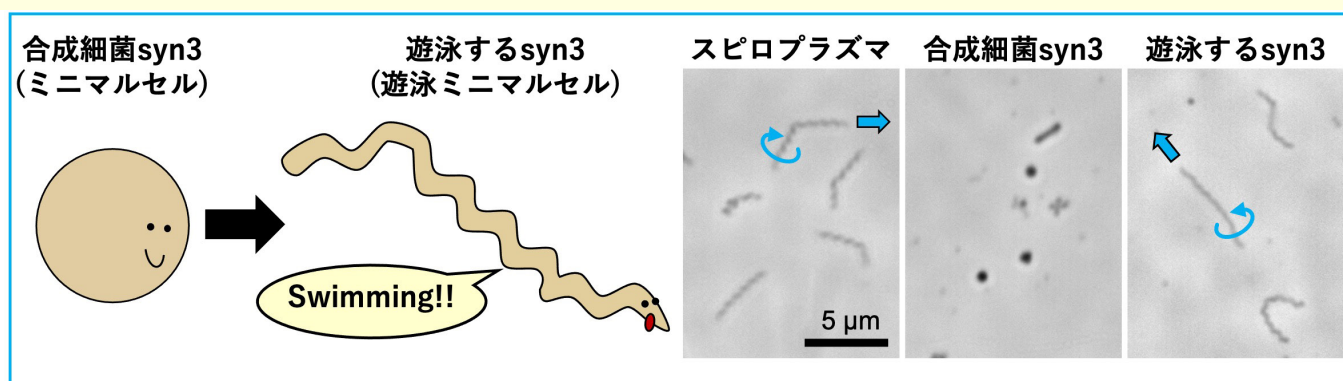


# 日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

## 遊泳する『最小の』細菌を作り出すことに成功

木山 花<sup>1</sup>、柿澤 茂行<sup>2</sup>、笹嶋 雄也<sup>1</sup>、田原 悠平<sup>1,3</sup>、宮田 真人<sup>1,3</sup>

1) 大阪公大・理、2) 産総研・生物プロセス、3) 大阪公大・複合先端



### らせん形状と遊泳運動の再現に成功

スピロプラズマの7つのタンパク質を合成細菌 syn3 にて発現させることで、細胞がらせん形状になり遊泳することを発見した。また2つの MreB のみの発現でも、らせん形状と遊泳が再現された。

スピロプラズマは、細胞壁がないことや小さなゲノムを持つことで知られるマイコプラズマに近縁な細菌で、らせん形状の細胞を形成し、らせん方向を反転して反転部より後ろ側の細胞を回転させることで遊泳する。今回、スピロプラズマが持つ7つの遺伝子を合成細菌 syn3 にて発現させることで、球状の細菌がらせん形状になり、回転して遊泳することを発見した。つまり、らせん形状と回転遊泳運動を再現することに成功した。加えて7つの遺伝子のうち、2種類のアクチンホモログ (MreB) のみを発現させても、らせん形状と遊泳運動が再現されることが分かった。合成細菌 syn3 は、米国ベンター研究所で作られた「最少の遺伝子を持った細菌：ミニマルセル」であり、増殖以外の機能を持たないと考えられている。今回の成果は、たった2つの遺伝子をミニマルセルに追加することで「細胞形状と遊泳運動という高次の機能」を再現できた、驚くべき結果と考えている。

歩く、泳ぐ、飛ぶなど「運動」の起源は、細胞の運動にまで遡ることができると考えられているが、ではその「細胞運動」はどのように進化してきたのだろうか。本研究グループは、ATP合成酵素やヘリカーゼなどの生命を維持する装置の動きが細胞の外に伝わるのが細胞運動の起源であるという仮説を提唱してきた。MreBは動物の筋肉などを構成するアクチンのホモログで、多くの細菌にも存在しているが、スピロプラズマ以外の細菌ではペプチドグリカン層を正しい形に作る役割を担っている。今回の成果は、たった2つの遺伝子をミニマルセルに追加することで細胞全体の回転遊泳運動が生じたことを示しており、「細胞内のタンパク質が起源となった細胞運動」の実証例と言える。

発表論文：Hana Kiyama, Shigeyuki Kakizawa, Yuya Sasajima, Yuhei O Tahara, Makoto Miyata. Reconstitution of a minimal motility system based on *Spiroplasma* swimming by two bacterial actins in a synthetic minimal bacterium. *Science Advances* 8(48):eabo7490, (2022). doi:10.1126/sciadv.abo7490

# 細菌代謝機構の病原性や抗菌薬感受性への関与

港 雄介

藤田医科大学医学部 微生物学講座

## 1. はじめに

私は2008年に博士号を取得した直後に渡米し、現所属先に着任するまでの11年間、博士研究員として米国で過ごした。予定以上に長期の留学となってしまったが、振り返れば試行錯誤を重ねながら研究者として生涯取り組んでいきたいと思える研究テーマを見つけることが出来た貴重な時間であった。本稿では、私が米国で現在の研究テーマを確立した経緯を簡単に振り返りながら、細菌代謝機構に注目してこれまで展開してきた私の研究について簡単に紹介させて頂く。

## 2. コレラ菌の代謝機構と病原遺伝子発現制御

大学院時代の私は、細菌の薬剤耐性機構について研究を行っていた。しかし良い業績を挙げることができなかつたため、希望していた研究室への留学が叶わなかった。そこでしかたなく、指導教員に勧められた米国の研究室に留学した。しかし実際に行ってみると、発表論文の元データが怪しいなど色々問題がある研究室であった。

このままここにいたら先が危ないと思った私は、これまでの研究に捉われず様々な論文を読み、新たなポストドク先を探した。ここで様々な分野の研究に触れたことはその後の研究者人生の大きな糧となった。そして多くの研究分野の中で特に、コレラ菌研究の第一人者である John Mekalanos 先生 (Harvard 大学) の研究に強く興味を惹かれた。コレラ菌はヒトの腸管でコレラ毒素を産生し、激しい下痢を引き起こす。コレラ毒素遺伝子の発現は、ToxT という転写調節因子によって制御されている。コレラにおける Mekalanos 先生の大きな業績の一つは、ToxT を含むコレラ毒素遺伝子の転写を調節している一連の転写因子カスケードを明らかにした事である。しかしコレラ菌の研究経験もなかった私は結局、Mekalanos 先生の研究室に行くことは叶わなかった。そこで私は Mekalanos 門下生のラボに片っ端から応募し、米国 Oregon State University の Claudia Häse 先生の研究室に

受け入れてもらった。正直に言うと希望順位としては低い研究室ではあったが、米国滞在ビザの期限が迫っていたのと Mekalanos 先生の研究手法の一端でも学べればと思いつ断した。

Häse 先生は Mekalanos 研究室に所属していた当時、ToxT の発現を制御する膜結合転写調節因子である TcpP を発見している (1)。Häse 先生はさらに、Mekalanos 研究室でコレラ菌の *toxT::lacZ* レポーター株からトランスポゾン変異株を作製し、*toxT* の発現が変化した株の同定し、ナトリウム輸送性 NADH- ユビキノン酸化還元酵素 (NQR) 遺伝子のトランスポゾン変異株で *toxT* 遺伝子の発現上昇が見られることを見出している (2)。

NQR は、ミトコンドリア呼吸鎖では複合体 I に、大腸菌呼吸鎖では Nuo に相当する。複合体 I も Nuo も共通して、NADH- ユビキノン酸化還元反応と共役してプロトンが排出されるが、NQR はプロトンではなくナトリウムを排出する。私は NQR の存在を知り、細菌呼吸鎖にそのような大きな多様性があることに衝撃を受けた。NQR がきっかけでコレラ菌の代謝機構に興味を持った私は、代謝機構に特に注目して解析を進め、コレラ菌の TCA 回路遺伝子破壊株において *toxT* 遺伝子の発現に変化が見られることなどを見出し、代謝機構がコレラ毒素の産生制御と密接に関連していることを明らかにした (3)。一連の研究を通じて私はコレラ菌の代謝機構について専門性が高まっていったのだが、モデル生物に比べコレラ菌の代謝機構には不明な点が多くあることに気が付いた。そこで他の病原細菌についても代謝機構に注目して文献を調べていったのだが、他の病原細菌でも同様に代謝機構に関しては未解明な点が多かった。ちょうどそのころ、総説でも病原細菌の代謝機構について取り上げられているものが増えてきていた (4,5)。そこで私は、病原細菌の代謝機構に注目した研究の将来に大きな可能性を感じ、自分の専門分野にしようと決めた。

### 3. 結核菌の代謝機構

病原細菌の代謝機構を自分の専門分野としようと決めた私は、結核菌を研究対象に選んだ。理由として、結核菌のユニークな代謝機構に興味を惹かれたことが大きい。結核菌は自然宿主である哺乳動物以外の環境中からは、ほとんど検出されない。結核菌は、哺乳動物との長い共生の歴史を通じて、哺乳動物生体内環境に適応する能力を進化させてきたと考えられている。例えば、多くの細菌は複数の炭素源が利用可能な環境においてカーボンカタボライト抑制 (Carbon Catabolite Repression; CCR) により、自身が効率的に利用できる炭素源一種類を優先的に代謝し、他の炭素源代謝は抑制している (6)。この機構は、他の細菌種と炭素源を競合的に獲得する必要がある環境下における炭素源獲得に有効な機構であると考えられる。これに対し結核菌は、カーボンカタボライト抑制機構を有しておらず、複数の炭素源を同時に代謝することができる (7)。このことは、共生する他の細菌種が存在しない宿主細胞内の環境において、結核菌が効率よく炭素源を代謝するために独自の進化を遂げたと考えられている。このような高病原性細菌として特化された代謝機構に、私は研究対象として強い魅力を感じた。

### 4. 結核菌の葉酸代謝拮抗薬に対する自然耐性メカニズムの解明

私は2013年にAnthony Baughn先生 (University of Minnesota) の研究室に移り、結核菌の研究を開始した。私が最初に取り組んだのは、結核菌の葉酸代謝経路を標的とするパラアミノサリチル酸 (PAS) という抗結核薬に関する研究であった。PASは1940年代に開発された非常に古い薬だが、近年までその作用機序は明らかにされていなかった。PASは葉酸合成の前駆体であるパラアミノ安息香酸 (PABA) に水酸基が結合した構造である (図1)。PASはPABAの代わりに結核菌の葉酸代謝経路に取り込まれ、水酸化ジヒドロ葉酸に変換される。この水酸化ジヒドロ葉酸がジヒドロ葉酸還元酵素を阻害することでテトラヒドロ葉酸の合成を阻害するというメカニズムが近年明らかにされた (8-10)。少し話は逸れるが、PASは結核菌以外には無効な抗菌薬であり、大腸菌はPASをPABAの代わりに葉酸生合成の先駆体として利用してしまう。

細菌葉酸生合成経路は抗菌薬の有効な標的の一つで

あり、様々な葉酸代謝拮抗薬が臨床で使われている。しかし、結核菌はほとんどの葉酸代謝拮抗薬に対して自然耐性を示す。PASは結核治療に使用される唯一の葉酸代謝拮抗薬であるが (9)、PASの結核菌に対する抗菌活性は他の抗結核薬に比べると弱く、その使用は治療薬の選択が困難な多剤耐性結核の治療に限定されている。結核菌が何故多くの葉酸代謝拮抗薬に対し自然耐性を示すのかは、未解明であった。

多くの葉酸代謝拮抗薬の活性は、PABAを培地中に添加することで阻害される事が知られていた。PABAは結核菌の菌体内でも生合成されているので、私たちは結核菌のPABA生合成を阻害し菌体内のPABA濃度を低下させることで、結核菌の葉酸代謝拮抗薬の効果を増強できないかと考えた。そして予想通り、PABA生合成に関与する遺伝子である *pabC* の遺伝子変異株は、最小発育阻止濃度 (MIC) で調べた場合 PAS に対して 1000 倍感受性が增大していた (11)。さらに、結核菌に対する MIC が高いため結核治療には用いられないスルファメトキサゾール (SMX) やダブソン (dapson) に対しても、それぞれ 8 倍と 512 倍の感受性の増大が見られた。結核菌は、ペプチドグリカン層の外側にアラビノガラクトサン層、さらにそ

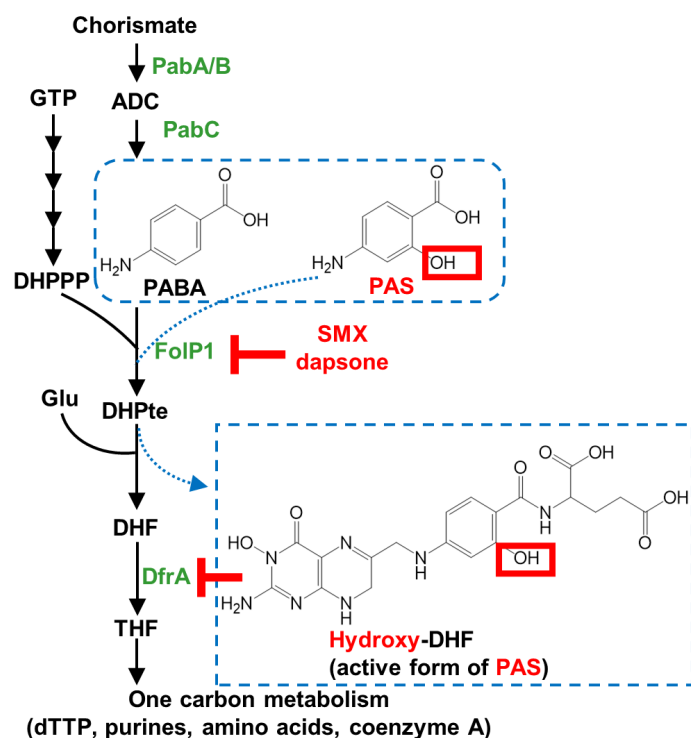


図1. 葉酸代謝拮抗薬の作用機序

Abbreviations: GTP, guanosine-5-triphosphate; DHPte, 7,8-dihydropterin pyrophosphate; PABA, Glu, glutamate; DHPte, dihydropteroate; DHF, dihydrofolate; THF, tetrahydrofolate.



