

# 微生物ゲノムの解読と機能解析

吉川博文\*†

(平成30年3月15日受付/平成30年4月20日受理)

**要約:** 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。その後、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、要所要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。本稿では、始めにその端緒となった成果について紹介し、その後のゲノム解読関連の成果について述べる。次いで、次世代シーケンサーを用いた微生物の新規研究法に関する取り組みを紹介する。最後に、このような背景の下に得られた研究成果から、シアノバクテリアに関して光依存、DnaA非依存のDNA複製系の発見について、そして枯草菌に関して脂質合成系必須遺伝子*plsX*の相互作用解析から見えてきたいくつかの細胞機能ネットワークについて解説する。

**キーワード:** 微生物ゲノミクス, 次世代シーケンサー, シアノバクテリア, 枯草菌, 機能ネットワーク

## はじめに

メンデルによって確立された遺伝学が人々に浸透して以来、遺伝子の本体に対する興味は世界中の科学者を惹きつけた。その流れの中で、二十世紀最大の科学上の発見とも言われるDNAの二重らせんモデルが確立すると<sup>1)</sup>、その解析法が人々の大きな関心になった。ファージの感染に対するバクテリアの制限現象を解析していたSmith, Arber, Nathansの3名が、DNAの塩基配列特異的に切断する酵素の発見という、その生物学的業績ではなく、DNA解析のツールの発見によってノーベル賞を受賞するという極めて特異な現象が、関心の大きさと意義を物語っている。同時に、ACGTの4つの文字の並び(塩基配列)が持つ意味に対する関心は究極にまで高められ、分子生物学の勃興とともに生命現象解析の基盤的背景として機能の裏付けをする役割を担ってきた。その解析法の歴史は、まさに高速化、簡便化の歴史であった。筆者が大学院生時代に与えられたテーマが、枯草菌ファージゲノムの末端配列の解析であったが、DNA複製のメカニズムとして、5'端複製の問題が学会の重要な課題の一つであったためである。同じ興味を持っていたスペインの研究グループと、最新技術を駆使して末端の配列を決める競争状態にあった。Keystoneで開かれたシンポジウムで、並んでポスター発表をしたが、彼らは7塩基の末端逆向き反復配列を、我々は6塩基の同

配列を発表した。私が彼らの間違いを指摘し、結局、アメリカ科学アカデミー紀要に並んで掲載されることになったが<sup>2,3)</sup>、1塩基の違いは決定的な差であり、たった1塩基といえども大きな意味があるのではないかと、という姿勢を生涯貫くきっかけとなる事件であった。類縁のファージに解析を拡張すると、この末端逆向き反復配列という構造がすべて保存されており<sup>4)</sup>、先行していたアデノウィルスの研究と相まって、プロテイン-プライミングの一般的機構解明に大きく貢献した。

その後、微生物遺伝学の研究過程でさまざまな変異株の作製と変異点の同定(マッピング)を行ってきたが、塩基配列決定の従来法における究極の解析がゲノム計画であった。一つの生物種のゲノム配列をすべて決めようというゲノム計画は、ヒトゲノムを中心に国家プロジェクトとして大々的に推進された。このプロジェクトは、ヒトやバクテリアも含むさまざまな生物種の研究者ばかりでなく、情報科学や生命倫理の専門家も一堂に会することによって、ゲノム解析の情動的基盤や倫理的側面も構築する貴重な機会となった。その後、急速に発展する生命科学のさまざまな分野における指針となったことは間違いない。我々も、日本とヨーロッパの研究室を中心にコンソーシアムを形成し、モデル微生物としての枯草菌ゲノム計画に携わったが<sup>4)</sup>、当初は、大学院生にひたすらシーケンスばかりやらせて学位に相応しいか、といった議論が各大学で巻き起こり困難

\* 東京農業大学名誉教授 (生命科学部バイオサイエンス学科)

† Corresponding author (E-mail: hiyoshik@nodai.ac.jp)

な時期もあった。しかし、結果として完成した全ゲノム解読の価値は当事者の想像以上のものであり、ゲノム解読に異議を唱える者はいなくなった。何と言っても情報の全量を把握出来ているという安心感こそが、全ゲノムを知ったことの最大の意義であろう。得体の知れない、手がかりの見えないものを闇雲に探すようなイメージが払拭され、生物学がきちんとした方法論と論理的な思考によって成り立つことを示したことで歴史的な意味を持ったと思う。バクテリア一つの解析においても、領域を越えた解析技術によってゲノムを俯瞰的に見る事が出来るようになり、例えばGC含量を領域毎にプロットすることにより、外来性因子の同定が簡単にできるようになったり<sup>5)</sup>、ゲノムを比較することでシンテニーや大規模な重複、逆位等が容易にわかったり、進化の足跡を辿れるようになるなど、生物学の画期的な変革が起きた。21世紀はゲノム時代といわれるが、その幕開けとなる現象であった。こうした時代の流れの中、いわゆる次世代型と呼ばれるシーケンサーが登場した。

### 1. 次世代シーケンサー (NGS) を用いた微生物の新規研究法

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、東京農大生物資源ゲノム解析センターの設立に尽力した<sup>6)</sup>。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(表1)。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。これらの解析を通して、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ておくことがいかに重要であるかを痛感することになり、それを元に変異株を取得することを提唱してきた<sup>7)</sup>。

(1) 枯草菌とシアノバクテリアの研究室保存株の比較解析  
 バクテリアの表現型はコロニー形態一つとってもさまざまに変化する。こ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。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<sup>8)</sup>。各研究室から保存法の情報を取得して検証した結果、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、別のストックセンター(BGSC: Bacillus Genetic Stock Center)から取り寄せた株と比較すると数十箇所の違いが見られたことから、由来の違いが明確に判明することも明らかになった(図1)。

表1 東京農業大学生物資源ゲノム解析センターで新規に解読した生物種(2017年現在)

