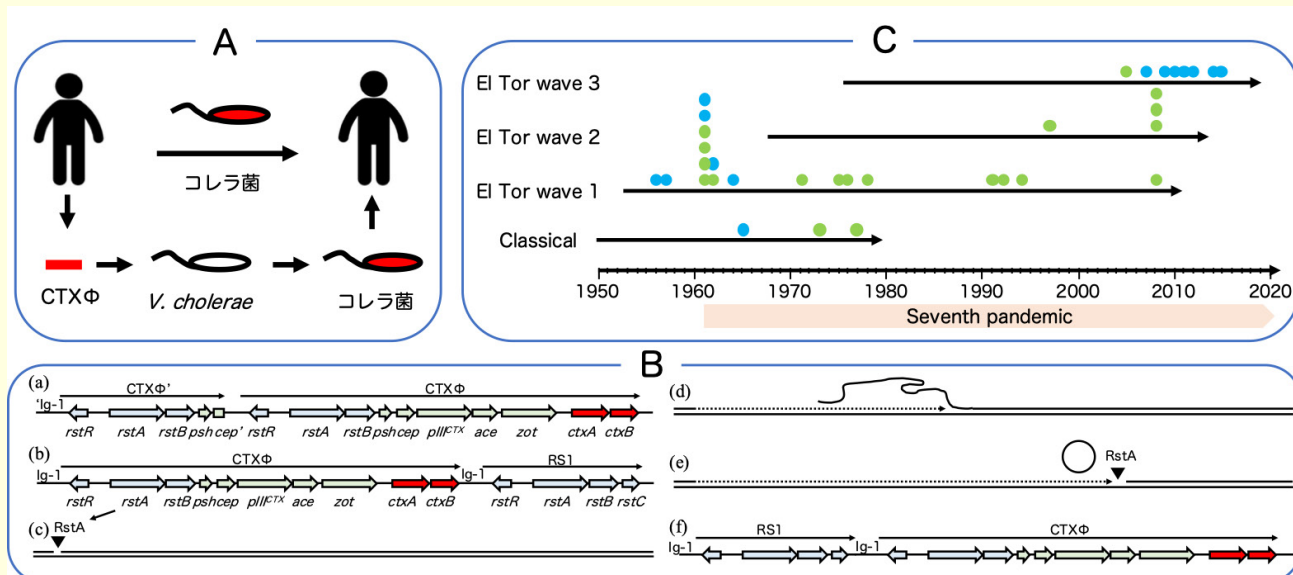


# 日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

近年のコレラ流行株は CTX Φ プロファージゲノムを複製できない

今村 大輔 (法政大学 生命科学部)



コレラ菌はコレラ毒素遺伝子を持った CTXΦ ファージが *Vibrio cholerae* に感染・溶原化しコレラ毒素生産性になることにより発生する (図 A 下)。第 6 次までのパンデミックを起こした Classical 型のコレラ菌は CTXΦ プロファージゲノムを単独または不完全なコピーと共に有していた (図 B a)。現在の第 7 次パンデミックを起こしている El Tor 型は CTXΦ プロファージゲノムをタンデムまたは RS1 という関連配列と共に持っていることが知られている (図 B b)。この構造の違いにより、Classical 型コレラ菌は CTXΦ ゲノムを複製することができず、ファージ粒子を生産できないが、El Tor 型は CTXΦ ゲノムを複製し、ファージを放出することができる (図 B b-e)。近年のコレラ流行株の完全ゲノム配列を解析したところ、CTXΦ プロファージと RS1 の並びに変化があり、CTXΦ ゲノムを複製できなくなっていることを見出した (図 B f)。また、この複製系を再構成することにより、並びの変化が複製能を失った原因であることを明らかにした。そこで、データベース上に完全ゲノム配列のあるコレラ菌を CTXΦ 複製能の有無で分類したところ、第 7 次パンデミックでは、1970 年頃から 30 年以上に渡って CTXΦ 複製株 (図 C 緑) が流行していたものの、2010 年頃から世界中で CTXΦ 非複製株 (図 C 青) に変化したことが分かった。これらの結果は、現在のパンデミックでは、CTXΦ の放出と感染による新たなコレラ菌の発生は起こらず、糞口経路による伝播に限定されていることを示している (図 A 上)。

発表論文: Ochi K, Mizuno T, Samanta P, Mukhopadhyay A, Miyoshi S, and Imamura D. Recent *Vibrio cholerae* O1 epidemic strains are unable to replicate CTXΦ prophage genome. mSphere. 6:e00337-21 (2021)

## 微生物学分野の研究動向

## 宿主細胞環境に適応的なウイルスゲノムの方向性のある変化

岩崎 裕貴

長浜バイオ大学 メディカルバイオサイエンス学科

## 1. ゲノム微生物学におけるウイルスゲノム解析の位置付け

近年、微生物ゲノム解析の分野において、感染症ウイルス類の大規模ゲノム解析が注目されている。インフルエンザウイルスやコロナウイルスなどのRNAウイルスの場合、進化速度が速く、短時間で変異が蓄積されやすい。ワクチン開発を含む防疫対策の必要上、世界的規模での大規模なゲノム配列解読がなされ、新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) については、100万を超えるゲノム配列が公開されている。ビッグデータ解析に適した、様々な統計解析が重要になっている。我々のグループでは、この急速に発展しているウイルスゲノム研究について、AIを含む大規模解析に適した手法を用いて取り組んでいる。本稿では、私が関わってきた感染症RNAウイルスゲノムについての研究動向を紹介する。

## 2. ウイルスの宿主適応メカニズム

ウイルスの最大の特徴は、多様な宿主の因子に依存して増殖することである。そのため、ウイルスが能率的に増殖するには、如何に宿主生物種の細胞内環境に適応し、宿主の抗ウイルス機構から逃れるのが重要である。ウイルス別に感染可能な宿主、あるいは体内での増殖可能組織が異なるということも知られているが、普段流行している自然宿主とは別の生物種にウイルスが感染するというケースも知られている。人獣共通感染症ウイルスが代表例であるが、ヒト以外の生物種集団で流行していたウイルスがヒトへ感染するというケースが多く報告されているものの、ヒト-ヒト間での感染が拡大する確率は低い。しかしながら、他生物種から伝播してきたウイルス株がヒト集団での流行を開始すると、そのウイルスに免疫を持たない人類にとっては脅威となる。例えば、2009年にパンデミックを引き起こしたインフルエンザH1N1 (H1N1pdm) 株は、ブタ集団で流行していた株由来であることが知られている(1)。同様に2019年から流行を開始して現在でもパンデミックを引き起こしているSARS-CoV-2は、コウモリ集団で流行していたコロナウイルス株が別の中間宿主を経て、ヒト-ヒト感染を起こしたと考えられている(2)。ウイルスの増殖には様々な宿主因子が関与するため、他生物種で流行していたウイルス類は、元宿主の細胞環境では効率よく宿主因子を利用して増殖していたとしても、ヒトという新しい宿主環境に侵入した時点では、十分に新宿主因

子に適応できているとは考えづらい。ヒトという新宿主環境で流行を開始したウイルスが能率的に生育するためには、新環境に適応するための変化が求められる。

一般的に、ウイルスのゲノムには変異が入りやすいと言われており、RNAウイルスではその性質は特に顕著である。加えて、世代時間も非常に短く、短期間でゲノム配列が大きく変化する。例えば、インフルエンザウイルスはスパイクタンパクの抗原性に関わる領域のアミノ酸配列に変異が蓄積されやすく、ヒトの免疫システムから逃げ続けることを可能としている。SARS-CoV-2においても、流行開始から1年の間に様々な変異が報告されており、中には感染性を強めていると考えられている変異(3)も複数特定されている。このように、ウイルスはヒトを新たな宿主として適応するために、自身のゲノムに様々な変化を蓄積している。

## 3. 配列アラインメントに依存しないゲノム比較：連続塩基組成

ウイルスに限らず、ゲノム配列の比較で最もよく使われている手法は、配列アラインメントに基づいた系統樹作成である。この手法は塩基配列やアミノ酸配列の比較解析において最も重要な手法ではあるものの、近年のゲノム解析において解決困難な問題点も抱えている。従来のアラインメントベースの解析手法は、解析対象となる配列の数が増えれば解析に必要な計算機資源や計算時間も膨大になってしまう。近年の配列決定技術の劇的な進歩により、短期間で膨大な量の配列情報を決定することが可能になり、社会的に重要性の高い対象においては、ゲノムデータが膨大な量になってしまう。例えば、SARS-CoV-2は流行開始から1年の間に約100万件以上のゲノム配列がGISAIDデータベースに登録されているが、これら全ての配列を対象にアラインメントベースの解析を実施することは容易ではなく、個人や小グループでの研究を困難にしている。

私が学生時代に所属していた研究室(長浜バイオ大学池村研究室)では、アラインメントベースでは扱うのが困難な大量データを対象とした解析手法の開発に取り組んでいた。具体的には、生物種間のゲノム配列中の連続塩基組成の違いに注目した解析を行っていた。生物種のゲノム配列の特徴を記述する際に一般的に使われる指標としてGC%がよく知られている。しかし、生物種間のゲノムの特徴の違いを説明するにはGC%だけでは

だけでは単純すぎて不十分である。カーリンらのグループは、ゲノム配列中の2連以上の連続塩基の出現頻度を調べたところ、生物種ごとに大きく異なることを見出し、この特徴を genome signature と呼んだ(4)。我々の研究室では、この連続塩基組成に注目した解析に取り組んでおり、様々なウイルスを含む多様なゲノムを対象とした解析を行ってきた(5,6,7)。

#### 4. AIを用いた大量のウイルスゲノム情報からの知識発見

連続塩基組成は数値データとして取り扱うことが可能なため、様々な統計解析に応用可能であり、特にAIを用いた解析が有望に思える。ウイルスゲノムの連続塩基組成には、そのウイルスが流行している宿主に特有な性質が反映されている可能性が考えられる。膨大かつ複雑な情報の中から意味のある情報の抽出は簡単ではないが、AIの一種である機械学習を用いることにより、ウイルスゲノムの中に潜んでいる宿主に関する特徴の抽出が期待できる。例えば、Babayanらは、Gradient boosting machines を用いてヒトへの感染が知られているRNAウイルスの自然宿主の予測を行なった(8)。Liらは、support vector classifier を用いてインフルエンザウイルスのヒトへの適応度を調べた(9)。このように、AIを用いることによって、ウイルスゲノム中に内在する特徴の検出が可能になってきている。しかしながら、一般的な機械学習を用いた手法において、その手法で分離した結果の根拠となる情報が得られていない(ブラックボックス化)という難点がある。分離することのみに焦点を当てるなら問題はないが、宿主適応に関わる特徴の分子メカニズムの解明を目指す場合、AIによる予測の根拠となる情報が重要な手がかりになる。この課題を解決するため、我々の研究室では説明可能型AIの1種である一括学習型自己組織化マップ法

(BLSOM)を用いた解析を行っていた。このBLSOMは膨大な量のゲノム情報から、連続塩基組成の特徴に基づいたクラスタリングが可能であり、”どのような要因でクラスタリングされたか”についての情報も得られる。

学生時代より、このBLSOMを用いてインフルエンザウイルスゲノムの宿主適応に関わる特徴抽出を行ってきた。国際塩基配列データベースに登録されていた全インフルエンザウイルスを対象にBLSOMを用いてクラスタリングを行なったところ、インフルエンザウイルスのゲノムは、機械学習の過程でこれらの連続塩基組成の情報しか与えていないにもかかわらず(教師無し学習)、分離された宿主ごとに明確に分離していた。また、その分離に寄与する連続塩基を特定することにも成功した(図1)(10)。前章でも記述したように、ウイルスの増殖は様々な宿主因子に依存している。AIでの分離に寄与した連続塩基が、インフルエンザウイルスがヒトという新宿主に適応するために重要な役割を果たしている可能性が考えられる。このように、ゲノム解析にAIを活用することによってウイルスゲノム中に内在する宿主適応に関連した重要な特徴を抽出することを可能にした。また、これらの解析で得られた結果の検証として、インフルエンザウイルスゲノムの連続塩基組成について、ヒト集団内での流行過程における時系列変化にも注目した。その試みの一つとして、2009年にパンデミックを引き起こしたH1N1pdm株の連続塩基組成の時系列変化を調べた。興味深いことに、ヒトに適応するために重要であると推定される連続塩基の組成の変化に注目したところ、H1N1pdm株の組成が、ヒトで流行を繰り返しているB型を含む季節性インフルエンザウイルス株の組成に近づくように変化していることを見出した(10)。

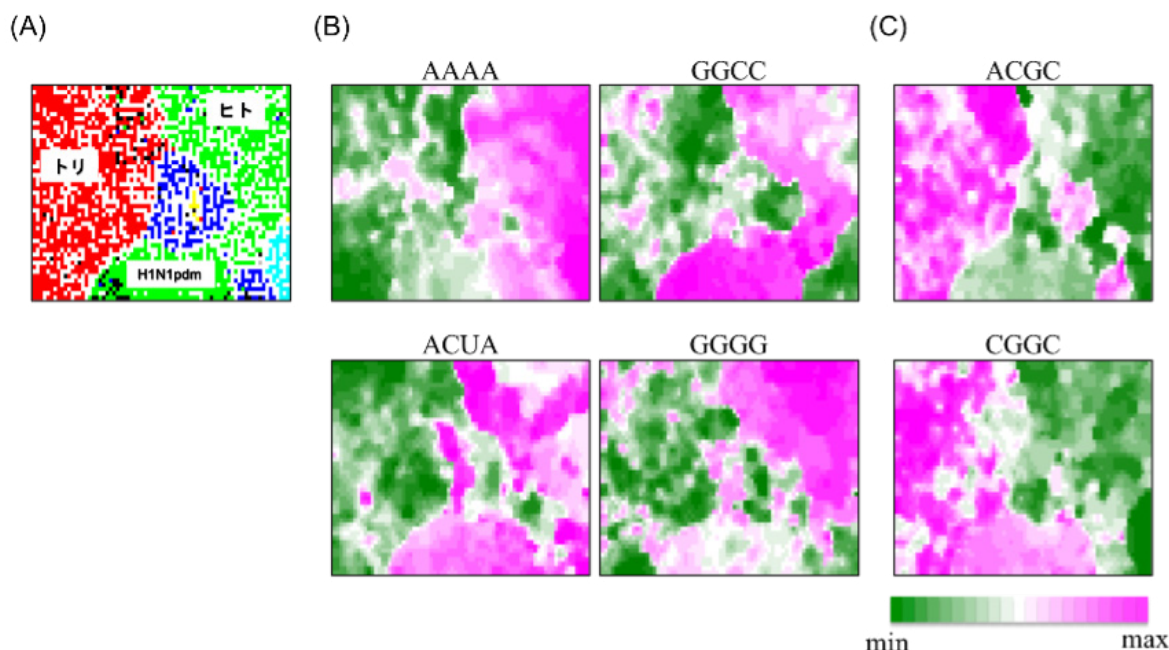


図1. インフルエンザウイルスを対象とした4連続塩基組成のBLSOM解析

(A) 4連続塩基組成に基づいたBLSOM解析の結果。ヒトから分離されたウイルスゲノムを含む領域を緑、トリから分離されたウイルスゲノムを含む領域を赤、ブタから分離されたウイルスゲノムを含む領域を青で表している。インフルエンザウイルスゲノムは、分離された宿主ごとに明確に分離していた。(B, C) ヒトから分離されたウイルスで特異的に高頻度(B)及び、低頻度(C)の連続塩基のヒートマップ。BLSOMマップ上で頻度が高い領域を紫、低い領域を緑で表している。

