

生物資源ゲノム解析拠点 ニュースレター

2014 No. 2

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

CONTENTS

生物資源ゲノム解析拠点

農学分野と次世代型シーケンサー技術の融合を目指して 3

共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」

生物資源ゲノム解析センターの運用実績 4

発表論文 5

平成 26 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧 6

採択課題研究紹介

継続課題..... 10

新規採択課題 24

後期新規採択課題 39

生物資源ゲノム解析拠点

農学分野と次世代型シーケンサー技術の 融合を目指して

東京農業大学では平成 20 年度に、文部科学省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業に採択され「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領域の創出」というテーマで、あらたな研究領域の開拓を行いました。当時、まだ国内で運用が始まったばかりの次世代型シーケンサー Genome Analyzer II を導入し、生物資源ゲノム解析センターにおいて、学内の研究に活用をしてきました。その後の次世代型シーケンサーの普及はめざましく、本センターでも後継機種 HiSeq 2500、MiSeq の導入を行っています。この新技術は、いまでは通常の実験ツールのひとつになりつつあるように思います。しかし一方では、すべての研究者が利用するにはコスト、技術面で、まだハードルが高いという印象もあるのではないのでしょうか。

そのような中で、本学では、平成 25 年度に文部科学省より共同利用・共同研究拠点の認定をうけ、「生物資源ゲノム解析拠点」としての活動を開始しました。次世代型シーケンサーを利用した大規模遺伝情報解析は、科学研究費によるゲノム支援が以前より行われ、研究者コミュニティを広くサポートしています。それに対し本拠点では、特に農学という学問分野において次世代型シーケンサー技術の導入とその応用に貢献することを目指しています。これは、研究対象の多くがいわゆる非モデル生物とも言える農学分野においてこそ、次世代型シーケンサーの能力が有効に活用できる、また活用できるようにしたい、との考えからです。現在は、文部科学省から「特色ある共同研究拠点の整備の推進事業」の支援を一部受け、私立大学という立場を生かして共同研究を行っています。

技術面では、本センター所有のシーケンサーがショートリードかつハイスループットであることをふまえて、*de novo* ゲノム解析よりも、reference を有する生物のゲノム、RNA 解析や *de novo* RNA-seq 解析、PBAT などの解析が主流となっています。まだ、拠点としての活動は始まって間もないですが、徐々に成果が報告されるようになりました。

今後とも本拠点では、新しい解析手法の導入や、セミナー等の開催を通して、新技術を生かした研究の推進を目指します。

東京農業大学

生物資源ゲノム解析センター

センター長 矢嶋 俊介

共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」

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、文部科学省より認定を受け、平成 25 年度より共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」としての運用を開始しました。

本拠点は学外の専門家を含む運営委員会のもと、農学分野を中心とする新しい研究領域の開拓を目指し、広く学外の研究者が本センターを利用し、次世代シーケンサーを用いた共同研究を推進することを目的としています。微生物から植物、高等動物に至るまで、生物の遺伝子解析に関わる研究を推進すること、特に、モデル生物のみならず、農学分野において重要となる非モデル生物の解析にも取り組み、育種、品種改良など有用資源の活用に貢献すること、さらには、センターを中心に研究者間の交流を深め、この分野の研究を担う人材育成にも貢献することを目指しています。

センターには Illumina 社のゲノム解析装置 4 台が設置されており、サンプル調製、装置のオペレーション、情報解析や個別テーマの研究に関わる研究員が学外研究者との共同研究に取り組んでいます。2 年目となる今年度はスタッフを増員し、情報解析装置も拡充するなど、充実した体制で各研究課題に対応しています。

共同利用・共同研究拠点

農学分野を中心とした次世代シーケンサーによる遺伝情報解析研究を推進し、新しい農学研究分野を開拓するため、本拠点は広く学外から共同研究課題を公募し共同研究を推進しています。初年度からこれまでに受け入れた研究課題はのべ 100 件を数えます (図 1)。公募課題の研究分野や解析手法、解析の規模は様々であり、各課題の担当研究者は研究代表者と打ち合わせを行い綿密に連携をとりながら解析を進めています (図 2)。

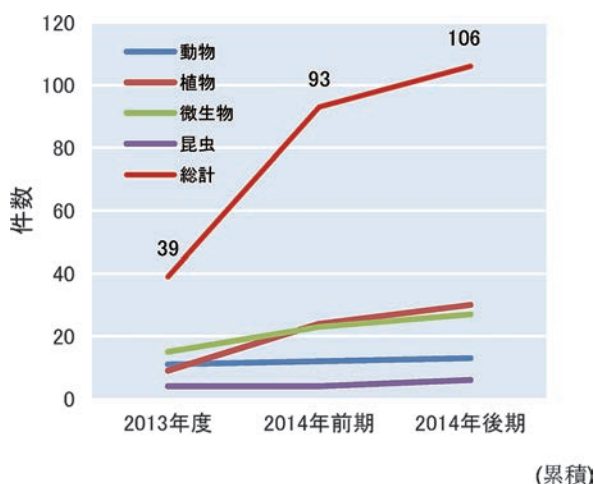


図 1 共同利用・共同研究課題件数

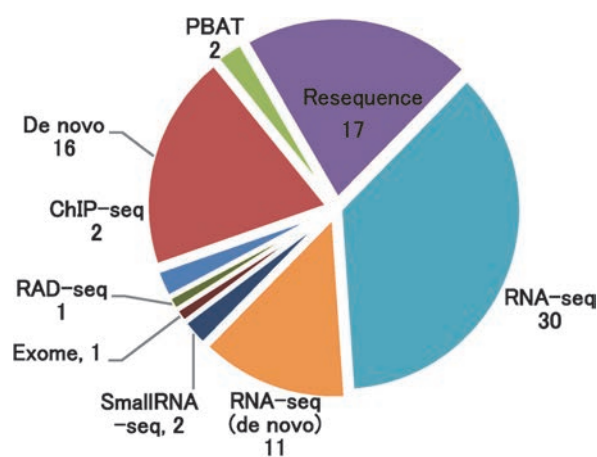


図 2 共同研究課題における解析手法

研究者交流

研究者交流を目的としたセミナー・勉強会も行っています。今年度は「東京農業大学生物資源ゲノム解析センター特別講演」として京都大学 iPS 細胞研究所の渡辺亮先生をお招きし、「細胞社会学を明らかにするシングルセルバイオロジー」をテーマにご講演いただきました。また、2015年1月には拠点セミナー・勉強会「NGS データを用いた非モデル生物のゲノム・トランスクリプトーム解析」を主催し、研究員や共同研究課題採択者の間で最新の解析手法や研究成果について情報交換を行いました。

(生物資源ゲノム解析センター 川原玲香)



拠点セミナー・勉強会の様子

発表論文

- Nakahigashi K, Takai Y, Shiwa Y, Wada M, Honma M, Yoshikawa H, Tomita M, Kanai A, Mori H. Effect of codon adaptation on codon-level and gene-level translation efficiency *in vivo*. *BMC Genomics*. 15: 1115. (2014)
- Kanesaki Y, Masutani H, Sakanaka M, Shiwa Y, Fujisawa T, Nakamura Y, Yokota A, Fukiya S, Suzuki T, and Yoshikawa H. Complete genome sequence of *Bifidobacterium longum* 105-A, a strain with high transformation efficiency. *Genome Announc*. 2 (6). pii: e01311-14. (2014)
- Tsurumaru H, Kanesaki Y, Hashimoto S, Okizaki K, Yoshikawa H, and Yamakawa T. Draft genome of *Bradyrhizobium japonicum* Is-34, which is incompatible with *Rj4* genotype soybeans. *Genome Announc*. 2 (6). pii: e01316-14. (2014)
- Kono N, Arakawa K, Sato M, Yoshikawa H, Tomita M, and Itaya M. Undesigned selection for replication termination of bacterial chromosomes. *J Mol Biol*. 426 (16): 2918-27. (2014)
- Futahashi R, Kawahara-Miki R, Kinoshita M, Yoshitake K, Yajima S, Arikawa K, and Fukatsu T. Extraordinary diversity of visual opsin genes in dragonflies. *Proc Natl Acad Sci USA*. *in press* (2015)

平成 26 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧

平成 26 年度継続採択課題一覧

1. 川原 学 (北海道大学)
「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」
2. 板谷光泰 (慶應義塾大学)
「枯草菌ゲノム大規模改変変異体の解析」
3. 田村文男 (鳥取大学)
「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」
4. 川口眞理 (上智大学)
「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」
5. 鈴木義人 (茨城大学)
「昆虫により形成されるゴールの形成機構の解明」
6. 多田雄一 (東京工科大学)
「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」
7. 伊藤秀臣 (北海道大学)
「高温ストレス誘導型転移因子の育種への応用」
8. 高田達之 (立命館大学)
「琵琶湖固有種ホンモロコ生殖巣のトランスクリプトーム解析」
9. 豊留孝仁 (帯広畜産大学)
「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」
10. 中東憲治 (慶應義塾大学)
「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」
11. 二橋 亮 (産業技術総合研究所)
「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」
12. 武島弘彦 (人間文化研究機構総合地球環境学研究所)
「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」
13. 長岐清孝 (岡山大学)
「植物動原体 DNA 配列の ChIP-Seq 解析」
14. 二橋美瑞子 (農業生物資源研究所)
「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」
15. 武田 真 (岡山大学)
「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」
16. 佐瀬英俊 (沖縄科学技術大学院大学)
「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」
17. 戸崎晃明 (競走馬理化学研究所)
「ゲノム解析による在来馬の起源の解明に関する研究」

18. 市村和也 (香川大学)
「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」
19. 菊池 潔 (東京大学)
「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」
20. 松下一信 (山口大学)
「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」
21. 木村 澄 (畜産草地研究所)
「日本在来種ニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) の全ゲノム解読」
22. 橋本 周 (IVF なんばクリニック)
「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」
23. 霜田政美 (農業生物資源研究所)
「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」
24. 西條雄介 (奈良先端科学技術大学院大学)
「植物パターン受容体による耐病性・耐塩性誘導に伴う遺伝子発現リプログラミングの解析」
25. 宗原弘幸 (北海道大学)
「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」
26. 広瀬 侑 (豊橋技術科学大学)
「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」

平成 26 年度新規採択課題一覧

27. 中村幸治 (筑波大学)
「枯草菌の新奇ファージ防御機構の解析」
28. 賀屋秀隆 (農業生物資源研究所)
「シロイヌナズナ分裂組織機能維持に関わる新奇遺伝子の単離と機能解析」
29. 島田友裕 (東京工業大学)
「大腸菌におけるグルコース異化における新規代謝経路切り替え因子の探索」
30. 高原美規 (長岡技術科学大学)
「農作物の栽培管理及び商業利用に有用形質を与える候補遺伝子の網羅的探索」
31. 有泉 亨 (筑波大学)
「次世代シーケンサーを利用したトマトの新規突然変異体の原因遺伝子同定と果実肥大抑制機構の解明」
32. 和地正明 (東京工業大学)
「RNA-Seq によるコリネ型細菌 RNase G の基質同定と細胞内代謝制御機構の解明」
33. 友岡憲彦 (農業生物資源研究所)
「逆遺伝学的手法による *Vigna* 属野生種の Neo-domestication」

34. 蟻川謙太郎 (総合研究大学院大学)
「次世代シーケンサーを活用した鱗翅目昆虫の視覚における適応進化の検証」
35. 高橋秀和 (秋田県立大学)
「RNA-Seq 法による秋田県在来ダイコンの辛み成分遺伝子の単離」
36. 関 功介 (長野県野菜花き試験場)
「RAD-seq 法によるレタスの農業形質に関する QTL 解析」
37. 尾崎克久 (JT 生命誌研究館)
「昆虫化学感覚機能解明のための比較ゲノム解析」
38. 執行正義 (山口大学)
「ネギ類の分子育種と機能性開発を目的とした染色体添加系統の遺伝子発現解析」
39. 岡本昌憲 (鳥取大学)
「花粉形成におけるアブシジン酸の分子生理学的解析」
40. 横山栄二 (千葉県衛生研究所)
「食品媒介病原体の次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析がもたらす食の安全」
41. 深井英吾 (新潟大学)
「植物培養細胞からの再分化個体において活性化されるトランスポゾンの同定」
42. 花田耕介 (九州工業大学)
「オオハマニンニクのトランスクリプトーム解析」
43. 木下 哲 (横浜市立大学)
「イネのオルガネラゲノムの多様性解析」
44. 野崎久義 (東京大学)
「植物細胞内共生リケッチア “MIDORIKO” の宿主緑藻細胞への影響」
45. 白井健郎 (筑波大学)
「天然由来液胞化誘導剤 vicenistatin と抗ウイルス物質 eudistominC の標的分子同定」
46. 齋藤大樹 (京都大学)
「QTLseq による短日条件下のイネ出穂遅延因子の探索」
47. 河鱈実之 (東京大学)
「トルコギキョウの多様な花形が生まれる仕組みをゲノム情報から解析する」
48. 上村 匡 (京都大学)
「害虫を含むショウジョウバエ近縁種を用いた食性依存的な生体応答の比較ゲノミクス」
49. 盧 尚建 (東北大学)
「黒毛和種牛における離乳前後のルーメン発育と糖脂質代謝変化に関わる新規調節遺伝子の同定」
50. 辻 寛之 (奈良先端科学技術大学院大学)
「植物生産性を支える幹細胞・分化器官のエピゲノムコミュニケーション」
51. 木下奈都子 (筑波大学)
「シロイヌナズナにおける環境ストレスと赤色光経路で機能する *GIA3* 遺伝子の単離」
52. 小池英明 (産業技術総合研究所)
「糸状菌の二次代謝の開始に関わる制御機構の解明」

53. 福澤秀哉（京都大学）
 「環境応答遺伝子ネットワークの解明による生産力規定因子の同定」
54. 西沢正文（慶応義塾大学）
 「*C. neoformans* 転写因子 Pho4 の結合領域の網羅的探索」

平成 26 年度後期新規採択課題一覧

55. 佐々木謙（玉川大学）
 「モンシロチョウ雌の交尾による行動転換に伴う脳・胸部神経節内の遺伝子発現」
56. 和田康彦（佐賀大学）
 「プロイラー飼料への乳酸菌資材の添加が小腸の遺伝子発現に及ぼす影響」
57. 宅野将平（総合研究大学院大学）
 「無肥料無農薬環境に適応したイネ系統の遺伝的基盤の解明」
58. 田中朋之（京都大学）
 「ソバの主要アレルゲンである 13S グロブリンの遺伝子構造の解明」
59. 青木 考（大阪府立大学）
 「茎寄生植物ネナシカスラの内在性 small RNA の解析」
60. 得平茂樹（首都大学東京）
 「シアノバクテリアにおける窒素固定活性制御機構」
61. 山川武夫（九州大学）
 「*Bradyrhizobium japonicum* Is-1 のゲノム解析」
62. 野尻秀昭（東京大学）
 「重要酵素 Rieske oxygenase の機能構造解析のためのゲノム情報基盤の整備」
63. 小林佑理子（岐阜大学）
 「起源の異なるシロイヌナズナ野生株のトランスクリプトーム比較解析とゲノムワイド関連解析による酸性土壌耐性メカニズムの解明」
64. 小野正人（玉川大学）
 「セイヨウミツバチにおける新規初期応答遺伝子の網羅的探索」
65. 藤田泰成（国際農林水産業研究センター）
 「植物の乾燥ストレス応答におけるフィードバック制御機構の解明」
66. 太田垣駿吾（名古屋大学）
 「フェニルプロパノイド代謝経路の劇的な転換を果たしたブドウ培養細胞からの原因遺伝子の単離」
67. 門多真理子（武蔵野大学）
 「乳酸発酵に優れた *Enterococcus mundtii* QU25 におけるカタボライト抑制メカニズムの解明と解除法の開発」
 〈課題番号順〉

◆◆◆ 採択課題研究紹介 ◆◆◆

継続採択課題

▶ 枯草菌ゲノム大規模改変変異体の解析 ◀

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は土壌や空气中に常在しているグラム陽性の桿菌で、菌体外プロテアーゼに代表される様々な物質を分泌し工業用途にも広く用いられる有用菌である。枯草菌の標準株である枯草菌 168 株は外部の DNA を自分の細胞内に能動的に取り込める性質のおかげで、遺伝子研究領域、ゲノム研究領域ではモデル微生物の一つである。一方で近縁種である納豆菌は納豆作製に利用され、納豆菌の無塩発酵により得られる (図)。人体には無害で、病原性のない極めて安全な枯草菌、納豆菌のゲノム塩基配列は表で比較した。

5S-23S-16S のリボソームの配列は両ゲノムで同じで親戚同士に見える特徴も、詳細にみると驚くほど異なる。一例をあげると IS (insertion sequence) を全く保持しない枯草菌に対して、納豆菌は 30 個以上も保持している (1)。

枯草菌ゲノムは我々の長年の研究により、巨大 DNA の安定クローニングに用いられ (2, 3)、枯草菌ゲノムベクターと命名されている。ゲノム工学の概念と実践を支えるシステムをさらに発展させるために、枯草菌ゲノム自身の可塑性と安定性、およびゲノム再構築の研究に取り組んでいる。課題の一つであるゲノム再構築の例として、納豆菌ゲノムが水平伝播によって

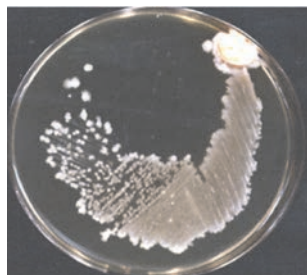


図 納豆に生息する納豆菌。
市販の納豆から大豆の粒を寒天プレートに移し爪楊枝で上げると、多数の納豆菌コロニーが一晚で出現する。

表 枯草菌、納豆菌ゲノムの比較

	枯草菌168株	納豆菌
サイズ(bp)	4,215,606	4,091,591
G+C 含量(%)	43.51	43.73
Protein-coding gene	4,176	4,375
rRNA gene (5S-23S-16S)	10	10
tRNA gene:	86	93
環状プラスミド	0	2

モザイク状に枯草菌ゲノムと置き換わった株 (1, 4) を報告している。納豆菌と枯草菌両方の遺伝子を共有する中間種であるこれらの株にはナツコ (納枯) の愛称が付けられており、これらの株のゲノム構造をシーケンスレベルで明らかにすることを目的としている。

【引用文献】

- (1) 板谷光泰:「納豆菌と枯草菌:ゲノムから眺める安全な菌の活用」第13章 pp111-118、発酵、醸造食品の最新技術と機能性 II、シーエムシー出版 (2011)
- (2) 板谷光泰:「生命システムにおけるゲノム科学とゲノム工学」、第7章、pp131-146、'生命システム工学—進化分子工学から進化生命工学へ'、田口精一編、【化学同人】(2012)
- (3) 板谷光泰「ゲノム構造の再編成」第2章、pp35-65 '合成生物学'、浅島誠・他編、シリーズ現代生物科学入門9、【岩波書店】(2010)
- (4) 板谷光泰、「ゲノムをデザインする」、岩波科学、vol.70、No.12、1073-1080 (2000)。

板谷光泰 (慶應義塾大学先端生命科学研究所)

共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

地球上には多様な生物が分布しています。地球表面の 70% 以上を占める最も広大な生物圏である水域に目を向けてみると、哺乳類 (クジラなど)・鳥類 (カモなど)・爬虫類 (ワニなど)・両生類 (カエルなど)・魚類など様々な脊椎動物を見ることができます。中でも魚類は脊椎動物最大の動物群です。その繁殖戦略は多種多様で、何億個もの多量の卵を海中に放つものもいれば、鳥のように巣を作って卵を保護するものもいます。親が卵を保護することは生存率を高める繁殖戦略の 1 つですが、興味深い保護の仕方をする魚としてタツノオトシゴがあげられます。タツノオトシゴは、他の魚にはない特殊な「子育て」器官である育児嚢を持っています。育児嚢は袋状の構造をしており、オスの腹部にあり、育児嚢内にメスが卵を産み、メスから卵を受け取る過程でオスが精子を放出して受精させます。受精した卵はオスの育児嚢内で発生が進み、孵化した稚魚をオスが出産します。

タツノオトシゴの育児嚢の形成にはどのような遺伝子が関与しているのでしょうか? また、育児嚢ではどのような遺伝子が「子育て」に関わっているのでしょうか? 現在私たちは、「子育て」中のタツノオトシゴの育児嚢で働く遺伝子を同定し、それぞれの遺伝子がどのような機能を持っているのかを明らかにすることを目指しています。

タツノオトシゴを含むヨウジウオ科の育児嚢の形態は多様です。タツノオトシゴでは育児嚢はよく発達し、袋状の形態をしています。一方、その近縁種であるトゲヨウジでは育児嚢は未

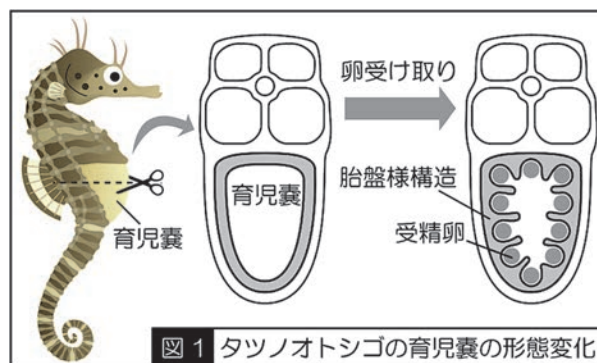


図 1 タツノオトシゴの育児嚢の形態変化

発達で袋状の構造物はなく、尾の近くの表皮上に卵をのせるだけの構造です。近縁種間で育児嚢の構造が大きく異なっていることから、ヨウジウオ科の進化過程で育児嚢の形成に関わる遺伝子が多様化・適応し、その結果タツノオトシゴで見られる育児嚢という袋状の形態ができたのではないかと推測されます。タツノオトシゴで「子育て」に関わる遺伝子が明らかになれば、近縁種間で相同遺伝子を探索し、どのようにして育児嚢の多様性がもたらされているのかを明らかにできると考えています。

川口眞理 (上智大学)

共同研究先: 河野友宏 (応用生物科学部)

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 昆虫によるゴール形成の適応的意義に関する研究 ◀

ある種の昆虫は植物に寄生し、自らの住まいであり食料でもある異常組織（ゴール）を宿主植物上に誘導する。ゴールは宿主と寄生昆虫の組み合わせによって、色、形、形成過程など多種多様である。我々はこれまで、寄生昆虫がオーキシンやサイトカイニンなどの植物ホルモンを生産し、それを用いてゴールを誘導する機構を示してきた（Yamaguchi *et al.* 2012; Tanaka *et al.* 2013; Suzuki *et al.* 2014）。一方で、ゴールは内部の昆虫にとっては住みやすい場所であり、植物による防御応答を免れている可能性も指摘されてきた。我々は、ハルニレの葉にオカボノクロアブラムシが誘導する袋状のゴールを材料に、抵抗性反応についてゴールと葉の組織での比較を行った。食害への抵抗性反応としては、テルペノイドなどの揮発性物質の生産が典型的であり、植物ホルモンの中ではジャスモン酸（JA）が主要な働きをしている。ハルニレの葉の主要な揮発性物質として、perillene と (Z)-3-hexenyl butanoate が検出され、それらはJA処理によって放出量が増加したが、ゴールではこれらの生産量は低く、JA処理によっても誘導されなかった。JA誘導性遺伝子であり、JAの生合成にも関与しているLOX遺伝子の発現解析を行ったところ、葉ではJAによって発現量が増加したのに対し、ゴールでは低いレベルに抑えられていた。傷害によるJA生合成の急激な誘導は葉でもゴールでも正常に起こるのに対し、傷害によるLOX遺伝子の発現誘導は葉でのみ認められた（Takei *et al.* 2015）。以上より、ゴールではJAに対する応答性が低下しており、揮発性物質の生産に代表される昆虫への抵抗性反応がゴールでは抑えられている可能性が考えられた。すなわち、昆虫はゴールという住み心地の良い性状に改変され

