

日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

巨大プラスミドグループ IncP-2 群における誤分類の是正

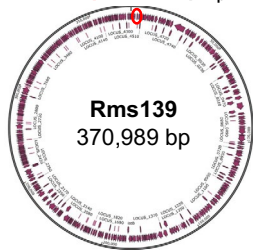
新谷政己^{1, 2}、鈴木治夫³、野尻秀昭⁴、鈴木仁人⁵

1) 静大院・総合科技、2) 静大・グリーン研、3) 慶大・環境情報、4) 東大・AgTECH、5) 感染研・薬剤耐性セ

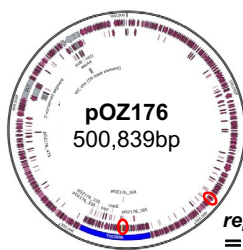
IncP-2群: 緑膿菌を宿主とする薬剤耐性遺伝子を伝播する巨大プラスミドグループ

日本で発見された
IncP-2群プラスミド

$repP-2A = repA_{pRBL16}$



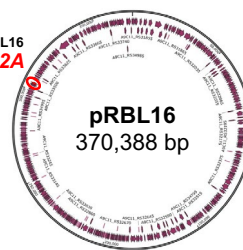
最初に塩基配列が解読された
IncP-2群プラスミド



$repA_{pRBL16} = repP-2A$

$repA_{IncP-2}$
→IncP-2群を規定するRIP遺伝子と誤同定
(誤分類を引き起こしていた)

新規Inc_{pRBL16}群に属すると
提唱されたプラスミド



複製開始タンパク質をコードする遺伝子 $repP-2A$ は、pRBL16 で $repA_{pRBL16}$ と命名された遺伝子と同一。

Inc_{pRBL16}群こそが真のIncP-2群

近年、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* を含むグラム陰性菌のプラスミドを介した薬剤耐性遺伝子の拡散が、これまで効果のあった抗生物質の効かない多剤耐性菌の出現を促し、世界的な公衆衛生上の脅威となっている。従って、こうしたプラスミドの同定と正確な分類は、多剤耐性菌による感染症の拡大を防ぐ上で極めて重要となる。不和合性 (incompatibility, Inc) 群は、複製開始を担うタンパク質、RIP (replication initiation protein) と、複製開始点 (*oriV*) の類似する2種類のプラスミドが、同一の細胞内で維持されない性質に基づくプラスミドの分類群で、緑膿菌を宿主とするプラスミド群としては、IncP-1 から IncP-14 群が提唱されている。各不和合性群を規定する RIP 遺伝子配列が同定されるにつれ、その塩基配列に基づく分類が容易にできるようになった。しかし、最初に RIP 遺伝子のミスアノテーション (誤同定) が生じると、他のプラスミドの誤分類が頻発してしまう。IncP-2 群は、400 kb を超える巨大プラスミドを含むプラスミド群で、種々の薬剤耐性遺伝子を有する。本研究では、日本で発見され、不和合性試験を経て IncP-2 群とされた、薬剤耐性プラスミド Rms139 の完全長塩基配列を解読した。推定 RIP 遺伝子と複製開始点 *oriV* を含むミニレプリコンが、緑膿菌内で複製されたことから、当該遺伝子を $repP-2A$ と命名した。しかし、IncP-2 群プラスミドで最初に塩基配列が解読された pOZ176 の RIP 遺伝子として報告された配列 (doi: 10.1128/AAC.00423-13) と、 $repP-2A$ の配列には類似性が認められなかった。これは、pOZ176 が2つの RIP 遺伝子 ($repP-2A$ と相同な遺伝子と非相同な遺伝子) を有し、非相同な遺伝子の方が、IncP-2 群プラスミドの RIP 遺伝子として誤認識されていたためであった。そこで、 $repP-2A$ の塩基配列に基づいて公的データベース (PLSDB, <https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb>) に登録されたプラスミドを再分類したところ、種々の薬剤耐性遺伝子を有する巨大プラスミドを、IncP-2 群プラスミドとして見出すことに成功した。さらに、新たな Inc 群として提唱された Inc_{pRBL16} 群プラスミド pRBL16 (doi: 10.1093/jac/dkaa143) の RIP 遺伝子は、 $repP-2A$ と同一の配列を示し、Inc_{pRBL16} 群は IncP-2 群と同一であることも判明した。

発表論文: Shintani M, Suzuki H, Nojiri H, Suzuki H. Precise classification of antimicrobial resistance-associated IncP-2 megaplasmids for molecular epidemiological studies on *Pseudomonas* species. J. Antimicrob. Chemother. 77(4):1203–1205 (2022)

奨励賞受賞研究

細菌の mRNA から生成する機能性 RNA の発見

宮腰 昌利

筑波大学・医学医療系



細菌の遺伝子発現制御の研究は、ゲノム微生物学によって飛躍的に進歩してきた。様々な RNA-seq 解析の応用によって、転写の開始から終わりを定量的に 1 塩基レベルの解像度で網羅し、ゲノムブラウザで容易に閲覧できるようになっている。さらには、転写産物のどの領域が翻訳されるかも明らかになり、最近では小さなペプチドなど新しい機能分子が同定されてきている。「設計図」であるゲノム DNA が解読され、「部品」である RNA やタンパク質の構造や機能がおおよそ明らか

になってきている中で、「部品」としては同じでも、細胞では発現様式が異なる場合もあり得る。「部品」が時空間でどのように発現、機能するのか、さらには一つ一つの細胞ごとにどのように発現が異なり集団として機能するのか、今後の更なる研究の発展、応用が期待される。

細菌ゲノムに見られる特徴的な構造であるオペロンは、プロモーターから同一の mRNA として転写される転写単位と、本来はその制御に関わる領域全てを含むものとして定義されている（単純にゲノムで同一方向に並ぶ遺伝子群をオペロンと呼ぶ例も散見される）。細菌では、タンパク質複合体のサブユニットなど複数のタンパク質をコードする遺伝子がオペロンを構成することが多く、機能が関連するタンパク質の発現を転写レベルで同時に制御することが可能である。このようなポリシストロニックな mRNA から発現する各タンパク質のストイキオメトリーは、遺伝子の順序は保存されていなくても、大腸菌から枯草菌にいたるまで進化系統が異なる生物種にも維持されている。したがって、転写レベルの制御に加えて、各遺伝子の翻訳効率もしくは mRNA の安定性を制御する転写後レベルの制御が重要になると考えられる。

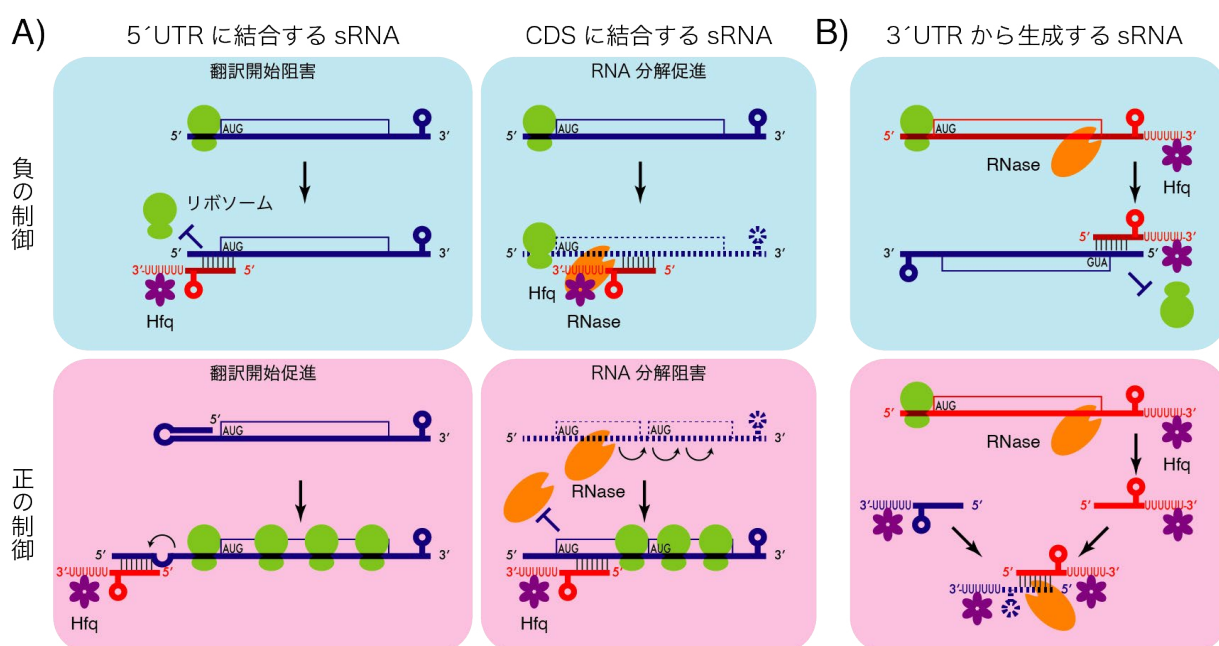


図 1. バクテリア sRNA の作用機構

A) sRNA は mRNA の 5' UTR に結合してリボソームを阻害、もしくは CDS に結合して RNase による mRNA の分解を促進して負に制御する。正の制御では sRNA が mRNA の 5' UTR の翻訳阻害構造を解除する、もしくは CDS 内に結合して mRNA 分解を阻止する。B) 3' UTR はプロセッシングを経て sRNA を生成し、従来の sRNA と同様に他の mRNA を負に制御する。sRNA が sRNA を抑制すると正の制御の制御に転ずる。

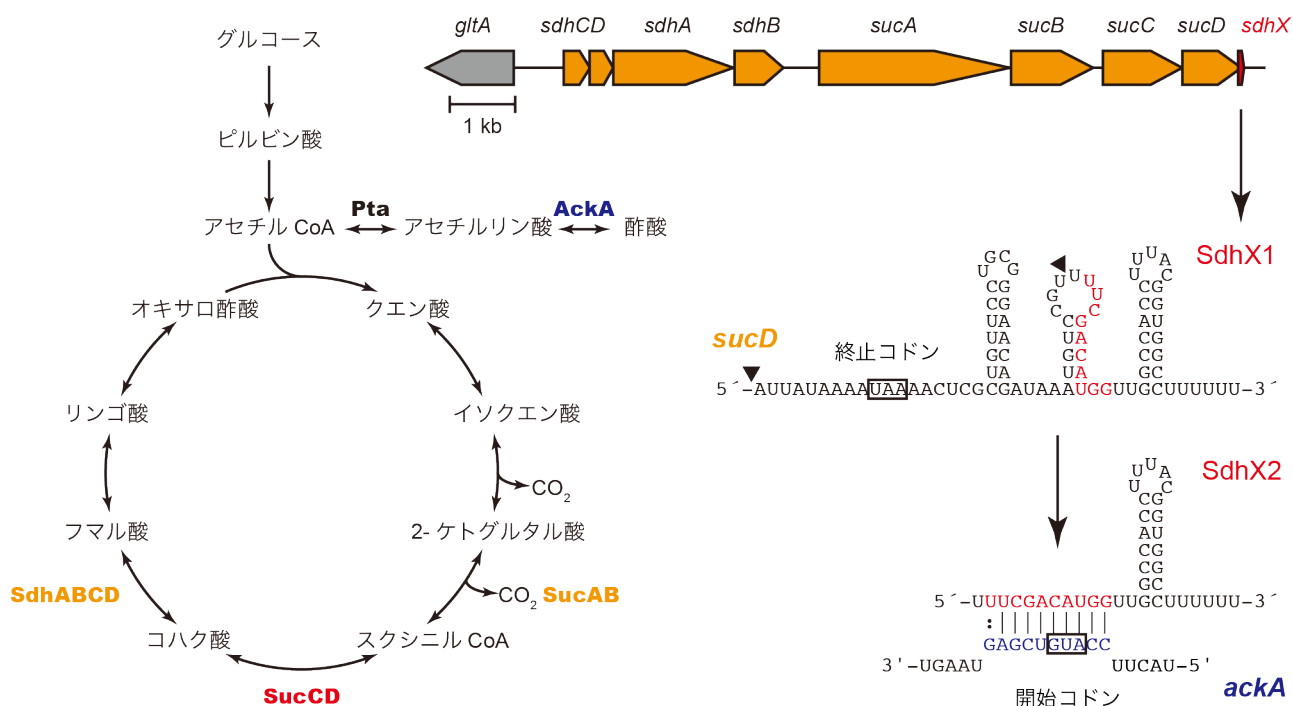


図 2. TCA 回路オペロン mRNA の 3'UTR から生成する sRNA SdhX

sucD mRNA から RNase E によるプロセッシングを経て生成される SdhX は、*ackA* の開始コドン周辺に塩基対形成することで *AckA* の発現を転写後レベルで抑制する。

