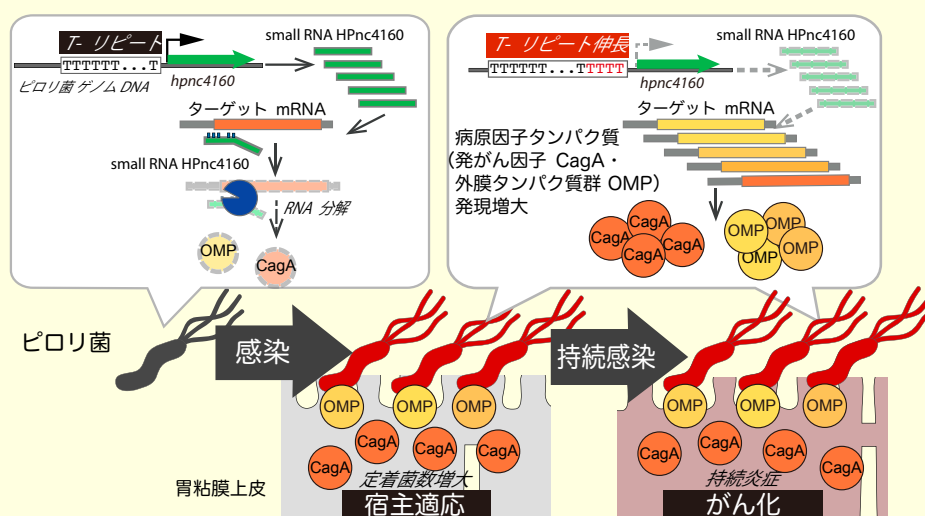


日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) の small RNA が制御する環境適応と病態発症

三室 仁美 (大阪大学 微生物病研究所 / 現・大分大学 グローカル感染症研究センター)



ピロリ菌は乳幼児期から何十年にもわたり胃粘膜に付着性の持続感染を成立させ、胃炎や胃がん等の消化器疾患を引き起こす。しかし、細菌が胃の環境に適応するメカニズムは不明であった。我々は、ピロリ菌の non-coding small RNA HPnc4160 が、細菌の発がんタンパク質の産生だけでなく、宿主環境への病原体の適応を調節することを明らかにした。ピロリ菌感染げっ歯類モデルの胃から分離された細菌のゲノムは、HPnc4160 コード領域の上流で連続チミジン配列(T リピート)数が増加しており、これによって HPnc4160 の発現が低下した。RNA-seq および iTRAQ 解析によって、外膜タンパク質および発がんタンパク質 CagA をコードする遺伝子を含む HPnc4160 の 8 つのターゲットを同定した。HPnc4160 欠損変異株は、野生型株に比べ、短期間感染マウスの胃での定着能が増大していた。しかし持続感染マウス胃内での HPnc4160 欠損変異株の定着菌数は、野生型株に比べ低下しており、胃内持続感染に HPnc4160 が重要であった。T リピートが異なる変異株解析により、T リピート長の伸長と HPnc4160 発現量はオシレーションを示すこと、さらに、感染前の HPnc4160 発現量に関わらず、T リピートが長いほどマウスに持続感染しやすいことがわかった。また、胃がん患者由来臨床分離株では非胃がん患者由来株よりも、T リピートは長く、HPnc4160 発現は低く、標的因子発現は高かった。したがって、small RNA HPnc4160 は、宿主環境へのピロリ菌の適応を調節し、胃の発がんを調節することが示唆された。T リピートの長い菌株は、感染中に変異が挿入されやすく、多様な T リピートと病原因子発現パターンを示す多様な菌株集団が構築できる。それにより、環境がダイナミックに変化する胃内においても、その時その時に適した発現パターンを示すピロリ菌菌体亜集団が生き延びることができ、環境にしなやかに適応することで持続感染が可能となり、胃がんを誘導することが示唆された。

発表論文: Kinoshita-Daitoku R, Kiga K, Miyakoshi M, Otsubo R, Ogura Y, Sanada T, Bo Z, Phuoc TV, Okano T, Iida T, Yokomori R, Kuroda E, Hirukawa S, Tanaka M, Sood A, Subsomwong P, Ashida H, Binh TT, Nguyen LT, Van KV, Ho DQD, Nakai K, Suzuki T, Yamaoka Y, Hayashi T, Mimuro H. A bacterial small RNA regulates the adaptation of *Helicobacter pylori* to the host environment. *Nat Commun.* 2021;12(1):2085

微生物学分野の研究動向

シアノバクテリアの細胞外多糖合成系について

前田 海成

東京農業大学 生命科学部

1. はじめに

シアノバクテリア(藍藻)は酸素発生型光合成をおこなう原核生物であり、その祖先は細胞内共生により葉緑体になったと考えられている。モデル種である *Synechocystis* sp. PCC 6803 の全ゲノムがかずさ DNA 研究所の田畑先生らによって 1996 年に決定されて以来(1)、シアノバクテリアは光合成や光受容体の研究におけるモデル生物として世界中で用いられてきた。また光独立栄養バクテリアである点とモデル種の形質転換が容易である点から、環境負荷の少ない物質生産のホストとしても注目されており、応用研究が盛んである。これらに関しては国内でも多くの先生方が研究なされているため、学会員の皆様が見聞きされる機会も多いと思われる。そこで本記事では、研究者が比較的少ないシアノバクテリアの細胞外多糖合成系に関する研究について紹介させていただきたい。

シアノバクテリアは淡水、海水、温泉、陸上などの幅広い環境に生息し、微生物マット(図1)、群体、ブルームなどの多様な細胞集合体を形成している。シアノバクテリア細胞集合体の代表的な構成要素は細胞外多糖(EPS)であり、その蓄積が集合体の形成やストレス耐性などの機能において重要であると考えられている。そして、シアノバクテリアには多種多様な EPS が存在することが、組成分析によって明らかにされてきた(2)。その中にはスイゼンジノリ EPS であるサクランのように、化粧品材料や医薬品としての利用を目的に研究されているものもある。一方で、シアノバクテリア EPS の合成・制御機構や、生理機能に関する研究はあまり進んでいなかった。私は学生として池内昌彦 東京大学名誉教授(当時教授)の研究室に所属していた頃から現在まで、シアノバクテリアのゲノム情報と形態を手掛かりに、EPS 合成・制御機構の解明に取り組んできた。



図1. 中房温泉の微生物マットとその断面

表面には主にシアノバクテリア *Thermosynechococcus* が生息し、内部には主に光合成細菌が生息する。

2. NDP-sugar pyrophosphorylase

私が最初に取り組んだのは多糖合成の基質である NDP-sugar の合成酵素 NDP-sugar pyrophosphorylase (PPase) に関する研究である。本研究は多糖合成系そのものの研究ではないが、NDP-sugar は多糖合成のみならず様々な代謝の基質として働く重要な分子であるため簡単に紹介させていただく。細胞内には UDP-glucose や ADP-glucose、GDP-Mannose などの多様な NDP-sugar が存在し、それらは対応する NDP-sugar PPase により合成される。私がシアノバクテリアゲノム情報を調べたところ、基本的にはほとんどの種に既知のバクテリア型 NDP-sugar PPase のホモログが存在したが、既知のバクテリア型 UDP-glucose PPase の遺伝子 *galU* を持つ種はごく僅かであった。その代わりに、シアノバクテリア特異的な新規 UDP-glucose PPase である CugP の遺伝子が普遍的に存在した(3)。CugP は他のバクテリアの UDP-glucose PPase (GalU) よりも動物の GDP-Mannose PPase とよく似ており、後者と CugP の共通祖先酵素がシアノバクテリア内で進化して CugP になったと考えられる。また *Yersinia* や *Vibrio* などのバクテリアの中の一部の種のゲノム上では、*cugP* とシアノバクテリア特異的な細胞壁セルロース合成酵素遺伝子群がクラスターを形成していた。この現象は、この領域の水平伝播と、CugP により合成された UDP-glucose がセルロース合成の基質として利用されていることを示唆している。

3. ゲノム情報から見えるシアノバクテリア EPS 合成関連遺伝子の特徴

バクテリアの EPS 合成系に関しては主に病原菌を対象として長年研究されており、様々な EPS 合成酵素複合体や制御機構、そしてそれらの遺伝子が網羅的に解明されてきた(4)。EPS 合成は大まかに糖鎖の合成と修飾、排出という過程からなる。それぞれの反応には 1~複数個のタンパク質が関わり、それらが集まって複雑な EPS 合成酵素複合体を形成する。これらの知見をもとにシアノバクテリアゲノム情報を解析することで、シアノバクテリアの EPS 合成関連遺伝子の様々な特徴がわかってきた。

まず、シアノバクテリアゲノムには既知のバクテリア EPS 合成関連遺伝子と配列類似性の高い遺伝子やホモログが多く存在するが、遺伝子セットの一部を欠いている場合がある。例えば、ある既知の EPS 合成酵素複合体の必須構成要素をコードする遺伝子のうち、一部しか存在しない場合がある。これはシアノバ

クテリアに特異的な別の構成要素の存在を示唆しており、実際に私は複数の新規遺伝子を同定してきた。

次に、1つのEPSの合成に関わる遺伝子群は、一般的なバクテリアゲノム上では1つの大きな遺伝子クラスターを形成する 경우가多いが、シアノバクテリアゲノム上では散在している場合が少なくない。幸いにも種Aで散在しているEPS合成系遺伝子群が種Bでは遺伝子クラスターを形成しているケースがあるため、シアノバクテリア全体のゲノム情報を調べ比較することが重要である。また、1種のシアノバクテリア内には基本的に複数のEPSの合成系が存在するが、EPS合成関連遺伝子の配列情報から「どのEPSの合成に関わるのか」を予測するのは困難である。その判別のためには、形質転換により破壊株を作製して表現型を調べるという古典的な手法が有効である。

最後に、ゲノム情報から多くのEPS合成関連遺伝子を持つと推測される種であっても、研究室環境でEPS蓄積を示さないことがある。これは、単純にEPS合成を誘引する環境条件下にない場合もあるが、研究室で培養されるうちに遺伝子変異が生じEPS合成能が失われた場合もある。

