



NGRC ニュース

No. 5

東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター

農大ゲノムセンターを農学のゲノム解析拠点に



CONTENTS

「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」採択と 「共同利用・共同研究拠点」として第2期ゲノムセンター始動.....	4
生物資源ゲノム解析センターの運用実績.....	5
次世代シーケンサーを用いた生殖細胞系列の 網羅的 DNA メチローム解析	6
ニワトリの就巢行動発現制御遺伝子の特定	8
キシロース代謝能を持つ乳酸菌 <i>Enterococcus mundtii</i> QU 25 の 全ゲノム解読	9
リシーケンス解析によるシアノバクテリア突然変異株の 変異部位の同定.....	10
ニホンウズラ host defense peptide のゲノム解読.....	11
次世代シーケンサーによる多様なイネ品種の解析	12
平成 25 年度 新規学内公募一覧.....	13
学内公募事業とその成果.....	14
研究発表実績	22-26
平成 25 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧	27-29
研究紹介～採択課題より～	30-36

「生命科学と情報科学の融合による農学研究の 拠点形成」採択と「共同利用・共同研究拠点」 として第2期ゲノムセンター始動

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、平成20年度に採択された文部科学省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業により設置されました。当時、登場間もない次世代シーケンサーを導入し、以来5年間にわたり数多くの実績を残してきました。今年度、それらの実績を踏まえ、「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」というあらたなテーマで再度、同支援事業に採択されました。これまでの5年間では、酒米、在来牛を柱に、微生物から動植物までゲノム解析を中心に成果を挙げてきました。その間、次世代シーケンサーの改良も進み、性能が大きく向上しました。またゲノム解析以外にRNA-seqやChIP-seq、メチローム解析といった各種実験手法も登場し、幅広く研究に使われるようになってきています。そこで、第2期プロジェクトでは、生殖機能制御、エピジェネティクスによる機能制御、環境適応機構の制御、生物の形態の制御、生物機能の食資源生産への応用、ゲノム情報の保全と進化科学の6つの分野について、次世代シーケンサーを活用することを目指しています。次世代シーケンサーの運用においては、ビッグデータとも言われる大量のデータが生成されます。インフォマティクス解析による情報を効果的に組み入れることで、農学分野における生物機能の解析をより加速、展開させることを目指しています。

さらに、本年度より本センターが文部科学省より「生物資源ゲノム解析拠点」として共同利用・共同研究拠頭に認定されました。こちらも今までの実績を踏まえ、農学分野における次世代シーケンサーを利用した共同研究を行います。医学分野では遺伝情報と病気との相関解析や創

薬、治療への応用に結びつけるためのツールとして装置の利用が急速に普及しています。また、解析対象もほぼヒトに限られています。一方、農学分野では微生物から、動物、植物、昆虫、魚類などあらゆる生物を研究対象としています。そのため非モデル生物と言われるような、ゲノム情報に乏しい生物が研究対象となっていることも多くみられます。このことから、遺伝情報をもとに生物機能を解析するためには、農学分野においても次世代シーケンサーの利用が非常に有用かつ不可欠であると言えるでしょう。一方で、次世代シーケンサーは本体、ランニングコスト、解析とすべてにわたりコストがかかるため、個々の研究者が導入するのは現実的ではありません。そこで、本センターとの共同研究により、次世代シーケンサーを利用した実験へのアクセスが容易となり、あらたな展開を切り開くことが期待されます。また、本ゲノムセンターが農学領域におけるゲノム解析の拠点として機能することで、研究者コミュニティの活性化に寄与することを目指しています。

本センターでは、次世代シーケンサーとしてGenome Analyzer IIを導入して以来、HiSeq 2500の導入でスループットの向上をはかり、今年度はリード長の確保などを目的としMiSeqの導入を行いました。また、データ解析用の計算機、データサーバーも継続的に増設しています。技術進展の早いこの分野において、今後もup to dateな体制による研究推進をおこない、東京農業大学が農学ゲノム解析の拠点となることを目指していきます。

生物資源ゲノム解析センター長
矢嶋俊介

生物資源ゲノム解析センターの運用実績

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、文部科学省の平成 20 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業として採択された「革新的ゲノム情報解析を用いた生物資源ゲノム解析と農学新領域の創出」プロジェクトの一環として、東京農業大学の全学組織として新設され、動植物から微生物まで農学分野を中心とするゲノム解析の研究を推進してきました。主な業績として、世界で初めて在来牛、酒米のゲノム情報を明らかにするなど、めざましい成果をあげました。またこれらの実績が高い評価を受け、平成 25 年から文部科学省の私立大学戦略的研究基盤形成支援事業への採択および共同利用・共同研究拠点に認可されました。

生物資源ゲノム解析センターには、Illumina 社のゲノム解析装置が 4 台設置され、装置のオペレーターならびに情報解析や個別テーマの研究に関わる研究員が常勤スタッフとして活動しています。

当センターは東京農業大学の世田谷キャンパスに設置され、運営に当たっては、総合研究所の支援のもと、センター長以下、世田谷・厚木・オホーツク各キャンパス所属の教員、さらに学外の専門家による管理運営委員会を設置して行なっています。解析課題については、センターの主要課題の他に、学内および学外ともに農学分野を中心とする新しい研究領域の開拓をめざし取り組んでいます。

過去のプロジェクトで用いた Illumina 社の Genome Analyzer IIx および HiSeq2500 を運用し、平成 26 年 1 月からさらに高速かつ長い塩基配列を解読できる Illumina 社の MiSeq を 2 台運用しています。これら 4 台の次世代シーケンサーから排出される膨大な塩基配列情報を処理するために、情報解析システムの増強を数回にわたって行ないました。最終的に 9 台、総メモリ容量 3.2TB、総ディスク容量 464TB のスペックまで拡張し、増え続けるデータ量に対応しています。

塩基配列を解読するサンプル数は年々増加し、平成 26 年 1 月現在で、約 2,600 を超えるサンプル数

をシーケンスしてきました (図 1)。

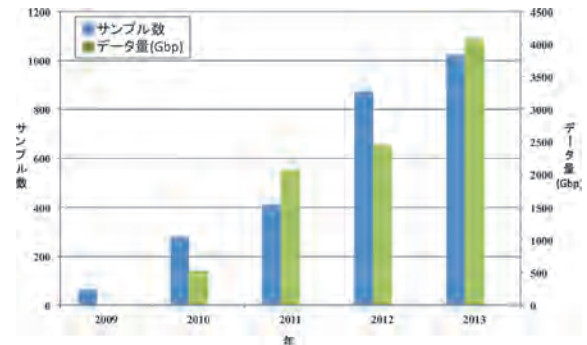


図 1 解読したサンプル数およびデータ量

その内訳として、マウス、ラット、昆虫などの動物が 536 サンプル、ダイコン、シロイヌナズナ、イネなどの植物が 156 サンプル、残りは微生物のサンプルです。

これらのシーケンスデータは、RNA-seq 解析 (遺伝子発現量の解析) やリシーケンス解析 (変異解析や近縁種のゲノム解析) を中心に、de novo 解析 (ゲノム未知種の配列決定) など様々な解析に使われています (図 2)。

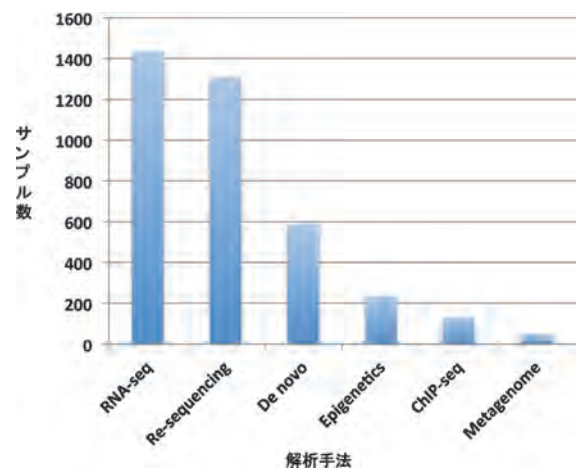


図 2 サンプルの解析種別

また、解析されたデータは、国立遺伝学研究所のデータベース (DDBJ DRA) に登録を行ないますが、平成 26 年 2 月時点で未公開のデータを含め 36 の研究内容、154 サンプルを登録しています。

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)
小菅是子 (生物資源ゲノム解析センター)

次世代シーケンサーを用いた生殖細胞系列の網羅的 DNA メチローム解析

次世代シーケンサーの登場とエピゲノム解析

生物の個体を構成する細胞（成人の体は 60 兆個の細胞からなる）は、もともと一つの受精卵の細胞分裂から生じているにもかかわらず、その役割に応じた形態・性質に大きな差があります。すべての細胞が同じ DNA の塩基配列情報、つまりゲノムを持つにもかかわらず、細胞分化により性質の差が生じるのは、エピジェネティクスと呼ばれる“DNA 塩基配列を変えることなく、遺伝子の働きを決めるしくみ”によるものです。DNA のメチル化（図 1）や、DNA が巻き付いているヒストン蛋白質の様々な化学修飾（メチル化、アセチル化）などがエピジェネティクスの代表例として知られており、次世代シーケンサーの登場によって、現在ではゲノムワイドなエピジェネティクス情報のプロファイリングが可能となりました。このような細胞種ごとに特定されたエピジェネティクス情報の総体を“エピゲノム”と呼び、ポストゲノム時代の生命科学における最も重要な研究として注目されています。

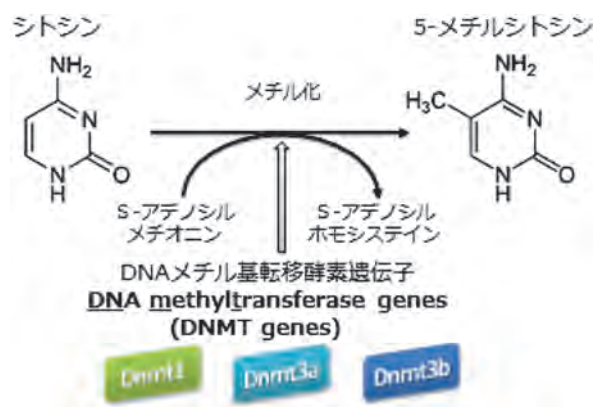


図 1 DNA メチル化の分子機構

生殖細胞と DNA メチローム解析

DNA メチル化とは、シトシン塩基 5 位の炭素にメチル基が付加される現象で、細胞機能を調整する重要なエピジェネティック機構として、生命現象に深く関与することが知られています。人間を含む哺乳類の生殖細胞（図 2）が形成される過程で DNA

メチル化がダイナミックに変化することが知られており、内在性レトロウィルスの抑制や、ゲノムインプリントの確立など、正常な生殖細胞の形成に不可欠な役割を果たします。本センターでは次世代シーケンサーを用いてマウス全ゲノムレベルでの DNA メチル化を解析することに成功し、作製された DNA メチロームマップの解析により、数多くの生殖細胞間メチル化差異領域の同定と、Gene-body メチル化とゲノムワイドな転写との間の有意な相関を証明することができました（図 3）。またメチル化差異領域より転写される新型非コード RNA 遺伝子を同定することにも成功し、ゲノムインプリント確立のキーとなる新たなパラダイムを得ることができました。さらに、精子・卵子の起源となる始原生殖細胞のメチル化プロファイリングを行い、マウス生殖細胞の包括的な DNA メチロームマップ（ゲノム広範囲にプロファイリングされた DNA メチル化情報）の作製に成功しました（図 3）。全ゲノム DNA メチローム解析が可能となったことにより、染色体特異的かつ性特異的なメチル化リプログラミング機構を明らかにすることができました。精子・卵子が形成される過程における DNA メチル化の詳細な確立機構と役割を明らかにすることは、生殖細胞の新たな評価基準を設ける上でも重要なステップといえます。

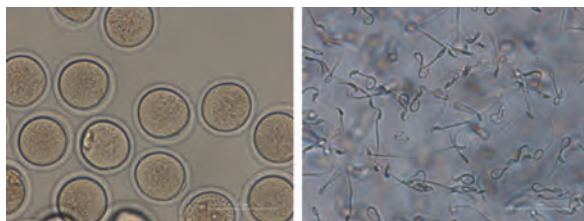


図 2 マウスの生殖細胞である卵子（左）と精子（右）

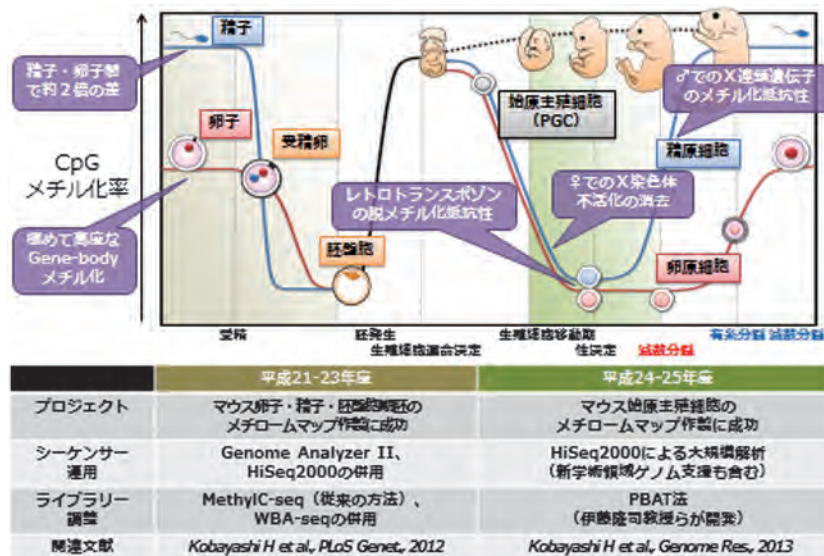


図3 DNAメチル化のダイナミックな変化と本研究プロジェクトの進捗状況

DNAメチロームマップの比較と今後の展望

本センターでの生殖細胞のDNAメチロームマッピングには、全ゲノムバイサルファイトシーケンス(Whole-Genome Bisulfite Sequencing: WGBS)を採用し、解析をすすめてきました。WGBSはゲノム包括的に解析を進めることができるパワフルなツールであると同時に、多くのリード配列を必要とする高コストな解析です。現在、我々はゲノムワイドなターゲットメチロームシーケンス(Target Methylome Sequencing: TMS)による効率的な準包括的メチローム解析の確立に取り組んでいます(図4)。TMS法によるゲノム中の解析対象は、高CpG密度領域に限定したグローバル解析法であるReduced Representation Bisulfite Sequencing法(RRBS)よりも多くの重要領域をカバーしつつ、シーケンスの低コスト化を実現できます。WGBSでは難しい多検体解析も可能であり、DNAメチローム解析のすそ野を広げる画期的な手法となるこ

とが期待されます。日本には同様の解析を十分にできる環境がまだ少なく、このような解析法の開発と普及は生殖細胞だけではなく初期腫瘍や特定部位の細胞などの解析が極めて困難な検体の解析にも貢献するでしょう。

注) この研究は東京農業大学が基盤研究(S)補助金の支援により実施されました。



図4 バイサルファイト置換によるDNAメチローム解析用のライブラリー調整法

小林久人(生物資源ゲノム解析センター)
河野友宏(応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

ニワトリの就巢行動発現制御遺伝子の特定

ニワトリの就巢性

毎日の食卓に欠かせない卵。この卵を効率よく生産するため、ニワトリは度重なる品種改良を経てきました。もともと野生のニワトリは数個から10個前後の卵を産むと、巣の中でそれを温めます(抱卵)。母親は産卵期が終了し抱卵期に入ると、1日のほとんどを抱卵に費やし、ヒヨコが孵化すると子育てを行います(育雛)。これらの行動を引き起こす性質を就巢性とよび、この間ニワトリは卵を産みません。経済的に効率よく卵を得るためには就巢性は不利益な性質であり、この性質を排除するように長年にわたって選抜淘汰がすすめられた結果、白色レグホーンのような全く就巢性を持たずに年間300個以上の卵を産むような卵用鶏種が作出されました。

就巢性の発現機構については研究がすすめられ、現在では脳下垂体前葉から分泌されるプロラクチンというホルモンが就巢行動を発現・継続させ、そのプロラクチンの分泌を調節している内分泌機構もある程度解明されてきました。しかし今のところ就巢行動の発現機構を制御している遺伝子は特定されていません。卵用鶏種からの就巢性の排除は、産卵成績と就巢行動の発現状況の記録による育種選抜の成果であり、従って、卵用鶏種以外の鶏種や、肉用として改良されてきたシチメンチョウなどでは就巢性はまだ完全に排除されていません。それらの生産性をさらに向上させるためには、就巢行動の発現機構を制御している遺伝子を特定し、効率的に就巢性を排除する事が必要です。