た住まいを自分で誘導していると考えることが出来る。本プロジェクトでは、主にJA応答性に焦点を当てつつ、食害応答を含めたゴール組織の性状をさらに網羅的に解析し、JA応答性が低下している原因や、その生理的意義を明らかにすること、あるいはゴールが持つ未知の適応的意義を発掘することを目的としており、RNA-seqによる網羅的な発現解析によってゴールと葉の比較をしつつJA応答性に関する知見を収集している。現時点で、葉におけるJA応答性遺伝子数に比べて、ゴールでは明らかに限られた遺伝子のみがJAに反応するという結果が得られており、今後更に詳細に分析することによって、より具体的な情報を得たいと考えている。



オカボノクロアブラムシによってハルニレに形成されたゴール

鈴木義人（茨城大学）
共同研究先：伊藤晋作（応用生物科学部）
石毛太郎（生物資源ゲノム解析センター）
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

▶ 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 ◀

世界の灌漑地で問題となっている塩類集積による生産量の低下や砂漠化を防止するために、植物の耐塩性を向上させる技術の開発が期待されている。また、作物に海水に対する耐塩性を付与できれば、海水を灌漑水として利用した農業が可能になる。そのためには、塩性植物が持つ耐塩性機能を解明して、その仕組みを作物に導入する必要がある。

我々は、これまでに塩生植物のソナレシバの耐塩性機能を解明するために、生理学的、分子生物学的解析を進めており、ソナレシバが1500mMという海水の3倍の塩濃度でも生育可能なこと、塩ストレス下でナトリウムイオンの濃度上昇を一定以下に抑制しつつ、カリウムイオン濃度を比較的高く保つことなどを明らかにしている。本研究では、ソナレシバのゲノム解析と塩処理サンプルのトランスクリプトームの解析を行い、その耐

塩性機構に関連する遺伝子を同定することを目的としている。

塩処理と無処理のソナレシバをシュートと根に分けてRNA-seq解析を行い、unigeneにアセンブルすることで、この高度耐塩性植物のトランスクリプトーム情報を明らかにした。また、シュートと根で塩応答性を示す転写物を網羅的に同定し、水ストレス応答性遺伝子やカチオントランスポーター遺伝子の発現上昇が認められた。また、アミノ酸、ピルビン酸、リン脂質の代謝系が活性化されていた。さらに、イネのトランスクリプトームとの比較により、ソナレシバ特異的な転写因子の転写を確認した。これらの結果を論文にまとめて投稿中である。

現在はゲノム解析も行っている。さらに、ソナレシバは塩類腺という体内の塩分を排出する器官を葉の表面に持っており、この塩類腺の形成に関与する遺伝子の同定を目指している。そのため、ソナレシバの異なる発達段階の葉や塩類腺を持たない他の野生シバのRNA-seqを行い、トランスクリプトームを比較解析することで候補遺伝子の絞り込みを実施している。

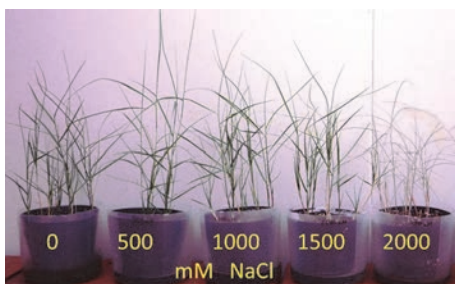
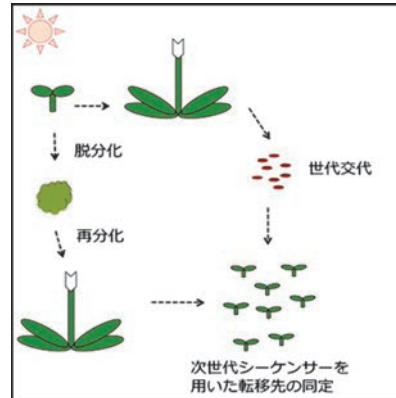


図 異なる塩濃度で処理したソナレシバ

多田雄一（東京工科大学応用生物科学部）
遠藤千里（東京工科大学応用生物科学部）
来須孝光（東京工科大学応用生物科学部）
山本直樹（明治大学農学部）
矢野健太郎（明治大学農学部）
共同研究先：矢嶋俊介（応用生物科学部）
田中啓介（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、シロイヌナズナで同定された、高温ストレスで活性化するレトロトランスポゾン *ONSEN* を人工的に転移誘導することで、ダイコンの品種改良に役立てようとするものである。*ONSEN* は積極的に遺伝子領域に転移することから、転移先の遺伝子の発現に影響を与える可能性が高い。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、高温ストレスによる転移を誘発し、*ONSEN* の転移個体の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した。シーケンス結果から、トランスポゾンの転移先の特異性について解析中である。*ONSEN* の転移は植物の細胞を脱分化させ、未分化な状態となったカルスを誘導をおこなった。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とから、このトランスポゾンを利用することにより、育種上有用な作物のゲノム改変を誘導し、*ONSEN* の新たな挿入による新規有用植物の育成を行うことを試みた。昨年度は、高温処理したカルスを再分化させたシロイヌナズナ個体の次世代集団の DNA を HiSeq でゲノムを 20x でシーケンスし、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した。本年度は、育種上重要なアブラナ科植物であるダイコンにおいて同様に高温処理したカルスを作成した。ダイコンゲノムは HiSeq でゲノムを 20x でシーケンスした。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中である。



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ことを考えている。

伊藤秀臣 (北海道大学大学院理学研究院)

高木宏樹 (岩手生物工学研究センター)

共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)

小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 琵琶湖固有種ホンモロコ生殖巣のトランスクリプトーム解析 ◀

琵琶湖は近畿圏 1400 万人もの生活を支える重要な水源であると共に、水鳥をはじめとする多種多様な動植物を育む生物相豊かな湖である。また、世界有数の古代湖としても知られ、垂種も含め約 60 種類の固有種が生息し、そのうち魚類は 17 種類を占めている。しかし近年、琵琶湖固有魚の生息数は急激に減少し、その多くが絶滅危惧種に指定されている。なかでもコイ科に属する小型の琵琶湖固有種ホンモロコは、ごく近い将来、野生での絶滅の危険性が極めて高いとされる絶滅危惧種 IA 類に指定されている。ホンモロコはコイ科で最も美味とされ、地域の特徴的な食文化形成に関与してきた歴史があるため、生物資源としてのみならず食料資源としても重要な生物である。

我々は、琵琶湖固有種ホンモロコの生殖サイクルおよび配偶子形成メカニズムに興味を持ち、生殖細胞、精子・卵子分化、およびその保存研究を行ってきた。これまでにホンモロコの精巣、卵巣からアンドロジェン、エストロジェン等の内在性核内レセプターを発現するセルトリ細胞株を樹立し、ホルモン応答性レポーター遺伝子を導入して、外因性内分泌攪乱物質が抗雄性ホルモン (抗アンドロジェン) 効果を有することを見いだした。また、ホンモロコ精巣細胞の *in vitro* 分化により、精子形成が可能なることも明らかにしている。ホンモロコは明瞭な季節

繁殖性を示すことから、生殖巣のトランスクリプトーム解析を行うことにより、固有種における生殖サイクル、精子形成に関し、遺伝子発現レベルでの知見が得られると考えている。また、トランスクリプトーム解析から得られた結果を *in vitro* 分化培養系にフィードバックし、永続的な *in vitro* 精子分化培養系の確立を試みると共に、生物、食料資源として貴重な固有種の新たな保存方法の構築を目指している。



高田達之 (立命館大学薬学部)

共同研究先: 河野友宏 (応用生物科学部)

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

Aspergillus flavus はアフラトキシンを産生してナッツ類などの汚染を引き起こす、農学分野では非常に重要な真菌です。また、重要な人獣共通の深在性真菌症であるアスペルギルス感染症の原因真菌の一つでもあります。一方、*A. oryzae* は日本古来の発酵食品を生産する上で重要な役割を果たしてきた真菌であるが、上述の *A. flavus* がその直接の祖先であり、長い歴史の中で家畜化された菌種であると考えられています。このように *A. flavus* は人獣共通の感染症原因真菌、カビ毒産生真菌、そして *A. oryzae* の祖先、と農学をはじめとする様々な分野にまたがって重要な位置を占めている真菌です。

A. oryzae および *A. flavus* のゲノム解析結果はすでに発表もしくは公開されています。しかし、ゲノム情報が広く公開されている *A. flavus* 株は米国環境由来のアフラトキシン産生株であり、*A. oryzae* の祖先株とは国内環境株よりも遠縁の株と考えられます。日本国内由来の *A. flavus* はゲノム解析が十分に行われておらず、本研究において日本国内で臨床検体から分離された *A. flavus* 11 株を用いてゲノム解析を行っています。本研究が対象としている株は臨床検体から分離されているという点が一つの特徴です。また、国内臨床分離株はもともと環境から患者さんに定着・感染したと考えられることから日本の環境由来の *A. flavus* の特徴がつかめるといのも特徴となります。これらの株の解析結果をゲノム解析がすでに行われている米国環境分離 *A. flavus* および馴化された菌種 *A. oryzae* と比較し、いずれと近縁であるかを解析しています。また、アフラトキシンを含む二次代謝産物生成遺伝子クラスターに着目して 11 株それぞれのデータを比較・解析し、クラスター内の多様性、そしてあらたな遺伝子クラスターの発見などを進めています。さらにこれらの解析から *A. flavus* の病原性発現に関する知見も得られるのではないかと期待しています。

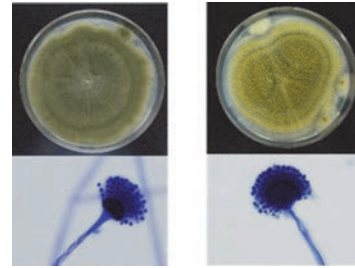


図1 *Aspergillus flavus* (左) および *A. oryzae* (右)。それぞれの巨大培養像 (上図) と分生子頭の観察像 (下図)。

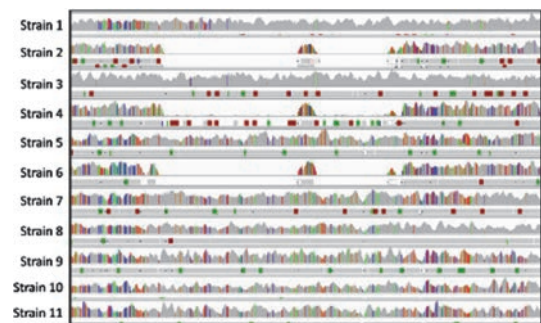


図2 現在興味を持って解析している二次代謝産物生成遺伝子クラスターの一つ。

A. oryzae のゲノムを参照配列として解析した結果、strain 2、4、6 の 3 株は *A. oryzae* と大きく異なっていることが明らかとなった。*A. flavus* のゲノムと比較しても大きく異なっていることも明らかとなってきた。

豊留孝仁 (帯広畜産大学)

共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

細胞システムを定量的に捉えるには、細胞を構成する物質の存在量を明らかにするだけでなく、細胞外からどれだけの物質が取り込まれ、細胞構成成分がどれだけ合成されたかを知る必要がある。タンパク質は細胞活動の中心的機能を担っており、その合成と分解の過程を定量的かつゲノムワイドに理解することが非常に重要である。我々は細胞の代謝システムを理解する一環として、タンパク質のターンオーバー速度の網羅的解析を行っている。本課題では、遺伝子毎の翻訳効率の違いを明らかにすると共に、翻訳効率に影響を与える mRNA や新生ペプチドの局所的な構造（短い配列）を解析して違いの生じる機構を明らかにすることを目標としている。

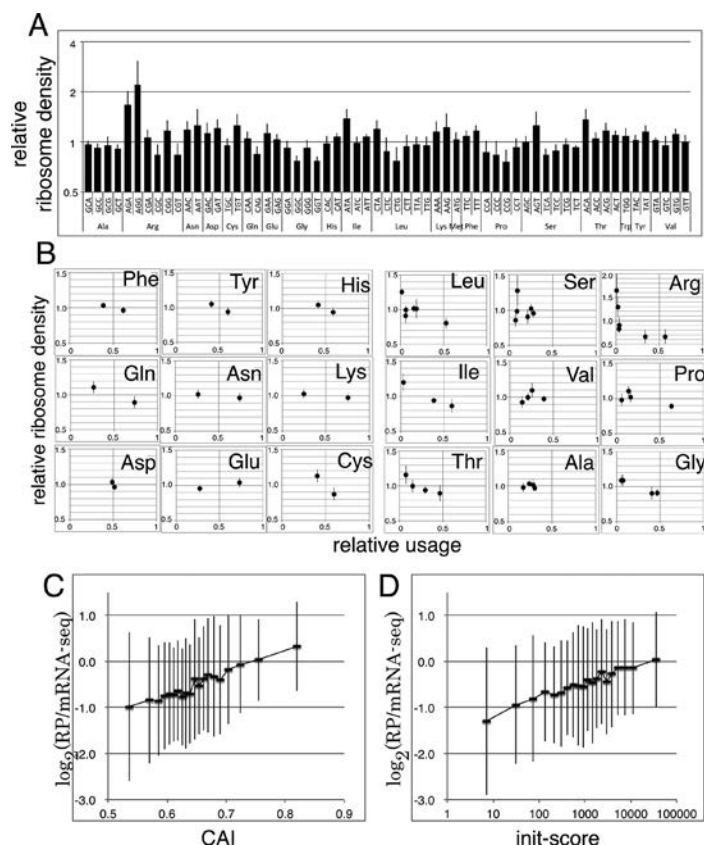
手法としてはリボソームプロファイル (RP) を用いる。細胞よりポリソームを分離し、RNase 処理の後にリボソームによって RNase から物理的に保護された mRNA 断片を抽出して、small RNA シーケンシングの手法でシーケンシングを行うことで、mRNA のどの位置にリボソームが結合しているか、高解像度で解析できる特徴がある。

RP と通常の mRNA-seq の結果を、同条件から抽出したタンパク質の量と比較したところ、RP は mRNA-seq よりもタンパク質の合成量をより正確に表しており、リボソーム密度 (RP/mRNA-seq) は翻訳効率の違いを反映することを示していた。平均から離れたリボソーム密度を持つ遺伝子は、F1/F0

ATPase やリボソームタンパク質オペロンなど、必要量の違うタンパク質がオペロンを形成している場合に多く見られ、同じ転写制御下に置きながらタンパク質量を調節する機構として翻訳効率が使われていると考えられる。リボソーム密度は翻訳の開始率、進行速度の双方に影響を受ける筈だが、同一アミノ酸をコードするコドン間で、平均的なリボソーム密度を比較すると、使用頻度が低いコドンほど高いリボソーム密度がみられ、局所的には翻訳効率が低いとリボソームの進行が遅いことを反映していた (Fig A, B)。ところが、遺伝子レベルで見ると、使用頻度の高いコドンが多く使われた (CAI の高い) 遺伝子ほどリボソーム密度が高かった (Fig C)。翻訳開始点付近の構造から予想した開始効率 (init-score) とリボソーム密度にも同様の相関が見られ (Fig D)、進行速度より開始率が翻訳効率により大きな影響を及ぼしていることを示している。

この結果は、RP によって遺伝子レベル、局所的な構造どちらのレベルでも翻訳効率の解析が可能であることを示しており、翻訳機構の研究だけでなく、薬剤の作用機序などについても解析を進めている。

Nakahigashi K, Takai Y, Shiwa Y, Wada M, Honma M, Yoshikawa H, Tomita M, Kanai A, and Mori H. (2014) Effect of codon adaptation on codon-level and gene-level translation efficiency *in vivo*. *BMC Genomics*. 15: 1115



図の説明 A. コドン毎のリボソーム密度、B. コドン使用頻度とリボソーム密度の関係、C. CAI と遺伝子レベルのリボソーム密度の関係 D. 開始効率とリボソーム密度の関係 (文献の Fig を改変)

中東憲治 (慶應義塾大学先端生命科学研究所)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ RNAseq から明らかになったトンボの色覚多様性 ◀

トンボは、昼行性の大型昆虫で、非常に発達した複眼を持っています。嗅覚に関わる触角は退化しており、聴覚に関わる鼓膜器官が存在しないことから、基本的に視覚で相手を認識すると考えられています。体色や斑紋が近縁種間で多様化した例も多く、見た目の違いがトンボの種分化に重要であると考えられてきました。一方で、トンボの色覚の分子機構についてはほとんど解明されていませんでした。

動物の色覚の多様性を作り出す遺伝子としては、オプシン遺伝子が有名です。たとえば、ヒトでは青、緑、赤の「光の3原色」に対応する3種類のオプシン遺伝子を用いて、さまざまな色を識別しています。昆虫は紫外線オプシンを持っているので、紫外色も識別できることが知られています。今回、東京農業大学 生物資源ゲノム解析センターとの共同研究で、次世代シーケンサーを用いてトンボの幼虫および成虫頭部のRNAseq解析を行い、トンボにおけるオプシン遺伝子の網羅的な同定と発現解析を行いました。

昆虫のオプシン遺伝子は、分子系統解析から紫外線タイプ、短波長（青）タイプ、長波長タイプ（緑～赤）の3タイプの視覚型オプシンと、それ以外の非視覚型オプシンに分けられます。多くの昆虫は、ゲノム中に2～4種類の視覚型オプシンを持ち、ハエ目昆虫は6～9種類と視覚型オプシン遺伝子の種数が比較的多いことが知られていました（図1A）。最初にアキアカネの

オプシン遺伝子の同定を行ったところ、視覚型オプシン16種類を含む20種類ものオプシン遺伝子を同定することができました（図1A）。さらに、11科12種のトンボから同様にオプシン遺伝子を探索したところ、15～33種類という昆虫の中では桁違いに多くのオプシン遺伝子が存在することが明らかになりました（図1B）。

トンボの複眼は、背側と腹側で構造が異なっており、背側では主に空を背景に物体を見るのに対して、腹側では地表の物体からの反射光を受け取ると考えられてきました。また、成虫では大きな複眼の他に、3つの単眼が存在し、水平感覚を保つのに重要と考えられてきました。一方で、水中生活を送る幼虫（ヤゴ）は、成虫と比べて動きが乏しく、単眼が存在していません。RNAseqから、それぞれの時期・組織における発現パターンを解析した結果、幼虫と成虫および成虫の複眼背側、複眼腹側、単眼周辺で発現する遺伝子の種類が全く異なっていることが明らかになりました（図1C）。つまり、トンボは多数のオプシン遺伝子を使い分けることで、水中に届く光、短波長成分の多い空から直接届く光、地表の物体からの反射光といった異なる光環境に適応している可能性が考えられました（図1C）。今回の発見から、トンボなど一部の生物は、従来想像されていたよりも複雑な色覚を持っている可能性が示唆されました。なお、結果の詳細は、2015年にPNAS誌で発表しました。

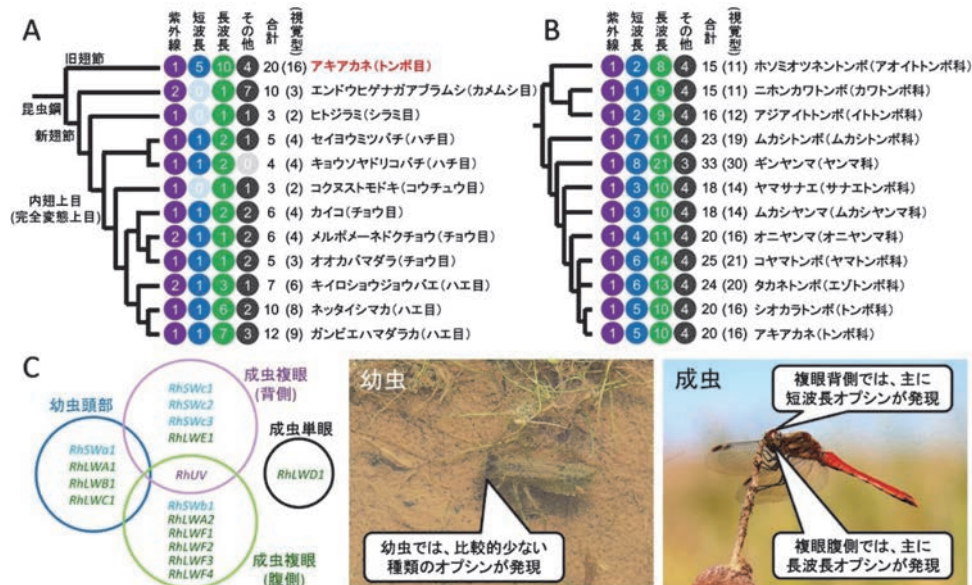


図1 トンボにおけるオプシン遺伝子の多様化
 A: 昆虫におけるオプシン遺伝子数の進化
 B: トンボ 12 種間でのオプシン遺伝子数の進化
 C: アキアカネにおける視覚型オプシン 16 種類の発現パターンのまとめ

二橋 亮 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)
 共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
 川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

動物の細胞内には2つのゲノムがあります。ひとつは核ゲノムで、もうひとつはミトコンドリアに内在するミトコンドリアゲノム（ミトゲノム）です。核ゲノムが非常に複雑であるのに対して、ミトゲノムは、組み換えがなく、サイズ的にもコンパクト（約16kb）です。

これまで、動物の進化多様性研究において、特に大規模系統研究の分野では、ミトゲノムの全塩基配列分析（ミトゲノム分析）が、有用な遺伝的情報源の取得手段として、大きく貢献してきました。その一方で、ミトゲノム分析による、動物の種内の集団遺伝学的研究や、ミトゲノムにかかる自然選択の研究は、ヒトなどのモデル生物を除いて、まだ、ほとんど実現されていません。集団遺伝学的研究では、多くのサンプル数の分析が必要です。ミトゲノムはコンパクトとはいえ、従来のサンガー法では、多くのサンプルを分析するのは困難でした。

「次世代シーケンサー」の登場により、大量の塩基配列データを取得できるようになりました。これにより、分析サンプル数の増大が可能になったことから、非モデル生物でも、集団ミトゲノム研究「集団ミトコンドリアゲノミクス」の道が拓かれたと言えます。しかしながら、集団解析では多くのサンプルについてDNAを扱うために、質の悪いDNA試料を対象とする場合も多く、効率的な研究の遂行には、まだまだ大きな困難があります。

そこで本研究では、この困難を「キャプチャー・ビーズ」によってミトゲノムを濃縮する技術（Maricic et al., 2010）により解決し、次世代シーケンシングによって、集団ミトコンドリアゲノミクスの研究基盤を切り拓くことを目的としています。

対象生物は、非モデル生物の魚類、アユです（写真）。アユは、日本の淡水における漁業資源としては、最も重要な魚種のひとつです。まずは、アユを用いて実験条件の詳細な検討を行い、本格的な



大量ミトゲノム分析を実施します。アユで実験基盤を確立した後は、大規模「集団ミトコンドリアゲノミクス」が未着手である、その他の水産資源にも本手法を適用したいと考えています。この研究を遂行することによって、非モデル生物の魚類においても、集団ミトコンドリアゲノミクスのための技術基盤が確立できます。分析結果から得られる遺伝的集団構造や自然選択に関する知見は、魚類の進化多様性研究や、各魚種の資源管理に有用な情報となると考えられます。

武島弘彦（総合地球環境学研究所）

平瀬祥太郎（東京大学大気海洋研究所）

岩崎 渉（東京大学）

西田 睦（琉球大学）

共同研究先：河野友宏（応用生物科学部）

川原玲香（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複製された染色分体を娘細胞に均等分配するための必須の機能体であり、特異的なタンパク質とDNAで構成されている。動原体は、複製開始点、テロメアと組み合わせることにより染色体ベクター（人工染色体）を構築することが可能である。人工染色体は、(1) 長鎖DNAが導入可能である、(2) 安定な遺伝子発現が保証される、(3) 組換えDNAの伝達を制御できる等の利点をもつことから、その植物での開発が期待されている。シロイヌナズナで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」は未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配列は種特異的であることから、個々の生物種で機能する人工染色体を作出するためには、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存する動原体DNA配列を多くの異なる分類群に属する植物種から単離してきた。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プールの全体像をつかむことが難しかった。