の外側にミコール酸を主要成分とする外膜で構成された細胞壁を有しているため、結核菌の薬剤に対する自然耐性は薬剤透過性の低さに起因すると信じられている。しかし以上の結果から、結核菌の葉酸代謝拮抗薬に対する自然耐性については、PABA 生合成系が主な要因であることを明らかにすることができた。

私たちは次に、大腸菌の PABA 生合成系を阻害する抗菌化合物 MAC173979 (12) が、結核菌に対しても PABA の生合成を阻害することで抗菌活性を示すことを確認した (11)。私たちは、*pabC* の遺伝子変異株が葉酸代謝拮抗薬に対し超感受性化することから、PABA 生合成系を標的とする MAC173979 は葉酸代謝拮抗薬と組み合わせることで強い相乗効果を示すと予想したが、予想は外れ MAC173979 と PAS を組み合わせても強い相乗効果を示さなかった (11)。そこで次に私は、なぜ MAC173979 と PAS は強い相乗効果を示さなかったのかを明らかにすべく、大腸菌を用いて葉酸代謝拮抗薬の相乗効果発揮メカニズムについて研究を進めた。

## 5. 細菌葉酸生合成経路と抗菌薬の相互作用

葉酸代謝拮抗薬の中で SMX とトリメトプリム (TMP) は、組み合わせることで強い相乗効果を示す。私たちは大腸菌を用いて、PABA の生合成を阻害する MAC173979 と、PAS と同じくジヒドロ葉酸還元酵素を阻害する TMP の併用効果を調べたところ、結核菌における MAC173979 と PAS の組み合わせと同様、この組み合わせは相乗効果を示さなかった (図 2) (13)。なぜ葉酸代謝拮抗薬は、薬剤の組み合わせによって相乗効果を示したり示さなかったりするのと考えながら葉酸代謝経路を眺めていたところ、葉酸代謝経路はプリン生合成経路を介して下流から上流に繋がっていることに気が付いた。このことから私は、作用点が SMX よりも葉酸代謝経路の下流に位置する TMP が、プリン生合成経路を介して葉酸代謝経路の上流の代謝フラックスを減弱し、SMX の効果を強化していることを突きとめた。これまでに SMX が下流への代謝フラックスを減弱する事で TMP の効果を強化することは知られていたことから、SMX と TMP は互いにその効果を強化し合うことで相乗的に葉酸代謝経路のフラックスを阻害しているというメカニズムを明らかにすることができた (13)。SMX と TMP の相乗効果メカニズムから、結核菌における MAC173979 と PAS の併用においては、MAC173979 による PAS の一方的な効果増強しか起こら

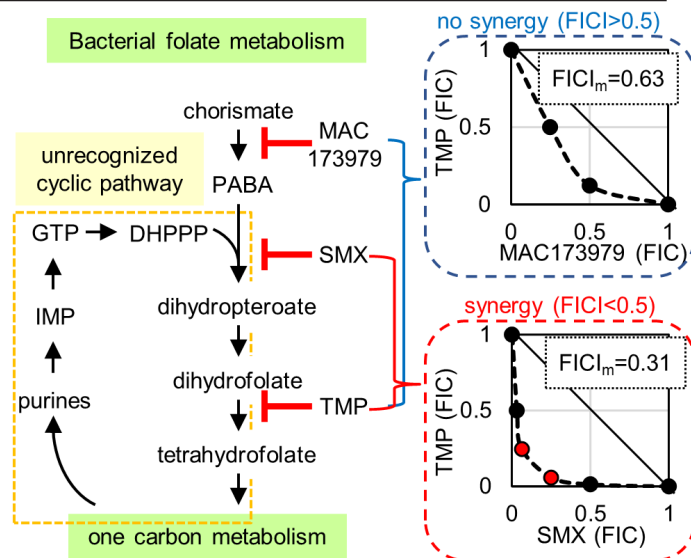


図 2. 葉酸代謝拮抗薬の作用点と相互作用  
抗菌薬の相互作用は Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) によって判定した。FICI =  $([\text{MIC drug A in presence of Drug B}] / [\text{MIC of drug A}] + [\text{MIC of drug B in presence of drug A}] / [\text{MIC of drug B}])^{-1}$ 。FICI が 0.5 以下を示した場合、薬剤の組み合わせは相乗効果を示すと判定した。

ず、SMX と TMP のように相互に作用を増強することができないと考えられる。同一の生合成経路を標的とする抗菌薬の組み合わせ、例えば細胞壁合成を標的とする抗菌薬を併用した場合などにおいても、相乗効果を示す組み合わせと示さない組み合わせがある。現在は他の生合成経路を標的とする組み合わせについても、SMX と TMP と同様に相互増強作用によって相乗効果を示しているものもあると考え、現在解析を進めている。

## 6. 結核菌必須遺伝子のゲノムワイドな解析

三年前に米国から帰国し現所属先に着任した私は、結核菌やその類縁菌である非結核性抗酸菌を対象に、新規抗菌薬の創薬標的の同定を目指した研究を主に実施している。抗菌薬の創薬標的とはすなわち細菌必須遺伝子であるため、必須遺伝子の同定とその機能解析をおこなっている。

結核菌の必須遺伝子に関する研究は、トランスポゾン挿入変異株ライブラリーを次世代シーケンシングで網羅的に解析するトランスポゾンシーケンシング法 (Tn-Seq 法) が確立された事によって、飛躍的に進んだ (14)。当初は解析を独自に行わなければならず難易度が高かったが、TRANSIT というソフトウェアが公開されてからは解析も非常に簡便となった (15)。これまでは、*in vitro* と *in vivo* を含む様々な条件によって必須遺伝子群がどのように変化するかといった研究が主に行われてきたが

(14,16,17)、近年は Lineage が異なる株間での株間必須遺伝子の比較にまで研究が進んでいる (18)。

必須遺伝子の機能解析については、2016年に *Bacillus subtilis* を対象として CRISPRi (19) を用いた必須遺伝子の網羅的な遺伝子ノックダウン解析が行われている (20)。そこで私も結核菌に CRISPRi を適用しようと試みたが、広く用いられている *Streptococcus pyogenes* 由来の Cas9 が結核菌に対して毒性を示したため、用いることが出来なかった。しかし2017年、現在ロックフェラー大学で研究室を主宰されている Jeremy Rock 先生が、*Streptococcus thermophilus* 由来の Cas9 が結核菌に対しての毒性が少ない事を見出し、結核菌において本菌由来の Cas9 を用いた CRISPRi 遺伝子ノックダウン法を確立された (21)。Rock 先生はすでに、結核菌のほぼすべての遺伝子をカバーする 96,700 の sgRNAs を独自に設計し、各 sgRNA の相対量を次世代シーケンシングによって測定する方法を用いて、結核菌必須遺伝子のゲノムワイドな機能解析を進めている (22)。ちなみに結核菌とその類縁菌を対象に Rock 先生がデザインした sgRNA 配列の情報と解析結果は、ウェブ上で公開されている (<https://pebble.rockefeller.edu/tools/sgrna-design/>)。これらの Tn-Seq 法や CRISPRi 法は米国で確立された手法であるが、将来的には本学会の先生方と共同して新しいツールを開発し、本研究分野においても日本独自の革新的な研究手法を提示していきたいと思う。

現在私たちは Tn-Seq 法や CRISPRi 法を用いながら、結核菌必須遺伝子の中から生存に必須な役割に加え、薬剤耐性や病原性にも関与する遺伝子の特定を進めている。このような遺伝子を標的とすることで、他の抗菌薬との併用時に相乗効果を示すことや、殺菌作用と病原性低下作用を同時に発揮させるなど、複数機能 (マルチファンクショナル) を有する抗菌薬の開発に繋がることが期待できる。このようなマルチファンクショナル抗菌薬の標的として、代謝関連遺伝子に特に注目し研究を進めている。

## 7. 終わりに

本稿で私の過去の研究について振り返る機会を頂いたが、改めて無計画な研究者人生を過ごしてきたと痛感した。しかし、これまであまり困ってこなかったのは、渡米後間もなく YouTube で見つけた Steve Jobs が2005年にスタンフォード大学の卒業式で行ったスピーチに影響を受けたからだと思う。この中で Steve Jobs

は、“*You can't connect the dots looking forward; you can only connect them looking backward. So you have to trust that the dots will somehow connect in your future. You have to trust in something — your gut, destiny, life, karma, whatever. This approach has never let me down, and it has made all the difference in my life.*” とメッセージを送っている (<https://news.stanford.edu/2005/06/12/youve-got-find-love-jobs-says/#:~:text=Again%2C%20you%20can't%20connect,%2C%20life%2C%20karma%2C%20whatever.>)。このスピーチに私は強く感銘を受け、その時に一番面白いと思える研究をし、得られた研究結果を必ず過去の結果と併せて振り返り、過去の結果とどのように繋がるのかを考えることを実践してきた。この方法を実践してからは、将来の事をあまり悩まずに目の前の面白いことに専念できるようになったように思うし、ネガティブなデータが得られても将来の結果といつか繋がるだろうと思うので、研究者人生がより楽しくなった。

## 引用文献

- 1) Hase CC. and Mekalanos JJ., Proc Natl Acad Sci U S A., 95: 730-734 (1998)
- 2) Hase CC. and Mekalanos JJ., Proc Natl Acad Sci U S A., 96: 183-3187 (1999)
- 3) Minato Y. et al., Microbiology., 59: 792-802 (2013)
- 4) Eisenreich W. et al., Nat Rev Microbiol., 8: 401-412 (2010)
- 5) Rohmer L. et al., Trends Microbiol., 19:341-348 (2011)
- 6) Gorke B. and Stulke J., Nat Rev Microbiol., 6: 613-624 (2008)
- 7) de Carvalho LP. et al., Chem Biol., 17: 1122-1131 (2010)
- 8) Chakraborty S. et al., Science., 339: 88-91 (2013)
- 9) Minato Y. et al., Antimicrob Agents Chemother., 59: 5097-5106 (2015)
- 10) Dawadi S. et al., Org Lett., 19: 5220-5223 (2017)
- 11) Thiede JM. et al., Sci Rep., 6: 38083 (2016)
- 12) Zlitni S. et al., Nat Chem Biol., 9: 796-804 (2013)
- 13) Minato Y. et al., Nat Commun., 9: 1003 (2018)
- 14) Griffin JE. et al., PLoS Pathog., 7: e1002251 (2011)
- 15) DeJesus MA. et al., PLoS Comput Biol., 11: e1004401 (2015)
- 16) Zhang YJ. et al., Cell., 155: 1296-1308 (2013)
- 17) Minato Y. et al., mSystems., 4:e00070-19 (2019)
- 18) Carey AF. et al., PLoS Pathog., 14: e1006939 (2018)
- 19) Qi LS. et al., Cell., 152: 1173-1183 (2013)
- 20) Peters JM. et al., Cell., 165: 1493-1506 (2016)
- 21) Rock JM. et al., Nat Microbiol., 2: 16274 (2017)
- 22) Bosch B. et al., Cell., 184: 4579-4592 (2021)

## 微生物学分野の最前線

## Small RNA とはどのような RNA なのか？

森田 鉄兵

慶應義塾大学 先端生命科学研究所

## 1. はじめに

微生物は、環境を有効利用するために、栄養の取り込みや使用を厳密に制御する。さらに、このような制御を、バイオフィームや病原性といった微生物の生理を司る遺伝因子の発現と結びつけていることが多い。つまり、微生物生理の理解には、環境に応じた遺伝子発現制御の解明が一つの鍵となる。

今日では、小分子 RNA は、転写後段階での遺伝子発現制御を司る分子の代表格に挙げられる。RNA-Seq が普及して以来、「ある培養条件で発現する短い RNA を見つけたが、これが小分子 RNA としての機能を持つか？」といった質問を筆者は受けてきた。残念ながら、RNA 配列を見ただけでその機能を見抜けるところまで当該研究領域は至っていない。しかし、近年のいくつかの研究を踏まえることで、ある程度の予測が立つと筆者は考える。本稿が、今まさに気になっているその RNA の機能推定の一助になれば幸いである。

## 2. Small RNA

本稿では、小分子 RNA の一例として、大腸菌やサル

モネラを中心に研究が進められてきた small RNA (sRNA) を紹介したい<sup>1)</sup>。sRNA の多くは 100 塩基前後であり、ほとんどの場合、環境変化に起因するストレスに応答して発現する。そして、RNA シャペロンタンパク質である Hfq の補助を受けることで標的 mRNA と塩基対を形成し、標的 mRNA の翻訳や安定性を変化させる (図 1A)。標的 mRNA との塩基対形成領域は 8~15 塩基程度であり、シード配列と呼ばれる (図 1B)。sRNA が標的 mRNA との間に形成する塩基対は不完全であり、この不完全さにより、1つの sRNA が複数の標的 mRNA を一手に制御することが可能になる。

なお、sRNA に対する Hfq のように、小分子 RNA のタンパク質パートナーとして CsrA や ProQ が知られている。また、枯草菌をはじめとする一部のグラム陽性菌では、*hfq* 遺伝子が存在するものの、RNA 結合部位の一部のアミノ酸の違いなどが原因となって、sRNA 制御の様相が大腸菌とは異なる。さらに、ピロリ菌などゲノム上に *hfq* 遺伝子が存在しない細菌も存在する。以上のようなケースについても個々に研究が進んでおり、総説等にまとめられていることを書き留めておく。