これらの特徴から、シアノバクテリアの未知EPS合成系を解明するためには、EPS蓄積が容易に観察可能な種を研究対象に選び、ゲノム情報に基づいて予測したEPS合成関連遺伝子の変異株を作製し、その表現型を調べることが重要となる。これはごく当たり前のことだが、実際に実行可能な種は非常に限られており、それがシアノバクテリアEPS合成系研究の発展を妨げてきた。

4. 細胞外セルロース合成系

シアノバクテリアEPS合成系の研究として、私はまず細胞外セルロース合成系の解明に取り組んだ。本研究には、実験室で低温と青色光に応答して細胞外セルロースを蓄積し細胞凝集体を形成する好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* NIES-2134 (以下 *T. vulcanus*) を用いた。この種では、バクテリアに一般的なセルロース合成酵素遺伝子 *bcsA* のホモログ *tl10007* が存在しセルロース合成を担うこと (5)、複数の光受容体タンパク質により c-di-GMP の合成/分解反応がおき Tl10007 の活性が調節されることがわかっていた (6)。一方で、既知のバクテリアセルロース合成酵素複合体の重要な構成要素である BcsB, BcsC, BcsZ (図2左) などの遺伝子はゲノム上に存在しなかった。そこで我々は *T. vulcanus* には未知のセルロース合成関連遺伝子が存在すると予想した。

tl10007 の近傍にはセルロース合成に関わると思われる遺伝子が無かったため、我々はシンテニー解析をおこなった。*T. vulcanus* 以外のシアノバクテリアの *tl10007* ホモログの近傍に存在する遺伝子を調べたところ、いくつかの種で HlyD 様タンパク質の遺伝子とエンドグルカナーゼの遺伝子が保存されていた。これら2つの遺伝子の *T. vulcanus* におけるホモログ (*tlr0903* と *tlr1902*) はゲノム上で *tl10007* と離れた位置に存在したが、変異株解析の結果セルロース合成に必須であることがわかった。

また、低温による *tlr0903* の転写誘導がセルロース蓄積の増強をもたらしていた。同定された2つのタンパク質のうち、エンドグルカナーゼは既知セルロース合成酵素複合体にも存在するため (図2中 BcsZ)、この反応がセルロース合成に普遍的に重要であることを示唆している。一方で HlyD 様タンパク質の存在は既知のセルロース合成系では知られていなかった。本来の HlyD は hemolysin などの分子の分泌に関わる I 型分泌装置において、細胞膜タンパク質 HlyB、外膜孔タンパク質 TolC を繋ぐ通路として働くタンパク質である。*T. vulcanus* では HlyD 様タンパク質 (Tlr0903) だけでなく TolC (Tlr1605) もセルロース依存性細胞凝集に必要であったことから、I 型分泌装置に似たシアノバクテリア特異的なセルロース合成酵素複合体 Xcs が存在すると我々は考えている (図2右) (7)。ただし、この複合体について構造生物学的な証拠はまだ得られていないため、今後の研究が必要である。

また、セルロース合成酵素の系統解析や遺伝子クラスターの情報を元に、原核生物のセルロース合成系の再分類をおこなったところ、既知のバクテリアセルロース合成系 Bcs 型、シアノバクテリア細胞外セルロース合成系 Xcs 型、シアノバクテリア特異的な細胞壁セルロース合成系 (本記事では細胞壁型と呼称) の大きく3つに分かれた。つまり、シアノバクテリアは独自に2種類のセルロース合成系を発達させたと考えられる。一方で、Xcs 型はごく一部のバクテリアで存在が知られているβグルカン合成系と近縁であった。また、細胞壁型もごく一部のバクテリアに見られ、シアノバクテリアから水平伝播したと考えられる。さらに、細胞壁型のセルロース合成酵素を植物セルロース合成酵素の祖先とする説もある (8)。これらはシアノバクテリアのセルロース合成系の進化が生物全体のセルロース合成系の多様化に寄与した可能性を示唆している。

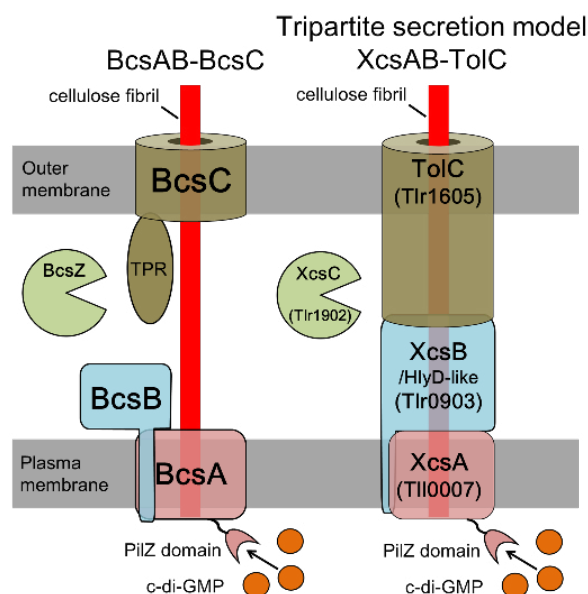


図2. セルロース合成酵素複合体モデル
左は酢酸菌などでよく知られているバクテリアに一般的なセルロース合成酵素複合体。右は我々の研究により示唆されたシアノバクテリア特異的なセルロース合成酵素複合体

5. 硫酸多糖シネカン合成系

シアノバクテリアには多様な EPS が存在するが、セルロースのように組成が単純で合成系の情報が豊富な EPS は稀であり、大多数の EPS は組成がわかったとしても合成系の遺伝子を推定することは難しい。しかし、シアノバクテリア特異的な未知 EPS の合成系こそ解明する意義がある。その第一歩として、私は *Synechocystis* sp. PCC 6803 (以下 *S.* 6803) の細胞外硫酸多糖合成系について研究を進めてきた (9)。

S. 6803 には 2 つの substrain 系統がある。*S.* 6803 GT (Glucose tolerant) 株はその名の通りグルコース耐性であり、運動性がない。この株は培地にグルコースを添加することで従属栄養的に増殖させることが可能であるため光合成関連変異株の作製に適しており、世界中で光合成研究のモデル生物として用いられてきた。一方で *S.* 6803 PCC 株は原種に近いとされ、グルコース感受性で運動性があり微生物学的研究に適しているが、研究材料として主流ではない。

私は *S.* 6803 PCC 株が粘性 EPS を介して培養液の液面付近にブルーム様の細胞集合体を形成する現象を発見した (図 3 左)。そして EPS 合成候補遺伝子の破壊株を多数作製し、細胞集合体形成と粘性 EPS 蓄積を指標としてスクリーニングすることで、この粘性 EPS の合成制御関連遺伝子を網羅的に同定した (図 3 右)。この中には、バクテリアの EPS 合成系の 1 つである Wzx/Wzy 型合成系の遺伝子一式と複数の制御関連遺伝子、そして 2 つの硫酸基転移酵素遺伝子が存在した。この硫酸基転移酵素遺伝子の存在から、私は粘性 EPS が硫酸多糖ではないかと考え組成を分析した。すると、予想通り硫酸基を含む多糖であった。

硫酸多糖 (硫酸化多糖ともいう) とは硫酸基で修飾された多糖であり、動物のグリコサミノグリカン (ヘパラン硫酸など)、真核藻類の細胞壁多糖 (カラギーナンなど)、シアノバクテリアの EPS (サクランなど) として存在する。興味深いことに、硫酸多糖を合成する既知のバクテリアはシアノバクテリアのみである。その一方で、シアノバクテリアには多様な硫酸多糖が

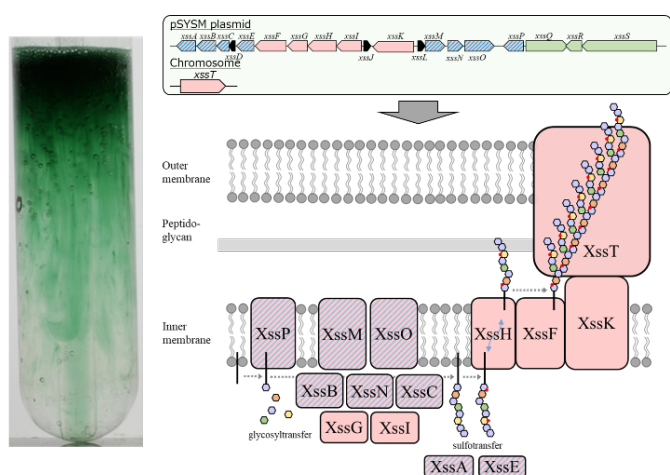


図 3. シネカン合成系の制御モデルと *xssS* 破壊株の表現型
左は *S.* 6803 PCC 株の *XssSRQ* による *xss* 遺伝子転写制御モデル。
中央は *xssS* 破壊株の培養液。右は野生株と *xssS* 破壊株それぞれの粘性 EPS 蓄積量。

存在し、その多くがバイオフィームや群体などの細胞集合体中に見られる。つまり、硫酸多糖はシアノバクテリアの生態に関わるシアノバクテリア特異的な EPS である。

私は本研究で初めて同定されたシアノバクテリア硫酸多糖合成制御遺伝子群を *xss*、*Xss* によって合成される硫酸多糖をシネカンと命名した。*xss* の制御関連遺伝子領域には、二成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼ遺伝子 *xssS* とレスポンスレギュレーター遺伝子 *xssR*、新規転写制御因子遺伝子 *xssQ* が存在しており、この *XssQ* が多くの *xss* 遺伝子の転写を大きく上げることでシネカン合成を増強していた。また、普段は *XssS* が *XssQ* による *xss* 転写制御を抑制していることも示唆された (図 4 左)。