この解析により、2009年からヒト集団で流行を開始した H1N1pdm 株のゲノムにおいて、宿主適応に重要であると推定された特徴が蓄積されて行く過程を観察することができた。この成果は、ウイルスゲノムの変化の近未来予測への応用が期待できる。また、連続塩基組成が、ヒトへの適応についての重要な指標を与えているのなら、ヒト以外の宿主で流行しているウイルス類の連続塩基組成を調べることで、そのウイルスが将来的にヒトへの流行を引き起こす危険性について評価できる。この可能性を調べるためにトリから分離された全インフルエンザウイルス株の連続塩基組成を調べたところ、ヒトで流行しているインフルエンザウイルス株の連続塩基組成と似た組成を持っている株を見出した (11)。このように、AI によって抽出された宿主適応に関連した特徴をもとに、様々な応用が可能になった。

### 5. 新型コロナウイルスを対象としたゲノム解析

2019年12月、中国の武漢で SARS-CoV-2 による最初の感染が確認され、このウイルスはわずか数ヶ月の間に世界規模のパンデミックを引き起こしている。世界中でこのウイルスのゲノム解析が進められ、様々な特徴が明らかになりつつある。我々のグループでは、まず、このウイルスゲノムの連続塩基組成の変化のパターンに注目した解析を行った。前章で述べたように、2009年にパンデミックを引き起こした H1N1pdm 株では、新たな宿主であるヒトの中で流行を繰り返すうちに、自身のゲノムの中に宿主適応に関わる特徴が蓄積されていった。興味深いことに、SARS-CoV-2 のゲノム組成の時系列変化にも明確な方向性があり、ヒト集団で流行している他のコロナウイルス株の連続塩基組成に近づくように変化していた (図2 および図3) (12,13)。また、このウイルスのより詳細な特徴を調べるために、AI を用いた解析も行なった。ヒトから分離された全ての SARS-CoV-2 ゲノムを対象に BLSOM を用いた解析を行なったところ、SARS-CoV-2 のゲノムは BLSOM の map 上で Clade (系統) ごとに明確に分離しており、その分離に寄与している連続塩基の検出にも成功した (14)。このように、AI を用いることによって新たにヒト集団でパンデミックを引き起こした SARS-CoV-2 においても能率的な知識発見が可能になっている。

### 6. ウイルスゲノム解析の今後の展望

我々のグループを含む様々な研究グループが、ウイルスのゲノム配列には宿主適応に関連した特徴が埋もれていることを明らかにした。しかしながら、これらの特徴が具体的にどのような分子機構と関係しているかについては、不明な部分も多い。5～10程度の連続塩基は、タンパク質との相互作用について、15～20連続塩基は miRNA を含む宿主 RNA との相互作用についての知見を与える可能性が考えられる。ウイルスゲノム配列中の連続塩基が、宿主のどのような因子と相互作用するか解明することができれば、そのウイルス感染に対する有効な治療法や、感染予防方法の開発にも貢献できると考えられる。これは、ウイルスゲノム解析という分野における次の大きな課題の1つと言えるだろう。

### 引用文献

- 1) Smith G. J., Vijaykrishna D., Bahl J., et al. *Nature*. 459:1122–5 (2009)
- 2) Singhal T. *Indian J. Pediatr.* 87(4):281–6 (2020)
- 3) Rathnasinghe R., Jangra S., Cupic A. et al. *medRxiv*. 2021.01.19.21249592. (2021)
- 4) Karlin S., Campbell A. M., Mrzcek J. *Annu. Rev. Genet.* 32:185–225 (1998)
- 5) Abe T., Kanaya S., Kinouchi M. et al. *Genome Res.* 13(4):693–702 (2003)
- 6) Iwasaki Y., Wada K., Wada Y. et al. *Chromoe Res* 21, 461–474 (2013)
- 7) Iwasaki Y., Abe T., Okada N., Wada K., Wada Y., Ikemura T. *DNA Res.* 21(5):459–67 (2014)
- 8) Babayan S. A., Orton R. J., Streicker DG. *Science*. 362(6414):577–580 (2018).
- 9) Li J., Zhang S., Li B., Hu Y., Kang X. P., Wu X. Y., Huang M. T., Li Y. C., Zhao Z. P., Qin C. F., Jiang T. *Mol. Biol. Evol.* 37(4):1224–1236 (2020)
- 10) Iwasaki Y., Abe T., Wada K., Itoh M., Ikemura T. *DNA Res.* 18(2):125–136 (2011)
- 11) Iwasaki Y., Abe T., Wada Y. et al. *BMC Infect. Dis.* 2013, 13, 386.
- 12) Wada K., Wada Y., Ikemura T. *Gene*. 2020, 5, 100038.
- 13) Iwasaki Y., Abe T., Ikemura T. *BMC Microbiol.* 2021, 1, 89.
- 14) Ikemura T., Wada K., Wada Y., Iwasaki Y., Abe T. *bioRxiv* 2020, 10.11.335406

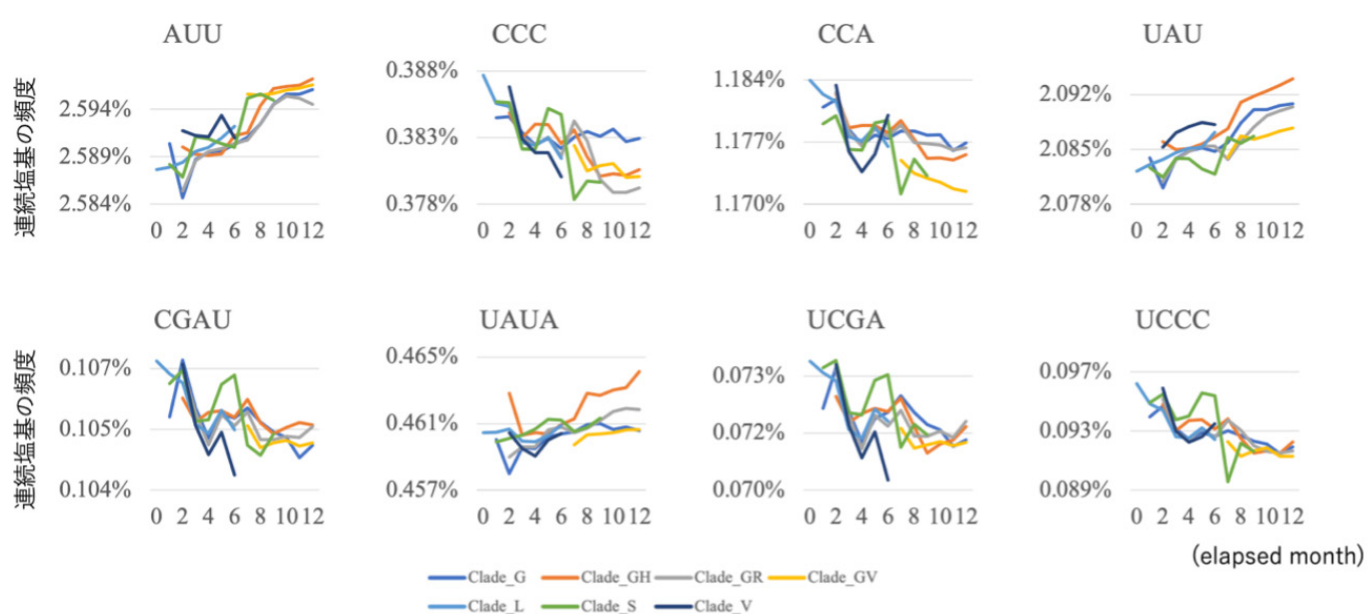


図2. 新型コロナウイルスの連続塩基組成の時系列変化

それぞれの Clade に分類される新型コロナウイルスについて、連続塩基組成の月毎の平均値を計算した。全ての Clade で共通した方向性をもって変化している連続塩基が見られた。

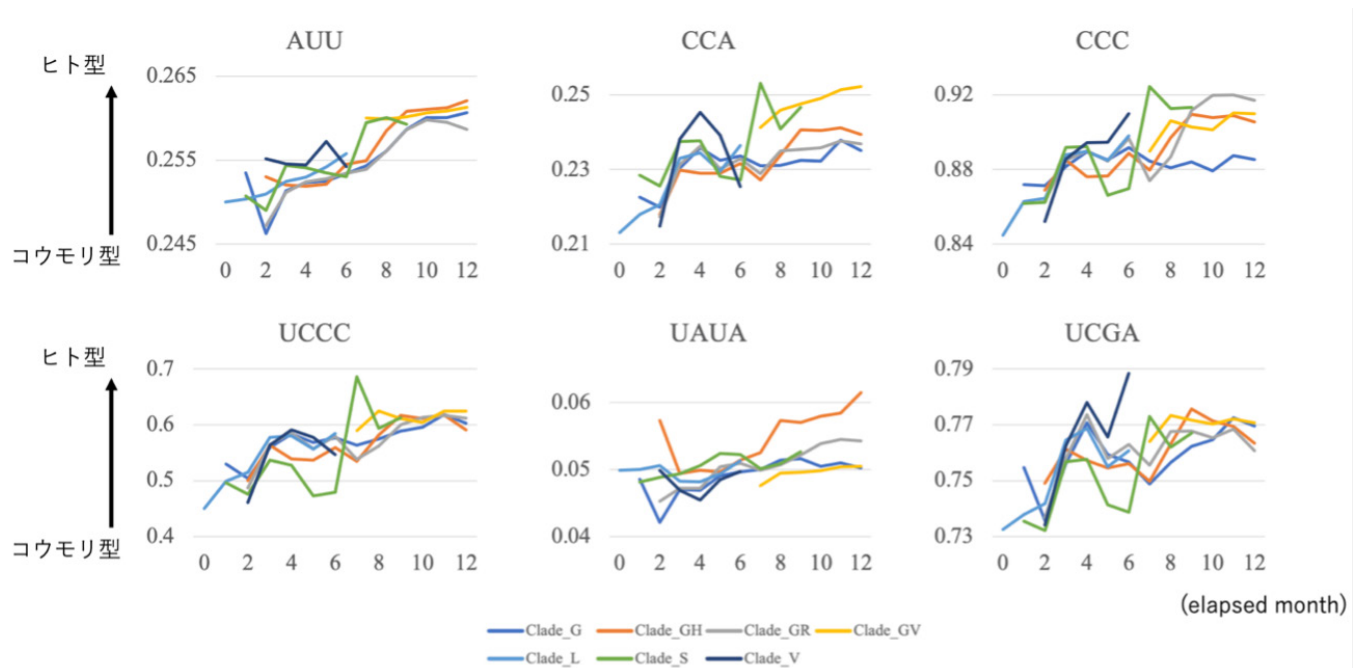


図3. ヒト株との連続塩基組成の類似度の時系列変化

それぞれの Clade に属する新型コロナウイルスの連続塩基組成と、ヒト集団で流行しているコロナウイルス株の連続塩基組成の類似度の時系列変化を調べた。新型コロナウイルスの連続塩基組成は、ヒト株の連続塩基組成 (ヒト型) に近づくように変化していた。

## ゲノム微生物学会奨励賞受賞研究

## 日本ゲノム微生物学会研究奨励賞受賞にあたって

岩崎 渉

東京大学 大学院新領域創成科学研究科



このたび、2021年の第15回日本ゲノム微生物学会研究奨励賞を受賞させていただきました。推薦いただいた先生、共同研究や様々な形でお世話になった先生方、そして、過去と現在の研究室メンバーに、改めて感謝申し上げます。

まるで「異世界転送」されたかのように静かなキャンパスと、どこからか聞こえてくる美しい鳥の鳴き声。“いながら”にしてバラエティ豊かな研究者のトークを（時にはラジオ代わりに？）聞くことができるようになった研究室で、「2020年度、生物学上最も重要だったニュースは何か？」という質問と、その意味を考える。

新型コロナウイルス感染症の流行、初めてのRNAワクチンの実用化。

タンパク質立体構造予測問題の進展を挙げる人はどの程度いるだろうか。

あらゆる意味で通常とは程遠かった1年が過ぎた今、「ゲノムは生命の設計図」という枕詞がかつて啓蒙の文脈を超えて確かに持ちえていたもの、そして、ポストゲノム時代にいつのまに

か失われてしまったものに、再び目を向ける必要があるように思う。

一次配列があれば、タンパク質三次元構造は予測できる。

タンパク質立体構造予測コンテスト CASP14において、DeepMindのAlphaFold2が挙げた成績は、2012年にImageNetでいわゆるAlexNetがトップに躍り出た時とも比較にならないほど、優れたものであった。タンパク質立体構造予測のバイオインフォマティクスの科学から工学への変質が、おそらくは、その一つの含意だろう。

「ゲノム配列には基本的にほとんどのことが書かれており、それを正しく読み解けば必ず生命は理解できるはずである」

私が今後の研究者人生を見据えて、このことを改めて信じる（あるいは“信じてみる”）ことにしたとき、微生物ゲノムがその研究の中心の舞台となることは、自然な帰結だろう。

ゲノム配列情報をいわば正面から見ることを出発点とした関連研究の多く、例えば分子機能・相互作用予測、表現型予測、合成生物学、システム生物学、そして進化学までが、遠くない将来、構造プロテオーム情報を基盤として再構築されていくだろう。

その一方で、ゲノム情報を読み解くにはそれだけでは足りないというのもまた、私の直感である。

私の最初の研究成果は、超好熱古細菌 *Pyrococcus horikoshii* が持つアスパラギン tRNA 合成酵素の X 線結晶構造解析および変異体の生化学実験によって、アスパラギンとアスパラギン酸を区別した正確なタンパク質翻訳が起こる分子メカニズムが、水分子を介した水素結合ネットワークによって支えられていることを証明したことであった(1)。このときに培った構造生物学・分子生物学の経験や知識は、例えば、海洋細菌のゲノ

ム情報から新規微生物型ロドプシンを発見し、さらに立体構造解析および機能解析によって、塩化物イオンを細胞膜内向きにポンプする分子メカニズムが、ナトリウムイオンを外向きにポンプする微生物型ロドプシンと極めて良く似た構造によって実現されているという、微生物型ロドプシンの分子メカニズムに関する研究にも繋がった(2)。また、巨大ウイルスシングルセルメタゲノム情報から新規ウイルス型ロドプシンを発見し、立体構造解析および機能解析によって、光感受性プロトンポンプ活性を持つことを明らかにし、「宿主微生物への光利用能力の付与」が巨大ウイルスにとって重要な役割を持つことを示唆した成果にもつながっている(3)。

一方で、微生物ゲノムから微生物の生理・生態・進化に関する理解を深めていくために、多様な微生物ゲノム情報を多角的に読み解くための情報解析技術の開発も進めてきた。具体的には、大規模なゲノムデータをもとに遺伝子の不均一な獲得・欠失速度を最尤推定し、ゲノム進化過程を高速かつ高精度に再構築するアルゴリズム(4)、グラフ理論に基づいて大規模な進化系統樹を高速に精度良く推定するソフトウェア(5)、同じ分子機能を持っていると推定されるオルソログ遺伝子グループを超高速度に推定することを可能にするソフトウェア(6)、さらに、そうしたオルソログ遺伝子データから遺伝子間の複雑な機能依存関係を網羅的に推定することを可能にするソフトウェア(7)などの研究を進めてきた。加えて、微生物ゲノムから微生物の生息環境を推定することを可能にするために、微生物の生息環境を配列データから予測するためのデータベースおよびパイプラインの開発(8,9)を行ったほか、大規模で複雑なデータの解釈を助けるための可視化ツールとして、遺伝子水平伝播の影響なども考慮した大規模な系統樹の描画手法(10)、代謝ネットワークなどの生命ネットワークデータの直感的な描画手法の開発(11,12)を行ってきた。