ニワトリの比較ゲノム解析

ニワトリゲノムの解読は2004年、セキショクヤケイにおいて報告されています。このデータをもとに本研究では、ニワトリが持つ就巢性に関わる遺伝子の特定を目的に、就巢形質が完全に排除された白色レグホーン種と強い就巢形質を示す烏骨鶏を用いて比較ゲノム解析を行っています(図1)。

まず、セキショクヤケイのゲノムデータをリファレンスとして白色レグホーンの配列をマッピングし、リファレンス更新を繰り返してゲノム配列を作



図1 就巢性が排除された白色レグホーン種(左)と就巢性を保持する烏骨鶏(右)。

成しました。得られたゲノム配列に烏骨鶏の配列をマッピングし、このデータをもとに白色レグホーンと烏骨鶏で比較した結果、約200万の違い(1塩基多型:SNP)がみつき、白色レグホーンと烏骨鶏のゲノムは0.22%の違いがあることがわかりました。

同定したSNPのうち8割以上は遺伝子のない領域に存在していましたが、遺伝子上にあるSNPも33万ほど見つかりました。そのうちアミノ酸を置換するような(非同義置換)SNPは9197あり、2754の遺伝子に存在していました。アミノ酸置換を起こすSNPはアミノ酸が構成するたんぱく質の機能に影響を及ぼし、形質の違いに結び付く可能性があります。このような変異を持つ遺伝子には免疫やタンパク質結合、胚発生や恒常性に関わるものが多いこともわかりました。

同定されたSNPは白色レグホーンと烏骨鶏の品種間の違いを表すものと考えられ、今後これらの中から就巢性に関わる変異や遺伝子を絞り込んでいく予定です。また、岐阜地鶏など他の品種との比較をすすめ、就巢性を保持する品種に共通するSNPに注目し、それらがどんな遺伝子の上にあるのか調べる予定です。就巢行動の発現機構を明らかにすることで、就巢性が排除されていない鶏種からその性質を排除することが可能になり、効率的な家禽の生産性に貢献することが期待されます。

本研究課題は、学内公募により農学部畜産学科桑山岳人先生、麻布大学との共同研究として実施されています。

川原玲香(生物資源ゲノム解析センター)

神作宣男(麻布大学)

河野友宏(生物資源ゲノム解析センター)

桑山岳人(農学部 畜産学科)

キシロース代謝能を持つ乳酸菌 *Enterococcus mundtii* QU 25 の全ゲノム解読

近年、微生物を利用したバイオマス物質生産が非常に注目されています。特にセルロースなどの木質系バイオマスの有効利用法の確立は、この分野における大きな課題の一つです。しかし、セルロースやヘミセルロースを直接、原料糖としてバイオマスに利用することは困難であるため、次善の策として、ヘミセルロースを加水分解した後に生成するキシロースを代謝できる微生物の探索とそれを利用した有用物質生産系の確立が求められています。

バイオマス物質生産に有利な乳酸菌の条件

乳酸菌とは、代謝により乳酸を生成する細菌類の総称で、非常に多数の細菌属を含んでいます。また、乳酸は、ポリマー化させてポリ乳酸にすることで生分解性プラスチックとしても利用可能な有用物質です。

これまで、キシロースから高効率・収率でL-乳酸を生産する産業微生物で、次の6つの条件を満足する菌は今まで見つかっていませんでした。(1) 生産する乳酸が光学活性体である、(2) 副産物が少ない、(3) 乳酸の生産速度が速い、(4) 生産する乳酸濃度が高い、(5) 基質や代謝産物による代謝阻害が低い、(6) 耐熱性である。今回、九州大学などとの共同研究により全ゲノム解読に成功した乳酸菌 *Enterococcus mundtii* QU 25 株は、上記の条件を満たす唯一の微生物です。しかし、そのゲノム配列はこれまで解読されていなかったため、どのような代謝酵素群を持っているのか不明でした。

次世代シーケンサーによる新規ゲノム解読

ゲノム情報が既知の *Enterococcus* 属には近縁種が存在しなかったため、種々の次世代シーケンサーを用いて多様な塩基長のライブラリーから塩基配列情報を取得し、それらを用いて全ゲノム配列を決定しました。その結果、約 302 万塩基対のゲノム DNA と 5 個のプラスミドが明らかとなりました。

このゲノム情報から、いくつかのキシロース代謝

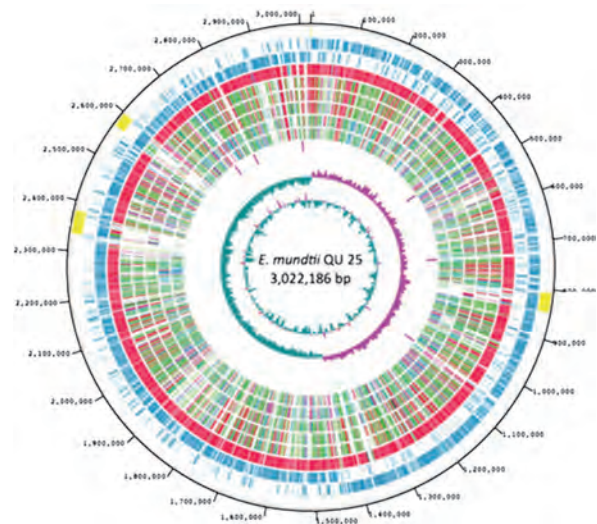


図1 *Enterococcus mundtii* QU 25 のゲノム構造

酵素とその他の遺伝子が連続して並んだオペロン構造を取っていることや、その他の乳酸発酵に関わる遺伝子の情報が明らかになりました。今後、リグノセルロースなどの未利用バイオマスからの物質生産など、多様な応用研究への展開が期待されています。本研究成果は *DNA Research* に発表される予定です。

志波 優 (生物資源ゲノム解析センター)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)
渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

リシーケンス解析によるシアノバクテリア 突然変異株の変異部位の同定

シアノバクテリアは地球上で最初に酸素発生型の光合成を始めた生物であり、海水、淡水、陸上、または他生物との共生状態など極めて多様な自然環境に棲息しています。スピルリナなど食用にされている種も多数いますし、またアオコや水の華と呼ばれ水中で大発生して水質汚染を引き起こす種も存在するなど、環境問題や農業・水産業とも密接に関わっている生物です。1996年に全生物で4番目に全ゲノム情報が解読されたシネコシスティスという種をはじめ、多数のシアノバクテリアが光合成やバイオマス物質生産などの研究分野で用いられています。東京農業大学では次世代シーケンサーを用いたシアノバクテリアのゲノム解析を通じて農学分野・基礎科学分野への貢献を進めています。

次世代シーケンス技術を用いたリシーケンス解析によるゲノムワイドな変異解析手法の普及

バクテリアのゲノムには容易に突然変異が生じます。培養条件を少し変えたり、わずかに薬剤を添加したりするだけでも、その条件に適応した突然変異株が生えてきます。そうした突然変異株のゲノムDNAのどこに変異が生じたかを調べることは、以前はとても困難なことでしたが、近年、次世代シーケンス技術の普及により容易に同定できるようになりました。

例えば、我々の研究室において、シアノバクテリアの一種であるシネココッカスの温度感受性の異なる変異株や、遊泳性が異なる変異株が得られました。これらの株からゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーで塩基配列を解読したところ、株ごとに数箇所の変異が見つかりました。そこで、これらの変異のどれが細胞の表現型に影響を与えたのかを調べるために、相同組換えという遺伝子組換え手法を用いて個別に検証したところ、それぞれの表現型に関わる原因遺伝子座が同定できました。

今後のバクテリアを使った分子生物学的研究にお



図1 シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 におけるリシーケンス解析の実際
図示した解析手法により、容易に突然変異の原因遺伝子座を同定できるようになった

いて、このような次世代シーケンス技術を用いたリシーケンス解析は、ごく当たり前の手法となって普及するものと思われます。現在はまだ基礎研究が主体ですが、より有用な形質を示す突然変異株の解析から、より応用的な研究へと発展することが期待できます。

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

ニホンウズラ host defense peptide の ゲノム解読

ニホンウズラの特徴

ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) は、我が国で唯一家畜化された動物種です。ニワトリと比較し、小型、飼料摂取量が少ない、代謝率、成長ならびに性成熟が早く、産卵能力が高く、孵化日数が短く、強健、光刺激、環境変化の感受性が高く、抗病性が高いことが知られています。そのためニホンウズラは家禽の改良に資する有用遺伝子の宝庫であることが期待されています。

host defense peptides

Host defense peptide は、脊椎動物、植物、昆虫などが持つ自然免疫系で働く物質で、様々な生物種が有し、多くの器官・組織で発現しているアミノ酸残基が 100 以下の小さなペプチドです。分子中に塩基性アミノ酸を多く含んでいるため正電荷を帯びます。また両親媒性の立体構造をとり疎水環境下では α ヘリックス構造や β シート構造などの二次構造を示します。正に電荷していることで負に帯電した膜を有す病原体（微生物、酵母、ウィルス、一部の寄生虫）を認識し、膜破壊作用による殺傷効果を示します。我々は、家禽産業において有用と考えられるコクシジウム症を引き起こすコクシジウムに有効な NK-lysin 遺伝子、鳥インフルエンザ感染にて発現量が増加する defensin 遺伝子群に注目し、両者の塩基配列および多様性解析をしています。



野生羽色 panda 羽色 dark 羽色

図 1 ゲノム解析に用いたニホンウズラ

NK-lysin と defensin 遺伝子の解読

我々は、両遺伝子を含むコスミドクローンおよび long-range PCR 産物の塩基配列を次世代シーケンサーにて決定しました。NK-lysin は、コスミドク

ローンより得られた塩基配列を *de novo* アッセンブルにより contig を作成し、NK-lysin 遺伝子の全長を含む約 13kb のコンティグが得られました。defensin は、2つのコスミドクローンおよび2つの long-range PCR 産物より得られた塩基配列を *de novo* アッセンブルおよびサンガー法により、繰り返し配列を除く約 71 kb のニホンウズラ defensin 領域を決定しました。

ゲノム配列から得られた情報をもとに更なる研究へ

これら配列の情報をもとに、次世代シーケンサーを用いた long-range PCR 産物による系統間での多様性解析を実施しています。系統間により免疫応答、病原微生物への感受性が異なるため、機能的に興味深い多型を発見できる可能性があります。Host defense peptide は微生物の膜電荷認識だけでなく、peptides それぞれの特異なアミノ酸配列および構造が各微生物に特有な構造の一部を認識し、細菌を選択的に殺傷していることが近年報告されています。これが腸内に共生・定着している腸内細菌叢の細菌を殺傷せず、病原性の非共生・侵入細菌を選択し殺傷し、腸内細菌叢の維持に貢献していると考えられます。さらに host defense peptide の多様性が微生物選択性の相違と関係し、腸内細菌叢の構成に影響すると考えられるため盲腸糞を用いた腸内細菌のメタゲノム解析も実施しています。これら研究を通して、家禽免疫の究明と抗病性の高い家禽作出へ貢献することが期待されています。

本研究は学内公募により農学部畜産学科半澤恵先生との共同研究として実施され、成果の一部は国際誌 *Animal Science Journal* に掲載されました。

石毛太一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

半澤 恵 (農学部 畜産学科)

原ひろみ (農学部 畜産学科)

平野 貴 (農学部 畜産学科)

次世代シーケンサーによる多様なイネ品種の解析

温帯および熱帯ジャポニカイネ品種の解析

これまで、次世代シーケンサーにより得られたリード配列を基に「日本晴」をリファレンスとして多数のイネ品種の遺伝子多型を明らかにしてきました。主に日本で栽培されている温帯ジャポニカの「雄町」「亀冶」「五百万石」「山田錦」、「コシヒカリ」「農林8号」、アジア地域で栽培されている熱帯ジャポニカの「Moroberekan」について解析し、すでに論文として報告しました (Arai-Kichise *et al.* 2011, 2014)。その結果、「Moroberekan」は温帯ジャポニカ品種に比べて5倍以上の一塩基多型 (SNP) を持つことが分かりました。この品種のゲノムは、read depth (読み深度) が他の品種ゲノムと比べて最も低く、また、リードでカバーされない遺伝子数が最も多いにも係わらず、100%カバーされる遺伝子は39,000以上と最も多かった「コシヒカリ」に次ぐものでした。このことは、解析したすべての品種で90%以上の遺伝子について80%以上の配列が明らかにされたことを示します。

リード情報の有効利用

日本型イネであっても異なる生態型に属するイネやインド型イネを解析するに当たって、次世代シーケンサーで得られたリード情報を効率的に利用するための方法を探りました。その結果、ゲノム配列を30倍以上の深度 (depth) で解析することにより、イネゲノムの約80%がカバーできることが分かりました。実際に、「Moroberekan」ゲノムでも「コシヒカリ」に次ぐ数の遺伝子が明らかにされています。次に、リファレンスゲノムにマップされないリード、すなわち unmapped read を利用することに成功しました。図1にその方法の概略を示しました。

より多くのイネゲノム配列を明らかにすることによって、品種改良のための有益な情報が得られます。しかし、現在のところ、次世代シーケンサーを用いても全ゲノム配列を明らかにすることは困難です。そこで、unmapped read を集めてより長い配列 (contig) を構築し、それを「日本晴」リファレンスにマッピングしたところ (図1の①)、7品種に

おいて合計119個の遺伝子が新たにカバーされました。その内訳は「Moroberekan」で最も多く「農林8号」で最少でした。このことは、unmapped read による contig の再構築は、遺伝的にリファレンス品種に遠い品種でより効力を発揮する可能性を示していると考えられます。「日本晴」ゲノムにヒットしなかった contig の配列についてインド型イネゲノム配列との類似性を調べたところ (図1の②)、「雄町」「亀冶」「Moroberekan」で多くの contig がそれと類似の配列を持つことが分かりました。

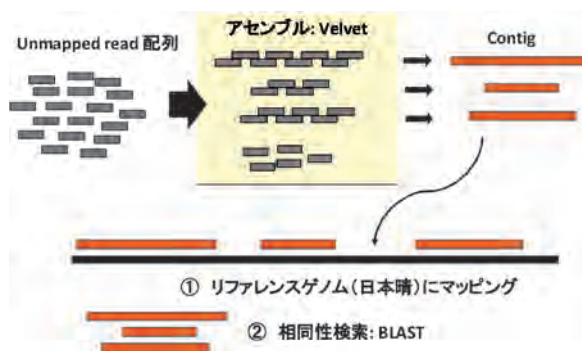


図1 unmapped read を利用した contig 再構築

熱帯ジャポニカより遺伝的に離れているアウスグループに属する品種「Kasalath」についても (独)農業生物資源研究所との共同研究により結果を論文として報告しました (Sakai *et al.* in press)。さらに多くの日本型イネとは遺伝的に離れたイネ品種についても、ゲノム全体の80%の配列を「日本晴」の配列に貼り付けて多数のSNPや挿入欠失 (InDel) を見出すことができています。これらの異なる生態型に属するイネについて得られた情報を詳細に解析して、論文公刊および情報公開の準備を進めています。

解析結果は http://www.nodai-genome.org/oryza_sativa_en.html において閲覧可能です。これらの研究は (独)農業生物資源研究所、兵庫県立農林水産技術総合センター、神戸大学の協力を得て行われました。

柴田 (八田) 真理 (生物資源ゲノム解析センター)
吉瀬 (新井) 祐子 (生物資源ゲノム解析センター)
若狭 暁 (生物資源ゲノム解析センター)

///// 平成 25 年度 新規学内公募一覧 /////

1. 村上覚史 (農学部 畜産学科)
「*Actinomycetales* 菌類の新規ゲノム決定」
2. 伊藤晋作 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ダイズシストセンチュウ孵化促進物質グリシノエクレピン A (GEA) 応答遺伝子の解析」
3. 貝沼章子 (応用生物科学部 醸造科学科)
「食酢醸造用酢酸菌二属の酢酸発酵性能に関する包括的研究」
4. 田村倫子 (応用生物科学部 栄養科学科)
「耐糖性酵母の浸透圧耐性メカニズムに関する研究—特に *Zygosaccharomyces mellis* の耐糖性について—」
5. 小塩海平 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「青葉アルデヒドによるトマト果実の代謝制御機構の解明」
6. 小塩海平 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「ソルビタントリオレート処理によって誘起されるスギ雄花のプログラム細胞死の課程におけるトランスクリプトーム解析」
7. 小栗秀 (生物産業学部 生物生産学科)
「次世代シーケンサーを用いたホップ品種の香気成分量に関与する遺伝子群の網羅的な同定」
8. 太治輝昭 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「シロイヌナズナ塩馴化能欠損変異株の変異同定」
9. 和田健太 (生物産業学部 生物生産学科)
「次世代シーケンス解析に基づく眼球疾患モデル動物の発症原因遺伝子および修飾遺伝子の同定」
10. 佐々木康幸 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「放線菌の新規窒素代謝系の解析」

