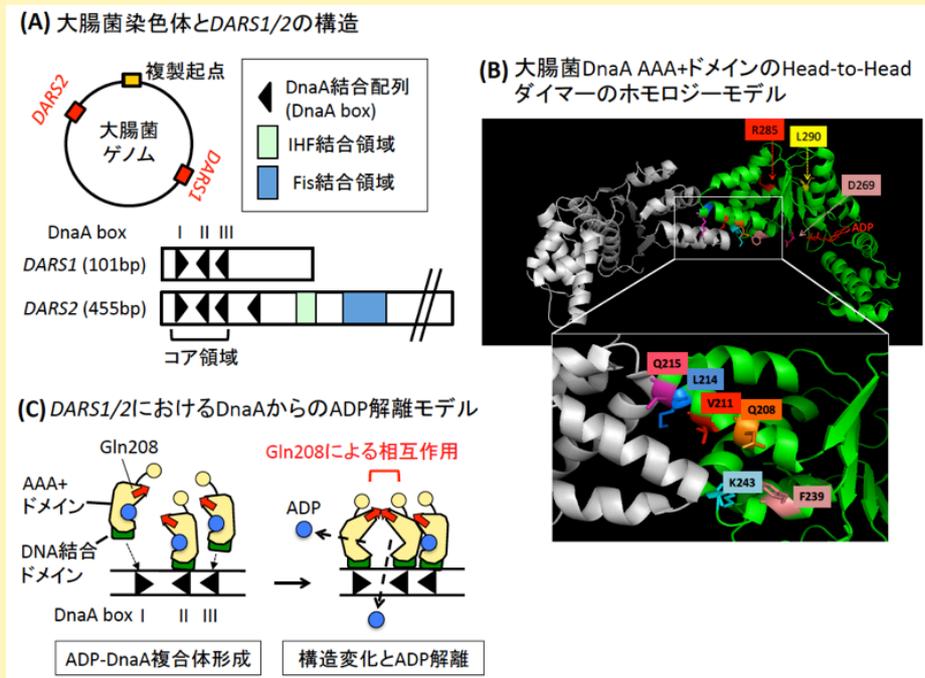


日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

大腸菌ゲノム非コード領域*DARS1/2*による複製開始タンパク質DnaAの活性化機構

三善 賢弥、片山 勉 (九州大学薬学研究院/薬学府 分子生物薬学分野)

DnaAタンパク質はゲノム複製の開始複合体の主要因子であり、ATP/ADPと結合するAAA+ドメインをもつ。開始複合体では、AAA+ファミリーの原則どおり、ATP-DnaAはHead-to-Tail型結合によって安定なオリゴマーを形成する。大腸菌細胞内では、複製開始活性をもたないADP-DnaAが多くを占めるが、複製開始直前のタイミングで、複製開始活性をもつATP-DnaAに変換される。当研究室では、ADP-DnaAがゲノム上の非コード領域*DARS* (DnaA-Reactivating Sequence) *1/2*において動的な複合体を形成し、ADPを解離することを明らかにしていた(図A) (Genes Dev. 2009)。生じたapo-DnaAは*DARS*複合体から解離し、ATPと結合する。しかしながら、ADP-DnaAによる*DARS*複合体形成とADP解離の分子機構は不明であった。*DARS1/2*ではADP解離に必須な3つのDnaA結合部位 (DnaA box)のうちbox IとIIが対向している(図A)。今回、この部位においてDnaAのAAA+ドメイン間でHead-to-Head型複合体が形成され、ADP解離を導くことが示された(図B, C)。これらの結果から、DnaAを活性化する分子機構に加え、AAA+ドメインの新規な相互作用機構とその機能が示された(Sugiyama, Kasho, Miyoshi, Ozaki, Kagawa, Kurumizaka, and Katayama, Nucleic Acids Res. 2019; F1000Prime推薦)。



(A) *DARS1/2*のDnaA box I-IIIは、ADP解離に必須な共通コア領域となっている。*DARS2*では核様体タンパク質IHFとFisの結合が活性を促進する。
 (B) 好熱菌DnaAダイマーの結晶構造 (PDB : 2Z4R) を基に作成。全体図と相互作用領域の拡大図を示す。
 (C) DnaA box IとIIにHead-to-Head型で結合したDnaA分子からのみADPが解離する。この過程にはHead-to-Head型の相互作用界面に位置するGln208残基が重要であった。

ゲノム微生物学分野の研究動向1

合成ゲノムを細胞に導入する潮流： 世界を変える接合伝達システム

板谷 光泰

高機能遺伝子デザイン研究技術組合 (TRAHED)

ゲノム合成センター長

【はじめに】

ゲノムを“合成”して研究する動きが加速している。20世紀には、ゲノムは「調べて学ぶ」対象であった。ゲノムをつくれる（複製できる）のは生物だけで、通常の遺伝子工学の手法では不可能。ゲノム全合成などSF世界の話だった。21世紀、ゲノムは「作って学ぶ」対象になり、今やサイエンスの現実的なパイオニア研究課題になった。対象ゲノムも、単細胞微生物から動物、植物まで拡大する動きを見せている。まもなく、ゲノムは一から設計し設計図通りのゲノムを合成して調べる時代になるだろう。ゲノムの完全合成手段が提示されたからである。筆者は、30年以上に亘ってゲノムに接し、巨大DNAの扱いを常時考え、できることは実践してきた。そして、ゲノムを合成して目的細胞（シャーシと呼ぶ）に導入し、再起動までの一気通貫システムの目途が立ち、汎用的なプランを提案できるまでになった。本稿では、現場の一研究者が見てきた回顧録ではなく、今後数年にわたるゲノム合成の予定、予測も交えて紹介したい。特に本稿のキーワード「接合伝達システム」は、若い研究者にはなじみが薄い現状を考慮して紙面の許す限り詳細に紹介したい。

ゲノムは合成するのはまだまだ大変な作業であるが、所望のシャーシに導入してゲノムに含まれる遺伝子群の再起動までを検証することが目標であり、それによってゲノム機能の本質理解にも到達すると期待される。なお文献は、本文の語句で検索が難しいものに限定させていただいた。

【ゲノム合成の潮流】

ゲノムは合成できる時代になったようだ。例えばネットで「ゲノム合成」で検索するとゲノムはいとも簡単に合成できるのではないかとの2次情報があふれており、正確な相互理解のためには“ゲノム”を定義しておくのが有効である。筆者は、“合成対象としてのゲノム”を500 kbp以上のサイズ（線状、環状は問わない）で定義した[1, 2]。図1にサイズに依存するDNA合成の概略を示した、遺伝子工学での短鎖DNA (<10 kbp) 調製法の確立、長鎖DNA (50~200 kbp) 調製による多数の遺伝子を一括して扱う概念と実践、さらに超長鎖(>500 kbp)と呼んでもよいゲノム合成までである。短鎖DNAとは、大腸菌での汎用的な遺伝子工学で調製できるいわゆる組み換えDNAである。日常の研究現場で扱える数個の遺伝子を含む概ね10 kbp以下であり、ボルテックスでの攪拌、エタノール沈殿等の過酷な取り扱いにも安定であり、初心者でも問題なく取り扱える。短鎖DNAの調製は天然のDNA（鋳型）からPCR法等の工夫で済むことが多いが、天然に存在しない、つまり鋳型のない新規に設計した短鎖DNA合成は化学合成からスタートするのでコストとの折り合いになる。先に言ってしまうと、実は図1の裏にあるのがコストの課題であり、そこが克服されれば長鎖DNAもゲノム合成ももっと気軽に手の届く技術になるのは間違いない。

長鎖DNA (50~200 kbp) は利用がようやく研究現場の日常になりつつある。多数の遺伝子をひとまとめにして細胞に導入できる効果は、特に代謝系の遺伝子群を対象とした代謝工学で成果が得られている。Golden Gate, Gibson Assembly, OGAB法, RCR法に代表される長鎖DNA合成に共通するアイデアは多数の短鎖DNAの“in vitroでの連結”である。ではゲノム合成は長鎖DNAを連結すればよい？その通りであるが以下に述べるように、長鎖DNAより大きなDNA >200 kbpは水溶液中で擦り切れ損傷するつまり、in vitroでの連結そのものが不可能である。一言でいうと“長鎖DNAのin vitroでの安定した操作”は大変困難であるから、さらに巨大なゲノム合成はin vivo(細胞)で連結するしかない。

