して働いているのではないだろうか、という疑問がわいてくる。このアイデアの是非は今後の研究を待たなければならないが、酸化ストレスは神経変性疾患における神経細胞死を誘導し、また糖尿病、癌、動脈硬化性疾患との関連することが示唆されている。加えて、近年 GAPDH がアポトーシスなどによる細胞死を制御しているという報告がされ^(6, 7)、今後 GAPDH と酸化ストレスに関する研究はますます盛んになると思われる。

- 1) K. Shiozaki & P. Russell: *Nature*, **378**, 739 (1995).
- 2) A. Ikner & K. Shiozaki: *Mutation Res.*, **569**, 13 (2005).

- 3) S. Morigasaki, K. Shimada, A. Ikner, M. Yanagida & K. Shiozaki: *Mol. Cell*, **30**, 108 (2008).
- 4) C. Godon, G. Lagniel, J. Lee, J.-M. Buhler, S. Kieffer, M. Perrot, H. Boucherie, M. B. Toledano & J. Labarre: *J. Biol. Chem.*, **273**, 22480 (1998).
- 5) D. Shenton & C. M. Grant: *Biochem. J.*, **374**, 513 (2003).
- 6) A. Tarze, A. Deniaud, M. Le Bras, E. Maillier, D. Molle, N. Larochette, N. Zamzami, G. Jan, G. Kroemer & C. Brenner: *Oncogene*, **26**, 2606 (2007).
- 7) A. Colell *et al.*: *Cell*, **129**, 983 (2007).

(森ヶ崎 進^{*1, 2}, 塩崎一裕^{*1}, ^{*1}Department of Microbiology, University of California, Davis, ^{*2}奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

ゲノムから解き明かす難培養性細菌の機能 数百細胞からの未培養細菌のゲノム完全長の取得

地球上の 99% 以上の微生物は培養法が見つからない、という事実は現在ではよく知られるようになった。環境サンプルからの PCR 法によるリボソーム RNA 遺伝子配列の取得により、現在記載されている 25 の真正細菌門に加え、門レベルで異なる 40 以上もの真正細菌系統群が認知されている。その大部分が培養に成功しておらず、機能は未知で、産業利用も困難である。

このような難培養性細菌群の機能解明の手段として、環境中の細菌群集 DNA を断片化し、合計で数十 Mb から 1 Gb くらい配列を読むという、メタゲノム解析が近年普及している。得られた配列断片上の遺伝子を同定することで、細菌群集全体としての機能を遺伝子レベルで推測できる⁽¹⁾。現在までに、海洋、土壌、動物消化管などを材料とした、130 以上のメタゲノムプロジェクトが報告されている (GOLD-genomes online database; <http://www.genomesonline.org/gold.cgi>)。これらによって、難培養性細菌群からの新規有用遺伝子の取得、機能遺伝子の多様性解析、細菌群集間の網羅的な遺伝子レベルでの比較なども可能となり、大きな成果がもたらされた。

しかし、ごく単純な群集でない限り、メタゲノム解析で得られる配列断片を連結して、細菌 1 種類ごとのゲノム完全長かそれに近い配列を得るのはきわめて困難である。例外的に、廃水処理槽微生物群集の 1.2 Gb からなるメタゲノム配列断片群から、未培養細菌門 WWE3 の 1 種の環状染色体配列再構築に成功しているが⁽²⁾、一般には個々の細菌種の機能は未知のままである。群集メン

バー間の相互作用解明、培養法開発などを含め、より高度で有意義な成果を得るためには、やはり個々の細菌種のゲノム完全長か、少なくとも特定の 1 種由来であると判別可能なゲノム配列断片群 (ドラフトゲノム) の取得が求められる。

そこで最近では、“single-cell genomics” という、メタゲノムとは対照的な手法が注目されている。核となるのは、Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた等温全ゲノム増幅である。Dean ら⁽³⁾が確立したこの増幅法は、Phi29 DNA ポリメラーゼが DNA 二重鎖をほどいて、ランダムプライマーから数十 kb を複製していくというものである (multiple displacement amplification: MDA) (図 1)。Marcy ら⁽⁴⁾は、環境サンプル中の細菌細胞を 1 個ずつに分配する装置 (microfluidic device: 微細なキャピラリーを収納したチップ) を開発し、その微細な反応槽内での MDA を実現した。彼らは実際にこの装置をヒト口腔微生物群解析に適用し、未培養細菌門 TM7

