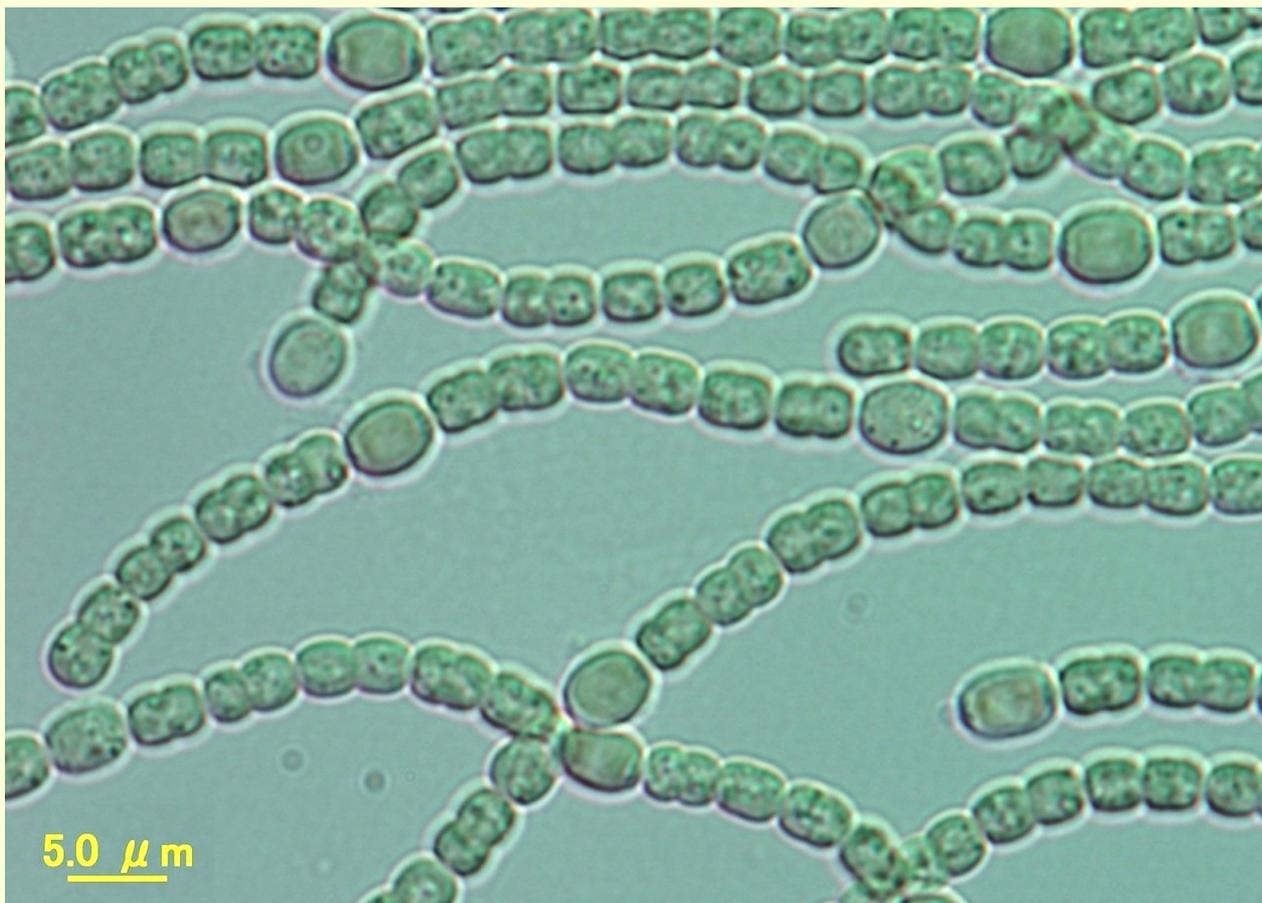


日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

多細胞性シアノバクテリアのヘテロシスト



ヘテロシスト（異質細胞）は、多細胞体制をとるシアノバクテリアが形成する窒素固定に特殊化した分化細胞である。酸素を発生する光合成と嫌気的環境を必要とする窒素固定を同時に行うために、2つの反応の場を空間的に分けているのがヘテロシストである。ヘテロシストでは光合成による酸素発生は停止し、酸素の流入を妨げる外膜が形成され、さらに呼吸活性を高め酸素を積極的に消費することで嫌気的環境を作り出している。ヘテロシストは窒素固定に必要な還元力やATPを光合成により生産することができないため、隣接した栄養細胞から糖を受け取り利用している。一方、窒素固定により作られた窒素化合物は栄養細胞へと送られ、増殖に利用されている。このように、多細胞体の中で2種類の細胞が相互に依存した関係を構築している。形態的にも生理的にも大きく異なる特徴をもつヘテロシストが、栄養細胞からどのように分化するのか、また2種類の細胞間での代謝の統御がいかになされているのか、ゲノム情報をもとにした研究が進められている。