転写レベルの制御を司る転写因子に関しては、一つの生物種の全ての転写因子がそれぞれゲノム DNA 上のどの領域に結合するのかが網羅的に明らかにされてきている。一方で、転写後レベルの制御に重要な役割を果たしている small RNA (sRNA) は、RNA シャペロン Hfq の作用によって mRNA とトランスに塩基対形成することで、RNA の安定性や翻訳効率を制御する (図 1)。sRNA についても、MAPS や RIL-seq などの RNA-seq 解析の応用によって、その標的 RNA が網羅的に同定されてきている。我々は最近、sRNA-RNA 相互作用データを解析することにより、大腸菌のアミノ酸輸送系・合成経路をグローバルに制御する sRNA GcvB の標的 mRNA を新たに同定し、GcvB レギュロンが 50 以上の遺伝子で構成されることを明らかにした (Miyakoshi, Okayama et al., 2022 Mol. Microbiol.)。大腸菌の sRNA は少なくとも 100 種類以上存在するが、このような研究手法によって更に RNA 制御ネットワークの全体像が見えてくるであろう。一つの生物種において転写レベルと転写後レベルの制御ネットワークがどのようにクロストークしているのか、今後明らかにしていく必要がある。

ここで、トランスに作用する sRNA の標的配列は、mRNA の 5'UTR もしくは CDS に位置することが多く、3'UTR が制御を受ける場所になることは稀である。細菌では転写と翻訳が共役するため、3'UTR が転写されるのは最初の翻訳がほぼ終結する時点であり、その頃には mRNA の他の部分は分解されている可能性が高い。CLIP-seq 解析などで Hfq に結合している RNA が網羅的に同定された結果、Hfq は sRNA と同様に Rho 非依存

性ターミネーターを持つ 3'UTR にも結合していることが明らかになった。もし 3'UTR に他の RNA と塩基対形成する配列が備わっていれば、3'UTR は「部品」としては sRNA と全く同じであり、転写後調節因子として機能することが理論的には可能である (Miyakoshi et al., 2015 Curr. Opin. Microbiol.)。筆者は、大腸菌やサルモネラにおいて、このような 3'UTR が実際に転写後調節の機能を持つことを明らかにしてきた。原核生物の mRNA 3'UTR から生成する sRNA は、大腸菌などのグラム陰性細菌に限らず、グラム陽性細菌やシアノバクテリアに至るまで、様々な生物種で報告例が増加してきている。

この発見の最初の例は、グルタミン酸・アスパラギン酸 ABC トランスポーターオペロン *gltIJKL* の *gltI* mRNA 3'UTR から生成する sRNA SroC である (Miyakoshi et al., 2015 EMBO J.)。 *gltI* は上述の GcvB の標的遺伝子の一つであるが、その 3'UTR は RNase E によるプロセッシングを受けて SroC を生成する。当初は、SroC も通常の sRNA と同じように mRNA を標的とすることを想定していた。しかし実際には、SroC は GcvB と 2ヶ所で塩基対形成することで、GcvB の RNase E による分解を促進することが判明した。本研究は、sRNA が sRNA を制御する最初の発見である。GcvB によって制御される mRNA が SroC を生成して GcvB の分解を促進し、さらに SroC による GcvB レギュロンの脱抑制を通して、グルタミン酸・アスパラギン酸だけでなく複数のアミノ酸の輸送を同時に活性化する RNA 制御ネットワークが明らかになった。

次に、約 10,000 塩基にわたる TCA 回路酵素群オペロン *sdh-*

CDAB-sucABCD mRNA の 3'UTR から生成する sRNA SdhX を同定した (Miyakoshi et al., 2019 Nucleic Acid Res.)。RNase E によるプロセッシングを受けた 40 塩基の SdhX2 は Hfq 結合性 sRNA の中でも最小のものであり、標的 mRNA と塩基対形成するシード配列と Rho 非依存性ターミネーターだけで構成されている (図 2)。SdhX のシード配列に対して相補的な配列を腸内細菌科ゲノムから抽出し実験的に検証した結果、SdhX は酢酸キナーゼをコードする *ackA* をはじめ、中心炭素代謝系を包括的に制御することを明らかにした。ポリシストロニックな mRNA が、タンパク質だけではなく 3' 末端に機能性 RNA をコードすることで、その機能を拡張していることを示した。現在筆者らは、グルタミン合成遺伝子 *glnA* など、他にも代謝に関与する mRNA の 3'UTR の機能解析を進めている。

以上のように、細菌の mRNA にはタンパク質を翻訳すると同時に sRNA を生成して転写後調節する 2 つの機能を兼ね備えているものがある。対照的に、本来はタンパク質をコードしないノンコーディング RNA として考えられてきた sRNA の中に、実は転写後調節機能だけでなく小さな機能性ペプチドをコードするものも最近発見されている。このような二元的な機能を有する同一分子において、それぞれの機能は「部品」としては分離可能でも、その発現は転写と翻訳の共役によって制限されていると想像される。セントラルドグマは奥深く、そこには未知の精巧なメカニズムが存在していると思われる。

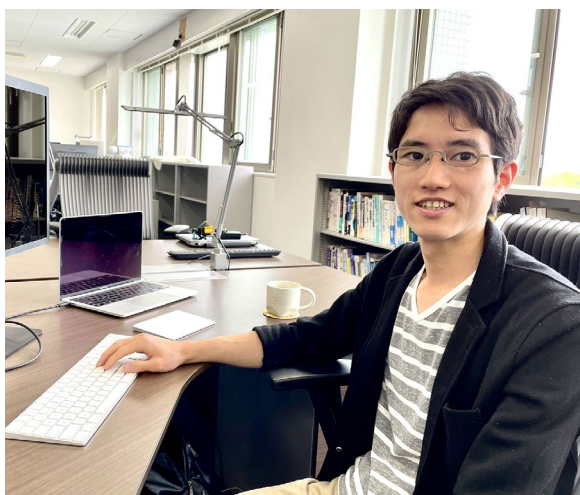
最後になりましたが、日本ゲノム微生物学会の関係者の皆様、選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。また、今回の受賞は野尻秀昭先生、津田雅孝先生、ヨークフォーゲル先生をはじめとする諸先生方、共同研究者の皆様のご指導、ご支援の賜物です。心より感謝申し上げます。

若手賞受賞研究

ゲノム縮小が大腸菌の増殖に及ぼす影響の網羅的分析

黒川 真臣

国立遺伝学研究所・ゲノム進化研究室



大腸菌ゲノムから細胞増殖に無関係な機能の遺伝子を取り除くと、大腸菌はより速く増殖できるでしょうか？大腸菌ゲノム上には4,000以上の遺伝子があり、2018年時点でも約28%の遺伝子は機能が同定されていません(1)。加えて、安定した実験室環境では機能しない遺伝子もあります。転写、翻訳、DNA複製におけるエネルギーや化合物利用の効率化を考えると、機能的に増殖と無関係な遺伝子の欠失は速い増殖につながる可能性があります。一方で、ゲノムは染色体物理構造や全遺伝子の発現バランスなども含めて適応度が高くなるように進化したため、遺伝子が抜け落ちることはゲノム全体としての機能に支障をきたすかもしれません。冒頭で述べた問いを出発点とし、私たちは非必須遺伝子群の欠失が大腸菌の表現型に与える影響を研究してきました。

ゲノム縮小が増殖速度に与える影響を調べるために、大腸菌ゲノムから非必須ゲノム領域が段階的に欠失された、協和発酵広域欠失株コレクション29株の網羅的な増殖測定を実施しました。3種類の液体培地を用いた増殖測定の結果、ゲノムの縮小に相関して増殖速度が低下することが明らかとなりました。さらに、ゲノムの縮小による増殖への影響は貧栄養な条件ほど顕著であることがわかりました(図1A)。増殖速度の低下は別のゲノム縮小株シリーズにおいても報告されており(2)、欠失させる遺伝子の種類に依存せず一般的な現象と考えられます。続いて、コレクションから選んだ5株に対して約1,000世代の実験進化を実施した結果、ゲノム縮小株の増殖速度は野生型株と同程度にまで回復しました(図1B)。これらの結果から、機能的に増殖に寄与しない遺伝子であってもそれらの欠失は細胞

増殖に支障をきたす一方、細胞は遺伝子の欠失に適応するレジリエントな性質を持っていることが示唆されます。

次に、ゲノム縮小に伴う増殖速度への影響と栄養条件の関係をより詳しく理解するために、栄養成分濃度を段階的に変化させた培地セットを作成して、5株の網羅的な増殖測定を実施しました。そして、栄養成分の濃度変化の影響の受けにくさをロバスト性と定義しました。その結果、ゲノムの縮小に相関して、グルコース、アンモニウムイオン、硫酸イオンの濃度変化に対するロバスト性が低下することがわかりました。ここから、炭素源、窒素源、硫黄源の濃度が過剰または希薄である条件では、ゲノム縮小に伴う増殖速度の低下が顕著であることが考えられます。さらに、M63培地を用いた実験進化によって、ゲノム縮小株の各栄養成分の濃度変化に対するロバスト性が上昇することがわかりました(図1C)。ゲノム縮小株において、特定の栄養条件に対する適応が栄養条件の異なる環境における適応度の上昇をもたらしたことは特筆すべき点です。

遺伝情報の変異は増殖と並んで生物の重要な特徴の一つです。変異の多くはゲノム複製の際に確率的に生じる突然変異に起因しており、特定の塩基が1回の複製あたりに突然変異を生じる確率は変異率として評価されます。そこで次に、ゲノム縮小が変異率に与える影響を調べました。その結果、ゲノム縮小に相関して変異率が上昇することが明らかとなりました。ミスマッチ修復遺伝子は欠失していないにもかかわらず、最もゲノムが縮小された株(No. 28)の変異率は野生型株の約20倍に上昇しました。さらに、実験進化の結果No. 28の変異率は低下しました。上述の結果と合わせると、ゲノムの縮小によって増殖速度は低下する一方、変異率は上昇し、さらに実験進化によって増殖速度は上昇する一方、変異率は低下することが示されました(図1D)。異なる生物学的パラメーターが同調するように変化していることは非常に興味深い現象です。

現在のところ、ゲノムの縮小がどのようにして表現型の変化をもたらしているのか明確な説明は明らかにすることはできていません。実験進化によるゲノム変異のみから増殖速度や変異率の回復の原因を説明することは難しく(3)、配列情報のみに依存しない、よりダイナミックなメカニズムによる説明が求められるように思います。大腸菌ゲノムの化学合成(4)も可能になっている時代において、デザインされたゲノムが期待通りの機能を発揮するために必要な細胞内外の条件を理解することが