さらに、開発した情報技術も活用しつつ実際の微生物ゲノムデータを解析することで、微生物の進化・生態の解明を目指した研究を進めてきた。具体的には、原核生物において遺伝子水平伝播が代謝ネットワークの進化に重要な役割を果たしたという仮説の提示(13)、東北地方太平洋沖地震に伴う津波の影響を受けた東北沿岸土壌における *Arthrobacter* 属細菌ゲノム進化の解明(14)、雨水の長期サンプリングによる雨水中微生物叢の全体像解明および海洋性・土壌性微生物が大気を介して移動していることの示唆(15)、微生物生態系におけるジェネラリストとスペシャリストの共存のバランスが「ジェネラリストによって駆動される進化」によって保たれていることの解明(16)、海洋表層の微生物が光エネルギーを利用する「ソーラーパネル型」と色素で光を遮る「パラソル型」の2つの適応戦略をとっていることの示唆(17)、深海熱水噴出孔に生息する無脊椎動物の外部共生微生物叢のメタトランスクリプトーム解析による極限環境における微生物代謝機能の遺伝子基盤の全体像の解明(18)、根粒菌が持つ根粒形成遺伝子 *nodJ* の起源が  $\alpha$  プロテオバクテ

リアではなく  $\beta$  プロテオバクテリアにあり、根粒菌の起源に関するこれまでの定説を見直す必要性の指摘(19)、メタゲノム解析による1,500以上のプロテオロドプシン遺伝子の配列多様性および系統的分布・空間分布の解明(20)、メチロトロフとメタノトロフの栄養共生がメタノール以外の物質を介して行われている可能性のトランスクリプトームによる示唆(21)などがあげられる。メタゲノム解析をエピゲノム解析と組み合わせることで、難培養微生物のエピゲノムを解析する「メタエピゲノム解析」を世界に先駆けて提唱し、琵琶湖の環境細菌叢から多様なDNAメチル化モチーフ配列を検出したほか、それらのモチーフ配列を認識する新規のDNAメチル化酵素の同定までを行った成果(22)も、ゲノム微生物学を拡張する研究として位置付けられると考えている。

また原核生物にとどまらず、真核微生物ゲノム、特にその特有のゲノム進化イベントであるハイブリッドゲノムの進化について、近縁種で2度独立にハイブリッドゲノムが生じた *Trichosporon* 属真菌(酵母)を対象としたゲノム解析を行い、そのゲノムの安定化に遺伝子の進化速度の低下や転写・翻訳に関わる遺伝子の欠失が関わっていることを解明し(23)、バックボーン系統樹を推定することも行ってきた(24)。さらに、比較トランスクリプトームとの統合解析により、遺伝子配列レベルと遺伝子発現レベルでの進化がそれぞれ別々に、ハイブリッドゲノム上で生じるゲノム不和合の解消に働くことを明らかにした(25)ことも関連する成果として挙げられる。

---

私は、微生物ゲノムが研究対象として特に魅力的なゆえんは、分子レベルのミクロの世界から、生態系や進化史などのマクロの世界までが、「微生物ゲノム」という一つの確固たる基盤を元に直結することだと考えている。

しかし残念ながら(あるいはそもそも現代生物学全体を俯瞰すれば当然のことながら)、ゲノム微生物学は未だ、ゲノム情報さえ与えられればその微生物を十分に理解できるという段階には至っていない。微生物ゲノムの理解を深める上では、必ず、大規模データの存在を前提として、それをいま以上に多角的な観点から解析し、知識を引き出すためのさらなるアプローチが必要となるだろう。新たな概念・現象・機能を発見することを目的としつつ、同時に、新規性のあるアプローチを模索することを、今後も続けていければと考えている。

---

日々の研究生活の中で、どこまで本質に近づいているのだろうかという疑問はもちろん尽きない。それでも、方向性のようなものは、見えてきたようには感じている。

私の大学院の指導教員である高木利久先生が、折々に語って

くれた言葉を思い出す。

方向性が見えたなんてそれは勘違いだと、そして同時に、研究者にはどこかで勘違いのようなものが必要だと、言ってくれるのではないかという気がする。

もちろん、それ自体も私の勘違いかもしれない。

#### 引用文献

- 1) Iwasaki W. et al., J. Mol. Biol., 360:329-342 (2006)
- 2) Hosaka T. et al., J. Biol. Chem., 291:17488-17495 (2016)
- 3) Needham D.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 116:20574-20583 (2019)
- 4) Iwasaki W. and Takagi T., Bioinformatics, i230-i239 (2007)
- 5) Matsui M. and Iwasaki W., Syst. Biol., 69:265-279 (2020)
- 6) Cosentino S. and Iwasaki W., Bioinformatics, 35:149-151 (2019)
- 7) Fukunaga T. and Iwasaki W., PLOS One, 15:e0232106 (2020)
- 8) Yang C.C. and Iwasaki W., PLOS One, 9:e87126 (2014)
- 9) Mise K. and Iwasaki W., iScience, 23:101624 (2020)
- 10) Iwasaki W. and Takagi T., Syst. Biol., 59:584-93 (2010)
- 11) Praneenararat T. et al., Bioinformatics, 27:1121-1127 (2011)
- 12) Praneenararat T. et al., BMC Genomics, 13 Suppl 7:S24 (2012)
- 13) Iwasaki W. and Takagi T., PLOS Genet., 5:e1000402 (2009)
- 14) Hiraoka S. et al., BMC Genomics, 17:53 (2016)
- 15) Hiraoka S. et al., Front. Microbiol., 8:1506 (2017)
- 16) Sriswasdi S. et al., Nat. Commun., 8:1162 (2017)
- 17) Kumagai Y. et al., ISME J., 12:1329-1343 (2018)
- 18) Motoki K. et al., mSystems, 5:e00551-20 (2020)
- 19) Aoki S. et al., Mol. Biol. Evol., 30:2494-2508 (2013)
- 20) Olson D.K. et al., ISME J., 12:1047-1060 (2018)
- 21) Takeuchi M. et al., PLOS One, 14:e0213535 (2019)
- 22) Hiraoka S. et al., Nat. Commun., 10:159 (2019)
- 23) Sriswasdi S. et al., Genome Res., 26:1081-1090 (2016)
- 24) Takashima M. et al., Yeast, 35:99-111 (2018)
- 25) Sriswasdi S. et al., Commun. Biol., 2:263 (2019)

## 若手賞受賞研究

### デザインに向けたバクテリアの ゲノム情報構造理解

河野 暢明

慶應義塾大学 先端生命科学研究所



この度は栄えある日本ゲノム微生物学会の若手賞をいただき、とても光栄に思っております。まずはじめに今回推薦して下さった多くの先生方、審査してくださった先生方、そしてこれまで共に研究をして下さった多くの方々々に心より御礼申し上げます。

私はこれまで一貫して生命のデザイン原理について研究を行ってきました。大腸菌や枯草菌ゲノムから、時に真核生物やその生産産物たるバイオマテリアル(クモやミノムシの糸)に至るまで、多様な規模を対象に、その設計原理理解を目指してきました。どの様なルールに則って進化してきたのかを理解することは、生命理解という学理的な成果を得るだけでなく、生物利用という工学あるいは持続可能な未来社会の実現へとつながっていくことになるでしょう。そうした研究理念において、「全ゲノム合成」というキーワードはボトムアップアプローチの一つとして重要な役割を担います。合成生物学分野では数年前より HGP-write (the Human Genome Project-write) というプロジェクトの活動が盛んになってきました。ヒトゲノム計画 (Human Genome Project: HGP-read) から十数年、ゲノムを読む時代から書く時代へ。微生物ゲノムスケールでのコドンの書き換えなど、ヒトゲノムに限定しない GP-write として様々な成果を達成しています。「ゲノムを書く」ために達成すべき鍵となる技術として4つの項目、「DNA synthesis」、「Genome editing」、「Chromosome construction」、そして「Genome design」が挙げられることがあります(1)。PAMの制約から解放された CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集や、ゲノムスケール



の大規模アセンブル技術などは着実に発展してきています。特に昨今、技術革新が目覚ましく話題を集めているのが DNA 合成関連技術です。従来用いられているホスホロアミダイト法に代わる DNA 合成法として、TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) を用いた酵素法が注目を集めています (2)。酵素法は化学薬品を用いずに安全に DNA を合成できる技術であるが、その実用性はまだ検証されていませんでした。ところが 2019 年に DNA Script 社が 150-mer の DNA 合成に成功したと発表して以降、天然 TdT を改変することでスループットやコストの向上が計られ、実用化に向けて一気に動き出しています。同様に George Church らの Nuclear 社や Jay Keasling らの Ansa Bio 社なども参画し、DNA 合成業界はバイオベンチャーの乱立で盛り上がりを見せています。こうして「DNA synthesis」、「Genome editing」、「Chromosome construction」の技術革新に関しては将来性が見えてきた一方で、「Genome design」を達成する兆しはあまり見えていません。遺伝学分野では、遺伝子の配列設計、プロモーターの選択、あるいはコドンの最適化などは日常的に行われており、ノウハウは十分に蓄積していると思われます。しかしながらその一方、もう少し全体を俯瞰してゲノムスケールでの設計を想定すると、我々はゲノムを自在に設計することが叶うか不安を覚えてしまいます。そして実際に私の知る限りそのための条件はまだ揃っていません。例えば遺伝子同士をどの程度の間隔でどういう向きに配置すれば良いのか、複製開始・終結点の対称性はどれほど維持すれば良いのか、ゲノム上のタンパク結合サイトであるオリゴ配列分布のロバスト性は如何ほどか。ここに例示した疑問はすべて、まだ我々が全ゲノム合成を達成できていないがために顕在化していない課題であり、いずれ近い将来掌握しなければならないゲノムの基本的な設計原理です。こうした基本原理を理解し、生命の基本動機である増殖戦略を基盤から普遍的にモデリングできるようになれば、真の意味で生物を理解・利用できるようなりません。

今回の若手賞ではこうした背景に基づいた「デザインに向けたバクテリアのゲノム情報構造理解」という研究課題を評価していただきました。各研究成果に関する詳細は省きますが、これまで私は計算機シミュレーションで確からしい細胞内のゲノム複製終結モデルの候補を挙げ (3)、細胞内の複製挙動をモニタリングする技術 (4) を用いて予測された複製終結モデルの正しさを実験的に証明してきました。その検証過程で我々は複製機構が大規模なゲノム改変にも適応できるほどのロバスト性を有していることも明らかにしました (5)。さらに我々は複製や転写などの生命システムの中で、最もゲノムに変異を与えるプロセスが複製であり、遺伝子の変異蓄積はその複製プロセスによって方向付けられていた事実を実験室進化によって明らかにし、遺伝子の配向性に関する基礎的な指針の提唱に成功しました (6)。こうした成果はまだ Genome design のほんの一部にすぎませんが、今後も研究に邁進していきたいと思えます。

また私はこれまで何度かこのゲノム微生物学会ニュースレターに記事を掲載していただいております通り、2017 年より日本ゲノム微生物学会若手の会の世話人をさせていただいております。代表としては 3 年目となります。今回若手賞受賞を受けて、今一度若手の会の在り方についてご承知いただきたく、最後に述べさせていただきます。日本ゲノム微生物学会若手の会は日本ゲノム微生物学会の入門編、あるいは単に初学者が学ぶ場ではありません。少なくとも近年、この若手の会に学会員の先生方がご自身の研究室に所属する「若手」を参加させる動きは、ほとんどございませんでしたので、きっとそうした認識は共通していると思われます。その上で我々世話人一同は、若手の会は所属や立場に限定されることもなく、分野や技術に制限されることもなく、より新しいことに挑戦したい気概のある学際的なフロンティアの集まりとして、創造的で凛とした会であるべきであると考えております。世話人は挙手制で、特に募集期間などは設けておりません。微生物やゲノムを軸に、あるいはそれらを飛び越えた分子生物学をキーワードに、分野発展を共にして下さる方がいらっしゃいましたら、是非お声がけください。

#### 引用文献

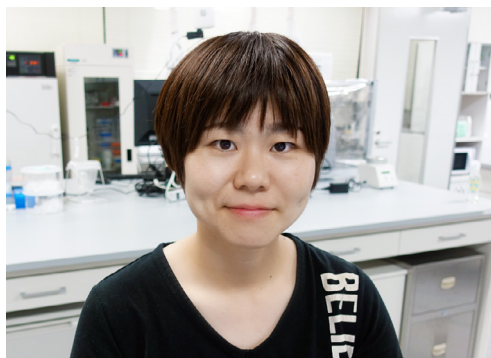
- 1) Ostrov N, et al. *Science* 366(6463):310-312 (2019)
- 2) Palluk S, et al. *Nat. Biotechnol.* 36(7):645-650 (2018)
- 3) Kono N., Arakawa K., Tomita M. *BMC Genomics* 1219 (2011)
- 4) Kono N, Tomita M, Arakawa K. *BMC Genomics* 18(1):784 (2017)
- 5) Kono N., Arakawa K., Tomita M. *PloS One* 7(4):e34526 (2012)
- 6) Kono N., Tomita M., Arakawa K. *Genome Biol. Evol.* 10(11):3110-3117 (2018)

## 若手賞受賞研究

ハイブリッドアプローチによる  
環境ホログenom解析

藤吉 奏

広島大学 学術・社会連携室



人の健康は身の回りに生息する多種多様な微生物に影響を受けています。特に空気中に浮遊する微生物は、呼吸系を通して健康に大きな影響を与えています。屋内の浮遊性微生物の種類と量は、屋外やヒト、建築物などと密接に関係していることから、屋内微生物環境の動態を理解するためには、居住者をはじめその環境に存在する(微)生物のゲノム総体(環境ホログenom)を捉える必要があります。そこで、2017年以来、フィールドワークを含む実験とゲノム情報解析の両面から本研究課題に取り組んでいます。その結果、屋内においては温湿度、空気交換率、居住者密度が細菌の種類や量を左右する要素となるのに対し(1)、屋外の場合は、細菌群集構造自体に季節性があり、それには温湿度以外にエアロゾルが関連している可能性があることを総説で提唱しました(2)。

空気は流動性が高いため、これまで浮遊性微生物も均一拡散すると考えられていました。しかし、屋外の浮遊性微生物群集構造をアンプリコン解析および系統解析したところ、たとえ近い距離(富山市—横浜市: 350 km、富山市—立山: 40 km)であっても構造が異なること(地域特異性)、また、微生物種にエアロゾルの粒径依存性が見られ、その中にはエアロゾル感染症の原因となるレジオネラ属細菌が存在することが見えてきました(3, 4)。また、微生物群集構造の分布からみた場合、世界的に大気質指数の一つとして測定されている粒子状物質PM2.5よりも、PM1.1の方がより重要であることが分かりました(図1)。

「蟲師」第5巻「山抱く衣」に産土(うぶすな)という蟲が出てきます(5)。ここで、蟲とは動物でも植物でもない生命の原生体という設定です。この産土は各土地に固有で、それを口にすると生涯他の様々な蟲から守られること、子供の頃に産土を十分取れなかった人は成長が遅いという説明がありました。もちろんこの話はフィクションですが、生活環境に存在する微生物と人の健康は、我々が思っているよりも密接にリンクしているのではと思えてなりません。

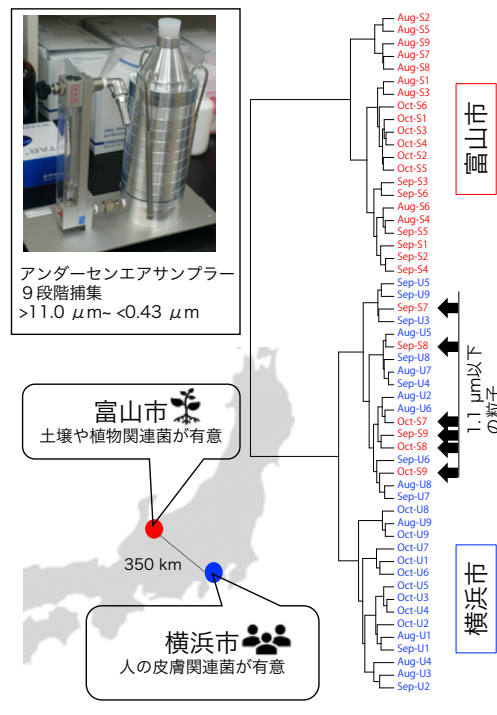


図1. 富山市と横浜市にて、9段階サイズ分画可能なエアロゾルサンプラーを用いて同日に採取した微生物群集構造の比較。富山由来の $1.1 \mu\text{m}$ 以下の粒子に含まれる微生物群集が、横浜の群集に入り込んでいる。(3)の図3を改変)。