Prokaryote	
<i>Alphaproteobacterium</i> Strain	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>Aquabacterium</i> sp. Strain	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Leptolyngbya</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i> phage SP10	<i>Leuconostoc</i> sp.
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Nostoc</i> sp.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Porphyromonas crevioricanis</i>
<i>Burkholderia plantarii</i>	<i>Porphyromonas cansulci</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1
<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>Ralstonia</i> sp. NT80
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptomyces rochei</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942
<i>Fischerella</i> sp.	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>Fructobacillus</i> sp.	<i>Cyanobacillus</i> (合成生物)
Eukaryote	
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>
<i>Mixia osmundae</i>	<i>Oryza sativa</i> L. cv Omachi 他
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Bos taurus Kuchinoshima-Ushi</i>
<i>Saitoella complicata</i>	<i>Homo sapiens cell line</i>

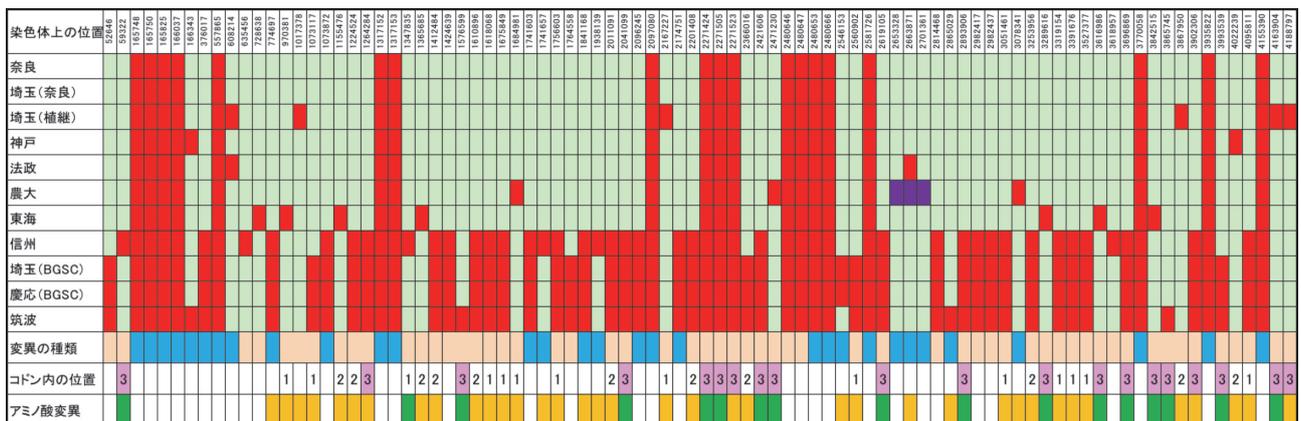


図1 枯草菌168株のリシーケンス結果。各研究室保存株のゲノム配列のうち、参照配列(NCBI Refseq NC\_000964.3 文献19)と異なる塩基番号(上段)の箇所を赤色で示した。変異の種類はSNPを肌色、挿入・欠失を水色、コドン内の変異は3文字目の変異(ピンク色)が比較的多い。アミノ酸置換を伴うコドンの変異をオレンジ色、伴わない場合を緑色で表した。農大株に見られる紫色はプロファージ(Skin element)の欠失を示す。各研究室(2013年当時)は次の通り。奈良:小笠原, 埼玉(奈良):朝井(奈良より移管して保存), 埼玉(植継):朝井(植継ぎ使用株), 神戸:吉田, 法政:佐藤, 農大:吉川, 東海:小倉, 信州:関口, 慶応:板谷, 筑波:山根。BGSC: Bacillus Genetic Stock Center. 文献8, 図1に加筆して改訂。

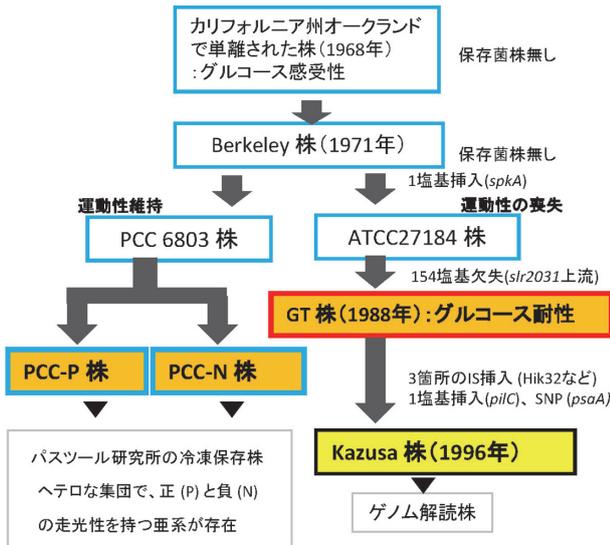


図2 シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 亜系統の系統関係。文献9, 図4より加筆して改訂。

また、遺伝マーカーをほとんど用いてこなかったシアノバクテリアについては、系統保存株の配列と株譲渡の歴史からミニ進化系統樹を作成した。*Synechocystis* sp. PCC 6803 株において、明確に表現型が比較出来るのは運動性とグルコース感受性であるが、既に現有の保存株に違いが見られている。これらの株のゲノムをすべて解読して比較することにより、図2のような系譜を作ることが出来た<sup>9)</sup>。各ゲノムの違いを詳細に明らかにしたことにより、今後の解析や育種の過程において、どのような変化が起きたかを追跡することが容易になり、機能との相関を検証する情報基盤が整備されたと言える。

これらの結果から、今後の微生物研究においては研究室保存株のゲノム解析をしておくことが必須であり、それを基盤にして育種していくことが重要である。

## (2) リード深度プロットを利用した複製起点の同定

ショートリード型の次世代シーケンサー (NGS) 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 (Ori) 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に着想した (図3)。すなわち、対数増殖期には、複製フォークが終点 (Ter) に達する前に、次の複製が起点 (Ori) から開始するため、Ori/Ter 比が2以上になるのに対し、定常期のゲノムでは Ori/Ter 比は1である。実際に枯草菌ゲノムを2つの時期から抽出して NGS の解析にかけ、Ori を両端においたリファレンスヘリド深度をマッピングすると、対数増殖期のゲノムではきれいな V 字形を示し、上記仮説が当てはまることがわかった<sup>8)</sup>。この原理を複製起点が同定されていない菌種に適用すれば、簡単に同定できると考えられた。