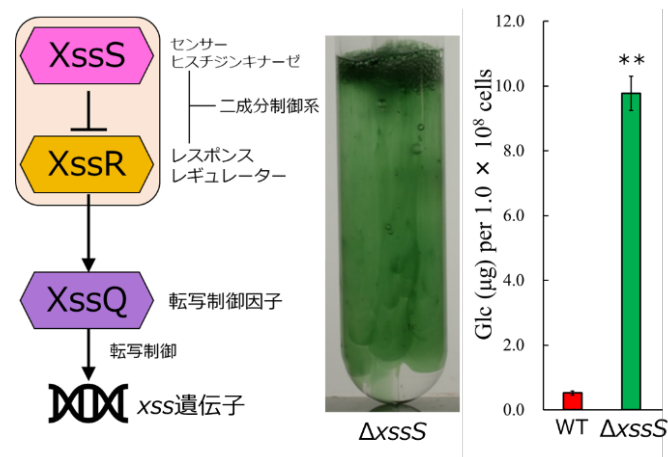


図 4. シネカン合成系の制御モデルと *xssS* 破壊株の表現型
左は *S.* 6803 PCC 株の *XssSRQ* による *xss* 遺伝子転写制御モデル。
中央は *xssS* 破壊株の培養液。右は野生株と *xssS* 破壊株それぞれの粘性 EPS 蓄積量。

では *S.* 6803 は何のためにシネカンを合成するのだろうか? *S.* 6803 の詳しい生態は不明であるため自然界における役割を推測するのは難しいが、培養液の様相から私はブルーム形成への関与を考えている。ブルーム (アオコ、水の華) とは異常増殖したシアノバクテリアが浮いて水面を覆い尽くす現象であり、生態系に多大な影響を与える。ブルーム形成の浮力源としてはシアノバクテリア細胞内のガス泡が知られていたが、*S.* 6803 はガス泡を持たない。しかし、実験室環境では、シネカンに捕らえられた気泡を浮力源として *S.* 6803 細胞集合体が浮上していた。この EPS と気泡による浮上はブルーム形成の新たなメカニズムかもしれない (10)。また *xss* 遺伝子の転写量は低温条件や planktonic 条件で大きく上昇することがドイツのグループから報告されている (11)。そのため、そのような環境刺激に反応してシネカンを合成・蓄積することが、*S.* 6803 の生態において重要であるのかもしれない。

本研究は *S.* 6803 の基礎研究として始めたが、硫酸多糖は化粧品材料や医薬品などとして注目されている高分子であるため、得られた知見の応用利用も期待される。例えば、硫酸多糖の大量生産や組成改変などが将来的に可能になるかもしれない。これまでに、シネカン合成を抑制する *XssS* の破壊により

シネカン合成量の増強(約19倍)に成功した(図4右、特願:2020-148194)。今後はシネカンの産業的有用性の解明も含めて共同研究を展開したいと考えている。

6. シネカン合成系から見えること

シネカン合成系 Xss はバクテリアの Wzx/Wzy 型 EPS 合成系に硫酸基転移酵素が組み合わさったものであった。このことから、動物と同様にシアノバクテリアでも、硫酸基転移酵素により糖鎖に硫酸基が付加されることで硫酸多糖が作られると考えられる。硫酸多糖の合成に硫酸基転移酵素が必須であることは、合成系を推定する上で大きな手掛かりとなる。つまり、硫酸基転移酵素遺伝子を含む EPS 合成遺伝子クラスターが硫酸多糖合成系(の一部)と推定できる。実際に硫酸多糖を蓄積するシアノバクテリアのゲノム情報を調べると、硫酸多糖合成遺伝子クラスターと推測される遺伝子領域が複数見つかった。その中には、Xss 同様の Wzx/Wzy 型 EPS 合成系の他に、もう一つの代表的なバクテリア EPS 合成系である ABC-transporter 型も存在した。ABC-transporter 型は細胞表面性多糖の合成に関与するため、これを含むものは細胞表面性硫酸多糖の合成系なのかもしれない。また、シアノバクテリアにおける硫酸基転移酵素の分布を調べたところ、海洋、塩湖、陸上といった環境に生息するシアノバクテリアに多い傾向が見られた。まだ生理学的な証拠は得られていないが、硫酸多糖は高塩や乾燥といった環境への適応に必要なのかもしれない。このように硫酸多糖は他の EPS よりも合成系の遺伝子を推測しやすい。また、シアノバクテリアの生理学上の重要性に加え、産業的な有用性も世界中で注目されている。これらの特徴から、シアノバクテリア EPS の中でも硫酸多糖の合成系研究が今後積極的に進められると考えられる。

シネカン合成系の転写制御因子遺伝子 *xssQ* のホモログはシアノバクテリア特異的に広く存在した。興味深いことに、硫酸多糖合成系を持つことが推測される種には、*xssS*, *xssR*, *xssQ* が遺伝子クラスターとして保存されている傾向があった。一方で、硫酸多糖合成系を持たないシアノバクテリアの一部では *xssQ* ホモログのみが保存されており、それは *xssS*, *xssR* とは異なる二成分制御系と遺伝子クラスターを形成していた。これはシアノバクテリア EPS 合成の転写制御における XssQ の普遍性と多様性を示唆している可能性があり、今後私が取り組みたいテーマの1つである。

7. シアノバクテリア EPS 合成系研究の今後

本記事で紹介したように、モデルシアノバクテリアの EPS 合成系の網羅的解明はまだ始まったばかりである。例えば *S. 6803* にはシネカン以外にも複数の EPS とそれらの合成系が存在し、細胞の固着や運動に関わっていると推測されている。シネカン合成が planktonic な状態で誘導されることを考えると、固着状態ではシネカン合成を抑える代わりに別の運動に関わる EPS 合成を促進しているのかもしれない。そのような可能性を検証す

るためには、個々の EPS の合成系の網羅的解析を継続する必要がある。また、EPS 合成系を識別することは、それらを調節する複雑な制御系の理解にも繋がると期待できる。

一方で、モデルシアノバクテリアの研究だけでは、シアノバクテリア EPS の環境中における役割を正確に理解することはできない。幸いにも環境中には EPS を蓄積し細胞集合体を形成するシアノバクテリアが多く存在し、それらの単離やゲノム解析も進んできている。特に硫酸多糖は蓄積する種が多く知られており、前述の通りゲノム情報から合成系をある程度予測可能であるため有望な研究対象である。しかし、EPS を蓄積するシアノバクテリアのほとんどは現状では形質転換できないという大きな問題が残っている。そのため、シアノバクテリア EPS 合成系研究のさらなる発展には、幅広いシアノバクテリア種に適用可能な新規形質転換系の構築などのブレイクスルーが必要である。

8. おわりに

シアノバクテリアの EPS 合成系は他のバクテリアのものとは比べると遥かに未解明ではあるが、シアノバクテリアの生き方の理解という基礎研究と有用多糖の探索や利用という応用研究の両方の面から重要な研究対象であると私は考えている。同時に、その研究には私が現時点で専門外である分析化学などの観点も必要不可欠であると強く感じている。本記事がシアノバクテリア EPS について様々な分野の先生方に少しでも興味を持っていただくきっかけになれば幸いである。

9. 謝辞

私のこれまでの研究は池内 昌彦 名誉教授(東京大学)、成川 礼 准教授(東京都立大学)、渡辺 智 准教授(東京農業大学)のご指導、ご助言をいただきながらおこなわれました。この場を借りて深く御礼申し上げます。また、このような記事執筆させていただく機会をお与えくださったニュースレター幹事の先生方にも心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Kaneko et al. DNA Res. 3, 109-136 (1996).
- 2) De Philippis & Vincenzini. FEMS Microbiol. Rev. 22, 151-175 (1998).
- 3) Maeda et al. J. Bacteriol. 196, 2348-2354 (2014).
- 4) Schmid et al. Front. Microbiol. 6, 496 (2015).
- 5) Kawano et al. Plant Cell Physiol. 52, 957-966 (2011).
- 6) Enomoto et al. PNAS. 112, 8082-8087 (2015).
- 7) Maeda et al. Mol. Microbiol. 109, 121-134 (2018).
- 8) Nobles et al. Plant Physiol. 127, 529-542, (2001).
- 9) Maeda et al. eLife. 10, e66538 (2021).
- 10) Mullineaux & Wilde. eLife. 10, e70327 (2021).
- 11) Oeser et al. Mol. Microbiol. 3, 743-765 (2021).

微生物学分野の研究動向

シングルドメイン型 (p)ppGpp 合成酵素ホモログの新機能

倉田 竜明

Dept. of Exp. Med. Sci., Lund University, Sweden

1. 背景

微生物は絶えず周囲の環境に応じて自身の状態（増殖速度・休眠状態・運動・分化など）をコントロールし、今日まで種として生存してきた。アミノ酸飢餓時におけるバクテリアの緊縮応答は古くから知られる環境応答の一つであり、中心的な役割を果たすシグナル分子 (p)ppGpp の発見は半世紀以上に遡る (1)。緊縮応答時の (p)ppGpp の合成機構に関する研究は伝統的に大腸菌 RelA が対象とされてきたが、近年の技術・方法論の発展により、この 10 年ほどの間に再びスポットライトが当てられるようになった。

その中でも最も顕著なブレイクスルーとなったのがクライオ電顕を用いた構造生物学的進展である。リボソームはクライオ電顕による構造解析の主要なターゲットの一つであり、リボソーム上で機能する (p)ppGpp 合成酵素 RelA の構造が明らかとなった (2, 3, 4)。この構造情報を元に (p)ppGpp 合成酵素の分子解剖と呼べる解析がなされ、近年その詳細な分子機構が明らかとなってきた (5, 6)。

もう一方の進展は日々蓄積されるゲノム情報とその情報解析である。それまで研究されてきた RelA や SpoT、Rel といった RelA/SpoT Homolog (RSH) は、ポリペプチドの N 末端側から (p)ppGpp 分解ドメイン - (p) ppGpp 合成ドメイン - 活性調節ドメインで構成された 80 kDa 程の比較的大きなタンパク質である。一方でポストゲノム時代以降、情報解析をもとに (p)ppGpp の合成、もしくは分解ドメインしか持たないタンパク質が見出されてきた (7, 8)。このような (p)ppGpp 合成ドメインしか持たない RSH は SAS (Small Alarmone Synthetase)、分解ドメインし