現在行っている次世代シーケンサーによるChIP-Seq解析で

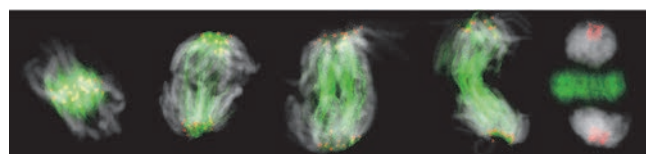


図1 ニンニク体細胞分裂各期の染色体

染色体DNA：白、動原体特異的ヒストンH3（AsaCENH3）：オレンジ、チューブリン（紡錘糸）：緑

は、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配列を高速かつ網羅的に解析している。この方法では、2つのプールに存在する反復配列をクラスター化し比較するので、通常のChIP-Seqの様にリファレンスゲノムを必要としない。つまり、この解析法はゲノム配列が未読な種に対しても利用することが可能であり、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9種の植物種の動原体DNA配列を同時並行的に解析している。

長岐清孝（岡山大学資源植物科学研究所）

共同研究先：小林久人（生物資源ゲノム解析センター）

田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

▶ 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 ◀

オモクローム系色素は、ほとんどの昆虫の赤、茶、紫の体色を担う色素で、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参与しています。オモクローム系色素の合成や輸送に関わる遺伝子を明らかにする研究は、これまでは主にショウジョウバエの複眼の色の変異体を用いて進められてきましたが、合成経路の後半、特に最終色素産物の合成に関わる遺伝子は現時点でもほとんど同定されていません。この理由としては、ショウジョウバエの赤い複眼に含まれるオモクローム色素はキサントマチンのみで、ほとんどの昆虫の複眼に存在し黒い眼を作り出すオミン色素も欠いていることが関係していると考えられます。カイコでは黒い複眼にオミン色素も含まれており、さらにも複眼と同じ組成でオモクローム色素が含まれています。そして、オモクローム系色素の合成の後半に関わると考えられる卵色眼色変異体が独立に複数存在します。私たちは、カイコの卵色眼色変異体の原因遺伝子の解明により、昆虫の主要な色素であるオモクロームの生合成経路後半のブラックボックスの解明を目指しています。

カイコの卵色眼色変異体の1つに、卵と複眼の色が赤い「赤卵 (*red egg, re*)」があります。私たちは、ポジショナルクローニングにより、赤卵の原因遺伝子が、Major Facilitator Superfamilyに属する新規のトランスポーター遺伝子 (*Bm-re*) であることを発見しました (Osanai-Futahashi *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2012)。赤卵ではオミン合成に異常がありますが、興味深いことに、オミン色素が複眼にないショウジョウバエのゲノムには、*Bm-re* 遺伝子のホモログを検出することが出来ませんでした。現在は、*Bm-re* 遺伝子を使って、卵の色で遺伝子組み換え個体を判別できるようなシステムの開発を進めています。

私たちは今年度、卵が白くて複眼が明るい赤色のカイコの卵色眼色変異体「淡赤眼白卵 (*pink-eyed white egg, pe*)」(図1)について、HiSeq2500を用いたRNAseqによる卵の着色時期の遺伝子発現解析により、原因遺伝子の有力候補を割り出すことに成功しました (Osanai-Futahashi *et al.*, in preparation)。この

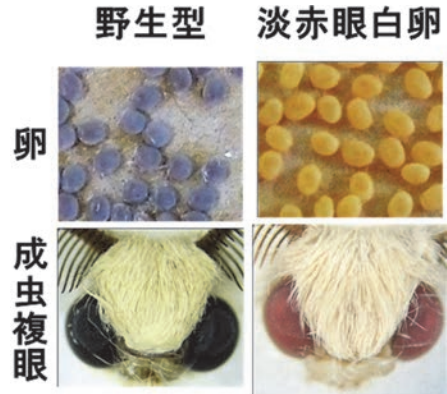


図1 野生型 (左) と淡赤眼白卵変異体 (右) の卵と複眼

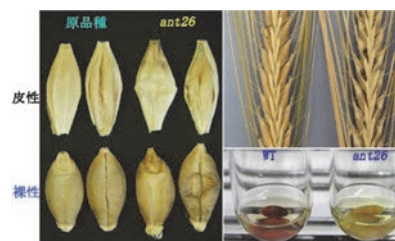
候補遺伝子について、RNAiによる遺伝子ノックダウン、そしてTALENによる遺伝子ノックアウト個体と *pe* 変異体との相補性試験を行うことで、原因遺伝子であることを直接的に証明することができました。RNAseqは、ポジショナルクローニングの原因遺伝子の絞り込みに非常に有用と実感しています。また、モデル甲虫であるコクヌストモドキにおいて *pe* 遺伝子のホモログをRNAiによりノックダウンすると、野生型では黒い成虫の複眼がカイコの *pe* 変異体同様赤くなり、機能が保存されていることも分かりました。カイコには、他にもオモクローム色素合成系に異常があると想定される複数の独立の変異体が存在し、これらについて、RAD-seqによる連鎖解析とRNAseqによる発現解析を進めることで、オモクローム色素合成経路の全体像を理解して行きたいと考えています。

二橋美瑞子 (農業生物資源研究所)
共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ オオムギ種子のプロアントシアニン色素とタンパク質含量を制御する変異体の解析 ◀

オオムギの重要な用途にビール醸造原料としての利用がある。ビール醸造用のオオムギ種子のタンパク質の適正値は11%前後であり、それから逸脱するとビール会社に購入してもらえない。ビールのムギは農産物でありながら工業原料並の厳しい品質が要求される。オオムギのタンパク質含量は、窒素を大量に施用する栽培法で一般に上昇しやすい。これに加え、昨今の異常気象で、開花期の高温不稔が発生し、種子タンパク質含量の上昇する事例が報告されている。さらに、オオムギ種子にはフラボノイド系色素の1種であるプロアントシアニン (PA) が種子の表面に蓄積する。PA含量が高いとビールが濁り問題になる。オオムギ突然変異体 *ant26* は種子のPAが無いことに加え、種子が凹む興味深い特徴を示す。通常のオオムギ種子は殻で被われているが、殻を剥き取った裸性 (*nud*) 遺伝子を交配で導入することで *ant26* 変異体の種子形態を詳しく観察できるようになった。われわれはオオムギで *ant26* 以外にPAおよびアントシアニンの合成や制御に関わる遺伝子を体系的に特定し、機能を解析している。

Ant26 遺伝子はオオムギのPA生合成経路とタンパク質合成



の両方を制御する重要な役割を担うと考えられる。原品種と *ant26* 突然変異体の未熟種子から抽出したRNAの網羅的発現解析により、原因遺伝子を特定するとともに、*Ant26* が制御する遺伝子経路も解明することを目指している。*Ant26* の解明はオオムギ種子の品質を醸造、食用および飼料など異なる用途に応じて適正に制御するのに役立つと期待される。

武田 真 (岡山大学資源植物科学研究所)
共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
佐々木卓治 (総合研究所)
石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

動植物を含む真核生物のゲノムの大部分はトランスポゾン (TE) などのリピート配列によって形成されている。TE は時に“寄生因子”とも呼ばれ、自らの配列を増幅して転移し遺伝子に変異を導入するなど宿主ゲノムに悪影響を及ぼす。このため、生物 (宿主) は TE を不活性化するため RNAi や抑制的なヒストン修飾、DNA メチル化といったエピジェネティック制御機構を進化させてきた。こうしたエピジェネティック修飾により TE は一般にヘテロクロマチンと呼ばれる不活性化クロマチン構造をとり転写が抑制されている。一方、生存に必要な通常の遺伝子領域からはこうした抑制的な修飾は排除されており、活性化エピジェネティック修飾であるヒストン H3K4 メチル化や H3K36 メチル化などが mRNA の転写伸張やスプライシングなど遺伝子発現の過程に重要な働きをしていることが知られている。

最近、我々の研究からシロイヌナズナゲノム中に TE が挿入された遺伝子座、特にイントロンに TE が存在している遺伝子座の存在が明らかになった。興味深いことにこれら遺伝子の多くは TE が挿入されているにもかかわらず活発に転写が起こっており、多くの場合イントロン内に挿入された TE は成熟した mRNA からはスプライシングされて排除されている。さらに驚くべきことに、遺伝子内 TE はその領域を RNA PolII が通過し活発な mRNA の転写が引き起こされているにもかかわらず、遺伝子間領域やセントロメア近傍に蓄積している TE と同様、抑制的ヘテロクロマチン修飾である CG, CHG, CHH サイトの

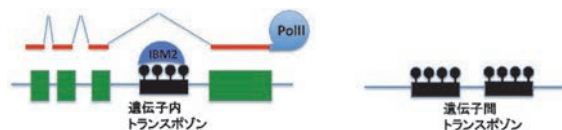


図1 遺伝子内トランスポゾンの制御

遺伝子内トランスポゾンと遺伝子間トランスポゾンではともに DNA メチル化 (黒オリポップ) を受けている。しかしながら IBM2 は遺伝子内トランスポゾン配列に特異的に局在してその影響をマスクし、mRNA 伸長に寄与している。

DNA メチル化や H3K9 メチル化、siRNA の蓄積、維持が観察されている。我々はこれまでの研究からこうした遺伝子内 TE を持つ遺伝子の転写に必要な因子 IBM2 を見いだしている (図1)。現在、次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス解析 (BS-seq) 解析から、こうした因子が遺伝子内 TE に与える影響について解析を進めている。より大きなゲノムをもつ植物には数多くの TE が遺伝子内に挿入されていることがわかっており、我々の知見が農作物などのゲノム解析に寄与することを期待している。

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)
共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)

小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ ゲノム解析による在来馬の起源の解明に関する研究 ◀

近年、サラブレッド種 (*Equus caballus*) を対象としてゲノム解読が実施され、26 億 8900 万塩基対 (推定長) の DNA 配列および 110 万箇所を超える SNP が同定されている。このことにより、サラブレッド種の距離適性に関わる遺伝子も同定され、その生産における配合決定、育成方法や出走競走 (短距離・長距離) の選択に際し、遺伝情報が積極的に活用されつつある。

一方、わが国では、北海道和種馬、木曾馬、御崎馬、対州馬、野間馬、トカラ馬、宮古馬および与那国馬が、固有の在来種として飼養されている。これらの在来馬は、サラブレッド種のような品種改良は実施されておらず、欧米や中近東などの品種との交雑はほぼ皆無であることから、遺伝資源としての価値は極めて高い。つまり、ゲノム配列の解読によって在来馬固有の SNP を同定することは、その形質・表現型の解明に有用であるとともに、逆説的にはサラブレッド種の形質・表現型を知ることにもつながると考えられる。

現在のところ、日本在来馬の起源や由来は定かではなく、主に「二波渡来説」および「単一起源説」の二つの学説が提唱されている。前者は、体高の相違を根拠として、沖縄諸島などの小型在来馬は縄文時代から弥生時代にかけて南方から、本州の中型在来馬は弥生時代から古墳時代にかけて朝鮮半島から、導入されたとする学説である。後者は、マーカーとして中立である血液型蛋白質を用いた系統関係の調査から、朝鮮半島を経由して導入された馬が全国に拡大したとする学説である。品種の起源や由来の検討は形質・表現型の調査のうえで重要であることから、本プロジェクトにおいては、日本在来馬の全ゲノム・リシーケンスによって、日本在来馬の起源を解明することを目的とした。



図 木曾馬 (日本在来馬) 写真は木曾馬乗馬センターの中川氏より提供

木曾馬のゲノム配列を、サラブレッド種と比較したところ、木曾馬のゲノム全般にわたって 540 万箇所を超える SNP、特に非同義置換として 1.4 万箇所を超える SNP が同定された。つまり、同一生物種であっても、品種によって遺伝的に大きな相違が存在することが明らかとなった。本プロジェクトは、日本在来馬の起源や系統の解明のみならず、特に、品種内および品種間における非同義置換の比較により、在来馬やサラブレッド種特有の生理的特徴を明らかにするものと期待される。

戸崎晃明 (競走馬理化学研究所遺伝子分析室)

共同研究先: 半澤 恵 (農学部)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 構成的な防御反応を示す *mekk1* 変異体のサブレッサー遺伝子の同定 ◀

MAP キナーゼ (MAPK) 経路は、3 種類のプロテインキナーゼ (MAPK, MAPKK, MAPKKK) から構成され、病原体感染、塩、低温、傷害など様々な環境ストレスの情報伝達に関与している。これまで我々が同定・解析してきたシロイヌナズナ MEKK1 (MAPKKK) → MKK1, 2 (MAPKKs) → MPK4 (MAPK) 経路は、エリシターにより活性化し、ファイトアレキシン誘導など、低レベルの防御反応を正に制御する。一方、*mekk1* 変異体をはじめ上記経路の変異体は、細胞死、活性酸素蓄積、サリチル酸誘導、矮性 (図 1) など高レベルの防御反応を構成的に示すため、当初の予想に反して、これらの防御反応を負に制御するように見受けられた。一見矛盾するこの現象は、本経路の複雑な制御機構が背後に存在するためであると仮定し、その仕組みの解明に向けてサブレッサー変異体を単離した。本研究ではシロイヌナズナ *mekk1* 変異体表現型に着目した解析であるが、当該変異体の致死形質を回避するため、MEKK1 のドミナントネガティブ型をステロイド処理により発現誘導する形質転換植物系統を親系統としている。

サブレッサー変異体単離にあたり、我々はドミナントネガティブ型 MEKK1 の発現により現れる矮性表現型に着目し、矮性が弱まった変異体を EMS 変異により単離した。これまでに 80 系統の変異体を単離し、抑制度、MEKK1 コンストラクトへの変異、発現誘導量への影響などを評価し、表現型が強くかつ安定している 10 系統に解析対象を絞り込んだ。相補性試験の結果、少なくとも 2 つの相補群に分類可能であることがこれまでに明らかになっている。相補群 1 については NBS-LRR タンパク質をコードする抵抗性 (*R*) 遺伝子をすでに同定している。本研究では相補群 2 の遺伝子同定を試みる。本研究では相補群 2 に属するサブレッサー変異体のリシークエンスを行い、親系



野生型

mekk1 変異体

図 1 野生型と *mekk1* 変異体の比較写真
発芽 2 週間後の植物体を撮影した、白いバーは 5 mm

統をレファレンスとして MutMap 解析 (Nature Biotechnol. 30: 174, 2012) により原因遺伝子の同定を目指す。

本研究により病害抵抗性を誘導する分子機構の一端が明らかになることが期待される。同定された遺伝子の機能強化または抑制により病害抵抗性がどのように変化するか、また、病原体の感染を植物は細胞内でどのような仕組みによって伝えているのか、今後解明していきたい。

市村和也 (香川大学農学部)

寺内良平 (岩手生物工学研究センター)

共同研究先: 太治輝昭 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

国内だけを見ているとなかなか実感することは困難ですが、世界全体に目を向けると魚類養殖は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。先進国における養殖産業成功の鍵は、品種開発にあると言われていますが、海産養殖魚の品種化が成功した例は多くありません。この状況は、高度に品種化された生物を扱う他の農業部門（例 畜産業）とは対照的です。一方で海産魚には、多様な種内集団や近縁種が自然界に豊富に存在するという特徴があります。もし、養殖対象魚の近縁種が有用形質（高成長など）を持つ場合、その形質原因遺伝子の情報を利用することで迅速な品種作製が可能となるはずですが、しかし、食用魚で有用形質原因遺伝子が同定された例は本当にわずかです。というのも形質原因遺伝子の同定が可能な生物は、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に限られていたからです。ところが、次世代シーケンサーの登場により、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とその近縁種たちを材料に用いて、有用形質原因変異の同定を目指します。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っています。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が、成長速度、好適環境、耐病性、骨格形態といった表現型が大きく異なります（図 1、2）。表現型変異の大部分はゲノム DNA の変異

によってもたらされているはずなので、それら原因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ようというのが、我々の計画です。種間に認められる DNA 配列の差をすべてリストアップすることが研究の重要なスタートポイントとなります（図 3）。これに加えて、種間交雑を利用した遺伝マッピングや、野生集団の種内・種間比較といった様々なアプローチを組み合わせ、表現型の際をもたらし原因変異の同定をおこないます。こういった研究は、遠くない将来、水産遺伝育種研究において常法となっていくのではないかと予想しています。

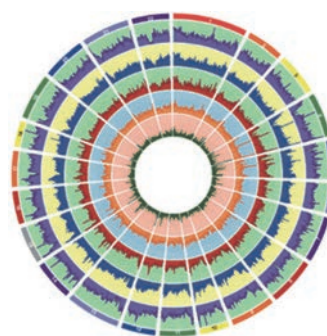


図 3 フグ近縁種群間に認められる 1 塩基置換を全染色体レベルで同定。この図は、5 魚種の比較データを示している。



図 1 成長速度が大きく異なる 2 種のフグ (Hosoya *et al.* 2012 Evolution を改変して引用)



図 2 フグ近縁種群における鱗の多様性。フグ類は一般に棘鱗を持つが、鱗がほとんど退化してしまった種もいる。

菊池 潔 (東京大学水産実験所)

細谷 将 (東京大学水産実験所)

共同研究先: 河野友宏 (応用生物科学部)

小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

酢酸菌には「酸化発酵」と言われる特徴的な生理学的特性があり、その特性を利用した多くの産業が展開されている。その「酸化発酵」には、関与する酸化呼吸鎖、酢酸耐性能、菌膜生成能など解明されるべき多くの課題が残されている。これらの特性を理解し、さらなる産業利用に結びつけるためには、関与する遺伝子群の理解と解析が必要である。

酢酸菌は比較的容易に適応的なゲノム変異を起こすことができ、目的に応じたゲノム育種ができることが知られている (Azuma *et al.*, 2009)。そこで、我々はタイで単離された耐熱性酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 株を用いて、酢酸発酵条件下かつ生育極限温度下で継代培養を繰り返すことにより、TI 株、TH-3 株の 2 つの個別の適応育種株を得た。ゲノムリシーケンスによって、これらの適応育種株の変異箇所を全ゲノムレベルで解析した結果、TI 株、TH-3 株にはそれぞれ 6 箇所および 11 箇所の変異箇所が存在することが見出されている。両株で共通の遺伝子に変異が見出された 2 つの遺伝子を個別に破壊したところ、それぞれ酢酸発酵能と耐熱性の増大に限定的ではあるが寄与していることが明らかとなった (Matsutani *et al.*, 2013)。しかしながら、それらの易変異性によって生じた変異による酸化発酵能の変動機構とその遺伝子発現との相関関係については未だ未知な部分が多い。そこで Illumina HiSeq を利用したトランスクリプトーム解析を行い、適応変異箇所と遺伝子発現との相関解明を目指している。継代培養を繰り返すこ

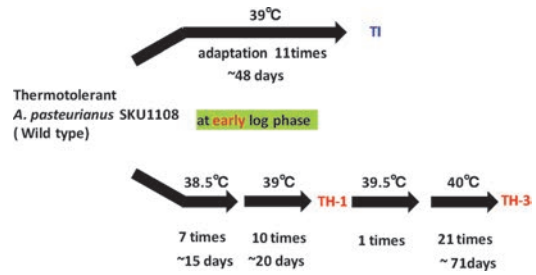


図 1 酢酸菌の適応育種の例。タイで単離された耐熱性酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 株からの高温適応株 TI、TH-3 の適応育種。

とによって得られた適応育種変異株と野生株との遺伝子発現の比較を行うことで、酸化発酵、特に酢酸発酵能、の原理解明が進むことが期待される。

松谷峰之介 (山口大学農学部)

片岡尚也 (山口大学農学部)

薬師寿治 (山口大学農学部)

松下一信 (山口大学農学部)

共同研究先：貝沼章子 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶日本在来種ニホンミツバチの全ゲノム解説◀

日本には2種のミツバチがいます。セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) (写真1) は、養蜂種として世界各地で蜂蜜を始めとした蜂製品の生産、及び栽培植物の受粉に広汎に利用されています。もう一つはニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) (写真2) で、在来の野生種です。ニホンミツバチは、アジアに広く分布するトウヨウミツバチ (*Apis cerana*) の亜種で、青森から鹿児島に分布しています。ニホンミツバチは、一部養蜂種としても人間の管理下で飼養され、(写真3) ニホンミツバチの飼養はブームになっています。その蜂蜜は高値で取引されています。

ニホンミツバチを含むトウヨウミツバチは、セイヨウミツバチと比較すると養蜂種として改良されていないので、蜜の収量は低くまた逃亡しやすいという欠点を持っています。しかし、一方、多くの有用形質が淘汰されずに残っていると考えられ、遺伝資源として注目されています。特に、疾病に対して抗病性が高く、実際、セイヨウミツバチでもっとも重大な病気であるアメリカ腐蝕病には羅病しにくいとされています。さらに世界的な問題になっている寄生ダニミツバチヘギタダニに対して強い抵抗性を持つことが知られています。また、トウヨウミツバチは、アジアの多くの国では、養蜂種として広く蜂蜜生産に利用されています。

セイヨウミツバチは、家畜としての重要性だけでなく、花粉媒介昆虫として多大な貢献していることなどから、研究を進展させるべき動物として全ゲノムを解析対象動物に選択され、2006年には昆虫では、ショウジョウバエ、蚊について3番目に全ゲノムが解読されました。(写真4) その後ゲノム情報を使ってのミツバチの研究は加速度的に進み、昨今の世界的なミツバチ不足の問題のための研究には必要なツールを提供しています。その後、この種の近縁種のコミツバチ (*Apis florea*) の全ゲノムも解読され、ミツバチ種間の比較も可能となりました。

一方トウヨウミツバチは、セイヨウミツバチに最も遺伝的に近い種ですが、そのゲノム解析には手がつけられてきませんでした。トウヨウミツバチを解析し、それをセイヨウミツバチと比較することで、セイヨウミツバチの抱える問題に資することができると考えられます。またニホンミツバチのゲノム解析には、セイヨウミツバチのシーケンスの情報が使えするというメリットもあります。そこで、私たち(農研機構畜草研・京産大)は本共同研究にニホンミツバチの全ゲノム解読を行うことで応募し、採択され、ゲノムセンターの協力も得られることになりました。

ミツバチは、雌が2倍体、雄が1倍体の昆虫で、雄蜂をゲノム解析に用いると染色体間の差を考えなくてもよいというメ



写真1 セイヨウミツバチ (撮影：芳山)

写真2 ニホンミツバチ (撮影：高橋)

写真3 伝統的なニホンミツバチ飼養 (撮影：高橋)

写真4 ミツバチゲノム解読が載った際のネイチャー誌表紙

リットがあります。しかし、ミツバチは小さな“虫”ですので、ゲノム解析に用いる純粋で十分な量なゲノム DNA が抽出できず、大変苦労しましたが、幸いに、キットを使わないクラシカルな方法が功を奏し解析を開始することができました。DNA抽出で少し遅れをとってしまいましたが、現在シーケンスが終了しセイヨウミツバチのゲノムをリファレンスとしてマッピングを行っています。

もうすぐにニホンミツバチのゲノムの全貌が明らかになり、皆様に結果がお知らせできると思います。この共同研究の成果が、新しい養蜂の発展に役立つものと信じています。

木村 澄 (畜産草地研究所)

芳山三喜雄 (畜産草地研究所)

高橋純一 (京都産業大学総合生命科学部)

野村哲郎 (京都産業大学総合生命科学部)

横井 翔 (名古屋大学農学部)

共同研究先：矢嶋俊介 (応用生物科学部)

古川 力 (農学部)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 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 ◀

多くの哺乳類では第二減数分裂中期の卵子（成熟卵子）に精子が侵入することにより受精が完了する。発生工学技術の進歩により、体外で成熟卵子を作成し、同様に受精することが可能となったが、その後の発育能力が体内で成熟した卵子と比べ、著しく低いことが知られている。その原因として細胞周期の進行と細胞質内の変化が調和できていないことがあげられている。そこで、体内と同様の機構で細胞周期を制御する試みが多数なされてきた。その中で我々はウシ卵母細胞を用いて、細胞周期を制御する培養環境がその後の発育能力に影響することを明らかにした (Hashimoto ら, Biol Reprod 66: 1696-1701, 2003)。さらに、Albuz ら (Hum Reprod 25: 2999-3011, 2010) はウシ卵母細胞の cAMP 量を一時的に上昇させることにより、細胞周期の進行が遅延すること、卵母細胞の発育能が向上することを明らかにした。cAMP により cAMP 依存タンパク質キナーゼが活性化され、様々な遺伝子発現を誘起することが知られている。

