

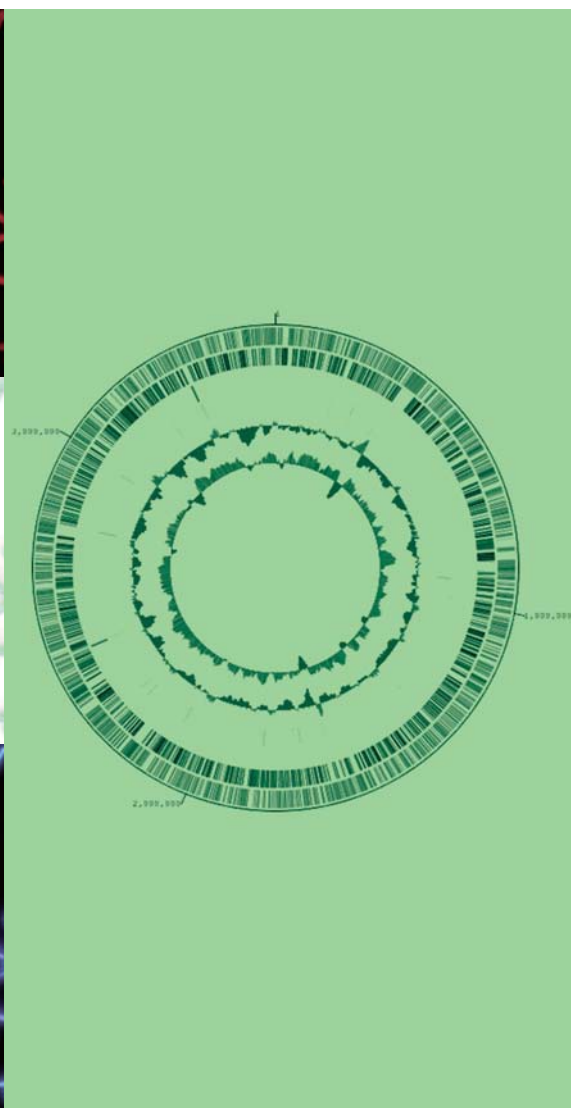
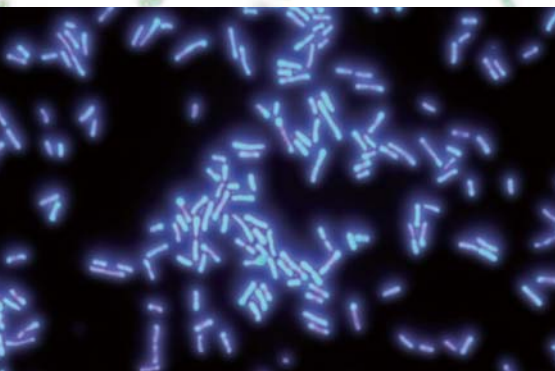
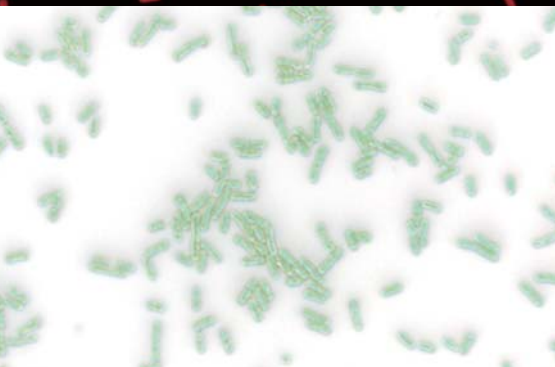
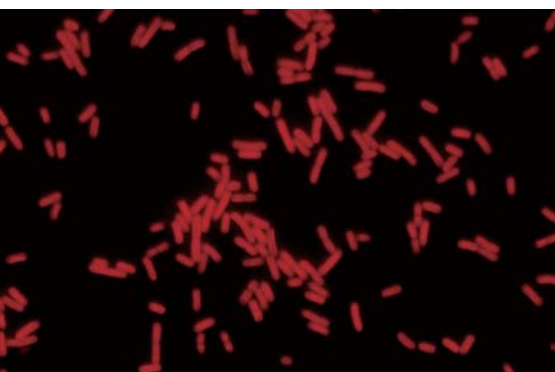


