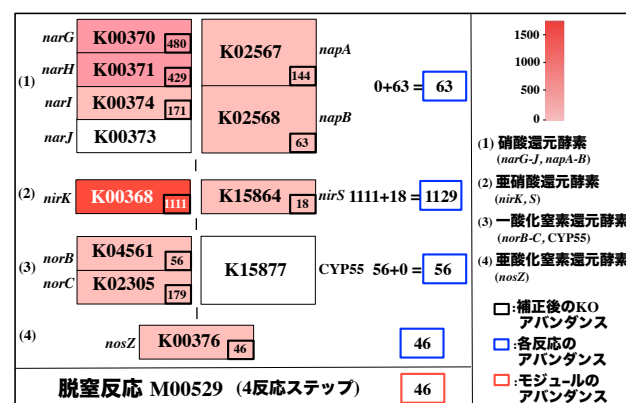


図4. モジュールアバンダンスの概念と計算例

硝酸から分子状窒素までの脱窒反応を担う4ステップからなるモジュール(M00529)。縦方向に並んだK番号は各ステップの反応を担う酵素の複合体、並列に並んだKOは異なるタイプの酵素(アイソザイム)を示している。縦方向に並んだK番号は全てが充足されないと酵素として機能しない。まず、モジュールを構成する各KOのアバンダンスを基に各ステップ単位のアバンダンスを計算する。メタゲノムの場合は、複数のアイソザイムが含まれるため、(2)のように2つのアイソザイムが充足されている場合は、それぞれのアバンダンスを加算したもの(1129)がステップ2のアバンダンスとなる。モジュール全体のアバンダンスは、各ステップの最小値を用いるので、46となる。

算する機能が組み込まれているので、メタゲノム中の潜在的機能ポテンシャルの頑強性の指標として用いることができる。また、個別生物種のゲノム配列を用いた解析では、ABCトランスポーターなど複数のタンパクからなる複合体のコピー数(何セット有しているか)の把握に有効である。モジュール機能のアバンダンスの概念と計算方法については、4ステップの反応からなる脱窒反応のモジュールを例として図4に示した。多くのモジュールは、複数のステップからなり各ステップにKOが割り振られている。モジュールのアバンダンスは各KOのアバンダンスをもとに計算される。しかし、メタゲノムDNAを抽出する際に用いられた細胞数は環境サンプルによって一定ではないため(例えば微生物のゲノムサイズが異なる)、異なる環境間のモジュールアバンダンスを一概に比較することができない。MAPLEはこの点に留意し、各モジュールのアバンダンスをメタゲノムに見出されたりリボソームタンパクの総配列数で除して補正したものをモジュールアバンダンスとして表記している。これは、リボソームを構成するリボソームタンパクの総数が生物種によらず一定であるため、単位リボ

ソームタンパクあたりの相対モジュールアバンダンスとすれば他の環境との比較が可能となるからである。

機能を担う生物種の組成

MAPLEでは、各K番号が割り振られたクエリーの生物種情報はKEGGで定義された第二階層の分類群(主に門(phylum)、分類群が大きいものについてはクラス(class)や目(order)レベル)が用いられており、これら個別の分類群をITR (Individual Taxonomic Rank)として表示している。一般に、反応ステップの多い代謝モジュールについては、必ずしも1つのITRでモジュールが完成せず、部分的な反応ステップしか有していない複数の異なるITRに属する生物群集 (WC: Whole Community) によって完成する場合も少なくない。これらの場合を考慮し、MAPLEでは、モジュールを充足するITR数とITRごとのアバンダンス、WCによるアバンダンスが表示されるので、各ITRのアバンダンスをITRアバンダンスの合計値で除することでモジュール機能を担う生物種の組成を容易に知ることができる。

リボソームタンパクに基づく菌叢の生物種組成

先に述べたように、ゲノム中の16S rRNA遺伝子数は生物種によって大きく異なり、PCRに用いるプライマーの設計にも限界がある。そのため、16S rRNA遺伝子に基づく菌叢解析では、その結果に偏りが生じる場合が多い。一方、リボソームを構成するリボソームタンパクの数は、アクセサリタンパクを除けば生物種によらずバクテリア:52、アーキア:58、真核生物:77と一定で、ごく一部の例外を除けば基本的にゲノム中に1コピーしかない。MAPLEにはリボソームモジュールが登録されているので、リボソームタンパクの由来生物の内訳を調べれば、環境中の生物種組成をより正確に把握することが可能である。また、全生物を網羅した仮想的リボソームモジュールM91000を用いれば、これまで定量PCRなどを用いて見積もられていた環境中のバクテリア、アーキアと真核生物の組成比も簡単に求めることができる(図5)。ただ、アーキアのリボソームタンパクの数はバクテリアより6つ、真核生物の場合15多いので、アーキアと真核生物のリボソームタンパクの配列数にそれぞれ52/58、52/77を乗じて補正する必要がある。種情報が必要な場合

は、'KAAS result'ファイル(図1(2))に記載された3文字表記の種コードを参照すればよい。一方、ゲノムが解読された生物種が少ない分類群については、情報量の少なから必ずしも正しい生物種情報が割り振られない場合もあるので、その際は、MAPLEでアサインされたリボソームタンパクの配列を抜き出し、再度ドラフトゲノム情報も含む遺伝子データベースを対象としたホロジー検索を行うことが推奨される。

メタ16S解析から機能メタゲノミクスへの展望

ゲノミクス、メタゲノミクスの主な目的が単に“だれが”、“何種類”を知ることではなく、生物の生き様、生態系の成り立ちや構築原理を知ることにあるとすれば、ゲノム、メタゲノム配列情報からいかに生理・代謝機能情報をマイニングし、生命の本質に迫れるかが重要な課題である。筆者らは、いち早くこの課題に取り組み、これまで困難であったゲノム・メタゲノム配列から生理・代謝機能ポテンシャルを容易に可視化するMAPLEシステムの開発を続けてきた。2015年度には約9万3千件だった公開版MAPLEへのアクセス数が、2016年度には250万件を超えたが、このことは“メ