目的：ウシ卵母細胞の cAMP 量を一時的に上昇させることにより誘導される遺伝子を解明し、卵母細胞の発育能に関わる遺伝子群を明らかにし、体外培養の効率を向上させる。

現在までに得られている結果：既報 (Albuz ら) 同様にウシ

卵母細胞の cAMP 量を一時的に上昇させることにより、卵母細胞の発育能が向上することを明らかにした。また、卵母細胞内の cAMP を上昇させる条件を設定した。また、cAMP 量を上昇させた卵母細胞から RNA を抽出し、ライブラリーの構築を進めている。

期待される成果：TTP に伴い国内の農産物は海外製品との厳しい競争に曝されることが予想される。特に、牛肉、乳製品、豚肉はそれを避けることは難しいと考えられる。今回提案する研究により、優良な遺伝的形質を持つウシ個体を食肉生産のために屠殺された個体から、効率的、かつ安価に生産するシステムが提供できる。また、ブタにおいても同様のシステムが期待できるだけでなく、生殖医療技術を介して本邦における少子化問題を解決する方法を提供する。

橋本 周 (医療法人三慧会 IVF なんばクリニック)

後藤大也 (医療法人三慧会 IVF なんばクリニック)

三谷 匡 (近畿大学生物理工学部)

共同研究先：岩田尚孝 (農学部)

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 植物のパターン認識受容体による遺伝子発現リプログラミングと環境ストレス ◀

植物は、微生物に特有の因子 (MAMPs) や内生の免疫制御シグナル因子 (DAMPs) を、細胞表面にあるパターン受容体と呼ばれる免疫センサーが察知すると、効果的に防御応答を誘導して病原体の感染を防ぐ。パターン受容体が誘導する抵抗性は植物の免疫システムの根幹として働き、特に高温などの環境ストレス条件下においては抵抗性タンパク質の機能が低下するため、より重要な働きを担うと考えられている。

シロイヌナズナの代表的な MAMP 受容体として FLS2 (細菌のフラジェリンを認識) や EFR (細菌の翻訳伸長因子 EF-Tu を認識)、DAMP 受容体として PEPRI/PEPR2 (内生の Pep ペプチドを認識) が知られる。それぞれ特定のリガンドが結合すると、共受容体 BAK1 と複合体を形成して、細胞内へのシグナル伝達を開始する。その結果、大規模な遺伝子発現のリプログラミングを介してさまざまな防御応答経路が活性化され、抵抗性の発動に至る。その過程を担う重要なシグナル制御因子や律速となるシグナル制御ステップについて徐々に明らかになりつつある。しかしながら、植物の免疫システムが、野外では往々にして病害を拡大する環境ストレスからどのような影響を受けるかについてはほとんど研究が進んでいない。DAMP は非生物学的な環境ストレスによっても産生されることや、PEPR シグナル系は私たちの研究から植物ホルモンバランスの攪乱に強いことが示されており、複合ストレスの存在下で生体防御に働くことと推察された。そこで、塩ストレスの存在下で Pep 応答性のトランスクリプトームプロファイルを得ることで、塩

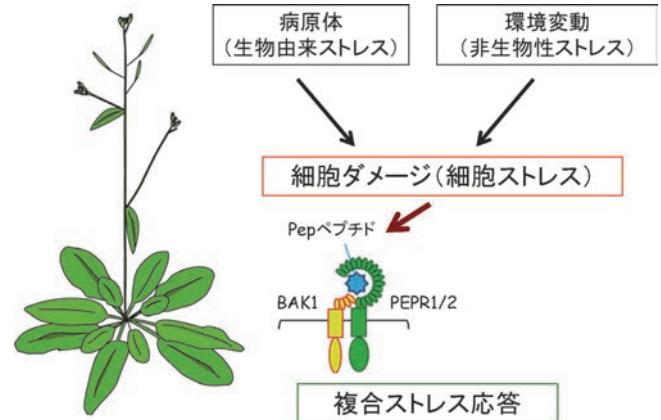


図1 PEPR シグナル系を始めとした DAMP シグナル系を介した植物の複合ストレス応答の概念図。

ストレス応答と PEPR シグナル系の相互作用を明らかにすることを試みている。その結果、植物の複合ストレス耐性の仕組みに関する理解が深まると期待される。

西條雄介 (奈良先端科学技術大学院大学)

共同研究先：太治輝昭 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

新規採択課題

▶ 大腸菌におけるグルコース異化における新規代謝経路切り替え因子の探索 ◀

代謝系は全ての生物に普遍性が高く、自在にその流れを変えながら、様々な局面で重要な生命現象を引き起こしている。しかし、代謝制御に関わる知見が蓄積した今日でも、代謝フローの方向性を細胞が操る機構は明確でなく、任意の人為操作が可能となる目処も立っていない。私たちは研究の背景となる情報に富んだ大腸菌を材料とし、代謝フローの転換を引き起こす分子機構の「枠組み」を明らかにすることを目的として研究を進めている。

私たちはこれまでの研究で、グルコースを主要な炭素源とした最小培地でのバッチ培養系を用い、培養開始時のグルコースを低濃度 (0.002%) とすることで、代謝ステート (Metabolic States) が順次遷移していく実験系を確立した。この遷移の状況は、関連する代謝酵素や制御因子の変異株で調べることで、特定の酵素 (因子) がどの代謝ステートに、あるいは代謝ステート間の遷移に働くかを解析することができる。その一環で、グルコース酸化により解糖系を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート (State I) から、酢酸を利用して TCA を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート (State II) への切り替えの際に Acetyl-CoA を酢酸へ変換する代謝ステート (Transition State) が存在する事を発見し、現在その制御機構を解析している。

Phosphate acetyltransferase をコードする *pta* 遺伝子を欠損させると図 1 のように State I から State II への移行期の Transition state に生育が停滞することが観察された。そこで、この現象に関与する因子を探索する目的で、*pta* 欠損株をグルコース低濃度培地プレート上に塗布し、大きなコロニーを形成する株をスクリーニングし、候補となる 2 株を単離した。液体培養で Transition state が短縮されていることを確認した後 (図

1)、ゲノム上の変異を同定する目的で MiSeq を用いたゲノム解析を行った。その結果、大腸菌 BW25113 を親株とした *pta* 欠損株ゲノム 4.6Mbp に対して、1 つ目の変異体では 0.27-1.47 Mbp の領域が、2 つ目の変異体では 0.39-1.10 Mbp の領域が重複していることが分かった (図 2)。このことから、0.39-1.10 Mbp 内にある遺伝子がゲノム上で 2 倍になることで、*pta* 欠損による Transition state の停滞を部分的に解消することが示唆された。この領域には 600 個以上もの遺伝子が存在しており、現段階では原因遺伝子を特定することは困難であるが、実際に本手法によりアプローチできることが分かった。本手法を継続して行い、変異体の解析数を増やしていくことにより、State I から State II への代謝ステートの遷移に関連する分子機構が明らかとなっていくことが期待される。

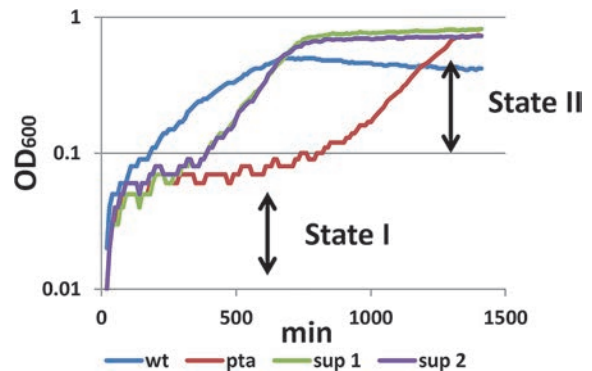


図 1 グルコース低濃度培地における大腸菌野生株、*pta* 欠損株、およびサプレッサー 2 株の生育曲線。

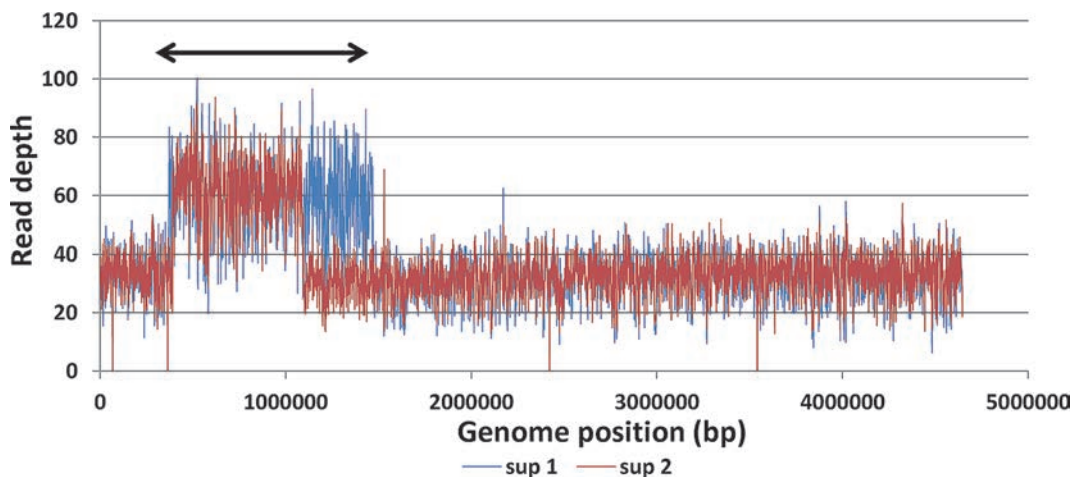


図 2 サプレッサー 2 株のゲノム解析結果。ある領域が重複していたことが分かった (矢印の領域)。

島田友裕 (東京工業大学資源化学研究所)
 共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
 渡邊 智 (応用生物科学部)
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 農作物の栽培管理及び商業利用に有用形質を与える候補遺伝子の網羅的探索 ◀

近年、マーカー選抜や遺伝子導入など、ゲノムレベルで農作物が育種及び作出されるようになりました。そのため、全ゲノム配列はもとより、特定の器官や時期で発現する遺伝子の種類や量もまた、重要な基盤情報といえます。本研究は、「自然界こそが遺伝資源の宝庫である」という視点の下で、農作物に対して有用形質を与える遺伝子を探るために、野草に注目しました。

ニガナ種 (*Ixeridium dentatum*) は、キク科ニガナ属の宿根多年生植物であり、日本全土を含む東アジア温帯・亜熱帯地域の山地や野原、耕地の周辺など至る場所に自生する野草です。この植物は、形態や染色体構成に高度な多様性を有することから複合種とされており、種内で6亜種、1変種、3品種の系統にまとめられています。本研究室では、これら種内の系統関係がどのように成立しているか明らかにするために、個体群調査によるフィールドスケールからDNA多型解析による分子レベルまで幅広く調査を行ってきました。また、これら種内には、系統や倍数体によっては有性生殖を伴わず、アポミクシスと呼ばれる無性生殖を伴う個体が存在します。我々は、ニガナ種内の遺伝的多様性と共に、生殖様式の違いについても関心を寄せていました。

アポミクシスとは、植物で確認される栄養繁殖や無融合性種子形成を起こすような無性的な生殖現象を示す用語です。ニガナの場合、ディプロスポリーと呼ばれる雌しべの胚嚢形成過程における減数分裂時期の異常に由来したアポミクシスに区別されています。ディプロスポリーは、以前から細胞レベルで観測されてきましたが、どのような遺伝子によって制御されているか解明されておらず、未だ謎の多い現象です。もし、アポミクシスを理解し、人為的に制御できるようになれば、例えばヘテロシスの固定化が可能となり、一代雑種品種の育成と増殖の飛躍的な効率化につながると考えられ、農業に新たな革命がもたらされるだろうと期待できます。

そこで、本研究はアポミクシスに関わる候補遺伝子を網羅的に探索するために、有性生殖系統のイソニガナ (*I. dentatum*



今回の研究材料に用いたイソニガナ(写真左)とハナニガナ(写真右)

subsp. *nipponicum*) と無性生殖系統のハナニガナ (*I. dentatum* subsp. *nipponicum* var. *albiflorum* f. *amplifolium*) から開花前後の子房由来のRNAを単離し、RNA-seqによる*de novo*トランスクリプトーム解析を行いました。

現在、イソニガナとハナニガナのそれぞれ開花前後で発現している遺伝子の比較発現量解析による結果が得られました。イソニガナでは、24884遺伝子が開花前で高い発現量を示した一方、14267遺伝子が開花後で高い発現量を示しました。ハナニガナでは、6112遺伝子が開花前で高い発現量を示した一方で、4980遺伝子が開花後で高い発現量を示しました。そして、これら遺伝子は、ホモロジー検索によって識別され、直接アポミクシスを制御しているものかどうか確認しているところです。

さらに今後は、GO解析やパスウェイ解析を利用して複数遺伝子から関連性をまとめる予定です。そして、候補となる遺伝子や代謝系を追及したいと考えております。

高原美規 (長岡技術科学大学生物系)

共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 次世代シーケンサーを利用したトマトの新規突然変異体の原因遺伝子同定と果実肥大抑制機構の解明 ◀

トマトは野菜の生産量世界最大級の作物であり、その栄養価の高さから人類の健康の維持と促進に欠かせないものになっている。一方、我が国ではトマトの自給率が約55%と低く、大部分を輸入に頼っている。この現状を打破するためにはより効率的に収量増が可能となる品種開発が必要である。そのため、果実形成のメカニズムを解明することが重要であるが、この分子機構については未だに未解明な部分が多い。

筆者らが所属する研究室において、EMS処理やγ線を利用して矮性トマト品種マイクロトム (*Solanum lycopersicum*, cv. Micro-Tom) を基盤とした大規模突然変異体集団が作出されている。この中で、着果 (果実形成) が促進される変異体が多数得られている。他方、逆に着果が抑制される変異体 (*suppressor of fruit set*, *sfs*) が得られた。しかし、この *sfs* 変異体の原因遺伝子同定には至っていない。そこで本研究ではこの *sfs* 変異体の原因遺伝子を明らかにすること、また、RNA-seq解析による *sfs* 変異体の着果抑制の機構を解明すること、の2点を目的とした。

本研究で用いる変異体は、受粉後の着果効率が低く、稀に果実が形成する場合でも肥大のスピードが遅く、最終的な果実サイズも極めて小さい (図1)。また、変異体の花粉の稔性に問題は無く、外見上の雌蕊形態に異常も見当たらない。遺伝学的な解析により、*sfs* 変異は単因子劣性と推測されている。マップベースクローニングを実施するため、変異体とトマト栽培品種とのF2雑種集団を作成した。既に開発済みのDNAマーカー

を利用して、原因遺伝子座乗位置を絞り込んでいる最中である。現在、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンセスを実施しており、この情報等を利用して原因遺伝子の同定を目指す。また、緑熟期の果実からRNAを抽出して、RNA-seq解析を実施中である。次世代シーケンサーを利用したゲノム情報科学を用いて *sfs* 変異体を解析することで、果実肥大を抑制する機構の理解が深まり、着果に関する新しい機構が解明されると期待される。

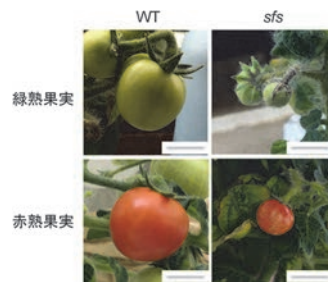


図1 野生株と *sfs* 変異体の果実発達比較。野生株 (WT) と *sfs* 変異体の緑熟果実、赤熟果実の形態比較。 *sfs* 変異体は着果効率が極めて悪く、稀に形成される果実のサイズも小さい。Bar = 1 cm.

有泉 亨 (筑波大学)

平川英樹 (かずさDNA研究所)

共同研究先: 坂田洋一 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ RNA-Seq によるコリネ型細菌 RNase G の基質同定と細胞内代謝制御機構の解明 ◀

一般に細菌では mRNA の転写と翻訳は共役しており、mRNA の合成が完了する前に翻訳が開始される。そのため遺伝子発現制御は主に転写段階で制御されていると考えられ、RNA レベルの転写後遺伝子発現制御の研究は真核生物に比べて遅れていた。しかし近年、大腸菌や病原性細菌をはじめ多くの細菌においてその重要性が明らかにされてきた。本研究では、産業上有用なコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* における RNase を介した遺伝子発現制御の全容解明を目指している。

我々はこれまでに、大腸菌の RNase G が解糖系酵素をコードする mRNA を選択的に分解することにより、解糖系の代謝流量を制御していることを見出している。そこで、コリネ型細菌においても同様な RNase による代謝制御が存在するか検証することとした。コリネ型細菌は RNase G ホモログを一つだけ有しており、欠失可能であった。これまでに、酢酸や脂肪酸の代謝に関わるグリオキシル酸経路の酵素イソクエン酸リアーゼをコードする *aceA* mRNA を特異的に分解することを見いだした。RNase G ホモログは *aceA* mRNA の 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) を認識して mRNA を分解していた (図 1)。

そこで本研究では、RNA-Seq 解析によりコリネ型細菌 RNase G ホモログの基質となる mRNA 分子を網羅的に探索することとした。RNase G ホモログによる mRNA 切断部位を同定することができれば、未だ不明な点の多い RNase G ホモログによる選択的な mRNA 分解制御機構が明らかになると期待される。応用面では特定の mRNA の安定性を制御することにより、効率的な発酵生産のための代謝系の各酵素発現の強化や外来タンパク質の高生産などへの応用が可能になると思われる。

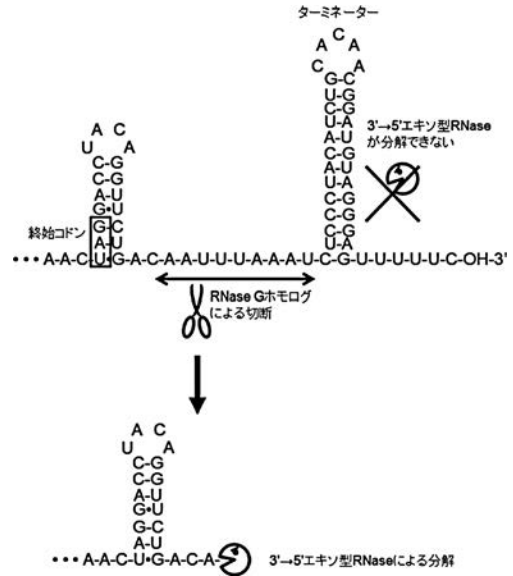


図 1 RNase G ホモログによる 3'-UTR を介した mRNA 分解のモデル

和地正明 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)

平沢 敬 (東京工業大学大学院生命理工学研究科)

共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 環境ストレス耐性を有する *Vigna* (ササゲ) 属野生種の Neo-domestication ◀

我々は Neo-domestication という新たな概念に基づいた育種戦略を展開中である。アフリカのササゲ、インドのリョクトウ、日本のアズキ等、9 種の栽培種を生み出した *Vigna* 属野生種の中には下図に示すとおり、様々なストレス耐性に優れた種が存在している。野生植物の栽培化に重要な形質は「種子脱粒性の消失」「種子休眠性の消失」「可食部大型化」の 3 つであり、このような栽培化形質の多くは遺伝子の機能欠損によって生じたものである。この事実に基づき、ストレス耐性のある *Vigna* 属野生植物に、栽培化遺伝子の機能欠損型人為突然変異を誘発し、既存の作物を超えた強力なストレス耐性作物を作出する Neo-domestication に挑戦している。しかし、目的の変異体を選抜するには、数千から数万個体の植物を栽培する必要があり、多様な劣悪環境に対応する新たな作物群を創成するには莫大な労力を要する。そこで、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って、次世代シーケンサーを用いた逆遺伝学的選抜法 (NGS-TILLING) による Neo-domestication の迅

速化に取り組むこととした。

これまでに、NGS-TILLING で用いる種子大型化遺伝子 (MOG) と難裂莢遺伝子 (SPD) を *Vigna* 属栽培種から同定した。同時に、病虫害に抵抗性のある野生種 *V. stipulacea* の種子に突然変異誘発剤 EMS を処理して 2827 系統の M2 種子を得、表現型選抜により種子休眠性を欠いた変異体を選抜した。さらに M2 種子の EMS 処理から 2112 系統の M2M2 種子を得た。その過程で M2M1 植物から DNA を抽出して NGS-TILLING を行った。その結果、MOG と SPD のエクソンにアミノ酸変異が予想されるアリルを見いだすことに成功した。これら選抜した変異体候補について、今年の夏に系統を栽培して表現型を評価する予定である。この手法で栽培化形質を選抜することができれば Neo-domestication を迅速に達成でき、乾燥、過湿、塩、酸、塩基、病虫害などの劣悪環境に適応した作物群の開発が実現可能な目標となるだろう。

乾燥地

過湿土壌

塩性土壌

酸性土壌

塩基性土壌

耕地

Neo-domestication



耐乾性
(*V. trilobata*)



耐湿性
(*V. mungo*)



耐塩性
(*V. marina*)



耐酸性
(*V. vexillata*)



耐塩基性
(*V. exilis*)



耐病虫害性
(*V. stipulacea*)

友岡憲彦 (農業生物資源研究所)

高橋 有 (農業生物資源研究所)

内藤 健 (農業生物資源研究所)

共同研究先:

入江憲治 (国際食料情報学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 次世代シーケンサーを活用した鱗翅目昆虫の視覚における適応進化の検証 ◀

昆虫の視覚システムは複眼であり、数百から数万の個眼によって構成されている。視覚の仕組みに関する研究が比較的進んでいる鱗翅目昆虫では、個眼には3つのタイプがあり、各個眼には9個の視細胞が含まれることが知られている。全ての視細胞からは、個眼の中心軸に向かって微絨毛が伸びている。レンズを介して集められた光は、微絨毛の膜に多量に含まれる視物質によって特定の波長成分が吸収される。視物質はタンパク質分子のオプシンと発色団のレチナルールからなり、特定の波長が吸収されると細胞内の情報伝達系を活性化する。加えて、感桿の周囲や上部には色素が存在することが多く、これも視物質に吸収される光の波長を変化させる。つまり、視細胞の分光感度を決める要因は2つあり、一つは視物質の波長吸収特性、もう一つは色素によるフィルター効果である。視物質に吸収された光は視細胞を興奮させ、この情報が脳で処理されることで最終的に視覚が生じている。

昆虫の視覚システムには多様性が見られるが、それがなぜ存在するのかについてはほとんど分かっていない。例えば多くの昆虫が生息する陸上で、視覚が生息環境に適応して多様化するのか、またそれが種の多様化の一因となるのかといったことはまだ分かっていない。

そこで本研究は、鱗翅目昆虫を使い視覚システムの多様化進化メカニズムについて明らかにすることを目的とした。これを種間および種内での比較トランスクリプトーム解析による2つのアプローチから行っている。一つ目は、(1) 夜行性と昼行性のスズメガ種間におけるオプシン遺伝子の比較解析と日周環境への視覚の適応の検証である。光環境は日中と夜間とで大きく異なる。スズメガ科 (Sphingidae) は系統関係が明らかにされていて、近縁種間で夜行性から昼行性への生態の移行が複数回起きていることが知られる。このため、日周環境の変化における視覚の適応について進化的解析を行う研究に適している。そこでスズメガ科昆虫を用いて、種間における日周性の移行に

おける視覚の進化メカニズムをトランスクリプトームから探っている。二つ目は、(2) モンシロチョウ種内における色覚の性的二型の進化の検証である。モンシロチョウ (*Pieris rapae*) では1タイプの個眼の上部に、オスにのみ存在する蛍光色素フィルターがあり、視細胞の分光感度に性的二型が生じる (図1)。また、日本のモンシロチョウはメスの翅のみが紫外線を強く反射する。そのためオス特異的な色素フィルターは、オスがメスの翅色を認識する、性選択により進化してきた可能性がある。そこで、モンシロチョウの色覚の性的二型がどのような分子機構によって形成されているかを明らかにし、それが性選択により進化してきたことを検証している。