## 2. 光依存 DnaA 非依存 DNA 複製系の発見

上述の原理を複製起点が不明なことで知られるシアノバ

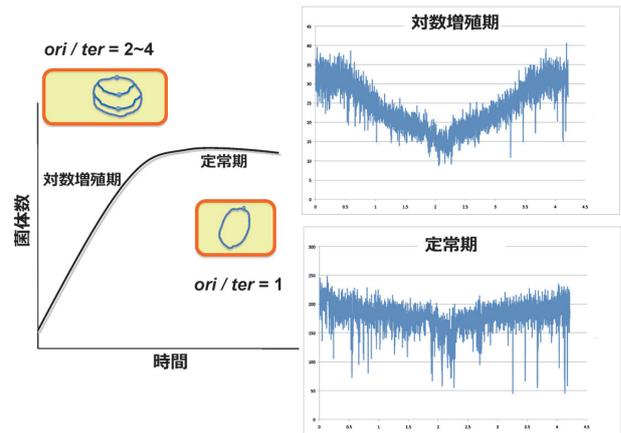


図3 リード深度マッピングによるゲノム DNA 量の解析。θ型複製を行うバクテリアにおいて、複製開始領域 (ori) と複製終了領域 (ter) の DNA 量を比較すると、対数増殖期では複製頻度が高いため、ter に比べ ori 付近の DNA 量は多くなる。一方、複製が停止する定常期では ori と ter のゲノム量の差は少ないと考えられる (左)。次世代シーケンサーを用いてリード深度 (縦軸) を参照配列 (Ori を 0 に配置) にマッピングするとライブラリーに含まれる DNA 断片の数を定量的に解析できる (右)。対数増殖期の細胞から抽出した DNA を用いると Ori 近傍のゲノム量は Ter 近傍の約 2 倍の存在比を示している。

クテリアに適用したところ、興味深い事実を見出した。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ほとんど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、我々はこの点に興味を持ち、NGS 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。

*Synechococcus elongates* PCC 7942 株のリード深度マッピングでは、緩やかな V 字形を示し、Ori はかろうじて推定できたが (図4)、*Synechocystis* sp. PCC 6803 株においては、まったく V 字形を示さず、特定の Ori を持たないことが分かった<sup>10)</sup>。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。そして、このことから多くのバクテリアにおいて複製開始に必須である DnaA 因子との関連に注目することとなった。S. 7942 株において *dnaA* 遺伝子の必須性に対し、ごく稀に欠損株が取れるという奇妙な結果を得たが、NGS の結果、内在性プラスミドがゲノムに組込まれ、プラスミドの複製機構によって染色体を複製するという生存戦略をとっていることを見出した<sup>10)</sup>。すなわち、S. 7942 株においては *dnaA* 遺伝子は本来必須であることを示している。一方、S. 6803 株においては、通常の方法で *dnaA* 遺伝子は欠失できた。また糸状性シアノバクテリアの *Anabaena* sp. PCC 7120 では、もはや *dnaA* 遺伝子はゲノム中に存在していない。これらの株は通常の生育、複製活性を示し、DnaA はもはや必須ではなくなっていた。このような *dnaA* 依存性の多様性は、本来のバクテリアゲノム複製の形態としては初めての発見

である。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* は保存されていない。こうした事実から、シアノバクテリアの多様な *dnaA* 依存性は、葉緑体への進化の過程を体現しているのではないかと考えられ、まだ謎である葉緑体ゲノムの複製機構を解く大きな鍵になると考えている (図5)。

一方で、複数コピーあるゲノムの動態に関して詳細な解析を行った結果、*S. 7942* 株では、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いることが分かった<sup>11)</sup>。このことがリード深度マッピングにおいて、緩やかなV字になった原因であった。このような複数コピーゲノムの複製様式解明も世界で初の成果である。また、シアノバクテリアは光依存的に増殖する独立栄養生物であるが、このDNA複製の開始が光合成電子伝達系に依存していることを見出した。すなわち、DnaAの *oriC* への結合が光依存的な制御によっていることを明らかにした。さらに、増殖相によってゲノムのコピー数は変動することが知られてい

るが、我々の解析の結果、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も見出した<sup>12)</sup>。

### 3. 必須機能から探る細胞機能のネットワーク解析

上記枯草菌ゲノム計画が1997年に終了した後、同コンソーシアムは引き続きポストゲノム計画として必須遺伝子の探索プロジェクトに従事し、全遺伝子中300余りの必須遺伝子を同定した<sup>13)</sup>。自律増殖をする生物として、栄養が与えられた条件で増殖に最小限必要な遺伝子の数は多くの微生物でほぼ共通しており、生命の一般像が明らかになった。

その後、我々は独自のプロジェクトとして、酵母ツーハイブリッドを用いたタンパク質間相互作用の網羅的解析を行った。機能未知の必須遺伝子の機能を探るべく、これらをベイト(釣り餌)としてプレイ(獲物)ライブラリーから相互作用因子を同定したが、多くの場合に機能未知因子が機能未知因子と相互作用しているなど、結局機能にたどり着けないケースも多く、網羅的解析の限界も明らかになった。一方で、細胞分裂が膜合成を伴う現象であるのに、両者の相互作用はそれまで知られておらず、何らかの機能的相関があるに違いないと予想し、細胞分裂装置と脂質合成系因子の総当たり解析(マトリックス解析)を行った結果、必須遺伝子を含む多くの相互作用を見出した<sup>14)</sup>。この中から、脂質合成系の必須遺伝子 *plsX* の相互作用解析から見えてきたいくつかのネットワークについて紹介する。*plsX* は脂肪酸、リン脂質両系統の根元に位置する生育に必須のアシル基転移酵素をコードしている。まずはこの酵素自身の局在等の解析を始め、次いで遺伝学の常套手段としてその温度感受性株を取得し、さらに抑圧変異株を多数取得した。これらの変異点を同定して機能解析を進めるのが微生物遺伝学であるが、従来のマッピング法では1つの抑圧変異同定に何ヶ月も要する作業であった。しかしNGSの登場により、数十の変異を1週間程度で同定できるようになった。このように微生物遺伝学の常套手段は、NGSの登場で飛躍的に効率化するとともに、これまでマッピング法がなかった多くの微生物にも遺伝学を可能にした。ここでは *plsX* の解析から見えてきた3つのネットワークについて述べることにする。

