

NGSの普及とさらなる挑戦

NGRC



Tokyo University of Agriculture

ニュース

No. 8

CONTENTS

プロジェクト最終年度に向けて	3
生物資源ゲノム解析センターの運用実績	4
2016 年度セミナー	5
平成 28 年度 学内公募一覧	7
学内公募事業とその成果	12
培養皿で分化させた卵からマウス誕生	12
Sry 欠損性転換雌マウスにおける XY ^{Sry} 卵母細胞形成の分子基盤	14
小規模およびシングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス解析による ゲノム散在性反復配列の DNA メチル化測定	16
次世代シーケンサーを用いた味蕾オルガノイドの性質決定	18
NAK/Nokh ラットの無眼球症の発症原因の解明	20
ヒト染色体複製開始領域におけるサイクリン A と複製開始因子との相互作用解析	22
老化がウシの妊孕性に与える影響とその制御に関する研究	24
牛の分娩時胎盤節における炎症誘導機構の解明と胎盤成熟誘導型分娩誘起技術開発	25
アジアに生息するカワウソ亜科 (Lutrinae) のマイクロサテライトマーカー開発	26
エミュールにおける新規遺伝マーカーの開発と、それを用いた家畜育種学的研究	28
RNA-seq により発現を確認したニホンウズラ MHC クラス I α (<i>Coja-IA</i>) 遺伝子座の 多様性解析	30
環境 DNA 解析による塩場およびヌタ場利用野生動物の網羅的モニタリング	32
食性の異なるテントウムシの比較トランスクリプトーム解析	33
ニホンウズラの腸内細菌叢と免疫応答との相互作用	34
生理活性化化合物フラボノイドをリード化合物とした食品成分による 網羅的遺伝子発現解析法の確立	36
オオムギにおける耐病性二次代謝化合物の新規生合成経路の解明	37
ジネンジョ (<i>Dioscorea japonica</i>) の品種識別に利用できる SSR マーカーの開発	38
そうか病罹病ジャガイモ塊茎における発現遺伝子のトランスクリプトーム解析	40
トマト第 1 染色体上の開花時期と側枝発達を制御する遺伝子の探索	42
鉄欠乏時にキュウリ (<i>Cucumis sativus</i>) で生成される新規ビタミン B2 誘導体 (4'-ketoriboflavin) の生成機構の解析	44
単子葉植物イネにおける新規アブシジン酸シグナル伝達機構の探索	46
イネのフラボノイド型ファイトアレキシン生産制御機構の解明	48
ナチュラルバリエーションを利用した植物の環境ストレス耐性の解明	50
<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>rapa</i> cv. 77B の核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子の同定	52
<i>Brassica juncea</i> 在来品種の系統解析と亜種識別マーカーの開発	54
清酒酵母における有機酸生成低減変異株の網羅的遺伝子発現解析	56
酢酸菌における活性酸素種の発生および応答生理	58
ビタミン B ₁₂ 欠乏による <i>Lactobacillus delbrueckii</i> の挙動	60
単細胞性真核紅藻における複製開始点の同定	62
突然変異の入り方の分布はべき乗則で近似できる	64
経腸栄養剤による栄養管理を併用した骨髄(造血幹細胞)移植患者における腸内細菌叢の解析	66
牛白血病ウイルス (BLV) 感染および牛白血病発症における遺伝子異常の検出	68
研究発表実績	69

◆プロジェクト最終年度に向けて

文科省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業として平成 25 年度より推進をしてきました「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」も平成 29 年度で最終年度を迎えることとなります。これまでの間、いわゆる次世代型シーケンサー（NGS）を取り巻く環境は常に進歩を続けており、生命科学領域の研究においては、この装置を利用した解析があたり前ようになってきています。また、今まで DNA を利用することが必ずしも簡単ではなかった生態、環境、考古学といった分野にまでその利用は広がり、新たな研究の可能性を広げています。そのような状況と連動し、本学における利用も年々増え、今までにオホーツク、厚木、世田谷の 3 キャンパスから 14 学科の先生方の研究に取り入れて頂いてきました。その成果も論文として順次発表されています。

NGS の利用では、シーケンス後のデータ解析が大きなハードルになっています。そこで、本ゲノム解析センターでは、そのハードルをできるだけ下げるための解析システムを導入し、学内での利用講習会も開催しています。また、より高度な解析が必要な場合には、専門のスタッフによる解析サポートを行ってきています。このように、シーケンサーの稼働だけではなく、データ解析までを支援できる組織は、国内の農学分野においては本学のみと言えるでしょう。さらに、昨年 8 月には、国立遺伝学研究所と本学が包括連携協定を締結しました。これは、特に遺伝情報解析の分野での協力を目指すものです。データ取得やデータ解析において、困難な問題の解決に大いに寄与できると期待しています。

最近では、パーソナルユースなシーケンサーの登場や専門業者によるシーケンスも拡大しつつあるなかで、今後もデータ解析にどのように取り組んで行くかという問題が残っていく可能性が大きいと考えられます。そのため、支援事業の残り 1 年間では、先生方にもセンターの解析環境をさらに積極的にご利用頂き、今後 NGS がますます身近な研究手法のひとつとなれば幸いです。

最後になりますが、支援事業の最終年度に向けまして、5 年間のとりまとめと、成果発表を積極的に進めて頂きたく合わせてお願い申し上げます。

生物資源ゲノム解析センター
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、教員、博士研究員、技術員、事務員のスタッフが所属し、次世代シーケンサーと呼ばれる超高速 DNA 配列解読装置を使った研究の推進・支援をおこなっています。当センターは、Illumina 社の次世代シーケンサー 5 台（HiSeq2500、NextSeq500、MiSeq 2 台、GAIIx）と、情報解析サーバー 10 台（総メモリー量 7TB、総ハードディスク容量 750TB）を所有、運用しており、現在までに解析したサンプル数の累計は約 11,000 サンプル、総解読塩基量は約 34 Tbp に達します（図 1）。一部の研究成果については、データベース化して当センターのホームページより広く一般公開しています。平成 28 年度は約 80 件の学内共同研究プロジェクトを受け付けました。昨年度の学内共同研究が約 60 件でしたので大幅に増加したことになります。それだけ次世代シーケンサーを用いた研究がさらに広い研究分野に浸透してきたことの表れだと考えられます。次世代シーケンサーは 1 台で様々な解析がおこなえる機器であることも大きなメリットです。平成 28 年度に当センターが実施した共同研究課題における、解析目的とサンプル数の割合を図示すると（図 2）RNA-seq やメタゲノム解析などが解析目的の上位を占めており、次いでリシーケンス解析、Amplikon-seq 解析、RAD-seq 解析の割合が多くなっています。特にメタゲノム解析と呼ばれる微生物集団ゲノム解析が、昨年度までに比べサンプル数が大きく増えてきています。この解析手法は、環境中の培養できない微生物のゲノム情報を得ることが可能であるため、基礎研究だけでなく応用研究の分野でも近年ますます盛んになってきています。次世代シーケンサーの解析技術や実験手法の進歩は非常に早いため、当センターでは次年度も引き続き研究支援と技術開発を進めて参ります。

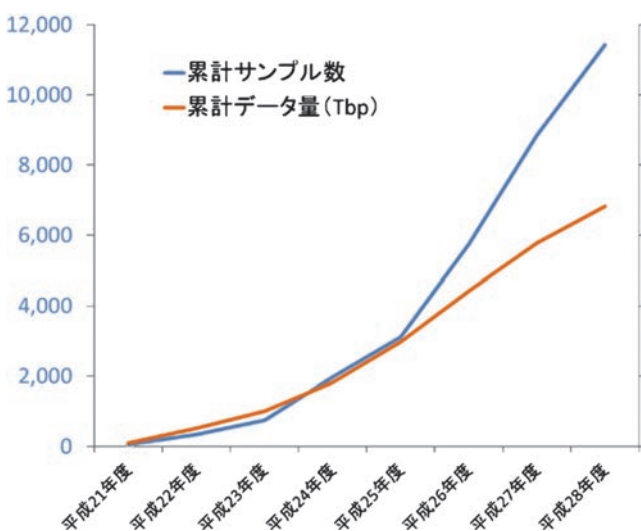


図 1 累計サンプル数（青）と累計データ量（赤）

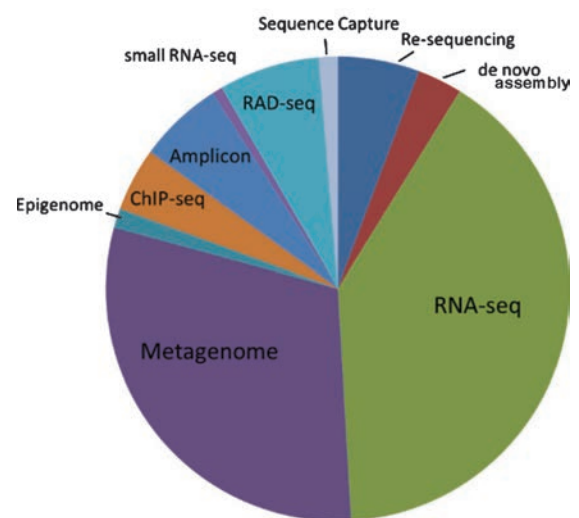


図 2 解析手法ごとのサンプル数の割合

兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）

◆ 2016 年度セミナー

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターでは、研究交流を目的としたセミナーを毎年開催しています。今年度は国内から3名の講師の先生方をお招きし、7月29日に2016年度セミナー「NGSデータ利用法最前線」を主催し、学内利用者、研究者間で最新の解析法や研究成果について情報交換を行いました。



荒川和晴先生（慶応義塾大学・先端生命科学研究所）
演題「非モデル生物のマルチオミクス解析—クモ糸とクマムシの解析」



宮 正樹先生（千葉県立中央博物館）
演題「魚類の環境 DNA メタバーコーディング：データ駆動型・発見探索型アプローチがもたらす新たな展開」



上西博英先生（農業・食品産業技術総合研究機構）
演題「ブタゲノム研究における次世代シーケンサーの利用」



セミナーの様子

◆平成 28 年度 学内公募一覧

1. 岩田 尚孝 (農学部 畜産学科)
「高質な胚生産のための培養環境の構築に関する研究」
2. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「オルガノイド培養系を用いた腸管および味蕾の機能解析」
3. 峯 洋子 (農学部 農学科)
「トマト第 1 染色体上の開花時期および側枝発達に関わる原因遺伝子の探索」
4. 須恵 雅之 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「オオムギにおける耐病性二次代謝化合物の新規生合成経路の解明」
5. 吉川 博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 の Cl⁻ 欠乏条件への応答」
6. 渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「単細胞性真核紅藻における複製開始点の同定」
7. 遠藤 明仁 (生物産業学部 食品香粧学科)
「ミツバチ消化管および花から分離したバクテリオシン生産性乳酸菌のゲノム解析」
8. 吉川 博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「盗葉緑体性渦鞭毛藻 *Nusuttodinium aeruginosum* における盗葉緑体拡大・分裂機構の解明」
9. 河野 友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「哺乳類における生殖系列の分化とエピゲノム制御」
10. 小林 久人 (生物資源ゲノム解析センター)
「哺乳動物におけるゲノム刷り込み機構の解析」
11. 平山 博樹 (生物産業学部 生物生産学科)
「牛の分娩時胎盤節における炎症誘導機構の解明と胎盤成熟誘導型分娩誘起技術開発」
12. 半澤 恵 (農学部 畜産学科)
「二ホンウズラの腸内細菌叢と免疫応答との相互作用」
13. 半澤 恵 (農学部 畜産学科)
「ウマ赤血球系幹細胞に発現する mRNA の解析」
14. 藤本 尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)
「ダム湖における微生物群集の鉛直分布および季節変化の解析」
15. 佐々木 剛 (農学部 バイオセラピー学科)
「アジアに生息するカワウソ亜科 (*Lutrinae*) のマイクロサテライトマーカー開発」
16. 入江 憲治 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「起源の異なる半矮性対立遺伝子 *sd-1* を持つイネ同質遺伝子系統における節間および穂のトランスクリプトーム解析」
17. 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」

18. 和田 健太 (生物産業学部 生物生産学科)
「エミューのゲノム情報の蓄積と、それを用いた家畜育種学的研究」
19. 辻井 良政 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「ジャスモン酸シグナル関連変異体を用いたターゲット遺伝子の探索および食味成分変化の解析」
20. 伊藤 晋作 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「イネにおけるアブシジン酸 (ABA) シグナル伝達機構の解析」
21. 伊藤 晋作 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「根圏におけるストリゴラクトンの機能解析」
22. 伊藤 晋作 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「植物寄生性線虫の宿主認識に關与する根圏微生物群の動態解析」
23. 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に関する研究」
24. 千葉櫻 拓 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ヒト染色体複製開始領域におけるサイクリン A, E と Mcm7 の相互作用解析」
25. 千葉櫻 拓 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「5-アミノレブリン酸によるがん温熱細胞死の分子機構解析」
26. 太治 輝昭 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ナチュラルバリエーションを利用した植物の環境ストレス耐性の解明」
27. 平野 貴 (農学部 畜産学科)
「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」
28. 村上 覚史 (農学部 畜産学科)
「畜産物による食品起因感染症の制御のための次世代シーケンサーを用いた食品起因感染症原因菌の進化系統グループの解明」
29. 遠藤 明仁 (生物産業学部 食品香粧学科)
「経腸栄養剤による栄養管理が骨髓 (造血幹細胞) 移植患者の腸内細菌叢へ与える影響」
30. 篠原 卓 (短期大学部 生物生産技術学科)
「登熟期間中の高気温によって誘起されるエンドウ種子の生理障害 (Hollow Heart) 発生過程におけるトランスクリプトーム解析」
31. 林 隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「アラビ細胞壁におけるキシログルカン生分解機構」
32. 林 隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「振動によるポプラ木部細胞壁形成の制御機構」
33. 小松 憲治 (短期大学部 生物生産技術学科)
「苔類ゼニゴケのアブシジン酸応答における PYL 受容体の役割」
34. 丹羽 克昌 (農学部 農学科)
「RNA-seq 法によるライムギ B 染色体上の転写産物の検出」
35. 尾畑 やよい (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「卵母細胞の発育機構に關与する新規因子の探索」

36. 和久井 健司 (短期大学部 生物生産技術学科)
「*Brassica rapa ssp. rapa* cv. 77B の核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子の同定」
37. 川崎 信治 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「微生物の環境ストレス耐性機構と感受性機構に関する研究」
38. 三井 裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)
「植物葉身の形態形成を司る分子基盤の解明に向けたトランスクリプトーム解析」
39. 三井 裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)
「植物の抽だい抑制機構の解明」
40. 三井 裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)
「植物病原菌の生きる知恵の生物有機化学ならびに分子生物学的解明」
41. 高橋 信之 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「生理活性化合物フラボノイドをリード化合物とした食品成分による網羅的遺伝子発現解析法の確立」
42. 坂田 洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ヒメツリガネゴケの環境ストレス応答における ARK および SnRK2 の役割」
43. 和久井 健司 (短期大学部 生物生産技術学科)
「*Brassica juncea* 在来品種の系統解析と亜種識別マーカーの開発」
44. 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」
45. 小塩 海平 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「ストレス環境下におけるトウガラシ果実の代謝制御機構の解明」
46. 喜田 聡 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「精神疾患マイクロエンドフェノタイプ同定を目的としたトランスクリプトーム網羅的解析」
47. 小栗 秀 (生物産業学部 生物生産学科)
「そうか病罹病ジャガイモ塊茎における発現遺伝子のトランスクリプトーム解析」
48. 新村 洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「鉄欠乏時にキュウリ (*Cucumis sativus*) で生成される新規ビタミン B2 誘導体 (4'-ketoriboflavin) の生成機構の解析」
49. 中山 俊一 (応用生物科学部 醸造科学科)
「醸造酵母の網羅的遺伝子発現解析による香気・呈味成分生合成機構の解明」
50. 佐々木 剛 (農学部 バイオセラピー学科)
「カワウソ亜科 (Lutrinae) の祖先種探索」
51. 小林 久人 (生物資源ゲノム解析センター)
「サボテンにおけるフロリゲン遺伝子の同定」
52. 藤本 尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)
「メタゲノム解析による草木湖の微生物生態系の解明」
53. 小林 朋子 (農学部 畜産学科)
「牛白血病ウイルス (BLV) 感染および牛白血病発症における遺伝子異常の検出」
54. 吉川 博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「バクテリオファージφ29 耐性を持つ枯草菌の解析」

55. 横田 健治 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「環状リポペプチドの炭素鎖構造を決定する *Bacillus* 属細菌の遺伝子の特定」
56. 徳岡 昌文 (応用生物科学部 醸造科学科)
「麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるアグロバクテリウムによる遺伝子導入に伴う形質異常の遺伝的原因の解明」
57. 長島 孝行 (農学部 農学科)
「天然素材 (シルクフィブロイン、ビタミン C) の生体へ及ぼす影響 RNA シーケンスによる遺伝子発現の網羅的解析」
58. 長島 孝行 (農学部 農学科)
「アリの三原色を生み出すオプシンの同定と種間比較」
59. 長島 孝行 (農学部 農学科)
「昆虫オプシンの大規模探索」
60. 長島 孝行 (農学部 農学科)
「昆虫の食性と化学感覚遺伝子」
61. 長島 孝行 (農学部 農学科)
「ニホンミツバチの誘引物質の合成に関連する遺伝子の共進化」
62. 長島 孝行 (農学部 農学科)
「昆虫の構造色に関わる多層膜構造の形成・制御の分子メカニズム」
63. 吉川 博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「細胞における増殖停止期の生存戦略ならびに変異蓄積と進化に関する理論構築」
64. 渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「シアノバクテリア *Synechocystis* sp.PCC 6803 における DNA 複製開始機構の解明」
65. 貝沼 章子 (応用生物科学部 醸造科学科)
「食酢醸造に関する研究—酢酸菌の発酵生理解析および伝統的食酢醸造技術に関与する微生物ゲノム解析—」
66. パチャキル バビル (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「ジネンジョ (*Dioscorea japonica*) の多様性解析および品種識別に利用できる SSR マーカーの開発」
67. 田中 尚人 (応用生物科学部 菌株保存室)
「*Lactobacillus* 属細菌の細胞分裂制御因子の推定」
68. 小栗 秀 (生物産業学部 生物生産学科)
「ホップの香気成分生合成に関与する遺伝子群のトランスクリプトーム解析」
69. 川崎 信治 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「花に共生する微生物叢のメタゲノム解析」
70. 佐々木 康幸 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「放線菌様クロロフレクサス門細菌 *Thermosporothrix* sp. MYC 株のゲノム解析」
71. 新村 洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「摂取栄養源によるラット腸内菌叢解析」
72. 徳岡 昌文 (応用生物科学部 醸造科学科)
「麹菌 *Aspergillus oryzae* の新規二次代謝生産制御因子の機能解析」

73. 中村 隆俊 (生物産業学部 生物生産学科)
「湿生植物の低酸素・温暖環境適応に関する比較トランスクリプトーム解析」
74. 小林 朋子 (農学部 畜産学科)
「牛白血病発症のウイルス学的要因解明を目指した BLV ウイルス遺伝子配列の多様性解析」
75. 樋口 恭子 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「イネ科野生植物ヨシのイオン輸送体遺伝子配列の網羅的取得」
76. 太治 輝昭 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ナチュラルバリエーションを利用した植物の環境ストレス耐性の解明 (高温耐性欠損変異株 *hts1* におけるトランスクリプトーム解析)」
77. 笠原 浩司 (応用生物科学部 アイソトープセンター)
「出芽酵母を用いたリードスルー作用薬 (+)negamycin 誘導体の標的分子同定」
78. 齋藤 彰宏 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「RNA シーケンス解析を用いたコメの良食味に関わる遺伝子発現パターンの解明」
79. 松林 尚志 (農学部 バイオセラピー学科)
「環境 DNA 解析による塩場およびヌタ場利用野生動物の網羅的モニタリング」
80. 中山 俊一 (応用生物科学部 醸造科学科)
「ブタノール生産菌におけるゲノム比較解析」

◆学内公募事業とその成果

培養皿で分化させた卵からマウス誕生

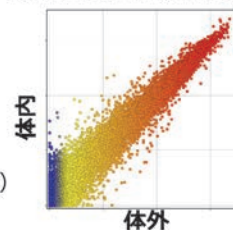
生物にとって生殖は種の維持や進化に不可欠である。生殖細胞である卵は、その形成過程で全能性を獲得し、遺伝子、エピゲノム情報、ミトコンドリアなどを親から子に受け渡す根源的な役割を担っている。しかし、卵の分化機構の詳細は不明な点が多く、体内で起きる複雑な過程を体外培養で再現することが可能になれば、卵形成機構解明のツールとして有用となるほか、生殖資源の増産につながることも期待できる。そこで、私たちの研究グループは、モデル動物であるマウスを用い、始原生殖細胞と呼ばれる未分化な生殖細胞から成熟卵を産生する培養系の確立を目指した。

生殖細胞の分化には生殖巣の体細胞が不可欠なため、マウス雌胎仔より生殖巣を採取し、これを標準的な血清添加培地を用いて培養した。培養 17 日目（出生後 10 日齢相当）に体外培養で分化した卵巣内には卵母細胞様の成長した細胞を確認することができた。しかし、卵巣内の卵母細胞様細胞は支持ユニットである卵胞構造を欠如していた。体内において卵母細胞は、その周囲を顆粒膜細胞層、基底膜、莖膜細胞層の順で覆われた卵胞と呼ばれる構造内で分化し、卵胞形成が不全になると成熟卵が分化できず不妊となることが知られている。実際、この体外培養法で分化させた卵母細胞様細胞は受精や減数分裂の完了に失敗した。そこで、卵胞形成不全の原因を明らかにするために、体内で分化した卵巣と体外培養で分化した卵巣における RNA-seq 解析を行い、差次的発現を呈する遺伝子群 (DEG) の抽出を行った。体外培養で分化した卵巣と体内由来卵巣の遺伝子発現プロファイルと比較すると高い相関を示したが ($R=0.99$)、有意に 3 倍以上の発現差を示した DEG が 547 検出された。これらのジーンオントロジー解析を行った結果、生殖に関連する遺伝子群が有意に濃縮され、卵胞で発現する遺伝子群も含まれた。さらにパスウェイ解析を実施したところ、

547 遺伝子を制御する上流因子内で有意に共通性の高い因子として Estradiol、SP1 および Beta-Catenin がこの順で予測された。驚くべきことに、これらはいずれも、エストロゲン受容体 (ESR) に結合して遺伝子発現を制御することが知られる因子であった。これまでに、エスト

体内と体外で分化した卵巣における差次的発現遺伝子 (DEG) の抽出

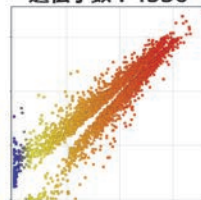
発現遺伝子総数 : 35892



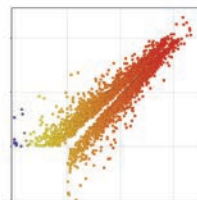
N = 3
R = 0.9911

Morohaku et al.,
PNAS 113: 9021-9026 (2016)
を一部改変

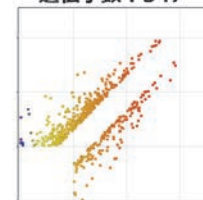
5%水準で有意に
発現変動した
遺伝子数 : 4536

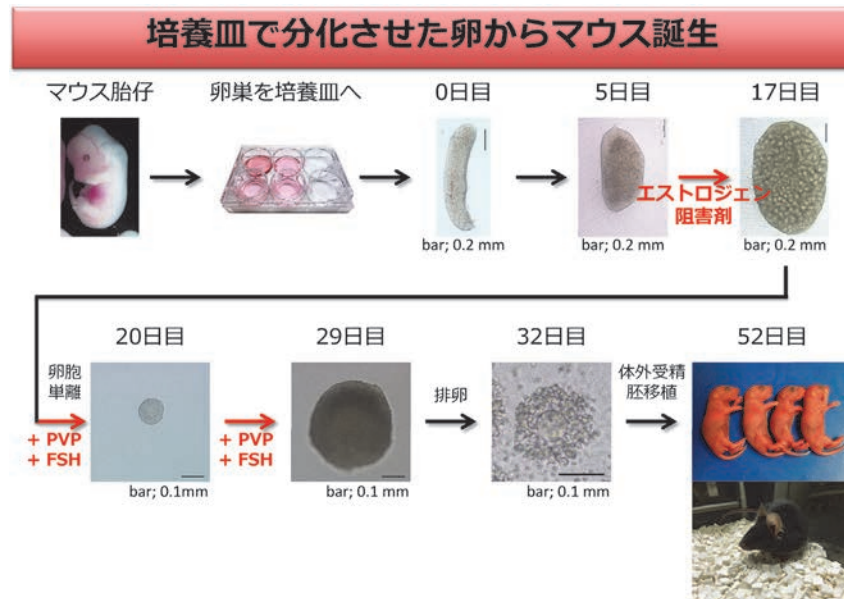


RPKMが5以上の
遺伝子数 : 4267



3倍以上の発現変動
が認められた
遺伝子数 : 547





ロジエンは、卵胞形成に阻害的であることが知られていた。マウスでは、胎生期に母親あるいは胎盤で合成されるエストロジェンの感作を受けているため、胎生期の生殖巣では卵胞形成は認められず、出生を期に、胎盤や母親の内分泌環境から隔離されると卵巣内で卵胞形成が進行すると考えられてきた。体外培養系では胎盤や母親のエストロゲンからは隔離されているため、私たちは、培地に添加している血清にエストロゲンあるいはその類似物質が存在し、卵胞形成を阻害しているのではないかと推察した。そこで、卵胞形成期に相当する培養5から11日目にESRの阻害剤を添加することにした。その結果、体外で分化した卵巣内には卵胞が形成され、卵胞内に成長期の卵母細胞を観察することができた。ESR阻害剤を添加した体外培養卵巣のRNA-seq解析を行ったところ、547のDEGから213遺伝子が除かれ、遺伝子発現レベルでも体内由来卵巣に近づくことが示された。器官培養17日目に体外で分化した卵巣から成長期の卵胞を採取し、これを成長用培地でさらに12から16日間培養すると、卵胞内に十分成長した卵母細胞が分化した。始原生殖細胞ではほ乳類に不可欠なエピジェネティック修飾（DNAメチル化インプリント）がリプログラミングにより全て消去されているが、体外で成長した卵母細胞では、卵特異的なDNAメチル化インプリントを完了していた。得られた卵母細胞をさらにFSHやhCGなどのホルモン添加培地で培養すると卵母細胞は第一減数分裂を完了し、生殖細胞に特異的な現象である染色体の半減が認められた。これらを体外受精に供試し受精卵を胚移植した結果、正常なマウスが誕生した。始原生殖細胞から機能的な成熟卵が産生された体外培養系は世界で初めての報告となった。今後は、この体外培養系の改変を図るとともに卵形成機構の解明に役立てたい。

尾畑やよい（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

諸白家奈子（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

谷本 連（大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻）

佐々木恵亮（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

河野友宏（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）

林 克彦（九州大学医学研究院）

平尾雄二（農研機構 畜産草地研究所 家畜育種繁殖研究領域）

Sry 欠損性転換雌マウスにおける XY^{Sry-} 卵母細胞形成の分子基盤

哺乳動物の性分化は、性染色体の構成による遺伝的性に支配され、XX は雌に XY は雄となる。雄型生殖巣 (XY) の支持細胞において Y 染色体上から一過性に発現する SRY が雄への性分化を決定する。マウスでは、胎齢 (E) 11.5 日に SRY が発現すると SOX9 や FGF9 などの下流の雄性決定因子の発現が逐次的に誘起され、生殖巣支持細胞は精巣形成および精子形成を支持するセルトリ細胞へと分化する。一方雌型 (XX) の生殖巣では、SRY による卵巣決定因子 (WNT4、RSPO1) の発現抑制が生じず、FOXL2 および FST による卵胞形成が誘導される。雄型もしくは雌型に構築された体細胞環境に支持され、雌雄始原生殖細胞 (PGCs) は性特異的な運命を獲得する。上述の通り、生殖巣支持細胞における SRY の発現は、性特異的分化に極めて重要であり、この機能欠損は生殖巣環境を雌型へ転換させ、XY 雌へと性転換を誘導する。しかし、XY^{Sry-} 卵子は卵胞数の減少および性染色体不対合などの異常を呈し、性転換雌マウスの妊孕性は喪失することが報告されている。本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いて性転換 XY^{Sry-} マウスを作出し、E13.5 PGC および P1 卵母細胞を対象にトランスクリプトーム解析を実施し、XY^{Sry-} 雌性配偶子形成異常の分子機構を明らかにしようとした。

C57BL/6N 系統の受精卵に Sry ターゲティングベクターを前核注入し、CRISPR/Cas9 システムにより XY^{Sry-} 性転換雌マウスを作製した。胎仔期 (E13.5)、新生仔期 (P1) の野生型および XY^{Sry-} 雌マウスから生殖巣を採取し、タンパク質分解酵素処理によって細胞懸濁液を作製した。抗 SSEA1 抗体もしくは抗 c-Kit 抗体を用いて生殖細胞を標識し、FACS 法により回収を行った。1 × 10⁴ 細胞から RNA を抽出し、SMART 法により cDNA ライブラリを構築した。その後、HiSeq2500 を用いて高速シーケンスを行い、得られた各サンプルのリードデータをリファレンス配列にアライメントした。

作出した XY^{Sry-} 雌マウス生殖巣の形態学的特徴は完全に雌型を示していた (Figure 1)。しかしながら、野生型と XY^{Sry-} 生殖細胞の RNA-seq データを階層的クラスタリングにより比較解析した結果、XY^{Sry-} E13.5 PGC および P1 卵母細胞は野生型と全く異なる遺伝子発現パターンを保有していることが明らかになった。XY^{Sry-} マウスの配偶子形成に障害を与える要因を特定するため、統計的手法により野生型および XY^{Sry-} 生殖細胞間の発現変動遺伝子群を抽出した。その結果、発現上昇遺伝子群に WNT シグナル関連遺伝子群が、発現低下遺伝子群に細胞周期および減数分裂関