# NGRC ニュース

No. 3

東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター

## 国際シンポジウム「Genome Research」を開催



#### 表紙の説明

シアノバクテリアの顕微鏡写真（左）とその環状ゲノム地図（中央）、及び次世代シーケンサーに付随する実験機器（右）とデータ解析用サーバー（裏表紙）。シアノバクテリアの形態変化観察には、光合成色素の自家蛍光（左上）や DNA 染色試薬（左下）など様々な手法が用いられます。そのゲノムは環状構造をとり、多数の遺伝子が高密度に分布しています。

## CONTENTS

「戦略的研究基盤形成支援事業」最終年度を迎えるにあたって.....	4
生物資源ゲノム解析センターのご紹介 .....	5
国際ゲノムシンポジウムを開催して .....	6-7
次世代シーケンサーによるタラバエビ類の網羅的遺伝子発現解析 .....	8
日本型イネ品種「雄町」のゲノム情報を元にした DNA マーカーの利用 .....	9
次世代シーケンサーを用いた生殖細胞系列の DNA メチローム解析 .....	10-11
次世代シーケンス技術が解き明かすシアノバクテリアの ゲノム小進化と DNA 複製機構 .....	12-13
次世代シーケンサーによる新規微生物ゲノムの解析 .....	14
学内公募事業とその成果 .....	15-21
研究発表実績 .....	22-25
国際シンポジウム要旨 .....	27-39

## 「戦略的研究基盤形成支援事業」

### 最終年度を迎えるにあたって

さまざまなゲノム解析がようやく結実し始めた昨年度でしたが、今年度は2台のシーケンサーがほぼフル稼働し、データの排出量は膨大なものになりました。また、ゲノムを解読するだけでなく、ゲノム情報を利用して生物学的意味を探る新しいステップの研究もいくつかの方面で始めることができました。昨年公開したイネゲノムに関しては、「雄町」に続いて「五百万石」や「山田錦」など、酒米として非常に名高い品種も全ゲノム解析を終了しました。酒米に関しては世界一の実績を挙げたセンターということが出来ます。これまで難しかった近縁のイネ品種間でもDNAマーカーを大量に見つけられるようになったことは、日本の農業の発展に大きく貢献したと言えます。さらに、今年度は「雄町」と「日本晴」間の一塩基多型(SNPs)からタイピングアレイを作製した結果、簡単に全領域での品種間の違いを検出できるようになりました。これも単にゲノム解析に留まらない、発展的成果の代表例です。

ゲノムサイズがヒト並みと大きいウシゲノムについても挑戦的研究を続けています。昨年度の「口之島牛」に続き、今年度は山口県萩市の離島、見島で飼育されてきた国の天然記念物「見島牛」の解読を行いました。西洋種の影響を受けていない日本の在来牛は、「口之島牛」と「見島牛」の2種類しか残っていません。したがって、これらの配列を西洋種の既知ゲノムと比較すること、および、西洋種との交配により成立してきたいわゆる黒毛和種と比較することにより、霜降り等の重要な経済形質に関わる遺伝子や系統維持に必要な遺伝子の抽出に向けて解析を続けています。他の品種には見られない見島牛特異的な非同義置換は248個(173遺伝子)に絞られてきています。

微生物チームの新たな試みは、進化の一側面である突然変異のパターン解析です。酵母を材料とし、外界の環境圧力の代表として化学変異剤、そして内在性要因としてDNA複製装置の変異株を用い、変異スペクトルを解析した結果、複製装置に起因する方がはるかに効率よく非同義置換をもたらすこと、また変異パターンに偏りが少なく、より多様性に富んでいることを見出しました。これらの結果は、内在性要因の方が進化のプロセス

に対して有効に働いてきたことを示唆する興味深いものです。ゲノムの小さい微生物に対する先駆的な試みと解析技術は高く評価されており、ゲノム微生物学会での招待講演と今後のゲノム解析に関するパネルディスカッションのパネリストに選出されました。

学内公募研究では、オホーツクとの共同で行ったタラバエビの発現解析が大変ユニークです。次世代シーケンサーはゲノムが未知の非モデル生物の解析は本来得意ではありません。しかし、本研究では2個体群間の発現解析を行い、決定したcDNA配列のみを用いてアセンブルし、発現遺伝子を再現することによって候補遺伝子の発見に到りました。これも新たな挑戦的テーマが成就したものであり、今後、野生生物など他の非モデル生物へも応用が期待できる、本学らしい素晴らしい成果です。