従って、オンサイトで微生物群集構造を解析し、迅速に病原菌を含め微生物の有無を確認できたら、自分が普段どんな微生物と共に暮らしているのかを知ることができるので、衛生微生物学的観点からも重要となることでしょう。特定の遺伝子を検出するためのポータブル実験機器システム(通称スーツケースラボ)は完成し、既に公表しています(日本ゲノム微生物学会ニュースレター No. 22, 学会員の最新の論文紹介コーナーにも掲載させていただきました)(6)。現在はこれを基に、メタゲノム解析可能なアップデート版の製作を進めています。今後は、人と密接に関わる空気中の微生物の実態・機能・環境相互作用・健康影響評価、新たな生物資源の探索などを、国内外の研究者と協力しながら推進し、現場で活かせるゲノム微生物学の発展に貢献していきたいと考えています。

最後になりましたが、この度はゲノム微生物学会から若手賞をいただき、大変嬉しく光栄に存じます。お忙しい中選考いただいた委員の先生方に厚く御礼申し上げます。そして、これまでご指導下さった先生方、ご指導いただいている先生、共同研究者の皆様がこの場をお借りして心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Fujiyoshi et al., *Front Microbiol.* 8:2336 (2017)
- 2) Ruiz et al., *Environ Int.* 145:106156 (2020)
- 3) Tanaka et al., *Sci Rep.* 10:12406 (2020)
- 4) Tanaka et al., *Front Bioeng Biotechnol.* 7:12 (2019)
- 5) 漆原友紀. 蟲師. 第5巻. 講談社. (2004)
- 6) Fujiyoshi et al., *Environ Sci Pollut Res.* 28(11):14144–55 (2020)

## 最優秀ポスター賞

## 機械学習による微生物生命システム

## 進化の法則解明と未来予測

今野 直輝

東京大学 大学院理学系研究科



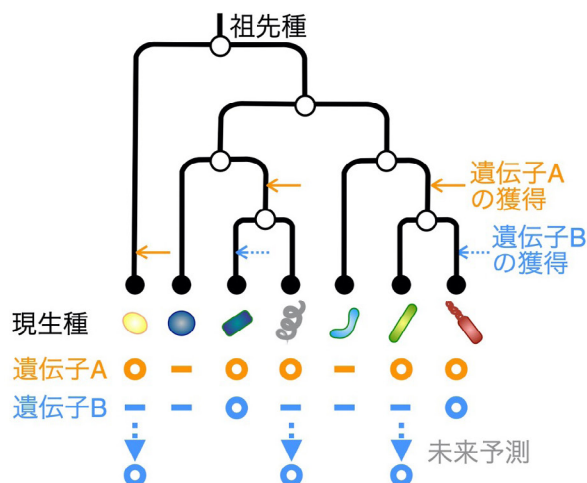
地球上には多様な微生物が存在し、それぞれが多数の機能を組み合わせた生命システムとして振る舞っている。そのシステムの「設計図」であるゲノムは、様々な遺伝子を獲得/欠失しながら多様化してきた訳だが、その未来の進化を予測することはできるのだろうか？一見すると、突然変異、水平伝播や遺伝的浮動のような偶発的な現象によって進化はランダムに起きるように思える。しかし、異なる系統間に共通の自然選択があることで収斂進化・平行進化が起きたり、進化制約によって獲得/欠失しうる遺伝子が制限されたりすることによって、異なる系統が共通の遺伝子を共通の順番で獲得/欠失するという「進化順序のパターン」が生じることも知られている(1)。

従って、この進化順序のパターンを網羅的に検出・考慮する

事ができれば、各現生種が持っている遺伝子セットの情報をもとに、ある遺伝子をこれから獲得/欠失しそうな種を予測できると考えられる。例えば、遺伝子Aを獲得してから遺伝子Bを獲得するという順序のパターンがある場合には、既に遺伝子Aを持っている種の方がそうでない種よりも、今後遺伝子Bを獲得する確率は高いと予測できる(図1)。このような予測ができれば、例えば薬剤耐性遺伝子を今後獲得する危険性が高い種を予測することや、有用遺伝子を人為導入しやすい種を予測することにも繋がるだろう。しかしこれまでの進化の予測研究は1個から数個の遺伝子の塩基配列レベルの進化を主な対象にしており(2-4)、各遺伝子の獲得/欠失のような生命システムレベルの進化の予測可能性を網羅的に検証した研究は存在しない。そこで本研究では、生物情報科学という筆者のバックグラウンドを生かしながら、機械学習を用いてバクテリアの遺伝子獲得/欠失による進化の予測可能性を明らかにすることを目指した。

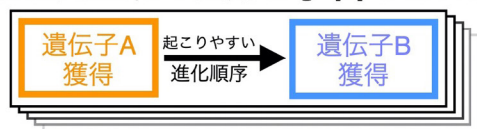
まずは過去の進化で生じた各遺伝子の獲得/欠失のタイミングを推定するため、40門3,171株のバクテリアの遺伝子セットの情報(5)とその系統樹の情報(6)を用いて、系統樹上の各祖先種について各遺伝子の有無の祖先状態推定を行った。そして、系統樹上の各枝について、その枝の直前の祖先の遺伝子セットの情報から、ある遺伝子とその枝で獲得/欠失する確率をロジスティック回帰モデルで予測する機械学習モデルを構築した。系統樹上の枝をランダムに2グループに分け、片方のグループで進化順序のパターンを学習して、もう片方のグループに対して進化の予測精度を測定した。

その結果、全代謝酵素遺伝子の傾向として、獲得/欠失ともに予測の正確性がランダム予測よりも有意に高い事が示された。興味深いことに獲得を予測可能な遺伝子群は芳香族化合物の分解経路に特に集中していたため、この経路においてどのような進化順序のパターンがあるのか解析した。すると3種類の芳香族化合物の分解経路について、分解産物から分解対象の化合物に向かって反応経路が伸びるように進化するというパターンが見つかった。この順序で遺伝子を獲得すれば、遺伝子を獲得する度に代謝可能な化合物の範囲が広がり適応度が上昇する



## Idea: 機械学習による進化の予測

## ① 過去の進化の法則を学習できれば...



## ② 未来の進化を予測できる??

遺伝子Bを今後獲得しそうなのは...

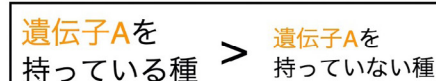


図1. 機械学習による遺伝子獲得/欠失進化の予測

と考えられるので、この順序の進化が異なる系統で共通に見られるのはリーズナブルである。このことから、本研究の進化予測モデルが生物学的に解釈可能な進化の傾向を捉えられることが示唆された。

さらに、この進化予測を現生種の遺伝子セットに対して適用することで、各現生種がある遺伝子を未来に獲得する確率を予測した。予測の妥当性を検証する上で現生種 114 種に対して代表株以外のゲノムも加えて解析した結果、予測された獲得確率が高い種では、その種に属する一部の株が既にその遺伝子を獲得しているという傾向が見出された。このことから、ある遺伝子を未来に獲得しそうな種や今まさに獲得しつつある種も予測可能であることが示唆された。

本研究ではバクテリアの代謝酵素遺伝子群を対象に獲得/欠失による進化の予測可能性を網羅的に検証した。その結果、様々な遺伝子について獲得/欠失する種を予測できることが明らかになった。しかし、なぜ予測できるのか、つまり実際にどのような進化順序のパターンがあるのかは解釈できていないものが多い。今後はその解釈をさらに深めると共に、薬剤耐性遺伝子を獲得する種の未来予測や有用代謝経路の人為導入可能な種の予測など、応用研究にも繋げたいと考えており、情報解析に加えて実験によるアプローチも取り入れて研究を進めていく予定である。

最後に、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。進化、生態から構造、生理機能まで非常に多様な専門の方々と議論させて頂き、微生物のゲノムを眺めるときの視野も広がったように感じます。今年はオンライン開催という新しい形でしたが、特に Zoom のブレイクアウトルーム機能のお陰で、非常に快適に議論する事ができて大変ありがたかったです。頂いた多くのフィードバックを糧に今後も研究を深めて参ります。議論して下さいました方や発表を聞いて下さった方、そして年大会をご企画・ご援助下さった皆様に改めて深く感謝申し上げます。是非また次の機会にも議論させて頂けたら幸いです。

#### 引用文献

- 1) Press M. O. et al., *Genome Biol.*, 26(6):826-833 (2016)
- 2) Salverda M. et al., *PLoS Genet.*, 7(3):e1001321 (2011)
- 3) Hosseini S. et al., *Bioinformatics*, 35(14):i389-397 (2019)
- 4) Hie B. et al., *Science*, 371(6526):284-288 (2021)
- 5) Kanehisa M. et al., *Nucleic Acid Res.*, 45(D1):D353-D361 (2017)
- 6) Parks D. H. et al., *Nat. Biotech.*, 38(9):1079-1086 (2020)

## 優秀ポスター賞

### 枯草菌 *sigK* 再編成に關与する 新規溶原性ファージの機能解析

伊藤 光瑠

法政大学 生命科学部



溶原性ファージ DNA の挿入と欠失は、*att* 部位と呼ばれる短い配列を介して、インテグラーゼ (Int) と欠失因子 (RDF) によって行われます。挿入の際は Int、欠失の際には Int に加え RDF が必要とされます (1)。従って、部位特異的組換え (SSR) の方向 (挿入 or 欠失) は Int と RDF の濃度比によって決定されます。さて、枯草菌は栄養源が枯渇すると細胞内に胞子を形成します。胞子形成は  $\sigma$  因子の逐次的な機能発現により進行します。その  $\sigma$  因子の 1 つである  $\sigma^k$  は *sigK* によってコードされています。*sigK* は *skin element* (48 kb) と呼ばれる欠陥プロファージによって分断されていますが、胞子形成期後期母細胞内でのみ部位特異的組換えによって *skin* が切り出され、再編成されます (2)。*sigK* 再編成に働く Int は SpoIVCA、RDF は Skr です (3)。一般に溶原性ファージの *int* と *rdf* は独立の転写単位で制御され、構成的に *int* が発現している場合は挿入、*int* に加えて *rdf* が発現すると欠失というように組換えの方向が制御されています。しかし、*skr* と *spoIVCA* は同じ転写単位であるため欠失しか制御できません。さらに *skr* の 3' 末端側と *spoIVCA* の 5' 末端側は重複しているという特徴を持っています。*skin* は欠陥プロファージですが、もし *skin* の SSR 装置 (Int, RDF) を持つ溶原性ファージが存在した場合、それは *rdf-int* が同一転写単位を構成し、かつ挿入と欠失を行うことのできる溶原性ファージであるということになります。そこで、私たちはこのような組換え機構を持つ *sigK* に感染する溶原性ファージの単離を目指しました。本研究室において、特定の *att* 部位を標的とする溶原性ファージのスクリーニング法が開発されています。このスクリーニング系を用い、全国の土壌から分離した溶原性ファージの中から *sigK* を標的して溶原化する  $\phi$ shrK を得ることに成功しました。

驚いたことに、 $\phi$ shrK(42 kb)は、*skin element* とほぼ同一の SSR 装置を持ち、かつファージの構造に関与する遺伝子領域において、枯草菌の溶原性ファージ  $\phi$ 105 (39 kb) と 88% の相同性があることが分かりました。このことは、 $\phi$ 105 と *skin* の間で、SSR 装置の交換がおき、*skin* の SSR 装置を持つ  $\phi$ shrK が誕生したことを示しています。*sigK* を標的に溶原化した  $\phi$ shrK は、*skin* と同様に胞子形成後期に切り出され、*sigK* を再編成することが確認されました (図 1)。一方で、 $\phi$ shrK の RDF=Skr (65 aa) と Int =SpoIVCA (500 aa) は *skin* と同様に、*rdf* の 3' 側の半分の領域 (33 aa) が *int* の 5' 側領域と 1 フレームずれて重複してコードされていました。また、*rdf-int* は、同じ転写ユニットとして発現しており、それぞれの欠失解析から RDF、Int をコードしていることが明らかとなりました。さらに、*rdf* の 3' 末端領域 33 aa は、*int* の 5' 末端領域と 1 フレーム読み枠がずれて重複しているため、翻訳されても整ったタンパク質構造を取らないと予測されました。では、この RDF の C 末端側半分の領域は機能しているのでしょうか？ 次に、この重複領域について Int のアミノ酸配列の変化がないように、点突然変異を導入し、RDF のみに生じる段階的欠失株を作製しました。その結果、全ての欠失株において *sigK* 再編成が確認されました。つまり、RDF の 3' 末端領域の 33 aa は、欠失には関与していないことが明らかになりました。即ち、重複領域は存在しても RDF としての機能には影響なく、かつ除去されても RDF として機能するという事です。

本研究で行った実験はここまでなのですが、*rdf* と *int* が同時に転写されるのにも拘らず、組換えの方向を調節できることに

ついて、重複部分に見られる配列構造に着目して考察してみました。HIV や SARS-Cov などのウイルスにおいては RNA 上でステムループを形成し、その直前にある *slippery sequence* により、リボソームがフレームシフトを起こします。これにより 2 種類のタンパク質の生産量を調節しています。実は、この構造が  $\phi$ shrK の *rdf-int* の重複領域に存在しています。*slippery sequence* 上でフレームシフトが起こると不完全な 15 aa の RDF が生産されます。一方、フレームシフトが起こらないと 65 aa の RDF が生産されます。つまり、挿入か欠失か？という方向の選択は、フレームシフトにより、調節されているのではないかとことです。現在、この仮説が正しいか各フレームとの翻訳融合システムを構築して検証しています。

最後になりますが、この度は名誉あるポスター賞に選んでいただき大変嬉しく思います。本研究では法政大学生命科学部 佐藤 勉 教授や今村 大輔 准教授をはじめとした研究室メンバーに日頃よりご指導、ご助言をいただきました。また  $\phi$ shrK 全ゲノム配列決定において国立遺伝学研究所 仁木 宏典 先生、岡本 尚 氏にご協力いただきました。加えて、コロナ禍で大変な中、このような発表の場を設けてくださった学会組織委員の皆様をはじめとした関係者の皆様に心より感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) Fogg P. C. M. et al., J. Mol. Biol., 426: 2703-2716 (2014)
- 2) Stragier P. et al., Science, 243: 507-512 (1989)
- 3) Suzuki S. et al., iScience, 23(1): 100805 (2020)

