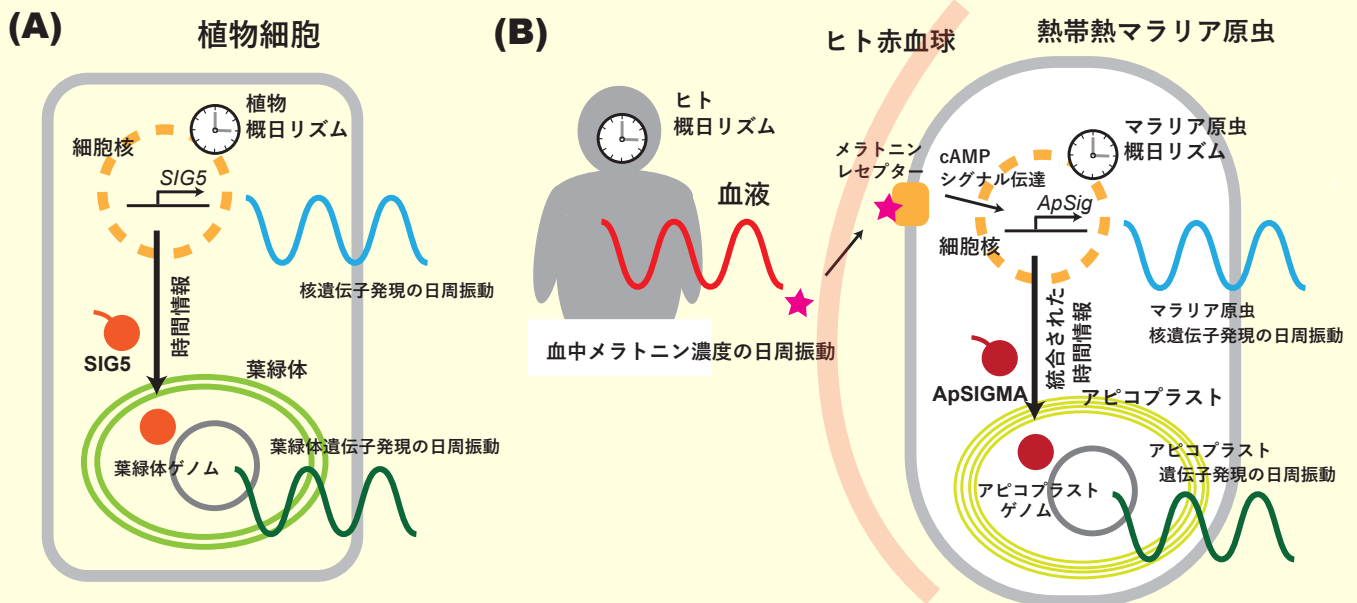


日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

時を告げる葉緑体シグマ因子

田中寛

東京工業大学科学技術創成研究院 化学生命科学研究所



(A) 植物細胞 (Arabidopsis) では核ゲノムコードの葉緑体シグマ因子 SIG5 が概日リズムの制御下にあり、葉緑体ゲノム上の光合成遺伝子の発現に日周リズムを与えている。

(B) 熱帯熱マラリア原虫はヒトに感染してから赤血球内に入り、48時間周期で一斉に増殖して血中に放出されるサイクルを繰り返すが、この同調性はヒト概日リズムに従って変動する血中メラトニン濃度に依存することが知られていた。今回の研究で、私たちはメラトニンが核コードのシグマ因子を活性化することで、アピコプラスト (光合成を失った葉緑体) ゲノムの転写をヒトのリズムに同期させることを明らかにした。この同期がマラリアの発症に必須の機能であることから、今後はこの仕組みを標的とした抗マラリア薬の開発も考えられる。

葉緑体ゲノムには細菌型 RNA ポリメラーゼのサブユニット群がコードされており、その転写開始因子であるシグマ因子は例外なく細胞核ゲノムにコードされ、細胞質から葉緑体に輸送されて葉緑体ゲノム転写を調節している。核コードの葉緑体シグマ因子には多くの藻類・植物で細菌同様の多型性があり、それらの発現や機能制御による葉緑体分化やストレス応答への関与が明らかにされてきた。特に、シロイヌナズナの葉緑体シグマ因子 SIG5 は細胞核内で刻まれる概日リズムを葉緑体転写に伝え、地球環境での光合成最適化に重要な役割を果たしている (1)。緑色植物や紅藻の葉緑体はシアノバクテリアが真核細胞に内部共生して生じたと考えられているが、それ以外の多くの藻類の葉緑体は2次共生、つまり葉緑体を既に持つ真核藻 (紅藻や緑藻) が、さらに他の真核細胞に内部共生したのが起源とされている。そして、これら共生藻の核コードシグマ因子遺伝子はさらに共生宿主の核ゲノムに移動し、そこから葉緑体ゲノムの転写に関わり続けている。最近私たちは、このような2次共生藻から光合成能を失って進化したマラリア原虫の核ゲノムからシグマ因子遺伝子 *ApSig* の同定に成功した (2)。マラリア原虫は、退化した葉緑体であるアピコプラストをもつが、このシグマ因子は実際に原虫の増殖に必要なアピコプラストのゲノム転写を活性化していた。ヒト感染後にマラリア原虫は赤血球に入り込んで増殖するが、この際に彼らは血液中で概日リズムを刻むホルモン“メラトニン”を感知しており、これにより決まった時間に一斉に増殖して強烈な症状を引き起こす。今回の研究では、*ApSig* 遺伝子がメラトニン制御下にあり、アピコプラスト遺伝子を直接に活性化することで原虫の増殖に関与することが明らかとなった。シアノバクテリアからマラリア原虫まで、概日リズムとシグマ因子には常に深い繋がりが示されている。興味深い進化的な保存性と言えるだろう。

(1) Noordally, Z. B. et al. Circadian Control of Chloroplast Transcription by a Nuclear-Encoded Timing Signal. *Science* 339, 1316–1319 (2013)

(2) Kobayashi, Y. et al. Coordination of apicoplast transcription in a malaria parasite by internal and host cues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 120, e2214765120 (2023)

微生物学分野の研究動向

核様体タンパク質から複製開始メカニズムの共通原理を展望する

片山勉¹、吉田竜星¹、川上広宣²、加生和寿¹、尾崎省吾¹¹九州大学大学院薬学研究院、²山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部

1. はじめに

核様体タンパク質 HU が染色体の複製開始を促進するメカニズムは何か？ HU は主要な核様体形成因子であり、原始的な高度好熱菌から大腸菌までバクテリアドメインには広く保存されている (1)。そして HU が大腸菌染色体の複製起点 *oriC* による複製開始、特に DNA の一本鎖化の段階に重要であることは、40 年ほど前 (1984 年～1988 年) に Arthur Kornberg 研 (米国スタンフォード大) で開発された *in vitro* 再構成系などによって明らかにされていた (2)。しかしその分子メカニズムは解明されず、曖昧なまま今日まで取り残されていた。このような重要な謎が解かれていなかったのは、複製開始そのもののメカニズムが解明されておらず、HU はそのメカニズムに深く関係していたからである。最近、この謎の解明が大きく進み、複製開始メカニズムの進化的保存性についても新たな視野が開けてきた (3)。

2. 複製開始複合体

DnaA タンパク質は複製起点 *oriC* に結合して特異的な多量体を形成し、複製開始反応を進めさせる (4)。複製開始反応は、複製起点 DNA の一本鎖化、そして、そこへの複製ヘリカーゼの導入という 2 段階からなる。*oriC* は大きく 2 つの機能領域に分けられる (図 1)。まず DUE (Duplex Unwinding Element) 領域は AT に富む反復配列をもち、複製開始反応のなかで最初に二重鎖 DNA の開裂 (局所的一本鎖化) を起こす。大腸菌 *oriC* では TT[A/G]T(T) 配列をもつ一本鎖化 (ss)DUE 部位が DnaA に直接結合し開裂状態を安定化する。