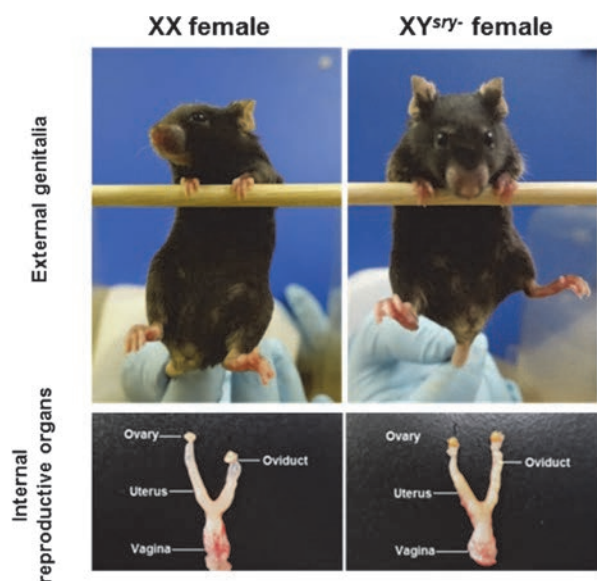


Fig. 1 8 週齢における野生型雌マウス (XX female) および Sry 欠損性転換雌マウス (XY^{Sry-} female) の外部生殖器および内部生殖器の構造解析

連遺伝子群が有意に濃縮された (Figure 2)。また、いくつかの Y 染色体上遺伝子の発現が胎仔期を通して検出された。さらに免疫染色の結果、XY^{Sry} PGC 核内には安定的な β-カテニンが存在し、これが細胞周期の遅延に寄与する可能性が示された。また、P1 卵母細胞にはレトロトランスポゾンの活性化と減数分裂の障害が確認された。

現在まで性転換雌マウス卵巣において大規模な貯蔵卵子の消失を招く明確な分子機構は不明であったが、我々は XY^{Sry} 生殖細胞は細胞周期の遅延およびレトロトランスポゾンの活性化を介して胎仔期から大幅に削減されることを明らかにし、これが著しい妊孕性の低下に寄与する主要な原因プロセスであることを示唆した。また XY^{Sry} E13.5 PGC および P1 卵母細胞にはいくつかの Y 染色体上遺伝子の発現も検出されたため、雌性生殖系列には本来存在しないこれらの発現が正常な卵子形成を阻害している可能性も考えられる。今後この Y 染色体の影響を含め、XY^{Sry} 生殖細胞における転写レベルの異常がどのようなエピゲノム修飾に起因するか詳細な解析が必要である。

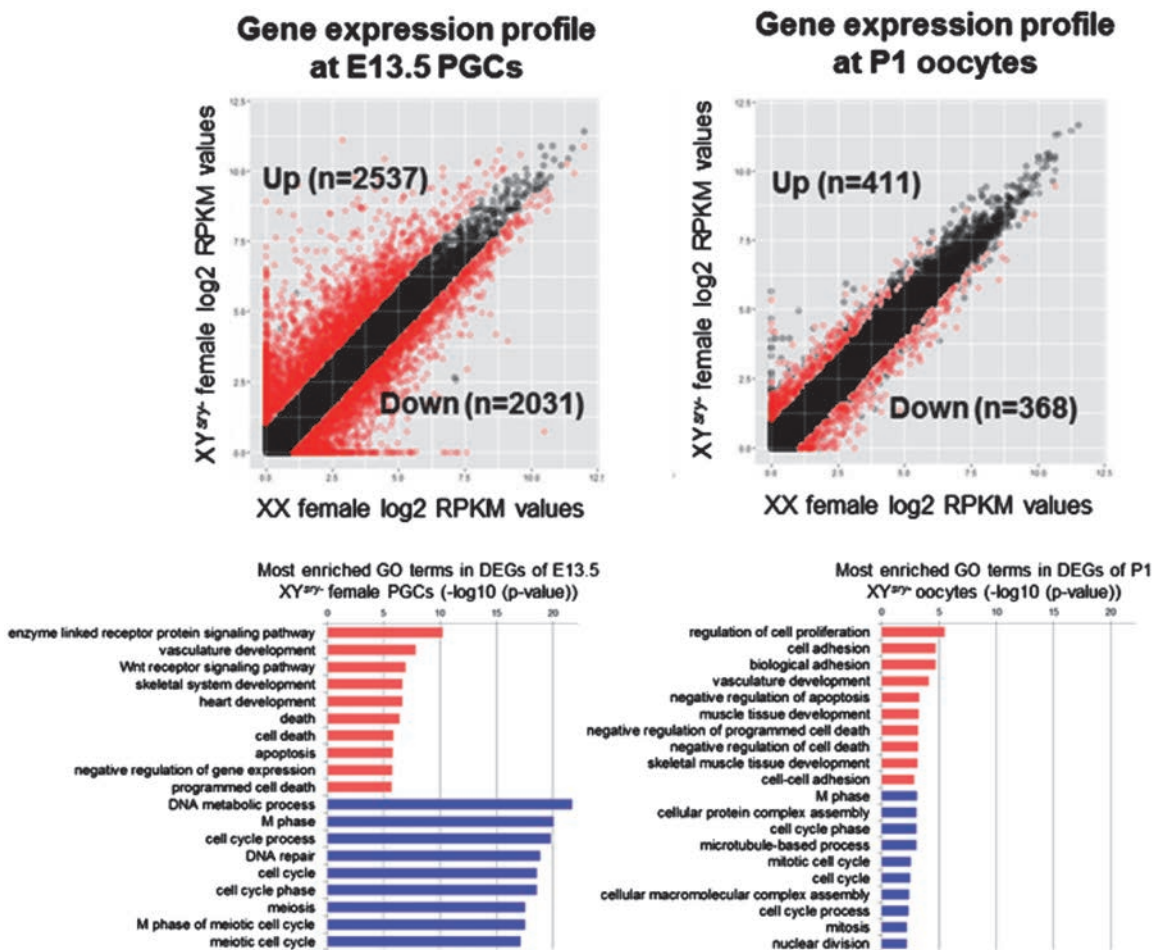


Fig. 2 野生型および性転換雌マウス個体間の発現変動遺伝子群の同定

上段の散布図は、野生型 (XX female) および性転換雌個体 (XY^{Sry} female) 由来生殖細胞間の遺伝子発現プロファイルを示す (左: E13.5、右: P1)。Red sphere は発現変動遺伝子を示す。下図は発現変動遺伝子群 (右: E13.5 PGCs、左: P1 NGOs) の GO 解析の結果を示す。最も濃縮されていた上位 10 個の GO term (Biological process) を棒グラフで示す (Fisher's exact test: cut-off < 0.1)。赤の棒グラフは Up-regulated genes の p value を、青の棒グラフは down-regulated genes の p value をそれぞれ示す。

坂下陽彦 (大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻)

河野友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

小規模およびシングルセルショットガンバイサル ファイトシーケンス解析によるゲノム散在性 反復配列の DNA メチル化測定

ショットガンバイサルファイトシーケンス (Shotgun Bisulfite Sequencing: SBS) 解析法は特定の生物の全ゲノムを対象に一塩基レベルで DNA メチル化状態を定量化することを可能とするパワフルな解析ツールである。しかしながら、この手法は大容量シーケンスを必要とする高コストな解析となるため、ゲノムサイズの比較的大きい哺乳動物での研究は現段階では限定的である。1ゲノム中に基本的には1つしかない遺伝子など、ユニーク配列の評価にはゲノム全体に渡る十分なシーケンスの深度 (Depth) が必要となる一方、1ゲノムに多数のコピーが存在するゲノム散在型反復配列であれば小規模の SBS データでも十分な Depth による DNA メチル化定量化が可能である可能性が考えられた。我々は、これまで発表されたヒト・マウス始原生殖細胞の SBS データをゲノム散在型リピー

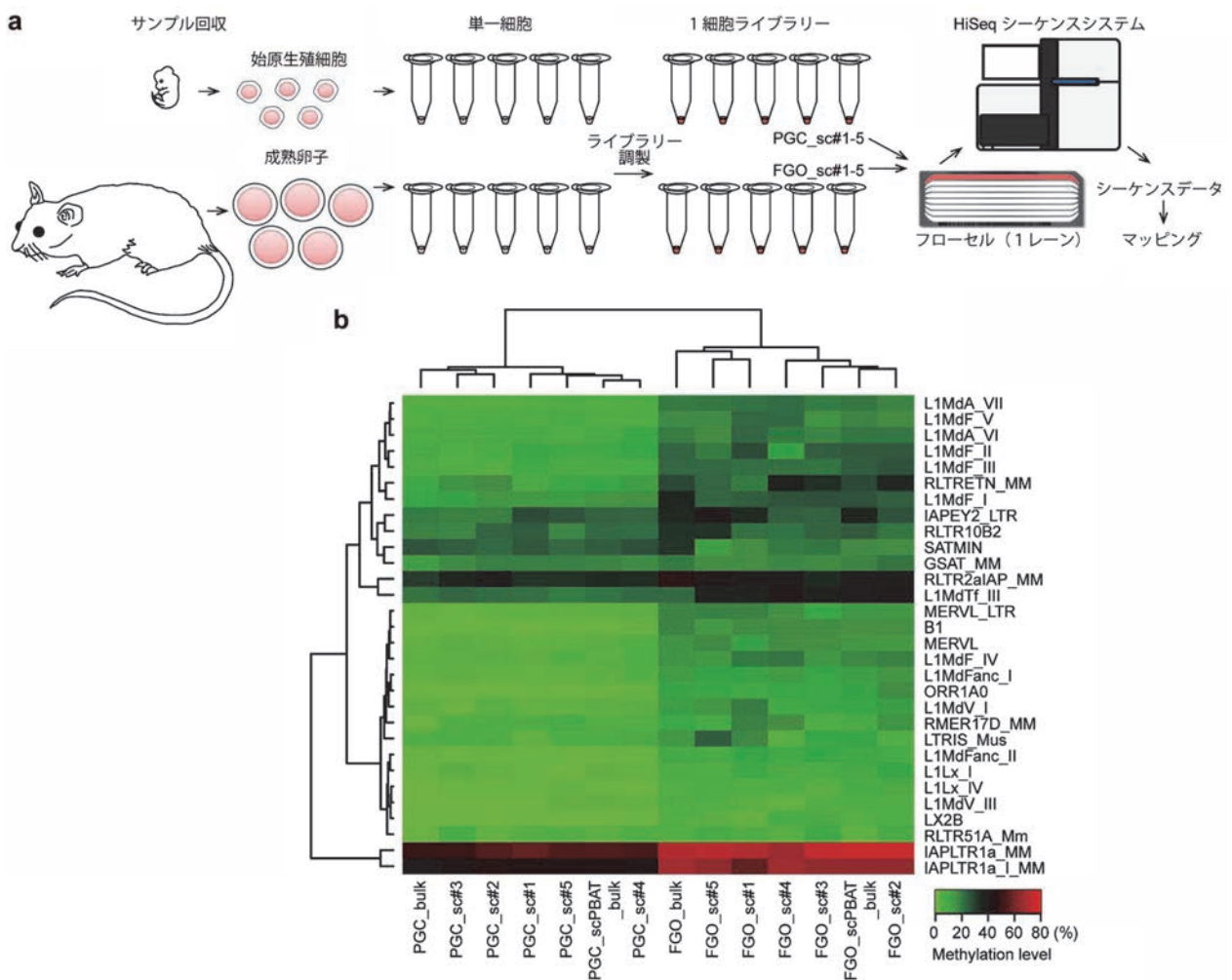


図1 シングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス解析のワークフロー (a)、反復配列メチル化率測定とクラスタリング解析 (b)

ト配列の共通配列にマッピングした。この新たなマッピングにより、生殖細胞型初期化における DNA 脱メチル化に抵抗的な反復配列を効率的に同定することに成功した。脱メチル化抵抗性を示す反復配列には、セントロメア・ペリセントロメアを構成するサテライト DNA (Minor satellite, Major satellite など) や進化的に若い LINE 型・LTR 型レトロトランスポゾン等が含まれ、特に LINE1 では各サブファミリーの進化的推定年齢とメチル化率の相関が明確に認められた。さらに我々は始原生殖細胞および成熟卵子 1 細胞から SBS データを取得すること (シングルセルショットガンバイサルファイトシーケンス) に成功し、バルクベースの解析データとの高い一致性を確認した。また、高メチル化状態を示す IAP レトロトランスポゾンにおいては、すべての細胞において高～低メチル化コピーが同程度検出され、細胞内での同一種の反復配列が不均一なメチル化状態にあることを示した。この新たなシングルセル DNA メチローム解析手法はコストパフォーマンスも良く、これまでエピゲノム研究が困難であった微量サンプルでの解析や多検体解析も可能である。また、反復配列共通配列のデータベースが充実している生物種であれば、非モデル動物の細胞での研究にも貢献することが期待される。本研究成果は科学雑誌「Genes to Cells」に掲載された。

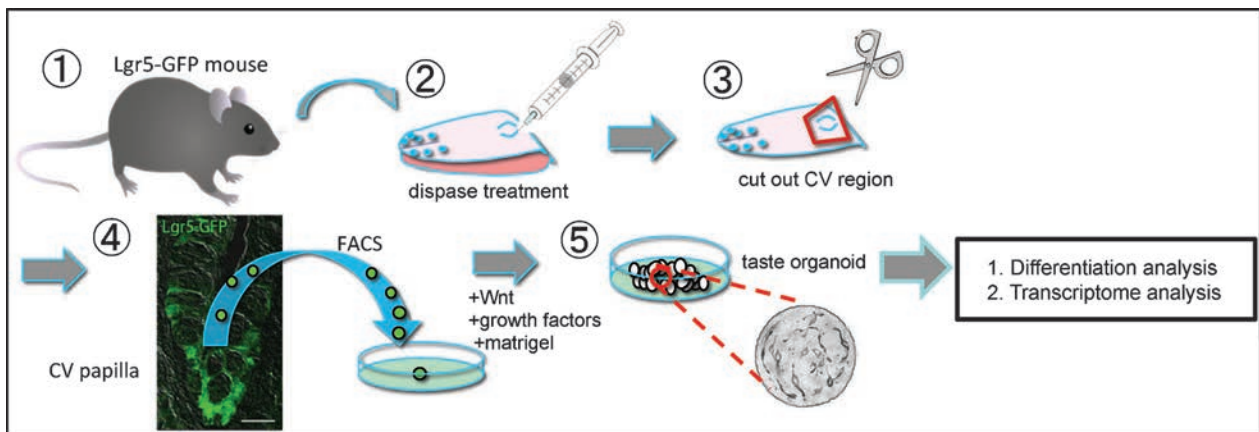
小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

河野友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

次世代シーケンサーを用いた味蕾オルガノイドの性質決定

味細胞は再生を繰り返す内胚葉由来の上皮細胞であり、味細胞は約2週間で再生する事が分かっている。我々は、米国の2グループとともに世界に先駆けて味蕾基底部に味幹細胞を同定し、続いて味幹細胞のオルガノイド培養に成功している。昨年度は、Lgr5-EGFP の味蕾周辺部より EGFP 陽性細胞を分取しオルガノイド培養を行い、培養を開始してから2週間後までの2日おきに RNA を回収し次世代シーケンサーに供した。再現性を調べる必要性から、再度同じ実験を行い、味蕾幹細胞から成熟味細胞へ分化する際の遺伝子発現変化を、次世代シーケンサーを用いて調べた。

方法の概略を下図に示した（下図参照）。

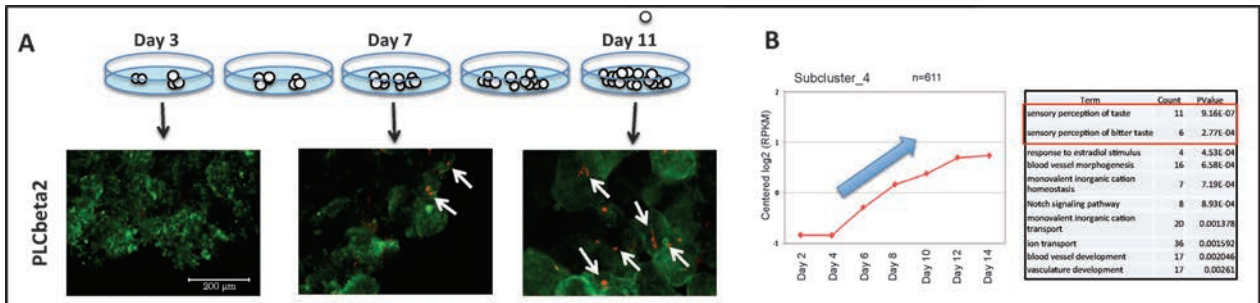


Generation of taste organoid from Lgr5+ cells.

Lgr5+ cells were selected from Lgr5-GFP circumvallate papillae and cultured with Wnt and other growth factors or cytokines such as EGF, Noggin and R-Spondin. The organoid culture method was introduced and modified from the original article published by Sato *et al* (Nature, 2009). Proliferating cells were observed within several days and these cells become organoid and subjected to differentiation analysis, RNA-seq analysis and Ca imaging analysis using tastants.

まず、Lgr5-EGFP マウスの舌より有郭乳頭周辺の味蕾組織を dispase 消化することにより取得し、FACS によるソーティングにより EGFP 陽性細胞のみ単離した上でオルガノイド培養に供した。オルガノイド培養では、FACS でソーティングした EGFP 陽性細胞をマトリジェルの中に埋め込み、Wnt、R-Spondin、Noggin、EGF などの増殖因子やそのインヒビターを含む培地で培養し、幹細胞だけが増殖する環境を構築した。約5日後には、味蕾幹細胞が増殖した結果としてボール状の細胞塊が観察された。約7日経つと、免疫染色によりうま味、甘味、苦味を伝えるII型味細胞のマーカである α -Gustducin およびIII型味細胞のマーカである CA4 (carbonic anhydrase 4) の発現が確認された (A 図)。これらの味細胞マーカ分子の発現は、培養12日まで増え続けた。

次に、培養開始から培養14日に至るまでの遺伝子変化を調べるため、オルガノイド培養 Day 2、4、6、8、10、12、14の各ポイントにて RNA を抽出し、SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing により完全長 cDNA 合成と増幅を行った。得られた cDNA を Covaris S2 により



A, Taste organoid culture and taste gene expression

Taste organoids were subjected to whole mount immunostaining using type II taste marker “Gustducin” and type III taste marker “CA4 (carbonic anhydrase 4)”.

B, Temporal gene expression patterns during taste organoid development

RNA samples from every 2 days of organoid culture were purified and subjected to transcriptome analysis using NGS. K-means cluster analysis revealed that subcluster 4 contains taste related genes such as umami and sweet taste receptors.

裁断し、KAPA Hyper Prep Kits for Illumina でライブラリを作製した。Illumina 社の HiSeq 2500 により 100bp のシングルリード配列を得て、遺伝子発現を網羅的に解析した。

これまでの解析により、過去 2 回にわたり取得した味蕾オルガノイド培養の経日的変化は非常に似ていた。特に、k-means クラスタ解析 (k=6) により、培養を進めるにつれ、発現が亢進し続ける遺伝子群が見出された (B 図)。本遺伝子群には化学感覚に関わる遺伝子群として味細胞関連分子が多く入っており、免疫染色の結果を裏付けるように約 2 週間で成熟した味細胞が出現する事が明らかとなった。逆に、培養 14 日に向けて減少する遺伝子群も存在したが、これらは幹細胞や増殖に関わる遺伝子群であり、発現が亢進する遺伝子群と機能が異なる事が分かった。

以上の事から、味幹細胞を 2 週間にわたり培養する事で、成熟した味細胞が出現する事が分かった。今後は、より積極的に味細胞の分化誘導系を構築するため、トランスクリプトーム解析の結果を参考にしながら、より効率的な味細胞分化誘導系を構築したい。

岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
 Peihua Jiang (Monell Chemical Senses Center)
 内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

NAK/Nokh ラットの無眼球症の発症原因の解明

ヒト小眼球症は 10,000 人に 1 人の割合で発症し、そのほとんどの患者が視力を欠失する極めて重篤な先天性眼球疾患であり、多くの症例において発症原因が明らかにされていない。そこで、ヒト小眼球症モデル動物を樹立し、その発症責任遺伝子を同定することは、ヒト小眼球症の発症メカニズムを解明する上で、重要な情報を提供することと考えられる。

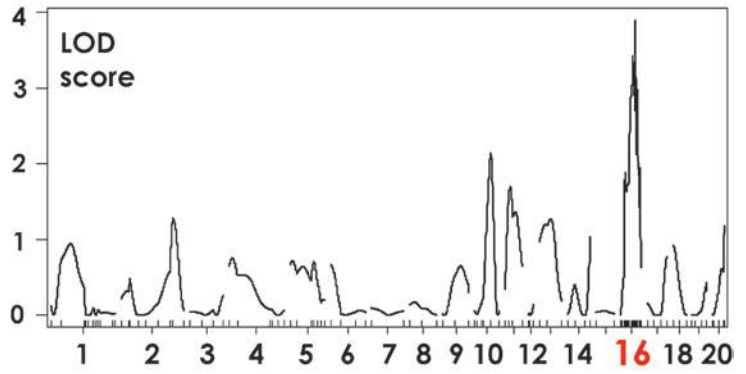
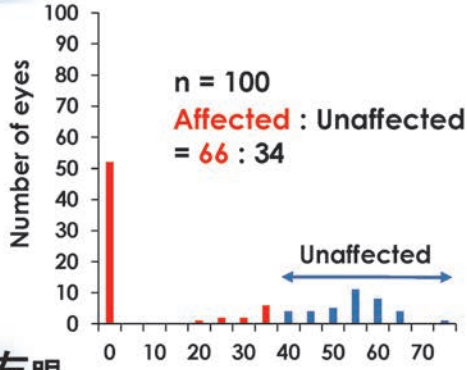
我々はヒト小眼球症モデルとなり得る劣性の突然変異系統である Nodai aphakia (NAK/Nokh) が、他の系統との交雑個体が両眼または片眼性の無眼球および小眼球症などの不均一な表現型を示すこと、その主要な発症原因が第 16 番染色体に存在することを報告してきた。しかしながら、第 16 番染色体の広範囲の領域がヘテロ接合性のハプロタイプを示す個体においても無眼球症が認められることから、第 16 番染色体の他にも NAK の無眼球症に関与する遺伝子が存在することと推測された。そこで、NAK と Brown Norway (BN) 系統との戻し交配個体における左右それぞれの眼球の表現型について連鎖解析を実施した。左眼の眼球重量では、これまでの結果と同様に第 16 番染色体に、右眼では 2 番染色体に 16 番染色体よりも高い LOD スコアを示すピークが検出された。以上の結果から、本研究では NAK において左右の無眼球症を引き起こす複数の遺伝子座、特に 2 番染色体に強い効果を有する遺伝子座の存在を確認した (図 1)。

そこで、高い LOD スコアが認められた領域について、RNA-seq および WGS による変異スクリーニングを行った結果、第 16 番染色体では *Tti2* に高い保存性を示すアミノ酸残基の置換を引き起こすミスセンス変異を検出した。さらに *Cyp4v3* をコードするゲノム領域に大規模な欠失変異の存在が推測され、それはエキソン 8 以降の欠失であることを確認し、それにより *Cyp4v3* の 3' 末端を欠失した異常な転写産物が発現することを明らかにした。第 2 番染色体では白内障の原因遺伝子として知られる *Gja8* に哺乳動物間で高度に保存されたアミノ酸残基の置換を引き起こす一箇所のミスセンス変異を同定した。

次に、*Cyp4v3* の転写異常と無眼球症との関連を検証するために、NAK と BN との戻し交配個体において転写異常の有無を指標としたジェノタイピングを行った。その結果、*Cyp4v3*^{nak/+} の無眼球発症率が左および右眼でそれぞれ 32.5% および 22.5% であったのに対し、*Cyp4v3*^{nak/nak} ではそれぞれ 63.3% および 48.3% であった。また、無眼球を除いた戻し交配個体における眼球重量の比較では、*Cyp4v3*^{nak/+} の右眼と比べて *Cyp4v3*^{nak/nak} の左眼において有意な眼球重量の減少が認められた ($P < 0.01$)。本研究は、*Cyp4v3* の転写異常が NAK ラットの無眼球症および小眼球症の発症、特に左眼の表現型に関与する 1 つの要因であることを示唆した。

加えて、*Tti2* および *Cyp4v3* について *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った結果、胎児期の眼球組織に両遺伝子の発現を示唆するシグナルが得られた。従って、本研究は *Tti2* および *Cyp4v3* が眼球発生において何らかの機能を有することを示唆した。現在は、NAK 無眼球症に関与する候補遺伝子となった *Tti2*、*Cyp4v3* および *Gja8* のそれぞれについてゲノム編集マウスの作製を進めており、NAK ラットの眼球表現型における個々の遺伝子の効果と相互作用について検証したいと考えている。

左眼



右眼

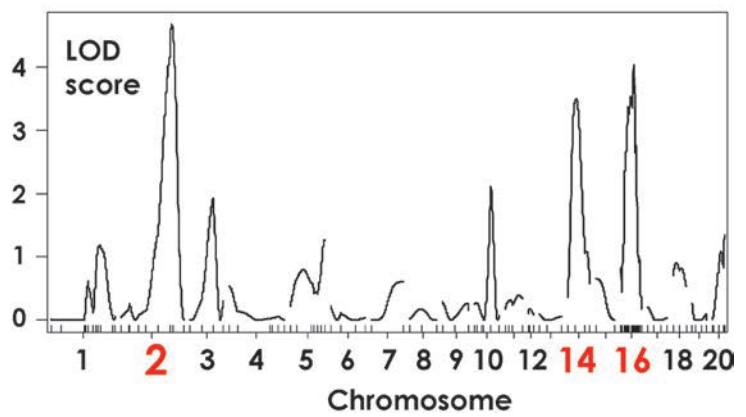
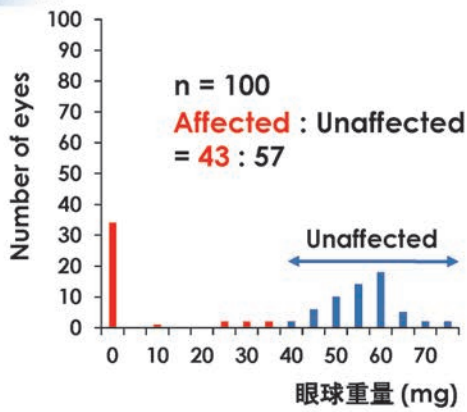


図1 NAK ラットの眼球重量に関与する複数の遺伝子座

和田健太 (生物産業学部 生物生産学科)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)



ヒト染色体複製開始領域における サイクリン A と複製開始因子との相互作用解析



真核細胞周期進行の中心制御因子サイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体は、その活性制御異常が細胞の増殖・分化制御の破綻を誘導する要因となることから、がん・発生異常・老化等の疾患に深く関わるものとして極めて重要である。哺乳動物細胞において G1/S 遷移期から M 期中期に発現し、細胞周期の最重要ステップである染色体複製と細胞分裂を制御するサイクリン A (CycA) は、多くのがんにおいて発現量が増大または脱制御されており、細胞増殖の加速や染色体不安定化を介して染色体恒常性の破綻、さらにはがん化の初期過程に関与することが示唆されている。しかし、CycA-CDK の活性亢進による S 期移行促進の分子メカニズムについては未だ不明な点が多く、その解明は細胞周期制御と染色体恒常性維持、発がん機構の基礎的理解において重要な課題である。我々は、哺乳動物細胞において CycA が複製ライセンス化因子 Mcm7 との結合を介して S 期移行を促進することを既に明らかにしていたが、両者が染色体上の複製開始領域において相互作用して

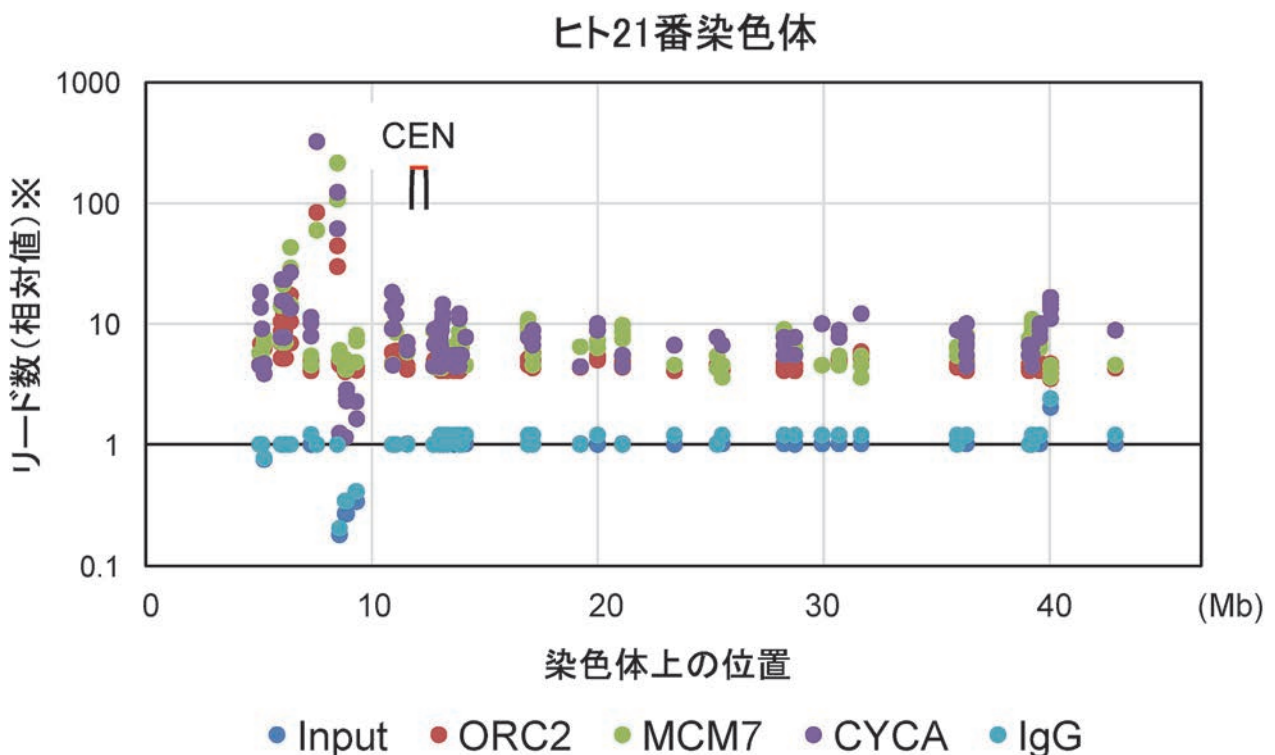


図1 ヒト21番染色体における Orc2、Mcm7、CycA 結合領域のマッピング

Input (免疫沈降前のクロマチン DNA サンプル) のシーケンスリードの平均を 1 として、染色体上にマップされた各抗体による ChIP サンプルのシーケンスリード数の相対値を算出 (※) し、コントロール IgG サンプル (水色) のリード数と比較して Orc2、Mcm7、CycA 抗体サンプルが 4 倍以上の相対リード数を示す領域を散布図で示す。CEN: セントロメア領域

