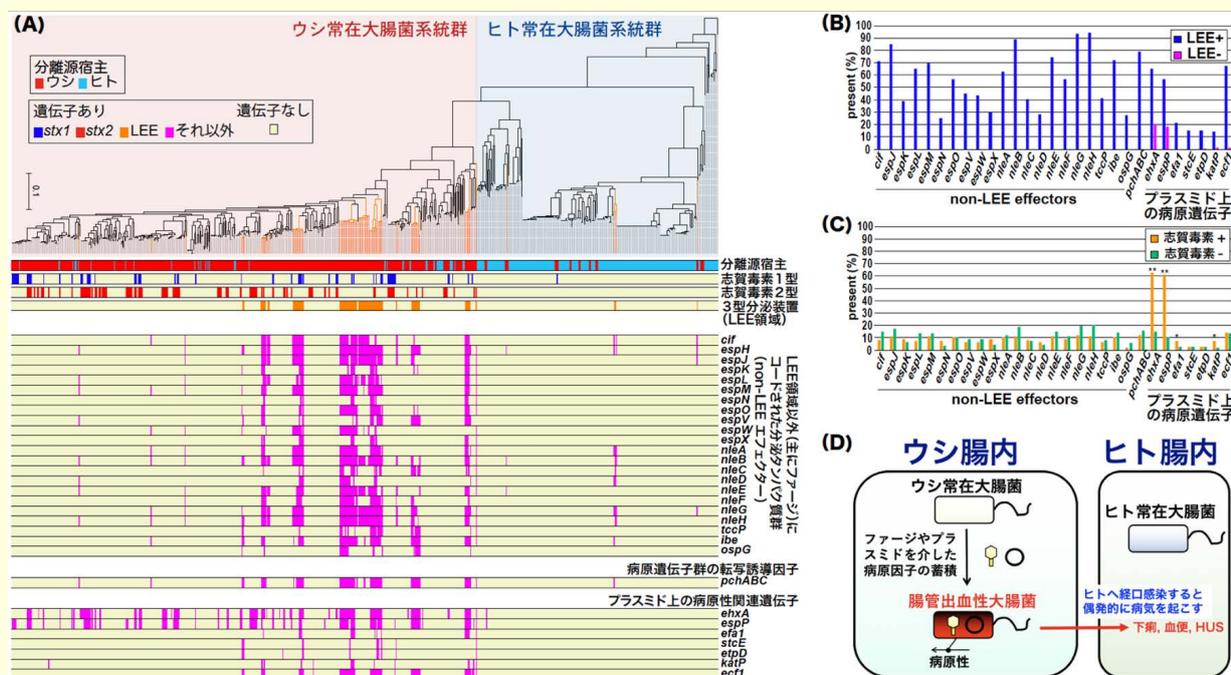


日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

腸管出血性大腸菌の起源と出現機構の解明

小椋 義俊 九州大学 医学研究院 細菌学分野 / 現・久留米大学 医学部 感染医学講座

大腸菌は本来、脊椎動物に常在する非病原菌であり、ほとんどは無害であるが、一部の菌株は病原性を示し、病原性大腸菌と呼ばれる。O157を代表とする腸管出血性大腸菌は、主な病原因子として志賀毒素と3型分泌装置（LEE領域）を保持しており、下痢に加えて、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群などの重篤な症状を引き起こす。主な宿主はウシと考えられており、ウシの便で汚染された食肉や野菜などからヒトへ感染する。我々は、健康なウシとヒトの常在性大腸菌、ヒト患者由来の腸管出血性大腸菌について、大規模比較ゲノム解析を行った結果、ウシとヒトの常在性大腸菌は系統的に異なる大腸菌であり、ウシ常在性大腸菌に様々な病原因子が蓄積することで、次々と腸管出血性大腸菌が出現していることを明らかにした（図A）。病原遺伝子は、LEE陽性株（図B）や志賀毒素陽性株（図C）に偏った分布をしており、機能的な関連が示唆される。腸管出血性大腸菌は、ウシにはほとんど病気をおこさないが、ウシ体内では、ウシ常在性大腸菌への病原因子の蓄積を促進する選択圧が存在し、それにより腸管出血性大腸菌が出現していると推察された（図D）。



ゲノム微生物学分野の研究動向

根粒菌とマメ科植物の攻防によるゲノム進化？

南澤 究

東北大学大学院生命科学研究科

1. 植物マイクロバイオーーム研究と根粒菌

植物体内外に生息している微生物群集を扱う植物マイクロバイオーーム (Plant microbiome) が近年着目されており、基礎および応用研究としての展開が期待されている。しかし、メタゲノム解析による植物マイクロバイオーームの多様性や機能の解析は記載的になりやすく、情報科学を駆使して法則性を抽出しても、その新規機能や相互作用メカニズムについてそれほど研究は進んでいない。

植物マイクロバイオーームのゲノム研究として、植物から数百株の細菌株を分離混合し、それを無菌植物に接種して研究する SynCom (Synthetic community) という手法がドイツのグループから提案された (1, 2)。彼らは手始めに、その植物由来分離菌 484 株のドラフトゲノムを決定し、植物環境以外の細菌ゲノムと比較した (3)。その結果は、植物由来細菌には、根粒形成遺伝子 (*nod*)、窒素固定遺伝子 (*nif*)、ジベレリン生合成遺伝子、走化性遺伝子 (*che*, *mcp*)、Type III/Type VI 分泌系遺伝子、鞭毛生合成遺伝子の頻度が有意に高く、その他の特異なモジュールの一部は Type VI 分泌系のエフェクター遺伝子であった (3)。これらは根粒菌が保有している性質そのものである。さらに、網羅的な植物マイクロバイオーーム解析データと植物接種実験により Alpha-Proteobacteria に属する Rhizobiales 目細菌が植物環境において中心的な細菌グループであることが示唆された (4, 5)。つまり、Rhizobiales 目細菌は広義の意味で植物共生に適したゲノム背景を持っている

可能性がある。このような証拠から、Rhizobiales 目の根粒菌の共生研究は植物マイクロバイオーームを理解するためにも重要であると私は考えている。

2. *Bradyrhizobium* 属が祖先型根粒菌

Rhizobiales 目の根粒菌には色々な属があり、*Rhizobium* 属、*Mesorhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Azorhizobium* 属、*Sinorhizobium* 属などが知られている。その中で、*Bradyrhizobium* 属細菌は、800 種以上と推定される膨大な種多様性と原始的なマメ科植物に共生するため、祖先型の根粒菌であると考えられている (6, 7)。*Bradyrhizobium* 属根粒菌として最も有名なのがダイズ根粒菌であり、ダイズは世界の重要な作物でもあり、共生菌による地球環境に優しい食料生産につながる。

ダイズ根粒菌のゲノムは、共生アイランドと呼ばれる共生に必須な巨大なゲノミックアイランド (600~1000 kb) を単独の環状染色体上に保有し、そのゲノムサイズは 8.6~10.5 Mb と通常の細菌ゲノムより大きい (図 1A)。一方、土壌や非マメ科植物根から分離された *Bradyrhizobium* 属細菌は一般に共生アイランドがなく、ゲノムサイズは 7.2~8.2 Mb と相対的に小さい (6-9)。北米での野生マメ科植物の大規模な調査では、マメ科植物毎に適応した共生アイランドを持った *Bradyrhizobium* 属根粒菌が進化してきたことが報告されている (10)。つまり、共生アイランドが根粒菌の植物共生を維持・進化させていると考えられる。