得平 茂樹（中央大学理工学部生命科学科）【写真は *Anabaena* (*Nostoc*) sp. PCC7120 の連なった細胞で、ところどころに見える他の細胞と形態的に異なる細胞がヘテロシストである】

次世代シーケンサー立ち上げから運用まで ～1私立大学の奮闘記～

吉川 博文 (東京農業大学)

2008年9月に、われわれの申請した文部科学省の私立大学助成制度「戦略的研究基盤形成支援事業」が採択され、本学の生物資源ゲノム解析センターが産声を上げた。申請段階で最も苦心した点は、当時候補として考えられた次世代シーケンサーの3機種のをどれを選定するかという作業である。われわれはプロジェクトの主題目として「農学への新領域創成による貢献」を掲げたため、ゲノム解析の対象として家畜や作物といった高等生物を含むことになるが、学内に情報学的な解析技術に長けた人材がいないという状況に鑑み、イルミナ社製のGenome Analyzer (GAII) が最適であると判断した。学内での設置場所の整備を経て機器が納入されたのが2009年2月であり、トレーニングを経て実質的な運用の開始は2009年度からとなった。当該支援事業により、施設の整備を始め、周辺機器の設置や人材確保が可能になったことも大きかったが、最大の利点は高額なランニングコストを補助予算に含めることが出来た点である。

こうした経緯を経て、動物、植物、微生物担当のPD 5名、インフォマティクス担当研究員、事務員の計7名で運用を開始した。テストランを含め、運用開始後2ヶ月ほどは順調に推移し、その威力を目の当たりにした。ショートリードを既知のリファレンス配列に貼り付けることで一定レベルの信頼度を確保する次世代シーケンシングでは、その貼り付け回数(リード深度)が重要なファクターになる。GAIIでは8レーンのフローセルを用いるが、1レーンのみを使用した場合でも3Gb以上のデータ量であり、4 Mb程のバクテリアゲノムでは数百のリード深度が得られることになる。これは十分すぎる値なので、同一レーンに複数のサンプルを載せることが有効利用には必須である。サンプルDNAにタグ配列を付加することで、1レーンにつき最大12サンプルまでシーケンスできるマルチプレックス解析法が開発されており、近頃発売された後継機HiSeq2000では解読量がさらに増進しているため、マルチプレックスを標準的に使用する例が増えるであろう。シーケンスコストは一回のランに150万円程度かかるが、マルチプレックス法により一回のラ

ンで50サンプル程度のゲノムをシーケンスした場合は、1サンプルあたりのコストは5万円程度にまで下がる。また、シーケンスにかかる時間は、100bp両端読みの場合、一回のランにつき10日程度である。

ところで、ショートリードの貼り付けという方法では、リード深度は必然的にサンプルDNAの量に比例する。実際、対数増殖期の枯草菌から抽出したゲノムを用いて解析したところ、予想通り複製起点付近が終点の2倍程度のリード深度を示した(図1)。この原理を利用し、複製起点の実験的証明がなされていないシアノバクテリアで行ったところ、図2のような結果が得られ、複製起点の予測と共に複数コピーあるシアノバクテリアゲノムは同調して複製していないことが推定できた。

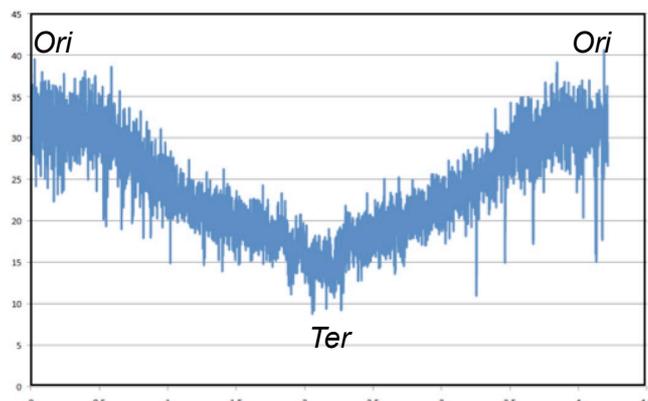


図1. 枯草菌ゲノムのリシーケンス。GAIIから排出されるショートリードを既知のリファレンス配列(横軸)に貼り付けたもの。対数増殖期のゲノムはOri付近のリード深度(縦軸)がTer付近の約2倍になった。