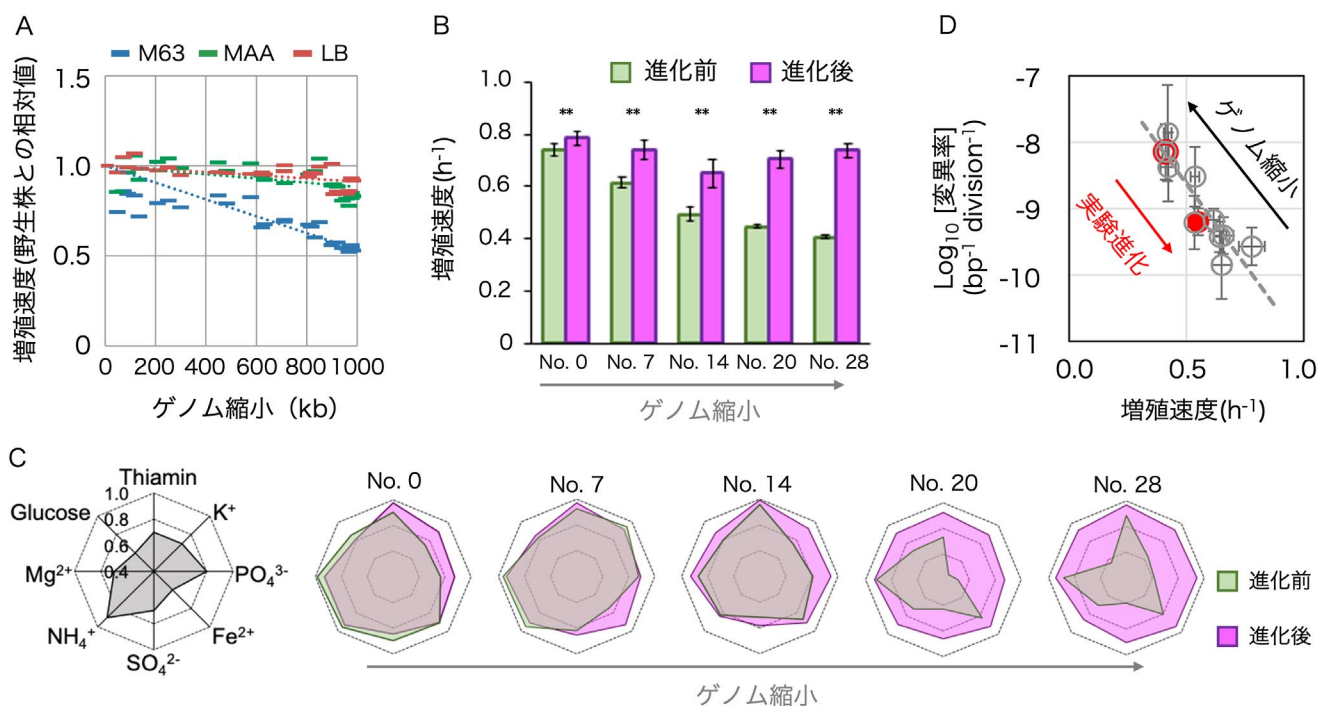


図1. (A) ゲノムの縮小に相関した増殖速度の低下。(B) 実験進化による増殖速度の上昇。番号が大きいほどゲノム配列の欠失が蓄積した大腸菌株を意味する。(C) M63 最少培地に含まれる8種類の培地成分の濃度変化に対するロバスト性。培地成分の濃度を変化させても増殖速度が全く変化しない場合は最大値の1をとる。進化後はM63培地で約1,000世代の実験進化させた後の結果。(D) ゲノム縮小および実験進化に伴う増殖速度と変異率の同調的な変化。灰色のプロットはコレクション中の9株、白抜き赤丸はNo. 28、塗りつぶしの赤丸は400世代ほど実験進化したNo. 28を表す。

より大きな価値を持つでしょう。本研究がゲノム情報と表現型
の関係を理解する一助になれば嬉しく思います。

この度は栄誉ある賞をいただき、大変嬉しく思います。選考
員の先生方、関係者皆様に御礼申し上げます。そして、本研究
を行った筑波大学での研究生活において長きにわたってご指導
をいただきました應蓓文先生には格別な感謝を申し上げます。
また、現在遺伝研にて行っている研究について、年会において
最優秀ポスター賞をいただくことができました。特許出願の関
係上、ニュースレターでの研究紹介は控えさせていただきます
が、ご推薦いただきました皆様、年会で議論させていただきました
皆様に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Karp P. D. et al., *EcoSal Plus* 8(1):1–34 (2018)
- 2) Hashimoto M. et al., *Mol. Microbiol.* 55(1):137–149 (2005)
- 3) Kurokawa M. et al., *Front. Microbiol.* 13:1–12 (2022)
- 4) Fredens J. et al., *Nature* 569:514–518 (2019)
- 5) Kurokawa M. et al., *DNA Res.* 23(6):517–525 (2016)
- 6) Nishimura I. et al., *MBio* 8(4):1–10 (2017)

ポスター賞受賞研究

古細菌のゲノム進化をバクテリアの
ゲノム進化から予測する

今野 直輝

東京大学 大学院理学系研究科



この度は、栄誉ある賞を頂きまして大変嬉しく思っております。ゲノム微生物学会には昨年参加しておりますが、コロナ禍でオンラインという場でも議論しやすい環境を提供して頂き、今年も沢山の方からフィードバックやご批判・激励を頂きましたこと、深く感謝しております。昨年頂いたフィードバックを糧に今年は研究をさらに深めて新しい成果を報告することができ、また先生方・同年代の方の中には昨年の研究内容を覚えてくださった方もいて、この学会を親しみ深く感じられるようになってきました。

「微生物の一番面白いところはどこか？」と考えたとき、今の私はその複雑さと多様さだろうと思っています。例えば代謝マップなどを眺めていると数千個の遺伝子の機能が複雑に組み合わせられた「システム」としての複雑さが感じられます。また地球上には実に多様な微生物が存在していてそれらが全て別々のシステムを持っています。その多様さは共通の祖先から長い進化の歴史によって生まれたものであり、一見、生命のシステムは如何様にも進化できるのではないかとすら感じられるかもしれません。

しかし、実際に微生物のシステムが進化する過程では、異なる系統であるにも関わらず共通の順序で共通の進化(例: 遺伝子獲得・欠失)を起こすという進化順序のルールが存在することが知られています(1)。もしもそれらのルールを網羅的に明らかにできれば、現生の微生物達が「なぜそのようなシステム

を進化させたのか」、「これからどんな進化をするのか」、そして「人為的にどのように改変することは可能/不可能か」を議論することにも繋がると考えられます。そこで私は、機械学習という情報解析技術を導入することで、進化順序のルールを網羅的に見つけ出し、さらに進化の予測を可能にすることを目指して研究を行なっています。

昨年の学会では細菌の遺伝子獲得・欠失による進化には異なる系統で共通の進化順序のルールがあり、機械学習によって進化が予測可能であることを報告しました。その研究の過程で私は、細菌に見られる進化順序のルールがどれだけ普遍的であるのかに興味を持ちました。そこで原核生物のもう一つの系統である古細菌にも共通しているような普遍的な進化順序のルールがあるのか否かを検証したいと考えたのです。

どのようにして進化順序のルールの共通性を測れば良いかと考えたとき、私が既に確立した進化の予測可能性の解析手法を用いることを思いつきました。まず細菌(25,877種)・古細菌(901種)それぞれの系統樹上の各祖先種の各遺伝子の有無を祖先状態推定によって推定します。そして、ある遺伝子を系統樹上の各枝で獲得・欠失する確率を、その枝の直前の祖先種の遺伝子セットの情報から予測する機械学習のモデルを構築します。このモデルに細菌の系統樹上での遺伝子獲得・欠失進化を全て学習させ、古細菌の系統樹のどの枝で獲得・欠失が起きるのかを予測しました。もし、ある遺伝子の獲得・欠失が有意に予測できるならば、その遺伝子の獲得・欠失に先んじて、細菌と古細菌が共通に持っている/いない遺伝子が存在することになるため、ドメインを超えて共通な進化順序のルールが存在することになります。

その結果、驚くべきことに予測可能性を検証した遺伝子(両ドメインで5回以上獲得・欠失されている遺伝子)の全体の傾向として、ランダム予測よりも有意に獲得・欠失を予測可能であることがわかりました。すなわち細菌・古細菌の遺伝子獲得・欠失による進化には共通の進化順序のルールがあると言えます。さらに遺伝子ごとに予測可能性を検定することで、獲得・欠失それぞれ350個程度の遺伝子について有意に予測が可能であることを明らかにしました。

ではどのような進化順序のルールが存在するのでしょうか？ 私たちは特に獲得を予測可能な遺伝子がエンリッチしていた代謝経路である異化的硫酸還元に注目し、この経路の遺伝子の獲得に先んじてどのような遺伝子を持っている/いないのかを検証しました。その結果、両ドメインにおいて異化的硫酸還元の獲得に先んじて獲得されている遺伝子の中には、異化的硫酸還元の機能に必要であるヒドロゲナーゼの成熟に関わる遺伝子(2)や、異化的硫酸還元の阻害剤であるモリブデン酸のトランスポーターの遺伝子(3)が含まれていました。すなわち、予め異化的硫酸還元に必要なまたは重要な遺伝子群を獲得すると、異化的硫酸還元経路を獲得できるようになるという進化の制約が細菌・古細菌で共通に存在するのだと解釈できました。

また異化的硫酸還元を獲得する際に両ドメインで共通して持って「いない」遺伝子が存在することもわかりました。これらには酸化ストレス耐性など好気環境で必要と考えられる遺伝子が多数含まれていました。異化的硫酸還元は嫌気呼吸経路であるため、この経路を獲得する種が好気環境で必要な遺伝子を持っていない傾向はリーズナブルです。このことは異化的硫酸還元獲得に先んじて、両ドメインの遺伝子セットが嫌気環境に適応して収斂していることを示唆します。

このように本研究によって、遺伝子獲得・欠失による細菌と古細菌の進化には共通の進化順序のルールが存在し、それらのルールは遺伝子間の機能関係による進化の制約や共通の環境への収斂進化によって生じている可能性が示されました。今後は、異化的硫酸還元以外の機能も解析してドメイン間で普遍的な進化順序のルールの理解を深める予定です。またこれまでの研究を通じて、大規模な進化解析により進化順序のルールを網羅的に検出できることがわかってきました。私はこれまでに大規模な系統樹を高速推定するための解析手法も開発しており(4)、今後はこれらの技術を基盤として微生物進化の普遍的なルールを明らかにするための研究をさらに推進していきたいと考えています。

引用文献

- 1) Press O. M. et al., *Genome Biol.*, 26(6), 826–833 (2016)
- 2) Hansel, A. et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 201, 59-64 (2001)
- 3) Grunden A. M. and Shanmugam K., *Arch. Microbiol.*, 169, 345-354 (1997)
- 4) Konno, N. et al., *Nat. Biotechnol.*, 40, 566–575 (2022)

遺伝子獲得・欠失進化

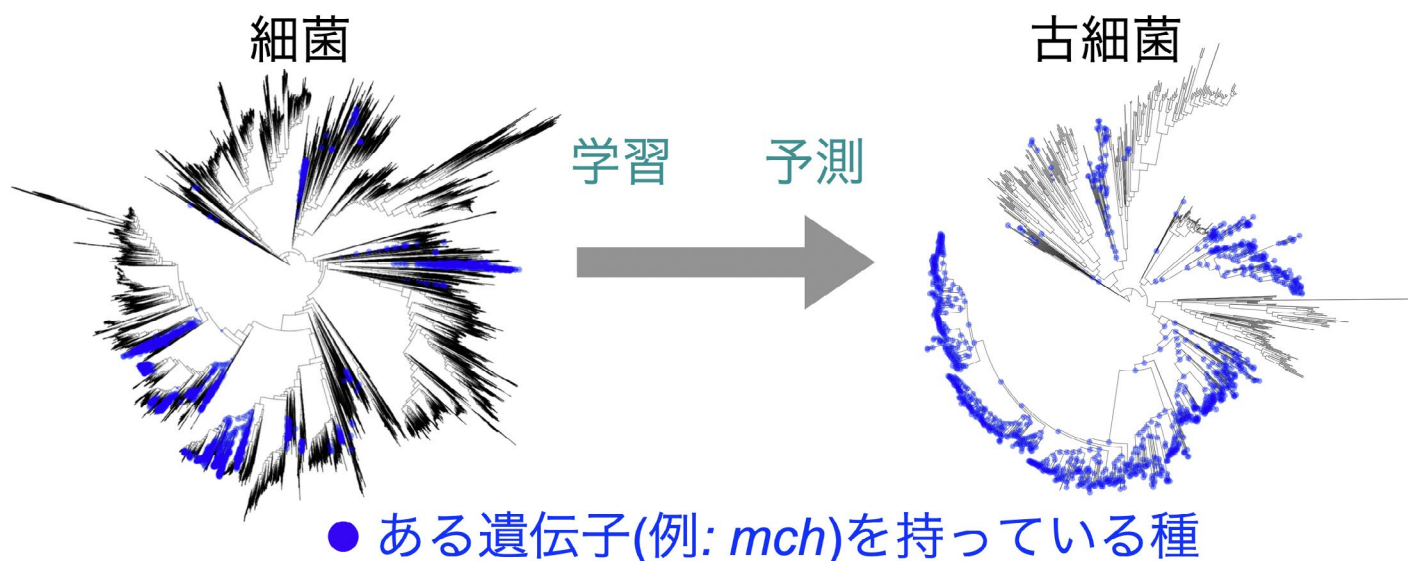


図1. 本研究の枠組み

細菌の系統樹上での遺伝子獲得 / 欠失を学習することで同じ遺伝子を古細菌の系統樹上のどの枝で獲得 / 欠失するのか予測した

ポスター賞受賞研究

酵母を用いた難培養性細菌の

全ゲノムクローニング

水谷 雅希

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門



多くの昆虫はその細胞内外に共生細菌を宿しており、それら共生細菌は宿主昆虫の成育に必要な物質を生産している。この共生関係の中でも、親から子へと垂直伝達される共生細菌は、ゲノムサイズの縮小 (> 0.1 Mb) や偽遺伝子の蓄積が起り、難培養化している (1)。これら難培養性細菌の遺伝子の機能は、配列比較から予測することは可能である一方、遺伝子のノックアウトや過剰発現ができないため、その遺伝子の機能についての確実な証明はほとんどされていないのが現状である。