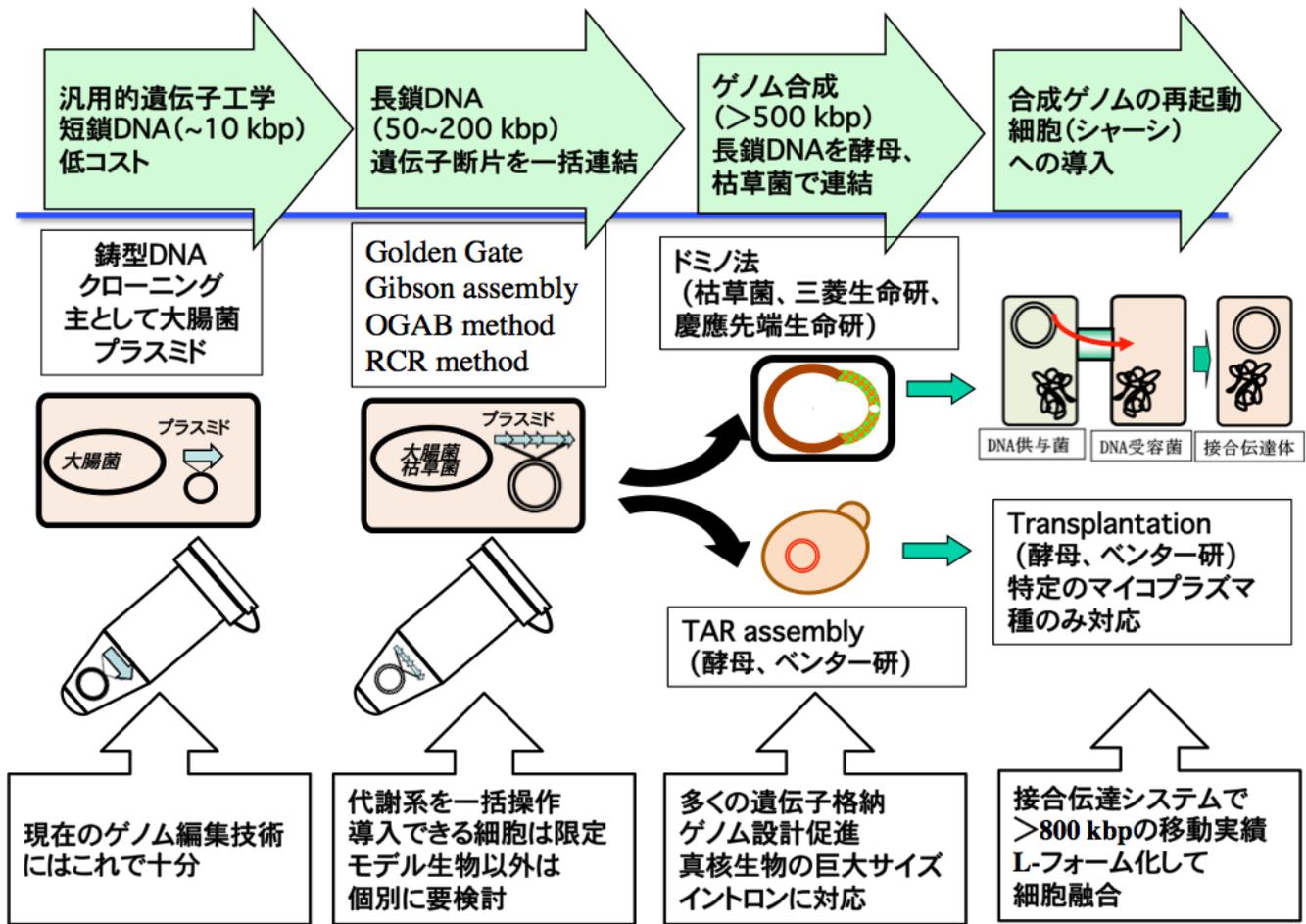


図1 サイズに対応するDNA操作法の概略。

【ゲノム合成は長鎖DNA合成とは異なるテクノロジーである】

線状高分子であるDNAは水溶液中で擦り切れるのは物理化学的な宿命であるが、10 kbp程度の短鎖DNAサイズなら支障は目立たず問題はない。サイズが50 kbpを超える長鎖DNAになると、擦り切れる割合が高くなりマイルドな操作法が必須になる。さらに100 kbpを超えると収率が減少し、200 kbpを超えると水溶液中での操作は事実上不可能になる。したがって100 kbp以上のDNAを日常的に安定に合成、操作するには、擦り切れ損傷から守ってくれる細胞内で行う以外にない。その条件を満たす宿主細胞として筆者の枯草菌とベンター研究所の酵母が開発された。大腸菌ではだめなのかと頻りに聞かれる。大腸菌のBACベクターでのゲノム合成は、過去に少なくとも数グループが取り組んでいた。しかしながらBACが大腸菌で安定に保持できるDNAサイズに上限がある (<450 kbp) ことが明らか

になった2004年頃までに、すべてのグループが大腸菌から撤退した。500 kbpを超えるゲノムの合成には大腸菌以外の細胞システム、つまり長鎖DNAをうまくつなぎ合わせる細胞システムが必須である。ゲノム全部を合成するにはどうしても生物の手を借りるしかない。どんな生物でもよいかというとそう簡単ではなく図1に示した、枯草菌と酵母に集約された。

【酵母でのゲノム合成、ゲノム移動】

酵母を宿主とするゲノム合成はベンター研究所（以下JCVIと称する）が開発した。JCVIは、マイコプラズマゲノムを完全にカバーするDNA断片から再構築して最終的に酵母で環状DNAとして合成した[3]。合成したゲノムが機能するかは、他の細胞（シャーシ）に導入して再起動させられるかを調べる必要がある。合成ゲノムは「in vitroに取り出せない」ので、移動させるには新規な手法が必要である。JCVIでは酵母から取り出すマイコプラズマゲノムを、溶液ではなくアガロースゲルに閉じ込めて損傷から保護し、近縁のマイコプ

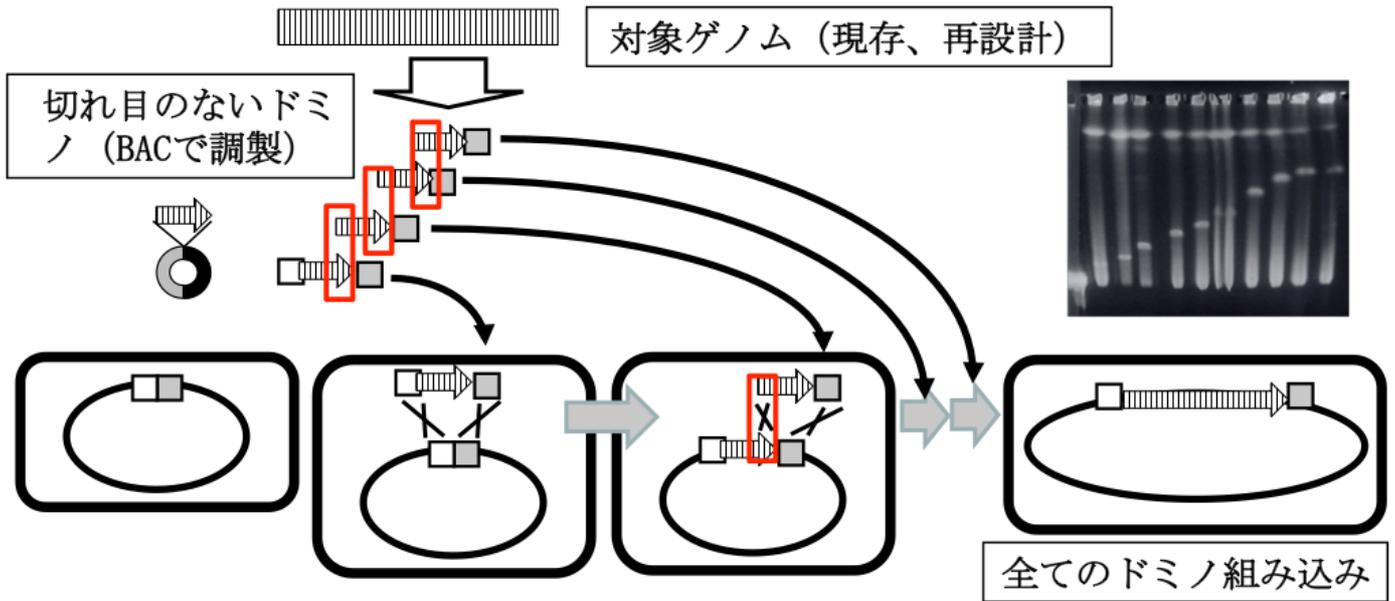


図2. BGMvでのゲノム合成法 (ドミノ法) 概要。

対象DNA を完全にカバーするドミノをセットで調製。1つのドミノサイズはBACで~50 kbp、前後のドミノとのオーバーラップ (赤枠、~5 kbp) が必要。ドミノ22個で1,000 kbp (=1 Mbp)の合成が達成。

右上写真は、ゲル電気泳動で合成DNAのサイズがドミノ法のステップごとに (左から右) 増大したことを示す。

ラズマ菌 (*Mycoplasma capricolum*) に直接移植するシステムを開発し、最大1660 kbp *Prochlorococcus marinus*合成ゲノムを保持する細菌を作り出した[4]。JCVI独特の画期的なゲノム合成、ゲノム移動、再起動システムである。最近では、マイコプラズマの遺伝子901個の中からある組成の培地で生育するために必要な遺伝子を473個まで減らした人工ゲノム合成を報告した[5]。生存、増殖に必要な最小遺伝子セットのみからなる、最小ゲノム作製であり、派手に宣伝された。

ベンター研のメンバーの多くは筆者の友人でもあり素晴らしい成果であることは間違いなく心から敬意を抱いているとともに、対象ゲノムが動物、植物ゲノム合成まで拡大するかに注目している。酵母での合成には低GC含量でなければならない制限があり[2, 3-5]、またシャーシは *M. capricolum*に限定されるからである。

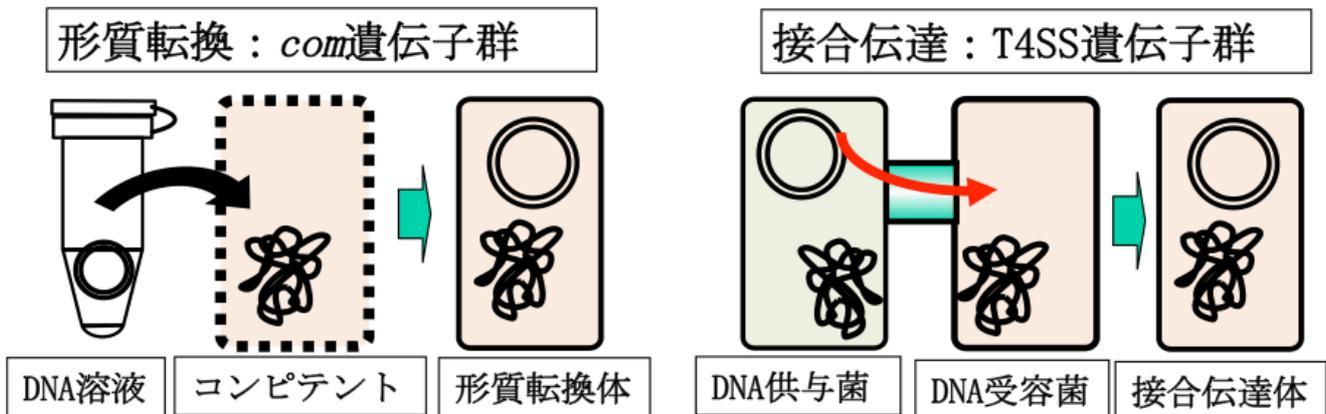


図3. 異なる遺伝的制御によるDNA導入。枯草菌プラスミドの場合を示したが、枯草菌ゲノムへの組み込み (*recA*依存) も実施済み。形質転換 (左) でのDNA導入はcompetent遺伝子群の制御を受ける。DNAの最大サイズは、溶液DNA<200 kbpの制約も受ける。接合伝達 (右) はT4SS遺伝子群による制御を受ける。最大DNAサイズの上限は無い。competent遺伝子群 (枯草菌ゲノムにコード) とT4SS遺伝子群 (pLS20プラスミドにコード) は独立に機能し、お互い干渉しない。

