

日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

微小容器と大腸菌を融合させたhybrid cell 田端 和仁 (東京大学・大学院工学系研究科)

細胞を創るという目的を考えたとき、細胞を定義する入れ物が必要となる。そこで、微細加工で作製した微小容器と大腸菌を融合させる実験を試みた(図1A)。微小容器を作製し、その開口部に脂質二重膜を展開する技術を開発した。そこに、大腸菌プロトプラストを膜融合すると大腸菌の細胞質は微小容器内に導入され、膜タンパク質は開口部の脂質二重膜内に再構成される。これをhybrid cellと名付けた(図1B)。また、微小容器にあらかじめ物を閉じ込めることでhybrid cellに導入することができる。そこで、βガラクトシダーゼをコードした遺伝子を閉じ込め、hybrid cellからの発現を行ったところ、hybrid cellとなっても遺伝子発現ができることがわかった。また、hybrid cellに大腸菌を閉じ込めることで細胞内に細胞を入れるというようなことも可能である(図1C)。このように、人工的な器と細胞を融合しても細胞内の機能はある程度機能していることがわかった。(Moriizumi *et al.* Sci Rep 2018)。

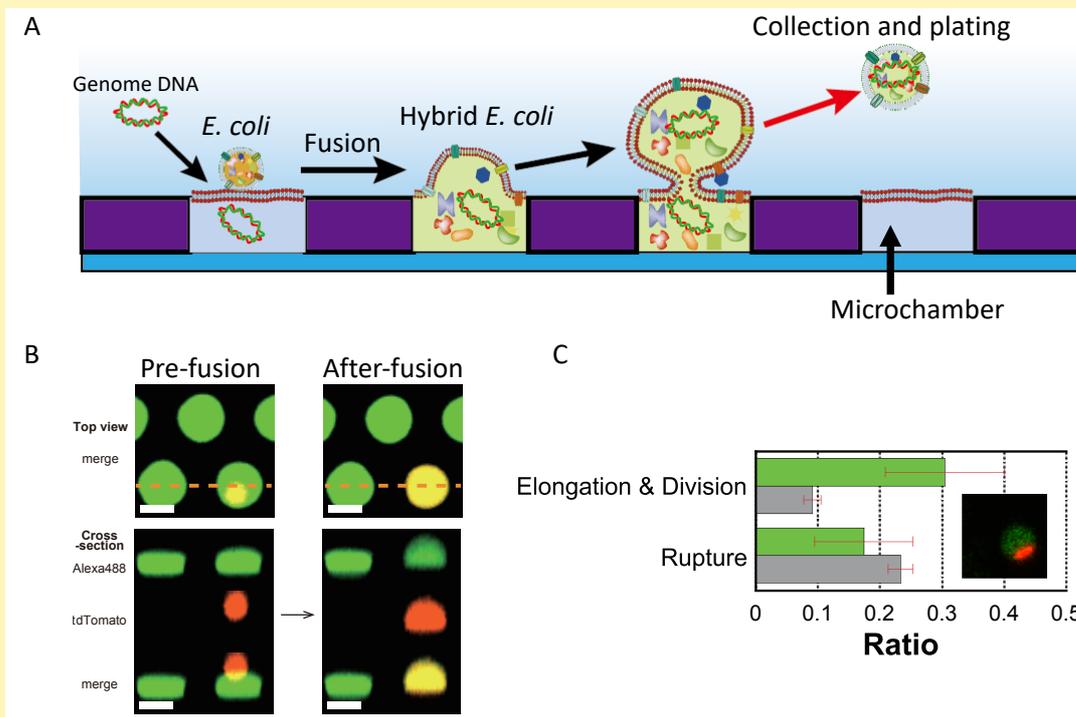


図1. Hybrid cell作成と応用

A:実験の概念図 B:微小容器と大腸菌プロトプラストの融合。大腸菌はtdTomatoを発現しており、容器内には蛍光色素溶液を閉じ込めてある。融合後、形状が膨らむように変形している。C: Hybrid cellに閉じ込めた大腸菌。グラフ緑色はhybrid cell中の大腸菌が成長したかもしくは破裂したかを示す。灰色はhybrid cellではない所に閉じ込めた大腸菌が成長したか破裂したかを示す。Hybrid cellに閉じ込めた方が成長しやすいことがわかる。写真はhybrid cellに閉じ込めた大腸菌の蛍光像。

第13回年会を振り返って

加藤 潤一
首都大学東京

日本ゲノム微生物学会第13回年会を、2019年3月6日(水)-8日(金)の3日間、首都大学東京南大沢キャンパスで開催致しました。事前登録者230名、当日参加者120名、合わせて360名の参加者を得て、盛況のうちに終えることが出来ました。参加者の皆様を始め、ご支援頂きました各企業・財団に厚く御礼申し上げます。



今回は口頭発表・シンポジウムは大講堂で、ポスター発表は小講堂と講堂内の控室などで、ランチョンセミナーは講堂の向かいの教室で実施しました。ポスター発表は複数の部屋に分かれる形になってしまい、またスペースも十分ではなく申し訳ありませんでしたが、3日間貼りっぱなしにいたしました。懇親会は生協食堂で開催いたしました。

今回年会を開催するにあたっては特に3つの点を重点的に考えました。第一に特定の分野に限らず、近年微生物関係で素晴らしい研究をされていらっしゃる方々に講演をお願いしたいと考えました。そこで医学、理学、農学、またミクロ系、マクロ系、情報系などいろいろな分野の何人かの方々に推薦をお願いし、その結果8人の方々に招待講演として講演をお願いしましたところ皆様が快くお引き受けくださいました。また招待講演はシンポジウムのようなまとめた形ではなく、それぞれに関連する口頭発表と組み合わせる形で各セッションのところに設定いたしました。一方こ

のような構成とは別に日本農芸化学会から共催シンポジウムの呼びかけがありましたので、3日目の午後にも実施いたしました。

第二に学部学生などできるだけ多くの若い方々の参加を促すことが重要と考えました。そのためにここ数年行われているように学部学生の参加費を無料とし、また掲示用ポスターを作成して首都圏の100以上の大学に送付いたしました。また法政大の佐藤勉先生にお願いし、微生物研究会のメーリングリストで2度ほど案内を送っていただきました。

第三に企業などによる多くの展示およびランチョンセミナーの開催が運営面などで重要と考えました。そのために本学会の規模を基に費用を見直し、またランチョンセミナーを応募しやすいように分割する形で実施いたしました。実際には遺伝研の黒川顕先生のご尽力により、NBPやCRESTの参加もいただき、多くの展示、また二日間のランチョンセミナーを実施することができました。

このような3つの点を具体化するにあたっては、準備段階の初期には首都大学東京の得平茂樹先生に相談させていただき、また全体にわたって東工大の和地正明先生には副年会長として多くの面で助けていただきました。年会の進行につきましては東工大の岩井伯隆先生が担当してくださり、良い雰囲気を作ってくださいました。これらの先生方および招待講演の推薦をいただいた先生方、法政大の佐藤勉先生、遺伝研の黒川顕先生、また運営にご支援頂きましたクバプロの皆さん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

マイクロコズムの長期培養実験から探る進化

中島 敏幸

愛媛大学大学院理工学研究科

はじめに

実験進化と総称される手法が生物進化の研究において重要性を増してきている。この手法は、進化に関する既存の仮説を検証するだけでなく、検証可能な新しい仮説の発見も可能にしてくれる良さもある。微生物を用いた実験進化の研究には意外と長い歴史がある。細菌個体群の進化的変化についての、おそらく最初の詳細な研究は Atwood et.al. (1951) だろう¹⁾。

「背後にある原因がなんであれ、選択は調べている要素の相対的増殖率の違いという言葉で表現できる¹⁾」という視点で、細菌を用いた進化の実験が始まった。微生物は一般に世代時間が短いので、一人の人間の時間スケールで進化を“現象”として観測する事が可能である。実験進化の材料は微生物だけではないが、短い世代時間や実験的な扱いやすさから微生物が多く用いられ、異種から数種のモデル個体群を用いた様々な研究がなされてきた²⁾。

私たちの研究室では、個体群の進化を生態系から切り離さない状態で観察するために、世代時間が短い微

生物から成る合成生態系を作り、生物が進化する過程を直接観察して進化の仕組みを明らかにすることに取り組んでいる。

具体的には、無機塩類から成る培養液をいれた300 mlのガラスボトルの中に生産者である藻類（クロレラと近縁の緑藻である *Micractinium* sp.）、これが分泌する有機物を利用して増殖する細菌（*Escherichia coli*）、そして細菌を捕食して増殖する原生動物（*Tetrahymena thermophila*）の3種を混合し光を照射するだけで3種が安定して共存する微小生態系である（図1、2）³⁾。藻類は *Chlorella vulgaris* として供与されたので、構成種のイニシャルをとってCETマイクロコズムと名付けたが、後にrDNA解析で *Micractinium* 属と判定された。

30℃・12時間明暗周期・静置培養で、これまで13年間培養を継続し、生態系の挙動と構成種の進化過程を観察し、藻類と原生動物との間に細胞内共生が、また藻類と細菌の間に細胞外共生が進化しつつあることが明らかになってきた。

このような光だけ照射すれば構成種が存続するような生態系を用いた実験進化の研究はこれまで行われていなかった。なぜ、わざわざ相互作用の複雑な生態系を作り、進化を見ようというのか？その一番の理由は、個体群を生態系という全体から切り離さずに進化



図1. CETマイクロコズム

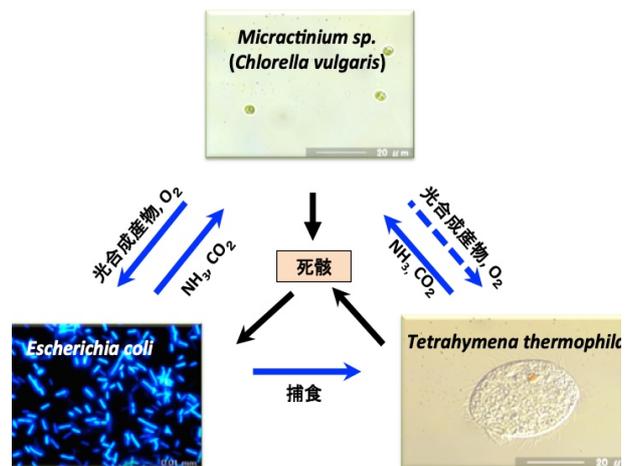


図2. CETマイクロコズムの構成種と生物間相互作用

を観察したいからである。では、なぜ全体から切り離れたくないのか？それは、全体（生態系）が部分（個体群）の進化の“諸条件”を作り出すからである。主な諸条件を挙げると、選択環境の生成、変異体による置換・共存の機構、構成種間の遺伝子の水平移動やハイブリダイゼーションによる新しい遺伝的タイプの生成、シンビオジェネシス（細胞内共生による新しいタイプの生成）、などが考えられる⁴⁾。

CETマイクロコズムの長期的ダイナミクスと構成種間の共生の進化

実験を始めるにあたり、特定の仮説を立て検証するというよりも、新しい仮説を発見することに重点を置いた。以下、特に進化を生じさせる“選択圧がどのように生まれたか”という視点に焦点を当てて、開始6年までの実験結果をまとめてみたい。開始から約3年目まで、構成種の数の変化や溶存酸素濃度の変化等を調べた。その結果、以下の3つのフェーズに分けて整理できることが明らかになった³⁾。

初期（0～100日）：この時期は肩上がりから定常状態へのフェーズである。緑藻、大腸菌、テトラヒメナの数はそれぞれ増加し、おおよそ定常密度に達した（図3A）。

中期（約100～約300日）：この時期は初期の定常状態からゆるやかな減少のフェーズであり、後期への移行期ともいえる。緑藻の生細胞数は減少し始めた（図3B）。このことは、系内の総生産量が減少したことと、緑藻において特に資源不足からくる飢餓の選択圧が働いていることを示している。さらに、このときテトラヒメナの個体数も減少し、エサ不足からくる飢餓の選択圧がテトラヒメナにも働いたと考えられ

