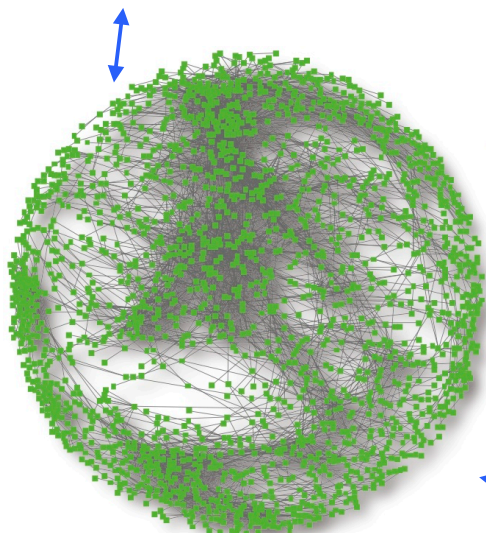
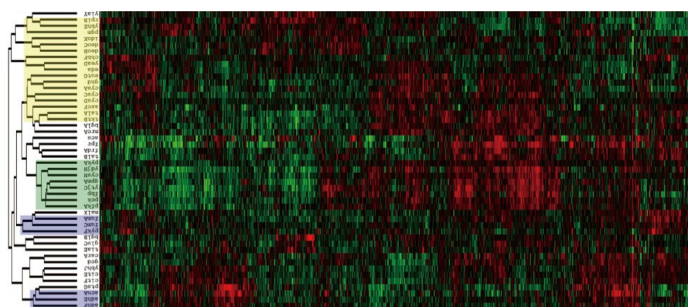


日本ゲノム微生物学会 ニュースレター

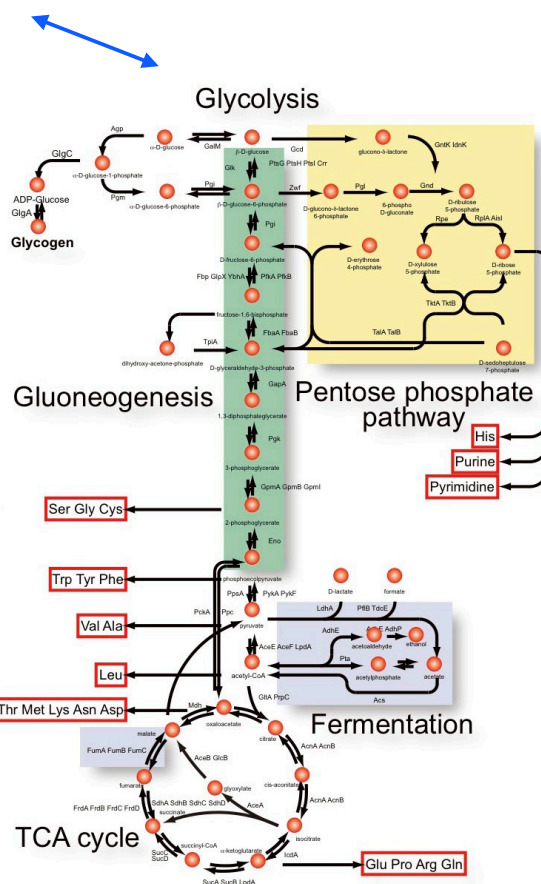
大腸菌をシステムとして解析する

森 浩禎 (奈良先端大学システム微生物学講座)

Clustering analysis of genes involved in central metabolism



Network of genes involved



「頑強性」(robustness)と呼ばれる性質は生命が生き延びる為に必須のものである。環境中には、化学物質、放射線、トランスポゾンやウイルス等、様々な種類の生育を攪乱する要因が存在し、それらを乗り越えなければ生命は生き延びることができない。大腸菌や酵母では一遺伝子欠失株ライブラリーが構築されているが、一遺伝子の欠失程度ではその表現型に変化が起こることはそれほど多くはない。おそらく、代替経路や補償経路が欠失を補償しているものと考えられる。私達は遺伝子欠失に対して、どの遺伝子あるいは経路がその欠失を補償しているのかを調べるために、大腸菌全遺伝子の2重欠失株の作製をシステムティックに進めている。例えば、中心代謝経路に関与する遺伝子群の欠失株に対して残る全4000遺伝子との2重欠失を網羅的に作製して生育に対する影響を調べる。左上の図で、赤は組み合わせると生育が極端に悪くなるか生育出来なくなる遺伝子、それと逆に緑は生育が変化しないか、あるいは回復する組合せを示す。このような解析を大腸菌全遺伝子の組合せに拡張することで、細胞内の遺伝子生理機能ネットワークの解明を進めることができると考えている。さらに、転写制御ネットワーク、タンパク質相互作用ネットワーク、代謝ネットワークなどの網羅的な情報を組み合わせて解析を進め、同様の解析が進んでいる酵母と比較することで、細胞生理機能ネットワークの普遍的なルールの発見につなげたい。

第III期会長就任にあたって

小笠原 直毅

(奈良先端科学技術大学院大学)



ご存じのように、日本ゲノム微生物学会は、今年から第III期の新しい役員の体制が発足しました。三期以上は連続して勤めることはできないという会則もあり、評議員会のメンバーも大幅に交代しました。その中で、第II期に引き継いで、私が学会の会長を勤めさせて頂くことになりました。皆さんのご協力をお願いいたします。

日本ゲノム微生物学会は5年前に発足しました。そこには、研究目的や菌種ごとに個別に進められてきた微生物研究が、ゲノム配列情報を共通の基盤として、お互いに情報を交換しながら統合的に研究できるようになったという認識がありました。実際、ゲノム微生物学会には基礎・応用、理学・医学・工学・農学・環境学等の分野の研究者が参加し、年会等では全参加者が一同に会して情報交換・議論を行うというスタイルを取ってきています。

私が会長となった3年前は新型シーケンサーが広がり始め、微生物分野でこそ、それを活用した新しい研究が展望された時期でした。タイリングアレイを作らなければならなかったChIP-chip解析が、新型シーケンサーを用いたChIP-seq解析によりゲノム配列さえあれば可能になり、また、ゲノム配列の変異を洗い出すことにより自然に生じた抑制変異も迅速に同定できるようになりました。さらに、自然界における微生物の多様性の理解もゲノム配列解析により大きく進むことが期待されました。現在、JGIのGOLDデータベースによれば、世界で2847種の真正細菌の全ゲノム配列が決定され、

7908種の配列解析が進行中とされています。また、334種のメタゲノム解析データがまとめられています。ゲノム微生物学会年会での発表でも、様々なメタゲノム解析の研究発表が増えてきています。しかし、世界の微生物研究の流れの中で、日本の存在感は低下してきているように感じています。