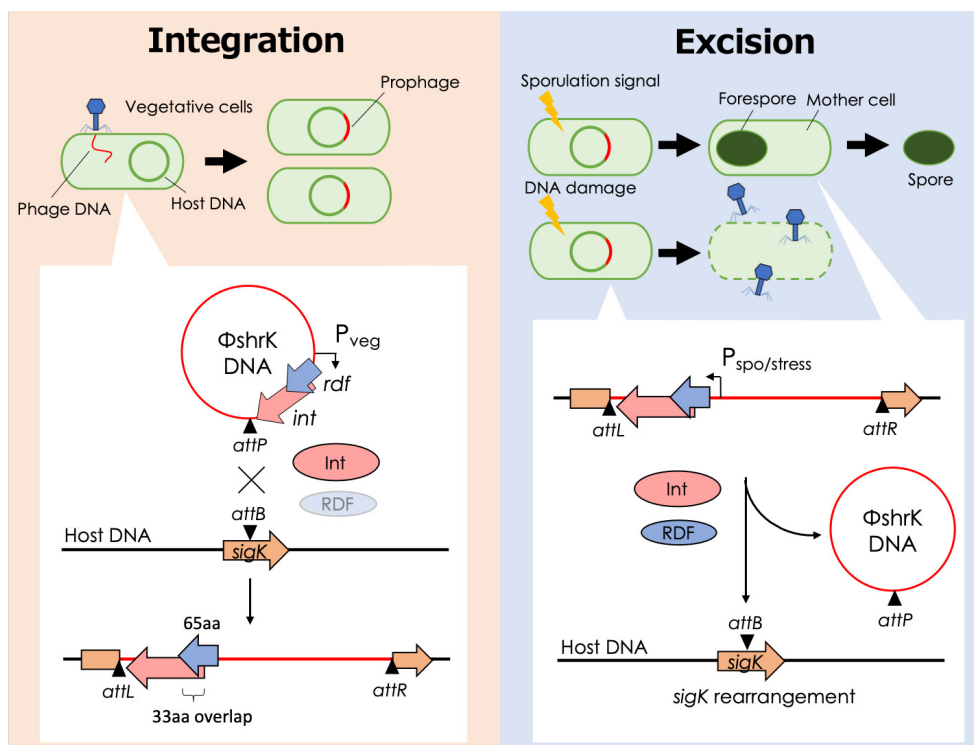


図 1. 枯草菌の  $\phi$ shrK プロファージの挿入と欠失

左)  $\phi$ shrK DNA の *sigK* 遺伝子への挿入による遺伝子断片。右) 胞子形成母細胞と DNA 損傷時に起こる  $\phi$ shrK プロファージの欠失。母細胞での  $\phi$ shrK プロファージの欠失により  $\sigma_K$  をコードする *sigK* が再編成し、胞子形成が進行する。*rdf* と *int* は同じ転写単位であるが、挿入時には Int のみが、欠失時には Int に加え RDF が機能する。

## 優秀ポスター賞

## 抗生物質アラレマイシン合成酵素から 5-アミノレブリン酸合成酵素への 進化仮説

川口潤

東京工業大学 生命理工学院



ポルフィリンは、呼吸や光合成に欠かせないヘムやクロロフィルといった分子の基本骨格です。そのため、およそ40億年という生命の進化の歴史において、ポルフィリンの獲得は非常に重大なイベントであったといえるでしょう。私たちはポルフィリン生合成経路の進化過程を紐解くことで、生命の進化の一端を明らかにすることができるのではないかと考えています。

私たちが特に焦点を当てているのは、ポルフィリン生合成の第1段階であるALA (5-アミノレブリン酸) の合成経路です。ALAからポルフィリンまでの6段階の反応は幅広い生物種において共通であるのに対して、ALAの生合成には2つの経路があることが知られており、それぞれC5経路とShemin経路と呼ばれています。C5経路はほとんどの細菌やアーキアが用いることから、最初に登場した経路である考えられます。一方Shemin経路はヒトを含む動物や真菌が用いるため、こちらは後発的な経路といえるでしょう。しかし、Shemin経路がどのような経緯で出現したかは明らかになっていません。

Shemin経路ではグリシンとスクシニル CoA が縮合されることでALAが合成され、その反応はALAS (ALA合成酵素) によって触媒されます。そのため、ALASの起源を明らかにすることで、Shemin経路の起源も明らかとなるでしょう。ここで私の所属研究室において抗生物質アラレマイシンが発見され [1]、興味深いことに、その合成酵素として見出したAlmAはALASと高い配列相同性を有していました。その相同性は約50%と高く、触媒反応も類似していたため、両者の間には進化的な関連性があると予想されました。こうした背景から私たちは、AlmAのような抗生物質合成酵素が進化してShemin経路のALASとなった、という進化仮説を提案し、その検証を行っております (図1)。ALAS (つまりShemin経路) はすでにC5経路が広まった状況で出現したと予想されるため、遠縁の酵素から徐々に進化して

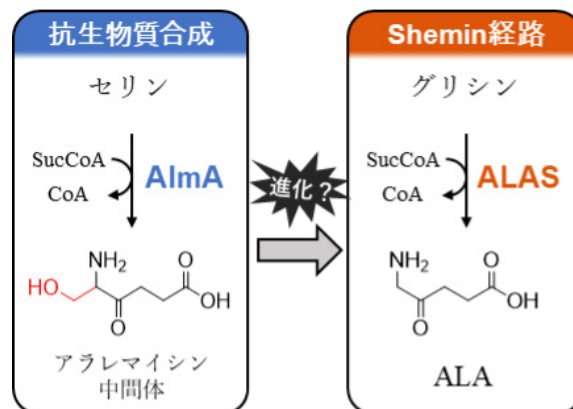


図1. 抗生物質合成酵素 (AlmA) から ALA 合成酵素 (ALAS) への進化仮説

ALA合成酵素となったと考えるよりも、近縁のAlmAからわずかな変異によってALASが成立したと考えた方が自然です。また、抗生物質合成酵素は欠失可能なため、生育に必要な酵素よりも変異が入りやすいといえます。私はこの進化仮説を検証することを目的に、主に2つの方向性から研究を行ってきました。まず取り組んだことは、部位特異的変異導入によるAlmAからALASへの機能改変実験です。AlmAの基質ポケット周辺に変異を導入することで、AlmAの基質を本来のセリンからALASのグリシンへと改変することを試みました。この実験により、AlmAとALASの基質特異性を左右する要因が特定されると期待されました。AlmAとALASの配列アライメントや既知のALAS立体構造から基質特異性に関与するアミノ酸残基を推定し、それらのアミノ酸残基をALAS型に置換した変異型AlmAを複数作製しました。その結果、AlmAはたった2つのアミノ酸残基を置換することで、その基質が本来のセリンからグリシンへと変化することが確認されました。これにより、AlmAはわずかな変異によってALASへと進化する可能性が示唆されました。

次に、AlmAとALASの祖先配列復元 (ASR: Ancestral Sequence Reconstruction) を行いました。ASRは現代の生物から得られた配列情報を基に系統解析によって祖先配列を復元する手法であり、タンパク質の進化を研究する際にしばしば用いられる手法です [2]。NCBIのProteinデータベースから取得したAlmAホモログとALASホモログのアミノ酸配列、計65配列から系統樹を作成し、PAMLソフトウェア [3] を利用して祖先AlmA、祖先ALAS、およびAlmA/ALAS共通祖先の配列を復元しました。ALA要求性大腸菌株の相補試験から、祖先ALASはALA合成活性を持つことが示唆されました。一方、祖先AlmAおよびAlmA/ALAS共通祖先の発現は宿主大腸菌の生育を阻害したため、これらは抗生物質を合成していると示唆されました。AlmA/ALAS共通祖先が抗生物質を合成しているということは、ALASの起源が抗生物質合成酵素であるという仮説を支持する結果であります。

冒頭で述べたように、ポルフィリンは呼吸や光合成に欠かせない分子であるため、その生合成経路の進化過程を解明するこ

とは、生命の進化の一端の解明につながると考えています。さらにこの進化仮説は、抗生物質合成酵素から生体物質の合成酵素へと進化するという点でも興味深く、これまで知られていなかった抗生物質の新たな一面ではないかと期待しています。

#### 引用文献

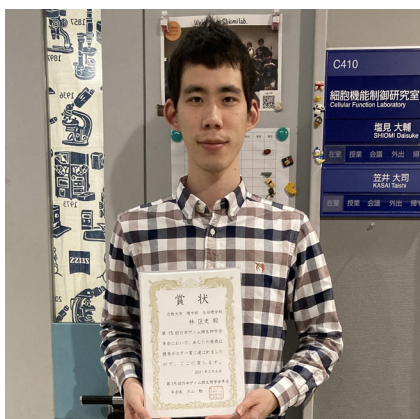
- 1) Awa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 69, 1721-5 (2005)
- 2) Randall et al., Nat. Commun. 7, 12847 (2016)
- 3) Yang, Mol. Biol. Evol. 24, 1586-91 (2007)

## 優秀ポスター賞

### 大腸菌 L-form における分裂装置の 制御メカニズム

林 匡史

立教大学 理学部 生命理学科



グラム陰性細菌である大腸菌の表層構造は内膜、外膜とそれに挟まれたペプチドグリカン層（細胞壁）の3層からなっている。中でも細胞壁は細胞形態の決定や、膨圧から細胞を守る上で非常に重要であり、ペニシリンなど様々な抗生物質が細胞壁合成経路に関与するタンパク質や細胞壁を標的としている。これらの抗生物質存在下では、通常、細菌は溶菌する。しかし、後述するような特殊な条件下では一部の細菌は細胞壁が無くても生存可能な状態に移行し、増殖する。このような細菌の増殖形態は L-form と呼ばれる。L-form は 1935 年に Klieneberger に

よってラットの血清中から見出された (1)。また、L-form は細菌感染したヒトからも単離されている (2, 3)。L-form は細胞壁を持たないので、不定形となるが、細胞壁合成を再開することで通常の増殖形態へと戻ることが可能である (4)。L-form は細胞壁を失うことで、宿主の免疫から逃れているが、細胞壁を再合成できる環境になれば、再び通常の増殖を開始し、病原性を示すと考えられる。

細胞壁を持つ通常の状態では、大腸菌の細胞分裂は、FtsZ を中心とした複数のタンパク質からなる Z-ring と呼ばれる分裂装置による制御を受ける。細胞分裂が進むにつれて Z-ring の収縮が起こり細胞は分裂する (5)。そのため、FtsZ は細胞分裂に必須である。しかしながら、L-form の分裂は FtsZ に依存せず、膜増加に伴って分裂するとされている (4)。一方で、L-form が桿菌へと戻る際には FtsZ が必須となることも報告されている (6)。このような場合、L-form は FtsZ 非依存的な分裂から、FtsZ 依存的な分裂へと変化する必要があるが、細胞内の分裂装置がどのように制御されているのかは不明である。本研究では、L-form の増殖過程と L-form から桿菌に戻る際の分裂装置の制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

本研究では、L-form の観察に液体培地還流装置 (CellASIC ONIX, Merck) を用いた。これにより、実験室環境における L-form 化の条件 (細胞壁合成阻害、高浸透圧、高濃度  $Mg^{2+}$  イオン、嫌気) を満たした上で、「細胞の L-form 化」、「L-form の分裂と増殖」、「L-form から桿菌への変換」という3つのステップを経時的に観察することが可能になった (7) (図 1)。図 1 に示したように、野生型大腸菌は L-form 化することで、大きく丸い形状もしくは細長い形状へと変化する。また、L-form が分裂する様子や、L-form から桿菌へと転換し、分裂する様子も観察された (7) (図 1)。*fisZ* 欠損株の L-form でも同様の分裂・増殖の様子が観察された。一方で、桿菌に戻ることはできず放射状に細胞が伸び、分裂できなかった。液体培地還流装置によって、先行研究と一致したデータを経時的に観察することに成功した。

次に、L-form において、Z-ring の形成や局在がどのような制御を受けているのかを明らかにするために、Z-ring の観察を行った。Z-ring の可視化には ZapA-GFP 株を用いた。ZapA は FtsZ 結合タンパク質として知られており、FtsZ に結合することで、Z-ring の安定に寄与している (8)。FtsZ に直接 GFP を融合した

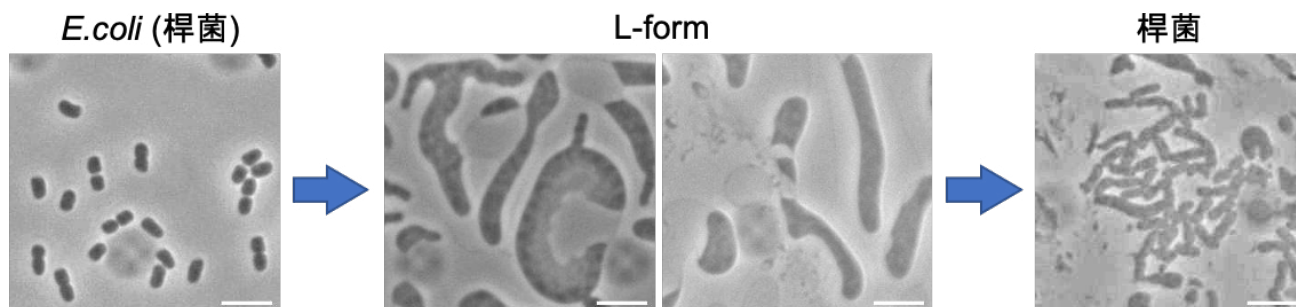


図 1. 大腸菌の L-form 化と L-form から桿菌への転換

液体培地還流装置を用いて大腸菌を L-form 化の条件下 (細胞壁合成阻害、高浸透圧、高濃度  $Mg$  イオン、嫌気) で培養すると、細胞は L-form 化し、分裂・増殖する。L-form は細胞壁合成を再開させることで桿菌へと転換し、分裂・増殖する。Scale bar = 5  $\mu m$

株を用いて実験を行った。実験を始める前は、桿菌の時に存在していた Z-ring が L-form 化に伴って霧散し、桿菌に戻る際に再度集合するのではないかと予想していた。ところが、予想に反して、Z-ring は脱重合せずに構造を保ち続けていた。L-form に見られる Z-ring の特徴として、「①細胞中に複数の Z-ring が存在」、「② L-form の分裂箇所とは異なる場所に局在」、「③収縮しない」の3点が挙げられる。「①細胞中に複数の Z-ring が存在」については、細胞壁を持つ大腸菌で細胞分裂の後期因子を機能欠損すると、伸長した細胞中に複数の Z-ring が観察されることから、L-form でも似た表現型が観察されたのではないかと考えた。また、Z-ring が「② L-form の分裂箇所とは異なる場所に局在」、「③収縮しない」点については L-form が *ftsZ* 欠損株でも分裂可能な点と一致している。一方、桿菌へと戻る過程では、L-form の時に存在していた Z-ring の収縮が始まることで分裂を開始していたことから、この過程で FtsZ が必須という先行研究と一致した。以上の結果から、L-form は分裂・増殖に FtsZ を必要としないにも関わらず、細胞内に Z-ring が形成されていることを明らかにした。以前の研究で、膜小胞内に膜結合ドメインを付加した FtsZ を取り込ませた場合、FtsZ の働きによって、小胞にくびれができることが報告されている (9)。そのため、FtsZ はそれ自身でくびれを形成する能力を持っていると考えられている。ところが、L-form では Z-ring の局在する場所にくびれが観察されなかったことから、L-form では Z-ring が収縮しないように制御されている可能性がある。これに加えて、L-form の Z-ring は桿菌に戻る際に利用されることから、収縮する能力を持たないわけではない。そのため、どのような因子が集まって Z-ring を形成しているか、何をトリガーとして Z-ring 依存的な分裂を開始しているか調べることで、L-form の分裂装置制御メカニズムだけではなく、桿菌の際に働く未解明の分裂装置制御メカニズムを知ることができるかもしれない。

この度は素晴らしい賞をいただきありがとうございました。新型コロナウイルスが社会に影響を与え中、年會を主催いただいた学会関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究は、立教大学・理学部・生命理学科・細胞機能制御研究室にて行いました。ご指導いただきました塩見大輔教授ならびに研究室の方々に深く感謝いたします。また、ポスター討論の際にはたくさんの方々にお越しいただき、様々なご意見、ご討論をいただきました。今後の実験の参考にし、より良い報告ができるよう努めて参ります。

#### 引用文献

- 1) Klieneberger. J Pathol Bacteriol. 40:93–105 (1935)
- 2) Domingue and Woody. Clin Microbiol Rev. 10(2):320–344 (1997)
- 3) Mickiewicz et al. Nat Commun. 10(1):4379 (2019)
- 4) Leaver et al. Nature. 457(7231):849–853 (2009)
- 5) Monteiro et al. Nature. 554(7693):528–532 (2018)
- 6) Billings et al. Mol Microbiol. 93(5):883–896 (2014)
- 7) Chikada et al. Front Microbiol. 12:645965 (2021)

8) Huang et al. J Bacteriol. 195(9):1859–1868 (2013)

