

次世代シーケンサーが拓く農学新領域の創出



表紙の説明

日本在来イネ品種「雄町」：古くから酒米として利用され、現在の品種の母本ともなっている日本在来品種

酒瓶：東京農業大学卒業生の蔵元銘酒（東京農業大学「食と農」の博物館 提供）

CONTENTS

「戦略的研究基盤形成支援事業」折り返し点にあたって	4
生物資源ゲノム解析センターのご紹介	5
日本型イネ品種「雄町」のゲノムワイドな多型情報の公開	6-7
日本の「ウシ」の全ゲノム解析	8-9
次世代シーケンサーが加速させる微生物のゲノム解析	10
次世代シーケンサーとシアノバクテリアのゲノム科学	11
次世代シーケンサーを用いた生殖系列細胞のエピゲノム解析	12
学内公募事業とその成果	13-17
研究発表実績	18-21

「戦略的研究基盤形成支援事業」折り返し点にあたって

生物資源ゲノム解析センターは、今年度ようやくその成果が結実し始めました。実質的に2年目の今年度でしたが、1年目の試行錯誤と奮闘の末に解読したイネとウシのゲノムを、一層の努力を重ねて解析し、論文発表に至ることが出来ました。イネゲノムが平成23年1月6日、ウシゲノムが約1ヶ月後の2月10日と相次いで論文採択となり、データベースも公開されています。次世代シーケンサーによるゲノム解読の終了後に歴大な解析作業があることが、この事実からも理解していただけたと思いますが、詳細は個々のチーム報告を参照下さい。2年目はこのように基幹プロジェクトの第一段階成就、学内公募研究の開始、新機種HiSeq 2000の導入と新研究体制の確立、の3点が大きな出来事でした。

イネチームによる酒米「雄町」の解読は、国際コンソーシアムで決定した「日本晴」との比較を行うことが可能になり、遺伝的に近い品種間ではこれまで見つけにくかった詳細なDNAマーカーを大量に構築する基盤を整備することができました。日本型米の今後の育種に役立つ貢献として関係者から高い評価を得ています。ウシチームも日本在来種「口之島牛」の全ゲノム解読を完成させ、明治以来、西洋牛の遺伝的影響を受けてきた近代牛が追求してきた経済形質の遺伝的背景を把握することが可能になりました。すなわち頻繁な経済形質の選抜によって減少している遺伝的多様性を把握し、今後の育種に役立つ情報基盤が整備されたわけです。微生物チームの試行してきた変異解析や発現解析は、1塩基レベルの違いを全ゲノムレベルで瞬時にして把握出来る次世代技術が新しい微生物研究法を築き上げたとと言えます。実験的に変異を追跡出来る微生物レベルの特徴を活かし、進化のプロセスを解明する新しいプロジェクトを開始しています。三本柱の基幹プロジェクトでは、このような二年間の成果を踏まえ、「農学新領域の創出」を謳った戦略プロジェクトに相応しい展開研究に着手しています。

ゲノムセンターでは、昨年度末に学内公募を行い、今年度当初から広く全学的に次世代技術の提供

を開始しました。当初応募件数は動物分野6件、微生物分野5件の計11件でした。応募者の学科別では、畜産4件、生物応用化学2件、バイオサイエンス、醸造科学、アクアバイオ、食品香粧、生物生産各1件でした。学内応募課題は原則的にすべて採択し、サンプル調製と解析能力の点からスケジュール調整をして実施してきました。また、年度途中でも中小規模の解析依頼は随時受け付ける体制を整えています。

平成22年9月には、イルミナ社の新機種HiSeq 2000が世界的にもトップクラスの早さで導入されました。原理は基本的に旧機種GAIIと同じですが、データ産出量は200Gb/ラン以上と従来機の5倍以上、ラン日数も短縮され、操作性も向上しています。結果的にサンプルあたりのコストも下がることになります。ゲノムセンターでは主として動植物の大規模解析にHiSeq 2000を、微生物等の小規模解析にはGAIIを使うことにより、効率的な運用を行うよう体制作りをしています。また、冒頭にも述べたように、データ産出後の解析に、より多くの時間と労力を費やします。ゲノムセンターでは今年度から新たに情報解析技術者を雇用し、律速段階になっているデータ解析の円滑な処理を図っています。

今年度結実したイネとウシの成果は、日経BP社がオンラインジャーナルに取り上げてくれました。また、微生物を中心とした当センターの画期的取り組みについては、ゲノム微生物学会のニューズレターに掲載されたほか、イルミナ社のユーザー向けニューズレター・ラボ訪問記第1号にも特集記事として紹介され、大きな反響を呼んでいます。平成22年9月の時点で、文部科学省に対して中間報告を提出しました。概ね順調に研究成果を挙げていると評価され、更に2年間の継続が認められました。多くの方々の積極的な参加をお願い致します。

ゲノムセンター世話人

バイオサイエンス学科 教授

吉川博文 (プロジェクトリーダー)

河野友宏

矢嶋俊介

▶ 生物資源ゲノム解析センターのご紹介 ◀

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、文部科学省の平成 20 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業として採択された「革新的ゲノム情報解析を用いた生物資源ゲノム解析と農学新領域の創出」プロジェクトの一環として、東京農業大学の全学組織として新設されました。

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

センターは東京農業大学の世田谷キャンパスに設置され、運営に当たっては総合研究所の支援のもと、センター長である大澤学長以下、世田谷・厚木・オホーツク各キャンパス所属の教員による管理運営委員会を設置して行っています。また、解析課題については、センターの主要課題の他に、学内に広く公募して共同研究を行い「ゲノム農学」と呼ぶにふさわしい、農学新領域の創出に向けて取り組んでいます。

次世代シーケンサーについて

現在 2 台の次世代シーケンサーが稼働しております。平成 21 年度に導入されたイルミナ社の「Genome Analyzer II」は、一回の実験で約 400 億塩基を読み取ることができ、主として微生物等の小規模解析に使用しています。また、平成 22 年 9 月

には旧機種約 5 倍の塩基数を読み取ることができるイルミナ社の新機種「HiSeq 2000」が導入され、ゲノムの大きな動植物に威力を発揮しています。特長の異なる 2 台の機種を併用することで、効率的な運用を行っております。

研究を支える情報解析システム

2 台の次世代シーケンサーから排出される膨大な塩基配列情報を処理するためには、それらを解析するコンピュータシステムにも高い性能が要求されます。当センターでは、デル社のラック型サーバを 4 台導入しています。総メモリ容量 768 GB、総ディスク容量 105TB の潤沢なスペックですが、それでも大規模な動植物ゲノムの解析には、かなりの計算時間を要します。

インターネット上での研究成果の公開にも力を入れています。当センターのホームページから、論文発表された「口之島牛」、日本型イネ品種「雄町」のゲノム情報を格納したデータベースを公開しています。また、当センターと厚木キャンパス、オホーツクキャンパスがネットワークで接続されており、各キャンパスに設置されたワークステーションから解析データにアクセスでき、3 キャンパスでの共同研究を支援するシステムを構築しています。

(志波優)



HiSeq 2000



生物資源ゲノム解析センタースタッフ

日本型イネ品種「雄町」のゲノムワイドな多型情報の公開

—新品種作りに役立つ情報を提供—

イネ品種「雄町」は古くから酒米として利用され、現在の品種の母本ともなっている日本在来品種です。当センターでは次世代シーケンサーを用い、「雄町」ゲノムの解読を2009年11月に終了しました。得られたデータを国際プロジェクトで明らかになった「日本晴」ゲノムと比較して、DNAマーカーの一種である1塩基多型（SNP）や挿入欠失を16万ヶ所以上見いだすことができました。これらの例を図1に示します。また、遺伝子情報などの詳細な情報を付加したデータベースを構築して当センターHPにおいて公開しました。この様な大量のDNAマーカーは、今後ゲノム情報を基にした遺伝解析などに用いられ、新しい品種を生み出すために大きく貢献することが期待されます。

ゲノム育種のためのDNAマーカー

ゲノム研究の進展により、DNA塩基配列の違いを基にした目印であるDNAマーカーが開発されました。このDNAマーカーを利用することで新しい育種法が可能になりました。従来の育種では、親品種を交雑して得られた後代の形質を調査し、希望する有用形質を受け継いだ個体を選抜することを繰り返します（図2）。この手法では、収量や味などの有用形質には気温や日照などの栽培環境の影響が出るため正確な選抜が困難な場合があります。また、収穫までたくさんの個体を栽培しなくてはなりません。このため、形質選抜を行うのに膨大な労力と時間がかかります。DNAマーカーを利用することでこれらの問題が軽減されました。収量などの有用遺伝子に関連するDNAマーカーを指標に個体を選抜できれば生育時期や環境に依存せずに早期の選抜が可能になります。また、収量だけでなく酒米の重要形質である心白や大粒などの有用な農業形質の多くは複数の遺伝子が関与する量的形質であることが多く、遺伝的解析は困難でした。しかし、このような量的形質に関わる遺伝子の位置（QTL）はDNA

マーカーを利用して解析することができます。これによって、量的形質の遺伝子がいくつも明らかになってきています。DNAマーカーがゲノム上に多くあるほど高精度に遺伝子の位置を推定することができ、原因遺伝子の単離、同定へとつなげることができます。さらに、病害抵抗性などのように選抜方法が同じ形質の遺伝子を複数導入する際や、期待する複数の形質を1品種に集積（ピラミディング）したりするような複合した形質を持つ品種をデザインする育種（テーラーメイド育種）の実現の為にDNAマーカーが必須です（図3）。最近では、ゲノム全体にわたるDNAマーカーとこれまでに得られた品種などの形質情報との関連から「ゲノムワイドなDNAマーカーから目標とする形質を予測するモデル」を作り、これを用いて実際の形質を測定することなくDNAマーカーの情報から目的の個体を選抜するゲノミックセレクションなど新しい手法も行われ始めています。