か持たない RSH は SAH (Small Alarmone Hydrolase) と呼ばれ、RelA などのマルチドメイン型の場合は long RSH と区別されるようになった。Long RSH はほぼ全てのバクテリアに保存され、主要な (p)ppGpp 代謝を担うと考えられる一方、SAS や SAH はゲノム中にコードされていない、もしくは逆に複数コードされている。すなわち、この SAS や SAH の発見は RSH による新たな環境応答機構の可能性やその生理機能を問いかけるものとなった。

2. 細胞毒性の高い SAS の発見

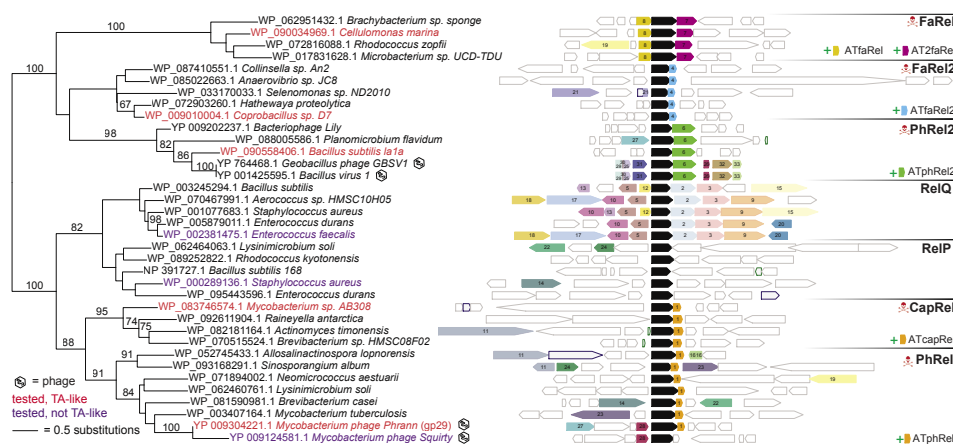
私は 2019 年よりスウェーデンに留学し、生化学が専門の Vasili Hayryliuk とバイオインフォマティクスが専門の Gemma Atkinson が共同で運営するラボで研究している。私たちは前述の SAS、SAH の発見を踏まえ、各ドメインに基づいて RSH の系統樹を再解析した。その結果、long RSH に対して SAS または SAH の系統は明確に分岐していることが明らかとなったが、驚くべきことに、SAH は long RSH と同等数の、SAS に至ってはその倍以上となる 30 種のサブファミリーが見出された (9)。すなわち、半世紀にわたって研究されてきた RelA などの long RSH の系統は、系統解析の視点で見ればむしろ少数派であった。

次に私たちはこれらの SAS 遺伝子の近傍に保存される遺伝子群をサブファミリーごとに探索することで、各 SAS の機能がどのバイオプロセスに関連するのか予想することを試みた。その結果、5 種のサブファミリー (FaRel、FaRel2、PhRel、PhRel2、CapRel) に属する一部の SAS の下流に保存される隣接遺伝子群が発見された。しかし残念なことに、それらすべては機能未知

図 1. SAS 遺伝子の系統解析と

隣接保存遺伝子

保存された隣接遺伝子が発見された SAS サブファミリー (FaRel、FaRel2、PhRel2、CapRel、PhRel) に加え、(p)ppGpp 合成活性が確認されているサブファミリー (RelQ、RelP) の遺伝子を周辺遺伝子とともに示す。黒色の矢印が SAS 遺伝子を示し、系統樹は SAS 遺伝子に基づいている。FaRel サブファミリーの SAS 遺伝子上流に保存された遺伝子は SAH (シングルドメイン型 (p)ppGpp 分解酵素) をコードしている。



であった。また、faRel 遺伝子についてはその上流にも別の遺伝子が保存されていたが、その遺伝子は前述した SAH (シングルドメイン型 (p)ppGpp 分解酵素) をコードしており、結局一見したところでは SAS の多様性や新機能を予測することは難しかった (図 1)。ただ、周辺遺伝子の保存性は SAS の隣接遺伝子までであり、主に bicistronic operon (FaRel サブファミリーでは tricistronic operon) を形成していることが予想された。この特徴は既に SAS として同定されている RelQ、RelP が属するサブファミリーではみられなかった。また、(p)ppGpp は DNA 複製や翻訳、代謝などを緊縮状態へ誘導するため、その過剰な生産はバクテリアにとって潜在的に毒性を示す。以上のことから、これらの SAS-隣接遺伝子のセットはバクテリアのトキシン-アンチトキシンシステムの様に機能するのではないかと推測された。

そこで私たちは各サブファミリーに属する SAS 遺伝子のコードンを最適化し、大腸菌内で発現誘導したところ、予想通りこれらの SAS の過剰発現が細胞毒性を示し、さらに隣接遺伝子の発現誘導はその細胞毒性を中和した。このことからこれらの遺伝子が実際にトキシン-アンチトキシンのように機能することが示唆された。SAS 間で毒性に強弱の違いが見られ、それが何に由来するかは不明だが、興味深い点として、既知の SAS (*S. aureus relP* と *E. faecalis relQ*) を同様に過剰発現した場合にはそれほど細胞毒性が認められなかった。したがって、隣接する調節遺伝子を持つこれらの SAS は潜在的に他の SAS よりも毒性が強ことが考えられ、私たちはこれらの SAS を *toxSAS* (toxic SAS) と名付けた。

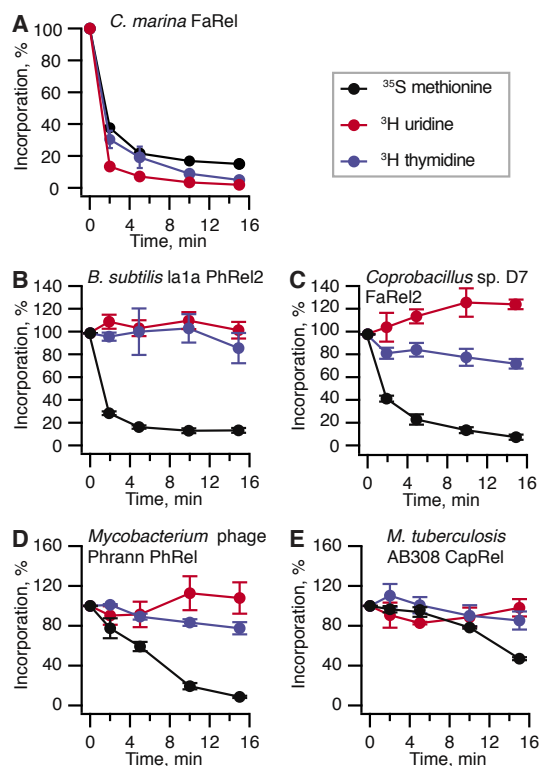


図 2. *toxSAS* 誘導時の転写、翻訳及び複製の活性
toxSAS 誘導 (time 0) 後、継時的に放射性同位体の生体高分子への取り込み量を測定した。(9, 10) より抜粋し編集

3. *toxSAS* 発現による転写・翻訳・複製への影響

それでは一体 *toxSAS* の毒性はどのようにしてもたらされるのであろうか。最も単純な仮説は *toxSAS* が高い (p)ppGpp 合成活性を有するということであるが、恐らくそうではないだろうと私たちは考えていた。なぜなら (p)ppGpp が合成できない株の表現型を *toxSAS* は相補しなかったためである。そこで放射性ラベルされたチミジン・ウリジン・メチオニンの細胞内の生体高分子への取り込みを調べることで、*toxSAS* 発現の複製・転写・翻訳への影響を大まかに調べた。その結果 FaRel を大腸菌内で発現誘導した場合、転写を第一として翻訳、複製の順で程度は弱くなるものの、すべての反応が低下することが明らかとなった (図 2A)。一方で、他 4 種の FaRel2・PhRel・PhRel2・CapRel に関しては翻訳を特異的に阻害することが明らかとなった (図 2B-E) (10)。(p)ppGpp 量の増加は速やかな転写の低下につながることを考えると (11)、少なくとも翻訳を阻害する 4 種の *toxSAS* は (p)ppGpp 合成とは異なる機能を有しているということが示唆された。ここからは FaRel とその他の *toxSAS* に分けて話を進めていく。

4. ppApp 合成活性を有する FaRel

まず、FaRel 発現株の細胞内ヌクレオチド量を HPLC によって解析したところ、発現誘導後 (p)ppGpp 量の増加が確認された (図 3A)。同時に GTP・GDP 量が減少したが、(p)ppGpp がグアニンヌクレオチドの *de novo* 合成経路を負に制御することを踏まえると妥当であり、実際に大腸菌の緊縮応答時に一般的に見られる結果である (12)。一方でアデニンヌクレオチド量に関して不自然とも思える ATP・ADP 量の明確な減少が確認された (図 3B)。当初この原因は不明であったがちょうどその頃に、SAS と相同なドメインを持つ分泌タンパク質が分泌先の細菌内で (p)ppGpp の代わりに (pp)pApp を合成し、ATP・ADP 量を低下させることによって毒性を発揮するという報告がされた (13)。そこで注意深く HPLC の結果を見ると、ppApp に相当するピークを発見し、それが FaRel 誘導に依存して蓄積することが明らかとなった (図 3B)。さらに、低毒性型の FaRel 変異体 (Y175A) タンパク質の精製には成功していたので、それをを用いて生化学的解析を行ったところ、確かに ppApp 合成活性が確認された。FaRel 誘導時に増加した細胞内 ppGpp は FaRel と内在性の RelA のどちらによって合成されたのは不明であるが、少なくとも FaRel は ppApp を合成し、細胞毒性を示すと考えられる。

5. tRNA のピロリン酸化により翻訳を阻害する *toxSAS*

一方で、他の *toxSAS* の機能については依然として不明なままであり、これらの *toxSAS* を発現誘導しても当然ながら ppApp の蓄積は確認されなかった。そんな中、部分的ではあるが FaRel2 と PhRel2 タンパク質を精製することができたので、これらを再構成型無細胞翻訳系 (PUREsystem) に加えたところ、