//////////////// 学内公募事業とその成果 //////////////////

■ ニホンウズラ主要組織適合性複合体 *Mhc Coja* クラス IIB 遺伝子群の構造解析 ■

主要組織適合性複合体 Major histocompatibility complex (*Mhc*) 領域には、獲得免疫においてリンパ球への抗原提示を担う *Mhc* クラス I およびクラス II 遺伝子をはじめ、免疫応答に関わる遺伝子群が極めて高い遺伝子密度で存在する。ニワトリでは *Mhc B* ハプロタイプとマレック病、ラウス肉腫、ニワトリ白血病および鳥インフルエンザなど各種ウイルス性疾患に対する抵抗性との関係が報告され、抗病性育種への活用が期待されている。しかし *Mhc B* 領域内の強い連鎖の為、一部をのぞき責任遺伝子の同定には至っていない。これに対し、ニホンウズラは、ニワトリと同じキジ科に属し、ニワトリとの間にキメラや属間雑種が作成可能であり、またニワトリでは感染すると発症し死に至る鳥インフルエンザなどの疾患に対して不顕性感染を示す。この両種間の疾患感受性の差異を明確にすることは、家禽の抗病性向上に貢献するものと考えられる。

本研究室では、ニホンウズラ *Mhc Coja* 領域に 13 マーカー、*TRIM* 亜領域 (60 kb) : *HEP21*, *TRIM39.2*, *BTN1* および *BTN2* ; クラス II 亜領域 : *DCB1-TAPBP-DBB1* ; クラス I 亜領域 (180 kb) : *DMB1*, *DMB2* および *TAP1-TAP2*, ならびに *CD1* 亜領域 : *CD1.1* および *CD1.2* (40 kb) を構築し、11 系統、612 個体のニホンウズラを対象にこれらマーカーの多様性を検索した。その結果、各マーカーの総対立遺伝子数はいずれも 8 種類 (*DMB1* のみ 7 種類) と一定であった。したがって各マーカー (*Mhc Coja* 領域) は、*Mhc B* 領域と同様、ハプロタイプ (HT) ブロックを形成して共進化してきたものとも考えられる。然るに HT 解析の結果、低頻度ながら HT ブロックとは相反する対立遺伝子の組合せの存在が確認された。特に、クラス II 亜領域はその上流の *TRIM* 亜領域、ならびに下流のクラス I 亜領域との間で比較的高頻度の組換えを起こしている可能性が示唆された。このことは *Mhc B* 領域ではクラス II 亜領域と I 亜領域との間の強固な連鎖が、両亜領域の遺伝子の機能を個別に解析する障害になっていることを鑑みると大変興味深い。

一方、*Mhc B* 領域が最小不可欠 MHC と呼称されるコンパクトな遺伝子構成を有することとは対照的に、*Mhc Coja* 領域の *Mhc* クラス I α (*Coja I*) および II β (*Coja IIB*) 遺伝子が冗長な重複を示し、しかも HT 間には Copy number variation (CNV) が存在することが示唆されている。しかし重複した遺伝子間の塩基配列の高い類似性のため、各 HT の遺伝子構造や mRNA 転写量をサンガー法により解析することが困難である。これに対し、*Coja IIB* 遺伝子群および *Coja I* 遺伝子群にそれぞれ共通なプライマー (ユニバーサルプライマー) を設計し、すべての遺伝子座を一気に PCR 増幅しうることが示唆されている。そこで、本研究ではゲノム DNA および cDNA を鋳型とした PCR 産物を次世代シーケンサーで解析し、各 HT の遺伝子構成と転写量の多寡を明確にし、*Coja IIB* および *Coja I* 遺伝子群の基本的な特徴を明確にすることを目的としている。

次世代シーケンサーでの解析に先立ち、*Mhc Coja* HT がホモ化した個体の選択を試みた。まず、本研究室が保有する 6 系統、321 個体を対象に主働 *Coja IIB* 遺伝子のひとつである *DBB1* の遺伝子型を Sequence Based Typing (SBT) により決定し、*DBB1**01、*03、*04、*05 あるいは *06 ホモ接合体 22 個体を選

抜した。ついでこれらの個体を対象に、*DBB1* の上流、4 遺伝子 : *HEP21*, *TRIM39.2*, *BTN1* および *BTN2*, ならびに下流、3 遺伝子 : *DMB1*, *DMB2* および *TAP2* の遺伝子型を SBT により決定した。その結果、*DBB1**01、*03、*04、*05 および *06 は、周辺の 7 遺伝子との間でそれぞれ 3、4、3、2 および 5 種類、計 17 種類の HT を形成した。これら 17 HTs はいずれもクラス II 亜領域に最も近い *BTN2* もホモ接合体であるため、クラス II 亜領域全体がホモ化していると考えられる。現在、それぞれのハプロタイプに当たる個体の赤血球由来のゲノム DNA および末梢白血球由来の cDNA を調整中である。しかし、クラス I 亜領域の 3 遺伝子がホモ接合体であったのは 7 HTs のみであり、クラス I 亜領域の遺伝子解析には別途、個体選抜が必要であることが示唆された。

今後は *Coja IIB* 遺伝子の exon2 領域を共通に増幅するユニバーサルプライマーによる PCR 産物を用いてゲノムおよび cDNA を増幅し、増幅産物の塩基配列を Illumina の次世代シーケンシング MiSeq にて解析することにより、各 HT における *Coja IIB* 遺伝子の構成ならびに depth の差による各遺伝子の機能性の検証を行う予定である。

原ひろみ (農学部 畜産学科)
平野 貴 (農学部 畜産学科)
石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)
鈴木進悟 (東海大学)
椎名 隆 (東海大学)
細道一善 (遺伝学研究所)
半澤 恵 (農学部 畜産学科)



実験に用いたニホンウズラ

■ 次世代シーケンサーを用いた黒毛和種の筋肉組織における発現量解析 ■

黒毛和種は筋肉組織に脂肪が蓄積する脂肪交雑に優れた品種であり、脂肪交雑が最も特徴的な形質です。また、脂肪交雑は世界的にも注目され、経済的影響の大きい重要な形質となりました。しかし、そのような黒毛和種においても、血統により脂肪交雑の成績に差があり、黒毛和種の脂肪交雑形成に影響する遺伝子が存在すると考えられています。

そのような中で、ウシにおいても DNA 多型マーカーが大量に配置された染色体地図が整備され、これら DNA マーカーと家系などの集団を用いたゲノム解析によって、目的形質形成に影響する遺伝子が存在する染色体領域を探索することが可能となりました。これまでに、黒毛和種の家系を用いて枝肉形質に関する染色体領域の探索を行い、脂肪交雑に関する染色体領域を特定しています。また、この脂肪交雑関連領域において、好ましい効果を示すマーカーハプロタイプ (Q) と効果を示さないハプロタイプ (q) を明らかにしています。この Q 保有個体と q 保有個体間では、脂肪交雑形成に関わる遺伝子の筋肉における mRNA 発現量に違いがあると考えられます。発現量解析用のサンプルとして、屠殺時に枝肉から採取した筋肉組織を用いることも考えられますが、その時点で脂肪交雑の形成は完了しているため、遺伝子の mRNA 発現と脂肪交雑形成状態の関係を反映していないと考えられます。そのため、筋肉内脂肪細胞の分化が起こっていると考えられている肥育中期における発現量を調べる必要があると考えています。そこで、肥育中の Q 保有個体と q 保有個体からバイオプシーによって採取された筋肉組

織を用いて、次世代シーケンサーによって発現量を網羅的に解析しています。

この解析によって、黒毛和種の脂肪交雑形成に関わる遺伝子が明らかになるとともに、それら遺伝子情報が不明な点の多い脂肪交雑形成メカニズムの解明の一助となることも期待しています。



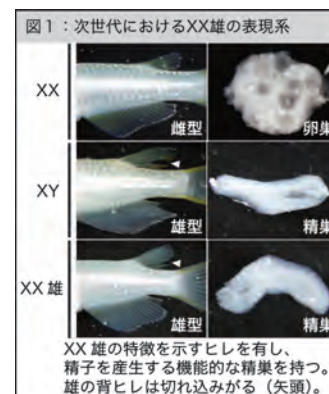
図 1 黒毛和種の枝肉断面

平野 貴 (農学部 畜産学科)
石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)
原ひろみ (農学部 畜産学科)
半澤 恵 (農学部 畜産学科)

■ 精子を介して次世代に伝わる DNA メチル化情報の解析 ■

野生型メダカの性分化は Y 染色体上の性決定遺伝子である *DMY* の有無により決まるが、性ホルモン投与によって性を逆転することが可能である。当研究室において、魚類の主要なアンドロゲンである 11-ケトテストステロンの暴露により遺伝子型は XX でありながら、表現型は雄となる XX 雄個体を作成した。この XX 雄個体と野生型 XX 雌個体とを交配すると次世代は全て XX 雌のみと予想されるが、雄の表現型を示す個体が複数認められた。これらの性転換個体は機能的な精子を作り、野生型 XX メス個体との交配により次世代を生み出した。興味深いことに、性転換個体は 3 世代目まで確認され、性転換率は世代を超えるたびに減少した。動物では本来、エピジェネティック情報は配偶子形成期に消去されると考えられている。しかしながら、エピジェネティック状態の変化によって生じた表現型が世代を超えて伝達される現象は動植物を含む多くの生物で報告されている。前述の学術的背景から、我々は性ホルモンが生殖細胞でのエピジェネティック状態を変化させ、精子を介してこれらのエピジェネティック情報が次世代へと伝わることにより XX 雄個体由来の次世代に性転換個体が生み出されると予想した。そこで、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムレベルで、次世代に性転換個体を生み出す XX 雄個体の精子と野生型 XY 個体の精子のメチル化状態を解析した。現在のところ、メチル化状態が異なる遺伝子領域を複数同定し、解析している。候補遺伝子の中に既に性分化に関わると報告のある *Sox9b* 遺伝子が含まれていた。XX 雄個体の精子における *Sox9b* プロモーターのメチル化は野生型 XY 精子に比べ亢進した。次に、DNA メチル化を介して遺伝子発現調節が次世代へと伝達されると予想し、生殖腺において *Sox9b* の発現とメチル化を解析した。F0 世

代では、性ホルモン暴露により発現が減少し、プロモーターのメチル化が亢進した。興味深いことに、高メチル化と発現減少は次世代、次々世代の生殖腺においてもみとめられた。上記の結果から、性ホルモンによるメチル化の変化は精子を介して次世代に伝達され、次世代の生殖腺において遺伝子発現に関わると示唆される。本研究により、不明であった脊椎動物の性が、エピジェネティックな観点から明らかにできると期待している。



田中 実 (基礎生物学研究所 生殖遺伝学研究室)
山本耕裕 (基礎生物学研究所 生殖遺伝学研究室)
小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

■ 加齢が卵子に及ぼす影響の解明を目指すトランスクリプトーム解析 ■

妊娠が成立するためには正常な卵子と精子の受精が必要です。卵子は胎生期に発生して以来、卵巣内で長い年月を過ごすため、加齢とともに卵子の質が低下します。いわゆる卵子の老化です。本邦では、晩婚化の傾向にともない、女性の出産年齢が上昇しており、卵子の老化に伴う不妊症が急増しています。現在行われている不妊治療では、卵子の時間を巻き戻すことはできず、卵子の質そのものを改善するには至っていません。従って老化した卵子で妊娠を目指すことは非常に困難な状況にあります。我々国立成育医療研究センター不妊診療科では、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターとの共同研究により、ヒト卵子の加齢メカニズムの解明を試みており、高齢女性の不妊治療成績向上を目指しています。

〈卵丘細胞発現遺伝子プロファイルの作成〉

ヒト卵子は、倫理的制約から直接的な研究材料とすることが困難なため、我々は卵子を取り囲む顆粒膜細胞である卵丘細胞を研究対象としています。卵丘細胞は、卵子とギャップジャンクションを形成し、互いの細胞質が結び付き、低分子の物質交換を行っています。この卵子卵丘細胞間の物質輸送によって、卵子は卵丘細胞からエネルギー供給を受け、また cAMP や cGMP の供給を受けることで卵子成熟が制御されています (図 1)。卵子成熟過程に異常が生じると、受精率や胚の質低下につながるから、卵丘細胞は卵子の質を制御する鍵細胞と考えられます。卵丘細胞による卵子成熟メカニズムが明らかになると、卵子の質を改善する新たな治療法の開発につながります。つまり高齢女性の妊娠率向上に寄与することが期待されます。我々は、体外受精を行う不妊治療患者から、ヒト卵丘細胞を個別に回収し、各々トランスクリプトーム解析を行うことで、ヒト卵丘細胞に発現する全遺伝子の発現遺伝子プロファイルを作成しました。なおこれは、患者の同意および成育医療研究センター倫理委員会承認のもと行われた研究です。現在、年齢別、病態別、治療成績別に各々解析を行っており、卵子成熟制御に関する遺伝子群の究明を試んでいます。

〈卵巣老化現象の解明への試み〉

卵巣が実年齢よりも早期に老化を来す疾患群があり、早発閉経 (早発卵巣機能低下症) といいます。この方たちは、40 歳までに排卵が途絶えてしまい閉経を迎えます。単一の原因があるわけではなく、様々な病態が存在し、結果として若年齢で閉経に至ります。排卵障害に至る過程も、卵子が早期に枯渇したり、原始卵胞から胞状卵胞に至る間に大多数が閉鎖卵胞に陥るなど様々です。排卵する卵子の質が低下しているか否かも症例により異なります。我々は、卵子の質低下を伴った早発閉経症例に対し、卵丘細胞のトランスクリプトーム解析を試み、上記で作成した卵丘細胞発現遺伝子プロファイルと遺伝子発現の比較を行いました。Preliminary なデータではありますが、卵丘細胞において老化に関連した遺伝子の発現異常を認めました。卵巣の老化現象と卵丘細胞の老化現象が密接に結びつく可能性が示唆されます。また卵丘細胞の老化が、卵子の質低下を招いたとも考えられます。

〈卵丘細胞発現遺伝子プロファイルの臨床応用〉

卵子の質低下を伴った早発閉経症例に対し、内科療法を行い、治療前後の卵丘細胞発現遺伝子発現量を比較したところ、治療により妊娠に至ることはありませんでしたが、異常な発現を示す遺

伝子群の一部が、卵子の質が良好であった卵丘細胞の遺伝子発現と同等となることが判明しました。この結果から、内科療法に一定の治療効果があったと推定されます。不妊治療の効果判定を行う場合、一般的には良好胚獲得率や妊娠率で議論されます。しかしながら症例数が少なく、不良胚の多い難治性不妊の患者ではそのような判定方法で治療内容を評価することは困難です。卵丘細胞発現遺伝子プロファイルを比較する手法は、わずかな変化を評価することができるため、難治性不妊に対する治療効果判定方法として有用と考えられます。また、卵子の質を改善する新たな治療法を開発する際、薬剤の投与方法や投与量を決定する際の羅針盤として臨床応用が期待されます。

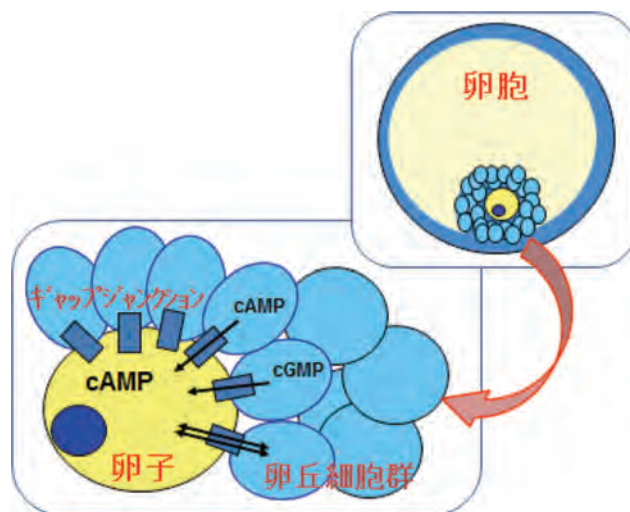


図 1 卵子と卵丘細胞

松井大輔 (国立成育医療研究センター)
 川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)
 岸 靖典 (国立成育医療研究センター)
 齊藤隆和 (国立成育医療研究センター)
 齊藤英和 (国立成育医療研究センター)
 河野友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