Orc2 (赤色)、Mcm7 (緑色) の結合領域と CycA (紫色) の結合領域が高頻度で一致することが示され、CycA が広範囲の染色体複製開始領域に結合していることが強く示唆された。

いるかどうかは不明であった。そこで、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) - Seq 解析により、in vivo におけるヒト染色体複製開始領域での CycA-Mcm7 相互作用解析を行ってきた。

既に予備的解析として、ヒト培養細胞のクロマチン画分より、複製開始領域結合因子 Orc2、Mcm7、CycA 各抗体およびコントロール抗体 (IgG) を用いた ChIP-Seq を行い、染色体上にマップした結果、Orc2、Mcm7、CycA が共通に結合しているヒト染色体領域が複数同定され、CycA と Mcm7 が in vivo で染色体複製開始領域において相互作用することが初めて明らかとなったが、Orc2、Mcm7、CycA が特異的に結合しているヒト染色体領域が 12 箇所しか同定されず、現在約 20,000 箇所以上と推定されているヒト全ゲノム複製開始領域数に比べて非常に少なかった。そこで、これら 3 者の抗体を用いた ChIP-Seq 解析を再度行い、3 者が共通かつ特異的に結合している染色体領域の同定を行った。コントロール IgG による非特異的な免疫沈降物を最小限にする条件検討を経て ChIP-Seq 解析を行なった結果、コントロールとの差が 4 倍以上となる Orc2、Mcm7、CycA の特異的な染色体上結合領域が多数検出された。21 番染色体上でのマッピング結果を図 1 に示す。同様の結果は他の染色体上でも得られており、染色体複製開始領域の指標である Orc2 結合領域において、CycA が高頻度で Mcm7 とともに結合していることが示された。

今回のデータは複製開始領域として Orc2 結合領域のみを指標としているため、実際には DNA 複製が開始されていない休眠領域も含まれると考えられる。今後は、DNA 複製基質のアナログであるブロモデオキシウリジン (BrdU) を in vivo で取り込ませた後に BrdU 抗体を用いた ChIP-Seq 解析を行い、新規 DNA 複製が行われた領域を検出して、Orc2、Mcm7、CycA 各結合領域との相関性を解析する予定である。

千葉櫻拓 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

老化がウシの妊孕性に与える影響とその制御に関する研究

卵子の発育は加齢に伴い低下し、さらに卵子の質も低下する。加齢個体では卵胞内の顆粒層細胞の数が著しく少なくなる。本研究では卵子を取り巻く顆粒層細胞に焦点を当て、卵胞の発育に伴う顆粒層細胞増殖の分子背景の解明と細胞の数が卵子の質に与える影響について取り組んだ。まずブタの初期胞状から胞状卵胞に至る各発育ステージの卵胞を切り出しその遺伝子発現を検討したところ低酸素誘導因子 HIF1 が非常に重要な働きをしていることが分かった。そこで HIF1 の発現を低酸素および高酸素条件で変化させ、どのような因子が HIF1 を介して細胞増殖に関わっているのかを検討したところ、細胞の代謝では HIF1 による解糖系の亢進、ミトコンドリアの機能や量的抑制が起こること、細胞増殖では HIF1 の下流として VEGF-AKT-mTOR 経路が働いていることが明らかになった。またこれらは先の卵胞発育の遺伝子解析から得た結果と酷似していた。次に卵子周囲の細胞数と卵子の質の関係について検討したところ、体外の培養系で細胞数が卵子の脂質、ATP 量そしてヒストンのアセチル化と高い相関にあることが明らかになった。そこで顆粒層細胞を増加させて卵子の質の改善が可能かについて取り組んだ。最初に培地へのインスリンの添加効果、もしくは人為的な顆粒層細胞の増加（他の個体の顆粒層細胞を体外培養している卵胞へ追加すること）の効果を評価したところ、細胞数の増加に伴い、卵子内のエネルギー状態すなわち脂質量、ATP 含量やヒストンのアセチル化状態が改善することが分かった。さらに加齢個体では組織が固くなっていたため、培養の基質の硬さをコントロールして卵胞の発育を調べたところ、柔らかい基質上では卵子の発育が改善し、細胞数が増え、卵子内の ATP や脂質そしてヒストンのアセチル化レベルが亢進することが明らかになった。さらに遺伝子発現解析においてこれらの卵胞の顆粒層細胞では遺伝子発現が正常な卵胞発育に近づくことが明らかになった。加齢個体の卵胞では前述のように細胞数が少なく、さらに卵核胞期の卵子の脂質やヒストンのアセチル化レベルが低い、これらの結果を受けて我々は加齢由来の初期胞状卵胞では顆粒層細胞数を増やす条件を作ることによって卵子の質を一部改善することが可能であると考えている。

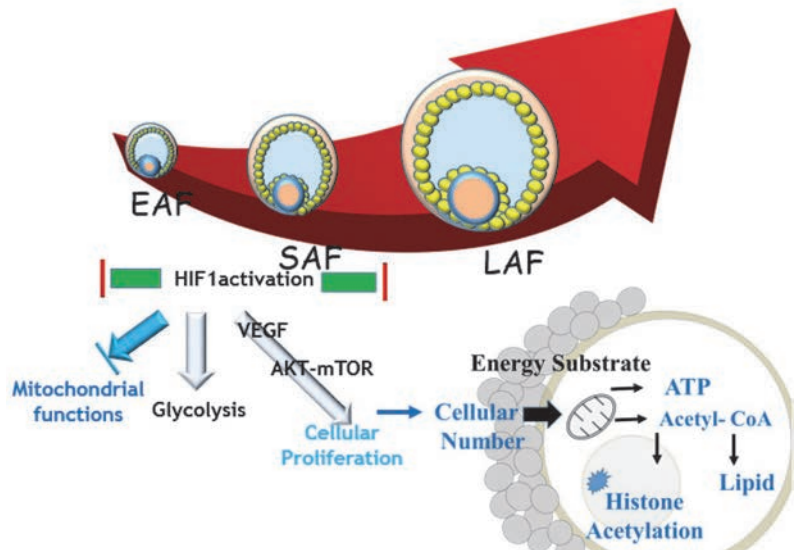


図 卵胞の発育に伴う顆粒層細胞の増殖は HIF1 による細胞増殖カスケードと解糖系の亢進、酸化的リン酸化の抑制が関与している。また卵子を取り巻く細胞数は卵子の ATP や脂質そしてアセチル化レベルと高い相関にある。

岩田尚孝（農学部 畜産学科）

川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）

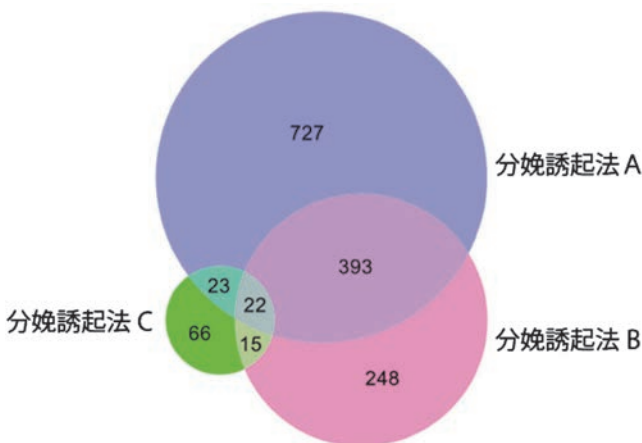
牛の分娩時胎盤節における炎症誘導機構の解明と 胎盤成熟誘導型分娩誘起技術開発

牛の胎盤停滞は分娩後の繁殖成績を低下させる重大な疾病であるにもかかわらず、その発症メカニズムは十分に解明されておらず、有効な予防方法も確立されていません。また、農家の大規模化が進むなか、分娩管理の省力化のために分娩誘起が有効な技術のひとつとなると期待されますが、臨床現場では1970年代に考案された分娩誘起方法がいまだに利用され、高い確率で胎盤停滞が発生することが問題となっています。

胎盤停滞低減のためには、分娩時に胎盤で起こる機能や構造の変化（成熟）を解析し、胎子胎盤が母胎盤から剥離するメカニズムを解明する必要があります。私たちは、自然分娩時と誘起分娩時の胎盤を比較することによって、アポトーシスや細胞増殖因子と胎盤成熟の関係を示してきました。現在は、分娩時の胎盤における炎症誘導機構に注目して研究を行っています。近年、ヒト産科領域では胎盤の炎症反応による分娩誘導の研究が盛んに行われ、早産防止への応用が期待されています。しかし、ウシでは胎盤における炎症性遺伝子発現の研究は限られており、我々は次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、炎症誘導機構の解明と胎盤成熟誘導型の分娩誘起技術開発への応用を目指しています。これまでに、自然分娩と3種類の分娩誘起法を比較することで、発現量の異なる遺伝子を多数同定しています。これらのなかには炎症反応に関わる遺伝子も多く含まれ、今後詳細な発現解析を進めていく予定です。



図1 ウシの分娩直後に採取した胎盤節（胎子胎盤と母胎盤が結合した状態）



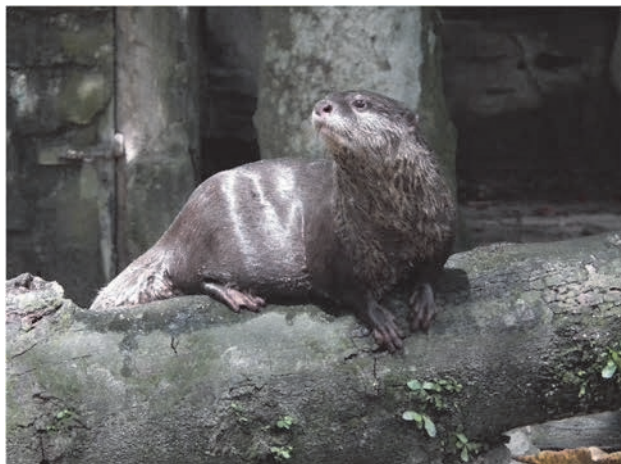
◀ 図2 誘起分娩時の胎子胎盤で自然分娩時に比較して発現量に変化した遺伝子数

平山博樹（生物産業学部 生物生産学科）
川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）
古山敬祐（北海道立総合研究機構
根釧農業試験場）

アジアに生息するカワウソ亜科 (Lutrinae) のマイクロサテライトマーカー開発

日本の動物園や水族館で、近年人気が上がっているカワウソはすべて国外に由来し、そのほとんどがアジアから導入されている。アジアに生息するカワウソは4種類で、コツメカワウソ *Aonyx cinerea*、ビロードカワウソ *Lutrogale perspicillata*、スマトラカワウソ *Lutra sumatrana* およびユーラシアカワウソ *Lutra lutra* がいる。このうちユーラシアカワウソは欧州にも生息しており、遺伝的な集団構造や生態について比較的詳しく調べられている。その一方で、生息地がアジアに限定されるコツメカワウソ、ビロードカワウソそしてスマトラカワウソはその生態や集団構造はほとんど調べられていない。しかしながら、ニホンカワウソの絶滅原因と同じように毛皮目的の密猟や生息地の開発により危機的な状況にあり、国際自然保護連合のレッドリストでは絶滅危惧II類に指定されている保全が必要とされる動物たちである。そこで、核DNA上に点在するマイクロサテライト遺伝子座を用いて集団構造とその生態を解明し、アジアに生息するカワウソの保全に役立てることが本研究の最終目的である。

しかしながら、これまでほとんど調べられていなかったコツメカワウソ、ビロードカワウソ、スマトラカワウソは集団構造の解明に有用なマイクロサテライト遺伝子座も特定されていない。そこで、我々の研究グループはコツメカワウソとビロードカワウソの試料を日本動物園水族館協会所属園館やマレーシアから提供していただき、近縁種のユーラシアカワウソで使われているマイクロサテライト遺伝子座用プライマーの有用性と、新たなプライマーの開発を行った。まず、コツメカワウソ40個体とビロードカワウソ5個体を使い、ユーラシアカワウソで使われている15遺伝子座を用いて有用性を検討した。その結果、増幅を確認した遺伝子座は両種とも11、そのうち多様性が確認された遺



マレーシアのコツメカワウソ (左) とシンガポールのビロードカワウソ (右)

伝子座は両種とも 8 となった。しかしながら、個体識別に必要とされる遺伝子座数には十分ではない可能性が高い。そこで、コツメカワウソとビロードカワウソの試料を生物資源ゲノム解析センターの次世代シーケンサーで解析した。解析の結果、両種ともに約 15,000,000 リードを得て、これらのリードから RepeatMasker プログラムを用いて単純反復配列 (SSR; microsatellite) を探索した。その結果、コツメカワウソから 46,039、ビロードカワウソから 35,397 の SSR を含むリードが抽出された。このうち、カワウソで一般的に用いられている 4 塩基の反復配列に絞るとコツメカワウソが 2,001、ビロードカワウソが 1,701 のリードに絞られた。

今後はこれらの候補から設計したプライマーで増幅可能かつ多様性が適度にある遺伝子座を探索していく。そして開発されたプライマーと既存のプライマーを合わせて、解析コストを大幅に低減できるマルチプレックス PCR 用プライマーセットを作成し、広く使われる実験系を開発する。また、実際に野生集団の集団構造を解明することが本研究の最終目的であり、現在試料採集も進めている。

和久大介	(農学部 バイオセラピー学科)
佐々木浩	(筑紫女学園大学 現代社会学部 現代社会学科)
関口 猛	(九州大学 医学研究院 分子生命科学系部門)
石毛太一郎	(生物資源ゲノム解析センター)
Pazil Abdul-Patah	(マレーシア野生生物国立公園局)
Badrul Munir Md-Zain	(マレーシア国民大学 理工学部 環境・自然資源学科)
Shukor Md-Nor	(マレーシア国民大学 理工学部 環境・自然資源学科)
佐々木剛	(農学部 バイオセラピー学科)

エミューにおける新規遺伝マーカーの開発と、 それを用いた家畜育種学的研究

エミュー (*Dromaius novaehollandiae*) はダチョウに次いで2番目に大型の走鳥類であり、肉、皮下脂肪、卵などを生産する新規動物資源として注目されている。このため、オホーツクキャンパスの所在する網走市では、エミューによる新産業創出に期待が寄せられている。特に、エミューの脂肪から抽出される良質なオイルは市場価値が高く、エミュー産業の中心を担うだけでなく、他の家畜との差別化を図る上でも重要な素材である。一方、現状の飼育形態は自然繁殖による集団飼育である上に、エミューの一妻多夫および多妻多夫、ならびに雄が抱卵を担当する習性から、その遺伝的改良を行うための家系情報の取得は困難なものとなっている。

そこで本研究では、エミューオイル生産形質の効率的な遺伝的改良のための遺伝マーカーの開発を試みている。これまでに、我々は既存の6種のマイクロサテライトマーカーに基づく集団遺伝学的解析から、オホーツクエミュー集団の遺伝的多様性は国外の他の集団と比べて低い傾向にあることを明らかにし、さらに16種のエミュー新規マイクロサテライトマーカーの開発に成功した。さらにオホーツク集団において、他の家畜において生産形質との関連が示唆されている *LEPR* および *SCD* に非同義置換を伴う多型が存在することを明らかにしてきた。

一方、我々はこれまでにエミューにおける新規マイクロサテライトマーカーの開発と系統選抜へ向けた個体識別法の確立に取り組んできたものの、そのゲノム情報を利用した家畜育種学的研究には、さらなる遺伝マーカーの単離が必要であると考えられた。そこで、エミューのNGSデータ (SRX252417 および SRX252416) でアセンブルを行い、得られた配列から QDD によりマイクロ

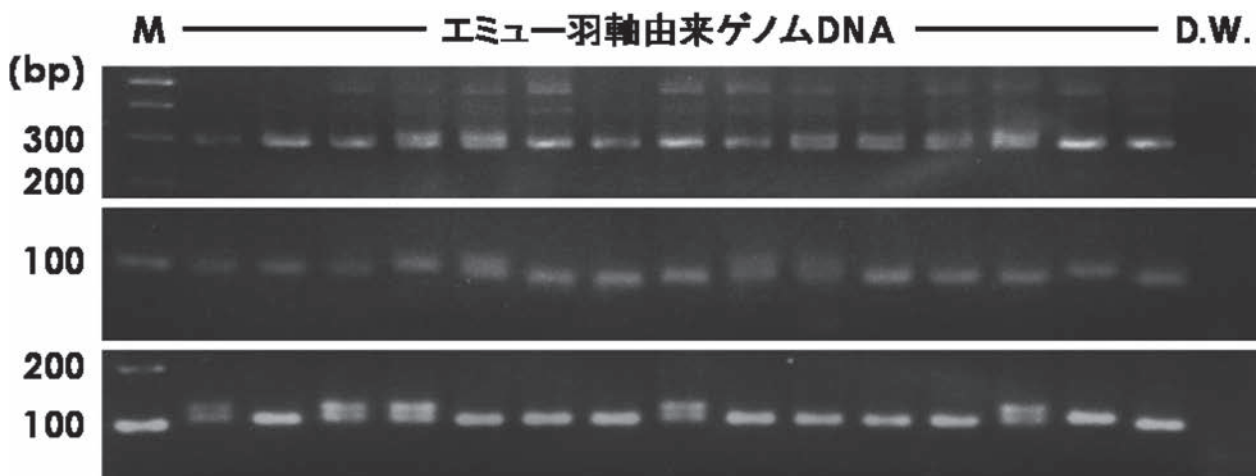


図1 QDDにより抽出されたマイクロサテライトに認められたエミュー個体間の多型

サテライト領域の抽出を試みた。SRX252417、SRX787590 および SRX767588 のそれぞれ 1.3-Gb、615-Mb および 3.3-Gb の塩基配列から QDD によって 5 回以上の反復配列を抽出した結果、26,281 箇所のユニークな配列が抽出された。抽出された配列には 74 種類のリピートユニットが認められ、(AC)_n、(AG)_n および (AT)_n が、それぞれ 38.51、30.78 および 18.17% と大部分を占めた。また、それぞれの反復ユニットにおける反復数を調査した結果、(AG)_n に 13 回と、最も多くの反復数が認められ、次いで (AC)_n および (AT)_n がそれぞれ 12 および 11 回の反復数と多い傾向にあった。抽出された反復配列領域から、2 塩基の反復数が 11 回以上、あるいは 3 塩基以上のリピートユニットを有する配列、合計 144 種類を選抜し、QDD により設計されたプライマーを用いて PCR-SSLP による PCR 増幅および多型の有無を確認した。その結果、選抜された 144 種のうち 143 種において PCR 増幅が認められ、そのうち 53 種類において明確な多型の存在が確認された (図 1)。現在は、これら 53 種類について蛍光プライマーを合成し、フラグメント解析による詳細な多型解析を進めている。

また、オイル生産形質と関連するマーカーを検索するための RAD-seq 解析、およびエミュー脂肪組織に高発現する遺伝子の探索を目的とした RNA-seq 解析についても進行中であり、エミューのオイル生産形質の改善に向けたゲノム情報を蓄積したいと考えている。

和田健太 (生物産業学部 生物生産学科)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

RNA-seq により発現を確認したニホンウズラ MHC クラス I α (*Coja-IA*) 遺伝子座の多様性解析

緒言：ニホンウズラの MHC クラス I α (*Coja-IA*) は、他のキジ科鳥類に比べて冗長な遺伝子重複を示す。過去の研究（細道ら 2004 未発表）により、既知の *Coja-IA* 遺伝子座（以下既知 16 配列）の抗原結合部位（PBR）を含むエクソン 2（Ex2）の一部からエクソン 3（Ex3）を共通プライマーにより増幅した RT-PCR 産物をクローニングして Sanger 法で塩基配列を決定し、遺伝子座間の発現量の多寡と *MhcCoja* ハプロタイプ (*Coja-HT*) 間での CNV を確認した。本研究では、*Coja-IA* の遺伝子構成および発現頻度の *Coja-HT* 間差異を RNA-seq により解析した。

方法：既知のすべての *Coja-HT* に検出されるクラス II β 遺伝子座 (*DBB1*) によりタイピングした *Coja*01/*03* (n=1)、*Coja*01/*05* (n=2) および *Coja*04/*04* (n=1)、4 個体の末梢リンパ球から全 RNA を抽出し (RIN 値 8 以上)、Poly-A にて mRNA を釣り上げ cDNA を合成し、Illumina HiSeq2500 にてシーケンシングした。QS30 以上で塩基長 80bp 以上 (最大 100bp) のリードを選択し、既知 16 配列をリファレンスとして類似性 70% 以上のリード配列をマッピングし、リファレンス配列との異同を検索した。カバレッジデプス 10 以上の新規変異を含むリード配列からコンティグ配列を構築し、これらリファレンス配列に加えて、特定のリファレンス配列と 100% 一致するリード配列をマッピングした。これを *Coja-HT* 毎に整理し、各配列由来 mRNA の発現頻度 (%) を RPKM 値に基づき算出した。

結果と考察：既知 16 配列は Ex2 に認められる 6 塩基の連続した挿入欠損 (Indel) により、挿入 (L) 型 10 配列と欠損 (S) 型 6 配列とに大別された。ウズラを除くキジ科鳥類ではいずれも 2 座位の *IA* 遺伝子が確認され、シチメンチョウは 2 座位共に L 型、ニワトリは 2 座位共に S 型である。ウズラ *Coja*01* のゲノムコンティグには各々 2 座位の L 型と S 型とがマッピングされ、Indel 変異の後に、遺伝子重複が生じたことが示唆された。Ex2 の一部 (L 型：202bp、S 型：196bp) の塩基配列の 78 ヶ所に SNPs が認められ、これらのうち L・S 両型間に特異的な 18SNPs は、Indel の直下 23bp 以内に存在した。この Indel を除いて作成した Ex2 の系統樹において L・S 両型は明確に分離するクレードを形成した。Ex3 (273bp) の 92 ヶ所に SNPs が認められたが、すべての位置で L・S 両型に共通した塩基が認められ、系統樹でも L・S 両型は明確に分離しなかった。また、Ex2 の系統樹の枝の長さは Ex3 よりも長い傾向があった。したがって、Ex2 と Ex3 との間に進化速度の差異、ならびに組換えの可能性が示唆された。PBR ($\alpha 1$: 8 ヶ所 ; $\alpha 2$: 7 ヶ所) のアミノ酸残基は、83 番目を除き、何れの部位にも L・S 両型の一部の配列間に共通したアミノ酸残基が認められたが、 $\alpha 1$ では L・S 両型間で Indel の直下 4 残基のアミノ酸に明瞭な差異が認められた。

各 *Coja-HT* から発現頻度 50% 以上の主働 *Coja-IA* が 1 配列ずつ検出された。*Coja*01*、**03* および **04* のそれらはいずれも S 型であるのに反し、*Coja*05* のみ L 型であった。また *Coja*01*、**03* および **05* から発現頻度 10 ~ 30% の *Coja-IA* が 1 配列ずつ検出されたが、*Coja*04* からは 3 配列検出された。さらに *Coja*01*、**03* および **04* から発現頻度 10% 未満の微働 *Coja-IA* がそれぞれ 3、1 および 2 配列検出された。*Coja*01* と *Coja*04* から 2 種類の共通配列が検出された (図 1)。

新規 23SNPs に基づき新たに 15 種類のコンティグ配列 (270 \pm 30bp) を検出した。発現頻度

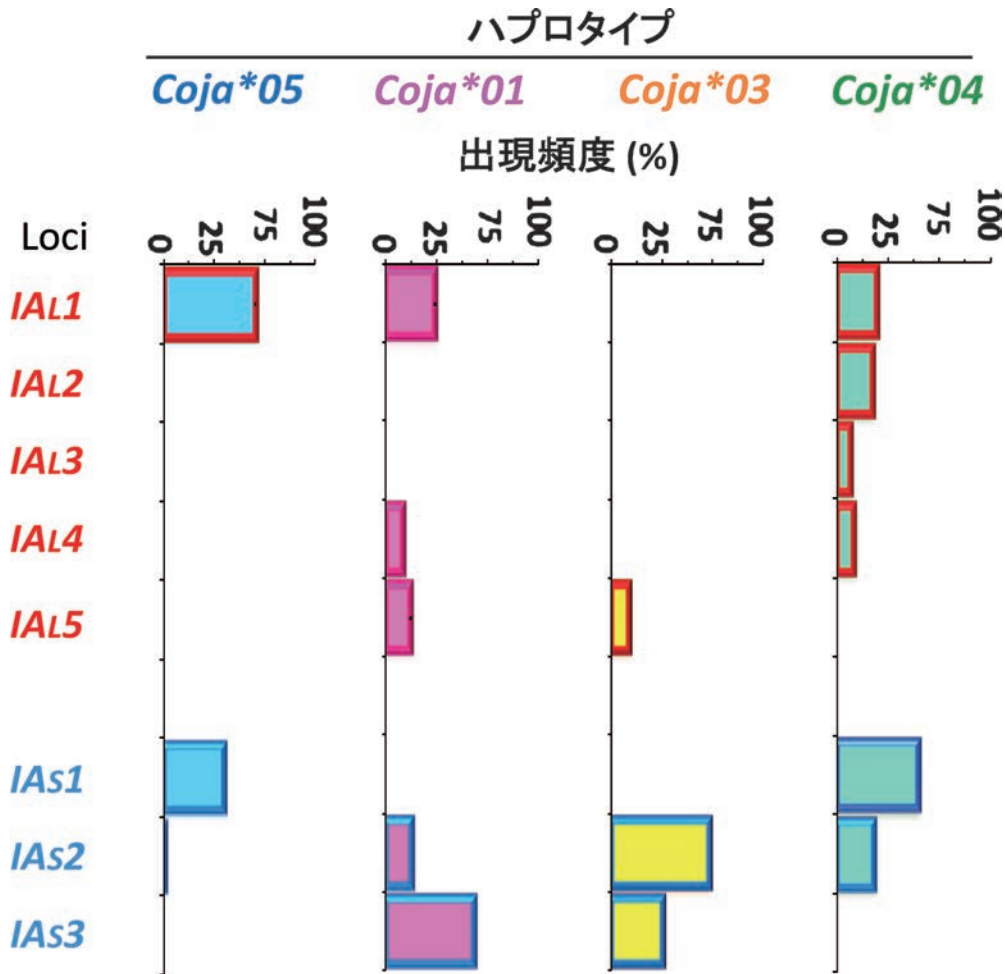


図1 ウズラ各 *Coja-HT* における発現 *Coja-IA* の構成およびその出現頻度

からいずれも微働 *Coja-IA* 由来配列と判断した。これらのうち Ex2 のみ、Ex3 のみおよび Ex2 と Ex3 の両者を 80bp 以上カバーしていた配列は、それぞれ 6 配列 (L 型 2 配列、S 型 4 配列：155 ~ 234bp)、4 配列 (LS 型不明：138 ~ 249bp) および 5 配列 (L 型 4 配列、S 型 1 配列：341 ~ 473bp) であった。*Coja*01*、*03、*04 および *05 の新規配列は、それぞれ 3、3、2 および 8 配列検出されたが、このうち 1 配列のみ *Coja*03* と *04 に共通であった。今後、Amplicon sequence など Ex2 と Ex3 の繋がりを明確にする必要がある。

Coja-HT を固定した個体を用いることで、*Coja-HT* 間の *Coja-IA* 遺伝子構成の変異が MHC の抗原提示能に及ぼす影響、ひいてはウズラの免疫学的特性の解明の一助となることが期待される。

- 朝治桜子 (ジェノダイブファーマ)
- 石毛太一郎 (生物資源ゲノム解析センター)
- 細道一善 (金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科)
- 鈴木進悟 (東海大学 医学部)
- 原ひろみ (農学部 畜産学科)
- 平野 貴 (農学部 畜産学科)
- 椎名 隆 (東海大学 医学部)
- 半澤 恵 (農学部 畜産学科)

環境 DNA 解析による塩場およびヌタ場利用 野生動物の網羅的モニタリング

我々は、以前から森林内の小規模湧水地である、マレーシア・ボルネオ島の「塩場（しおば）」や山梨県小菅村ならびに神奈川県丹沢地域の「ヌタ場」を訪問する野生動物のモニタリング調査を行っている。

塩場は、ナトリウムをはじめとするミネラル類に富んだ泉である。これまでの自動撮影カメラ調査によって、塩場は、大型絶滅危惧種のオランウータン（図1）やバンテン、アジアゾウをはじめとする野生動物のホットスポットであること、さらに、ミネラル類摂取の場に加えて、利用個体同士の出会いの場、あるいは肉食動物にとっては捕食の場としても機能していることなどが明らかになった。また、ヌタ場では哺乳類だけでなく、希少種を含む鳥類も多数確認している。しかし、これらは固定されたカメラによるものであるため、コウモリ類をはじめとする小型かつ動きの素早い哺乳類や鳥類を検出することは困難であった。