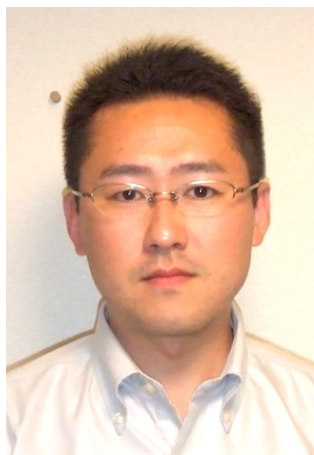
最近、久々にヨーロッパで開催された2つのシンポジウムに参加しました。ヒト腸内細菌の体系的な研究は、EUと米国で大きな研究費でサポートされています。3月に開催された、EUのヒト腸内細菌のメタゲノム解析プロジェクトが主催したシンポジウムに参加しましたが、EU諸国・米国を中心に約400名の参加があり、口頭発表に加えて170もの若手研究者のポスター発表が行われ、新しいチャレンジに多くの研究者が取り組んでいることが印象的でした。もう一つはEU諸国の枯草菌を中心としたグラム陽性菌研究者の情報交換のためのシンポジウムで、約150名の参加者がありました。その中には、旧知の研究者も居ましたが、多くは若い研究者でした。EUでは、医学的・産業的重要性から複数の研究プロジェクトにより枯草菌の研究が支援されていることもあり、活発に研究が行われていました。

Ion TorrentやPacBio等の新しいシーケンサーの普及により、ゲノム解析が一層、安価で効率的なものになろうとしています。今後の微生物研究は、モデル微生物を中心としたシステム生物学・合成生物学という視点に加えて、様々な自然環境中で生育している微生物の多様性をゲノムレベルで解析していくことが重要になってきていると考えています。微生物研究は、持続可能な社会の実現に向けた世界と将来の課題解決に大きな貢献ができるはずですが、しかしながら、我国では新学術領域研究に細菌を中心としたものがないことに象徴されるように、残念ながら研究費の配分等において微生物研究の重要性は認知されていないと言わざるを得ません。また、微生物研究者の新型シーケンサーを用いた研究へのアクセスは、世界に比べて距離があるように思います。日本の若い微生物研究者が、従来の研究の枠を越えて、新しい手法により、新しい研究テーマに挑戦できるように、ゲノム微生物学会としての積極的な取り組みを行っていくことにより、広く内外に見える形で新しい微生物研究者コミュニティを日本で作っていくことを、今期の重要な課題としたいと考えています。そのための、ご要望やご提案を是非お願いいたします。

奨励賞受賞研究

シアノバクテリアにおける細胞分化にともなう代謝変換制御機構の解明

得平 茂樹 (中央大学・理工学部生命科学科、JSTさきがけ)



シアノバクテリアは酸素発生型の光合成を行うグラム陰性細菌である。光エネルギーを利用して炭酸固定を行うとともに、多くの種類のシアノバクテリアは窒素固定を行うことができる。しかしながら、酸素発生型の光合成と窒素固定は本来、相容れない反応である。窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼ複合体は、極めて酸素に弱く、酸素により容易に不可逆的に失活してしまう。そのため、シアノバクテリアはこれら2つの反応を分離するための機構を発達させてきた。その機構とは、概日リズムを利用した時間的な分離と、多細胞体と細胞分化を利用した空間的な分離である。例えば、単細胞性のシアノバクテリアである *Cyanothece* sp. ATCC 51142 は、日中は光合成を行いグリコーゲンを蓄積する。

そして、夜になるとそのグリコーゲンを利用して窒素固定を行う。それに対し、*Anabaena* sp. PCC 7120 (アナベナ) などの糸状性のシアノバクテリアは、2つの反応を同時に行うことができる。アナベナは、数百に及ぶ細胞が数珠つなぎにつながった糸状体を形成している。糸状体の大多数の栄養細胞が光合成を行っている中で、一部の細胞を窒素固定に特殊化した細胞であるヘテロシストへと分化させ、2つの反応を空間的に分離している。

アナベナはアンモニアや硝酸などの窒素化合物存在下では、栄養細胞のみからなる糸状体を形成する。窒素化合物が無くなるとヘテロシスト分化が誘導され、窒素固定を行う。ヘテロシストの形成にはパターンがあり、10~15個の栄養細胞ごとに1個の細胞がヘテロシストとなる。ヘテロシストは光合成によりエネルギーを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窒素固定に利用している。一方、窒素固定により作り出された窒素化合物は栄養細胞へと送られ、その増殖に利用される。つまり、2種類の細胞が一つの糸状体の中に同時に存在しない限り、どちらの細胞も機能することができないのである。ヘテロシストを形成するシアノバクテリアは、多細胞生物としての一面を持つバクテリアでは数少ない例である。また、ヘテロシスト分化は不可逆的な過程である。一度ヘテロシストへと細胞運命が決定すると栄養細胞に戻ることはで

表1：窒素欠乏により誘導される転写因子

ORF	product	Relative ratio in log ₂		
		3 h	8 h	24 h
<i>alr2178</i>	transcriptional regulator	0.61 ± 0.64	1.76 ± 0.70	0.02 ± 1.09
<i>alr2208</i>	transcriptional regulator	0.83 ± 0.33	1.76 ± 0.67	1.52 ± 1.67
<i>alr2339</i>	heterocyst differentiation protein HetR	0.91 ± 0.24	1.56 ± 0.30	0.17 ± 0.26
<i>alr2587</i>	transcriptional regulator	0.99 ± 0.43	2.20 ± 0.82	3.27 ± 1.57
<i>alr2625</i>	transcriptional regulator	1.01 ± 0.75	1.66 ± 0.49	1.06 ± 1.35
<i>all3788</i>	two-component response regulator	n.d.	2.12 ± 0.34	n.d.
<i>alr3952</i>	transcriptional regulator DevH	0.35 ± 0.27	2.29 ± 0.30	0.39 ± 0.07
<i>all4312</i>	two-component response regulator NrrA	3.67 ± 0.52	4.07 ± 0.56	1.94 ± 0.31
<i>alr4392</i>	nitrogen-responsive regulatory protein NtcA	0.62 ± 0.24	2.92 ± 0.61	0.68 ± 0.75
<i>all4925</i>	transcriptional regulator	0.99 ± 0.75	2.04 ± 0.81	0.01 ± 1.13