Bacteria (M00178)				Archaea (M00179)				Eukaryote (M00177)			
K02946	K02907	K02887	K02887	K02946	K02912	K02869	K02889	K02984	K02969	K02866	K02903
K02906	K02876	K02914	K02914	K02906	K02885	K02864	K02922	K02985	K02871	K02865	K02905
K02926	K02919	K02939	K02939	K02930	K02881	K02863	K02921	K02984	K02973	K02868	K02908
K02882	K02952	K02963	K02963	K02892	K02988	K02867	K02995	K02987	K02974	K02870	K02910
K02886	K02948	K02990	K02990	K02886	K02907	K02967	K02966	K02989	K02975	K02873	K02912
K02965	K02986	K02888	K02888	K02995	K02876	K02956	K02927	K02991	K02976	K02872	K02815
K02890	K02879	K02899	K02899	K02890	K02952	K02978	K02944	K02993	K02978	K02875	K02918
K02882	K02871	K02902	K02902	K02882	K02948	K02929	K02976	K02995	K02977	K02877	K02917
K02878	K02996	K02913	K02913	K02904	K02986	K02877	K02975	K02997	K02979	K02880	K02920
K02904	K02992	K02911	K02911	K02961	K02883	K02984	K02983	K02947	K02980	K02883	K02922
K02961	K02950	K02909	K02909	K02874	K02871	K02991	K02873	K02949	K02983	K02882	K02921
K02874	K02950	K02897	K02897	K02895	K02996	K02974	K02917	K02951	K02998	K02885	K02923
K02895	K02935	K02959	K02959	K02987	K02992	K02977	K02928	K02953	K02925	K02889	K02924
K02931	K02846	K02984	K02984	K02931	K02950	K02962	K02915	K02955	K02930	K02891	K02927
K02954	K02863	K02968	K02968	K02954	K02936	K02910	K02875	K02958	K02932	K02894	K02928
K02994	K02867	K02945	K02945	K02994	K02979	K02924	K02908	K02957	K02934	K02893	K02929
K02933	K02967	K02970	K02970	K02933	K02896	K02866	58 KOs	K02960	K02937	K02896	K02941
K02881	K02956			K02933	K02896	K02866	58 KOs	K02862	K02936	K02898	K02942
K02988	K02916							K02964	K02938	K02901	K02943
								K02966	K02940	K02900	77 KOs

☒ アーキアと真核生物に共通な26のKO
☒ バクテリアとアーキアに共通な31のKO
☐ 必ずしも必要でないアクセサリ-KO

(M91000): 130 KOs

図5. 仮想的リボソームモジュールM91000

MAPLEのstructural complexモジュールの中にはバクテリア、アーキア、真核生物の各リボソームモジュールが含まれている。しかし、バクテリアとアーキアのモジュールには31、アーキアと真核生物には26のリボソームタンパクが共通に用いられている。これらの共通なリボソームタンパク(同じK番号を持つKO)はどちらのモジュールにもマッピングされるので、それぞれのモジュールで二重にカウントされてしまう。したがって、3つの個別モジュールからメタゲノム中の生物種(バクテリア、アーキア、真核生物)組成を算出する際は、生物種の情報をもとに片方のモジュールから共通項を除く必要があり、計算が煩雑になる。そこで、MAPLEではこれらの重複を考慮した130のKOからなる仮想的な全生物リボソームモジュール(M91000)を作成し、生物種組成算出の手間を省いた。

タ16S解析”ではなく“機能メタゲノミクス“に対する期待感が高まったことを示すものと考えられる。MAPLEを用いた機能メタゲノミクスはまだ途に就いたばかりであるが、微生物を対象とした研究であれば、分野を問わず広く応用が可能である。実際、筆者らの研究チームでは、海洋や湖沼などの水圏のみならず、農耕地や森林土壌、ヒト腸内やリアクターの微生物叢を対象とした機能メタゲノミクス研究を進めている。今後の機能メタゲノミクス研究の発展には、高速で安定した計算リソースの提供が重要となるが、筆者の現在の所属機関からもMAPLEが利用できるよう準備を進めている。MAPLEの詳細な利用方法、結果の解釈については、書面の都合上文献3,4を参照されたい。

参考文献

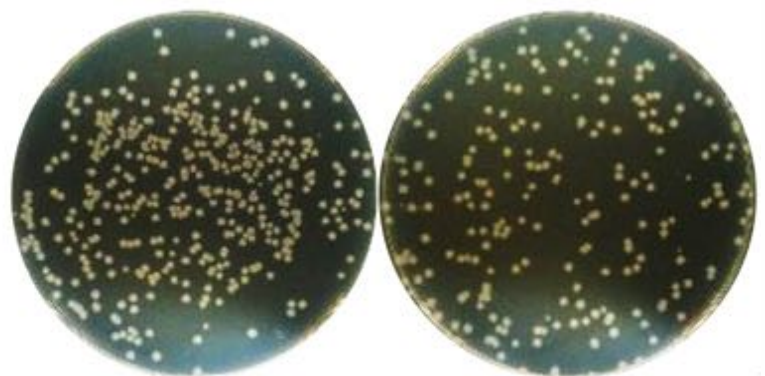
- 1) Takami, H. *et al.* BMC Genomics, **13**, 699 (2012)
- 2) Takami, H. New method for comparative functional genomics and metagenomics using KEGG MIDULE, 「Encyclopedia of Metagenomics」 (Nelson K.E. ed.), pp. 525-539, Springer (2014)
- 3) Takami, H. *et al.* DNA Res. **23**, 467-475 (2016)
- 4) 高見英人、荒井渉：微生物叢の生理代謝機能进行评估するMAPLEシステム、「NGSアプリケーション今すぐ始める！メタゲノム解析実験プロトコール」(服部正平編) pp. 215-225 (2016)
- 5) Suzuki, S. *et al.* PLoS ONE, **9**, e103833 (2014)
- 6) Moriya, Y. *et al.* Nucleic Acids Res. **35**, W182-W185 (2007)

実験技術紹介コーナー

みなさん、微生物を寒天プレートに塗布するときに、コンラージ棒またはガラスビーズを使うと思います。培養液を希釈して、100 μ Lを寒天プレート上に落とし、それらを使って均一にした後、培養してコロニーを形成させます。場合によっては、培養液中の生菌数を計測するために、コロニー数をカウントすることもあるでしょう。コンラージ棒とビーズで均一にした枯草菌のコロニーの写真を載せました。ビーズの方が均一ですね。ということで、ビーズの方が良いと思うのですが、コロニー数が大幅に減少することがあるため注意が必要です。例えば、ガラスビーズ（直径3-5mm）40個を寒天プレート上に置いて、スプレッドしたところ、コンラージ棒を使った場合に比べ、30%ほどコロニー数が減少しました。恐らく、コンラージ棒に吸着した細菌数よりも40個のビーズに吸着している細菌数の方が多いためだと考えられます。生菌数を計測する場合はコンラージ棒の方が正確ですね。この目的でビーズを使う場合は、ビーズの数を減らす必要があるのと、使用するビーズの数も何個と決めておく必要があります。ただ最近では、コーティングされた細胞が吸着しないプレーティングビーズが販売されているようです（佐藤）。