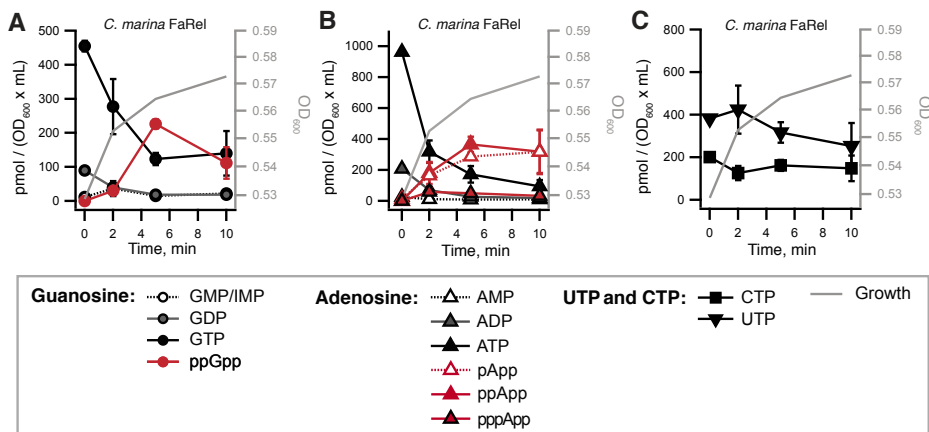


図3. FaRel 誘導時の細胞内ヌクレオチド量

FaRel 誘導 (time 0) 後、継時的に細胞内ヌクレオチド量を HPLC により測定した。(10) より抜粋し編集

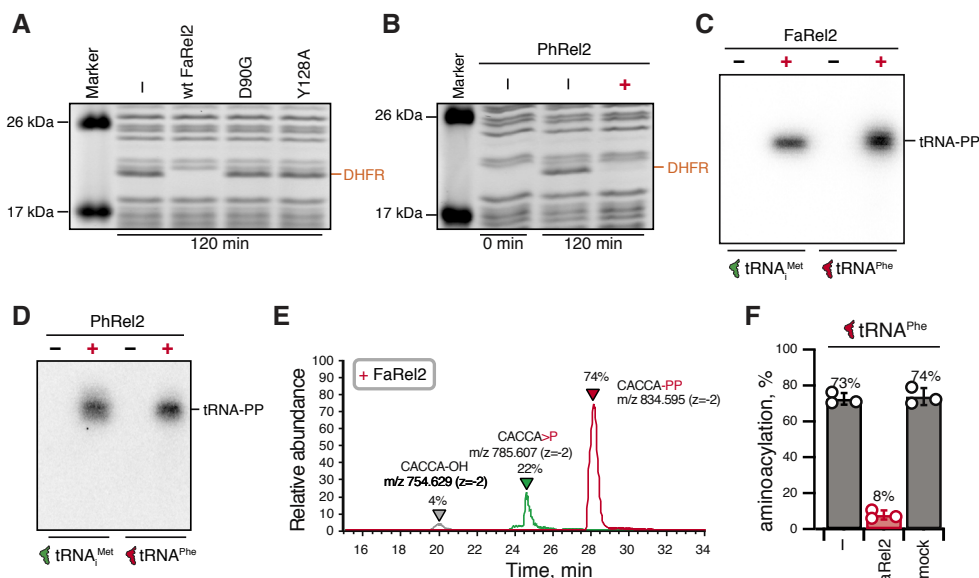
翻訳阻害活性を有することを確認することができた (図 4A, B)。

そこで RSH の酵素活性にもう一度振り返った。まず基本として、(p)ppGpp は ATP を供与体としてグアニンヌクレオチドの 3' 位の水酸基をピロリン酸に置換することによって合成される。この時 GDP がピロリン酸化すると ppGpp ができ、GTP の場合は pppGpp が合成される。ここまで頻出してきた (p)ppGpp という表記はこれらをまとめたものであり、前半の p は 5' 位の、後半の p は 3' 位のリン酸基の数を示している。一方で、ppApp の場合は GDP の代わりに ADP の 3' 位がピロリン酸化されることによって合成される。つまり RSH の活性に共通することは、ATP を供与体としてリボヌクレオチドの 3' 位をピロリン酸化するという点である。

ここで PUREsystem を構成する物質を見てみると、*toxSAS* の活性と翻訳阻害を結びつける因子として tRNA が浮かび上が

ってくる。これまで RSH によるピロリン酸化の標的はリボヌクレオチドであったが、tRNA の 3' 末端はアデニン残基であり、FaRel の基質と共通している。またアデニン残基の 3' 位はアミノアシル化反応によりアミノ酸が付加される位置であり、その位置のピロリン酸化は潜在的にその反応と競合する。tRNA のアミノアシル化が阻害されれば必然的に翻訳反応もまた阻害される。

この仮説を検証するため、精製 tRNA と FaRel2 を ^{32}P で標識された ATP 存在下で反応させ、変性 PAGE により tRNA を分離した後、オートラジオグラフィによりリン酸基の転移を検出した。その結果、開始 tRNA (tRNA^{iMet}) とフェニルアラニン tRNA (tRNA^{Phe}) が FaRel2 に依存してリン酸化された (図 4C)。また、このリン酸基転移は PhRel2 を用いた場合でも確認された (図 4D)。

図4. tRNA のピロリン酸化を介した *toxSAS* による翻訳阻害

(A, B) FaRel2、PhRel2 による再構成翻訳系の阻害。DHFR が目的の翻訳産物。(C, D) tRNA に対する FaRel2、PhRel2 によるリン酸基の転移反応。 γ 位リン酸基が ^{32}P で標識された ATP を使用した。(E) tRNA の 3' 末端のピロリン酸化。FaRel2 により修飾された tRNA^{Phe} の質量分析の結果とそのイオンクロマトグラム。(F) 3' 末端のピロリン酸化による tRNA アミノアシル化の阻害。tRNA^{Phe} と FaRel2 を ATP 存在下で反応し、その後 PheRS (フェニルアラニン tRNA 合成酵素) と ^3H 標識されたフェニルアラニンを加えさらに反応した。反応後酸不溶画分に含まれるフェニルアラニンを液体シンチレーションカウンターにより測定した。(10) より抜粋し編集

ただ、この時点では tRNA の「どの位置」に「いくつ」リン酸基が転移したかという、修飾反応の詳細までは不明であった。そこで東大の鈴木勉先生のグループに質量分析を用いた解析を依頼し、その結果、確かに 3' 末端のアデニン残基がピロリン酸化されていることが明らかとなった (図 4E)。さらに、FaRel2 による 3' 末端のピロリン酸化は tRNAPhe のアミノアシル化を阻害した (図 4F)。これらのことから、前述の仮説の通り、FaRel2 が tRNA の 3' 末端のピロリン酸化をすることによって翻訳を阻害することが示唆された。

6. まとめ

今回は、スウェーデンでの私の研究について、*toxSAS* に焦点をあてて掻い摘んで報告してきた。詳細に関しては直近に報告した 2 報の論文を参照していただくと幸いである (9, 10)。結果として、バイオインフォマティクスを用いた解析に端を発し、いくつかの SAS から RSH の新機能を見出すことができた (図 5)。とりわけ、tRNA のピロリン酸化については目新しいものであり、(p)ppGpp などのアラーム分子の合成とは異なることから、FaRel2 や PhRel2 はこれまで考えられていた SAS (Small Alarmone Synthetase) という括りをもはや逸脱しているようにも見える。本研究では非モデル生物を含めたゲノム情報を用いて遺伝子を探査し、大腸菌などのモデル生物を用いて簡単な *in vivo* の実験と、そのタンパク質の生化学的解析を行うというスキームで、興味深い成果を得られた。一方で、これらの *toxSAS*

の生理的機能については、本来の生物を用いていないため、あまりアプローチできていないのが実情である。ただし、phRel2 として解析された gp29 はマイコバクテリウム属細菌に感染する溶原性ファージ由来で、他のファージによる感染を抑制することが報告されている (14)。したがって、他の *toxSAS* もそのような何らかのバクテリア-ファージ間の生理機能に関連していることを想定し現在新たな実験系を構築している段階である。

本稿ではあまり触れなかったが、*toxSAS* に隣接して保存された遺伝子もまた興味深い。faRel の上流に保存される SAH 遺伝子は、*cognate* な *toxSAS* である FaRel (ppApp 合成) だけでなく、他の *toxSAS* の毒性も中和する (9)。このような SAH は他にもいくつか (PaSpo や PbcSpo) 見つかっており、その緩い基質特異性は進化の過程における SAS 機能の多様化に何らかの形で関与しているかもしれない。また、これらの SAH の存在は私たちにとっては幸運でもあり、SAH の共発現による毒性の中和がなければ、*ToxSAS* タンパク質の精製など到底不可能であった。

phRel2 の下流に保存される遺伝子 (aTphRel2) と *C. crescentus* の SocA アンチトキシンは互いに DUF-4065 ドメインを持つホモログであった。SocA が中和するトキシン SocB は DNA ジャイレースの阻害因子であり、*toxSAS* とは異なる。したがってアンチトキシン側からの観点では、DUF-4065 は多様なトキシンを中和する、一種のコアドメインとなっている可能性がある。