DNAマイクロアレイを用いて、ヘテロシスト分化過程で誘導される転写因子の同定を行った。最も初期に誘導される遺伝子 *all4312* (*nrrA*) に関して解析を進め、ヘテロシスト分化を促進する機能をもつことを明らかにした。

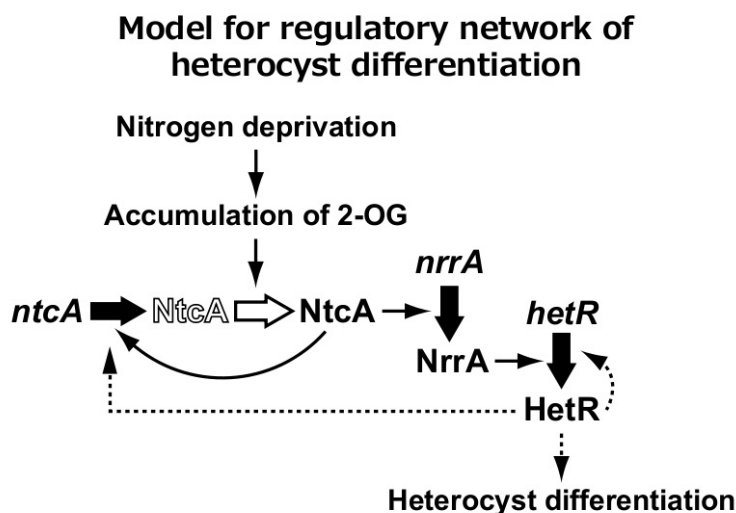


図1：ヘテロシスト分化誘導の制御ネットワークモデル

窒素欠乏シグナルがNtcAとNrrAの2個の転写因子を介して、*hetR*遺伝子の発現を誘導する。HetRは自身の発現を正に制御すると同時に、*ntcA*の発現も正に制御し、ネットワーク全体にポジティブフィードバック制御がかかる。そのため、一度*hetR*の発現誘導が起こると、その細胞において*hetR*の発現量が急激に増加し、ヘテロシスト分化が誘導されると考えられている。【2-OG: 2-oxoglutarate】

きず、細胞分裂もしない。このようにヒトの体細胞と同じ最終分化細胞としての特徴をもつ細胞は、バクテリアでは他に知られていない。ヘテロシスト分化を制御する分子機構に関する研究は、遺伝子発現の時間的、空間的な制御機構だけでなく、細胞運命の決定やパターン形成の分子機構に関する研究に最適なモデルであると考えられている。

ヘテロシストに関する研究は、2001年にかずさDNA研究所でアナベナの全ゲノム塩基配列が解読されたことで飛躍的に発展した。ゲノム情報が利用できるようになっただけでなく、ゲノム解析に使われたライブラリーを利用して、日本のシアノバクテリア研究者のいくつかのグループの協力によりDNAマイクロアレイが作られた。当時はオリゴアレイの技術は開発段階にあり、PCRにより増幅した遺伝子領域をプローブとするアレイが主流であった。しかし、アナベナには5,000を越す遺伝子があり、その全てを特異的プライマーで増幅するのは色々な意味で困難であった。そこで、ゲノムライブラリーを利用してマイクロアレイが作られることになった。全ゲノム領域をカバーするようにクローンを選抜し、

それぞれを鋳型に1セットのプライマーでほぼ全ての遺伝子を増幅することができた。私はこの手作りのマイクロアレイを用いて、世界で始めてヘテロシスト分化過程における遺伝子発現の変動を、ゲノム網羅的に解析した。その結果から、細胞運命が決定する窒素欠乏後8時間という時間において、劇的な遺伝子発現変化が起こることを明らかにした。この劇的な遺伝子発現変化に先立ち、ヘテロシスト分化のマスターレギュレーターをコードする*hetR*遺伝子の発現が誘導されていた。私はこの*hetR*の発現誘導こそが、細胞運命決定の鍵であると考え、その制御機構の解明に取り組んだ。新たに作られたオリゴアレイにより、新規転写因子NrrAを同定し、NrrAが*hetR*の発現誘導に働くことを示した。このNrrAの発見により、窒素欠乏シグナルが*hetR*遺伝子の発現を誘導し、そしてヘテロシストの分化を引き起こす制御

ネットワークが明らかとなった。また、NrrAは糖代謝系を制御することも明らかとなり、分化過程での代謝系変換に関わっていることが示唆されている。

これまでの研究においては、遺伝子発現や分化の誘導に注目してきた。しかし、細胞分化は新たな機能を獲得する過程であると同時に、これまで持っていた機能を失う過程でもある。今後は、シアノバクテリアをシアノバクテリアたらしめている光合成能がどのように失われていくのか、また細胞増殖や脱分化がどのように抑制されているのかなどの課題に取り組み、シアノバクテリアの細胞分化だけでなく、広く生物全般の細胞分化の理解へとつながる研究を進めていきたい。

最後になりましたが、本研究を行うにあたり、大森正之先生（現・中央大学）、佐藤直樹先生（現・東京大学）をはじめ、多くの方々に御指導・御支援を賜りました。心より感謝いたします。

ゲノム微生物学分野の研究動向

マイコプラズマにおける宿主との共進化を ゲノムの退行進化と遺伝子重複による新機 能獲得から読む

佐々木裕子

(国立感染症研究所)

微生物が宿主に感染し増殖する際、感染経路の生態には大きくわけて二つある。一つは媒介感染で、例えばヒトの腸管から出た菌が水や土壌中で生き延びて、あるいは食物で増殖してヒトにかかる。ま