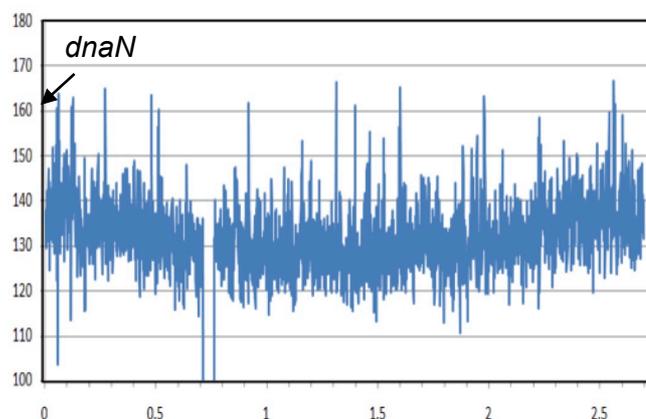


図2. シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC7942株のゲノムリシーケンス。明確なV字型ではないが、両端がやや上がっており、*dnaN*上流に複製起点があることが推察される。

テストランに続き運用開始した直後から3ヶ月ほど、さまざまなトラブルに見舞われた。装置の数カ所に機械的不具合が次々に起こり、修理続きでデータが得られず終いであった。各地のユーザー情報では、こういったケースは珍しくないようであるが、イルミナ社としては終始誠意ある態度で対処して頂けた。その後、復調した装置は10ヶ月以上順調に稼働している。

ランニングコストが上述のように高額であり、サンプル調製の失敗は許されないということから、ライブラリーの作製後、目的生物種のDNAが正しく含まれている効率を従来のキャピラリー法で検定してからランを行なっている。運用し始めての実感、インフォマティクスの重要性である。リファレンスゲノムへのマッピングや *de novo* アセンブルには汎用ソフトがあり、さまざまな改良やバージョンアップがなされており、多少Unixの知識があれば使うことはできるが、個々の解読の目的に沿った詳細な解析をしようとする、現場でのプログラミングは欠かせない。いくつもあるリファレンスが正確でなかったり、リード配列のトリミング等で同じラン結果でもその精度や信頼度が向上したりするため、その都度試行錯誤は必要である。アノテーションに関しても、自動化ソフトはまだ発展途上であり、個々の対応が必須である。このようなインフォマティクスに対応出来る者が使用する側にどうしても必要であり、外注するだけでは運用出来ない。特に、マルチプレックス法では一回のランで50サンプル以上の膨大なデータが排出されるので、われわれは解析を自動化するパイプラインを開発しており、変異点解析や *de novo* アセンブルについてはほぼ自動化しつつある。



図3. 東京農業大学に設置されているイルミナ社製GAIIシーケンサー。右は制御用PC。サーバはDell社のPowerEdgeR900、CPUはXeon X7460 (2.66GHz)を6個、メモリは256GB、ハードディスク容量は48TB。

正確なSNP解析ができるということは、必然的に正確なリファレンス配列が必要となる。さらにバクテリアゲノム自身が高頻度に変異しており、有効変異の同定は意外に簡単ではないということがわかった。変異株を取得する直前の野生型をリシーケンスして、“My野生株”の配列を決めておくと共に、複数の変異株を表現型毎に取得して配列決定を行うといったノウハウが次世代時代に求められる新しい逆遺伝学であろう。例えば、リファレンス配列が4回も改訂されている枯草菌でさえも、国内の複数の研究室の野生株をリシーケンスしたところ、30程度のSNPsとindelsが検出された。蛇足ながら付け加えると、このようなバクテリアゲノムの解析法は、高等生物の解析法にも貴重な情報を与えている。高等生物のゲノム解析も進んでいけば1 SNP、1 In/delが問題になってくる。したがって精度の追求という点ではバクテリアのゲノム研究が先陣を切っており、ユーザーミーティング (2010年4月、プーケット) において筆者は唯一人の原核生物発表者 (メタゲノムを除く) として多くの質問を浴びた。