このようにDNAマーカーは効率的な育種のために必要不可欠なものになっていますが、日本で栽培されているイネ品種はゲノムのDNA配列が非常に似ており、これらの間ではDNAの塩基配列の違いを見つけることが非常に困難で、有効なDNAマーカーがほとんどありませんでした。近年、次世代シーケンサーの登場により全ゲノム配列の解読を短期間で行うことが可能となったので、このような遺伝的に良く似た品種間でもゲノム配列同士を比較することで、DNAマーカーを大量に得られるようになりました。

「雄町」と「日本晴」ゲノム配列の比較

次世代ゲノムシーケンサーを用いて解読された「雄町」ゲノム全体の89.7%の配列について「日本晴」と比較しました。その結果、SNPが132,462ヶ所、挿入が16,448ヶ所、欠失が19,318ヶ所検出されました。また、全SNPsからゲノム上に分散す

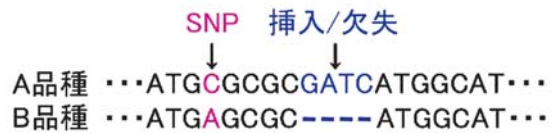
る 577 個を一度に検出できるタイピングアレイを作製しました。これを用いて「雄町」「日本晴」間 SNPs の検証を行ったところ、95% の高い確率で「雄町」SNPs が正しいことが確認され、本研究から得られた SNPs が DNA マーカーとして有用であることが示唆されました。現在、作製した SNP アレイを用いた QTL 解析等を進めており、酒米に特徴的な形質に關与する遺伝子の同定を目指して研究を進めています。本研究は、独立行政法人農業生物資源研究所 QTL ゲノム育種研究センターとの共同研究として実施され、研究成果の一部は、雑誌「Plant and Cell Physiology」のデータベース特集号 (2011 年 2 月) に掲載されています。

多型情報の公開

本研究で得られた SNPs や挿入欠失の情報は、大量の DNA マーカーとして今後 QTL 解析などに用いられ、新しい品種を生み出すために大きく貢献することが期待されます。そこで、遺伝子情報等などの詳細な情報を付加したデータベース (NGRC_Rice_Omachi, http://www.nodai-genome.org/oryza_sativa_en.html) を構築して本センター HP において公開しました。今後は「雄町」とは異なる形質を持つ品種のゲノム解読をすることで、より多様な DNA マーカーの提供を目指します。

(吉瀬 (新井) 祐子・イネチームリーダー若狭暁)

DNA マーカーの例



電気泳動による検出例

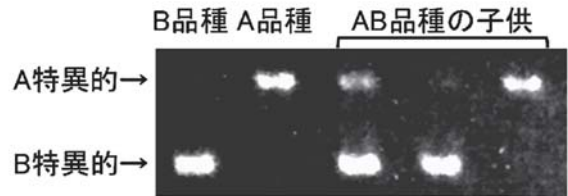


図 1 DNA マーカーとその検出例
配列の違いを電気泳動で判別できる。

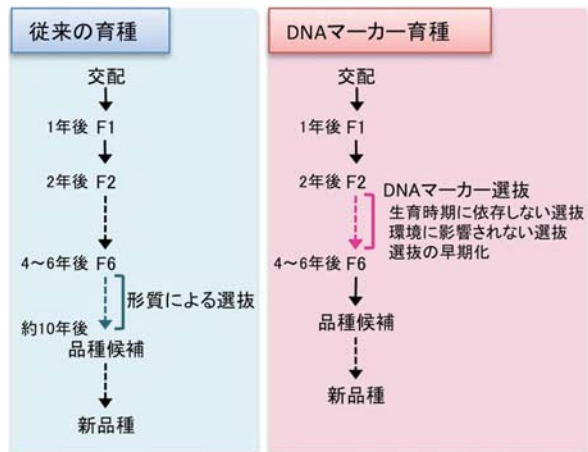


図 2 従来法と DNA マーカーを使用した育種の比較

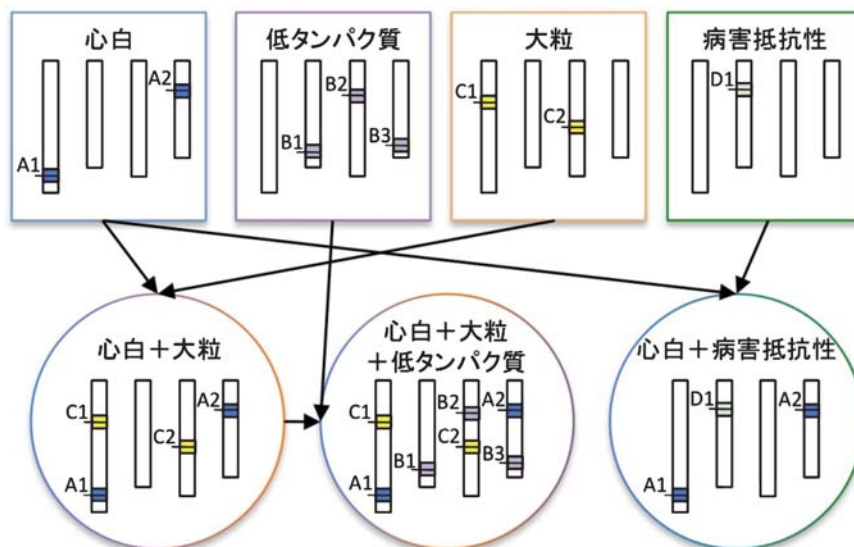


図 3 DNA マーカーの使用により可能となったテーラーメイド育種

各形質に特有の DNA マーカー (A ~ D) を目印に、有効性質を担う遺伝子を集積 (ピラミディング) する。

日本の「ウシ」の全ゲノム解析

日本在来牛「口之島牛」の全ゲノムを解読

口之島牛は、鹿児島県のトカラ列島に位置する口之島に生息しています。もともと明治以前から放逐されていたものが野生化し、品種改良を経ずに今日に至っていることから、西洋種の遺伝的な影響を受けていない日本在来牛であるといえます。小柄で後駆のしまった体格の特徴は、日本古来の牛の形質を現在まで保持していると考えられています。

本センターでは、次世代シーケンサーを用いてこの口之島牛の全ゲノムを解読し、すでに解読されている西洋種（ヘレフォード種）のゲノムと比較しました。その結果、29億塩基ある牛の全ゲノム中のおよそ630万箇所に1塩基多型（SNP）を発見し、そのうちの87%がこれまでに発見されていない新規のものであることがわかりました。また、アミノ酸置換を伴う多型が4643の遺伝子に存在していることも明らかになりました。

口之島牛ゲノムについて得られたこれらの情報は、遺伝子の位置情報など詳細なデータを付加し、データベースとしてweb上で公開しています。研究成果は雑誌「BMC genomics」に掲載されました。

注) この研究は東京農業大学が「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」の支援を受け、名古屋大学との共同研究として実施しました。

論文情報

Whole-genome resequencing shows numerous genes with nonsynonymous SNPs in the Japanese native cattle Kuchinoshima-Ushi. BMC Genomics 12,103 (2011).

日本在来牛「見島牛」の全ゲノム解析

見島牛は、山口県の日本海側に位置する見島に生息しています。この系統は明治以前から今日まで品種間交雑を行っておらず、口之島牛同様、西洋種の遺伝的な影響を受けていない「日本在来牛」です。見島牛の特徴は「霜降り肉」を持つことで、この事から見島牛は「霜降り」の表現型を持たない口之島

牛よりも和牛に近縁で、経済形質に関わる要素を持つと考えられています。

ゲノムセンターでは、見島牛の全ゲノムを解読し、既存の西洋種（ヘレフォード種）のゲノムとの比較解析を行って口之島牛と同様の解析を行っています。加えて既に解読済みの口之島牛のデータと比較することで、お互いの遺伝的な距離を把握すると共に、表現型がかなり似ている近縁な系統間ですからSNPの数も少ないことが予想でき、一番目立つ違いとも言える「霜降り肉」に関する遺伝領域を絞り込めるかもしれません。

冒頭で述べましたが、見島牛は閉鎖的な環境で維持されていて、個体数も多くありません。ですから、各個体の血縁関係も近いと考えられ、遺伝的關係は今後の見島牛の維持に影響を及ぼすかもしれません。ゲノムセンターでは複数個体の見島牛についてゲノム解析を行い、その多型率から近縁関係を算出して、今後の見島牛の継代・維持に必要な情報を出すことを試んでいます。

注) 見島牛の材料については山口県萩市および見島ウシ保存会の協力のもと、特別天然記念物からのサンプル（血液）の採取および研究の推進には文化庁の許可を得て実施しました。

肉用和牛「黒毛和種」の全ゲノム解析

和牛は、西洋種と日本在来牛の交配と選抜を経て昭和初期にその形質が確立しました。中でも黒毛和種は和牛の8割を占めています。彼らの産業的に優秀な肉質を維持するため、その繁殖方法は限られた優良形質の雄牛による人工授精で行われています。しかし2001年に、この繁殖様式が原因となる遺伝的偏りによって、黒毛和種の遺伝的多様性が減少することが報告されました。多様性が減少すると、集団規模での抗病性の低下や近交退化という事態が想定されます。ですから、黒毛和種のゲノム解読は、この遺伝的多様性を回復するために必要な作業なのです。その一端を担うのが、「日本在来牛」