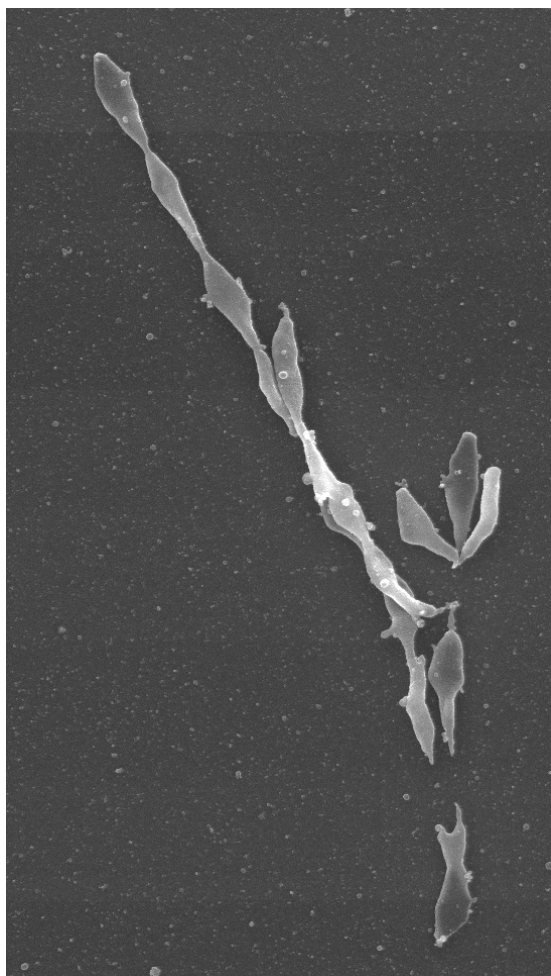


図1 : *Mycoplasma penetrans* の走査型電子顕微鏡観察像

た、レズルボアと呼ばれるヒト以外の脊椎動物で増えたものが、あるいは、ベクター昆虫を介してヒトにかかるといったものである。もう一つは絶対寄生で、かつ宿主域が狭く、ヒトからヒトへかかるだけのものである。感染流行の集団での広がり（疫学）の数理統計的解析（S-Iモデルの格子空間での予測）によれば、絶対寄生での毒性の強さは、致死率が高すぎると宿主も感染微生物も絶滅し有限の閾値以上にはならないと予想される。言い換えれば、感染経路の生態が感染の毒性（宿主における反応）の進化に関係するということになる。では、絶対寄生細菌が宿主と共進化してきた軌跡を細菌ゲノムから読むことは可能だろうか？

私が興味を持つのは、1) 宿主とのかけひき、2) 宿主特異性の発達機構、3) 独自かつ新規な病原性因子である。ゲノムを見る際には、宿主依存に関連して遺伝子が欠落する退行進化と、その一方で、遺伝子重複による宿主に適応するための新機能獲得の相反する二つの現象に着目している。対象とするモリキューテス綱マイコプラズマ目の種は絶対寄生細菌で脊椎動物を宿主とし、宿主域は、魚、鳥、爬虫綱、齧歯目、偶蹄目、食肉目、霊長目に別れ、それぞれ別種が感染する。常在菌である場合から関節炎や呼吸器疾患、牛肺疫という防疫上重要な疾患を引き起こす種もある。一方、分類上近縁なモリキューテス綱アコレプラズマ目には、2つの属があり、アコレプラズマ属は植物表面という外界でも生存可能で、かつ植物からヒトまでの広い宿主域を持つ（約1.5M）。もうひとつのファイトプラズマ属は、昆虫を宿主とし、昆虫を介して植物に感染する病原性細菌でゲノムサイズは約0.8Mと小さい。両目におけるゲノムサイズは、約1.4M～0.6Mと幅があり、目毎に退行進化が生じた可能性を示唆する。図1に示す*Mycoplasma penetrans*は、ヒトの呼吸窮促症候群の患者由来株で、約1.3Mと比較的大きなゲノムサイズを持ちGC含量26%である（Sasaki, Y. et al. NAR 30: 5293-5300; Sasaki Y. Chapter 10 "Mycoplasma", "Bacterial Genomes and

Infectious Disease", Humana Press, pp. 175-190)。

図2のマイコプラズマ肺炎の起因菌*Mycoplasma pneumoniae*は約0.8Mと小型であるが、GC含量は40%と比較的高い。どちらも細胞壁を欠き、細胞膜は脂質二重膜とリポタンパクを主な成分とする。フラスコ型の菌体は、先端のtip構造中に宿主への付着蛋白を持つ。分裂や滑走運動にもこの構造が関係する。またリポタンパクは、宿主の自然免疫ならびに液性免疫に認識される標的である。

M. penetrans ゲノム上のコード領域 (CDS) の17%はパラログ遺伝子で、うち44個がP35リポタンパク群をコードし抗原変異機構への関与が示唆される。魚、鳥、ほ乳類などを宿主とするマイコプラズマ24種において発達したパラログの多くが宿主への付着蛋白とリポタンパクをコードする遺伝子群である。脊椎動物で発達したToll-likeレセプターの標的分子であり、かつ、抗原の菌側のリポタンパク質が抗原変異機構を発達させて宿主免疫を回避することで狭い宿主域での生存に有利な点があるのではないかと考えている。これらの遺伝子はアコレプラズマ

目には無く、一方で、アコレプラズマ目特有遺伝子には植物への適応に関与することが予想される遺伝子がある。興味深いことに、ゲノムサイズの比較的小さいファイトプラズマは、全CDSの12-27%と多くのパラログを有し、アコレプラズマの4%を上回る。宿主依存により欠落する遺伝子が多い一方で、遺伝子重複が起きている。現在確認されている種や遺伝子型 (ファイトプラズマは難培養性のため) の数を種分化の一つの指標と仮定するならば、マイコプラズマ属は約400種、ファイトプラズマ属は約1,100型と多様な環境に適応することに成功しているように見えるが、アコレプラズマ属は約30種のみである。ゲノムにおいて遺伝子欠落と遺伝子重複のダイナミックな軌跡を見せるマイコプラズマとファイトプラズマの宿主適応戦略は、今のところ成功しているように見受けられる。おそらく、絶対寄生細菌のモリキューテスにおいて、退行進化は、宿主のオルガネラになる過程ではなく、自律複製を保持しつつ、新機能を生み出す原動力である遺伝子重複によって新しい宿主に適応範囲を広げることを可能にしているのではないかと推測される。