る。一方、大腸菌の生細胞数は若干増加し始めた。これは、資源として利用可能な緑藻の死細胞が増加したためかもしれない。

この時期に細胞内に緑藻を持ったテトラヒメナが個体群中に増加し始めた（図4）。この割合は、後期に向けて個体群の約80～90%まで増えた。ちなみに、テトラヒメナは緑藻細胞（*Micractinium*）を消化することはできず、前者の細胞内で後者は生きていることが示されている。また、同時期に、緑藻と大腸菌との細胞が集まった集塊が存在することが観察から明らかとなった（図4）。この要因としては、緑藻とテトラヒメナの双方が飢餓条件に置かれ、これが両者の共生（互いに物理的に近接すること）を有利とする環境が作られたためと考えられる。

後期（約300～1100日）：この時期は、中期の変化が終わり構成種の数安定するフェーズである。緑藻の生細胞数の減少が下げ止まった（図3B）。この時期のマイクロコズムの溶存酸素濃度（DO）を計測すると、前期や中期に比べると、後期のDOは低く、気相の酸素が水との交換により成立する飽和濃度に近かった。このことから、光合成で生成された酸素は大腸菌やテトラヒメナによってすみやかに消費され、酸素の生産と呼吸はバランスが取れていたと考えられる。この後期は、構成種にとっての資源が余っておらず、リサイクルによりゆっくり供給される生態系の成熟段階と見なすことができる。この段階で緑藻を細胞内に持つテトラヒメナの割合は80%以上の高い水準を維持していた。これは、利用可能な資源の減少に加え、溶存酸素濃度の低下も両種の共生関係を有利とする選択環境として働いていただろう。自然界においても、共生藻をもつ繊毛虫は、有酸素環境と無酸素環境の境界近くに最も多く分布することが観察されている

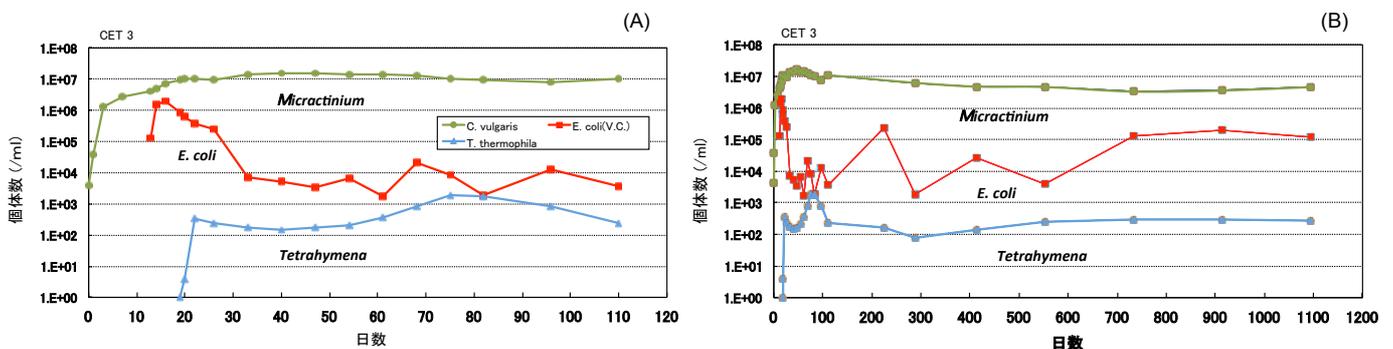


図3. CETマイクロコズムにおける構成種の生細胞の個体群密度の時間変化（静置培養、植え継ぎなし）(A) 開始から110日、(B) 開始から1100日（複製系NO. 3の結果）

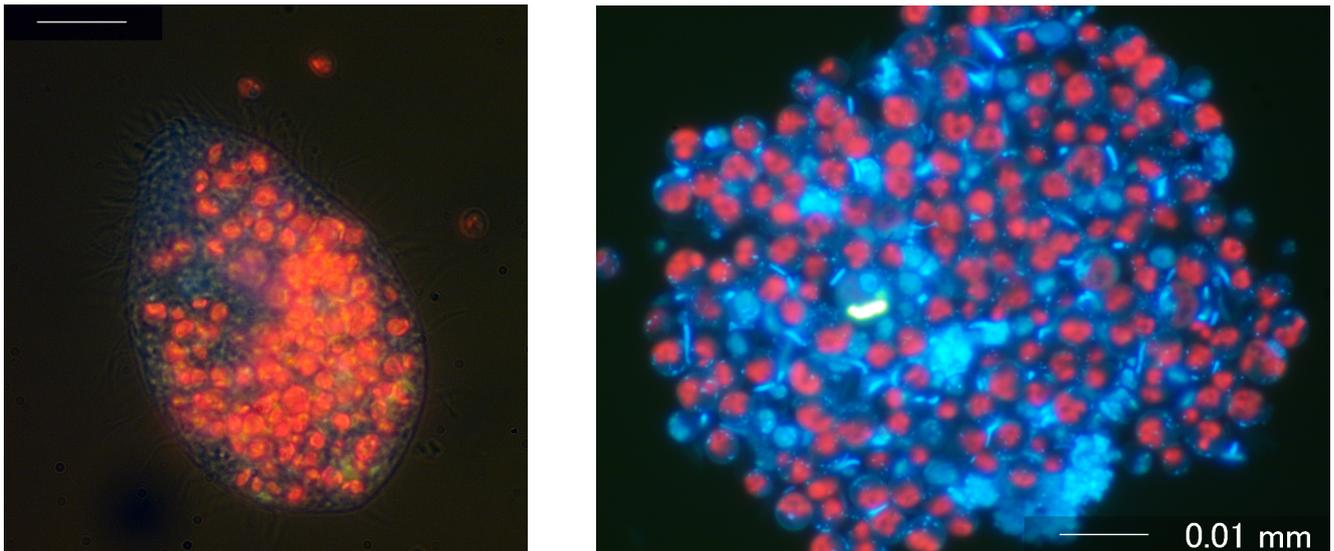


図4. 左：テトラヒメナ細胞内に藻類（赤）が存在する。右：藻類（赤）の集塊の内部に細菌（青）が存在する。

5). 細胞内共生により、2つの種が新しいニッチを開拓することの一例である。ちなみに、現在広く採用されている共生の定義は、de Bary による「共に生きる (living together)」である。物理的に近接して生きていることであり、これには、相利共生だけではなく、片利共生や寄生も含まれる。繊毛虫には緑藻（一次共生で光合成能力を獲得したグループ）と二次共生する種も多く、一時的に細胞内に保持するものや安定して宿主細胞と同調して共生藻が保持されるものまである6)。

後期には、緑藻と大腸菌との細胞集塊も目立って観察されるようになった。両者は集塊形成で近接するこ

とにより生存率が高まるということが明らかになっている。中期で見られた大腸菌生菌数の増加にもかかわらずテトラヒメナ数が増加しなかったことは、大腸菌にとって細胞集塊形成は緑藻からの資源利用だけではなく、テトラヒメナという捕食者からの隠れ家としても機能しているためと考えられる。大腸菌の選択環境は利用可能な資源量の低下とテトラヒメナからの捕食であり、緑藻にとってもCO₂やその他の律速資源の量の低下が考えられる。従って、両種が物理的に近接することは互いに効率的な資源獲得につながる。

図5は、前期と後期の種間関係を比較したものであるが、構成種間の共生の進化に伴い生態系内の物質や

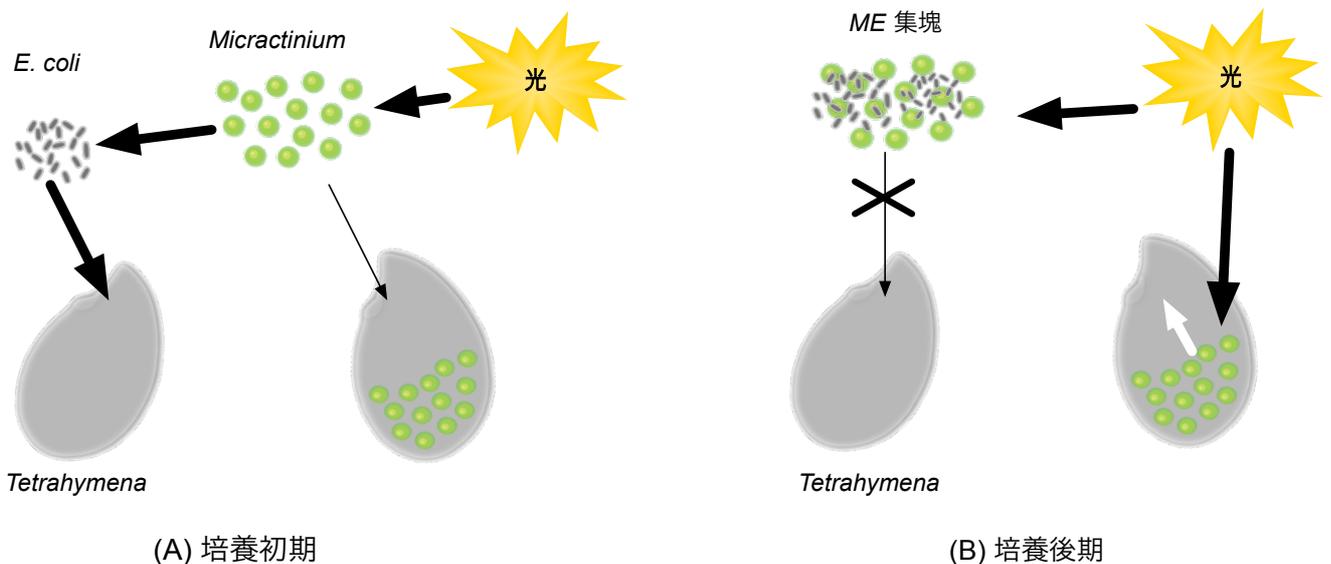


図5. CETマイクロコズム内の物質・エネルギー流の変化7)

エネルギーの流れの構造が変化していることがわかる。

ここで少々この研究の裏話を述べたい。この研究の着手に遡ること15年ほど前に、遊び心でこの3種（株は異なる）を混ぜて培養したことがある。1年と経たないうちにテトラヒメナの細胞内に緑藻が入っており元気に泳いでいた。このことを人に話すと面白いと言っていたが、計画だった実験をする機会もないまま放置していた。その後、現在の職場である愛媛大学の生物学科に職を得て、またやってみようという気になった。理論的な仮説を検証するような実験デザインではなく、むしろ面白い仮説を引き出すための実験と位置付けていた。仮説検証型の実験と比べると、この種の発見的実験は実に頭を使うことを身にしみて感じた。例えば、緑藻と大腸菌の集塊が出現したことは、当初気づかなかった。なぜなら、大腸菌と藻類の計数では、顕鏡前にボルテックスをかけるので（テトラヒメナの場合手で優しく攪拌する）、弱く結合している細胞集塊は壊れてしまっていたのだ。しかし、前述のごとく、データをグラフにしてみると大腸菌生菌数の増加にもかかわらずテトラヒメナ数が増加しないことがわかった。この不可解な結果をこの実験を執念深くやっていた当時修士課程の学生の佐野明子さんと夜遅くまでテーブルのグラフを眺め議論したことを思い出す（後に本研究で博士の学位を取得）。そして、おそらく大腸菌は隠れ屋に住んでいるか、細胞が長くなる変異体が捕食を回避して増加しているはずだという考えに達し、次のサンプリングの時にボルテックスをかけずに観察してみた。その時得た写真が図4の右の写真である。

分離株を用いた相互作用の解析

5~6年間培養したマイクロコズムから分離した緑藻、大腸菌、テトラヒメナを分離して相互の関係を調べた結果、以下のことがわかった。緑藻（祖先株は分散型）は、細胞集塊を形成する集塊型と集塊形成しない分散型に分化した⁸⁾。