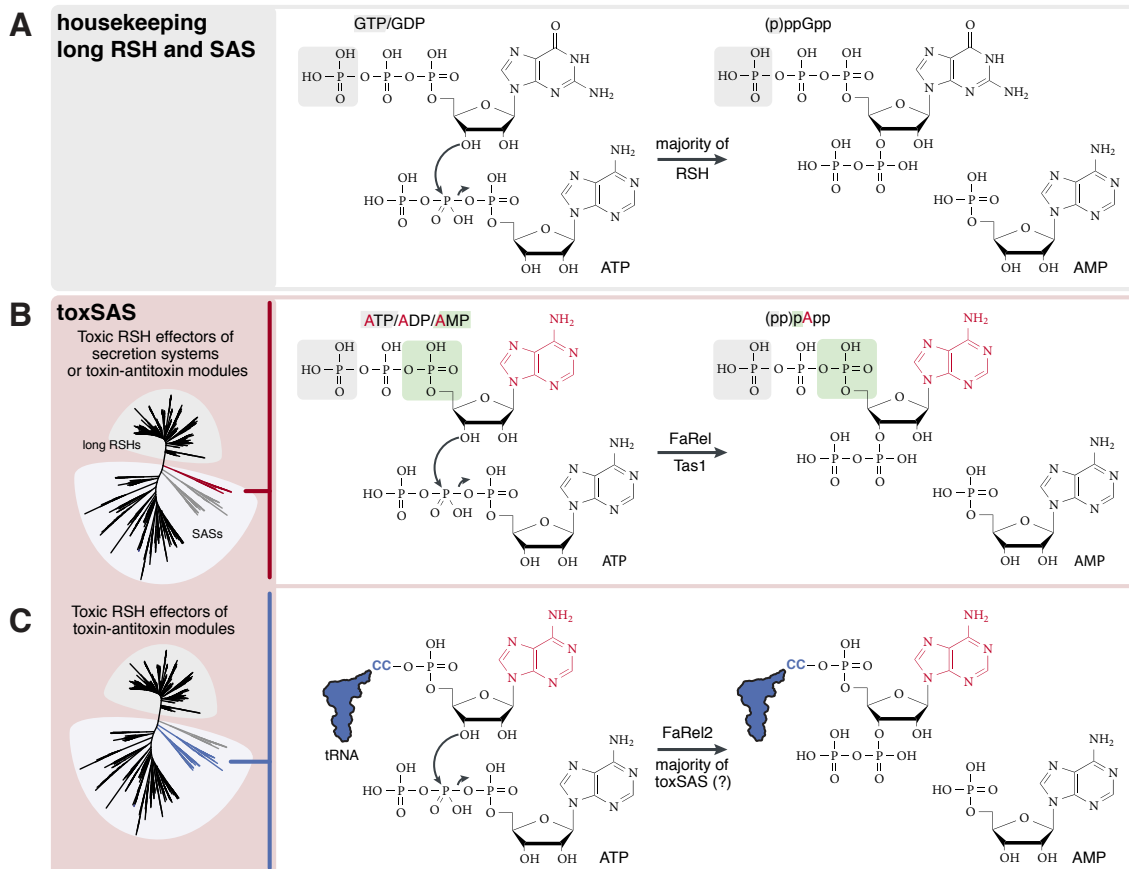


図 5. RSH の (p)ppGpp 合成ドメインの多様性

赤背景の図は SAS ドメインに基づいた RSH の系統樹を模式化したもの。Tas1 は ppApp の合成活性を有する分泌タンパク質。(10)より抜粋

7. 最後に

本研究を共に行った Vasili/Gemma 研のメンバー及び、鈴木勉教授、坂口裕理子氏をはじめとする共同研究者の方々に深く感謝する。また、このような機会をくださったニュースレター幹事の皆様にも深く御礼申し上げる。

いただいたご依頼に海外での研究活動に関する内容も含まれていたため、最後にその点について記す。前述の通り私は2019年よりスウェーデン・ウメオ大学で研究を行なっているが、Vasili/Gemma の移動に伴い今年9月から、同じくスウェーデンのルンド大学に移った。ウメオでの体験に関する記事を先日寄稿したのでこちらも参照していただくと幸いである(15)。このルンドは歴史的な街並みが美しい所で、ルンド大を中心とした学園都市である。市内の至る所に大学施設が点在する一方、郊外には大学に関連するベンチャー企業が並んでいる。地理的にはスウェーデンの南部に位置し、デンマークの首都コペンハーゲンにアクセスが良い。ウメオはオーロラも見えるようなスウェーデンの北部に位置するため、大分ヨーロッパの中心に近づいてきた印象である。実際にヨーロッパ各国の研究者とのコラボレーションも活発化しており、ヨーロッパに来てから感じた、時差すら煩わしい研究のスピード感を改めて実感している。

Vasili/Gemma 研は現在ちょうど過渡期にあり、ラボ移動の決定後、新メンバーの受け入れをルンドへの移動後にずらしたこ

とにより、ラボのメンバー入れ替わりが一時的に出ていく一方の状態になった。このような経緯で実験系ラボの移動とセットアップをほぼ Vasili と二人で行うこととなり、それは現在進行中である。大学によって文化やルールが異なり、ラボのセットアップに苦労する日々だが、この経験もまた貴重なものであり、やがて彼との語り草になるであろうと思う今日この頃である。

引用文献

- 1) Cashel et al. Nature 221: 838–841 (1969)
- 2) Brown et al. Nature 534: 277–280 (2016)
- 3) Arenz et al. Nucleic Acids Res. 44: 6471–6481 (2016)
- 4) Loveland et al. elife 5: 1–23 (2016)
- 5) Roghanian et al. Mol. Cell 81: 3310–3322.e6 (2021)
- 6) Takada et al. Nucleic Acids Res. 49: 444–457 (2021)
- 7) Nanamiya et al. Mol. Microbiol. 67: 291–304 (2008)
- 8) Murdeshwar et al. J. Bacteriol. 194: 4003–4014 (2012)
- 9) Jimmy et al. PNAS 117: 10500–10510 (2020)
- 10) Kurata et al. Mol. Cell 81: 3160–3170.e9 (2021)
- 11) Winslow et al. J. Biol. Chem. 244:3387-92 (1969)
- 12) Varik et al. Sci. Rep. 7:11022 (2017)
- 13) Ahmad et al. Nature 575: 674–678 (2019)
- 14) Dedrick et al. Nat. Microbiol. 2:16251 (2017)
- 15) 倉田 竜明 日本 RNA 学会会報 <https://www.rnaj.org/newsletters/>



図6. ウメオのクライオ電顕（左）およびルンドの新しいラボ（右）

現在も一部のメンバーはウメオに残り、リボソームと関連因子の構造解析を行っている（左）。ウメオのファシリティは北欧地域の拠点となっている。実験台は黒い方が個人的に好みだが、こちらはなぜか白い（右）。ここでも放射性同位体を用いた実験ができるのがありがたい。

年会開催報告

第16回日本ゲノム微生物学会年会 のお知らせ(2)

塩見 大輔

立教大学 理学部 生命理学科

第16回日本ゲノム微生物学会年会を2022年3月2日(水)から4日(金)の3日間完全オンラインで開催致します。対面開催とオンライン開催のいずれの可能性についても考えた準備をしておりましたが、2021年7月の段階では新型コロナウイルス感染症の状況が全く不透明であり、完全オンラインでの開催が決定されました。原稿執筆時点(2021年11月10日)では、陽性者数が全国的に減少しておりますが、依然として今後の感染状況の動向は楽観視できない状況です。会員の皆様には対面での開催を期待されていた方もおられることと思いますが、完全オンラインでの開催になることにご理解いただきますようお願い致します。

発表形式は、前回の年会と同様に、口頭発表をzoom(<https://zoom.us>)で、ポスター発表をZoomとLINC Biz(<https://getlincbiz.jp>)のシステムを用いて行う予定です。Zoomではブ

レイクアウトルームを使用し、口頭発表終了後に発表者と直接議論できます。また、年会組織委員会の企画として、シンポジウム「様々な環境の微生物とその利用」を開催します。ポスター発表では、LINC Bizに年会開催中だけでなく、年会の数日前から数日後までポスターを掲示して頂きます。Zoomでのポスターセッションの発表に加えて、LINC Bizのチャット機能などを通して、深い議論ができるようにします。

オンライン学会では、参加者同士のコミュニケーションを取ることが難しく、対面での学会のような「立ち話」ができません。このような状況では、とくに学生・ポスドクを含めた若い参加者にとっては、新たな人的ネットワークの構築が困難となっています。そこで、学会参加者のコミュニケーションを促進するために、oVice(<https://ovice.in/ja/>)のサイトを年会開催中および年会の前後数日もアクセス可能にしますので、議論やコミュニケーションにご自由にお使い下さい。また、年会2日目にはoVice上でオンライン懇親会を開催する予定です。できるだけ、参加者の間で対面のような感覚でコミュニケーションが取れるような年会にしたいと考えています。

参加登録はGoogle formを用いて、要旨の提出はメールで行います。年会の詳細は年会ホームページ(<https://www2.rikkyo.ac.jp/web/sgmj2022-rikkyo/>)でお知らせ致します。

年会開催にあたって会員の皆様のご理解とご協力を頂きましたら幸いです。そして、できるだけ多くの会員の皆様にご参加頂きますよう、心から願っております。

(年会長:塩見大輔、組織委員:関根靖彦、末次正幸、笠井大司、鈴木祥太、野崎晋五、向井崇人)



会期: 2022年3月2日(水)~4日(金)

年会長: 塩見 大輔 (立教大学 理学部 生命理学科)

完全オンライン開催

Zoomによるライブ配信

LINC Bizによるポスター発表

oViceによる懇親会

学会員の最新の論文紹介コーナー

Relationship between the microbiome and indoor temperature/humidity in a traditional Japanese house with a thatched roof in Kyoto, Japan

小久保舞香¹、藤吉奏²、小椋大輔¹、中嶋麻起子³、
藤枝絢子⁴、能田淳⁵、丸山史人²

¹京大、²広島大、³広島工業大、

⁴京都精華大、⁵酪農学園大

Diversity 13 (10):475 (2021)

<https://doi.org/10.3390/d13100475> (Open access)



住環境には多様な微生物が生息しており人と生活を共にしている。住環境の中で微生物が人や構造物に与える潜在的な影響を明らかにするため、我々はさまざまな住まい方、性能を持つ家屋を対象として微生物群集について調査を進めている。本論文では、我が国の伝統的家屋の代表である茅葺古民家の壁・床面の微生物量と温湿度の関係性を調べた。その結果、茅には未培養の稲分解菌と近縁の細菌が、土間には土間作製時に混ざる“にがり”が原因と思われる *Halococcus* が群集中に高い割合を占めていた。微生物群集は屋外と屋内、あるいは各部屋で類似しており、気密性の高い現代住宅とは全く異なる結果であった。これらは、夏場に窓や間仕切りを開けるなどの居住者の行動や、自然素材を用いて建造する古民家ならではの住環境が反映されていると考えられる。一方、生物量の指標となる DNA 濃度は、年間最低湿度あるいは年間の相対湿度の変動幅と強い相関 ($R^2=0.99$) を示した。これらのことから、茅葺のような伝統的家屋の方が、温湿度管理が進んだ現代家屋よりも、自然環境中の微生物群集を維持可能な環境であると言える。