最後に、多くの微生物研究者は新規ゲノムに対して1本にすることを望むので、*de novo* アセンブルについての試みを紹介する。まずリファレンスゲノムがある枯草菌、シアノバクテリアで検証し、その後、乳酸菌、ビフィズス菌、放線菌など様々な種で新規ゲノム解析を行った。枯草菌等での試行ではコンティグが200程度生成され、最長のコンティグはうまくいけば1Mbまで伸びた。しかし、種によってはコンティグ数が数千程度まで分断されるケースもあった。コンティグはAT/GC Richや反復配列が多いゲノムで短く分断される傾向にある。また、離れ離れになったコンティグ間の位置関係を推測するのはショートリードだけでは容易ではなく、近縁種との比較や、近縁種の情報がない場合にはBACライブラリーのシーケンスを併用するなどの工夫が必要となる。

第3、第4世代のシーケンサーが来年あたりから実用化されようとしている中ではあるが、歴大なシーケンスを処理するインフォマティクスは引き続き重要視され、益々汎用化して行くであろう。この方面の開拓者に敬意を表すると共に、時代の波に呑み込まれないよう望むところである。

末筆ながら、当初の機種選定にあたり、的確な助言を頂いたタカラバイオ (株) ・ドラゴンジェノミックスの北川正成氏にこの場を借りて感謝致します。

「国産」放線菌 *Kitasatospora* のゲノム解析

藤田信之

(製品評価技術基盤機構・
バイオテクノロジー本部)

我々は北里大学等の国内の9つの研究グループと共同で放線菌 *Kitasatospora setae* NBRC 14216^T のゲノム解析を行いました。その論文が間もなくDNA Research誌に掲載されます⁽¹⁾。属名の *Kitasatospora* は言うまでもなく北里柴三郎博士にちなんだものであり、種小名の *setae* は世田谷の地名に由来するものだそうです。その後この属には20を越える新種が正式に記載されていますが、その約半数は国内で分離されたものであり、ニッポン (*K. nipponensis*)、ニイガタ (*K. niigatensis*)、カズサ (*K. kazusensis*)、キフネ (*K. kifunensis*) などのなじみのある地名にちなんだ種名が付けられています。すべてが国産というわけではないにしろ、我が国にとっては大変なじみの深い放線菌群と言えるでしょう。その代表株を国内の多くの研究者の力を結集する形で解析できたことは感慨深いものがあります。

キタサトスポラは系統分類のうえで数奇な運命をたどってきました。細胞壁成分の違いなどをもとに、ストレプトミセスとは独立した属として1983年に一旦は承認されたものの、約10年後には形態の類似性や16S rDNAによる系統解析の結果などを根拠に、ストレプトミセス属の中の1グループに格下げになってしまいました。その後1997年になって、rDNAスペーサー領域の配列の違いなどを根拠にしてキタサトスポラ属が復活しています。実際、16Sの配列を使って系統解析を行うと、キタサトスポラがひとつのグループを形成するのは間違いのないものの、ストレプトミセスとの相対的な位置関係はアウトグループの取り方などによって変動することがあります。このような永年の論争に決着をつけたいというのも、*K. setae* のゲノム解析を行ったひとつの動機でした。ゲノム配列をもとに多くの生物に共通する31遺伝子のアミノ酸配列を取り出して系統解析を行ったところ、*K. setae* は明らかにストレプトミセス菌群の外側に位置し、現在の分類を強く支持する結果となりました。

キタサトスポラとストレプトミセスは細胞形態がよく似ていますが、9M近い線状ゲノムを持つ点や、ゲノムの末端に長い逆位反復配列を持つ点でも

共通していました。加えて、ゲノム上にはストレプトミセスにも匹敵する数の二次代謝遺伝子が存在していることがわかりました(図参照)。*K. setae* はもともと setamycin (bafilomycin B1) の生産菌として分離されたものですが、ゲノム配列を利用して、その生合成遺伝子クラスターはもとより、factumycin生合成遺伝子クラスターなどが実験的にも確認されつつあります(池田ら、未発表)。ストレプトミセスと並んで、生理活性物質の探索源としてのキタサトスポラの重要性を再確認する結果となりました。二次代謝遺伝子の多さだけではありません。ストレプトミセスでは二次代謝遺伝子の発現はγ-ブチロラクトン型のレギュレーターによる制御カスケードの下にあることが知られていますが、*K. setae* はレギュレーターの生合成遺伝子 (*afsA*) と受容体遺伝子 (*arpA*) に相当すると考えられる遺伝子をそれぞれ3個重複して持っていることがわかりました。二次代謝遺伝子の発現に関してストレプトミセスよりもさらに複雑な調節が行われているのかもしれない。