図 1 ■ Phi29 DNA ポリメラーゼによる等温全ゲノム増幅
複製された DNA 二重鎖がさらに複製され、37℃、数時間で 1 千万倍以上の増幅が可能である。最終的に数 kb~40 kb 程度の二重鎖断片が生成する。PCR を応用した手法と比べて増幅バイアスがかかりにくく、複製エラー率も驚異的に低い。同酵素は GE Healthcare, Qiagen など数社から販売されている。

図2 ■ 未培養細菌門 TG1 の 1 種 Rs-D17 のゲノム完全長取得スキーム

ヤマトシロアリ (A) の後腸 (B) 内には 10 数種の原生生物と数百種の細菌が合計 1 千万個/腸も共生するが (C, 矢印は原生生物 *T. agilis*)、大部分が難培養性である。原生生物 *T. agilis* を 1 細胞分離して界面活性剤で膜を壊し、細胞内共生する TG1 細菌 Rs-D17 を数百個キャピラリーで回収した (D, 矢印は漏出した TG1 細菌)。細菌細胞はアルカリ処理して等温全ゲノム増幅の鋳型とし、1 千万倍に DNA 増幅して配列解析した。参考文献 (6) より一部改変

の 1 種の 1 細胞からのドラフトゲノムを得た⁽⁵⁾。しかし、ゲノム部位間での増幅バイアス、非特異的増幅、異なる増幅断片間でのキメラ配列形成、他細菌由来 DNA 混入など、克服すべき問題があり、環境中の細菌 1 細胞からのゲノム完全長取得はまだ現実的ではない。

こうした中、筆者らは最近、現在とり得る最善の手段を用いて、わずか数百細胞からの未培養細菌のゲノム完全長取得に成功した⁽⁶⁾。標的としたのは、シロアリ腸内に共生するセルロース分解性原生生物 (単核真核生物) *Trichonympha agilis* の、さらに細胞内に共生する未培養細菌門 Termite Group 1 (TG1) の 1 種 Rs-D17 である。実験の概略図を図 2 に示した。宿主の原生生物も難

培養性かつ多系統が混在しているため、マイクロマニピュレーターで原生生物 1 細胞のみを分離し、界面活性剤で細胞内共生細菌を漏出させて回収した。これを MDA によって DNA 増幅して配列解析したところ、1.1 Mb の環状染色体と 3 個の環状プラスミドの配列再構築に成功した。6 倍程度のゲノム部位間での増幅バイアスがあり、また増幅過程で生じたキメラを排除するためにも十分な配列重複が必要であったので、通常の細菌ゲノム解析の数倍量の配列解析を行なった。取得したゲノム配列から、この TG1 細菌は 761 個のタンパク質遺伝子をコードし、さらに 121 個もの偽遺伝子をもつことがわかった。偽遺伝子群には染色体複製開始因子 *DnaA* のほか、制限酵素などの防御系、細胞壁合成系、各種輸送系などが多数含まれており、この細菌ゲノムが縮小進化を遂げ、細胞内環境に適応する過程であると考えられる。一方、アミノ酸や補因子合成系の遺伝子は豊富に残されており、餌である木材に含まれない多様な窒素化合物をこの細菌が合成して宿主原生生物、最終的には宿主シロアリに供給していることが示唆された。

今後は、酵素反応系や細菌細胞分離法、シーケンス手法などの改良により、難培養性細菌 1 細胞からの、より完全長に近いドラフトゲノムの取得が可能となっていくであろう。そのときには、現在アクセス困難な膨大な遺伝子資源の有効利用が可能となり、さまざまな産業応用が期待できよう。

- 1) J. C. Venter *et al.* : *Science*, **304**, 66 (2004).
- 2) E. Pelletier *et al.* : *J. Bacteriol.*, **190**, 2572 (2008).
- 3) F. B. Dean *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5261 (2002).
- 4) Y. Marcy *et al.* : *PLoS Genet.*, **3**, 1702 (2007).
- 5) Y. Marcy *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5261 (2007).
- 6) Y. Hongoh *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5555 (2008).

(本郷裕一, 大熊盛也, 独立行政法人理化学研究所)

乳酸菌による T 細胞応答制御

活性化 T 細胞にアポトーシスを誘導して恒常性維持に寄与

乳酸菌は、ヨーグルトや乳酸飲料などの発酵乳製品、キムチや浅漬け、ピクルス、ザワークラウトなどの発酵植物製品などに含まれ、日常的に摂取されている。また、乳酸菌のうち、特にラクトバチルス属とビフィドバクテ

リウム属は、ヒトの消化管内や膣内の常在細菌叢の一部をなしている。近年、乳酸菌の摂取が、感染予防、炎症性腸疾患の症状緩和、NK 細胞の活性化など、さまざまな免疫異常疾患に対して効果を有することが示されてき