のゲノム解析です。

現在、日本に存在している「日本在来牛」は鹿児島県の口之島に生息している「口之島牛」と、山口県の見島に生息している「見島牛」の2系統です。両者の差は見島牛が「霜降り肉」を持つことで、この事から見島牛は口之島牛よりも和牛に近縁であると考えられます。(図参照)

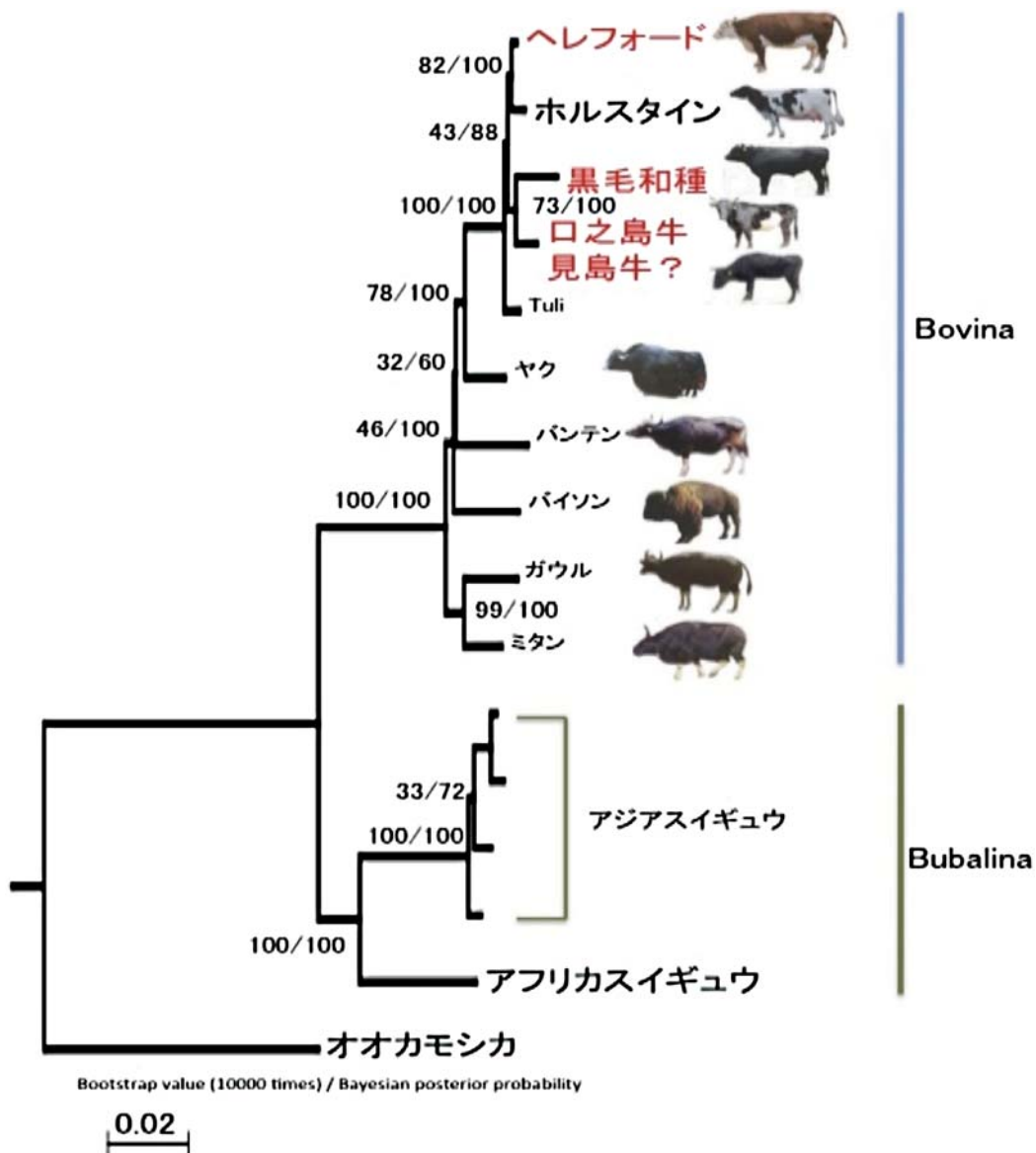
ゲノムセンターでは、口之島牛、見島牛と黒毛和種の全ゲノムを解読し、既存の西洋種（ヘレフォード種）のゲノムのデータとの比較解析を行っています。この解析によって、約29億塩基から成る黒毛和種のゲノム中の、何処に西洋種の遺伝要素が乗っているのか？ どの領域を日本在来牛の遺伝要素が支配しているのか？ 等の構造的なデータが集まります。これらを利用して黒毛和種の詳細な染色体地

図を作り上げることが期待できます。

これらの結果は、和牛に対して本来保有していた遺伝的多様性の情報を提供するとともに、遺伝子の位置情報など詳細なデータを付加することで、有用な遺伝形質の導入や遺伝病の解明などにも貢献する重要な情報となると考えられます。

注) 黒毛和種の材料については東京農業大学 富士農場の協力の下、サンプル（血液）の採取を実施しました。

(津田薫・川原玲香・ウシチームリーダー河野友宏)



次世代シーケンサーが加速させる 微生物のゲノム解析

微生物サンプルの解析状況

微生物のゲノムサイズは細菌の平均が 350 万塩基対、カビなどの真菌でも数千万塩基対と次世代シーケンサーの性能に対して小さいため、1 反応槽で複数サンプルの同時解析が可能なマルチプレックス法を採用しています。一度に 30-40 サンプルをシーケンスする効率的な運用により、2009 年度に 9 属 21 種 118 サンプル、2010 年度には約 2 倍にあたる 21 属 41 種 231 サンプルの解析を達成しました。研究の情報基盤形成に重要なモデル微生物を始め、酵母や乳酸菌などの実用微生物、環境問題の解決に向けた応用研究が期待されるバイオ燃料生産菌や環境汚染物質分解菌など、農学分野の多様な課題に関連する生物種のゲノム解析に取り組んでいます。

次世代シーケンサーの多様なアプリケーション

次世代シーケンサーの特徴は高い並列性にあります。100 塩基程度の配列を数百万～数億という単位で読み取り可能なため、従来のシーケンサーでは難しかった定量性を求められる解析に応用することができるのです。当センターでも遺伝子の発現を網羅的に定量する RNA-seq を 2010 年度から開始しました。これまでもゲノム全体を解析する手法としてタイリングアレイやマイクロアレイが存在しましたが、感度とダイナミックレンジの両面において次世代シーケンサーが勝っています。また、生物種ごとに DNA チップを作製する必要がない点も次世代シーケンサーの長所です。リシーケンス解析、新規ゲノム解析、RNA-seq、ChIP-seq (DNA 結合性タンパク質の局在部位を決定する解析手法) という幅広いアプリケーションによって多くの成果を生み出しています。

(兼崎友・松本貴嗣・微生物チームリーダー吉川博文)

属名		解析数
<i>Bacillus</i>	枯草菌・納豆菌	135
<i>Synechococcus</i>	シアノバクテリア	50
<i>Saccharomyces</i>	酵母	27
<i>Thermus</i>	高度好熱菌	15
<i>Lactobacillus</i>	乳酸菌	14
<i>Synechocystis</i>	シアノバクテリア	11
<i>Schizosaccharomyces</i>	酵母	10
<i>Bifidobacterium</i>	ビフィズス菌	9
<i>Bradyrhizobium</i>	根粒菌	8
<i>Clostridium</i>	偏性嫌気性菌	8
<i>Cyanidioschyzon</i>	原始紅藻	7
<i>Mesorhizobium</i>	根粒菌	7

シーケンス解析した主な生物種

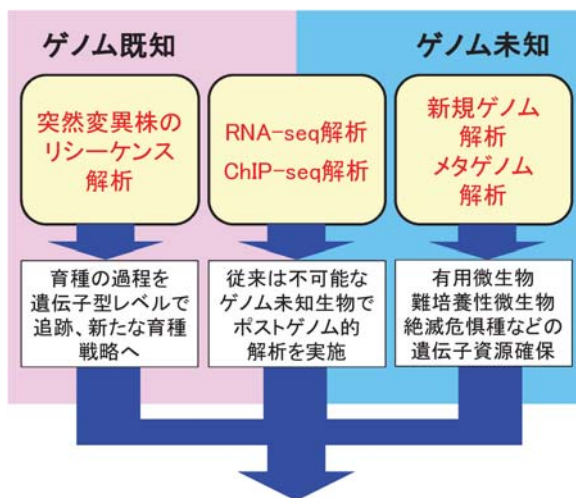


枯草菌



シアノバクテリア

次世代シーケンサーがもたらす
新しい研究戦略とイノベーション



新しい微生物ゲノム解析の時代へ

次世代シーケンサーとシアノバクテリアの ゲノム科学

シアノバクテリアのゲノムプロジェクト

シアノバクテリアは地球上で最初に酸素発生型の光合成を始めた生物であり、海水、淡水、陸上、または他生物との共生状態など極めて多様な自然環境に棲息しています。スピルリナなど食用にされている種も多数いますし、またアオコや水の華と呼ばれ水中で大発生して水質汚染を引き起こす種も存在するなど、環境問題や農業・水産業とも密接に関わっている生物です。1996年に全生物で4番目に全ゲノム情報が解読されたシネコシスティスという種を皮切りに、現在、全世界で169種ものシアノバクテリア・ゲノムプロジェクトが進行中です。しかし生物学的・農学的に重要でありながら、未だゲノム解読されていないラン藻種もまだ数多く存在しています。東京農業大学では次世代シーケンサーによる有用形質を持ったシアノバクテリアの新規ゲノム解読を遂行中で、これまでに5属7種の新規ゲノム情報をほぼ決定しています。