■ 放線菌の窒素酸化物生産機構と生理的意義の解析 ■

放線菌は生理活性物質の宝庫と呼ばれ、抗生物質、抗がん剤や免疫抑制剤等の医薬、さらに抗寄生虫薬や農薬など畜産や農業等にも重要な細菌で、微生物学の中でも研究対象として独特のグループを形成している。放線菌は長い間、絶対好気性の微生物であるとされ、現在でもそのように考える専門家がほとんどである。そのような状況下、筆者らは世界で初めて放線菌 *Streptomyces antibioticus* が硝酸呼吸（嫌気呼吸）を行うことを見出し、通性嫌気性細菌であることを報告した。

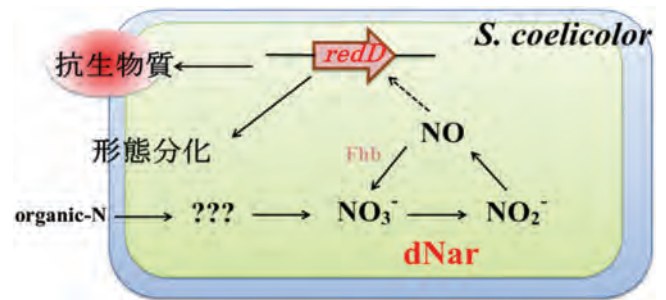
その後、本菌の硝酸呼吸能を検証する過程で、3つの興味深い現象を確認した。即ち、a) 既知の知見において、嫌気条件かつ硝酸塩存在下で生産されることが知られている異化型硝酸塩還元酵素 dNar が、好気条件下で硝酸塩の非添加培地で生育させたにもかかわらず、高生産されていたこと、そして、b) 同条件下で本菌が培地中に亜硝酸を蓄積すること、さらに c) 同条件下で、nitrosative stress に対する解毒酵素として知られ、一酸化窒素 (NO) を NO₂⁻ に変換する NO ジオキシゲナーゼ (flavo-hemoglobin, Fhb) が細胞質タンパク質のおよそ 4% を占めるほど生産されていたことである。この NO₂⁻ forming pathway を生化学的に検証した結果、*S. antibioticus* は有機体窒素から NO、NO₃⁻、NO₂⁻ を細胞内で生産し、その生産酵素として dNar や Fhb が関与していることが示唆された。

このような代謝系は、これまでに報告例がなかったため、全塩基配列の決定が終了しており、*S. antibioticus* と同様に有機体窒素からの NO₂⁻ 生産能を有する *S. coelicolor* について遺伝学研究を進めた。

本菌の生産する NO₂⁻ は、培養開始時から経時的に培地中に蓄積され、蓄積量、単位菌体当たりの生産量ともに3日目でピークをむかえ、その後、減少していった。次に、*dnar* 破壊株 (NO₂⁻ 非生産株) 及び *fhb* 破壊株 (内在性 NO 蓄積株) の形態観察を行ったところ、両破壊株ともに親株と顕著な違いが観察された。*dnar* 破壊株は、親株では培養3日目以降に見られる赤色抗生物質 (図; コロニー中央) 生産が全く確認されず、気菌

糸形成の開始時期に異常が見られた。この表現型は培地に NO₂⁻ を添加することによって相補され、抗生物質生産及び気菌糸形成に関する異常が回復した。一方、*fhb* 破壊株では、逆に赤色抗生物質生産量が顕著に増加した。これらの結果は、明らかに、菌自らが生産する窒素酸化物が二次代謝制御に関与していることを示しており、筆者らは、本菌の生産する窒素酸化物が放線菌の A-factor や、ピブリオに代表されるアシルホモセリンラクトンと同様にクオラムセンシングにおけるオートインデューサーとして機能している可能性を考えた。実際、NO₂⁻ を培養初期の菌に与えると、二次代謝開始が顕著に早くなり、NO₂⁻ 濃度依存的に抗生物質の生産量は増加した。

これまでの研究で、*S. coelicolor* における新規窒素代謝経路と、本代謝を行う意義について検証を行ってきた。遺伝学的な解析を行った結果、新規の窒素代謝経路が同定され、さらに、生産される窒素酸化物が二次代謝を制御している可能性も示唆された。有用微生物である放線菌において新たな知見を得たことは非常に意義深く、産業的な応用も期待される。そこで、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析により、内在性窒素酸化物による遺伝子転写の網羅的解析を行い、本菌の窒素酸化物応答を分子レベルで明らかにすることを目指す。



佐々木康幸 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

■ 蜂蜜から分離された酵母の耐糖性メカニズムに関する研究 ■

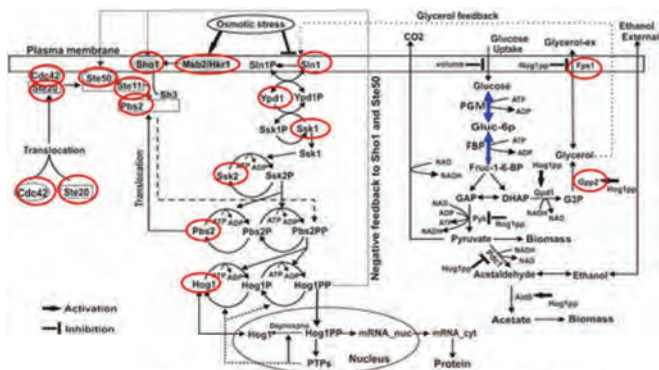
浸透圧の高い食品に生育する酵母が知られている。食塩濃度の高い醤油諸味からは *Zygosaccharomyces rouxii* や *Candida versatilis* などの酵母が分離される。これらは醸造食品の特徴的な香味形成に関与する一方で、塩蔵品や糖蔵品の品質を劣化させる原因ともなる。

Saccharomyces cerevisiae の浸透圧耐性メカニズムとして HOG (high osmolarity glycerol response) 経路が知られている (図1)。Sho1 と Sln1 の2種類の浸透圧センサーが存在し、センサー Sho1 は MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) の Stel1、センサー Sln1 は MAPKKK の Ssk2 を活性化し、次いで共通の MAPKK である Pbs2、MAPK である Hog1 を順次活性化する。活性化された Hog1 は細胞核に移行して転写因子をリン酸化することでグリセロール合成に関わる酵素 (Gpd1) やグリセロール輸送体 (*Fps1*, *Stl1*) の転写を誘導する。

当研究室ではカナダ産蜂蜜から *Zygosaccharomyces mellis* を分離した。*Z. mellis* は分類上 1990 年に *Z. rouxii* から独立した酵母である。両者の浸透圧耐性を比較するため、YM 培地に高濃度の NaCl またはグルコースを添加して培養したところ、NaCl 添加においては *Z. rouxii* が 20% NaCl 存在下でも生育したのに

対して、*Z. mellis* は 10% 存在下で生育が阻害された。一方、グルコース添加においては *Z. mellis*、*Z. rouxii* ともに 80% グルコース存在下で生育した。このように、*Z. mellis* は、NaCl に対する耐性は見られなかったがグルコースに対しては *Z. rouxii* と同等の耐性を示したことから、糖に特異的な応答機構があることが示唆された。そこで、*Z. mellis* の耐糖性メカニズムの検討を目的として、1% グルコース含有培地と 50% グルコース含有培地とで生育させた *Z. mellis* の RNA-Seq を行った。解読された 9674 遺伝子を用いて以下2つの解析を行った。

まず、これまでに *S. cerevisiae* において耐糖性に関わるとされる遺伝子群の配列に最も類似した *Z. mellis* の配列を抽出し、その発現変動をしらべた。その結果、赤丸で示したタンパク質をコードする遺伝子群は、培地中のグルコース含有量に関わらず 2 倍以下の発現変動であった (図1)。これらはいずれもリン酸化脱リン酸化により浸透圧シグナル伝達を行うため *Z. mellis* にこの経路が存在したとしても変動しないことが予測された。一方、青矢印で示したフルクトース 1,6-ビスフォスファターゼ (FBP) およびホスホグルコノムターゼ (PGM) をコードする遺伝子は発現が down-regulate され (図1、図2)、糖新生が抑



J H Parmar et al., Phys. Biol. 6.036019 (2009)より引用

図1 出芽酵母の浸透圧応答経路

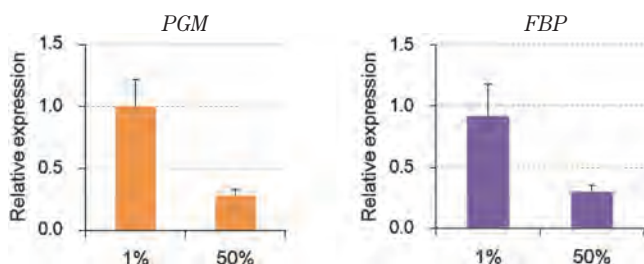


図2 RT-PCRによる相対的遺伝子発現変化

制されていることが示唆された。

次に、1%グルコース含有培地と50%グルコース含有培地とで3倍以上発現が変動した遺伝子を抽出すると250遺伝子であり、これらの配列を用いてKEGG automatic annotation server (KAAS) による代謝解析を行った (KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)。表1に示したように、グリシンや分岐鎖アミノ酸代謝に関わる酵素、コレステロールを合成するメバロン酸経路の律速酵素、細胞壁の剛性や出芽に関わるキチンシンターゼ、糖質分解酵素、細胞分裂の制御に関わる遺伝子、トランスポーターをコードする遺伝子などの発現が変動し、高糖度環境に応答したと考えられた。

今後は、これらの現象のトリガーとなった遺伝子をRNA-Seq データの中から抽出し、*Z. mellis* が有する耐糖性メカニズムの解明を行うとともに、食品加工時の制御に応用したい。

表1 発現変動した遺伝子群とそれに関わる代謝経路

Pathways	Genes
Carbon metabolism	• Formic acid dehydrogenase
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	• Glycine hydroxymethyltransferase
Valine, leucine, and isoleucine biosynthesis	• Dihydroxy-acid dehydratase
Fatty acid metabolism	• Acyl-CoA synthetase • Carnitine O-acetyl transferase
Terpenoid backbone biosynthesis	• Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	• Chitin synthase
Starch sucrose metabolism	• Maltase • glucoamylase
Oxidative phosphorylation	• Ubiquinol-cytochrome reductase iron sulfur subunit • Cytochrome C oxidase subunit
Cell cycle / meiosis	• Cell division cycle complex • Mitosis inhibitor protein kinase SWE1 • Regulatory subunit for cdc7p protein kinase • Major facilitator superfamily transporter • Sugar-H ⁺ symporter
Calcium signaling pathway	• Adenine nucleotide translocator of mitochondrial ATP-binding cassette
ABC transporter	• ATP binding cassette
Nucleotide metabolism	• DNA directed RNA polymerase subunit

村 清司 (応用生物科学部 栄養科学科)
 田村倫子 (応用生物科学部 栄養科学科)
 石毛太一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

■ シロイヌナズナ塩馴化能欠損変異株の変異同定 ■

高濃度の塩や乾燥ストレスは作物の収量に大きな影響を及ぼすストレスです。近年のモデル植物を用いた研究により、これらのストレスに対して耐性を付与できる遺伝子も明らかとなり、いくつかの耐塩性植物も作出されています。しかしながら、まだ実用に耐えうる耐性の獲得には至っていません。一方、自然界にはこれらのストレスに対して極めて高い耐性を示す植物が存在します。このような自然界で高い耐性を示す植物はどのような分子メカニズムを用いているのか、非常に興味深いものの、適した実験材料がなく不明のままです。

モデル植物、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、世界中に 1000 種程度の accessions (エコタイプ) が存在します。近年の研究から、様々な表現型に大きなバリエーションが観察されることが明らかになってきました。また、ゲノムシーケンサーなどの技術革新により、多くの accessions のゲノムシーケンスと遺伝子多型が公開され、これらを用いた分子遺伝学的解析の基盤整備が進められています。先行研究において、350 種のシロイヌナズナ accessions について耐塩性を調べたところ、海水と同程度の塩濃度でも耐性を示す accessions を見だしました (挿入図)。この極度の耐塩性を示すメカニズムを生理学的に解析したところ、生育に影響を与えない程度の塩ストレスを一定期間経ることで、海水程度の塩水 (浸透圧) にも耐性を示す「塩馴化能」が優れていることが明らかとなりました。塩馴化能獲得に至るメカニズムを明らかにするため、塩馴化を有

する耐塩性 accession, Zu-0 の種子にイオンビームを照射することで突然変異を誘導し、これらの種子を用いて塩馴化能が欠損した変異株を得ました。本研究では、この変異株の原因遺伝子を同定することを目的に、Zu-0 野生株と変異株のゲノムシーケンスを解読します。

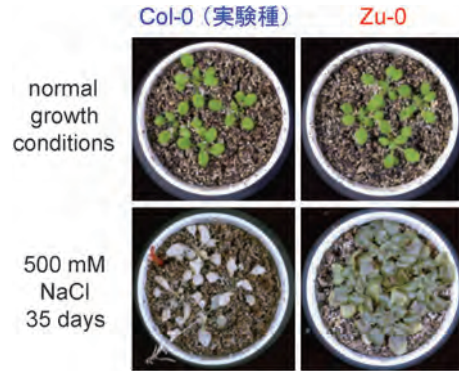


図 シロイヌナズナ accessions の耐塩性評価
海水と同程度の塩ストレス処理を行った結果、実験種である Col-0 に対して、Zu-0 は極めて高い耐性を示す。

太治輝昭 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

■ ダイコンのゲノム解読と根部のトランスクリプトーム解析 ■

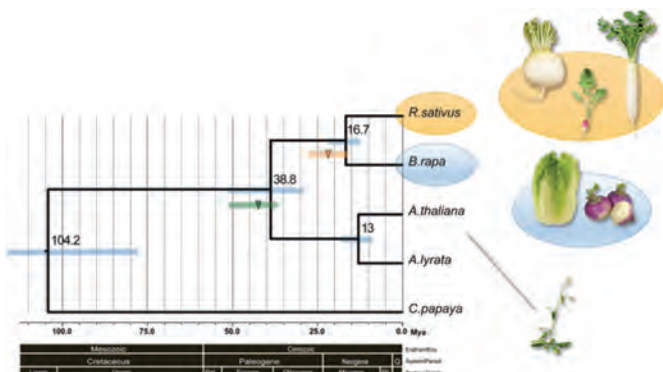
アブラナ科ダイコン属 *Raphanus* L. の 1 年生草本であるダイコンは、豊富な栄養価と機能性成分を含むなど利用価値が高く、世界中で栽培される重要な農作物である。日本では全国各地で、根部の形態、含有成分、作型などに幅広い変異をもつ在来品種が育種され、遺伝子資源としての価値が高まっている。本研究は、ダイコンのゲノム情報を蓄積し、分子レベルでの育種・開発のための基盤を構築することを目的としている。

はじめに、青首総太系ダイコンについて、大規模シーケンスデータからゲノムのドラフト配列 (総計 383.8 Mbp) を構築し、ゲノム、遺伝子配列を管理するダイコン用データベースを整備した。アブラナ科植物間でのゲノム比較と系統解析から、ダイコン属と *Brassica* 属の分岐は 1670 万年前頃生じ、それに先立つかあるいは同時期に、ゲノムの重複 (3 倍化) が生じたことが推定された (図)。ゲノム構造の改変は、アブラナ科の主要

作物を含む *Brassica* 属やダイコン属の多様化に寄与したと考えられた。

さらに、肥大性や辛味成分の異なるダイコンの品種間で、根の組織や生長ステージごとに発現する遺伝子を網羅的に検出し、発現量を比較定量した。初期肥大が生じる前の実生段階の根部においては、細胞の増殖や分化を誘導するカルシウムシグナル代謝経路の活性が著しく上昇し、シグナル伝達、ストレス応答に関する遺伝子群の発現が高まっていた。肥大段階の根部では、根部維管束形成層や木部柔組織を中心にデンプン・ショ糖代謝経路が最も活性化し、特にショ糖代謝系の酵素遺伝子が根の肥大に中心的な役割を果たしていることが示された。また、細胞増殖が抑制される皮層組織では、特に根の肥大性が低いダイコンの系統で、リグニン合成を誘導する代謝経路が活性化していた。さらに、ダイコンの辛味成分合成に関わる GSL 生合成関連遺伝子、酵素 myrosinase 遺伝子の発現と、これらを制御する転写因子の発現パターンを分析し、辛味物質合成に関与する主要な遺伝子群を同定した。

三井裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)
小松憲治 (短期大学部 生物生産技術学科)