計数が目的ではなくシングルコロニーを拾いたいときは、プレートの2/3ぐらいに菌体を塗りつけてほぼ乾燥した状態になってから、空白部分をコンラージ棒で「ひとなで」します。プレーティングは均一にするものだ、と教わるものと思いますが、目的によって使い分けてはどうでしょう(大坪)。

次号では、消耗品の在庫切れを防ぐ工夫について紹介したいと思います。前号の、オートクレーブ後の器具の乾燥機の整理法についても、まだお読みで無い方はご一読ください。



コンラージ棒

ビーズ

名誉会員就任にあたって

再び「新しい一般微生物学の構築に 向けて」

別府 輝彦

日本ゲノム微生物学会が発足して10年に当たる年に、名誉会員の一人にいただいたことを有難く思うと同時に、「十年帰ルヲ得ズ、忘却ス来時ノ道」という昔の人の言葉が改めて身に沁みています。お礼言上の方を与えられて発足当時を思い出そうとハードディスクを検索したら、2007年3月1～3日にかずさアカデミアホールで開かれた、第1回日本ゲノム微生物学会年会で話したファイルが出てきました。ここに持ち出すのはそれこそ「十年一昔」、場違いであることは承知の上で、その時の演題をこの文章のタイトルに、要約の大部分を以下の段落に挙げさせていただくと、

”The Microbial World” 第2版(1963)は微生物学の教科書に革命をもたらした本として今でも私などの記憶に新しいが、その主著者である R.Y. Stanier が原核生物の概念を持ち出したことが、「一般微生物学」が成立する上で大きな引き金になったように思われる。しかしその後アーケアを提唱した C.R. Woese が、原核／真核二分論は生物学を誤らせた「悪い理論」だったと口を極めて論難しているのを見たりすると、改めて一般微生物学というものはこれまで一度も存在したことがなかったのではないかと疑われる。

難培養性微生物の発見を契機として、微生物が地球生物圏において占める圧倒的な位置が明らかになった今、微生物を相手にする本当の科学が強く求められており、「ゲノム微生物学」がそのきっかけとなることが期待される……

どうやら Genome Microbiology を General Microbiology に無理にこじつける一方で、ゲノム科学がもたらす技術・情報両面での爆発に目をつぶった偏った文章ですが、新しい微生物学の間を作り出すきっかけになるだろうという期待は間違っていなかったように思われます。

系統分類で定義できない微生物をどう説明するかは、はるか昔に微生物学の講義を担当して以来、私にとって手に余る難題でしたが、いまでは微生物は、環境中に分散しながら社会的な相互作用を及ぼし合い、集団として環境に働きかけて巨大な機能を発揮する細胞レベルの生き物であり、要するに微生物とは「微生物という生き方」のことだと、自信を持って言い切れるようになりました。その姿に最初に気付かせてくれた、DNAを通して微生物を見る手法の直接の延長線上にあるゲノム微生物学と本学会が、今後ますます発展することを期待します。

ゲノム微生物学会の ますますの発展を願って

磯野 克己

この度は本学会の名誉会員にご推挙いただきましてありがとうございます。私自身、自分がゲノム微生物学会の「名誉会員」にふさわしいかどうかを考えるとささか面映ゆい感じを持ちますが、自分では「ゲノム微生物学会の名誉を傷つけないように心すべき会員」なのだと考えて納得するようにしています。

私はゲノム微生物学会の草創期から学会活動に関わって参りました。そして、2009年から数年間学会の広報活動の一環であるニュースレターの作成・発行に微力を尽くして参りました。このニュースレターは2015年の11号以降、佐藤さん、大坪さん、相馬さんの3名の若手会員の方々が中心となって編集され発行が継続されていることは皆様ご存知の通りです。私がニュースレターの作成・発行に関わっていた頃、学会員の方々に各種の記事を書いていただくことをお願いすることからはじめて、関連する情報を寄せていただくことを含めて多大なご協力をいただきました。私としてはできるだけ有効に「黒子役」を務めることを心がけ、記事の執筆に当たる会員の方々の思いができるだけスムーズに伝わるようにすることを中心に努力してきたつもりですが、私のやったことにどれだけ実効性があったのかは私自身では判断できません。ただ、おかげさ

まで各号のニュースレターの作成・発行はだいたい順調に推移させることができたと思っています。

ところで、いわゆる次世代シーケンサーが開発されて広く使用されるようになって以来、ゲノム微生物学の研究分野は急速に広がり、進化すると同時に深化しています。それは、毎年発表される本学会の年会の口頭発表やポスターの内容に如実に反映されていますし、また現在の私の「本業」であるDNA Researchの編集業務の一環として毎日目を通しての投稿論文の内容にも反映されています。今やゲノム情報自体が膨大なビッグデータ化しつつあり、そこから何をどのように汲み取るかによって研究の方向が左右される場合も多々あることでしょう。昔、コツコツといろいろな突然変異株を分離・解析していた時代の研究のあり方を思うと、現在の研究の進み方/進め方はまさに隔世の感があります。もちろん、私の学生の頃にもすでに分子生物学という言葉は存在しましたし、J. Mol. Biol. という雑誌が出されていたくらいですから、「分子生物学」という概念自体は多くの研究者に理解されていましたし、またゲノムという概念も日常的に定着していました。しかし、当時はゲノムという語はある生物の持つ遺伝情報の総体という概念の域を出ておらず、それ自体を直接解析の対象とするものではありませんでした。

ゲノム微生物学のあり方が今後どのように変わり、それにつれて本学会がどのように発展していくかはわかりません。しかしこれまでがそうであったように、科学のどの分野であっても、ある現象の発見や研究手法の改善、さらに特定の機器の開発などによって、それまでは想像できなかった方向へ進展していくことはよくあることです。私個人としては、例えば微生物集団の全体を平均化した解析ではなく、single cellレベルでの解析が進むことにより、その微生物集団の機能的な変動がどのように予測できるようになるのかといったことに興味がありますが、さてどうなることやら。いずれにせよ、当然のことながらこれからも個々の研究者の自然現象を見る目や興味が新しい分野を切り開く鍵となるということは変わらないことでしょうし、それとともに、学会という場で異なる背景や考え持ったいろいろな年齢層の会員が意見交換することにより、さまざまなものの見方や考え方の展開が促され、それが時に特定の現象の解明に繋がるようになるということも当分は変わらないことでしょう。私自身、今後そ