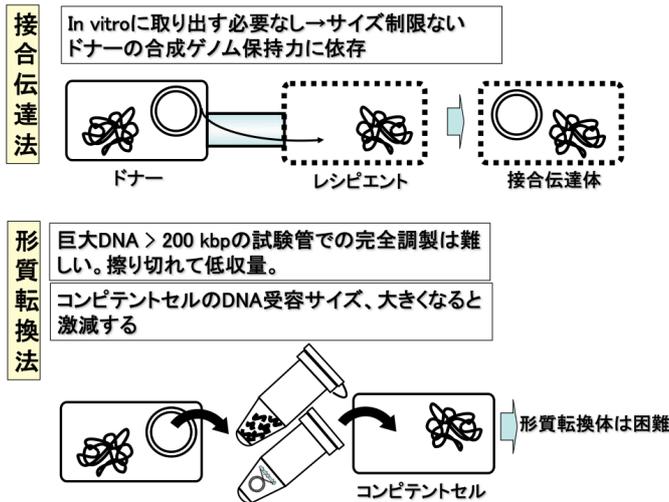


図4.巨大ゲノムを無傷で確実に導入する接合伝達システム。

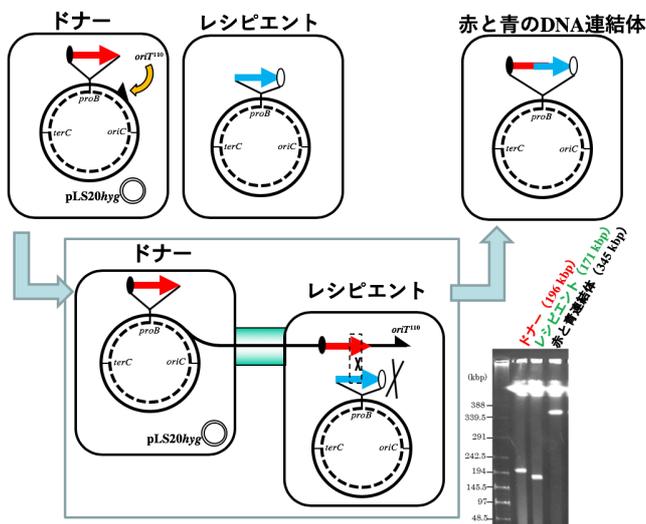


図5. 接合伝達システム（四角枠）で長鎖DNAを連結（BGMv）。詳細は文献11参照。

【枯草菌でのゲノム合成】

筆者のグループが開発した枯草菌での長鎖DNA連結の原理、概略を図2に示す。後述する接合伝達の説明にも必要なので合わせて眺めていただきたい。長鎖DNAを効率的につなぎ合わせられるような枯草菌株を開発し、これを枯草菌ゲノムベクター、以下BGMv (*Bacillus Genome Manipulation vector*) と称する。BGMvにドミノを順番に導入する延長プロセスでは枯草菌のDNA取り込み能のおかげで正確に行える。最高3,500 kbpのラン藻ゲノムの合成に成功した[6, 7]。BGMvの元である枯草菌ゲノムは、環状、4,200 kbp、1コピー/細胞で、トランスポゾン等の繰り返し配列は

無く、ゲノム構造は極めて安定である。加えて枯草菌は細胞質にDNAを積極的に取り組むcompetent遺伝子群が揃っている（図3左）。この機構で枯草菌細胞内に取り込んだDNAは、枯草菌の高いrecA依存相同組み換えにより、枯草菌ゲノム中の指定した部位に極めて正確に、高頻度で組み込める。BGMvの成功は枯草菌生来の並外れた形質転換能力のおかげである。

【合成ゲノムを別のシャーシへ導入】

BGMvでのゲノム合成技術は、対象ゲノムの配列上の制約が少なく、ゲノム合成の対象はバクテリアから動物、植物までをカバーできている。この点が、酵母でのゲノム合成が対象ゲノムのGC含量の制約を受けること、シャーシは*M. capricolum*に限られることと異なり、BGMvは対象ゲノムの範囲が極めて広い。しかしBGMvで合成したゲノムを他のシャーシに動かすのは至難の業であった。ゲノムは合成しただけでは片手落ちで、枯草菌からのゲノム移動は前例が全く無いチャレンジでもあった。早くから目をつけたのが、接合伝達システムである（図3右）。接合伝達システムではDNAを細胞外に晒すことなく、細胞から別の細胞へ直接DNAを移動させられる。分子遺伝学勃興期に、大腸菌の接合プラスミドであるF(fertility)が大腸菌染色体に組み込まれたHfr株が大腸菌染色体をまるごと受容菌へ輸送することが知られ、大腸菌遺伝学が大いに進展した。ちなみにFを小型にしたのがBACベクターである。また院内感染で、広宿主域接合因子のR因子による薬剤耐性遺伝子の接合伝達が、薬剤耐性の拡散の主因であることもよく知られている。また細菌*Agrobacterium tumefaciens*から植物へT-DNAを水平移動するTiプラスミドも古くから知られている接合伝達システムであり遺伝子組換え植物作製の手法となった。F因子やR因子もTiプラスミドも、IV型分泌(TypeIV Secretion System:T4SS)装置と呼ばれる共通の分子メカニズムでDNAを対象細胞へ導入する。図4で示すように、DNAを試験管に取り出す必要がないので、形質転換法での移動に比べてサイズ制限がなくなることが期待できる。

接合伝達は1990年代の分子生物学の急速な発展と反比例するかのようになり、分子生物学の教科書から解説がなくなり、今の若年層にその知識は伝えられてきてい

ないようである。一方海外の、とりわけ合成生物学分野では遺伝子導入に接合伝達システムを使うのは当たり前の最先端領域である。例えば大腸菌のゲノムdecodeプロジェクトでは大腸菌ゲノムを4領域に分けてそれぞれの領域で遺伝暗号を変更し、それら4領域をHfrの接合伝達でダイナミックなゲノム全体の置換を達成している[8]。

ゲノム合成はすべてBGMv行うので、枯草菌から広範なシャーシへ導入できる接合伝達システムがあれば大ブレイクをもたらす。筆者は枯草菌で作動する接合伝達研究に1998年頃から取り組んだ。大腸菌で作動する接合伝達プラスミドは多数研究されているのとは違い、枯草菌ではpLS20 (65 kbp) しかなかった[9, 10]。pLS20の系の改良を重ね、BGMvでの長鎖DNA連結が200 kbpを超えても、接合伝達システムで、短時間、高効率、正確に行えることが実証された (図5) [11]。さらに合成した875 kbのシアノバクテリア由来のDNAを無傷で供与菌 (枯草菌) に4時間で完全に移動に成功した (図6) [11]。図6のゲノムに組み込まれた巨大外来DNA (今の場合シアノバクテリアゲノムの最高875 kbp) を動かすことは、大腸菌間の接合伝達 (Hfr) では試されていない、接合伝達システムの本領がいかに発揮され実感できた。

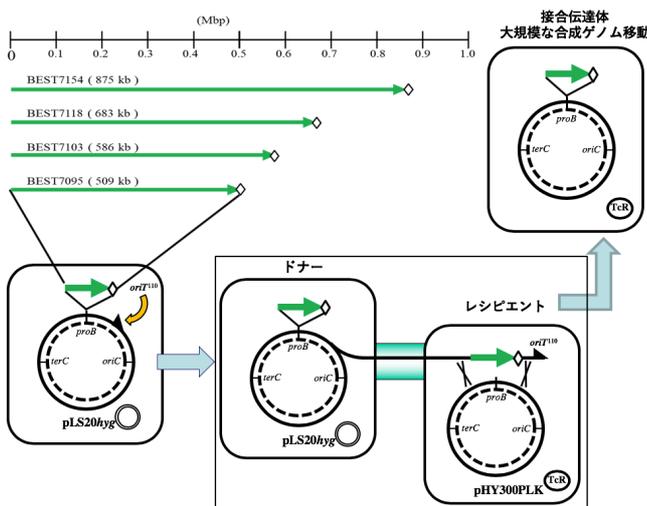


図6. 接合伝達システム (四角枠) で最大875kbpの合成ゲノムを別の枯草菌に確実に、迅速 (4時間) に移動。

【接合伝達システムでシャーシの選択】

これほどのダイナミックな細胞間移動ができるにもかかわらず、惜しむらくは、pLS20は枯草菌同士での接合伝達に制限されるnarrow-host-rangeタイプであり、枯草菌以外のシャーシへの伝達はまだである。枯草菌同士ではと言え、目の前で巨大なDNAが移動する様を目の当たりにし、現在はpLS20の宿主範囲を拡大する課題に取り組んでいる。手掛かりはbroad-host-rangeタイプの接合伝達システムでの成果である。大腸菌で作動するRP4プラスミドは大腸菌から属を超えて接合伝達できることが知られており、このプラスミドで大腸菌からシアノバクテリア*Synechococcus elongatus* PCC7942にDNA >100 kbpを接合伝達で導入することに成功した[12]。pLS20の接合伝達はRP4プラスミドと同じT4SS遺伝子群支配であることから (図3)、pLS20のbroad-host-range化に本格的に取り組むことにしている。(補足図1右)。接合伝達をコントロールする遺伝群 (T4SS) は両プラスミドで明らかにされてはいるが、宿主域を決める因子は不明であり世界中が探している。

【ゲノム合成センターでの取り組み】

対象ゲノムをBGMvで完全合成し、しかも枯草菌以外のシャーシに導入できる一気通貫システムの構想が描けるレベルになっている (図1)。筆者が所属する、高機能遺伝子デザイン研究技術組合 (TRAHED) で最近、ゲノムDNA合成から細胞へ導入するまでのシステムを構築、開発するゲノム合成研究センターが設立された[13]。ゲノム合成とゲノム導入の両面から新規技術を開発するプラットフォームとしてBGMvの汎用案を図7に示した。本稿では詳細は省かせていただくが、随時HP等で公開していく予定である。目指す応用は、ヘルスケア、エネルギー、農業、化学合成、環境浄化と広範である。現存のゲノムをそのまま完全合成することではなく、目的に応じて塩基配列を設計、合成、細胞への導入で構成される。本格的に稼働すれば、微生物、動物、植物を巻き込むバイオ医薬品製造効率向上、グリーンバイオ産業プロセスの革新的な基盤技術に直結すると期待している。

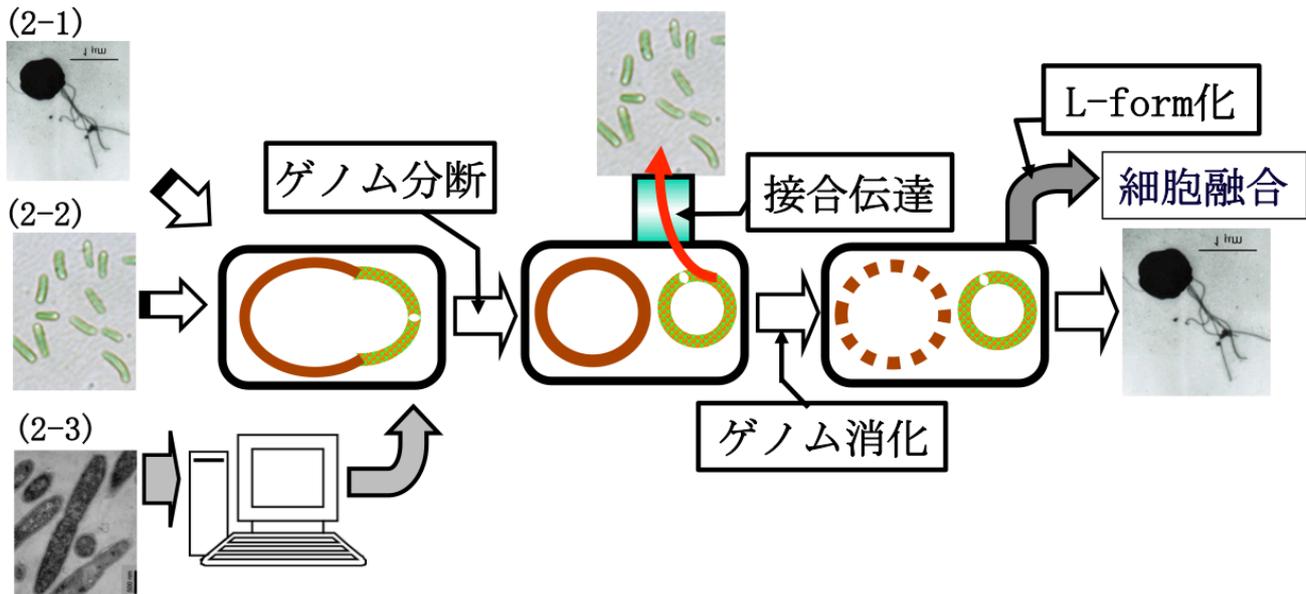


図7. ゲノム合成センターで予定している、BGMvでのゲノム完全合成→バクテリアゲノム再起動の対象ゲノム。

(2-1) 超好熱性アーキア:*Thermococcus kodakarensis* KOD1 (2.09 Mbp)