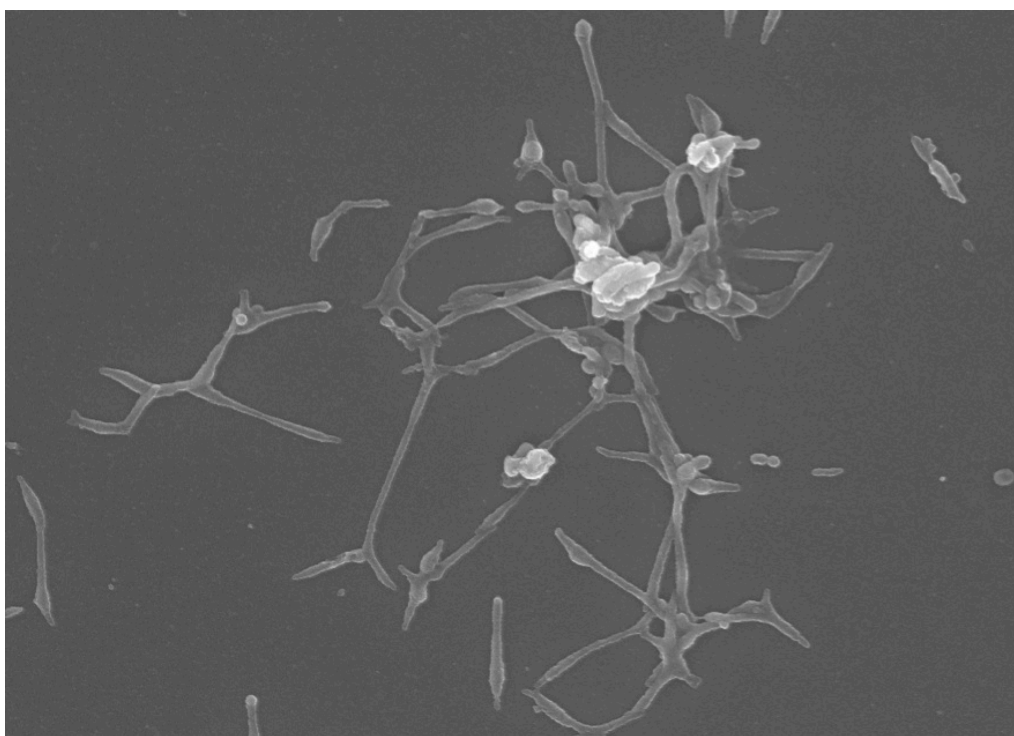


図2：*Mycoplasma pneumoniae* の走査型電子顕微鏡観察像

外国人の目線から

日本の研究現場において思うこと

應 蓓文 (いん・べいうえん)

(大阪大学大学院情報科学研究科・特任准教授)



はじめに

外国人女性研究者として、日本の研究現場についての良い点や悪い点を考えてみたが、結局のところ、良くも悪くもそれぞれの立場により主観的な判断に過ぎないことに気付いた。適応するかしないかの違いだけである。外国人だから、女性だからというのはすべていい訳であり、自分に適した環境を探して適宜な活性（適応度）を保てる環境に辿り着くか、自分を変えてすでにある環境に適応するか、の二択しかないと思う。これは、研究者が人間であり、人間社会が生態圏の一部にしか過ぎないため、適応進化の仕組みを破ることが難しいだろう。

産業界や商業界においては、日本社会は独自のルールで進化してきたが、サイエンスの領域では意外に国際的な共通ルールで進んでいるように思う。そのため、グローバルな目線から見ると、日本のモノづくりやサービス業と比べ、日本の研究業界はそれほど「日本らしく」ないようだ。これは、国際基

準の言語である英語をベースにしたサイエンスの評価系が根強いいため、国際基準にしたがった手順を踏む結果である。例えば、論文を投稿するにしても、研究費を申請するにしても、それぞれの分野の組織の中に生きていくのが肝心であることは世界中のどこでも変わらない。真新しいことに挑戦する前に既存分野での自分の立ち位置を確立しないと、痛い目に会うかもしれない。そういう意味で、日本の一般社会に比べ、科学研究の業界は異文化を受け入れやすい環境である。これは、「国境なきサイエンス」の証しであろう。あえて愚痴を言えば、日本では、スポンサーまたサポーターがいないと、日本人より外国人のほうが四面楚歌の局面に陥りやすいのである。さらに、日本に敬意を払うつもりで敢えて日本語で書いた書類が評価されにくいことがある。

科学研究は生産力に直接貢献できる側面がある一方、文化や思想的な影響力も大きい。国際基準に従うほか、何か日本独自の研究スタイルを発展するための環境づくりがあると、英語圏ではないという壁を超えるのが容易になり、世界中から多様な人材がより集まるだろう。独特の個性と高度な技術力で世界中に影響を及ぼす日本のアニメから何か学ぶことがないだろうか。日本のアニメの特徴は、西洋のスタイル（英語でcartoonと呼ばれるもの）の基準に合わせて認めてもらったのではなく、日本らしさを強く感じさせる独自の魅力で評価されていることにある。日本を選んだ私には、日本のサイエンスがもっと世界的に異色さを光らせたなら、という願望がある。小さな島国だから国際基準を合わせないと、というような「グローバル化」が研究分野を含む日本社会の様々な業界内で流行りのキーワードとなっているようだ。しかし、個性がなければ、存在価値も評価されにくいのでは？とずっと疑問を持っている。つまり、世界的に均一化されると、日本が小さい分、淘汰されやすい危険性があるのだ。「ナンバーワン」になるよりは「オンリーワン」になった

ほうが、長い目で日本の国益や社会発展に重要ではなからうか。このような思いが大学教員になってからは、日々増している。不思議の国としての日本のほうが魅力的なのだ。

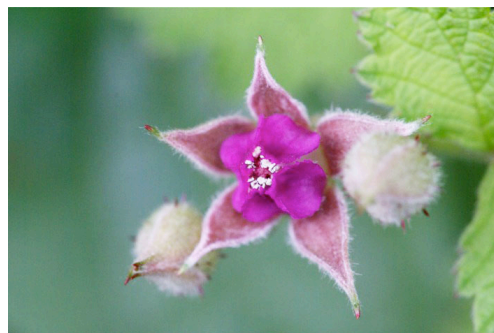
「ここが変だよ、日本人」といったテレビ番組がよく見られるが、前述のように、実際、研究を推進するにあたって、「変だ」と言えるほどのことがほとんどなかった。唯一、男女共同参加という企画が日本らしさを感じさせる。確か、職場でも学術集会でも男性が圧倒的に多い。学生参加者の多い学会では女子が頻繁に見られるが、シニア研究者が集まる場では、男性社会であると言っても過言ではない。これは日本の社会現象でもあるので、研究教育の場のみ男女の地位を改善しようと思っても、実現しにくいものだと感じている。筆者が雇用される前までは、「大丈夫なの？」と大概心配されていた。女性外国人であるため、不安にさせる理由が女性なのか、それとも外国人なのかを区別することができない。学生のころは、留学生という枠組みに分類され、特別扱いされずに済んだのに対して、大学教員（社会人）になってからは、自分がほかの人と違うという事実をやっと気づかされた。この「差」を区別する日本社会が保守的だと読み取る人がいるが、日本人の責任感に対する重みから生まれた慎重な姿勢であると個人的に理解している。そのため、一旦信頼関係を作り上げると、非常にやりやすい環境に生まれ変わるのである。