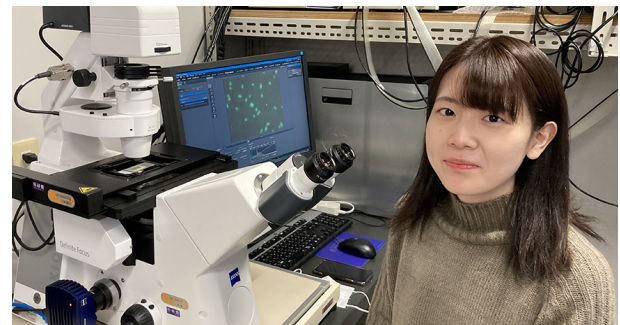
9) Osawa et al. Science. 320(5877):792–794 (2008)

## 優秀ポスター賞

### SanA による大腸菌の新規バンコマイシン耐性機構の解析

山口 穂野香

立教大学 理学部 生命理学科



大腸菌は、グラム陰性細菌に属しており、その表層構造は、外膜・ペプチドグリカン層・内膜の3層からなる。ペプチドグリカンは、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と N-アセチルムラミン酸 (MurNAc) が交互に連なった糖鎖と、N-アセチルムラミン酸に結合した数アミノ酸からなるペプチドから構成されている (図1)。これらが架橋されて巨大分子を構成する。ペプチドグリカンの架橋は、ペプチドの3番目のアミノ酸ジアミノピメリン酸 (*meso*-Dap) と、別のペプチドの4番目のアミノ酸 D-Ala の間で起こるが、この架橋を行うのは、PBP1A・PBP1B・PBP2・PBP3 のようなトランスペプチダーゼ (TPase) 活性を持つ酵素である (1, 2)。TPase は、ペンタペプチド末端 D-Ala 切断とペプチド架橋を連続的に行う。一方で、PBP4・PBP5 のような DD-カルボキシペプチダーゼ (DD-CPase) 活性を持つ PBP は、ペンタペプチド末端の D-Ala 切断のみを行う。主要な DD-CPase である PBP5 を欠損させると、末端の D-Ala が切断されていないペンタペプチドが多く残ることに加えて、細胞形態も異常になること (3) から、DD-CPase は、架橋の調節および細胞形態の維持に寄与していると考えられている。このように、大腸菌の細胞形態は、ペプチドグリカンの構造により決定されるため、細胞形態の維持には、ペプチドグリカン合成が正しく制御されることが重要である。また、ペプチドグリカンおよびペプチドグリカン合成酵素 (PBPs) は、様々な抗生物質の標的となることから、ペプチドグリカン合成制御機構の理解を深めることは、抗生物質耐性機構の解明につながると考えられる。

大腸菌において、細胞伸長時のペプチドグリカン合成を担う Rod 複合体では、構成因子である膜貫通タンパク質 RodZ が、ペリプラズムでのペプチドグリカン合成と細胞質での合成



酵素複合体形成の局在を決定する MreB アクチンの機能を橋渡ししていると考えられている (4)。当研究室の先行研究により、RodZ 機能欠損株は、増殖遅延と形態異常を示すことが明らかになった。さらに、同じく先行研究において、RodZ 機能欠損株から増殖速度が回復した抑圧変異株を複数単離し、その変異部位を特定したところ、*sanA* 遺伝子に変異を持つ株が見出された。以上の結果は、SanA がペプチドグリカン合成に関与する可能性を示唆しているが、その分子機構は、現時点では明らかになっていない。

SanA は、推定膜貫通型タンパク質で、Rod 複合体との関係については報告されていない。一方で、SanA は、バンコマイシン感受性の大腸菌変異株をバンコマイシン耐性にする因子として同定されたこと、および、*sanA* 欠損株はバンコマイシン感受性になることが報告されている (5)。したがって、SanA は大腸菌がバンコマイシン耐性になるために必要な因子であると考えられるが、SanA によるバンコマイシン耐性化機構は不明である。また、*sanA* は、大腸菌の近縁種のみには保存されている遺伝子で、その配列はグラム陽性細菌などではほとんど見られない。以上のことから、SanA タンパク質の機能を解析し、SanA が関与するペプチドグリカン合成制御機構およびバンコマイシン耐性機構の解明を目的とする本研究は、将来的には、大腸菌のような特定の細菌を標的とした薬剤開発への応用が期待される。

バンコマイシンは、ペプチドグリカンのペンタペプチド末端の D-Ala-D-Ala 部分に結合し、PBPs によるペプチドグリカン合成を阻害する抗生物質である (図 1)。細胞表層がペプチドグリカン層と内膜の 2 層からなるグラム陽性細菌はバンコマイシンに対して感受性を示すが、大腸菌は、一般的にはバンコマイシン耐性であることが知られている。これは、大腸菌のようなグラム陰性細菌は外膜を有しているため、分子量の大きいバンコマイシンは透過しにくいためであると考えられる。しかし、高濃度 (> 100 $\mu$ g/ml) のバンコマイシン存在下では、大腸菌は野生株であってもバンコマイシン感受性の表現型を示す。したがって、大腸菌のバンコマイシン感受性の度合いは、外膜の透過性あるいはペプチドグリカンの構造を反映していると考えられる。SanA と Rod 複合体との関連が示唆されたことと、*sanA* 欠損は外膜透過性に影響しないこと (6) から、*sanA* 欠損株がバンコマイシン感受性になる原因はペプチドグリカンの構造にあると予想した。

本研究では、SanA による大腸菌の新規バンコマイシン耐性機構を解明するため、バンコマイシンの作用機序から考えて、ペプチドグリカン構築を行う酵素、すなわち、D-Ala-D-Ala の切断や架橋に関わる因子に着目した。各因子の欠損株のバンコマイシン感受性を調べた結果から、(*mrcB* 遺伝子にコードされる) PBP1B と (*dacA* 遺伝子にコードされる) PBP5 は、SanA との遺伝的相互作用がある可能性が示唆された。PBP1B (TPase) と PBP5 (DD-CPase) は、いずれもペンタペプチド末端の D-Ala を切断する点が共通しているため、バンコマイシンの基質である D-Ala-D-Ala の量の制御に SanA が関与しているために、その影

響が、欠損株のバンコマイシン感受性の表現型に現れたと考えられる。また、*dacA* (PBP5) 欠損株と、*dacA sanA* 二重欠損株の表現型が完全に一致し、どちらも強いバンコマイシン耐性になったことから、PBP5 が SanA の制御下にある可能性が示唆された。さらに、PBP1B は、Bacterial two-hybrid 法による解析から SanA との相互作用も示され、SanA が PBPs によるペプチドグリカン構築の制御に関与している可能性が強く示唆された。今後は、PBPs を始めとするペプチドグリカン合成関連タンパク質と SanA との相互作用や、SanA がペプチドグリカン組成 (D-Ala-D-Ala の量) に与える影響を定量的に示し、SanA による大腸菌のペプチドグリカン合成制御機構およびバンコマイシン耐性機構の解明を目標に、本研究を継続していきたいと考えている。

最後に、本研究の抑圧変異株の全ゲノムシーケンスは、国立遺伝学研究所・仁木宏典教授、岡本尚博士との共同研究で行いました。また、本研究を行うにあたって、塩見教授を始めとする研究室の方々には、日頃より温かく丁寧なご指導、アドバイスをいただきました。この場を借りて、深く感謝申し上げます。この度は、新型コロナウイルスの影響で行動が制限される状況下ではありましたが、オンラインという形で学会に参加できたこと、そして、優秀ポスター賞に選んでいただいたことを大変嬉しく思います。学会関係者の皆様、発表を聞きにきてくださった皆様に、心より感謝申し上げます。ポスター討論の際にいただいた沢山の貴重なご意見を生かし、今後も本研究をより発展させられるように励んでいきたいと思っております。

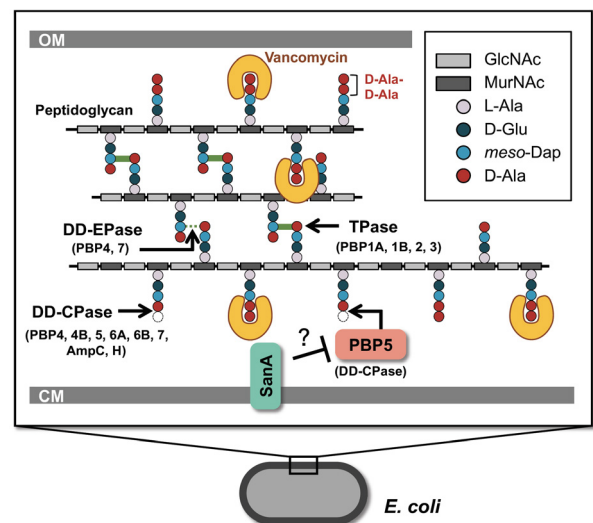


図 1. ペプチドグリカンの構造とバンコマイシンの作用機序。ペプチド間の緑色の実線は架橋を、緑色の破線は架橋の加水分解を示している。CM: 内膜、OM: 外膜

#### 引用文献

- 1) Typas et al. Nat Rev Microbiol. 10(2): 123-136 (2012)
- 2) Egan et al. Nat Rev Microbiol. 18(8): 446-460 (2020)
- 3) Potluri et al. Mol Microbiol. 84(2): 203-224 (2012)
- 4) Ago and Shiomi. Aims Microbiol. 5(4): 358-367 (2019)
- 5) Rida et al. J Bacteriol. 178(1): 94-102 (1996)
- 6) Paradis-Bleau et al. Plos Genet. 10(1): e1004056 (2014)

## 年会開催報告

第15回年會を完全オンラインで  
開催いたしました

片山 勉

九州大学 薬学研究院

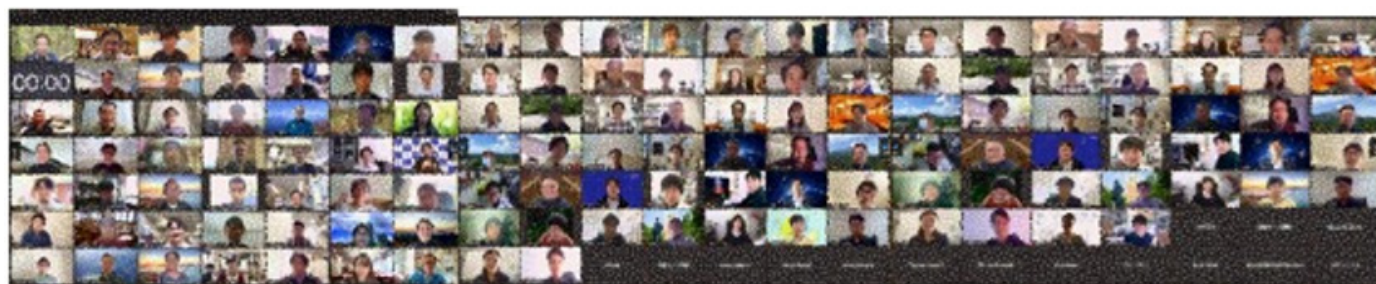
第15回年會を2021年3月4日から6日まで完全オンライン形式にて開催いたしました。受賞講演5題、口頭発表29題、ポスター発表63題からなる昼間のアカデミックプログラムに加え、夜間に行った2つウェビナーでは計4題の講演が実施されました。参加者総数は285名となりました。本学会では初めての完全オンライン形式ということでご心配もされたかと思いますが、おかげさまで、大きなトラブルは1つもなく、活発な熱い議論が終始展開されました。全ての参加者、発表者、講演者、座長、ウェビナーのオーガナイザーの方々、また賛助いただいた団体・企業の方々に厚く御礼申し上げます。今回はコロナ禍のため社会状況が変動する時期と重なり、開催の経緯には本来いろいろとご報告すべきことがあるのですが、ここでは紙面の限りもありますので、結果的な部分についてご報告させていただきます。

まずオンライン開催にあたって、アカデミックプログラムの実施様式についての検討に時間を費やしました。オンライン会議では、現実感の低下、効率的なコミュニケーションや人間的交流の阻害、情報のセキュリティなどが問題となります。まず情報のセキュリティについてはすでに先行していた海外のオンライン学会などの方式を取り入れました。決して完全ではありませんが、実際的にはほとんどのオンライン学会が同様の方式で開かれています。活気あるオンライン年會とするため、「臨場感」「ライブ感」「双方向同時コミュニケーション」「柔軟な発表形式」の実現を重要方針として掲げました。そしてこれらの条件にできるだけ見合い、かつ、運用面でも合理的なオンラインシステムとして、口頭発表ではZOOM、ポスター発表ではLINC BizとZOOMとを併用する形式を採用しました。LINC Bizは、発表一覧の作成、発表資料の多様性、慣れれば実際のポスター会場の様にも思える簡便な掲示・閲覧法、コス

トなどに優れており、「柔軟な発表形式」には最適でした。一方、双方向コミュニケーションの方ではchatを採用しており不便さがあります。そこで「臨場感」「ライブ感」「双方向同時コミュニケーション」を支えるためZOOMとの併用としました。ここでは通信キャパシティーの問題に心配もありましたが、実際はその様な問題は起こらず幸いでした。

並行して、本学会の特長を生かすため、年會の全体様式は例年通り、一会場での口頭発表、および、ポスター発表としました。口頭発表では、質疑応答は口頭で行うこととしました。質問者は発表時間中にchatで「質問」と書いて送るだけで、質疑応答の時間に座長に指名していただきました。そこで質問者はマイクオンにして質疑応答となります。この方式で問題なく、活発な討論ができました。「臨場感」のため、参加者の方々にも「カメラオン(顔出し)」をお勧めしました。現地での学会でも、発表者が講演中に参加者のお顔を認識できるのは前列のせいぜい数列くらいです。数名でもカメラオンにしてくれば、それに近づくという思惑でした。ここでも通信キャパシティーの心配もありましたが、実際は全く問題ありませんでした。かつて慶応大で行った年會では当時の板谷年會長が、拍手が大事と力説し私も共感しました。しかし多くの参加者の拍手を音声で送ることはZOOMでうまくできません。カメラオンもせっかくなしていただいても、ZOOMの画面に入る上位に来るとは限りません。このあたりはオンライン会議システムの進歩に期待したいところです。

現地開催の学会では、口頭発表の合間の休み時間に、参加者が発表者をつかまえて質問したり、発表者を取り囲んで討論が進むことがあります。その様なイメージで、口頭発表のセッションごとにZOOMブレイクアウトルーム(個別の小会議室)を活用した「ブレイクアウトディスカッション」の時間を設けました。とても多くの方々が積極的にここに参加していただきました。ポスター発表でも同じですが、オンラインでは、この様なグループディスカッションで参加人数が現地開催より多く取れます。ディスカッションに参加するチャンスも増えますし、またそこで理解や考察も深まるので聞いているだけでも面白かったとか、現地開催の場合より画面が見やすく討論も聞き取りやすいという感想も聞きました。また追加で参加者が自由に使えるブレイクアウトルームも複数設け、交流促進や打ち合わせに利用していただきました。



ポスター発表では発表資料本体の形式も、オンラインシステム（LINC Biz）が可能な範囲で自由としました。資料説明や質疑応答は ZOOM によるライブです。なるべく多くの時間を双方向の自由討論に向けるため、ポスター発表のショートトークは取りやめ、代わりにオンラインの柔軟な発表形式を生かして graphic summary を 1 枚スライドで投稿していただくこととしました。さらに多くの発表者が発表資料本体に加え、発表の動画を投稿してくれました。動画については、あえて任意としておりました。しかし実際はそれでも多くの動画の投稿があり、今後のオンライン年会の実施について参考になることでしょう。事前に発表動画を閲覧することで、当日の討論にもスムーズに参加できるメリットは大きいと実感しました。ほとんどの発表者は動画と当日の発表とで内容的にうまく使い分けており、両方を聴講する意義も十分感じました。異なるポスターの巡覧でも、ZOOM の切り替えも含め、大きな不便を感じるほどの問題はありませんでした。ポスター賞にも、多くの発表のエントリーがありました。その選考には、例年どおり参加者の投票を設けました。

若手賞、奨励賞の受賞講演は計 5 名の会員によって行われました。昨年度は受賞講演もありませんでしたので、5 名のうち、2 名は昨年度の受賞者です。多数の聴衆がカメラオンで参加いただきました。懇親会がないので受賞講演にも質疑応答の時間を設け、交流の機会としました。