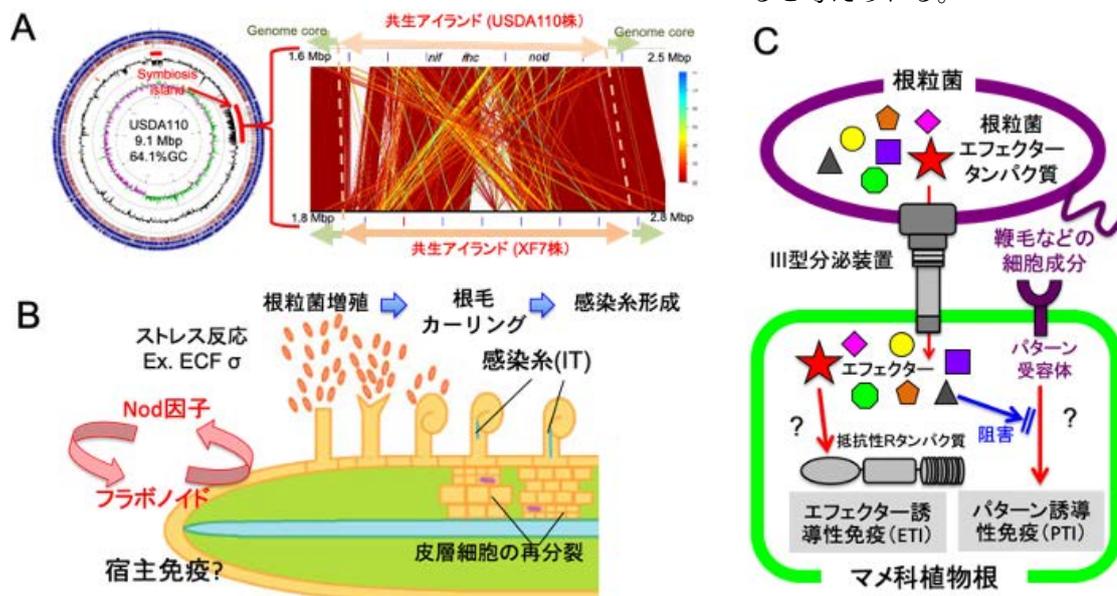


図 1. 根粒菌のゲノム (A)、初期感染過程 (B)、推定宿主免疫機構 (C)

ダイズ根粒菌の共生アイランドには、根粒形成シグナル Nod factor の合成分泌遺伝子 (*nod*)、窒素固定遺伝子 (*nif*) と III 型分泌系 (T3SS) 遺伝子 (*rhc*) があり、多種類の挿入配列 (IS) が密集している (図 1A)。特に、III 型分泌系は病原菌が病原因子を植物に導入するシステムであり、共生における意義は十分理解されていなかった。最初に日本で全ゲノムが解読された *B. diazoefficiens* USDA110 と XF7 株の共生アイランドを比較すると、両株は系統マーカー (16S rRNA 遺伝子/ITS 領域) やゲノムコア領域が全く同じであるにも関わらず、共生アイランド領域は変化していた (図 1A)。

3. 根粒菌感染と植物免疫

自然環境では多種の土壌細菌が存在するなかで、なぜ特定の根粒菌のみがマメ科植物根に感染し、細胞内共生を確立できるのであろうか? 根粒菌の初期感染過程とそれに伴う両パートナー間におけるフラボノイドや Nod 因子のシグナル交換や宿主植物側の分子機構が研究されてきた (図 1B) が、ここでは微生物側に着目してみたい。例えば、ダイズ根粒菌のストレス応答に関わる ECF シグマ因子の遺伝子を破壊すると、初期段階で根粒菌の感染が抑制された (11)。宿主の細胞内共生系確立は、根粒菌にとってもストレスのある過程であると言える。

根粒菌感染と宿主免疫の関係は重要なテーマであり、根粒菌と植物の組合せで異なる場合が多いことが、近年多数報告されている (12, 13)。病原菌に対する免疫系の知見から、植物細胞には、1) 微生物のエリシター成分 (PAMP) をパターン受容体が認識すると誘導されるパターン誘導性免疫 (PAMP-triggered immunity: PTI) と、2) 微生物の持つエフェクターを抵抗性 (R) タンパク質が認識すると誘導されるエフェクター誘導性免疫 (Effector-triggered immunity: ETI) の二つの免疫システムが備わっている (図 1C) (12, 13)。

4. 根粒菌とマメ科植物の共生不和合性

共生不和合性は、本来は共生窒素固定が可能な菌と植物であるにも関わらず、特定の遺伝型のマメ科植物と特定の根粒菌株が共生できない現象である。*Rj2* 遺伝型のダイズ品種は、特定の根粒菌 USDA122 株の感染による根粒形成を特異的に抑えることが 1960 年代から知られていた。2010 年にダイズの *Rj2* 遺伝子が抵抗性 R タンパク質をコードすることが明らかにされ、植物のエフェクター誘導性免疫応答と類似するシステムが特異的な根粒菌による根粒形成を制限すると推測されたが、その分子機構は不明であった (14)。

私達が共生不和合性を示す根粒菌 USDA122 株の T3SS 装置の遺伝子破壊を行ったところ、その破壊株は *Rj2* ダイズに根粒を形成したので、USDA122 株の T3SS エフェ

クターのいずれかがエフェクター誘導性免疫を誘導していると考えられた (図 1C) (15)。その後、酵母ツーハイブリッド法や EMS 処理変異株スクリーニングを行ったが、さっぱり原因エフェクターは同定されず、時間ばかりが過ぎていった。

問題解決のヒントは、EMS 変異体接種実験の対照区に起こった現象にあった。*Rj2* ダイズに共生不和合性を示す野生型 USDA122 株においても極めて低頻度で根粒を形成する場合がある。これは、たまたま共生不和合性の宿主側のバリアを乗り越えた根粒菌が感染したと誰もが考えていた。もしかしたら、この根粒は USDA122 株の共生不和合性を克服した変異株ではないかと考え、根粒からの分離株の再接種実験を行ってみた。予想は的中し、8 株の再分離株は全て *Rj2* ダイズに根粒を形成し、*rhc* 遺伝子 (T3SS 装置) の欠失や T3SS エフェクター *nopP* 遺伝子への IS 挿入が起こっていた (図 2) (16)。さらに、地上部が黄色の窒素固定の起こっていない Fix⁻ 株は、*rhc* 遺伝子群とともに窒素固定に関わる *nif* 遺伝子群を欠失していた (16)。ここまで研究が進展すると後は面白いことが次々と明らかになった。

6 年間追い求めていた *Rj2* 共生不和合性の根粒菌の原因エフェクターは NopP であることが、*rhc/nif* 欠失は IS を介した組換えによって生じたことが明らかになった (図 3) (16)。このように、ダイズ根粒菌の共生アイランドでは IS 挿入や IS 介在型欠失が頻繁に起きており、共生アイランドが動的状態であることを実験室においても証明できた。その後の研究で、鍵と鍵穴のように根粒菌 NopP と宿主抵抗性 R タンパク質のそれぞれ 3 残基と 1 残基の特定の組合せ時に、エフェクター誘導性免疫が起動し、初期感染が拒絶されることが明らかとなった (図 3) (16, 17)。