(2-2) 光合成ラン藻:*Synechococcus elongatus* PCC7942 (2.76 Mbp)

(2-3) 高度好熱菌: *Thermus thermophilus* HB8 (1.85 Mbp)

【終わりに】

ゲノムは「作って学ぶ」対象との認識が一気に拡大している。そしてゲノムの対象は、単細胞微生物から動物、植物まで一気に拡大する動きを見せている。ゲノム合成 (>500 kbp) できるシステムは現在でもBGMvとJCVIに限られる。CRISPR-Cas9で今を時めくゲノム編集はゲノムを操作できるとされるが、基本的にピンポイントの塩基配列変異技術である。少なくとも短鎖DNAの導入が達成されれば十分である。図1に記したように、短鎖DNAは20世紀にほぼ確立した大腸菌での遺伝子工学で調製でき、繰り返し適用すれば多数の配列変異を持つ細胞も創製可能である。筆者のbroad-host-range接合伝達システムは、モデル生物以外でも短時間で確実にしかも100 kbpを超えるDNAを送り込めることから[12]、対象ゲノムの長大な領域を一度の操作で変換できるかもしれない。大規模にゲノムを改変できる第二世代のゲノム編集技術(仮)に最も近いと考えており、本稿のタイトルに「接合伝達システム」を入れたゆえんである。

【参考文献】

1. 板谷光泰、金子真也「ゲノム合成の潮流」実験医学、vol.37,(No.3) 452-457 (2019)
2. 板谷光泰、「枯草菌ゲノムベクターと利用する長鎖DNAの(超)長鎖化技術」、シーエムシー出版、スマートセルインダストリー—微生物細胞を用いた物質生産の展望— pp26-31, (2018)
3. Gibson D. et al., :Science, 329: 52-56, (2010)
4. Tagwerker,C. et al., :Nucleic Acids Res. 40: 10375-10383 (2012)
5. Hutchison C. et al., :Science, 351: (2016) aad6253-1~11
6. Itaya, M. et al.:PNAS, 102: 15971-15976, (2005)
7. 板谷光泰 他：蛋白質核酸酵素、51: 61-67 (2006)
8. Isaacs, F. et al., Science. 333(6040): 348-353 (2011)
9. Itaya, M. et al., : Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 740-742 (2006).
10. Ohtani, N. et al., : Biosci. Biotechnol. Biochem. 72, 2472-2475 (2008)
11. Itaya M. et al., : Sci Rep 8:8792 (2018)
12. Itaya, M., et al., : J. Biochemistry. 164, 15-20 (2018)
13. <http://www.trahed.or.jp/>

ゲノム微生物学分野の研究動向2

長年の探索から逃れていたtRNA 修飾酵素の同定

酒井 雄介

Malopolska Centre of Biotechnology,
Jagiellonian University (Poland)

(前所属：東京大学工学系研究科 化学生命工学専攻
鈴木勉研究室)

筆者は東京大学の鈴木勉研究室で大腸菌の遺伝暗号解読に関わるtRNA修飾についての研究で学位を取得し、現在は、DNAを用いたバイオナノテクノロジー[1]に分野を変えてポーランドはクラクフのヤギェウォ大学で研究している。本稿では6月に発表したtRNA修飾についての論文[2]を概説する。無骨なテーマだが、生化学とゲノミクスの相互貢献の果実として読んでいただくと幸いである。また、蛇足になるが折角の機会なので、ポーランドにおける研究環境について終章で簡単に紹介する。

【導入】

全ての生物はゲノムを構成するDNAに記述された遺伝情報を伝令RNA(mRNA)に転写し、それをタンパク質に翻訳することで遺伝子発現を行なっている(セントラルドグマ)。RNAは遺伝情報の伝達役であるだけでなく、転移RNA(tRNA)やリボソームRNA(rRNA)の形で翻訳装置を形成し、mRNAの遺伝情報をタンパク質へと変換する重要な役割を担う。また、構造遺伝子を記述しない転写産物であるノンコーディングRNA(ncRNA)が原核生物から古細菌、真核生物まで広く見られ、遺伝子発現調節、シグナル伝達、RNA成熟化に寄与していることも広く知られている。RNAは転写後の成熟過程において様々な化学修飾を施されることで、構造を微調整され、その本来の機能を発揮することができる。最近では、次世代シーケンシングや既知の修飾や修飾酵素を手がかりとした免疫沈降や比較ゲノム解析といった研究手法の成熟と発展により、RNA修飾の多彩さとそれが担う様々な機能が注目を集めている。それらはエピトランスクリプトミクス[3-5]と総

称され、遺伝子発現の新たな調節機構として生命科学において大きな潮流を生み出している。

特にtRNAには、多種多様な修飾が含まれており、現在までに見つかっている約160種のRNA修飾のうち8割はtRNAから見つかったものである[6]。tRNAは翻訳においてmRNA上のコドンを読み取り、タンパク質のアミノ酸配列に変換するためのアダプター分子として働く。tRNAのアンチコドンの1字目にあたる34位(wobble位)には、特に化学的なバリエーションに富んだRNA修飾が見出されている。これらのtRNA修飾は、正確なコドンの認識を可能にし、高精度かつ高効率な翻訳に寄与している。原核生物におけるtRNA修飾の研究は主に大腸菌やサルモネラで進められてきた[7]。その修飾遺伝子の探索においては、既知の修飾の機能に基づいて古典的な遺伝学を用いてスクリーニングするアプローチ[8]や、比較ゲノム[9]やタンパク質ライブラリ[10]を用いてゲノムワイドなスクリーニングを行う手法が採られている。鈴木研究室では遺伝子欠損株ライブラリを用いた逆遺伝学と液体クロマトグラフィーを用いた微量RNAの質量分析法(RNA-MS)を組み合わせた独自の研究手法であるリボヌクレオーム解析[11]を確立しており、これまで大腸菌や出芽酵母、ヒトミトコンドリアを対象に多くの修飾遺伝子とその生合成機構を同定してきた。最も解明が進んでいる大腸菌とサルモネラにおいて、2019年初の時点で64のtRNA修飾遺伝子が報告[7, 12]されており、修飾遺伝子が未同定だったのはwobble位の5-カルボキシメトキシウリジン(cmo⁵U)の一部(後述)と(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン(acp³U)のみとなっていた。

多くの細菌はwobble位に5-ヒドロキシウリジン(ho⁵U)を中間体とする修飾塩基を持ち、大腸菌はcmo⁵Uやそのメチル化誘導体5-メトキシカルボニルメトキシウリジン(mcmo⁵U)、枯草菌は5-メトキシウリジン(mo⁵U)を用いている(図1A)。1969年[13]にこの修飾が発見されて以来行われてきた、遺伝学、生化学、構造生物学的な解析により、この修飾は、非ワトソンクリック型塩基対の形成を許容することで、コド

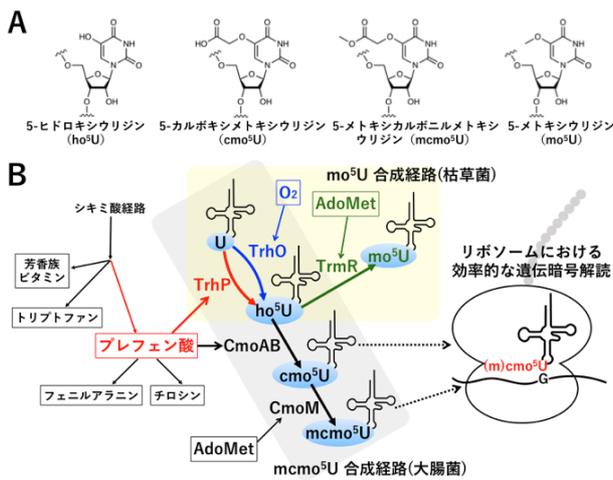


図1 tRNAの水酸化から始まる修飾生合成の概略図。(A) 修飾ウリジンの化学構造。ho⁵Uは大腸菌におけるcmo⁵Uとmcmo⁵U、枯草菌におけるmo⁵Uの前駆体。(B) ho⁵Uはシキミ酸経路に由来するプレフェン酸に依存的なTrhPによる経路と、酸素依存的水酸化酵素TrhOによる経路の二つの経路によって合成される。枯草菌においてはTrmRによってho⁵Uがメチル化されてmo⁵Uが合成される一方、大腸菌においては、CmoAとCmoBが協奏して再度プレフェン酸を用いてho⁵Uをカルボキシメチル化し、cmo⁵Uが生成される[8, 14]。更に一部のtRNAではCmoMによってメチル化されmcmo⁵Uが合成される[12]。cmo⁵Uやmcmo⁵Uをwobble位に持つtRNAはリボソームにおける翻訳に用いられ、効率的な暗号解読に寄与する。

ン認識を拡張する働きがあることが判明している。これらの修飾の形成には多段階の酵素反応が関わっていることが知られていた(図1B)が、その第一段階目であるho⁵Uを形成する修飾酵素や基質については未解明であった。そのため、これらの修飾の生理機能および生物学的意義の解析は立ち遅れていた。

【リボヌクレオームと比較ゲノムによるho⁵U合成遺伝子の発見】

筆者らは、大腸菌におけるcmo⁵Uの生合成過程および生理機能の解析を行うために、その第一段階目の反応であるho⁵U修飾形成に関わる遺伝子の探索を行った。筆者らの先行研究[15]で見出されたりボソームRNAの水酸化修飾を担う遺伝子の相同遺伝子であるtrhPを欠損した大腸菌株からtRNAを単離し、RNA-

MSで解析するとtRNAの水酸化が顕著に抑制されていることが明らかとなった。しかし、この欠損株でcmo⁵U修飾が完全に失われていなかったことから、trhPと別の経路の存在が示唆された。