このように我が国有数のゲノムセンターと位置づけられるまでに成長したこの機に、成果公表と世界の先駆的ゲノム研究者との交流を兼ね、平成24年1月21日に国際シンポジウムを開催しました。佐々木実行委員長の記事にもありますが、国内外11人の招待講演者の顔ぶれは参加者から驚きを持って迎えられるほどの豪華さで、貴重な、かつ充実した一日を過ごすことができました。

さて、本プロジェクトも残すところ一年余りとなりました。ゲノムセンターの研究遂行能力は開設当初から飛躍的に向上しており、最終年度への期待は益々高まっています。解析規模によってはまだまだ十分、開始可能です。同時に、“次”を見据えて発展的に締めくくるには、これまでの成果を広く公表することも求められます。学内公募研究の累積は畜産5件、バイオ3件、化学、醸造、食品各2件、セラピー、栄養、アクア、生産、アイソ各1件となっています。成果のまとめと論文投稿へ向けて加速して頂ければ幸いです。

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。イルミナ社の「Genome Analyzer IIx」は、前機種 II と比較して得られるデータ量が約 1.5 倍に増え、操作性も向上しており、主として微生物等の小規模解析に使用しています。また、昨年度導

入されたイルミナ社の「HiSeq 2000」は導入後も試薬・ソフトウェアの改良により性能がさらに向上し、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。今年度新たにメモリ容量 500 GB の計算サーバ、ディスク容量 50 TB のストレージサーバを導入し、ゲノムの大きな動植物向けの解析能力を増強しました。当センターでは現在 5 台の計算サーバを有し、総メモリ容量 1.2 TB、総ディスク容量 150 TB というスペックではありますが、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、「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が閲覧でき、今年度発表された論文に関するデータも公開しています。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、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)