この「差」が特別視され、苦しむこともあれば、この「差」を「個性」として受け止めることもある。研究者また教育者として、日本にいる自分の価値がどこにあるのかという問いに悩んでいた。お互いに通じやすい日本人がたくさんいる中、同僚として招かれる理由はなにか？結局、他の人との「差」という点に過ぎないという結論にたどり着いた。外国人かつ女性とのダブルカウントで、厳しい状況に陥るように見えるが、逆手をとって、多様性を増すための特別な価値があるという見方も可能である。弱点をいかに強みに変えるのが勝負のポイントである。これは、どんな社会環境においても大切な能力であろう。ある意味で、適応進化である。

男性社会による高効率化が日本の高度発展と高速進化に繋いだことは間違いないだろう。この進化の末、適応度が極めて高められたものの、分散（ばらつき）が非常に狭まっているようだ。これは、実験室内進化に関する研究で得られた結論「最適化し続けてきた結果、ゆらぎ（ばらつき）が小さくなり、進化しにくくなる」に類似している。これ以上に進化を進めても、効率や機能の向上につながり難なることを指している。研究教育の現場において、「差」のある研究者また教員は集団内ばらつきを保つ機能がある。平穏な環境におかれたときは、彼らが優れた適応度を示さないかもしれないが、環境が変化する際に、集団の存続に重要な役割を果たす可能性が高い。つまり、一定の環境で効率化なら均一な集団にするほうがよいが、環境変化（科学ならどんどん新しい進展）があるなら、多様性を作り出すために個性の分散を増やすことが重要である。これは、集団内個体のばらつきが生物の適応進化に寄与するという研究結果から示唆された普遍原理かもしれない。「差」を有効に利用することは、日本人にとっても外国人にとっても、また男女を問わず、なかなかの良戦略の一つである。これは、激動する社会一般にも通じるであろう。

おわりに

これは、筆者の上海、東京、パリ、大阪での暮らしと研究教育の体験から得られた個人的な感想を述べたものである。本文の内容が必ずしも一般的には当てはまらないことがあることを予めお断りしておきたい。日本にいる日本人と外国人の研究教育者に何か有益なヒントや共感を与えることができれば幸いである。



ナワシロイチゴ（バラ科）：2009.5.21

ポスドク・大学院生として学会に参加して

Analysis of Transcriptional Regulators in *B. subtilis* by GeF-seq, a High Resolution Method of Genome Footprinting

Onuma Chumsakul

(Postdoctoral Researcher, Laboratory of Genomics of Bacterial Cell Functions, Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology)



It is five and a half years since I came to Japan in autumn 2006. I received Monbukagakusho Scholarship for my doctoral study in the Graduate School of Biological Science, Nara Institute of Science and Technology (NAIST). I successfully completed my degree work in September 2010 and have been staying on to work as a postdoctoral researcher in the same laboratory up to present. Studying abroad is a really good opportunity for me as a researcher and as a person as it enriches my research as well as my life experiences. Six years ago I had no plan to come and study in Japan, but looking back I could say that I made one of the best decisions of my life.

I actually majored in medical technology for my university degree. When I was a 4th year

undergraduate student, I learned about some topics in genetic engineering as part of a course I was taking up then. I got really interested in it, which also marked the beginning of my interest in microbial genetics. After working for two years as a medical technician in a hospital, I decided to pursue a Master's degree majoring in Biotechnology, specifically molecular and medical biotechnology, at Mahidol University in Thailand. My research then was focused on the cloning and characterization of the crystal toxin protein gene in *Bacillus thuringiensis*, a bacterium producing intracellular crystal proteins that have bio-insecticide activities. Later on I became interested in transcriptional regulation of gene expression. So, when I obtained the chance to study in Japan, I decided to join the Laboratory of Genomics of Bacterial Cell Functions to study *B. subtilis*, an organism similar to *B. thuringiensis*. I hoped that I could study the regulatory network of gene expression at a research level different from what I was used to, by learning advanced technology to fully understand the fundamentals of science.

In my doctor's degree course, I studied on a transition state regulator, AbrB, and its homolog Abh in *B. subtilis*. AbrB is an important and well-known global transcriptional regulator that represses more than 200 post-exponential growth phase genes involved in biofilm formation, antibiotic production, and other biological functions during active cell growth. Although AbrB had been extensively studied for many years, how it would select the binding sites to achieve its desired functions was still unclear. Thus, I explored the functional roles of proteins by determining their binding sites on the genome through modified chromatin immunoprecipitation (ChIP)-chip method called the

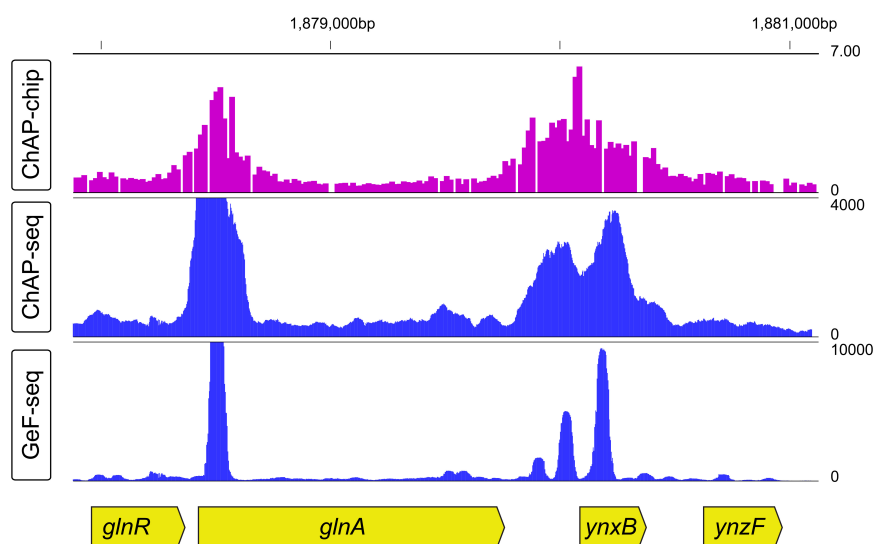


Fig. 1 shows improvement in the resolution of AbrB binding sites within a *B. subtilis* genomic region determined by the GeF-seq (genome footprinting by high-throughput sequencing) method in comparison to the resolution achieved by the ChAP-chip and ChAP-seq method.

ChAP-chip (or, chromatin affinity precipitation coupled with tiling chips), in parallel with the analysis of transcriptional profiling in mutants using custom Affymetrix tiling chips. I was able to find hints for the complex recognition mechanism of AbrB/Abh and published a paper on this at the completion of my doctoral degree. However, the resolution to restrict protein binding sites obtained by the ChAP-chip method was not high enough to really understand their exact molecular mechanism.