DUE に隣接する DOR (DnaA oligomerization region) 領域

は多数の DnaA 結合部位 (DnaA box) をもち複製開始複合体形成の足場となる。DOR 内の DnaA box は当初、Kornberg 研、Walter Messer 研 (独国 Max Planck Institute)、高浪 満研 (京都大) 等で主に解析され 5 つの部位が決められ、TTA[T/A]NCACA という 9-mer コンセンサス配列が示された。一方、電子顕微鏡での観察などからは 20 分子ほどの DnaA が *oriC* と複合体形成することが示唆されていた (5)。続いて Jon M. Kaguni 研 (米国ミシガン州立大)、Alan Leonard 研 (米国フロリダ工科大) と我々のグループは精力的に *oriC* 内の DnaA 結合部位を Footprint 等の手法で解析し、Leonard 研と我々は DnaA との結合力の弱い DnaA box を新たに見出した。これら低親和性 DnaA box は縮退したコンセンサス配列を持つ。現在は全部で 12 ヶ所の DnaA box とその方向が明らかになっており、さらに新たな部位が見つかる可能性はほとんどないだろう (図 1)。低親和性 DnaA box は 4～5 つで 1 つのクラスターを形成しているため、活性型の ATP 結合 DnaA はここでオリゴマーを形成し比較的安定に協同結合できる。

なお、開始活性の無い ADP-DnaA はオリゴマーを安定的に形成できないため、低親和性 DnaA box に結合できず、開始複合体を形成できない。よって細胞周期における ATP-DnaA の適時的形成は複製開始の制御メカニズムの要となっている。詳細は文献 (4) にゆずるが、ATP-DnaA による複製開始の後には、DNA ポリメラーゼ等との相互作用によって ATP 加水分解が活性化され、ADP-DnaA に変換される。次の複製開始前には、ADP-DnaA とゲノム上の特異的な非コード DNA 因子との相互作用によって ADP → ATP 交換反応が起こされ、ATP-DnaA が適時的に形成される。

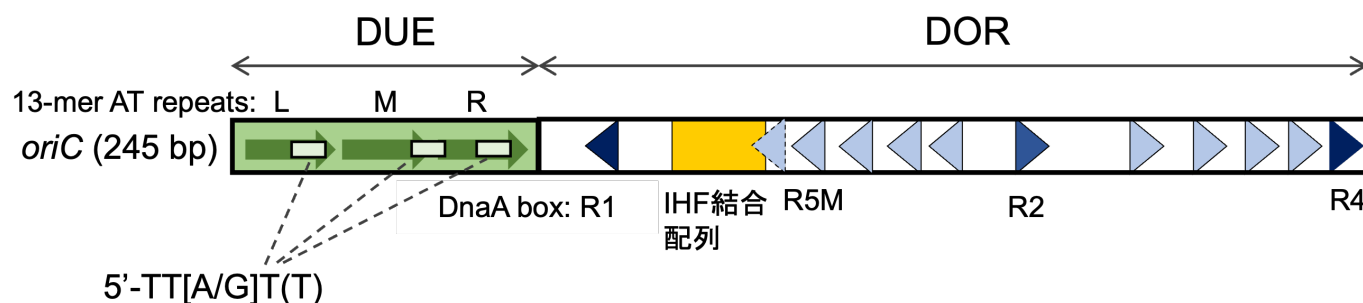


図 1 *oriC* の機能構造

詳細は本文参照。三角は DnaA box。DnaA box R1, R2, R4 には DnaA が単独で結合できる。他の DnaA box (R5M 以外、名称割愛) は低親和性のため ATP-DnaA オリゴマーが結合できる。DnaA box と IHF 結合配列 (黄色) が一部重複した部位には IHF 結合が優先する。

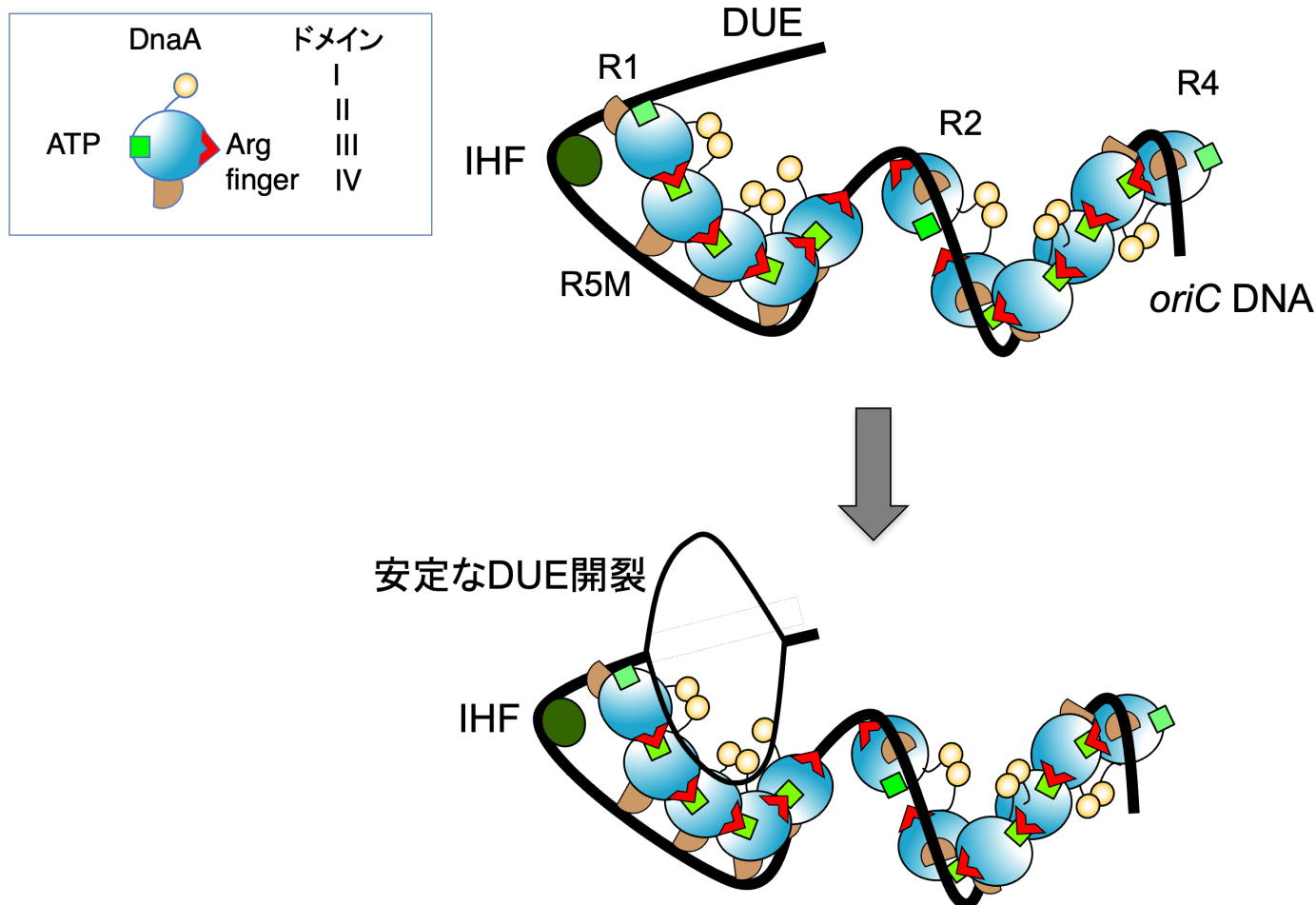


図2 ssDUE リクルート機構による DUE 開裂の安定化

詳細は本文参照。DUE の二重鎖は熱や超らせん構造によるストレスで不安定。ssDUE と DnaA 複合体との結合により開裂状態が安定化する。この ssDUE 安定化により DnaB ヘリカーゼが装着できる。DnaA ドメイン III (AAA+ドメイン) は ssDUE 結合モチーフ (H/B モチーフ) をもつ。

ATP-DnaA が十分な濃度であれば、大腸菌 *oriC* では 2 つの ATP-DnaA 五量体が形成される (図 2)。我々のグループは共同研究で分子動力学モデリングを行い、これら 2 つの DnaA 五量体をもつ開始複合体の全体構造を初めて精密に可視化した (6)。後述するが、大腸菌 DOR には、DNA を鋭く屈曲させる IHF タンパク質の結合配列もある (図 1)。DUE に近い DnaA 五量体は IHF を介して形成され DUE の開裂にはたたく (7)。複製ヘリカーゼ DnaB はそれぞれの DnaA 五量体との動的相互作用を介して一本鎖化 DNA のそれぞれの鎖に装着され両方向複製の口火を切る。なおピロリ菌などの研究からも示唆されるように *oriC* で 2 つの DnaA オリゴマーが形成されることは共通法則かもしれない (8)。