大腸菌と集塊型緑藻の共培養において、集塊に属している細胞と外に単独でいる細胞をそれぞれの生死判定できる蛍光試薬で染め、集塊形成の利益を評価したところ、集塊型緑藻ではその集塊内に大腸菌が入り込み、両者の生存率が共に高まった。また、大腸菌が存

在しない条件で集塊型緑藻とテトラヒメナを共培養すると、テトラヒメナの個体数は単調減少して消滅した。つまり、集塊型はその集塊サイズ故にテトラヒメナ細胞内には入れず、両者は共生的関係（物理的近接性）を進化させていない。

一方、大腸菌が存在しない条件で分散型の緑藻をテトラヒメナと共培養すると、テトラヒメナ数は、はじめは減るが、緑藻がテトラヒメナの細胞内に入り、V字回復する。これによりテトラヒメナが最終的に消滅するまでの期間は、緑藻祖先株や集塊型緑藻と共培養した場合に比べ、3倍から6倍まで延びる^{8, 9)}。この延命効果の原因の一つとして、この分散型は、祖先株に比べより多くのグリセロールやスクロースを細胞外に出していることが分かった¹⁰⁾。これらの有機物はテトラヒメナの栄養として利用可能なものである。

DNAレベルでの変化

特に、論文投稿時によく指摘されたことであるが、上記の結果に関して、真っ先に次のような疑問が出される。「形質の変化を見て進化と言っているが、DNAのレベルではどうなのか？」というものである。本学会の方々にとっても最も関心のあることだと思う。形質レベルの変化に対応してどのような変化が分子のレベルに生じているのかは、目下の課題であるが、1、2年前から大腸菌について代表的な分離株の全ゲノムの解読を始めた。現在、培養6年目、8年目、13年目の個体群から分離された各15クローンのゲノムを読んだ。6年目の分離株（クローン）について言うと、1塩基置換の数は、クローンによる違いはあるが、ゲノム全体で30から84あり、いずれのクローンも1から6の必須遺伝子に変異が入っていた。現在、これらの変異と形質との関連を調べているが、マイクロコズム内の生物的環境（藻類やテトラヒメナとの生物間相互作用）と非生物的環境の多様性の下で、大腸菌個体群（祖先株は1つのクローン）は適応放散と中立的進化によってかなり多様化していることがわかってきた。実際、上記の6年培養後の15の分離クローンには他と同一の配列を持つものはなかった。

今後、藻類やテトラヒメナに関してもゲノムDNAの情報を解析し、共生に関与する遺伝子群や生態的性質

とゲノムDNA情報との関係、またDNA配列の種間の移動の有無などを明らかにしたいと考えている。

筆者は、進化生態学を実験進化と理論の両面からスタートした経歴を持つが、このマイクロコズムの研究を進めていくと、自分の不勉強な分野や性に合わない分野の必要性を日々痛感している。学問の境界は人間が決めたもので、自然現象は簡単に越境していく。様々な分野の方々と共同研究の重要性を痛感する。

おわりに：なぜ生態系における進化？

CETマイクロコズムの研究プロジェクト全体をジグソーパズルに例えると、これまで発表した一つ一つの論文は不完全な小さなものだろう。ただ、これらのピースを地道に繋げ合わせていけば一つの絵が見えてくるかもしれない。何の絵なのだろうか？私は、それは「生態系は構成種を進化させる装置であり、構成種の進化に伴い自らの組成と構造が変化する一つの進化システムである」と観ている。

ダーウィンは「種の起源」の中で、現在の生態系に相当する概念として「自然 (nature)」を用い、それを“絡み合った土手 (entangled bank)”で喩えている。ダーウィンは、自然選択が起こる生態学的状況を細かく分析しているのだが、後の進化生物学者（特に集団遺伝学者）たちにより彼の生態学的視点は捨象され、以下の3つ条件が成り立てば個体群は進化するという形に整理された。すなわち、ある“環境”に置かれた個体群（集団）において、(1) 形態、生理および行動等の形質において異なる個体が集団に存在する（“形質の変異・多様性”）、(2) 異なる形質は異なる生存率と繁殖率を示す（“適応度の差異”）、(3) 親と子の間に形質の相関が存在する（“形質の遺伝”）。これらの条件が成り立てば、個体群は自動的に進化するといわれている。なお、条件1と3は遺伝的形質の変異・多様性の存在として一つにまとめることもできる。

冒頭（はじめに）にも述べたように、環境（いわゆる“選択環境”）とこれら3つの条件の生成に生態系が関与している。上述の研究紹介では、特に、生態系が多様な選択環境を生み出し、それに応じ、共生を含む適応進化が進行する様子が示されたと思う。新しい遺伝

的形質の生成についても、内発的要因（分子・細胞・個体発生レベル）はもちろん重要だが、遺伝子の水平移動や異種個体間の交配による変異の生成、シンビオジェネシス（細胞内共生）なども重要で、これらは構成種の密度や時空間分布を規定している生態系の関与が不可欠である⁴⁾。

CETマイクロコズムを用いた研究はまだ入口であるが、これを一つのパイロットスタディとして批判的に踏み台とすれば、より洗練された実験生態系も様々な形で構築し、仮説検証のツールとしても利用できそうである。

最後に謝辞として、当時研究室に所属していた佐野明子（博士）の執念深いこだわりと努力がなければ、このような“いつ論文が書けるかわからない”研究は不可能であった。また、その後の共生関係の生化学的、生理的な研究を進めたArno Germond（博士）、その他多くの学生が生物間相互作用の研究に貢献している。

参考文献

1. Atwood, K.C., Schneider, L.K. & Ryan, F.J. *Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol.* 16: 345-355. (1951).
2. Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., Whitlock, M. C. *Trends in Ecology and Evolution* 27, 547-560 (2012).
3. Nakajima T., Sano A. & Matsuoka H. *BioSystems* 96, 127-135 (2009).
4. Nakajima, T. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 131, 298-311 (2017).
5. Berninger U.G. & Finlay B., Canter H. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 33, 557-563 (1986).
6. Germond, A. & Nakajima, T. *Biocommunication in ciliates* (Springer), 253-275 (2016).
7. Sano, A., Watanabe, M. & Nakajima, T. *Symbiosis* 47, 151-160 (2009).
8. Nakajima, T., Fujikawa, Y., Matsubara, T., Karita, M. & Sano, A. *BioSystems* 131, 9-21 (2015).
9. Nakajima, T., Matsubara, T., Ohta, Y. & Miyake, D. *BioSystem* 113, 127-139 (2013).
10. Germond, A., Kunihiro, T., Inouhe, M. & Nakajima, T. *BioSystems* 114, 164-171 (2013).

2019年受賞研究

研究奨励賞

微生物集団ゲノミクスの歩みと展望

矢原 耕史

国立感染症研究所

この度は栄えある奨励賞を頂き、大変光栄に、そして励みに思っております。5年前に若手賞を頂いた際にも申し上げましたが、私は、ゲノム微生物学会がまだ、かずさで開かれるワークショップだった頃に大学院に入りました。何とか大学院に行けることが決まって最初に、右も左も分からない中で、ただワクワクして足を運んだのが、そのワークショップでした。いわば、私にとっての原点と言えるこの学会から、こうして再度背中を押して頂いたことになり、本当に有り難く思っております。応援して頂いた先生方に、改めて深く御礼申し上げます。



私は、集団レベルの多数のゲノムデータの比較に基づいて生物学・医学の問題にアプローチする、集団ゲノミクス (population genomics) という領域で、研究の発展に努めてきました。特に、ゲノムの組換え

と、系統関係・集団構造を、微生物学にとって本質的でかつ互いに関係するキーワードだという問題意識を持って、研究を進めてきました。受賞講演では、この5年間に公表してきた9本の論文に基づいて、これまでの研究の流れと、今まさに動いているnext projectとその方向性について、紹介させて頂きました。このニュースレターでも、そのポイントを紹介させて頂きます。

まず、ゲノムの組換えについて。ゲノムの組換えは、進化の原動力であり、細菌の場合には真核生物とは異なる機構で生じます。私が長らく注目してきたのは、他個体由来のDNA断片をゲノムに取り込む形質転換 (図1A) による組換えであり、この数年かけて追い求めた問は、「組換えの強度は、ゲノム全域に渡って、一体どのように変化しているのか」、そして特に「組換えが頻発して見えるホット領域はどのように検出できるのか」 (図1B) という問いです。組換えのホット領域の典型例としては、髄膜炎菌のヒト免疫系と相互作用する膜タンパク質の遺伝子 (tbp) が知られていました。こうした抗原膜タンパク質の遺伝子は一般に、自然選択を受け、細菌の環境適応と進化に重要な役割を果たすと考えられます。しかし、突然変異率がゲノム内の特定の領域で高いことはよく知られている一方、組換えの強度・生じた回数をゲノムに沿って推定することは未解決の難問でした。そのため、ゲノムの中に一体どれだけ組換えのホット領域が存在するかは、大半の細菌種で未解明のままでした。そこで私

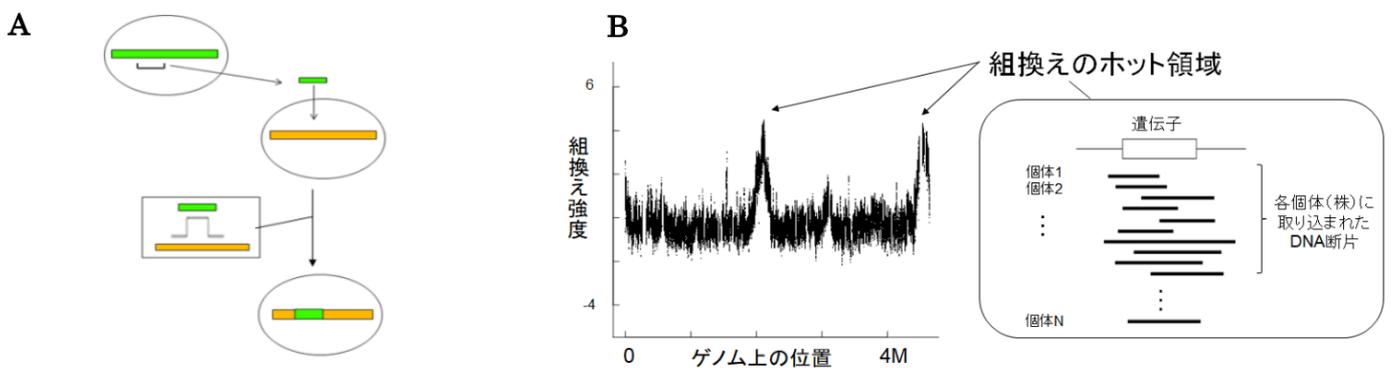


図1. A. 細菌ゲノムの組換え (形質転換の場合) B. ゲノムの組換え強度の分布と、組換えのホット領域 (Yahara et al (2016), Mol. Biol. Evol.および矢原 (2015) 化学と生物 を改変)

は、種内で数十から数百本の集団レベルのゲノムデータから、ゲノムに沿って組換えの強度を1塩基レベルで推定し、ホット領域を推定する手法を、まず開発しました (Yahara et al (2014), Mol. Biol. Evol.)。次に、この手法を私は、オックスフォード大学の有する病原細菌種全般を対象としたゲノムデータベースに適用し、ゲノム内の組換え強度の分布とホット領域の全貌解明と種間比較を行いました (Yahara et al (2016), Mol. Biol. Evol.)。その結果、公衆衛生に重要な10種において細胞表面タンパク質や膜タンパク質の遺伝子がしばしば組換えのホット領域に存在する一方、10種全てで見られた唯一の特徴として、リボソーム遺伝子で組換えの強度が低下していることが明らかになりました。

次に、この手法の開発と応用に基づいて私は、組換えと自然選択・適応進化の関係という生物学の中心的課題にアプローチしました。組換えが適応進化を促進するとすれば、該当領域で組換え率も高いと考えられますが、ゲノムデータからその証拠を示すのは難しく、真核生物ではcontroversialでした。特に、霊長類を対象にdN/dSという多様化選択の指標を吟味した先行研究では、No effect of recombination on the efficacy of selectionという結論が下されていました。細菌に関しても、そもそも定量的な研究はありませんでした。そこで私は、ゲノムの多様性が高く、組換え率が非常に高いことで知られるピロリ菌を材料として、まず、dN/dSが1を超える多様化選択を受けてい

るコドンが、ゲノム内にどう分布しているのかを探りました。その上で、そうしたコドンが、他のコドンよりも頻繁に組換えを受けているように見えるかどうかを探りました。適切な方法論での解析に行きつくまでに数年の時間を要しましたが、最終的に、塩基多様度の効果で調整しても、多様化選択を受けている領域で組換え強度が有意に高いことを示しました (Yahara et al (2016), DNA Res.)。これは、細菌のゲノムデータから初めて定量的に示された、組換えと自然選択の関係についての知見だと言えます。

一方、科研費新学術領域「ネオウイルス学」の公募を契機に、バクテリオファージにも研究対象を広げ、様々な環境から得られた3042サンプルのメタゲノムデータを再解析することで、ゲノムの組換えの痕跡が、どのような系統・遺伝子でどの程度見られるのかを探りました。その結果、ファージのゲノムの組換えは幅広い系統で広く生じており、特に口腔内のファージ (特にその形態形成遺伝子) で高頻度に見られることを明らかにし、それが口腔細菌との進化的軍拡競争を示唆することを示しました (Meier-Kolthoff et al (2018), Sci. Rep.)