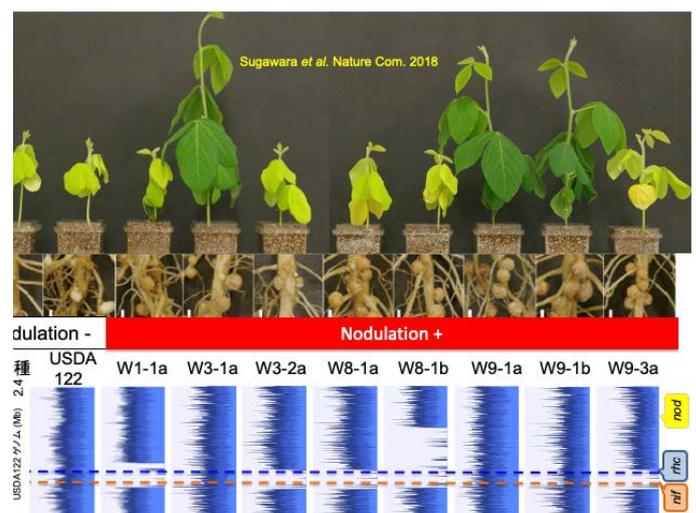


図 2. USDA122 株の *Rj2* ダイズ根粒形成変異株の *Rj2* ダイズへの再接種

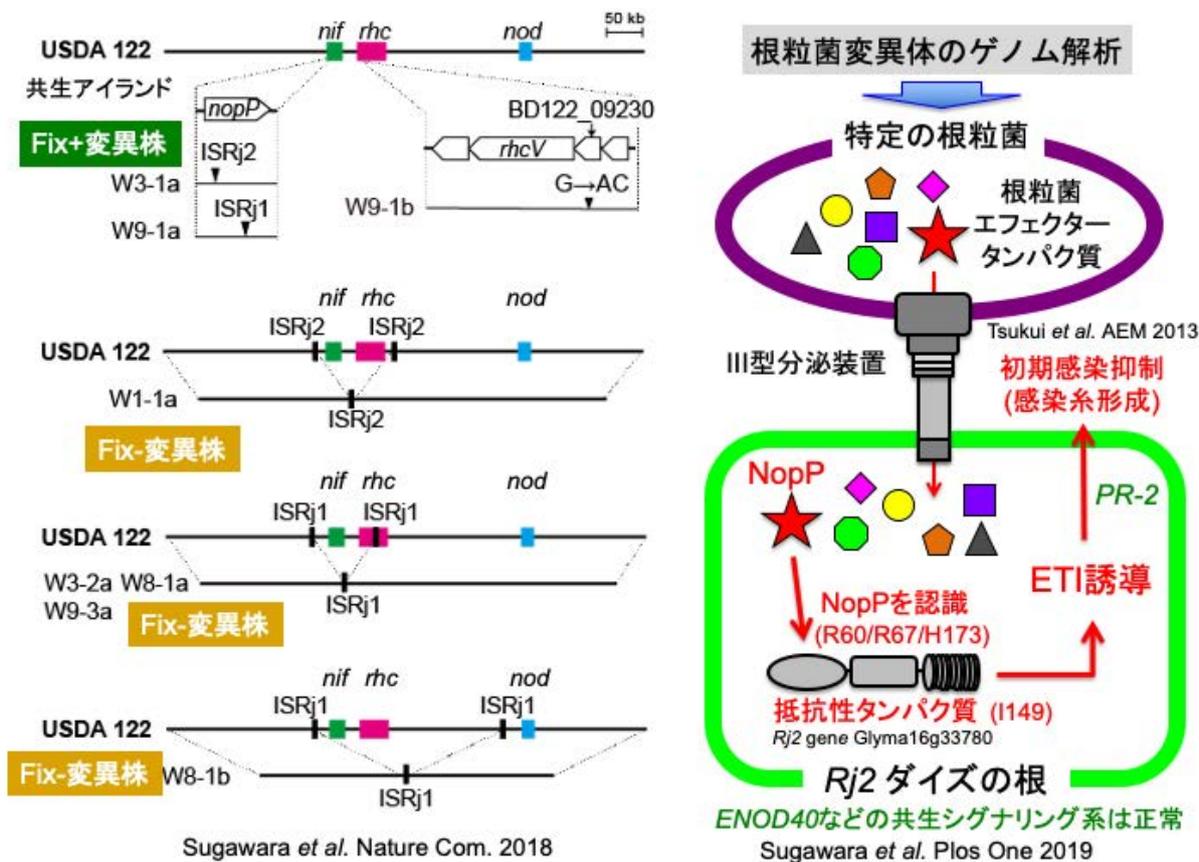


図3. Rj2 ダイズ根粒形成変異株のゲノム解析と共生不和合性機構

5. NopP-Rj2 システム発見の意義

ダイズ根粒菌が特定の T3SS エフェクター NopP を介して強力な宿主免疫系を誘導して自身の感染を拒絶するという私どもの発見は、根粒菌がエフェクターを介して宿主の防御応答を抑え自身の感染のみを促進するという従来の説とは逆である (12, 13)。しかし、野外由来のダイズ根粒菌の *nif* 遺伝子クラスター内には *nopP* 遺伝子が必ず存在し、また他のマメ科植物にも *Rj2* 遺伝子ホモログが保存されている (16, 17)。したがって、根粒菌とマメ科植物の共進化に必須の役割を持っている可能性がある。また、*nif/rbc* 遺伝子周辺には多種類の IS コピーが密集しており、*nif/rbc* 遺伝子群を欠失した変異株が分離されるが、環境中からはそのような根粒菌は分離されず、いわゆる役立たずの Cheating 根粒菌として、宿主との共生時に排除されている可能性がある。つまり、根粒菌の共生アイランドは IS などを介して相当動的な状態にあり、宿主と土壌の二つのライフサイクルの間で両者の攻防が起り、その過程で新規の共生アイランドが絶え間なく生成しているという姿が見えてきた。今後、NopP-Rj2 システムの分子機構を解明することによりその意義がさらに明快になることが期待される。広義の植物共生細菌においても T3SS や T6SS を保有しており、植物マイクロバイオーム研究においてもタンパク質分泌系や植物免疫の関係は重要であると考えられる。

農学的な応用として、NopP-Rj2 システムを利用して土

着根粒菌を排除し、窒素固定効率や温室効果ガス N_2O 削減能の高い接種根粒菌のみを着生する夢の根粒菌接種技術への展開も期待される。最後に、共に研究を行ってきた菅原雅之氏を始めとする研究室の皆様深く感謝致します。

引用文献

- Bai et al. Nature. 528(7582):364-369 (2015)
- Liu et al. Curr Opin Microbiol. 49:97-102 (2019)
- Levy et al. Nat Genet. 50(1):138-150 (2017)
- Yeoh et al. Nat Commun. 8: 215 (2017)
- Garrido-Oter et al. Cell Host Microbe. 24(1):155-167.e5 (2018)
- Ormeño-Orrillo and Martínez-Romero. Front. Microbiol. 10: 1334 (2019)
- Avontuur et al. Syst. Appl. Microbiol. 42(4):427-439 (2019)
- Wasai-Hara et al. Microbes Environ. 35(1). doi:10.1264/j sme2.ME19102 (2020)
- Hara et al. Front. Microbiol. 10:407 (2019)
- Parker. Mol Ecol. 21(7):1769-1778 (2012)
- Ledermann et al. Mol Plant Microbe Interact. 31(5):537-547 (2018)
- Benezech et al. Cell Microbiol. 22(1):e13124 (2020)
- Gourion et al. Trends Plant Sci. 20(3):186-194 (2015)
- Yang et al. PNAS 107(43):18735-18740 (2010)
- Tsukui et al. Appl. Environ Microbiol. 79(3):1048-1051 (2013)
- Sugawara et al. Nature Commun. 9:3139 (2018)
- Sugawara et al. PLoS One. 14(9):e0222469 (2019)

2020年度若手賞受賞研究

バイオインフォマティクスによる
環境微生物生態へのアプローチ

平岡 聡史

海洋研究開発機構 (JAMSTEC)
海洋機能利用部門 生命理工学センター

細菌や古細菌といった原核生物は、地球表層のあらゆる環境に生息しており、地球全体の物質循環や環境生態系を支える重要な存在です。このような環境微生物の分布や生理生態にアプローチするために、単離株のゲノム解析やショットガンシーケンスによるメタゲノム解析、16S rRNA アンプリコンシーケンスといった様々なゲノム解析が登場し、普及してきました。ゲノムシーケンス技術や情報処理用計算機の能力向上、そしてそれらを取り巻くバイオインフォマティクスの発展に伴い、このようなゲノム解析は技術的にもコスト的にも身近なものとなり、一つの研究で得られる配列情報の量も膨大なものになってきています。得られた大量のデータを前に、単純な通り一遍の菌叢解析や機能遺伝子の分布評価だけではなく、それらを超えて、バイオインフォマティクスを武器にいかにかデータの奥深くに隠された未知の生命現象にアプローチするのか。このことは、微生物分野を始めとするあらゆる生命を取り巻く学問分野において、本質的に重要な課題になってきていると、私には強く感じられます(1)。

このような現状のもと、各種のゲノムデータを用いて環境微生物の生態を明らかにする研究に、私は今まで取り組んできました。具体的には、津波という環境攪乱を受けた環境下で微生物がどのようなゲノム上の挙動を示

したのかを *Arthrobacter* 属細菌の単離株ゲノム解析や土壌サンプルのメタゲノム解析から調べた研究(2)や、上空から降る雨水を対象とした16S rRNA 菌叢解析から微生物の大気中の移動メカニズムに迫った研究(3)、太平洋北西部に位置する海溝内部・周辺部の深海堆積物中の菌叢構造を海域横断的に調べ、堆積物中の化学成分や細胞数のデータと統合的に解析した研究(4)などがあります。