もともとキタサトスポラ属を提唱するきっかけになったのは、細胞壁成分であるジアミノピメリン酸(DAP)の組成のユニークさでした。ストレプトミセス属放線菌の細胞壁はLL型のDAPのみを持つものに対して、他の多くの放線菌はmeso型のDAPを持ちます。これに対してキタサトスポラ属の放線菌はLL型とmeso型の両方のDAPを持っています。しかも、菌糸細胞が主にmeso型のDAPを持つものに対して、胞子はLL型のDAPのみを持っていることから、形態分化の過程で何らかの調節が行われていることが示唆されていました。これを遺伝子構成の点から見ると、DAPをペプチドグリカンに取り込む酵素(MurE)はストレプトミセスの場合と大差なかったものの、DAPの異性化を行う酵素(DapF)を*K. setae*は3種類も持っていることがわかりました。分子系統解析の結果、このうちの2個はLL型のDAPを持つストレプトミセスのDapFに類似していましたが、残りの1個はこれらとは異なり、meso型DAPを持つ*Clostridium*や*Lactobacillus*などの低G+Cグラム陽性菌のDapFと近い関係にありました。これらがDAP組成の調節に関わっている可能性が考えられます。他の可能性も含めて実験的な検証が待たれるところです。

ストレプトミセスとの形態の類似性を反映して、ストレプトミセスで知られている形態分化関連遺伝子の多くが、*K. setae*でも保存されていました。特

に気中菌糸を形成する際の調節に関与すると考えられている *bld* 遺伝子群の多くが、ストレプトミセスとの間でアミノ酸配列で90%以上の高い一致度を持っていました。オーソログ間の平均一致度が約60%であるのと比べると極めて高い値と言えます。一方、形態分化に関連する遺伝子の中で唯一とも言える違いは、ストレプトミセスで保存されている *amf* 遺伝子群を *K. setae* は欠いている点でした。 *amf* はストレプトミセスが気中菌糸を形成するのに先立って分泌する界面活性タンパク質の合成に関わる遺伝子群です。 *bld* 遺伝子群の高い保存性と合わせて、放線菌の形態の進化を考えるうえで重要な情報を与えるものと言えるでしょう。

以上のように、似て非なるキタサトスポラとスト

レプトミセスとの関係を解き明かす重要なヒントをゲノム情報から多く得ることができました。最後に、ゲノム解析に関わったすべての皆さん、とりわけ、プロジェクトのスタート時から多くの叱咤激励をいただいた故郷之内末治先生に心よりお礼申し上げます。

1) Ichikawa, N., Oguchi, A., Ikeda, H., Ishikawa, J., Kitani, S., Watanabe, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Kishi, E., Sasagawa, M., Ankai, A., Fukui, S., Hashimoto, Y., Kamata, S., Otoguro, M., Tanikawa, S., Nihira, T., Horinouchi, S., Ohnishi, Y., Hayakawa, M., Kuzuyama, T., Arisawa, A., Nomoto, F., Miura, H., Takahashi, Y. and Fujita, N. (2010) Genome sequence of *Kitasatospora setae* NBRC 14216^T; An evolutionary snapshot of the family *Streptomycetaceae*. DNA Res., in press.