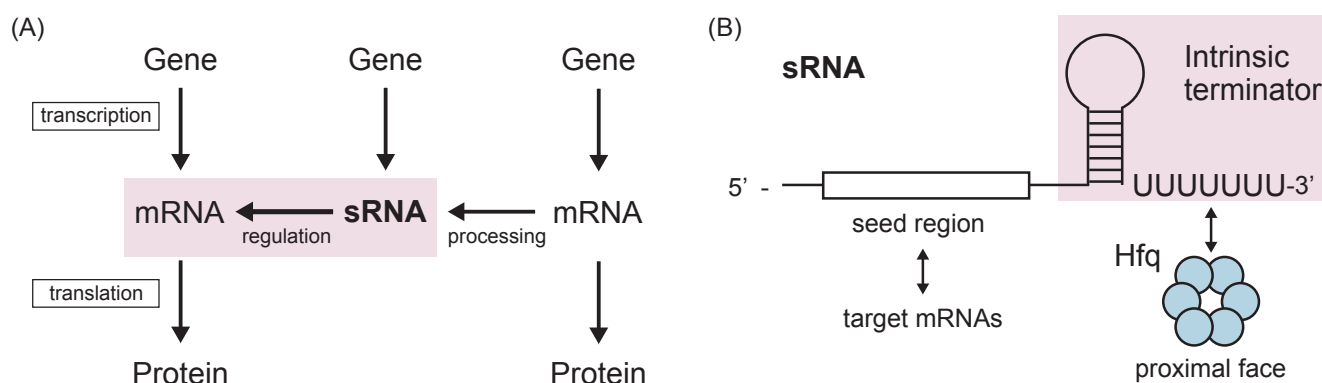


図 1. sRNA は mRNA の翻訳や安定性を制御する

(A) 遺伝子発現における sRNA の位置付けの概略図。sRNA の発現には、独自の転写単位に由来する主経路に加えて、mRNA の 3' 非翻訳領域のプロセッシングを介した経路がある。sRNA は塩基対を介して標的 mRNA と結合し、標的 mRNA の翻訳や安定性を制御する。(B) sRNA の基本構造の概略図。sRNA は、標的 mRNA との塩基対形成領域 (seed region)、Hfq との結合領域、及び転写終結領域 (intrinsic terminator) の 3 つで構成される。Hfq との結合領域は、近位面 (proximal face) との結合領域に加えて内部にもう一箇所存在し、遠位面 (distal face) か側面 (rim) のどちらかと結合する。この違いにより、sRNA は 2 つのクラスに分類される。



### 3. sRNA 遺伝子が転写され機能を発揮するまで

sRNA のストレスに応じた発現誘導は、主に転写開始の制御により起こる。多くの sRNA は固有のプロモーターを持ち、その上流に転写開始を司る制御領域が位置する。加えて、sRNA の中には、mRNA の 3' 非翻訳領域のプロセシングにより生じるものも存在する。この場合、sRNA の転写開始は格納庫である mRNA と協調的な制御を受ける一方、プロセシングのタイミングにより sRNA 固有の発現パターンが生じる可能性がある。3' 非翻訳領域に由来する sRNA の成熟過程の詳細については、(宮腰, 日本ゲノム微生物学ニュースレター No. 25, 2022) を参照されたい。

sRNA の 5' 末端が転写開始、あるいはプロセシング末端のどちらかに由来する一方、どちらの場合でも、3' 末端は Intrinsic termination によりもたらされる 2)。Intrinsic termination は、RNA ステムループ構造とそれに続く U リッチテールで構成されるターミネーターにより誘起される転写終結機構であり、細菌遺伝子の大部分の転写終結を担う (以降は、Intrinsic termination を転写終結と示す)。筆者らは、大腸菌 sRNA の 1 つである SgrS を用いた解析により、sRNA のテールが 7 塩基以上の連続した U で構成され、さらに 7 塩基より手前での早熟な転写終結を起こさないよう適した安定性のステムループ構造を必要とすることを明らかにした 3-5) (図 1B)。このテールを構成する U は Hfq 6 量体の近位面と個々に結合し、特に末端の U は 3' 位の OH 基で強固に Hfq と結合するため重要な役割を担う 6)。これは、転写終結産物が Hfq と結合し sRNA として機能する一方、転写終結領域を乗り越えた

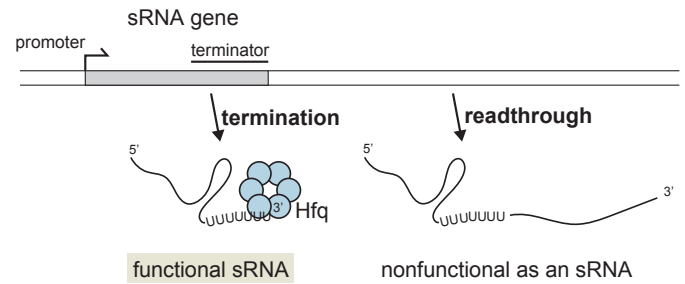


図 2. sRNA の機能発揮において転写終結が持つ意義

Hfq は、転写終結に由来する 7 塩基以上のポリ U テールに優先的に結合する。このため、sRNA 遺伝子の転写終結産物は、mRNA の制御機能を発揮することができる。一方、転写終結領域を乗り越えて転写が伸長した場合、そのリードスルー産物は Hfq と結合しないため、sRNA として機能しない。なお、大腸菌の *sgrS* 遺伝子では、下流に *setA* 遺伝子の翻訳領域が位置する。このため、リードスルー産物は *setA* mRNA としての機能が考えられる。

リードスルー産物は Hfq と結合せず、結果として sRNA として機能しないという結果に裏打ちされる 7) (図 2)。したがって、興味がある RNA が sRNA としての機能を持つかどうかを予想する際には、まずはその RNA の 3' 末端に目を向けることをお勧めしたい。

因みに、Hfq 6 量体には、近位面の他に 2 つ RNA 結合面 (遠位面、側面) が存在する。これら 3 つの RNA 結合面がどのように sRNA や mRNA と結合し、塩基対形成を促進させるかについては、(Updegrave, et al., Curr. Opin. Microbiol., 2016) を参照されたい。

### 4. sRNA の転写終結制御

図 2 にも図示したように、転写終結位置がその転写産物の運命を決定する要素であることから、sRNA の機能

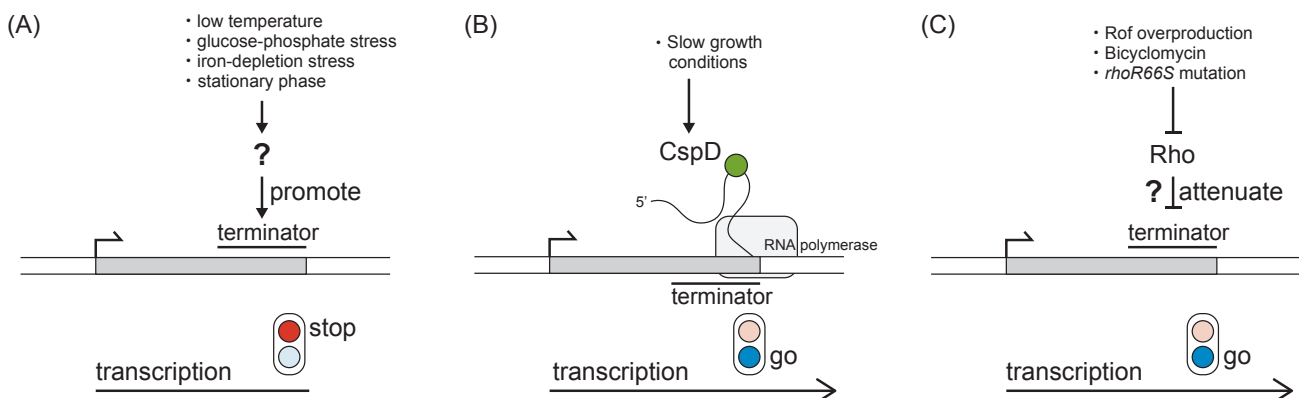


図 3. 転写終結の制御

(A) 低温、グルコースリン酸ストレス、鉄枯渇ストレス、及び定常期の条件では、DsrA (低温)、SgrS や RyhB (残りの 3 条件) といった sRNA の転写終結率の向上が観察されている。(B) 低温ショックドメインタンパク質の 1 つである CspD は SgrS に結合し、SgrS やリードスルー産物を安定化するとともに、転写終結率を顕著に減少させる。この他にも、CspD の過剰発現により、GcvB や CyaR といった sRNA の転写終結の抑制、及び *tnaCAB* オペロンや *gdx* Riboswitch などの転写伸長/終結の切り替え制御の破綻が確認された。(C) *rof* の過剰発現、Bicyclomycin の添加、及び Rho R66S 点変異は、いずれも Rho の機能を阻害する。これらの条件では、SgrS の転写終結が抑制される。

発揮を司る転写終結段階での制御が考えられた。この予想は、大腸菌において、DsrA や SgrS といった sRNA の転写終結率が、培養温度やストレスにより変化するという観察からも支持される 7, 8) (図 3A)。

最近になって、筆者らは、大腸菌のゲノム断片をランダムに挿入したプラスミドライブラリーを用いて、SgrS の転写終結を抑制する新規遺伝因子を同定した 9)。低温ショックドメインを持つ CspD はもっとも顕著な影響を示した遺伝因子であり、SgrS の転写終結率を大きく減少させた (図 3B)。さらに、CspD の過剰発現下では、SgrS による標的 mRNA の制御が強く抑制された。これらの結果は、CspD が転写終結の抑制を介して機能的な SgrS 産生量を減少させ、結果として SgrS 制御系が発動しなかったことを強く示唆する。また、このスクリーニングでは、Rho の阻害因子である *rho* 遺伝子が単離された (図 3C)。そして、*rho* 機能欠損変異や Rho 阻害剤である Bicyclomycin の影響を解析し、これらが同様に SgrS の転写終結を抑制することを確認した。転写終結 (intrinsic termination) は別名 Rho-independent termination と呼ばれることを踏まえると、これらの結果は、細菌における転写終結機構の概念を覆し得る可能性を持つ。CspD や Rho 阻害がどのようにして転写終結を抑制するかについて、今後の詳細な解析で明らかにしたい。

以上に示したように、転写終結の制御にはいくつかの経路があることが示唆された。その全体像を捉えるには至っていないものの、RNA の機能推定においては、sRNA が独立した転写単位や mRNA の 3' 非翻訳領域のみに存在すると思込めないでほしい。なぜならば、オペロンや遺伝子の内部に潜んでいた不完全な転写終結領域

が特定の環境下で機能を発揮し、sRNA の 3' 末端となる可能性が考えられるからである。事実、CspD の過剰発現下における RNA-Seq 解析を行い、リボスイッチなどの転写伸長/終結の切り替え制御の多くが破綻することを明らかにした 9)。また、RNA-Seq を基盤とした解析により、転写終結の位置が培養条件などにより変化することや 10, 11)、mRNA の 5' 非翻訳領域内で早熟な転写終結末端 (Rho-dependent termination を含む) が多数検出されることがゲノムレベルで明かされている 12)。これらを踏まえれば、遺伝子領域内から現れた小分子 RNA も、3' 末端の配列によっては十分に sRNA の候補になり得るだろう。

## 5. sRNA を制御する因子

ここまでは、sRNA 産生の場合である転写に焦点を当て sRNA の特徴を紹介してきたが、それ以外にも sRNA の機能に関与する因子が報告されている。例えば、大腸菌の鉄イオン枯渇の応答制御を司る RyhB sRNA の制御因子として、N-acetyltransferase 活性を持つ YhbS や RNA 分解の補助的役割が想定される YicC が単離された 13)。特に、YhbS は、RyhB 以外にも ChiX や ArcZ などいくつかの sRNA を抑制することが確認されており、sRNA 制御系を一手に司る制御機構が示唆された。したがって、もし、気になる RNA の機能を LB 培地などの一般的な実験室環境で検証し、その結果がネガティブだった場合でも、そこには YhbS などの sRNA 制御系を制御する因子が関与している可能性があるため、培養条件を変えてさらに検証を試みることを勧めたい。

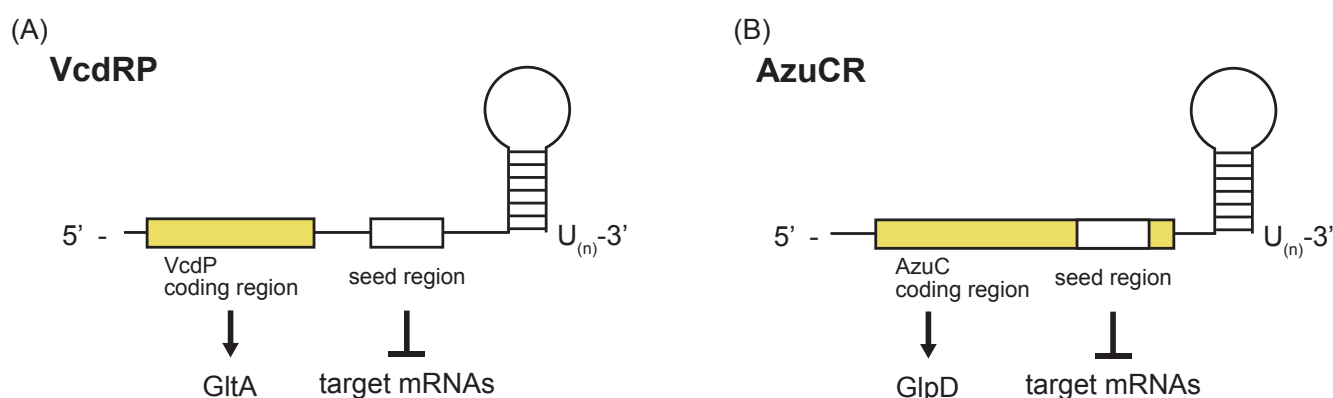


図 4. dual-function RNA

(A) VcdRP は、コレラトキシンの産生を抑制する sRNA として同定された。その後の解析により、sRNA (VcdR) としての機能に加え、内部の翻訳領域から産生される small protein (VcdP) の機能が明らかにされた。(B) AzuCR は、大腸菌ゲノムの情報学的解析により sRNA の候補に挙げられた。その後、内部の翻訳領域から産生される small protein (AzuC) の機能が明らかとなり、加えて、翻訳領域内の変異解析により sRNA (AzuR) としての機能が明らかになった。