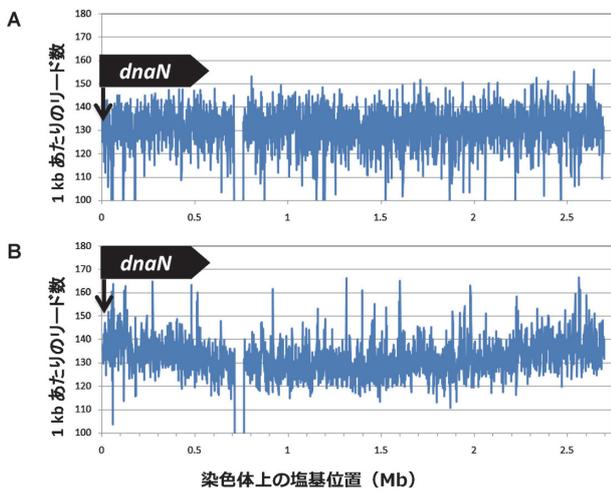


図4 次世代シーケンサーを用いたシアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 株の複製起点の解析。図3同様、リード深度を参照配列に対してマッピングした。参照配列は0点に多くのバクテリアの複製起点に見られる *dnaN* 遺伝子上流を配置した。暗条件下でサンプリングしたDNAから調整したライブラリーからでは平らなのに対し(A)、照射後22時間後にサンプリングしたものでは若干ピークがしなる程度の結果が得られた(B)。

	大腸菌	枯草菌	シアノバクテリア				葉緑体
			<i>S. 7942</i>	<i>S. 6803</i>	<i>N. azollae</i>	<i>C. meliorae</i>	
<i>dnaA</i> 遺伝子	○	○	○	○	×	×	×
必須性	必須	必須	必須	非必須			

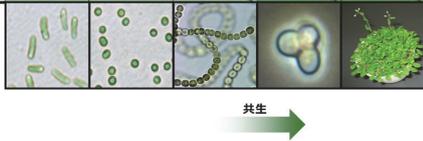


図5 生物種における *dnaA* の有無と必須性。シアノバクテリアは共生する以前に、葉緑体と共通した複製開始機構を持っていたのではないかと考えられる。N: *Nostoc*, C: *Cyanothrix*, A: *Arabidopsis*。

#### (1) 栄養状態に応じた細胞増殖・分裂の制御機構

第1に我々は *PlsX* が *FtsA* 始めいくつかの細胞分裂関連因子と相互作用を示したことから、細胞分裂への関与を解析した。局在を調べると *PlsX* は *FtsZ* や *FtsA* 同様、分裂隔壁に局在した。しかも、*ftsZ* の発現を制限した条件下で観察したところ、細胞はフィラメント状になるものの、*PlsX* は分裂予定域に局在していた。すなわち、両者の階層性では *PlsX* は *FtsA* よりも上位にあることがわかり、脂質合成系が細胞分裂装置を支配していることを示唆している(図6)。またPCRにより変異導入を行い、*plsX* の変異による温度感受性変異株を取得した。この株は細胞分裂

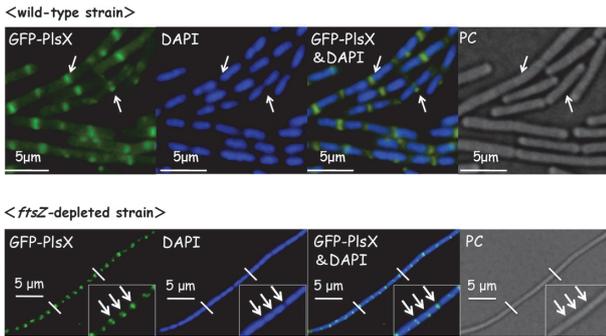


図 6 PlsX は FtsZ 非依存的に分裂予定域に局在する。PlsX の N 末端に GFP を融合させた株を作製し、PlsX の細胞内局在を検証した。PlsX は核様態 (DAPI 染色) と核様態の間に位置する分裂予定域に局在していた。この局在は FtsZ などの細胞分裂関連タンパク質の局在と類似している。また、この局在が FtsZ に依存するか検証するため、*ftsZ* 誘導株における PlsX の局在を観察した。*ftsZ* の誘導を制限すると正常な Z-ring が形成できず、分裂異常を示す。しかし、PlsX は野生株の場合と同様に分裂予定域に局在していた。したがって PlsX は、FtsZ 非依存的に分裂予定域に局在することが分かった。PC: 位相差顕微鏡像。

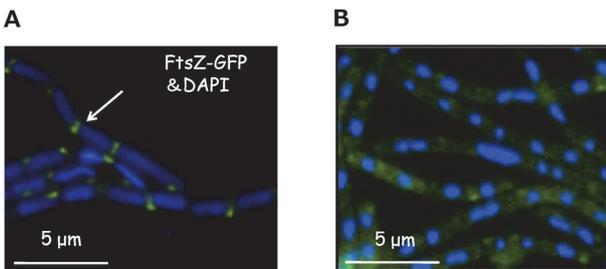


図 7 野生株と *plsX* 温度感受性株における制限温度下の Z-ring 形成。野生株 (A) では高温 (45°C) シフト後も FtsZ-GFP は分裂予定域に正常に局在するが、*plsX* 温度感受性株 (B) では、GFP 蛍光が細胞全体に広がってしまい、Z-ring 形成異常が観察された。文献 15, 図 7 を一部改変。

が異常になり、細胞がフィラメント化した。さらに、*plsX* 変異株における細胞分裂装置 FtsZ, FtsA の動態を観察したところ、制限温度下では両者とも異常な局在を示し、やはり PlsX の方が FtsZ/A よりも上位にあることを支持する結果を得た (図 7)<sup>15)</sup>。