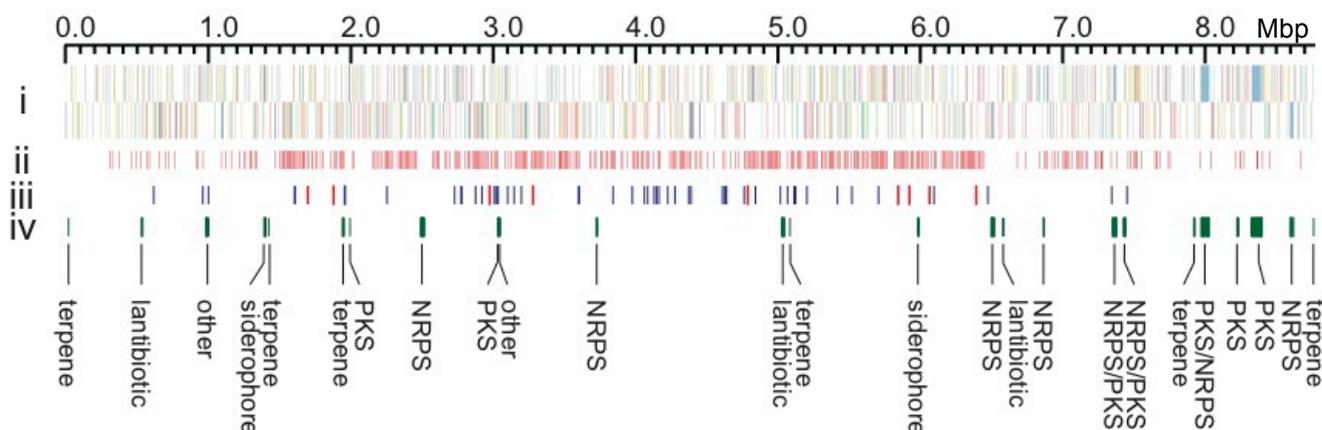


図 *Kitasatospora setae* のゲノム

i) 順鎖と逆鎖にコードされるORF。ii) ゲノム解析されている4種のストレプトミセス属放線菌との間で共通に存在する遺伝子。iii) rRNAオペロン (赤) とtRNA遺伝子 (青)。iv) 二次代謝遺伝子クラスターおよび予想される産物。

.....

大学院生として学会に参加して

微生物集団ゲノミクスに向けて

矢原 耕史

久留米大学医学研究科・バイオ統計学群
(博士課程3年)

催されるワークショップだった頃に、私は修士課程の大学院生として研究をスタートさせました。修士2年の折には、大学院生であるにもかかわらず長時間の口頭発表の機会を頂き、指導教官の小林一三先生と分担で発表させて頂いたことを、懐かしく思い出します。その後、IT企業でインフォマティクスの技術に磨きをかけた上で大学院に復帰し、博士課程3年として今を迎えています。

ゲノム微生物学会がまだ、かずさDNA研究所で開

修士時代は、微生物の集団中で特定の遺伝子（例えば宿主細胞から排除された場合に細胞死を引き起こす「中毒」遺伝子）がどう拡散し、進化的に維持されるのかという問題に理論的・進化生態学的にアプローチし、Geneticsに2報の論文を發表しました。この路線の研究はその後、減数分裂を通じて利己的に増殖し拡散するホーミング・エンドヌクレアーゼ遺伝子が、水平伝達の生じない閉じた微生物集団でどう進化的に維持されるのかを解明した、2009年のPNASの論文に結実しました。これらの研究は、微生物が生息する上で形成する集団の意味に注目した、microbial population biologyとして位置付けられる研究であり、米国ではGordon conferenceの対象でもあります。日本では研究者が皆無に近い状況ですが、2009年度には国際科学技術財団からJapan prize若手版の研究助成を頂くことができ、日本でもこの路線で研究を続けて評価されるのだと大変嬉しく思いました。

博士課程では、修士時代に取り組んだ理論的な研究からdata-drivenの研究へとシフトし、III型分泌装置のエフェクタータンパク質の特徴解析（Yahara

et al, *in press*) を行う一方、同一菌種内の集団レベルでのゲノム塩基配列データに根ざしたmicrobial population genomicsを進展させようとしています。具体的には、ピロリ菌日本株のゲノムを新たに4つ解読した上で、既に解読済の欧州株・アメリカ株とあわせて、ピロリ菌集団がどのように分化し、集団内でどうゲノムが進化し、ゲノムのどの場所にどのような自然選択が作用し、ヒト社会の中で拡散して胃がんを引き起こすに至っているのかを、解明しようとしています（図1）。

これまでの成果で、リーダの小林一三先生はヘリコバクター学会上原賞を受賞され、小林研の後輩の古田君は細菌学会優秀ポスター賞を受賞されました。一方、近年のゲノム微生物学会では、ゲノムレベルの塩基配列データ解析に関する発表が減少しています。私達のグループの発表を通じて、この分野を一緒に活性化して下さる方が増えることを願っております。