## 6. 標的 mRNA を見つける

標的 mRNA の同定には、sRNA の短時間の過剰発現により量的変化が生じた mRNA の抽出といった一般的な手法に加え、RIL-Seq 法や CLASH 法、MAPS 法などの RNA 相互作用に特化した解析手法が確立されている。また、IntaRNA など RNA 相互作用を予測する Web ツールが公開されている。(Miyakoshi, et al., Mol. Microbiol., 2022) では、実際にこれらのデータセットや予測ツールを利用することで大腸菌の GcvB sRNA の標的 mRNA を決定しており、解析例の 1 つとして参照されたい。

## 7. Small Protein

近年、一部の sRNA において、内部に small protein をコードする翻訳領域が存在することが報告され始めた。small protein は 50 アミノ酸以下のポリペプチドであり、固有の機能を持つ。このような RNA は、sRNA 及び small protein の翻訳領域の 2 つの機能を持つという意味で、“dual-function RNA” と呼ばれる。一例として、コレラ菌の VcdRP を紹介する 14) (図 4A)。VcdR は sRNA であり、グルコースなどの糖取り込みに関与する遺伝子群の mRNA の発現を制御する。さらに、VcdR は small protein である VcdP の mRNA としても機能する。VcdP は TCA 回路の代謝酵素である GltA に結合し、その活性を増加させる。したがって、VcdRP は、sRNA 及び small protein の 2 つの機能を発揮することで、解答系 -TCA 回路のバランスの調整役を担っていると考えられる。また、大腸菌 AzuCR は、sRNA として UDP-glucose 4-epimerase をコードする *galE* mRNA などの発現制御を司る一方、内部の翻訳領域から産生された AzuC は、グリセロール -3-リン酸デヒドロゲナーゼである GlpD と結合しその活性を増加させる 15) (図 4B)。この 2 つの機能を発揮することで、AzuCR はガラクトースとグリセロールという 2 つの糖代謝経路に関与する。もし、研究の中で sRNA を見つけたが、表現型の原因となる標的 mRNA が今ひとつ絞りきれない場合には、改めて sRNA 内部に目を向け、小さな翻訳領域を探してみるのも 1 つの打開策になるかもしれない。

因みに、dual-function RNA はまだ論文報告例が少なく、不明な点が残されている。特に、sRNA と small protein の 2 つの機能の切り替えについて、AzuCR では、AzuR sRNA としての機能が AzuC の翻訳を阻害するといった部分的な観察が報告されているのみである 15)。もし、一

方の機能の発揮により他方の機能の制御が可能であれば、dual-function RNA を用いた巧妙な遺伝子発現制御ネットワークの設計など応用の可能性が広がる。

## 8. おわりに、思うこと

本稿を読み返してみて、意外と簡単に sRNA が見つかるのではないかと筆者自身が錯覚してしまったが、実際には、わずか 100 塩基前後の機能性 RNA を微生物の広大なゲノムの上で見つけ出すことはやはり困難である。しかし、RNA-Seq 解析などにより、候補となる RNA がリストに挙がっている状況であれば、本稿で掲示したヒントをもとにそのリストの上で sRNA を浮き上がらせることができるかもしれない。あるいは、学会員の方々の中で、「興味はあるが、やはりまだ sRNA の探索や機能解析に高い壁を感じる」という方は、筆者 (morita-t(at)ttck.keio.ac.jp) まで連絡を頂ければと思う。

## 9. 引用文献

- (1) Holmqvist E. and Wagner EGH., Biochem. Soc. Trans., 45: 1203-1212 (2017)
- (2) Chen J., Morita T. and Gottesman S., Front. Cell., Infect. Microbiol., 9: 201 (2019)
- (3) Otaka H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 108: 13059-13064 (2011)
- (4) Ishikawa H., et al., RNA., 18:1062-1074 (2012)
- (5) Morita T., Nishino R. and Aiba H., RNA, 23: 1419-1431 (2017)
- (6) Sauer E. and Weichenrieder O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 108: 13065-13070 (2011)
- (7) Morita T., et al., RNA., 21: 1490-1501 (2015)
- (8) Sledjeski DD, Gupta A and Gottesman S., EMBO J., 15:3993-4000 (1996)
- (9) Morita T., et al., mBio., online ahead of print (2022)
- (10) Yan B., et al., Nat. Commun., 9: 3676 (2018)
- (11) Ju X., Li D. and Liu S., Nat. Microbiol., 4: 1907-1918 (2019)
- (12) Adams PP., et al., eLife., 10: e62438 (2021)
- (13) Chen J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 118: e2106964118 (2021)
- (14) Venkat K., et al., EMBO J., 40: e108542 (2021)
- (15) Raina M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 119: e2117930119 (2022)

## 特別企画

# サンガーシーケンスのコツ： 簡単、確実に高品質なデータを得るために

隅田 周志

株式会社日立ハイテク、アナリティカルソリューション事業統括本部  
ライフ & メディカルシステム製品本部、バイオシステム第一設計部

サンガーシーケンスは登場から40年以上、様々な分野で日常的に使用されています。しかし、現在でもサンプルによっては、読み取りエラーにより目的のデータが得られないことがあります。ここでは当社の小型CEシーケンサ日立DS3000を例に、読み取りエラーを減らすコツを3つ紹介いたします。

## 1. 信号強度の調節

ピーク波形の信号強度が低すぎたり、または高すぎたりすると、ピーク波形が正しく検出されず読み取りエラーが生じます。このような場合は、DNAをキャピラリーに注入する条件（サンプル注入条件）を調節していただくことが改善することがあります。DS3000では、サンプル注入条件の注入電圧と注入時間を変更できます。どちらの条件もタッチパネルから簡単に変更が可能です（図1）。

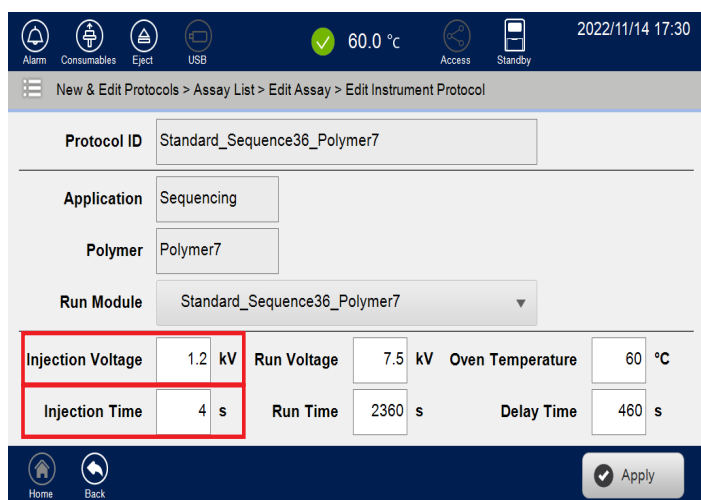


図1. サンプル注入条件の設定方法

Home画面から、「New & Edit Protocols」、「Assay」、変更したいAssayの順に選択してください。続いて表示される画面で、Instrument Protocolの「Edit」を選択すると上記の画面が表示されます。Injection VoltageとInjection Timeにサンプル注入条件を入力してください。

サンプル注入時間と注入電圧は、どちらも信号強度と強く関連します。例として注入時間と信号強度の関係を示します（図2）。注入時間を2倍にすると、信号強度が

ほぼ2倍になっています。一方、注入時間が長くなると、読み取り塩基長が短くなる傾向があります。これは、サンプル注入時間、注入電圧を大きくすると、ピーク波形の幅が広がるためです。信号強度を調節する際は、図2を参考に、適切な読み取り塩基長が得られる条件をご検討ください。また、より詳細な検証結果を当社ホームページで公開しています。こちらをご参照ください（1）。

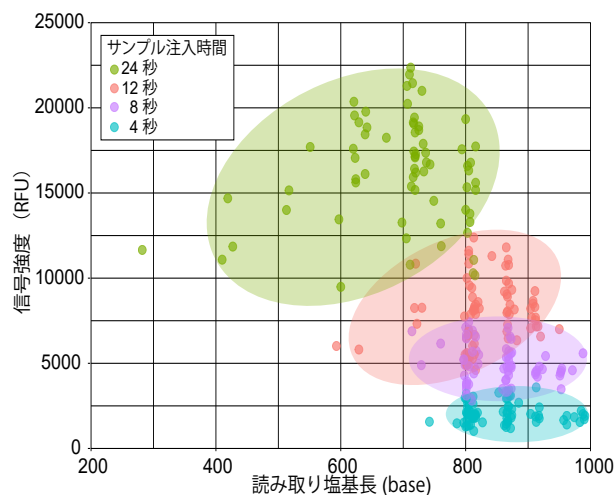


図2. サンプル注入条件とデータ品質の関係  
標準サンプル（Sequencing Standard, BigDye™ Terminator v3.1, Thermo Fisher Scientific）を用いて得られたデータの一例を示します。

次に、信号強度を調節して読み取りエラーが改善され

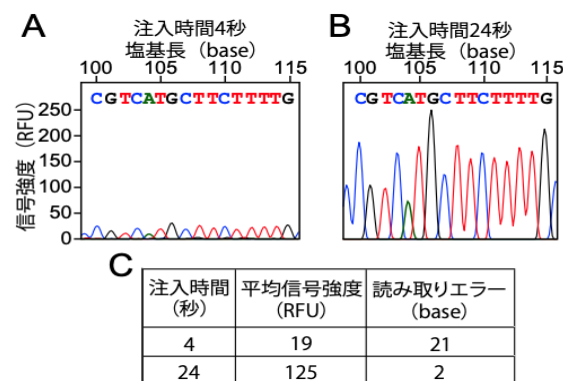


図3. サンプル注入時間の調節による読み取りエラーの改善  
(A, B) 注入時間4秒および24秒の波形データ。(C) 読み取りエラーの数。読み取りの正誤は40-700塩基の範囲で確認しました。

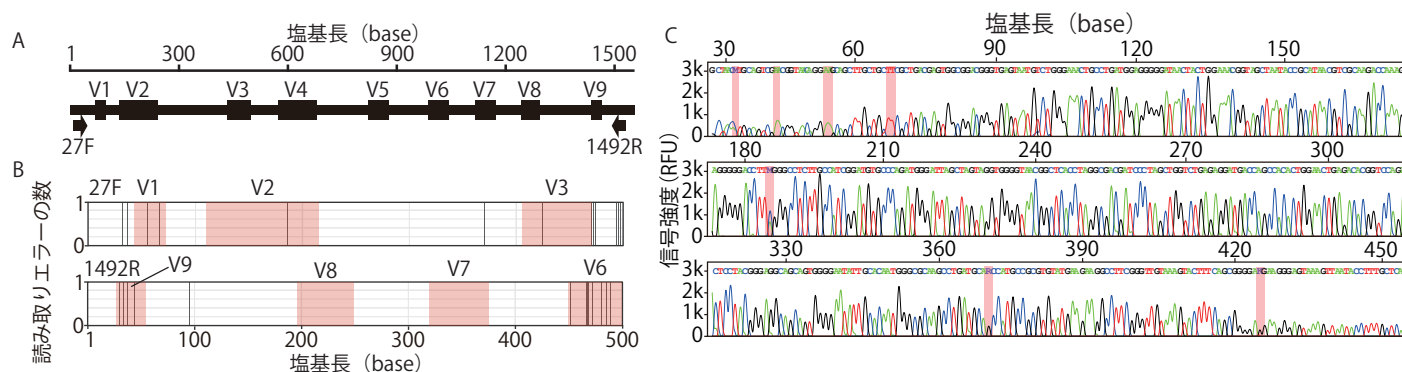


図4. 大腸菌ゲノム DNA を鋳型にしたサンガーシーケンス

(A) 大腸菌 16S rRNA 遺伝子の構造。可変領域(V1-V9)とシーケンスプライマ(27F と 1492R)の位置を示します。(B) 読み取りエラーの位置。読み取りエラーの位置を黒線で、可変領域の位置を赤枠で示します。(C) 27F プライマで得られた波形データ。読み取りエラーを赤枠で示します。

た実例を示します (図3)。平均信号強度が 19 RFU のサンプル (図3A) では、21 個の読み取りエラーが発生しました。同じサンプルの注入時間を 6 倍 (24 秒) に増やすと、平均信号強度は 6.6 倍 (図3B) になり、読み取りエラーの数は 2 個に減少しました。以上から、読み取りエラーの改善が確認できました (図3C)。

サンプル注入条件の調節は、ゲノム DNA を直接シーケンスする際にも有効です。日本ゲノム微生物学会ニュースレター (24 号) では、微生物ゲノム DNA を PCR せずに直接シーケンスする方法が紹介されました (2)。ここではこの記事と先述の知見を活かしながら、大腸菌ゲノム DNA を鋳型にして 16S rRNA 遺伝子をシーケンスしました。シーケンスプライマには、可変領域 V1 の上流にアニールする 27F と V9 の下流にアニールする 1492R を使用しました (図4A) (3)。サイクルシーケンス反応では大腸菌ゲノム DNA を 10  $\mu$ g 使用し、25 回の熱サイクルで ddNTPs を付加しました。サンプル注入条件は次のように検討しました。DS3000 では注入電圧を 1-15 kV、注入時間を 1-600 秒の範囲で変更できます。しかし、先述の通りそれぞれの値を大きくすると読み取り塩基長が短くなります。そこで、注入電圧を通常の 3 倍 (3.6 kV)、注入時間を通常のまま (4 秒) に設定しました。

得られたシーケンスデータを正解の配列と比較したところ、100-400 base の範囲で 2 個の読み取りエラーが認められました (図4B、C)。また、60-420 base までの領域で 1,000 RFU を超える信号強度が得られました。以上から、この領域では、組み換えプラスミドや外来 DNA の挿入部位を確認する用途にお使いいただけることが分かりました (2)。