リシーケンス解析による情報基盤の再構築

ゲノム解読が終了したシアノバクテリアのうち、シネコシスティスやシネココッカスなどの種は分子生物学的な研究に広く用いられています。しかし世界中の研究機関で用いられている個々の菌株には、解読された標準菌株のDNA配列情報とは局所的に異なる配列や突然変異の痕跡が多数あることは経験的に広く知られています。この問題はこれまで、コストと時間と新規性の乏しさから解決されないまま放置されてきました。しかし、次世代シーケンサーの登場により、個々の研究室株のリシーケンス解析を通じてゲノム情報基盤の再構築をすることが現実的に可能になりました。そこで我々は次世代シーケンサーを用いた様々な研究室株のリシーケンス解析を通じ、遺伝学的アプローチによる新規の高温耐性遺伝子の探索をおこないました。

温度感受性が異なる研究室株 A、B について、そ

れぞれ全ゲノム配列を解読し、得られた配列情報を標準菌株のゲノム配列上に貼り付けて、2つの菌株間で配列の異なる部位を網羅的に探索しました。これにより個々の菌株に特異的な一塩基多型や挿入欠失部位を発見しました。これらの部位のうち、遺伝子のコード領域内に変異が入っていたものを選抜したところ、いずれも今まで温度感受性との関連が知られていない新規の遺伝子座であることが判明し、本研究手法が極めて有効であることが示されました。

(兼崎友・松本貴嗣・微生物チームリーダー吉川博文)

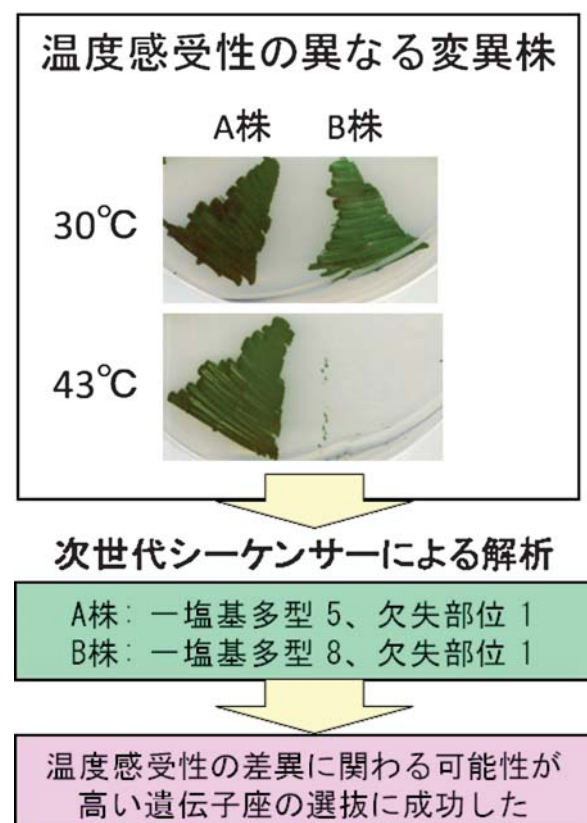


図1 次世代シーケンサーを用いた順遺伝学的アプローチによる重要遺伝子の選抜戦略

次世代シーケンサーを用いた生殖系列細胞のエピゲノム解析

新研究分野「エピゲノム解析」の開拓

近年登場した次世代シーケンサーは、ゲノム解析のみならず、生命現象を明らかにする様々な解析への応用が可能です。その一つが“エピゲノム解析”です。エピゲノムとは、DNA のメチル化状態、ヒストン修飾状態、ヌクレオソーム配置などをゲノムワイドに解析した情報のことを指します。これらはDNA 配列の変化を伴わずに遺伝子機能を変化させるエピジェネティック (Epigenetic) な修飾であり、細胞機能調整の重要な分子基盤として、生命現象に深く関与することが知られています (図1)。近年でもっとも大きな注目を浴びている人工多能性幹細胞：iPS 細胞も、元の細胞のエピゲノムをどれだけ「リセット」できたかを調べる研究と言えるでしょう。このように、エピゲノム解析は現在もっともホットな研究分野といえます。

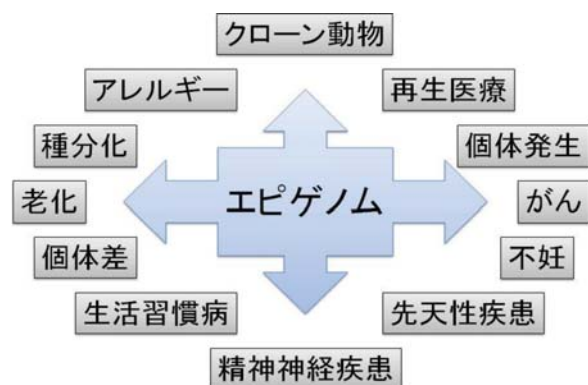


図1 エピゲノムと様々な生命現象・疾患とのかかわり

生殖細胞のエピゲノム解析

私たちは、マウスの生殖細胞つまり精子や卵子のエピゲノム解析を行っており、特にDNAメチル化状態について研究しています。ゲノムワイドなDNAメチル化の情報は“DNAメチローム”と呼ばれます。DNAメチロームは細胞の分化・生殖細胞の形成・受精後の細胞複製を通してダイナミックに変化しており、各ステージにおいて重要な役割を担

います (図2)。またこのようなメチル化に異常が起これば、先天性疾患、がん化、不妊などの重篤な問題を引き起こすことが知られています。これらの異常の原因を正確に特定・診断するためにも、様々な細胞のDNAメチル化を広範囲に調べることは不可欠です。私たちはDNAメチロームの解析方法として、DNAメチル化検出法の一つであるバイサルファイト処理法と次世代シーケンサーを利用したバイサルファイトショットガンシーケンス (BSS) 法を開発・実施しています。この方法はDNAメチロームを全ゲノム包括的に解析することができる利点があります。独自に改良したBSS法により卵子などの少量の細胞からも解析が可能となり、現在、生殖細胞のDNAメチロームマップを作製しています。日本には同様の解析を十分にできる環境がまだ少なく、このような解析法の開発と普及は卵子だけではなく初期腫瘍や特定部位の細胞などの解析が極めて困難な検体の解析にも貢献するでしょう。

本研究は東京農業大学が基盤研究 (S) 補助金の支援を受け、東京大学との共同研究により実施されています。

(河野研究室 小林久人研究員)

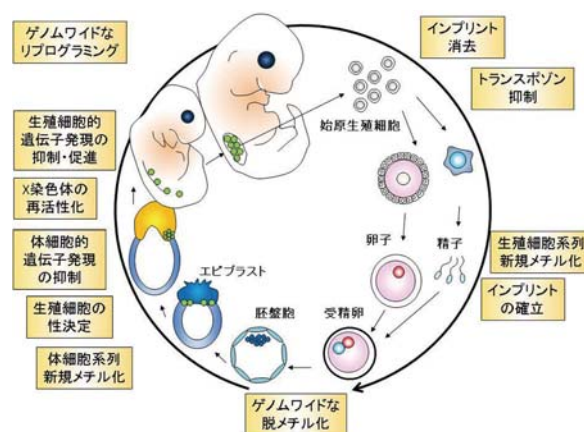


図2 体細胞分化と生殖細胞分化でみられるエピゲノムの変化

学内公募事業とその成果

●野生ウシ“バンテン”の *de novo* シークエンス—遺伝資源としての保全と活用—●

【目的】バンテン (*Bos javanicus*) は東南アジアに生息する野生ウシの一種である。総個体数5千頭以下と推定される絶滅危惧種で、マレーシアでは半島部の個体群は絶滅し、ボルネオ島のサバ州に500頭前後が生息するのみである。開発に伴う生息地の分断・孤立に加え、家畜ウシとの交雑も問題となっている。そのため、地域個体群の遺伝的多様性や遺伝的攪乱の把握は、本種の域内保全を考えるうえで重要である。また、バンテンは家畜ウシにおいて失われた抗病性や耐暑性などの遺伝特性を有すると考えられ、古くから家畜化も行われており、その遺伝資源としての価値は高い。しかし、バンテンの遺伝子情報はきわめて限定的である。そこで本研究ではバンテン (ボルネオ亜種) の遺伝的集団構造の把握、ならびに有用遺伝子の検索に資する為にバンテンの全ゲノム塩基配列を決定することを目的とする。なお本研究は、マレーシア・サバ大学・熱帯生物保全研究所 (Institute for Tropical Biology and Conservation, Universiti Malaysia Sabah) との国際共同研究である。

【計画】バンテンの保全：サバ州内の野生バンテン個体群の糞からゲノムDNAを抽出する。常染色体のマイクロサテライト、ミトコンドリアDNAのチトクロームbおよびD-loop、ならびにY染色体のSRY領域をPCR増幅し、その塩基配列を解析する。DNA多型を活用して、サバ州内での分布域、家畜ウシとの交雑、地域個体群の遺伝的構造を明確にし、サバ州におけるバンテンの具体的な保全計画に資する。

バンテンの活用：バンテンの歯髄および筋肉組織からゲノムDNAを抽出する。次世代シーケンサーを用いて全ゲノムを解析する。得られた配列情報を、欧米乳肉用種、ならびに和牛および日本在来牛と比較し、家畜ウシの経済形質向上に資する有用遺伝子多型を検索する。