本研究では、難培養性細菌の遺伝子操作と発現系の開発の第一歩として、極小ゲノムサイズ (0.1-0.2 Mb) の難培養性昆虫共生細菌を標的として、酵母 Transformation-associated recombination (TAR) 法 (2) による全ゲノムクローニングを行った。まず、昆虫共生細菌のゲノム DNA をテンプレートとして、10-30 kb 程度の断片になるように KOD One PCR Master Mix を用いて PCR を行った。この時、隣り合う断片同士が数百塩基程度の重複配列を持つようにして、ゲノム全領域を増幅した。次に、これら PCR 産物を 100-200 ng/断片かつ全量が 10-20 μ l になるように混ぜ、酵母の自律複製起点、セントロメア配列、ウラシル合成遺伝子を持つ酵母染色体ベクターと共に、出芽酵母スフェロプラストにポリエチレングリコール (PEG) を用いて導入した。これら形質転換体酵母をウラシル欠損培地でスクリーニングし、得られたコロニーに対して、各断片の繋ぎ目をまたぐ Junction PCR によって断片の連結の成否を確認し、すべての断片が連結されたクローンを選抜した。そして、形質転換体酵母から昆虫共生細菌クローニングゲノムを粗精製し、次世代シーケンス解析を行った。リードマッピングの結果、テンプレートゲノム全領域に多くのリードが検出されたことから、全ゲノム領域がクローニングされていることが示唆された。その一方で、PCR 断片毎にリード数が数倍異なるようなサンプルもあり、

これらについてはその PCR 断片が重複してクローニングされている可能性が考えられた。これらについては現在、ロングリードシーケンス解析によって詳細を明らかにしている。さらに、変異解析を行ったところ、0.1 Mb あたり 25-35 個の変異が検出された。これには PCR エラーおよびテンプレートとデータベースの差異が混在しているため、テンプレートの次世代シーケンス解析を行い、エラー率の算出を行う予定である。

また、これらクローニングゲノムの発現系を構築するために、ミニマルセルへのゲノム導入も行っている。ミニマルセル (JCVI-syn3.0) は、米国のベンター研究所によってマイコプラズマのゲノム情報を基に創られた人工合成細菌であり、必須遺伝子のみがアSEMBLされたゲノムを持つことから、生命の根幹の理解に貢献することが期待されている (3)。また、遺伝子導入が容易であることから、導入遺伝子の機能解析のプラットフォームとして利用されつつある (4, 5)。そこで、約 0.12 Mb の昆虫共生細菌クローニングゲノムを Cre-loxP 法を用いてミニマルセルに形質転換した。コロニー PCR と次世代シーケンス解析の結果、ミニマルセルへのクローニングゲノムの導入に成功したことが示唆されたが、SDS-PAGE によりタンパク質発現を調べたところ、クローニングゲノムからのタンパク質の発現は検出されなかった。現在、クローニングゲノムからのタンパク質発現を可能にする系を構築すべく、実験を行っている。増殖以外の機能をもたないミニマルセルにおいて、難培養性細菌のゲノムを発現させることができれば、難培養性細菌を疑似的に培養可能に変え、様々な実験に利用できるようになる。また、酵母で利用可能な遺伝子改変技術と組み合わせることで、クローニングゲノムに任意の改変をすることも理論上は可能であり⁶⁾、詳細な機能解析にも繋がる革新的な技術になり得るだろう。

この度はこのような素晴らしい賞をいただき、年会長の立教大学塩見大輔先生、組織委員会の先生方、学会員の皆様に感謝申し上げます。引き続き、本学会に貢献できるように努めてまいります。最後に、本研究を行うにあたって多大なご尽力をいただきました産業技術総合研究所の柿澤茂行博士、テクニカルスタッフの宮腰かおりさんに深く感謝申し上げます。また、昆虫共生細菌ゲノムをご提供いただきました産業技術総合研究所の深津武馬博士、古賀隆一博士、生物共生進化機構研究グループのメンバーの皆様にも御礼申し上げます。本研究は、JST ERATO 深津共生進化機構プロジェクトの助成を受けました。

引用文献

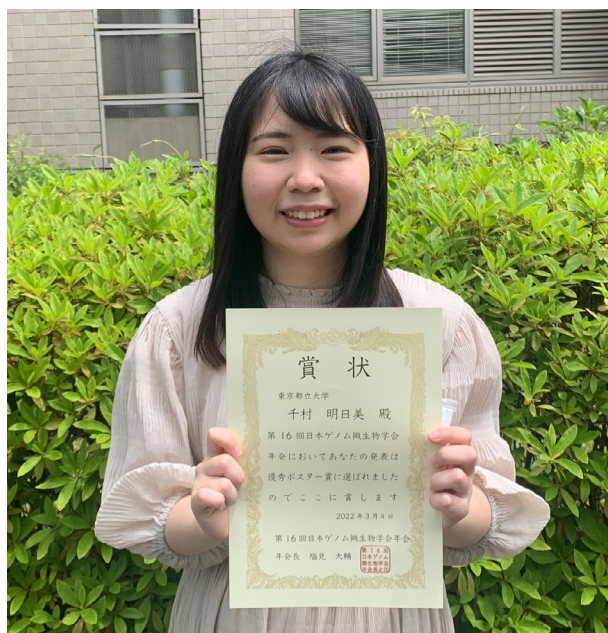
- 1) Nakabachi A. et al., *Science*, 314(5797):267 (2006)
- 2) Gibson D. G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 105(51):20404-9 (2008)
- 3) Hutchison C. A. 3rd., Chuang RY. et al., *Science*, 351(6280):aad6253 (2016)
- 4) Nishiumi F. et al., *Cell. Microbiol.*, 23(12):e13392 (2021)
- 5) Kiyama H. et al., *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2021.11.16.468548> (2021)
- 6) Tsarnopoulos I. et al., *ACS Synth. Biol.*, 5:104-9 (2015)

ポスター賞受賞研究

多細胞性シアノバクテリアにおいて
栄養細胞集団の中から分化する細胞
が選出される仕組みの解析

千村 明日美

東京都立大学大学院 理学研究科 生命科学専攻



Anabaena sp. PCC 7120 は、数百の細胞が一行につながった糸状体を形成するシアノバクテリアである。窒素源存在下においては糸状体は光合成を行う栄養細胞のみで構成されるが、窒素源が欠乏した条件では、窒素固定を行う分化細胞ヘテロシストを 10-15 細胞に 1つの割合で含む。窒素欠乏にตอบสนองして、栄

養細胞が分化することでヘテロシストが形成される。つまり、ヘテロシスト分化の過程では、糸状体を構成する均質な栄養細胞集団からヘテロシストへと分化する細胞と分化しない細胞に分かれていく。しかし、栄養細胞集団からヘテロシストへと分化する細胞が選出される仕組みは解明されていない。

ヘテロシスト分化において、*hetR* はマスターレギュレーターとして働いており、窒素欠乏にตอบสนองした *hetR* の発現制御機構が明らかにされている。まず、窒素源の欠乏により細胞内の 2-オキシグルタル酸 (2-OG) レベルが上昇する。転写制御因子である NtcA は 2-OG と結合し、活性化されることで *nrrA* の発現を誘導する。NrrA は *hetR* の発現を誘導し、さらに HetR は *hetR* 自身の発現を誘導することで、*hetR* が高発現する細胞が現れる。この *hetR* の発現が高い細胞が将来ヘテロシストへと分化する。したがって、分化する細胞が選出される仕組みを理解するためには、*hetR* の発現が上昇する細胞がどのように決まるのかを明らかにすることが重要である。*hetR* は窒素源存在下でも低レベルで発現しており、その発現が細胞ごとに異なることが最近報告された。このことは、分化誘導前の個々の細胞状態の違いがあることを示唆している。我々はこのような分化誘導前における細胞状態の違いがヘテロシストへと分化する細胞の決定に関与しているのではないかと考え、本研究ではレポーター系を用いてヘテロシスト形成過程での細胞ごとの *hetR* 遺伝子の発現変動のタイムラプス解析を行った。ヘテロシスト分化誘導前の *hetR* 発現レベルの違いがヘテロシスト形成に及ぼす影響を評価することで、糸状体を構成する多数の細胞からヘテロシストへと分化する細胞が選出される仕組みの解明を目指した。

まず、液体培地中でタイムラプス観察を行うための観察手法を確立した。これまでのヘテロシスト分化過程のタイムラプス観察では、寒天培地が用いられてきた。しかし、寒天培地では顕微鏡下で窒素源存在条件から窒素源欠乏条件へと移行することができないため、ヘテロシスト分化誘導前の *hetR* レベル

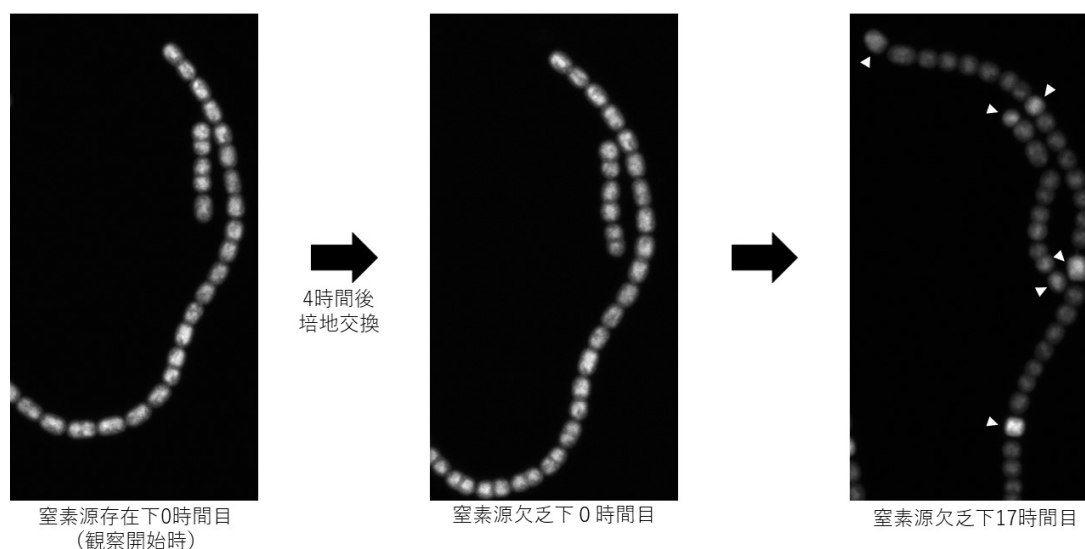


図 1. ヘテロシスト分化過程のタイムラプス観察

窒素源を含む培地から含まない培地に交換することによって、顕微鏡下でヘテロシスト分化を誘導することが可能となった。白矢印はヘテロシストに分化した細胞を示す。

とヘテロシストに分化する細胞との関係を調べることができない。今回液体培地中でタイムラプス観察を行う方法を確立したことで、顕微鏡下で窒素源を含む培地から窒素源を含まない培地に交換することが可能となった。実際、本手法を用いて顕微鏡下でヘテロシスト分化を誘導することに成功した(図1)。