ポトムアップのシンポジウム企画として、夜の時間を活用して、公募ウェビナーを行いました。オーガナイザー（学会員）のおかげで、本学会に属さない先端研究者の講演や外国人研究者による英語での講演など、学際性、国際性を補強する有意義なセミナーを実施することができました。タイトなスケジュールとなったにも関わらず、ここでも多くの方が参加され活発な討論が繰り広げられました。

まだいろいろな対応や、アカデミックプログラム以外の部分でも、今回は特別に対応しなくてはならないことが多々ありましたが、紙面の制約もありますのでここでは割愛させていただきます。

最後になりましたが、今回の年会実施は、仁木会長（当時）、年会組織委員、および、オンライン開催検討委員の皆様のご多大なご尽力無くしては、到底不可能でした。特に組織委員の川上先生、尾崎先生には、年会ホームページや参加募集システムの設定・運営から当日の ZOOM、LINC Biz の管理・運用まで、全ての実務のため大変なご尽力をいただきました。その過程で色々なアイデアも出させていただきました。この場を借りて改めて御礼申し上げます。そして年会に参加された皆様の大いなる発展を願っております。

## 学会員の最新の論文紹介コーナー

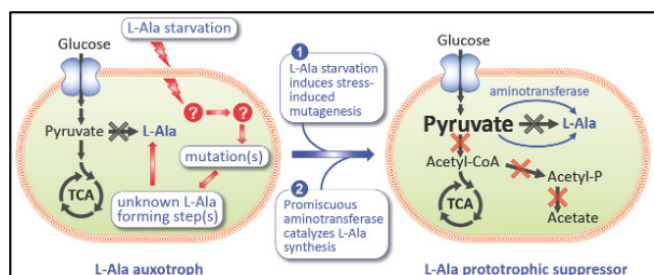
### L-alanine prototrophic suppressors emerge from L-alanine auxotroph through stress-induced mutagenesis in

*Escherichia coli*

三嶋 玄隆、渡邊 裕一、内ヶ崎 啓、下田 蒼、関 翔太、  
熊谷 俊高、野地 智法、安藤 太助、米山 裕

**Microorganisms** 9(3): 472 (2021)

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030472> (Open access)



現在のライフサイエンスの著しい発展を支える知識と技術の基盤は細菌の研究に負うところが大きい。アミノ酸代謝も例外ではなく、アミノ酸合成経路のほぼ全ては細菌の栄養要求性変異株の分離とその遺伝学的・生化学的研究から解明されてきた。しかし、興味深いことに解糖系産物であるピルビン酸の一段階アミノ化反応で生成する L-alanine (L-Ala) の合成経路は 21 世紀に至るまで L-Ala 要求性変異株が分離されていなかったことから不明であった。著者らはこれまでの遺伝学的な手法を用いる研究で L-Ala 要求性変異株の分離に成功し、大腸菌の L-Ala 合成酵素は 3 つのアイソザイム (AvtA, YfbQ, YfdZ) であることを明らかとした。

それに続く本研究において、1) L-Ala 要求性変異株から出現する L-Ala 非要求性サプレッサー変異株は、自然突然変異より遙かに高い頻度で生じるストレス誘導性突然変異によって出現すること、2) 40 株のサプレッサー変異株ゲノムを解析した結果、ピルビン酸脱水素酵素 (16 株) と酢酸生成 (PTA-ACK) 経路 (18 株) を構成する酵素遺伝子に点変異をもつクローンが大半を占めること、3) それら変異酵素の活性は低下していることを明らかとした。

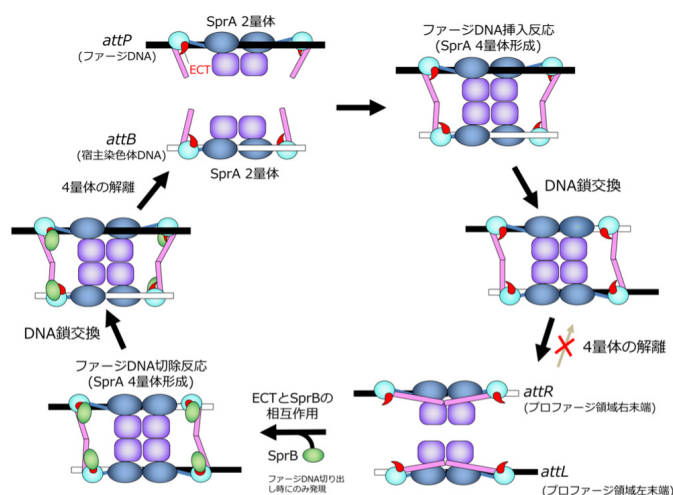
以上より、これらのサプレッサー変異株は、L-Ala 飢餓ストレス感知後突然変異頻度の上昇が起り、細胞内ピルビン酸レベルの上昇をきたす突然変異導入の結果、本来 L-Ala を合成しない promiscuous enzyme が関与する multicopy suppression に関連した現象によって出現したことが明らかとなった。

### Extreme C-terminal element of SprA serine integrase is a potential component of the “molecular toggle switch” which controls the recombination and its directionality

安部 公博、高橋 匠、佐藤 勉

**Molecular Microbiology** 115(6):1110-1121 (2021)

<https://doi.org/10.1111/mmi.14654>



溶原性 phage において、溶原サイクルにおける phage DNA の宿主 genome への挿入反応と溶菌サイクルにおける切り出し反応は、phage integrase と呼ばれる site-specific DNA recombinase が担う。挿入 / 切り出しの反応の方向性は厳密に制御されているが、その機構は不明な点が多い。

本研究において、枯草菌溶原性 phage SPβ にコードされる phage integrase である SprA は、単独では挿入反応のみを、SprA の C 末端 (Extreme C-Terminal region; ECT) に低分子量タンパク質 SprB が結合すると、切り出し反応のみを触媒することを明らかにした。また、ECT は、SprB 非存在下では、挿入反応における SprA 4 量体形成を安定化することで、反応性を向上させる働きがあることがわかった。今回得られた知見は、溶原性 phage の生活環の理解だけでなく、宿主遺伝子内に挿入された溶原性 phage 様配列の切り出しによる遺伝子再編成のメカニズムの解明にも大きく寄与する。

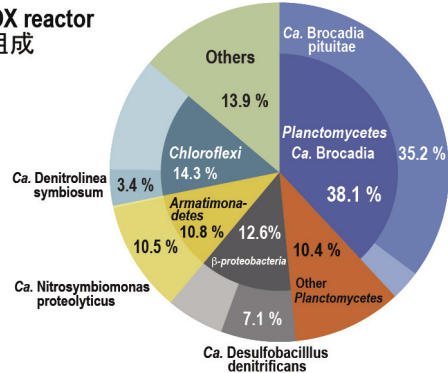
## The physiological potential of anammox bacteria as revealed by their core genome structure

大久保 卓、豊田 敦、福原 康平、内山 郁夫、  
針ヶ谷 優生、黒岩 恵、鈴木拓磨、村上由夏、諏訪 裕一、  
高見英人

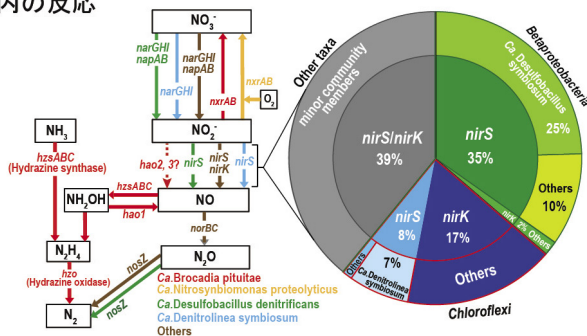
DNA Research 28 (1): dsaa028 (2021)

<https://academic.oup.com/dnaresearch/article/28/1/dsaa028/6046978?searchresult=1> (Open access)

### ANAMMOX reactor の菌叢組成



### ANAMMOX reactor 内の反応



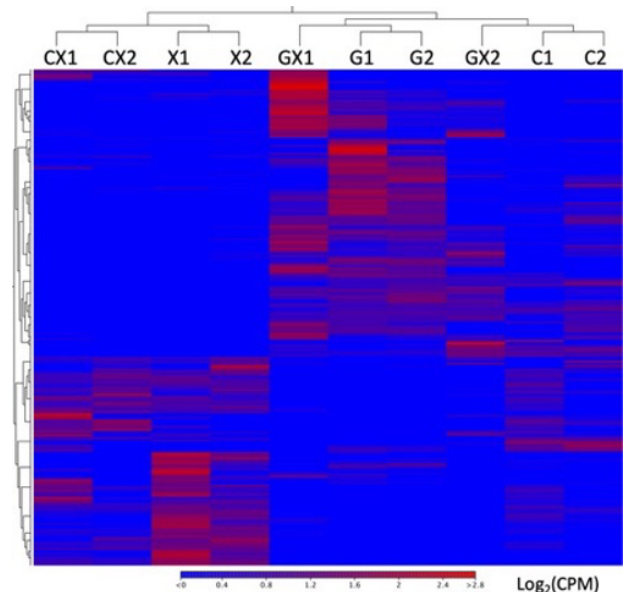
嫌気性アンモニア酸化反応による (anammox) 窒素除去リアクターのメタゲノムから anammox 細菌 *Ca. Brocadia pituitae* 及び共存する亜硝酸酸化細菌と NO reductase を欠く 2 種の不完全脱窒菌のゲノムを全解読した。NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の NO への還元は anammox の最初のステップであるが、*Ca. B. pituitae* は、この反応を担う nitrite reductase 遺伝子 (*nirK*, *nirS*) を欠いていた。*Ca. B. pituitae*、*Ca. Kuenenia stuttgartiensis* 及び完成度の高いゲノムを持つ 6 種の anammox 細菌との比較ゲノム解析により 1,152 の連続的な並びのオーソログからなるコアゲノムを定義した。しかし、他の *Brocadia* 2 種に検出された *nirK*, *nirS* はコアに含まれておらず、これらの遺伝子は複数の系統からの水平伝播により獲得されていた。一方、これら以外の nitrite reductase の候補遺伝子 (*hao2*, *hao3*) を含む少なくとも 5 つの NH<sub>2</sub>OH oxidoreductase のパラログがコアに含まれていた。また、Metatranscriptome 解析の結果、メタゲノム中に存在する不完全脱窒菌由来の多くの *nirS*, *nirK* 遺伝子や、*Ca. B. pituitae* の *hao2*, *hao3* 遺伝子の発現が確認された。したがって、*Ca. B. pituitae* は、不完全脱窒菌から供給される NO だけでなく、自己産生による NO や NH<sub>2</sub>OH も anammox 代謝に利用可能と考えられた。

## Transcriptome profile of carbon catabolite repression in an efficient l-(+)-lactic acid-producing bacterium *Enterococcus mundtii* QU25 grown in media with combinations of cellobiose, xylose, and glucose

志波 優、藤原 治子、沼口 真緒、Mohamed Ali Abdel-Rahman、鍋田 啓介、兼崎 友、田代 幸寛、善藤 威史、  
田中 尚人、藤田 信之、吉川 博文、園元 謙二、  
門多 真理子

PLoS ONE 15(11): e0242070. (2020)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242070> (Open access)



真正細菌は一般に、混合糖存在下でその同時消費を妨げるカーボンカタボライト抑制 (CCR) を示すが、*Enterococcus mundtii* QU25 株は、セロビオースとキシロースからの同時乳酸発酵が可能である。本研究では、単糖条件 (G: グルコース, C: セロビオース, X: キシロース) と混合糖条件 (CX, GX) で培養した QU25 株のトランスクリプトーム解析を行い、セロビオース存在下でのキシロース代謝遺伝子群の発現プロファイルを明らかにした (上図)。その結果、セロビオースとキシロースの混合糖条件の発現プロファイルは、キシロース単糖条件に類似している一方、キシロースオペロンに対する弱い転写抑制が認められた。本研究結果は、遺伝子改変による QU25 株の混合糖の同時乳酸発酵能のさらなる改良につながる事が期待される。

## A specific combination of dual index adaptors decreases the sensitivity of amplicon sequencing with the Illumina platform

広瀬 侑、塩崎 拓平、濱野 樹、吉原 静江、徳本 勇人、浴 俊彦、原田 尚美

DNA Research 27(4): dsaa017 (2020)

<https://doi.org/10.1093/dnares/dsaa017> (Open access)

Illumina 社の MiSeq は、比較的長いリードをシーケンスできるため、菌叢解析においてよく使われています。Illumina 社のシーケンスでは、デュアルインデックスによって識別した複数のライブラリをプールし、1 度にランを行います。中でも、Nextera XT Index kit ver. 2 は Illumina 社の公開プロトコル ([https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)) でも紹介されるなど、広く使われています。私達は、Nextera 型のアダプター配列を有するライブラリにおいて、N704/S507 のインデックスを組み合わせると、得られたシーケンスのクオリティが低下することを見出しました (図)。この現象は、大腸菌ゲノム DNA のシーケンスでも見られたことからインサート配列とは無関係でした。豊橋技科大と大阪府立大の装置で同じ現象が見られたことから、装置固有の問題ではありませんでした (図)。N704 もしくは S507 いずれか一方のインデックスを使用した時にはみられないことから、インデックスの組み合わせによって生じる現象で、ライブラリの両端に相補的な配列が出現することが原因であると考えられました。この影響を QIIME2 を用いた菌叢解析で評価したところ、低頻度配列がノイズ除去の過程で失われてしまい、多様性を正しく評価できないことがわかりました。菌叢解析はゲノム解析や RNA-Seq 解析と比べて、リードのクオリティが解析結果に大きな影響を与えるため、特定のインデックスやプライマーの組み合わせが悪影響を与える可能性があります。ユーザーサイドでの対応策として、各サンプルで得られたリードのクオリティチェックが重要です。

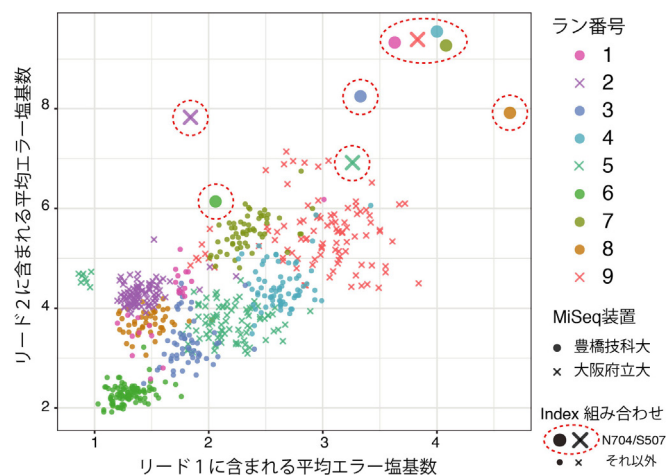


図. MiSeq の 9 回分のランにおけるエラー率の比較 (論文より引用)

## Protocols for monitoring harmful algal blooms for sustainable aquaculture and coastal fisheries in Chile

鎗水 京子、藤吉 奏、丸山 史人

Int. J. Environ. Res. Public Health 17 (20):7642 (2020)

<https://doi.org/10.3390/ijerph17207642> (Open access)

赤潮は、プランクトンの異常増殖により引き起こされる水域汚染を指し、世界的な現象である。しかしながら赤潮を早期警告するための海水モニタリング手法は、未だ標準化が進んでいない。本論文は、物理的、化学的、微生物学的、分子生物学的な様々な分析方法を統合し、赤潮モニタリング手法として標準化したものである。特に、将来的な赤潮発生機序の解明に資することを期待し、大規模モニタリングには煩雑な 16S, 18S rRNA 遺伝子の amplicon sequencing を盛り込んでいる点が特徴である。現在、日本とチリにおける国際共同研究プロジェクトのメンバー全員が、このプロトコルに従ってフィールド調査と分析を実施している。この標準化されたプロトコルは、世界中の有害赤潮藻類研究者に有益で広く活用されることが期待される