Therefore, in my postdoctoral research stint, I developed a new method called 'genome footprinting by high-throughput sequencing' (GeF-seq) to attain a high-resolution mapping of protein-binding sites by combining *in vivo* DNase I digestion and ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation coupled with high-throughput sequencing). This method provided me with the precise region bound by the protein of interest with the resolution comparable to that of the *in vitro* footprinting method. In the case of AbrB/Abh, I found that AbrB/Abh recognizes not only paired motifs but also multiple motifs, probably through oligomerization. Therefore, I think this method will be effective in elucidating the co-ordinate

regulatory roles of transcriptional regulators in *B. subtilis* and other organisms. If the transcriptional regulatory network is well understood, then bacterial transcription can be controlled and manipulated for a wide-range of applications.

I have a busy research life and I think I work harder than ever. During the first two years of graduate school, my research did not go so smoothly as I had hoped. I unsuccessfully tried several different ways to solve the problems I faced. I did learn a lot from my failures though,

which helped me inch by inch to bring my way to success. That is why I am so grateful to my chosen laboratory, working with active and wide-visioned full and assistant professors. Their positive thinking and different perspectives in research impressed me. From them I have learned how to think as a scientist, something more important than knowledge and techniques.

Besides research, I also enjoy my life in Japan. Living in Japan has been a very pleasant experience for me. The country has a very rich culture and has many famous historic and scenic places to visit for sightseeing. I honestly had no idea about life in Japan and did not even know a single Japanese sentence before coming here, which was also my first time to be in a foreign country. But I was not really afraid nor did I have any anxiety to come here. Instead I was very excited to explore new things. I did not experience a culture shock since I did not have any expectations about life in Japan. Thankfully, everything worked out well.

I am thankful to my friends in the lab for their support and very warm friendship. To be able to speak Japanese was one of my goals

when I first came. As I had no time to take intensive language course when I first arrived, I took Japanese classes twice a week and tried to learn Japanese by myself when time allowed me to do so. My friends in the lab also encouraged me to talk to them in Japanese so my language skill has slowly been improved. Now, I am glad that I can understand Japanese better (although not completely yet). Through the Japanese language classes that I took, I also enjoyed learning and experiencing different aspects of the Japanese culture such as tea ceremony, cooking party or Japanese theater performances and so on. All of these activities have given me a long-lasting impression. I had difficulty in eating Japanese foods in my early days, but I slowly realized how tasty Japanese foods are, especially the raw ones, which were impossible for me to eat before. When I leave the country, I am sure I will miss all of these,

but I will definitely take with me a lot of good memories about Japan. I think being in a foreign land not only allows us to learn and understand the country itself but also enables us to see our own home country with a clearer view.

It was my first time to join the SGMJ annual meeting this year and I introduced my work there. I think the meeting was highly informative and broadened my knowledge on a wide-range of research and advanced techniques in microbial genetics. I thoroughly enjoyed the meeting.

In future when I return to Thailand, I hope I shall be able to conduct collaboration with Japanese researchers to share ideas, knowledge, and technology in the field of microbial genetics, among other things.

新しい“性”を人為的に創れるか？

清家 泰介

(大阪市立大学・大学院理学研究科生物地球系専攻・博士後期課程2年)



新しい接合型を持つ酵母を求める日々

奇跡的な出会いを果たした変異型同士のカップルを探すのは大変です。

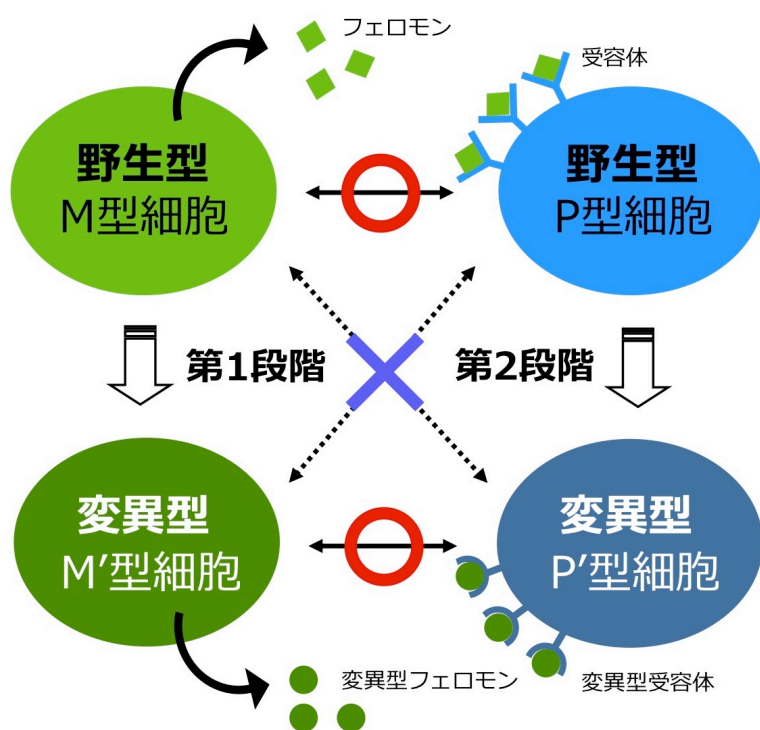
今年3月に立教大学で開催された第6回日本ゲノム微生物学会年会では、年会に参加するのは初めてで、しかも研究室から参加したのは私一人だったので少し緊張していました。ショートトークとポスター発表をさせていただきましたが、連日の会場を埋め尽くす人の数と活発な討論が印象的でした。卒論生として研究室に入った時からの目標である「酵母の新しい性を創る」という目標も、早4年を経ましたが、ようやくゴールに近づいているような気がします。

ヒトと同じように分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) にも2つの性 (交配型) が存在します。それらはプラス型とマイナス型と呼ばれ、異なる交配型の細胞間で融合して遺伝子を混合します。交配型の特異性は接合フェロモン (ペプチド) とその受容体の分子認識によって決まります。そこでこれらの遺伝子に突然変異を導入して、フェロモンと受容体を人為的に変えてやると、偶然に変異型細胞間でのみ接合できる酵母が見つかるのではないかと考えました。このアイデアは正しいはずだ、だから絶対創つ