海や川、湖などは、そこに生息もしくは利用する動物のDNA（環境DNA）が存在する。これらを検出することにより、野生動物のモニタリングが可能と考えられていたが、データ量などの問題から研究が進まなかった。しかし、近年、次世代シーケンサーの登場により課題が克服された。環境DNA解析は、これまで魚類相の解析で多く行われていたが、2016年に亜寒帯林において、池を利用する地上性哺乳類（普通種）を検出しようことが報告された。そこで本年度は、環境DNA解析により、陸上生態系で最も生物多様性の高い熱帯雨林において、塩場を利用する野生動物を網羅的にモニタリングすることを目的とした。

一つの塩場から複数のポイントから水を採取し、環境DNA解析により塩場を利用する動物の検出を試みた。その結果、1回のサンプリングで複数の絶滅危惧種が検出され、これまでの長期間自動撮影カメラ調査の結果と一致した（論文投稿中のためデータは割愛）。本研究によって、熱帯雨林の塩場をターゲットとした環境DNA解析は、絶滅危惧種をはじめとする野生動物を効率よく検出できる有力なツールであることが示された。今後も塩場での調査を継続しつつ、ヌタ場でも同様に環境DNA解析を実施する予定である。



図1 塩場で確認されたボルネオオランウータンのフランジオス

松林尚志（農学部 バイオセラピー学科）

石毛太郎（生物資源ゲノム解析センター）

宮 正樹（千葉県立中央博物館）

潮 雅之（京都大学 生態学研究センター）

食性の異なるテントウムシの比較トランスクリプトーム解析

多様な種が存在する昆虫は、その食性も多様である。食性の異なる種では、食性に関わる感覚である視覚や嗅覚、味覚などもそれぞれ異なると考えられる。特に、嗅覚と味覚の化学感覚の受容体は種類が非常に多いため、食性によって異なると予想される。

テントウムシには、アブラムシやカイガラムシなどを食べる捕食性、植物を食べる植食性、菌の胞子を食べる菌食性の種が存在する。植食性や菌食性のテントウは、捕食性のテントウから食性を変化させたと言われている。日本には180種ほどのテントウムシがいるが、その大半は捕食性である。捕食性のテントウムシは天敵として、一方、植食性のテントウムシは害虫として、またうどん粉病菌を食べる菌食性の種は益虫として、農業上重要な昆虫である。

昆虫の食性にかかわる感覚受容体の遺伝子を調べるため、捕食性、植食性、菌食性の種が存在するテントウムシでRNA-seqを行い網羅的な遺伝子配列取得と発現解析を行った。捕食性では、ナミテントウ、ナナホシテントウ、ヒメカメノコテントウ、植食性ではニジュウヤホシテントウ、菌食性ではキイロテントウとムアシロホシテントウを用いた。これらの種を比較することで、共通もしくは特異的な発現をする感覚遺伝子を同定し、進化的な知見を得ることを目的とした。

本年度は、頭部全体からmRNAを抽出し、ライブラリ作成、シーケンスを行った。現在、データ解析中であるが、化学感覚遺伝子の全体的な傾向からは、同じ食性のものでも化学感覚のトランスクリプトの種類には差があり、食性に関わらず系統関係や生態的な要因を反映することがわかってきた。例えば、ヒメカメノコテントウとキイロテントウは食性は異なるが、化学感覚のトランスクリプトの種類やその配列は類似していた。ここから推測できるのは、食性を変化させるのに化学感覚をそれほど大きく変えてはいないということである。また、それぞれの食性のテントウムシで、餌を探す際に植物の二次代謝物質を感知することが知られている。食性によらず、植物のある二次代謝物質を介した餌の探索行動があるため、化学感覚遺伝子は、捕食者の食性だけでなく、被食者の宿主（植物）の幅などの生態的な要因が関係しているのではないかと考えられる。

今後は、データ解析を進めて、種内でオスやメス、幼虫での発現比較を行い、食性の異なるテントウムシの種間で比較をすることで食性特異的な感覚遺伝子を探し、機能解析の候補として、今後の応用研究につなげたいと考えている。

内山博允（生物資源ゲノム解析センター）
長島孝行（農学部 農学科）

ニホンウズラの腸内細菌叢と免疫応答との相互作用

感染症による生産性の低下や人畜感染症を防ぐことは、家禽産業だけでなく社会的にも重要な課題の1つである。家禽産業において生産性を損なう原因として最も大きなものの一つは感染症と考えられる。感染症への対策は、ワクチンや治療薬の開発、飼養環境の改善等も有効であるが、家禽自体の抗病性の向上が重要と考えられる。これまでに、様々な免疫関連遺伝子を対象とした疾患感受性との関連が研究されてきた。ニホンウズラは日本で唯一家禽化された鳥類であり、ニワトリのパイロットバードとしても活用されている。早熟、強健、繁殖が容易で、産卵能力も高いが、近交系の作出が困難といった特徴がある。ニワトリに比べ、重篤な感染症に対しても不顕性感染を示し、環境変化に高い順応性を示すなど興味深い特徴を持つ。そこで本研究はニホンウズラの主要な Host Defense peptide (HDP) 群の分子免疫学的特性とその多様性を明確にし、家禽の抗病性向上の一助となすことを目的としている。

我々は、これまでに次世代シーケンサーなどによりニホンウズラの Avian β -defensin (AvBD)、Cathelicidin (CATH)、Liver expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP2) および NK-lysin (NKL) の遺伝子構造を明らかにし、ニワトリと synteny を保ちつつも、多様性があることを明らかにしてきた。さらに、NKL は、抗菌活性領域のアミノ酸置換による net charge の変化に起因すると考えられる大腸菌に対する抗菌活性の差を見いだした。また、AvBD および CATH には多様性があることを確認している。一方で、LEAP2 の抗菌活性領域には、多様性がないことを明らかにした。

本年度は、「ニホンウズラの腸内細菌叢と免疫応答との相互作用」の解明を目的とし、腸内細菌叢解析を実施した個体で CATH および AvBD の多様性解析を実施した。本報告では、AvBD の多様性解析を紹介する。

ニホンウズラ AvBD (*CjAvBD*) は、第3染色体の長腕のテロメア付近の約 66 kb の領域に 14 個の遺伝子がクラスターを成して座位している。他の鳥類の AvBD または哺乳類の defensin は、多型およびコピー数多型 (CNV) の抗病性への関与について報告されている。我々は、これまでの研究から *CjAvBD* 領域の末端付近に座位する *CjAvBD1* および *12* が、連鎖していることを見出している。そこで、我々が所有する 5 系統、99 個体について、これら遺伝子の多様性を amplicon sequence にて解析し、PHASE によりハプロタイプ (HT) を決定した。

CjAvBD1 および *12* の allele はそれぞれ 9 および 8 種類確認であり、両者の組合せによる 10 種類の HT が確認され、これらのうち 3 種類は系統特異的であった (表 1)。ついでホモ接合体個体が確認された 8 HT のうち 7 HT の *CjAvBD* 遺伝子群の塩基配列を Long RANGE PCR 産物の amplicon sequence により決定した。7 HT の *CjAvBD* 遺伝子群は、56 ~ 70 kb の遺伝子領域にクラスターを形成し、いずれも 11 種類の *CjAvBD* 遺伝子座が各 1 座位ずつ確認された。これに対し *CjAvBD101* 遺伝子座のコピー数には、7 HT 間でニワトリの相同遺伝子座のコピー数変異 (CNV : 1 ~ 3 個) よりも大きな CNV (1 ~ 5 個) を認めた (図 1)。このことはウズラの自然免疫の機能的多様性をもたらすことが示唆された。

今後は、今回決定できなかった 3HT の *AvBD* 遺伝子領域について MinION または PacBio など塩基配列を決定する。さらに、今回発見された CNV が、免疫系へ及ぼす影響を解析していく予定である。

表 1 ニホンウズラ 6 系統における CjCAvBD12-CjAvBD1 のハプロタイプ頻度

Haplotype	Locus		Strain						Total
	<i>CjAvBD12</i>	<i>CjAvBD1</i>	A	B	K	ND	P	Y	
*01	*04	*08	-	-	0.37	-	-	-	0.06
*02	*04	*05	-	0.07	-	0.05	-	0.47	0.10
*03	*01	*01	0.61	0.27	0.27	0.42	0.13	0.03	0.29
*04	*08	*09	0.11	-	-	-	-	-	0.02
*05	*03	*03	-	0.13	-	0.11	-	0.13	0.06
*06	*03	*04	-	0.23	-	0.32	0.03	-	0.10
*07	*05	*07	-	-	0.37	-	-	-	0.06
*08	*06	*03	-	-	-	0.11	-	0.25	0.06
*09	*07	*06	0.08	0.30	-	-	0.03	-	0.07
*10	*02	*02	0.19	-	-	-	0.81	0.13	0.19

赤字:それぞれの系統で最も頻度の高い値、下線:系統特異的に確認されたハプロタイプ

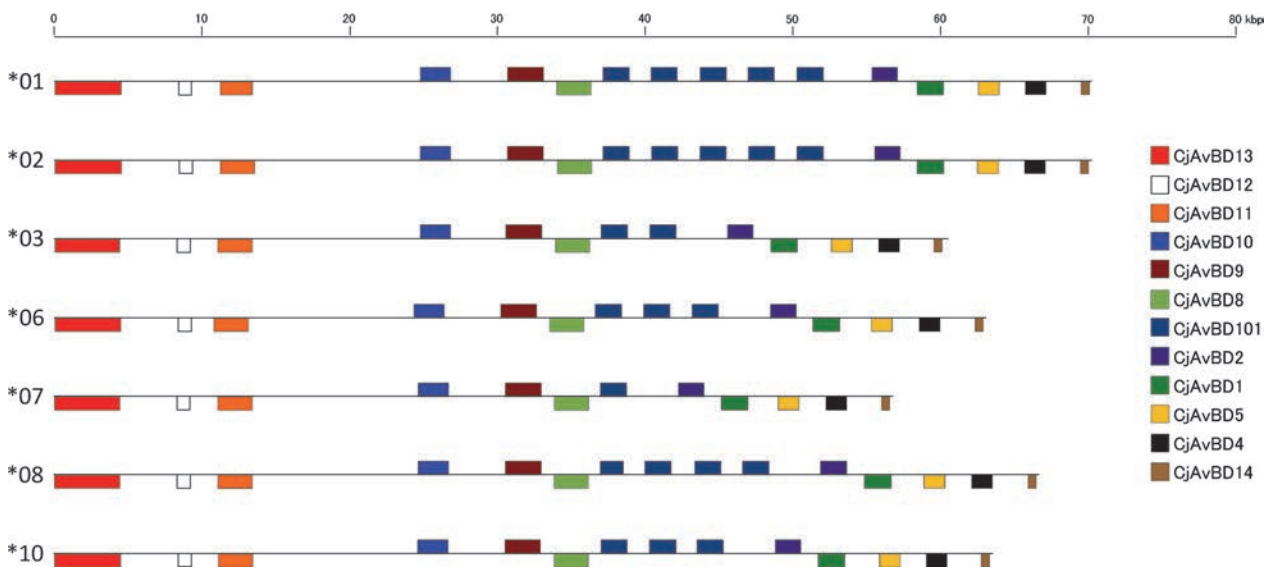


図 1 ハプロタイプごとの CjAvBD 遺伝子群

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)
 平野 貴 (農学部 畜産学科)
 半澤 恵 (農学部 畜産学科)

生理活性化合物フラボノイドをリード化合物とした 食品成分による網羅的遺伝子発現解析法の確立

食品成分は、抗炎症作用など様々な生理活性を有するが、その多くの作用メカニズムが不明である。さらに食品成分の機能性を評価する場合、細胞増殖や脂肪蓄積、酵素活性など単一指標を測定する手法が主流であったが、個々の結果が相反する場合も多かった。これは、食品成分の生理活性が低分子化合物に担われているため、複数の細胞内標的分子が存在し、それぞれの細胞内反応が異なっていることの一因であると考えられた。したがって mRNA の網羅的解析法を行うことで、従来法では得られない食品成分の細胞全体への影響を統合的に解析することが可能となると考えられる。

我々の研究グループでは、これまで mRNA 成熟阻害活性を指標とする抗がん活性を有する食品成分の探索を行い、その機能解析および作用メカニズムの解明を試みてきた。これまでの探索により、食品成分の 1 つアピゲニンが核内 mRNA の代謝制御に関わっている可能性を見出した。さらにアピゲニンは動物レベルで抗がん活性を示すことが他の報告で明らかになりつつある。しかし、その生理活性の具体的な標的遺伝子の同定や作用メカニズムの解明には至っていない。そこで、アピゲニンを含むフラボノイドが細胞に及ぼす影響を網羅的に精査し、どのような遺伝子の mRNA 成熟阻害が抗がん活性につながっているのかを明らかにするため、フラボノイドを添加した細胞のトランスクリプトーム解析を行うことを計画した。

具体的には、京都大学生命化学研究科・増田誠司准教授のグループが機能解析を行った結果、核内 mRNA 代謝に影響を及ぼすことが判明している食品由来フラボノイド化合物を今回の解析法のリード化合物として使用し、これらを細胞に添加して、mRNA ライブラリーを作製、次世代シーケンサによる網羅的解析を行う。得られたデータについて、大阪大学情報科学研究科・瀬尾茂人助教のグループがバイオインフォマティクス的手法を用いて、mRNA 代謝、特に mRNA スプライシングの不具合について検討する。高橋のグループは、研究全体を統合して研究を進めていくこととした。

現在、シーケンス解析を終了し、大阪大学情報科学研究科・瀬尾茂人助教のグループによって、mRNA トランスクリプトームの変化、特に選択的 mRNA スプライシングの変化を統計学的に解析するアルゴリズムを開発中である。市販の解析プログラムでは、選択的 mRNA スプライシングの有無など正確に解析が出来ないことから、これまでないアルゴリズムによるプログラムの開発が必要であるためである。この解析アルゴリズムを用いて、実施されたシーケンスデータをもとに、mRNA スプライシングに関する網羅的解析を行う予定である。またシーケンスされたサンプルには、これまでの生化学的な検討により同定された食品由来フラボノイド化合物の標的タンパク質を RNA 干渉法によりノックダウンした細胞の RNA サンプルも含まれており、より詳細な食品成分の作用メカニズムの解析が進むと期待される。本研究で得られる解析データにより、食品成分の細胞全体への作用を網羅的に把握することが出来れば、同様の生理活性を持つ食品成分の機能解析や構造活性相関から推測される新規化合物のスクリーニングまたは開発などにつなげていく予定である。

高橋信之（応用生物科学部 食品安全健康学科）

増田誠司（京都大学大学院 生命化学研究科 統合生命化学専攻）

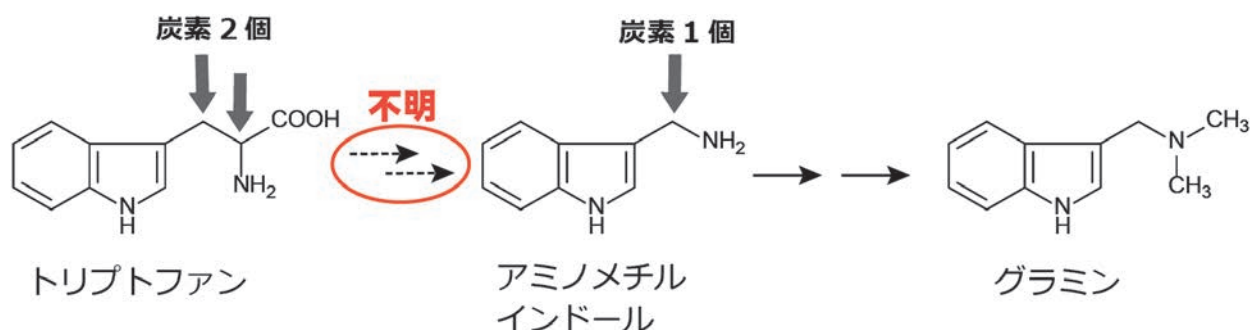
瀬尾茂人（大阪大学大学院 情報科学研究科 バイオ情報工学専攻）

オオムギにおける耐病性二次代謝化合物の 新規生合成経路の解明

解糖系やTCA サイクルといったエネルギー代謝、タンパク質や核酸の生合成など、生命活動に直結する重要な代謝系を一次代謝といい、これは動物や植物など様々な生物で共通な場合が多い。一方で、植物や微生物は一次代謝以外に、それぞれの生物種に独特な代謝産物を生産しており、これらは二次代謝と呼ばれる。植物における二次代謝産物の機能の一つとしては、植物の自己防御があげられる。植物は身の回りにいる微生物、昆虫、動物などから自身を守るために、例えば抗菌物質のように他者に対して有害な化合物を生産・蓄積している。このような機能を担う化合物が二次代謝化合物であり、多くの植物に含まれるフラボノイドや、ダイコン・ワサビなどの辛み成分（グルコシノレート）等がよく知られている。またその他にも、非常に多くの化合物がこれまでに報告されており、その中には医薬・農薬に使用されるものもある。上述のような二次代謝の特徴として、その種類や量は、植物種・植物の部位・栽培条件などによって大きく異なっているため、結果として様々な植物-病原の関係が存在することになる。そこで、このような化合物がどのようにして植物体内で生産されるのかということをつまらかにすることは、植物の持つ防御機構の解明や、さらにはその有効利用などにつながるものと考えられる。

オオムギには耐病性二次代謝産物として、ホルダチンやグラミンを生産している。これらの化合物は、同じイネ科の主要穀物であるイネやコムギ、トウモロコシなどには存在せず、オオムギ独特の化合物である。この中でグラミンはその構造的な特徴から、アミノ酸の一つであるトリプトファン (Trp) より生合成されるものと考えられている。しかし、Trp からアミノメチルインドール (AMI) までの過程は未だ不明のままである。Trp から AMI の過程で、インドール環と窒素原子間の炭素原子数が一つ減少しており、代謝経路としてとても興味深いものである。この経路の解明はオオムギの耐病性研究だけでなく、生合成研究の発展や新規酵素反応の発見などにもつながる可能性がある。

今回ゲノムセンターとの研究では、六条系オオムギ品種の中でグラミン生産量が高い品種と非常に低い品種を用い、mRNA の発現量が両品種間で大きく異なるものを網羅的に解析することにした。オオムギのゲノム配列は数年前に公開されているが、まだアノテーションなど不十分な点も多い。そこで今回は *de novo assemble* によりデータを解析していただいた。今後は発現量に差が認められたタンパク質遺伝子について、その機能の詳細な解析を行ってゆく予定である。



須恵雅之 (応用生物科学部 生物応用化学科)

ジネンジョ (*Dioscorea japonica*) の 品種識別に利用できる SSR マーカーの開発

日本各地に自生し、「山薬」としても知られるジネンジョは、健康・滋養食として古くから利用されてきた。希少性が高いジネンジョは、贈答用としてのニーズが高く、イモ約 1 kg あたり 3000 円前後の高値で販売されている。また、栽培面積 10 アールあたりの農家所得は約 150 万円と、サツマイモ (13 万円) やナガイモ (25 万円) よりも収益性が非常に高いのも特徴である。さらに、栽培技術の改良により高齢者や女性でも栽培できるようになったジネンジョは、過疎化が進む中山間地域の「まちおこし」の材料としても極めて有用であり、大規模栽培に取り組んでいる地域が年々増えつつある。

ジネンジョ栽培に取り組む地域が増える一方で、粘性が低く、風味も劣る「不良品種」の流通がしばしば問題となっており、産地崩壊につながることを懸念されている。ジネンジョ栽培における不良品種混入の要因として、近縁種であるナガイモとの交雑種の混入が考えられる。筆者は、ジネンジョとして国内で生産・販売されている品種を購入し、染色体数の予備調査を行ったところ、染色体数が既報と同じ $2n=40$ の品種に加え、 $2n=90$ の品種もあることが明らかになった。さらに、染色体数が 90 本のジネンジョ品種は、その葉形状がナガイモとジネンジョの中間的な特徴を示すことから、ジネンジョ ($2n=40$) とナガイモ ($2n=140$) の交雑種であると推察された。

従って、高品質のジネンジョを生産・販売し、高い収益性を維持するためには、ジネンジョおよび、ジネンジョとナガイモの交雑種と思われる品種群の類縁関係を解明し、両品種群を簡易的に識別できる DNA マーカーの開発が必要である。そこで本研究では、田中ら (2016) が開発したマイクロサテライト領域 (SSR) 検出方法を用いてジネンジョの品種識別に利用できる共有性マーカーである SSR マーカーの開発を目的とした。

本研究では、ジネンジョ 3 品種およびナガイモ (*D. polystachya*) 7 品種を供試材料とした。なお、供試材料のナガイモ 7 品種は、その塊茎形状に基づいて、ツクネイモ群 (2 品種)、イチョウイモ群 (2 品種)、ナガイモ群 (2 品種) およびトックリイモ群 (1 品種) に分類することができる。CTAB 法により抽出した DNA を制限酵素により断片化し、田中ら (2016) のプロトコルに従い SSR 濃縮ライブラリーを構築した。各ライブラリーのクオリティー評価および定量後、全てのライブラリーを均一に混合して MiSeq を用いた Paired-end 600 cycles でシーケンシングを行った。得られたリードデータに対して、アダプタートリミング、クオリティーフィルタリングおよびペアリードの一本化を行った。次に、CD-HIT により統合されたリードの中から、SSRIT により SSR 領域を検索した結果、供試材料 10 品種から平均して 20,770 の SSR 領域が検出された。

さらに、全サンプルに共通して検出された allele を対象に系統解析を行った結果、イチョウイモ群およびツクネイモ群、トックリイモ群およびナガイモ群、ジネンジョの 3 つのクレードが形成された (図 1)。イチョウイモ群およびツクネイモ群は同種のナガイモ群およびトックリイモ群よりもジネンジョ品種群と遺伝的に近いことが明らかになっており、ナガイモおよびジネンジョの種レベルの分類を見直す必要があることが示唆された。

今後、ジネンジョ種内の多様性解析および品種識別に利用できる共有性マーカーを構築するため

に、検出された allele を伴うリード配列を基に、プライマー設計を行い、有効な SSR 多型を選抜する。一方、ジネンジョとナガイモ、さらに両種の種間雑種を識別できるマーカーを構築するために、ジネンジョ系統内で特異的な allele、ナガイモ系統内で特異的な allele を伴うリード配列を基にプライマー設計を行い、有効な SSR 多型を選抜する予定である。

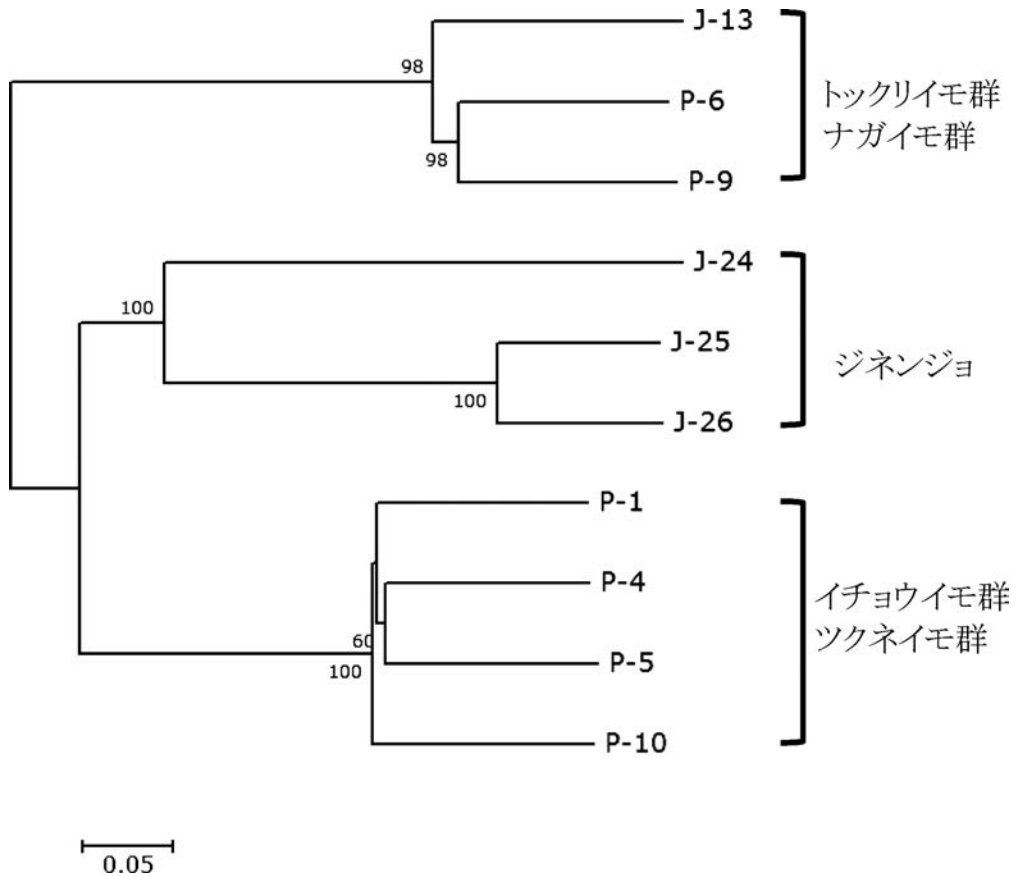


図 1 近隣結合法により構築したジネンジョ、ナガイモ群、トックリイモ群、イチョウイモ群およびツクネイモ群の系統樹。

パチャキル バビル (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

そうか病罹病ジャガイモ塊茎における 発現遺伝子のトランスクリプトーム解析

ジャガイモそうか病は、放線菌 *Streptomyces* 属菌の感染によってジャガイモの塊茎周皮に直径 1 ~ 2 cm のかさぶた状の病斑を呈し、イモの商品価値と加工特性を著しく損なう植物病害です (図 1A)。本病の発症は世界中に見られ、ジャガイモ国内総生産量の約 8 割を担う北海道においても、栽培面積の 2 ~ 4 割にそうか病が発生しているとの報告があります。そうか病の発症は酸性土壌において抑制されるため、土壌の酸性化は予防のための栽培上の指針となる一方で、その抑制効果は確実ではありません。また、過度の酸性化は後作にとって好ましくなく、効果的な防除法の対策が必要とされています。東京農業大学生物産業学部の立地する道東地域においても本病害の発生は農業上の深刻な問題となっています。研究メンバーの一人である吉田らは、道東地域における本病の多発要因の解明と防除法について研究を続け、これまでにそうか病発病抑制要因の一つが土壌溶液中のアルミニウムイオンであることを明らかにしてきました。総合的な防除のためには、そうか病の感染過程の解明が必要ですが、そうか病菌による宿主 (ジャガイモ) の認識や、感染の成立過程、あるいは宿主の抵抗性反応などに関しては、未解明な点が多く残されています。

本グループでは、そうか病の発症メカニズムを分子レベルにおいて理解するため、まず、そうか病の感染成立におけるジャガイモの遺伝子発現変化を調べることにしました。そうか病菌は、感染に際して宿主に毒性を示す抗生物質の一種 (Thaxtomin A) を生産し、その活性によりジャガイモ塊茎組織に壊死を誘導する他、植物組織の異常成長、根とシュートの生育阻害、セルロース合成抑制、防御タンパク質の発現誘導などの幅広い作用を引き起こすことが知られていました。一方、そうか病菌が保持する病原性遺伝子として *nec1* 遺伝子が同定されており、その遺伝子産物である Nec1 タンパク質は塊茎組織に壊死を誘導し、宿主の抵抗性を低下させる作用が先行研究から想定されていました。このように一言に「感染」と言っても、ジャガイモの中ではそうか病菌側の因子により様々な遺伝子発現の変化があつて発症に至ることが考えられました。発症に伴う多様な遺伝子の発現変化を調べるために、我々は、次世代シーケンサーを用いたジャガイモのそうか病病斑の網羅的な発現解析を計画しました。東京農業大学網走寒冷地農場のそうか病発生圃場で栽培した健常塊茎および罹病塊茎の病斑部と無病斑部について、RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を行い、得られた各 3 千 Mb の配列を既存のジャガイモゲノム遺伝子配列にあてはめたところ、健常塊茎と罹病塊茎の病斑の遺伝子発現量の比較において約 150 遺伝子の発現量に明らかな差が検出されました (図 1B)。病斑部では、ストレス応答に関与する植物ホルモンの制御下にある複数の防御タンパク質遺伝子や、病斑の形成と色素沈着に関与する Thaxtomin A に関する先行研究の知見を含む一連の遺伝子発現の異常亢進が観察されました。さらに病斑部では 10 遺伝子の発現量が健常塊茎組織に比べて低下していることが明らかになったことに加え、代謝変化を示す予期せぬ知見も得られました (図 1C)。これらの遺伝子発現変化は、病斑の形成のみならず、そうか病菌の感染成立の鍵を握る現象と考えられます。

このように、全く予期していなかった遺伝子とそうか病との関連が示されたことは、次世代シーケンサーによる全遺伝子発現プロファイリングの威力でありましょう。今後は、そうか病の発症程度

の異なる品種間の遺伝子発現量変化を比較することにより、抵抗性に関する遺伝子の特定を進める予定です。これらの研究を通して、そうか病発症抑制に効果的な栽培法や農薬の開発、あるいは抵抗性品種の育種に利用できる知見を提出したいと考えています。