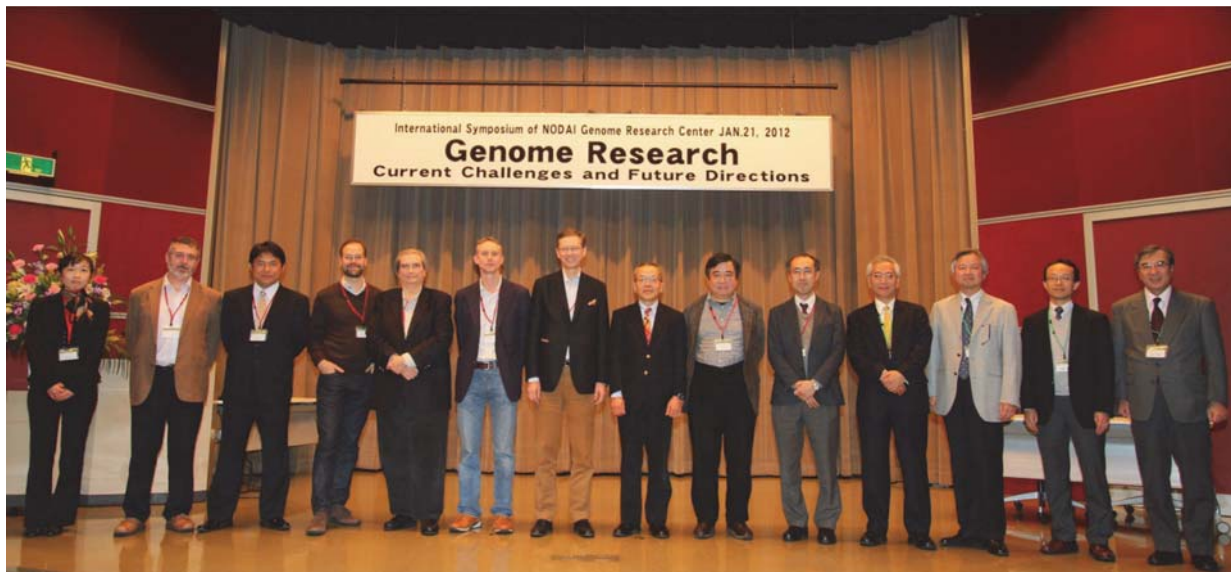


イルミナ社 HiSeq 2000



生物資源ゲノム解析センタースタッフ

## 国際ゲノムシンポジウムを開催して



招待講演者と実行委員会の先生方

東京農業大学ゲノム解析センターは文部科学省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業の支援を受けて平成 20 年度に設置され、最新鋭の自動塩基配列装置（シーケンサー）を 2 台購入し、また、得られる配列情報の解析等を行う研究スタッフを雇用することにより、学内の動物・植物・微生物に関する多くのゲノム解析研究課題を主担当あるいは分担して遂行しています。これらの成果は著名な国際誌等に論文として発表、あるいは国内外の学会等において口頭発表しており、当センターの活動は広く知られるようになってきました。一方、この間、ゲノム塩基配列情報の獲得技術あるいはこれを利用して生物の遺伝子機能を解析する手法は大きく進歩しています。例えば、第三世代シーケンサーとよばれる、現在の機種よりも更に速く、より大量に、かつより長く配列を読むことができる装置の開発、そのようにして獲得される大量の配列情報の高速処理を行うための新しいコンピューターソフトウェアの開発、あるいは配列情報を利用して新たな遺伝解析や分子生物学的解析に用いる研究の展開などが挙げられます。今回の国際シンポジウムではこのような分野で研究の最前線にたつて世界をリードしておられる国内外の研究者を 11 人お招きしてご講演をお願い

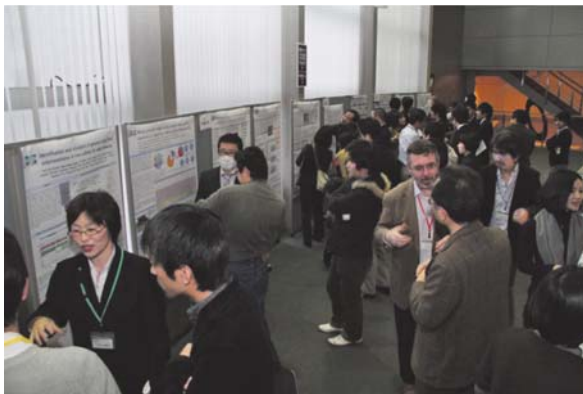
いたしました。また同時に、ゲノム解析センターを利用して研究を行っている学内の先生方や大学院生の方々によるポスター発表が行われました。

シンポジウムは 1 月 21 日（土）に品川ココロホールで開催されました。当日はあいにくの雨模様の天気でしたが、173 名の参加があり、そのうち 52 名は学外の方々でした。このことから当日のプログラムに学内外から高い関心が寄せられたことがわかります。基調講演は国立遺伝学研究所 五條堀孝教授と米国コールドスプリングハーバー研究所 Richard McCombie 博士により行われました。



五條堀先生による基調講演の様子

五條堀教授はゲノムシーケンスにより大量に得られる情報の適切な解析に欠かせないバイオインフォマティクスの重要性を述べられ、McCombie 博士は遺伝子領域に特化したシーケンス解析方法を含めた最新のゲノムシーケンス解析法の紹介を行われました。その他 9 人の先生方の招待講演では、ヒトの遺伝病あるいは孤発性の病気について原因遺伝子を解明する新たな手段としての全ゲノムアソシエーション解析の有効性 (Aarno Palotie 博士)、マウス卵母細胞における後天的なシトシンのメチル化修飾と遺伝子発現の関連 (Gavin Kelsey 博士)、鳥類の進化とゲノム構造の特徴 (David Burt 博士)、ウシゲノム情報を利用した 1 塩基多型 (SNP) の収集 (杉本喜憲博士)、ネムリユスリカの乾燥耐性と遺伝子の相関 (黄川田隆洋博士)、カイコが桑葉を唯一の食草としている生理的理由の解明 (嶋田透教授)、植物の病気防御に関わる遺伝子を制御しているマイクロ RNA の特徴 (Blake Meyers 教授)、リン欠乏・過剰ストレス条件下でのイネ発現遺伝子の網羅的解析 (大野陽子博士)、およびピロリ菌におけるゲノム構造の動的再編と病原性の関係 (小林一三教授) が発表されました (プログラムおよび講演・ポスター発表要旨は本ニュース、27～39 ページに掲載されています)。