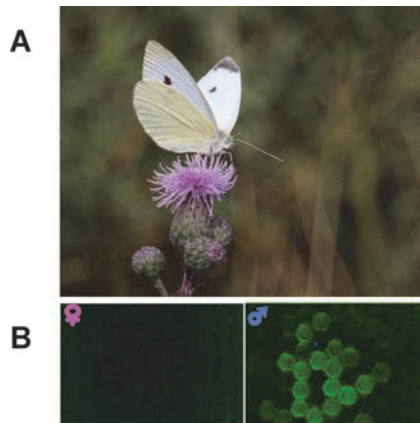


図1 (A) モンシロチョウ。(B) モンシロチョウ複眼表面を蛍光顕微鏡下で撮影したもの。雄の特定の個眼には蛍光色素が存在する。

蟻川謙太郎 (総合研究大学院大学先導科学研究科)
 寺井洋平 (総合研究大学院大学先導科学研究科)
 秋山辰穂 (総合研究大学院大学先導科学研究科)
 共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
 内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ RNA-Seq 法による秋田県在来ダイコンの辛み成分遺伝子の単離 ◀

日本で栽培されるダイコンのなかには、強い辛味を持つ在来の地方品種が存在する。秋田県鹿角市八幡平地区松館集落では‘松館しぼり’ダイコンと呼ばれる在来の辛味ダイコンが栽培されている。これまでに‘松館しぼり’の辛味は、4-メチルチオオプチルイソチオシアネート (エルシン) と 4-メチルチオ-3-ブテニルイソチオシアネート (4MTBI) の2主成分で決まり、青首ダイコンに比べて辛味成分が2倍程度多く含まれることが明らかにされてきた (堀ら 1999)。最近、椿ら (2015) は‘松館しぼり’の集団のなかから、エルシンまたは4MTBIのみを主成分とする個体を見出した。

そこでダイコンの辛味に関する DNA マーカーの開発を目指し、本研究では‘松館しぼり’のエルシンまたは4MTBIのみを主成分とする個体群を供試して、辛味に関する遺伝子の単離を目的として研究を進めている。将来的には、この DNA マーカーを育種の選抜に活用することを考えている。なぜダイコンの辛味に関する DNA マーカーが育種に必要なのだろうか? 官能検査では3個体も口にすれば感覚が麻痺してしまい目的の個体を選ぶことができなくなるため、多数の個体を対象とする育種にとって DNA マーカーは必須となる。

ダイコンの辛味成分は、食欲増進や消化液分泌促進など健康



写真引用 東北ダイコン風土記 佐々木 寿 東北出版企画 2011年

食品としての利用、抗菌作用や食中毒防止など機能性成分としての利用が期待されるので、DNA マーカーが開発されれば、ダイコン育種での多様な利用が展望される。

高橋秀和 (秋田県立大学生物資源科学部)
 椿 信一 (秋田県農業試験場野菜・花き部)
 共同研究先: 小松憲治 (短期大学部)

▶ RAD-seq 法によるレタスの農業形質に関する QTL 解析 ◀

レタス根腐病は、糸状菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* が引き起こす土壌病害であり、近年、長野県ほか4県の露地栽培およびハウス栽培で大規模な発生が確認されている。土壌病害は土壌消毒以外に対応策がなく、抵抗性品種の導入が望まれるが、選択肢が少ないのが現状である。加えて、根腐病を引き起こす3つのレースの存在が確認されているが、複数のレースに対し複合的に抵抗性を示す品種はわずかである。また、アメリカと日本では産地の気候が異なるためアメリカで晩抽性品種として育成された「サリナス」は日本では早抽性品種に分類される。現在、日本の産地が求める晩抽性を有した品種はわずかしか存在しない。日本で育成された玉レタスの多くは、非常に狭い遺伝資源のみを利用して交配育種を行ってきたため遺伝的多様性に乏しく、SSRなどの反復配列多型が非常に出にくい傾向がある。そのため、AFLPやRFLPなど再現性や利便性に難のある多型マーカーを用いて遺伝解析を行ってきた経緯がある。本研究では、迅速な新品種開発を進めるため、RAD-seq法による根腐病抵抗性および晩抽性などの農業形質に関するQTL解析を実施したいと考えている。レタス根腐病抵抗性や晩抽性などの農業形質の原因遺伝子を含む領域が特定された場合、新品種開発を目的としたDNAマーカーの開発や、分子メカニズムの解明に繋げることができる。また、整備された多型マーカーは今後のレタス育種を進める上での技術基盤となりうる。



関 功介 (長野県野菜花き試験場)
芹澤啓明 (長野県野菜花き試験場)
平賀正浩 (長野県野菜花き試験場)
共同研究先: 和久井健司 (短期大学部)
小松憲治 (短期大学部)

▶ 食草転換を出発点とするアゲハチョウ類の進化に迫る ◀

鱗翅目昆虫(チョウとガ)の99%以上が植食性で、その大多数が決まった植物だけを食する偏食家である。チョウは餌植物を変更すること(食草転換)をきっかけとして棲み分けが起こり、何世代にもわたる棲み分けによって変化が蓄積し、種分化(進化)が起きたと考えられている。それならば、食草を認識する仕組みに関わる遺伝子群を見つけ出し、複数種のアゲハチョウ間で比較すれば、種分化が起きた時の原動力を解明することができるのではないだろうか。

チョウの成虫は花の蜜を餌としているので、植物の葉を食べることはないのだが、幼虫は決まった植物だけを食する。しかし、卵から孵ったばかりの幼虫は、体長が約1.5mm程度と小さくて、吸盤状の腹脚を使ってヨチヨチと歩くため移動能力が小さく、広い環境中から餌となる植物を自力で見つけ出すことは難しい。そこで、飛ぶことができ移動能力が高いメス成虫が、幼虫のために餌となる植物を見つけ出し、そこへ卵を産み付けるのである。

メス成虫が植物の種類を正確に見分けるために使っているが、前脚先端部の「ふ節」で感じる味覚の情報である。メス成虫は飛びながら主に視覚を利用して植物を見つけ、半ば手当たり次第に着地する。着地すると、羽ばたきながら中脚と後脚の4本で姿勢を支え、2本の前脚で植物の表面を交互にたたく「ドラミング」と呼ばれる行動をとる。前脚ふ節には、味を感じるための化学感覚子が多数あり、ドラミングで感じ取った味で幼虫が食べられる植物かどうかを確認しているのだ。自らは食すことのない葉の味見によって、幼虫の餌であることが確認できたら腹部を曲げ、先端を葉に押しつけて卵を産み付けるのだ。もし母親が味音痴だった場合は、食草とは異なる植物に卵を産み付けることになってしまい、孵化した幼虫は食えることがで



きなくて餓死してしまう危険がある。

我々の取り組みで、ミカン科食性のナミアゲハから、産卵行動の誘発に関与する味覚受容体遺伝子をひとつ発見し、RNAiによる発現阻害をおこなうことで産卵活性が低下することを確認している。

NGSを利用することで、メス成虫前脚に特異的に発現している遺伝子を網羅的に見つけ出し、ゲノム構造を含めて複数種間の比較を行うことができれば、より詳細にアゲハチョウにおける「進化の原動力」を理解することが可能になるだろう。

尾崎克久 (JT生命誌研究館)
共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ ネギ類の分子育種と機能性開発を目的とした染色体添加系統の遺伝子発現解析 ◀

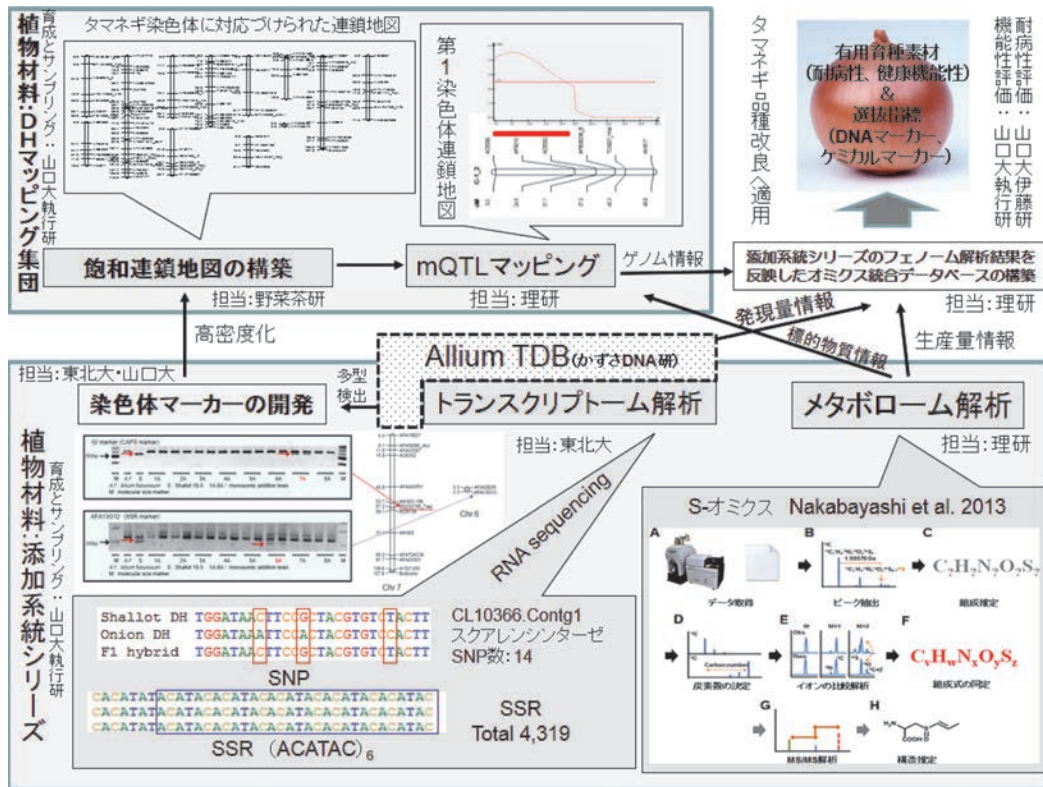
タマネギ (*Allium cepa* L. Common group) の年間生産量は全ての作物中世界第15位 (2011年・約8千6百万トン) となり、野菜の中ではトマト、スイカに次いで生産量が多い (FAOSTAT 2011)。タマネギを人類が栽培した歴史は古く、紀元前23世紀のエジプトまで遡ることができ、ピラミッド建設に従事した労働者の食生活改善に貢献した。この様にタマネギは、‘先住民の伝統的な知恵’ から健康食材と信じられており、このことは今日の医科学分野での基礎研究や広範な臨床研究においても立証されている。

8種類の染色体より構成されるタマネギゲノムはシロイヌナズナの約107倍にあたる約152億塩基対 (17.9pg/1C) を包含している。この巨大ゲノムは研究者の解析意欲を減退させ、連鎖地図作成からなるゲノム解析も限定的に行われていた。我々は、他の主要野菜にないユニークな植物材料として、我々は異種間交雑と染色体倍加を組み合わせて「シャロット (*A. cepa* Aggregatum group) 由来単一異種染色体を添加したネギ (*A. fistulosum* L.) 系統シリーズ (添加系統シリーズ)」を完成し、膨大な遺伝情報を8本の染色体毎に整理することを開始した。まず、添加系統シリーズを用いてウィスコンシン大と国際植物研究所がそれぞれ構築した多数のDNAマーカーからなる連鎖地図が対応するタマネギ染色体を決定しつつ、両地図の統合を後押しすることで染色体地図の基本骨格を整備した。

一方で、遺伝子 (ゲノム)、転写産物 (トランスクリプトーム)、代謝産物 (メタボローム) や表現形質 (フェノーム) を網羅的に解析する研究手法を‘オミクス’と称し、それらを統

合解析して代謝産物の量的変化や表現形質の発現に直接関与する遺伝子を明らかにすることをオミクス統合解析という。ネギ類において成分育種や耐病性育種を精密に行う場合には、この解析手法から得られる情報をバイオインフォマテックス手法により加工・標準化したオミクス統合データベースが必要となる。申請者が研究代表者を務めた平成24-25年度JST日本-NZ戦略的国際科学技術協力推進事業においてネギ類のオミクス統合解析を行い、器官別および系統別のオミクス情報 (10実験区について遺伝子発現5万種、代謝産物蓄積100種を調べた) を相関解析した。その結果、ネギ類の葉鞘部 (鱗莖部) に特徴的に高蓄積するフラボノイド (ルテオリン配糖体2種) が特定の転写因子、水酸化酵素、配糖化酵素などの発現量と高い正の相関を示すことが解った。これらの遺伝子のアノテーションはいずれもシロイヌナズナで機能解明されているフラボノイド生合成関連遺伝子であった。すなわち、“オミクス統合解析で非モデル植物の代謝関連遺伝子を推定することは可能であり、その予測精度も既知の現象を説明できるレベルにある”と結論付けられた。

本研究では、機能性代謝物の宝庫 ‘タマネギ’ の化学内容成分群 (含硫化合物、フラボノイド類、サポニン類等) に着目し、染色体変異系統や交雑集団からなるネギ属バイオリソースのオミクス統合解析により複雑な代謝系やその遺伝系を紐解きながら、持続可能な農業生産に寄与する健康機能性と植物病害抵抗性を併せもつタマネギ育種素材の獲得を目指す。



執行正義 (山口大学)
 共同研究先: 杉山信男 (農学部)
 峯 洋子 (農学部)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 食品媒介病原体を次世代シーケンサーによる全ゲノム解析することがもたらす食の安全に関する研究 ◀

我が国の畜産界を取り巻く状況は厳しく、安価な海外産畜産物の輸入増加により経営状況が悪化している。この状況を打破するためには、より消費者の嗜好に合った畜産物を提供していくことで国内産畜産物の付加価値を向上させ、安価な輸入畜産物との価格競争から脱却する以外に方法はない。近年、消費者のより安全な食品を求める嗜好が増加しており、多少割高であっても安全な食品を購入するように意識が変化してきている(図1)。従って、食の安全は畜産物の付加価値向上のための要素として成立する。しかし、現状では畜産物による食中毒等の食品起因感染症が毎年多く発生しており、畜産物は食の安全を消費者に十分提供出来ているとは言い難い。

食品起因感染症の制御には、家畜、ヒトおよび環境中といった広範囲における食品媒介病原体の動向を把握し、From Farm To Table での対策を行う必要がある。そのためには一塩基多型

(SNP) のような安定的な遺伝子マーカーに基づく集団動向調査 (population dynamics) や集団遺伝学的解析 (population genetics) に基づくリスク解析を実施しなければならない。しかし、食品媒介病原体の SNP はまだあまり明らかになっていない。

そこで、食品媒介病原体のうち腸管出血性大腸菌 O157 および *Salmonella infantis* を対象として、次世代シーケンサーを使用して re-sequencing 解析を行い、SNP 検出を行った。*S. infantis* に関してはこれまでの我々の先行研究に合致する結果が得られた。一方、腸管出血性大腸菌 O157 では 146,937 個の SNP が検出された。それらの中から、過去に報告されている SNP (図2) との整合性等を調査したところ、それら SNP を系統学的解析に使用することへの疑義が生じたため、新たに系統学的解析に有用な SNP を調査する必要があることが判明した。

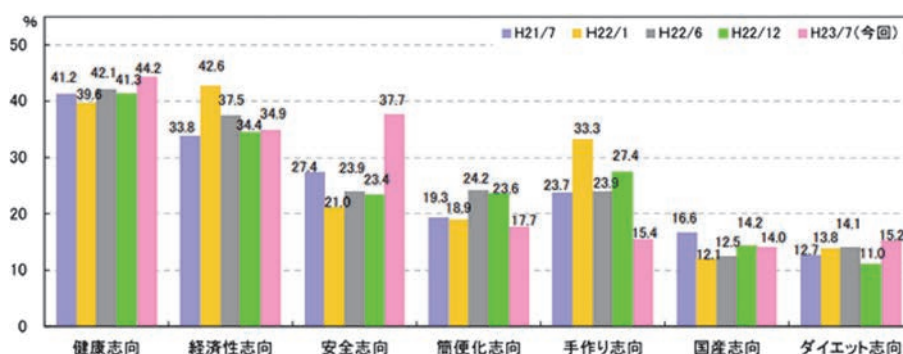


図1 今後の食の嗜好の推移 (「平成 23 年度消費者動向調査結果」日本政策銀行)

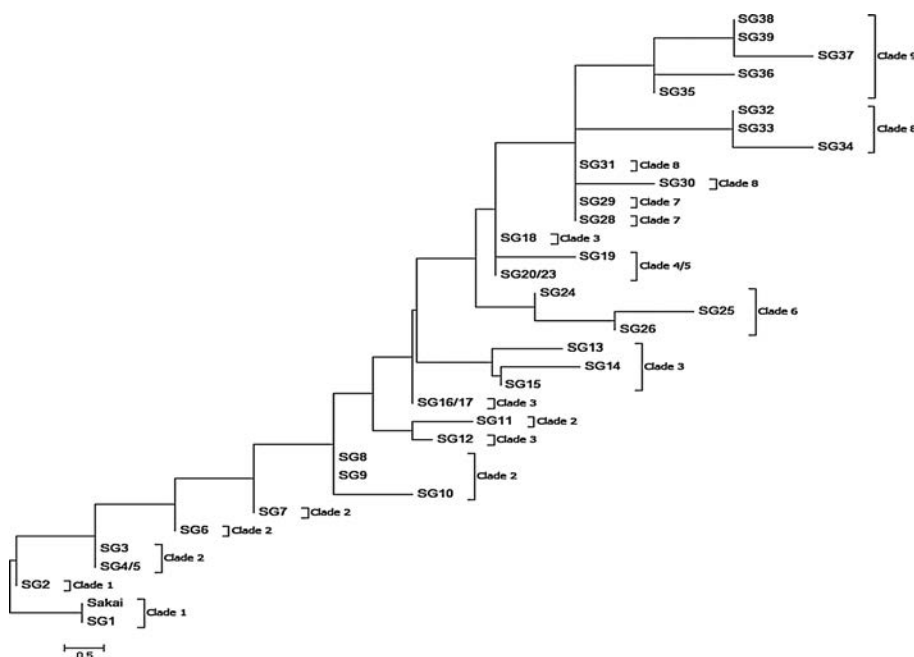


図2 Manningらによって報告された SNP に基づく腸管出血性大腸菌 O157 の進化系統

横山栄二 (千葉県衛生研究所)

共同研究先: 村上寛史 (農学部)

石毛太一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 植物培養細胞からの再分化個体において活性化されるトランスポゾンの同定 ◀

植物ゲノムには多くのトランスポゾンが含まれているが、それらは通常エピジェネティックに不活化されており、転移頻度は極めて低い。我々は、培養細胞から再分化させた植物個体において、内在のレトロトランスポゾンがエピジェネティックに脱抑制され転移する現象を、マメ科のモデル植物ミヤコグサで見出した。この現象は、組織培養が植物ゲノムのエピジェネティックな変化を誘発しうる事、またその変化が再分化個体にも受け継がれ、維持されうる事を示している。またレトロトランスポゾンが活性化されたミヤコグサは、遺伝子タギング集団の構築に利用できた。同様の現象はあらゆる植物種で起こりうると考えられ、つまりあらゆる植物種で内在トランスポゾンを利用した遺伝子タギング系が構築可能と考えられたが、その実現可能性についての検証は未だ行われていない。

上述のような組織培養に伴うエピジェネティックな変動は、トランスポゾン以外でも生じる可能性がある。植物において組織培養は、クローン植物体を大量生産する技術として、またトランスジェニック植物作出の基盤技術として盛んに利用されているが、再分化植物に形態異常等が生じることがあり、それらは「ソマクローナル変異」と呼ばれる。ソマクローナル変異にも、培養期間中のエピジェネティックな変動が関与している可能性が示唆されているが、その詳細は分かっていない。

そこで本研究では、ダイズ、トマト、アブラナ科野菜、コムギ、イネという複数の栽培植物種において、培養細胞から再分化させた植物個体のトランスクリプトーム解析を行う。解析を通じ、再分化個体で活性化されるトランスポゾンを同定する事ができれば、そのトランスポゾンを利用した遺伝子タギング系を構築し、当該栽培植物の育種や有用遺伝子同定に利用できる。一方、解析を通じて、再分化個体において発現レベルが変動した遺伝子を同定する事ができれば、それらの遺伝子のエピジェネティックな変化の有無を解析し、ソマクローナル変異とエ

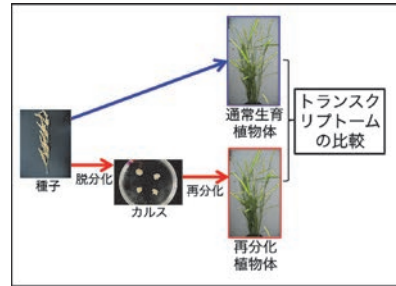


図 解析の概略

種子から通常の方法で栽培して得た植物体（上）と、カルスから再分化させた植物体（下）との間で、トランスクリプトームの比較を行い、再分化個体で転写変動している遺伝子やトランスポゾンを同定する。

ジェネティック制御との関係について理解を深める事ができる。以上は、栽培植物におけるトランスポゾントギングの汎用性向上や、ソマクローナル変異の積極的な農業利用の可能性を検討する上で、必要不可欠な解析である。

- 深井英吾 (新潟大学自然科学系)
 有泉 亨 (筑波大学生命環境科学研究科)
 藤郷 誠 (農業食品産業技術総合研究機構)
 安倍史高 (農業食品産業技術総合研究機構)
 野々村賢一 (国立遺伝学研究所)
 西尾 剛 (東北大学大学院農学研究所)
 岡崎桂一 (新潟大学自然科学系)
 共同研究先：小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 次世代シーケンスを用いたオオハマニンニクのトランスクリプトーム解析 ◀

大気中のCO₂濃度の上昇、乾燥地域の拡大や温暖化、土壌劣化（酸化やアルカリ化、塩害）により、穀物が良好に生育する適地が失われつつある。野生植物には、現在でも様々な厳しい環境で生育するものがあり、その遺伝子資源を作物開発に用いることが重要である。海浜において根茎を形成し、旺盛に生育する多年生植物のハマニンニク属 (*Leymus*) は、コムギ連の中でもバイオマス生産性が高く、乾燥、塩、高温ストレスなどに強いスーパー植物である（図1）。これらの形質は、現在の主要穀物では栽培化の過程で失われている傾向にある重要な形質である。オオハマニンニクはコムギとの属間交雑が可能であり、オオハマニンニクの染色体を一对保有するコムギ系統（染色体添加系統）が開発されている。これらの染色体添加系統はコムギとほぼ同等の形態であるが、オオハマニンニクの性質の一部を持ち合わせており、低投入で高生産性を実現する生物的硝化抑制 (BNI) や高リン酸吸収性、アルミニウム耐性、高温耐性などの有用形質が付与されていることが明らかになっている。しかしながら、オオハマニンニクの遺伝子情報が明らかになっていないために、これらの有用形質がどのような遺伝子によりもたらされているのか明らかになっていない。そのために、本年度は、通常状態、高アンモニウム処理、高塩ストレス処理時に発現するオオハマニンニクの全遺伝子配列を決定することを目指した。今年度の解析では、オオハマニンニク染色体を添加したコムギの次世代シーケンス解析を行い、コムギ遺伝子とオオハマニンニク遺伝子の違いを判別できる塩基配列を把握す



図1 海岸に生えるハマニンニク属

る SNP を同定した。

今後は、この SNP 情報を利用し、オオハマニンニクの各染色体を添加したコムギ系統で、トランスクリプトーム解析を行い、各オオハマニンニク遺伝子がどの染色体に存在しているかを明らかにすることを目指す。