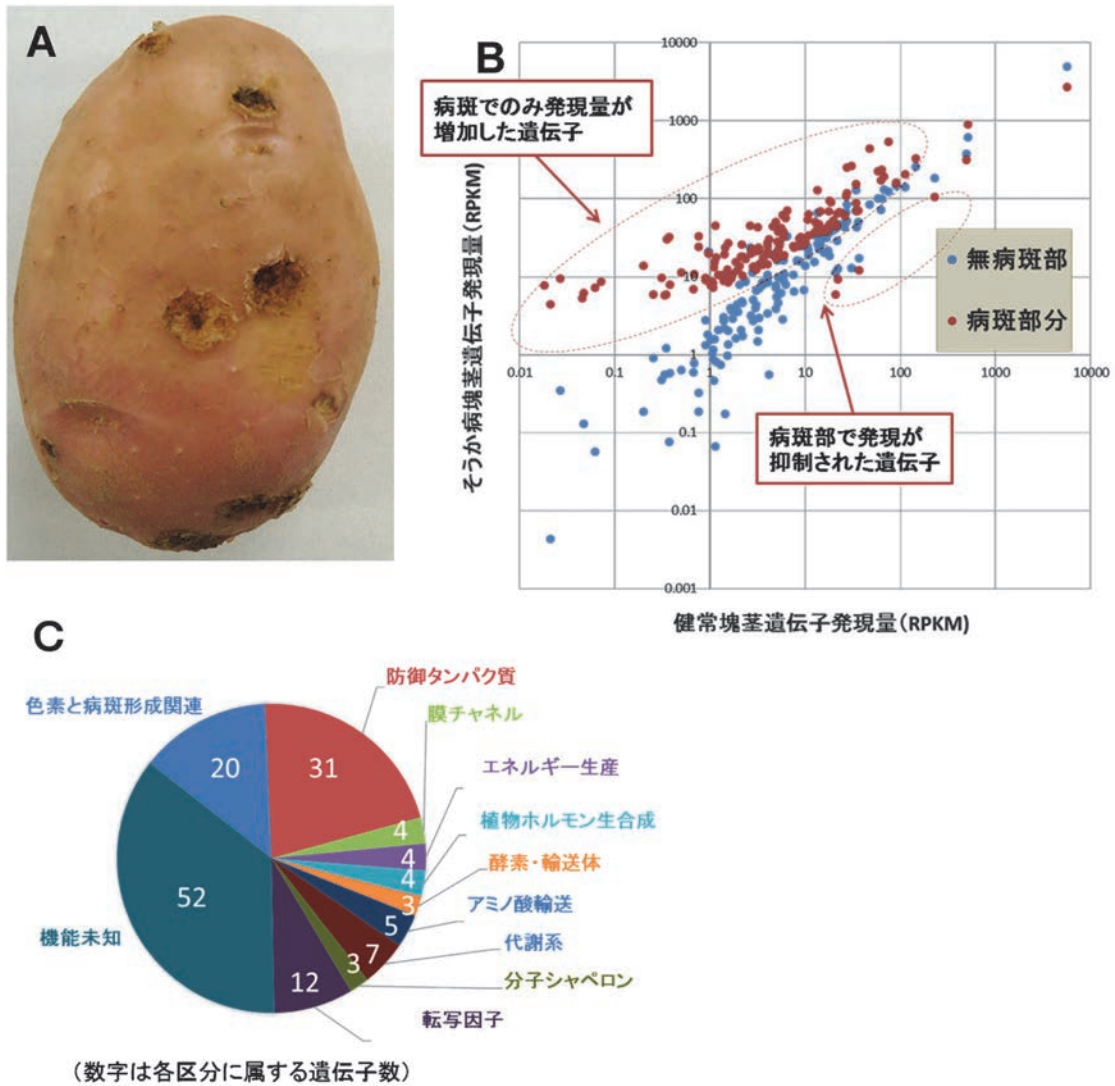


図1 そうか病罹病ジャガイモ塊茎のトランスクリプトーム解析
 (A) そうか病罹病塊茎
 (B) 健全塊茎と罹病塊茎の遺伝子発現量の比較
 (C) そうか病罹病塊茎において発現量が増加した遺伝子の機能

小栗 秀 (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)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

トマト第1染色体上の開花時期と側枝発達を 制御する遺伝子の探索

トマト *Solanum lycopersicum* は通常、7～11枚の葉を分化した後に最初の花芽を分化して第1花房を形成する。この花房が開花するまでの日数は、環境条件や遺伝的要因によって変動し、最初の収穫までの日数を左右する重要な形質である。著者らはこれまでに、トマト栽培種 'M570018' と近縁野生種 *Solanum pimpinellifolium* (PI124039) の交配に由来する戻し交雑自殖系集団を用いて量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行い、第1染色体上の隣接した3つのマーカー TGS0241、TGS0271、C2_At5g49480 近傍に、開花までの日数 (DTF) に関わる QTL を検出した。この DTF QTL の近傍には、子葉展開までの日数 (COT) に関わる QTL および側枝の発達に関わる QTL も検出された。これらの QTL は対立遺伝子が野生種由来のときに、子葉展開までの日数と開花までの日数を短くし、側枝発達を促進する作用を示した。その後、戻し交配とマーカー利用選抜によって、第1染色体のこれら QTL が存在するとされる3つのマーカー近傍のみが野生種ホモ型、その他の染色体領域がすべて栽培種ホモ型になっている染色体部分置換系統 (87-132 系統) を育成した。この87-132 系統と反復親のトマト栽培種 'M570018' をともに栽培して比較したところ、87-132 系統で栽培種よりも実際に子葉展開および開花の時期が早まり、側枝がより発達することが確認された (図1)。

そこで87-132 系統と栽培種 'M570018' の間で塩基配列にどのような変異が起こっているのか、また変異の起きている遺伝子は開花時期や側枝の生育に関連のある遺伝子なのかを調査することを目的として、リシーケンス解析を計画した。'M570018' と87-132 系統について次世代シーケンサーを用いてペアエンドシーケンスを行い、得られたリードデータを Sol Genomics Network のデータベースを基にトマトのゲノム配列 (SL2.50) にマッピングした。その結果、'M570018' と87-132



図1 トマト野生種 (PI124039、左)、栽培種 'M570018' (中) と87-132 系統 (右) の播種後50日目の草姿

系統それぞれについて第1染色体の配列データを得ることができた。87-132系統において野生種ホモ型となっている3つのマーカー TGS0241、TGS0271、C2_At5g49480 の近傍に存在する遺伝子を調査するために配列データ上における上記3つのマーカーの位置の特定を試みたところ、図2に示すように、過去の研究で作成した連鎖地図とはマーカーの配列順序が異なっていることが明らかとなった。これは、連鎖地図作成に用いた集団が栽培種‘M570018’と野生種 (PI124039) の交配によって得られたものであることから、栽培種と野生種ではマーカーの配列順序が異なっており、集団の一部の系統では野生種の配列順序になっているためではないかと考えられた。これを確かめるためには、野生種 (PI124039) についてもシーケンスを行い、得られた配列データについてマーカー TGS0241、TGS0271、C2_At5g49480 の位置を特定する必要があると考えられる。

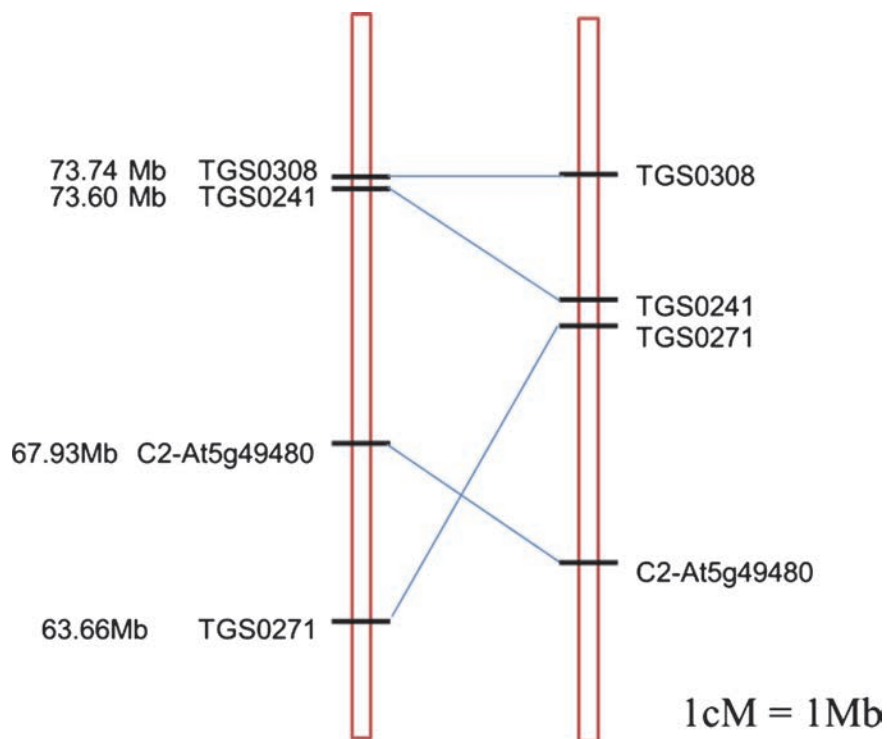


図2 配列データ上のマーカー位置 (左) と従来の連鎖地図 (右)

峯 洋子 (農学部 農学科)
 中野 玄 (大学院 農学研究科 農学専攻)
 杉山信男 (農学部 農学科)
 河緒真之 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

鉄欠乏時にキュウリ (*Cucumis sativus*) で 生成される新規ビタミン B2 誘導体 (4'-ketoriboflavin) の生成機構の解析

鉄は、植物生育の必須元素であるが、通常は不溶の酸化鉄で存在するため、鉄の還元可溶性は、植物にとって必須の過程である。稲、麦等の単子葉植物では麦根酸が発見され、酸化鉄可溶性研究は飛躍的に発展した。一方、双子葉植物では、鉄可溶性にフラビン類の関与が推定されたが、フラビン類の具体的解析は遅れていた。本研究では、新町等（1994 年）の鉄欠乏条件における双子葉植物の遊離フラビン生成報告を基に、双子葉植物で検索を行い、キュウリから未知のフラビン誘導体を見だし、NMR とマススペクトル解析から 4'-ketoriboflavin と構造決定された (*Biosci. Biotech. Biochem.* 80(2), 363-367, 2016)。

4'-ketoriboflavin は生物界で始めて生成が観察された新規ビタミン B2 誘導体で、本鉄欠乏状態でキュウリより生成されるため、強力な鉄還元活性が期待されるが、その生成代謝系は未知である。本研究は、本化合物生成代謝系を明らかにし、その多量生産系の構築を目的とする。

本化合物は、鉄欠乏条件下に生産されるが、化合物生成とキュウリの白色化とは、並行して進行する。白色化では、分解修復系の酵素タンパクが発現する可能性が大である。RNA-Seq 解析には、安定に RNA を生成する培養条件が必要なため、以下の実験 1～4) を試みた。

1) 培養条件検討：4'-ketoriboflavin は、強い酸化鉄還元活性が期待されるため、鉄欠乏状態に酸化鉄を添加し、白色化を防止する培養条件を検討した。

1 ppm Fe₂O₃ 存在下で 4'-ketoriboflavin を安定生成し、白色化を防止する培養条件が確立できた。本化合物は通常状態で生成されないため、生成に関する酵素遺伝子は、鉄欠乏条件にて瞬時発現誘導されると推定される。一方 4'-ketoriboflavin 検出には、水耕液からの抽出と HPLC 分析まで、1 両日の時間が必要となる。そこで、2) RNA 処理に対応する迅速なフラビン定量法を検討した。

2) 迅速なフラビン測定法：通常の抽出・HPLC 分析の代替として、培養液を直接蛍光分析し、簡略化 HPLC 分析（濃縮せず直接 Sepack 処理する）と組み合わせ方法を試みた。培養液を遠心処理後に直接蛍光測定することにより、培養における RNA 抽出時期を決定する。RNA 発現状態の良好な試料は、簡略化 HPLC 分析（濃縮せず直接 Sepack 処理する）により、4'-ketoriboflavin と riboflavin を分別定量する。この方法で RNA 抽出時期を迅速に決定でき、分析時間も 1/4 に短縮した。1)、2) の条件が確立できたので、次に 3) 実際の培養し、RNA 調製を試みた。

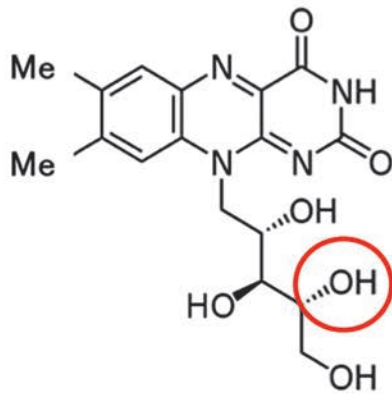
3) 培養・フラビン分析・RNA 調製：通常培養を 1 ppm Fe (EDTA キレート体)、鉄欠乏培養として 1 ppm Fe₂O₃ 存在下でキュウリ培養のフラビン生成を検討した。健康な生育状態でのキュウリの酸化鉄添加後の初期から中期培養で、通常培養に対して 4'-ketoriboflavin が 4 倍以上生成する条件を見だし、キュウリの根から RNA 抽出を行った。次にこの RNA を用いて RNA-Seq 解析を試みた。

4) RNA-Seq 解析：通常の鉄条件鉄濃度培養 1 ppm Fe (EDTA キレート体) に対して、4'-ketoriboflavin が 4 倍以上生成するキュウリ根より調製した RNA 試料を得たので、RNA-Seq 解析を行った。

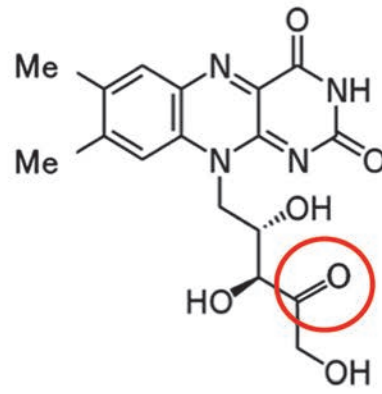
RNA-Seq 解析から、通常培養と比較して、鉄欠乏条件下にて酸化鉄添加培養時で 3 倍以上増幅さ

キュウリは Fe_2O_3 存在下で 4'-ketoRiboflavin を分泌する。

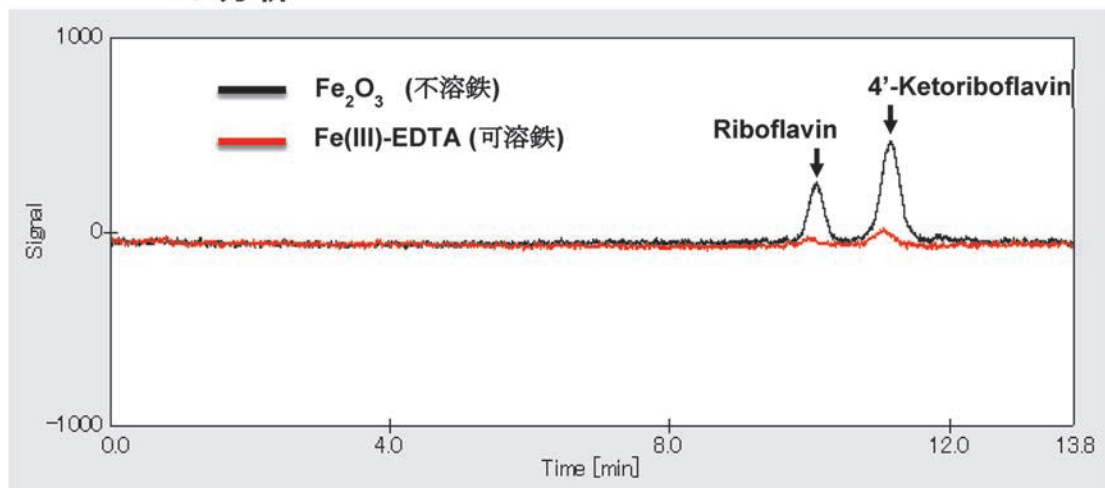
Riboflavin



4'-KetoRiboflavin



HPLC 分析



れる遺伝子で dehydrogenase 系と推定される遺伝子が、20,400 遺伝子から 7 遺伝子検出された。現在この遺伝子の発現系を大腸菌で構築中である。4'-ketoRiboflavin は新規ビタミン B2 誘導体で、その生成代謝系の詳細は不明のため、構築したタンパク発現系の大腸菌から無細胞液を作成し、riboflavin からの 4'-ketoRiboflavin 生成活性を測定する予定である。

Fe_2O_3 は地殻に多量に存在するが、安定なため、最も生物に利用されにくい鉄化合物の一つである。食用作物から分泌される 4'-ketoRiboflavin は、 Fe_2O_3 有効利用の安全な化合物として期待される。

新村洋一（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

木俣真弥（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

単子葉植物イネにおける新規アブシジン酸シグナル伝達機構の探索

アブシジン酸 (ABA) は種子の休眠を誘導・維持するとともに、乾燥や低温など種々の環境ストレス応答において中心的な役割を担っている植物ホルモンである。その作用機構は主にモデル植物であるシロイヌナズナを用いて解析されており、シロイヌナズナにおいては ABA の受容から応答性遺伝子の発現制御に至るまでの概要が明らかになっている。ABA は受容体 (PYL) と結合後、PYL の配座変化を誘起し、PYL とタンパク質脱リン酸化酵素タイプ 2C (PP2C) との複合体形成を誘導して PP2C の酵素活性を阻害する。これにより、PP2C によって不活性化されていたタンパク質リン酸化酵素が自己リン酸化によってその機能を回復し、転写因子やイオンチャネルを活性することで ABA 生理作用が誘導される。近年、他の植物においても上記 ABA 誘導性の PYL-PP2C 間相互作用が ABA シグナル伝達に関与することが報告されているが、多くの植物種において PYL にはサブタイプが複数存在するため、遺伝学的手法による解析が困難であり、生体内での ABA シグナル伝達機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。

このような背景のもと、我々はシロイヌナズナの PYL (AtPYL)-ABA 結晶構造に基づいて PYL サブタイプを網羅的に阻害する PYL アンタゴニスト (AS6、PAO4、PANH およびその構造類縁体) の創出に取り組んできた (Takeuchi et al. NCB 2014, Takeuchi et al. OBC 2015)。ABA の 3' 位方向にアルキル鎖を導入した AS6 および PAO4、4' 位方向にフェニルプロピニル基を導入した PANH はいずれも *in vitro* 試験において PYL-PP2C 間相互作用を阻害し、シロイヌナズナ種子発芽に対しても ABA 拮抗活性を示した。その一方で、単子葉植物であるイネに対しては、予想に反してそれぞれ異なる活性を示した。PAO4 は ABA 拮抗活性を示したものの、AS6 は全く活性を示さず、PANH に至ってはシロイヌナズナに対する活性とは真逆で、種子発芽と節間伸長を阻害する ABA 様の生物活性を示した (図 1)。

しかし、最近報告されたイネの PYL (OsPYL2)-ABA-OsPP2C06 の複合体結晶構造はシロイヌナ

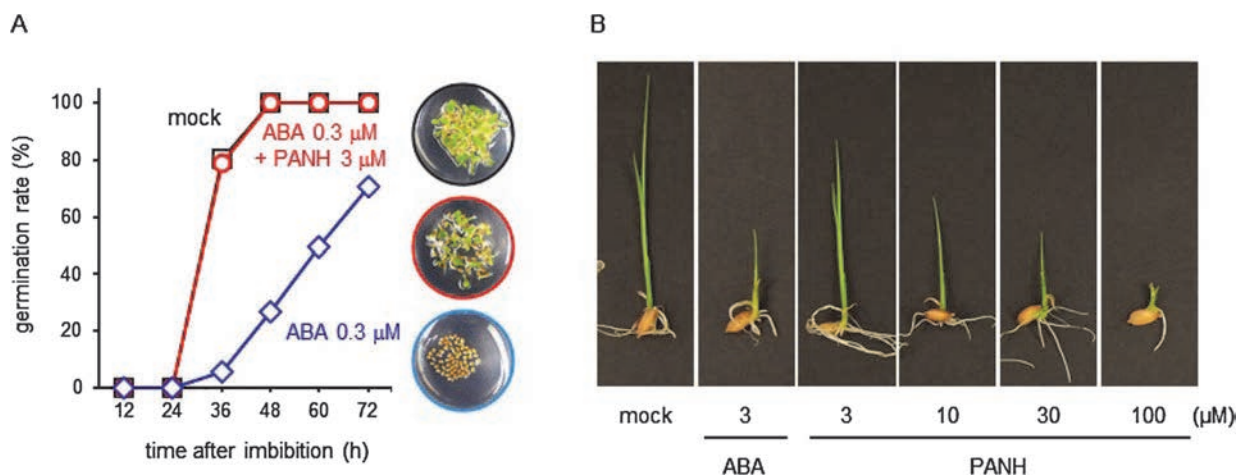


図 1 PANH の生物活性 (A) シロイヌナズナ種子発芽試験、(B) イネ第二葉鞘伸長試験

ズナの AtPYL-ABA-PP2C 結晶構造と非常に類似しており、実際に OsPYL2 と OsPP2C06 を用いた in vitro 試験においては、いずれの化合物も OsPYL アンタゴニストとして機能した。他の OsPYL サブタイプもリガンド結合ポケットを構成するアミノ酸残基は高度に保存されていることから、シロイヌナズナとイネに対する AS6、PAO4 および PANH の生物活性の相違を PYL 受容体の立体構造の差異で説明することは難しい。さらに、イネ植物体に対する PANH の ABA 様活性は、ABA の場合と同様に PAO4 によって抑制されたことから、PANH は ABA と同じシグナル伝達経路を活性化していると予想される。以上の知見から、我々は「イネにおいては PYL を介さない ABA シグナル伝達機構が存在する」可能性が高いと考えている (図 2)。

本研究では、PANH および PAO4 の標的タンパク質を未知 ABA 受容体と位置づけ、PYL 受容体を介さない新たな ABA シグナル伝達機構を解明するため、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析により標的タンパク質をコードする候補遺伝子の探索を行っている。播種後 11 日齢のイネ実生に ABA (3 μ M)、PANH 類縁体の中で最も強い ABA 様活性を示した PANSF5 (3 and 30 μ M)、PANSF5 (3 μ M)+PAO4 (30 μ M) を処理し、その際の遺伝子発現の変化を網羅的に比較解析した。ABA と PANSF5 処理で共通して発現が亢進する遺伝子を PYL 非依存的な ABA シグナル伝達に関与する候補遺伝子 A とし、さらにその中で PANSF5+PAO4 処理では発現が抑制される (無処理区に近いレベルまで発現量が低下する) 遺伝子を候補遺伝子 B とした。今後、これら候補遺伝子 A および B の詳細を解析するとともに、光親和性標識プローブを用いた化学修飾法 (直接的な標的分子の同定手法) を組み合わせることで標的同定の高精度化を図り、新規 ABA シグナル伝達機構の解明を進めていく。

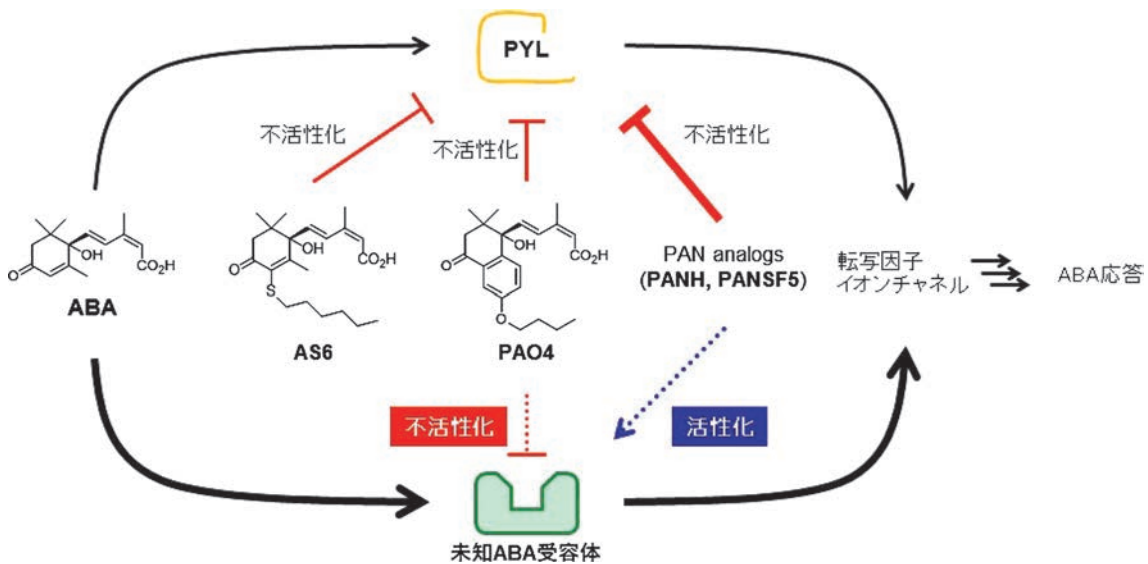


図 2 イネにおける推定 ABA シグナル伝達経路と AS6、PAO4 および PAN analogs の作用

竹内 純 (静岡大学 農学部 応用生命科学科)
 伊藤晋作 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

イネのフラボノイド型ファイトアレキシン 生産制御機構の解明

植物の防御応答のうち、代表的なものとしてファイトアレキシンの生産が挙げられる。ファイトアレキシンは、病原菌感染により植物体内で生合成され蓄積する抗菌性低分子化合物と定義づけられた化合物であり、イネにおいて多くの異なる構造体が報告されている。イネにおけるファイトアレキシン生産は、植物ホルモンのジャスモン酸（JA）を介した誘導性防御反応の1つであり、これまでに17種類の化合物がファイトアレキシンとして同定されてきた。そのうち16種類がジテルペン型、1種類がフラボノイド型の化合物である。特にジテルペン型のみミラクトンA-B、ファイトカサンA-F、ent-10-oxodepressin、およびフラボノイド型のサクラネチンは、高い抗菌活性といもち病菌に対する抗菌性から、主要なファイトアレキシンとされている。

イネのファイトアレキシンのうち唯一のフラボノイド型化合物であるサクラネチンは、その生合成の最終ステップで前駆体であるナリンゲニンが naringenin 7-O-methyltransferase (NOMT) によりメチル化されることで生産される。サクラネチンの生合成は JA シグナル要求性であり、JA 生合成変異株である *cpm2* においてはもち病菌感染や紫外線照射によるサクラネチンの生産誘導が顕著に抑制される。我々は、NOMT をコードする遺伝子として *OsNOMT* を同定し、最終産物のサクラネチンの生産と同様、JA 要求性の発現を示すことを明らかにしている。さらに、*OsNOMT* の発現誘導に着目することで、JA 要求性のサクラネチン生産制御メカニズムの解明を目指し、その制御因子

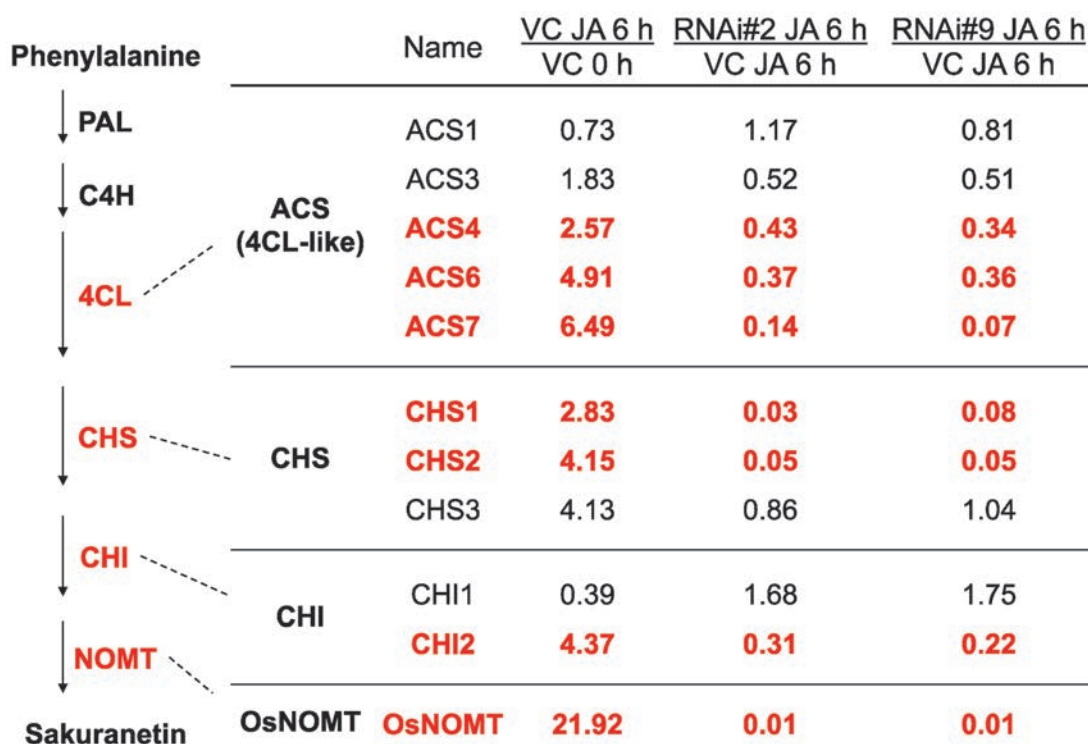


図1 OsMYC2はサクラネチン生合成経路の下流を担うフラボノイド遺伝子群の発現を活性化する。

の探索を進めてきた。過去に行われた JA 要求性のマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析から選抜された転写因子のうち、*OsNOMT* のプロモーター活性を顕著に上昇させる転写因子として、JA シグナル伝達のマスター転写因子として知られる bHLH 型転写因子の *OsMYC2* が得られた。さらに *OsMYC2* の抑制株の解析を進め、*OsMYC2* が JA 要求性を示す *OsNOMT* の発現およびサクラネチンの生産に対し中心的な役割を担っていることが示された。そこで、*OsMYC2* 抑制株を用いた RNA-seq 解析を行うことで、*OsMYC2* がサクラネチン生合成遺伝子の発現誘導に及ぼす影響を網羅的に解析した。その結果、サクラネチンの生合成に至る上流のフラボノイド生合成経路のうち、Coumaric acid lyase (4CL)、Chalcone synthase (CHS)、Chalcone isomerase (CHI) の一連の酵素遺伝子の発現が、*OsNOMT* の発現変動と同じく *OsMYC2* に強く依存していることがわかった。このことは、*OsMYC2* がフラボノイド生合成経路上の特に後半を担う遺伝子の制御に関わることを示している。また、*OsMYC2* は同種の転写因子であり JA 誘導性の *OsMYL1* と物理的に相互作用することで、*OsNOMT* の転写活性化の増強を引き起こすことも明らかにしたが、*OsMYL1* の JA による発現誘導にも、*OsMYC2* が必須あることも RNA-seq の結果から示された。このように、*OsMYC2* による JA 依存的なサクラネチン生産誘導においては、*OsMYL1* との相互作用を介した制御が重要な役割を果たし、また、フラボノイド生合成経路の後半を構成する遺伝子群への発現誘導によって、病害抵抗性時の迅速かつ十分な量のサクラネチン生産を可能にしていることが考えられる。