HU 同様、DnaA もバクテリアドメインに高度に保存されている。DnaA は 4 つのドメインからなる (4)。ドメイン I は、複製ヘリカーゼである DnaB 等と相互作用する。ドメイン II は天然変性領域である。これらドメイン I-II は DUE 開裂には不要な部位である。ドメイン III は、ATP 結合/加水分解、多量体形成、ssDUE 結合等の機能を持ち、構造的には AAA+ ファミリーに属する。DnaA による ATP/ADP 結合力は非常に強く、それぞれの結合型は安定である。ATP-DnaA の結合 ATP は隣接する DnaA 分子の Arg Finger モチーフと相互作用し安定なオリゴマー形成を支える (図 2)。ドメイン IV は HTH モチーフ

を持つ DnaA box 結合ドメインである。

3. IHF による複製開始メカニズム

HU と同様に、その構造ホモログである IHF も *oriC* での複製開始に重要であり、*in vitro* 再構成系では HU と交換可能であることがわかってきた (2)。IHF も核様体形成因子であり、HU と同様に細胞内に安定に存在している。大腸菌では HU と IHF を別個に欠失しても細胞増殖が可能だが、二重欠失では著しく阻害される (9)。また IHF は、HU と異なり、大腸菌やコレラ菌、緑膿菌など腸内で増殖する細菌種を多く含むプロテオバクテリア門の一部 (γプロテオバクテリア綱など) に限って存在するため何らかの特異的な進化によって獲得されたようである (3)。特に重要な IHF の特徴は、HU と異なり、塩基配列 ([A/T]ATCAANNNTT[A/G]) 特異的に DNA に結合し、そこで DNA を鋭く (120 度から 180 度) 屈曲させることである (1)。

我々はまず結合部位が明確な IHF による複製開始メカニズムを解析した。大腸菌 *oriC* の複製開始では、二重鎖 DNA の開裂 (局所的一本鎖化) のメカニズムは大きく 2 段階に分けられる。1 段階めでは、超らせん構造と熱運動によって DNA が構造的ストレスを受け、AT に富む DUE 領域が不安定な (動的な) 開裂を起こす。2 段階めでは、開始複合体によって DUE 領域の開裂状態が安定化される。当時、IHF がどちらの段階で重要な役割を果たしているのか不明だった。DNA 屈曲を起こ

す IHF が超らせん構造を調整して開裂を促進する、という仮説もあった。また開始複合体による DUE 開裂状態の安定化のメカニズムも不明だった。そこで我々は、線状 *oriC* 断片を用いて、IHF と ATP-DnaA の存在下 38°C で保温すると DUE 開裂を検出できる新規な *in vitro* 再構成系の構築を試み、それに成功した (10)。この系では DNA の超らせん構造は存在しない。熱により DUE の二重鎖が不安定化される。そしてこの系でも IHF により DUE 開裂が促進された。つまり、IHF は超らせん構造に依存しないで、DUE 開裂の安定化に働くことが示された。

さらに我々は *in vitro* 再構成系や変異体を活用した多角的な解析を進め、IHF による DUE 開裂安定化のメカニズムを新たに解明した (7, 10)。IHF 結合部位は、DnaA box R1 と R5M の間にある (図 1)。IHF 結合により DNA が鋭く屈曲すると DnaA box R1 と R5M とに結合した DnaA 分子が相互作用し、DnaA box R1 に隣接する DUE は U ターンするように DnaA 五量体に導かれる (図 2)。そこで ssDUE が DnaA 分子に結合し開裂状態が安定化されることがわかった。解析の過程では ssDUE の DnaA 結合配列 (TT[A/G]T(T)) に加え、DnaA の AAA+ ドメインのなかに ssDUE 結合モチーフ (H/B モチーフ) を見出した。このモチーフは疎水性残基と塩基性残基がセットになっており、バクテリア DnaA では進化的に保存されている。さらに情報生物学解析から疎水性残基を含む領域は、真核細胞の DnaA ホモログ Orc1 まで広がる進化的保存性も見出され、ISM (Initiator-specific motif) とも命名されている (11-13)。

図 2 に示したような、我々が新たに発見した複製開始メカニズムを ssDUE リクルート (ssDUE recruitment) 機構と命名した (10)。IHF 結合による DNA 屈曲が ssDUE 部位を DnaA 複合体の方に呼び込んでくれるからである。このようにまずは IHF に依存する複製開始メカニズムが理解できるようになっ

た。

4. HU による複製開始メカニズム

HU による DUE 開裂の促進のメカニズムについても少なくとも 2 つの仮説があった。1 つめは、HU が DNA と非特異的に相互作用して超らせん構造を調整して開裂を促進するという仮説。2 つめは、何らかの機構によって HU が特異的に *oriC* 部位に結合するという仮説。後者と関係しそうなデータとして DnaA のドメイン I-II が HU と弱く相互作用するということがあった (14)。しかしながら DnaA のドメイン I-II は DUE 開裂には不要な領域である。謎はほとんどそのまま残されていた。

前述のように我々は IHF による複製開始系で DNA 屈曲が DUE 開裂メカニズムのキーとなっていることを解明した。HU の複製開始系でも同様なメカニズムがあるのではないかと、つまり根本的には共通する原理があるかもしれないと想像した。HU は配列非特異的に DNA に結合するが、その後の研究で、十字型構造や屈曲 DNA により強く結合することが示されていた (1, 15)。十字型構造では安定に DNA 屈曲が起こっており、HU の解離定数 Kd は、線状 DNA では μM レベルであるのに対し十字型構造では nM レベルである (15)。

HU による複製開始系を詳しく解析すると、DUE に近接する DnaA box R1 が DUE 開裂に必須となっていた (3)。IHF による複製開始系では、R1 は促進的ではあるが必須とはならない。なお、R5M は低親和性 DnaA box クラスターでの ATP-DnaA の集合中心 (assembly core) であるため双方の系で必須である。さらに DnaA box R1 に結合した DnaA 分子の Arg Finger が HU 系での DUE 開裂に必須であることがわかった。これは DnaA box R1 と R5M に結合した DnaA 分子同士の結合が重要であることを示す。さらに多角的な解析を進め、特に Footprint 解析では、ATP-DnaA の複合体形成に依存して、