- 花田耕介 (九州工業大学若手フロンティア研究アカデミー)
 辻本 壽 (鳥取大学乾燥地研究センター)
 岡本昌憲 (鳥取大学乾燥地研究センター)
 共同研究先：三井裕樹 (農学部)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ イネのオルガネラゲノムの多様性解析 ◀

イネの祖先種の栽培域は、熱帯域の狭い地域に限られていましたが、その後の栽培化の過程によって、イネの栽培域は世界中に拡大し、赤道直下の気候や北海道の気候といった多彩な環境に適応しました(図1)。このような栽培域拡大の大きな推進力が、イネの核ゲノムの適応・進化であることは明らかです。一方で、我々は、イネのオルガネラゲノムの適応・進化の効果もまた、環境適応のもう1つの原動力であったのではないかと考え、本研究を開始しました。

これまでに、我々が独自に開発したイネの屋内栽培系(バイオトロンプリーディング法)を用いて、1世代あたり2-3ヶ月の速さで、連続戻し交配を行い、22系統(ジャポニカ品種の水稲と陸稲、トロピカルジャポニカ品種、インディカ品種、アフリカ栽培イネ、野生イネなど)の外來性オルガネラゲノムをもつイネの細胞質置換系統を作出しました。これらの細胞質置換系統の一部を圃場で栽培したところ、比較的遠縁の*O. glaberrima*, *O. rufipogon*の細胞質ゲノムに置換することで、開花期が遅延し、草丈が高くなった(図2)。このことは、オルガネラゲノムが機能的な多様性をもつことを示唆します。

本共同研究においては、次世代シーケンズ解析サンプルと

して、全DNAを用いるのではなく、新潟大学の三ツ井敏明研究室との共同研究により、オルガネラ単離を行い、高純度のオルガネラゲノムサンプルを用いて、解析を実施します。精製度の高いサンプルを用いることで、プラスチドゲノムとミトコンドリアゲノム間に相同性の高い領域が多く見られますが、これらの影響を最小限に抑え、高精度の結果を得ることが期待できます。

イルミナのMiSeqによるゲノミクス解析によってイネのオルガネラゲノムの種間比較を行い、塩基多型を網羅的に検出し、機能的な多様性の原因に迫ります。本研究結果から、環境適応のために成されたイネのオルガネラゲノムの変化の足跡を辿り、核ゲノムとオルガネラゲノムの両者の変遷を理解することで、イネのさらなる環境適応力の向上策の発見を目指します。

また、上記の研究目的と合わせて、ミトコンドリアゲノムの*de novo assemble*を試みることで、植物ミトコンドリアゲノムの構造に特有なマルチパーティット構造(単一環状の構造を取らず、長さの異なるさまざまなサイズの環状構造DNAの集合体として存在している)についても解析を行う予定です。

イネの歴史(→栽培域拡大の変遷)

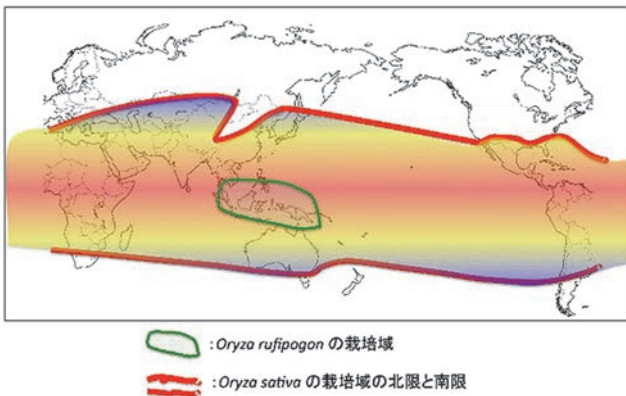


図1

核ゲノムをコシヒカリ(Ko)を共通にもつ細胞質置換系統イネ

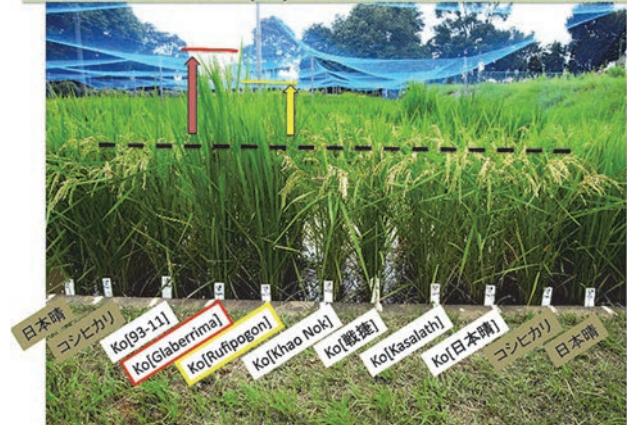


図2

木下 哲 (横浜市立大学木原生物学研究所)

三ツ井敏明 (新潟大学農学部)

共同研究先: 小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 植物細胞内共生リケッチア “MIDORIKO” の宿主緑藻細胞への影響 ◀

リケッチアは宿主の細胞内でのみ増殖するバクテリアである。リケッチアのほとんどの種は昆虫やダニなどの節足動物の細胞内に生息しており、一部はヒトに感染するとツツガムシ病や発疹チフスなどの重篤な感染症を引き起こす。一方、真核生物の細胞内器官であるミトコンドリアは、リケッチアに近縁なバクテリアが10億年以上前に共生して誕生したと考えられている。この恐ろしくも興味深いリケッチアが最近、30年以上培養されていた緑藻類ボルボックス目の細胞内にも共生し続けていたことが明らかになった。

緑藻類ボルボックス目は、モデル生物である単細胞のクラミドモナスや群体性のボルボックスなど、鞭毛を持ち遊泳する多数の種で構成される。ボルボックス目には細胞内にバクテリアが共生している系統株が存在することが1970年頃から知られており、筆者らの研究においても、プレオドリナというボルボックスに近縁な群体性緑藻の一種 (*Pleodorina japonica*) の細胞内に、おびただしい数のバクテリアが生息することが顕微鏡で観察された。しかし、それらの共生バクテリアの種類や性質は一切不明のままであった。2012年、筆者らは細胞内共生バクテリアが報告されていた緑藻ボルボックス目の藻類、プレオドリナと単細胞・4鞭毛性のカルテリア (*Carteria cerasiformis*) を用いて、バクテリアの系統的位置を明らかにする目的で研究を行った (Kawafune et al. 2012, PLoS ONE 7: e31749)。その結果、バクテリアのリボソーム RNA 遺伝子を解読し、カルテリアとプレオドリナの共生バクテリア “MIDORIKO” がヒト病原体のリケッチアと同じリケッチア目リケッチア科に位置することを示した。また “MIDORIKO” のリボソーム RNA に特異的に結合する蛍光 DNA プローブを用いた細胞染色 (FISH) によって “MIDORIKO” の植物細胞内における存在を確認した。

“MIDORIKO” は非捕食性の植物細胞内に生息することが初めて確認されたリケッチアである。宿主の緑藻細胞は容易に無菌培養でき、餌由来の塩基配列の混入なしにリケッチアと宿主細胞を同時に解析できる点で “MIDORIKO” は優れた材料であり、

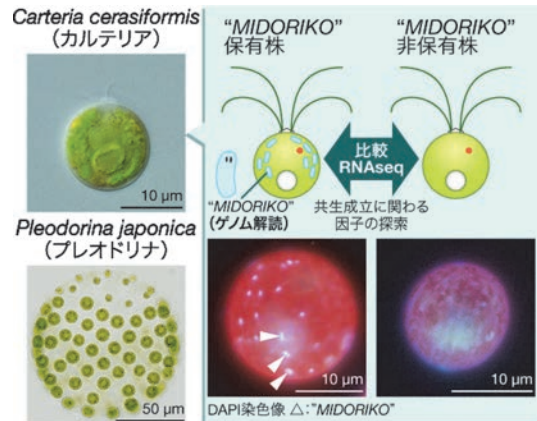


図1 “MIDORIKO” の宿主緑藻カルテリア (左上) とプレオドリナ (左下)、及びカルテリアの “MIDORIKO” 保有株 (中央) と非保有株 (右)。細胞内の “MIDORIKO” は DAPI による DNA 蛍光染色では桿菌状シグナルとして観察される (中央下)。

今後医学や農学、及びミトコンドリアの初期進化過程の研究に大いに役立つと期待される。現在、“MIDORIKO” ゲノム解読ならびに “MIDORIKO” 保有株と非保有株の比較 RNAseq 解析を実施し、“MIDORIKO” と宿主緑藻細胞間の共生成立に関与する遺伝子を探索している。

野崎久義 (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)
川船かおる (東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 天然由来液胞化誘導剤 vicenistatin と抗ウイルス物質 eudistomin C の標的分子同定 ◀

土壌微生物や海産生物等が生産する小分子化合物には、そのユニークな構造や生理活性の強さから臨床薬のリード化合物や特異的阻害剤として用いられるものが多い。このような応用には、それぞれの小分子化合物の標的分子・作用機構を明らかにすることが必要であるが、一般に標的分子の同定や作用機構解析は困難を伴うことが多い。

Vicenistatin は土壌放線菌が生産する抗腫瘍性マクロラクタムであり、動物細胞に対して短時間のうちに液胞様構造を誘導すると言ったユニークな活性を示す。我々は本物質が出芽酵母においても細胞毒性を示すこと、またエルゴステロール合成系の各遺伝子破壊株が本物質に対して耐性あるいは感受性を示すことを見出しているが、直接的な標的分子・作用機構は未だ持って不明のままである。一方、eudistomin C はカリブ海産海綿から単離された抗ウイルス活性を示す小分子化合物である。我々は本物質が細胞毒性も示すことに着目し、出芽酵母を用いて細胞毒性に関わる標的分子の同定を行った。3つの相補群からなる eudistomin C 優性耐性変異株を解析したところ、*YER1* 遺伝子はリボソーム小サブユニットをコードしており、生化学的解析から eudistomin C は蛋白質合成を阻害することが明らかとなった。また eudistomin C ビオチン化プローブを用いた結合蛋白質探索においても結合することを見出した。しかしながら *YER2*, 3 の耐性に関わる変異点はタンパク質コード領域に見出すことが出来なかったことから、*YER2*, 3 の耐性遺伝子はタンパク質をコードする領域には無いと考えられる。本研究では、1) vicenistatin 感受性を示す出芽酵母株 (エルゴステロール合成遺伝子欠損株) を元株に、耐性変異株を取得し、その変異遺

Vicenistatin による動物細胞の液胞形成

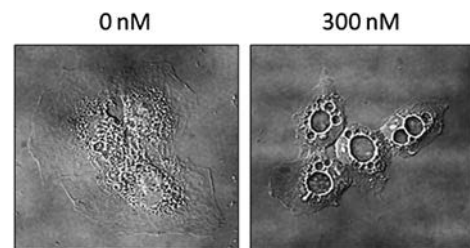


写真 ラット正常繊維芽細胞 3Y1 に 2 時間薬剤処理を行った時の細胞形態

伝子を同定することで、vicenistatin の作用に関わる因子 (標的分子や下流のシグナル因子など) を同定すること、及び、2) non-coding 領域に存在する eudistomin C 耐性遺伝子を同定すること、を目的としている。これらの研究により、初期エンドソームの融合・成熟に関わる分子機構や、抗腫瘍活性との関連、及び、細胞増殖に関わる新たな non-coding 領域が同定されることが期待される。

臼井健郎 (筑波大学生命環境系)
知念拓実 (筑波大学生命環境科学研究科)
吉田圭佑 (筑波大学生命環境科学研究科)
共同研究先: 笠原浩司 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

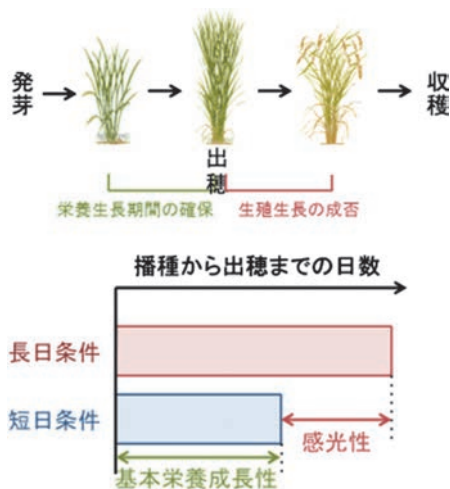
▶ QTLseqによる短日条件下のイネ出穂遅延因子の探索 ◀

イネの出穂期（開花期）は、栄養生長期の長さや好適環境下での生殖の成否に関わることから、栽培作期や品種の地域適応性を決める重要な農業形質の一つである。古くから品種の出穂特性は、基本栄養成長性と感光性によって表されてきた。基本栄養成長性は、イネが出穂するのに最適な環境、すなわち高温・短日条件における出穂日数によって表される。一方、感光性は、長日条件下の出穂日数と短日条件下の出穂日数の差によって表される。近年の分子遺伝学的研究の進展により、多くのイネ出穂関連遺伝子が単離されてきた。しかし、これらの多くの遺伝子が長日条件下で出穂遅延に関わる感光性遺伝子であることがわかっている。一方、基本栄養成長性に関わる遺伝子について、これまで私たちはγ線照射変異体や交配集団を用いて探索してきたが、ほとんど解明が進んでいない。

イネジャポニカ品種日本晴は短日条件において50日程度で出穂するのにに対し、インディカ品種 Kasalath では出穂までに80日以上を要する。この出穂遅延は日本晴を遺伝的背景の一部の Kasalath ゲノム断片を持つ準同質遺伝子系統では説明できないことから、一遺伝子支配ではないことが実験により明らかになっている。日本晴に Kasalath を戻し交雑した自殖系統 (BIL) 98 系統を調査したところ、Kasalath と同程度の出穂期を示す BIL55 が見つかった。そこで本研究は、BIL55 と日本晴の交雑後代 F2 集団を利用して QTLseq を行い、短日条件下での出穂遅延 QTL を網羅的に検出することを目的とする。

本研究では、BIL を交配親として利用するため、F2 集団の

遺伝的背景の8割程度が日本晴である。そのため分離の歪みや遺伝的背景によるノイズが少ないことが期待できる。また日本晴と Kasalath はゲノムがすでに解読されているため、QTL 領域を特定できるだけでなくシーケンス情報から遺伝子内のアミノ酸置換や機能欠損を特定することが可能であり、遺伝子単離までの期間を大幅に短縮することが可能である。



齋藤大樹 (京都大学大学院農学研究所)
共同研究先: 佐々木卓治 (総合研究所)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ トルコギキョウの多様な花形が生まれる仕組みをゲノム情報から解析する ◀

トルコギキョウ (ユーストマ, *Eustoma grandiflorum*) は、北アメリカに自生する野草ですが、1970年頃から日本の種苗会社や育種家を中心に品種改良が大きく進み、現在ではバラ、カーネーション、ユリとならぶ世界で広く生産される主要な園芸切り花にまで成長しました。現在では非常に多種多様な草姿、花型、花色、作型の品種が育成されています。

植物は、軸状の器官である茎を中心として、平面的な形態をした葉状の器官が、らせん状に配置した形態が基本です。花もこの基本構造をもち、花軸のまわりに花弁など花器官がらせん状に配置した形態が基本です。進化にともない、軸の分枝パターン、葉状器官の配置、それぞれの葉状器官のかたちが多様化して現在の被子植物の多様な形態ができあがりました。

私たちは、特に花弁の形態がどのように多様化したのかを明らかにしたいと考えています。この研究では、トルコギキョウの花弁の立体形態に着目しました。トルコギキョウの花のかたちは、コップ型、ロート型、ベル型など花弁の湾曲の仕方により分類することができます。これらの花の形はどのような仕組みで決定されるのでしょうか。チューリップやユリの花では、花被の表裏における成長の差によって花被の屈曲が説明されます。しかし、トルコギキョウのように厚みのない花弁では、表裏の成長の差はほとんどありません。たとえば、厚みが0.1mmで半径1cmの屈曲がある場合、表裏の弧の長さの差は計算上1%にしかならず、このような差は弾性的に生じる範囲内であり、この差によって立体的な構造を維持することはできないでしょう。むしろ、平面内で領域的に生じる歪みによって形成される力学的な構造によって立体形態が維持されていると考えられます。

もし花弁全体が同じ速度で成長すれば、面積が拡大するだけで、花弁のかたちは変わりません。しかし、花弁のある部分の面積だけが特異的に拡大すると、花弁全体に構造的な歪みが生じ、立体的な湾曲構造を生じます。たとえば花弁の周縁の成長が速いと、花弁の周りがフリル状に波打ち、一方、花弁の中心



図1 左: テキサス州に自生するトルコギキョウ。右上: 花弁の湾曲。右下: コップ型の花

部の成長が速いと、中心部が盛り上がりドーム状の形態になります。花弁の部位による成長速度の違いは、より進化した植物では一般的にみられ、極端な例ではランのような複雑な花形をつくります。花弁の部位による成長速度の違いは、花形が進化にともない多様化する基本的な機構と考えられます。

この課題では、花形の異なるトルコギキョウ品種の花弁の各部位における遺伝子発現を RNA-Seq 解析により網羅的に解析し、多様な花形が形成される仕組みをさぐることを目指しています。

河鱒実之 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
共同研究先: 乗越 亮 (農学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ ショウジョウバエ近縁種を用いた食性依存的な生体応答の比較ゲノミクス ◀

ヒトを含む多細胞生物は絶えず変化する環境要因にさらされており、その主要な要因の一つは栄養です。我々が日常摂取している栄養素は、それぞれ単独で個体の成長や健康に影響を与えるのではなく、互いのバランスが重要であると報告されています。本研究では、絶えず変化する栄養バランスに対して、個体はどのように応答し発生などの生命活動を維持しているかを、ゲノム情報が整備されたショウジョウバエ近縁種群を活用して、ゲノムレベルで解明することを目指しています。具体的には、栄養バランス変化に柔軟に対応できるシステムを備えている種と、そうではない近縁の種との遺伝子発現や代謝レベルでの生体応答の違いを比較し、適応能力の分子基盤を解明したいと考えています。

モデル生物キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) は、近年、栄養状態依存的な成長と代謝を調節する基本メカニズムの理解にも大きく貢献をしつつあります (Padmanabha and Baker, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2014)。*D. melanogaster* は、自然界では全世界の人家近くに生息し、発酵した多種類の果物を食性としており (広食性)、実験室内では様々な栄養条件下での飼育が可能です。たとえば、低栄養状態におかれた幼虫は、幼虫期の進行を遅延させ、身体の体積が富栄養条件下の50%あるいはそれ以下にまで減少させてでも、成虫まで発生できる強靱な仕組みを持ちます。このような、栄養不良下でも極めて柔軟に発生を調節する現象は、特定の地域にのみ生息し、発酵した特定の植物のみを食性とする (狭食性) ショウジョウバエ近縁種では観察されません (Green II and Extavour, *Proc. R. Soc. B*, 2014; Matzkin et al., *J. Nutr.*, 2011)。本研究では、このような種間の相違が、どのような遺伝子の制御プログラムによって生み出されているのかを、RNA-seq 解析などを糸口にして明らかにしようと試みています (図)。

東京農薬大学生物資源ゲノム解析センターの皆様との共同研究の機会を賜ったことに、厚く御礼申し上げます。

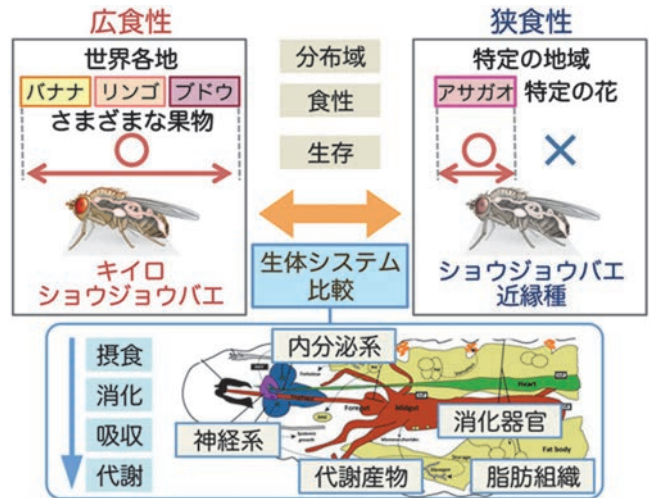


図 栄養バランスに応答する生体システムの比較解析

広食性の *D. melanogaster* は、狭食性の近縁種に比べて、栄養条件に対して極めて柔軟に対応する能力をもち、分布域も広い。このような能力のちがいを生むメカニズムを、種間を比較することで解明することを目指す。Lemaitre and Miguel-Aliaga, *Annu. Rev. Genet.*, 2013 と Padmanabha and Baker, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2014 の図を改変。

服部佑佳子 (京都大学大学院生命科学研究所)

渡辺佳織 (京都大学大学院生命科学研究所)

古溝優生 (京都大学大学院生命科学研究所)

上村 匡 (京都大学大学院生命科学研究所)

共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 黒毛和種牛における離乳前後のルーメン発育と糖脂質代謝変化に関わる新規調節遺伝子の同定 ◀

反芻家畜は離乳前後で反芻胃および糖・脂質代謝系が大きく変化し、反芻動物特有の消化管形態、代謝系を持つようになる。離乳前の子牛はミルク由来の糖や脂質、蛋白質を小腸において吸収し、エネルギー源として利用している。しかし離乳後では発達した反芻胃内の微生物発酵により生じた揮発性脂肪酸から、肝臓および脂肪組織においてそれぞれ糖新生、脂肪酸合成を行うようになる。このような特徴的な変化を引き起こすメカニズムについては、過去に形態学および生理学的なアプローチから解明が試みられており、反芻胃内で発生する揮発性脂肪酸や飼料自体の機械的な刺激が反芻胃の発達を促すことが知られている。しかし、その背景となる分子メカニズムは十分に解明されていない。

そこで本研究では離乳に伴う反芻胃および肝臓、脂肪組織の発達を引き起こす遺伝子の探索およびそれらの機能解析を行う。その主な手法として次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子発現変化の解析を行う。これらの遺伝子の同定および発現解析を行うことにより、反芻動物の反芻胃発達およびエネルギー代謝の変化に関わる新たな分子機構を明らかにすることが期待される。また、このような結果から離乳期の子牛のマネ

離乳前(5週齢)

離乳後(15週齢)

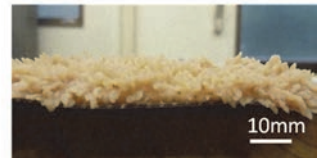


図1 黒毛和種牛の離乳前(5週齢)と離乳後(15週齢)のルーメンの絨毛組織

ジメントや給餌法を改良し、反芻動物の生産性の向上にも寄与できる可能性がある。

盧 尚建 (東北大学大学院農学研究科)

後藤貴文 (九州大学大学院農学研究科)

共同研究先: 河野友宏 (応用生物科学部)

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 植物生産性を支える幹細胞・分化器官のエピゲノムコミュニケーション ◀

植物の地上部の器官、すなわち葉や茎、花や実はすべて、元をたどると「茎頂メリステム」と呼ばれる組織から形成されているため、茎頂メリステムの機能を理解することは植物の生産性向上を目指す上で重要な研究領域である。茎頂メリステムは茎の先端に位置する直径 50 マイクロメートルほどのドーム状組織であり、その内部には幹細胞（自身は未分化性を維持したまま、周囲に分化細胞・組織を提供していく細胞）が位置している。茎頂メリステムは生殖過程の直前まで維持されているため、その機能がいかに長期間維持されるのかは科学的にも大変興味深く、また器官の発生制御による生産性向上を目指した農学的な重要性をも内包する問題である。

茎頂メリステムがその機能を維持し続けるためには、ゲノム中に存在する転移因子の活動を抑制することが重要であると考えられる。転移因子はゲノム中を移動可能な DNA 配列であり、移動先に重要な遺伝子や制御領域があればそれらを破壊する。茎頂メリステムは植物の地上部器官の起源として長期間維持される組織であり、最終的には次世代へゲノムを伝達する生殖器官の形成に至るため、そこでは特に厳密に転移因子の活動が抑制されることが期待されよう。一方で、生殖過程に参加しない葉などの分化器官では、転移因子の抑制に対する要求性は比較的低い。従って、メリステムには分化器官と比較して特殊化した転移因子抑制機構が存在する可能性が考えられる。