以上のように、イネ *OsMYC2* 抑制株の RNA-seq 解析により、サクラネチン生産の最終ステップを担う酵素遺伝子 *OsNOMT* だけでなく、付随する上流フラボノイド生合成経路の遺伝子やさらに制御を担う転写制御因子の役割を明らかにすることができ、サクラネチン生産制御機構の全貌解明に向けた大きな一歩を踏み出したと言える。

辻井良政 (応用生物科学部 生物応用化学科)

ナチュラルバリエーションを利用した 植物の環境ストレス耐性の解明

高温・乾燥・塩の集積は作物の生長や収量に大きな影響を及ぼす重大なストレスです。地球規模では、ここ 30 年の温度上昇により、主要穀物である小麦やトウモロコシの収量が 3-5%減少したと報告されており (Lobell *et al.*, 2011 *Science*)、今後安定した食糧供給を望む上でも、植物の環境ストレス耐性の解明、耐性植物の作出が植物科学の重要な課題とされています。

これまでに多くの植物生理に関する分子レベルでの知見が、モデル植物のシロイヌナズナを中心に明らかとなってきました。高温ストレス応答に関しては、耐性に必須の遺伝子群の他、耐性を付与することの出来る遺伝子も明らかとなり、申請者らの研究を含め、いくつかの高温耐性植物が作出されています (Higashi *et al.*, 2013 *Molecular Plant*)。現在、モデル植物から得られた研究成果を基に耐性作物の作出が進められていますが、未だ応用面で十分な成果を得られるまで至っていません。一方、自然界には高温に対して極めて高い耐性を示す植物が存在します。このような実際に高い耐性を示す植物のメカニズムは非常に興味深いものの、これまでに全く明らかにされていません。

近年、シークエンサーなどの科学技術の発展により、ナチュラルバリエーションを用いた分子遺伝学的な解析が可能となってきました。シロイヌナズナは、日本にも自生種が数種類あるように、世界中に 1000 を超える accession (エコタイプ) が存在し、ストレス耐性に大きなバリエーションが観察されることが明らかとなってきました。申請者らの先行研究においてシロイヌナズナ 170 accessions の高温耐性を評価したところ、高温耐性についてもバリエーションを示し、高い耐性を示す accessions、あるいは高感受性を示す accessions を見出しました (挿入図参照)。得られた耐

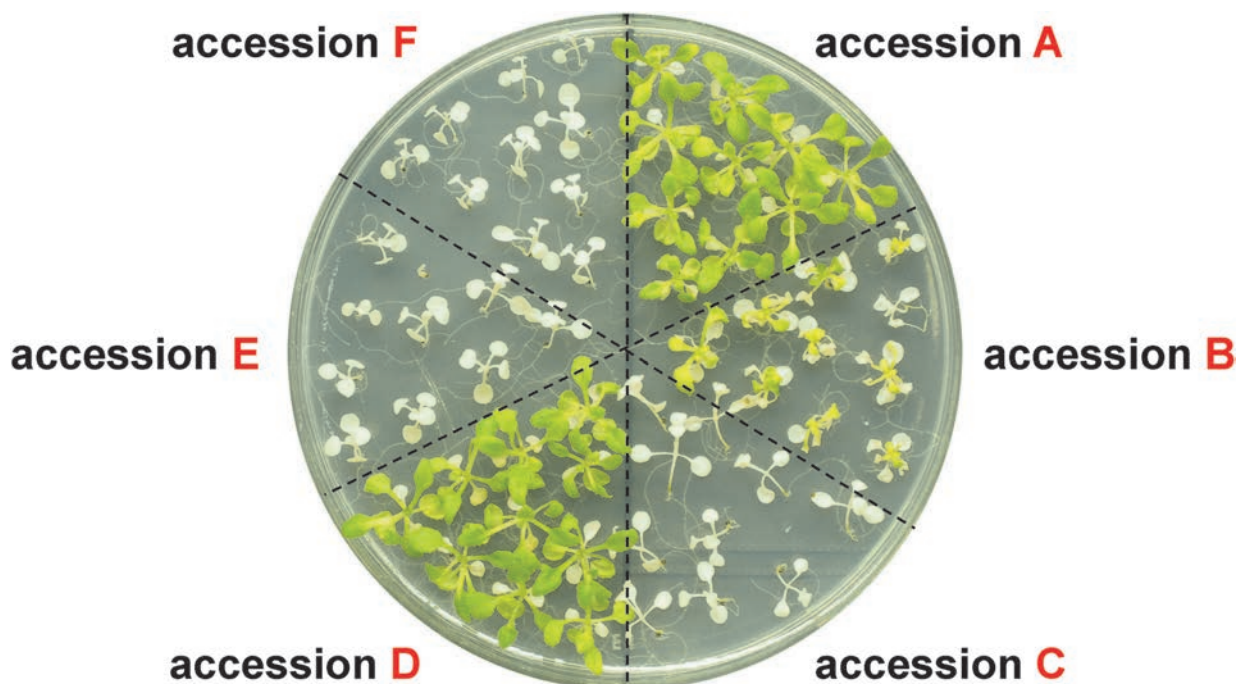


図 シロイヌナズナ accession 間における高温耐性バリエーション

性結果を基に、Genome-Wide Association Study (GWAS) を行ったところ、閾値を超えて相関を示すゲノム領域は検出されなかったことから、シロイヌナズナの高温耐性は accession によって寄与する遺伝子座が異なる、あるいは複数の遺伝子座が関与する複雑なメカニズムであることが示唆されました。実際にこれまでいくつかの高温耐性 accession における原因遺伝子座を調べたところ、それぞれ異なる遺伝子座が寄与していることが明らかとなりました。現在、原因遺伝子座が異なることが分かったいくつかの耐性 accession について、高感受性 accession を 3～4 回掛け戻すことにより、Near Isogenic Lines (NILs) を作出し、原因遺伝子座の絞り込みを行っています。原因遺伝子座の絞り込みにはマーカーの整備が重要であること、また原因遺伝子の特定には耐性 accession と高感受性 accession の多型を知る必要があることから、それぞれの accession についてゲノムシーケンスを行いました。作成した NIL は原因遺伝子座のみが耐性 accession 由来で、その他は高感受性 accession 由来のゲノムとなっており、原因遺伝子座のみの影響を調べることが可能です。そこで、その高温耐性メカニズムを明らかにするため、高温耐性 NIL と掛け戻しに用いた高感受性 accession を RNA-seq 解析し、網羅的な遺伝子発現の違いを調べています。

これまでに自然界で見られる高温耐性を制御する遺伝子を同定した例はなく、その同定は極めて高いインパクトを与える成果となります。また、その成果は耐性作物の作出に繋がると期待されます。

太治輝昭（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

Brassica rapa ssp. *rapa* cv. 77B の核遺伝子型 雄性不稔性を支配する遺伝子の同定

カブ (*Brassica rapa* L. ssp. *rapa*) は、ハクサイ (ssp. *pekinensis*) やミズナ (ssp. *japonica*) などと同種であり、アブラナ科ブラシカ属に分類される日本人にとって馴染み深い野菜のひとつです。漬物や煮物に向くことから日本各地で在来品種が分化を遂げ、多様な色や形の品種が存在しています。私たちの研究室では、これまでに固定種である在来カブの遺伝的類縁関係に関する研究を進める中で、雄性不稔性を示す個体を見出してきました。雄性不稔性とは、植物の生殖器官において雌ずいは正常に機能するのに対して、雄ずいが欠如したり花粉が発育を止めて退化する現象であり、アブラナ科植物をはじめ雑種強勢を利用した一代雑種育種においては、 F_1 種子の効率的な採種技術の確立に用いられる形質です。例えば、母本（種子親）に雄性不稔個体を使うことにより、自家受精を防ぐための除雄作業を省けるため、効率よく F_1 種子を生産できることになります。

当研究室で見出した雄性不稔性を示すカブ品種“77B”は、遺伝学的解析から、雄性不稔形質が核の劣性一遺伝子によって支配される核遺伝子型雄性不稔性であることが明らかとなっています。また、本雄性不稔性の表現型は、雄ずいに葯が全くみられないものであり、雄性可稔個体と明瞭に区別できるものでした (Fig. 1)。さらに、蕾の発達過程の組織学的観察より、品種“77B”の雄性不稔花の花粉は葯内において発達段階初期に消失することが示され、その結果として葯全体が退化し消失することが推察されました。

Brassica rapa では 2011 年にハクサイ (ssp. *pekinensis*) の全ゲノム配列が公開されています (Wang et al., 2011 *Nat Genet*)。私たちは、公開ゲノム配列をリファレンスとして次世代ゲノムシーケンサー (NGS) を用いた品種“77B”および品種“津田カブ”のゲノム解読を行い、ゲノムワイドな SNP マーカーの獲得を試みるとともに、MutMap 法 (Abe et al., 2012 *Nat Biotech*) を用いた遺伝子同定を目指します。具体的には、“77B”および“津田カブ”間の F_1 個体の自殖により作成した F_2 集団に対し、雄性不稔性を指標にフェノタイピングを行い、稔性個体および不稔個体のバルク集団を作成しました。その集団から得たバルクゲノム DNA に対し NGS を用いた SNP 解析を行い、



Fig. 1 カブ品種“77B”の雄性可稔（左）および雄性不稔個体（右）の表現型。

雄性不稔形質と強い相関を示す SNP の同定を試みます。その後、同定された SNP を含む遺伝子に対し、形質転換体を用いた遺伝子相補を含む証明実験を行い“77B”の核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子を同定します (Fig. 2)。

両親個体および各 F₂ バルク DNA のシーケンスを行い、MutMap 法を用いた解析を行ったところ、雄性不稔形質と強い相関を示す領域が、第 10 番染色体にのみ見出されたことから、この領域内に雄性不稔形質の原因遺伝子があることが強く示唆されました。MutMap 解析から見出された領域は、高密度に遺伝子が座乗する領域であったことから、該当領域に複数の CAPS マーカーを設計し、約 100 系統の F₂ 集団を対象に相関解析を進めています。

遺伝的雄性不稔性は、核遺伝子のみで支配される核遺伝子型雄性不稔と細胞質遺伝子の働きで起こる細胞質雄性不稔に大別され、アブラナ科における一代雑種育種においては雄性不稔個体の獲得効率から細胞質雄性不稔のみが用いられますが、その分子メカニズムは十分に分かっていません。本研究において核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子が同定されることで、当該雄性不稔のみならず細胞質雄性不稔の機構解析の進展が期待できるとともに、植物の花粉形成に関わる分子生物学的機構解明の一助となるものと考えています。

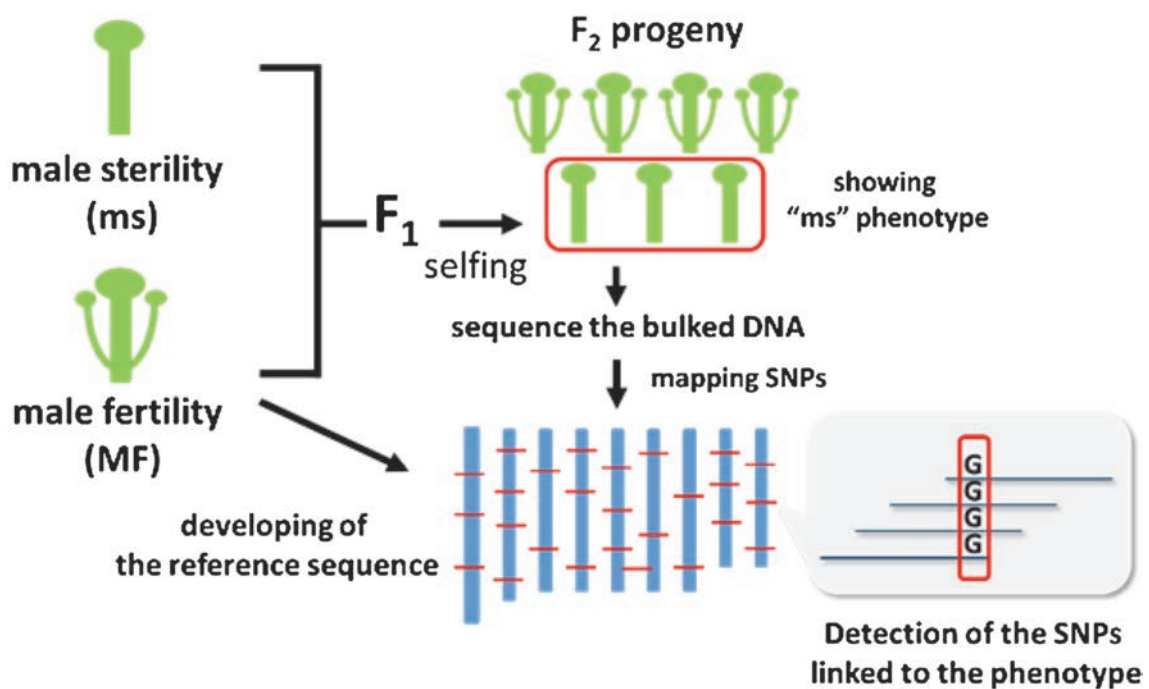


Fig. 2 MutMap 法による遺伝子同定の流れ

和久井健司 (短期大学部 生物生産技術学科)

小松憲治 (短期大学部 生物生産技術学科)

Brassica juncea 在来品種の系統解析と 亜種識別マーカーの開発

カラシナ・タカナ類 (*Brassica juncea*) は中央アジアを原産地とするアブラナ科に属する一・二年生草本です。変化に富んだ多くの品種・系統が地域在来品種として国内外に存在し、形質の特性によって野菜用、油料用、香辛料用として利用されています。特に油料用、香辛料用のものはインドとヨーロッパで、野菜用は主に中国で分化が進んだといわれています。日本においても在来品種が存在する一方で、戦後中国より導入された品種が各地域に根ざした品種として栽培されています。こうした国内外の品種・系統は将来的な品種育成のための有用遺伝資源として期待されるものです。

カラシナ・タカナ類は、形態のおよび生態的特長から、葉カラシナ類・根カラシナ類・タカナ類・多肉性タカナ類・莖用タカナ類・アザミナ類などに分類されており、種内はさらに亜種としてグルーピングされています。しかしながら、その一方で亜種間の差異が明確に示されていないことから、探索・収集により新たに見出されたカラシナ・タカナ類を既存の分類体系に当てはめることは容易ではありません。私たちは現在ミャンマーを中心にアジアにおけるカラシナ・タカナ類の遺伝資源収集を進めており、前述の問題を克服し収集系統を今後効率的に育種現場で利用するために、収集系統の遺伝的差異を評価し系統の違いを簡易に識別する手法の必要性を感じています。そのためにカラシナ・タカナ類品種および系統を識別する DNA マーカー (SSR マーカー) の構築を目指し、マーカースクリーニングのための品種・系統グルーピングを目的として、RAD-seq によるゲノムワイドな品種・系統関係の推定を試みました。

供試材料としてジーンバンク保存のカラシナ・タカナ類 20 系統 (日本在来 11 及び中国 9 品種) およびミャンマーより収集 (2015 年度) した 4 系統 (内、1 系統はアウトグループとして *B. oleracea* カイラン) を用いました。各品種・系統 1 個体より抽出した DNA を用い RAD-seq を行い、全体で得られた 16,656 個の多型について、多型箇所の塩基を集め、サンプルごとに一つの配列としてまとめたものを、MEGA を用いて系統樹を構築し系統関係を推定しました。

その結果、近隣接合法を用いた系統樹において 1 つの小グループと大きな 2 グループに分類された一方、カイランは大きくアウトグループとして分けられました (Fig. 1)。大グループの 1 つは、その中で中国品種のタカナ類と日本品種のカラシナ類の 2 つの小グループに分かれる傾向がみられました。もう一方の大グループは、日中品種混在のタカナ類とカラシナ・タカナ混在の日本品種グループに分けられました。2 つの大グループから分かれた小グループには、日中 1 品種ずつとミャンマー 2 品種が含まれた。以上のことから、日本および中国の品種間の遺伝的差異が小さいこと、さらには、現行用いられているカラシナおよびタカナの呼称に基づく分類が遺伝的差異を反映していない可能性が示唆されました。現在、各グループ間の遺伝距離が亜種としての遺伝的分化を含むものであるか否かを推定するために、同属他種の品種を加え、さらにミャンマー収集系統を含め、同様の解析を進めています。

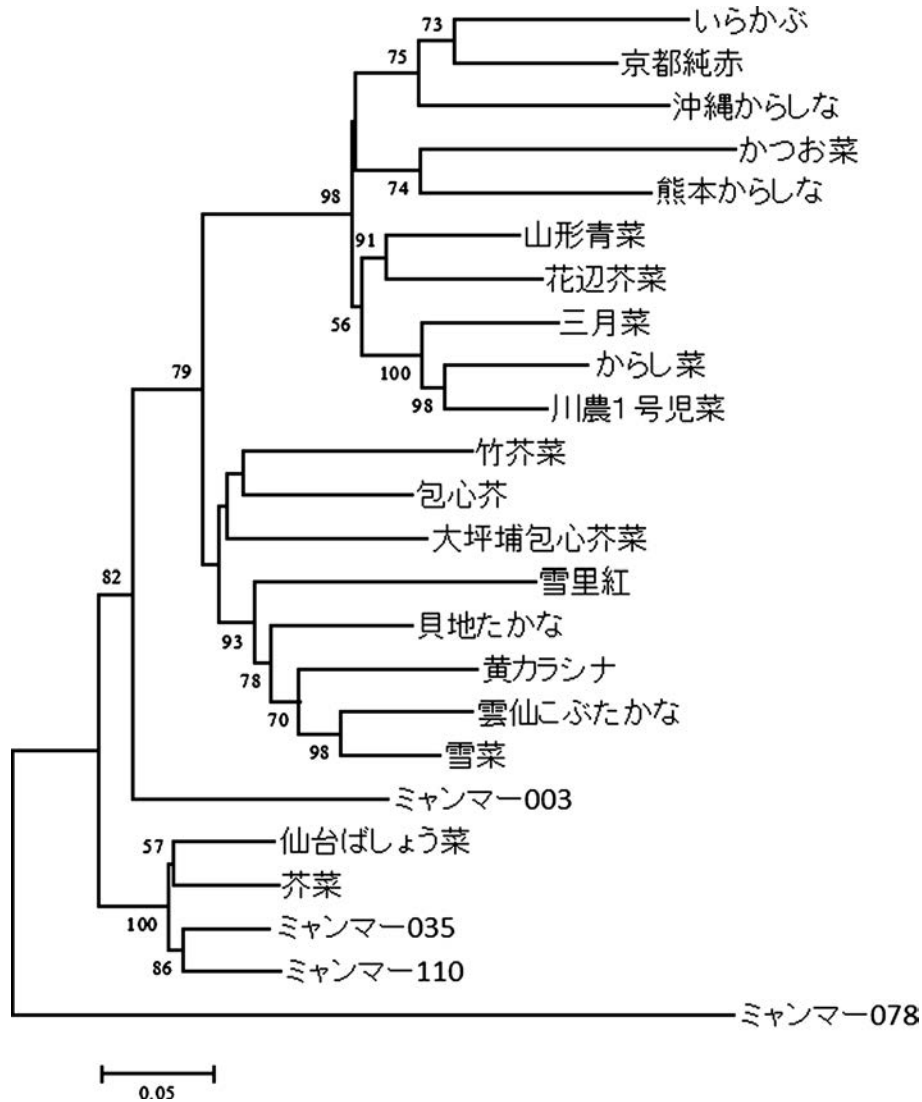


Fig. 1 カラシナ・タカナ品種・系統の類縁関係の推定。

和久井健司 (短期大学部 生物生産技術学科)
 入江憲治 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

清酒酵母における有機酸生成低減変異株の 網羅的遺伝子発現解析

清酒の呈味を決定する因子には、糖、アミノ酸、有機酸等が知られている。我々はこれまでに酒質の多様化を目的とし、清酒酵母 K901 を親株に呼吸阻害剤である 2,4-dinitrophenol (DNP) に耐性を示し有機酸生成量に顕著な差がみられる変異株を多数取得している。中でも DNPR89 は YM10 培地（グルコース 10% を含む YM 培地）においてエタノール生成能は親株である K901 とほぼ同等であるのに対して、有機酸生成量は親株と比較して酢酸は 41.3%、リンゴ酸は 29.4%、コハク酸は 61.4% に低下した（図 1）。DNPR89 は商品化にも利用された変異株であり、実際の醸造時にも低い有機酸生成能を示し親株とは異なる呈味を示すことが明らかとなっている。本研究では RNA-seq 法により網羅的に転写量を比較解析することで YM10 培地における DNPR89 の低有機酸生成機構の解明を試みた。

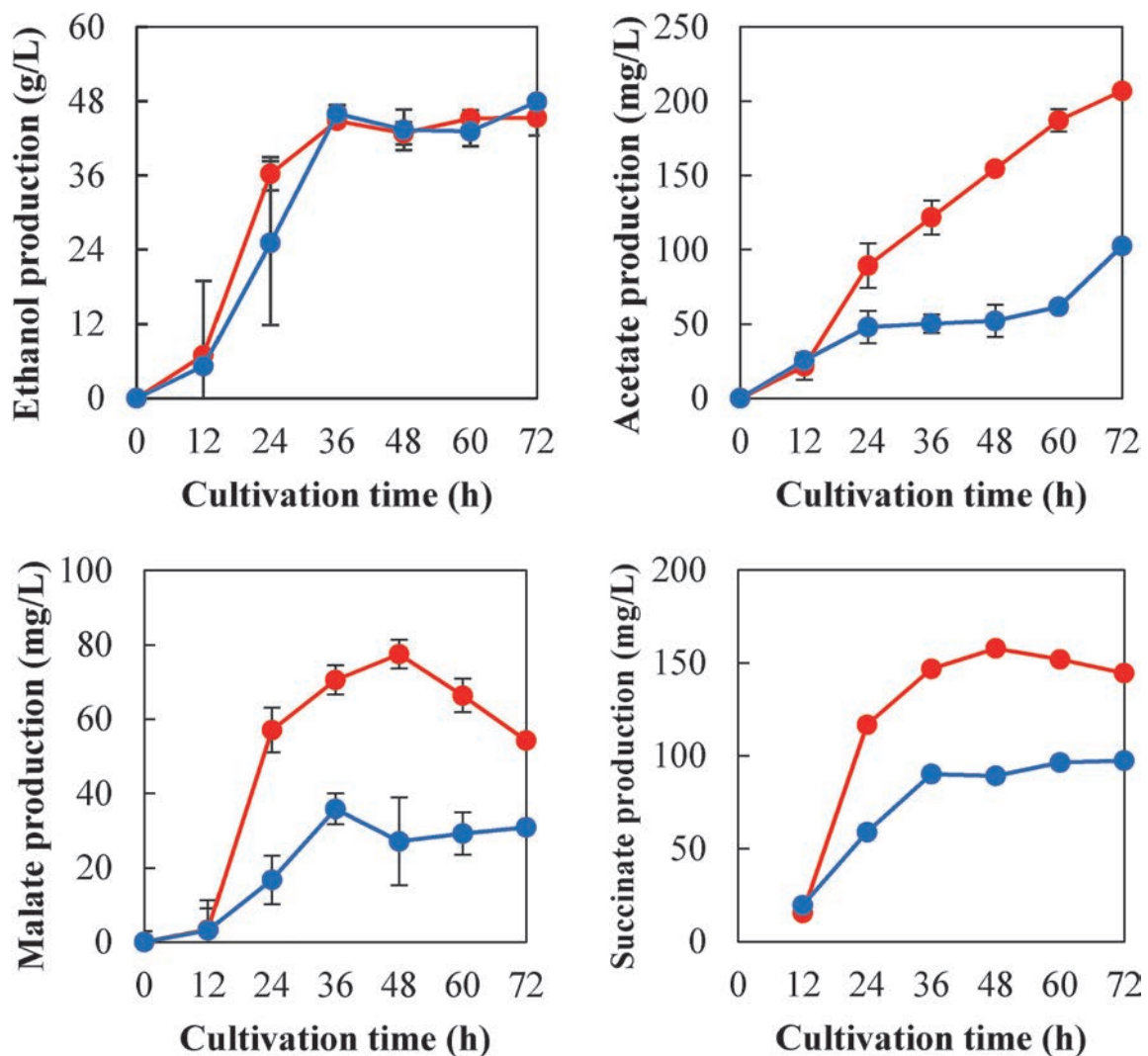


図 1 親株 K901 (赤色) と変異株 DNPR89 (青色) のエタノール、酢酸、リンゴ酸、コハク酸生成量の経時変化。

酢酸生合成に関して、細胞質においてアセトアルデヒドを酢酸に変換する *ALD6* (Aldehyde dehydrogenase) の DNPR89 における転写量は親株と比較して 47% に低下しており、その酵素活性も 62% に低下していた。また、ミトコンドリアにおいてアセトアルデヒドを酢酸に変換する *ALD4* の発現量も 45% に低下しており生合成に関与する遺伝子群の転写量の減少が確認された。一方、酢酸代謝に関連し酢酸を Acetyl CoA に変換する *ACS1* と *ACS2* (Acetyl-coA synthetase) の転写量もそれぞれ 68% と 60% に低下していた。酢酸を唯一の炭素源とした時の DNPR89 の生育能を調べたところ、親株と比較して顕著に生育能が低下していた。以上のことから、酢酸生成能の低下は活発な酢酸代謝の結果ではなく、酢酸の生合成能の低下によることが推察された。リンゴ酸やコハク酸に生合成に直接生合成に関与する TCA サイクルにおける *ACO1* (Aconitase) や *KGD1*、*KGD2* (α -Ketoglutarate dehydrogenase) の発現量が低下していたことから、TCA サイクルの酸化的経路が低下することによりその生成量が低下することが示唆された。一方、変異株 DNPR89 においては α -ケトグルタル酸をミトコンドリアから細胞質へ輸送する *ODC2* (Mitochondrial 2-oxodicarboxylate transporter) と α -ケトグルタル酸をグルタミン酸へと変換する *GDH1* (Glutamate dehydrogenase) が高発現していた。このことは、変異株においては TCA サイクルで生成される α -ケトグルタル酸が活発に細胞質へと輸送されグルタミン酸へと変換されるため、 α -ケトグルタル酸以降の TCA サイクルへ供給されないためコハク酸やリンゴ酸が相対的に減少することが示唆された。また、DNPR89 ではアミノ酸取り込みに関与するトランスポーターである *DIP5* (Dicarboxylic amino acid permease) の発現量も低下していた。*ODC2* と *GDH1* により細胞内のアミノ酸が十分にあるため細胞外からのアミノ酸取り込み能を低下させているか、あるいはアミノ酸取り込み能が低下することで *ODC2* と *GDH1* を高発現させることで不足するアミノ酸を供給しているいずれかの可能性が考えられた。以上の様に、有機酸生成機構とアミノ酸代謝機構に相関性があることが示唆された。

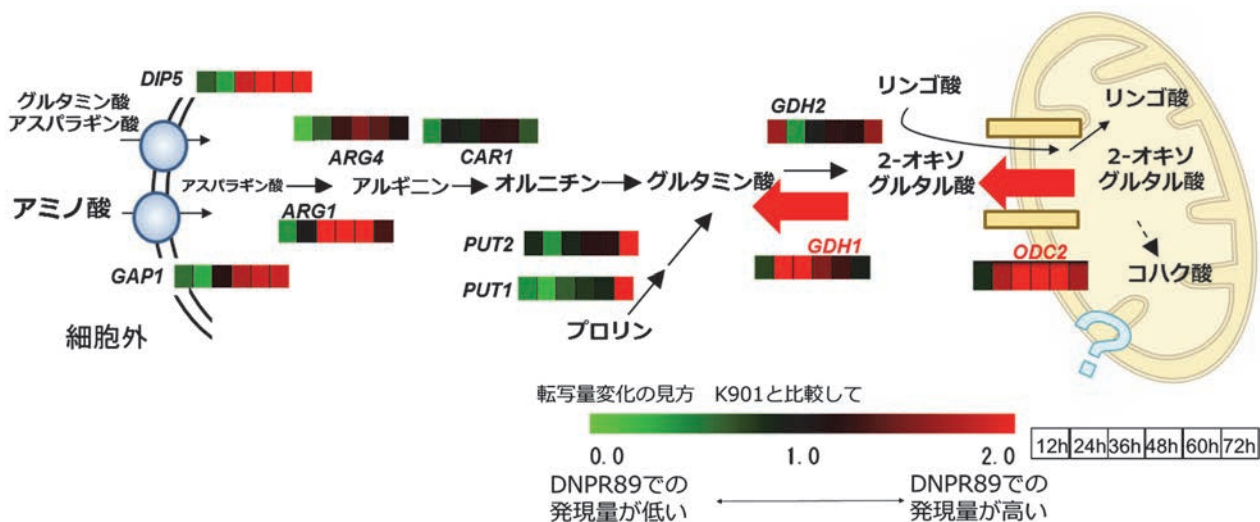


図2 アミノ酸取り込み系と TCA サイクルとを連結する遺伝子群の継時的な転写比較解析。赤は変異株 DNPR89 で高発現、緑は変異株 DNPR89 で低発現を示す。

酢酸菌における活性酸素種の発生および応答生理

酢酸菌は食酢醸造に用いられる産業用微生物である。本菌は、エタノール存在下では酢酸発酵を行い、エタノールを酢酸に変換する。これを応用した技術が食酢醸造であり、世界中の食酢は酢酸菌の行なうこの酢酸発酵により製造されている。

酢酸発酵とは、菌にとっては好氣的なエネルギー獲得手段のことである。本菌は、細胞膜上にアルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素を持ち、これにより細胞外のエタノールを酸化して酢酸を生成する。この酸化反応は同様に細胞膜上に存在する電子伝達系と連動しており、酸化により基質から遊離した電子の酸素への運搬と共役して最終的に ATP を生成する。従って、酒類のようなエタノール溶液中に酢酸菌を添加すると、菌体増殖に伴って酒が酢へと変化していく。また、本菌は解糖系や TCA サイクルを介する通常の好氣的エネルギー代謝も行なうことができ、これにより自身が生成した酢酸を細胞内に取り込んでアセチル-CoA とした後に TCA サイクルを経て完全酸化し、連動して ATP を生成するという生理も示す。これは酢酸の過酸化現象と呼ばれており、この酢酸発酵と酢酸過酸化の二種類のエネルギー獲得方法により、酢酸菌はエタノール存在下では特徴的な二段階の生育挙動を示す。