## 2. GC-rich 配列の増幅

GC-rich 配列ではポリメラーゼの伸長反応が阻害され、PCR やサイクルシーケンス反応で目的の産物が得られないことがあります。この時、PCR 反応を促進する添加剤 (PCR 添加剤) を加えると改善する場合があります。代表的な PCR 添加剤には、ホルムアミド (FA) やベタインがあります (4)。ここでは GC-rich 配列を用いて、FA とベタインの濃度、および添加するタイミングについて検討しました。GC-rich 配列の例として Human CCAAT enhancer binding protein alpha (CEBPA) と Human retinoblastoma susceptibility protein (RB) を選定しました。

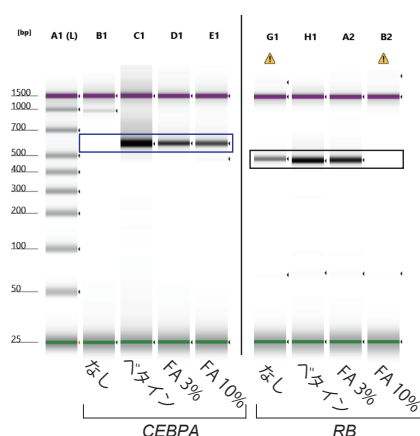


図5. PCR 添加剤の効果

PCR 反応後の溶液を Agilent D1000 ScreenTape System (アジレント・テクノロジー株式会社) で分析しました。青枠と黒枠部分は正しい PCR 産物の信号を示します。CEBPA では PCR 添加剤を加えないサンプル (図中の“なし”) で、RB では FA10% のサンプルで、正しい PCR 産物を得られませんでした。



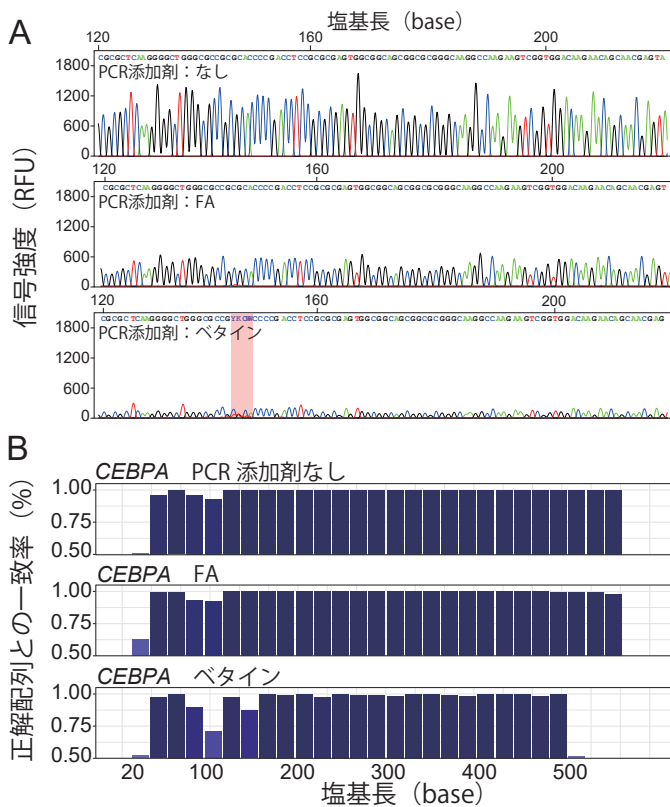


図6. サイクルシーケンス反応時のPCR添加剤の効果 (A) CEBPAを鋳型として得られたピーク波形。赤枠は読み取りエラーが発生している領域を示します。(B) 正解配列との一致率。各条件で8回ずつシーケンスを実施し、得られた塩基が正解と一致する割合を20塩基ごとにまとめて表示しています。塩基長はシーケンスプライマーの3'末端と隣接する塩基を1としてカウントしています。

GC含有率はそれぞれ71%と72%です。

始めにPCR反応時のPCR添加剤の効果を確認しました。CEBPAではPCR添加剤を加えると目的のPCR産物が得られました(図5)。RBではPCR添加剤を加えなくても目的のPCR産物が得られました。しかし、ベタインやFA(終濃度3%)を加えると、より多くのPCR産物が得られました。一方で、FAを終濃度10%で添加すると目的のPCR産物が得られませんでした(図5)。適切なPCR添加剤の量は塩基配列やポリメラーゼによって異なります。PCR添加剤を加えても目的のPCR産物が得られない場合は、添加量をご検討ください。

続いて、サイクルシーケンス反応におけるPCR添加剤の効果を確認しました。サイクルシーケンス反応にPCR添加剤を加えると、信号強度が低下することが示されました(図6A)。特に、ベタインを添加すると信号強度が1/10程度に低下し、ノイズと区別することが難しくなります。このノイズにより、読み取りエラーが発生しました(図6A、赤枠部分)。さらに、ベタインを添加すると

読み取り塩基長が短くなりました(図6B)。同様の傾向はRBでも確認されました(データ未記載)。サイクルシーケンス反応では、ベタイン、FAを加えないことをお勧めします。

### 3. 読み始めの領域の品質改善

サンガーシーケンスでは、読み始めの領域で読み取りエラーが発生することがあります。これは、キャピラリーに充填された電気泳動媒体(ポリマー)が、短いDNAをうまく分離できないことがあるためです。短いDNAの分離性能は、泳動電圧を調節することで改善します。DS3000で得られた実例を、解像度(R)を用いて説明します。解像度(R)は隣り合うピーク間の距離を、ピーク幅と塩基長差で割った値です(図7A)(5)。解像度が大きいほどベースコールの精度が向上します。解像度は電気泳動で設定する電圧(泳動電圧)と、塩基長により変化します。DS3000では泳動電圧が異なる2種類のアッセイをご用意しています。それぞれのアッセイにおける塩基長と解像度の関係を、図7Bに示します。読み始めの領域の品質を重視する場合は、fast sequencing(泳動電圧14 kV)をお勧めします。逆に、できるだけ長いDNA分子を分析したい場合はstandard sequencing(泳動電圧7.5 kV)

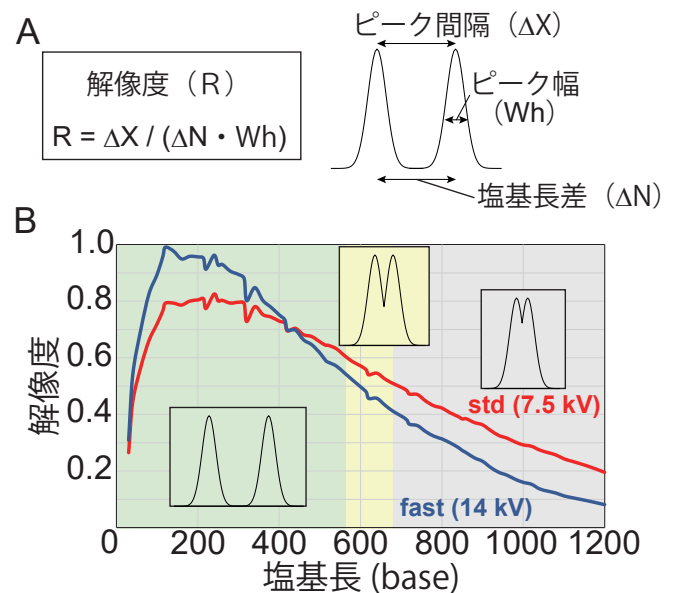


図7. 解像度と泳動電圧の関係

(A) 解像度の定義。(B) DS3000における相対的な解像度。(A)の定義で得られる解像度を元に、最大値に対する比率をプロットしました。DS3000では、解析の目的に応じて2種類のアッセイを使い分けることが可能です。fast sequencing (fast) は短時間でできるだけ長い読み取り塩基長を得たい場合に使用し、standard sequencing (std) はfastよりも長い読み取り塩基長を得たい場合に適しています。図は、解像度0.5の領域を中心に色分けしてあります。図中に、各領域で得られるピーク波形の模式図を示します。

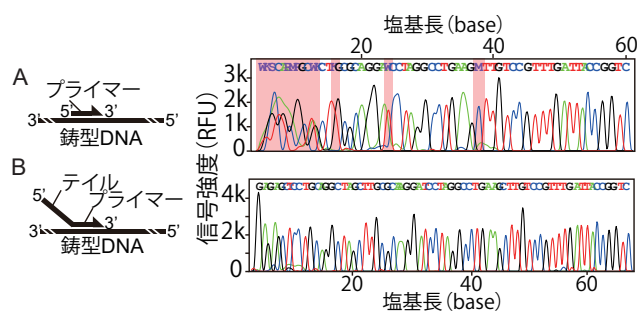


図 8. テイル付きシーケンスプライマーの効果  
(A) テイルの無いシーケンスプライマーで得られた波形データ。読み始めの領域でピーク波形が乱れてしまい、読み取りエラー（赤枠部分）が発生しています。(B) テイル付きシーケンスプライマーで得られた波形データ。(A)のプライマーに40塩基のテイルを付加しました。読み始めからピークが分離できているため、読み取りエラーが認められません。

kV) をご利用ください。

読み始めのデータ品質は、シーケンスプライマーにテイルを付加することでさらに改善します(6)。テイルはシーケンスプライマーの5'側に付加する任意の塩基配列です。テイルにより反応産物が長くなるため、電気泳動で分離できるようになります。ここでは40塩基のテイルを付加した例を示します(図8)。テイルの無いプライマーでは読み始めの領域でピーク波形が乱れているため、読み取りエラーが発生しています(図8A、赤枠部分)。対照的に、40塩基のテイルを付加したプライマーでは読み始めから正しい塩基が同定されています(図8B)。読み始めの領域で、読み取りエラーを避けたい場合はプライマーにテイルを付加してください。

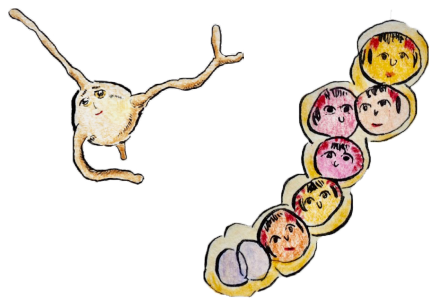
#### 4. まとめ

サンガーシーケンスで読み取りエラーが発生したり、目的の産物が得られない場合は、下記のコツをお試しください。

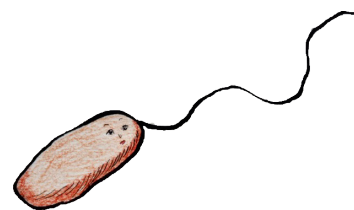
1. ピーク波形の信号強度が低すぎる、または高すぎる場合は、サンプル注入条件を変更して信号強度を調節する。
2. 解析したい領域が GC-rich 配列を含む場合は、PCR 反応時に PCR 添加剤を加える。
3. 読み始めの領域の読み取りエラーを減らしたい場合は、fast sequencing を用いて電気泳動するか、シーケンスプライマーにテイルを付加する。

#### 参考文献

- 1) DS3000 Compact CE Sequencer におけるサンプル注入条件と泳動性能の検証  
[https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/asi\\_applicationdetail?category=a122x000000Z02gAAC%2Ca1228000001ZQqLAAW&freeword=%2Cfalse&kijiId=AP100514&viewLanguage=ja](https://biz.hitachi-hightech.com/sinavi/asi_applicationdetail?category=a122x000000Z02gAAC%2Ca1228000001ZQqLAAW&freeword=%2Cfalse&kijiId=AP100514&viewLanguage=ja)  
閲覧には登録（無料）が必要です。
- 2) 大坪嘉行 日本ゲノム微生物学会ニュースレター 24:14 (2021)
- 3) Lillo et al. Oral Microbiol. Immunol., 21:61-68 (2006)
- 4) Henke et al. Nucl. Acids Res., 25:3957-3958 (1997)
- 5) Heller. Electrophoresis., 22:629-643 (2001)
- 6) Binladen et al. BioTechniques., 42:174-176 (2007)
- 7) 図のピーク波形は sangerseqR を用いて描画しました。  
Hill et al. Developmental Dynamics., 243: 1632-1636 (2014)



# 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、25号に引き続き26号においても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)

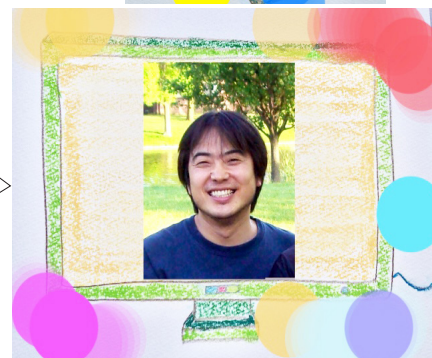
Q 8 : 微生物の命名法の議論の今後のスケジュールについて、わかっていることがありますか？

A 8 : ICNP の改訂は 2022 年の夏までに行う予定でしたが、スケジュールは遅れているかもしれません。加えて、2023 年 1 月に未培養微生物を含むゲノムシーケンスに基づく分類体系を担う The Committee on the Systematics of Prokaryotes Described from Sequence Data (略称 the SeqCode Committee) という委員会が立ち上がります。SeqCode Executive Board の面々が International Society for Microbial Ecology (ISME) におけるいくつかのタスクグループの役割を担うとされています。the SeqCode Committee には、the SeqCode Community というコミュニティもあり、こちらは微生物に関わるお仕事をしている ISME メンバーであれば参加できるようです。

Q 9 : 日本ゲノム微生物学会員が着目しておく方が良い、と思われる事がありますか？

A 9 : ICNP は (あくまでも培養が可能な) 原核生物の命名規約であり、一方で分類はそうした規約による縛りはなく、研究者が自由に考えていけば良いものと思います (もちろんコミュニティの中で認められることは必要でしょうが)。培養できているものはほんの一部でしかないので、原核生物全体の分類体系を見ていく上では今後も GTDB (Genome Taxonomy Database) や NCBI などのデータベースは有用な情報源になると思います。さらに LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <https://www.bacterio.net>) は承認されている学名を調べるためには優れたソースです。