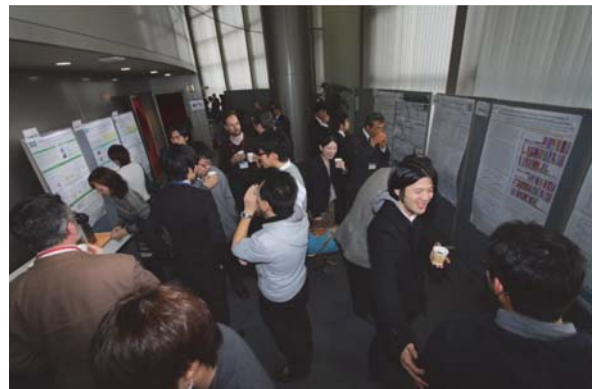
東京農大の研究成果に関するポスター発表の様子

以上のように今回の国際ゲノムシンポジウムでは広範囲な生物のゲノムシーケンス情報をどのように利用して更に研究を進展させるのかといった観点から講演が行われました。農大ゲノム解析センターは来年で開設 5 年目を迎えます。従来以上に優れた成果を挙げ更に多くの研究者に利用していただく

めにも今回のシンポジウムは参考にするべき点が多く、ゲノム解析センター関係者の皆様方にお礼申し上げますとともに、心を新たにしてい層の努力を傾注したいと考えています。



McCombie 博士の質疑応答の様子



東京農大の研究成果に関するポスター発表の様子



コクヨホールでの講演の様子

(シンポジウム実行委員長・佐々木卓治)

# 次世代シーケンサーによる タラバエビ類の網羅的遺伝子発現解析

## オスからメスへの性転換を行う タラバエビ類

タラバエビ類は寒海で最も漁獲されている甲殻類です。タラバエビ類の特徴として、性転換をすることが知られています。生まれてからしばらくは未成熟なオスの状態で、オスとして成熟し繁殖に参加した後、今度はメスに性転換して繁殖に参加します。漁業においては大型の個体が優先的に漁獲されていますが、このエビはオスからメスへの性転換を行うため、体サイズへの選択性は性選択的に作用することになります。つまり、体の大きなメスほどその集団から漁獲によって除去されることになります。この漁獲による性比の歪みの結果、有効集団サイズの縮小が起き、持続的漁業の障害となることが懸念されます。

これまでの研究から、タラバエビ科のホッカイエビ (*Pandalus latirostris*) 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つの個体群で卵サイズに変異が認められており、漁獲圧との関連が示唆されています。これらの個体群は、マイクロサテライトマーカーを用いた解析により、遺伝的に分化していることも明らかになりました。

## RNA-seq による 2 個体群間の発現比較

本研究では、遺伝的に分化し、卵サイズに変異の認められるこのホッカイエビの2つの個体群を対象に、卵サイズという形質の差異に関わる遺伝子を同定することを目的としました。次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析を行い、個体群間で遺伝子発現を網羅的に比較しました。

成熟メス卵巣由来の RNA を、個体群ごとに5個体分プールしてライブラリを作製し、発現している遺伝子の配列を決定しました。通常のトランスクリプトーム解析ではゲノム配列へのマッピングにより発現遺伝子の種類と量を解析します。しかし、ホッカイエビやその近縁種においては未だゲノム配列が明らかになっておらず、既存の配列情報がほとんど

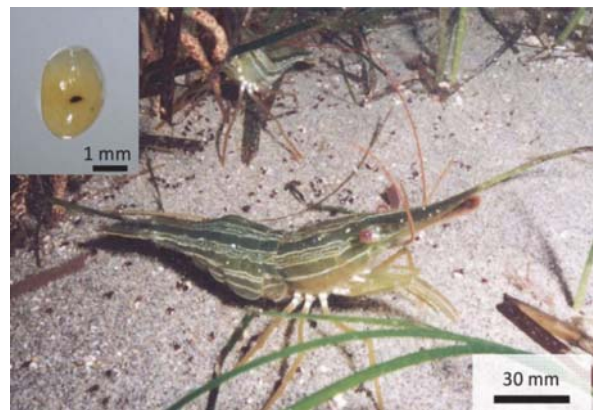


図1 ホッカイエビとその卵 (左上)