次に、系統関係と集団構造に着目した研究について。この路線の研究も、ゲノムの組換えの研究と密接に関係しています。なぜなら、組換えによる系統間のgene flow、および集団間の交雑・admixtureに注目しているからです。その観点からもピロリ菌が有用な研究材料になります。その集団構造は、系統地理的な分

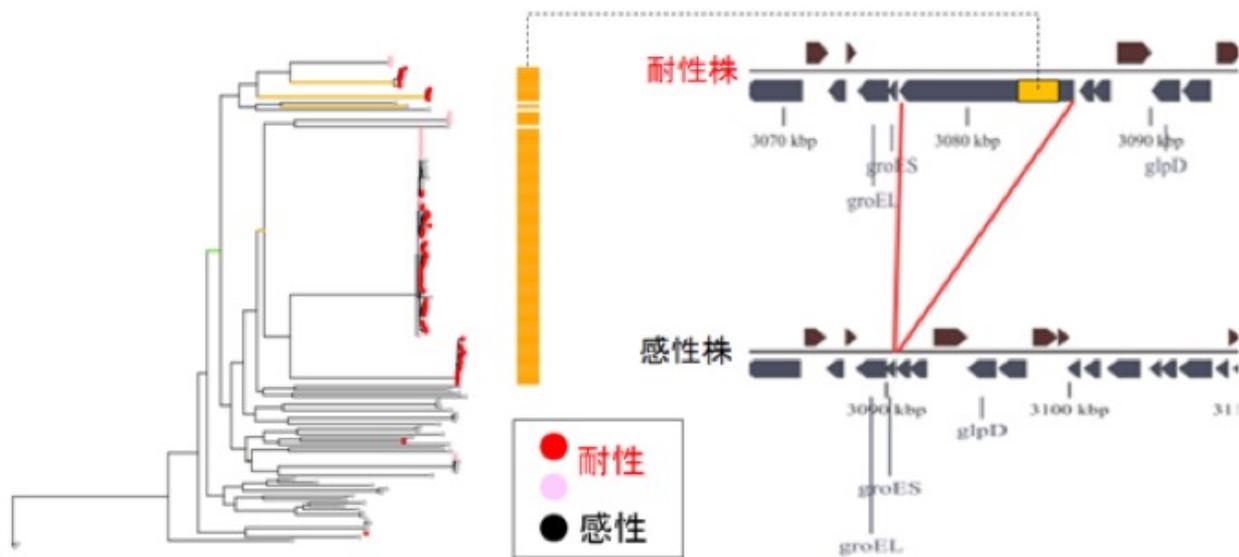


図2. 薬剤耐性菌集団に広く保存された、水平伝達由来の細胞表面接着因子の遺伝子 (Suzuki, Shibayama, Yahara (2016), Sci. Rep.を改変)

化が進んでおり、どの地域の集団が、人類の進化の過程で、いつどのように形成されてきたのについて、これまでトップジャーナルにいろいろな論文が出てきました。しかし、大きく未開拓だったのは、アメリカ大陸のピロリ菌です。従来の定説として、アメリカ大陸のピロリ菌は、基本的にはヨーロッパ型だと考えられてきました。これは自然な考えです。なぜなら、もともとはヨーロッパからアメリカ大陸へと、人類は移住してきたためです。しかし、ゲノムレベルで、アメリカのピロリ菌が、その他の旧世界のピロリ菌と比べてどれだけ分化しているのかは、未解明でした。そこで私は、若手賞で評価して頂いた系統・集団構造の解析手法を改良し、世界各地で分離されたピロリ菌合計400株以上のゲノムデータを解析しました。その結果、新たな分集団構造と、それが形成されるに至る適応進化の過程で鍵となった外膜タンパク質のアミノ酸置換を明らかにしました (Thorell*, Yahara* et al (2017), PLoS Gen.)。さらに、ヘリコバクター属のピロリ菌以外の種 (ヒト以外の様々動物に感染する) にも研究対象を広げ、その詳細な系統関係を初めて明らかにすると同時に、動物の体内でも、重複感染した異なる種間でのゲノムの組換えが広く生じていることを明らかにしました (Smet*, Yahara* et al (2018), ISME)。

一方、集団ゲノミクスの王道の一つと言えるゲノムワイド関連解析 (GWAS) について、細菌のゲノムはダイナミックに変化するためにSNPに限らず、indelや遺伝子の有無を含め、様々な遺伝的変異を統一的・網羅的に同定する必要があります。また、細菌の形成する集団構造 (各株が独立でなく、系統関係を持って相関していること) を考慮して、遺伝子多型と表現型の関連の有意性を統計学的に評価する必要があります。私は、これらの解決のために提案された手法を活用し、临床上最も重要な広域抗菌薬であるカルバペネムの耐性に初めて焦点を当てたGWASを行いました (Suzuki, Shibayama, Yahara (2016), Sci. Rep.)。院内での感染制御に難渋する菌として有名なアシネトバクターを材料に、水平伝達 (他種との組換え) に由来し耐性菌集団に広く保存された細胞表面接着因子の遺伝子 (図2) を同定しました。

さらに、キャンピロバクターを対象に、ニワトリに感染しているキャンピロバクターが、食肉を通じてヒトに感染して食中毒を起こす際、ゲノムにどのような変化を起こすのかを探りました。従来、食中毒を起こ

したヒトから分離される株は、ニワトリから分離される株によく似ていると言われてきましたが、集団レベルのゲノムデータを用いて、1塩基レベルでその違いを探った研究はありませんでした。GWASの結果、ヒトに食中毒を引き起こした株の集団に有意に高頻度に存在する遺伝因子は全てSNPであり、かつ系統特異的なものであることが明らかになりました (Yahara*, Meric* et al (2017), Env. Microbiology)。

約3年前に感染研に異動してから、私は、薬剤耐性菌の全国サーベイランスに注力しています。例えば、院内感染対策サーベイランスJANIS (<https://janis.mhlw.go.jp>) は、すでに2,000以上の病院が参加しており、世界で最も包括的な表現型レベルのサーベイランスとして、WHOからも高く評価されています。ただ、従来は表現型 (薬剤感受性) の電子データだけを収集していました。そこで今後は、特定の基準を満たす菌株を収集し、ゲノム解読を行い、ゲノムと表現型の関係を探ることを可能にします。これは、感染研の同僚が一致団結して進めようとしているビッグプロジェクトであり、その中で私は、情報解析を担います。そして、病原菌の薬剤耐性が、ゲノム組換えと系統関係・集団構造という私のキーワードに直結する課題であるという問題意識に基づいて、新たな研究の発展に努めます。その第一歩として、CDCおよびWHOの警戒リストの中から、私が研究対象としたのは、淋菌です。日本は、第一選択薬への耐性株が初めて分離され、新型も最近分離された国です。その日本で、耐性遺伝子・系統がどれだけ広まり、どのように進化しているのかを、サーベイランスによる各地からの菌株収集とゲノム解読に基づいて、明らかにしました (Yahara et al (2018), Microbial Genomics)。今後は、同様の研究を他の重要な菌種にも展開しながら、将来的には、収集する菌株のタイプと、それが分離された患者さんの予後の関係までを探る、多施設共同の臨床研究を発展させたいと考えています。ゲノム微生物学会の皆様からも、是非応援を頂ければ幸いです。

最後に、私の研究は、多くの共同研究者と同僚、家族、グラント、スパコンシステムに支えられていると改めて思います。その全てに心から感謝しつつ、今回の受賞を励みに、これからも日々精一杯の努力を続けて参ります。今後ともどうぞよろしくお願い申し上げます。

若手賞

微生物ゲノムと微生物群集構造の
多様性に関する研究

東 光一

国立遺伝学研究所 情報研究系 ゲノム進化研究室

この度は名誉ある日本ゲノム微生物学会若手賞を頂き大変光栄に思います。審査員の先生方をはじめ日本ゲノム微生物学会関係者の皆様に深く御礼申し上げます。



地球上にはきわめて多様な微生物がありあらゆる環境に生息しています。私はこのような微生物の膨大な多様性がいかに生成されたのか、なぜ維持されているのかについて興味を持ち、その一端を明らかにするための研究やツール開発を行ってきました。生物多様性には、遺伝的多様性、種多様性、生態系多様性の3つのレベルの多様性があるとされています。本稿では、遺伝的多様性に関する研究として、学生のころに東京工業大学で行なった水平伝播遺伝子の進化の研究、また種多様性・生態系多様性に関する研究として、国立遺伝学研究所で行なった微生物群集構造の大規模データ解析の研究をそれぞれご紹介します。

微生物、とくに細菌や古細菌などの原核生物においては、遺伝子水平伝播 (Horizontal Gene Transfer; HGT) がゲノムの爆発的な多様化を駆動してきたことが知られています。しかしながら、HGTにより獲得した外来性遺伝子の無作為な発現は安定した生命システムの秩序を攪乱し生存を困難にし得るため、HGTは細菌の進化にとって諸刃の剣です。近年、大腸菌においては、核様体タンパク質の一種であるH-NSが外来性DNA配列へ選択的に結合し、その領域の転写を抑制する「サイレンサー」として機能することで、HGTによる破壊的影響を回避していることが明らかとなりました。一方で、外来性因子からの防御という点から見ると制限修飾系をはじめとして細菌は他にも様々な防衛手段を持っていますし、単に外来性因子を排除するだけではHGTによって進化する機会を逸してしまいます。そこで、HGTによる進化が可能であるために

は、外来性遺伝子を宿主のシステムに適切に組み入れるまでの「長期的に安全な保持」が重要であり、H-NSはその役割を担っているのではないかという仮説が提案されてきました。しかしこれまで、H-NSの結合と外来性遺伝子の長期的な進化との関係性についてはよくわかっていませんでした。

そこで私は奈良先端科学技術大学院大学 (当時) の大島拓先生らとの共同研究により、3株の大腸菌染色体上のH-NS結合領域をChIP-seq解析によって高精度に決定し、H-NS結合領域下のDNA配列の進化を詳細に解析しました。その結果、コアゲノム領域におけるH-NSの結合は長期的に高度に維持されていること、そしてH-NS結合領域下においてDNA配列の進化 (多様化) が加速していることを明らかにしました (Higashi et al., 2016, PLoS Genetics)。この結果から、H-NSの結合が外来性遺伝子の長期的な進化に寄与していることを分子進化解析の側面からも示唆することができました。したがって、少なくとも大腸菌においては、獲得された外来性遺伝子を即座に「評価」するのではなく、サイレンシングによって変異が安全に蓄積可能な状況を作り出し、環境変化でH-NSのサイレンシングが解除されたときに評価する、こういった適応度評価の時間的遅延が、HGTによる進化において重要であると思われます。このようなシステムは、外来性遺伝子を既存の転写調節ネットワークに安全に組み込み、様々な環境へ適応する上で非常に優れた手段であると考えられます。