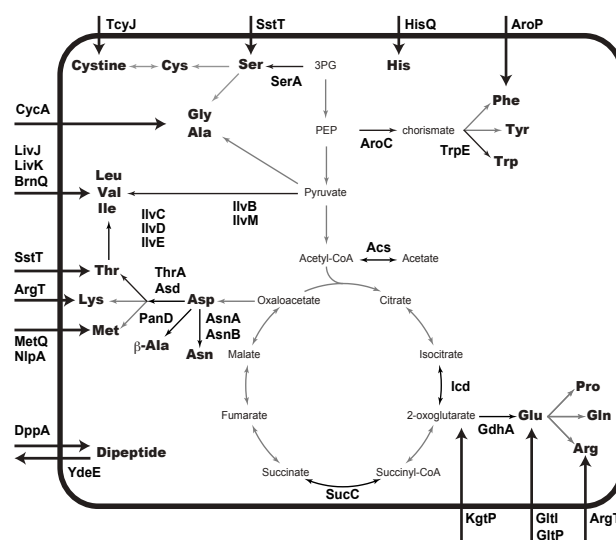
Mining RNA-seq data reveals the massive regulon of GcvB small RNA and its physiological significance in maintaining amino acid homeostasis in *Escherichia coli*

宮腰昌利¹、丘山春奈²、Maxence Lejars¹、神田健¹、
田中佑樹²、板谷佳織²、奥野未来^{2†}、伊藤武彦²、
岩井伯隆²、和地正明²

¹筑波大、²東京工業大、[†]久留米大(現所属)

Mol. Microbiol. in press (2021)

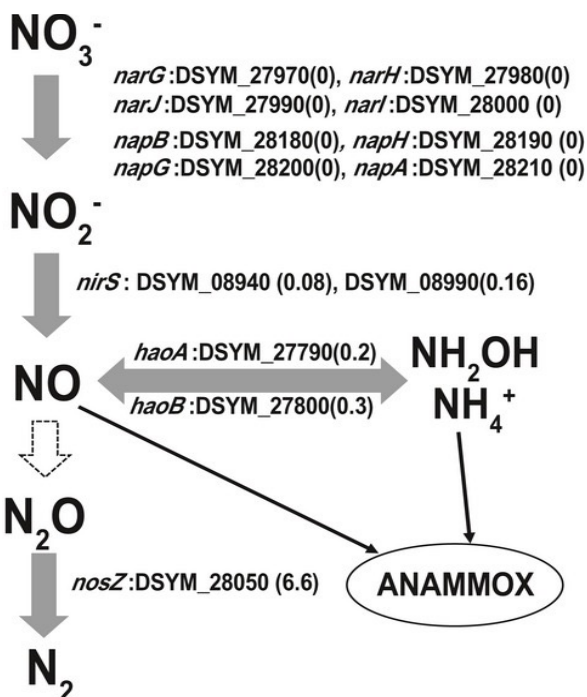
<https://doi.org/10.1111/mmi.14814> (Open access)



GcvBは大腸菌などの腸内細菌科を含むγ-プロテオバクテリアに広く保存されている small RNA である。大腸菌で3種類の RNA-seq 法 (RIL-seq, CLASH, MAPS) によって報告されていたデータを精査することにより、GcvB との塩基対形成を介して発現が制御される遺伝子を同定した。まず3種類の RNA-seq データ全てに共通するものとして47遺伝子が抽出された。さらに GcvB の2つのシード配列 R1 と R3 のいずれか、もしくは両方と塩基対を形成して発現が転写後レベルで制御されるものとして、21 遺伝子を明らかにした。これにより大腸菌の GcvB 標的遺伝子は合計で54遺伝子となった。GcvB はほぼ全てのアミノ酸の輸送系・生合成経路を制御するだけでなく、核酸合成、細胞膜合成や翻訳制御に関与する遺伝子も調節することが明らかになった。また、大腸菌ペプチダーゼ欠損株の示すジペプチド Ala-Gln 感受性に、GcvB によって制御される Dpp ジペプチド取り込み系と YdeE ジペプチド排出担体が関与していることが示された。

Metabolic potential of the imperfect denitrifier *Candidatus**Desulfobacillus denitrificans* in an anammox bioreactor大久保 卓¹、高見英人¹¹ 海洋研究開発機構

MicrobiologyOpen 10 (4) e1227 (2021)

<https://doi.org/10.1002/mbo3.1227> (Open access)

Ca. D. denitrificans の窒素代謝能。()内は ribosomal protein との RPKM 比。点線の矢印は欠損反応。不完全脱窒菌の副産物 (NO, NH₂OH, NH₄⁺) が anammox バクテリア (*Ca. B. pituitae*) に供給されていると考えられる。

一酸化窒素 (NO) 還元酵素を欠く不完全脱窒菌である *Ca. D. denitrificans* は、嫌氣的アンモニア酸化 (anammox) アクターに頻出する。本論文ではゲノム、トランスクリプトミクスを通して *Ca. D. denitrificans* の代謝能を評価し、anammox 細菌 (*Ca. B. pituitae*) との関係性を推定した。*Ca. D. denitrificans* は不完全脱窒の副産物である NO を *Ca. B. pituitae* に供給すると思われるが、本菌は NH₄OH の NO への酸化とその逆反応をするヒドロキシルアミン酸化還元酵素も有していた。*Ca. D. denitrificans* は芳香族化合物、グルコース、硫黄化合物、水素など様々な電子供与体を脱窒反応に利用可能だが、メタトランスクリプトーム解析の結果、電子供与体は、主に anammox 反応を阻害する芳香族化合物であることが示唆された。この芳香族化合物を介した相互作用が、両細菌の個体群バランスを支配していると考えられる。また、*Ca. D. denitrificans* は、不規則なカルビンサイクルを介した CO₂ 固定能も有しており、これら多様な代謝能が本菌の anammox アクターでの定着性に貢献していることが示唆された。

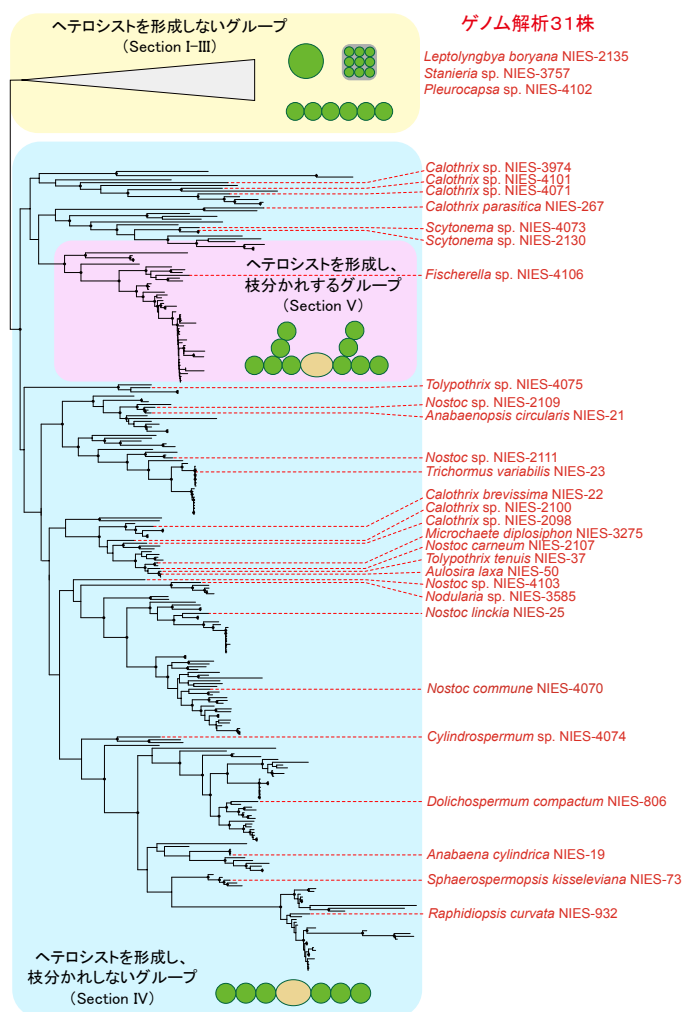
Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection

with a focus on the heterocyst-forming clade

広瀬 侑¹、大坪 嘉行²、三澤 直美¹、米川 千夏¹、長尾 信義¹、志村 暉平³、藤澤 貴智⁴、兼崎 友⁵、加藤 浩⁶、片山 光徳⁷、山口 晴代³、吉川 博文⁸、池内 昌彦⁹、浴 俊彦¹、中村 保一⁴、河地 正伸³

¹豊橋技科大、²東北大、³国立環境研、⁴国立遺伝研、⁵静岡大、⁶三重大、⁷日本大、⁸東京農業大、⁹東京大

DNA Res. 28(6):dsab024 (2021)

<https://doi.org/10.1093/dnares/dsab024> (Open access)

地球上には多様なシアノバクテリアが存在し、光合成反応の分子メカニズム、バイオマス生産、生態系における物質循環等、幅広い研究分野で注目されている。シアノバクテリアの中でも、ヘテロシストと呼ばれる異型の細胞をつくるグループはゲノムサイズが大きく、精度の良いゲノム情報の整備が遅れていた。本研究では、国立環境研究所 (NIES) が保管する 28 株のヘテロシスト形成株と 3 株の非形成株、合わせて 31 株のシアノバクテリアのゲノム解析を行った。ゲノム解析株およびゲノム情報は全世界の研究者に公開され、シアノバクテリアの多様性の理解と、それを活用した基礎・応用研究の進展に貢献できる。今後は、糸状性のヘテロ形成能を持たない株のシーケンスや、データベースの分類情報の精査が重要である。