このように酢酸菌は、他の細菌では見られないユニークなエネルギー獲得戦略を有しているが、いずれにしても電子伝達系を介する好氣的な ATP 獲得であるため、電子伝達系の活動により副生成物として活性酸素種が発生することが予想される。本菌は上記の生理より、他の細菌における好気代謝よりも活発に電子伝達系を駆動していることが予想され、活性酸素種の発生量も通常の好気代謝より多いことが推測されるが、活性酸素種に対する応答生理を含め、酢酸菌と活性酸素種の関連については不明な部分が多い。活性酸素種は、その高い反応性より細胞毒性が強いが、酸素を電子受容体とする電子伝達系を介した ATP 生成を行なう生物では、宿命的に発生する物質であることが知られている。このため、酢酸菌における活性酸素種の発生とそれに対する応答生理は、食酢醸造のメカニズムを考える上で興味深い。

我々は、酢酸菌の発酵生理について、諸々の条件で RNA-seq 解析を行なうことにより多面的に調べているが、本解析により得られたデータから活性酸素種との関連を示唆する知見も得られている。RNA-seq 解析以前から、*Acetobacter* 属の酢酸菌においては、酢酸発酵期よりも酢酸過酸化期にスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼが盛んに誘導されることが既に判明していたが、生育時期を追った RNA-seq 解析により、その他の活性酸素種消去系因子も殆ど酢酸過酸化期に多く発現していることが分かった。このことは、同じ電子伝達系を介する二種類の好氣的な ATP 生成のうち、過酸化期の生成様式の方がより活性酸素種を生じやすいという可能性を示している。また、同時期には消去系因子以外にも活性酸素種との関係が示唆される因子も高発現しており、この因子と活性酸素種耐性との関連を調べた結果、本菌において重要な機能を有することが確認された。

以上のように、酢酸菌の RNA-seq 解析により、菌体の代謝フローの特徴のみならず、付随する菌体生理の特徴および関連因子群を明らかにすることができ、より食酢醸造メカニズムの真の姿に近づくことができたと考えている。

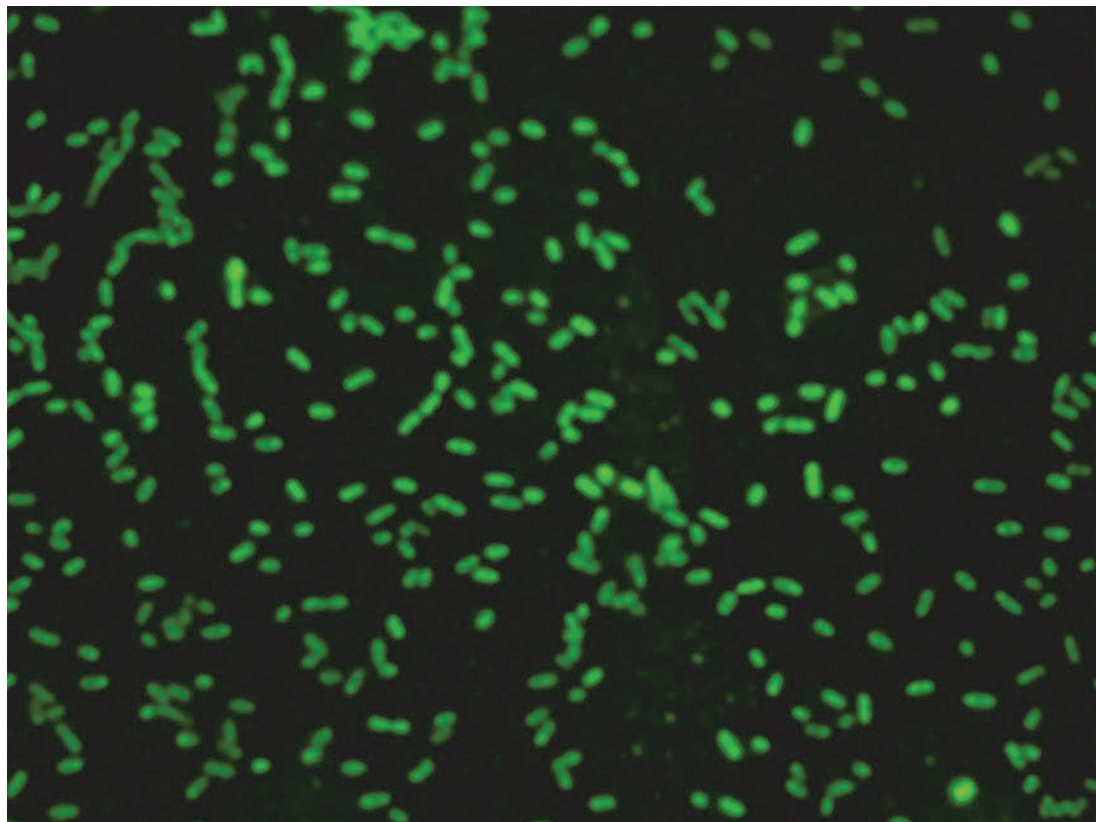


図1 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株の細胞内 H₂O₂ 蓄積状況の蛍光イメージング

貝沼章子（応用生物科学部 醸造科学科）
石川森夫（応用生物科学部 醸造科学科）
鈴木敏弘（応用生物科学部 醸造科学科）
吉川博文（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）
兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）



ビタミン B₁₂ 欠乏による *Lactobacillus delbrueckii* の挙動



Lactobacillus delbrueckii はヨーグルトで著名な乳酸菌であるが、他にもビタミン B₁₂ のバイオアッセイに用いられる乳酸菌でもある。*L. delbrueckii* は乳酸菌の中でも珍しいビタミン B₁₂ 要求性であり、不足すると当然増殖はできないが、それに加えて通常では見られない菌糸のように伸長した形態になる。通常の形態は 5～10 μm の桿菌だが、伸長すると数十 μm, 長いものは 100 μm にもなる (図 1)。この伸長細胞はビタミン B₁₂ が与えられると細胞分裂を開始し、再び桿菌になる。

本菌種を使ったビタミン B₁₂ のバイオアッセイは食品のビタミン B₁₂ 定量の世界的な標準方法であるが、吸光度を目的変数にして作成される検量線は不安定さ (再現性の低さ) が長年問題となっている。その原因はいまだ明らかにされていないが、ビタミン B₁₂ の不足によって伸長する性質上、細胞のサイズが不均一であることや、他の持ち込み成分の影響等が考えられる。また、バイオアッセイの他にも、生育が濃度依存的である性質を利用して発酵を制御する方法も開発された。

L. delbrueckii のビタミン B₁₂ に対する挙動は興味深く、また、扱い方によっては有用な特性でもある。しかし、そのビタミン B₁₂ が *L. delbrueckii* の何に作用しているのかについては全くわかって



図 1 伸長細胞の SEM の写真

いない。ヒトを始めとする高等生物はメチオニン合成系に欠かせないが、*L. delbrueckii* にはその合成系は存在しない。そこで筆者はこれまで様々な条件で作用点を検討し、ビタミン B₁₂ が関与する可能性のあるいくつかの代謝系の推定はしたが、明確な答えを得るには至っていない。また、ビタミン B₁₂ が欠乏したときの伸長細胞の細胞学的特性も様々な手法で検討してきた。図 2 に示すとおり、伸長細胞に DNA は存在するものの一般的な細胞のように全体に等分配されていることは無く、あっても一部に分配されている様子が見られるものや一カ所にのみ DNA があるようなものが観察されている。このとき細胞膜単位での分裂もみられない。加えて、主として細胞分裂に関連する遺伝子の発現についても検討し、ビタミン B₁₂ が欠乏しても隔壁形成に主要な役割を果たす *ftsZ* 遺伝子は発現し、細胞伸長に関与する *mreB* 遺伝子も発現していることはわかっている。定性的には通常細胞と伸長細胞の間ではこれら遺伝子の発現に違いは無いが、定量的なデータにおいては若干の違いがあり、これが影響している可能性はあるがこれもしっかりとした結論に至ることはできていない。

以上のように、*L. delbrueckii* におけるビタミン B₁₂ の作用点を明らかにすべく、ビタミン B₁₂ 欠乏時の伸長細胞やそのときの挙動について情報は集まってきている。これら点の情報を総合的に理解するため、点をネットワークのようにつなげ、細胞の全体像を新たな視点から理解し、ビタミン B₁₂ の作用点について新たな知見を得ることを期待し、*L. delbrueckii* のビタミン B₁₂ の有無による発現の変動を RNA-Seq により解析している。

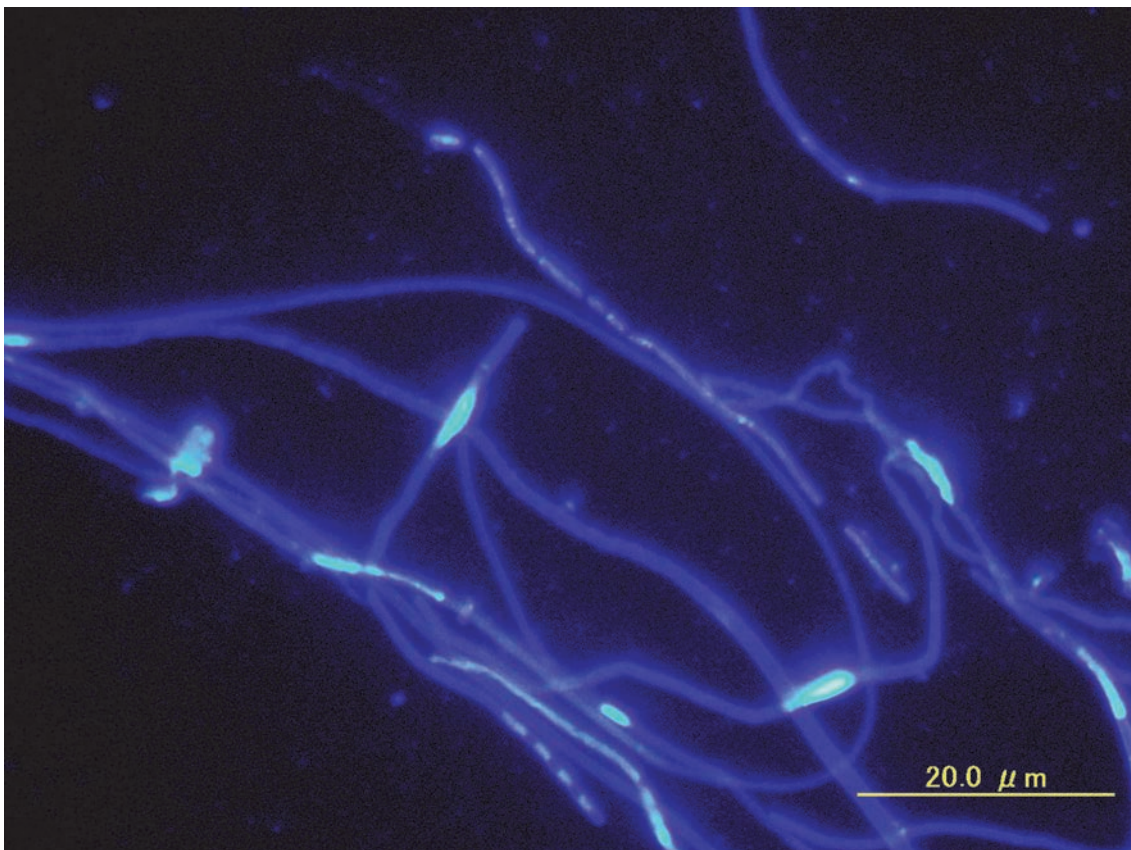


図 2 伸長細胞の DAPI 染色

田中尚人（応用生物科学部 菌株保存室）

単細胞性真核紅藻における複製開始点の同定

細胞は細胞周期あたり一度の DNA 複製を行うことでゲノムコピー数を正確に維持している。DNA の複製開始は厳密に制御されており、動物細胞では複製制御の破綻によりがんを引き起こされることが知られている。DNA 複製の開始制御は酵母や動物細胞を材料として研究が進められてきたが、光合成を行う藻類や植物では複製開始の分子メカニズムは不明である。これは倍数性が高く、高度に分化した植物細胞では複製のタイミングを揃えるのが困難なことが一因である。このような背景の下、我々は高温、強酸性の温泉に生息する単細胞性真核紅藻である *Cyanidioschyzon merolae* (以下シゾン) に着目した (図 1)。シゾンの細胞構造は核、ミトコンドリア、葉緑体をそれぞれ一つずつと非常にシンプルであり、ゲノムサイズが小さく (16.5 Mbp) 遺伝子重複が少ない、明暗処理により簡便かつ高度に細胞周期を同調できる等、複製研究に適した特徴を有している。

酵母や動物細胞の複製開始は複製開始点を認識するタンパク質複合体 ORC に依存して制御される (図 2)。シゾンにおいても ORC 複合体を解析することで、複製開始点を絞り込むことができると考えた。シゾン染色体にコードされている 3 つの ORC 相同遺伝子のうち、ORC2 タンパク質に HA タグを付加したシゾン株 (ORC2-HA 発現株) を新規に構築した。次に ORC2-HA 発現株より抗 HA 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を用いて ORC2 結合配列を取得し、次世代シーケンサーにより解析した。現在、ORC2 の結合が示唆された領域について、さらなる検証を進めている。

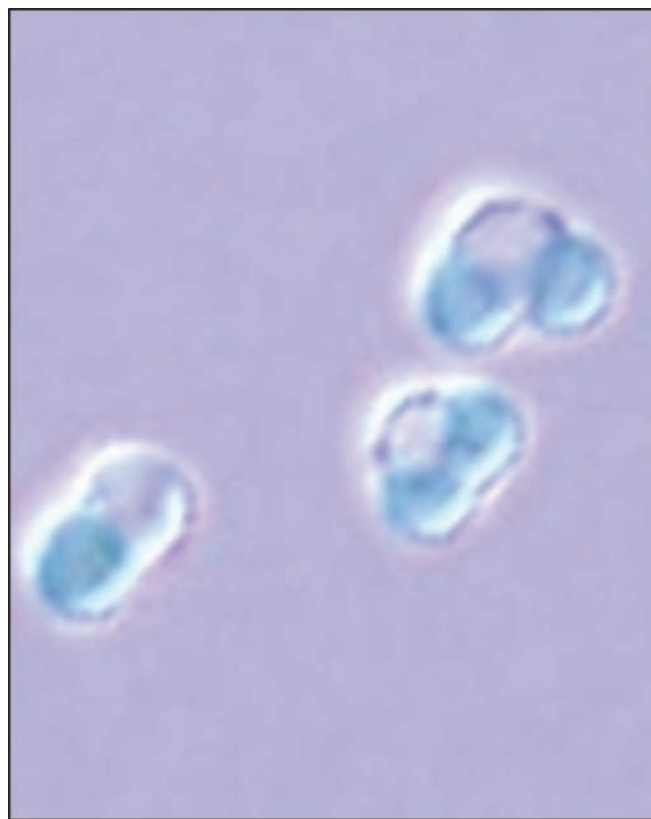


図 1 *Cyanidioschyzon merolae* (シゾン) の顕微鏡写真。緑色の箇所に葉緑体があり、透明な部分には核やミトコンドリアが局在している。左は分裂前 (S 期)、右は分裂中 (G2/M 期) の細胞である。

原始的な細胞構造、ゲノムを有するシズンは植物の進化の歴史上、初期に分岐した生物であり、高等生物における生理機構の原型を持っていると考えられる。これまでシズンを用いた研究から植物のみならず真核生物に普遍的な細胞機能が新規に見出されており、DNA 複製制御においても新たな発見が期待できる。

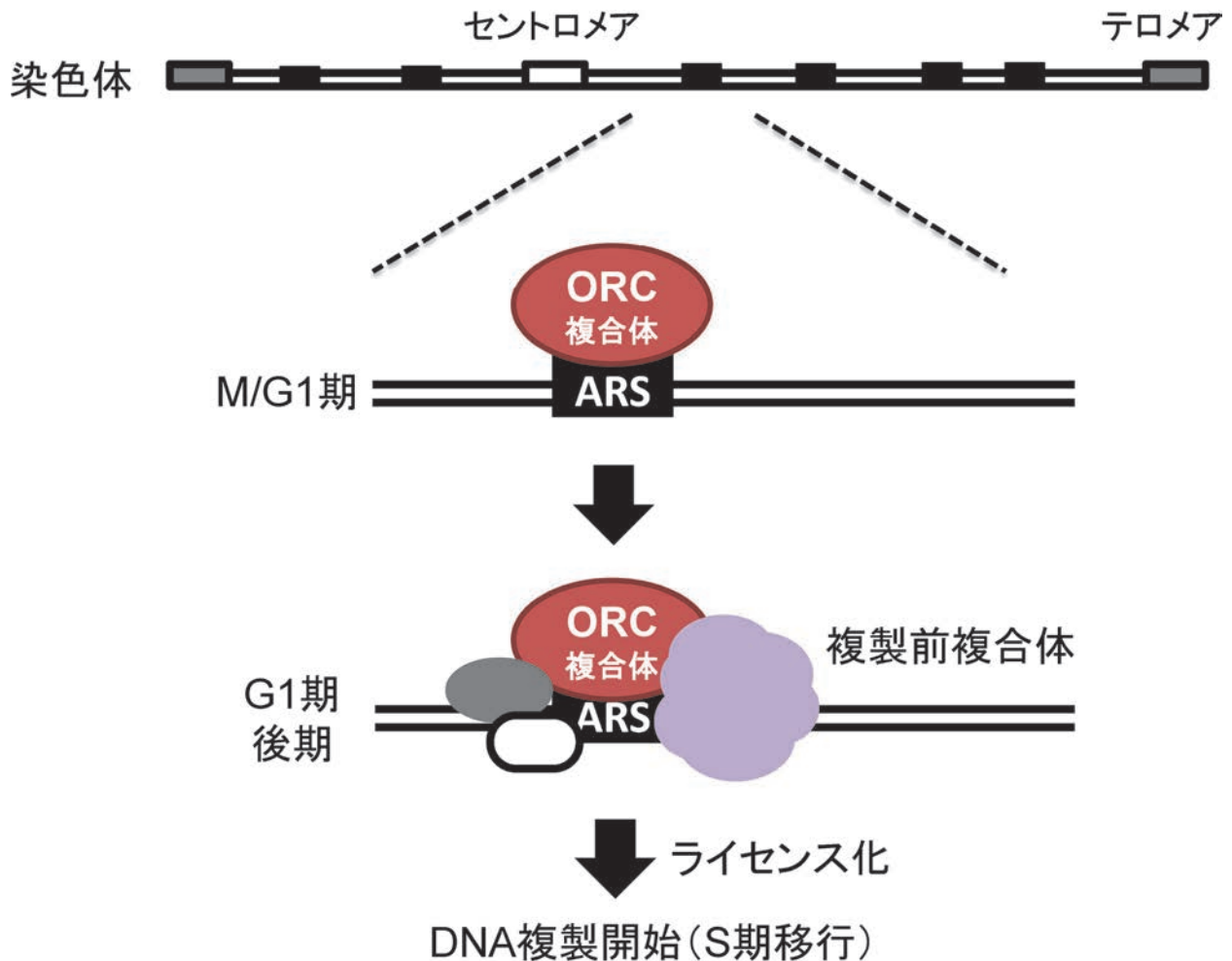


図2 出芽酵母における DNA 複製開始モデル。真核生物の染色体上には複数の複製開始点が存在し、これを ORC (Origin Recognition Complex) 複合体が認識・結合する。出芽酵母において複製開始点は自律複製配列 (ARS: Autonomously Replicating Sequence) と呼ばれている。

渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 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)

突然変異の入り方の分布はべき乗則で近似できる

進化のプロセスにおいて1塩基多型 (SNPs) は最も主要な要因である。一般に、ある世代の生物の配偶子に入った変異は次世代へと受け継がれる。変異数は親から世代を重ねるごとに増加していき、その中で親とは異なる形質を獲得する。しかし、世代間における変異蓄積数の違いや、ゲノム中における変異の入り方に法則性があるかは詳細には分かっていない。自然突然変異はDNA複製に伴う塩基の誤対合が主な要因と考えられるが、これまでどの領域でも均一にランダムに起こる現象と考えられてきた。しかし、近年、ゲノム中の変異の入り方は均質ではないという報告がなされてきた。例えば、コード領域では選択圧のバイアスがかかるため変異率が低くなるという報告や、さまざまな変異のプロセス、修復機構の多様性、選択圧のかかり方等が均質性を失わせる要因になるという報告である。一方で、ゲノム中のSNPs間距離の確率分布を調べた報告は今までになかった。我々は、ゲノム中のSNPsの分布に一般的に言える傾向があるのかどうか、3つの独立したヒト全ゲノムSNPsデータベースを解析した。その結果、3つのデータベースとも例外なく、SNPs間の距離の分布はべき乗則で近似できることを見出した (Gouda N. et al. *Genes to Cells*, 21: 396-407, 2016)。

上記の結論は、変異が長年蓄積した結果であるデータベースの情報を元に解析して得られたものであるが、それでは新しく入る変異に対してもこの確率分布は当てはまるのだろうか。すなわち、上記法則はこれから起きる変異の位置を傾向として予測することを可能にするのかどうか、実験進化の手法を用いて検証を行った。本研究では、酵母のラギング鎖を合成する遺伝子である *polδ* 変異体である *pol3-01* 変異を有する酵母を継代培養し、系統的な変異の蓄積を追跡した。この株はラギング鎖特異的なDNAポリメラーゼ Pol δ の校正活性ドメインの活性部位である D321、E323 を Ala に置換した変異を持ち、DNAポリメラーゼ自身の変異傾向を保持した株であると考えられ、継時的かつ

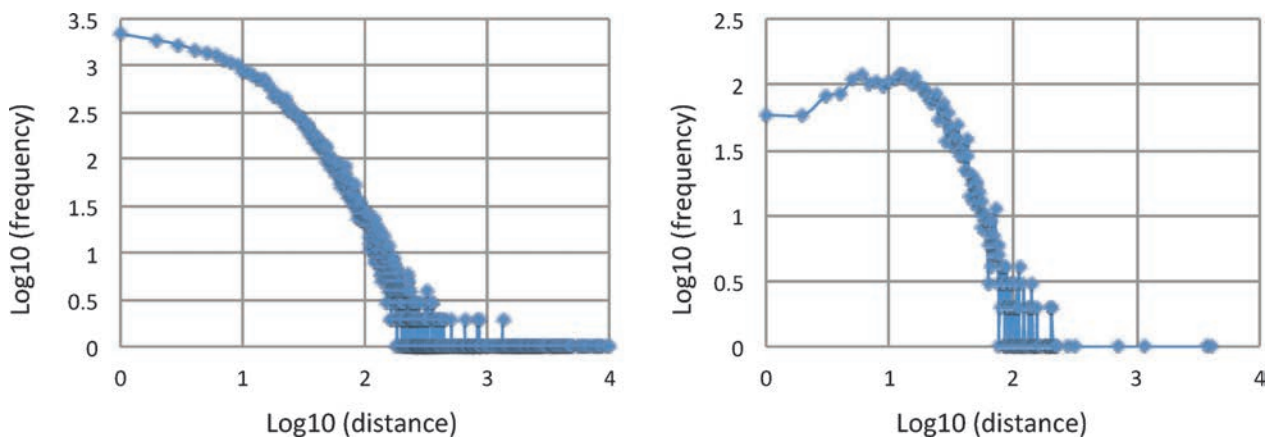


図1 継代前と後のSNPs分布。(左) 参照ゲノムとの比較から得たSNPs約32,000を解像度10bpのBox plotで示した。(右) 105世代継代後に獲得したSNPs約3,500と元の変異点との距離を解像度10bpのBox plotで示した。

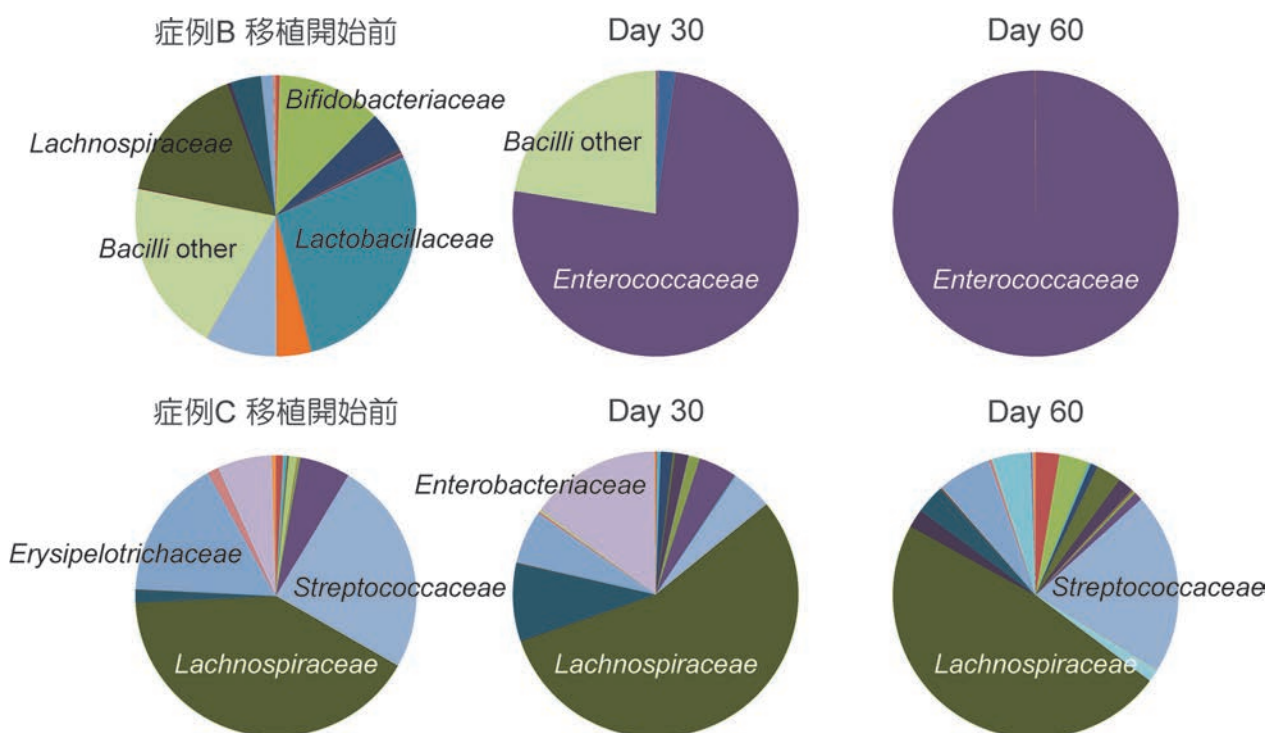
系統的な変異の蓄積を確認することで、酵母本来の変異の傾向が浮き彫りとなる。これは古澤らによる「不均衡進化理論」に基づき、ラギング鎖における本来の変異の蓄積傾向を検証するという点において、実際の進化のプロセスを短期間に実験室内で再現するという考え方である。

今回の実験では単なる液体培養の植継ぎではなく、親子関係の対応が分かるようにプレート上のコロニーを継代培養していき、0世代、105世代、210世代の3点で得られたシングルコロニーからゲノムを抽出して次世代シーケンサーに供した。図1左は本実験の出発点(0世代)において参照ゲノムとの比較から同定したSNPs間の距離で、上記ヒトゲノム同様、典型的なべき乗則に従うことを確認した。また0世代を元に、新たに105世代後に獲得したSNPsと元のSNPsとの距離をBox plotに供したところ(右)、この傾向もべき乗則に従うことが明らかになった。すなわち、既に存在する変異の近傍に新たな変異が落ちる確率が高いことを示しており、上記仮説が正しいことを証明した。

高松美沙樹 (大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻)
徳山麻里 (大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻)
北村夏美 (大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)
志波 優 (岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構)
古澤 満 (株式会社ちとせ研究所)
千葉櫻拓 (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)

経腸栄養剤による栄養管理を併用した骨髄（造血幹細胞）移植患者における腸内細菌叢の解析

白血病や悪性リンパ腫といった血液悪性疾患に対して行われる造血幹細胞移植（Hematopoietic stem cell transplantation: HSCT）においては、移植前処置（大量化学療法、全身放射線照射）や、移植した免疫細胞による宿主への免疫的攻撃である移植片対宿主病（Graft-versus-host disease: GVHD）によって消化管粘膜障害を発症して高度の栄養吸収障害を引き起こす。そのため、HSCT患者は容易に栄養不良状態に陥りやすい。通常 HSCT 患者には、移植後に経静脈栄養療法が施行され、早期に経腸栄養療法を導入する試みは殆ど行われていないが、移植後早期からの経腸栄養療法は、患者の栄養状態を良好に保つことを可能にするだけでなく、腸内細菌叢を正常に保つことで、バクテリアルトランスロケーション（腸内細菌が腸管粘膜バリアを通過して血液中に侵入すること）を原因とする感染症の発症を抑制する可能性がこれまでに示唆されている。このような背景から、本プロジェクトメンバーである札幌医科大学の井山らは、移植後の絶食期間と移植患者の予後との関連や、移植後に引き起こされる様々な問題点を解決するために HSCT 患者への早期の経鼻経腸栄養を導入した結果、良好な栄養状態が維持されるだけでなく、血液中に侵入した腸内細菌による敗血症の発症が顕著に低下することや、重篤な GVHD の発症率が抑制されることなど、良好な治療成績が得られたことを報告している。これは早期経腸栄養の導入が正常な腸内細菌叢の形成に対し、有益な影響を与えたことが一因であると考えられたことから、本研究では HSCT 患者の経腸栄養療法導入前



構成比が 10% を超える細菌科のみを表記

後の腸内細菌叢の解析を行った。その結果、移植開始前から多くの患者において本来ヒト腸内で優勢に検出される *Bacteroidaceae*、*Bifidobacteriaceae*、*Prevotellaceae*、*Ruminococcaceae* といった細菌科がほとんど検出されなかった。図に示した症例 B は、移植開始前には食事も経口摂取が可能で経腸栄養療法の導入も可能であった。しかし、全身状態の悪化に伴い、一時的な経腸栄養療法の中止を余儀なくされた。この症例の移植 30 日後の細菌叢は、構成する細菌科の数が大きく減少しただけでなく、本来ヒト腸内ではマイナーであるはずの *Enterococcaceae* が 70% 以上も占めていた。この傾向は 60 日後にはより悪化し、ほぼ *Enterococcaceae* のみという極めて異常な細菌叢が観察された。一方、症例 C は、経口摂取、経腸栄養療法ともに十分な摂取および投与が継続して可能であった症例である。この症例では、構成する細菌科は一貫して *Lachnospiraceae* が優勢である細菌叢を示し、バランスは異なるものの常に複数の多様な細菌科で構成されていた。これらの結果は、移植後の栄養状態の悪化が腸内細菌の多様性の減少と *Enterococcaceae* の異常増殖を導き、経腸栄養療法を行うことで、腸内細菌叢の異常を改善できることを示唆していると考えられる。*Enterococcaceae* に属する細菌は前述のバクテリアルトランスロケーションによる敗血症の起因菌として臨床問題となることが多く、本研究結果との関連は非常に興味深い。今後は、患者の臨床的な所見との関連や、細菌叢に関するより詳細なデータ解析を行うことで、HSCT 患者に対する経腸栄養剤による栄養管理の意義を明らかにしていきたい。

なお、本臨床研究は、札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認のもと実施された。

遠藤明仁（生物産業学部 食品香粧学科）

井山 諭（札幌医科大学医学部 血液内科）

白石 宗（札幌医科大学医学部 微生物学講座）

横田伸一（札幌医科大学医学部 微生物学講座）

牛白血病ウイルス (BLV) 感染および 牛白血病発症における遺伝子異常の検出

牛白血病は、体表リンパ節の腫脹等を示す牛の疾患で、家畜伝染病予防法に規定される届け出伝染病に指定されています。牛白血病は、牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus: BLV) の感染に起因する地方病性牛白血病 (EBL) と、ウイルス以外を原因とする散発性牛白血病に分けられます。近年日本において BLV 感染牛が増加しており、それに伴って地方病型牛白血病の発症牛も増加の一途を辿っています。牛白血病発症牛は、と畜場において法律に基づき全部廃棄の扱いを受け、出荷した牛の商品価値がなくなってしまうことから、畜産農家にとって経済的損失の極めて大きな疾病となっています。

これまでに、BLV 対策としてワクチン開発などが試みられてきましたが、BLV による白血病発症機構には未解明の部分が多く、未だ実用化には至っていません。効果的な抗ウイルス戦略構築のためには、細胞レベルでの感染病態および白血病発症の分子機構の解析が必要とされています。私達の研究グループでは、牛白血病ウイルス感染牛、白血病発症牛の遺伝子発現を、次世代シーケンサーによる RNA-seq により包括的に把握し、非感染牛のそれと比較することにより BLV による B 細胞腫瘍化機構に直接関与する遺伝子発現異常の検出を目指しています。

これまでに牛白血病の発症や BLV のウイルス量を部分的に規定する因子として、MHC の型や牛の系統、細胞内の宿主抵抗性因子の遺伝子配列や発現量が関与していることが報告されています。本研究により BLV 感染牛や牛白血病発症牛特異的な遺伝子発現パターンが明らかになれば、それらを感染や発症の指標として使用する新たな疾病マーカーを創出することが可能となります。さらには、このような技術を用いて BLV 感染の早期発見、白血病発症の早期防除などを実現することにより、畜産農家の経済的損失の軽減に寄与することができると考えています。

小林朋子 (農学部 畜産学科)

稲垣靖子 (東京大学 農学部)

◆ 研究発表実績 ◆

◆ 論文発表

Kobayashi I, Watanabe S, Kanesaki Y, Shimada T, Yoshikawa H, and Tanaka K.