ところで、この学会の名前ともなっている「ゲノム」という言葉は、「遺伝情報の全体・総体」を表す用語です。つまりゲノムとはACGTからなる塩基配列のみを指すのではなく、より拡張された、例えば各塩基に付加的に装飾される化学修飾なども、また「ゲノム」の概念の一部に他なりません。塩基の化学修飾には多くの種類が知られていますが、中でもメチル基が付加される修飾(DNAメチル化)は、ヒトを始めとする真核生物において遺伝子の発現制御や獲得形質の遺伝などに深く関わっていることが知られており、エピジェネティクスの文脈で研究が盛んに進められています。このDNAメチル化は一方で、細菌や古細菌といった原核生物においても起きていることが知られています(図1a)。

原核生物の場合、DNAメチル化はメチル化酵素(Methyltransferase; MTase)によって駆動されます。このメチル化酵素は多くの場合、特定の塩基配列の並びをモチーフとして特異的に認識し、その内部に含まれる塩基に対してメチル基を付加する、という反応を、ゲノム全域に渡って行います(図1b)。

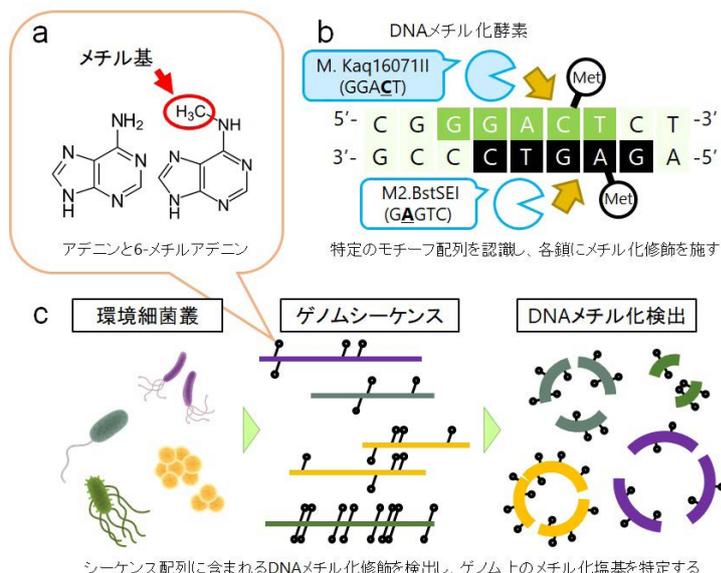


図1. 細菌・古細菌におけるDNAメチル化とメタエピゲノム解析の概要 (a) DNAメチル化の例。この図ではm6A (6-メチルアデニン)を示している。(b) 原核生物が持つDNAメチル化酵素と認識モチーフの例。(c) メタエピゲノム解析の概要

このようにしてメチル化されたゲノム上のモチーフ配列の一部については、遺伝子転写制御やDNA複製、DNA修復等のプロセスにおいて、重要な役割を担っていると考えられています。そして、それらの生理学的な機能の結果として、例えば幅広い微生物系統が持つファージ感染に対する防衛機構である制限修飾系(RMシステム)や、*Synechocystis* 属細菌における紫外線耐性(5)、病原性 *Burkholderia* 属や *Clostridioides* 属細菌の毒性・感染性の制御(6, 7)、*Caulobacter* 属細菌に見られる非対称細胞分裂(8)、といった様々な特徴的な生命機能がDNAメチル化に制御されていることが、近年徐々に明らかになりつつあります。

幅広い系統に属する単離株を大規模に用いた近年の研究からは、利用した株の実に9割以上のゲノム中からDNAメチル化が観測されており(9)、このDNAメチル化システムは非常に幅広い細菌・古細菌系統において普遍的に保持されていることが示唆されています。また、メチル化酵素の認識モチーフの変化はその酵素を持つ生物自体の適応進化に影響を与える可能性も指摘されており[10]、様々な角度からDNAメチル化機構の重要性が示唆されています。しかしながら現在に至るまで、このような原核生物のDNAメチル化を調べた研究の多くは、実験的な制約もあり、実験室で培養ができる微生物系統を対象としたものに限られていました。そのため、未培養系統が優占する自然環境中の細菌群集におけるDNAメチル化の普遍性や多様性は、ほとんど検証が進みませんでした。

環境微生物を培養を経ずに系統網羅的に解析する上で、メタゲノム解析は非常に有力な手法です[1]。一般的にメタゲノム解析に利用されるIllumina等のシーケンシング技術は、塩基配列の情報しか利用することができません。一方で、近年登場し発展しているPacBioによる1分子リアルタイム(SMRT)シーケンシング技術では、塩基配列を決定すると同時にDNAメチル化の検出も行うことができる特徴があります。既存のバイサルファイトシーケンシングを始めとするDNAメチル化の検出手法と比べても、このSMRTシーケンシングの手法は簡便であり、また技術のアップデートに伴い検出精度も高いものとなっています。しかしながらこの技術は、今まで培養可能な微生物株にしか主に適用されておらず、環境細菌叢の系統網羅的な解析には活用されていませんでした。

そこで私は、このメチル化観測技術をメタゲノム解析と組み合わせることで、未培養系統が優占する環境細菌叢のDNAメチル化を包括的に観測することができるのではないかと考え、研究を進めて来ましたが(図1c)。この研究では、琵琶湖という淡水環境に生息する水圏微生物を対象に、PacBioを用いたメタゲノム解析とメチル化修飾解析を実施しました。

具体的には、Circular Consensus Sequencing (CCS) の手法を用いたショットガンシーケンスを行い、ゲノムアセンブリから取得した計19株分のドラフトゲノムを対象に、ゲノム中のDNAメチル化を検出し、そのメチル化モチーフ配列の予測を行いました。その結果、新規のものを含む複数のメチル化モチーフの検出に成功しました。さらに各モチーフに対応するメチル化酵素遺伝子を推定し、新規の関係性を持つと予測された4組について大腸菌を用いた検証実験を行うことで、モチーフと酵素の対応関係を実証することができました(図2)。本研究は、PacBioシーケンサーをメタゲノム解析に応用することで、実験室で培養可能な系統を超えて環境微生物のエピゲノム状態を解析する「メタエピゲノム解析」を新規に提唱し、その有効性を実証した成果です(11)。

本研究では、淡水環境の細菌叢サンプルを利用し、培養株ベースの既存研究からは想像もつかないほど多様で新規なDNAメチル化モチーフの存在が明らかになりました。今までほぼ全く注目されてこなかった環境微生物のエピジェネティクスに光を当て、DNAメチル化が駆動する未知の生理生態の解明に貢献し得る手法を提唱できたのではないかと考えています。とはいえ現状では、用いた試料の数や環境的多様性、試料中の微生物の系統

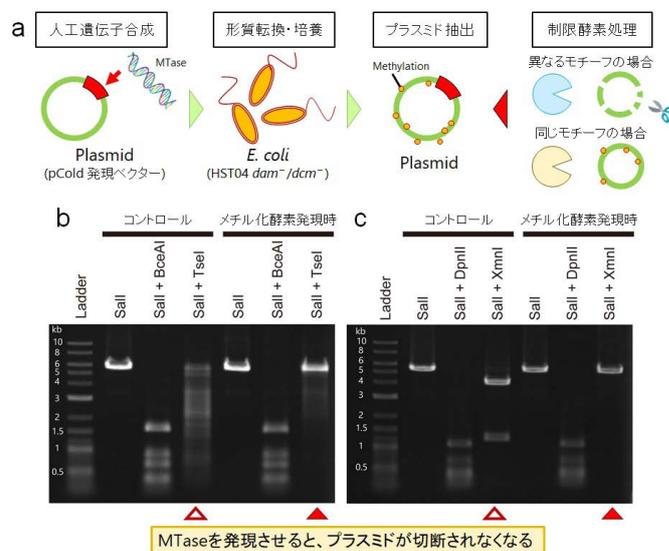


図2. 大腸菌を用いたメチル化酵素遺伝子実験の流れと結果 (a) 大腸菌にDNAメチル化酵素を人工的に組み込み強制的に発現させ、自身のゲノムにメチル化修飾を施させた後に、プラスミド抽出と制限酵素処理を行う。認識するDNA配列にメチル化修飾が起これば、この制限酵素はDNAを切断できなくなる。(b)(c) 制限酵素処理したプラスミドの電気泳動図の例。導入したメチル化酵素遺伝子の非発現時は制限酵素による切断が起これば、遺伝子の発現時は切断が起これなくなるのが実験的に観察された。