図：ダイコン、*Brassica rapa* (白菜、カブ類)、*Arabidopsis* の系統関係

■ ホップの香気成分生合成に関与する遺伝子群の解析 ■

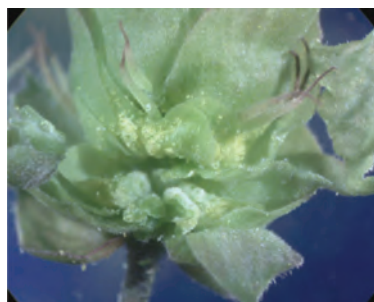
ホップ (*Humulus lupulus* L.) は、雌雄異株のアサ科の多年生植物である。ビールに独特の香気と苦みをもたらす作物であり、主生産国はドイツ、チェコ、アメリカ、中国である。年間約9万トンの生産量 (2012年、世界計) は、主要作物に比べればずいぶんと少ない。しかし、ホップ抜きのビールは考えられない、という点において圧倒的な存在感を放っている。古くから薬用植物として利用され、近年は、ホップ成分が生活習慣病の改善効果やアルツハイマー病の発症抑制効果等の機能性を示す点でも注目されている。ホップは、収穫まで約3年の栽培期間を要するため、迅速な形質判別を目的に分子遺伝学的手法が積極的に導入されてきた。ビールに特徴的な苦味を与える α 酸 (フムロン) 含量に基づいたQTL解析、耐病性因子の遺伝地図、DNAマーカーの開発、マイクロサテライトマーカーを用いた品種の系統解析などの研究が世界的に盛んである。

これまで、ホップの品質は苦味成分である α 酸含量を元に評価されてきたが、近年の消費者の嗜好性の多様化に伴い、ホップの様々な芳香に商品価値が見出されるようになってきている。これらの芳香は、ホップ球果の苞葉の特殊な器官「ルプリン腺」において作られる精油成分に起因する。中でも、特徴的な芳香をもつホップ品種は商業価値が高く、その開発はホップの育種目標の1項目となっている。

農大オホーツクキャンパス生物生産学科では、寒冷地農場において数年来ホップ栽培に取り組んでおり、そのホップは農大ブランドのビール「祝」に使用されている。また、食品香粧学科ではホップの香気成分について独自の研究が進められていた。このような背景からホップ研究の気運が高まっていた。我々は、次世代シーケンサーを用いて、ホップ球果が多様な成分を生成する分子メカニズムを明らかにする研究を計画した。本研究で得られた知見をホップの育種に応用し、優れた芳香を持つホップ品種の育種に発展することを期待している。



▲開花中のホップ雌花



◀ホップのルプリン腺毛 (黄色い粉状のもの)

- 川原玲香 (生物資源ゲノムセンター)
- 小栗 秀 (生物産業学部 生物生産学科)
- 坂本 光 (生物産業学部 生物生産学科)
- 吉田穂積 (生物産業学部 生物生産学科)
- 伊藤博武 (生物産業学部 生物生産学科)
- 妙田貴生 (生物産業学部 食品香粧学科)
- 中澤洋三 (生物産業学部 食品香粧学科)
- 上本允大 (サッポロビール)

■ マメ科植物の生産するダイズシストセンチュウ孵化促進物質応答遺伝子の探索 ■

ダイズシストセンチュウはマメ科植物に寄生し、大豆生産に被害を及ぼす主要な因子の1つとして知られている。シストセンチュウは土壤中にシストと呼ばれる状態で存在し、マメ科植物が生産、分泌する物質に反応して孵化し、宿主植物へ寄生、栄養を収奪する (図1)。シストの状態では乾燥や低温、高温といった環境ストレスに強い耐性を示すため、既存の農薬を用いた方法では完全な防除は困難とされている。我々はシストセンチュウ新規防除法の開発のため、シストセンチュウの孵化過程や宿主植物認識過程、孵化促進物質の生合成の研究を行っている。そこで次世代シーケンサーを用いて以下の研究を行う。

シストに孵化促進物質であるグリシノエクレピンを暴露した場合、即座に孵化するのではなく孵化に数日を要することから、シストが孵化促進物質を受容後、新たに遺伝子やタンパク質が発現し、孵化が起こると考えられる。そこで本研究ではシストにグリシノエクレピンを暴露し、経時的な遺伝子発現変動を網羅的に解析することで孵化に必須の遺伝子の同定を行う。

マメ科植物は、ダイズシストセンチュウの孵化促進物質を生産している。しかし、何故、マメ科植物が自身の生育に不利となる孵化促進物質を生産しているのかは明らかとなっていない。そこで孵化促進物質の植物における効果を明らかにするため、マメ科植物のモデル植物であるミヤコグサを用いてグリシ

ノエクレピンを処理し、遺伝子発現変動を解析することによって植物における孵化促進物質の機能を明らかとする。



図1 シストセンチュウの生活環

伊藤晋作 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

■ ダイジョ (*Dioscorea alata* L.) の葉における色素変異に関する研究 ■

ダイジョ (*Dioscorea alata* L.) はヤマノイモ属の食用種の一つであり、アフリカや熱帯アジア、ラテンアメリカなど広い地域で栽培されている。ポリフェノールをはじめとするファイトケミカル (植物微量成分) が多く含まれるほか、ダイジョが作るアントシアニン色素は、天然の着色料として利用でき、付加価値を付けた商品の開発ができると期待されている。しかし、ダイジョは塊茎分割によって繁殖させるため、栽培されている植物体はクローンであるにもかかわらず、種内には多様な遺伝的変異が観察される。2000年から現在にかけて、ダイジョの地方品種「沖縄 A」の塊茎分割によるクローン増殖を継続し、繰り返し発生する体細胞変異の系譜的解析を行ってきた結果、「沖縄 A」のクローン増殖過程において、アントシアニンが増減する色素変異が繰り返し出現した。また、2003年には変異型 (濃赤) の一部の系統の色素が元の原型 (薄い赤) に戻る復帰型変異が出現した。2009年には変異型の一つの塊茎片から本来の変異型とともに、アントシアニン色素をほとんど形成しない新変異型 (緑) の特徴をもつシュートが発生した (図 1)。古くから植物の突然変異体には不安定、つまり野生型になる復帰変異を起こすものが知られており、俗に枝変 (易変性変異) と呼ばれている。これらの変異は花卉園芸分野で、特に花色の研究が盛んに行われているが、ダイジョにおいては、ほとんど行われていないのが現状である。原因不明の色素変異が頻繁に生じ、栽培・普及の隘路となっていることから、本研究ではダイジョにおける色素発現のメカニズム解明にアプローチし、将来的に色素発現をコントロールできるようにすることを目的としている。

研究方法は、温室内で栽培した濃い赤色の変異型および緑色の新変異の葉を試料とし、フラボノールの分析とともに、アントシアニンの分子種の同定および蓄積量を調査した。また、次世代シーケンサーによる mRNA の解析を行い、アントシアニン色素合成にかかわる酵素群の発現量を比較した (図 2)。

アントシアニンは、新変異の緑色の葉では検出されず、変異型の赤色の葉でのみシアニジンが検出された。mRNA の発現量は CHS、CHI、F3H、F3'H、DFR では発現量に大きな差はみられなかったが、シアニジンを含む赤色の葉では緑色の葉と比較して ANS で 84 倍、UFGT では 38 倍、発現量が増加していた。この結果は赤色を発現している表現型に準えた結果となった。また、フラボノールの分析結果から、ケンフェロールおよび

ケルセチンが赤、緑ともに合成されていること、CHS から DFR までのアントシアニン合成経路の構造遺伝子の発現には大きな変化が無いことから、ロイコシアニジンまでは合成され、緑色の葉では基質として利用されないため蓄積されていると思われる。

以上のことから、表現形質に見られる色素発現の変異は、緑色の葉において ANS 遺伝子の発現が抑制されていることに起因し、復帰変異等が観察されることから、トランスポゾンなどの可動性因子による遺伝子機能破壊もしくは DNA メチル化などのエピジェネティック変異による発現抑制が原因であると考えられた。現在までに、ANS の cDNA の全長配列が決定され、今後はゲノム DNA を単離し構造解析を行い、変異の発生要因の特定を試みる。

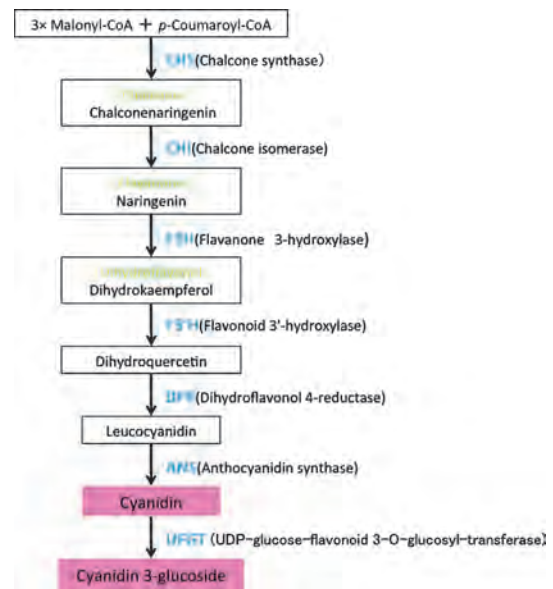


図 2 シアニジン生合成経路

- 飯島 健 (応用生物科学部 生物応用化学科)
- 川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)
- 児玉浩明 (千葉大学)
- 野口治子 (応用生物科学部 生物応用化学科)
- 内野昌孝 (応用生物科学部 生物応用化学科)
- 高野克己 (応用生物科学部 生物応用化学科)

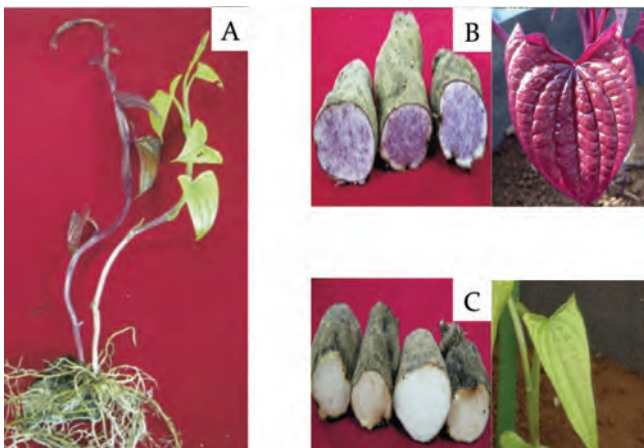


図 1 A: 変異型から生じた色素変異 (右)
B: 変異型 C: 新変異型

研究発表実績

●論文発表

- **Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, Hanzawa K.**
Basic characterization of avian NK-lysin (NKL) from the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Anim Sci J* 85: 90-5 (2014)
- **Arai-Kichise Y, Shiwa Y, Ebana K, Shibata-Hatta M, Yoshikawa H, Yano M, Wakasa K.**
Genome-Wide DNA Polymorphisms in Seven Rice Cultivars of Temperate and Tropical Japonica Groups. *PLoS ONE* 9 (1): e86312. (2014)
- **Sakai H, Kanamori H, Arai-Kichise Y, Shibata-Hatta M, Ebana K, Oono Y, Kurita K, Fujisawa H, Katagiri S, Mukai Y, Hamada M, Itoh T, Matsumoto T, Katayose Y, Wakasa K, Yano M, and Wu J.**
Construction of pseudomolecule sequences of the *aus* rice cultivar Kasalath for comparative genomics of Asian cultivated rice. *DNA Research*. (2013) *in press*
- **Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A, Sugawara N, Kumakura S, Ogawa H, Akutsu H, Hata K, Nakabayashi K, Kono T.**
Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. *Epigenetics*. 8 (6): 635-45. (2013)
- **Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura, Chiba H, Ito T, Kono T, Sasaki H.**
Mouse Oocyte Methylomes at Base Resolution Reveal Genome-Wide Accumulation of Non-CpG Methylation and Role of DNA Methyltransferases. *PLoS Genetics*. 9 (4): e1003439. (2013)
- **Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T.**
High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. *Genome Research*. 23 (4): 616-27. (2013)
- **Tasaki H, Iwata H, Sato D, Monji Y, Kuwayama T.**
Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*. 79 (5): 809-814. (2013)
- **Endo M, Kawahara-Miki R, Cao F, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H.**
Estradiol supports *in vitro* development of bovine early antral follicles. *Reproduction*. 143 (1): 85-96. (2013)
- **Takeo S, Goto H, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H.**
Effect of maternal age on the ratio of cleavage and mitochondrial DNA copy number in early developmental stage bovine embryos. *J Reprod Dev*. 59 (2): 174-9. (2013)
- **Goto H, Iwata H, Takeo S, Nisinonso K, Murakami S, Monji Y, Kuwayama T.**
Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. *Zygote*. 21 (3): 256-64. (2013)
- **Nishida H, Matsumoto T, Kondo S, Hamamoto M, Yoshikawa H.**
The early diverging ascomycetous budding yeast, *Saitoella complicata*, has three histone deacetylases belonging to the Clr6, Hos2, and Rpd3 lineages. *J Gen Appl Microbiol*. (2013) *in press*
- **Yano K, Wada T, Suzuki S, Tagami K, Matsumoto T, Shiwa Y, Ishige T, Kawaguchi Y, Masuda K, Akanuma G, Nanamiya H, Niki H, Yoshikawa H, Kawamura F.**
Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 159 (11): 2225-36. (2013)
- **Tsuda K, Kawahara-Miki R, Sano S, Imai M, Noguchi T, Inayoshi Y, Kono T.**
Abundant sequence divergence in the native Japanese cattle *Mishima-Ushi* (*Bos taurus*) detected using whole-

- genome sequencing. *Genomics*. 102 (4): 372-8. (2013)
- **Takeo S, Kawahara-Miki R, Goto H, Cao F, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Iwata H.**
Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events. *Mol Reprod Dev*. 80 (7): 508-21. (2013)
 - **Kawahara-Miki R, Sano S, Nunome M, Shimmura T, Kuwayama T, Takahashi S, Kawashima T, Matsuda Y, Yoshimura T, Kono T.**
Next-generation sequencing reveals genomic features in the Japanese quail. *Genomics*. 101 (6): 345-53. (2013)
 - **Suzuki S, Hosomichi K, Yokoyama K, Tsuda K, Hara H, Yoshida Y, Fujiwara A, Mizutani M, Shiina T, Kono T, Hanzawa K.**
Primary analysis of DNA polymorphisms in the TRIM region (MHC subregion) of the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Animal Science Journal*. 84 (1): 90-6. (2013)
 - **Akanuma G, Ishibashi H, Miyagawa T, Yoshizawa R, Watanabe S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Ushio K, Ishizuka M.**
EliA facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80. *FEMS Microbiol Lett*. 339 (1): 48-56. (2013)
 - **Ohbayashi R, Watanabe S, Kanasaki Y, Narikawa R, Chibazakura T, Ikeuchi M, Yoshikawa H.**
DNA replication depends on photosynthetic electron transport in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 344 (2): 138-144. (2013)
 - **Han X, Shiwa Y, Itoh M, Suzuki T, Yoshikawa H, Nakagawa T, Nagano H.**
Molecular cloning and sequence analysis of an extracellular protease from four *Bacillus subtilis* strains. *Biosci Biotechnol Biochem*. 77 (4): 870-3. (2013)
 - **Iwata T, Kaneko S, Shiwa Y, Enomoto T, Yoshikawa H, Hirota J.**
Bacillus subtilis genome vector-based complete manipulation and reconstruction of genomic DNA for mouse transgenesis. *BMC Genomics*. 14 (1): 300. (2013)
 - **Aoki K, Shiwa Y, Takada H, Yoshikawa H, Niki H.**
Regulation of nuclear envelope dynamics via APC/C is necessary for the progression of semi-open mitosis in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Genes Cells*. 18 (9): 733-52. (2013)
 - **Sakamoto M, Tanaka N, Shiwa Y, Yoshikawa H, Ohkuma M.**
Draft Genome Sequences of *Porphyromonas crevioricanis* JCM 15906T and *Porphyromonas cansulci* JCM 13913T Isolated from a Canine Oral Cavity. *Genome Announc*. 1 (4): e00483-13. (2013)
 - **Yano K, Wada T, Suzuki S, Tagami K, Matsumoto T, Shiwa Y, Ishige T, Kawaguchi Y, Masuda K, Akanuma G, Nanamiya H, Niki H, Yoshikawa H, Kawamura F.**
Multiple rRNA operons are essential for efficient cell growth and sporulation as well as outgrowth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 159 (Pt 11): 2225-36. (2013)
 - **Shimizu-Kadota M, Kato H, Shiwa Y, Oshima K, Machii M, Araya-Kojima T, Zendo T, Hattori M, Sonomoto K, Yoshikawa H.**
Genomic features of *Lactococcus lactis* IO-1, a lactic acid bacterium that utilizes xylose and produces high levels of L-lactic acid. *Biosci Biotechnol Biochem*. 77 (9): 1804-8. (2013)
 - **Shiwa Y, Matsumoto T, Yoshikawa H.**
Identification of laboratory-specific variations of *Bacillus subtilis* strains used in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem*. 77 (10): 2073-6. (2013)
 - **Machii M, Watanabe S, Zendo T, Chibazakura T, Sonomoto K, Shimizu-Kadota M, Yoshikawa H.**
Chemically defined media and auxotrophy of the prolific l-lactic acid producer *Lactococcus lactis* IO-1. *J. Biosci. Bioeng*. 115: 481-484. (2013)
 - **Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, Iwata H.**
Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization Outcome of Bovine Oocytes. *J Reprod*