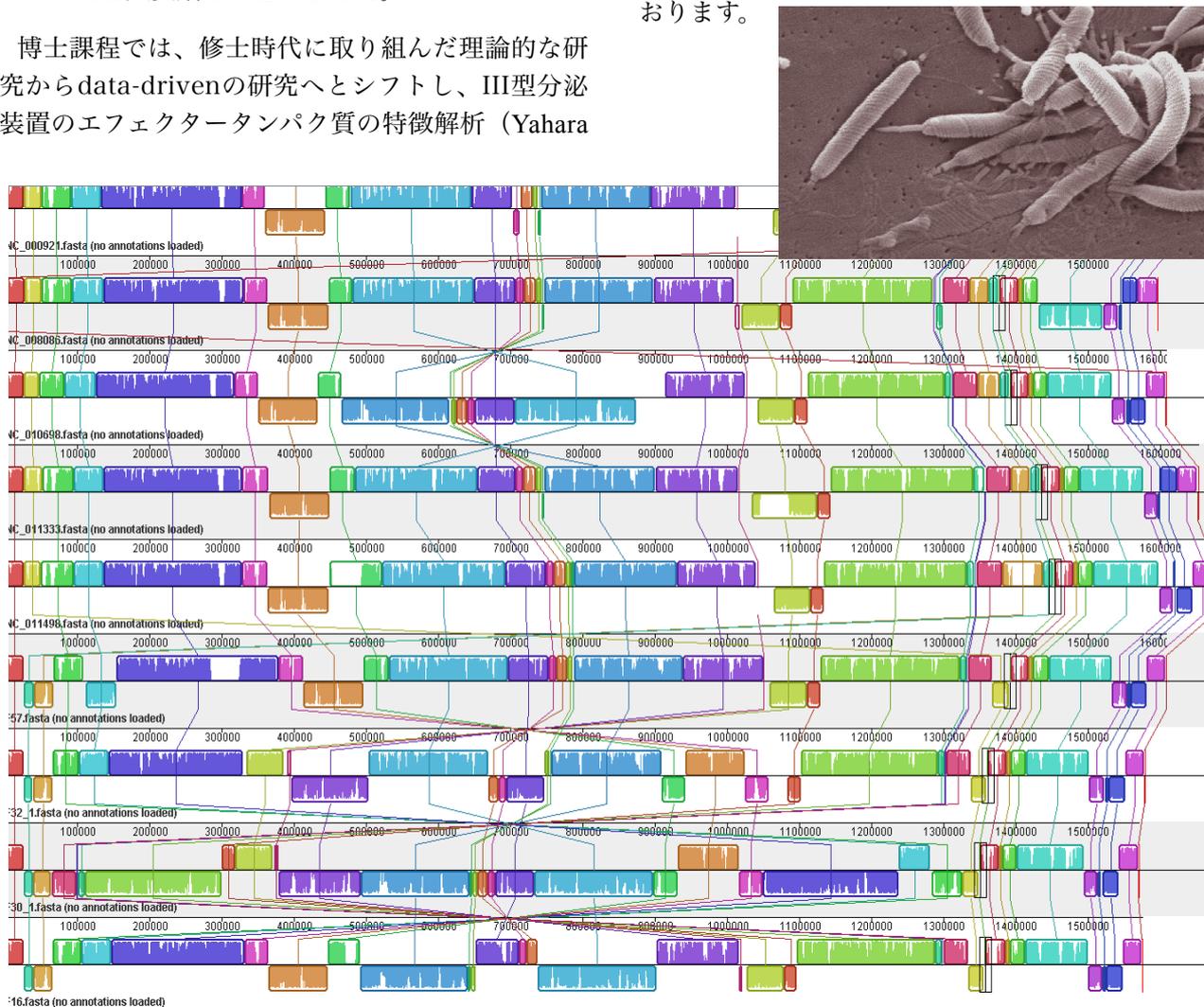


図1：ピロリ菌集団の比較ゲノム解析の出発点となるアラインメント ピロリ菌（上掲写真）のゲノム内には大小あわせて数十のブロックが存在し、ゲノムのダイナミックな変化の様相が伺える。

アメリカ研究雑記

広瀬 侑

東京大学理学系研究科 生物科学専攻

池内研究室 博士課程3年

サブプライムローンに端を発した住宅バブル崩壊により、リーマン・ブラザーズ社が破産、その後のアメリカ経済への不安から世界金融危機が始まりました。このような経済危機に対応し、当時の麻生政権は2009年度に15.7兆円の補正予算を計上、それを受けて学術振興会は特別研究員の海外派遣事業を開始しました。その事業に応募した私は、2010年6月から約5ヶ月間、カリフォルニア大学デイビス校のクラーク・ラガリアス教授の元で研究を行うこととなり、時代の流れというものを実感しました。

毎日、私は自転車に乗って研究室に通いました。カラッとした乾季の夏、晴れ上がった青空の下、片道20分のサイクリングはとても気持ちが良いものです。デイビスは非常に治安が良く、夜中の12時に女性が一人でジョギングしていることもありました。このような光景はアメリカではほとんど見られないそうです。アジア人の割合も多く、人種の壁もあまり感じませんでした。食事に関しては、外食をすると10ドル程度かかってしまい、やや割高でした。しかし、スーパーに行けば、野菜・果物・肉・酒類のほとんどが、日本よりも安く手に入りましたので、食費が安く済みました。また、多くの日本食材はアジア系のスーパーで手に入り、不自由ませんでした。週末は、サッカーのフリーゲームに参加しました。皆、あまりパスをせず、どンドンドリブルで切り込んでシュートを打ちます。ラフプレー後には激しい言い争いも起こり、驚きました。しかし、次の週になると、何事もなかったかのように楽しくプレーしていました。