次に我々は、これらの *plsX* 変異株から、温度感受性を抑圧する変異株を多数得た。これらの抑圧変異を、上述のように NBS を用いてマッピングした。まず始めに、その中から同じ脂肪酸合成系の遺伝子 *fabF*, *fabHA* に同定されたもの、および中央代謝系の PTS 酵素 *ptsI* に同定されたものについて述べ、そのネットワークについて考察する。これらの遺伝子の代謝マップ上の位置を図 8 に示す。まず *fabF*, *fabHA* に関しては、いずれもミスセンス変異であったが、FabF の阻害剤である抗生物質セルレニンを添加すると同様に *plsX* 変異を抑圧することから、この過程の触媒活性を低下させることが抑圧の要因と考えられる。Acyl 基の蓄積は細胞にとって有害であることが知られているため、Acyl 基が蓄積し過ぎないように、脂肪酸合成系の初発

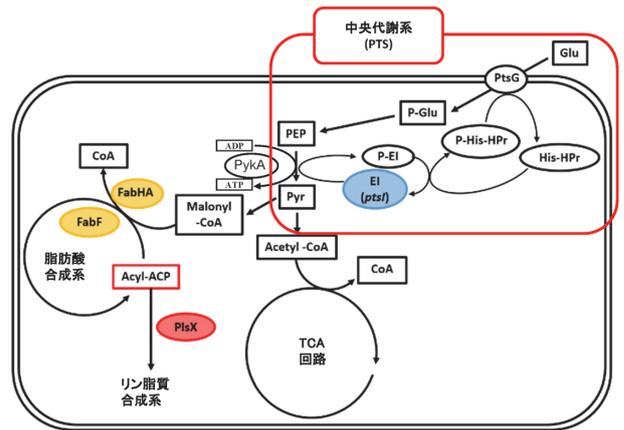


図 8 *plsX* 変異株の抑圧変異として同定された脂質合成系および PTS 系遺伝子の代謝地図上の位置。

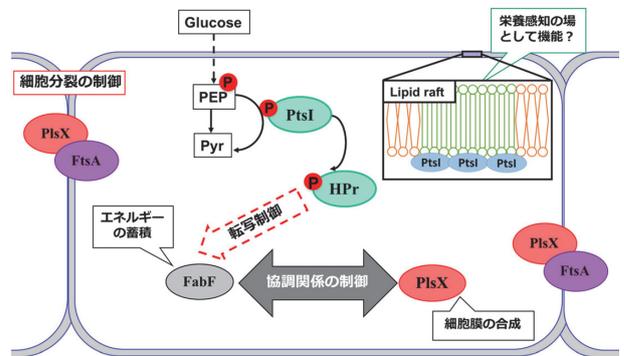


図 9 栄養状態を感知して細胞の増殖・分裂を制御するシステム。脂質ラフトの構成に関しては文献 20 を参照。

酵素の活性を制限して抑圧しているのではないかと考えられる。一方、PTS 系に関しては、さまざまな検証を行った結果、PTS 系のリン酸リレーが起きなくなることが抑圧の要因であることがわかった。さらにこのことが、最終的に *fabF/HA* 抑圧変異同様の効果をもたらしていることを解明した。この詳細な分子機構は不明であるが、PTS 系のシグナルが脂質代謝の発現制御を行う転写因子に影響を及ぼした結果ではないかと考えている。実際、*plsX* 変異の抑圧変異の中に、この脂質代謝制御因子 *fapR* にマップされたものも得られており、この可能性は強く示唆される。以上の結果より、脂質合成系、細胞分裂装置、PTS 系の 3 者が互いに相互作用し、ネットワークを形成していることが判明した。PTS 系はグルコースの取り込み系で、栄養感知システムと捉えることが出来ることから、この 3 者の構成するネットワークは、栄養状態に応じて細胞の増殖・分裂を制御するシステムであると考えられる (図 9)。

(2) リボソームタンパク質の関与する新規 SigD レギュロン制御機構

*plsX* の抑圧変異がリボソームタンパク質遺伝子 *rpsK* (S11), および *rpsU* (S21) にマップされたものがあった。S11 および S21 はリボソームの最外殻に位置し、最後にア

センブリーされるサブユニットである点も踏まえ、リボソームが PlsX の機能に関わっていることは興味深く、更なる解析を行うこととした。まず、各々 *rpsK* あるいは *rpsU* の変異点を *plsX* 温度感受性株に導入したところ、確かに温度感受性を抑圧した。なお、*rpsK* は必須遺伝子であり、抑圧変異はミスセンス変異であった。一方、*rpsU* は非必須遺伝子であることが近年明らかにされたが、この遺伝子にマップされた抑圧変異は 2 番目のコドンが終止コドンになる変異で、事実上欠損変異であった。30S リボソームのアセンブリーマップ (いわゆる野村マップ) によると、S11 に続いて最後に S21 がアセンブルする。さらに *rpsK* にマップされた抑圧変異の位置は、S11 が S21 と相互作用する領域であった。したがってこの両者の変異は同様のメカニズムによると考えられる。

これらの変異株に関してさまざまな検証を行った結果、両変異株とも軟寒天培地上でコロニーが拡がらず、運動性を失っていることがわかった。枯草菌の運動性に関してはシグマ因子 SigD の制御下にあることが知られている。SigD レギュロンは栄養増殖後期において細胞の増殖相変換に重要な働きをしており、鞭毛形成等により栄養を求めて泳ぎだす運動性を支配している。したがって、まず SigD レギュロンの *lytA* (細胞壁溶解酵素) や *hag* (鞭毛タンパク質) を指標としてリポーターアッセイを行ったところ、*rpsU* 破壊株で著しく転写活性が落ちていた。さらにメカニズム解明のため *rpsU* 破壊株からもう一度運動性を回復した抑圧変異株を取得し、マッピング解析したところ、*sigD* の転写を負に制御している RemA 因子遺伝子に同定された。この二重抑圧変異株は、上記リポーターアッセイにおいてやはり SigD レギュロンの転写誘導が回復していた。以上のことから、S11 や S21 のリボソームサブユニットが、RemA を活性化することにより運動性を支配する SigD レギュロンを制御していることが明らかになった<sup>16)</sup> (図 10)。翻訳装置の一サブユニットがこのような制御機構を持っている