現在知られている主要な転移因子抑制機構のひとつはゲノム DNA のメチル化である。DNA のシトシン残基がメチル化修飾を受けると、これを認識するタンパク質が集合してその周辺領域の転写等を抑制する状態を作り出す。DNA がメチル化される仕組みは複数存在するが、特に転移因子の DNA メチル化は small RNA を介した仕組みによって生じている。転移因子と配列相同性を有する small RNA が、その相同性によって DNA メチル化領域を規定し、DNA メチル化酵素を含む複合体をリクルートするというメカニズムである。

ここで、葉原基とメリステムの間で興味深い転移因子の制御過程が提案されている。すなわち (1) 分化した葉原基で転移因子の DNA メチル化を低下させてその発現を許容し、(2) ここで生じた転移因子に由来する転写産物を元に small RNA が合成され、(3) さらにこの small RNA が茎頂メリステムへと輸送

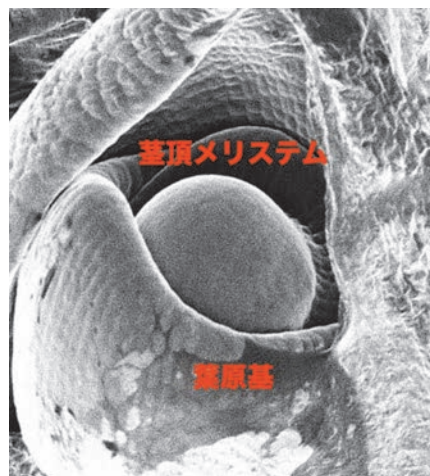


図1 イネ茎頂メリステム（中央のドーム状構造）と葉原基

されてメリステムにおける転移因子の DNA メチル化を亢進させるとするモデルである。

このモデルの検証には茎頂メリステムと葉原基を単離した網羅的な解析が必須である。本研究では、茎頂メリステムと葉原基の精密なサンプリングを行い、極微量ゲノム DNA を元に DNA メチローム解析を実施可能な PBAT 法を駆使した全ゲノムバイサルファイトシーケンシングによって両者の DNA メチロームを比較する。並行して、同器官の small RNA-seq 及び RNA-seq を実施し、茎頂メリステムから葉が分化する過程の DNA メチル化、small RNA の蓄積、転移因子 RNA の発現に関する上記モデルを検証する。本研究で対象としている茎頂メリステムの機能制御や葉の分化は植物の生産性向上を目指す上で重要な研究領域であるが、これまでに網羅的・統合的な解析はなく、本提案から新しい研究分野を開拓できると期待している。

辻 寛之 (奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)
共同研究先：小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ シロイヌナズナ *gia3* 変異体のリシーケンスによる原因遺伝子の同定と染色体重複部位での突然変異蓄積頻度の解明 ◀

乾燥種子から独立栄養体への変換期である実生時は、植物のライフサイクルの中で特に塩・乾燥などの環境ストレスに弱い時期である。シロイヌナズナの実生が環境ストレスに曝されると、アブシジン酸と呼ばれるホルモンを合成し、成長を停止することにより、ストレス耐性を獲得する。シロイヌナズナからとられた *gia3* 変異体は、このアブシジン酸による成長を起こさない変異体です (図1)。連鎖解析から *GIA3* 遺伝子は3番染色体の1メガ塩基 (Mbs) の領域まで狭めることができた (図2)。この領域には既知のアブシジン酸に関する遺伝子が存在しないため、アブシジン酸経路に関する新規な因子が得られると考えられる。しかし、この部位での組換え率が極端に低下したため、遺伝子を同定するには至らなかった。

その後の解析から、2番染色体の25%にあたる7.5Mbsの領域が、問題としている3番染色体の1Mbs部位に重複・挿入されていることがわかった (図2)。我々は、これをFISH・サザン解析・シーケンス・マイクロアレイによって詳細に性状解析を行った (図3-4; Kinoshita *et al.*, Plant & Cell Physiol. 2010)。この結果から、組換え率の急激な減少の原因が明らかになった。大規模な染色体の重複・挿入による物理的な障害によって、減数分裂時の組換えが起りにくくなっていたと考えられた。

これにより、*GIA3* 遺伝子が存在する領域は、物理的には1Mbsから8.5Mbsに広がったことになる。しかし、*gia3* 変異体の表現型は劣勢形質として振る舞うので、*GIA3* 遺伝子が重複部位に存在する確率は極めて低いと考えられる。

この様な遺伝的な解析をしている際に、*gia3* 変異体は白色光下で矮性であることに気づいた。実際にどの波長に反応してい

るのか解析した結果、赤色光に過敏に反応することで矮性を示していることが明らかになった (木下ら、未発表)。実生時の水環境と光に関する情報は、植物のその後の生育を左右する非常に重要なファクターであり、特にアブシジン酸と赤色光の相互作用は近年研究が目覚ましく進んでいる分野である (Dai *et al.*, Plant Cell 2013; Lee *et al.*, Genes Dev. 2012)。

今回、我々は *gia3* 変異体のゲノムをリシーケンスすることで、*GIA3* 遺伝子候補領域1Mbsでの変異を解析し、*GIA3* 遺伝子を同定する。これと合わせて、重複部位での変異の蓄積を解析することで、短期的な染色体重複による変異の蓄積度合いを明らかにする。被子植物の進化の中で繰り返し起ったゲノムの倍数化に関して、重複部位における変異の蓄積を求めることで倍数化と植物の進化を繋げるヒントが得られると期待できる。

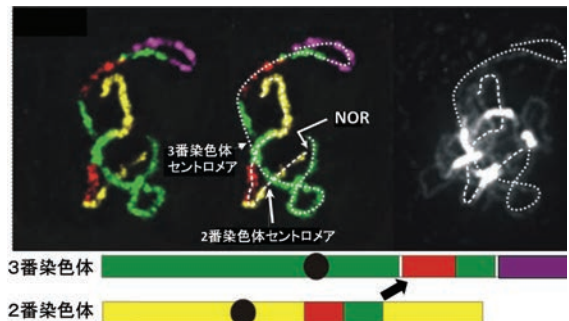


図3 FISHを用いた *gia3* における2番及び3番染色体の可視化(上) 3番染色体に2番染色体由来の赤と緑の部位が存在する。矢印は、NOR (Nucleolar Organizing Region)、2番・3番染色体を示す。下) FISHの模式図。

(Kinoshita *et al.*, Plant & Cell Physiol. 2010)

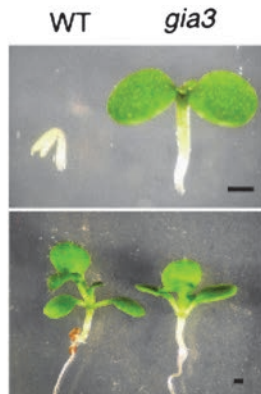


図1 実生時の *gia3* 変異体の表現型

野生型 (WT) と *gia3* 変異体は3 μ Mのアブシジン酸 (ABA) 存在化で播種し4°C 3日間の処理後、長日条件で発芽させて1週間後に写真撮影した。

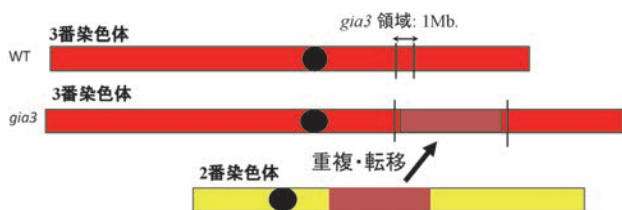


図2 *gia3* 変異体で起っている大規模な染色体の重複・転移の模式図
黒丸はセントロメアを示す。WT、野生型。

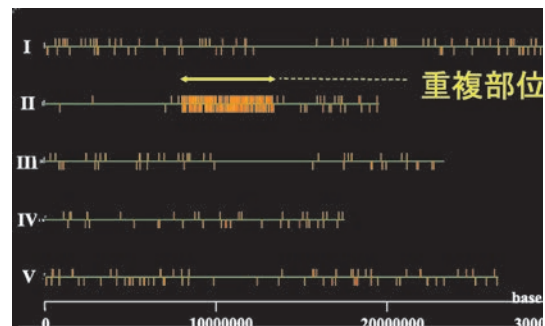


図4 マイクロアレイを用いた *gia3* を置ける染色体重複部位の可視化

重複部位では明らかに野生型よりも高発現している遺伝子が多い。IからVはそれぞれ染色体番を表す。野生型よりも発現量が高い遺伝子 (cut-off: 1.5) をオレンジの線で表した。上段がワトソン鎖、下段がクリック鎖方向に染色体上に配置されている遺伝子を示す。*gia3* で特異的に発現量が下がっている遺伝子がクラスターとして存在する領域は検出されなかった (Kinoshita *et al.*, Plant & Cell Physiol. 2010)。

木下奈都子 (筑波大学)

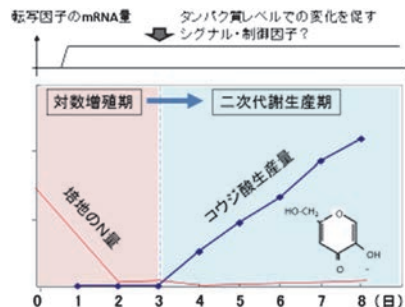
共同研究先: 太治輝昭 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 糸状菌の二次代謝の開始に関わる制御機構の解明 ◀

糸状菌由来の二次代謝物質は農薬など農業分野を含め、様々な分野で応用されている。アカパンカビのゲノム解読（2003年）以降、数百種の糸状菌ゲノムが解読され、糸状菌が多くの未知二次代謝物質を生産する潜在能力を持つことが明らかにされた。しかし、既知の二次代謝の数と比べると、ゲノム中に配列モチーフだけで同定される二次代謝関連遺伝子の大半はその生産物が未知である。二次代謝の生産条件は特殊なことも多く、ほとんどの二次代謝は生産条件や遺伝子発現の制御機構についての知見が少ない。本研究では、申請者が研究してきた**麹菌のコウジ酸生産をモデルとして**、RNA-seqを用いて遺伝子発現の詳細を解析し、糸状菌の二次代謝の制御機構の一端を明らかにしたい。

発酵食品の生産に使われる *Aspergillus oryzae* (麹菌) は胞子色素など少数を除けば二次代謝物質を生産しないが、ゲノムが解読された野生株 RIB40 株はペニシリンやコウジ酸を例外的に生産することを明らかにした。二次代謝と一括りにされるが、ペニシリンとコウジ酸では生産条件が異なり、細胞の増殖の「相」や培地の栄養条件にตอบสนองして開始が決定される。対数増殖期が終わって定常期に入ったときに余剰のグルコースがあると、麹菌はコウジ酸に変換して分泌する(図)。コウジ酸の酵素遺伝子の発現を制御する転写因子は、酵素・膜輸送体と遺伝子クラスターを形成する。興味深いことに、この転写因子は、対数増殖期の時期から一定量が転写されているが、しかし機能が発現するのは対数増殖期が終わった後である。タンパク質レベルで機能の発現を促す制御があることが推定された。一次代謝が主となる対数増殖の段階から、二次代謝がONになるまでの移行には、多くの転写制御が関わっていることが考えられる。多くの遺伝子を制御するグローバル因子から、局所的な数個の代謝遺伝子を制御する因子までが想定されるものの、シグナルの実体や応答する因子の詳細は明らかにされていない。今まで麹菌を用いて、コウジ酸の生産に与える培養条件などとともに、局所的な転写制御因子やその他の因子の影響に関する知見を蓄



積してきた。さらに関連する別の研究から、ある一次代謝の遺伝子を高発現した変異株が本来コウジ酸を生産しない条件で生産することを発見した。麹菌のコウジ酸生産をモデルとして、一次代謝から二次代謝生産までに発現する遺伝子を詳細に研究することにより、糸状菌の二次代謝の開始に関わる制御機構を明らかにできると考えている。

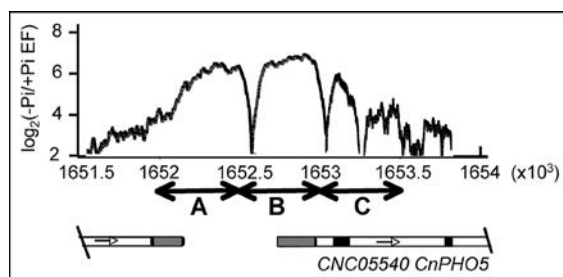
糸状菌の二次代謝は、農薬、医薬、食品など人間の生活の様々な面で役立っている。糸状菌の二次代謝の制御機構の解明から、糸状菌による物質生産のコントロールに応用するための重要な知見を得ることができる。制御因子のコントロールを組み合わせることで特定の代謝を選択して増やすなどの物質生産も可能となる。コウジ酸は生産量が100 g/Lを超えることでも魅力を感じる。コウジ酸合成遺伝子のプロモーターを利用して、対数増殖期が終わった後に物質を生産する系を構築して検証している。本研究から分かる知見を、糸状菌の二次代謝生産に役立てていきたいと考えている。

小池英明 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ *C. neoformans* 転写因子 Pho4 の結合領域の網羅的探索 ◀

病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* はヒトやイヌ、ネコに感染し、中枢神経系を冒す等の重篤な症状を引き起こす。*C. neoformans* の感染・発症機構について分子生物学的研究が進んでいるが、ヒト体内というストレス環境(高温、pH、免疫系等)にどのように適応して、定着・増殖するかについてはまだわからないことが多い。リン酸は核酸や生体膜の構成要素であることに加え、生体エネルギー、細胞内情報伝達に必須な栄養素であり、ヒト体内でこれを着実に獲得することが病原菌の感染成立に必要なものである。

真核微生物のリン酸獲得に関わる PHO 遺伝子系の発現制御機構は出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で詳細に研究されており、PHO 遺伝子の転写活性化因子 Pho4 の核内局在が Pho85 キナーゼによるリン酸化によって制御されていること、そして Pho85 キナーゼ活性はリン酸濃度によって制御されることがわかっている。*C. neoformans* にも PHO 遺伝子系 (CnPHO) が存在しており、RNA-seq 解析により *CnPHO5* (ホスファターゼ)、*CnPHO84* (トランスポーター) 等のリン酸代謝系遺伝子の発現がリン酸によって制御されていること、CnPho4 がその転写活性化に必要であり、CnPho80 (Pho85 のサイクリン) がそれを抑制することがわかった。*CnPHO85* は出芽酵母と異なり、*C. neoformans* の生育に必要な遺伝子であった。出芽酵母においては、Pho4 はリン酸飢餓だけでなく、他のストレスにตอบสนองして遺伝子の発現を抑制し、Pho85 はその不必要な発現を抑えてい



る。*C. neoformans* でも同様のことが観られるかどうかを調べるために、ChIP-seq 解析により CnPho4 が結合する遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、CnPho4 がリン酸濃度依存的にリン酸代謝系遺伝子やそれ以外遺伝子のプロモーター領域やイントロンに結合することがわかった。これらの結果は、*C. neoformans* の PHO 遺伝子系の発現制御機構は出芽酵母と共通していることと全く異なることがあることを示しており、*C. neoformans* が生体内で感染を起こすために必要な機構の一つという可能性が考えられる。

西沢正文 (慶応義塾大学医学部微生物学・免疫学教室)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

後期新規採択課題

▶ モンシロチョウの雌による交尾拒否行動発現の分子機構の解明 ◀

モンシロチョウは全世界の温帯や亜寒帯に広く分布する昆虫で、日本では春から秋にかけて低地で普通に見られるシロチョウの一種です。春先の暖かい日にキャベツ畑でモンシロチョウの成虫を見かけることがありますが、畑の上で盛んに飛びまわる個体の多くが雄で、キャベツの葉の裏などで動かずにいる個体の多くは雌です。モンシロチョウの雌は羽化後、葉の裏などにぶら下がり、翅を十分伸ばした後に雄と交尾を行います。雌の行動は交尾前後で大きく変わります。未交尾雌はまず雄と交尾する必要があり、雄が近寄ると交尾を受け入れますが、既交尾雌にとって雄は産卵を邪魔する存在でしかありません。したがって、既交尾雌は雄が近づくと腹部を上方に立ち上げて、物理的に交尾を拒否します(図1)。このような行動を“交尾拒否行動”と呼んでいます。既交尾雌が近寄ってきた雄に対して示す典型的な行動です。この行動は交尾刺激で発現します。その生理機構は交尾後に雄から受け取る精包によって生殖器官の一部(交尾囊)が膨張し、その機械感覚刺激によって“交尾拒否ホルモン”が血中に分泌され、行動が発現すると考えられています。

我々の研究グループはその“交尾拒否ホルモン”がセロトニンであると考えています。セロトニンは主に神経系で作用する神経作用性物質の一つで、ヒトも含めて多くの動物分類群でその存在と機能が知られています。モンシロチョウの未交尾雌にセロトニンを経口摂取あるいは注入すると、雄に対して交尾拒否行動を示すようになります。そこで、そのような未交尾雌を用いた実験系で行動薬理学実験を行い、セロトニンが作用する受容体のタイプなどを決定しています。

セロトニン受容体を介したシグナル伝達系を手がかりに、交



図1 モンシロチョウ雌の交尾拒否行動

尾拒否行動の発現に関わる脳・神経系の分子機構の解明を目指しています。そのためには交尾前後で変化する脳・神経系内の遺伝子発現を網羅的に調査する必要があります。次世代シーケンサーを用いたRNAseq法がその方法の一つです。行動様式の転換、すなわち脳の可塑性に関わる様々な遺伝子群から産卵開始を促す内分泌系の遺伝子群、栄養代謝系の遺伝子群などがダイナミックに発現を変えるのではないかと予想し、期待しています。そのような遺伝子発現の網羅的な調査結果を再び行動生理学へとフィードバックさせて、行動様式を転換させる機構を解明したいと考えています。

佐々木謙 (玉川大学農学部)

巢籠 瑛 (玉川大学農学部)

共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ ブロイラー飼料への乳酸菌資材の添加が小腸の遺伝子発現に及ぼす影響 ◀

近年、効率重視の育種改良や多羽数飼育による弊害などによって、ブロイラーの伝染病に対する抵抗性が弱まっているのではないかと指摘がある。これに対する対策として、さまざまな抗菌活性や免疫活性化作用を持つ物質を飼料へ添加することが行われている。その中で乳酸菌製剤は、ヒトにおいて古くから利用されているヨーグルトや乳酸菌飲料の効能を踏まえて、ブロイラーにおいても添加されることが多い。これらの乳酸菌製剤の効能としては、腸内微生物叢の改善による悪玉菌の増殖抑制などが知られている。しかし、下痢などの症状は腸内環境の悪化がニワトリの小腸を刺激して起きると考えられ、ニワトリの小腸内の生理作用、ひいては遺伝子発現の変化が直接の引き金になっていると考えられる。

しかしながら、乳酸菌製剤を飼料に添加した時のニワトリの小腸の遺伝子発現については、いくつかの遺伝子について発現動向が調べられてはいるものの、網羅的に遺伝子発現を調べた研究はない。そこで、新世代シーケンシング技術を用いて、乳酸菌製剤を飼料に添加した時のニワトリの小腸のRNA-Seqを実施する。

RNA-Seqは発現しているすべてのmRNAのシーケンスを行い、既知のゲノムDNA配列にマッピングするもので、個々の遺伝子で発現しているすべてのバリエーションを捕捉することが可能であり、さらにマイクロアレイと同程度に発現量の解析をすることも可能である。RNA-Seqによって小腸の網羅的な遺伝子発現が明らかになれば、小腸内での生理作用を推定するこ



図1 試験実施状況

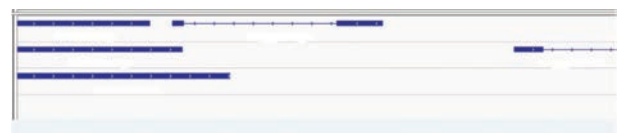


図2 RNA-Seqで得られた新規遺伝子の例
ニワトリ骨髄のみで発現する新規遺伝子 (上段中央)

とが可能となり、今後、新たな乳酸菌製剤や抗菌剤、免疫活性化剤等を開発するときに役立つと考えられる。

和田康彦 (佐賀大学農学部)

共同研究先: 半澤 恵 (農学部)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 無肥料無農薬環境に適応したイネ系統の遺伝的基盤の解明 ◀

栽培品種の改良のプロセスにおいて、育種目標となる形質をより良くする対立遺伝子の同定は重要である。ゲノムワイド関連解析や、栽培種集団を様々な環境下で実験進化させ、選択された対立遺伝子を同定する手法が最近のトレンドである。これらの手法は、次世代シーケンサーの発展とともに急速に広まりつつある。本研究では、60世代以上にわたって完全に無肥料無農薬の環境下で栽培されてきたイネ系統に注目する。このイネ系統は、貧栄養状態に適応した形態的特徴を示し、病虫害への抵抗性を示す。最終目標を、このイネ系統の無肥料無農薬環境適応の遺伝的基盤を明らかにする事に設定する。その第一歩として、このイネ系統の全ゲノム配列の決定と遺伝子発現パターンの解析を行う。昨今の農薬や化学肥料の多投入は環境への影響が大きく、人体への影響を懸念する声も小さくはない。無肥料無農薬環境に適応したイネ品種を作出できれば、これらの問題を一掃できると考えている。

無肥料無農薬田は、NPO 無肥研により60年以上に渡って維持されてきた。この圃場で育成されてきたジャポニカイネ (*Oryza sativa* ssp. *japonica*)、「ベニアサヒ」品種のゲノム、遺伝子発現解析を行う。申請者はこれまでの研究で、野生、栽培イネ32系統の全ゲノム配列決定と、ジャポニカイネ「ニッポンバレ」の発現解析に携わってきた。本研究による無肥料無農薬



図 ベニアサヒ品種

イネ「ベニアサヒ」と他の系統の、ゲノム・遺伝子発現情報を解析し、無肥料無農薬環境適応の遺伝的基盤解明の第一歩とする。

宅野将平 (総合研究大学院大学)

寺井洋平 (総合研究大学院大学)

共同研究先：佐々木卓治 (総合研究所)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ ソバの主要アレルゲンである13S グロブリンの遺伝子構造の解明 ◀

ソバは、栽培期間が短く、中山間地域の傾斜地・やせ地・高冷地などの不良環境下でも育ち、病害虫・雑草の害を受けにくい。そのため、省力的・環境保全的な栽培が可能であり、増え続ける耕作放棄地や休耕田での栽培を普及させることで耕地の保全を図ることが期待されている。一方、食味が優れ、ソバ打ちなどの愛好家も多い上に、血圧上昇を抑えるルチンやバランスの良いアミノ酸組成を有することから、生活の質や健康を維持増進させる食材としても着目されている。特に高齢化と地方の過疎化が進むわが国においては、注目すべき重要な作物である。しかしながら、ソバは時に深刻なアレルギーを引き起こす場合があり、その原因物質(アレルゲン)を同定し取り除くことが強く求められている。近年、ソバの消費量・作付面積は共に急速に増加しているため、確実なアレルギー対策の必要性が

増している。これまでに、ソバ種子全タンパク質の43%を占める貯蔵タンパク質13S グロブリンが、主要なアレルゲンとして同定されている。ソバは他殖性のため、同じ品種であっても種子ごとにタンパク質組成が異なり、これまで13S グロブリンのサブユニットについては不明な点が多かった。我々は、13S グロブリンのサブユニット組成をタンパク質レベルで詳細に解析するとともに、ゲノムDNAライブラリーを網羅的にスクリーニングして遺伝子の全塩基配列を解読した。その結果、13S グロブリンには、15アミノ酸残基から成る挿入配列を0-6回タンデムに持つサブユニットがあり、分子量に著しい変異があること(ただし6回反復サブユニットの遺伝子は未同定)、反復配列を持たないサブユニット(0回反復サブユニット)はトリプシン難消化性で、アレルゲン性が高い可能性のあること、13S グロブリン遺伝子は少なくとも17種類あり、うち0回反復サブユニット遺伝子は調べた系統の中では2種類あることを明らかにした。今後は、これらの基礎的な情報をゲノム解析により更に充実させ、低アレルゲンソバの育成に向けたマーカーの開発や、ソバアレルゲンの確実な検出技術の構築に活用していくことが必要と考えられる。さらに、13S グロブリン遺伝子の重複や反復配列の増加・減少が生じた進化的機作の解明を通じて、近縁野生種や在来種の遺伝資源評価にも貢献できると期待される。