そのため、cmo⁵Uやmo⁵Uの生合成の後半の修飾酵素(cmoAやcmoB、trmR)を持ち、かつtrhPを持たない生物種のゲノムを比較することでもう一方の経路を担う遺伝子を絞りこんだ(図2A)。7つに絞り込まれた機能未知遺伝子の内、trhOはいくつかの種でtrmRと融合遺伝子を形成し、酸化還元に関わるログナーゼのドメインを持っていた。trhOを欠損した株のtRNAをRNA-MSで解析したところ、trhOとtrhPの両方を欠損した時のみ、cmo⁵U修飾が完全に消失した。一方でtrhO欠損株そのものにおいてはcmo⁵U修飾の減少が観測されなかった。この結果はtrhPを主とし、trhOを副とする二つのho⁵U生合成経路の存在を示していた。

枯草菌においても同様に解析を行い、trhPの二つの相同遺伝子の両方及びtrhOの相同遺伝子がそれぞれ大腸菌と同様に二つの冗長なho⁵U生合成経路を形成していることが示された。

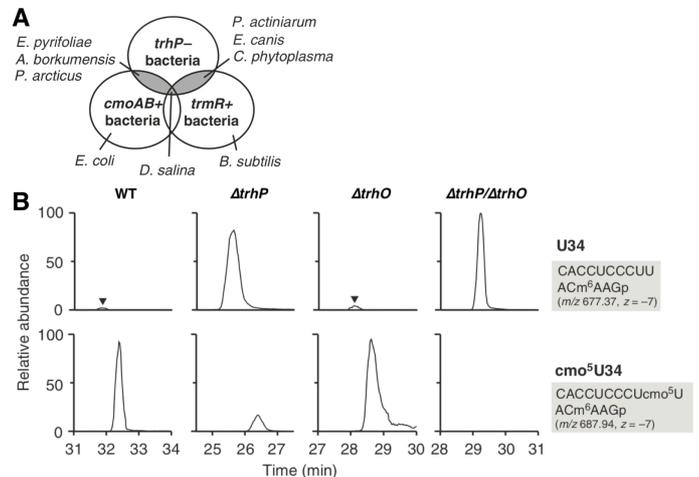


図2 比較ゲノムによるho⁵U合成遺伝子の探索。(A) 比較ゲノム戦略の概略図。ho⁵Uを基質とするtRNA修飾酵素遺伝子cmoABまたはtrmRを持ち、かつtrhPを持たない7種(ベン図の網掛)を選択し、それらに共有される遺伝子群を絞り込んだ。(B) trhP/trhO欠損株のwobble修飾。野生株とtrhO欠損株はwobble位にcmo⁵Uを持つのに対し、trhP欠損株は顕著に修飾が阻害され未修飾のUを蓄積する。trhPとtrhOの二重欠損株は修飾を完全に失う。[2]より改変。

【cmo⁵U修飾の機能解析】

*trhO*と*trhP*が同定されたことで、cmo⁵U修飾を全く持たない大腸菌株の形質を調べ、その生理的意義を実験的に確かめられるようになった。まず、cmo⁵U生合成の各段階を担う遺伝子の欠損株の生育速度を比較した。修飾を全く持たない*trhP/trhO*二重欠損株は中間体ho⁵Uをwobble位に持つ株や野生株に比べて生育速度の低下が見られた。

また、mcmo⁵U修飾を持つtRNAが解読するコドン冗長に解読する別のtRNA(アイソアクセプター)を欠損させたところ、*trhP/trhO*二重欠損株は、**高温感受性を示した (図3)**。この結果は、アイソアクセプターがない状況において、mcmo⁵U修飾は特にコドン解読に重要な役割を担っていることを示唆している。興味深いことに、この形質は*trhP*や*trhO*の単独欠損株では見られなかった。これはho⁵U生合成の冗長性が大腸菌の生育に重要であることを示唆している。

更にこれら一連の変異株を用いて、レポーターアッセイを行い、特定のコドンに対するtRNAの暗号解読効率を評価した。その結果、セリンのコドンであるUCGの解読効率において、修飾を持たない株が中間体ho⁵Uを持つ株や野生株より有意に低下していることが示された。この結果から、mcmo⁵U修飾側鎖の根元の酸素原子が遺伝暗号の解読に寄与していることが、初めて証明された。

【TrhP/TrhOそれぞれによるtRNAの水酸化機構】

*trhP*と*trhO*が担う二つのtRNA水酸化経路を逆遺伝学的かつ生化学的に解析した。その結果、*trhP*は**酸素非依存的かつプレフェン酸依存的にho⁵Uを形成**することが判明した(図1B)。プレフェン酸はフェニルアラニンとチロシンの前駆体であり、シキミ酸経路で合成される代謝物である。興味深いことに、プレフェン酸はho⁵Uからcmo⁵Uへの修飾過程でも使われることが知られている[14]。シキミ酸経路は、芳香族アミノ酸やビタミンをはじめとする様々な代謝物の合成に関与する。このことから、栄養飢餓など細菌がおかれる生育環境によっては細胞内のプレフェン酸の濃度が変化し、cmo⁵Uの修飾率が制御されている可能性がある。また、嫌気的な水酸化反応はカフェインの代謝など、ごく限られた例でしか知られておらず、*trhP*が担う嫌気的水酸化の生物学的な意義が興味深い。また現時点で、TrhPの組換えタンパク質を用いたtRNA水酸化反応の再構成には成功しておらず、酸素ドナーの解明や反応機構の詳細を含めて、今後の更なる研究が必要である。

一方の*trhO*が担うho⁵U修飾経路は、¹⁸Oの安定同位体酸素を用いた代謝標識の実験で環境中の酸素分子が直接基質となっていることが示された(図1B)。実際に、TrhOの組換えタンパク質を用いることでtRNAを酸素依存的に水酸化し、ho⁵Uを形成することに成功した。また、構造ゲノミクスによって報告されてい

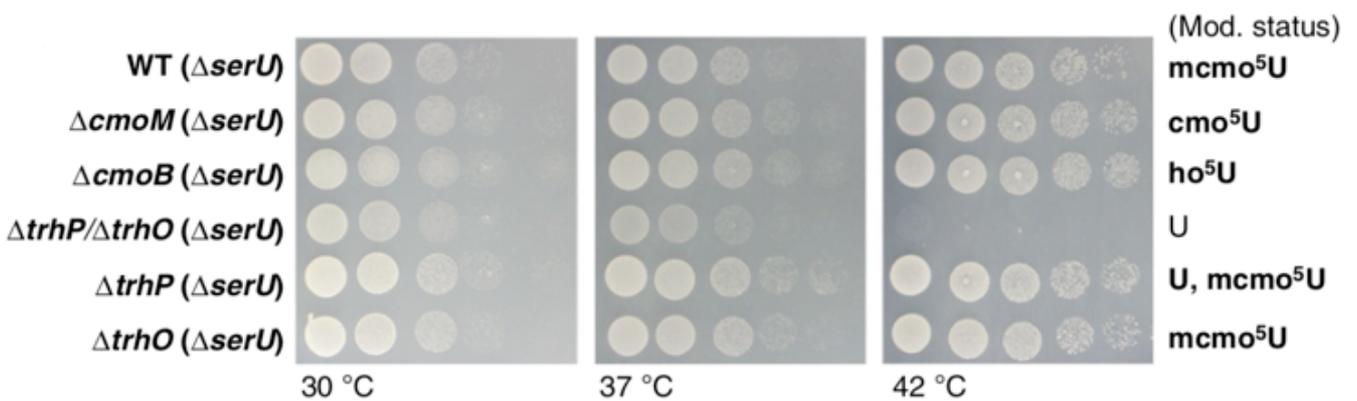


図3 修飾欠損による形質。アイソアクセプターの遺伝子(*serU*)をKOし、mcmo⁵Uを持つtRNAのみでセリンのUCGコドンを読解する株を構築した。この株において、wobble修飾を完全に失う*trhP/trhO*両方の欠損株は高温感受性を示した。一方で、*trhO*によって修飾が限定的に相補されている*trhP*欠損株は野生株と同様の生育を示した。[2]より改変。

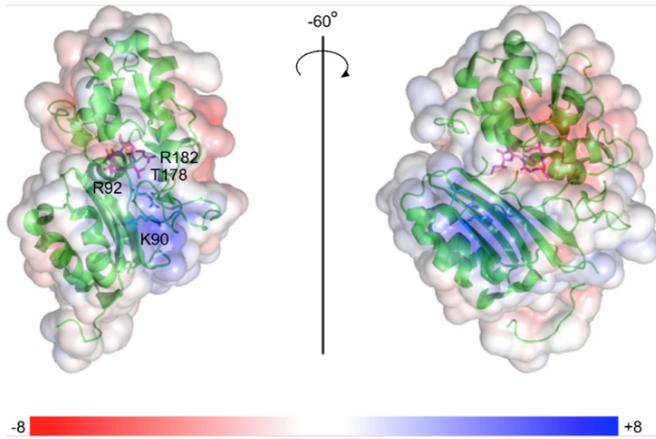


図4 TrhOの必須残基探索。構造生物学で報告されていたレジオネラのホモログの三次構造から活性中心に近い保存された塩基性残基の形成するcaveがtRNAの認識に寄与しているのではないかとあたりをつけ、ミュレーションスタディを行なったところ、アラニン置換により一つは完全に、もう一つはほとんどの修飾活性を失った。図示したアミノ酸は大腸菌において修飾に重要な残基。ただしアミノ酸番号はレジオネラホモログのもの。[2]より改変。

たレジオネラのTrhOホモログの結晶構造[16]や相同遺伝子間の保存性の高さから酵素活性に重要な残基を推測し、ミュレーションスタディを行なった(図4)。ロダネーゼドメインの活性残基や、RNAとの結合に寄与すると推測される塩基性の残基など、5つの必須残基が明らかとなり、他2つの残基でもアラニン置換による修飾活性の顕著に低下が観測された。TrhOは真核生物のシアン化物代謝酵素として知られるロダネーゼのホモログであり、水酸化を触媒する酵素としては知られていなかった。今回の研究により、真核生物にも保存されたTrhOのホモログが、新たな酸素依存的水酸化酵素のファミリーであることが明らかとなった。今後はTrhOが触媒する水酸化の詳細な反応機構や、補酵素の同定が必要である。

【まとめ】

今回の研究で多くの細菌のtRNAが持つcmo⁵Uとその誘導体の生合成の開始段階が、TrhPとTrhOによる二重の経路で冗長的に担われていることが明らかになった。殆どtRNA修飾遺伝子が明らかとなっている大腸菌においても、このような修飾経路の冗長性はこれまで知られておらず、驚くべき発見である。

cmo⁵U修飾の発見から半世紀にわたり、これらの生合成遺伝子が発見されなかったのは、独立した二重の修飾経路であるため、遺伝学的、逆遺伝学的な網羅探索が困難だったことが挙げられる。筆者らのリボヌクレオーム解析と比較ゲノム解析が功を奏した結果、今回の発見につながったのは言うまでもないことである