【経過】多型解析用のゲノムDNA試料を150検体、ならびに *de novo* シークエンス用のゲノムDNA試料を1検体分、それぞれ調整した。現在、多型マーカーによる家畜ウシとの交雑の有無の確認、および遺伝的集団構造の解析に着手している。

また、2011年3月28日に共同研究者松林尚志サバ大学准教授が、東京農業大学厚木キャンパスにて開催される(社)日本畜産学会第113回大会の大会企画シンポジウムにて「バンテンの遺伝資源としての保全と活用」について講演する予定である。



松林尚志 (Universiti Malaysia Sabah)
半澤蕙 (農学部 畜産学科)

Abdul Hamid Ahmad (Universiti Malaysia Sabah)
覚張隆史 (東京大学)

●老化がウシ卵子に及ぼす影響とその制御方法に関する研究●

加齢により哺乳動物の卵子の質が低下することは広く知られている。人の卵子の研究には量や倫理上の制約があるため、人の加齢モデル動物が必要である。本研究では繁殖年限が長く、卵子の選抜形態や加齢に伴う内分泌的变化がヒトと類似しているウシを用いている。これまで加齢が卵子に及ぼす影響を、卵子の質を構成する要因として、卵子の数、卵子の成熟(減数分裂)、体外受精、初期発生およびエピゲネティクスなどの側面より検討し、様々な異常を見出している。そしてこれらの異常の背景にある分子生物学的原因を同定するために次世代シーケンサーを用いてゲノムの網羅的な発現状態を調べている。

具体的には、これまで老齢牛 (> 120カ月齢) と若齢の牛 (21-50カ月齢) 間の比較を行い、加齢に伴い卵巣中の原始卵胞や卵胞卵胞の総量が減少しているが、2次卵胞数は変化していないこと、卵胞卵胞より得られた卵子の体外成熟において減数分裂の進展が早く、卵子と顆粒層細胞間のギャップ結合の喪失が早いこと (Mol Reprod Dev 2010)、体外受精に供した場合では異常受精が多く、卵子の内包するミトコンドリア数や機能が変化していることを示している (Reprod Fertil Dev 2011)。また、若齢牛の卵子に比べて高齢牛の卵子に由来する初期胚の発育能力の減退や、前卵胞卵胞の体外発育能力の低下も見いだしている。そこで次世代シーケンサーを用いて網羅的解析をする卵子の発育段階として、前卵胞卵胞、卵胞卵胞から採取した未成熟卵子、体外培養後の成熟卵子、体外受精後の初期胚の4つを設定した。これまでに、未成熟卵子の比較を行い、次世代シーケンサーにおいて5つの遺伝子に差が確認され、こ

れらはリアルタイムRT-PCRによる検証においても、ほぼ同様の有意な差があることを確認した。現在、前卵胞卵胞卵胞を用いて両月齢区間で比較を行っている。また、成熟卵子および初期発育胚のサンプルの準備中である。

次世代シーケンサーより得られた結果は、リアルタイムRT-PCRの結果と相関性が高く、かなり正確な結果が期待できることが判明した。さらに未成熟卵子間で発現差が認められた遺伝子は、これまでのマウスでの報告に照らし合わせても新規なものであり、今後他の発育ステージにおいても興味深い遺伝子候補が判明するものと考えている。今後はこれらの差が認められた遺伝子発現をマーカーとして、体外培養条件の改変によって異常の制御が可能かどうか検討しようと考えている。



岩田尚孝 (農学部 畜産学科)

●ニホンウズラゲノムの *de novo* シーケンス●

ニホンウズラ（英名 Japanese quail；学名 *Coturnix japonica*）は、室町時代から武士の間で啼き鶉として飼い馴らされ、日本人になじみの深い動物で日本人によって家畜化された唯一の動物種と言われている。ニホンウズラは日本では卵が、欧米では肉が食されているが、17日で孵化し、孵化後6週令で産卵を開始するなど、ライフサイクルが短いことから、食資源として重要である。また、発生学、神経科学、内分泌学などの研究に不可欠な実験動物として、世界中で研究に用いられている。さらには経済協力開発機構（OECD）の化学物質の安全性評価においても鳥類のモデル実験動物として推奨されている。このようにニホンウズラは我が国が世界に誇るモデル生物であるにも関わらず、ゲノム情報は未だ欠落している。そこで我々の研究グループは、ニホンウズラのゲノム情報を世界で初めて解読・発信することで我が国が国際的イニシアティブを確保する事を目指している。

平成22年度において我々の研究グループは、ZW型染色体を持つ雌のニホンウズラ1個体を用いて塩基配列の決定と配列のアセンブルを進めた。ウズラの血液から抽出したDNAを用いて、解析用に複数のDNAライブラリを作製した。これらのライブラリを用い、次世代シーケンサーによってウズラゲノムの32.97倍に相当する46Gbの塩基配列を決定した。ゲノム解読を行うにあたっては、すでに全ゲノム配列が決定されているニワトリのゲノム配列をリファレンスとしたマッピングの手法と、ウズラの配列情報のみでゲノム配列をつなぎ合わせる *de novo* アセンブルの手法の2つを併用することで、効率的な全ゲノム配列の決定を目指し、現在一部の配列を用いた予備的解析を進めている。今後、コンティグの作成が進めば、2つの方法で得られたコンティグの連結を進めていく予定である。

本研究によってウズラの全ゲノム配列が解読され、公開され

れば、鳥類では4種目となり、配列情報そのものが今後の生物学の発展に大きく寄与すると考えられる。また、わが国に数多く存在するニホンウズラの突然変異体の原因遺伝子の同定や、その機能解析も飛躍的に進むことが期待される。比較ゲノム学的視点では、ゲノム配列が決定されているニワトリ、ゼブラフィンチ、シチメンチョウとの比較によって、鳥類特異的遺伝子の同定や、鳥類の進化的特徴についての議論が可能となり、さらには脊椎動物の進化に関する有用な情報を提供することもできると考えられる。



川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）
 佐野賢（生物資源ゲノム解析センター）
 吉村崇（名古屋大学）
 松田洋一（名古屋大学）
 河野友宏（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）
 桑山岳人（農学部 畜産学科）

●ニホンウズラの免疫応答ならびにストレス応答関連 遺伝子領域の高密度シーケンシング●

【目的】我々はニホンウズラ (*Coturnix japonica*) の抗菌ペプチド (DEFB, NK-lysin)、自然免疫抗原提示分子 (TLR)、主要組織適合性複合体領域抗原分子 (MHC)、白血球抗原分子 (CD)、熱ショックタンパク質 (HSP) などを含むコスミドクローンおよびハプロタイプを確定した LR-PCR 産物を多数保有し、それらの一部の塩基配列をサンガー法で決定している。今回は次世代シーケンサーにより、これら抗原遺伝子およびその発現調節領域の DNA 多型を解析することを目的としている。

【計画】MHC 領域：ハプロタイプ毎に、コスミドクローンの塩基配列を決定し、それらを比較解析することで、ハプロタイプをもたらす組換え領域を推定すると共に、その機序を考察する。また抗体産生、腸内細菌叢、コクシジウム抵抗性など、当方が保有する表現型の多様性との関係を解析する。

DEFB, NK-lysin, TLR, CD：遺伝子構造を明確にし、機能を考察すると共に、その多様性を規程する候補領域を検索する。

HSF, HSP70 および HSP90：HSP 遺伝子の上下流の塩基配列を haplotype 毎に決定する。HSP90AA1 の RT-PCR 産物の塩基配列から、スプライスバリエーションに対する熱ショックの影響を明確にする。それらを比較解析することで、HSP の熱ショック応答性転写の多寡をもたらす転写調節領域を明確にする。

【経過】MHC のクラス I 亜領域 (D1-C4)、DM 亜領域 (DMB2)

および TRIM 亜領域 (BTN2)、ならび DEFB 領域、TLR2 あるいは TLR4 を含有する、計8つのコスミドクローンの塩基配列を解析した。目下、既知塩基配列と比較中である。また、4つの主要な HSP90 遺伝子の基礎的な特徴を明確にした。

【業績】Kohji NAGAHORI, Shigehisa IWAMOTO, Akira MARUYAMA, Shingo SUZUKI, Kazuyoshi HOSOMICH, Takashi SHIINA, Hiromi HARA, Yutaka YOSHIDA, Kei HANZAWA, 2010, Basic characterization of 90 kDa heat shock protein genes *HSP90AA1*, *HSP90AB1*, *HSP90B1* and *TRAP1* expressed in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Animal Science Journal* 81, 513-518.