ういうことにどれだけ貢献できるかわかりませんが、少しでも何かのお役に立てればと思っています。

名誉会員就任にあたって

吉川 寛

大阪大学、奈良先端科学技術大学院大学名誉教授

JT生命誌研究館非常勤顧問

初代会長

ゲノム微生物学会名誉会員への推薦と選出有難うございます。とても名誉なことと嬉しく思う反面、学会に参加し会員の皆さん、特に若い研究者と話し合うほどの体力気力がなく、学会のお役にたてないことに忸怩たる思いです。せめてもとと考え、お礼の気持ちをこめて、歴史を語ることにしました。

私は研究者としての生涯で二度学会の設立に参加することができました。一度目は1970年代の分子生物学会の設立です。1960年代に欧米で新しい学問—分子遺伝学—の洗礼を受けて帰国した研究者が、我が国におけるDNA研究の遅れというより皆無に近い状況に危機感を持ち、欧米ではすでに確立しつつある分子生物学を推進するために立ち上がったのです。科学は普遍的なものですから、優れた業績が世界中で続出すれば、それが新しい学問分野として波及するのは自然なことのはずです。ところが日本には特別な風土があり、既存の学会が新分野の進出の壁になっているのです。当時の日本では生命科学分野は医学会と医学者が主流の生化学会の力が強くDNAや分子が入り込む余地はなかったのです。新しい分野は大腸菌の分子生物学かせいぜいショウジョウバエの分子遺伝学だったのですから、無理はなかったかもしれません。とにかく、分子生物学が学界に認知され政府から研究費を獲得するには学会を設立して声を大きくしなければならなかったのです。ちなみに分子生物学会が存在するのは世界中で日本だけの現象なので、国際的に連携できる組織はないのです。

二度目は30年後のゲノム微生物学会です。ゲノム研究はご承知のように1989年ワトソンが船長をする黒船によって開眼されました。この時の受け皿は年会の発表演題数が1000件に達していた分子生物学会でした。ゲノム配列決定は土木作業のようなものだという根強い反論を押し切って国際プロジェクトへの参加に踏み切った仙台での総会は珍しく満員の盛況だったのを想起します。ゲノム研究は分子生物研究とは事情がことなり、比較的容易に学界に認知されました。それはこ

の研究の提唱者が癌研究者のダルベコであったように、医学、医療への期待が初めから大きかったからでしょう。米英の国家的な取り組みと予定外の私企業の参画によって予想をはるかに超えるスピードでヒトゲノムが解読されました。その速いスピードによって国際協力が乱された結果、日本のような小国の貢献は数%にとどまってしまいましたが、ゲノム研究はあらゆる生物ゲノムに波及し、基礎生物学の新しい発展の基盤を確立したと言えるでしょう。ゲノム広場などを開催して広く社会的な普及につとめていたゲノム研究者の間には、ゲノム学会を設立しようという声もありましたが、実現しなかったのはゲノム研究に対する国家的な支援が比較的潤沢で継続していることと、毎年開かれている1000人近い研究者が参加する研究報告会が学会の年会のような役割を果たしてきたためだと思われます。

それではなぜゲノム微生物学会なのでしょう。これには流行に流れ、移ろいやすい日本の学問基盤の脆弱さに原因があります。石浜明さんの言うように現代科学が暴走した（学会ニュースレター、2016年11月）とまでは思いませんが、多細胞生物の研究が主流となり、分子生物学の勃興期やゲノム研究の技術開発においてモデルとして機能した単細胞の研究は忘れられ、市民権を失い始めました。ゲノム研究報告会や、分子生物学会の年会においても細菌領域のセッションは殆どなく、一時は理事の大半を占めていた細菌研究者が分子生物学会の理事会から消えてしまったのです。細菌の分子やゲノムの生物学はほんとうに終わったのでしょうか。

私は本学会のニュースレターの前身の通信欄に“網羅と枚举”というエッセイを書きました。このタイトルでGoogleを検索すると、当時はイの一番に掲載されていましたが、最近調べると今でもトップ採用されているのに驚きました。ところがそれはエッセイに対する読者の好意的な感想のみで、肝心の原文は学会のホームページにも見当たらないので二重の驚きでした。記憶をたどるとエッセイの趣旨は、「生物現象には有限なものではなく、それを個別に枚举する研究は重箱の隅をつつくようなものに陥りがちな枚举の生物学だと戒められてきた。ところがゲノム情報は有限であることが明らかになり、網羅的研究が初めて可能になった—いわばパラダイムが変化したのだ」、というようなものでした。

大腸菌の核酸の代謝に係わる必須酵素の一種が枯草菌では見つからなかったとき、それは研究者の努力不足だと片づけられていました。ところが両種の全ゲノ

ムが解読された時、対応する遺伝子は枯草菌ではなく、同じ機能をする別の遺伝子が存在することが明らかになりました。いまでは、オルソログ遺伝子の displacement という概念は普通になっています。大腸菌O-157のゲノムは非感染性の大腸菌に大量の感染性遺伝子が他の細菌から水平伝達されて形成されたものだという発見は驚きでした。その後の多くの水平伝達遺伝子群の発見は細菌の種概念を一新するものと言えるでしょう。

大腸菌や枯草菌など少数の細菌が分子遺伝学のモデルとして重宝された時代は終わり、いまこそ細菌—その多様な生き物—そのものの全体像を、ゲノム情報をベースに研究することが出来るようになったのです。今世紀の初め欧米では環境微生物の研究が新しいゲノム研究の装いで進み始めていました。対照的にすばみ始めている日本のゲノム微生物研究に危機感を抱き、新しい学問を推進するために、日本的な手段である学会の設立によって、研究コミュニティを守ろうと願ったのです。

10年ほど前、私は線虫の細胞死の発見でノーベル賞を受賞したシドニー・ブレナーさんと、受賞の前年ゲノム研究について親しく話し合いをする機会を持ちました。その時私は、ゲノム研究が生物学研究に新しいパラダイムをもたらすだろうと主張したのに対し、ブレナーさんは、ゲノム研究は “New Technology and Old Paradigm” だと譲らなかったのです。確かに多細胞生物ではブレナーさんの指摘は正しいでしょう、しかしゲノムの網羅的な研究が可能な細菌（微生物）では従来のパラダイムを超える新しい展開が起こると私は信じています。学会の目的の重要な部分は、日本からそのような研究が生まれるような場を提供することでした。それから11年が経過しましたが、どうでしょう。皆さんのご意見を聞かせて下さい。期待しています。