実験レシピ紹介コーナー第4回

ゲノム DNA を鋳型にした
サンガーシーケンシング

大坪 嘉行 東北大

「細菌のゲノム DNA を鋳型にしてシーケンス読めますよ」と言うと、「ゲノムを鋳型に PCR で増やしてから、PCR 産物を鋳型にして読むってことでしょうか？」と聞き返されますが違います。ゲノム DNA と primer を混ぜて、シーケンス反応をします (BigDye kit を使用)。実際のところ、あまり長くは読めませんが、100 塩基でも読めれば良いという場合に有用です。筆者は以前、ICE (integrative and conjugative element; いわばゲノムに潜り込んだプラスミド) がゲノム中のどこに潜り込んだかを調べるのに、ゲノム鋳型シーケンスを実施したり (1)、ゲノムに integrate させたプラスミドの integration 位置の決定を多数行うなどしています (2)。

現在、筆者が考えるポイントは以下の通りです (最適化はしていません …)。

- (1) 特異性が高い primer を用いる。
- (2) 鋳型 DNA を十分に精製し、十分量用いる。
- (3) シーケンス反応溶液で kit をケチらない。
- (4) サイクル数を増やす。
- (5) エタノール沈殿で精製。
- (6) インジェクション時間を伸ばす。

各ポイントについて具体的には以下の通りです。

(1) primer の 3' の特異性に注意して primer をデザインします。弊ソフト「GenomeMatcher」の PrimerFinder は、複数指定した配列中の一配列の指定位置からユニークな k 塩基 (例えば 11 塩基) を探し出し、これに基づいて primer 候補を出力する機能です。例えば 1 kb のトランスポゾン DNA をゲノムに飛ばし、その近隣配列を読み取りたい場合は、ゲノム配列 + トランスポゾンの配列を入力し、トランスポゾンの末端部分 (例えば配列中 50 から 150 塩基の部分) を指定します。PrimerFinder は指定部分にしかない 11 塩基を探し出して、これを起点にして 5' 方向に、別に指定した T_m 値を超えるまで配列を伸ばして行き、primer 候補配列として出力します。

(2) kit を用いてゲノム DNA を調製している場合には、追加で PCI 抽出とエタノール沈殿を行い、100 ~ 1000 ng を反応に用います。kit の説明書に、調製後そのまま以後の反応に用いることができると書いてあっても信じないようにします。超音波

で DNA を切ると良く読めるような気がしますが、未確認です。

(3) 以下の組成を参考にしてください。BigDye premix が高いわけですが、これくらいは許容範囲かと思います (なお PCR 産物のシーケンシングの場合、筆者は 3 μl スケールで反応を行い、BigDye premix は 0.075 μl/sample です)。

表 1, 反応組成

5x sequencing buffer	1 μl
1.6 pmol primer	1 μl
水 + DNA	6 μl
BigDye terminator premix	2 μl
total	10 μl

(4) 70 から 100 サイクルを増やします。一方、伸長時間を 1 分程度に下げます。あまり増やしすぎると T のピークが小さくなる、ということがあるような気がします。

(5) 精製キット (例えば BigDye X Terminator™ Purification Kit) では反応産物濃度が薄くなってしまいますのでエタノール沈殿で精製します。

(6) シーケンサーの解析条件のうち injection 時間を通常 6 秒のところを 90 秒程度まで伸ばします。injection 時間と得られるシグナル強度はおおよそ比例するようです。injection 時間を長くするとピーク解像度が劣化しますが、長く読むわけではない場合にはそれほど影響がありません。なお、最近、株式会社日立ハイテクより新型のシーケンサー DS3000 が発売されました。こちらの機器でも injection 時間の変更ができるようです。

通常、1 kb の PCR 産物を鋳型にして、鋳型を 1 ng 程度、サイクル数 25、精製キットを使用 (最終的に 70 μl)、injection 6 秒といった条件だと思います。5,000 kb のゲノムが鋳型だとしても、鋳型量を 100 倍、サイクル数を 3 倍、精製方法をエタ沈 (最終的に 10 μl) にして濃度を 7 倍、injection 時間を 15 倍にすれば、十分読める、ということかと思います。まずはお試しを。

引用文献

- 1) Ohtsubo et al. J. Bacteriol. 194:4237–4248 (2012)
- 2) Nishiyama et al. Env. Microbiol. 12:2539–2558 (2010)

閑話休題 - その12 - 夏から秋にかけて咲く花々

このところ相変わらずあまり遠出ができませんので、もっぱら神戸市近郊の山や公園などで花の写真を撮影しています。ただし、かねてより実物を見たかったトウヤクリンドウだけは高山から乗鞍にバスで登って撮ってきました。また、知人の紹介で訪れたあいな里山公園というところはなかなかいいところで、いろいろな里山の植物がありました。また春に行ってみようという計画しています。(磯野克己)



トウヤクリンドウ (リンドウ科)
Gentiana algida Pall., 2021.8.31 乗鞍岳



ウド (ウコギ科)
Aralia cordata Thunb., 2021.10.20 神戸市



ゲンノショウコ (フウロソウ科)
Geranium thunbergii Sieb. ex Lindl. et Paxton
2021.9.29 神戸市



セージ (シソ科)
Salvia guranitica A.St.-Hil. ex Benth
2021.9.10 神戸市布引ハーブ園



← イヌコウジュ (シソ科)
Mosla scabra C.Y.Wu et H.W.Li
2021.9.22 神戸市

キンエノコロ (イネ科) →
Setaria pumila Roem. et Schult.
2021.9.29 神戸市



学会の動向

2021年度日本ゲノム微生物学会役員

会長：黒川 顕

庶務幹事・会計幹事：大島 拓、渡辺 智

集会幹事：河野 暢明、森 宙史

広報幹事：矢原 耕史、大島 拓

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：相馬 亜希子

評議員 (会長推薦を含む)：朝井 計、跡見 晴幸、飯田 哲也、

岩崎 渉、大西 康夫、永田 裕二、仁木 宏典、布浦 拓郎、

野尻 秀昭、林 哲也、本郷 裕一、南澤 究、市川 夏子、

大林 龍胆、神沼 英里、島田 友裕

会計監査：阿部 貴志、伊藤 武彦

会員の動向

一般会員 343 名、学生会員 134 名、名誉会員 3 名

賛助会員 12 名、機関会員 1 名 (計 493 名)

編集後記

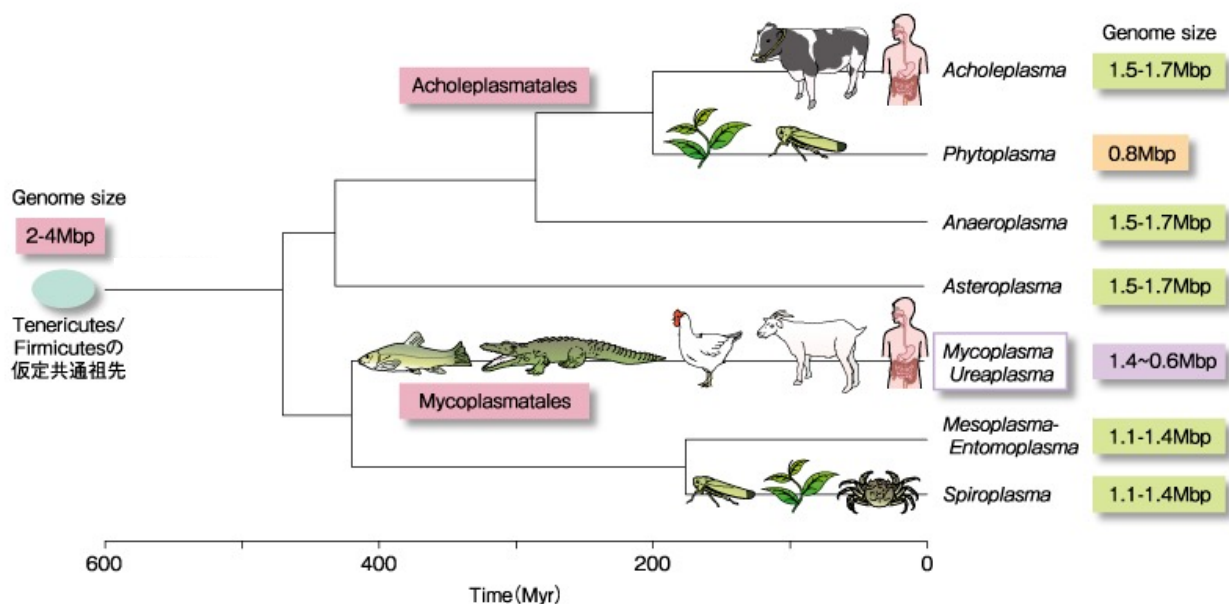
柿の実が赤く色づき、干し柿づくりの季節がやってきました。紅葉の沼にコハクチョウも舞い降りる季節、ジョウビタキのヒーッと澄んだ声が碧い空に響き渡ります。青と赤コントラストのイソヒヨドリは美しい声で囀っています。24号の編集も大坪、佐々木、佐藤、相馬、広瀬で行ってまいりました。

ところで、2年後に大阪で開催予定の国際学会について御紹介させてください。マイコプラズマというゲノムが小型の細菌達 (分類は Mollicutes 綱) に特化した学会です。この細菌達は、植物、昆虫、甲殻類、魚類、鳥類、ほ乳類が地球上に現れるのに共進化し寄生したのではないかと仮説が立てられる程に、宿主特異性があります。おまけに産業植物、産業動物、人間に病気を引き起こす種も多くあり、国際マイコプラズマ学会 (IOM) は、異なる分野の発表が集まる学際的な会議です。小型ゲノムの特性を活かした世界初の合成生物としても有名で、昨今では合成生物の応用もされはじめています。進化、微生物生態、感染症の疫学や疾病病態、ワクチン開発など日本ゲノム微生物学会の方々が興味をいだかれることでしょう。

国際マイコプラズマ学会 (IOM) 2023 大阪の詳細は、下記の URL からご覧になれます。HP から Twitter に入ることができます。2023年7月16-20日は、大阪市中央公会堂 (国指定重要文化財) に集いましょう。下記に学会サイトを記します。

<https://www.iom2023-osaka.org/>

Phylogenic tree of mycoplasma and related mollicutes



Phylogenetic tree: Manilof J. "Phylogeny and evolution" in Molecular biology and pathogenicity of mycoplasma, by Razin S and Herrmann R (eds) Kluwer academic/ Plenum publishers
Yuko Sasaki, 「Mebio」29 (10): 16-23, 2012 より引用