それでは、そもそも微生物が適応し群集として生息する「環境」とはなんでしょうか。漠然とした問いですが、「環境」を整理・分類した体系 (オントロジー) はすでに様々なものが提案されています。しかしながら、人間が認識する「環境」と微生物が適応し群集構造が最適化される「環境」は必ずしも一致しません。人間の環境分類が粗すぎる (「ヒト腸内」でも異なる複数の群集構造パターンが存在する) 場合もあれば、逆に異なる環境で同じ微生物が検出されることもあります。むしろ「環境」は、微生物群集構造のパターンから間接的に定義できるのではないか? 微生物群集は環境の変化に素早く応答して群集構造を変化させるため、十分な量の微生物群集構造データがあれば、そこから逆算的に地球上に存在する「環境」を抽出できるのではないか? そのような問題意識のもと、微生物統合データベース MicrobeDB.jp に蓄積された約3万サンプルのマイクロバイームデータに対して教師なし機

械学習を適用し、潜在的な（直接観測することのできない）環境因子を抽出することを試みました (Higashi et al., 2018, PLoS Computational Biology)。

この研究では、3万サンプルの微生物群集構造データ（メタゲノム・メタ16Sサンプル）と、各サンプルの由来環境について研究者が記述した文書（自然言語）を、統計的潜在意味解析として知られる確率モデルで表現し、微生物群集の形成に影響を及ぼす環境因子を抽出しています。機械学習結果をもとに、環境に対応する微生物を検索する、あるいは逆に微生物から環境を予測するウェブツールLEA (Latent Environment Allocation) を開発しました (図1)。すべてのサンプルは複数の「環境」の混合として表現されています。したがってLEA上でどのような「環境」が接続されているかを見ることで、どのような環境間で連続的な群集構造の変化が見られるかを評価できます。抽出された環境は、土壌、海洋など比較的解釈しやすいものもありますが、ヒト腸内環境は22の異なるパターンの複雑な組み合わせとして表現されました。LEAは <http://leamicrobe.jp> にアクセスすることで自由に使うことができます。微生物系統名で検索することでその微生物がどのような環境に生息するのかを調べたり、メタゲノムサンプルの系統組成データをアップロードしていただくことでそのサンプルがどんな環境に由来す

るのか、LEA上にマッピングする機能も提供しています。LEAは既知の微生物群集構造パターンの全体像です。メタゲノムデータは現在もさらなる勢いで蓄積し続けており、今後も新たなデータを追加してLEAを拡張していくことで、より詳細なパターンが得られることを期待しています。

以上、テーマや手法がやや発散した研究の紹介になってしまいましたが、これらの研究を「微生物の多様性に関する研究」という大きなくくりとして評価していただけたことは大変嬉しく思います。研究をはじめたころ、微生物の膨大な多様性、個々の微生物の名前や生態が到底覚えられないくらいの多様性にたじろぎ、その起源や全体像をなんとか把握したいという思いを持ってこれまで研究を行ってまいりました。今後も加速度的に増大する大量データと格闘しながら、微生物多様性の全容を明らかにしていきたいと考えています。

本研究を行うにあたって、黒川顕先生（現・国立遺伝学研究所）、大島拓先生（現・富山県立大学）、小笠原直毅先生および研究室のみなさま、戸邊亨先生（大阪大学）、鈴木稯先生（東京大学）、金井昭教先生（広島大学）、丸山史人先生（京都大学）をはじめ、多くの先生方にご指導・ご支援を賜りました。心より感謝申し上げます。

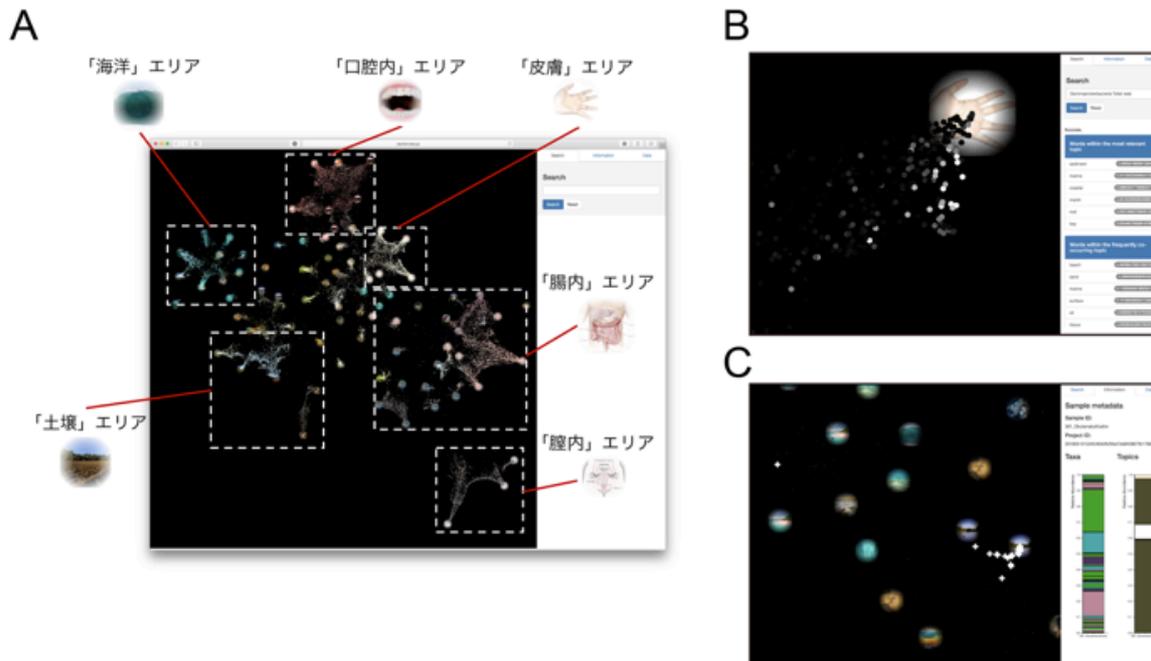


図1. ウェブアプリケーション LEA

A. 3万サンプルの全体像

B. サンプル検索の例。「Toilet seat + Gammaproteobacteria」による検索でハイライトされるサンプル

C. ユーザサンプルのマッピング例。多摩川河川マイクロバイオーームデータのマッピング

第13回年会におけるポスター賞

最優秀ポスター賞

マイクロインジェクションによる バクテリア細胞への長鎖DNA導入 システムの構築

高橋沙和子

富山県立大学工学研究科生物工学専攻

近年、人工細胞を創る研究が活発に行われており、人工的にデザインされたゲノムDNAをもつ生物の創生への関心が高まっている。人工細胞の実現への第一歩として、デザインされたDNAを膜に囲まれた細胞に導入する必要がある。外来性の



ゲノムDNAをバクテリア細胞内に導入する研究は、アメリカのベンター研究所や慶応義塾大学の板谷先生らによって行われている。本研究室では、1度の操作で、1細胞に対しDNA溶液を直接注入できるマイクロインジェクションに注目した。マイクロインジェクションは、マイクロマニピュレータ装置(図1)を用いて、針を細胞内に挿入する必要があるため、真核生物の卵細胞などの直径が数十 μm を超える細胞に対して行われている。一般的なバクテリア細胞の大きさは数 μm であるため、マイクロインジェクション操作に適用できなかった。私の知る限りにおいて、マイクロインジェクションによってDNAやRNA、タンパク質をバクテリア細胞に導入した報告はない。一方、パッチクランプ法による膜輸送タンパク質の活性測定などの目的で、バクテリア細胞の巨大化が行われている。私は、細胞の巨大化方法を工夫して、マイクロインジェクション可能なバクテリア細胞を創ることに取り組んだ。

本研究室では、*Bacillus subtilis*や*Deinococcus grandis*、*Escherichia coli*を含む様々な種類のバクテリ

アを巨大化している(図2)。リゾチームやペニシリンによってスフェロプラストおよびプロトプラストにした細胞を、細胞壁合成阻害剤であるペニシリンを添加したDifco Marine Broth (DMB)で培養することで巨大化している。本研究では、ペニシリンを含むDMB中で内膜直径10~15 μm まで巨大化したグラム陰性の*Lelliottia amnigena*およびグラム陽性の*Enterococcus faecalis*を使用した。

*L. amnigena*は、腸内細菌科に属する桿菌である。DMBで巨大化すると、外膜の方が内膜よりも伸長速度が速いためそれらが乖離し、通常では生じない大きなペリプラズム空間を形成する。内膜の内側には液胞を形成し、細胞質は内膜と液胞の間に存在する。よって、DNAを導入する際、液胞を避けて限られた細胞質に入れる必要がある。DMBで巨大化した*L. amnigena*を用いて、青色蛍光タンパク質(BFP)溶液のマイクロインジェクションに取り組んだ。細胞の固定には、孔径6 μm と15 μm のピペットを細胞の大きさに合わせて使い、蛍光タンパク質溶液の注入には、孔径0.5 μm のインジェクション針を使用した(図1)。しかし、ペニシリンを含むDMBで巨大化した*L. amnigena*の内膜は、針の挿入に耐えられず、マイクロインジェクションに適していなかった。一方、本研究室では、巨大化には Ca^{2+} や Mg^{2+} などの金属イオンが

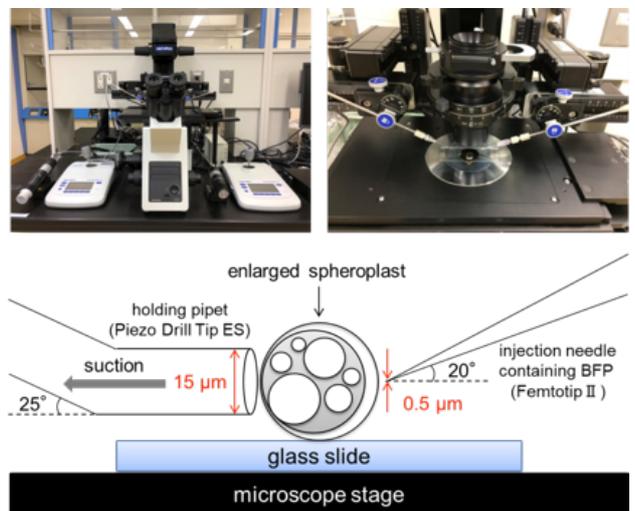


図1. バクテリア細胞へのマイクロマニピュレーション

重要な役割を担っていること、巨大化にともなって、細胞膜の脂質組成が変化することを明らかにしている。そこで、*L. amnigena*における巨大化培地の金属塩組成を考慮し、マイクロインジェクションに適した膜を持つ細胞をつくる条件を検討した。その結果、*L. amnigena*の巨大化は、 Ca^{2+} の影響を強く受けることが分かり、最終的に3つの金属イオン Ca^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+} を含む培地において、内膜と外膜が同調して巨大化し、20 μm を超える巨大化細胞が得られた。この細胞は、9個全ての細胞にインジェクション針を刺すことができ、9個中6個の細胞は、注入量が多く破裂したが、3個の細胞にBFP溶液を注入することができた。よって、金属塩の組成を考慮することでマイクロインジェクション可能な細胞を創ることに成功した。