原ひろみ（農学部 畜産学科）
 鈴木進悟（東海大学）
 椎名隆（東海大学）
 細道一善（遺伝学研究所）
 半澤恵（農学部 畜産学科）

● NC マウスのヒトアトピー様皮膚炎発症の原因遺伝子の包括的解析 ●

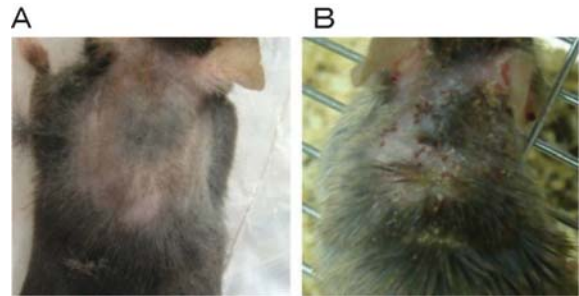
アトピー性皮膚炎は周囲のアレルゲンに過度に反応することにより免疫グロブリン E (IgE) の値が上昇し、極度のかゆみや湿疹、乾燥といった症状が皮膚に現れ、このような症状が慢性的に発症する疾患の総称である。このようなヒト疾患の分子遺伝学および病理学的解析にはモデル動物の解析が有用である。ヒトアトピー性皮膚炎の一つのモデルマウスとして NC/Nga (NC) マウスが知られている。NC マウスはコンベンショナルな飼育環境で高 IgE 血症および掻痒行動を伴うヒトアトピー性皮膚炎と類似した病態を示すモデルマウスである。その発症原因は複数の遺伝因子によって規定されているが、その実体は不明である。そこで本研究はゲノムワイドな連鎖解析に基づいた遺伝因子のマッピング、および次世代シーケンサーを用いたリシーケンシングデータを統合することによりその発症原因となる責任遺伝子の同定を試みた。

NC マウスのアトピー性皮膚炎発症に関与する遺伝子座を同定するため、NC および C57BL/6J (B6) の F₁ に NC を戻し交配し、96 頭の N₂ 個体を作製した。次に N₂ 個体の皮膚炎発症の有無を判定した。判定後の個体はマイクロサテライトマーカーを中心とした遺伝子マーカーによって全染色体の遺伝子タイピングを行い、表現型と遺伝子型との連鎖解析を行った。また、NC マウスから抽出した DNA からライブラリーを作製し、次世代シーケンサー HiSeq 2000 を用いてシーケンシング解析を行った。

連鎖解析の結果、皮膚炎発症に関わる複数の遺伝因子の関与が示唆されたが、その主要な原因遺伝子座は我々が以前報告したマウス第 9 番染色体上の *derm1* 領域であり、本研究において

その領域は約 2Mb にまで限定された。また、*in Silico* 解析によりこの領域には 10 種のタンパク質をコードする遺伝子が含まれている事が確認され、これらが NC マウスの皮膚炎発症の主要な原因遺伝子の有力な候補であると考えられた。

一方、次世代シーケンサーを用いて NC マウスのゲノムシーケンシングを行った結果、B6 のマウスリファレンスゲノム配列に 1,787,559,018 リードをマップし、NC ゲノムの 14x をカバーする 49.36 Gbp を解析した。現在 *derm1* 領域を中心に NC 特異的な SNP および Indel のリストアップを行っている。



コンベンショナル環境において飼育した A) B6 マウスと B) NC マウスの表現型。

尾崎真央 (生物産業学研究所)
津田薫 (生物資源ゲノム解析センター)
吉川欣亮 (生物産業学部 生物生産学科)

● タラバエビ類を用いたトランスクリプトーム解析による新規遺伝的多型マーカーの開発および遺伝子発現解析 ●

海産動物は幼稚仔の時期の死亡率が極めて高いため、他の動物と比較して多くの卵を産出する傾向にある。ただし、母親の卵巣あるいは育房の大きさには制限があることから、卵数の増加は卵サイズの小型化によって達成されることになる。その一方で、小型の幼稚仔は死亡しやすいので、その小型化にも限界がある。つまり、卵数と卵サイズは拮抗関係にあり、その関係は最適なバランスで保たれる必要がある。

タラバエビ類は寒海で最も漁獲されている甲殻類である。漁業では大型の個体が優先的に漁獲されているが、このエビは雄から雌へ性転換するため、体サイズへの選択性は性選択的に作用する。つまり、大きな雌ほどその集団から除去 (漁獲) されるため、漁獲圧に応じて、雌の小型化、および卵数確保のための卵サイズの小型化が進行しやすい。これまでの研究から、タラバエビ科のホッコイエビにおいて、生息環境はほぼ等しいものの、遺伝的交流が乏しい 2 つの個体群間で卵サイズに差異が認められており、漁獲圧との関連が示唆されている。

本プロジェクトでは、このホッコイエビの個体群間での遺伝的差異の明確化、さらに、卵サイズの差異に関わる遺伝子の同定を目的とし、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によって、遺伝子コーディング領域に存在する一塩基多型 (SNP) の同定、そして個体群間での遺伝子発現量の網羅的な比較を行っている。

ホッコイエビの 2 つの個体群それぞれにおいて、成熟メス卵巣由来のトータル RNA を 5 個体分プールし、cDNA ライブラリーを調製した。これを用いてゲノムアナライザ (GA) による網羅的な配列の決定を行い、各個体群 60 億塩基以上の配列情報を得た。GA で得られた cDNA 配列の解析にはリファレンスとなる同種のゲノム DNA 配列へのマッピングが基本となるが、

ホッコイエビやその近縁種では未だゲノム配列が明らかになっていない。そこで、ゲノム配列へのマッピングを介さない、cDNA 配列のみを用いた *de novo assembly* を行い、得られたコンティグを転写単位として、SNP の探索や発現量の比較を複数の方法により行った。その結果、それぞれの方法で多くの SNP や発現量の変化する遺伝子が得られ、異なる探索方法で共通に同定されるものも複数あった。

今後、発現量の変化する遺伝子については、先行研究から形質との関連を探るとともに、定量 PCR によるバリデーションを行って再現性の確認を行う予定である。配列データの少ない非モデル生物を対象とした本研究の知見は、生態学・進化学的研究における次世代シーケンサーの今後の活用においても方法的に貢献すると考えられる。



千葉晋 (生物産業学部 アクアバイオ学科)
和田健太 (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)

●ゲノム解析技術を応用した高耐熱微生物の酵素による糖化システムの確立●

人類はこれまでに様々な場面で微生物を利用してきた。現代においては“微生物酵素の利用”が我々の生活を支える重要な技術の一つとなっている。その利用範囲は食品分野や化学工業分野、さらには臨床検査などの分析分野、医療分野にまでおよんでいる。例えば食品分野においては食品原料の生産にはじまり、食品製造・加工への利用、さらには食品廃棄物の処理までなされている。

しかし、酵素は一般的に温和な条件においてその機能を発揮するが、高温や酸・アルカリなどの環境下では非常に不安定であり、その利用範囲が制限されている。このため高温や酸・アルカリといった極限環境下で利用可能な微生物酵素が必要とされている。このなかでも特に、食品製造・加工においては耐熱性に優れた酵素が求められている。これは耐熱性を有することにより酵素反応と殺菌が同時に可能であること、原料濃度を高めることができるといった利点をもつためである。特に酵素反応と殺菌が同時に行える点は、エネルギーの削減やコストダウンが期待できることから、近年の地球環境の保護の観点からもそのニーズに合っていると見える。

このように有用な耐熱性酵素を産生する微生物として、米飯の保温時（60～70℃）に炊飯器中で増殖し、汚染に関与していた細菌を供試菌株とした。この細菌は生育温度試験において40～70℃という中温域から高温域で生育可能であり、耐熱性酵素を有すると考えられた。また、糖類資化性試験において多くの糖類に資化性を示したことから、様々な酵素を産生すると考えられ、食品分野において幅広い利用が期待された。

この耐熱性細菌のゲノムを解読することにより、標的酵素の選択を容易にすること、これまでにデータベース上に登録されている酵素のアミノ酸配列と比較することにより、これまでの

利用されてきた酵素とは異なるユニークな酵素を見出せる可能性があり、ゲノムを解析することはこのような点で非常に意義がある。

本研究では得られたゲノム情報をもとに、食品分野において有用性の高い耐熱性酵素の大量発現および取得した耐熱性酵素の応用を目的としている。食品分野において現在も利用されているアミラーゼ系酵素、プロテアーゼ系酵素およびペクチナーゼなどの酵素に加え、希少糖や機能性を有する糖類、物質を生産する新規性の高い耐熱性酵素の取得を目指し、研究を行っている。

本研究の成功によって、食品分野における微生物酵素のさらなる有効利用と近年大きな課題となっている地球環境問題に対応した食品生産の実現が期待できる。



入澤友啓（応用生物科学部 生物応用化学科）

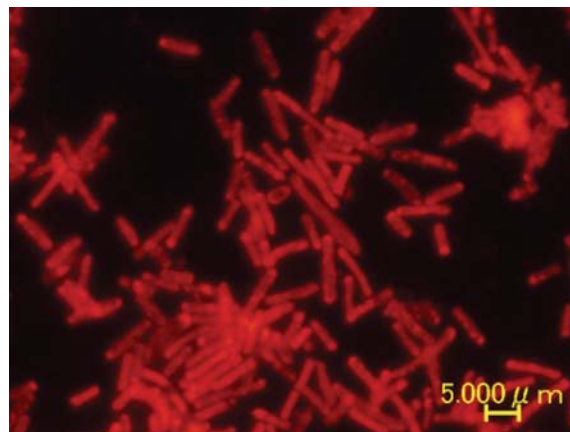
●水素発酵微生物 *Clostridium* sp. の *de novo* シーケンス●

水素は、化石燃料のように枯渇する心配が無く、また燃焼に際して大気汚染物質を発生しないことからエネルギー問題を解決する資源として注目されている。また、微生物を用いた水素発酵技術は食品廃棄物などの廃棄物系バイオマスから水素を回収できるため、持続可能なエネルギー開発に向けた最も期待される研究分野の一つである。しかしながら、水素発酵のメカニズムについては未だ十分に理解されていないことから、高い水素生産能力を有する微生物の獲得と水素発酵機作の解析が肝要とされている。当研究グループでは、食品醸造残渣などの廃棄物系バイオマスから安定的に水素を生産可能な微生物群を獲得し、水素生産の主役を担う特徴的な *Clostridium* 属菌種の存在を特定した。本研究課題では、当該微生物を単離して水素生産能力を評価すると共に、ゲノム解析により廃棄物系バイオマスからの安定的な水素生成能に寄与する因子の特定を試みる。

