



東京農業大学応用生物科学部 吉 川 博 文

微生物ゲノムの解読と機能解析

はじめに

ワトソン・クリックのDNA二重らせんモデル以来、遺伝子の本体であるDNAの塩基配列は分子生物学の発展と共に生物学者の大きな関心の的となった。1980年、サンガーとギルバートが塩基配列決定法でノーベル賞を受賞するが、筆者は1978年にいち早くサンガー法、マクサム・ギルバート法を試みた。条件検討の難しさからサンガー法は再現性が低く、80年代半ばまではマクサム・ギルバート法を用いた。やがてキット化によりサンガー法が世の主流になり、蛍光試薬の利用による非RI化、自動化、さらにキャピラリー化による大量解読の時代に入った。21世紀に入り、桁違いの解読量を誇ることから次世代型と呼ばれる革新的シーケンサーの登場で生物学の様相は一変する。モデル生物に関してはゲノム情報を共有した上でその機能解析を行うことが基盤となり、ゲノム生物学という新分野も誕生した。このような時代の流れの中、筆者は形質転換能の高い枯草菌とシアノバクテリアを研究対象としてきたが、要素所で塩基配列を決定し、その情報から得られる恩恵に預かってきた。その背景には、常に1塩基の持つ意味を追求してきた姿勢がある。以下、その端緒となった成果から、ゲノム解読の成果、および近年興味を持っている実験進化の取り組みを紹介する。

1. ゲノム解読の成果

1-1. 枯草菌ファージ ϕ 29の末端逆向き反復配列の発見

直鎖状ゲノムの5'端複製の問題は、1970年代当時のDNA複製分野における重要な課題であった。アデノウイルスと共通して5'端にタンパク質が結合している ϕ 29ゲノムの末端配列をすべての4方向から決定したところ、6塩基の逆向き反復配列を見出し、両端が同じ機構で複製開始をしていることを示唆した¹⁾。競合するスペインのグループが学会で7塩基と報告していたが、筆者の注意深い検証を説明したところ間違いを認めた。このことが1塩基の違いに注視するきっかけになった。

1-2. 枯草菌分泌装置遺伝子の発見

枯草菌は菌体外酵素の分泌が大きな特徴であり、分泌装置が注目されていたが、先行する大腸菌に比べて全く同定されていなかった。リボソームタンパク質遺伝子クラスターが大腸菌とシンテニーを持つことを手がかりにSpectinomycin耐性の*rpsE*遺伝子を指標にクローニングしたところ、大腸菌同様、近傍に*secY*が存在していた。同じ手法で、Thiostrepton耐性の*rplK*をクローニングしたところ、近傍に*secE*を見出した。これは思い返せばかなり無謀な挑戦だったが、幸運にも見つけることが出来た。特に*secE*に関しては、その領域から両ゲノムは全く異なっており、しかも枯草菌*secE*は大腸菌*secE*の半分以上しかなく、大腸菌に3回ある膜貫通ドメインを1回しか持っていなかった。これは本当に*secE*かと思われたが、大腸菌*secE*変異株を相補できることを示して証明した²⁾。一方、*secY*に関しては孢子形成欠損になる変異株を取得し、孢子形

成過程に分泌装置が重要な働きを持つことを発見した³⁾。

1-3. 枯草菌ゲノム計画への貢献

枯草菌ゲノム計画では約150 kbを担当し、完全ゲノム解読に貢献するとともに⁴⁾、ポストゲノム解析として必須遺伝子の同定を引き続きコンソーシアムとして行った⁵⁾。また単独の成果としては酵母2ハイブリッドを用いた網羅的相互作用解析を行い、多くの新規相互作用を見出して、その後の研究の大きな基盤になった⁶⁾。

2. 次世代シーケンサーの活用

革新的超高速シーケンサーの登場に際し、筆者はいち早くその有効性を認め、2008年、東京農大ゲノム解析センターの設立に尽力した。本センターの運用に関しては、農学分野を中心とした多くの研究者との共同研究に発展させることが出来た。主な解析目的は、リシーケンス(変異解析)、de novo(新規ゲノム)解析、RNA-seq(発現解析)であり、特に開設当初は微生物ゲノム解析のノウハウを蓄積した。微生物育種に関してはまず研究室保存株の配列を決定し、それを元に変異株を取得することを提唱してきた。例えば、それまで曖昧な表現型の違いとして黙認してきた様々な研究室保存株間の違いを白日の下に晒すことになった⁷⁾。枯草菌ゲノム計画の際に各研究室に分譲した株を、20年後に再度取り寄せて比較したところ、ゲノム全体で1~7ヶ所の変異が見られた。冷凍保存中は安定なこと、植継ぎを繰り返すことで変異が蓄積することを確認した。一方、ショートリード型の次世代シーケンサーでは試料中のゲノム量に比例してリード深度(本数)が深まる原理から、対数増殖期のゲノムを使えば複製起点が予測できるのではないかとこの次世代型ならではの方法を着想した(図1)⁷⁾。この原理を複製起点が不明なことで知られるシアノバクテリアに適用したところ、興味深い事実を見出した。この点は次項で述べる。