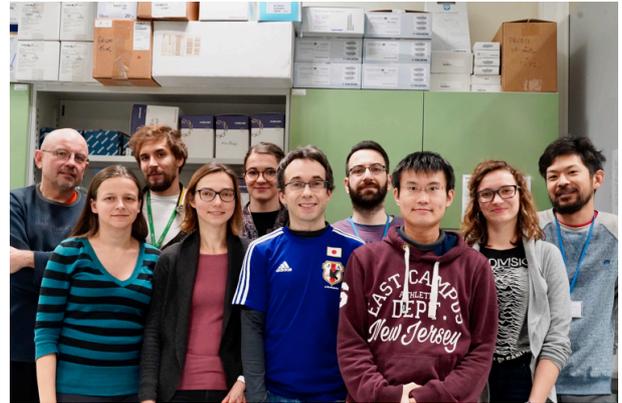


図5 ホストのHeddle labのメンバー(の一部)と。筆者の加わった時は6人だったラボのメンバーも今は30人近くに。右から3番目が筆者、5番目がHeddle教授(イギリス)、6番目が筆者のプロジェクトのテクニシャンのAsia、4、8、9番目が同じDNA origamiサブグループのHalim(ポストドク・トルコ)、Piotr(ポストドク)、Sylwia(テクニシャン)。その隣と7番目がGyraseサブグループのZuza(博士学生)、Karolina(ポストドク)。一番左はNIH出身でProtein cageサブグループのJan(ポストドク)。一番右はETH Zurich出身で新たにProtein cageのテーマで研究グループを始動する東佑翼助教(日本)。半分以上はポーランド人だが、インド、ドイツや中国からも来ている。

が、比較ゲノム解析には、研究コミュニティによる膨大なデータベースの整備が不可欠であり、これらの蓄積がこの発見を可能にしたと言っても過言ではない。

今回、限定的ながらもcmo⁵U生合成の冗長性が生育に必要な条件を示せた。細菌がどのような生育環境におかれても、正確なタンパク質合成を達成するために、細胞内のシキミ酸経路および環境中の酸素の有無をモニターすることでtRNA修飾を頑強に保つ仕組みと考えることもできる。今後は、cmo⁵U修飾がどのような生育条件でダイナミックに変動し、それがど

のように遺伝子発現に影響を与えているかについて更なる研究が進むことに期待したい。

【終わりに代えて—ポーランドの研究事情】

筆者は現在、拠点をポーランドに、フィールドをDNAナノテクノロジーに移し、半独立の立場でDNA origamiを用いたナノデバイスの研究を行なっている



図6 修了生がケーキをお土産に遊びに来た。右が9月に修士課程を修了したAnna、その隣と一番左がGyraseサブグループのDmitry (ポストドク・ロシア)とŁukasz(博士学生)、左から2番目がProtein cageサブグループのIza(博士学生)。

[1, 17]。ポーランドはドイツの東隣に位置し、約4千万人の人口を擁する中央ヨーロッパの国である。日本ではワルシャワ条約機構やアウシュビッツ強制収容所、あるいはコペルニクス、シヨパン、キュリー夫人、ヨハネパウロ二世などの人名で知られるだろうか。今年のノーベル文学賞を受賞したオルガ・トカルチュクもポーランドの女性作家である。中世から続く欧州大陸の大国ながら、近代は列強に囲まれて一時国家として消滅し、第一次大戦後の独立、第二次大戦後の共産主義時代を経て1989年に民主化した。そのため、西欧先進諸国に比べ経済発展が遅れていたが、2004年のEU加盟以降、欧州市場へのアクセスのよさ、賃金水準の低さや教育水準の高さを背景に国外からの投資を集め、急速に発展しつつある。

筆者は理研出身のイギリス人研究者Jonathan Heddle教授[18]に誘われ、ポーランド第二の都市クラクフにあるヤギェウォ大学のMalopolska Centre of Biotechnology (MCB)に2016年からポストドクとして参与している(図5-7)。ヤギェウォ大学は13世紀に設立



図7 クラクフを観光中の共著者ら(いい集合写真がなかった)。6月にクラクフで国際RNA学会が開かれ、鈴木教授(左)と共同筆頭著者で現在はハーバードでポストドクをしている木村博士(右)と再会。彼らを連れて少しだけ観光した。背景は15世紀からの城址バルバカンとクラクフ旧市街外周を走るトラム。

されたスラブ系最初の大学であり、首都のワルシャワ大学に次いでポーランドで最も外部資金を獲得している総合大学である。他に、ウッチ、ヴロツワフ、ポズナン、グダンスク等の都市に有力な大学が集まっており、筆者の分野ではワルシャワ大IIMCBのBujnicki教授がRNA修飾のデータベースMODOMICS[6]を管理している。クラクフは、複数の世界遺産を擁する風光明媚な観光都市であり、治安が良く、物価も(ただし給与も)安く、若い人を中心に概ね英語が通じて暮らしやすい街である。クラクフからは高速バスや特急・夜行列車、複数のLCCや欧州のレガシーキャリアがポーランド国内や欧州内の多くの都市と結んでおり、休日の観光や国際共同研究や学会・会議のための出張にも便利である。また、日本とは、ワルシャワと成田の間でポーランド航空が直通便を週5便往復している。

先述の通り、ポーランドはEUの枠組みの下、多くの科学研究投資を集めている。日本のJSPSに当たるNCN(国立科学センター)がボトムアップ型の研究提案に対して、キャリアステージや研究規模、目的に応じた様々な助成スキームを提供している。他、日本のJSTに近いNCBR、国際交流や国際共同研究に出資するNAWA、企業や大学等研究組織への出資を主に行うFNP等がポーランドの主要な科学研究費助成組織として挙げられる。それらの積極的な投資の元、ワルシャ

ワのIIMCBやクラクフのMCB、ポズナンのNBMCなど新しい研究所次々が設立されている。また、欧州内で個々の研究者が直接応募するプログラムとしてERC Grantやマリーキュリーフェローシップ、EMBO Grantなども豊富である。尚、上記で挙げた助成機関の内、NCN・NAWA・マリーキュリーアクション(大学コンソーシアムに奨学金資金が出資される)・EMBOは学生向けのフェローシップも提供している。筆者自身もポーランド渡航後に、POLONEZというEUとNCNが共同出資する地域型のマリーキュリーフェローシップを2年間受け取った[17]。今秋以降はHeddle教授のサポートで1年間ポーランド滞在を延長しながら、次の行き先を検討中である。MCB内では筆者の他に3人の日本人研究者[19-21]がNCNやFNPから研究助成を受けて独立、または半独立な立場で自分のやりたい研究を行なっている。上記に述べた以外に日本国内にも、海外学振をはじめ、長期・短期の海外留学や海外ポスドクを支援する仕組みは多い。簡単ながら本節が海外渡航を含めたキャリア設計を考える読者の参考となれば幸いだ。

【謝辞】

本稿で概説した論文は筆者の博士論文の一部を成す。原著論文の共同筆頭著者であり、在学中はメンターとして直接指導して下さった木村聡博士、指導教員の鈴木勉教授、宮内健常博士や坂口裕理子氏をはじめとする鈴木研究室のメンバーに感謝を申し上げる。また、この特集への寄稿を招待いただいた編集委員の千葉大学相馬亜希子講師には貴重な機会をくださったことに心から謝辞を述べたい。

【参考文献】

1. Sakai, Y., et al., DNA Aptamers for the Functionalisation of DNA Origami Nanostructures. *Genes*, 2018. **9**(12): p. 571-20.
2. Sakai, Y., S. Kimura, and T. Suzuki, Dual pathways of tRNA hydroxylation ensure efficient translation by expanding decoding capability. *Nature Communications*, 2019: p. 1-16.
3. Frye, M., et al., RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nature Reviews Genetics*, 2016. **17**(6): p. 365-372.
4. Harcourt, E.M., A.M. Kietrys, and E.T. Kool, Chemical and structural effects of base modifications in messenger RNA. *Nature*, 2017. **541**(7637): p. 339-346.
5. Roundtree, I.A., et al., Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell*, 2017. **169**(7): p. 1187-1200.
6. Boccaletto, P., et al., MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 2017: p. 1-5.
7. Bjork, G.R. and T.G. Hagervall, Transfer RNA Modification: Presence, Synthesis, and Function. *EcoSal Plus*, 2014. **6**(1), DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0007-2013.
8. Nasvall, S.J., P. Chen, and G.R. Bjork, The modified wobble nucleoside uridine-5-oxyacetic acid in tRNA^{Pro}(cmo5UGG) promotes reading of all four proline codons in vivo. *RNA*, 2004. **10**(10): p. 1662-1673.
9. El Yacoubi, B., et al., A role for the universal Kae1/Qri7/YgjD (COG0533) family in tRNA modification. *The EMBO Journal*, 2011. **30**(5): p. 882-893.
10. Jackman, J.E., et al., Identification and Characterization of Modification Enzymes by Biochemical Analysis of the Proteome, in *Methods in Enzymology*. 2007, Elsevier: p. 139-152.
11. Suzuki, T., et al., Mass spectrometric identification and characterization of RNA-modifying enzymes. *Methods in enzymology*, 2007. **425**: p. 211-229.
12. Sakai, Y., et al., Biogenesis and growth phase-dependent alteration of 5-methoxycarbonylmethoxyuridine in tRNA anticodons. *Nucleic Acids Research*, 2016. **44**(2): p. 509-523.
13. Yaniv, M. and B.G. Barrell, Nucleotide sequence of E. coli B tRNA^{1-Val}. *Nature*, 1969. **222**(5190): p. 278-279.
14. Kim, J., et al., Structure-guided discovery of the metabolite carboxy-SAM that modulates tRNA function. *Nature*, 2013. **498**(7452): p. 123-126.
15. Kimura, S., et al., Biogenesis and iron-dependency of ribosomal RNA hydroxylation. *Nucleic Acids Research*, 2017. **45**(22): p. 1-14.
16. Kuzin, A., et al., Three dimensional structure of the double mutant of UPF0176 protein lpg2838 from *Legionella pneumophila* at the resolution 1.8Å, *Northeast Structural Genomics Consortium (NESG) Target LgR82*. 2012, DOI: 10.2210/pdb4F67/pdb
17. *POLONEZ project (Yusuke Sakai)*. Available from: <http://www.heddlelab.org/YusukeSakaiPolonez.html>.
18. *Bionano and Biochemistry Lab (Heddle Lab)*. Available from: <http://www.heddlelab.org/>.
19. *Plant Molecular Biology Laboratory - Małopolskie Centrum Biotechnologii - Jagiellonian University (Dr. Kenji Yamada)*. Available from: <https://mcb.uj.edu.pl/laboratorium-biologii-molekularnej-roslin>.
20. *Shino Goto-Yamada - Polonez 2 - Małopolskie Centrum Biotechnologii - Jagiellonian University*. Available from: <https://mcb.uj.edu.pl/shino-goto-yamada-polonez-2>.
21. *Bionano and Biochemistry Lab - Azuma Project*. Available from: <http://www.heddlelab.org/Azuma.html>.