*E. faecalis*は、エンテロコッカス科に属する乳酸球菌である。ペニシリンを含むDMBで巨大化すると、*L. amnigena*と同様に細胞膜の内側に液胞を形成した。一方、電子顕微鏡観察によって、*E. faecalis*の巨大化細胞は球状の液胞の他に、ゴルジ体のような円盤状の構造体を有することがわかった。この円盤状の構造体は、*L. amnigena*では見られず、*E. faecalis*に特徴的な構造であった。*E. faecalis*の巨大化におけるタイムラプス撮影より、液胞が突然現れる姿を捉えたことから、円盤状の構造体は、未熟な液胞であり、内部に水分を取り入れることで球状の液胞になることが示唆された。ペニシリンを含むDMBで巨大化した*E. faecalis*は、金属塩組成を考慮しなくても、マイクロインジェクションに適しており、BFP溶液を注入できた。次に、巨大化した*E. faecalis*のプロトプラストに対して、*E. faecalis*

のプロモーターの下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をコードするDNA断片をマイクロインジェクションし、その細胞からのGFP蛍光を確認した。このことは、インジェクションしたDNAに対しての転写・翻訳が行われたことを示し、生きたバクテリア細胞へのマイクロインジェクションの成功を意味している。今後は、この巨大化細胞にデザインされたゲノムDNAを導入し、そのゲノムDNAで制御される細胞の創生に取り組んでいく。

最後に、本研究に関しまして、魂のこもったご指導ご鞭撻を賜りました富山県立大学工学部生物工学科応用生物情報学講座 西田洋巳 教授に心より深く感謝致します。また、日頃の研究室にて助言を賜り、丁寧に指導して下さいました大島拓 准教授、高橋裕里香 助教を始めとする研究室の皆さまに御礼申し上げます。そして、共にマイクロインジェクション実験に励んだ水間真鈴さん、上慧さんに深く感謝いたします。最優秀ポスター賞の名に恥じないよう、今後とも真摯に研究と向き合っていきます。

優秀ポスター賞

大規模ゲノム変異で解き明かす バクテリアゲノムの可塑性

河野 暢明

慶應義塾大学

2017年に1,003種のバクテリア・アーキアゲノムがたった一本の論文で発表された (Mukherjee, et al., 2017)。シーケンス技術の発展が対象生物とゲノム情報の距離を縮め、分子生物学でゲノム情報がない微生物研究がそもそも存在し得なくなりつつある中で、ついにモデル生物という大きなボトルネックが解消されようとしている。モデル生物の存在は当該分野の発展に大きな貢献をしてきたことは疑いようがない。しかし問題となるのが、そのモデル生物と呼ばれる生物が地球型生物の理想形として整理されて来たバーチャルな存在ではなく、実際に存在している一生物であるという点である。モデル生物とは様々な要因で選択されてきてはいるが、生物学的には一例として使われてい

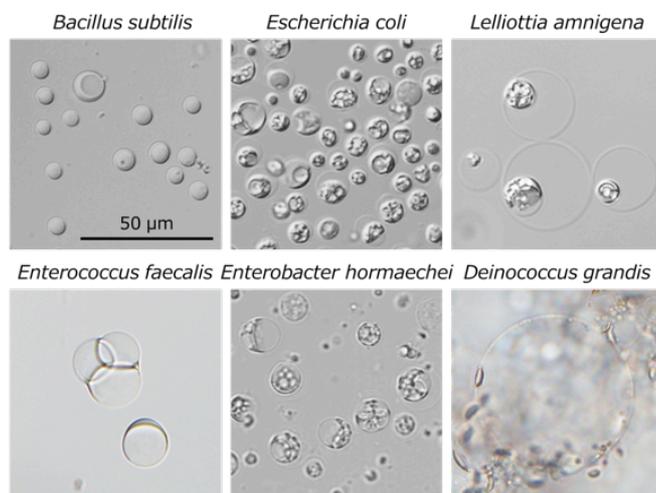


図2. DMBで巨大化したバクテリア細胞の顕微鏡観察写真

るだけであり、そのパラメーターは決して平均的なテストケースとして考えられるものではない。ゲノムにまつわる情報の蓄積は種の多様性を明らかにすることで、モデル生物の問題点をしっかりと浮き彫りにしてきた。その結果、これまで非モデルとして特別視されて来た生物たちも脚光をあびる様になり、様々なシーンで比較解析され始めた。モデル生物に関わるボトルネックの解消は、対象「生物」よりも対象「現象」に着目した研究を多く推進することになるだろう。

こうした背景のもと、明らかになって来た多様性の一つにゲノム構造がある。バクテリアのゲノムには様々なスケールの構造が備わっており、環状染色体上の複製開始・終結点を結ぶ対称軸、GC skewなどで表現される塩基組成の偏り、またゲノム全体に秩序立って分布しているモチーフ配列などがある。これらゲノム構造はゲノム解析の初期からよく知られており、特にモデル生物である大腸菌などで明確に確認できたことから一般化されて語られていた。しかしながら、ゲノム解析が進むにつれ、実はゲノム構造は画一的なも

のではなく、中にはそれほど多くのバクテリアにそもそも備わってないものなどもあることがわかってきた。そして同時にゲノム構造は遺伝子配列のコドンなどと同じように、もっと柔軟に各生物が自身の生活に最適化させて来た結果であったこともわかって来た。しかしながらゲノム構造は模様のように存在しているに過ぎず、その機能性や制御の必要性まではあまり大きく議論されてこなかった。もしここで、ゲノム構造が持つ可塑性を定量的に明らかにすることができれば、バクテリアがこれまで取って来た進化の戦略を追求だけでなく、全ゲノム合成が実現する様な時代を見据えたときに、そのデザイン指針に大きく貢献することになるだろう。

それに向けた取り組みとして我々はゲノム対称軸の役割と、それに伴う塩基組成の偏りに関する機能解明を目指した。複製開始・終結点を結ぶ対称軸の乱れは生育に影響を与えることが知られており、その原因として非対称性が生む非効率な複製が考えられた。そこで細胞内の複製挙動を観察する技術を開発し (Kono,

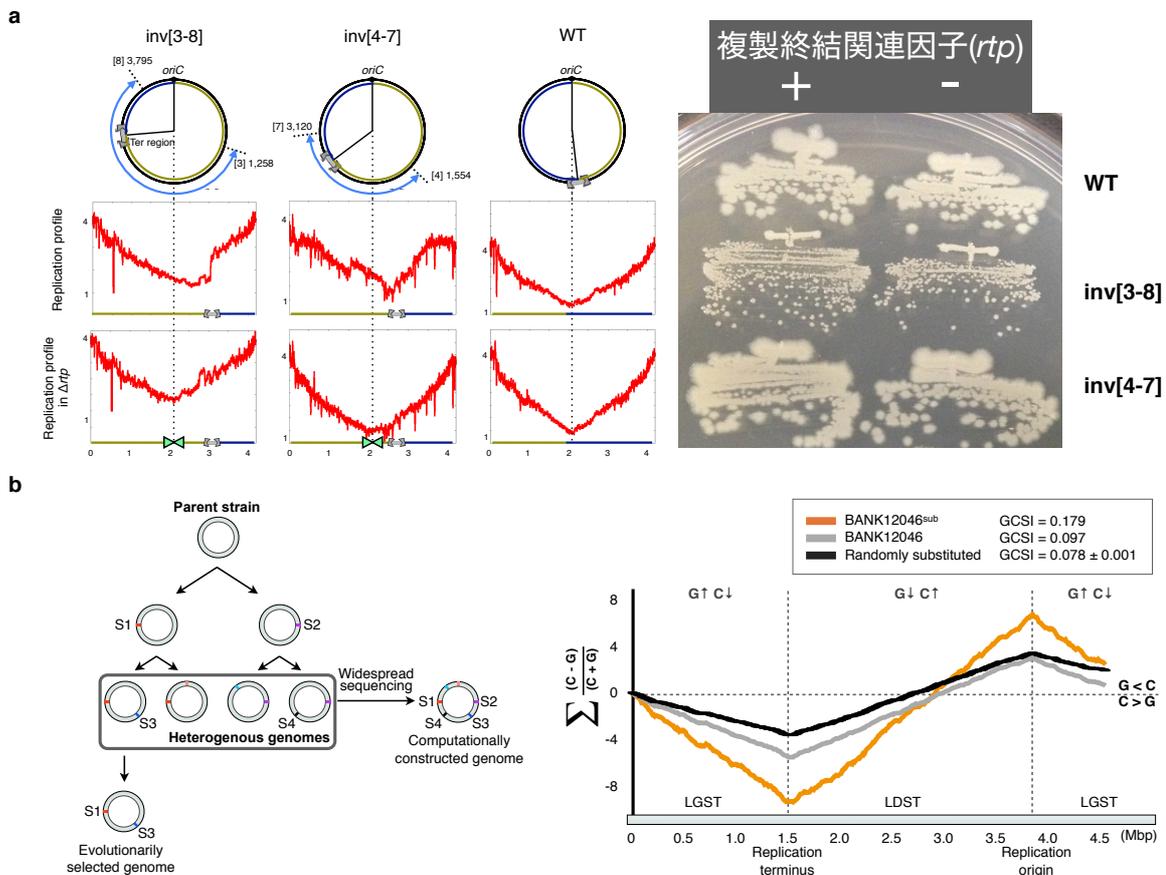


図1. a) Kono, *et al.*, 2014より一部改定。メガスケールの逆位変異によって大きく変わった複製プロファイルに対して、終結因子の*rtp*遺伝子を欠損させたところ、プロファイルが元に戻る様子が観察された。しかし、右図の通り増殖への影響はなかった。b) Kono, *et al.*, 2018より一部改定。実験室進化の変異を網羅的に収集できる手法を開発し、右図の通り実験的にGC skew改変に成功した。

et al., 2017)、大規模な逆位変異で対称構造が乱れた枯草菌ゲノムを観察した。その結果、複製は確かに非効率に実施されていることが確認された。しかし同時に、その挙動が複製終結関連因子の影響を強く受けていることが確認された。複製終結関連因子は複製を効率的に終結させるために複製開始点とほぼ対称の位置に設置されているため、逆位変異によってその装置が移動することで、非効率な複製を引き起こしていたことが考えられた。実際にこの因子を欠損させると複製は野生型と同様の綺麗な対称性を持った挙動に戻り、複製開始点と対称の位置という特徴以外特に配列的な特徴などない領域が新たに複製終結点として機能したことが確認された (Kono, et al., 2014)。しかしながら興味深いことに、複製終結関連因子は特に複製が早い大腸菌や枯草菌に観察されながらも、すべてのバクテリアでその存在が確認されているわけではない。さらに複製挙動が綺麗に戻ったとしても野生株ほど増殖効率は回復しなかった (図1a)。以上より、実は複製開始・終結点の対称軸はほとんどの生物では影響を及ぼさないほどの存在であり、増殖の早い種では複製以降のカスケードで効果を発揮する構造であったことを実験的に観察できた。次に我々はよりミクロな構造になる塩基組成の偏りがどのような生命システムによって形成されてきたのかを確認した。本来実験室進化はとても長い培養時間を必要とし、生物が経て来た進化をトレースするのは現時的な時間単位では不可能であった。そこで我々はQEM (Ultra-sensitive quantification of heterogenous mutations) 法という手法を開発することで、擬似的に実験室進化を加速化させることで偏った塩基組成の再現に成功した。QEM法はheterogeneousなゲノムプールを一括シーケンスし、得られたリード情報から多様な変異箇所を網羅的に収集する手法で、擬似的に超長期間の実験室進化を再現することができる (図1b)。その結果、塩基組成の偏りは転写機構などとはほとんど関係なく、複製機構によって主導されて来た進化の軌跡であったことを証明できた (Kono, et al., 2018)。

多様なゲノムが読まれる様になった事でゲノム構造の多様性が明らかになり、大規模な比較解析が可能になってきた。そうした中からゲノム構造に備わっている本質的な機能が浮き出てきている。いま我々はゲノムを情報として享受し、局所的な編集・改変でバイオ

テクノロジーを進めてきている。しかし将来、そのゲノムを人工的に制御する様な世界をイメージした時、きっとこのゲノム構造の機能やそのデザイン性が求められる日が来るだろう。

参考文献

1. Kono, et al., (2014) Undesigned selection for replication termination of bacterial chromosomes. *Journal of Molecular Biology* 426(16), 2918-2927.
2. Kono, et al., (2017) eRP arrangement: a strategy for assembled genomic contig rearrangement based on replication profiling in bacteria. *BMC Genomics* 18(1): 784.
3. Kono, et al., (2018) Accelerated laboratory evolution reveals the influence of replication on the GC skew in *Escherichia coli*. *Genome Biology and Evolution* 10(11):3110-3117.
4. Mukherjee, et al., (2017) 1,003 reference genomes of bacterial and archaeal isolates expand coverage of the tree of life. *Nature biotechnology* 35(7), 676-683.