Dev. (2013) *in press*

・ **Matsubayashi H, Hanzawa K, Kono T, Ishige T, Gakuhari T, Lagan P, Sunjoto I, Sukor JRA, Sinun W, Ahmad H.**

First molecular data on Bornean banteng *Bos javanicus lowi* (Cetartiodactyla, Bovidae) from Sabah, Malaysian Borneo. *Mammalia*. (2014) *in press*

●学会、セミナー等での発表

…… 国内学会 ……

2014年3月26-29日

日本畜産学会 (つくば)

石毛太郎、平野 貴、原ひろみ、万年英之、半澤 恵
ニホンウズラ Avian β -defensin (CjAvBD) の遺伝学的解析

2014年3月18-20日

日本植物生理学会 (富山)

Yu Kanesaki, Keigo Ozawa, Marie Suzuki, Yuh Shiwa, Satoru Watanabe, Hirofumi Yoshikawa
Resequencing analyses of laboratory strains of *Synechococcus elongatus* PCC 7942.
重信直人、兼崎 友、渡辺 智、千葉櫻拓、吉川博文
単細胞紅藻 *Galdieira sulphuraria* 新規単離株における糖添加時の細胞応答の解析

2014年3月6-8日

日本ゲノム微生物学会 (東京)

中東憲治、高井 幸、志波 優、兼崎 友、吉川博文、森 浩禎、富田 勝
遺伝子レベル、コドンレベルでの翻訳効率解析
小田しおり、重信直人、兼崎 友、渡辺 智、千葉櫻拓、三角修己、黒岩常祥、吉川博文
極限環境紅藻の新規単離と重金属イオン耐性に関わる遺伝子の探索

2013年12月10日

2013年度第1回ウズラ研究会 (名古屋)

布目三夫、只野 亮、中野幹治、川原玲香、河野友宏、高橋慎司、川嶋貴治、藤原 哲、菰澤圭二郎、水谷誠、松田洋一
マイクロサテライトマーカーと mtDNA を用いたニホンウズラの遺伝的特性の解析

2013年12月3-6日

第36回分子生物学会年会 (神戸)

小林久人、柳澤永吉、坂下陽彦、菅原直子、熊倉紫織、小川英彦、阿久津英憲、秦健一郎、中林一彦、河野友宏
刷り込み遺伝子クラスター領域 GPR1-ZDBF2 における lncRNA を介したエピジェネティクス制御機構とヒト・マウスゲノム間の保存性

2013年11月15-16日

第58回日本生殖医学会 (神戸)

松井大輔、川原玲香、岸 靖典、齊藤隆和、河野友宏、齊藤英和
次世代シーケンサーを用いた卵丘細胞発現遺伝子リストの作製と抗セントロメア抗体陽性高度不妊症例の原因究明への応用

2013年10月12日

日本動物遺伝育種学会 第14回大会 (東京)

只野 亮、布目三夫、水谷 誠、川原玲香、菰澤圭二郎、藤原 哲、高橋慎司、川嶋貴治、河野友宏、松田洋一
ニホンウズラの新規マイクロサテライト DNA マーカーの開発ならびに遺伝資源の特性評価への応用

2013年9月14-15日

日本鳥学会 2013 年度大会 (名古屋)

布目三夫、只野 亮、中野幹春、川原玲香、河野友宏、藤原 哲、葦澤圭二郎、水谷 誠、松田洋一
マイクロサテライトマーカーを用いたニホンウズラの野生集団および家禽化集団における遺伝的多様性の調査

2013年9月12-14日

第 106 回日本繁殖生物学会大会 (東京)

原 聡史、川原玲香、尾畑やよい、河野友宏
マウス卵母細胞におけるゲノム刷込みの分子機構

2013年9月9-10日

日本畜産学会 117 回大会 (新潟)

川原玲香、神作宜男、河野友宏、桑山岳人
比較ゲノム解析によるニワトリの就巢行動発現制御に関わる変異の探索
只野 亮、布目三夫、水谷 誠、川原玲香、河野友宏、藤原 哲、松田洋一
実験用ウズラ 5 系統の遺伝的多様性ならびに系統相互の遺伝的分化

2013年9月7日

日本家禽学会 2013 年秋季大会 (新潟)

只野 亮、葦澤圭二郎、布目三夫、水谷 誠、川原玲香、河野友宏、藤原 哲、松田洋一
新たに開発したマイクロサテライト DNA マーカーによる野生系ウズラの遺伝的特性評価

2013年9月4-5日

NGS 現場の会 第 3 回研究会 (神戸)

川原玲香
比較ゲノム解析によるニワトリの就巢行動発現制御に関わる変異の探索

2013年9月3日

食品分析研究会 (東京)

飯島 健、バビルパチャキル、井土 岳、松原紀嘉、川原玲香、野口治子、内野昌孝、高野克己
次世代シーケンサーを用いたダイジョ (*Dioscorea alata* L.) の葉におけるフラボノイド合成系遺伝子発現量の変動解析

2013年5月30-31日

第 7 回日本エピジェネティクス研究会 (奈良)

小林久人
マウス生殖細胞における全ゲノム包括的 DNA メチローム解析 (奨励賞受賞)

2013年5月25-26日

第 54 回 日本哺乳動物卵子学会 (東京)

岸 靖典、川原玲香、松井大輔、齊藤隆和、河野友宏、齊藤英和
卵丘細胞の網羅的遺伝子発現解析による卵子卵丘細胞複合体の成熟に関与する遺伝子の同定

2013年5月24日

(株)トミーデジタルバイオロジー主催 PacBio セミナー (東京)

兼崎 友、吉川博文
微生物ゲノム解析における PacBio の使用例

…… 国際学会 ……

2013年7月24-26日

International Symposium: Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells (京都)

Kanesaki Y, Misumi O, Watanabe S, Kuroiwa T, Yoshikawa H.

Mitochondrial genome sequence of the unicellular red alga, *Cyanidium caldarium*.

2013年4月11-12日

Non-coding RNA, epigenetics and transgenerational inheritance (ケンブリッジ、イギリス)

Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T.

Amplification-free whole-genome shotgun bisulfite sequencing of mouse primordial germ cells

●マスメディア

2013年9月

見島牛のゲノム解析の研究成果が中国新聞、毎日新聞、静岡新聞、はぎ時事新聞に紹介されました。

●その他

兼崎 友 バイオメディア： 万緑藻中紅一点：紅藻の科学 *生物工学会誌* 91: 469 (2013)

兼崎 友 Opinion ~研究の現場から： 就職氷河期の進学先・キャリア選び *実験医学* 31: 468 (2013)

2014年3月6-8日

日本ゲノム微生物学会 (東京)

吉川博文 (年会長)

2013年11月22-23日

ラン藻の分子生物学会 2013 (千葉)

吉川博文 (年会長)、渡辺 智、兼崎 友 (総務)

//////// 平成 25 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧 //////////

1. 鈴木徹（岐阜大学大学院 連合農学研究科）
「アトピー性皮膚炎発症メカニズム理解を目指したヒト皮膚常在 *Staphylococcus aureus* と *Staphylococcus epidermidis* のゲノム解析」
2. 鶴間和幸（学習院大学 文学部）
「中国古代馬の系譜にかんする遺伝学的研究」
3. 佐瀬英俊（沖縄科学技術大学院大学 植物エピジェネティクスユニット）
「高等植物の遺伝子領域における高 DNA メチル化変異体の解析」
4. 豊留孝仁（帯広畜産大学 動物・食品衛生研究センター）
「日本国内由来 *Aspergillus flavus* 株のホールゲノムショットガン配列解析」
5. 赤沼元気（中央大学 理工学部 応用化学科）
「枯草菌 L1 リボソームタンパク質遺伝子破壊株のサプレッサー解析」
6. 伊藤秀臣（北海道大学大学院 理学研究院）
「高温ストレス誘導型転移因子の育種への応用」
7. 花井亮（立教大学 理学部）
「ファージ ϕ X174 による宿主 DNA 複製の阻害のメカニズム」
8. 戸崎晃明（公益財団法人競走馬理化学研究所 遺伝子分析室）
「ゲノム解析による在来馬の起源の解明に関する研究」
9. 二橋亮（独立行政法人産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門）
「トンボの体色および色覚に関わる遺伝子の網羅的比較解析」
10. 宗原弘幸（北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター）
「配偶子形成時に父親ゲノムを排除する半クローン遺伝子の探索」
11. 藤田泰太郎（福山大学 生命工学部 生物工学科）
「枯草菌の緊縮転写制御作動時のトランスクリプトームの変動の次世代シーケンサーを用いた解析」
12. 長岐清孝（岡山大学 資源植物科学研究所）
「植物動原体 DNA 配列の ChIP-Seq 解析」
13. 中東憲治（慶應義塾大学 先端生命科学研究所）
「リボソームプロファイルによる翻訳効率のゲノムワイド解析」
14. 菊池潔（東京大学大学院 農学生命科学研究科）
「近縁種群の全ゲノム配列比較による魚類有用変異の同定」
15. 広瀬侑（豊橋技術科学大学 エレクトロニクス先端融合研究所）
「シアノバクテリアの NGS データを共有するための統合プラットフォームの構築」
16. 小林和夫（奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科）
「特異な運動性を示す *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 株のゲノム配列の決定」

17. 花井泰三 (九州大学 農学研究科 生物機能制御学)
「合成代謝経路構築によるシアノバクテリアのバイオアルコール生産」
18. 武田真 (岡山大学 資源植物科学研究所)
「オオムギ種子のタンパク質含量を支配する遺伝子群の RNA-seq 解析」
19. 川原学 (北海道大学大学院 農学研究院)
「着床前期発生におけるウシ胚の遺伝子発現動態について」
20. 田村文男 (鳥取大学 農学部 生物資源環境学科生物資源科学 園芸学研究室)
「次世代シーケンサーを利用したナシの芽の自発休眠導入関連遺伝子の解析」
21. 多田雄一 (東京工科大学 応用生物学部)
「ソナレシバの耐塩性機構の解明のためのゲノムとトランスクリプトームの解析」
22. 二橋美瑞子 (独立行政法人農業生物資源研究所 遺伝子組換えカイコ研究開発ユニット)
「カイコの卵色変異体の解析による昆虫のオモクローム色素合成の新規経路の解明」
23. 川口眞理 (上智大学 理工学部 物質生命理工学科)
「タツノオトシゴの育児嚢で発現している遺伝子の網羅的解析」
24. 高田達之 (立命館大学 薬学部)
「琵琶湖固有種ホンモロコシ生殖巣のトランスクリプトーム解析」
25. 霜田政美 (独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域 昆虫相互作用研究ユニット)
「天敵昆虫の優良行動形質を支配する遺伝子の探索と RNAi 育種技術の開発」
26. 古田芳一 (東京大学 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 バイオ医療知財分野)
「ピロリ菌ゲノムの家族内比較による近縁株の感染・進化経路の解明」
27. 木村澄 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所 みつばち研究ユニット)
「日本在来種ニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) の全ゲノム解読」
28. 内海龍太郎 (近畿大学 農学部)
「イネ苗立枯細菌病菌におけるトロポロン生産制御機構」
29. 内海龍太郎 (近畿大学 農学部)
「コネクター分子 SafA による細菌情報伝達ネットワークの制御機構」
30. 市村和也 (香川大学 農学部)
「構成的な防御反応を示す mekk1 変異体のサプレッサー遺伝子の同定」
31. 西堀正英 (広島大学大学院 生物圏科学研究科)
「ニワトリの有用経済形質を支配する遺伝子探索に関する分子遺伝学的研究」
32. 武島弘彦 (東京大学 農学生命科学研究科)
「次世代シーケンシングによる魚類の集団ミトコンドリアゲノミクスへのアプローチ」
33. 松下一信 (山口大学 農学部)
「酢酸菌の酢酸発酵能に影響を及ぼす酢酸菌の易変異性に基づく適応変異と遺伝子発現との相関」

34. 板谷光泰 (慶應義塾大学 先端生命科学研究所 ゲノムデザイン学 G)
「枯草菌ゲノム大規模改変変異体の解析」
35. 鈴木義人 (茨城大学 農学部)
「昆虫により形成されるゴールの形成機構の解明」
36. 山川武夫 (九州大学大学院 農学研究院)
「*Bradyrhizobium japonicum* Is-34 のゲノム解析」
37. 橋本周 (医療法人三慧会 IVF なんばクリニック研究部門)
「サイクリック AMP 依存性タンパク質キナーゼを活性化することにより発育能が向上した哺乳類卵母細胞の遺伝子発現様式の解明」
38. 西條雄介 (奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)
「パターン受容体による植物の免疫およびストレス応答」
39. 古田芳一 (東京大学 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 バイオ医療知財分野)
「多数のピロリ菌日本株ゲノム解読による細菌病原性の進化の解明」
40. 吹谷智 (北海道大学大学院 農学研究院 微生物生理学研究室)
「ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* 105-A 株の完全ゲノム決定」

//////////////// 研究紹介～採択課題より～ //////////////////

■ 高等植物の遺伝子領域における高 DNA メチル化変異体の解析 ■

〈研究概要〉

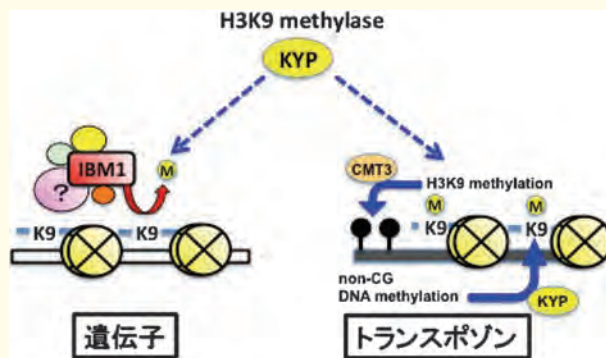
真核生物ゲノムではその大部分をトランスポゾンなどのリピート配列が占めているが、これらの配列はヘテロクロマチンと呼ばれる高度に凝集した構造をとって不活化されている。これまでの研究により、このヘテロクロマチン形成には DNA シトシン塩基のメチル化やヒストン H3Lys9 メチル化 (H3K9me)、小分子 RNA などのエピジェネティックな制御が関与していることが明らかになっている。このリピート配列のヘテロクロマチン化による抑制は、トランスポゾンの活性化による遺伝子の破壊などを防ぎゲノム構造を安定化させるために重要な働きをしていると考えられている。これまでの先行する研究によってリピート配列のヘテロクロマチン修飾の確立、維持には DNA メチル化酵素やヒストンメチル化酵素、RNAi 因子などが関与していることが明らかにされてきたが、その一方で遺伝子領域から DNA メチル化を積極的に排除する分子メカニズムについてはほとんど理解がすすんでいない。

我々はモデル植物シロイヌナズナにおいて遺伝子領域に異所的な高 DNA メチル化を引き起こす変異体を EMS 変異によって誘導し、独自に設計したスクリーニングを行った。これまでに複数の高 DNA メチル化変異体が得られており、そのうちの 2 つの原因遺伝子 *IBM1*、*IBM2* を同定している (Saze et al., 2008, 2013)。*IBM1* は H3K9 脱メチル化酵素をコードした遺伝子であり、この酵素の働きによって遺伝子領域から抑制的なエピジェネティック修飾が積極的に除去される機構の存在を明らかにしている (図 1)。この *ibm1*、*2* 以外にも同様の高 DNA メチル化と発生異常を示す未解析の変異株 *ibm3*、*ibm4* があり、本共同研究ではこれら変異体の DNA メチル化パターンをゲノムワイドに解析することで遺伝子領域がどのように DNA メチル化によるサイレンシングから防御されているのかの基本メカニズムが理解されると期待する。また、これにより

外来遺伝子のサイレンシングの回避や遺伝子発現の安定化の理解など農学への応用にも寄与すると信じる。

Saze H, Kitayama J, Takashima K, Miura S, Harukawa Y, Ito T, Kakutani T. (2013) Mechanism for full-length RNA processing of Arabidopsis genes containing intragenic heterochromatin. *Nat Commun*, 4: 2301.

Saze, H, Shiraishi, A., Miura, A., and Kakutani, T. (2008) Control of genic DNA methylation by a jmjC-domain containing protein in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 319 (5862): 462-465.