ことは非常にユニークであり興味深い。

ただし本解析では *plsX* との関連性は明らかになっていない。一方 RemA を介していることが示されたが、RemA は対数増殖後期において、細胞を分離して運動性を獲得させる SigD レギュロンを抑制し、対照的に運動性を抑制してバイオフィーム形成に向かわせるという相反する機能を持っているため、バイオフィーム形成能を調べたところ、予想通り *rpsU* や *rpsK* の変異株ではバイオフィーム形成が促進されていた<sup>16)</sup>。栄養を感知する詳細な機構や RemA の活性化機構は不明であるが、リボソームタンパク質は細胞内の翻訳活性の大半を占めることから、リボソームが栄養状態を感知していることは理に叶っている。したがって非必須因子の S21 が栄養状態を感知して *sigD* 転写の調節パスウェイに働きかけ、SigD の活性化を制御していることが考えられる。このようにリボソームが栄養状態を感知し、対数増殖期から定常期の移行を制御している新規のメカニズムを提唱した。

### (3) 必須二成分制御系 WalR/WalK の必須性に関する解析

バクテリアにおいて二成分制御系は、さまざまな環境ストレスに対する応答のシグナル伝達経路等として幅広く保存されているが、主として環境応答機構であるため、必須の因子はほとんど知られていない。枯草菌には約 30 組の二成分制御系が知られているが、その中で WalR/WalK は唯一の必須遺伝子ペアである。病原菌を含む多くのグラム陽性細菌に共通して存在することから創薬のターゲットとしても多くの研究がなされてきた。元々 YycF/YycG と呼ばれた機能未知因子であったが、細胞壁の動態に関与することから WalR/WalK と名付けられた。しかし、なぜこの二成分制御系が生育に必須であるのかという点については明確な答えが得られていない<sup>18)</sup>。我々の *plsX* 抑圧変異のマッピングの中で、その一つが *walK* 遺伝子に同定されたことから、この必須性の謎を解明すべく解析を行った。

細胞の形を決めているペプチドグリカンの合成は、細胞の伸長に伴い重合と切断をバランス良く協調させるメカニズムであり、綿密な制御機構が必要であることが伺える。すなわちエンドペプチダーゼによる切断とペニシリン結合タンパク質 (PBP) 等による重合反応のバランスが重要である。エンドペプチダーゼ活性を抑制すると、細胞が伸長できずに死滅してしまうし、逆に PBP を欠損させても細胞が球菌化し、溶菌してしまう。こうした点から、枯草菌に存在する 2 種類のエンドペプチダーゼ LytE と CwlO に着目した。この 2 者の二重欠損は上述のように致死になるが、その活性は IseA と PdaC という 2 つの因子によって厳密に制御されている。さらに、WalR/WalK 二成分制御系は *cwlO*、*lytE* の発現を正に、また *iseA*、*pdaC* の発現を負に制御している<sup>17)</sup> (図 11)。このようにエンドペプチダーゼ系とその制御因子の両者の発現をコントロールすることから、この必須であるエンドペプチダーゼの活性をバランス良く調節することがその役割ではないかと考えた。ゲノム中で *walR/walK* とオペロンを形成している下流の

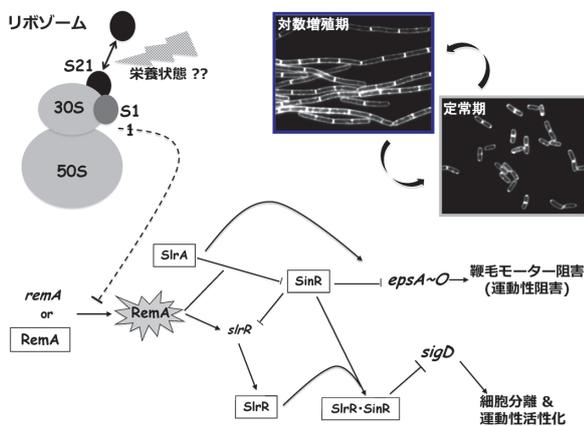


図 10 S11 および S21 の機能に関する考察。栄養を感知する詳細な機構は未だ不明だが、リボソームタンパク質、中でも、S11、S21 が栄養状態のセンサーとしての役割を持ち、SigD 転写制御機構のパスウェイに働きかけて SigD の活性化を抑制し、対数増殖期から定常期の移行に関与していると考えられる。文献 16、図 1 に加筆して改訂。

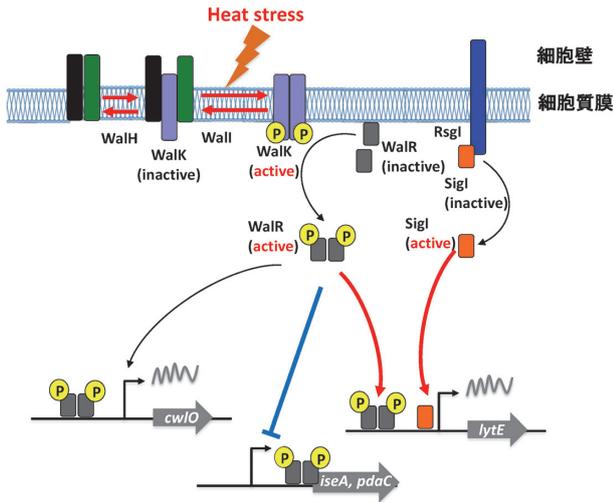


図 11 WalR/WalK 二成分制御系によるエンドペプチダーゼ系の制御と生育必須性に関する考察。WalR/WalK は生長環境に応じてエンドペプチダーゼ (LytE, CwlO) とその阻害因子 (IseA, PdaC) の発現をバランス良く調節することではないかと考えられる。

*walH/walI* 産物は細胞膜中でセンサーキナーゼ WalK を不活性化状態に保つ働きをしていることが知られているが、*walH/walI* の破壊株を作製すると、おそらく WalK が過剰に活性化されるため温度感受性を示した。ここから WalR/WalK の機能解析に手がかりを得るため、その抑圧変異株を取得してマッピングを行った。制限温度下の 49℃ で生育が可能になったコロニーを取得すると、大小 2 種類のコロニーが得られ、小さいコロニーは *lytE* に、大きなコロニーは *walK* にそれぞれ抑圧変異がマップされた。*lytE* の変異はナンセンス変異であり、*walK* の変異の中にもナンセンス変異があったことから、機能欠損が抑圧の要因であることが示唆された。したがって WalR/WalK の異常な活性化が温度感受性の原因と考えられ、上記仮説を支持していると考えた。