優秀ポスター賞

酵母のフェロモンが多様化する 仕組みを実験的に探る

清家 泰介

理化学研究所・基礎科学特別研究員

RIKEN, Center for Biosystems Dynamics
Research

酵母にも、動物と同じように性別があるのをご存知ですか？ 私がこれまでずっと研究対象にしている分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* では、プラス (Plus)型とマイナス (Minus)型と呼ばれています。動物では雄と雌

で外観が異なっているのが普通ですが、*S. pombe*は見ただけでは性別は判りません。しかし、必ずP型とM型の細胞の間で交配し、子孫にあたる胞子を作ります。この識別に重要なのは「性フェロモン」と呼ばれる物質です。酵母のフェロモンはアミノ酸がつながったペプチドで、これが異性細胞の細胞膜にある受容体



に結合します。フェロモンを受容した細胞は「異性が近くにゐるぞー」と俄然張り切って交配相手を探ようになります。フェロモンの構造が変わると、受容体とは結合できなくなるので、いわば「鍵と鍵穴」の関係と言えます。そのため、フェロモンの構造が違う酵母とは交配できません。この「厳密性」が同種間での交配を確実にしており、他種からの生殖隔離 (=2つの個体群の間で何かしらの原因により交配が行われない状態)に役立っています。

ではフェロモンを無理やり変えてやるとどうなるでしょうか?受容体に結合できなくなり、酵母は交配できなくなるはずですが。私は学生時代に、*S. pombe*のM型フェロモンとその受容体の遺伝子を人工的に改変することにより、野生型から生殖隔離された「新しい酵

母」を実験室で作ることに成功しました (Seike et al., PNAS, 2015; ニュースレターNo.5, 17でも詳しく解説していますので興味のある方は是非ご覧ください)。このいわゆる「鍵と鍵穴」が変化した酵母は、元の野生型酵母とは決して交配せず、あたかも別種のように振る舞います。つまり、このことはフェロモンとその受容体の組み合わせが変化すれば、生殖隔離が生じ、結果として新しい種が生まれる可能性があることを示唆しています。

しかし、フェロモンが変わると異性から正しく認識されなくなり、集団からは淘汰されてしまうリスクがあります。では、自然界でフェロモンの多様性はどのようにして生まれるのでしょうか? 私はその手がかりを探るべく、世界各地から単離された*S. pombe*の野生株 (150種類)を対象に、フェロモンとその受容体の遺伝子のシーケンス解析を行いました。すると面白いことに、M型フェロモンとその受容体のアミノ酸配列は完全に保存されていたのに対し、P型フェロモンとその受容体は大きく変化し、多様化していました (Seike et al., PLoS Biol, 2019; ニュースレターNo.17も合わせてご覧ください)。この2つのフェロモンに見られる多様性の違いは、同じ属の近縁種である*S. octosporus*や*S. cryophilus*にも見られる普遍的な現象でした (Seike et al., Microbial Cell, 2019)。つまり、分裂酵母ではM型フェロモンとその受容体のペアは厳密に保たれていますが、P型フェロモンとその受容体のペアは比較的柔軟性に富んでおり、どうやらその認識も曖昧なようです。最近、これを強く示唆する2つの実験データを得ました。

1) P型フェロモンは種を超えて作用する。

*S. pombe*と*S. octosporus*の細胞の間で、フェロモンの遺伝子を相互に交換しました。その結果、M型フェロモンの遺伝子を入れ替えると全く交配できませんでしたが、P型フェロモンの遺伝子を入れ替えても、交配することができました (Seike et al., PLoS Biol, 2019) (図1)。言い換えれば、P型フェロモンは同種のものである必要はなく、たとえ別種のもでも構わないということです。これはP型フェロモンの受容体における特異性の低さが原因だろうと推測しています。

2) M型フェロモンが種の認識に必須である。

P型フェロモンは修飾を受けない単純ペプチドですが、M型フェロモンはC末端のシステイン残基がファ

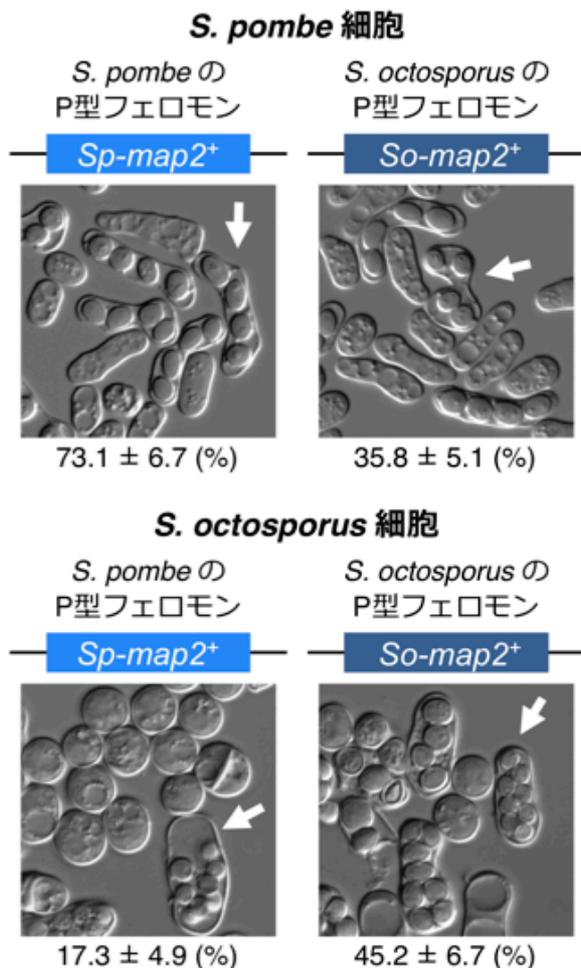


図1. *S. pombe*と*S. octosporus*の間でP型フェロモンの遺伝子を交換した場合のそれぞれの交配率 (%)
 矢印は代表的な胞子を含む子嚢を示しており、確かに交配が生じていることが分かる。map2+はP型フェロモンの構造遺伝子である。

ルネシル化された脂質ペプチドです。このようなフェロモンの化学構造の非対称性は、酵母を含む子囊菌類全般で保存されています (Seike, Curr Genet, 2019)。この非対称性が必須なのかを調べるために、P型細胞およびM型細胞のフェロモンの受容体の発現を人工的に操作し、自身の分泌するフェロモンにのみ反応する「オートクリン」細胞を作製しました。面白いことに、オートクリンM型細胞はP型細胞と交配できましたが、オートクリンP型細胞はM型細胞とは決して交配できませんでした (Seike et al., BioRxiv, 2019)。おそらく酵母は脂質ペプチドのM型フェロモンを使って、異性を厳密に認識しているのだと考えられます。

以上のことから、酵母のフェロモン認識機構には「厳密さ」と「柔軟さ」の両方を備えていることが段々と分かってきました。このシステムは同種間の交配を保ちつつも、フェロモンの多様性を生み出すことを可能にしていると考えられます。こうして、変化したフェロモンを特異的に認識できるように変化した受容体が集団内に出現すると、それらの子孫は元の集団から隔離され、新たな種として進化していくのかもしれませんが、これまで、交配という重要なイベントを司るフェロモンの認識は厳密であると考えられてきましたが、同時に「曖昧さ」も備わっており、これが生物の進化の原動力になっているのではないかと想像を膨らましています。今後は、片方の「鍵と鍵穴」の認識を(わざと?)緩くしておくことに、どういう生物学的なメリットがあるのかを実験的に解明していきたいと思っています。

おわりに: この度は、優秀ポスター賞に選んでいただき、投票して下さった方々、そして学会関係者の皆さまに厚くお礼申し上げます。本研究は、国立遺伝学研究所の仁木宏典先生、大阪市立大学の下田親先生、東京大学・理化学研究所の古澤力先生と共同で行われたもので、これら3人の先生方ならびに研究室の方々に深く感謝致します。ポスター討論では多くの方々に来ていただき、非常に貴重なコメントをいただきました。ぜひ今後の研究に生かし、これからも面白いと思っただけのような研究を続けていきたいと思っています。

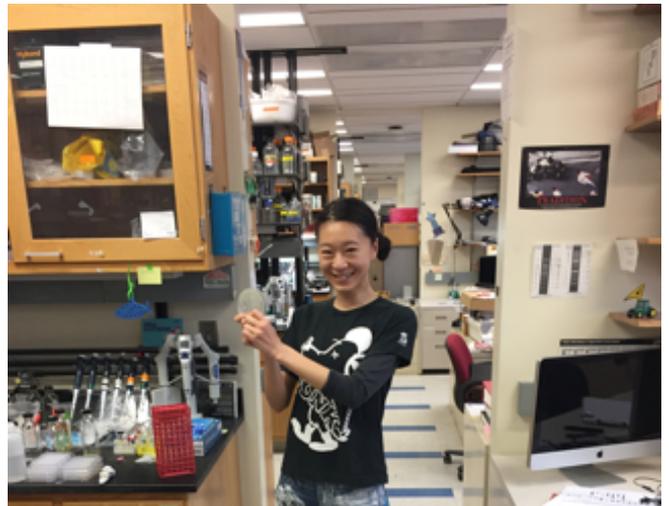
優秀ポスター賞

大腸菌におけるギ酸依存的な尿酸分解に関する遺伝子群の同定

岩館 佑未

イリノイ大学 分子・細胞生物学研究科 微生物学専攻

尿酸はプリン的一种で、核酸の異化代謝などによって生じます。これまで細菌・古細菌・真核生物で尿酸を分解する酵素が同定されてきましたが、全て酸素を必要とする反応を触媒するものであり、多くの通性嫌気性細菌や嫌気性細菌における、酸素を必要としない尿酸の分解経路については知られていませんでした。私は、嫌気または微好気条件で大腸菌が尿酸の分解活性を示すことを初めて明らかにし、尿酸の分解に関与する一部の遺伝子群を同定しました (Iwadate and Kato, J. Bacteriol., 2019)。研究を始めた当初は、大腸菌の酸化ストレス耐性の解析を目的としていたのですが、研究を進めることによって尿酸の分解活性の発見に至りましたので、その経緯を順を追って紹介したいと思います。



私たちはこれまでに、大腸菌のゲノム縮小株を利用して、種々の新規な酸化ストレス耐性機構を明らかにしてきました (Iwadate et al., FEMS Microbiol Lett., 2011; Iwadate et al., FEMS Microbiol Lett. 2017; Iwadate and Kato, Microbiology, 2017)。ゲノム縮小株を用いて、細胞内で活性酸素種を発生させるメナジオン耐性

に關する機能未知遺伝子*aegA*を同定していました。*aegA*がコードするタンパク質は、N末端側は電子伝達に關するフェレドキシンと、C末端側は窒素代謝に關するグルタミン酸合成酵素と、それぞれ高いホモロジーを持ちます。大腸菌のゲノムから*aegA*と高い相同性を持つ*ygfT*も見出してました。詳細な解析を行ったところ、微好気および嫌気条件で両遺伝子の発現量が増大することがわかりました。また*ygfT*遺伝子は尿酸のトランスポーターの遺伝子の隣に位置することから、尿酸への応答を調べたところ、*ygfT*は尿酸によって発現が誘導されることがわかりました。そこで*aegA*、*ygfT*変異株について尿酸を単一窒素源とした時の生育について調べたところ、*aegA*と*ygfT*の二重欠損株では尿酸依存的な増殖が見られず、培地中の尿酸量の減少も認められないことから、*aegA*、*ygfT*が尿酸分解に關与することがわかりました。