そこで、*hetR* プロモーターの下流に *gfp* を挿入したレポーター遺伝子をゲノム DNA に組み込んだ株 (PhetR-GFP 株) を用いて、*hetR* 遺伝子の発現変動をタイムラプス観察した。まず、ヘテロシストを形成しない窒素源存在下で PhetR-GFP 株をタイムラプス観察したところ、糸状体の細胞ごとに *hetR* の発現量が異なり、その発現レベルの違いが培養過程を通して維持されていることが明らかとなった。また、*hetR* 発現量の高い細胞が複数個連なり、クラスターを形成していた。次に、顕微鏡下で窒素源を除去することでヘテロシスト分化を誘導し、その過程でのタイムラプス観察を行った。その結果、ヘテロシストは窒素源存在下において *hetR* の発現量が元々高かった細胞だけでなく(図2、cell6,14-2)、低かった細胞からも分化することが確認できた(図2、cell10)。これまでに行われてきた時間ごとに異なる細胞を取ってきて観察した結果では、窒素源存在下で元々 *hetR* の発現が高い細胞のクラスターがあり、その中から *hetR* レベルの非常に高い1つの細胞が出現しその細胞がヘテロシストになると考えられていた。しかし、本研究でのタイムラプス観察の結果から、従来のモデルとは異なることが示された。窒

素源存在下で *hetR* の発現量が高い細胞はヘテロシストに分化しやすい傾向があると言えるものの、ヘテロシストに分化する細胞は *hetR* の初期発現量のみで決定されるわけではないことが示唆された。糸状体を構成する細胞の中からヘテロシストへと分化する細胞を決定する仕組みには、*hetR* の発現レベルだけではなく、他の因子も関与していると考えられる。今後は、*hetR* の発現を制御する NtcA や NrrA の発現および細胞内のレドックス状態をレポーター系を用いてタイムラプス解析していくことで、分化する細胞が細胞集団から選出される仕組みの解明を目指していきたい。

最後になりますが、この度は名誉あるポスター賞をいただき、大変嬉しく思います。本研究を行うにあたってご指導いただきました得平茂樹教授、高鳥直士准教授、ならびに研究室の方々に深く感謝しています。また、学会ではポスター発表で多くの方からご意見やご質問をいただき、非常に有意義な時間となりました。今後もより研究を発展させていけるよう、励んでいきたいと思ひます。

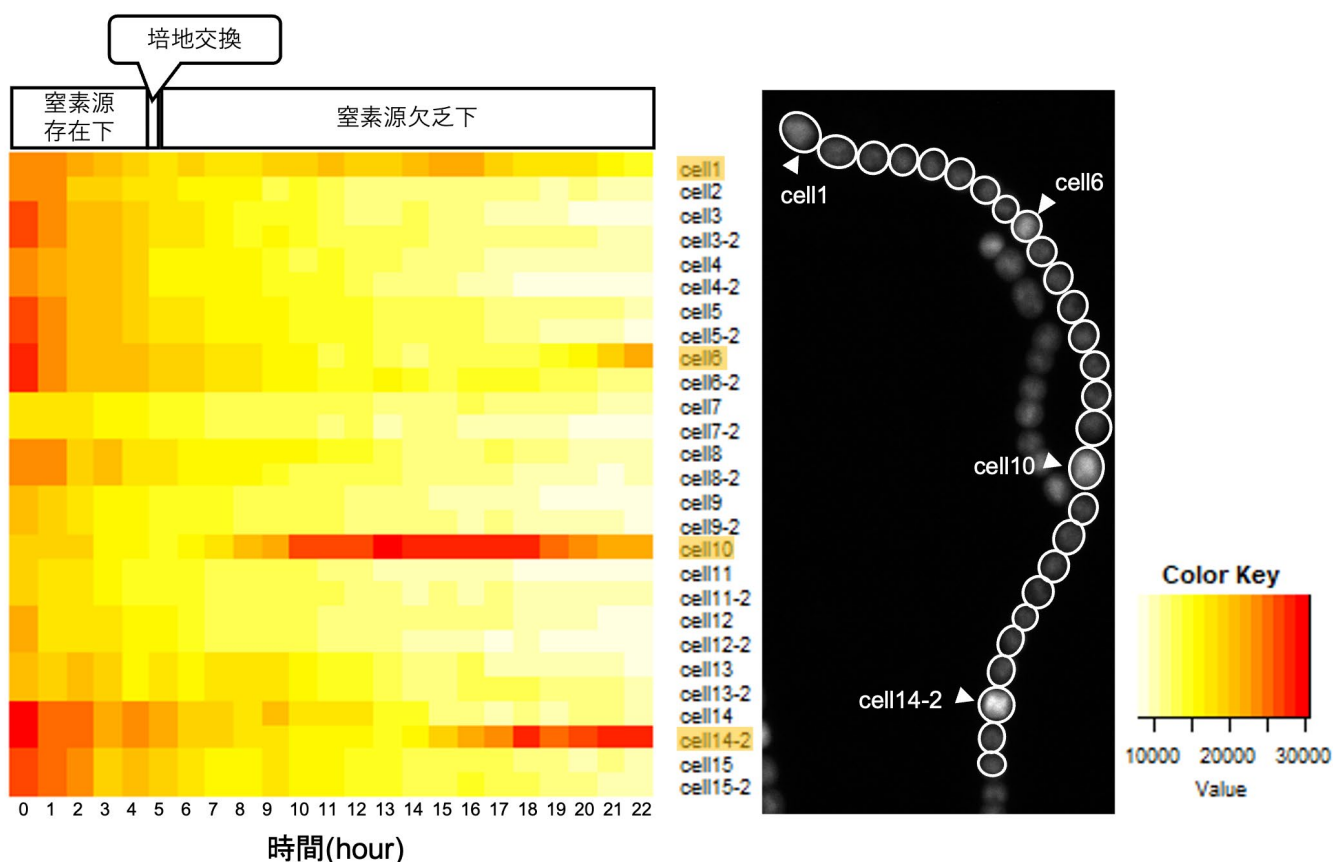


図2. ヘテロシスト形成過程における PhetR-GFP の発現変動

PhetR-GFP 株の GFP 発現量の変化をヒートマップで示した。右の写真は 22 時間における GFP 蛍光の観察結果である。4 時間において、培地交換により窒素源を除去し、ヘテロシスト分化を誘導した。白矢印はヘテロシストに分化した細胞を示す。

原核生物 PROKARYOTE 命名法 Q & A

原核生物の命名について、現在、国際的な動きがあることを受けて、誌面を借りて日本ゲノム微生物学会の会員の皆様に基礎的な情報提供をさせていただきます。本件、会員の方々の中にも様々な理解度、多方面からのご意見があることが推測されたため、Slack を用いた Q&A 方式にて、複数の会員の方々に基礎的な内容につきましてご回答をいただきました。また、関連論文ならびにサイト URL についてもご紹介させていただきます。ご協力いただきました会員の皆様に厚くお礼申し上げます。今回の Q&A は、回答者の現段階での個人的理解によるものです。従いまして、新しい動向による変更等がありえますことをご了承ください。会員の皆様からのさらなるご教示がございましたらお寄せいただければ、ありがたく存じます。今後の議論の足がかりになります事を願っております。なお、回答者と回答内容は、順不同であり、イラスト（顔写真）と回答内容は関係がありません。（ご協力いただいた方々、市川夏子、伊藤 隆、岩崎 渉、玉木秀幸、布浦拓郎、ニュースレター編集委員）



Q1, Whitman ら、Oren、Garrity によって、表 1 のように原核生物門の名前の変更が提案されましたが¹⁻⁴⁾、何が変わったのでしょうか？

A1, International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP) では、これまで門レベルの命名は規約の範囲に含まれていませんでしたが、次回の命名規約改訂でこれを含めることが決定されています。門名は基準となる属に基づいて命名することになっています。この基準となる属は規約に対して合法的につけられた学名のうち、最も早く発表されたものとするのが推奨されていますが、あくまでも門名の提唱者が決めることができます。このため今回の発表で優先権を持つ名前が提唱されたこととなります。規約の改訂後はこれらの門名が承認されると思われませんが、一方で、これまでによく使われてきた一部の門名（Proteobacteria, Firmicutes, Euryarchaeota, Crenarchaeota, Thaumarchaeota など）は裁定委員会によって保存名として残す可能性がある、とされています。

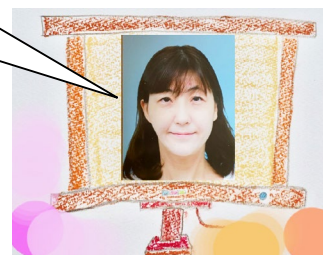
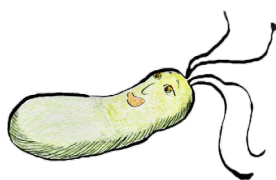


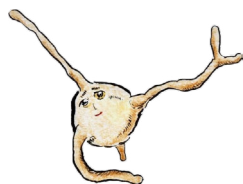
表 1, 原核生物の門についての新規提案

Phyla	Type genera	Phyla	Type genera
<i>Acidobacteriota</i>	<i>Acidobacterium</i>	<i>Fusobacteriota</i>	<i>Fusobacterium</i>
<i>Actinomycetota</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Gemmatimonadota</i>	<i>Gemmatimonas</i>
<i>Aquificota</i>	<i>Aquifex</i>	<i>Ignavibacteriota</i>	<i>Ignavibacterium</i>
<i>Armatimonadota</i>	<i>Armatimonas</i>	<i>Kiritimatiellota</i>	<i>Kiritimatiella</i>
<i>Atribacterota</i>	<i>Atribacter</i>	<i>Lentisphaerota</i>	<i>Lentisphaera</i>
<i>Bacillota</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Mycoplasmata</i>	<i>Mycoplasma</i>
<i>Bacteroidota</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Myxococcota</i>	<i>Myxococcus</i>
<i>Balneolota</i>	<i>Balneola</i>	<i>Nitrososphaerota</i>	<i>Nitrososphaera</i>
<i>Bdellovibrionota</i>	<i>Bdellovibrio</i>	<i>Nitrospinota</i>	<i>Nitrospina</i>
<i>Caldisericota</i>	<i>Caldisericum</i>	<i>Nitrospirota</i>	<i>Nitrospira</i>
<i>Campylobacterota</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Planctomycetota</i>	<i>Planctomyces</i>
<i>Chlamydiota</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>Pseudomonadota</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Chlorobiota</i>	<i>Chlorobium</i>	<i>Rhodothermota</i>	<i>Rhodothermus</i>
<i>Chloroflexota</i>	<i>Chloroflexus</i>	<i>Spirochaetota</i>	<i>Spirochaeta</i>
<i>Chrysiogenota</i>	<i>Chrysiogenes</i>	<i>Synergistota</i>	<i>Synergistes</i>
<i>Coprothermobacterota</i>	<i>Coprothermobacter</i>	<i>Thermodesulfobacteriota</i>	<i>Thermodesulfobacterium</i>
<i>Deferribacterota</i>	<i>Deferribacter</i>	<i>Thermomicrobiota</i>	<i>Thermomicrobium</i>
<i>Deinococcota</i>	<i>Deinococcus</i>	<i>Thermoproteota</i>	<i>Thermoproteus</i>
<i>Dictyoglomota</i>	<i>Dictyoglomus</i>	<i>Thermotogota</i>	<i>Thermotoga</i>
<i>Elusimicrobiota</i>	<i>Elusimicrobium</i>	<i>Verrucomicrobiota</i>	<i>Verrucomicrobia</i>
<i>Fibrobacterota</i>	<i>Fibrobacter</i>		



Q2, International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP) とは、何ですか？

A2, ICNP は原核生物命名規約です。組織としては International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP) が ICNP およびその改正の承認、裁定委員会の公的見解の受理と承認、分類学小委員会の設置、細菌・アーキアの学名の公式リストの公表、機関紙 ((Int. J. Syst. Biol. (IJSB)/ Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (IJSEM) 誌)) の出版を行っています。