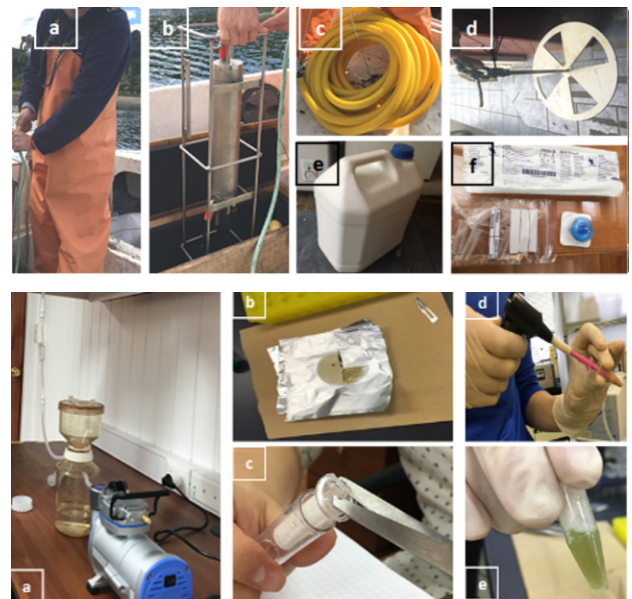


図. 赤潮モニタリングに必要な機材やサンプルの準備方法を示す (論文より引用)

「論文紹介コーナー」での論文紹介を希望される方は、研究内容を表す 1 枚のイラストと簡単な説明を、下記の編集担当までお送りください (迷惑メール対策のため [at] を @ に変換してください)。みなさまからのたくさんの原稿をお待ちしております。

大坪 嘉行 [yohtsubo\[at\]jige.tohoku.ac.jp](mailto:yohtsubo[at]jige.tohoku.ac.jp)

佐々木 裕子 [yuko\[at\]nih.go.jp](mailto:yuko[at]nih.go.jp)

佐藤 勉 [t-sato\[at\]hosei.ac.jp](mailto:t-sato[at]hosei.ac.jp)

広瀬 侑 [hirose\[at\]chem.tut.ac.jp](mailto:hirose[at]chem.tut.ac.jp)

相馬 亜希子 [soma\[at\]chiba-u.jp](mailto:soma[at]chiba-u.jp)

実験レシピ紹介コーナー第3回

イルミナシーケンスライブラリー、  
ハイブリッド型のススメ

大坪 嘉行

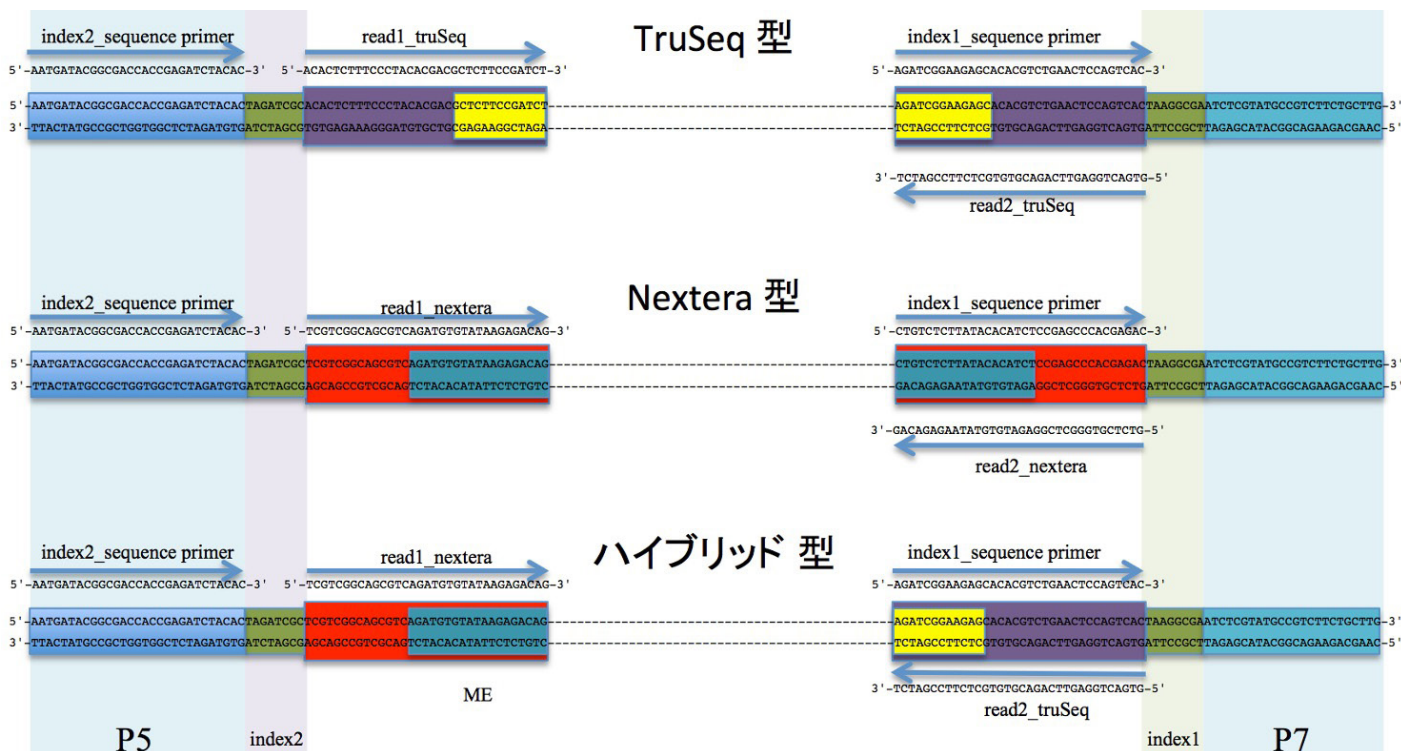
東北大学 大学院 生命科学研究科

イルミナシーケンスライブラリーの構成の話です。イルミナ社のシーケンサーでシーケンス可能なライブラリーの両端のアダプター配列は、2通りが可能です。1つは TruSeq 型(図上)、もう1つは Nextera 型(図中央)です。実際の配列は図のようになっています。よく使われる 2-step PCR 法では、1 回目の PCR で、TruSeq 型(紫色部分)もしくは Nextera 型(赤色部分)の配列を付加したプライマーで標的の DNA 配列を PCR によって増幅します。続いて、P5 もしくは P7 配列と Index 配列(黄緑色)を持ち、TruSeq 型(紫色部分)もしくは Nextera 型(赤色部分)にアニールするようなプライマーを用いて、2 回目の PCR によって増幅します。以上により、図のような配列を有するライブラリーが調製できます。

ここで注目したいのは、TruSeq 型の場合は末端 13 塩基(図上、紫色中の黄色の部分)が、Nextera 型の場合は末端 19 塩基(図中央、赤色中の緑色の部分)が、inverted repeat の関係になっているということです。inverted repeat になっているのは、ゲノム DNA や RNA のシーケンスの際、断片化したインサー

ト DNA にアダプターを酵素的に結合させるのに必要(TruSeq では Y 字アダプター形成、Nextera では Tn5 transposase の認識配列)だからであって、シーケンシングそのものには必要ありません。むしろアンプリコンシーケンシングの時などは、末端が同じなのは PCR 増幅する上で望ましくないかもしれません。例えば、Nextera 型のアダプターではインデックスの組み合わせによっては(N704 と S507)、取得リード数やクオリティに悪影響があることを広瀬さんが示していますが(Hirose et al. 2020 DNA Res)、末端が inverted repeat になっていることと関係がありそうです。

アンプリコンシーケンスでは、標的のインサート DNA に PCR によってアダプターを付加するため、P5 と P7 側の配列は別々に設計することが可能です。差し障りがないなら、P5 側の配列を Nextera 型、P7 側の配列を TruSeq 型のハイブリッド型(図下)にしてしまうと良いのではないのでしょうか?(実際読めます)。なお、このようなハイブリッド型のライブラリーでも読めるのは、イルミナ社のシーケンスにおいて、2 種類のシーケンス用 primer の mixture が使われているからだと思われます。TruSeq 型と Nextera 型のライブラリーを混合してシーケンスすることができるのも、これが理由と思われる。図中、index1 と index2 の配列部分は、他の Index kitなどを参考に置き換えてください。また、イルミナ社の資料では、index 1 (P7 側: index i7 とも言う)と index 2 (P5 側: index i5 とも言う)が間違えて入れ替わって描かれているものがありますのでご注意ください(以前、イルミナ社にご連絡したのですが、間違えているものがまだ出回っているようです)。ご参考になれば幸いです。



イルミナシーケンスにおいて、上記の矢印の部分にプライマーがアニールし、read1、index1、index2、read2 の順でシーケンスが進行します。primer のアニーリングの向きは、read 2 だけが逆向きです。この絵の PDF データは私が開発した SeqView を使用して作成しました。SeqView データは [こちら](#) からどうぞ。

## 閑話休題 - その11 - 春に咲く花々

今年はいままでのところ新型コロナの緊急事態宣言のためどこにも出かけず、ほぼ自宅に留まっていた。それでも3月はじめには六甲山の一角で今まで果たせなかったマンサクの花の写真を撮ることができました。オトメスマレという可愛い名前がスミレは、どこにでもあるタチツボスマレの品種で、白い花がきれいです。また、ホタルカズラは六甲山では今年初めて見つけました。モチツツジは六甲山の至る所に咲くツツジで、名前の由来は花の根元がねばねばするからでしょう。(磯野 克己)



マンサク (マンサク科)  
*Hamamelis japonica* Sieb. et Zucc.,  
2021.3.8 六甲山



ハコベ (ナデシコ科)  
*Stellaria neglecta* Weihe  
2021.3.1 神戸市



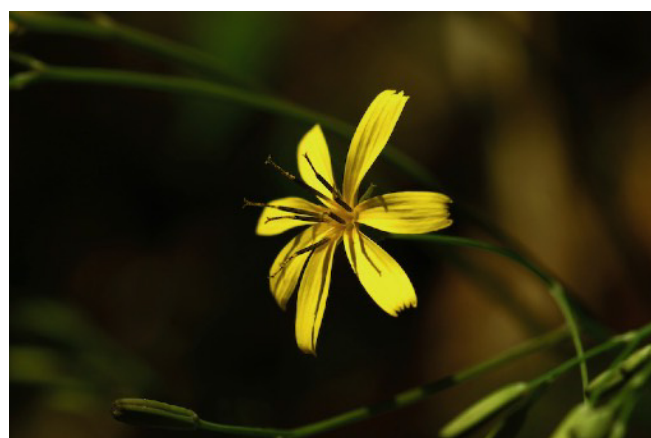
オトメスマレ (スミレ科)  
*Viola grypoceras* f. *purpurellocalcarata* (Makino) Hiyama  
2020.3.11 神戸市



モチツツジ (ツツジ科)  
*Rhododendron macrosepalum* Maxim.  
2020.4.27 六甲山



ホタルカズラ (ムラサキ科)  
*Lothospermum zollingeri* A.DC.  
2021.4.26 六甲山



ニガナ (キク科)  
*Ixeridium dentatum* Tzvelev.  
2021.4.26 六甲山



## 学会の動向

## 第16回日本ゲノム微生物学会

## 年会のお知らせ

塩見 大輔

立教大学 理学部 生命理学科

第16回日本ゲノム微生物学会年会を2022年3月2日(水)から4日(金)の3日間開催致します。本原稿執筆時点(2021年5月10日)では対面開催とオンライン開催または、ハイブリッド開催のいずれの可能性についても考えた準備をしております。対面開催の場合は、立教大学池袋キャンパスにて開催致します。立教大学は、東京・池袋駅西口から徒歩10分程と、大変便利なところにあります。立教大学での年会開催は、2012年の第6回大会(年会長:河村富士夫先生)以来10年ぶりとなります。再び、会員の皆様を立教大学にお迎えできることを嬉しく思います。

昨年来のコロナ禍により、2020年の第14回名古屋大会は中止(年会は成立)となり、2021年の第15回九州大会はオンラインによる開催となりました。2022年の第16回大会が対面での開催が可能な場合、口頭発表は600名程度収容できる大教室で行い学内の複数の教室へも配信する、ポスター会場は十分なスペースを確保する、などして、できるだけ密を避けて開催する計画です。しかし、新型コロナ感染症の状況によっては再びオンラインまたはハイブリッド開催での開催になる可能性もあります。学会における年会の重要な機能のひとつは、会員間の交流と、そこから生まれる共同研究など、新たな研究の創出や発展であると考えられます。どのような開催形式になろうとも、参加者間のインタラクティブな交流を可能な限り高めるような工夫をしていきたいと考えています。

今後の開催方式などは決定次第速やかに、学会ホームページなどを通して、会員の皆様へ情報発信していきます。年会開催にあたって会員の皆様のご理解とご協力を頂けましたら幸いです。そして、このような状況下ではありますが、できるだけ多くの会員の皆様にご参加頂けますよう、心から願っております。

## 第16回日本ゲノム微生物学会年会

日程:2022年3月2日(水)から4日(金)

開催場所:立教大学池袋キャンパスでの現地開催、オンライン開催、もしくはハイブリッド開催を検討中

年会長:塩見 大輔

組織委員:関根 靖彦、末次 正幸、笠井 大司、鈴木 祥太、野崎 晋五、向井 崇人

## 2021年度日本ゲノム微生物学会役員

会長:黒川 顕

庶務幹事・会計幹事:大島 拓、渡辺 智

集会幹事:河野 暢明、森 宙史

広報幹事:矢原 耕史、大島 拓

ニュースレター幹事:

佐藤 勉、相馬 亜希子、大坪 嘉行、佐々木 裕子、広瀬 侑

男女共同参画幹事:相馬 亜希子

評議員(会長推薦を含む):朝井 計、跡見 晴幸、飯田 哲也、

岩崎 渉、大西 康夫、永田 裕二、仁木 宏典、布浦 拓郎、

野尻 秀昭、林 哲也、本郷 裕一、南澤 究、市川 夏子、

大林 龍胆、神沼 英里、島田 友裕、

会計監査:阿部 貴志、伊藤 武彦

## 会員の動向

一般会員 347名、学生会員 158名、名誉会員 3名

賛助会員 12名、機関会員 1名(計 521名)

## 編集後記

22号のニュースレターより、AdobeのInDesignというソフトを使って編集を進めています。このソフトは便利なのですが多くの機能があり、使い方を習熟するまでに少し時間がかかりそうです。例えば、原稿Wordファイルのテキストを、InDesignの編集画面にコピーすると、イタリックなどの書式が保持されないため、1つ1つの単語の書式を手作業で直していました。よく調べてみると、Wordで書式を整えた後に、ファイルを配置するという方法を使えば、元の書式が維持されることがわかりました。また、著者の皆さんは原稿の図をWordファイルに貼り付けてくださることが多いのですが、解像度の高い図を入れるためには、貼り付けられた図を一度書き出す必要があります。そのときの解像度も、Wordでの図の大きさに依存するので、いくつか検討しています。この作業は手間なので、次号からは図のファイルを別添してもらいたいと思っています。編集作業は手探りで進めていますので、もしかすると細かいミスなどあるかもしれませんが、どうかご容赦ください。

一方で、論文紹介コーナーを新設したり、年会での受賞者の人数が増えたことで、ニュースレターのボリュームが増え、編集作業の負担は大きくなっています。受賞には至らなかったけれどもニュースレターに掲載する価値のある発表を紹介してはどうか、というアイデアも出ましたが、実現には至っていません。ニュースレターの編集は、Slackで情報共有しながら、編集委員の佐藤さん、相馬さん、大坪さん、佐々木さんと一緒に時間を作って作業をしています。もしかすると、編集委員を増やしたほうがよいのかもしれませんが、もしご興味ある方いらっしゃいましたら、ぜひお声がけください。(広瀬)