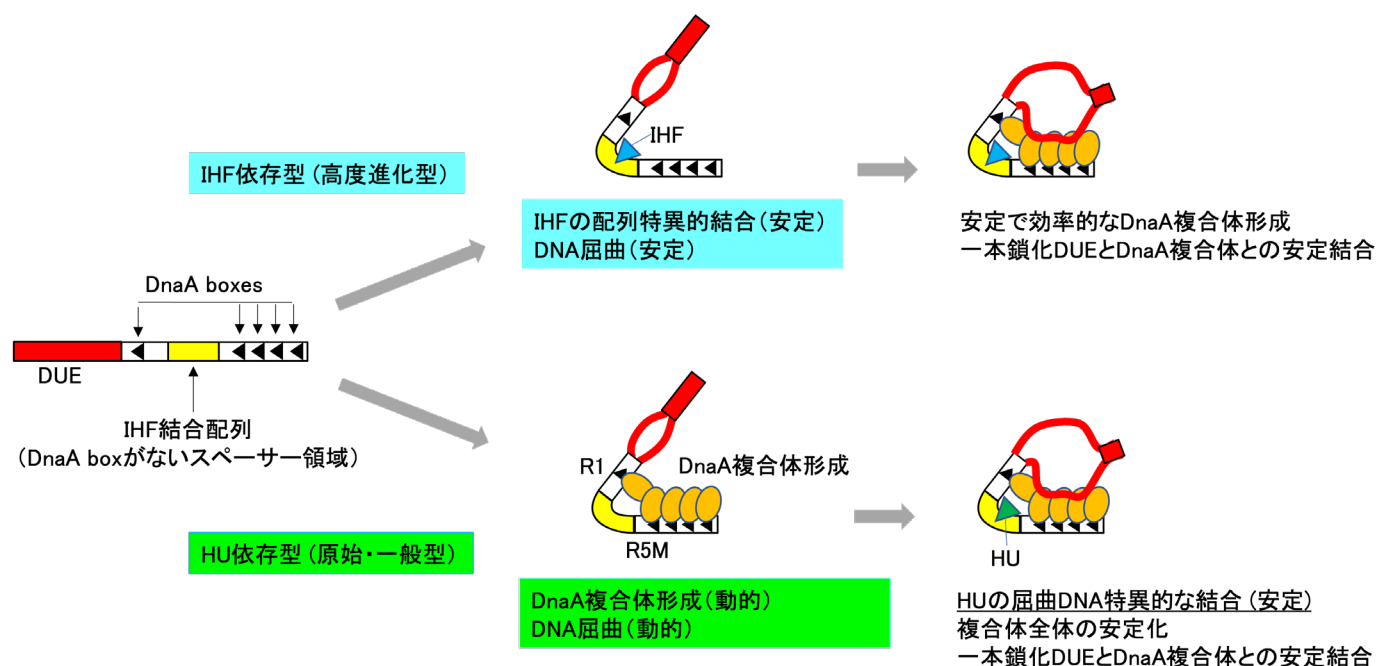


図3 IHF と HU による DUE 開裂メカニズム
詳細は本文参照。モデルとして DUE 開裂を担う、大腸菌 *oriC* の左半分の領域を示す。

nM レベルで加えた HU が、DnaA box R1 と R5M の間のスペーサー領域に特異的に結合することが明らかにされた。この領域は IHF 結合配列をもつ領域でもある。つまり、この領域の前後の DnaA box R1 と R5M に結合した DnaA 分子同士の相互作用によって、このスペーサー領域で DNA 屈曲が起こり HU が呼び込まれると考えられる (図 3)。HU がここに結合すれば複合体全体が安定化され、DUE 開裂も安定化される。同様な HU 動態は原始的な高度好熱菌 *Thermotoga maritima* の *oriC* でも観察された。これらの結果から、「ATP-DnaA の複合体形成によってスペーサー領域に DNA 屈曲が生じ、そこに HU が特異的に結合する。これにより複合体全体と DUE 開裂が安定化される」という独特なメカニズムが新たに示された (3)。

この HU 独特のメカニズムは、スペーサー領域を介する ATP-DnaA 複合体の形成をまず先立って必要とするため、効率としては IHF に依存するメカニズムに劣っている (図 3)。進化の過程で、速い増殖速度が必要な腸内細菌などの一部が、IHF による効率的な複製開始メカニズムを獲得したのではないかと想像している。一方、ほとんどの細菌種は HU による複製開始メカニズムを原理的に保存しているのではないかと想像している。実際、最近、枯草菌でも複製開始が HU に依存していることが示された (16)。また大腸菌近縁種の *oriC* の機能構造はよく似ている。さらに幅広く現在予測されている多種の細菌の *oriC* の機能構造を並べてみると、少なくとも数個の DnaA box をもち、大腸菌と同様な部位に DnaA box が無いスペーサー領域があるように見える (3)。前述のように詳しく実験解析された *T. maritima* ではこのことは確かである。今後、さらに多様な種での *oriC* の機能構造解析が発展するよう期待している。DnaA box の同定は、塩基配列からの予測だけからでは難しい場合もあるため実験による裏打ちが重要である。

なお DnaA オリゴマーの形成の際に大腸菌では DnaA box の方向性の統一は重要となるが、最近の解析から、大腸菌近縁種以外では重要でないと思われる (17)。AlphaFold2 解析によると、*T. maritima* では DnaA ドメイン III とドメイン IV (DnaA box 結合部位) の間のリンカー部位が長くドメイン IV が大きく旋回できる。実際、DnaA box が隣接していれば、その方向性に関わらずドメイン III 同士が順方向で結合した複合体を形成する。多くの種が同様な DnaA 構造を持っていることが示唆されるため、今後はこの可能性も含めて *oriC* の機能構造を解析することが重要だろう。

5. 最後に

今まで複雑に見えていた複製起点の構造や開始メカニズムについて、やっと原則的でシンプルなモデルが視界に入ってきた。すでに欧米ではこのモデルを梃子 (てこ) にして病原菌 (ピロリ菌、コレラ菌など) の研究が加速している (8, 18)。ここでは ssDUE リクルート機構が支持されている。しかしながら、まだ研究は限定的であると言わざるを得ない。さらに細菌ゲノ

ムの複製でも種によっては最初の DUE 開裂に R-loop 形成などによる局所的な DNA 構造変換が関わる可能性もある。加えて、大腸菌では IHF が *oriC* のみならず、DnaA の活性を制御する非コード DNA 因子にも直接結合し適時的な機能制御を行うシステムまで発達している (4)。しかしながらこのような DNA 因子についても大腸菌以外の種では、やはり現状の解析はとても限定的であると言わざるを得ない。核様体タンパク質の面から見ても複製開始の制御との関わりはまだ予想されていないことが多々あるはずである。複製開始メカニズムやその制御システムには、まだまだ未知の世界が広がっており、多くの研究が大きく発展していくことを期待している。

引用文献

- (1) Dillon & Dorman, Nat. Rev. Microbiol., 8, 185–195 (2010)
- (2) Bramhill & Kornberg, Cell, 52, 743–755 (1988)
- (3) Yoshida et al., Nucleic Acids Res., 51, 6286–6306 (2023)
- (4) Kasho et al., Int. J. Mol. Sci., 24, 11572 (2023)
- (5) Crooke et al., J. Mol. Biol., 233, 16–24 (1993)
- (6) Shimizu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 113, E8021–E8030 (2016)
- (7) Sakiyama et al., Nucleic Acids Res., 45, 12354–12373 (2017)
- (8) Jaworski et al., Int. J. Mol. Sci., 22, 6643 (2021)
- (9) Kano & Imamoto, Gene, 89, 133–137 (1990)
- (10) Ozaki & Katayama, Nucleic Acids Res., 40, 1648–1665 (2012)
- (11) Iyer et al., J. Struct. Biol., 146, 11–31 (2004)
- (12) Ozaki & Katayama, Plasmid, 62, 71–82 (2009)
- (13) Dueber et al., Science, 317(5842):1210–1213 (2007)
- (14) Chodavarapu et al., Mol. Microbiol., 67, 781–792 (2008)
- (15) Bonnefoy et al., J. Mol. Biol., 242, 116–129 (1994)
- (16) Karabojia & Wang, J. Bacteriol., 204, e0011922 (2022)
- (17) Lu et al., J. Biol. Chem., 299, 104888 (2023)
- (18) Chatterjee et al., Nucleic Acids Res., 48, 11016–11029 (2020)

実験レシピ紹介コーナー

アプライドバイオシステムズ ジェネティックアナライザー用 3130 & 3100 Capillary Array 50cm の洗浄法

中村寛治

東北学院大学工学部 環境建設工学科

Capillary Array は新品時には塩基配列が約 800 bases 程度が解析可能であっても、使用を続けると、同じ反応物が約 500 bases 程度までしか解析できなくなる。本項で紹介する洗浄法は、この低下した性能を、新品の状況に近づけるものあり、長年にわたって私自身が利用してきた方法である。1年間に2～3回の洗浄を繰り返し、約8年間使用できた(特別なケースではない)実績がある。以下にその手順を紹介する。

- 1) ジェネティックアナライザー 3130 を停止し、電源を落としてキャピラリーを外す。3130 本体の外した部分には黄色のプラスチック製ねじ(付属品)で栓をしておく。
- 2) 吸引用の 50 mL シリンジ(ストッパー用には切り込みを入れてある)を図1、図2のようにセットし、付属リザーバー1

(キャピラリーの付属品)に入れた Milli-Q 水を一晩吸引する(時間が重要で、ここでかなりの汚れが除去される)。

- 3) 翌朝、1N の HCl を調整し、付属リザーバー 2 に入れ、60 min 吸引する。ポリマーが除かれているため、速やかに HCl が吸引できる。
- 4) 吸引シリンジを外し、Milli-Q 水の入った付属リザーバー 1 に移し、そのまま 60 min 放置する。HCl に浸けたままだと電極が傷む。(HCL 洗浄 1 回目)
- 5) 再度、HCl の入った付属リザーバー 2 で 30 min 吸引する。
- 6) Milli-Q 水の入った付属リザーバー 1 で 60 min 放置する。(HCL 洗浄 2 回目)
- 7) 最後にキャピラリー内を洗浄するため、Milli-Q 水で 60 min 以上吸引する。