的多様性などは限定的なものにとどまっています。そのため、例えば異なる特性を持つ環境間でどのようなDNAメチル化の分布的な違いがあるのか、といったより「メタ」な解析や、菌叢構造とファージとの相互作用の中におけるDNAメチル化の使い分け、あるいは個々のDNAメチル化が具体的にどのような機能に結びついて生態学的なメリットを生み出しているのか、といったような微生物生態学的な視点からの解析は、今後の課題となっています。そして、DNAメチルというシステムの起源やその進化史、なぜほぼ全ての細菌・古細菌系統で広く保存されてきたのか、といった進化学上の疑問に関しても、解明はその端緒についたばかりと言えます。

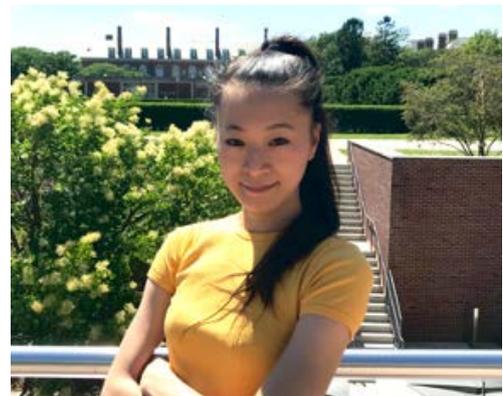
現在、私はこのような問題にアプローチするべく、新たに海洋表層に生息する細菌叢を対象としてメタエピゲノム解析をする研究に取り組んでいます。昨年度の年会は残念にも新型コロナウイルスの影響により中止となってしまいましたが、また本年度以降のどこかで、この研究の成果についても発表したいと思っておりますので、引き続きどうぞよろしくお願いいたします。ここに記した私の個別の研究成果はすべて、今までのゲノム微生物学会でポスターや口頭（ランチョンセミナーを含む）発表をしたものになります。過去の年会に参加された皆様のご記憶の片隅に残っていただけましたら、大変うれしい限りです。これらの研究をするにあたり、学部から博士課程までの学生時代を過ごした東京大学の皆様、学位取得後から現在に至るまで所属している海洋研究開発機構(JAMSTEC)の皆様、そして個々の研究するにあたって大変なご協力を頂いた京都大学、遺伝学研究所、Stazione Zoologica Anton Dohrn、Polytechnic University of Marcheの皆様(すべて当時の所属)に、厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Hiraoka et al. *Microbes Environ.* 31(3):204-212 (2016)
- 2) Hiraoka et al. *BMC Genom.* 17:53 (2016)
- 3) Hiraoka et al. *Front. Microbiol.* 8:1506 (2017)
- 4) Hiraoka et al. *ISME J.* 14:740-756 (2020)
- 5) Gärtner et al. *Front. Microbiol.* 10:1233 (2019)
- 6) Mannweiler et al. *bioRxiv* (2020)
- 7) Oliveira et al. *Nat. Microbiol.* 5:630-641 (2020)
- 8) Kozdon et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110(48):E4658-E4667 (2013)
- 9) Blow et al. *PLoS Biol.* 12(2):e1005854 (2016)
- 10) Furuta et al. *PLoS Genet.* 10:e1004272 (2014)
- 11) Hiraoka et al. *Nat. Commun.* 10:159 (2019)

2020年度若手賞受賞研究

大腸菌の定常期における酸化ストレス耐性に関与する遺伝子群の遺伝学的解析



岩館 佑未

東京都立大学(現在所属 イリノイ大学)

この度は、名誉ある日本ゲノム微生物学会の若手賞をいただき、審査員の先生方をはじめ関係者の皆さま、またこれまで日本ゲノム微生物学会の年会等でお話してくださった皆さまに深くお礼申し上げます。私は、微生物のゲノムにはなぜこんなにたくさんの遺伝子がコードされているのだろうか、これら遺伝子はどのような働きをしているのだろうか、という疑問を心の中に持っていました。例えば大腸菌の場合、全遺伝子約4800個のうち、およそ45%の2200遺伝子の機能は同定されていません(1)。研究の歴史が長い大腸菌についてでさえも、理解されていない生命現象がたくさんあるのではないかと、これまで機能が同定されていない遺伝子の働きを見つけられれば、新たな現象の発見や、その理解につながるのではないかと思い、わくわくしながら実験をしています。

私は宿主と細菌の相互作用に着目し、これまで特に細菌側の酸化ストレス耐性機構に焦点を当てて研究を行ってきました。分子レベルでの理解が最も進んでいるモデル生物である大腸菌を材料とし、新規の酸化ストレス耐性機構を明らかにすることができれば、将来臨床面での新しい治療法の開発などにもつながるのではないかと考えました。本研究は、博士課程まで在学していた首都大学東京(現 東京都立大学)の加藤潤一教授の研究室で開発された、大腸菌ゲノム縮小株群というユニークなり

ソースを用いることによって、定常期における酸化ストレス耐性に関する遺伝子群を同定することができました。またそれらの遺伝子の機能解析を行うことによって、これまで知られていなかった定常期の生存機構を解明することができました。

細菌は自然環境において増殖を支えるのに十分な栄養源がない場合、増殖はせずとも、生存しています。このような定常期における生存機構やストレス耐性の機構は、まだ充分には理解されていません。私は特に酸化ストレス耐性に着目し、関与する遺伝子群の探索を行いました。酸化ストレスとは活性酸素種によって引き起こされるストレスで、活性酸素種は酸素に電子が渡ることによって発生します(図1)。酸化ストレス耐性には、活性酸素種を除去する機構が関与することが知られていますが、活性酸素種の発生そのものを抑える機構については、大腸菌でさえもあまり理解が進んでいません。

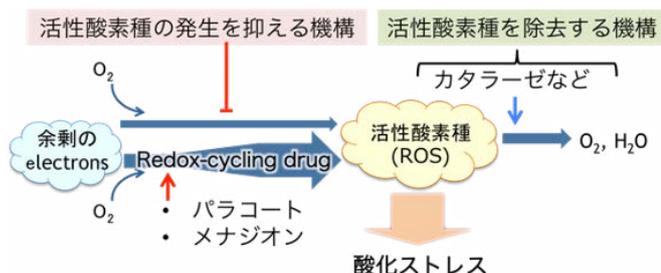


図1. 活性酸素種の発生と酸化ストレス耐性の機構

本研究では、除草剤として知られるパラコートと同様、Redox cycling drug の一つであるメナジオンへの耐性を酸化ストレス耐性の指標としました。メナジオンは電子が酸素にわたるのを促進することで活性酸素種の発生を増大させます。メナジオン感受性が増大した菌株の原因遺伝子を同定すれば、活性酸素種の発生および除去に関わる新たな遺伝子を同定することができます。

定常期における生存やストレス耐性に関わる遺伝子の変異株を単離するためには、一株ずつ丁寧なアッセイをすることが必要です。ところが、大腸菌の全遺伝子約4700個の変異株について一株ずつ丁寧なアッセイを行うのは大変です。そこで私は、数十から数百kbにわたる広域欠損変異を段階的に蓄積させたゲノム縮小株(図2A)に着目しました。ゲノム縮小株を用いると、わずか33株で大腸菌の全遺伝子の40%に当たる1718個の遺伝子の欠損の影響を調べることができるため、一つ一つの株について、様々な条件を検討しながら定常期における酸化ストレス耐性を調べることができます。実際にゲノ

ム縮小株群の定常期におけるメナジオン耐性を調べてみると、興味深いことにゲノムの縮小化の程度によって耐性度が変化しました(図2B)。メナジオン耐性度が低下した株の染色体の欠損領域には、酸化ストレス耐性に関する遺伝子が存在すると考えられます(2)(図2C)。この手法を用いて、酸化ストレス耐性に関する4個の遺伝子を発見し、詳細な解析を行いました。これらについて以下に紹介します。