さらに機能的に關連する遺伝子群の解析から、*aegA* および*ygfT*が關する尿酸の分解にはギ酸およびギ酸脱水素酵素Hが關与することも明らかになりました。

図1に示したように、ギ酸脱水素酵素Hはギ酸からAegAまたはYgfTへ電子を受け渡す役割を果たし、AegAやYgfTは受け取った電子を、NADP⁺と他の酵素に渡す役割をしていることを考えています。

これまで種々の生物の尿酸分解については好気的な代謝経路が同定されていましたが、本研究により通性嫌気性および嫌気性細菌においても尿酸が重要な窒素源として利用され、新規な代謝経路が存在することが示唆されました。またこの代謝経路に關するAegA、YgfTは余剰な電子を尿酸分解経路により処理することで活性酸素種の発生を抑える酸化ストレス耐性機構としても機能している可能性が考えられました。私はこれまで大腸菌をモデルとして広義の酸化ストレス耐性機構について研究し、代謝によって生じた電子を、活性酸素を産生させないように処理することが重要であることを明らかにしてきましたが、今回は逆に酸化ストレス耐性機構から新規代謝経路の同定につながりました。

今回の学会で発表した内容は、嫌気的な環境における尿酸の分解に關する最初の知見であり、まだ多くの謎が残されています。例えば、尿酸を分解する酵素は何なのか、どのようにギ酸から尿酸まで電子が流れて

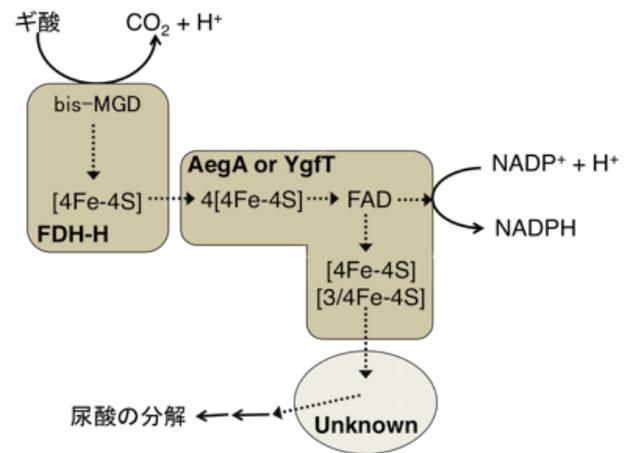


図1. ギ酸依存的な尿酸分解に關するギ酸脱水素酵素-H, AegA および YgfTのモデル (点線は、電子の流れを示しています。)

いるのかという点が未解明です。さらに、*aegA*と*ygfT*遺伝子以外にも、尿酸の分解に必要な遺伝子群も同定しましたが、これらが尿酸分解のどのステップに關与するのかもまだ明らかになっていません。今後はギ酸脱水素酵素-HやAegA、YgfT、他の關連する酵素群について、特に嫌気的な環境での電子伝達活性や尿酸の分解活性を生化学的に調べていきたいと考えています。

今回紹介させていただいた研究は、博士課程まで所属していた首都大学東京の加藤潤一教授の研究室で行っていたものです。ゲノム微生物学会年会では、口頭発表やポスター発表を聞きに来てくださった方々とディスカッションし、貴重なアドバイスをたくさんいただくことができました。ありがとうございました。これまで、大腸菌をモデルに細菌が持つ生存・ストレス耐性の機構について、試験管内で培養する実験系を使って研究してきましたが、現在はイリノイ大学でサルモネラをモデルに、宿主内での生存や病原性の發揮に必要な遺伝子群の探索を行っています。マウスを用いた実験系を使うことで、これまでの研究を応用面も含めてさらに発展させていきたいと思っています。

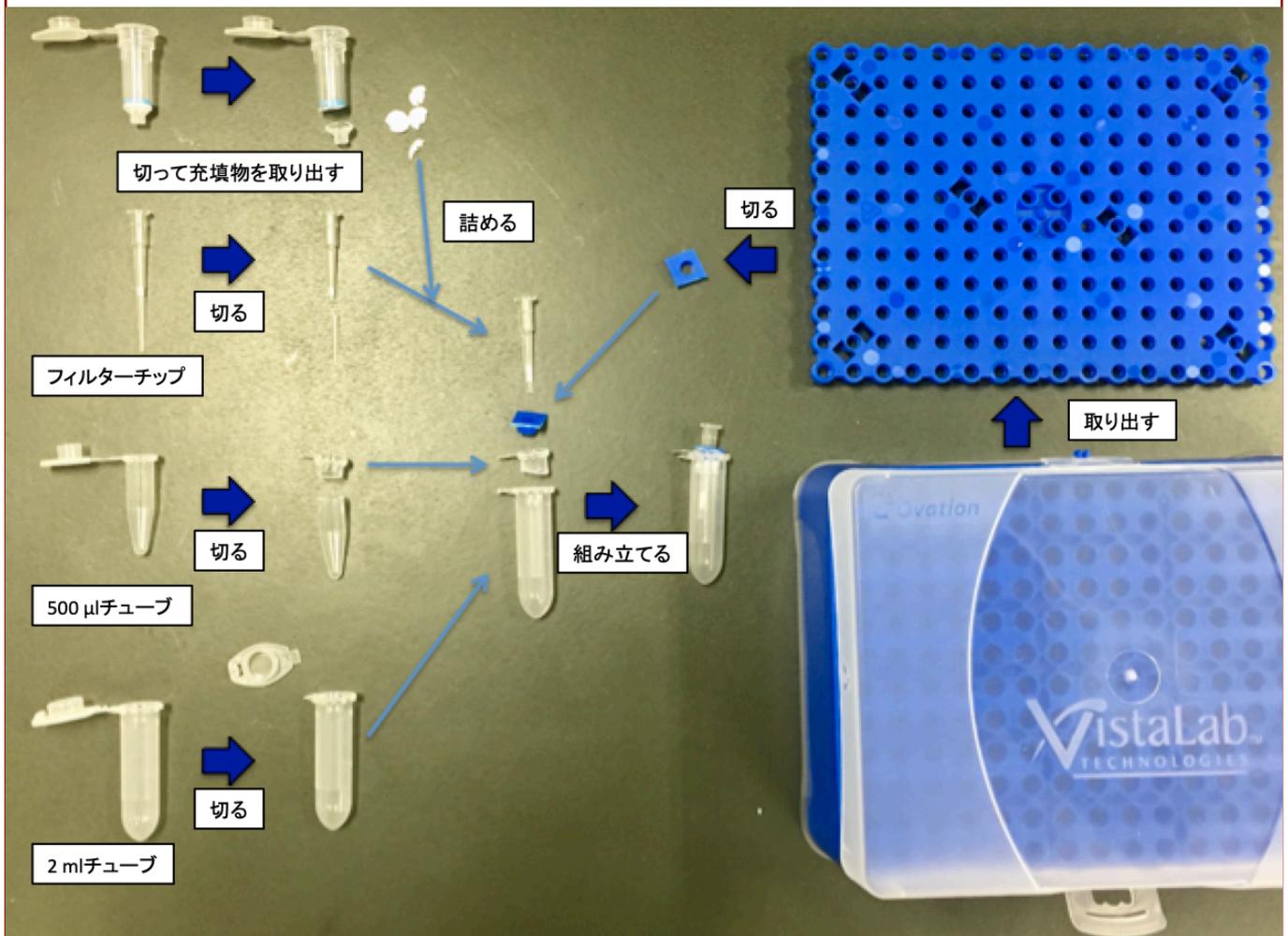
実験技術紹介コーナー

DNA精製用ミニカラムの作り方

DNAの精製にカラム精製を用いている人が多いのではないのでしょうか。今回のこのコーナーでは自作のミニカラムについて紹介します。ミニカラム使用のメリットは、少ない溶出液量で溶出できること(つまりDNA濃度を高くできます)、wash bufferのキャリーオーバーを減らせることの2点です。作り方については図を見てください。使用したのはフィルターチップ (VistaRak Cat No:4060-1333)とRBC Bioscience社のカラム精製キット (Cat. No. YDF300; 輸入販売サイトローブ社)です。大坪

Tips

- (1) 1つのDNA精製カラムから5から8個程度を作っています。
- (2) チップラックを切ったときに、穴の形状がフィットしないものがあります。
- (3) 切断にはキレイなカッターナイフ、ハサミを使います。
- (4) 充填物をフィルターチップ上部に詰めるには、同じチップを使うと良いです。
- (5) 遠心して使います。
- (6) カラム上部のスペースに添加できる液体量は90 μ l程度です。
- (7) 溶出するときは、新しい500 μ lチューブ(切っていないもの)を使います。
- (8) 2 μ l程度で溶出できます。



閑話休題

— その7 — 春・夏の花々

ここに掲載したのは春から夏に咲く花々の写真です。ここ2-3年は個人的な理由から出歩けるのがほとんど神戸近傍に限られているため、市街地に咲く帰化植物の花が多いですが、しかしそれらに混じって、今では見ることが難しくなった日本古来のミミナグサもあります。これを裏六甲で見つけた時はとても嬉しくなりました。(磯野克己)



ミミナグサ (ナデシコ科) : *Cerastium fontanum* subsp. *vulgare* var. *angustifolium* Hara 2018.6.9 裏六甲



ピレネーフウロ (フウロソウ科) : *Geranium pyrenaicum* Burm. f. 2017.4.9 神戸市



アメリカスミレサイシン (スミレ科) : *Viola sororia* Willd. 2019.4.15 神戸市



オオカワヂシャ (ゴマノハグサ科) : *Veronica anagallis-aquarica* L. 2019.4.15 神戸市



シロバナタンポポ (キク科) : *Taraxacum albidum* Dahlst. 2019.3.31 神戸市



イブキジャコウソウ (シソ科) : *Thymus quiquecostatus* Celak. 2017.7.22 伊吹山

第14回日本ゲノム微生物学会年会のお知らせ

第14回日本ゲノム微生物学会年会を2020年3月6日(金)～8日(日)の3日間、愛知県産業労働センター「ウインクあいち」にて開催いたします。会場は名古屋駅から至近距離にあり大変便利のよいところです。口頭発表は801席のメインホールで、それ以外のポスター発表、企業展示などは全て広い展示場1フロアに集約して開催する予定です。会員間の活発な交流が期待されます。

本学会を名古屋で開催するのは初となりますので、ぜひ全国から多くの皆様をお迎えしたいと思います。学会では、「ゲノムと微生物」をキーワードに最新研究成果の披露と活発な研究交流を、空いた時間には、「尾張名物・名古屋めし」などもお楽しみ下さい。詳細につきましては、ホームページに掲載して参ります。組織委員一同、名古屋で皆様にお会いできるのを楽しみにしています。

(年会長：饗場浩文、組織委員：井原邦夫、内山郁夫、加藤雅士、広瀬侑、藤田祐一)



学会の現況

学会役員 (敬称略)

会長：仁木宏典

庶務・会計幹事：黒川顕、相馬亜希子 集会幹事：大島拓、永田裕二 広報幹事：黒川顕、大西康夫
 ニュースレター幹事：佐藤勉、相馬亜希子、大坪嘉行、広瀬侑、佐々木裕子 男女共同参画幹事：
 佐々木裕子、矢原耕史

評議員 (会長推薦を含む)：饗場浩文(評議会議長)、跡見晴幸、有田正規、板谷光泰、小椋義俊、
 加藤潤一、高見英人、中村保一、丸山史人、森浩禎、吉田健一、渡辺智、片山勉、北川正成、
 應蓓文、得平茂樹

会計監査：塩見大輔、田中寛

会員の動向

会員数 510 名 (令和元年5月現在)

名誉会員3名；一般会員 361名；学生会員 132名

賛助会員 13 団体；機関会員 1 団体