ゲノム微生物学会若手の会報告

河野 暢明

慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任講師

開催概要

今年で13回目の開催となる日本ゲノム微生物学会若手の会は2019年10月26-27日の日程で静岡県伊東市にて開催されました。本年度の代表には私河野（慶應義塾大学）が務めさせていただき、世話人として広瀬侑さん（豊橋技術科学大学）、大林龍胆さん（理化学研究所）、梅谷実樹さん（東京大学）、そして本年度から新たに森さん（国立遺伝学研究所）と黒川さん（筑波大学）にも加わっていただき、計6名で運営いたしました。本年度の趣旨としては、成果発表会に終始するのではなく、様々な事案に対して多くの活発な議論をする場の提供を目指し、なるべく長いディスカッション時間と交流しやすい規模を目指しました。我が国の微生物学分野は成熟と共に細分化が進み、例えば、ゲノム微生物学会・細菌学会・微生物生態学会・農芸化学会・極限微生物学会・微生物資源学会などに分かれています。その結果情報の分断が生まれ、次世代の微生物学研究を担う若手研究者や学生の育成を妨げている要因の1つとなっています。第13回目となる本会では新たな試みとして、各学会に分散する多様な微生物学研究者を一堂に会する機会を設け、より高度に組合わされた分野間の連携を促し、そこから発展する新たな潮流を切り開くフロンティア性を持った若手の会を目指しました。

当日は25名にご参加いただき、2日間の活発な議論が行われました。12演題の一般口頭発表と1題の招待講演に加え、ワールドポスターと呼ばれるA3の手持ちポスターを持ち寄ったポスター発表やテーマごとに机で議論を交わすワールドカフェを実施しました。招待講演者に海外からCopenhagen大学Niels Bohr研究所御手洗菜美子准教授をお呼びし、細菌へのファージ感染やそれに伴う共進化現象を数理生物学的アプローチで解き明かす研究内容をお話いただきました。また本年度は産官学のネットワーキングも考慮し、「学」である大学研究者に加え、「官」として

は文部科学省および経済産業省の行政官や、「産」としては日本たばこ産業株式会社の研究員の方々にお越しいただき、キャリアパス、オープンラボ、さらには科学技術政策に関して議論いたしました。

若手の会とは

私はこれまで若手の会の在り方に関して様々な場所で問題提起をしてきました。非日常的な空間で似た領域にいる同世代が一カ所に集まり、議論する場には価値があると思います。しかしそれが若手の会として毎年運営されていく必要があるのでしょうか。本会で行ったワールドカフェ（テーマ別議論）ではその解決案の一つとしてオープンラボ・コアワーキングスペースの様な施設が提案されました。普段の生活でふと疑問に思ったこと、議論したいこと、あるいは共有したいことがあったとしても、これらをインターネット上で共有するにはどうしてもタイムラグが生まれ、熱量の差ができてしまいます。実際に会って行えるテンポの良い活発な議論をする場を提供さえできれば、今若手の会に求められていることは実現できます。そしてそういう場は何もアカデミック業界だけが主導して企画する必要はありません。企業や省庁側もそうした交流の場を求めていることが今回のワールドカフェでよくわかりました。具体的にどのような場所に設置し、どのように運用していくかは構想段階でしかありませんが、産官学連合で実際に動くことができれば、少なくとも参加者からは積極的に存続が求められているわけではない義務化してしまった若手の会を発展的解散できるのではないのでしょうか。



さらにこれは特に分野や学会を限定する必要がないかもしれません。本領域で言えば、「分子生物学」程度の枠組みでさえあれば議論する上での背景共有は叶い、むしろ既存分野の変革や新たな領域の創出につながりやすい可能性があります。そして新たな分野創造を考えたときに、会の名前はより一般化していくべきだと考えます。細分化された会合は一時的には役割を担いますが、継続されるたびに本来の意図が薄れ、形骸化してしまう危険性をはらみます。日本ゲノム微生物学会若手の会ではすでに学部生レベルの発表からゲノムありきの背景で全て発表が行われており、「あえて」ゲノムを冠する時代は終わりを迎えているのではないのでしょうか。昨年度のニュースレターにも寄稿いたしました。今こそゲノム微生物学会は「微生物学会」として新たなスタートを切る時だと考えます。再度ここに日本ゲノム微生物学会初代会長を務められた吉川寛先生が当時（2006年12月17日）会長候補として述べられた「会長候補の挨拶」を引用して締めさせていただきます。

「本学会は2002年から毎年一回“かずさ”において開催されているワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」の発展として提案されました。（中略）将来、ゲノムが古語となった時、本学会がGeneral Microbiology即ち日本微生物学会として存続できるように今から心がけたいと思います。」¹

最後に本会は日本ゲノム微生物学会・一般財団法人中辻創智社の助成、ならびに日本タバコ産業株式会社、日本ジェネティクス株式会社、そして株式会社カークのご協賛の上に無事開催することができました。世話人を代表しここにお礼申し上げます。

注釈1 https://www.sgmj.org/index.php?page=about_greet1

参加者内訳：全25名（内女性6名）

学部生～大学院生：6名、大学・研究所研究員：14名、企業研究員：2名、省庁行政官：文科省1名、経済産業省1名、海外招待講演者：コペンハーゲン大学より1名

参加者の声（一部）を以下に掲載させていただきます。

役職	感想
研究員	楽しかったです。スタッフのみなさまお疲れ様でした。特に企業と役所の方にご参加いただきがっつり議論できたのが良かった。
助教	私はゲノムもやっていなければ、微生物もやっていないので、果たして本当に参加しているのか疑問でしたが、とても楽しく2日間過ごすことが出来ました。久しぶりに会えた友人もいて、お互いにいい刺激を受けました。
学部3年	今回学部生でありながら口頭発表に臨んだのはとても良い機会になりました。学術発表の機会を増やすだけでなく、研究内容を会場全員に周知していただくことができました。そのため、懇親会の中では多方面から建設的なアドバイスをいただくことができ、昼夜ともに充実した時間を送れたと実感しています。
助教	手持ちポスターや、即席科研費作りなど、プログラムの工夫が多く、創造的で楽しい会でした。
修士2年	昨年のフロンティアミーティングから続けての参加です。今回は人数が減った分より濃密な議論が出来たように感じます。省庁や企業から参加している方の視点はとても新鮮で、懇親会なども含めて普通の学会では味わえないような非常に興味深いディスカッションが出来たと感じています。
博士2年	学会の本会では主に、口頭発表やポスター発表のみが行われることが多いですが、本研究会ではワールドカフェとして、キャリアパスや研究に関する制度のことなどを似たような境遇の人たちや、立場の異なる人たちと話し合う機会があり、今後の活動へと活きる有意義な研究会でした。
行政官・係長	皆さんの忌憚のない意見や、研究に実際に携わらないと分からないお話も聞かせていただき勉強になりました。また、元バイオ研究者としても、皆さんの研究のお話を楽しく聞かせていただきました。ありがとうございました。
博士2年	初めてゲノム微生物学会若手の会へ参加しました。ワールドポスターでは、1人あたりどれくらいの時間発表できるのかを事前に周知して欲しかったです。ワールドカフェでは、アカデミックな研究者だけではなく企業の研究者や文科省の方と議論するこ
研究員	若手の会で合宿形式は初めてだったので、夜中まで議論できて有意義だった。またワールドカフェやワールドポスターも初めてで、初対面の人と色々な視点から議論できて良かった。スタッフの皆様、お疲れ様でした。ありがとうございました。
行政官・係長	多ジャンルの若手研究者や学生からの生の声を聞ける機会となり、大変有意義でした。引き続きお付き合いさせて頂いたら幸いです。
学部4年	研究を始めて約半年ですが、菌叢解析に関する様々な知見に触れることができとても貴重な体験となりました。今後の研究に活かしたい研究発表も多く、終始充実しておりました。本会を企画・運営して下さった世話人の方々に心より感謝を申し上げます。
学部1年	研究発表を聞いて、研究のアイデア、手法について刺激を受けました。ワールドカフェという研究職を取り巻く状況について議論する場があり、皆どのような思考を持って行動しているのかが非常に参考になりました。今後研究人生を歩んでいく上で、有意義な交流の機会でした。有難うございます。

若手の会に参加して

日本ゲノム微生物学会若手の会 に参加して

城間 博紹

東京工業大学 山田研究室 D2

私は博士課程で大腸がんと腸内細菌の関連性について研究しています。私は、大腸のポリープ(腺腫)が大腸がんの後期へと進行していく過程における腸内環境の変化の解析と(Yachida et al., Nat. Med. 2019 25(6):968-976)、大腸がんの治療前後における腸内環境の変化の解析に取り組んでいます。現在、後者のテーマの研究内容を論文としてまとめている最中で、様々な研究者からのフィードバックを得たいと考え、第13回 日本ゲノム微生物学会 若手の会に参加しました。ちなみに、私はゲノム微生物学会の本会では2回のポスター発表をした経験がありますが、所属している他の学会も含め、“若手の会”への参加は初めてでした。本稿が若手の会に興味がある方の参考になれば幸いです。



今回の若手の会は、トークセッション、ワールドポスター、ワールドカフェ、招待講演、懇親会で構成されていました。トークセッションは、学会の口頭発表、ワールドポスターはポスター発表に該当します。通常の学会とは異なりポスター発表では、事前に提出した3-4枚で作成されたスライドがA3サイズのパスターとして印刷されており、このパスターを持ち歩くことで気軽に誰とでも議論することができ、自身の研究の懸念される問題点やその対応策を得ることができました。トークセッションの質疑応答は通常の学会以上に濃密で、様々な視点からの意見が飛び交い、自分

が口頭発表を申し込まなかったことを後悔しました。ワールドカフェでは、研究発表ではなく、事前に用意されたいくつかのテーマについて、少人数のグループで議論しました。私は、読むべき論文の取得・管理方法、博士号取得後のキャリアパス、企業とアカデミアの連携などについて議論しました。読むべき論文の取得・管理方法については、論文情報を効率的に取得する方法や、論文自体の管理方法、既に読み終えた論文の内容の管理方法などを、私を含めたバイオインフォマティシャン3人で議論しました。3人のそれぞれが異なる方法で論文の情報を取得・管理しており、非常に参考になりました。招待講演では、コペンハーゲン大学ニールスボーア研究所の御手洗奈美子先生が、ファージと細菌の関係性のモデリングと、実験によるその関係性の検証について講演してくださいました。普段あまり聞くことができない分野の講演で勉強になりました。食後の懇親会では、これまで接点のなかった研究者達と、研究の話だけにとどまらず、モチベーションの保ち方や進路に関しての相談をしたり、各自が持ち寄ったお土産を囲みながら他愛のない雑談などで盛り上がり有意義な時間を過ごすことができました。特にデンマーク土産のチーズが美味しかったです。