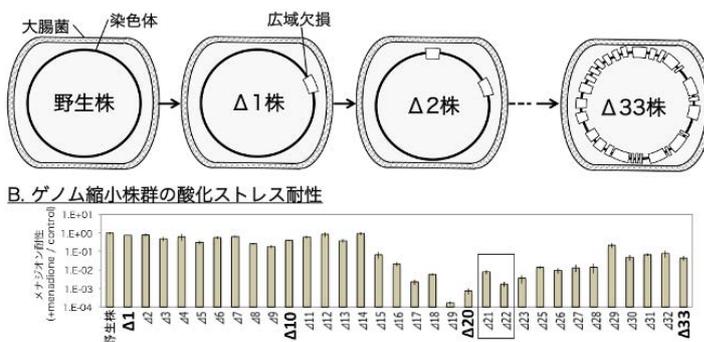


図2. ゲノム縮小株群を利用した酸化ストレス耐性に関する遺伝子群の同定方法

1. ギ酸脱水素酵素の新しい機能

メナジオン耐性に関与する遺伝子として、ギ酸脱水素酵素-Oをコードする*fdoGHI*を同定しました。ギ酸脱水素酵素-Oは、発酵や葉酸代謝の過程で生ずるギ酸を酸化し電子をキノンプールへと伝達する働きをします。ギ酸脱水素酵素の”ギ酸を酸化する”という活性には、モリブデンコファクターが必要であり、モリブデンコファクターの挿入にはFdhDというシャペロンが必要であることが知られています。このFdhDシャペロンが欠損した株では、ギ酸脱水素酵素は働かないと考えられます。ところが詳しく調べてみると、このFdhDシャペロン欠損株でギ酸脱水素酵素-Oを破壊すると、定常期における生存が低下することがわかり、FdhDシャペロンに依存しないギ酸脱水素酵素の機能が見出されました。また、この電子伝達活性は、微好気条件下でグルコース存在下での生存に重要であることから、活性酸素種の発生を抑制する働きを持つことが示唆されました(3)。

2. 機能未知遺伝子 *ytfK* の過酸化水素耐性への関与

ゲノム縮小株の一つで発現が上昇した、機能未知遺伝子 *ytfK* が、メナジオン耐性に関与することがわかりました。*ytfK* は 68 アミノ酸からなるタンパク質をコードし、過去の報告から、リン酸飢餓によって発現が誘導される PhoB レギュロンの一つであること (4)、および、酸化ストレスによって発現が誘導されること (5) がわかっていました。詳細に解析を行ったところ、YtfK は過酸化水素耐性にも関与し、過酸化水素の分解を担うカタラーゼ G の発現を促進することを見出しました。さらに、YtfK は硝酸存在下でのリン酸飢餓における生存に関与することがわかりました。リン酸飢餓条件では好氣的なグルコース代謝が継続され、活性酸素種の産生が増大することが報告されています (6)。今回の結果から、リン酸飢餓により PhoB レギュロンの *ytfK* 遺伝子の発現が誘導されると、カタラーゼ G などの発現量が増大し、細胞内の過酸化水素のレベルを下げることによって酸化ストレス耐性をもたらしていると考えられました (7)。

3. 機能未知遺伝子 *aegA* および *ygfT* の尿酸分解への関与

別のゲノム縮小株群の解析により、機能未知遺伝子 *aegA* がメナジオン耐性に関与することがわかりました。*AegA* は、N 末端側に電子伝達に関わるフェレドキシン、C 末端側に窒素代謝に関わるグルタミン酸合成酵素と、それぞれ高い配列相同性を示します。大腸菌のゲノムには *aegA* と高い相同性を持つ *ygfT* もコードされています。*aegA* や *ygfT* 遺伝子の持つ機能に迫るため、それぞれの遺伝子がどのような環境で発現するか調べたところ、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* と *ygfT* 遺伝子は、それまで大腸菌で報告されていなかった尿酸の分解に関与しているのではないかと考え、尿酸を単一窒素源とした時の生育について調べました。*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* が尿酸分解に働くことを見出しました。さらに機能的に関連する遺伝子群の解析から、*aegA* および *ygfT* が関わる尿酸の分解には、ギ酸およびギ酸脱水素酵素 H が関与することも明らかになりました。それまで知られていなかった酸素を必要としない尿酸の分解に電子を放出しやすい尿酸を分

解に導く事で、*aegA* と *ygfT* は活性酸素種の発生の抑制に働くと考えられます。尿酸の蓄積はヒトにおいて痛風の原因になるため、医学的にも興味深い面があります (8)。

このようにゲノム縮小株群を利用することで効率的に多数の遺伝子のスクリーニングすることができました。またゲノム縮小株では野生株よりも表現型が出やすい傾向があることも利点の一つでした。野生株でその遺伝子単独を欠損させた場合には、特殊な培養条件でのみ表現型が認められることがありました。またメナジオン耐性により酸化ストレス耐性を調べたことで、酸化ストレス耐性に重要な 2 つのステップのうち、活性酸素種の処理に働く遺伝子と、活性酸素種の発生の抑制に働く遺伝子の両方を同定することができました。これら 2 つの機構は定常期の生存に重要であると考えられます (図 3)。

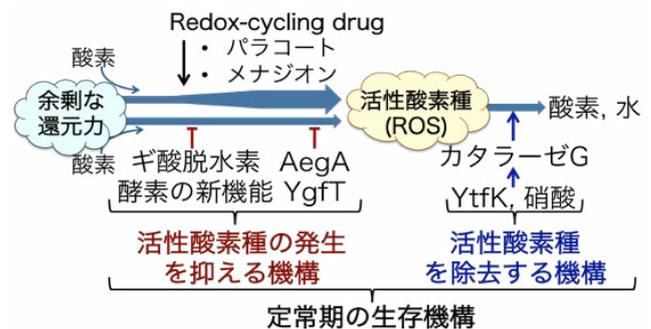


図 3. 本研究で明らかになった定常期の生存機構

現在私は、イリノイ大学 Slauch 研究室にて、細菌の感染モデルが確立されているサルモネラとマウスを用いた実験系を用いて、宿主内での生存に重要な機構の探索・解明に取り組んでいます。サルモネラは大腸菌と近縁な種ですが、宿主の免疫細胞であるマクロファージの中で生存・増殖できる能力を持っています。この能力に重要なサルモネラ特有の新たな機構を見つけたいらいたいと思います、研究を進めています。また年会などで皆様とお話しできるのを楽しみにしています。

引用文献

- 1) Riley et.al, Nucleic Acids Res. 34(1):1-9 (2006)
- 2) Iwadate et. al. FEMS Microbiol. Lett. 322(1):25-33 (2011)
- 3) Iwadate et. al. FEMS Microbiol. Lett. 364(20) (2017)
- 4) Baek and Lee. FEMS Microbiol. Lett. 264(1):104-9 (2006)
- 5) Zheng et al. J. Bacteriol. 183(15):4562-4570 (2001)
- 6) Moreau et al. Mol. Microbiol. 39(4):1048-1060 (2001)
- 7) Iwadate and Kato. Microbiology 163(12):1912-1923 (2017)
- 8) Iwadate and Kato. J. Bacteriol. 201(11):e00573-18 (2019)

学会開催報告

第14回日本ゲノム微生物学会年会 (名古屋大会) について

饗場浩文

名古屋大学 創薬科学研究科

学会員ならびに関係の皆様には、新型コロナウイルスへの対応のため名古屋大会を中止したことに伴い、多大なご迷惑をおかけしました。この場をお借りして深くお詫び致します。とりわけ、年会に参加し発表する機会を提供できなかった学生さんには、大変心苦しい思いであります。幸いにして、要旨集は発行することができましたので、年会そのものは成立し、研究成果の発表が行われたと認定することができました。未曾有の出来事への対応を含め、幻に終わった名古屋大会についてご報告したいと思っております。

年会は2020年3月6日(金)～8日(日)に名古屋駅前のウインクあいちで開催予定でした。2月24日の時点では、「感染予防対策をした上で催行する」方針であり、その旨の案内を年会HPに公開する準備をしていました。この間、東日本大震災後の東北大・津田年会長ならびに小笠原会長のご対応も参考に、状況調査とシミュレーションは進めていきましたが、一貫して基本方針は「開催する」でした。その根本には、「ゲノム微生物学会は微生物研究者の集まりであり、状況を理解・共有した上で感染症対策にも万全を期すことができる。具体的データや証拠がない段階で微生物関連の学会を自主的に取りやめるのは、社会に与える影響も大きく、学会の存立意義にも関わる」との考えがありました。しかしながら、2月25日に政府から「新型コロナウイルス感染症対策の基本方針」が発出され、学会執行部ならびに組織委員会で検討した結果、「国や地方自治体、医療関係者、事業者、そして国民が一丸となって、新型コロナウイルス感染症対策を進める」との方針に賛同し、「名古屋大会に関わる全てのイベントを中止」することにしました。