最後に蛇足ですが、学会の数が多い日本ですが、一つ重要な学会が欠けています。それは general microbiology の学会です。医学系の細菌学会、農学系の学会、生態学系の学会などが国際微生物学会の窓口をめぐって難しい努力を繰り返しているのではないのでしょうか。日本に基礎生物学としての微生物学が育っていなかったことが60年代の分子遺伝学の誕生に対応できなかった原因だと思います。本学会設立の初心にはゲノム研究という方法によって応用的な異分野との間に橋渡しをする目標も含まれていました。11年を経過して、初心を実現する可能性は生まれているのでしょうか。是非検討していただきたいと願っています。

2017年受賞研究

研究奨励賞

獲得免疫機構に着目した病原細菌の
ゲノム進化に関する研究

丸山 史人

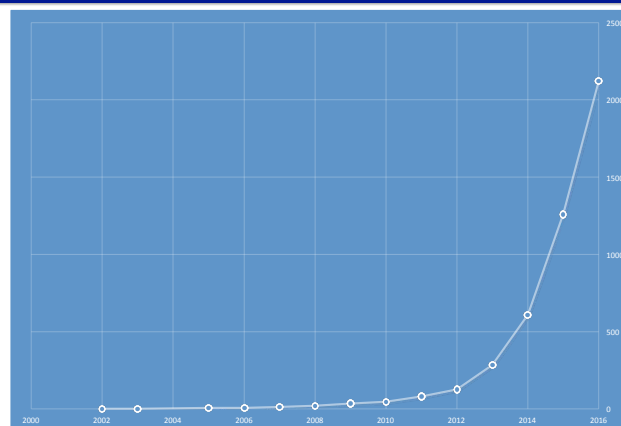
京都大学 大学院医学研究科 微生物感染症学分野

現在、真核生物のゲノム編集に革命をおこしている Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) は、1987年に日本人（現在九州大学の石野良純 教授）によって発見されたものである。2007年にBarrangouらによりレンサ球菌でバクテリオファージに対する獲得免疫機構として働いていることが実験的に示された。このCRISPRの有用性や新規性から、数多くの新機能の探索が行われ、指数関数的に本CRISPRに関する研究数は増加している（図1）。筆者らは、この黎明期からレンサ球菌ゲノム解析を行っていた強みを活かし、本CRISPRに着目したゲノム解析を様々な細菌種で行ってきた。その結果、プロファージの存在がほとんど知られていなかった *Streptococcus mutans* ではほぼ必ずCRISPRを保有し、免疫対象となるのが、ほぼ同一のバクテリオファージであるのに対し（引用1）、プロファージが主要な病原因子源で、複数の異なるプロファージをゲノムに保有する *S. pyogenes* では、CRISPRを欠損している株が多く、この欠損がゲノム再編成に関わっており、ファージの数とCRISPR免疫対象数との間に逆相関があるという新しいCRISPRの役割を明らかとした（引用2）。また、歯周病の原因菌 *Porphyromonas gingivalis* のゲノム配列の比較解析から、CRISPRの免疫記憶領域の一部が、可動性遺伝因子周囲の5-kbp領域内を標的とし、*P. gingivalis* では、ゲノム再構成・菌体間組換えにより株間多様性を創出する一方、それらをCRISPRにて制御している可能性を示した（引用3）。さらに、歯周病病変部位から高率に分離される *P. gingivalis*、*Tannerella forsythia* および *Treponema denticola* の3菌種同時比較ゲ



ノム解析を行った結果から3菌種において代謝経路の遺伝子欠損を互いに補完するという協調的戦略と、その一方でCRISPRによって他の細菌種の生命活動を阻害するという競合的戦略を示すことができた（引用4）。これらの成果（引用5）から、CRISPRの種類だけではなく、機能が細菌種によって大きく異なっており、種間相互作用にも影響される、またはすることが明らか

図1. PubMedに掲載されたCRISPRに関する論文数の推移



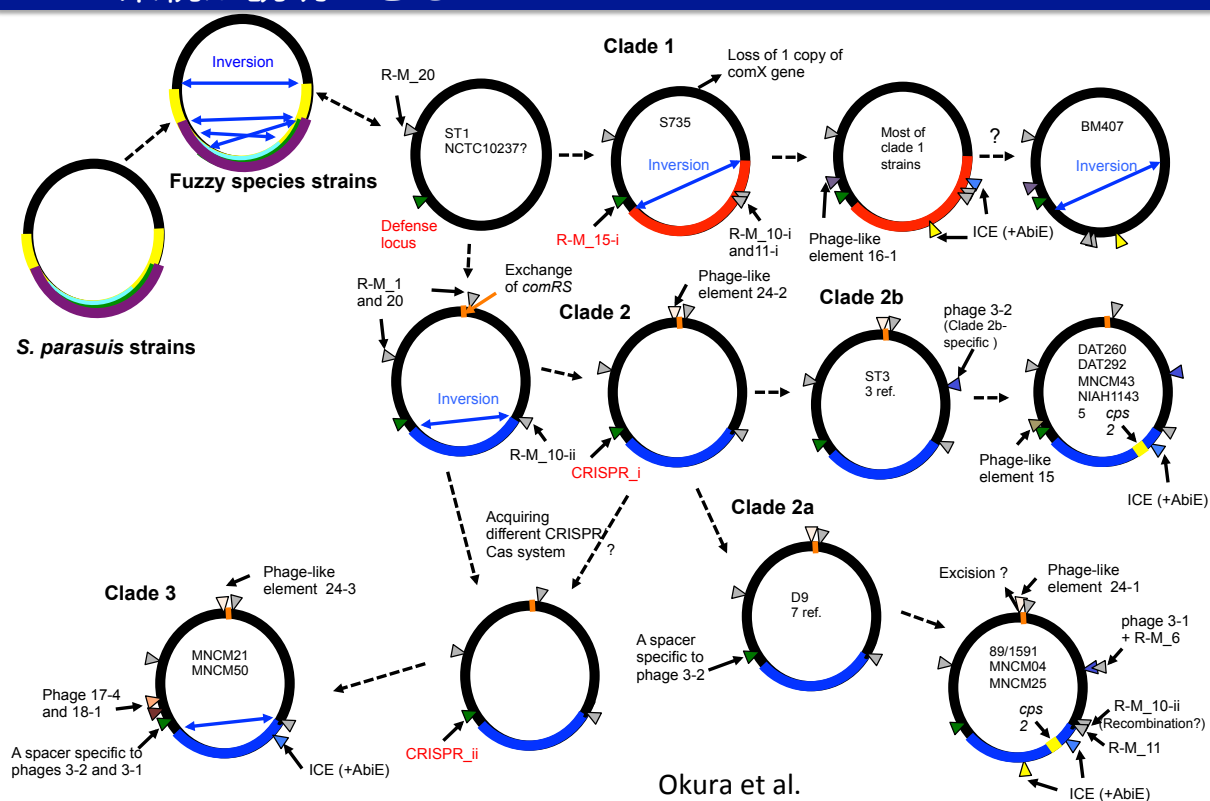
となってきた。このことは、相互作用しうる生物群集総体（ホロビオーム）を捉えることがCRISPR研究にも重要となることを示している（引用6）。