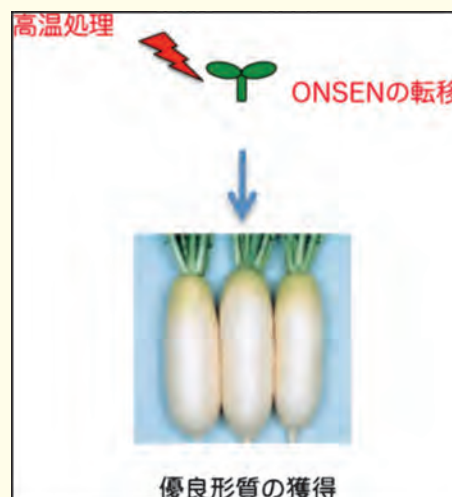


〈図 1〉 ヒストン H3K9 脱メチル化酵素 *IBM1* の遺伝子領域特異的な機能。不活性化エピジェネティック修飾 H3K9me は遺伝子、トランスポゾンともに起こるが、遺伝子領域では *IBM1* の働きにより除去される。

佐瀬英俊 (沖縄科学技術大学院大学)
小林久人 (東京農業大学生物資源ゲノム解析センター)

■ 高温ストレス誘導型転移因子の育種への応用 ■

本研究は、先行研究で見つかった、高温ストレスで活性化するトランスポゾン *ONSEN* を利用することで、ダイコンの品種改良に役立てようとするものである。*ONSEN* は選り好んで遺伝子内に飛び込むことから、転移先の遺伝子の発現に影響が出る可能性が高い。本研究の目的は、*ONSEN* を用いて植物ゲノムの遺伝的な変化を誘導し、育種上重要な作物のゲノム改変を行うことである。育種上重要な作物であるダイコンにおいて、転移によるゲノム構造の変化を次世代シーケンサーを用いることで解析する。その結果から、トランスポゾンの転移先の特異性について解析する。*ONSEN* は人工的に活性化をコントロールすることができる。さらに、このトランスポゾンは育種上重要なアブラナ科植物に広く保存されている。このトランスポゾンを利用することで、育種上重要な作物のゲノム改変を誘導することで *ONSEN* の新たな挿入による新規有用植物の育成を行う。シロイヌナズナにおけるトランスポゾンの転移が宿主のゲノムへ与えるインパクトを明らかにするため、まずトラ



ンスポゾンの転移先を決定する必要がある。本研究では、高温処理後シロイヌナズナの次世代集団の DNA をシーケンスし、無処理のリファレンスシーケンスと比較することで転移先を同定する。転移先を同定するためには Hiseq でゲノムを 20x でシーケンスする。次に、育種上重要なアブラナ科植物において同様に高温処理した個体から次世代集団を作成する。対象となる植物は、ゲノム情報が公開されていないダイコンを予定している。

ダイコンゲノムは Hiseq を用いてシーケンスする。解析データをもとに *ONSEN* の座乗位置を特定し転移能力のあるコピー

について実際に転移先を解析する。*ONSEN* は遺伝子近傍に有る可能性が高いので *ONSEN* の LTR を基準にその外の配列を BLAST でハクサイやシロイヌナズナと対照し、保存された領域からダイコンゲノムでの領域を推測する。転移先を同定するため Hiseq でゲノムを 20x でシーケンスする。

伊藤 秀臣 (北海道大学大学院)
高木 宏樹 (岩手生物工学研究センター)
小林 久人 (東京農業大学生物資源ゲノム解析センター)

■ 植物動原体 DNA 配列の ChIP-Seq 解析 ■

動原体は細胞分裂時に染色分体を娘細胞に均等に分配するための必須の機能をもった構造体であり、特異的なタンパク質と DNA で構成されている。ヒトでは動原体 DNA 配列を利用して人工染色体 (染色体ベクター) が構築され、その医療への応用が期待されている。それに対して、植物の人工染色体開発は黎明期にあり、最近我々が既存の染色体の分配機能に必要な領域のみを残し小型化した「Top-down 型の人工染色体」をシロイヌナズナで作出したが、DNA 断片を組み合わせる「Bottom-up 型の人工染色体」はまだ構築されていない。Bottom-up 型の人工染色体の作出には動原体 DNA 配列が必須であるが、動原体 DNA 配列の保存性は低く種特異的である。そのため、個々の生物種で機能する人工染色体を作成するためには、その生物種の動原体 DNA 配列を明らかにする必要がある。

これまで、我々は様々な植物の動原体構成要素を解析してきた。それらの研究の中で、動原体構成タンパク質の 1 つである動原体特異的ヒストン H3 (CENH3) を用いた ChIP (クロマ

チン免疫沈降) により、このタンパク質と共在する動原体 DNA 配列を単離してきた。これまでの研究では、ChIP で精製した DNA をクローン化し、その一部を解析していたため、得られる情報量は少なく、精製された DNA の全体像をつかむことが難しかった。

そこで、本研究では次世代シーケンサーを利用し ChIP により単離された DNA プールを網羅的に解析し、インプット DNA プールと比較することにより、動原体 DNA 配列の高速かつ網羅的な解析を試みている。この方法は、通常の ChIP-seq の様にリファレンスゲノムを必要としないので、ゲノム配列が未解読な種に対しても利用することが可能である。また、ゲノム全体をカバーする必要が無いのでシーケンスのリード数も削減できる。これらの特長を活かして、現在 5 種の動原体配列を同時並行して解析している。

本研究により、これらの種の動原体 DNA 配列が明らかになれば、明らかになった DNA 配列を用いて種特異的人工染色体を作成することが可能となる。作出した人工染色体は、品種改良のための染色体ベクターとして利用可能である。

長岐清孝 (岡山大学資源植物科学研究所)
小林久人 (東京農業大学生物資源ゲノム解析センター)

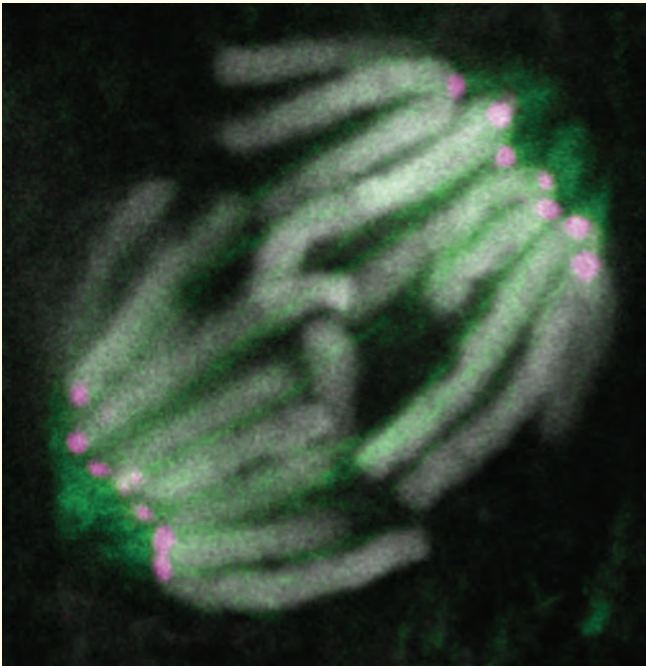


図1 タマネギ体細胞分裂中期染色体の免疫染色
染色体 DNA:白、動原体特異的ヒストン H3 (AceCENH3):
マゼンダ、チューブリン (紡錘糸):緑
(Nagaki et. al. 2012 PLoS One より)

■ 近縁種群の全ゲノム配列比較による魚類有用変異の同定 ■

北欧で養殖されたサケが様々な国の食卓を賑わせていることが象徴的ですが、魚類養殖は世界で最も急速に成長している産業分野のひとつで、今後もさらなる発展が期待されています。そのためには養殖に適した品種の開発が鍵となります。しかし、海産魚を用いて家畜や栽培植物に見られるような家畜化・品種化に成功した例はさほど多くありません。一方で海産魚には、遺伝的多様性に富んだ野生集団や多くの近縁種が自然界に豊富に存在するという特徴があり、これを積極的に利用する方法論の開発が求められています。例えば、養殖対象魚の近縁種が有用形質（耐病性が高いなど）を持つ場合、交雑により新たな品種ができる可能性があります。ただし、単に交雑するだけでは近縁種の好ましくない形質も混ざってしまいます。しかし、有用形質の好原因遺伝子が同定できていれば、この好ましい形質だけを養殖魚に持たせるような品種づくりが可能となります。これまで、この原因遺伝子の同定というステップが大きな制限要因でした。原因遺伝子が同定できるのは、マウスなどの実験モデル生物やブタといった高度に品種化が進められた生物だけだったのです。ところが、ゲノム解析技術の驚異的な進展により、海産魚などの品種化が進んでいない野生生物でも有用形質の原因遺伝子が解明できる可能性が高まっています。

本研究ではトラフグの近縁種たちの全ゲノム配列を用いた解析によって、海面養殖の高度管理化に有用な変異の同定を目指します。今回は、海産魚の淡水飼育を可能にする変異に着目しました。トラフグは我が国における代表的な海面養殖魚のひとつですが（生産額で第三位）、全ゲノム解析が進んでいるという特徴を持つ数少ない食用魚です（図1）。

このトラフグには交雑が可能な約20の近縁種が存在します（図2）。そのほとんどは海でしか生きられませんが、2種だけは淡水への進出に成功して河でも海でも生息が可能です。淡水に適応できる力は、2種のゲノムに変異が生じたことから生まれたはずですが。この変異を、近縁種群の全ゲノム配列を比較することにより同定します。ただし、工夫もなく比較しただけでは同定できるはずはありません。種間には莫大な量のDNA配列の違いが認められるからです。しかし、これらDNA配列の差をすべてリストアップすることは研究の重要なスタートポイントになります。この解析に加えて、種間交雑を利用した遺伝マッピング（図3）、種間と種内の多様性解析といった様々なアプローチを組み合わせ、海産魚の淡水飼育を可能にする変異

の同定をおこないます。この研究が持つ意義は、淡水適応遺伝子の原因変異解明だけには限られません。将来の水産遺伝育種研究において常法となる可能性を持つ戦略、すなわち「複数個体の全ゲノム配列比較による有用変異の同定」を確立することになります。つまり、同じ手順を用いて、様々な有用形質原因変異が多くの魚類で同定されることになると考えられます。

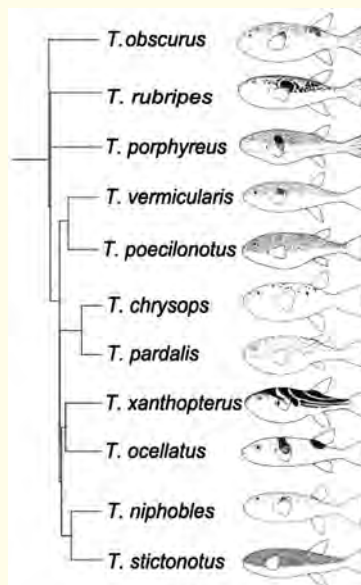


図2 トラフグには、遺伝的にごく近縁な多くの仲間が存在する（Yamanoue et al. 2009 MBE を改変して引用）

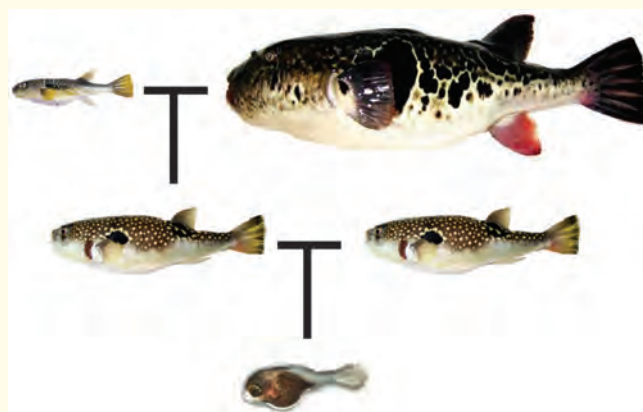


図3 トラフグ属魚類は種間交配が可能なので、遺伝マッピング法が適用できる



図1 トラフグ

菊池 潔（東京大学水産実験所）
 細谷 将（東京大学水産実験所）
 小林久人（東京農業大学生物資源ゲノム解析センター）

■ オオムギ有用遺伝子の特定と機能の解析 ■

オオムギはトウモロコシ、イネ、コムギの三大作物に次いで生産量が世界第4位の禾穀類です。約1万年前に近東地域で野生オオムギから栽培化され、東西に分布域を広げ、日本へは約2000年前の弥生時代に中国や朝鮮半島経由で伝わりました。オオムギの用途は飼料、醸造原料さらに食用と幅広く、用途により求められる特性が異なります。初夏にオオムギの穂が風になびく光景は爽やかです（図1）。

筆者の所属する岡山大学資源植物科学研究所は1914年に民間の研究機関として発足し、いくつかの曲折を経て、本年創立100周年を迎えます。設立当初からオオムギの在来系統を世界中から収集し、五千余点を維持しています。東アジアの材料が充実しているのが特徴です。このような独自の研究材料を基にオオムギ重要遺伝子の分子遺伝学的研究を行っています。現在のテーマとして、オオムギの穂の先端の針状の突起である芒（ぼう）の形状を決める遺伝子、種子のポリフェノール色素の合成酵素・制御因子遺伝子、土壌伝染性のウイルス病である縞萎縮病抵抗性遺伝子、さらに種子のタンパク質含量を支配する遺伝子について幅広く研究しています。以下に、これまでに完了している2つの研究題目について簡単に紹介させていただきます。



図1 成熟中のオオムギ（二条）

【オオムギ種子は殻と種子が接着する皮性が特徴】

オオムギは脱穀しても種子と殻が分離できず、種子が皮で被われた“皮麦”（図2左）が大多数です。他のイネ科作物はどれも種子がきれいに脱穀できるのと対照的です。皮麦はビール醸造に好適です。オオムギ種子の皮は脱穀時の胚への衝撃を防ぎ麦芽製造時の発芽率を高く保持する役目があります。それに加え、穀皮は麦汁のエキスを濾過する際の天然のフィルターとなるため、醸造に欠かせません。しかし、皮麦は食用には不適で、皮をローラーで削り取る手間がかかります。ところが、1遺伝子の突然変異で皮がきれいにむける“はだか麦”（図2）が約8000年前に自然に生じました。これを見つけた太古の農民の観察眼はすばらしい限りです。私たちは8年がかりで、この遺伝子をマップベースクローニングにより世界で初めて特定しました。オオムギのゲノムサイズはイネの約12倍の50億塩基対と巨大で、反復配列がゲノムの80%以上を占め、ゲノムシーケンスも解読されていないため研究は長い年月を要しました。原因遺伝子が脂質の合成を制御する ethylene response factor (ERF) 転写因子と判明したことから、殻と種子の接着物質は脂質であると考えられます。

【オオムギは水溶性食物繊維（β-グルカン）が豊富で健康食品】

オオムギは水溶性食物繊維の（1：3；1：4）-β-D-グルカン

（以下、β-グルカンと省略します。）を多く含み、血中コレステロールを下げ心臓病を予防するなどの機能性があることから健康食品として注目されています。私たちは、β-グルカンを全く合成出来ないβ-グルカンレス突然変異体を発見し、その原因がセルロース合成酵素様遺伝子F6の異常であることを突き止めました（図3）。β-グルカンレス変異体で醸造するとビールの粘度が低下し濾過が早く進行するため工場稼働率が向上し有益と思われます。一方で、この遺伝子を高発現させることで機能性成分であるβ-グルカン含量がさらに高い食用品種の開発を目指して研究を続けています。

【ゲノム解析新技術のオオムギ遺伝子研究に及ぼすインパクト】

2011年には日本の研究グループからオオムギの約2万5千個の完全長cDNAの配列が、2012年にはドイツを中心とする研究グループからオオムギのゲノム配列情報が発表されました。しかし、ドラフトシーケンスと呼ぶにはほど遠く、オオムギゲノム解読は海外主導で継続中です。イネのように立派な配列解読がオオムギで可能か疑問視されています。このような現状の中、オオムギの農業的に重要遺伝子を単離・同定し、機能を解明する国際競争は激化しています。

今回東京農業大学生物資源ゲノム解析センター「生物資源ゲノム解析拠点」から私たちの課題「オオムギ種子タンパク質含有率を支配する遺伝子群の解析」を採択頂き、次世代シーケンサーを利用して迅速な遺伝情報解析の支援を頂けることはありがたいことです。種子のタンパク質含量は食用には高い方が栄養学的には好ましいのです。しかし、ビール醸造用には高タンパク質オオムギは濁ったビールになるのでビール会社に買い上げてもらえません。高品質が要求されるビール麦は検査基準が厳しく、農産物ではなく工業原料として扱われます。そのため、オオムギ穀粒のタンパク質含量をビール醸造用に適正な範囲に育種的に制御することは重要な研究課題です。次世代シーケンサーを用いた新しいゲノム解析技術で遺伝実験に好適な材料を解析すれば、タンパク質含量のような複雑形質であっても制御に関わる遺伝子群を特定し、それらの相互作用も解明出来ると期待されます。二倍体のオオムギを突破口として、六倍体のパンコムギへ研究を展開することも目指しています。