名古屋大会は、口頭発表：41題、ポスター発表：92題を予定しており、209名の事前参加登録者と併せ、300名を超える参加が見込まれていました。また、企業展示19件、ランチョンセミナー2件、講演要旨集広告13件、年会協賛8口、その他、飲料提供2件、学会開催助成2件等を頂戴でき、年会参加費以外に450万円を超える収入を確保しておりました。当初は、企業展

示やランチョンセミナー、広告の獲得に苦戦していましたが、黒字開催ができるまでに学会員の皆様からお力添えを頂戴しましたことに厚くお礼を申し上げます。なお、年会在中止になったにもかかわらず、学会員の皆様には年会参加費をそのまま納めて頂きました。企業展示やランチョンセミナーにお申し込みいただいた企業様には、中止に伴いその機会をご提供できなかったにもかかわらず、必要経費の納入にご協力頂きました。これらの皆様に感謝申し上げます。なお、ご支援を頂きました関連企業様には「第14回日本ゲノム微生物学会年会協賛企業特集」として情報をPRいただく特設サイトを設けておりますので、皆様ご確認・ご利用下さい。https://www.sgmj.org/index.php?page=workshop_2020sp。幻に終わった名古屋大会では、以下のような新しい試みを予定しておりました。

- (1) ショートトークを止め、口頭発表とポスター発表を完全独立させる。ポスターの発表時間を十分に確保し、要旨集も分かりやすく簡潔なものにする。
- (2) 懇親会を止め、ポスター発表時間に全員が参加できるミキサーを開催する。
- (3) ポスター賞の発表と授賞式を最終日に行う。
- (4) 口頭での企業展示アピールタイムを設け、展示内容を参加者に理解いただく。

これら試みの評価はできませんが、今後の取組の中で検証されればと思います。最後となりますが、早急に新型コロナ禍が治まり、皆様の健康が確保され、ゲノム微生物研究が推進される環境が戻ることを願っています。来年以降の年会で皆様とお会いできるのを楽しみにしています。

学会開催案内

第15回日本ゲノム微生物学会年会の

お知らせ

片山 勉

九州大学 薬学研究院

世界を巻き込んだコロナ禍により、学会活動の新たなあり方の模索が必要となりました。第15回日本ゲノム微生物学会年会についても、学会長や評議員の方々とともに検討してまいりました。年会には、相互の研究発表・質疑応答による最新情報の共有や考察の深化、そして、研究者・学生の交流による信頼関係の構築・発展などという重要な役割があります。このような多面的な意義を考えると、オンライン開催の工夫もある一方、ある程度制約があるとしても現地開催の重要性も決して否めません。今年度の評議員会では、第15回年会は、現地開催をまず優先し、それが不可能となった場合はオンライン開催とすることが決められました。

現地開催の場合、2021年3月4日(木)～6日(土)の3日間、九州大学伊都キャンパスの椎木講堂にて開催

します。新型コロナウイルス感染症対応を遵守する形式での実施となるでしょう。椎木講堂は大変立派な巨大施設です。ほぼ1000人分の席が設置されたメイン会場に加え、さらに合計約2000席をもつ大小5つの会場があります。これらを柔軟に活用して、口頭発表を中心とした構成で実施する予定です。伊都キャンパスは福岡の中心地・天神からのアクセスも、直通バス、あるいは、地下鉄(JR線乗り入れ)との連携バスにより便利になっております。

もし状況により現地開催が不可能となった場合には、オンライン開催に変更します。幸い、この形式の実施に関しては学会長指名のオンライン開催検討委員会が組織され準備を進めていただけることになりました。今後は現地開催とオンライン開催の両面の準備を相互に連携協力しながら進めてゆきます。詳細な実施方式については、決まり次第、学会ホームページなどを通して、できるだけ速やかに情報発信してゆきたいと思っております。

今後の状況変化や2つの開催形式の実施における実際的な問題など多数の未確定要素がありますが、会員の皆様の特別のご理解と積極的なご協力をいただきましたら大変幸いです。そして開催の折には、皆様の興味や新たな発見の共有を通し、微生物学の進展や研究者の育成・発展を推進する有意義な会として、できるだけ多くの方々に参加していただけますよう心から願っております。(片山 勉)



第15回日本ゲノム微生物学会年会

2021年3月4日(木)～6日(土) 九州大学伊都キャンパス椎木講堂

ただし現地開催が不可となった場合、オンライン開催に変更



写真提供：福岡市

実験レシピ紹介コーナー

多様な細菌の RNA-Seq 解析 のための RNA 調製法

前号まで大坪さんが担当されていた実験技術紹介コーナーを引き継ぐことになりました広瀬です。どうぞよろしくお願いたします。近年、RNA-Seq 解析が身近になっています。RNA を調製して外部に解析を委託したり、自らライブラリ調製をおこなう研究者も増えてきました。RNA-Seq 解析が広まるにつれ、非モデルの細菌を扱う際に、ライブラリ調製に必要な RNA の調製につまづく方が増えているようです。今回は、RNA-Seq 解析のための非モデル細菌からの RNA の調製法について紹介したいと思います。

RNA 精製のポイントは、「状態の良い細胞を、十分に破碎して、カラム精製する」ことです。増殖期の状態のよい細胞から、細胞を素早く回収し、液体窒素で直ちに凍結しましょう。細胞集団の中に死にかけの細胞が存在すると、rRNA の除去効率が分解によって低下し、mRNA のシーケンス効率が低下することがあります。ストレス応答遺伝子など、低発現の遺伝子が誘導されると、発現量のバラツキの原因となる可能性があります。

細胞を十分に破碎することは、とても重要です。市販の RNA 抽出キットは界面活性剤やタンパク質変性剤を組み合わせると細胞を溶菌させます。ところが、これらの溶菌試薬では細胞壁を持つ細菌を十分に破碎できないことが多いです。そこで私は、溶菌剤に加え、0.1mm 径のビーズ破碎処理を行っています。ビーズ破碎はほとんどの細胞に有効ですが、細胞量が多すぎたり、細胞外多糖による粘性の増加によって破碎効率が落ちるので、気をつけましょう。また、泡の発生によっても破碎効率は低下するので、使用する溶菌剤の容器を振ってみて、泡立つかどうか確認しておきましょう。チューブは、スクリュウキャップ付きの 2.0 ml 容量タイプがオススメです。

また、細胞が塊になっていると、細胞とビーズが混ざらず、破碎できません。このような場合は、より大きなサイズのビーズによる破碎を加えましょう。液体窒素で凍結した細胞塊に直径 3 mm のタングステンビーズを加え、破碎機で振盪すると、細胞がパウダー状になります。この後に 0.1mm のガラスビーズを加えて破碎してください。チューブが割れ易いので、強度の高いチューブを使用してください。これでもうまくいかない場合は、手間がかかりますが、液体窒素で凍らせた細胞を乳鉢ですりつぶすのが確実です。

きちんと破碎ができれば、あとは市販の陰イオン交換カラムを使用して RNA を精製するだけです。フェノール・クロロホルム沈殿による精製は、不純物の多くを除くことができないので、精製法としては適しません。ゲノム DNA は DNaseI 処理によって除きましょう。ライブラリ調製時に使用する rRNA 除去キットには、RNA と DNA の二本鎖を形成させ、RNaseH で分解するタイプがあるためです。最後は RNase Free water で溶出しておく、どのようなライブラリ調製キットにも使用できます。

プロトコルの詳細を以下に示します。まずはオプションなしでやってみましょう。溶菌剤が泡立たないこと、ビーズ径に注意すれば、別メーカーの装置やキットを使っても大丈夫だと思います。今回はゲノム解析のための DNA 調製法について紹介します。もし紹介できる手法があれば、編集委員までお知らせください。(広瀬侑)