ありません。そこで本研究では、決定した cDNA の配列のみを用いて *de novo* assembly を行い、得られたコンティグを転写の単位として、発現している遺伝子を再現することにしました。このデータを基に、アセンブリに基づく方法とマッピングに基づく方法で個体群間の発現量比較を行いました。いずれの方法においても発現量に2倍以上の差が確認された遺伝子は29見つかりました。これらのうち機能性のタンパク質をコードする遺伝子配列は9つあり、卵における発現や機能が他の生物で報告されているものも複数ありました。

本研究は、次世代シーケンサーを用いることで、配列データの少ない非モデル生物における網羅的発現解析、個体群間での遺伝子発現の比較を行い、卵サイズという形質の多様性に関わる可能性のある遺伝子候補を同定することができました。今後、野生生物など他の非モデル生物においても、集団間の形質の差異に関わる遺伝子の同定等への応用が期待できます。

本研究は学内公募により生物産業学部千葉晋先生、和田健太先生との共同研究として実施されました。また成果の一部は国際誌 *PLoS ONE* (2011, 6:e26043) に掲載されました。

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

和田健太 (生物産業学部 生物生産学科)

千葉 晋 (生物産業学部 アクアバイオ学科)



# 日本型イネ品種「雄町」のゲノム情報を 元にした DNA マーカーの利用

これまで、次世代シーケンサーを用いて日本の在来品種「雄町」のゲノム解読を終了し、国際プロジェクトで明らかになった「日本晴」ゲノムの配列と比較して、DNA マーカーの一種である 1 塩基多型 (SNP) や遺伝子の挿入欠失が 16 万ヶ所以上あることを報告しました ([http://www.nodai-genome.org/oryza\\_sativa\\_en.html](http://www.nodai-genome.org/oryza_sativa_en.html) で閲覧可能)。

## DNA マーカーの重要性

従来の育種法では、親品種を交配して得られた後代の形質を調査して、希望する形質を持つ個体を選抜しますが、収量や耐病性などの作物として重要な形質の多くは気温、日照などの環境条件により大きく影響されるため、正確な選抜が困難な場合や、多数の個体を収穫まで育てる必要があります。これに対し、希望する形質を担う有用遺伝子に関連する DNA マーカーを指標に個体の選抜を行うことができれば、成育時期や環境の変化に影響されることなく早期の選抜が可能となります。次世代シーケンサーでは、全ゲノム配列の解読が短期間で行えることから、容易にゲノム情報を得られるようになりました。得られたゲノム情報を比較することで、「雄町」と「日本晴」間のように、これまで難しかった近縁の品種間でも DNA マーカーを大量に見つけられるようになりました。

## タイピングアレイの利用

次世代シーケンサーを用いて得られた大量の「雄町」「日本晴」間の SNP (132,462 個) から、ゲノム上に分散する 577 個を選抜し (図 1)、タイピングアレイを作製しました。このタイピングアレイを用いると一度に全領域での違いを検出することができます (図 2)。酒米を含む 32 品種について解析したところ、これらの遺伝的類縁関係を明らかにしたり、酒米以外の日本稲品種と酒米を分類することができました。このタイピングアレイは、今後、酒米形質の遺伝解析や育種の効率化に寄与するものと思われます。

## 新規 DNA マーカーの探索

次世代シーケンサーによる解析は、近縁品種間以外の多くのイネ品種でも新規 DNA マーカーの探索に効力を発揮します。現在、「山田錦」などの新たな酒米品種の他にフィリピン、中国など様々な国の品種について解析を行って日本のイネ品種との違いと類似性を明らかにしつつあります。今後、これらの情報も順次公開していく予定です。