現在、CRISPRに加えて、その他の外来因子に対抗する防御システム（制限修飾システム、トキシナーンチトキシシンシステムなど：引用7）に着目して*S. suis*のゲノム進化の解明に取り組んでいる（図2：引用8）。その結果、CRISPRの有無のみならず、その他の防御システムの有無により、種内系統が説明できることがわかった。従来、遺伝子の獲得に着目して種の多様化を説明している報告が多いが、「外来因子の侵入を防ぐ」ことも同様に多様化において重要な役割を果たす可能性を示している。さらに、現在のところ、機構が未知であるが、様々な防御システムがゲノム上の一箇所で置き換わっている新奇の現象がみつまっている（図2： defense locus）。これまで知られているdefense island（複数の防御システムが密に集まるゲノム領域）とは全く異なるもので、今後、生物学的意義や、組み換え機構の解明が望まれる。

ここに紹介した研究は、様々な所属の多くの先生、学生さんとの共同研究として、多大な支援を受けて実施してきたものです。この場を借りて御礼申し上げます。

1. F. Maruyama, *et al.* **BMC Genomics** 10:358. 2009.
2. T. Nozawa, *et al.* **PLoS One** 6:e19543. 2011.
3. T. Watanabe, *et al.* **Genome Biol. Evol.** 5:1099-1114. 2013.
4. A. Endo, *et al.* **ISME J.** 9:629-642. 2015.
5. 渡辺孝康ら. 化学と生物. 51: 440-443. 2013.
6. 藤吉奏ら. 生体の科学. 68: 97-101. 2017.
7. 渡辺孝康ら. 化学療法の領域. 31: 118-128. 2015.
8. M. Okura, *et al.* **Genome Biol. Evol.** doi: 10.1093/gbe/evx062.

図2. 外来因子に対する免疫システムの種類で種内系統が説明できる



第11回年会におけるポスター賞

最優秀ポスター賞

シアノバクテリアにおける 複数コピーゲノムのDNA 複製制御機構の解析

大林 龍胆

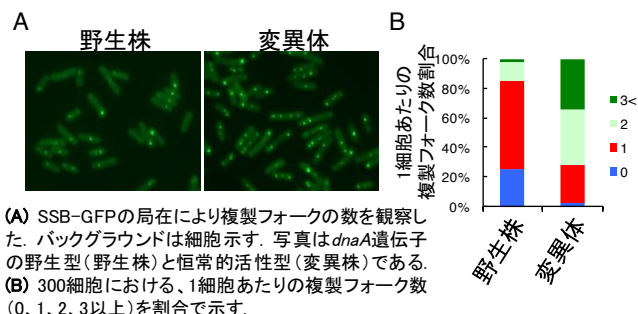
国立遺伝学研究所 細胞遺伝研究系
共生細胞進化研究部門

原核生物は大腸菌のような1細胞あたり1つのゲノムを保持する単純な生物(1倍体)であることが、現在の一般認識であろう。このような生物はDnaAという複製開始因子によって、そのゲノム複製が1細胞あたり1回と厳密に制御されている。一方、原核生物の中には1細胞あたり複数コピーゲノムを持つ



生物(倍数体)も存在する。好熱菌やデインコックス、さらにはアーキアなどにもゲノム倍数性が見られ、共生菌の多くは100倍体以上であることも報告されており、倍数体は系統的に多岐にわたる。しかしながら、倍数性の維持機構や根本的意義はほとんど解明されていないのが現状である。

倍数体のモデルとして本研究で用いたシアノバクテリアは光合成を行う原核生物であり、その多くは倍数体であることが知られている。また、DNA複製は光合成活性依存的に制御されており(Ohbayashi *et al.*, 2013, *FEMS Microbiol Lett.*)、複数あるゲノムのうち、一つのみしか複製されていないことも明らかとなっている(Watanabe *et al.*, 2012, *Mol Microbiol*, Jain *et al.*, 2012, *PNAS*, Chen *et al.*, 2012, *PLoS One*) (図: 野生株)。本研究で用いたシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942においては、大腸菌と同様にDnaAによる複製制御機構が示唆されていたが(Ohbayashi *et*



(A) SSB-GFPの局在により複製フォークの数を観察した。バックグラウンドは細胞を示す。写真はdnaA遺伝子の野生型(野生株)と恒常的活性型(変異株)である。(B) 300細胞における、1細胞あたりの複製フォーク数(0、1、2、3以上)を割合で示す。

al., 2016, *ISME J*)、光合成依存的な複製制御、さらには複数ゲノム複製制御に関する分子機構は不明であった。そこで、本研究では *Synechococcus elongatus* PCC 7942を用いて詳細な複製制御機構の解析を行った。

その結果、DnaAは明所では複製開始点(*oriC*)に結合しているが、暗所ではこの結合能が失われることがわかった。さらに、明暗でタンパク質量は変わらないことから、この制御機構は質的な制御であることが示唆されたため、dnaA遺伝子に変異を導入し、暗所においても結合能が上がる変異体の作出を試みた。その結果、ATP加水分解能の欠損変異を導入したDnaA(恒常的ATP型)は暗所における*oriC*への結合能が野生株に比べ10倍以上に上昇した。大腸菌などはDnaAのATP/ADP型を制御することで活性調節していることがすでに知られている。このことから、シアノバクテリアにおいてもDnaAのATP/ADP型によって結合能を制御することで暗所では複製開始を抑制しており、この制御機構は光合成活性依存的であることもわかった。さらに、この恒常的ATP型DnaAは明所においても野生株と比較し結合能が5倍以上に上昇していることから、複製への影響を検証した。その結果、野生株はほとんどの細胞が1つのゲノムしか複製していないのにも関わらず、恒常的活性型DnaA株は複数のゲノムを同時に複製していることがわかった(図)。以上のことから、DnaAのATP/ADP結合(活性)を調節することで、「明暗での複製開始制御」だけでなく、「明所における複製するゲノム数の制御」も行なっているという、倍数体特有の複製制御機構の存在が明らかになった。このような複製するゲノムコピー数の制御はDnaAに依存しないシアノバクテリアにおいても観察でき、倍数体において普遍的な制御機構である可能性が示唆される。現在は、生物間においてなぜこのようなゲノム倍数性の違いが生まれたのか?という根本的疑問に