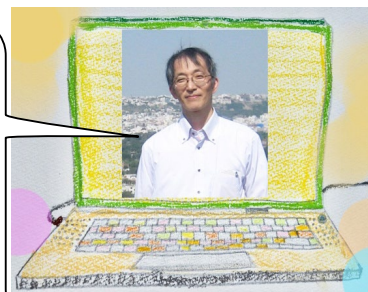
Q3, 微生物の種名は、どのような手順で決められるのでしょうか？

A3, 一般的に学名を提案する時には次の様な手順 (要件) が必要とされています。

- 1) 学名が命名規約を遵守しているか
- 2) 学名の優先権はあるか
- 3) 命名基準が指定されているか (属の場合は基準種、種の場合は基準株。基準株は原則的に2カ国以上の公的な保存機関に寄託され、論文発表後は公開される必要があります)
- 4) 適切な記載があるか
- 5) 適切に発表されているか (原核生物の場合は IJSEM 誌に論文発表するか、同誌が公表する validation list に掲載されることが必要)

原核生物の場合は IJSEM 誌に論文発表するか、同誌が公表する validation list に掲載されていない名前は未承認名となり、慣用的にはコーションマークをつけて表記していますが、正式なルールはありません。また、Candidatus を付けて表記している例もありますが、Candidatus は本来未培養原核生物名を表すものと提案されたものであり、適切な表記方法とは言えないと思います。未培養生物名につける Candidatus 学名は、ICNP の中で承認はされていますが、あくまでも暫定的な扱いで学名の優先権もありません。

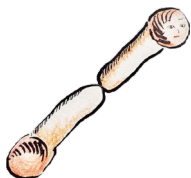
未培養系統群のゲノムに基づく Candidatus については、論文で適当に？記載されているものが殆どで、種レベルの記載が伴っていないものも多いです。また、単離株が IJSEM に掲載される場合には、文法的なチェックがありますが、他誌における単離株記載、未培養系統群の記載？とも、名称の文法確認がありませんので、後で文法間違いが指摘されることも多々あります (私も単離株、ゲノム双方で経験しています)。その他、最近 Candidatus 門もたくさん提案されていますが、それらの基準は非常に不明確です。単離株も含めた高次分類群の閾値をゲノムベースで設定しようという Genome Taxonomy Database (GTDB) を作っているグループからの提案⁵⁾は、その辺を整理する意味も含まれていると認識しています。



Q4, 特定の分類グループの微生物について議論が遅れている場合がありますか？

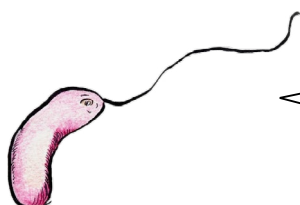
A4, 歴史的に、シアノバクテリアの分類は植物学の枠組みでなされてきました。そのため、シアノバクテリアは原核生物であるのにも関わらず、その命名は国際藻類・菌類・植物命名規約 (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants; ICN) に従って、多くの場合行われてきました。近年、シアノバクテリアの命名を行うための、国際原核生物命名規約 (International Code of Nomenclature of Prokaryotes; ICNP) の改正が提案されています⁶⁾。シアノバクテリアの命名法の背景や現状について、秋号での紹介を検討しています。





Q5, 微生物の分類もこれまで表現型によるものが多かったと理解しているのですが、ゲノム情報が影響する場合がありますか？

A5, 現在は IJSEM 誌や他のジャーナルでも新種を発表する場合はゲノム情報を記載することが必須になり、average nucleotide identity (ANI) 値の算出や digital DNA-DNA hybridization (dDDH)⁶ を行うことが一般的になりつつあります。



Q6, 微生物の命名についての最近の話題として、どのような事がありますか？

A6, ICNP が門レベルを含むことも一つの大きな話題ですが、未培養原核生物に公式的な学名を与えようという動きがおきています。こうした意図を持っている研究グループ（ここでは未培養生物命名グループとしておきます）から未培養生物の学名を現行の ICNP に取り込みたいという動議があり、ICSP の中で一旦諮られましたが無効されています。そこで未培養生物命名グループは ICNP とは別に未培養生物を命名するための SeqCode を作成しようとしています。私自身は SeqCode に関する動きを正しくは理解していませんが、今後の主張として予想されるのが、ゲノム情報を（命名）基準として認める、未培養原核生物の学名に優先権を認める、ということになると思います。（<https://www.isme-microbes.org/seqcode-initiative>）

SeqCode を主導する Whitman や Hugenholtz らが ICNP のメンバーになっており、また ICNP、IJSEM を主導する Oren も SeqCode に関連するワークショップ等においても積極的に発言しているところを見ると、ゲノム分類を基準とする流れは間違いなく、どこで折り合いをつけるか、というところに焦点は移ってきているように思います。



Q7, 微生物の分類もこれまで表現型によるものが多かったと理解しているのですが、ゲノム情報が影響する場合がありますか？

A7, ゲノム情報は分類学 (taxonomy) の3つのエレメントである分類 (classification)、同定、命名の全てについて大きな影響を与えています。今後も活用されていくことは間違いありません。



引用文献

- 1) Whitman B. W. et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68:967-969 (2018)
- 2) Oren A. et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71:004851(2021) (コメント：裁定委員会によって保存名として残す可能性がある)
- 3) Oren A. and Garrity G.M., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71(10):005056 (2021) (コメント：次回の命名規約改訂でこれを含めることが決定されています。)
- 4) Panda A. et al., *mBio* . 13(3):e0097022 (2022)
- 5) Parker et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:S1-S111 (2019)
- 6) Oren A. et al., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 71(8):004939 (2021)

年会開催報告

第16回日本ゲノム微生物学会年会

開催報告

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會を2022年3月2日から4日までの完全オンラインで開催いたしました。年會登録者数は281名（一般會員：159名、学生会員：74名、賛助會員・機関會員：9名、一般非會員：24名、学生非會員：11名、シンポジウム講演者：4名）でした。発表演題数は、口頭発表34演題、ポスター発表61演題、シンポジウム4演題でした。年會では大きなトラブルが無く進行することができました。また、全ての発表で活発な質疑応答、議論が行われ、盛況のうちに年會を終えることができました。年會参加者の方々、ご支援頂きました賛助會員・機関會員の皆様には厚く御礼申し上げます。

第15回年會に引き続き完全オンラインでの開催となったため、学会のフォーマットは基本的に第15回年會を踏襲しました。とくに、第15回年會での、zoomを用いた口頭発表、LINC Bizを用いたポスター発表、zoomのブレイクアウトルーム機能による発表者との密な議論というフォーマットは非常に素晴らしく、第16回年會でも同じように行いました。今回も多くの発表、

ブレイクアウトルームで非常に活発な議論が行われました。

それに加えて、年會での企画を2つ行いました。1つ目は、シンポジウム「様々な環境の微生物とその利用」の開催です。ゲノム微生物学会員ではないが実際には非常に近い分野でご活躍されている4名の先生方（宇宙航空開発機構・鈴木志野先生、大阪市立大学・宮田真人先生、早稲田大学・竹山春子先生、筑波大学・野村暢彦先生）をお招きし、最先端の研究成果をお話し頂きました。質疑応答やその後のブレイクアウトルームディスカッションも含めて、非常に盛況でした。2つ目の企画は、oViceを用いたオンライン懇親會の開催でした。オンライン学会は参加者間のインタラクティブなコミュニケーションが難しいという問題があります。少しでもこの問題を解消するためにオンライン懇親會を開催し、約50名の参加がありました。参加者の皆様には有意義な時間を過ごして頂けたと思っております。

年會を開催するにあたって、黒川会長の多大なサポートを頂きました。また、組織委員會の立教大学・関根靖彦先生、末次正幸先生、笠井大司先生、鈴木祥太先生、野崎晋五先生、向井崇人先生には、年會開催準備と年會当日の運営に多大な時間や労力を費やして頂きました。第15回年會を組織された九州大学・片山勉先生、尾崎省吾先生、山陽小野田市立山口東京理科大学・川上広宣先生には、第15回年會で作成されたホームページや要旨など多くのファイルを共有して頂き、加えて様々なご教示を頂きました。あらためて感謝申し上げます。

最後になりますが、第16回ゲノム微生物学会年會に参加された皆様の今後の研究の発展を祈っております。

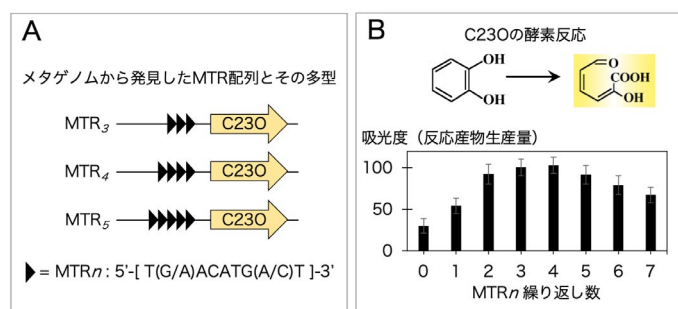


学会員の最新の論文紹介コーナー

Discovery by metagenomics of a functional tandem repeat sequence that controls gene expression in bacteria

未永光¹、松沢智彦²、佐原健彦³¹産総研・細胞分子工学, ²香川大・院・農, ³産総研・生物プロセス

FEMS Microbiol. Ecol. 98 (4) 1-9 (2022)

<https://doi.org/10.1093/femsec/fiac037>Metagenomic Tandem Repeat : MTR_n の構造と機能

真核生物、特にヒトを含む進化した動植物の多くのゲノム上には、しばしば同一配列が繰り返す「反復配列」が存在することが知られているが、そのほとんどが機能不明である。

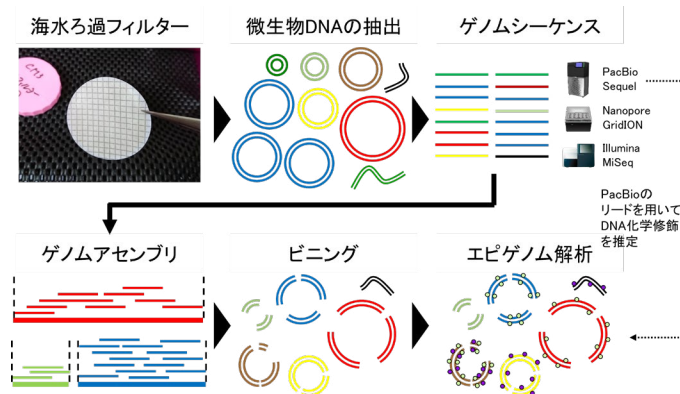
著者らは、メタゲノム手法を用いて、環境中の膨大な微生物群集から遺伝子資源の探索と収集を行ってきた。そのうち、芳香族化合物の変換酵素遺伝子を探索するなかで、環開裂酵素である catechol 2,3-dioxygenase (C23O) 遺伝子の上流に存在する、連続した9塩基ユニットの単純反復配列 (Metagenomic Tandem Repeat : MTR_n) と、その繰り返し数の多型 (n = 3, 4, 5) を偶然に見出した (図 1A)。ここで、人工合成した MTR_n を含む C23O 遺伝子を、大腸菌プラスミドにクローニングし、異種発現することを試行した。その結果、MTR_n の繰り返し数の相違によって、下流に存在する遺伝子の発現量が変化するという、興味深い生命現象を明らかにした (図 1B)。さらに、大腸菌以外の類縁の宿主 (*Pseudomonas putida*) においても同様の現象が確認されたことより、本配列は、微生物において汎用的に機能する遺伝子発現調節システムであることが示唆された。

本配列は、芳香環を多量に含む環境中のメタゲノム解析により発見されたことより、芳香環中間代謝産物のうち、比較的毒性の強いカテコール化合物の分解を促進するために機能していると考えられる。つまり本反復配列は、宿主にとって極限的な環境において、環境適応機構のひとつであると考えている。その一方で、著者らはテクノロジーにも転用できると期待して研究を進めている。たとえば、タンパク質の大量発現や遺伝子発現のコントロールのための、新規な合成生物学的装置となる可能性をも秘めている。

Diverse DNA modification in marine prokaryotic and viral communities

平岡聡史¹、澄田智美¹、平井美穂¹、豊田敦²、川口慎介¹、横川太一¹、布浦拓郎¹¹海洋研究開発機構, ²遺伝研

Nucleic Acids Res. 50:1531-1550 (2022)

<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1292> (Open access)

メタエピゲノム解析の概要。(画像素材として TogoPictureGallery (© 2016 DBCLS TogoTV) を利用)