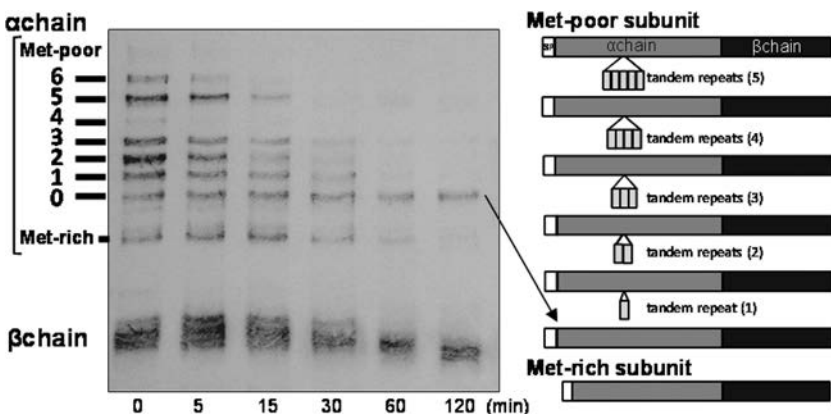


図 ソバ13S グロブリンのサブユニット模式図とトリプシン消化性の違い

田中朋之 (京都大学農学研究所)

共同研究先：

丹羽克昌 (農学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 茎寄生植物ネナシカズラの内在性 small RNA の解析 ◀

寄生植物はちょっとした面白い研究材料です。

我々の研究室では茎に寄生するタイプのネナシカズラ (*Cuscuta japonica*) と根に寄生するタイプのヤセウツボ (*Orobanche aegyptiaca*) を両方使って実験をしています。今回の共同研究ではネナシカズラの解析をしています。ネナシカズラは普通に発芽した種が胚軸を伸ばすように茎を伸ばさせるのですが、見ると確かに根が無いのです。このまま10日くらいはもつのですが、その後はさすがに寄主に取り付かないと生きていけません。自然な状態では、他の植物体に寄生しているネナシカズラ個体が茎を左回りに旋回させながら伸びてきて、新たな寄主に当たると茎への巻付きを始めます。では実験室ではどう寄生させるか？ネナシカズラの先端から少し下を寄主植物の茎にテープで貼ってやるのです。この接触刺激と Far Red 光によって巻付きが起こります。巻付きが終わると茎の伸長が一旦止まります。そして数日経つと伸長が再開します。どうやら茎の伸長を停止して巻き付いている間に、茎から Haustorium という特殊化した寄生根を寄主の茎の中に伸ばし、茎伸長が再開する際には寄主の維管束と接続し水と栄養をもらい始める、ということになっているようなのです (図1)。ちなみにネナシカズラの葉は小さなウロコ状に縮退しています。しかし時期が来るとちゃんと花が咲いて種子も作る。

こうしてみるとネナシカズラ的生活行動の中にはシロウトでも本質的な問いを投げかけられる「ちょっとした」問題が数多くあります。旋回行動の動力源は？寄主の誘引物質は何なのか？ Haustorium の分裂組織はどうやってできるの？ どうやって維管束をつなげるの？ なぜいまだにプラスチドを維持しているのか？ などなど……生物物理学から生態学まで色々な角度から取組めそうです。

さて、そんなネナシカズラを使って私たちは手始めに寄生部位の RNA-Seq 解析をやってみました。月並みですねー。でも調べるべきネナシカズラ遺伝子の配列すらわからなかったのが仕方ありません。なんだかんだ苦労して寄主植物由来の転写物とネナシカズラの転写物を仕分けして、それぞれの植物が寄生のどの段階でどんな遺伝子を出しているのかを見てみると、けっこう様々な仮説 (シナリオ?) が立てられそうなことがわかってきました。寄生側から分泌される細胞壁分解酵素と寄主側で細胞壁の再編成に作用するタンパク質のインタープレイ、



図1 ネナシカズラ寄生部位の外観 (左)、クローズアップ (右上)、横断面 (右下)。右上では、寄主茎に亀裂が入っているのが見える。

同じような細胞増殖制御因子を寄生側と寄主側とで異なるタイミングで用いているような例、などといった寄生-寄主関係が見えてきました。その中で、どうも寄生後寄主側では光合成関連遺伝子群の発現が選択的に減少していることに気がつきました。これは当たり前のようにも見えます。寄生による単なる生育阻害。しかしその結果ならばもっと光合成以外の様々なプロセスが抑制されていて良いはずですが。RNAi か？ しかしそもそもネナシカズラが普通の生活をしている中でどのような small RNA を内生的に持っているか不明ですし、寄主との接触後にどんな分子種が誘導されるかも調べられていません。そこで本共同研究では寄生前寄生後に寄主植物と寄主植物両方で small RNA のプロファイリングを実施しています。

ネナシカズラの「ちょっとした」小さな RNA が異種間関係維持のための相互作用の一端を垣間見せてくれることを期待しています。

青木 考 (大阪府立大学生命環境科学研究科)

共同研究先：矢嶋俊介 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ カルバゾール分解遺伝子群の進化の道筋 ◀

芳香族化合物は微生物により分解・資化されることが古くから知られています。当研究室でもダイオキシン様の構造を持つカルバゾール分解菌の単離と解析を進めており、これまでに活性汚泥から単離された *Pseudomonas resinovorans* CA10 株を初めとする種々の分解菌を単離してきました。カルバゾールの分解は細菌染色体上またはプラスミド上に存在する *car* 遺伝子群により行われますが、その初発酵素は carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) であることが知られています。CARDO は3つのコンポーネントから成り、フェレドキシンレダクターゼ (Red) が NADH から受け取った電子をフェレドキシン (Fd)、オキシゲナーゼ (Oxy) へと伝達し、Oxy がカルバゾールの二水酸化を行います (図)。当研究室でこれまで解析してきたカルバゾール分解菌は土壌や活性汚泥から単離されたもので、Rieske non-heme iron oxygenase に見られる Rieske 型の Fd や、P450 に見られる putidaredoxin 型の Fd を保持していました。しかし近年、海水から単離されたカルバゾール分解菌が植物に広く保存される葉緑体型 Fd を持つことが報告され [Maeda *et al.*, 2010, *Biotechnol. Lett.*, 32: 1725-31]、種々のカルバゾール分解菌が持つ *car* 遺伝子群の多様性に興味を持たれました。

当研究室では *car* 遺伝子群の多様性を調べるため、最近、新たに海水から単離した *Hyphomonas* sp. KY3 株と *Erythrobacter* sp. KY5 株に加え、以前から研究が行われてきた *Nocardioides aromaticivorans* IC177 株 (土壌由来) 及び *Pseudomonas stutzeri* OM1 株と *Sphingomonas* sp. KA1 株 (いずれも活性汚泥由来) の全ゲノム配列を決定しました。これにより KA1 株、IC177

株については過去の知見通りそれぞれ putidaredoxin 型、Rieske 型の Fd を持つことが確認され、また OM1 株が Rieske 型の Fd を持つことが明らかとなりました。一方、KY3 株・KY5 株については Oxy の遺伝子を含むカルバゾール分解系オペロン内に Fd 遺伝子候補は存在せず、ゲノムの異なる位置に存在する Fd 候補遺伝子も相同性が低いなど、これら2株が他株とは異なる遺伝子構造の *car* 遺伝子群を持つ、あるいは既知のものとは異なる電子伝達系を持つ CARDO である可能性が考えられました。また各株の *car* 遺伝子群近傍の GC 含量はゲノム全体の GC 含量に比べて低いこと、各株の *car* 遺伝子群近傍にトランスポゾンの遺伝子や逆向き反復 (inverted repeat) 配列が見られたことから、*car* 遺伝子群は外来からリクルートされた遺伝子群であると予想されました。一方で、海水由来の KY3 株・KY5 株と土壌由来の IC177 株では *car* 遺伝子群の一部が同じ並び方をしているなど、単離環境によらず共通点も見受けられました。

car 遺伝子群が水平伝播を通じて獲得されたとしたら、どの祖先から伝播し、どのように各分解菌に馴化し分解力が発揮されるようになったのか、その進化過程に興味を持たれます。「生物資源ゲノム解析拠点」では *car* 遺伝子群の多様性と進化過程を明らかにするため、さらに多くのカルバゾール分解菌のゲノム情報を収集することを目指します。今回は特に昨年度～今年度にかけて新たに単離された海水由来のカルバゾール分解菌に焦点を絞り、*car* 遺伝子群と CARDO の Fd の多様性を議論することで、種々のカルバゾール分解菌の進化的繋がりを解明する一端となることが期待されます。

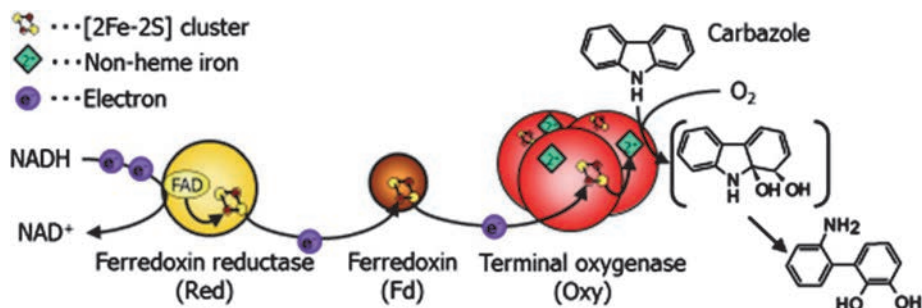


図 CARDO のコンポーネントとカルバゾールの二水酸化反応

野尻秀昭 (東京大学生物生産工学研究センター)
 水口千穂 (東京大学生物生産工学研究センター)
 共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 起源の異なるシロイヌナズナ野生株のトランスクリプトーム比較解析とゲノムワイド関連解析による酸性土壌耐性メカニズムの解明 ◀

酸性土壌は、世界に広く分布する問題土壌であり、そこでは主にアルミニウム (Al) 過剰害による植物生産の制限が問題となっています。このため、省エネルギーによる持続可能なバイオマス生産・増産を目指した植物の酸性土壌耐性機構、および品種改良に関する研究が世界中で活発に行われています。わたしたちは、これまでにシロイヌナズナを用いて、Al 耐性遺伝子であるリンゴ酸トランスポーター遺伝子 *AtALMT1* やその発現制御を担う STOP1 転写因子を同定し、酸性土壌耐性メカニズムについて研究を行ってきました (図 1)。しかし、酸性土壌耐性の分子メカニズムは他の環境ストレスに比べても未解明な部分が多く、実用化にたえる効率的な品種改良は今のところできていません。これを達成するためには、酸性土壌耐性バリエーションの遺伝的要因の解明が重要であると考え、シロイヌナズナを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) を試んでいます。

世界各地に自生するシロイヌナズナは、遺伝的多様性をもって異なる環境に適応して生育しています。これら多数のシロイヌナズナエコタイプでは、ゲノムワイドな SNP や全ゲノム配列情報が整備されつつあります。このような集団を利用し、ス

トレス耐性の表現型と遺伝子機能を比較、解析することは、ストレス環境適応メカニズムの分子レベルでの解明に非常に有効であると考えられます。これまでに、約 200 種のエコタイプの Al 耐性を評価し (図 2)、GWAS により Al 耐性に関連する 100 以上のゲノム領域を推定しました。そのいくつかは、プロモーター領域の変異との関連を示唆しており、Al 耐性バリエーションの遺伝的要因のひとつに Al 耐性関連遺伝子群の発現量の差異が考えられました。

そこで、本研究では、Al 耐性および遺伝的背景が異なる複数のエコタイプにおいて、NGS を用いた mRNA-seq 解析により遺伝子発現量や転写産物を調べることとしました。Al 耐性に関連のある発現変動を示す遺伝子群を選抜し、GWAS 結果と統合することで、Al 耐性関連遺伝子とその耐性バリエーションへの相対的貢献度を明らかにしたいと考えています。貢献度が高い因子は、主要作物での研究に利用できることが期待できます。また、本研究により特定されるシス配列情報から、酸性土壌耐性の多様な遺伝子発現制御機構の解明に貢献できると考えています。

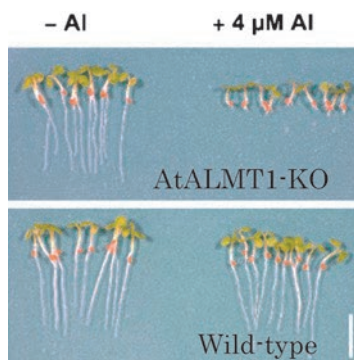


図 1 リンゴ酸トランスポーター *AtALMT1* 遺伝子破壊株 (写真上) は、Al 超感受性を示す。(Kobayashi *et al.* 2007 *Plant Physiol.* より)

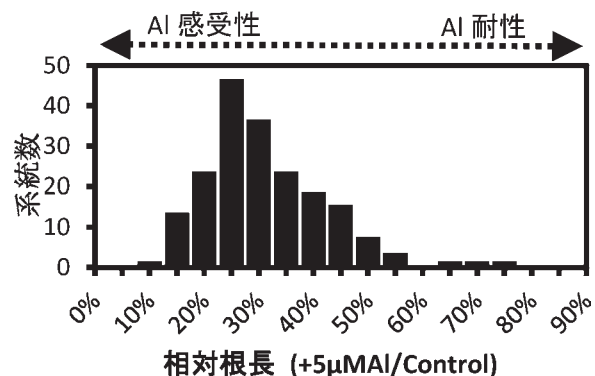


図 2 シロイヌナズナの Al 耐性バリエーション。幅広い分布が見られた。このような形質値を用いて GWAS を行った。また、これから選抜したエコタイプを用いて RNA-seq 解析を行うこととした。

小林佑理子 (岐阜大学応用生物科学部)
共同研究先: 坂田洋一 (応用生物科学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ セイヨウミツバチにおける新規初期応答遺伝子の網羅的探索 ◀

ミツバチは、花蜜と花粉を高い効率で採集してくるという有用な形質を持つことから、養蜂業や作物受粉に広く利用され、昆虫ではユニークな家畜として人類の生活に大きく貢献しています。この効率の良い採餌活動は、ミツバチが持つ昆虫の中でも際立って優れた記憶・学習能力によって可能になっていると考えられています。その能力は、報酬や罰と感覚刺激を連合させる連合学習（「パブロフの犬」として知られる現象）に留まらず、「同じ」「違う」といった抽象概念の認識・学習にまで及ぶことが知られていますが、脳を構成する数十万個の神経細胞のうち、「いつ・どの細胞が・どのように関わるのか？」という問いには未だ答えが出ていません。

私たちは、採餌行動のような自由行動条件下で活動している神経細胞を同定するために、神経活動の分子マーカーとしての「初期応答遺伝子」の利用を企図しました。初期応答遺伝子とは、神経細胞の活動後に一過的な発現上昇を示す遺伝子の総称で、ある行動後にこれらの遺伝子の発現細胞を検出することで、その行動に関わる神経細胞の同定が可能となります。この手法は脊椎動物で頻用されており、感覚刺激への応答や記憶・学習、性行動といった様々な行動を対象に、関わる神経細胞の同定が行われてきました。

昆虫では、初となる初期応答遺伝子 *kakusei* が 2007 年にセイヨウミツバチで同定されました。また、一昨年には *Egr* (図 1) と *Hr38* が新たに報告されましたが、ミツバチを含めた昆虫ではこれら 3 遺伝子に留まっています。対照的に、脊椎動物では既に 10 個以上もの初期応答遺伝子が報告されており、それぞれ研究の目的に応じて使い分けがなされています。残念なことに（興味深くはありますが）、脊椎動物で知られている初期応答遺伝子のミツバチホモログの多くは、神経活動後の発現上昇を示しません。そこで私たちは、ミツバチをはじめとした昆虫において利用可能な新規初期応答遺伝子の網羅的探索と遺伝子ごとの特徴付けを目的とし、本共同研究を開始しました。

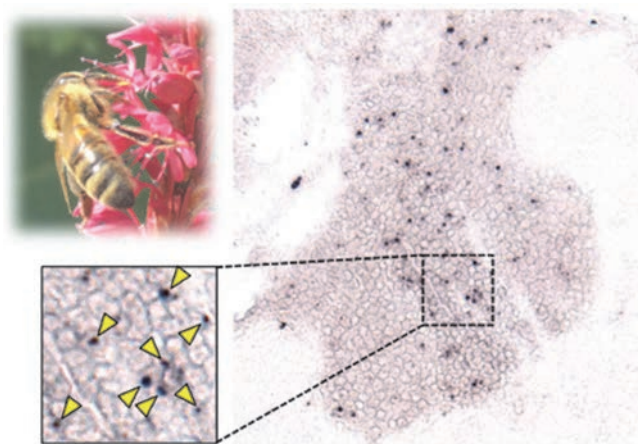


図 1 *Egr* の発現を指標にした採餌個体のキノコ体（脳内高次中枢）における活動神経細胞の分布
※黒点が *Egr* シグナル Ugajin *et al.*, 2013 より

ミツバチの仲間は記憶・学習だけでなく、餌場の情報を伝える 8 の字ダンスや「ミツバチの会議」として近年話題にもなった引っ越し先探し、ニホンミツバチの対オオスズメバチ熱殺蜂球形成など、多くの特徴的な行動を示します。同定した初期応答遺伝子群を用いた解析により、これらの行動の背景にある神経機構についても迫ることが可能になると期待しています。

小野正人（玉川大学）

宇賀神篤（玉川大学）

共同研究先：矢嶋俊介（応用生物科学部）

内山博允（生物資源ゲノム解析センター）

▶ フェニルプロパノイド代謝経路の劇的な転換を果たした ブドウ培養細胞からの原因遺伝子の単離 ◀

アントシアニンとレスベラトロールはブドウの果皮に多く蓄積される代表的な二次代謝産物であり、果皮の着色や病害抵抗性など、ブドウ生産上の重要形質と深く関連しています。また、抗酸化作用や抗ガン作用などの健康増進効果も報告されており、農学以外の研究分野からも注目されています。ブドウにおけるアントシアニンおよびレスベラトロールの生合成系に関しては多くの先行研究があり、(1) 両者は共にフェニルプロパノイド経路を介して生合成され、合成経路の中間産物(4-coumaroyl-CoA)に対して chalcone synthase (CHS) が作用するとアントシアニンの生合成がそれぞれ誘導されること、(2) CHS 遺伝子と STS 遺伝子の発現がそれぞれ異なる R2R3-MYB 転写因子によって制御されること、などが明らかとなっており(図1)。しかしながら、ブドウ個体内でのアントシアニンとレスベラトロールの蓄積量の決定機構、即ち代謝経路の一部を共有する2つの生合成経路の量的な制御機構については未解明です。これまで私達は、実験上の制約の少ないブドウ培養細胞を用い、アントシアニンとレスベラトロールの蓄積機構について様々な研究を展開してきました。

理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けたブドウ培養細胞 VR 系統および VW 系統は、高アントシアニン蓄積品種の薬壁から誘導されたカルスを継代・維持する過程で分離した系統であり、照射下で培養すると、VR 系統ではアントシアニンが大量に生合成されて赤く着色しますが、VW 系統では着色が見られず、アントシアニンもほとんど検出されません。さらに興味深いことに、レスベラトロールの生合成を強く誘導するエリシターを両系統に投与すると、VR 系統ではほとんどレスベラトロールが蓄積しないのに対し、VW 系統ではレスベラトロールが非常に大量に生合成されます。VR 系統および VW 系統が見せるこのような外部刺激に対する応答性の違いは、『培養変異により、VW 系統では培養元品種の性質に由来するアントシアニン高蓄積型からレスベラトロール高蓄積型へと代謝系が転換された』という可能性を示唆しています。これまでも種々の植物種において機能性二次代謝産物の増加やアレ

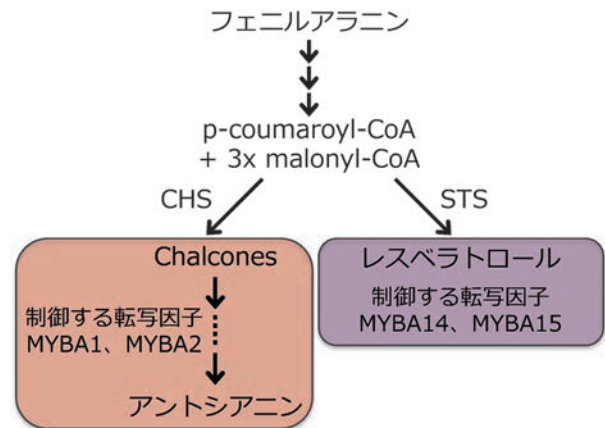


図1 アントシアニンおよびレスベラトロールの生合成経路
VR 系統ではアントシアニン生合成経路が、VW 系統ではレスベラトロール生合成経路が光やエリシターにตอบสนองして活性化する。

ゲンとなる物質の低減を目指した代謝経路の改変は試みられてきましたが、VR 系統と VW 系統に見られるような劇的な代謝経路の転換にまで成功した例はありません。そこで本研究では、RNA-Seq による網羅的遺伝子発現解析と遺伝子発現ネットワーク解析を組み合わせることで、VW 系統の示す『アントシアニン非蓄積・レスベラトロール高蓄積』形質の原因遺伝子を同定することを目指しています。本研究により、VW 系統の示す『アントシアニン非蓄積・レスベラトロール高蓄積』形質の原因遺伝子(群)が同定され、将来的には DNA マーカー育種によるレスベラトロール高蓄積ブドウ品種の効率的な作出に繋がると期待されます。

太田垣駿吾 (名古屋大学大学院生命農学研究科)
共同研究先: 藤澤弘幸 (農学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 乳酸発酵に優れた *Enterococcus mundtii* QU 25 における カタボライト抑制メカニズムの解明と解除法の開発 ◀

石油資源の枯渇や石油消費に伴う環境の悪化の問題解決に貢献するため、持続的に利用可能なバイオマス資源を乳酸菌による発酵で光学活性乳酸に変換し、バイオプラスチックであるポリ乳酸の原料を調達しようとしている。バイオマス資源の中でも、特に食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマスの有効活用は期待されている。リグノセルロース系バイオマスは、複数の多糖とリグニンからなり、前処理によってグルコース・グルコースの二糖であるセロビオース・キシロースなどを含む混合糖に分解される。一般的に複数種の糖の存在下では、微生物にとって資化しやすい糖(グルコース、セロビオース等)が先に代謝され、他の糖の資化を阻害するカーボンカタボライト抑制(CCR)が働く。

昨年全ゲノム塩基配列を解読した¹⁾ *Enterococcus mundtii* QU 25 株 (QU 25 株) は、グルコースやキシロースを糖源として優れた乳酸発酵能力を示すが、①グルコースとキシロース存在

下で不完全な CCR を示す²⁾、②セロビオースとキシロースを同時に資化するという³⁾、優れた発酵特性を持つ。そこでこの発酵特性を解明すべく、各種混合糖条件下で対数増殖期・定常期における転写解析を行い、混合糖を同時資化できるような、より優れた乳酸発酵菌株を育種することを目指している。

- 1) Shiwa *et al.*, 2014, DNA Res. 21: 369-377.
- 2) Abdel-Rahman *et al.*, 2015, J. Biosci. Bioeng. 119: 153-158.
- 3) Wang *et al.*, 2014, RSC Adv. 4: 22013-22021.

門多真理子(武蔵野大学)
園元謙二 (九州大学大学院)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
渡邊 智 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析拠点

〒156-8502 東京都世田谷桜丘1-1-1

TEL 03-5477-2719 FAX 03-5477-2377

E-mail kyoten-g@nodai.ac.jp

URL <http://www.nodai-genome.org>