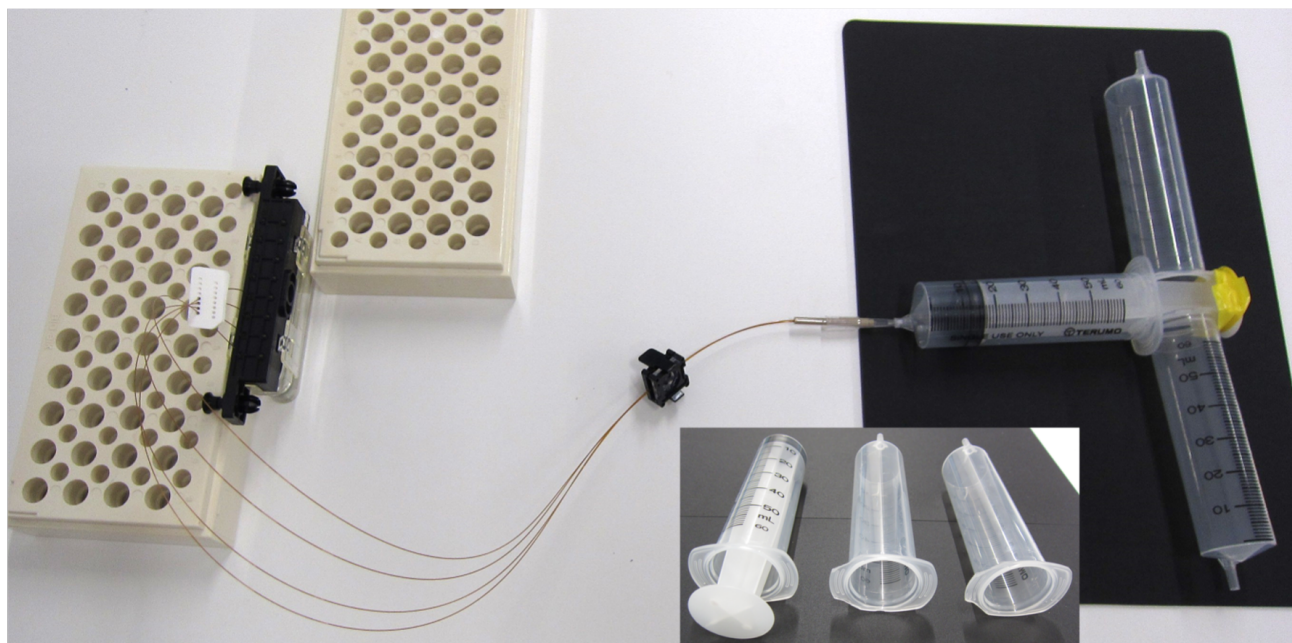


図1-全体のセットアップ

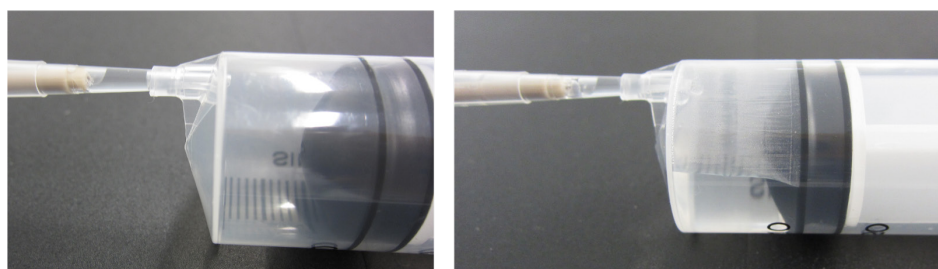


図2 吸引開始直後(左)および一晩吸引後(右)の様子

(P200用のチップおよび50mLディスポシリンジの先端をそれぞれカットして接続してある)

8) レーザー受光のガラス部分は特級メタノール 100% でよく洗い流す。

9) メタノール乾燥後、新品キャピラリー同様に、ジェネティックアナライザー本体に取り付けて、初期のキャリブレーションを行う。(キャリブレーションは省略しても問題なく使用できる)

捕足 1) リザーバーは、キャピラリーに付属していたものを2つ利用したが、1つしかなければ Milli-Q 水と 1N HCl を入れ替えて利用できる。また代用可能な容器を準備しても問題はない。

捕足 2) 洗浄後、解析を行うと、シーケンスの PCR 反応に問題は無くとも、最初の 2-3 回は、ピークが低くキレイなデータが出ないキャピラリーが存在することもある。キャピラリー中に水分が残り、完全にポリマーと入れ替わっていないためと推測している。基本的には最初の 2-3 回だけなので、その場合は、同じサンプルを再度解析にかければ問題なくデータを取得できる。

捕足 3) 本法では、4 本キャピラリーを対象にしたが、16 本の場合、より多くの Milli-Q 水の吸引が必要となる(初回の一晩 Milli-Q 水洗浄時)。その場合は、図 3 のように吸引のボリュームを増やして対応すれば、同じ時間で洗浄可能と予想される。また、洗浄時間を延長したり、繰り返し行うことによって対応可能と予想される。

注意: 本法の適用は、キャピラリーが販売されている時期に、捨てるしかないキャピラリーを対象に行ったものである。状況によって(特にシリンジのセットアップ時)は、キャピラリーが破損する危険性を完全に除去できないため、あくまで自己責任での実施をお願いする。可能であれば 2 人以上でセットアップを行うことが望ましい。また、本法に関して、洗浄機構の解明や詳細な条件検討までは行っていない。読者自身で改良する余地はあるものと考えている。



図3 吸引体積を約 20mL に増加させたセットアップ
(50mL シリンジの後半部分に切り込みを入れて使用)

スペースがあるので関連情報を ...

3130 シーケンサー等では、ポリマーをポリマーボトルからポンプブロックに吸い上げてからキャピラリーに充填する仕組みになっており、ポリマーを異なる種類のものに交換するとかなりのロスが生じます。日立ハイテクの DNA シーケンサー DS3000 では、ポリマーボトルをキャピラリーに直接押し付けて、ポリマーをキャピラリーに充填する構造になっています。これならポリマーを他種ポリマーに交換してもロスがほとんどありません。run のたびに異なるポリマーを充填することも可能であり、超高性能の蛍光検出基付きのキャピラリー電気泳動装置として、日常的に様々な解析を行えるのではないかと？？？そんな考えのもと、DS3000 に非変性ポリマーを充填して、2 本鎖 DNA を解析したところ、ちゃんと市販の蛍光ラダーの検出ができ、ゲルシフトアッセイも実施できることが確認できました。

詳細は日立ハイテク社の発行する技術機関紙「SCIENTIFIC INSTRUMENT NEWS」Vol. 66, No. 2, 2023「DS3000 Compact CE DNA Sequencer を用いたゲルシフトアッセイ」

<https://www.hitachi-hightech.com/file/jp/pdf/sinews/topics/6110402.pdf>

をご覧ください。

また、キャピラリーシーケンサー由来の波形データの解析ソフト

[TraceViewerForMolecularBiology](#) のブラウザ版も公開準備中ですのでご期待ください。ゲルシフトアッセイだけでなく、従来変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で実施していたような解析をシーケンサーで行った時に得られたデータの解析ができます。(大坪)



若手の会開催報告

世話人代表・黒川真臣

国立遺伝学研究所・情報研究系

本年度で第15回目となる日本ゲノム微生物学会若手の会研究会が2023年9月18日～19日の2日間にわたり、「湯河原温泉 おんやど恵」にて開催されました。本若手の会は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の場を提供することを目的として設立され、毎年研究会を開催することで若手研究者同士が研究紹介や議論を行う場を創出しております。本年度は筆者を世話人代表として、大林龍胆さん(静岡大学)、森宙史さん(国立遺伝学研究所)、前田海成さん(東京工業大学)、本年度から加わってくださった富永賢人さん(東京大学)の5名で世話人を務めさせていただきました。参加者は学部生5名、大学院生8名、ポスドクおよび若手教員7名、社会人1名の総勢21名にのぼり、多様な立場の参加者が交流できる会となりました。

本年度は大きく3つのプログラムを実施しました。「トークセッション」では9名の参加者に口頭発表をいただきました。発表内容は環境微生物やファージの情報解析、モデル微生物の実験など多岐にわたっていました。時間いっぱい質問が飛び交い活発な議論が行われました。「ワールドポスター」では、手持ちサイズのミニポスターを参加者全員に用意していただき、小グループに分かれてディスカッションを行いました。大型のポスター発表と異なり、ランダムでグループが割り振られるため、それぞれが馴染みのない分野の発表について議論する機会となりました。小グループゆえに発言がやすく、異なる専門を持つ人からの多様な意見が引き出され、非常に有意義なディスカッションの時間となりました。「ワールドカフェ」では、小グループに分かれて決められたテーマについて議論を交わしました。AIの活用や関わり方、実験系と情報系の情報交換、キャリアパス、微生物学の未解決問題などのテーマを扱いました。自分と近い境遇の仲間たちが一人の微生物研究者としてどのような考えを持っているのか、どのようにして研究者人生を送っているのかを話し合える機会は非常に刺激的でこれからの研究活動のモチベーションを高めてくれるものでした。