3. 光依存、DnaA非依存DNA複製系の発見

シアノバクテリアは光合成研究の対象として多くの研究がなさ

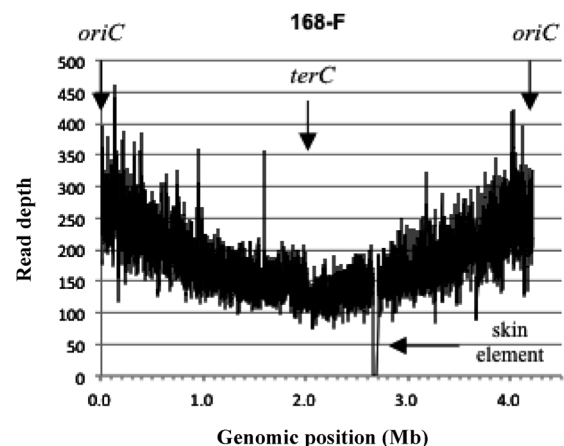


図1. 枯草菌168株のリード深度プロット⁷⁾。対数増殖期の細胞から抽出したDNAを使用。Ori近傍のゲノム量はTer近傍の約2倍の存在比を示している。

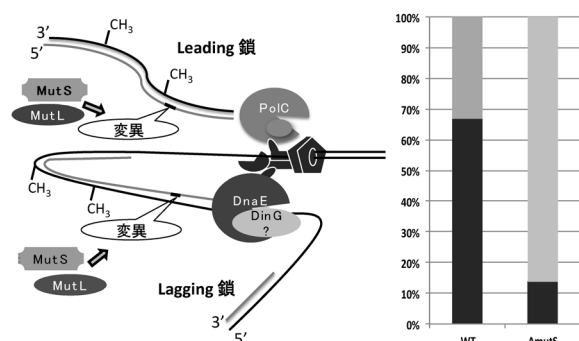


図2. 枯草菌のDNA複製機構と修復系欠損株の変異バイアス¹⁰⁾.

れてきたが、ゲノムの複製や分配、細胞分裂といった基本的生命現象の解析はあまり行われてこなかった。淡水性シアノバクテリアはゲノムを複数コピー持つことが大きな特徴であるが、筆者はこの点に興味を持ち、次世代シーケンサーを活用した遺伝的解析等によりいくつかの興味深い結果を得た。すなわち、複数のコピーはゲノム毎、細胞毎に非同調的に複製されており、その開始は光合成電子伝達系に依存して細胞分裂前のLag phaseに複製し、増殖・分裂と共にコピー数を減らしていくこと⁸⁾、さらに別の種では複製起点が一定でなく、しかも原核生物で普遍的に必要なDnaAに依存しない複製開始をするという事実である⁹⁾。

Synechococcus elongatus は *oriC* から複製するが、DnaAの*oriC*への結合が光依存的な制御によっている。また*dnaA*の欠失した株を得ることが出来、その株はなんと共存するプラスミドが染色体に組み込まれ、その複製開始機構を利用するという生存戦略を取っていた。一方、*Synechocystis*, *Anabaena*の*dnaA*欠損株は通常の生育、複製活性を示し、DnaAはもはや必須ではなくなっていた。そこで野生株において複製開始点を探索した結果、*oriC*と思われる領域に検出されないばかりか、他のどの領域にも検出されなかった。この結果は、複製開始点の複数性、非同調性を示しており、他のバクテリアとは異なる特異的な複製開始機構であることが示唆された⁹⁾。シアノバクテリアの祖先が共生進化したと考えられている植物の葉緑体においても*dnaA*は保存されておらず、謎である葉緑体の複製機構を解く大きな鍵になると考えている。