今回の若手の会を通して、様々なバックグラウンドをもつ若手研究者と交流し議論することが、自身の研究を進めていくだけでなくサイエンスを発展させるためにも重要だと感じました。今後も毎年積極的に参加させていただきます。最後に、今回の若手の会運営スタッフの方々、会場を提供して下さった山喜旅館様、そして本会に参加した若手研究者の皆様に感謝申し上げます。

太田 圭祐

北海道大学 理学部 生物科学科
高分子機能学専修分野 4年

この度私は、静岡県伊東市の山喜旅館にて開催された第13回日本ゲノム微生物学会若手の会に参加しました。本会では、様々な分野の研究発表や、アカデミックキャリアや研究の進め方についても議論することができました。本稿では、若手の会で私が学んだことの一部をご紹介します。



私は、北海道大学の数理生物学研究室で、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease: IBD) における腸内細菌叢の関与について研究しています。IBDは、腸管に原因不明の炎症を起こす潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis: UC) とクローン病 (Crohn's disease: CD) の総称です。これまでの研究で、腸内細菌叢の破綻が腸管免疫の異常を誘発し、IBDへの感受性を高めることが示唆されております。また、炎症に関与する菌代謝物の存在も明らかになりつつあります(Furusawa *et al.*, *Nature* (2013))。私は、IBDの発症率が性別や年齢層などの層別によって異なることに着目し、IBD に対する腸内細菌叢の関与も層別によって異なるという仮説を立てました。現在、各層別における被験者の腸内細菌叢や菌叢代謝をCD、UC、nonIBDの3群間で比較解析しております。

本会の研究発表は、代表者が登壇して15分間の講演をする口頭発表から始まりました。研究発表の中で私は、国立遺伝子研究所の東光一さんが発表していた、微生物群集構造の類似性が高い環境の特性を検索するLEA (<http://leamicrobe.jp>) というツールに興味を持ちました。LEA は、微生物の 16S rRNA amplicon sequenceと由来環境が登録されたデータベースに基づき、自分が解析した細菌がどの

ような環境中に多く存在するのかを可視化することができるツールです。CD、UC、nonIBDの菌叢差異もLEAのようなアプローチを用いることで可視化できるかもしれないと思いました。他にも様々な発表がありましたが、いずれも研究背景の丁寧な説明があり、研究活動期間が半年ほどの私でも理解でき、有意義な時間を過ごすことができました。

本若手の会では、参加者全員が4、5人の小グループに分かれA3サイズのポスターについて各自4分間ずつ発表をするワールドポスターも企画されました。私は口頭発表はしなかったため、この企画で発表を行いました。ワールドポスター形式は、トークセッション形式と比べて発表者に質問がしやすく、キャリアの浅い学部生である私も気軽に参加することができました。今回、私は4分間で発表を十分にまとめられなかったため、今後は要点を簡潔にまとめて伝える能力も身につけていきたいと思いました。また、ポスターの用紙サイズが小さいことから、空き時間や懇親会でも即興的なディスカッションを行うことができました。

ワールドカフェでは、アカデミックにおけるキャリアパスを中心に議論しました。私が参加した小グループでは、学生が海外の研究室に所属するきっかけを掴むための海外短期研修制度があることを知りました。また、論文の執筆だけでなく、関連企業と共同研究を進めることも、これからの研究者には必要であるという話も伺いました。自分の得意分野を模索しながら今後のキャリアを積んでいきたいと思いました。

最後になりましたが、本会を企画・運営して下さった世話人の方々に心より感謝を申し上げます。

実験技術紹介コーナー

今回は、(1) 溶液に溶かそうと思った粉末が、ダマになってしまってもうまく溶かせない時の溶かし方と、(2) L字管や試験管に入れてオートクレーブした液体培地について、内側に水滴がつかないようにする方法を紹介します。

(1) 粉末状の試薬を何らかの溶液に溶かそうとするのはよくあることです。薬包紙の上に量り取った粉末を、ビーカーなどに入れておいた溶液に入れた瞬間に、粉末が塊(ダマ)になってしまっても溶かすのに苦労することがあります(塊の溶液と接しているところが溶け、その内側に粉の部分が囲まれた状態になってしまった状態です)。例えばちょっと高級なアガロースの粉末や、ECLシステムのブロッキング試薬などがそうです。

ダマにならない程度の少量を、少しずつ加えて溶かすのが方法の1つですが、少々面倒です。ここで紹介する方法は、溶液を冷蔵庫などでよく冷やし、ビーカー等の中で溶液を流動させながら粉末を一気に加える方法です。粉末をこのように加えると、ダマにならずに溶液中に分散しますので、電子レンジで加熱するなどして溶かします。溶液を冷やして試薬が溶けにくくすること、試薬が塊の形状のまま、塊の外側が溶けるような状況を作らないことがポイントです。

(2) ガラス製のL字管や試験管などに液体培地を入れてオートクレーブすることがあるとおもいます。オートクレーブ後にそのまま冷やすと、内壁、特に口に近い側に水滴がたくさんついてしまい、無菌操作が多少しにくくなります。時間が経つと、水滴は無くなりますが、なくなるまでに結構時間がかかります。

水滴がつくのは、液体部分はなかなか冷めない一方で、ガラス部分は比較的早く冷めるため、液体部分から揮発した水蒸気が、ガラス内壁で液化するためと考えられます。これを防ぐには、オートクレーブ後、それなりに熱いうちに、L字管や試験管などの液体部分を水などにつけて冷まします。液体部分が先に冷めるようにすれば、チューブ内の水蒸気が液体部分に触れて液化することになり、水滴の形成を抑制できます。

以上、2点を紹介させていただきました(大坪)。

なお、ニュースレターでは実験技術紹介コーナーへの寄稿を募っております。身近な編集委員までお知らせ下さい。

閑話休題 -その8-

夏から秋に咲く花々

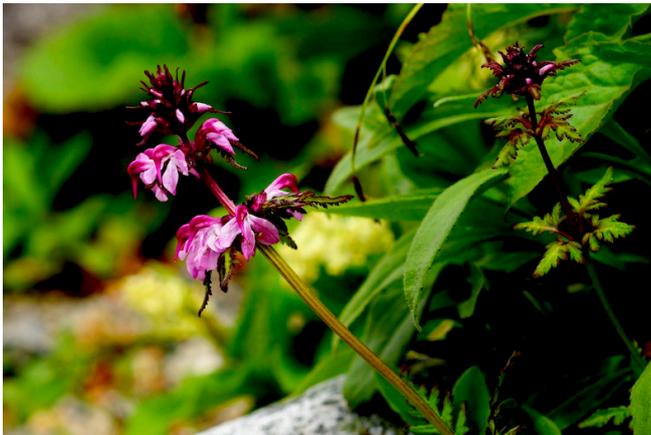
今年の夏は乗鞍岳、木曾駒ヶ岳、北八ヶ岳などに花の撮影に出かけました。最近では横着をしてできるだけケーブルカーやバスなどで登れる山を選んで撮影に行っていますが、それでも咲いている草花はこちらの事情などとは無関係にきれいな姿を見せてくれます。かつては、「苦勞して登るからこそ高山植物に出会った時の喜びがあるのだ。」などと嘯っていたのですが・・・。とまれ、コマクサをはじめ、上記の山々で撮った花々をお楽しみください。(磯野克己)



コマクサ (ケシ科) : *Dicentra peregrina* (Rudolphi) Makino, 2019. 7. 25 乗鞍岳



クロトウヒレン (キク科) : *Saussurea nikoensis* var. *sessiliflora*, 2019. 9. 3 木曾駒・千畳敷カール



ヨツバシオガマ (ゴマノハグサ科) : *Pedicularis chamissonis* var. *japonica* Maxim. 2019. 7. 25 乗鞍岳



イワギキョウ (キキョウ科) : *Campanula lasiocarpa* Cham. 2019. 7. 25 乗鞍岳



ハナイカリ (リンドウ科) : *Halenia corniculata* (L.) Cornaz 2019. 9. 12 北八ヶ岳



コマツナギ (マメ科) : *Indigofera pseudotinctoria* Matsum. 2019. 10. 9 神戸市

第14回ゲノム微生物学会のお知らせ

第14回日本ゲノム微生物学会年會を2020年3月6日(金)～8日(日)の3日間、愛知県産業労働センター「ウインクあいち」(写真1)にて開催いたします。会場は名古屋駅から至近距離にあり大変便利のよいところです。口頭発表はメインホール(写真2)で、それ以外のポスター発表、企業展示などは全て展示場の1フロア(写真3)に集約して開催します。本学会を名古屋で開催するのは初となりますのでぜひ全国から多くの皆様にご参加いただければ幸いです。

今回は以下の方針で学会を開催する予定です。

- (1) 口頭発表とポスター発表を独立させます。ショートトークは行いません。ポスターの発表時間を充実させ、学会の最後にポスター賞の発表と授賞式を行います。
- (2) 懇親会を止め、ポスター発表時間に全員が参加できるミキサーを開催します。

ミキサーをポスター発表と並行して行うことで、研究の議論を深め、全員が懇談いただく機会を提供したいと考えています。学会参加費はミキサー代金を含めて設定させて頂く予定でおりますので、何卒ご理解賜りますようお願い致します。懇親会を楽しみにしておられた方には申し訳ありませんが、幸い会場は繁華街のど真ん中にありますので、1日のスケジュールが終わった後は「尾張名物・名古屋めし」を肴に、気の合う仲間でご懇親頂ければ幸いです。

詳細につきましては、ホームページに掲載して参ります。組織委員一同、名古屋で皆様にお会いできるのを楽しみにしています。(年会長：饗場浩文、組織委員：井原邦夫、内山郁夫、加藤雅士、広瀬侑、藤田祐一)



写真1



写真2



写真3

学会の現況

学会役員 (敬称略)

会長：仁木宏典

庶務・会計幹事：黒川顕、相馬亜希子 集会幹事：大島拓、永田裕二 広報幹事：黒川顕、大西康夫
 ニュースレター幹事：佐藤勉、相馬亜希子、大坪嘉行、広瀬侑、佐々木裕子

男女共同参画幹事：佐々木裕子、矢原耕史

評議員 (会長推薦を含む)：饗場浩文(評議会議長)、跡見晴幸、有田正規、板谷光泰、小椋義俊、
 加藤潤一、高見英人、中村保一、丸山史人、森浩禎、吉田健一、渡辺智、片山勉、北川正成、
 應蓓文、得平茂樹

会計監査：塩見大輔、田中寛

会員の動向

会員数 511 名 (令和元年12月現在)

名誉会員3名；一般会員 362名；学生会員 132名

賛助会員 13 団体；機関会員 1 団体