こうした状況下で、必須の *lytE*, *cwlO* を人工的に誘導する系を作って発現を調節してやれば、これらの抑制因子である *iseA*, *pdaC* を欠損させることができ、条件を単純化できると考えた。実際にこの条件下で *walR/walK* の欠損株を作製することに成功した。すなわち限られた条件ながら、この必須性を回避することが可能になった。これは多くの研究者が試みたが上手く行かなかった試行であり、世界初の成果である。以上のことをまとめると WalR/WalK の必須性は生長環境に応じて、エンドペプチダーゼ (LytE, CwlO) とその阻害因子 (IseA, PdaC) の発現を調節してペプチドグリカン合成を協調させることであると結論づけた<sup>17)</sup>。さらに *walH*, *walI* を含むオペロン全体の欠失化も可能であった。ただしこれら *walR/walK* を含む破壊株はかなり異常な細胞形態を示しており、一部の細胞の球状化や溶菌が高頻度で見られる。したがって IPTG による *lytE* または *cwlO* の発現誘導は微妙な制御ができていないことを示しており、やはり正常な増殖には *walR/walK* による制御が必須であると考えられる。なお、本研究においても

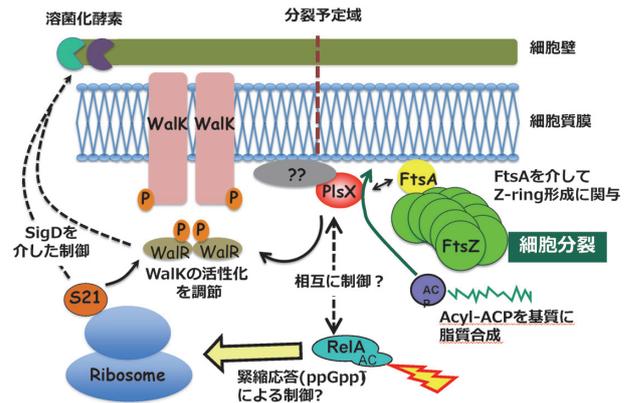


図 12 細胞増殖制御に関する PlsX の機能ネットワーク。これまでの結果より、PlsX は FtsA や WalR と相互作用し、脂質代謝と細胞分裂を共役させるネットワークを構築していると考えられる。またリボソームタンパク質 S11, S21 が SigD レギュロンを介して定常期移行を調節している。さらに本項では述べなかったが、S21 は WalR の活性化の機能をもつことがわかり、この WalR の活性化により PlsX の温度感受性を抑圧していると考えられること、さらに S21 は別の機能として、SigD を介した溶菌酵素への関与も見出している。一方、緊縮応答との関連を示唆するデータを得ており、これらもモデル図の中に加えた。

端緒となった *plsX* との機能的関連については未だ明らかになっていない。

以上、本研究において明らかになった PlsX を中心としたネットワークを図 12 にまとめた。まだ不明な部分も多いものの、細胞機能を俯瞰的に見るネットワーク解析の重要性を示唆出来たと考えている。最初に述べたように、細胞膜合成に必須な脂質合成系因子である PlsX そのものが細胞分裂に密接に関わっているということから、明らかになったネットワークはいずれも増殖環境の感知をして細胞分裂を制御するという共通項が窺える。このような制御機構は、細菌細胞周期の中で増殖相の遷移期、すなわち対数増殖後期から定常期初期の時期に見られる機能である。栄養等が十分に盛んに分裂している時期から、定常期への移行時期には、周囲の増殖環境を感知して増殖を制御する機構が必要であることは想像に難くない。実は、その点にこそ、一つの単細胞生物が抱えるさまざまな生存戦略が隠されている訳で、今回の解析から、その一端を垣間見ることができたのだと考えている。単に増殖遷移期と一言で言うが、実は細胞機能の重要な部分がそこに見られるということは、細胞が“生きる”ということの本質が詰まっている訳であり、生命科学の重要な要素を解き明かす大きな手がかりになったことが、改めて感じられる。これらのネットワーク解明が基盤となり、さらに全体像の把握と理解が進展していくことを期待したい。

## おわりに

以上、さまざまな微生物ゲノムの解読に携わってきた経緯から、その最新の技術と成果について紹介してきた。始めに述べたように NGS の登場によって、微生物研究の手法が革新されたが、生命現象の基本的理解にこれからも役

立って行くことは間違いない。シアノバクテリアの話題では、DNA複製開始という基本現象の解析に貢献したことを紹介した。さらに古くから多くの研究がなされてきた枯草菌の解析では、バクテリアの研究が一般的な細胞機能の理解に如何につながっていくかという点を紹介した。NGSによってもたらされた新しい時代の流れは、一般人をも巻き込む生命科学の一大エポックである。このことを、今回紹介した微生物研究の一端からも理解してもらえたら幸いである。

**謝辞：**本綜説に記載した研究内容の多くは、東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科、ならびに東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの多くの学生、スタッフの協力の下に挙げられた成果である。特に後半の記述に関しては、大学院バイオサイエンス専攻修了の大林龍胆博士、および高田啓博士の研究業績が中核となっている。この場を借りて彼らの尽力に感謝したい。また、私の研究者人生のスタートから導いて頂いた東京大学名誉教授、別府輝彦先生、同故齋藤日向先生、留学中に指導を受け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します。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る。現在は細胞ゲノム生物学研究室と名称変更し、研究を継続してくれている朝井計教授を含め、彼らに深甚な謝意を表します。