4. GC含量一定の謎への提言と実験室内進化

枯草菌ゲノムのGC含量は約43%であり、放線菌は約70%と生物種は固有のGC含量を持っている。生育温度とは相関がないことは示されているが、要因は不明である。筆者は枯草菌の野生株の変異がややATに偏ること、誤対合修復系の欠損株($\Delta mutS$)ではGCに偏ることを見出した(図2)¹⁰⁾。すなわち、グラム陽性菌においてはDNAポリメラーゼの機能に内在する性質として複製エラーがGCに偏っており、それが誤対合修復系の欠損によって顕在化したのであろうと考えている。放線菌群は総じて*mutS/L*誤対合修復系が欠損しており、これが高いGC含量の要因ではないだろうか。

一方、進化のプロセスにおいて突然変異、特に1塩基多型(SNPs)は最も主要な原動力である。ヒト全ゲノムSNPsデータベースを解析した結果、SNPs間の距離の分布はべき乗則で近似できることを報告したが¹¹⁾、さらに実験進化の手法を取り入れ、新しく入る変異に対してもこの確率分布が当てはまることを見出した(図3)。すなわち、突然変異の入り方はべき乗則に従い、新たな変異は既に存在する変異の近傍に起きる確率

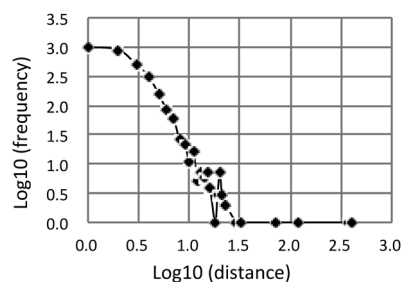


図3. 変異の確率分布はべき乗則に従う¹²⁾。
105世代継代後の酵母株が獲得したSNPsと元の変異点との距離を解像度100 bpのBox plotで示した。

が高いことを示している。

おわりに

以上のように、筆者の研究者人生はずっと1塩基の意味を考えてきた歴史といえるが、むしろ翻弄されてきたと言った方が正しいかもしれない。ここに述べられなかったが内容として、転写開始点の1塩基の置換が転写活性を劇的に変化させる発見があるが、RNAPがプロモーターに結合することが転写の開始と習ってきた身には驚きであった。また、長らくシャペロンの研究に携わったが、進化の過程で変異が起きても、表現型として顕れるのをシャペロンが緩衝しているというLindquistの報告は衝撃であり、筆者も枯草菌を用いて更なる検証を行った。1塩基が包括している意味はまだ多くの謎があり、生命現象との繋がりを解析して行く道は魅惑的である。

謝 辞 以上の研究成果は、多くの方々に支えられて得られたものです。研究者人生のスタートから導いていただきました東京大学名誉教授、別府輝彦先生、同故齋藤日向先生、留学中に研究の楽しさ厳しさを教えていただきましたアリゾナ大学教授、伊藤純悦先生、カリフォルニア大学デービス校教授、Roy H. Doi先生には心から感謝いたします。東京大学旧応用微生物研究所時代の先輩、後輩、第二研究部の院生、企業研究者の方々、枯草菌研究コンソーシアムのメンバーには多大なご協力を頂いたと同時に、ゲノム計画の時には悲喜交々を味わい、支え合って完成したという思いがあります。東京農業大学の新設学科に赴任してからは、千葉櫻拓教授、渡辺智准教授をはじめ、武蔵野大学 門多真理子教授やバイオサイエンス学科の同僚にご尽力いただいて教室運営をしてきました。そして微生物分子遺伝学研究室の院生、学生とともに人生をかけた研究を進められたおかげで今日の私があります。彼らに深甚な謝意を表します。最後に、本賞にご推薦いただいた立教大学名誉教授、河村富士夫先生および選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Yoshikawa et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1336 (1981)
- 2) Jeong et al., *Mol. Microbiol.* **10**, 133 (1993)
- 3) Yoshikawa et al., *J. Bacteriol.* **175**, 3656 (1993)
- 4) Kunst et al., *Nature* **390**, 249 (1997)
- 5) Kobayashi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4678 (2003)
- 6) Fukushima & Yoshikawa, *Research Signpost, India* (2007)
- 7) Shiwa et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 2073 (2013)
- 8) Watanabe et al., *Mol. Microbiol.* **83**, 856 (2012)
- 9) Ohbayashi et al., *ISME J.* **10**, 1113 (2016)
- 10) Akashi & Yoshikawa, *Front Microbiol.* **17**, 266 (2013)
- 11) Gouda et al., *Genes Cells* **21**, 396 (2016)
- 12) Takamatsu et al., in prep.