進捗状況としては、現在までに当該微生物の純粋培養株 (*Clostridium* sp. Sa44 株) を獲得し、生物資源ゲノム解析センターによる *de novo* シーケンスを完了した。*Clostridium* sp. Sa44 株の蛍光顕微鏡写真を図に示した。*Clostridium* sp. Sa44 株は廃棄物系バイオマスから高い収率で効率的に水素を生産可能であった。また、*de novo* シーケンスで得られたデータを基に水素生産で特徴的に働く遺伝子の存在を推定したところ、既知菌種の Hydrogenase 遺伝子に類似する配列が確認された。Hydrogenase は水素生産の要となる酵素の一群であることから、*Clostridium* sp. Sa44 株の水素生産では本遺伝子が重要な役割を果たしているものと考えられる。さらに、表現形質の分析結果から、*Clostridium* sp. Sa44 株はグルコースなどの単糖だけでなくセル

ロースからの水素生産能を有することも明らかになった。

このようなことから、今後は、*de novo* シーケンスで得られた223のコンティグの連結作業と共に、セルロース分解能に寄与する遺伝子群の特定を進める予定である。また、Hydrogenase 遺伝子およびセルロース分解能に寄与する遺伝子をターゲットとした分子育種により *Clostridium* sp. Sa44 株の廃棄物系バイオマスからの水素生産能の強化についても検討する。



Clostridium sp. Sa44 株の蛍光顕微鏡写真

大西章博（応用生物科学部 醸造科学科）

● Fructophilic LAB の機能解析と系統進化学的研究 ●

乳酸菌といえばミルクのような栄養的に恵まれた環境下でヨーグルトやチーズなどの発酵に関わっていることがよく知られている。しかし、意外にも環境適応能は高く、植物質のような栄養的に厳しいところにも生息する乳酸菌も存在し、味噌、醤油、漬物などの発酵食品に貢献しているものも数多くいる。様々な環境に適応して生息している乳酸菌だが、いずれの環境の乳酸菌も多くの場合には基本的にグルコースから乳酸を産生する乳酸発酵により生育する。そして酸素の有無に関わらず生育可能な通性嫌気性細菌であり、酸素は必要ないとされている。しかし最近、これまでの乳酸菌とは違う性質を持つ Fructophilic Lactic Acid Bacteria (Fructophilic LAB) と称されるフルクトースを特に好む乳酸菌 *Fructobacillus* 属が発見された。この乳酸菌は果実や花に生息することが多く、従来の乳酸菌とは異なる特徴が大きく2つある。1つはフルクトースを炭素源にしたときは通性嫌気性であるが、炭素源をグルコースにすると嫌気では生育できず好気でのみ生育すること。もう1つは糖からの代謝産物が乳酸と酢酸、二酸化炭素が同モル比であることが挙げられる(現在はホモ型とヘテロ型の発酵形式が知られており、それぞれの産物は乳酸のみまたは乳酸とエタノールと二酸化炭素が同モル比である)。また、高濃度(40% w/v)のフルクトースに対する浸透圧耐性があるなど環境適応と考えられる興味深い性質もある。

Fructobacillus 属はヘテロ型発酵をする *Leuconostoc* 属と系統的には最も近い。しかし、フルクトースの豊富な環境に特化したと思われる *Fructobacillus* 属と比較的どのような環境にも生息している *Leuconostoc* 属の間ではそれぞれ異なる進化を経てきたと容易に考えられる。さらに *Fructobacillus* 属内には5種あり、種

間では様々な性質の違いがある。

以上のことから、*Fructobacillus* 属のフルクトース環境に特化した性質に関わる機能やその環境適応のための進化について興味を持ち、本属5種および *Leuconostoc* 属の中でも本属に系統的に近い *L. fallax* のゲノム解析をすることとした。そして比較ゲノム解析により乳酸菌の環境適応について新たな知見を得ることや Fructophilic LAB の性質が新しい応用利用につながることを期待している。



田中尚人 (応用生物科学部 菌株保存室)

● 資源生物工学分野における有用微生物のゲノム解読 ●

資源生物工学研究室では、自然界からのスクリーニング、もしくは保存株の中からの表現型からの検索から、有用な原核微生物と真核微生物を数多く保有している。原核微生物としては、1:強力な過酸化水素分解能力を有する乳酸菌、2:酸素下で生育可能な嫌気性菌のピフィズス菌とクロストリジウム菌、3:環境ストレス耐性能の高いラン藻類、である。真核微生物としては、1:過酷な自然環境から単離された高度の環境ストレス耐性能を有すクラミドモナス属、クロレラ属の光合成微生物を数株、2:低温耐性クロレラを1種保持している。

これらの株のさらなる機能解明と応用のために、全ゲノム情報は必須である。しかし、全株が非モデル微生物のため、従来のゲノム解析法では対応できなかった。ゲノムセンターのプレラン時に一部原核微生物のデノボ解読を行っていただいた結果、卒論、修論の進行が大幅に改善される良好なデータを得ることに成功した。本申請では、有用株の機能解析を目的として、ゲノム解読情報が得られる種と同種または近縁種の原核微生物と、同属近縁種でゲノム解読情報のある真核光合成微生物のゲノム解読を行った。

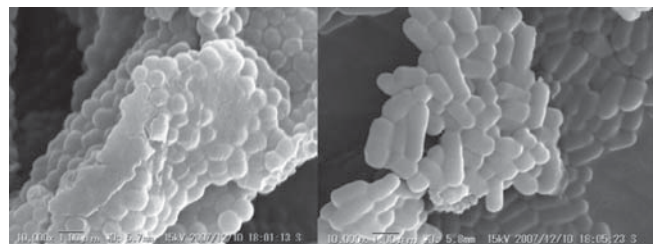
近縁種でゲノム配列が判明している種と同一の分離株: *Lactobacillus plantarum* PA1 株 (スクリーニング株)、*Pediococcus pentosaceus* Be1 株 (スクリーニング株)、*Bifidobacterium breve*、近縁種のゲノム配列が判明していない種: *Lactobacillus floricola* (新種)、*Lactobacillus ozensis* (新種)、*Clostridium tertium*、*Bifidobacterium boum*、*Bifidobacterium minimum*、*Bifidobacterium asteroides*、*Bifidobacterium indicum*)

以上の10株についてのゲノム情報をマルチプレックス法にて解読を行った。

解読結果はゲノム中の G + C 含量に応じて異なっていた。

G + C 含量が高いものはコンティグ数が100前後と、かなり良好な解読結果を得ることができたが、G + C 含量28%程度と低い *Clostridium tertium* はコンティグ数が1万ほどになってしまった。遺伝子情報の無い株に関して大量なゲノム情報を得ることが出来たため、遺伝子情報が未知の酵素遺伝子のクローニングを行うにあたり、大幅な労力の削減が期待できる。

現在は得られた遺伝子情報を基に、ゲノムインフォマティクスを試みている。完全な全ゲノム解析でなくても、メイン遺伝子の効率的な解析が実行できれば、機能未知遺伝子にコードされる酵素の機能解明も期待できる。効率的アノテーションを基盤とするゲノムインフォマティクス確立が鍵となる。



Pediococcus pentosaceus Be1 株 *Lactobacillus plantarum* P1-2 株

新村洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

川崎信治 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

佐藤純一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

研究発表実績

●論文発表

Lii Mien Yee, Takashi Matsumoto, Koichi Yano, Satoshi Matsuoka, Yoshito Sadaie, Hirofumi Yoshikawa, Kei Asai.

Genome of *Bacillus subtilis* phage SP10: comparative analysis with phage SPO1.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 2011 in press.

Ryouka Kawahara-Miki, Kaoru Tsuda, Yuh Shiwa, Yuko Arai-Kichise, Takashi Matsumoto, Yu Kanesaki, Sen-ichi Oda, Shizufumi Ebihara, Shunsuke Yajima, Hirofumi Yoshikawa, Tomohiro Kono.

Whole-genome resequencing shows numerous genes with nonsynonymous SNPs in the Japanese native cattle *Kuchinoshima-Ushi*.

BMC Genomics 2011 12, 103 doi:10.1186/1471-2164-12-103

Yuko Arai-Kichise, Yuh Shiwa, Hideki Nagasaki, Kaworu Ebana, Hirofumi Yoshikawa, Masahiro Yano, Kyo Wakasa

Discovery of Genome-wide DNA Polymorphisms in a Landrace Cultivar of *Japonica* Rice by Whole-genome Sequencing.

Plant Cell Physiol. (2011) 52 (2): 274-282

Takashi Matsumoto, Choong-Soo Yun, Hirofumi Yoshikawa, Hiromi Nishida.

Comparative Studies of Genome-Wide Maps of Nucleosomes between Deletion Mutants of *elp3* and *hos2* Genes of *Saccharomyces cerevisiae*.

PLoS ONE 2011 6(1), e16372 doi:10.1371/journal.pone.0016372

●著書

Hisato Kobayashi, Tomohiro Kono.

DNA methylation analysis of germ cells by using bisulfite-based sequencing methods.

In *Germline Development: Methods and Protocols*. 2011 Humana Press.