#### 参考文献

- 1) WATSON, J.D. CRICK F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171** (4356) : 737-8.
- 2) YOSHIKAWA H., FRIEDMANN T., ITO, J. (1981) Nucleotide sequences at the termini of  $\phi$ 29 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** (3) : 1336-40.
- 3) ESCARMIS C., SALAS M. (1981) Nucleotide sequence at the termini of the DNA of *Bacillus subtilis* phage  $\phi$ 29. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** (3) : 1346-1450.
- 4) YOSHIKAWA H., ITO J. (1981) Terminal proteins and short inverted terminal repeats of the small *Bacillus bacteriophage* genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** (4) : 2596-600.
- 5) KUNST F., OGASAWARA N. YOSHIKAWA H. et al. (total 151) (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390** (6657) : 249-256.
- 6) <http://www.nodai-genome.org>
- 7) 兼崎 友, 志波 優, 吉川博文 (2014) 「微生物研究での次世代シーケンサーの有効活用」 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発 (技術情報協会) 第5章第12節 p176-182.
- 8) SHIWA Y., MATSUMOTO T., YOSHIKAWA H. (2013) Identification of laboratory-specific variations of *Bacillus subtilis* strains used in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* **77** (10), 2073-2076.
- 9) KANESAKI Y., SHIWA Y., TAJIMA N., SUZUKI M., WATANABE S., SATO N., IKEUCHI M., and YOSHIKAWA H. (2012) Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* **19**, 67-79.
- 10) OHBAYASHI R., WATANABE S., EHIRA S., KANESAKI Y., CHIBAZAKURA T., and YOSHIKAWA H. (2016) Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution. *ISME J.* **10** (5) : 1113-1121.
- 11) WATANABE S., OHBAYASHI R., SHIWA Y., NODA A., KANESAKI Y., CHIBAZAKURA T., YOSHIKAWA H. (2012) Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes. *Mol Microbiol.* **83** (4) : 856-865.
- 12) OHBAYASHI R., YAMAMOTO J.Y., WATANABE S., KANESAKI Y., CHIBAZAKURA T., MIYAGISHIMA S.Y. and YOSHIKAWA H. (2017) Variety of DNA Replication Activity Among Cyanobacteria Correlates with Distinct Respiration Activity in the Dark. *Plant Cell Physiol.* **58** (2) : 279-286.
- 13) KOBAYASHI K., EHRLICH S.D., YOSHIKAWA H. et al. (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100** (8) : 4678-4783.
- 14) FUKUSHIMA S. and YOSHIKAWA H. (2007) Two-hybrid analysis toward establishing a comprehensive interactome in *Bacillus subtilis*. GLOBAL REGULATORY NETWORKS IN *Bacillus subtilis*. (Research Signpost, India.) p 229-p 249.
- 15) TAKADA H., FUKUSHIMA-TANAKA S., MORITA M., KASAHARA Y., WATANABE S., CHIBAZAKURA T., HARA H., MATSUMOTO K., YOSHIKAWA H. (2014) An essential enzyme for phospholipid synthesis associates with the *Bacillus subtilis* divisome. *Mol Microbiol.* **91** (2) : 242-255.
- 16) TAKADA H., MORITA M., SHIWA Y., SUGIMOTO R., SUZUKI S., KAWAMURA F., YOSHIKAWA H. (2014) Cell motility and biofilm formation in *Bacillus subtilis* are affected by the ribosomal proteins, S11 and S21. *Biosci Biotechnol Biochem.* **78** (5) : 898-907.
- 17) TAKADA H., SHIWA Y., TAKINO Y., OSAKA N., UEDA S., WATANABE S., CHIBAZAKURA T., SUETSUGU M., UTSUMI R., YOSHIKAWA H. (2018) Essentiality of WalRK for growth in *Bacillus subtilis* and its role during heat stress. *Microbiology.* **164** (4) : 670-684.
- 18) TAKADA H., and YOSHIKAWA H. (2018) Essentiality and function of WalK/WalR two-component system : the past, present, and future of research. *Biosci Biotechnol Biochem.* **82** (5) : 741-751.
- 19) BARBE V., CRUVEILLER S., KUNST F., LENOBLE P., MEURICE G., SEKOWSKA A., VALLENET D., WANG T., MOSZER I., MÉDIGUE C., DANCHIN A. (2009) From a consortium sequence to a unified sequence : the *Bacillus subtilis* 168 reference genome a decade later. *Microbiology.* **155** (6) : 1758-1775.
- 20) BACH J.N., and BRAMKAMP M. (2013) Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Mol Microbiol.* **88** (6) : 1205-17.

# Microbial Genome Analysis and Its Functional Genomics

By

Hirofumi YOSHIKAWA<sup>\*†</sup>

(Received March 15, 2018/Accepted April 20, 2018)

**Summary** : Since a double helix model of nucleic acid structure appeared, nucleotide sequences have been the focus of biologists' attention as molecular biology has developed. After the Nobel prize for sequencing technique by Sanger and Gilbert, nucleotide sequencing has been gradually improving and finally burst into an era of massive decoding. Present-day, for most biology targets, it has become essential to have their own sequence information to analyze and breed each biological material. Particularly in microbiology fields, genetic strategy was fundamentally reformed and a new field, "genome microbiology", has been born. The significance of one-nucleotide difference is more and more meaningful, and many past ambiguous results have been clearly elucidated by disclosing whole genome sequences. Here I present some unique techniques using next generation sequencer (NGS) and apply them to determining the bacterial origin of replication. For the analysis of the cyanobacterial study in which basic biological principle, i.e. DNA replication or transcription, has not been elucidated, NBS has been powerful tool and I introduce light-dependent DNA replication as well as DnaA dependency among various cyanobacteria. Alternatively, several newly identified networks involved in essential lipid synthetic enzyme, PlsX, in *Bacillus subtilis* are described. Based on our post-genome project, we identified several interactions between PlsX and cell division machinery. Besides, from the temperature sensitive mutant of *plsX*, we obtained many suppressor mutants and therefore analyzed functional interactions among these genes. These analyses revealed the global cellular function which, especially during transient growth phase, senses nutritional availability and regulates cell growth and divisions. It is important to describe cellular rational and intelligent functions at the level of molecular mechanisms.

**Key words** : Microbial genomics, next generation sequencer, cyanobacteria, *Bacillus subtilis*, functional network

---

\* Professor Emeritus, Tokyo University of Agriculture, Faculty of Life Sciences, Department of Bioscience

† Corresponding author (E-mail : hiyoshik@nodai.ac.jp)