興味を持ち、生理学的意義や進化的背景の解明を目指し研究を進めている。

おわりに、本発表を優秀ポスター賞に選んでいただいた皆様、選考に関わっていただいた学会関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、本研究は東京農工大学の吉川研究室と国立遺伝学研究所の宮城島研究室にて行なったものであり、吉川博文先生、渡辺智先生、宮城島進也先生をはじめ、研究室の皆様に感謝致します。

優秀ポスター賞

アミノ酸飢餓への適応に関与する枯草菌RNAポリメラーゼの変異解析

大坂 夏木

東京農工大学大学院

GTPは細胞内の多くの反応に利用されている重要なヌクレオチドであり、環境変化に応じて、細胞内におけるGTPレベルの恒常性を保つことは生命活動の維持には必須である。細菌一般においては、アミノ酸飢餓時にGTPレベルを低下させることが、生存するための代謝の切り替えに



重要な役割を担っている。枯草菌では、GTPレベルの低下が孢子形成開始のトリガーとなることが知られている⁽¹⁾。また、アミノ酸飢餓時にGTPレベルを低下させることで、rRNAオペロン等の発現を抑制し、生体分子の無駄な消費を抑制する⁽²⁾。細菌においてGTPレベルの恒常性を保つ主要な機構として、核酸小分子(p)ppGppによる制御が存在し、枯草菌においては、GTP生合成経路の酵素Gmk, HprT に結合し、酵素活性を阻害することで、GTPレベルを制御することが知られている⁽³⁾。また、細胞内GTPレベルが高いことは、アミノ酸飢餓とは関係なく致死性をもたらすが、その原因は不明である⁽³⁾。このように、細胞内GTPレベル制御の生理的意義は未だ不明な点が多い。

私はこれまで枯草菌における(p)ppGpp合成酵素を全て欠失させた株((p)ppGpp⁰株)を用いて、(p)ppGpp

に依存しないGTPレベル制御・アミノ酸飢餓へ適応する機構について研究を行ってきた。(p)ppGpp⁰株はアミノ酸飢餓時にGTPレベルを低下させることができないため、最少培地(アミノ酸非添加の合成培地)においてコロニー形成できない。この株から最少培地でコロニー形成できるようになった抑圧変異株を取得したところ、GTP生合成経路関連遺伝子の他に、RNAポリメラーゼ(RNAP)コア酵素をコードする*rpoB*, *rpoC*等に抑圧変異を同定した。

*rpoB/C*の抑圧変異は、RNAPの構造において、活性中心や、転写反応の基質となるNTPの入り口である二次チャンネルの近傍に多くみられた。このことから、*rpoB/C*の抑圧変異によって、RNAPのNTPに対する親和性が変化しているのではないかと考えた。多くの枯草菌遺伝子の転写開始の効率は、転写開始点+1の塩基に利用されるNTPの細胞内レベルに依存している。アミノ酸生合成関連遺伝子の多くは転写開始点+1の塩基がadenineであり、一方r⁺sRNAオペロンをコードする遺伝子は転写開始点+1の塩基がguanineである。したがって通常は、アミノ酸飢餓時にGTPのレベルを低下させ、結果的にATP/GTPのレベルが上昇するため、アミノ酸生合成関連遺伝子の発現が促進され、rRNAオペロンの発現が抑制されることになる。このことから、抑圧変異*rpoB/C*を持つRNAPは転写開始に利用するATPおよびGTPに対する親和性を変化させることによって適応しているのではないかと考え、転写開始点の塩基+1A,+1Gそれぞれに対する転写活性をレポーターアッセイにより比較した。その結果、変異株は野生株と比較して転写開始点+1Aに対する+1Gの転写活性が低下していることが分かった。以上の結果から、*rpoB/C*抑圧変異株では細胞内GTPレベルを低下させずともrRNAオペロンの発現を抑制し、アミノ酸飢餓に対し適応していると考えている。

現時点では仮説の域を超えないが、細胞内GTPレベル制御の生理的意義の一つに、転写開始効率が細胞内GTPレベルに大きく依存する主要な遺伝子群であるrRNAオペロンの発現を、細胞の増殖キャパシティと共役させて制限することにあるのではないかと考えている。今後は*rpoB/C*の抑圧変異によって、細胞内の転写レベルおよび代謝の全体像をより詳細に解析していく予定である。

謝辞

本研究を進めるにあたって、日頃からご指導を賜った東京農工大学の吉川博文先生、河村富士夫先生、立教大学の高田啓博士、変異株のリシーケンスを行っていただいた東京農工大学・ゲノム解析センターの兼崎友研究員に厚く御礼申し上げます。また、学会では多

くの方々にポスター討論に来ていただいた上、自分でも気づかない視点からのご意見・ご指摘も多く頂き、非常に有意義な時間となりました。ポスター討論に来てくださった方々、ポスター賞の選考に時間を割いてくださった方々にも感謝申し上げます。

参考文献

- (1) Lopez et al. (1981). J. Bacteriol 146: 605-613
- (2) Krasny and Guarise. (2004). EMBO J. 23: 4473-4483
- (3) Kriel et al. (2012). Molecular Cell 48(2): 231-41

優秀ポスター賞

大腸菌の定常期における過酸化水素耐性に関与する PhoBレギュロンの機能未知遺伝子 *ytfK* の機能未知遺伝子 *ytfK*

岩館 佑未

首都大学東京大学院 理工学研究科 博士後期課程3年

古くから研究が進められ、分子レベルで最も理解が進んでいるとされている大腸菌でさえも、そのゲノムにコードされた約4,400個の遺伝子のうちの多くの遺伝子の機能は、まだ実験的に明らかにされていません。近年、細胞が増殖・生存するのに必要な遺伝子群の中には、機能の分かっていない遺伝子群が含まれることが報告され、機能未知遺伝子群の機能解析の重要性が再確認されました。私は大腸菌の定常期の生存機構、特に酸化ストレス耐性の機構に興味があり、これまでに所属する研究室で作製されたゲノム縮小株を利用して、定常期の酸化ストレス耐性に関わる遺伝子群（ギ酸脱水素酵素などの遺伝子群）を同定してきましたが、今回はリン酸飢餓における酸化ストレス耐性に着目して研究を行いました。リン酸飢餓と酸化ストレスとの関連については16年前に報告があり、リン酸飢餓の状態が続くと活性酸素種の除去に働く遺伝子の変異株で生存率が低下することが知られていました。そこで、リン酸飢餓に応答する酸化ストレス耐性の機構があるのではないかと考え、それに働く遺伝子の同定を行うことにしました。