図2 オオムギ種子。
左：皮麦、右：はだか麦

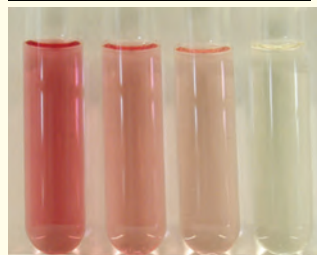


図3 オオムギ種子中のβ-グルカン含量の比色測定。右端はβ-グルカンレス突然変異体

武田 真（岡山大学資源植物科学研究所）
氷見英子（岡山大学資源植物科学研究所）

■ ウシ着床前期胚のトランスクリプトーム解析 ■

個体発生の過程で個々の細胞は特定の機能と構造をもつように分化していきますが、最初に細胞分化が明確になるのは胚盤胞期というステージです。この時期には、特徴的に胚は内部に空胞を生じ、また、空胞内部に偏った細胞塊が観察されるようになります。この偏った細胞塊は内部細胞塊 (Inner Cell Mass; ICM)、残りの外周を覆う細胞集団は栄養外胚葉 (Trophectoderm; TE) と呼ばれています。ICM は主に胎子成分を組織し、TE は胎盤を中心とした胎子以外の成分を構築していきます。したがって、胚盤胞期胚の時点で決まった ICM/TE 二極化が後の個体発生における細胞分化の最初の岐路といえます。

哺乳類胚における細胞の二極化は全哺乳類共通の現象であるにも関わらず、その発生過程に関わる遺伝子は種を超えて普遍的なものではないということが最近の研究で徐々に明らかとなってきました。例えば、マウス胚における *Oct4* と *Cdx2* の 2 種類の遺伝子が中心となった ICM/TE 分化調節機構は種を超えて保存された仕組みであると考えられてきましたが、ウシ胚では OCT4 タンパク質は ICM および TE の区別なく発現しており、マウスにおいて CDX2 が結合する *Oct4* の遠位エンハンサー領域はウシにおいては存在せず、*OCT4-CDX2* 転写制御の分子機構がマウスと異なっていることが明らかとされました。さらに北海道大学 / 家畜改良増殖学研究室と東京農業大学 / 動物発生工学研究室との共同研究によって、ウシ胚盤胞期胚を ICM と TE 成分に完全に分離した状態でマイクロアレイによる遺伝子発現解析が実施され、ウシ胚固有の部位特異的発現遺伝子が

21 個同定されマウス胚とウシ胚における転写レベルでの相違が証明されています。

このように近年の研究の発展によって、細胞分化に伴うウシ胚固有の遺伝子転写調節機構を解明する素地となる報告が増えてきておりますが、ウシ胚を特徴付ける決定的な発生ステージである伸長期における知見が欠けているのが現状です。ウシを含む反芻類やブタでは、マウスやヒトの初期胚とは異なり透明帯からの胚の脱出の直後に子宮に着床するのではなく、一定の長さに胚が伸長してから着床します。したがって、ウシは着床する胚のステージがマウスやヒトと比べて非常に遅い動物種であるといえます。このように決定的に形態の異なるステージを経て着床する動物種では特有の遺伝子発現調節機構が存在することが想像されますが実態はよくわかっておりません。なぜならば、体外で胚盤胞期胚を伸長期胚まで培養することができずに十分な解析ができなかったからです。しかし、近年の分子生物学の進展によって少ないサンプルからでも正確な遺伝子発現プロフィールを調べることができるようになりました。我々のグループでは、生体雌ウシから灌流操作により伸長期胚を採取して胚盤胞期胚との遺伝子発現動態を明らかにすべく次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を実施しております。本研究によりウシ伸長期胚特有の転写産物が明らかになれば、マウス / ヒト型の即時着床型動物とは性格を異にするウシ胚の特性が明確になり、近年問題になっているウシにおける受胎率低下の原因解明の一助になるものと期待されます。

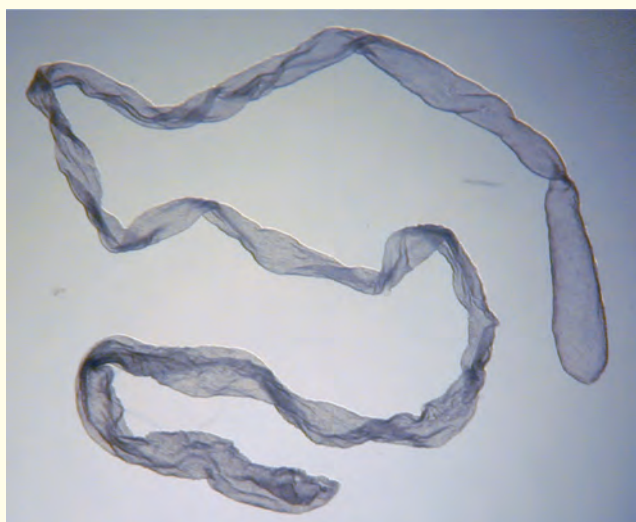


図1 妊娠 18 日目のウシ伸長期胚

川原 学 (北海道大学農学部)
 定郁里 (北海道大学農学部)
 永野昌志 (北海道大学獣医学部)
 柳川洋二郎 (北海道大学獣医学部)
 小林久人 (東京農業大学生物資源ゲノム解析センター)
 河野友宏 (東京農業大学応用生物科学部)

■ 次世代シーケンサーを利用したナシの自発休眠関連遺伝子の解析 ■

ナシをはじめとする落葉果樹の芽は秋季から自発休眠に入り、冬季に一定量の低温量を遭遇させることで自発休眠から覚醒し、翌春に萌芽することが可能となる。しかしながら、近年の暖冬の影響で自発休眠覚醒に必要な低温積算量が不足し、世界各地の中低緯度地域並びに日本の九州でも、ニホンナシの春の開花遅延や発芽不良が問題視されている。これまでの研究では、自発休眠覚醒に必要な低温要求量が樹種あるいは品種によって異なることが明らかになっているが、自発休眠導入および覚醒のメカニズムについては不明な点が多く、自発休眠機構の解明と低温要求量の少ない品種の育成が急務とされている。

我々は、少低温要求性ニホンナシ品種の育成を目的とし、自家不和合性遺伝子である S_4^{um} 遺伝子をホモで持つニホンナシ系統 TH3 と低温要求量が著しく少ない台湾在来ナシ横山の交配により得られた F_1 個体群の育成と休眠特性の解析を行っている。これまでの解析結果からは、低温要求量を決定する遺伝的要因として量的形質遺伝子の関与が示されており、 F_1 個体群の中からは少低温要求性ニホンナシ品種を育成するための中間母本も選抜されている。さらに、 F_1 個体の自植により得られた F_2 個体群についても休眠特性の調査を行っており、 F_2 個体群のうちの約 1/4 個体群が自発休眠に導入しない非導入性個体であり、全 F_1 個体が導入性個体であったことから、台湾在来ナシ横山が自発休眠に導入しないナシ属であるという可能性も示されている。

これらの結果をもとに、本プロジェクトでは、台湾在来ナシ横山とニホンナシ系統 TH3 並びにそれらの F_1 個体の芽で発現している遺伝子を RNA-seq 法にて解析し、発現量に差が出る遺伝子の中から低温要求量を決定する量的形質遺伝子を同定したいと考えている。さらに、 F_2 個体群の自発休眠導入性および非導入性個体のゲノム配列を次世代シーケンサーにより解析し、両個体群の塩基配列の比較から、自発休眠導入に関与する遺伝子の解析も行っていきたいと考えている。

ナシでのこのような自発休眠関連遺伝子の解析が進むことにより、他の落葉果樹での育種や施設栽培への応用、亜熱帯地域

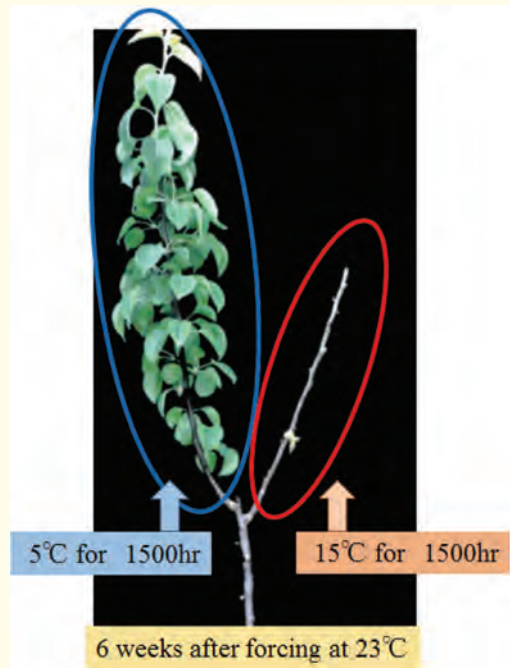


図. 低温積算量の違いによる二十世紀ナシの生育への影響。

での栽培が可能になるなど多くの成果が期待される。また、自家不和合性の落葉果樹では、 F_1 個体の自植によって F_2 個体を得ることが難しいため、次世代シーケンサーを用いてのこのような研究は行われておらず、今後の果樹のゲノム解析の新しい手法の一つとしても確立できると期待される。

田村文男 (鳥取大学農学部)
竹村圭弘 (鳥取大学農学部)

■ 昆虫の色素合成経路の解析と遺伝子組換えマーカーへの応用 ■

昆虫の色や模様は、生態学的に重要な形質であることから、古くからキイロショウジョウバエを中心に、その形成に関わる遺伝子の解析が進められてきました。近年はチョウなどでも研究が盛んになってきましたが、色や模様の形成に関わる分子機構に関しては、既知のキイロショウジョウバエの知見が当てはまらない例も多く存在します。また、そもそもショウジョウバエには存在しない色素が使用されている例も多く見られます。

カイコは、様々な卵色、体色、眼色変異体が存在することに加えて、ゲノム情報が整備され、遺伝子組換えや遺伝子ノックアウトなどの技術が確立していることから、色素合成経路を研究する上で良い材料と考えられます。さらに、カイコでは遺伝子組み換え技術を用いて医療などに役立つ有用物質生産に向けた研究も進められていますが、従来はカイコの眼で GFP などの蛍光タンパク質を光らせて遺伝子組換え体を判別していたため、大規模スクリーニングの際には肉眼で容易に判別できる組換えマーカーの開発が切望されており、この点からも色素合成経路の研究が非常に重要視されてきました。

カイコ赤卵変異体の原因遺伝子の同定

オモクローム系色素は、ほとんどの昆虫の赤色、茶色、紫色の体色に関わっており、擬態や婚姻色、さらには眼の遮蔽色素など多彩な生物機能に関与しています。カイコの黒っぽい複眼と紫色の卵の色もオモクローム系色素によるものです (図 1)。

オモクローム系色素の合成や輸送に関わる遺伝子は、主にショウジョウバエの複眼の色の変異体を用いて研究が進められてきましたが、ショウジョウバエでは他の昆虫よりも複眼のオモクローム系色素が単純な構成となっているため、特に合成経路の後半に関わる遺伝子は未解明な点が多く残されていました。

カイコには、卵と複眼の色が赤い「赤卵 (*red egg, re*)」という変異体が存在します (図 1)。私たちは、ポジショナルクローニングにより、赤卵の原因遺伝子を調べたところ、Major Facilitator Superfamily に属する新規のトランスポーター遺伝子 (*Bm-re*) に転移因子が挿入して膜貫通ドメインが破壊されていることが赤卵変異体の原因であることを発見しました (Osanai-Futahashi et al., *Journal of Biological Chemistry*, 2012)。



図1 野生型(上)と赤卵変異体(下)のカイコ

野生型のカイコの卵において、この遺伝子の機能を RNAi で抑制すると、赤卵と同じ卵の色が再現されました。興味深いことに、*Bm-re* 遺伝子は赤い複眼を持つキロショウジョウバエのゲノムには存在していませんでしたが、黒っぽい複眼を持つショウジョウバエ以外のほとんどの昆虫に存在することも分かりました。甲虫目のモデル昆虫であるコクヌストモドキでも、この遺伝子の抑制により眼色が薄くなったことから、*Bm-re* 遺伝子のホモログがカイコ以外の昆虫でも眼の色(色素)の違いに関与することが示唆されました。

その後、*Bm-re* 遺伝子が実際に卵色マーカーとして利用可能であることも確認しました。さらに、カイコでは、他にも多くの卵色変異体が存在するため、その解析により、オモクローム色素の合成に関して新しい知見が得られると考えています。

昆虫の体色を変える優性マーカー

赤卵は、卵の色が野生型と明確に違い、非常に分かりやすい形質ですが、赤卵遺伝子を遺伝子組換えマーカーとして使う場合、赤卵システムを使う必要があります。遺伝子機能解析や、有用物質生産においては、どんな系統でも利用可能な優性マーカーの方が望ましいと考えられます。

孵化したばかりのカイコの1齢幼虫は黒っぽい色をしています。昆虫の体表の黒い色は、ドーパミンメラニンが主要な色素であると考えられています。もし、何らかの遺伝子を強く働かせることでドーパミンメラニンの合成を操作できれば、カイコを含む幅広い昆虫に適用可能な優性形質を持つマーカーとして利用できる可能性があります。

ドーパミンは、黒いドーパミンメラニン以外にも、透明なクチクラ層(上皮の外側の膜)の合成に必要な物質である NADA (N-acetyl-dopamine) の合成にも使われることから、NADA の合成を強化することにより、ドーパミンメラニンの合成が阻害されることが予想されました。そこで、カイコの幼虫で NADA の合成に関わる酵素遺伝子 (*Bm-aaNAT*) の強制発現を試みました。

Bm-aaNAT 遺伝子をカイコの全身で強く働かせたところ、得られた全ての個体で1齢幼虫の体色が、通常の黒色から明るい褐色へと変化しました(図2, Osanai-Futahashi *et al.*, *Nature Communications*, 2012)。体色の変化は、全ての齢の幼虫や成虫の触角でも確認されました。

ドーパミンは神経伝達物質としても利用されますが、*Bm-aaNAT* 遺伝子を強く働かせたカイコは、心配された摂食や交尾などの行動に異常は見られず、生存率、成長スピードや産卵数



図2 *Bm-aaNAT* 遺伝子を強制発現させたカイコ1齢幼虫(白い矢頭)

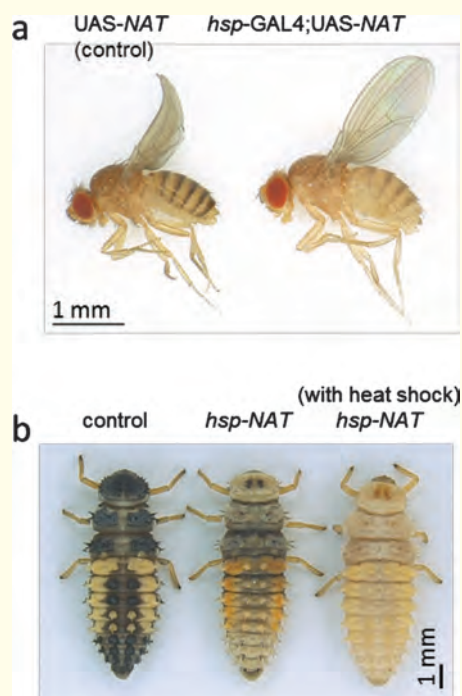


図3 キロショウジョウバエ成虫(a)とテントウムシ幼虫(b)における *Bm-aaNAT* 遺伝子の強制発現の影響

も通常の個体とほとんど変わりませんでした。これらの結果を踏まえて、*Bm-aaNAT* 遺伝子を、実際にカイコの遺伝子組換え個体を判別するマーカーとして、利用を始めているところです。

さらに、名古屋大学の新美輝幸先生のグループとの共同研究で、キロショウジョウバエの成虫と、ナミテントウの幼虫においても、カイコの *Bm-aaNAT* 遺伝子を強く働かせることで、黒い体色を薄くできることが分かりました(図3)。

カイコ以外の昆虫では、より効果的なプロモーターの検討が必要ですが、*Bm-aaNAT* 遺伝子は、幅広い昆虫において、遺伝子組換えマーカーとしての応用が期待できると考えています。

二橋美瑞子(農業生物資源研究所 日本学術振興会特別研究員 PD)