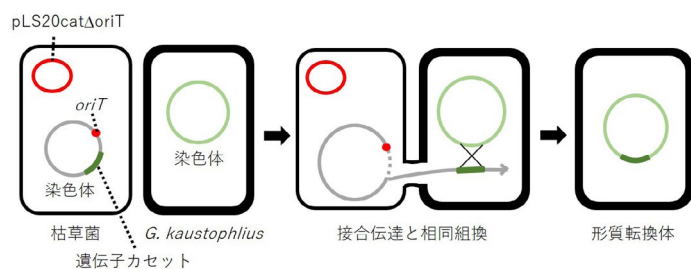
細菌や古細菌、二本鎖 DNA ウィルスでは、真核生物と同様に、生体内でゲノム DNA に化学修飾が施される「エピゲノム」が見られ、生理学的に重要な様々な役割を担う例が知られている。そのため、微生物の生理生態を理解する上で、エピゲノム情報を取得しその機能を明らかにしていくことは重要である。しかしながら、DNA 化学修飾を観測する技術的な難しさのため、特に未培養系統が優占する環境微生物叢を対象としたエピゲノム研究はほとんど行われていなかった。本研究では、メタゲノム解析とエピゲノム解析を組み合わせた「メタエピゲノム解析」手法を利用して、海洋微生物叢が持つエピゲノムを解析した。その結果、海洋微生物のエピゲノムの多様性や系統的分布を明らかにするとともに、これらの DNA 化学修飾を引き起こす新規酵素を複数発見したほか、詳細なゲノム解析から DNA 化学修飾と微生物の進化や生態との関連が示唆された。本研究は、塩基配列のみならず DNA 化学修飾を含めた広義の「ゲノム」解析を行うことで、微生物の生理生態や進化により深くアプローチできることを示した成果である。

A novel method for transforming *Geobacillus kaustophilus* with a chromosomal segment of *Bacillus subtilis* transferred via pLS20-dependent conjugation

森光太郎¹, 福井香帆¹, 天津遼太郎¹, 石川周¹, Valeria Verrone², Anil Wipat², Wilfried J. J. Meijer³, 吉田健一¹
¹神戸大・院・科学技術イノベ, ²ニューカッスル大,
³マドリード自治大学

Microb. Cell Fact. 21:34 (2022)

<https://doi.org/10.1186/s12934-022-01759-8> (Open access)



pLS20による接合伝達形質転換

枯草菌染色体 DNA が接合伝達され相同組換で *G. kaustophilus* の染色体へ取り込まれる。

Geobacillus kaustophilus は好熱性のグラム陽性菌であり、高温バイオプロセスの実現に寄与する好適微生物として期待される故に、その自在な遺伝子操作の開発が望まれている。そこで、グラム陽性菌接合伝達プラスミド pLS20 を応用して、枯草菌の染色体 DNA を *G. kaustophilus* へ伝達して形質転換を行う新たな遺伝子操作の方法論の開発を目指した。

pLS20 は遺伝子供与菌と受容菌の液体培養液を短時間混合するだけで自身の *oriT* 特異的な接合伝達を完了できる迅速さと簡便さを兼ね備えている。まず、pLS20 による接合伝達の効率化を検討した結果、(i) 遺伝子供与菌の接合伝達の抑制を解除する、(ii) 遺伝子供与菌と受容菌の比率を 1:4 とする、(iii) 接合伝達後に 3 時間追加培養を行うという好適条件を見出した。そして、最終的に *G. kaustophilus* に組み込む遺伝子カセットを枯草菌染色体上に設計し、それを *G. kaustophilus* へ接合伝達導入することで狙い通りの形質転換体を得ることに成功した。

この新規形質転換法は枯草菌の染色体の可塑性を活かした自在な遺伝子デザインを形質転換が困難な菌へと導入することを可能とする技術であり、*G. kaustophilus* のみならずその他のグラム陽性菌においても適応できる柔軟な遺伝子操作ツールを提供するものとなると期待される。

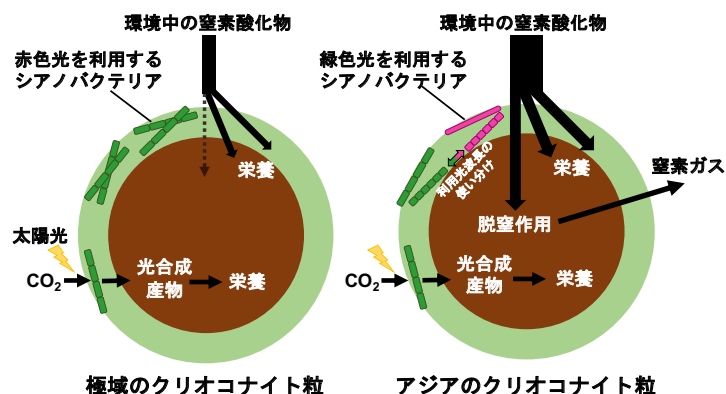
なお、本法について形質転換困難な他のグラム陽性菌への適応を実際に検証する共同研究を募集しており、ご希望やご相談については代表著者：神戸大の吉田 (kenyoshi@kobe-u.ac.jp) へご連絡賜りたい。

Metagenomics reveals global-scale contrasts in nitrogen cycling and cyanobacterial light-harvesting mechanisms in glacier cryoconite

村上匠¹, 竹内望², 森宙史¹, 広瀬侑³, Arwyn Edwards⁴, Tristram Irvine-Fynn⁴, Zhongqin Li⁵, 石井聡⁶, 瀬川高弘⁷
¹遺伝研, ²千葉大, ³豊橋技科大, ⁴アベリストウィス大,
⁵中国科学院, ⁶ミネソタ大, ⁷山梨大

Microbiome 10:50 (2022)

<https://doi.org/10.1186/s40168-022-01238-7> (Open access)



メタゲノム解析から推測された極域とアジアのクリオコナイトの違い

氷河表面で形成される顆粒状の物体「クリオコナイト」は、シアノバクテリアを中心とする微生物の集合体であり、世界各地の氷河生態系において主要な生化学プロセスを担う存在である。一方で、構成微生物のゲノム情報や群集構造の地域多様性に関する知見は極めて限定的であった。そこで本研究では、メタゲノム解析を活用して、クリオコナイトを構成する細菌群集のゲノム情報を幅広い地域の氷河から収集して解析した。その結果、クリオコナイト細菌群集の系統組成や機能遺伝子組成が、地域ごと、特に北極域とアジア山岳域の氷河とで大きく異なることが判明した。例えば、アジアのクリオコナイトからは脱窒関連遺伝子が豊富に検出されたが、北極域からはほとんど検出されなかった。また、クリオコナイトの主要構成種であるシアノバクテリアの組成にも差異が見られた。北極のクリオコナイトでは単一のシアノバクテリア種が優占するのに対し、アジアでは全く別の複数シアノバクテリア種によってクリオコナイトが構成されていた。特に、緑色光アンテナタンパク質の遺伝子を有する種はアジアのクリオコナイトから顕著に検出された。このようなクリオコナイト細菌群集の地域的差異は、栄養供給量や光環境といった、地域ごとに異なる様々な環境要因を反映した結果と推測され、氷河微生物の生態や氷河生態系構造の実態解明を進める上で重要な手掛かりになると考えられる。

Fabrication of a new all-in-one microfluidic dielectrophoresis integrated chip and living cell separation

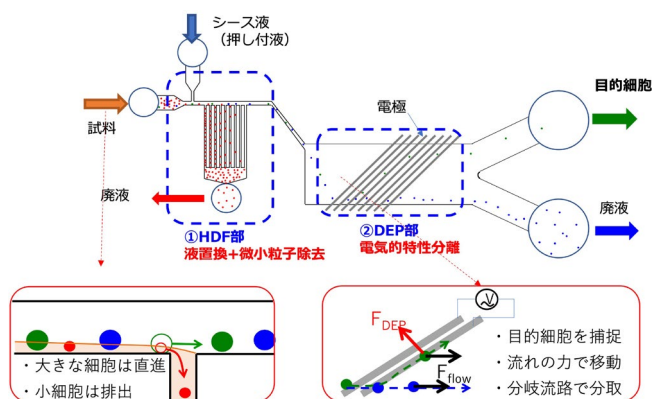
大代 京一^{1,2}, 脇坂 嘉一¹, 高野 雅代¹, 糸井 隆行¹, 大毛 宏喜²,

木庭一美³, 鎗水 京子⁴, 藤吉 奏⁴, 丸山 史人⁴

¹株式会社 AFI テクノロジー, ² 広島大学病院・感染症科, ³ 京都大・院・人間・環境, ⁴ 広島大・IDEC 国際連携機構

iScience 25(2):103776 (2022)

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103776> (Open access)



HDF-DEP 一体型チップの構造と機能

微細加工技術の発達、難培養微生物の単離やシングルセルゲノミクスをはじめとするゲノム微生物分野の発展に大きく貢献し、不可欠な技術となっている。本研究では、前処理なしの簡単操作で細胞分離を可能とする新たなマイクロ流路電極一体型チップを開発した。このチップでは、マイクロ流路によるサイズ分離 (HDF) と誘電泳動 (DEP) による電気的分離という二つの異なる原理による細胞分離を一体化したものとなっている。DEP とは、不均一電場内におかれた物質 (微粒子) に、電場とそれによって誘起された電気双極子モーメントによる力を受けた物質が移動する現象のことである。この誘電泳動におけるバッファ交換をチップ内で実施することにより、前処理をなくし簡単操作で連続的に細胞分離できるようになった。これを利用して、バクテリアを HDF により分離、異なる真核細胞の混合液から片方の細胞のみを分離・濃縮が可能であることを示した。分離・濃縮効率を最適化していくことにより、環境中のバクテリア分離や医療における有用細胞の分離など、多岐にわたる応用を期待している。

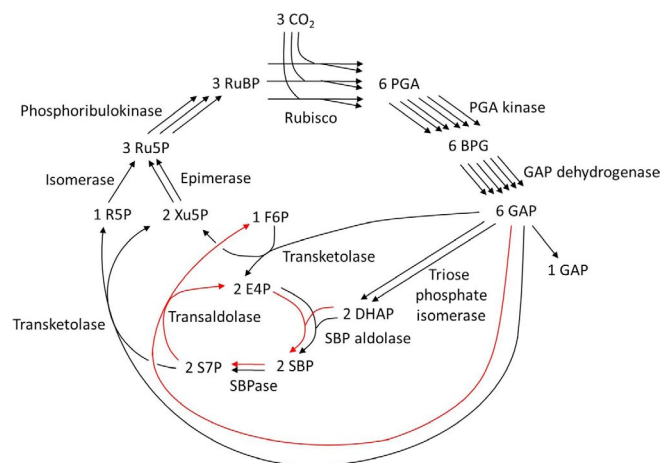
A novel variant of the Calvin-Benson cycle bypassing fructose bisphosphate

太田潤¹

¹ 岡山大・院・医歯薬

Scientific Reports 12(1):3984 (2022)

<https://doi.org/10.1038/s41598-022-07836-7> (Open access)



新規のトランスアルドラーゼ型経路 (本稿紹介論文の Figure 1) ライセンス: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

シアノバクテリアでも機能している炭酸固定経路であるカルビン-ベンソン回路 (CB 回路) は、教科書に記載されている標準型が有名ですが、標準型の CB 回路の一部の反応を、トランスアルドラーゼによる反応で代替した経路 (本稿で「既報のトランスアルドラーゼ型経路」と呼ぶもの) が理論的に可能であることが知られています。既報のトランスアルドラーゼ型経路の精査を目的として、標準型の CB 回路の反応とトランスアルドラーゼ反応からなる系で三炭糖リン酸を二酸化炭素から生成する原子レベル経路を調べていたところ、偶然、トランスアルドラーゼを既報のトランスアルドラーゼ型経路とは逆向きに用いる経路 (本稿で「新規のトランスアルドラーゼ型経路」と呼ぶもの) も理論的に可能であることに気づきました。今回紹介する論文では、この新規のトランスアルドラーゼ型経路を、原子レベル情報を用いることなく、既存のプロテオーム ExPA により、既知の 2 経路とともに算出し、トランスアルドラーゼの存在は炭酸固定経路をロバスト (頑健) にすると論じました。また、UniProtKB に、シアノバクテリアからのトランスアルドラーゼ遺伝子候補が 800 エントリー以上あることから、シアノバクテリアでも新規のトランスアルドラーゼ型経路が機能していることが示唆されると述べました。論文の中の微生物に直接関係する記述は僅かですが、この新規のトランスアルドラーゼ型経路を知っておくことはシアノバクテリアにおける炭酸固定経路の研究に重要と考え、この論文を紹介いたします。