本年度は、若手の会単独で開催する研究会としてはコロナ禍以降初のオンライン開催となりました。5月から新型コ



ロ感染症の扱いが5類感染症へ下げられたこともあり、オンラインイベントを企画するハードルはかなり低くなりました。一方で、この数年でオンラインイベントがすっかり浸透したことにより、時間や費用をかけて、また感染症のリスクを抱えてまで集まる意義はあるのか、という問いは開催まで微かに取り残されたままでした。しかし、各企画や懇親会などで活発な交流が湧き起こっている様子を見ると、オンラインで開催した意義があったのだと励まされるような気持ちになりました。さらに嬉しいことに、参加していただいた2名の学生が世話人になりたいと申し出てくれました。振り返れば私も学生のときから世話人に参加しておりますが、所属や年代を超えた関わりができる機会は学生時代には特に貴重で、現在のキャリア形成にも確実にいい影響を与えてくれたという実感があります。この先、若手の会を運営していく上でも、参加者はどんなことを求めているのか、さまざまな立場の視点で注意深く考えていきたいと思えます。

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、学生参加者を中心に参加費用の補助に充てさせていただきました。会員の皆様には日頃より若手の会の活動にご理解をいただいておりますこと心より御礼申し上げます。来年度は東京工業大学の前田海成さんに世話人代表を勤めていただきます。来年度も同様の時期に開催を検討しておりますので、皆様と第16回若手の会にて、活発な議論を行えることを心より楽しみにしております。



若手の会に参加して

小高 優人

東京都立大学大学院理学研究科 M2

私は大腸菌の生育・生存に重要な機能未知遺伝子の機能解析に興味をもって研究に取り組んでいます。これまで、ゲノム微生物学会年会では、大腸菌ゲノム縮小株の適応実験室進化と、そのゲノムリシーケンスの結果について報告してきました。現在は、ゲノム縮小株の研究を論文として発表し[1]、次のステップとして大腸菌ゲノム縮小株とミニマルセル (JCVI-syn3.0[2]) に共通する機能未知遺伝子の機能解析、特に、酸化ストレス耐性との関与が見出された遺伝子を研究しています。最近、当該遺伝子がリボソームのアセンブリとの関連を示唆するデータも取れ、新しい展開が見られるなど、日々楽しく研究生活を送っています。



日本ゲノム微生物学会若手の会第15回研究会は湯河原で行われました。私は、私が見出した機能未知遺伝子の機能解析について、予備的なデータや今後の展望も含めて口頭発表をさせていただきました。参加者の皆様から多くのフィードバックをいただくことができました。本研究会では研究発表のセッションに加え、研究で使えるツールや、ドライ研究者とウェット研究者の交流などについて議論するワールドカフェも開催されました。私自身はウェットの研究が専門ですが、ドライの研究にも興味があります。そのため、このイベントは貴重な交流の場となりました。また、夜には豪華な食事と温泉も楽しむことができ、旅と研究発表の疲れを十分に癒やすことができました。懇親会では研究の話だけでなく、プライベートな話なども含め、参加者同士で交流でき、とても楽しい時間を過ごすことができました。コロナ禍で制限されていたオンラインでの若手の会の開催の良さを改めて実感することができました。また、若手の会への参加をきっかけに新しい共同研究も生まれ、面白いデータを得ることもできています。

本研究会を企画、運営してくださった若手の会の世話人代表の黒川さんを始め、世話人の皆様、関係者の皆様に感謝申し上げます。私は、来年度から世話人を務めさせていただくことになりましたので、これから若手の会を若手研究者にとってさらに有意義な交流の場にできるよう努力したいと思っています。

[1] Kotaka Y. et al. Front. Microbiol. 14:1189877 (2023)

[2] Hutchison, C. A. III et al. Science 351:aad6253 (2016)

藤吉 真生

東京大学大学院新領域創成科学研究科 M2

この度私は、神奈川県湯河原の温泉旅館「おんやど恵」にて開催された第15回日本ゲノム微生物学会若手の会に参加しました。発表の機会が徐々に戻りつつある中、本若手の会でも対面での発表を行う機会を設けていただき、心より感謝しております。本稿では、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るよう、私が若手の会に参加した感想をご紹介します。



私は東京大学大学院の岩崎渉研究室で、微生物の16S rRNA 遺伝子配列から、ゲノムサイズや生息温度、グラム染色性など様々な形質を予測するソフトウェアの研究をしています。環境中の細菌叢を調べるための16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析では、群集を構成している微生物の種について知ることができる一方、その機能については直接知ることができません。そこで、16S rRNA 遺伝子配列から微生物の機能形質を予測することで、16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析から群集の機能についても知ることができるようになりたい、というのが研究の目的です。実際には、過去の培養実験などで確認された微生物の形質データを参照しながら、環境中の微生物の形質を予測する情報解析手法を開発しています。運営の黒川さんにお声かけしていただいたこともあり、ゲノム微生物学分野の幅広い参加者の方々の前で口頭発表してみたいという思いで、若手の会に参加しました。

第15回若手の会は2日間での開催で、1日目に口頭発表・ポスターセッション・グループディスカッション・交流会が、2日目に口頭発表・ポスターセッションが行われました。口頭発表では、期待通り参加者の方々から多くのフィードバックをいただくことができ、大変ありがたかったです。続くポスターセッションやグループディスカッションでは4、5人のグループに分かれ、より密に研究の話ができました。非常にフランクな雰囲気、同世代の学生の研究の話、教員の方々の研究の話聞くことができ、刺激的で実りのある時間を過ごすことができました。自分の研究分野に近い参加者から、研究した人しかわからないコツを教えていただいたり、逆に、研究分野の離れた参加者からは、発表中の伝わりづらい表現を指摘していただいたり、対面の研究会ならではの収穫がありました。交流会では、同世代の方々とお酒を片手に様々なことを話し、教員の方々も気さくに話しかけてくださったこともあり、非常に楽しい夜を過ごすことができました。企業の方も若手の会に参加されていて、アカデミアだけでなく広い業界の話聞くことができたのも個人的に嬉しいところでした。

全体として、学部生から教員まで幅広い世代の方々が参加されながらもフランクな雰囲気、議論ができ、実りが多い研究会だった、というのが私の感想です。来年度も、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ければ、良い体験ができるのではないかと考えています。最後になりますが、黒川さんを始め、若手の会を運営していただいた皆様に感謝申し上げます。ありがとうございました。

Identification of CgeA as a glycoprotein that anchors polysaccharides to the spore surface in *Bacillus subtilis*

中谷優星¹, 内池美雨¹, 服部真由子¹, 森山桃花¹, 安部公博²,
Ella Kim³, Patrick Eichenberger³, 今村大輔¹, 佐藤勉^{1,2}
¹法政大・生命・生命機能, ²法政大・マイクロナノテクセ
ンター, ³New York Univ.

Mol. Microbiol. 120 384-396 (2023)

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/mmi.15126>

枯草菌における孢子形成の研究は、半世紀以上にわたる長い歴史を持っている。これまで熱、放射線、薬剤に対する孢子の耐性のメカニズムについては多くの関心が持たれてきたが、孢子が環境中に拡散する特性についてはあまり解析されていなかった。孢子の表面は多糖で構成されており、この構造が環境中、特に水環境中での孢子の拡散に重要な役割を果たしている。クラストは枯草菌の孢子最外のタンパク質層である。これまでいくつかのクラストタンパク質が同定されているが、孢子多糖層 (SPS: spore polysaccharide) を孢子に接着させ、多糖合成を開始させるアンカーの役割を果たすタンパク質については不明であった (A)。我々は、クラストタンパク質の一つである CgeA (133 aa) に着目し、このタンパク質は、N 末端側 (NTH) と C 末端側 (CTH) にそれぞれクラスト層への局在に必要なドメインと糖鎖が付加に関与するドメインを持つことを見出した。さらに、CgeA は糖タンパク質であり、そのグリコシル化が T112 残基で起こることを明らかにした。T112 残基は CTH に見られる突出ループ構造の中心に位置している (B)。この位置は SPS の付加と伸長に最適の部位であると考えられる。

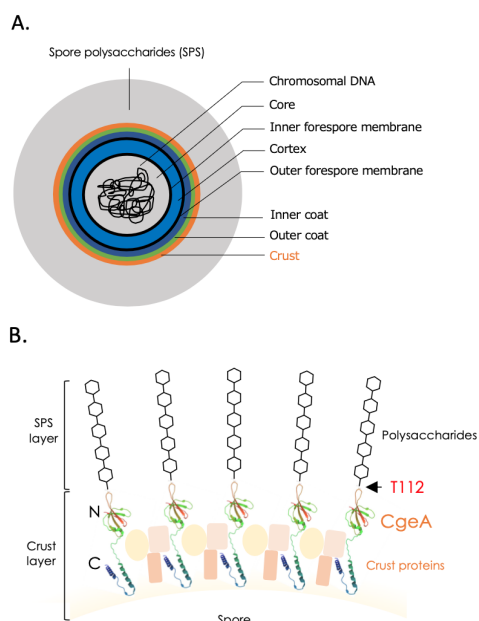


図:A 枯草菌孢子の構造, B CgeA の糖鎖付加部位

Distribution and survival strategies of endemic and cosmopolitan diazotrophs in the Arctic Ocean