●学会、セミナー等での発表

(国際学会)

平成 22 年 4 月 11-14 日

3rd Annual Illumina Asia Pacific & Japan User Symposium (Phuket, Thailand)

Hirofumi Yoshikawa, Y. Shiwa, Y. Kanesaki, T. Matsumoto, Y. Arai-Kichise, R. Kawahara-Miki, K. Tsuda, S. Yajima, T. Kono

“Genome resequencing and emerging issues in bacteria, rice and cattle”

Yuh Shiwa, Y. Kanesaki, T. Matsumoto, Y. Arai-Kichise, R. Kawahara-Miki, K. Tsuda, T. Kono, S. Yajima, H. Yoshikawa

“Analysis workflows and experiences at NODAI genome research center”

平成 22 年 7 月 1-5 日

The 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription (Okinawa, Japan)

Kei Asai, M. Sakuma, T. Matsumoto, H. Yoshikawa

“Characterization of genes encoding putative omega subunits of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*”

平成 22 年 11 月 22-24 日

International Symposium on Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells (Kyushu University, Japan)

Tomohiro Kono, H. Kobayashi, Y. Suzuki

“Methylomes and transcriptomes in mouse germ cells”

平成 23 年 1 月 10-14 日

Swiss-Japan International Science Seminar “Adaptation of the plastids to various environmental conditions: Evolution, acclimation and regulation” (Villars-sur-Ollon, Swiss)

Yu Kanesaki

“DNA microarrays and next-generation DNA sequencing technologies for chloroplast research.”

(国内学会)

平成 22 年 9 月 4 日

グラム陽性菌ゲノム機能会議 (南木曾)

吉川 博文、渡辺 智、志波 優、兼崎 友、松本 貴嗣、高田 啓、福島 (田中) 早苗、盛田 雅人、大林 龍胆、野田 明日翔、千葉櫻 拓

「次世代シーケンサーが拓く微生物研究の新展開」

平成 22 年 9 月 7-9 日

日本土壌肥料学会 (北海道)

板倉 学、椎名 陽子、Hyunseok Choi、植竹 佑輔、江田 志磨、松本 貴嗣、吉川 博文、三井 久幸、南澤 究

「ダイズ根粒菌の N₂O 還元能による根粒根圏モデル系からの N₂O 発生低減化」

平成 22 年 9 月 13 日

筑波大学生命環境科学研究科 公開セミナー (つくば)

兼崎 友

「次世代シーケンサーによるラン藻ゲノム科学の新展開」

平成 22 年 9 月 20-23 日

日本遺伝学会第 82 回大会 (北海道)

朝井 計、佐久間 萌里佳、松本 貴嗣、吉川 博文

「枯草菌 RNA ポリメラーゼのオメガ様サブユニットの解析」

平成 22 年 9 月 23-26 日

日本育種学会 (秋田)

吉瀬 (新井) 祐子、江花 薫子、長崎 英樹、志波 優、吉川 博文、矢野 昌裕、若狭 暁

「SNP アレイを用いた在来品種の大粒に寄与する QTL の検索」

平成 22 年 10 月 4 日

ライフサイエンス統合データベースセンター主催 統合データベース講習会: AJACS 本郷 7 (東京)

兼崎 友、菅原 秀明、大山 彰、黒川 顕

「微生物ゲノム自動アノテーションパイプライン MiGAP の使い方・使われ方」

平成 22 年 11 月 13 日

ユーグレナ研究会 第 26 回研究集会 (東京)

兼崎 友、渡辺 智、志波 優、吉川 博文

「次世代シーケンサーによるラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 研究室株のリシーケンス解析」

平成 22 年 11 月 24-26 日

アグリビジネス創出フェア 2010 (幕張)

東京農業大学 (生物資源ゲノムセンター)

「育種手法の開発につなげる高速ゲノム情報解析例の紹介」

矢嶋 俊介

「高速ゲノム情報解析と育種への利用可能性」

平成 22 年 11 月 24-26 日

日本微生物生態学会 (茨城)

菅原 智史、川原田 泰之、松本 貴嗣、志波 優、吉川 博文、江田 志磨、三井 久幸、南澤 究

「ミヤコグサ根粒菌の宿主植物への侵入に重要な cep 遺伝子の機能解析」

平成 22 年 12 月 7-10 日

日本分子生物学会 (神戸)

志波 優、兼崎 友、松本 貴嗣、矢嶋 俊介、吉川 博文

「次世代シーケンサーのための微生物ゲノム変異解析パイプラインの構築」

吉瀬 (新井) 祐子、江花 薫子、長崎 英樹、志波 優、吉川 博文、矢野 昌裕、若狭 暁

「全ゲノム塩基配列解析による酒米品種「雄町」及び「日本晴」間の多型検出」

川原 玲香、和田 健太、千葉 晋

「次世代シーケンサーを用いたタラバエビ類のトランスクリプトーム解析」

津田 薫、川原 玲香、野口 達生、河野 友宏

「和牛 (黒毛和種) の全ゲノム解析」

三本木 あずさ、森永 哲郎、鈴木 宏和、芦田 均、志波 優、吉川 博文、吉田 健一

「*Geobacillus kaustophilus* HTA426 の 3 種のイノシトール脱水素酵素オルソログの発現と機能の解析」

小林 久人、桜井 隆順、福田 篤、高橋 望、尾畑 やよい、中林 一彦、秦 健一郎、外丸 佑介、鈴木 稜、

河野 友宏

「Bisulphite Shotgun Sequencing 法によるマウス生殖細胞の包括的 DNA メチル化解析」

平成 23 年 3 月 4 日

東京大学大学院農学生命科学研究科アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット 微生物インフォマティクス・フォーラム研究交流会（東京）

松本 貴嗣

「Illumina GAII を用いた枯草菌の解析事例」

平成 23 年 3 月 14-16 日

第 5 回日本ゲノム微生物学会年会（仙台）

志波 優、田中（福島） 早苗、笠原 堅、堀内 貴之、吉川 博文

「不均衡変異導入法におけるゲノムワイドな変異スペクトル解析」

松本 貴嗣、吉川 博文

「次世代シーケンサーを用いた枯草菌の熱ショック応答遺伝子の解析」

松本 貴嗣、吉川 博文

「次世代シーケンサーを用いた枯草菌の発現解析ならびに転写開始点解析」

松本 貴嗣、尹 忠銖、吉川 博文、西田 洋巳

「出芽酵母ヒストンアセチル化酵素遺伝子 *elp3* および脱アセチル化酵素遺伝子 *hos2* の破壊株におけるゲノムワイドヌクレオソームマップ解析」

兼崎 友、志波 優、渡辺 智、佐藤 直樹、池内 昌彦、吉川 博文

「次世代シーケンサーによるラン藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 亜系株のリシーケンス解析」

新谷 政己、松本 貴嗣、大熊 盛也、吉川 博文、野尻 秀昭

「*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (pCAR1) 株のモデル汚染環境における遺伝子進化」

菅原 智史、川原田 泰之、松本 貴嗣、志波 優、吉川 博文、江田 志磨、三井 久幸、南澤 究

「ミヤコグサ根粒菌の宿主植物への侵入に重要な *cep* 遺伝子の機能解析」

Yee Lii Mien、松本 貴嗣、吉川 博文、朝井 計

「Genome of *Bacillus subtilis* phage SP10」

今泉 優、松本 貴嗣、コヌシュカン アイシェ、宮島 由紀、長谷川 登志夫、吉川 博文、朝井 計

「植物由来香気成分の抗菌活性の解析」

今村 壮輔、兼崎 友、大沼 みお、井上 貴之、関根 靖彦、藤原 崇之、黒岩 常祥、田中 寛

「植物で初めて同定された窒素同化を制御する転写因子」

高田 啓、盛田 雅人、志波 優、松本 幸次、吉川 博文

「脂質代謝と細胞分裂を共役させるネットワークの解析」

森本 拓也、高橋 弘喜、影山 泰、眞鍋 憲二、志波 優、荒 勝俊、尾崎 克也、吉川 博文、中村健介、金谷重彦、小笠原 直毅

「枯草菌ゲノム縮小株の構築と特徴」

平成 23 年 3 月 20-22 日

日本植物生理学会（仙台）

吉瀬（新井） 祐子、志波 優、江花 薫子、長崎 英樹、吉川 博文、矢野 昌裕、若狭 暁

「日本型イネ品種間のゲノムワイドな多型検出とその利用」

平成 23 年 3 月 25-28 日

日本農芸化学会大会 2011（京都）

志波 優、田中（福島） 早苗、笠原 堅、堀内 貴之、吉川 博文

「不均衡変異導入法におけるゲノムワイドな変異スペクトル解析」

松本 貴嗣、尹 忠銖、吉川 博文、西田 洋巳

「出芽酵母ヒストン修飾遺伝子 *elp3* 及び *hos2* の破壊株におけるヌクレオソームマップ比較解析」

堀寄 允文、松本 貴嗣、春田 伸、吉川 博文、五十嵐 泰夫、山根 久和、野尻 秀昭

「ドリリン系農薬分解性 *Geobacillus* 属細菌の分解能の解析」

夏谷 亮介、堀寄 允文、松本 貴嗣、太田 裕也、角谷 香織、吉田 映子、竹村 哲雄、吉川 博文、中谷 英樹、津田 武英、平賀 義之、山根 久和、野尻 秀昭

「有機フッ素化合物分解菌の単利と解析」

平成 23 年 3 月 26-29 日

日本畜産学会 第 113 回大会（厚木）

川原 玲香、後藤 大也、河野 友宏、岩田 尚孝

「加齢がウシ卵子に及ぼす影響：次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析」

川原 玲香

「遺伝資源としての日本在来牛「口之島牛」：次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析」

●マスメディア

口之島牛全ゲノム解読の研究成果が、四国新聞、大分合同新聞、高知新聞、47NEWS、下野新聞、琉球新聞、河北新報、NIKKEI NET、読売新聞、日経バイオテクノロジージャパンに紹介されました。

酒米用イネ品種「雄町」の研究成果が日経バイオテクノロジージャパンに紹介されました。