A 9 の 2 : 少し違うかもしれませんが、現在、学名の変更が頻繁に起こっていることは認識しておいていただいた方がよいと思います。例えば、ゲノム配列を INSDC に登録する際にエントリの Definition を付けますし、BioSample や BioProject も登録することになっています。学名の変更があった場合、RefSeq だと新しい学名に更新されていますが、オリジナルのゲノム配列の登録エントリでは旧名の Definition が残っていたり、BioSample のタイトルが更新されていなかったりします。(学名が更新されるケースとされないケースがあるようです)。結果として旧名の Definition がついたエントリと新学名のエントリが混在しているためわかりにくいのではと思います。

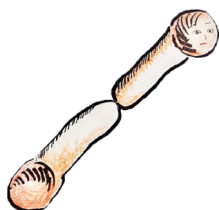




A 9の3：コメントは、Nat Rev Microbiol (<https://doi.org/10.1038/s41579-022-00706-z>)にも記載されています。とは言え、未培養系統群の名称等は、データベースも構築者の趣味が反映されることがしばしばであり、改訂も頻繁であって、かなり安定性に欠けるのが実情です



Q 10：今後、各種の国際DBや標準マニュアル等の門名は切り替わっていくのか、切り替わるとすればいつ頃になるのか、どのような見通しでしょうか？



A 10：LPSNでは今回の門名が既に登録されています。

例：<https://lpsn.dsmz.de/phylum/pseudomonadota>

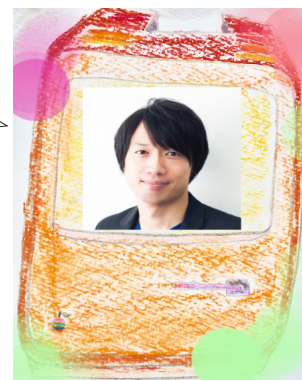
また、今回の経緯が掲載されています。

<https://lpsn.dsmz.de/text/names-of-phyla>

NCBI Taxonomyは2021年の論文をReferenceにして門名がエントリとして追加されているものもあり、また既存の門については現在のところ「heterotypic synonym」として門名が登録されています。

早さはDBそれぞれの事情に応じてになると思いますが、ICNPで新しい分類名が承認されれば従っていく流れではないかと思います。

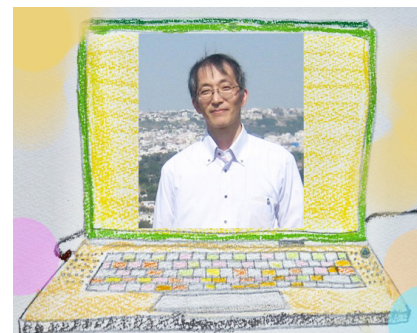
一方で旧名で菌株を探す方もいることから、旧名をSynonymなどで残したりする対応は行われています。



Q 11：門の名称と関連がある他階層の分類群名称（綱など）については、今後どうなる見通しでしょうか？



A 11：ICNPでは綱以下の学名の取り扱いは変わっていません。しかし、ゲノム情報が増えてきたことと相まって幾つかの分類群が再編成されています（例えばLactobacillusなど）。こうした動きはしばらくは続くのではないかと思います。一方、アーキアでは上門(superphylum)などを使うケースもありますが、このレベルの分類群がICNPの対象になることは当面はなさそうです。



A 1 1 の 2 : superphylum は完全に研究者の趣味ですね。門等、高次分類のゲノムベースの整理が進むにつれて、superphylum が門レベルとして認識されてくる等の事象が生じています。設問 1 の 3 : Thaumarchaeota 等は、このレベルの整理で門ではない、ということになりつつある場合があります。



A 1 1 の 3 : Alphaproteobacteria などの class 名は ICNP のもとで承認名 (正名) として扱われてきました。一方、2015 年に Rule 8 が改正されたことで (ICSP での承認は 2008 年だそうで、2015 年に施行という意味になるかと思いますが)、class・subclass 名の命名法が明確化しました。すなわち、class 名は命名基準である Type order の Type genus の名前に基づき、これに語尾として -ia (または -iia) をつけて造語するという命名法です。その方法に従い、Alphaproteobacteria については 2006 年に Type order を Caulobacterales として Caulobacteria の class 名が承認されています。Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria については, Burkholderia, Pseudomonadia, Myxococcia, Campylobacteria が承認されています。



さらに、Alphaproteobacteria などの名前をどう扱うかについて request for an opinion 「意見募集」 (Oren A et.al, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66: 4296-4298 (2016) doi 10.1099/ijsem.0.001319) が提出され、Alphaproteobacteria を Caulobacteria に変えようか、変えないままにしようかの議論を公開したのが 2016 年の論文です。その結論が出ていない現時点では Alphaproteobacteria は正名と見なすべきです。もし Caulobacteria にするという決定が出された場合、その時は Alphaproteobacteria は廃棄名となる可能性があります。

Request for an opinion は通例数年間の意見募集が行われ、それをもとに裁定委員会が判断し、ICSP が了承する形になると思います。今まで本件に関わる裁定委員会の報告を目にしたことがないと思っていましたが、最近の IJSEM 誌にはこの件はまだ検討中であるとのことでした。

尚、Class 名の変更は Phylum の決定とは直接的な関わりはありません。

同じ誌面には Mollicutes 綱は、Type order も無く、規則にのっとっていない名前であると記載があります。綱についても今後、注視していく必要があります。

本文に紹介した以外の関連する情報の紹介

International Committee on Systematics of Prokaryotes: ICSP 関連

<https://www.the-icsp.org/reports>

Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes: Minutes of the Meeting on 3 March 2022

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005395?emailalert=true>

Bergey's International Society for Microbial Systematics: BISMis 関連

[https://www.youtube.com/channel/UCScYG-RicXucp6x9vHTja\\_Q](https://www.youtube.com/channel/UCScYG-RicXucp6x9vHTja_Q)

SepCode 関連文献とサイト

<https://www.isme-microbes.org/seqcode-news>( リストされる文献を含む )

<https://www.isme-microbes.org/seqcode-initiative>

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005754>

<https://www.nature.com/articles/s41564-020-0733-x>

## 若手の会

## ゲノム微生物学会若手の会報告

国立遺伝学研究所 情報研究系

特任研究員 黒川 真臣

2022年9月20日～21日に、第14回目となる日本ゲノム微生物学会若手の会研究会がホテルラフォーレ修善寺にて開催されました。本年度は応用微生物学ルネサンスセンターさんと共同で「総合微生物学研究会」として開催しました。日本ゲノム微生物学会若手の会としては、筆者を世話人代表として、河野暢明さん（慶應大）、大林龍胆さん（静岡大）、森宙史さん（遺伝研）、新たに加わってくださった前田海成さん（東工大）の5名で世話人を務めさせていただきました。参加者38名のうち約半数は学生で、企業からの参加もあり多様な立場の人が交流できる会となりました。全員に発表もしくはショートトークを行ってもらうことで、初対面でも話しやすい環境を作ることができました。2019年以来3年ぶりに現地宿泊型の研究会として開催でき、時間を気にせず夜遅くまで研究の議論や生活の情報交換をしたりして非常に密度の濃い時間を作ることができました。学生や大人が混じって友人同士のように活発に話し合いをしている様子は世話人としては非常に嬉しく、オンラインセミナーによる知識の伝達のみでなく、面と向かって話ができる機会の意義を改めて感じました。

本若手の会は結成当初より「微生物学研究的次世代を担う若手研究者の交流と情報交換」を目的として掲げています。この目的を達成するために、自由闊達な議論が行える場であること、他の組織や若手の会とも交流し多様な知識や視点に触れられる場であることを大切に今後若手の会としての意義を模索していく所存です。本年度の研究会の開催にあたり日本ゲノム微生物学会から支援を賜り、学生会員や会員の紹介した学生は参加費を実質無料にすることができました。コロナ禍でこのような研究会の経験がなかった学生に対しても参加のハードルを下げることができました。この場をお借りして御礼申し上げます。会員の皆様には今後とも若手の会の活動を温かく見守っていただくと幸いです。

第一回総合微生物学研究会  
(修善寺の会) を終えて信州大学大学院 生命医工・  
応用微生物学ルネサンスセンター  
センター長 片岡 正和

信州大学応用微生物学ルネサンスセンターと日本ゲノム微生物学会若手の会の共催で、2022年9月20日から伊豆のラフォーレ修善寺で一泊二日の第一回総合微生物学研究会を開催しました。なんでこんな研究会をやっているかということ、、、信州大学では21年度後半に次世代の研究クラスターとして応用微生物学ルネサンスセンター（以下ルネサンス）を採択し、片岡がセンター長を務めています（といっても給料とかほとんどかわらんのですが）。このルネサンスの真の目的は信州大学の生き残り！（これは大学の考え）というよりも微生物周辺の研究者の意思疎通を太くして各人の研究を加速させるのが（片岡の）真の目的です。9/20の13時より北は北海道、西は広島、果ては中国広東省からの学生も含む38名の老若男女の参加者全員が多角的な研究紹介、あるいは自己紹介のトークで盛り上がりました。夜は、これが皆様待望のイベントだったのですが、ラフォーレの大サービスで素晴らしい材料のバーベキュー、そしてコテージでの研究討論会と続きました。特に研究討論会では午前4時まで熱い議論を中国から飛来した70歳手前の先生までガンガンやると。この熱い議論、しばらくは公開していなかったのですが、終了後もコロナ感染者はゼロで主催者としては心置きなく公開、宣伝しまくることになりました。

研究会そのものもレベルも高く、学生さんの発表もよく訓練されており、多分だめだったのは私的にはありがたい主催者の遅刻とか、時間をルーズにしてやや遅延し



たくらいです。ゲノム微生物若手の会の方も遺伝研の黒川さんがしっかりと進めていただき、いいメンバーが揃って楽しんでいました。やっぱり基礎研究はおもしろいとあきませんね〜。

最後に今回の開催をスムーズに進めていただきましたラフォーレのスタッフの皆様、その計画段階からお骨折りいただいた森トラストの豊島さんと様々な研究会主催における盟友の近畿大学の藤原先生にお礼申し上げます。そして何より、参加いただきめっちゃ楽しんでいただいた参加者の皆様に深くお礼申し上げます。あまり文字を書くとはホばれるので、会の様子の写真をあげておきます。特に高級肉が火事になってる図に着目！



## ゲノム微生物学会若手の会に参加して 信州大学大学院総合理工学研究科 修士課程2年 猪又 俊輔

私は接合伝達と呼ばれる遺伝子水平伝播現象について研究しています。特に RP4 と呼ばれるプラスミドの伝達機構を用いて、大腸菌から様々な細菌に DNA 導入を行っています。今現在は RP4 の接合伝達の開始に重要な役割を果たしている伝達開始起点 (*oriT*) に着目し、伝達の開始に必要な最小 *oriT* 領域の特定を目的として研究を行っ

ています。自分の研究に関するアドバイスやフィードバックをいただきたい、また自身の所属している研究室のみならず、広いコミュニティで様々な研究者の方々とディスカッションをしたいと考え、第14回日本ゲノム微生物学会若手の会に参加しました。本若手の会は静岡県伊豆市ホテルラフォーレ修善寺にて、応用微生物学ルネサンスセンターとの共同開催となりました。総勢約40名の方が参加され、多くの方々と研究に関する議論や趣味の話をする事が出来ました。本稿が少しでも若手の会への参加に興味を持っている方々の参考になれば幸いです。

第14回若手の会は2日間での開催となり、1日目に口頭発表と交流会、フリークロストーク、2日目に口頭発表とフリークロストークが行われました。口頭発表をしない方は自己紹介を数分程度していただき、参加される方全員に話す機会が設けられていました。1日目の口頭発表は3つのセッションで構成されており、有識者の方々の発表から始まりました。次に若者セッションとして、学生の口頭発表が行われました。質疑応答も活発に行われ、自分の研究のモチベーションをさらに高める事が出来ました。また、参加された学生の皆さんの発表に関してどれも興味深く、ディスカッションするには設けられた発表時間では物足りなく感じました。これに関しては交流会やフリークロストークで十分ディスカッションする事ができたので満足です。交流会では「BBQ GARDEN」でバーベキューを行いながら、研究の話やプライベートの趣味の話で他大学の学生さん、及び有識者の方々と交流する事ができました。研究内容に関するディスカッションのみならず、発表に関するアドバイス等を有識者の方々から頂いていた学生の方も見受けられました。バーベキューインストラクターと呼ばれる資格を持ったスタッフの方々が美味しい焼き方をアドバイスしてくださり、楽しい時間を過ごす事が出来ました。夕食後も名酒をいただきながらクロストークができる時間が設けられており、気が付いたら朝の3時まで話し込んでしまいました。2日目は朝から昼すぎまで、有識者の方々の発表が行われました。自分の専門分野とは異なっていましたが、薬剤耐性に関する研究やメタゲノム、ミニマルセルなど、興味惹かれる内容ばかりで、他分野の方との交流はとてもしっかりと勉強になると改めて感じました。

今回の若手の会を通して、自身の研究のモチベーションの向上、及び専門分野のみならず他分野の方との交流

が自身の研究を進めていく上でも重要であることを感じました。また、オンサイトでの学会は自身の研究に関する議論も多く行えるうえに様々な知識を得る事ができる機会だと改めて思いました。コロナ禍で数多くの学会がオンラインとなってきたこの3年間ですが、これからは徐々にオンサイトでの学会が多く行われていくのかと思われます。「若手の会」も対面で活発な議論ができる場なので興味ある方は参加されることを強くお勧めします。最後に黒川さんを始め、若手の会を運営して頂いた皆様、ルネサンスセンター長である片岡先生、会場や美味しい食事を提供して下さったホテルラフォーレ修善寺のスタッフの皆様、並びに本会に参加した皆様に感謝申し上げます。