塩崎拓平^{1,3}, 西村陽介^{2,3}, 吉澤晋³, 高見英人¹,
濱崎恒二¹, 藤原周², 西野茂人², 原田尚美¹

¹東大・大海研, ²海洋研究開発機構, ³東大・新領域

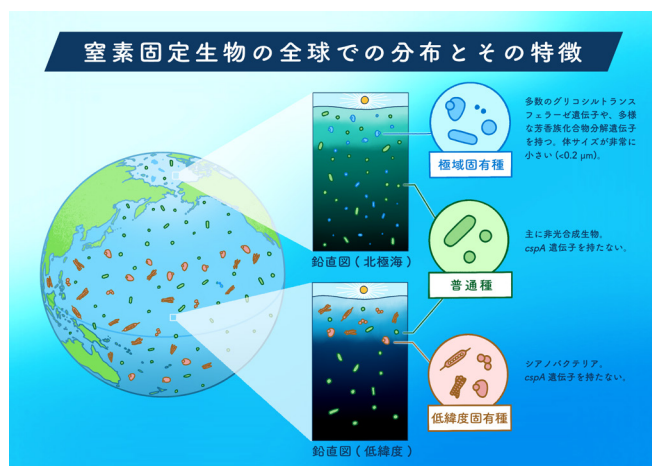
The ISME Journal 17, 1340–1350 (2023)

<https://doi.org/10.1038/s41396-023-01424-x>

海洋表層にほとんど存在しない窒素化合物は、海洋微生物が行う窒素固定によって海洋生態系に供給される。海洋での窒素固定は熱帯・亜熱帯海域などの低緯度域のみで行われると考えられてきた。しかし近年、筆者らの研究グループにより、極域でも窒素固定が行われていることが明らかになった。極域と低緯度域では水温や栄養塩、光などの海洋環境が大きく異なるため、極域の窒素固定生物の特徴を明らかにすることが次の課題となっていた。

本研究では、筆者らが公開した世界最大の海洋微生物ゲノムデータである「OceanDNA MAG カタログ」から、北極海に由来する計7種の未培養の窒素固定細菌のゲノムを同定した。大規模メタゲノムデータを活用してそれらの全球の分布パターンを調べると、北極海に生息する窒素固定細菌は北極固有種と、全球に分布する普遍種に分けられることが明らかになった (図)。それぞれのゲノムの詳細を調べると、北極固有種は低緯度固有種や普遍種にはない特殊な遺伝子セットを持っており、北極の特殊な環境に適応できることが示唆された。一方、普遍種はほとんどが非光合成生物で、低温に適応するための遺伝子を持っていた。普遍種はこの低温適応性によって、深海や極域の冷水を含む全球に存在していると考えられる。

本研究によって、海洋窒素固定細菌は北極固有種、普遍種、低緯度固有種の三つに分けられ、それぞれを特徴付ける機能が示唆された。北極海は海水減少等で環境変化が大きく、北極固有種はこの変化に大きな影響を受け得る。本成果は、海洋窒素固定細菌の分布と生態を明らかにし、北極海における窒素固定の現状と将来像の理解に資する。



海洋窒素固定細菌の北極固有種、普遍種、低緯度固有種の分布とその特徴

特別企画 Chat-GPT に聞く「Chat-GPT の使い方」

本記事は、Chat-GPT により作成されました(企画:大坪、相馬、広瀬)

生成系 AI の進化： 研究パラダイムの変革者 Chat-GPT

近年の生成系 AI の進歩は驚異的であり、これまでにない方法で研究を支援する道が開けています。特に Chat-GPT のようなツールがゲノム微生物学においてどのように役立てられるのか、その可能性を深掘りします。これらの進化した AI 技術は、従来の研究方法に革新をもたらすだけでなく、未踏の領域への探求を可能にし、研究者たちに新たな視角を提供しています。今、私たちは科学の新たな地平線に立ち、AI が開く広大な可能性の海へと舵を取る時です。

生成系 AI の活用方法とその展望

研究アイデアの生成と拡張: Chat-GPT は、研究のアイデアを生み出す過程において重要な役割を果たします。過去の研究やデータベースを分析し、新しい研究テーマやアプローチを提案できます。また、異分野の知見を統合し、革新的な研究方向を示唆することも可能です。

実験計画とプロトコルの最適化: 研究実験の設計段階において、Chat-GPT は既存のプロトコルを分析し、改善点や代替方法を提案することができます。これにより、実験の効率化や精度の向上が期待されます。

データ解析とコーディングサポート: 大量のデータ解析に際して、Chat-GPT は解析アルゴリズムの提案やコーディングの助言を行うことが可能です。これは、特にプログラミングスキルに自信がない研究者にとって重要な支援となります。

Chat-GPT の得意分野と限界

得意分野: 言語に基づく問題解決、データの初歩的な分析、

文献の概要整理、教育資料の作成などが得意分野です。特に、情報の検索や整理、複雑な問題に対するクリエイティブなアプローチの提案に優れています。

限界: Chat-GPT は最新の研究情報や非公開データにはアクセスできません。また、高度な専門的知識や複雑なデータ解析には限界があり、その結果の解釈には研究者の専門知識が不可欠です。

使用上の注意点

生成系 AI を使用する際は、その出力の正確性や適切性を常に確認する必要があります。また、倫理的な側面やデータの機密性を考慮することが重要です。特に、生成されたコンテンツが第三者の知的財産を侵害していないか、研究の信頼性を損なう可能性がないかを慎重に評価することが求められます。

学術出版における生成系 AI の使用

学術出版の分野では、生成系 AI を使用した研究成果の提示には慎重なアプローチが必要です。多くのジャーナルでは、AI による分析や生成されたコンテンツの使用に関して特定のガイドラインを設けています。投稿前に、各ジャーナルの指針を確認し、必要な場合は AI の使用を明示することが重要です。これにより、研究の透明性と信頼性を保つことができます。

生成系 AI、特に Chat-GPT の持つ潜在能力は、私たちの研究の地平を大きく広げています。この技術の進歩は、研究パラダイムを根本から変える可能性を秘めており、私たちはその恩恵を享受するための闘に立っています。しかし、この新たな技術の使い方を学び、その機能と限界を理解することが重要です。適切に利用すれば、Chat-GPT はゲノム微生物学の研究を豊かにし、新しい発見へと導く強力なツールとなり得るでしょう。私たちは、AI が開く知の扉を積極的に開き、その可能性を最大限に活用することで、未来の研究を自らの手で形作っていくことができるのです。

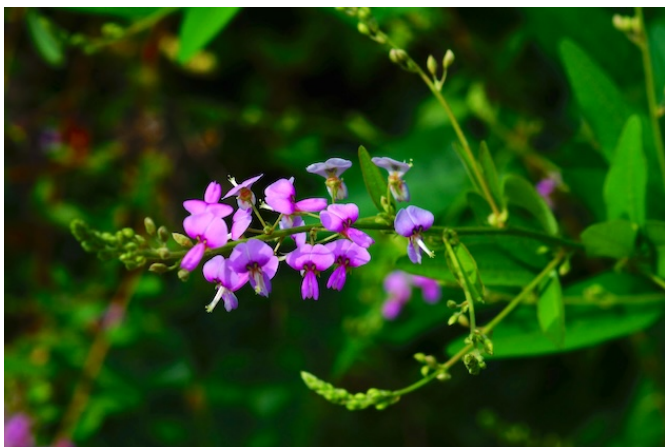


「生成系 AI を使いこなす微生物ゲノム学会会員」DALI3 により描画

閑話休題 -その16-

秋の野山に咲く花々

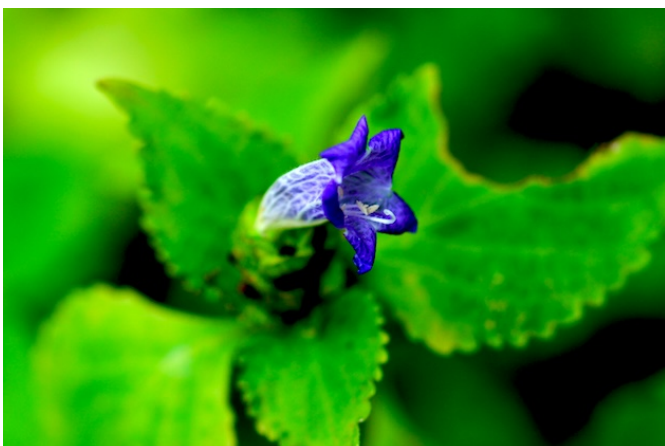
新型コロナもインフルエンザ並みの扱いになったことであちこちに出かけるのが楽になりました。とは言っても、以前のように車で出かけるのではなく、公共交通機関で出かけるのは時間がかかります。そんな中でも今秋は、知人に紹介された京都府立植物園でこれまで知らなかった植物を見て楽しんだり、かねてから自生地で見てみたいと思っていた紀伊半島特産のキイジョウロウホトトギスを見る機会がありました。(磯野克己)