まず酸化ストレスによって発現が誘導される遺伝子群の中で、リン酸飢餓に応答するPhoBレギュロンの遺伝子が含まれているか文献を調べたところ、過酸化水素によって発現が誘導される遺伝子群の中にPhoBレギュロンの遺伝子が2つ含まれることに気がつきま

した。そのうちの *ytfK* という68アミノ酸をコードする遺伝子は、その機能が全くわからない状態でしたので、本研究では *ytfK* と酸化ストレス耐性との関連を調べることにしました。

ytfK 欠損株を作製して、定常期における酸化ストレス耐性や遺伝学的解析、細胞の過酸化水素の除去活性などを調べたところ、*ytfK* 欠損株では硝酸を添加した培地で培養した時に、メナジオン耐性および過酸化水素耐性が低下することがわかりました。さらに *ytfK* は KatG カタラーゼの発現量の増大に働くこと、またリン酸飢餓における生存に関与することもわかりました。リン酸飢餓の状態の細胞では好氣的なグルコース代謝が継続されることにより、活性酸素種の産生が増大することが報告されています。この時に PhoB レギュロンの *ytfK* が働いて KatG の発現量を増大させて、細胞内の過酸化水素レベルを低下させている可能性が考えられました。今回の学会で発表した内容は、*ytfK* 遺伝子

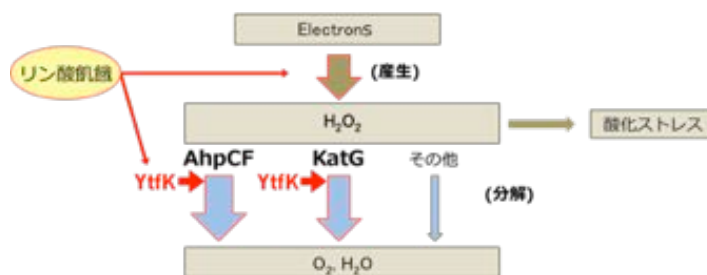


図 リン酸飢餓における酸化ストレス耐性の機構

の機能についての最初の手掛かりであって、まだまだ疑問がたくさんあります。例えばなぜ硝酸を培地に添加した場合のみに *ytfK* の表現型が観察できるのかという点です。硝酸を添加すると転写因子PhoBの活性が高くなる可能性を考えていますが、まだ検証できていません。今後は活性酸素種（ROS）だけでなく、活性窒素種（RNS）との関係についても調べていきたいと思っています。またどのようなメカニズムでYtfKはKatGカタラーゼの発現量を促進しているのかという点もまだわかっていません。これまでの実験からは、YtfKが働くとKatGのmRNA量が増加することがわかりましたので、YtfKは *katG* の転写量またはmRNAの安定性を高めていることが考えられました。当初は *katG* の転写を調節する転写因子の活性をYtfKが変化させているのではないかと考えていたのですが、これまでの実験の結果はこの仮説を支持しませんでした。リン酸飢餓の生存には、核様体タンパク質が生存に負の働きをすることが報告されているので、核様体タンパク質

の活性を通してKatGの転写量を調節している可能性も考えてみたいと思っています。

今後は*ytfK*遺伝子の機能について詳細に調べて行くと同時に、これまでに同定した他の酸化ストレス耐性に関わる遺伝子群についてもまとめていきたいと思っています。またさらに、酸化ストレス耐性だけでなく他のストレス耐性に働く遺伝子群の同定とそれらの機能解析を行うことによって、まだ人間が気付いていないバクテリアの持っている興味深い増殖に重要な機構

や定常期における生存機構を明らかにしていきたいと思っています。

おわりに：今回の学会では、口頭発表に初めて挑戦して緊張しました。ポスター発表の際には、話を聞きに来てくださった方たちとディスカッションしたり、研究の不明な点について一緒に考えることができ、とってもうれしかったです。ありがとうございました。

閑話休題

— その3 — 春に咲く花々

以下の花々は今年の春に撮影したものです。その気になって探せば、春早くからいろいろなところにいろいろな花々が咲いているのに気がつきます。私はこういう花々に触れるといつも心が和みます。皆様にも楽しんでいただければ幸いです。
(磯野克己)



ミヤマカタバミ (カタバミ科) : *Oxalis griffithii* (Edgew. et Hook.) Hara, 2017.4.4 京都市



トウゴクサバノオ (キンポウゲ科) : *Dichocarpum trachyspermum* (Maxim.) W.T. Wang et Hsiao 2017.4.4 京都市



スズシロソウ (アブラナ科) : *Arabis flagellosa* Miq. 2017.4.4 京都市



ナガバタチツボスミレ (スミレ科) : *Viola ovato-oblonga* (Miq.) Makino 2017.4.16 神戸市



イワウチワ (イワウメ科) : *Shortia uniflora* (Maxim.) Maxim. 2017.5.7 京都比良山系

第12回ゲノム微生物学会のお知らせ

第12回日本ゲノム微生物学会年会を2018年3月5日（月）～7日（水）の3日間、京都大学桂キャンパス内の船井哲良記念講堂（京都市西京区）にて開催します。桂キャンパスは2003年に開学し、主に工学研究科の研究・教育拠点となっています。桂キャンパスには、京都市の中心部（四条河原町）より阪急電鉄とバスを乗り継いで頂くと約30-40分で到着します。

大会スタイルは、例年通りの年会形式を基本とし、今後シンポジウム等の企画について大会実行委員会で検討します。詳細が決まり次第、情報を順次ホームページならびに秋号のニュースレター（11月に発行予定）に掲載します。桂キャンパスの近くには、嵐山・桂離宮・苔寺などがあり、とても自然が豊かな環境です。本会会員のみならず、非会員の方々も是非お誘い合わせの上、学会と年会の盛上げに御協力頂ければ、誠に幸いです（跡見晴幸）。



学会の現況

学会役員（敬称略）

会長：林哲也

庶務・会計幹事：黒川顕、仁木宏典 **集会幹事：**板谷光泰、大島拓 **広報幹事：**中村保一、佐々木裕子
ニュースレター幹事：佐藤勉、相馬亜希子、大坪嘉行、中村保一 **男女共同参画幹事：**板谷光泰、佐々木裕子

評議員（会長推薦を含む）：饗場浩文、朝井計、飯田哲也、池内昌彦、大西康夫、小椋義俊、加藤潤一、久原哲、小林一三、田中寛、津田雅孝、南澤究、吉川博文（評議会議長）、吉田健一、和地正明、内藤真理子、應蓓文、桑原知己、石川周

会計監査：有田正規、野尻秀昭

会員の動向

会員数 516 名（平成29年6月現在）

一般会員 368名；学生会員 124名

賛助会員 14 団体；機関会員 1 団体