## ゲノム微生物学会 若手の会

静岡大学 理学部 生物科学科 4年

### 奥本 麗奈

この度私は、静岡県のラフォーレ倶楽部修善寺にて開催された日本ゲノム微生物学会若手の会に参加しました。本若手の会はコロナ禍で開催できない状況が続いていましたが、今年は久しぶりの開催となり、参加できたことを心より嬉しく思います。私は今年の春に研究室に所属し研究を始めたため、これまで学会に参加したことはありませんでした。本会で初めて学外の研究者と意見交換をすることができ、とても勉強になりました。本稿では、若手の会に参加して感じたことや学んだことをご紹介します。

私は現在、静岡大学理学部の大林龍胆研究室でシアノバクテリアが持つゲノム倍数性の意義について研究を行っています。多くの原核生物、真核生物においてゲノムの倍数化がみられます。これまで植物での進化可能性やバクテリアでのUV耐性向上など倍数体のメリットは報告されています。しかし、本質的な細胞機能としてのゲノム倍数性の意義は不明な点が多く、生育条件下での複数ゲノムコピーを持つことによるメリットや細胞サイズとゲノムコピー数の関係性はほとんど明らかになって

いません。これまでの私達の研究室の研究より、シアノバクテリアの細胞の大きさとゲノムコピー数が正の相関を示すことや、細胞当たりのタンパク質濃度がゲノムコピー数に関わらず一定であることを明らかにしてきました。私は、シアノバクテリアがゲノムを複数持つ理由を解明するために、まずはシアノバクテリア1細胞あたりの転写または翻訳産物蓄積量を計測し、この実験データに基づいて転写または翻訳活性を定量しています。転写活性と翻訳活性を定量し細胞サイズとそれぞれの活性の関係性を明らかにすることで、細胞の大きさとゲノムコピー数の相関関係の解明が可能になります。また、種間比較することでシアノバクテリアに共通するゲノム倍数性の解明に繋がります。

本会の研究発表は、一人あたり15分間（学生は10分間）の口頭発表から始まりました。研究発表の質疑応答ではあらゆる観点で議論し合い、とても有意義な時間を過ごすことができました。私の発表の際にも相手に伝わりやすいグラフの作成方法などのフィードバックを頂くことができ、学生ではなく研究者としての作法を教えてくださいました。頂いた意見を活かして今後の研究に取り組んでいきたいと思えます。夜の食事は屋外でのバーベキュー形式でした。本会に参加した全員が所属関係なく、研究について話したり、プライベートの話をしたりしてとても盛り上がりました。最初は馴染めるか不安でしたが、隣の席にご一緒した本会主催の片岡正和先生が気さくに声をかけてくださったおかげで緊張が一気にほぐれました。本会に参加することで、日本各地で研究を行っている方たちと研究について意見交換を行うことで、繋がりを持つことができました。今までより広い視野で研究を進めることができると思いました。若手の会に少しでも興味のある方は是非、参加していただきたいと思えます。最後になりましたが、今回の若手の会を企画・運営して下さったスタッフの方々、関係者の皆様に心より感謝を申し上げます。





## 学会員の最新の論文紹介コーナー

### Zooplankton act as cruise ships promoting the survival and pathogenicity of pathogenic bacteria

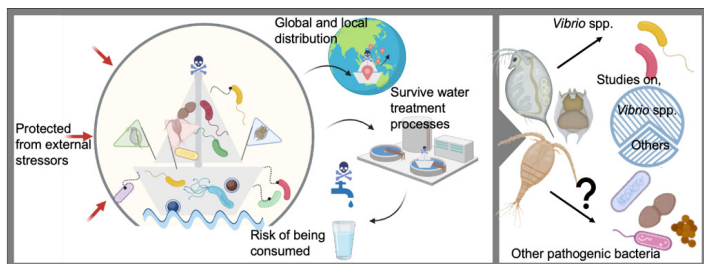
Ishara U. Perera<sup>1,2</sup>, So Fujiyoshi<sup>1,2</sup>, Yukiko Nishiuchi<sup>1</sup>, Toshihiro Nakai<sup>3</sup>, Fumito Maruyama<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hiroshima University • IDEC institute • Center for the Planetary Health and Innovation Science, <sup>2</sup>Hiroshima University • Center for Holobiome and Built Environment (CHOBE), <sup>3</sup>Hiroshima University • Graduate School of Integrated Science for Life • Takehara Marine Science Station.

**Microbiol Immunol. 1-15 (2022)**

<https://doi.org/10.1111/1348-0421.13029>

環境ゲノム科学においてメタゲノム解析が多く用いられるようになり、アンプリコン解析だけでは見えないウイルス、細菌、真菌を同時に捉えることができるようになってきた。本稿では、さらにサイズの大きな動物プランクトンと細菌の関係に着目している。動物プランクトンと病原性細菌の相互作用は古くから研究されているが、これらの相互作用が非病原性細菌を含めた環境中の細菌群集に与える影響については十分な注意が払われていない。本総説では、動物プランクトンを細菌の「クルーズ船」に例えている。クルーズ船では、細菌は増殖に必要な栄養を安定的に供給され、ストレス条件からも保護される。さらに、他の細菌種と相互作用することで病原性遺伝子の水平移動が促進されることから、動物プランクトンは病原体の格好の輸送船となる。病原性・非病原性にかかわらず、動物プランクトンに付着する細菌はフリーリビングの細菌と比較して、より高密度に長い期間存在することが知られている。また動物プランクトンとの相互作用により、細菌は水処理プロセスにも耐え生存・増殖することができるため、人間の健康への潜在的なリスクを生み出す可能性がある。このことから、これまで動物プランクトンと *Vibrio* spp. の相互作用にばかり注目されてきたが、ホロビオームの概念を取入れ、病原細菌と他の環境中に生息する生物全体の相互作用を明らかにすることが、リスク管理には重要である。



動物プランクトンは、病原性細菌のクルーズ船として、環境ストレスから細菌を保護し、局所および世界的な拡散を促進する。動物プランクトンに付着した細菌は、水処理において健康へのリスク要因となる可能性がある。

### Machine learning-assisted discovery of growth decision elements by relating bacterial population dynamics to environmental diversity

會田穂乃香, 橋詰崇雅, 芦野一葉, 應蓓文  
筑波大・生命環境

**eLife 11:e76846, (2022)**

<https://doi.org/10.7554/eLife.76846>

生命の最も基本的なプロセスである細胞増殖は温度や栄養源といった環境因子に影響を受ける。これらの環境因子は自然界に無数に存在するが、細胞増殖への定量的な寄与度がほとんど評価されていない。環境因子が細胞増殖に与える影響を理解するために、本研究は、膨大な計測実験に機械学習分析を組み合わせることで、微生物細胞の増殖と代表的な環境因子である培地成分の関係を初めて定量的にかつ網羅的に調査した。

本研究では、様々な微生物培地の構成成分中に最も代表的な化学成分を絞って、計 44 種類の化合物を様々な濃度で混合し、計 966 種類の合成培地を用意した。これらの培地で大腸菌を増殖させ、その経時的变化を測定し、12,989 個の増殖曲線を取得した。これらを紐づけることで化学成分 - 増殖ビッグデータを構築し、機械学習分析を適用した (図 1 A)。どの化学成分が大腸菌の増殖にどのような影響を与えているのかを推定した。その結果、大腸菌増殖における「ラグタイム」、「最大増殖速度」、「最大菌体量」の 3 つの指標の変化にはそれぞれセリン、硫酸イオン、グルコースが優位に寄与していることが明らかとなった (図 1 B)。集団増殖のシミュレーションでは、3 つの増殖指標が同一化学成分で決定される場合に比べ、異なる成分で決定された時の生存確率が高いことが検証された。微生物の各増殖期の運命を決める環境因子が異なることが集団全滅のリスクを減らすことを示唆している。

これらの研究結果は、リスク分散といった微生物の生存戦略への理解に繋ぐものであり、細胞増殖の普遍的モデルの構築に膨大なデータとシンプルな法則を提供することにもなる。

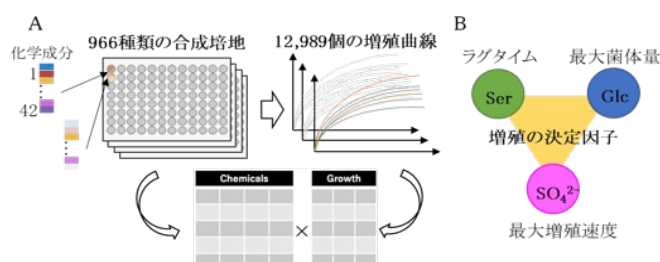


図 1. 研究概要 A 微生物実験とビッグデータ構築の概要。B 推定された増殖決定因子。Ser,  $\text{SO}_4^{2-}$ , Glc はそれぞれセリン、硫酸イオン、グルコースを表す。



## History-dependent physiological adaptation to lethal genetic modification under antibiotic exposure

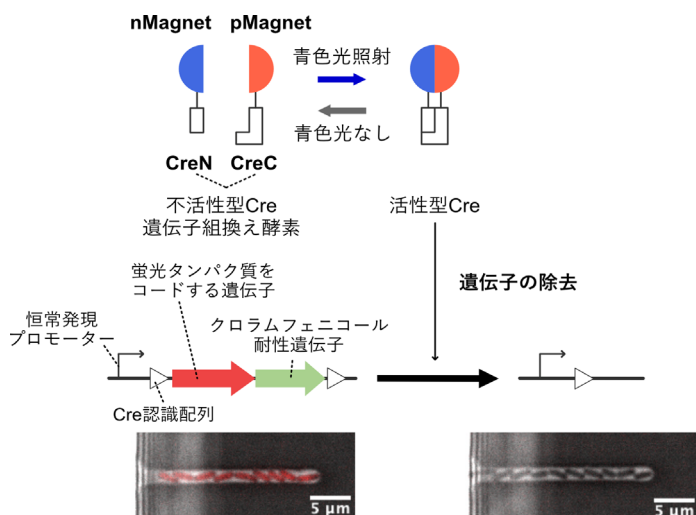
小金澤優太<sup>1</sup>, 梅谷実樹<sup>1,3</sup>, 佐藤守俊<sup>1,4</sup>, 若本祐一<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 東大院総合文化・広域科学, <sup>2</sup> 東大・複雑系センター, <sup>3</sup> 東大・生物普遍性, <sup>4</sup> KISTEC

elife 11:e74486 (2022)

<https://doi.org/10.7554/eLife.74486>

遺伝子型 - 表現型対応を理解するため、遺伝学的解析では遺伝子型変化の発生から十分に時間が経過した後の表現型を観察する。しかし、遺伝子型変化が起きた直後からその影響が表現型変化へ波及していく過程の理解はこれまで進んでいなかった。我々は遺伝子型変化の発生後の表現型のダイナミクスを観察するため、遺伝子欠失を青色光照射により任意のタイミングで誘導可能な Photo-activatable Cre (PA-Cre) システムと、細胞動態を1細胞レベルで長期間観察できるマイクロ流体デバイスを組み合わせさせた。抗生物質クロラムフェニコール (Cp) 耐性遺伝子を染色体上に持つ大腸菌をモデルに用い、マイクロ流体デバイスに導入した。そして本来、耐性遺伝子なしでは細胞が増殖できないと考えられる濃度の Cp 環境下で培養し、青色光を照射して耐性遺伝子を除去した。その結果、約40%の細胞が一時的に成長をほとんど停止した後、徐々に回復し安定した分裂を示した。耐性遺伝子欠失に適応した細胞で、その他の遺伝子変異は確認されなかったため、この適応は表現型レベルの変化で実現したと考えられる。さらに遺伝子欠失から Cp 投与までの時間を段階的に変化させた。その結果、遺伝子欠失から Cp 投与までの時間が3時間以内では適応細胞の割合はほとんど変化しなかったが、それ以上時間が経過するとその割合は減少し、10時間以上では適応細胞が出現しなかった。以上の結果は、大腸菌細胞は外的ストレスに限らず、遺伝子型変化という内的ストレスに対しても履歴依存的に適応できることを示しており、薬剤耐性菌の出現、進化、拡散を考えるうえで重要な知見であると考えられる。



青色光照射により遺伝子除去を誘導する PA-Cre システムと、マイクロ流体デバイス内の大腸菌細胞

## The OceanDNA MAG catalog contains over 50,000 prokaryotic genomes originated from various marine environments

西村陽介<sup>1</sup>, 吉澤晋<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 東京大・大気海洋研, <sup>2</sup> 東京大・院・新領域

Sci. Data 9, 305 (2022)

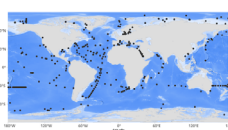
<https://doi.org/10.1038/s41597-022-01392-5>

海洋環境には「微生物ダークマター」と呼称される、未知の微生物が数多く残されています。これらの微生物がどのような生態を持ち、どういった進化を遂げてきたのかについては、謎に包まれてきました。本研究では、メタゲノムデータを用いて、個々の微生物ゲノム（一般に、「MAG」と呼ばれる）を解読する手法を開発しました。特に、ゲノム断片配列の様々な特性を解析することで、ゲノムに誤って含まれた断片配列を検出・除去するためのソフトウェア MAGRE を開発し、GitHub で公開しています。この手法を用いて、公共データベースから入手可能な、様々な海洋環境に由来する計 29 兆塩基対からなる大規模メタゲノムデータを解析しました。その結果、59 門 8,466 種にまたがる 52,325 個の高品質な原核生物ゲノムの解読に成功し、得られたゲノムの情報を整備して、世界最大の海洋生物ゲノムカタログ「OceanDNA MAG カタログ」として公開しました。本ゲノムカタログは約 15,000 ゲノムを収載する海洋微生物ゲノムデータベース MarDB などの既存のゲノムリソースの規模を大幅に上回っています。