てやろうという気持ちで研究を始めました。まず第1段階では、マイナス型のフェロモンが9アミノ酸からなるごく短い脂質ペプチドであることに注目し、アミノ酸残基を一つずつ19種類の異なるアミノ酸に置換するというほとんど前例のない網羅的なミスセンス変異の導入を行いました。1年がかりで152種類のアミノ酸置換体をすべて作り、その内35種類の変異型フェロモンが機能を失っていることが分かりました (Seike *et al.*, Genetics, in press)。そこで第2段階に進み、今度はこれらの変異型フェロモンを偶然に認識できるように変異した受容体の探索を行いました。受容体は365アミノ酸からなるGタンパク質共役型受容体 (GPCR) でフェロモン結合部位などの情報はほとんど得られていませんので、私たちは受容体タンパク質のコード領域全長にわたってランダムに突然変異を導入することにしま

した。数十万コロニーが対象という膨大なスクリーニングを済ませ、現在まで9個の求める突然変異受容体が得られています。これらの接合可能な変異型フェロモンと変異型受容体の組み合わせをもって、人為的な新規接合型の酵母ができたと考え、今回発表させていただきました。

今後の研究の方向ですが、創出した新たな交配型を持つ人為的生殖群が野生型生殖群から生殖隔離されていることを遺伝学的な手法で証明することが一つです。また、*S. pombe*の近縁種のゲノム情報を解析して、自然界での種分化の過程において、今回人為的に起こしたような変異が生じた痕跡を見つけないかと考えています。さらに野生型・変異型の両生殖群を同じフラスコ内で混合して長期培養し、これらのゲノム進化の様子をこの眼で見たいという夢を抱いています。



新規接合型ペアを創出するための戦略図:

第1段階では、M型細胞から分泌されるフェロモンに網羅的に突然変異を導入し、野生型の受容体が認識しない変異型フェロモンを取得します。次の第2段階では、受容体にランダムに突然変異を導入し、第1段階で取得した変異型フェロモンを認識できるものを探索します。この変異型受容体が野生型フェロモンを認識しなければ、互に変異型同士でのみ認識できる新規接合型のペアの誕生となる訳です。

ショートトークでは緊張もあって、時間を一杯使うことなく終わってしまいましたが、その直後に行われたポスター発表では、開始前からすでに3人の方が私のポスターの前に待っておられ、すぐさま討論することができました。ありがたいことにとても盛況で、発表の間、人が絶えることがありませんでした。発表を聞いて下さった多くの方々からお褒めをいただき、自分の研究が学問的に意味深いことを再確認できて、とても嬉しく思っています。特に数人の方とは濃密な討論ができ、これからすべき課題も多いということを痛感しました。研究は上手いかなことが多い、でも目標があるのなら、自分を信じて努力すべきだと思います。私はまだまだ未熟ですが、誰よりも一歩先のことを考えて努力し、将来は立派な研究者になりたいと思います。

次回の長浜バイオ大学で開催される第7回日本ゲノム微生物学会年会にもぜひ参加したいと考えています。今回色々な方から頂いた意見を参考に、さらに面白い結果を報告できるよう頑張ります。

第7回日本ゲノム微生物学会年会への誘い

第7回日本ゲノム微生物学会年会を、2013年3月8日（金）～10日（日）の日程で、長浜バイオ大学（滋賀県長浜市）で開催します。奮ってご参加下さい。

微生物ゲノムの研究は、シーケンサーの革命的とも呼べる進歩と共に急速な発展を遂げており、若い学問領域としての特徴を益々明らかにしています。新しい多様な実験や大量情報の解析技術については、教員が教えらえることは少なく、むしろ若い研究者・ポストドク、大学院生・学部生等が主体的に学び、教員の微生物に関する専門知識と組み合わせて新規発見を行う、魅力的な分野となっています。この様な分野では、若い世代が大学や研究所の壁を越えて情報や知識交流を行うことが必須であり、ゲノム微生物学会は正にこの情報交換や人的交流のための重要な場となっています。長浜大会においても、この点を意識した企画を立てたいと考えております。昨年度の立教大学における大会を継承して、「外国にいる、あるいは最近外国から帰ってきた若手研究者の招待講演」を企画し、併せて「本学会奨励賞の過去の受賞者の最近の研究発表」を加えたいと思います。

この分野の発展には、情報解析や新技術開発に携わっている企業の役割は重要であり、企業展示やランチセミナーが行われて来ました。今回はそれに加えて、企業に所属して大量情報解析等を担当しているメンバーに、技術面を中心にした一般講演を行っていただくセッションを設けたいと思います。併せて、日本の次世代シーケンスの専門家のグループにも呼びかけ、我が国のこの分野の情報交換の場を提供したいと考えています。

第7回日本ゲノム微生物学会・年会会長 池村 淑道



長浜バイオ大学は米原から北陸本線で3駅目の長浜駅のすぐ近くの琵琶湖の東岸にあり、東には伊吹山が聳え、南には彦根城があり、豊かな自然と歴史の調和のとれた環境に位置しています。



第6回日本ゲノム微生物学会年会のまとめ

第6回日本ゲノム微生物学会年会は2012年3月10日～12日の3日間、河村会員を年会長として、東京・池袋の立教大学池袋キャンパスで開催されました。交通の便のよい会場での開催だったせいか、非会員の出席者も多く、3日間の参加者は総計404名の多数にのびりました。



参加者の内訳は：正会員 158名、学生会員 84名、一般非会員 87名、学生非会員 48名、招待 5名、プレス関係 2名、賛助企業 20名でした。会場の大きさが手頃だったせいもあってか、口頭発表での活発な質疑応答や討論が目立ちました。また、新しい試みとして「海外若手研究者招待講演」も行なわれ、さらに11日と12日に行なわれたランチョンセミナーも盛況であり、また、学生会員による自分の発表したポスターの概要を3分で説明するショートトークも活発に行なわれました。



写真説明

上：総会：第二日の午後開かれた総会にも沢山の会員が出席し、年会の活気が伺えました。

下：ポスター会場風景：ポスターの会場はやや狭かったせいもあり、ポスター番号を奇数と偶数に分けて行なわれたにもかかわらず、発表者による説明時間には混雑を極めていました。

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：吉田健一、大西康夫 集会幹事：久原哲、有田正規 広報幹事：中村保一、佐々木裕子、磯野克己 男女共同参画：有田正規、佐々木裕子

評議員（会長推薦を含む）：朝井計、跡見晴幸、石川淳、板谷光泰、漆原秀子、大島拓、河村富士夫、黒川顕、菅井基行、高見英人、田中寛、田畑哲之、戸邊亨、内藤真理子、永田裕二、仁木宏典、野尻秀昭、林哲也、吉川博文、北川正成

会計監査：藤田信之、和地正明

会員の動向

全会員数 414名（平成24年 4月18日現在）

正会員 314名；学生会員 76名

賛助会員 22 団体；機関会員 2 団体