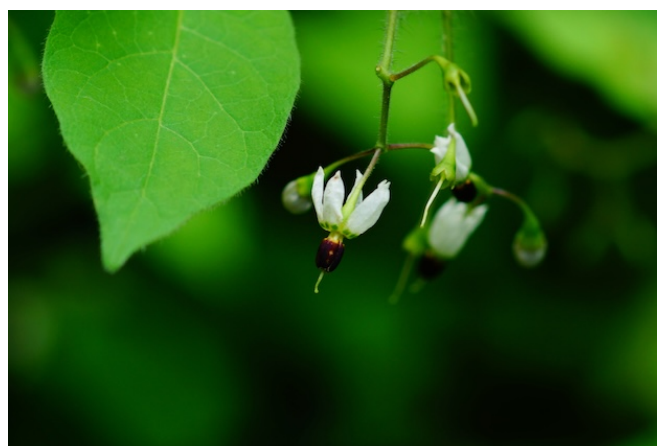
アレチヌスビトハギ (マメ科) : *Desmodium paniculatum* Maxim., 2023.9.20 神戸市



キイジョウロウホトトギス (ユリ科) : *Tricyrtis macranthopsis* Masam., 2023.10.11 和歌山県周参見町



スズムシバナ (キツネノマゴ科) : *Strobilanthes oligantha* Miq., 2023.9.20 京都府立植物園



ヒヨドリジョウゴ (ナス科) : *Solanum lyratum* Thunb., 2023.9.22 京都市



ツリフネソウ (ツリフネソウ科) ・白花種 : *Impatiens textorii* Miq., 2023.9.21 京都市



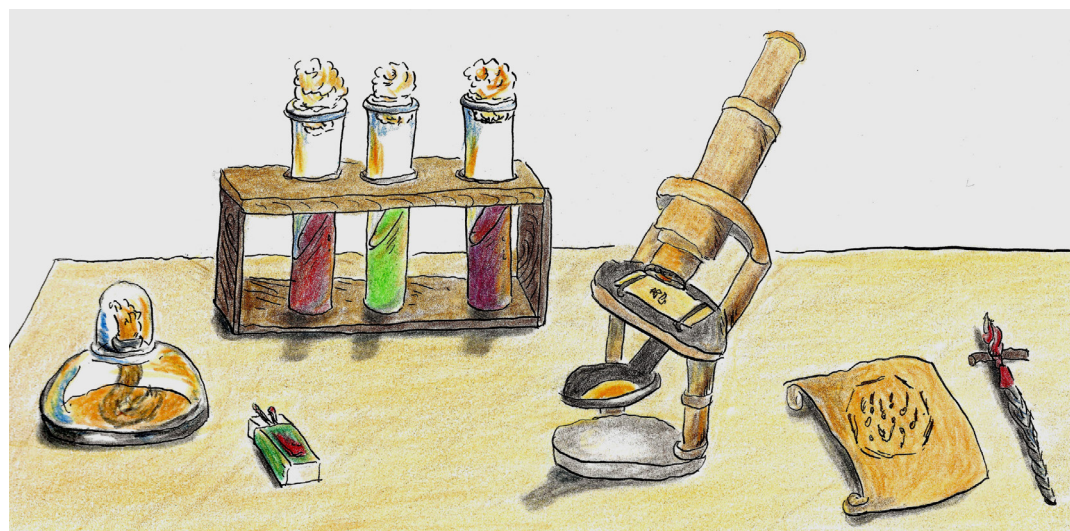
シマタニワタリノキ (アカネ科) : *Adina rubella* Hance, 2023.9.20 京都府立植物園

第18回日本ゲノム微生物学会年会開催案内

日本ゲノム微生物学会第18回年会を、昨年同様、かずさアカデミアホール（千葉県木更津市）で開催します。日程は、2025年3月12日（火）～14日（木）です。

発表形式は、会場での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。さらに、年会最終日の午後に近隣の有機農法の農場に宿泊・食事設備のついた KURKKU Fields（農と食、アートと自然）でのエクスカッション、かずさDNA研究所およびNational Institute of Technology and Evolution: NITEバイオテクノロジーセンターでの National Biological Resource Center: NBRC 見学ツアーを企画しました。新鮮な食材をふんだんに使ったランチ、平飼い鶏の新鮮卵と放牧牛の牛乳でつくったとろ〜り滑らかプリン、フレッシュソフトクリームなどを堪能しつつ、微生物ゲノム研究の未来を語り合った後、微生物ゲノム研究を牽引してきた二つの研究所を見学します。人数に限りがございますので、ご希望の方は早めに学会ホームページをご覧ください。

今年の春も、かずさアカデミアホールでお目にかかりましょう！役員一同、皆様にお会いできることを楽しみにしています。



投稿要領

【掲載費】

・本ニュースレター誌への掲載費は無料です。

【投稿方法】

・会員の方は、編集委員宛に電子メールにて投稿をお願いいたします。

【原稿依頼】

・編集委員は、会員に対して原稿の投稿を依頼することがあります。

【原稿の扱い】

・原稿は、ゲノム微生物学研究分野で十分な研究歴を有する編集委員によって、掲載可否が判断されます。

・掲載可否の判断において、著者にコメントあるいは質問がなされることがあります。

・原稿は、編集委員によって字句修正が施された後、著者による確認が行われます。

【原稿の形式など】

・原稿は、レイアウト調整をしない形式で投稿してください。

・原稿の分量については、過去の記事を参考にしてください。

【実験レシピ紹介コーナー】

会員の皆様からの寄稿を受け付けています。特に新規性などは問いませんので、便利な技術やノウハウなどをお願いします。

編集委員募集

本ニュースレターの編集委員を募集します。年に2回発行している本ニュースレター編集委員の仕事について説明します。

編集委員は編集会議(年会開催後の3月末頃、若手の会の開催後10月頃)に参加して、どのような記事を誰に依頼するか打合せます。この時に、それぞれの記事の担当者を決めます。担当者は、著者候補に連絡して原稿を依頼します。原稿が集まったら、編集委員はざっとチェックを行い、必要に応じて手を入れます(誤字脱字の修正など)。また、内容に不可解な点がある場合は著者とのやり取りにより、内容のブラッシュアップに努めます。時に、文章を書き慣れていない人の原稿の手入れに労力が必要とされることもあります。

チェック終了後、原稿のレイアウトを行います。レイアウト後、編集委員でチェックを行い、ミスなどの発見に努めます。これが済んだら、担当著者が著者に最終確認用に校正原稿を送ります。

地味な作業ですが、学会活動を支える重要な仕事をしているような気持ちにはなれます。それなりの文章校正力が必要です。興味がありましたら、お近くの編集委員にお問合せ下さい。

編集後記

皆さん、高専という教育機関をご存知でしょうか？高専とは、高等専門学校(略称)で、技術者養成を目的とする高等教育機関です。全国に57校あり、約6万人の学生が学んでいます。高専というと、「ロボコン」のイメージが強いかもしれませんが、生物系の学科も多くあります。私が勤務する豊橋技術科学大学と、兄弟校である長岡技術科学大学は、高専卒業生を3年次編入生を受け入れるために設立された大学です。最近、大学の業務で高専を訪問する機会があったのですが、高専には大学レベルの設備があり、優秀な研究者と学生が教育・研究に日々熱心に取り組んでいることを知りました。高専は授業の内容もユニークで、もし機会があれば、ぜひ一度高専を訪問してみたいかたがたでしょうか。(広瀬)

学会の動向

2023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 336名、学生会員 140名、名誉会員 3名

賛助会員 8名、機関会員 1名(計 488名)