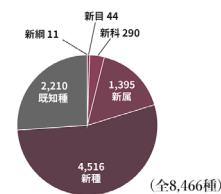
本研究は、「微生物ダークマター」に相当するゲノム配列を多数解読することで、海洋原核生物ゲノムの多様性に関する知識を大幅に拡充しました。また、OceanDNA MAG カタログは、海洋微生物の生態や進化の過程の解明に貢献するとともに、地球環境保全に取り組むための重要な知識基盤となることが期待されます。

## The OceanDNA MAG catalog

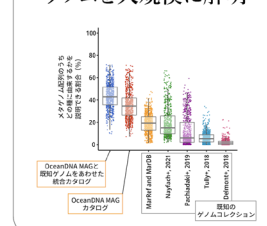
2千メタゲノム  
29兆塩基対を解析



5万のゲノムを解読  
73.9%が新種



「微生物ダークマター」のゲノムを大規模に解明



OceanDNA MAG カタログの概要

## 実験レシピ紹介コーナー第6回

## IPTG は安いグレードでも大丈夫？

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科

応用化学・生命工学系 准教授

広瀬 侑

タンパク質の発現・精製実験は、分子生物学実験において最もよく行われる実験の一つです。特定の生物種の持つタンパク質を大腸菌に発現させ、精製することができれば、そのタンパク質の性質を詳細に調べることができます。また、大量に調製することができれば、NMRやX線結晶構造解析などの手法によって、構造解析も可能となります。大腸菌におけるタンパク質の発現・精製では、内在の *lac* プロモータの活性を Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) の添加によって誘導し、それを利用して強力な T7 プロモーターの活性を誘導する pET システムがよく使われています。

分子生物学実験でよく使われる IPTG は、純度 99.0% の HPLC 精製のグレードで、国内試薬メーカーから 10 g で定価 3 万円ほどで販売されています。私はこれまでこのグレードの IPTG を購入してきました。ある日、IPTG の在庫が無くなったので、オンラインで価格の安い IPTG を検索していたところ、97% グレードの IPTG 試薬が 100g で定価 5.4 万円で販売されていました。これは 99.0% グレードの試薬と比べて 1/6 ~ 1/7 の価格です。説明書をよく見てみると、99.0% グレードの試薬には、抽出時に使用する有機溶媒ジオキサンが含まれていないと書いてあるのですが、97% グレードの試薬にはそのような記載がありませんので、ジオキサンや他の混入物があるのかもしれませんが、しかし、大腸菌培養に使用する 1L の LB 液体培養液 (乾燥重量 20 g) に添加する IPTG は 1 mM (238 mg) であり、その 3% 程度 (7 mg 程度) 混入物があったとしても、タンパク質発現は誘導されるのではないかと考えました。もし、97% グレード試薬に切り替えることができれば、研究費の節約につながります。そこで、グレードの異なる IPTG を用いてタンパク質発現実験を行ってみました。

実験手順は以下の通りです。タンパク質発現系として、シアノバクテリアの光受容体タンパク質 RcaE の発現系を使用しました (1)。大腸菌ホストとしては C41(DE3) を使用しました。100 mL 三角フラスコ 6 本のそれぞれに 50 ml の LB 液体培地と抗生物質を加え、前培養液を移し、37°C で 180 rpm の速度で震盪培養を行いました。培養開始から 2.5 時間経過後に 99.0% グレードと、97% グレー

ドの IPTG を終濃度 1 mM になるように 3 本ずつのフラスコに加え、同条件で培養を行いました。培養開始から 30 分ごとに細胞の OD<sub>600</sub> を測定しました。培養開始から 5h 後に細胞を遠心分離で回収し、3.0 mL の緩衝液に細胞を懸濁し、細胞を破碎し、変性・還元処理後、SDS-PAGE によってタンパク質の発現量を評価しました。(腕が衰えないよう、私自身の手で実験を行いました。)

細胞の増殖曲線を調べてみると (図 1)、99.0% グレードと、97% グレードのどちらの IPTG を添加した場合でも大腸菌の増殖曲線に大きな差は見られませんでした。IPTG 精製時に混入する不純物が大腸菌の増殖を阻害していることはなさそうです。続いて、SDS-PAGE によるタンパク質のバンドの強度を比較しました (図 2)。どちらの条件においてもタンパク質の発現量に明確な違いは見られませんでした。これらの結果は、97% グレードの IPTG を用いても、99.0% グレードの IPTG を用いた場合と同等の発現誘導を行うことができる可能性を示しています。タンパク質の発現系の評価は、目的とするタンパク質によって最適化する必要があるため、どのタンパク質においても 97% グレードの試薬で十分かどうかはわかりませんが、皆さんの研究室でも検討してみたいはいかがでしょうか？

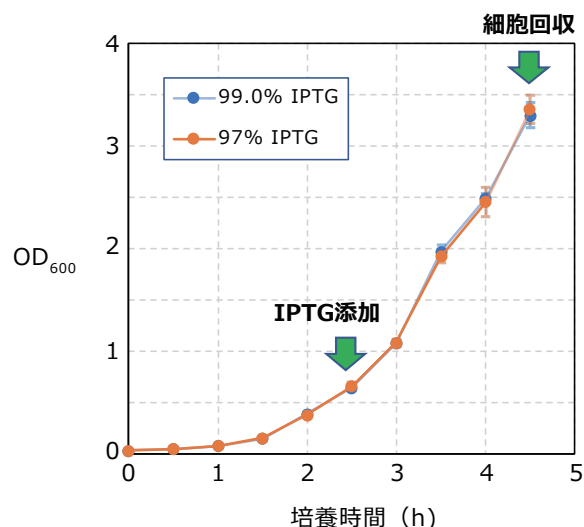


図 1. 大腸菌の増殖曲線 (n=3, エラーバー: 標準誤差)

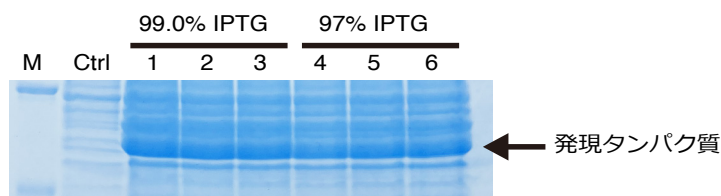


図 2. SDS-PAGE によるタンパク質発現量の比較

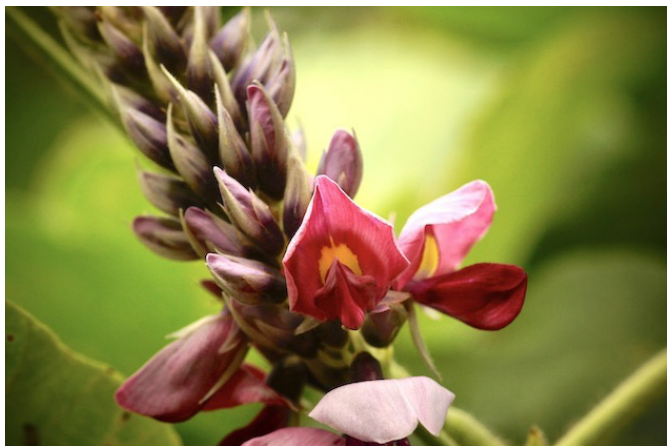
## 参考文献

- 1) Hirose Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 110: 4974- 4979 (2013)



## 閑話休題 - その14 - 夏 初冬の野山に咲く花々

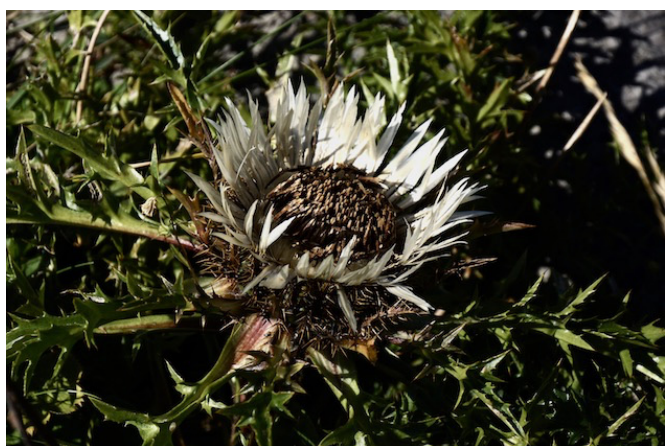
今年の8月から9月にかけて二週間ほどドイツのコンスタンツに滞在したのですが、その間コンスタンツから見えるスイスアルプスの Säntis という山の麓まで行く機会がありました。そこで出会ったたくさんの花のうち2種をお目にかけます（表示してある名前は正式な和名ではありません）。その他の花も皆さんがあまり見たことがないと思われる秋の花です。フヨウカタバミは南アフリカ原産の帰化植物です。（磯野克己）



クズ (マメ科) : *Pueraria lobata* Ohwi, 2020.9.13 神戸市



アキノノゲシ (キク科) : *Lactuca indica* L., 2022.9.29 神戸市



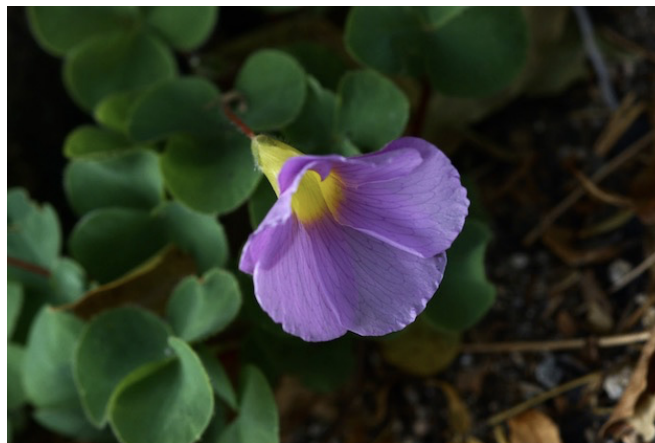
チャボアザミ (キク科) : *Carlina aculis* L.,  
2022.8.26 スイスアルプス



ツルソバ (タデ科) : *Persicaria chinensis* H.Gross,  
2022.10.23 富津市 (千葉県)



アイブライト (ゴマノハグサ科・コゴメグサに近縁) :  
*Euphrasia rostkoviana* Hayne, 2022.8.26 スイスアルプス



フヨウカタバミ (カタバミ科) : *Oxalis purpurea* L.,  
2021.12.12 神戸市



## 第17回日本ゲノム微生物学会年会 開催案内

かずさDNA研究所  
田畑 哲之

日本ゲノム微生物学会第17回年会を、2023年3月8日(水)～10日(金)の3日間、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)にて開催いたします。

夏以降、他学会の年会はオンサイト開催を基本として開催されており、一般的な感染対策を講じた上で、ほぼ通常通りのプログラムで実施されているようです。感染状況は相変わらず落ち着きませんが、総合的に考えれば3月の本学会年会もオンサイト開催の可能性が極めて高いと思われます。多くのセッションをオンライン配信する予定で準備が進んでいますが、ご都合がつくようであればぜひ木更津までお越しください。

発表形式は、コロナ前の年会と同じく口頭発表とショートトーク付きポスター発表、さらにシンポジウムも検討されています。発表者は原則としてオンサイト参加をお願いします。感染状況にもよりますが、会場での簡単なミキサーは開催、全体での懇親会は開催せず、木更津駅付近の飲食店で小規模に歓談をお楽しみいただくことになりそうです。年会の詳細や宿泊情報は随時年会HPを通じて提供されますので、こまめにご確認いただきますようお願いいたします。

すでにアナウンスしていますように、今回の年会は「原点に戻って」がメインテーマです。社会の状況、研究環境、微生物科学の現状について、この機会に一度立ち止まって「原点に戻って」考え、新たな一歩に向かって意見を交換する楽しい時間を提供できれば幸いです。かずさアカデミアホールで皆さんにお会いできることを心から楽しみにしています。



## 編集後記

ゲノム微生物学会ニュースレターは今回で26号目となります。学会ホームページのニュースレターのコーナーにこれまで発行した号がアーカイブされています。また、ここに編集委員がリストされていますが、初代の委員は磯野克己先生です。編集委員は代替りしましたが、磯野先生の編集方針は継承されています。編集委員会は春と秋にZoomで開催して、年会での話題や最新のトピックスについて、議論しながらコンテンツを考えています。25号は特別企画として原核生物の命名規約法を取り上げご好評いただきました。26号ではその企画に加えサンガーシーケンスのコツについての記事を掲載しております。一方、季節を感じるコーナーとして磯野先生より、毎回閑話休題として野山に咲く花々のお写真をいただいています。ホッとさせるコーナーとして楽しみにいただいている方も多いのではないのでしょうか。ご執筆いただきました方々に感謝申し上げます。今後ともニュースレターをご愛読いただけますと幸いです。

ところで、微生物の研究をしているとラボのフリーザーにはレポーター導入株など構築した株がどんどん貯まっています。フリーザーには先代からの菌株もストックされています。なかには500株もの菌株を作製する大学院生もいますので、毎年リストと照合し、整理をしています。しかし、年数が経つにつれ、苦勞して作製した菌株が無事に次の代に継承されるのか不安になります。2002年から作製した細胞・菌株の保存と分譲事業(NBRP)が進められています。ご存じの方も多いと思いますが、NBRPのHPには、多くの微生物事業が掲載されています。例えば、大腸菌・枯草菌のNBRP事業など。分譲株のリストは分かりやすく、魅力的な菌株がラインナップされています。研究室のフリーザーに眠っている菌株を積極的にNBRPに寄託すると、それらの分譲・利用を通じて微生物研究のコミュニティーの輪が広がります。NBRP事業のHPのURLを記します。是非とも積極的に利用ください。(佐藤)

<https://nbrp.jp>

## 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 345名、学生会員 142名、名誉会員 3名  
 賛助会員 9名、機関会員 1名(計 500名)