研究室では、広いスペースや豊富な機器を使用する事ができ、実験をとて早く進めることができました。また、研究室間での実験機器の貸し借りが頻繁に行われて

いて、効率的でした。使い捨ての器具も多く、便利でした。一方、日本では既に処分されているような古い機器が現役で稼働しており、驚きました。また、テクニシャンが器具の洗浄と試薬・備品の管理を担当しており、自分は研究活動に専念することができました。一研究室あたりの学部生・大学院生数はそれぞれ数人程度であり、研究の主な担い手は、ポスドクでした。これは、指導側の負担が少ないだけでなく、学生にとっても研究室の選択肢が広がるため、双方にメリットがあると感じました。

シアノバクテリア分子生物ワークショップにも参加し、日本の博士課程の学生の研究レベルは、アメリカの学生のそれを上回っているという印象を受けました。しかし、アメリカの学生は博士号を取得後に、ポスドクとして色々なラボを回る事で、幅広い知識や技能を身につけている点が良いところだと思いました。もちろん、個々の研究においては人事の流動性がデメリットにもなることもあるでしょう。しかし、例えば数万人規模の人事を、予算をきちんと投入して流動化させると、集団全体としてはメリットのほうが大きくなります。アメリカとはとても合理的な国だと思いました。また、博士号の取得後やポスドク後の人材の受け皿として、産業が大きな役割を果たしている点が良いところだ感じました。

写真：カリフォルニア大学サンフランシスコ校の林洋平博士（左）に話を聞く筆者（右）。アメリカと日本における研究環境の違いや研究の進行状況や日常生活など、ポスドクの視点からの貴重なお話を伺うことができました。



第5回日本ゲノム微生物学会年会のお知らせ

第5回日本ゲノム微生物学会年会を2011年3月14日～16日の3日間、仙台市の東北学院大学土樋キャンパスで開催することになりました。会場 (<http://www.tohoku-gakuin.ac.jp/page/nb002.shtml>) へのアクセスは、JR仙台駅から歩いて約1.5キロ、または、JR仙台駅から地下鉄南北線で五橋駅下車徒歩5分、JR仙台駅からバスで仙台市立病院前下車徒歩5分、と便利な場所に位置しております。

主な研究トピックスは以下の通りです。

- ・新規微生物ゲノム配列の決定と解析
- ・微生物ゲノム・遺伝子システムの機能解析
- ・微生物ゲノムと細胞の動態の研究
- ・ゲノムを基盤とした病原性の研究
- ・ゲノムを基盤とした微生物の有用活用の研究
- ・メタゲノム研究、環境微生物研究
- ・微生物ゲノムの機能・進化の情報学的研究



第5回年会では、戸邊 亨氏（大阪大学大学院医学系研究科）、鎌形洋一氏（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）、田之倉優氏（東京大学大学院農学生命科学研究科）、および、小山泰二氏（野田産業科学研究所）による特別講演を予定しております。また、若手研究者育成の一環として、ポスター発表予定大学院生を対象に3分程度の口頭発表の機会を設けます。

なお、第5回年会参加登録用ホームページは2010年11月中旬を目処に立ち上げる予定であります。

※ 微生物を対象としてゲノムを基盤に研究に携わっている、あるいは関心をお持ちの多数の皆様の参加をお待ちしています。【第5回日本ゲノム微生物学会年会長 津田 雅孝（東北大学大学院生命科学研究所）】

学会の現況

学会役員（敬称略）

会長：小笠原直毅

庶務・会計幹事：林哲也、吉田健一 集会幹事：有田正規、大西康夫 広報幹事：有田正規、黒川 顕、大西康夫 男女共同参画：有田正規

評議員（会長推薦を含む）：穴澤秀治、飯田哲也、池内昌彦、石浜明、磯野克己、板谷光泰、大森正之、久原哲、小林一三、五味勝也、高見英人、田畑哲之、津田雅孝、服部正平、藤田信之、別府輝彦、吉川寛、跡見晴幸、漆原秀子、北川正成、佐々木裕子

会計監査：饗場浩文、倉光成紀

会員の動向

全会員数 433名（平成22年10月 29日現在）

正会員 335名；学生会員 98名

賛助会員 31 団体；機関会員 2 団体