Conserved two-component Hik34-Rre1 module directly activates heat-stress inducible transcription of major chaperone and other genes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Mol Microbiol. in press. (2017)

Matsuda K, Hasebe F, Shiwa Y, Kanesaki Y, Tomita T, Yoshikawa H, Shin-Ya K, Kuzuyama T, and Nishiyama M.

Genome mining of amino group carrier protein-mediated machinery: discovery and biosynthetic characterization of a natural product with unique hydrazone unit.

ACS Chem Biol. 12: 124-131. (2017)

Nunome M, Nakano M, Tadano R, Kawahara-Miki R, Kono T, Takahashi S, Kawashima T, Fujiwara A, Nirasawa K, Mizutani M, and Matsuda Y.

Japanese quail inferred from mitochondrial DNA D-Loop and microsatellite markers.

PLoS One. 12: e0169978. (2017)

Fujisawa T, Narikawa R, Maeda SI, Watanabe S, Kanesaki Y, Kobayashi K, Nomata J, Hanaoka M, Watanabe M, Ehira S, Suzuki E, Awai K, and Nakamura Y.

CyanoBase: a large-scale update on its 20th anniversary.

Nucleic Acids Res. 45: 551-554. (2017)

Ohbayashi R, Yamamoto J, Watanabe S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Miyagishima S, and Yoshikawa H.

Variety of DNA replication activity among cyanobacteria correlates with distinct respiration activity in the dark.

Plant Cell Physiol. in press. (2017)

Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Polyacrylamide gel as a culture substrate improves in vitro oocyte growth from porcine early antral follicles.

Mol Reprod Dev. in press. (2017)

Itami N, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Promotion of glucose utilization by insulin enhances granulosa cell proliferation and developmental competence of porcine oocyte grown in vitro.

Zygote. 25: 65-74. (2017)

Uchiyama H, Uehara K, Nagashima T, Nakata A, Sato K, Mihara Y, Komatsu K-I, Takanari J, Shimizu S, and Wakame K.

Global liver gene expression analysis on a murine metabolic syndrome model treated by low-molecular-weight lychee fruit polyphenol (Oligonol®).

Anticancer Res. 36: 3705-3713. (2016)

Ohbayashi R, Watanabe S, Ehira S, Kanesaki Y, Chibazakura T, and Yoshikawa H.

Diversification of DnaA dependency for DNA replication in cyanobacterial evolution.

ISME J. 10: 1113-1121. (2016)

Klotz A, Georg J, Bučinská L, Watanabe S, Reimann V, Januszewski W, Sobotka R, Jendrosseck D, Hess WR, and Forchhammer K.

Awakening of a dormant cyanobacterium from nitrogen chlorosis reveals a genetically determined program.

Curr Biol. 26: 2862-2872. (2016)

Ohbayashi R, Akai H, Yoshikawa H, Hess WR, and Watanabe S.

A tightly inducible riboswitch system in *Synechocystis* sp. PCC 6803.

J Gen Appl Microbiol. 62: 154-159. (2016)

Kobayashi H, Koike T, Sakashita A, Tanaka K, Kumamoto S, and Kono T.

Repetitive DNA methylome analysis by small-scale and single-cell shotgun bisulfite sequencing.

Genes Cells. 21(11): 1209-1222. (2016)

Koike T, Wakai T, Jincho Y, Sakashita A, Kobayashi H, Mizutani E, Wakayama S, Miura F, Ito T, and Kono T.

DNA methylation errors in cloned mouse sperm by germ line barrier evasion.

Biol Reprod. 94: 128. (2016)

Tada T, Seki Y, Kameyama Y, Kikkawa Y, and Wada K.

Characterization and application of newly developed polymorphic microsatellite markers in the Ezo red fox (*Vulpes vulpes schrencki*).

Genet Mol Res. 15: gmr15049104. (2016)

Gurumurthy CB, Takahashi G, Wada K, Miura H, Sato M, and Ohtsuka M.

GONAD: a novel CRISPR/Cas9 genome editing method that does not require ex vivo handling of embryos.

Curr Protoc Hum Genet. 88: Unit 15.8. (2016)

Hirano T, Matsushashi T, Takeda K, Hara H, Kobayashi N, Kita K, Sugimoto Y, and Hanzawa K.

IARS mutation causes prenatal death in Japanese black cattle.

Anim Sci J. 87: 1178-1181. (2016)

平野貴、原ひろみ、半澤恵

黒毛和種における RBP4 多型と枝肉形質および子牛死亡の関連解析

日本動物遺伝育種学会誌. 44: 53-57. (2016)

朝治桜子、鈴木進悟、原ひろみ、平野貴、椎名隆、半澤恵

次世代シーケンサーによるニホンウズラの機能的な主要組織適合性複合体クラス IIB (CjIIB) 遺伝子座の多様性解析.

DNA 多型. 24: 76-80. (2016)

Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, and Hanzawa K.

Characterization and expression of non-polymorphic liver expressed antimicrobial peptide 2: LEAP-2 in the Japanese quail, *Coturnix japonica*.

Anim Sci J. 87: 1182-1187. (2016)

Ulfah M, Kawahara-Miki R, Farajallah A, Muladno M, Dorshorst B, Martin A, and Kono T.

Genetic features of red and green junglefowls and relationship with Indonesian native chickens *Sumatera* and *Kedu Hitam*.

BMC Genomics. 17: 320. (2016)

Tanaka H, Ohtsu A, Shiratsuki S, Kawahara-Miki R, Iwata H, Kuwayama T, and Shirasuna K.

Age-dependent changes in inflammation and extracellular matrix in bovine oviduct epithelial cells during the post-ovulatory phase.

Mol Reprod Dev. 83: 815-826. (2016)

Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shiratsuki S, Tasaki H, Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Gene expression patterns in granulosa cells and oocytes at various stages of follicle development as well as in in vitro grown oocyte-and-granulosa cell complexes.

J Reprod Dev. 62: 359-366. (2016)

岩槻健、Wenwen Ren、Peihua Jiang、粟飯原永太郎

「味幹細胞の同定と培養」～味幹細胞の探索から新規味蓄オルガノイドの作製まで～
化学と生物. 54(8): 543-547. (2016)

Akiyama T, Ishige T, Kanesaki Y, Ito S, Oinuma K, Takaya N, Sasaki Y, and Yajima S.

Draft genome sequence of *Microbacterium* sp. strain HM58-2, which hydrolyzes acylhydrazides.
Genome Announc. 4: e00554-16. (2016)

Akuzawa S, Nagaoka J, Kanekatsu M, Kubota E, Ohtake R, Suzuki T, and Kanesaki Y.

Draft genome sequence of *Oceanobacillus picturae* Heshi-A3 that was isolated from fermented rice bran with aging salted mackerel, which was named Heshiko as traditional fermented seafood in Japan.

Genome Announc. 4: e00218-16. (2016)

Maeno S, Tanizawa Y, Kanesaki Y, Kubota E, Kumar H, Dicks L, Salminen S, Nakagawa J, Arita M, and Endo A.

Genomic characterization of a bee symbiont fructophilic *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation.

Syst Appl Microbiol. 39: 516-526. (2016)

Shiratsuki S, Hara T, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Low oxygen level increases proliferation and metabolic changes in bovine granulosa cells.

Mol Cell Endocrinol. 437: 75-85. (2016)

Munakata Y, Ichinose T, Ogawa K, Itami N, Tasaki H, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Relationship between the number of cells surrounding oocytes and energy states of oocytes.

Theriogenology. 86: 1789-1798. (2016)

Sugiyama M, Sumiya M, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Addition of granulosa cell mass to the culture medium of oocytes derived from early antral follicles increases oocyte growth, ATP content, and acetylation of H4K12.

Zygote. 24: 848-856. (2016)

Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y, and Obata Y.

Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 113: 9021-9026. (2016)

Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, and Hayashi K.

Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line.

Nature. 539: 299-303. (2016)

◆学会・セミナー等での発表

=国内=

2016年5月13-15日

第70回日本栄養・食糧学会大会（神戸）

岩槻健、粟飯原永太郎、Jiang Peihua、大木淳子、山根拓実、大石祐一
 消化管オルガノイドを用いた新たな消化管栄養素受容細胞の解析

2016年5月18-20日

第63回日本実験動物学会総会（川崎）

大塚正人、高橋剛、和田健太、三浦浩美、Channabasavaiah B. Gurumurthy、佐藤正宏
 採卵、顕微注入、胚移植を要しないゲノム編集マウス作製法 GONAD によるノックアウトマウス作製

松岡邦枝、宮坂勇輝、和田健太、安田俊平、設楽浩志、山口碧、多屋長治、吉川欣亮
外有毛細胞特異的遺伝子 *Oncomodulin* ノックアウトマウスにおける聴覚障害
和田健太、宗形春花、内山博允、大久保咲、橋詰良一、吉川欣亮
NAK/Nokh ラットの無眼球症に関する複数の遺伝子座

2016年5月27日

秋田県立大学生物生産科学科公開セミナー（秋田）

兼崎友

次世代シーケンズ技術により変わりゆく微生物ゲノム科学

2016年7月4-6日

日本微生物資源学会第23回大会（千葉）

志村遥平、広瀬侑、三澤直美、藤澤貴智、兼崎友、森史、山口晴代、河地正伸

MCC-NIES が保有するシアノバクテリア株のゲノム情報整備

2016年7月9日

第13回北海道実験動物研究会総会・学術集会2016（札幌）

高橋剛、Channabasavaiah B. Gurumurthy、和田健太、三浦浩美、佐藤正宏、大塚正人

新規ゲノム編集マウス作製法「GONAD」のラットへの応用

古郡真宗、関優太、設楽浩志、島貫碧、斎藤潤一、吉川欣亮、和田健太

Foxe3^{ct} の白内障発症を加速させる *Pde6b^{dt}* の同定と、新たな修飾遺伝子の存在

和田健太、宗形春花、内山博允、大久保咲、吉川欣亮

NGS 解析に基づく NAK/Nokh ラットの小眼球症関連遺伝子のスクリーニング

2016年8月24-26日

第58回歯科基礎医学会学術大会（札幌）

岩槻健

味細胞研究のパラダイムシフト～味蕾幹細胞の同定と味覚研究への応用～

2016年9月28日-30日

第68回日本生物工学会大会（富山）

佐々木大樹、石川森夫、鈴木敏弘、今井健太郎、吉田将也、山本有紀、松原拓哉、兼崎友、吉川博文、貝沼（岡本）章子

Acetobacter 属酢酸菌における酢酸過酸化発現メカニズム

2016年9月11-15日

第109回日本繁殖生物学会大会（相模原）

有富大輝、武田久美子、尾畑やよい、平尾雄二

マウス始原生殖細胞を成熟卵子へと誘導する新規培養系の開発

谷本連、諸白家奈子、河野友宏、平尾雄二、尾畑やよい

ステロイドホルモン受容体の制御が *in vitro* におけるマウス卵胞形成に果たす役割

宗像祥久、川原玲香、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝

アクリルアミドゲル上での培養はブタ未発育卵子顆粒層細胞複合体の AP-1 発現を亢進する

諸白家奈子、谷本連、佐々木恵亮、林克彦、平尾雄二、尾畑やよい

マウス胎仔卵巣のガラス化保存と体外培養による始原生殖細胞の高度利用技術の開発

2016年9月15-16日

日本家禽学会2016年度秋季大会（静岡）

松田洋一、辰本将司、川原玲香、郷康広、山崎由紀子、山口勝司、重信秀治、河野友宏、石下聡

ニホンウズラのゲノムブラウザの開設とニワトリウズラの比較ゲノム解析研究の展開

2016年9月16-19日

日本植物学会第80回大会（沖縄）

岩上匡伸、山川健太、大庭優作、兼崎友、千葉櫻拓、渡辺智、吉川博文

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における核ゲノム複製開始点の解析

兼崎友、小田しおり、重信直人、渡辺智、三角修己、吉川博文
単細胞紅藻シアニジウムのオミクス解析と重金属ストレス応答

2016年9月23-26日

日本哺乳類学会 2016 年度大会（つくば）

多田智記、田中花、和田健太

キタキツネ (*Vulpes vulpes schrencki*) 特異的マイクロサテライトマーカーの開発と応用

2016年9月28-30日

第 68 回日本生物工学会大会（富山）

石井友理、赤坂直紀、佐古田久雄、秀瀬涼太、阿部達明、兼崎友、石川森夫、貝沼（岡本）章子、藤原伸介
酢酸菌 *Komagataeibacter europaeus* 由来転写因子 Lrp の標的遺伝子の網羅的探索

山元翔太、清啓自、久保田恵理、兼崎友、矢嶋俊介、門倉利守、鈴木健一郎、中山俊一

有機酸生成低減変異株 DNPR89 の網羅的遺伝子発現解析

2016年9月29日-10月1日

第 5 回生命医薬情報学連合大会（東京）

小林久人

ゲノミックインプリンティング～全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析から“目印”として働く DNA
メチル化の本質を探る～

2016年10月20日

第 8 回日本醸造学会若手シンポジウム（東京）

西村友里、山元翔太、久保田恵理、兼崎友、矢嶋俊介、鈴木健一郎、門倉利守、中山俊一

高リンゴ酸・低酢酸生産性変異株 DNPR38 の網羅的転写解析

山元翔太、久保田恵理、兼崎友、矢嶋俊介、鈴木健一郎、門倉利守、中山俊一

有機酸生成低減変異株 DNPR89 の網羅的遺伝子発現解析

2016年11月30日-12月2日

第 39 回日本分子生物学会年会（横浜）

赤池康範、吉川博文、千葉櫻拓

ヒト細胞株において cyclin A-CDK の活性亢進が M 期進行へ及ぼす影響

飯田友貴、浅沼真冬、高橋究、神谷敦子、小倉俊一郎、中島元夫、田中徹、吉川博文、千葉櫻拓

5-アミノレブリン酸による温熱条件下でのがん細胞死誘導機構の解析

岩上匡伸、山川健太、大庭優作、兼崎友、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文

単細胞紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における核ゲノム複製開始点の解析

岩槻健、内山博允、山根拓実、大石祐一、Peihua Jiang、粟飯原永太郎

味幹細胞の同定と培養系の確認

尾畑やよい、平尾雄二

マウス始原生殖細胞から卵子を産生する新規 in vitro 系の開発

川原玲香、河野友宏、神作宜男、桑山岳人

ニワトリ複数品種の比較ゲノム解析による就巢性に関わる変異の探索

小林久人、小池佐、坂下陽彦、都能遼、隈本宗一郎、若井拓哉、佐野賢、河野友宏

マウス生殖細胞・初期胚の DNA メチローム解析

和田健太、内山博允、輿石雄一、田村淳、西山祐樹、大久保咲、高橋剛、多田智記、古郡真宗、大久保倫子、
下井岳、平山博樹、相馬幸作

エミュー (*Dromaius novaehollandiae*) における新規遺伝マーカーの開発と応用

2016年12月17日

第 17 回構造色研究会（千葉）

森屋萌、内山博允、長島孝行

色彩多型をもつキンバエの多層膜構造～構造色を制御する遺伝子の解明に向けて～

2017年1月28日

東京工業大学・光合成科学シンポジウム「光合成科学：エネルギーとバイオマス」(横浜)

兼崎友

重金属耐性を示す紅藻シアニジウムのおミクス解析

2017年3月2-4日

第11回日本ゲノム微生物学会年会(藤沢)

阿部清孝、佐藤真幸、渡辺智、千葉櫻拓、園元謙二、門多真理子、吉川博文

Enterococcus faecium QU 50株におけるカタボライト抑制機構の解析

大坂夏木、円谷優佑、高田啓、多喜乃雄太、兼崎友、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文

アミノ酸飢餓への適応に関する枯草菌 RNA ポリメラーゼの変異解析

川口毅、渡辺智、板谷光泰、吉川博文

枯草菌ゲノムベクターを用いたシアノバクテリアゲノム編集系の構築

川目貴裕、遠藤諭、岩井伯隆、兼崎友、吉川博文、和地正明

Corynebacterium glutamicum における RNase E/G と転写終結の関係

北村夏美、法花津匠、大塚まみ、武井若紗、小菅是子、吉川博文

枯草菌分子シャペロンによる GroES/L による変異の蓄電池機能

高松美沙樹、兼崎友、朝井計、吉川博文

枯草菌 RNAP コア酵素の変異による耐熱化と高温適応に対するトレードオフ

美田知也、細村匡太郎、渡辺智、兼崎友、板谷光泰、吉川博文

合成生物“シアノバチルス”におけるシアノバクテリア遺伝子の発現解析

渡辺正樹、渡辺葵、渡辺智、赤沼元気、河村富士夫、吉川博文

枯草菌リボソーム改変による異種間における翻訳開始機構の多様性の解析

Vejarano F, Chakraborty J, Suzuki-Minakuchi C, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Okada K, and Nojiri H.

Genomic analysis of carbazole degrading bacteria from different environments.

2017年3月16-18日

第58回日本植物生理学会年会(鹿児島)

海田るみ、山崎稜太、坂東秀平、田中啓介、馬場啓一、太治輝昭、坂田洋一、林隆久

ポプラ幹におけるキシログルカンの役割

Sato E, Ariga H, Nakamura K, Barboza L, Tanaka K, Sakata Y, Hayashi T, and Taji T.

Genetic dissection of heat tolerance between *Arabidopsis thaliana* Da (1)-12 and Ei-2

Narushima J, Ariga H, Tanaka K, Sakata Y, Hayashi T, and Taji T.

Global identification of genes contributing to acquired osmotolerance in *Arabidopsis* via ABA-independent pathway

Uchida K, Tanaka K, Nozawa S, Hase Y, Narumi I, Sakata Y, Hayashi T, and Taji T.

Isolation and genetic dissection of acquired osmotolerance-defective mutants in *Arabidopsis thaliana* Bu-5, an osmotolerant accession

2017年3月17-19日

第67回日本木材学会大会(福岡)

海田るみ、山崎稜太、坂東秀平、太治輝昭、坂田洋一、林隆久、田中啓介、馬場啓一、高田直樹、谷口享

ポプラ幹におけるメカニカルストレスによるキシログルカン合成酵素の誘導

2017年3月17-20日

日本農芸化学会2017年度大会(京都)

赤池康範、吉川博文、千葉櫻拓

ヒト細胞株において cyclin A-CDK の活性亢進が M 期進行へ及ぼす影響

朝井計、清水葉子、廣澤早香、高田啓、吉川博文

SigI と WalKR による枯草菌の増殖維持の制御ネットワークの解析

- 阿部達明、石川森夫、鈴木敏弘、兼崎友、松原拓哉、吉川博文、貝沼（岡本）章子
RNA-seq 法による酢酸菌 2 属のグルコース利用時における代謝戦略の比較解析
- 宮平響子、石川森夫、鈴木敏弘、勝木浩平、貝沼（岡本）章子
酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株における Dps ホモログの機能解析
- 大坂夏木、高田啓、多喜乃雄太、兼崎友、渡辺智、千葉櫻拓、吉川博文
枯草菌における栄養状態に応じた新規 GTP 制御機構の解析
- 兼崎友、樋山智恵美、宮沢和己、渡辺智、吉川博文
シアノバクテリアにおける新規高温耐性株の取得とリシーケンス解析
- 北村夏美、法花津匠、大塚まみ、武井若紗、小菅是子、吉川博文
枯草菌分子シャペロンによる変異緩衝作用の検証
- 本寺夏穂、小田嶋拓也、刀禰高広、竹内有、兼崎友、吉川博文、河村富士夫、朝井計、牧野修
rsiV 変異株における枯草菌ファージ ϕ 29 の増殖阻害
- 佐藤契太、石川森夫、鈴木敏弘、原田佳子、勝間田憲子、兼崎友、吉川博文、貝沼（岡本）章子
RNA-seq 法による酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株の RpoE レギュロンの解析
- 高松美沙樹、兼崎友、朝井計、吉川博文
枯草菌 RNAP コア酵素の変異による耐熱化と高温適応に対するトレードオフ
- 宮澤和己、重信直人、兼崎友、渡辺智、吉川博文
紅藻ガルデリアの糖添加による葉緑体白化・再緑化現象の解析
- 渡辺正樹、渡辺葵、渡辺智、赤沼元気、河村富士夫、吉川博文
リボソーム 30S サブユニットを介した異種間における翻訳開始機構の多様性
- Vejarano F, Chakraborty J, Suzuki-Minakuchi C, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Okada K, and Nojiri H.
Diversity of carbazole degradative gene clusters, mobilization and recruitment according to whole genome sequencing.

2017年3月27-29日

第61回日本応用動物昆虫学会大会（東京）

- 田島晴菜、菅野晃平、長島孝行、内山博允
食性の異なるテントウムシでの比較トランスクリプトーム

2017年3月27-30日

日本畜産学会第122回大会（神戸）

- 石井梓、石毛太一郎、平野貴、原ひろみ、半澤恵
ニホンウズラ腸内細菌叢を構成するグラム陰・陽性細菌および週齢の関係
- 石毛太一郎、原ひろみ、平野貴、半澤恵
ニホンウズラ Avian β -defensin (CjAvBD) 遺伝子群の解析
- 波多野薫子、石毛太一郎、原ひろみ、平野貴、半澤恵
成熟培養したウマ末梢血単核細胞における赤血球系細胞関連遺伝子の発現量解析
- 原翔太、平野貴、原ひろみ、半澤恵
同条件で肥育された黒毛和種父方半きょうだい個体の母由来脂肪交雑 QTL の影響

＝国際＝

2016年4月4-5日

Crystalline Lens 2016 at Wakayama; Basic and Clinical Aspects (Wakayama, Japan)

- Wada K, and Kikkawa Y.
Identification of the gene mutations responsible for cataract in mouse and rat models.

2016年5月17-21日

Cold Spring Harbor Meeting on "The Cell Cycle" (NY, U.S.A.)

赤池康範、丹羽哲夫、吉川博文、千葉櫻拓

Constitutive activation of cyclin A-CDK induces tetraploidization via overduplication of centrosomes.

遠藤里佳子、黒田あゆみ、浅海健、福富一成、吉川博文、千葉櫻拓

Mechanism of cell cycle and cell death regulation in cancer cells under the thermal stress.

2016年6月26-30日

18th International Congress on Animal Reproduction (Nouzilly, France)

Munakata Y, Kawahara-Miki R, Sirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Gene expression in granulosa cells and oocytes during porcine oocyte development *in vivo* and *in vitro*.

2016年7月11-14日

Poultry Science Association 2016 Annual Meeting (New Orleans, U.S.A.)

Nunome M, Nakano M, Tadano R, Kawahara-Miki R, Kono T, Takahashi S, Kawashima T, Fujiwara A, Nirasawa K, Mizutani M, and Matsuda Y.

Genetic divergence in domestic Japanese quail inferred from mitochondrial DNA D-loop and microsatellite markers.

2016年7月16-20日

49th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (San Diego, U.S.A.)

Tanimoto R, Morohaku K, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, Hayashi K, Hirao Y, and Obata Y.

Abnormal follicle assembly *in vitro* correlates with ectopic expression of AMH in mice.

2016年7月23-27日

35th International Society for Animal Genetics Conference (Salt Lake City, U.S.A.)

Asaji S, Suzuki S, Ishige T, Hosomochi K, Shiina T, Hara H, Hirano T, and Hanzawa K.

Diversity analysis of transcribed MHC class II β loci in Japanese quail.

Hirano T, Okazaki A, Sasaki S, Suzuki Y, Hara H, Sugimoto Y, and Hanzawa K.

Mapping and exome sequencing of a weak calf syndrome with premature birth.

2016年8月22-25日

The 17th Asian-Australasian Animal Production Animal Science Congress (Fukuoka, Japan)

Asaji S, Suzuki S, Ishige T, Hosomochi K, Hara H, Hirano T, Shiina T, and Hanzawa K.

Identification of transcribed quail Mhc class II β loci of haplotype*O1 via amplicon sequencing of cDNA by next generation sequencer.

Ishige T, Hara H, Hirano T, and Hanzawa K.

Effect of the amino acid change in the Japanese quail NK-lysin (CJNKL) on antimicrobial activity.

Kawahara-Miki R, Ulfah M, Farajallah A, Muladno M, Dorshorst B, Martin A, and Kono T.

Genetic features of red and green junglefowls and relationship with Indonesian native chickens Sumatera and *Kedu Hitam*.

2016年8月23-25日

East Asian Plant Diversity and Conservation 2016 (Tokyo, Japan)

Tanaka K, Ohtake R, Yoshida S, and Shinohara T.

Novel SSR detection using DNA fragmentation technique and capture sequencing in Myrtaceae.

2016年9月25-29日**XXII Biennial Meeting of the International Society for Eye Research (Tokyo, Japan)**

Wada K, and Kikkawa Y.

Identification of the gene mutations responsible for cataract in mouse and rat models.

2016年10月2-7日**Genomic Imprinting, Epigenetics and Physiological Functions (Erice, Italy)**

Kobayashi H.

DNA methylome analysis in mouse germ cells and early embryos.

2016年10月23-28日**10th International Conference of Toxic Cyanobacteria (Wuhan, China)**

Shimura Y, Fujisawa T, Hirose Y, Kanasaki Y, and Kawachi M.

Genome sequencing of bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix agardhii* NIES-2 04T.**◆その他****=マスメディア=**

尾畑やよい先生の PNAS に掲載された論文について、以下の雑誌で紹介されました。

Proc. Natl. Acad. Sci. USA、ScienceShots、Biol. Reprod、Nature news

=招待講演=**2016年5月9日****キアゲンバイオインフォマティクスユーザーグループミーティング（東京）**

石毛太一郎

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターにおける CLC Genomics Workbench の活用法

=受賞=**2017年****日本農芸化学会功績賞受賞**

吉川博文

研究業績「微生物ゲノムの解読と機能解析」



NGRCニュースNo. 8

2017年3月発行

学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

TEL 03-5477-2769 FAX 03-5477-2377

E-mail nodaigc@nodai.ac.jp URL <http://www.nodai-genome.org>

[写真の説明]

左上から

野生ホップ、キイロテントウムシ、ナナホシテントウムシ、下等紅藻

カブの花、ボルネオオラウータン、培養皿で作られた卵から誕生したマウス