使用する試薬・装置

- RNeasy mini kit (Qiagen) (溶菌剤が泡立たないキット)
- TissueLyser II 破碎機 (Qiagen)
- φ0.1mm 径のジルコニア・シリカビーズ (BioSpec)
- DNaseI (どのメーカーでも OK)
- (• φ3 mm 径のタングステンビーズ (Qiagen))
- (• 乳鉢)

RNA 調製プロトコル

- 1, 細胞を 2 mL チューブに遠心回収 (50-100 mg 程度)
- 2, 直ちに液体窒素で凍結保存 (凍結後は -20°C 保存)

オプション 1

凍結した細胞に、3 mm 径タングステンビーズを 1 個もしくは 2 個加え、TissueLyser II で 30Hz 30 sec 振盪破碎。細胞が溶けてきたら再度液体窒素で凍結して振盪破碎を繰り返す。細胞がパウダー状になれば OK。ビーズは入れたまま 3 へ。

オプション 2 (オプション 1 がうまく行かない場合)

細胞を乳鉢に入れ、液体窒素を加えながらすりつぶす。パウダー状になった細胞をかき取って 3 へ。乳鉢を使うと細胞のロスが増えるので、細胞量を増やしましょう。

- 3, 2 mL チューブに入った凍結した細胞に、0.5-1g 程度の 0.1 mm 径のジルコニア・シリカビーズを加える
- 4, 400 μL の RLT buffer を加える
- 5, TissueLyser II で振盪破碎 (30Hz 3 min)
- 6, 5 min 遠心し、上清を回収
- 7, 上清に等量の 70% エタノールを加えて懸濁
- 8, RNeasy Mini カラムにサンプルをロードし、遠心
- 9, カラムを 700 mL RW1 buffer で 1 回、500 mL RPE buffer で 2 回洗浄、最後に遠心して乾燥
- 10, 30-50 μL の RNase free water で溶出
- 11, DNaseI および DNaseI buffer を加え 37°C 1h 静置
- 12, エタノール沈殿精製 (磁気ビーズ精製でも可)
- 13, 30-50 μL の RNase free water に懸濁し -20°C で保存

閑話休題 - その9 - 早春から初夏に咲く花々

今年新型コロナウイルス騒動のためあって、3月以降は神戸市の外へ撮影に出かけることはしませんでした。したがって今回の閑話休題に収録した花々はほとんど近くで撮影したものです。それでもこれまでに出会ったことのない花々(最後の2種)があり、どれだけ花の撮影を重ねてもまだ新しい植物に出会えたということにびっくりしました。これからも新しい出会いを楽しみに撮影を続けようと思います。(磯野克己)



ヒメツルソバ (タデ科)
Persicaria capitata H. Gross
2019.1.05 神戸市



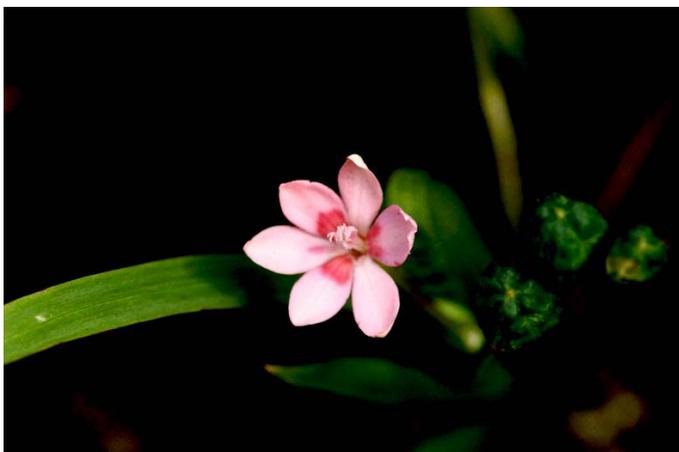
フクジュソウ (キンポウゲ科)
Adonis ramosa Franch.
2020.2.27 京都市



ベニカタバミ (カタバミ科)
Oxalis brasiliensis Lodd.
2020.4.05 神戸市



オランダフウロ (フウロソウ科)
Erodium cicutarium L.'Hér subsp. *cicutarium*
2020.5.24 神戸市



ヒメヒオウギ (アヤメ科)
Lapeyrousia cruenta Bak.
2020.6.01 神戸市



アレチハナガサ (クマツヅラ科)
Verbena brasiliensis Vell.
2020.6.01 神戸市

学会の動向

なんとか国内の新型コロナウイルスの影響も一段落して来ました。会員の皆さんにも少しは平穏な研究生活が戻ってきたのではないのでしょうか。当初、ここまで社会全体を揺るがすとは想像だにしていませんでした。2月に入りじわじわと拡大する国内の感染状況を見ながら第14回日本ゲノム微生物学会年会の開催に影響しないかと気にしておりました。が、年会の中止はまだ夢にも思っておりませんでした。2月14日になって、感染経路が不明な新型コロナウイルスによる感染者が出始めており、企業では大規模な集会を中止するなどの動きがあるという黒川さん（庶務・広報幹事）の情報を受け、執行部と年会長の饗場さんとで事前の対応策を練ることをその日のうちに決めました。参考になったのは、2011年の東日本大震災の時の第5回年会（東北大学）の対応です。要旨集の発行をもって年会成立とするという方針を今回も取るということにはしましたが、あくまでも開催を模索することにしておりました。「願わくば、感染症も研究対象とするゲノム微生物学会ですので、叡智を結集し、開催できればと思います。」という饗場年会長の思いを執行部は支持しておりました。また、すでに例年以上の企業展示や協賛があり、年会の準備は既に出来上がっており、ここで中止した場合に学会の被る金銭的な損失は学会の存続を揺るがしかねないものでした。しかし、日々状況は悪化していきました。他の学会は次々と中止、19日には政府、文科省からも慎重な対応が求められるようになりました。しかし、まだ年会を開催するという方針には変わりなく、22日には年会HPに感染防止策を施した上で開催する旨の案内を掲載しています。その後さらに状況は悪化し、行政機関からの中止要請も予想されるまでに至りました。また、開催を中止するなら少しでも早い決定のほうが金銭的な損失を軽減できるという年会事務局の助言もあり、できる限りの予防策をとった上で肅々と開催するか、自主的に完全中止の決定をするかの決断を迫られる状況に追い込まれたのが25日の午後です。夕刻に饗場年会長とは電話でも協議して、中止の方向で検討しました。最終決定まで時間をくださいということでその判断をお待ちしておりましたところ、「名古屋大会は「全面中止」とすることを決断しました。」というメールを21時36分付でいただきました。最後まで新型コロナウイルスに負けず、年会の開催を模索していた饗場年会長ですが、この決断をしていただきました。まだ静観

する時間はあったのですが、結果的に絶妙な時期での決断で、饗場年会長の隠れた大きな功績であります。これ以降はみなさんもホームページで知るところです。会員のみなさんからの参加費の徴収、展示経費の負担など展示団体等からの全面的な協力、愛知県（ウインク愛知）からの会場費の全額返還により、何とか新型コロナウイルスによる学会倒産第1号にならずに済みました。会員の皆様、企業・団体の皆様には心より感謝申し上げます。御援助していただいた企業・団体の皆様には次回の年会で何らかのお返しをしたいと思います。ただ、次回の第15回年会（九州大学）も通常通り開催できるかまだわかりません。日本ゲノム微生物学会、そして会員のみなさんが間接、直接のいかににかかわらずこのCOVID-19の克服における貢献を期待するところです。元気にまた全会員が集まれることを切に願っております。（日本ゲノム微生物学会会長 仁木宏典）

学会役員（敬称略）

会長：仁木宏典

庶務・会計幹事：黒川颯、相馬亜希子

集会幹事：大島拓、永田裕二

広報幹事：黒川颯、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、佐々木裕子、広瀬侑男女共同参画幹事：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

一般会員 369 名、学生会員 174 名、名誉会員 3 名

賛助会員 10 名、機関会員 1 名

編集後記

ニュースレターのデザインは初代の磯野先生から引き継ぎで、大坪さんがご担当でしたが、21号からは広瀬さんにバトンタッチ。デザインが一新されています。その21号はコロナ禍で発行が危ぶまれ、秋に先送りにするかなど、編集担当で話し合いながら進めてきました。少し遅れましたが、無事配信できてホッとしています。執筆者のみなさまのご協力に感謝申し上げます。（佐藤勉）