実験レシピ紹介コーナー第5回

シーケンス反応後に脱塩が
必要なのはなぜ？

大坪 嘉行 東北大

サンガーシーケンスを行うとき、シーケンス反応後の溶液を、エタノール沈澱あるいは専用のキットで脱塩(脱イオン)処理をしますよね。脱塩をしないと、キャピラリーシーケンサーで解析したときにシグナルが得られないのですが、これはなぜでしょうか？サンプルをキャピラリーカラムにインジェクションするときには、キャピラリー先端がサンプル溶液に浸かっており、キャピラリーの両側に電圧が数秒間かけられます。これによってサンプル溶液中のシーケンス反応産物が、キャピラリーに向かって泳動されてインジェクションされる仕組みです(図1)。

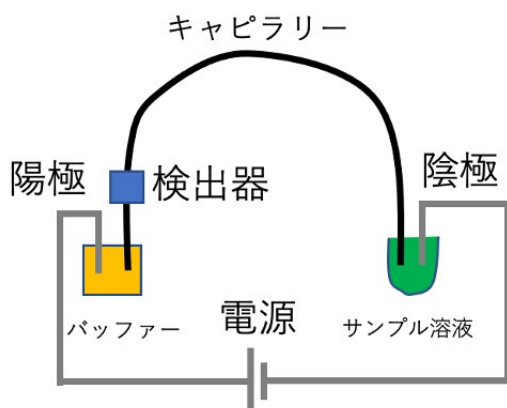
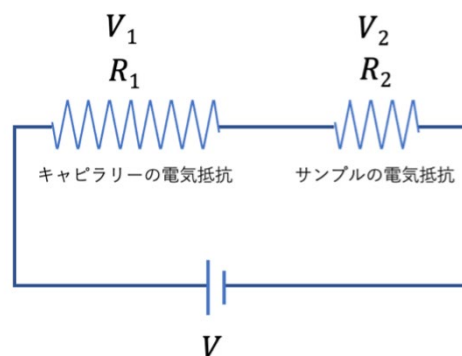


図1, キャピラリーシーケンサーの構造図

簡略化して描画してある。電圧をかけることによって、サンプル溶液中のシーケンス反応産物はキャピラリー中へと電氣的にインジェクションされる(6秒ほどの短時間の電気泳動とみなせる)。その後、陰極側のキャピラリー先端は泳動バッファーに浸されて、電圧が印加される。

高校の物理の授業では、電界の中に置かれた荷電粒子は、電界の強さと荷電量に比例した力を受けると習いました。サンプル溶液中でマイナスに帯電しているDNAは、印加電圧によって力を受けるはずですが、このときサンプル溶液中に他のイオン性物質があってもなくても関係なく力を受けるのではないのでしょうか？それならば、なぜ脱塩しないと、反応産物がキャピラリーにインジェクションされないのでしょうか？あるいはインジェクションはされるけれども、一緒にキャピラリーに導入されたイオン性物質が泳動を邪魔するなどして正常に泳動されないなどしてシグナルが得られなくなるのでしょうか？

この疑問について、長らく納得のいく答えが得られていなかったのですが、ようやくそれらしい説明にたどりつきましたので紹介します(間違えていたらご指摘ください)。結論から言えば、「サンプル溶液部分にかかる電圧が、サンプル溶液中の電気抵抗におおよそ比例するから」です。シーケンサーの電気回路を簡略化して考えます(図2)。陽極から陰極側キャピラリー出口までの電気抵抗値を R_1 、陰極側キャピラリー出口から陰極までの電気抵抗値を R_2 、インジェクション時に加える電圧を V とすると、 R_2 にかかる電圧は、 $V \cdot R_2 / (R_1 + R_2)$ になります。ここで、 R_1 が R_2 に比べて非常に大きな値であるとすると R_2 にかかる電圧は R_2 に比例します(例えば R_1 が10000だとすると R_2 が1の時と R_2 が2の時で、電圧値はそれぞれ $1/10001$ と $2/10002$ となり、おおよそ2倍です)。塩濃度と導電率は、おおよそ比例していると思わせるようですので、塩濃度が10倍になれば抵抗値は $1/10$ になり、従ってサンプル溶液中にかかる電圧は $1/10$ に、インジェクションされるサンプル量も $1/10$ になります。なーんだ。当たり前じゃないか。



印加電圧を V 、回路に流れる電流を I 、キャピラリーの電気抵抗を R_1 、サンプルの電気抵抗を R_2 とする。

回路全体の抵抗 $R = R_1 + R_2$ 、

$$\text{電流 } I = \frac{V}{R_1 + R_2}$$

$$\text{抵抗 } R_2 \text{ における電位差 } V_2 = R_2 I = \frac{R_2}{R_1 + R_2} V$$

$$R_1 \gg R_2 \text{ のとき, } V_2 = \frac{R_2}{R_1 + R_2} V \text{ は } R_2 \text{ に比例。}$$

図2, シーケンサーの電気回路

あやふやな物理の知識で書いています(間違えていたらご指摘ください)。

実際のシーケンス反応溶液の抵抗値についてはデータがないので、仮に0.3% NaCl (51.3 mM 相当) 溶液程度だとします。0.3% NaCl 溶液の導電率は5.7 mS/cm (抵抗率は175.4Ω・cm) とのことです。通常の脱塩後のシーケンスサンプルの塩濃度は不明ですが、ほぼ蒸留水並みの導電率10 μS/cm (抵抗率0.1 MΩ・cm) だとすれば、これと比べて0.3% NaCl 溶液の抵抗値は、その1/570倍ということになります。つまり、0.3% NaCl 溶液並みの導電率のシーケンス反応溶液を、脱塩処理によって蒸留水並みの導電率にすると、インジェクション量が570倍程度にな

る、と考えられます。超純水並みの導電率 $0.055 \mu\text{S}/\text{cm}$ (抵抗率 $18.248 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) にできれば $104,000$ 倍程度になるはずではありますが、あまりにもサンプル溶液中の導電率が低いと (抵抗率が大きいと)、上述の式の解釈に用いた前提「 R_1 が R_2 に比べて非常に大きな値である」ことが崩れるので、実際にはここまでインジェクション量が増えることはないと思われます。

また、回路全体の実際の抵抗値は、印加電圧データと測定された電流値 (シーケンスデータに含まれています) から計算でき、おおよそ $500 \text{ M}\Omega$ 程度のです。サンプル溶液中の抵抗値は、電極周りの形状によって決まるので簡単には計算できませんが、仮に、通電面積を 0.25 cm^2 、通電部分の長さを 0.5 cm 、抵抗率 $0.1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ とすれば抵抗値は $0.2 \text{ M}\Omega$ となり、「 R_1 が R_2 に比べて非常に大きな値である」ということは間違いなさそうです (抵抗率に通電部分の長さを乗じ、通電面積で除したものが抵抗値です)。

シーケンス反応が進みすぎると、シーケンサーの検出器がサチュレートしてしまって綺麗な波形データが得られないことがしばしばありますが、このようなときに、サンプルを超純水で 10 倍に希釈しても、シグナルが弱くならない、ということがあります。この現象は、上述の考えで説明がつかず。すなわち 10 倍に薄めると抵抗率が $1/10$ になり、したがってサンプル溶液にかかる電圧が 10 倍になって打ち消し合う、ということが起きていたと考えられます (100 倍程度に薄めると急にシグナルが弱くなりますが、これは絶対量が低下するためと考えられます)。このような理由で、サンプルを希釈するときは電気伝導率がそこそこある蒸留水などで行うのが適切だと思われます。シグナルがサチュレートして困ったことがない人は、鋳型 DNA の精製時にエタノールなどのシーケンス反応を阻害する狭雑物が十分に除去できていないのかも知れません。鋳型 DNA をカラム精製するのであれば、以前このコラムで紹介したミニカラム https://www.sgmj.org/pdf/newsletter/sgmj_no19.pdf を使用するか、溶出前に長めに (30 分ほど) カラムを風乾すると良いと思います。

閑話休題 - その13 - 春の野山に咲く花々

以前も書きましたように、ここ3年ほどは花の写真の撮影がもっぱら神戸市近郊の山や公園などになってしまっています。そのため、このコラムに掲載する植物を新しく撮ったものに限定すると、植物種の実験の幅が狭くなります。そこで今回は、できるだけいろいろな分類群の植物を含めるため、新しく撮った植物の写真に加えて、以前千葉に赴任していた時に撮ったやや珍しい植物を加えました。いかがでしょうか？（磯野克己）



ヤマウグイスカグラ（スイカズラ科）：*Lonicera gracilipes* Miq. var. *gracilipes* Miq., 2022.3.30 神戸市



マンテマ（ナデシコ科）：*Silene gallica* L. var. *quinquevulnera* W.D.J.Koch, 2020.5.14 神戸市



シデコブシ（モクレン科）：*Magnolia stellata* Maxim., 2020.3.26 神戸市



サツマイナモリ（アカネ科）：*Ophiorrhiza japonica* Blume, 2009.4.18 大多喜町（千葉県）



← キバナオドリコソウ
（シソ科）

Lamium galeobdolon L.,
2022.4.28 神戸市

クマガイソウ（ラン科）→
Cypripedium japonicum Thunb.,
2010.4.25 大多喜町（千葉県）



年会開催予告

第17回日本ゲノム微生物学会年会

開催予告

田畑 哲之

かずさ DNA 研究所

2007年に発足した日本ゲノム微生物学会は、来年3月に16年目を迎えます。本学会は、1999年より8回にわたってかずさアカデミアホール(千葉県木更津市)で開催されたワークショップ「微生物ゲノムのフロンティア」の実績のもとに設立され、同会場で第一回年会が開催された後全国に旅立ちました。

日本ゲノム微生物学会第16回年会は、「原点に戻って」をキーワードに、3月8日～10日にかずさアカデミアホールを会場として開催されます。新型コロナウイルス蔓延により、日本社会全体が未曾有のダメージを受けました。学会活動もその例外ではなく、過去2回の年会はオンライン開催を余儀なくされました。この禍がどのような形で終息するかを見通すことは未だ困難ですが、私たちは科学者として状況を冷静に分析しつつ、前に進み始めなければなりません。次回はオンサイト開催に向けて空間的なゆとりを確保し、口頭発表は700名収容できるメインホール、ポスター発表はかつての会場であった201会議室を使用します。

15年ぶりのかずさアカデミアホールでの年会では、コロナ後の研究現場を取り巻く厳しい状況の中、微生物ゲノム学会設立の「原点に戻って」今後進むべき道を探ってゆきたいと思いません。2022年千葉県の住みやすいと思う街ランキング(byねとらぼ調査隊)第1位の木更津で、皆さんに再びお会いできることを心から楽しみにしています。



学会の動向

2022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 涉、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

会員の皆様のご協力により25号も無事に発行されました。心より感謝いたします。今号も学会顕彰や発表賞の受賞研究紹介など定番の記事のほか、原核生物の命名規約改定に関する特別企画記事も含み、非常に読み応えのある内容となっています。編集委員会では毎号、微生物に関する情報の発信・共有ツールとしての役割を果たせるように委員全員で取り組んでいます。ニュースレターは学術的な情報収集だけでなく、研究の経緯やそれにまつわる苦労話、学会参加の感想や今後の研究活動への意気込みなど学会発表では伺えないエピソードを交えた記事を読むことができ、また、何気ない文章表現から著者の人となり垣間見ることができるのも魅力だと思います。学生会員や若手会員による記事が比較的多いことも特徴で、5年後、10年後に読み返すのもまた一つの楽しみ方ではないでしょうか。コロナ禍により本会・若手の会ともにオンラインでの開催となっていますが、またオンサイトで皆様の色々なお話を伺えることを願っています。(相馬)

(おまけ：帰省ができない期間に、故郷でよく食べられているギバサ(海藻)をアンテナショップで購入しました。葉緑体ゲノムは解読されているようで、tRNA 遺伝子を調べると数が足りません。どのような機構で翻訳するのか気になるところで)