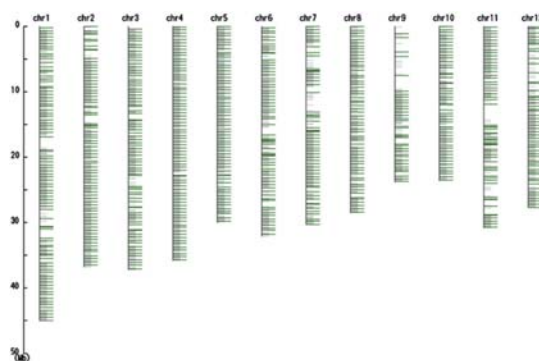


図 1 DNA アレイ作製のために選んだ SNP の位置  
12 本の染色体上で約 500 kbp 離れた場所を選択し、緑の線で表している。

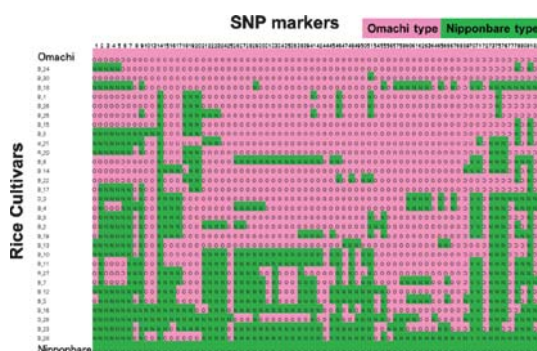


図 2 タイピングアレイを利用した染色体 1 番における結果の例

SNP タイプが「雄町」のものをピンク、「日本晴」のものを緑で示してある。横軸に SNP マーカー、縦軸に品種を並べている。

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

# 次世代シーケンサーを用いた 生殖細胞系列の DNA メチローム解析

## 次世代シーケンサーの登場：

### 個々の DNA メチル化解析から DNA メチローム解析へ

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“DNA メチローム解析”です。DNA メチロームとは、エピジェネティックな修飾である DNA のメチル化状態をゲノムワイドに解析した情報のことを指します。DNA 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、DNA メチル化を広範囲に調べることは不可欠です。

本センターでは、次世代シーケンサーを用いてマウス全ゲノムレベルでの DNA メチル化を解析することに成功しました。これらの得られた情報は web 上で公開しています。研究の成果はオンライン科学雑誌「*PLoS Genetics* (2012,8:e1002440)」に掲載されました。

注) この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、国立成育医療センター、広島大学との共同研究により実施されました。

### 微量サンプルからの DNA メチル化 マップの作製

DNA メチル化マップを作製する上で重要となるのは、解析対象となるサンプル（細胞、組織など）からいかに効率的に DNA ライブラリーを調整するかという点です。特に哺乳類の卵子は採取できる数が極めて少なく、一般的なライブラリー調整法では卵子の DNA メチル化マップの作製は不可能でした。しかし、私たちはバイサルファイトショットガンシーケンス (BSS) 用のライブラリー調整法

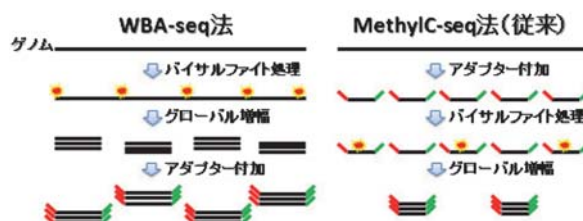


図1 DNA メチローム解析用の DNA ライブラリー作製法

(MethylC-seq) を改良し、1000 個単位の細胞からでも可能な新たなライブラリー調整法 (Whole Genome Amplification sequencing: WBA-seq) を考案しました (図1)。この方法により、卵子・精子ともに包括的な DNA メチル化マップを作製することが可能となりました。

### マウス生殖細胞の DNA メチル化 マップの作製

私たちは C57BL/6 純系マウスの精巢上体尾部由来の精子、ならびに卵核胞期の卵子からゲノム DNA を回収し、BSS 用の DNA ライブラリーを作製しました。本センターが所有するイルミナ社の Genome Analyzer II、HiSeq 2000 により、それらのライブラリーの大規模シーケンス解読を行い、各生殖細胞の DNA メチル化マップを作製することに成功しました (図2)。DNA メチローム解析の結果、精子はゲノム全体にわたり高メチル化状態 (平均メチル化: 89.4%) である一方、卵子では高メチル化・低メチル化状態に二分しており、全体として中程度のメチル化状態 (40.0%) であることが明らかとなりました。一方で、哺乳類ゲノム中に散在する CpG アイランド (CpG 配列が密な領域) の解析では、むしろ卵子で高メチル化領域が精子で高メチル化領域より多く、またゲノムインプリント制御領域における精子・卵子での明確なメチル化差異が確認できると同時に、1329 の卵子型メチル化差異

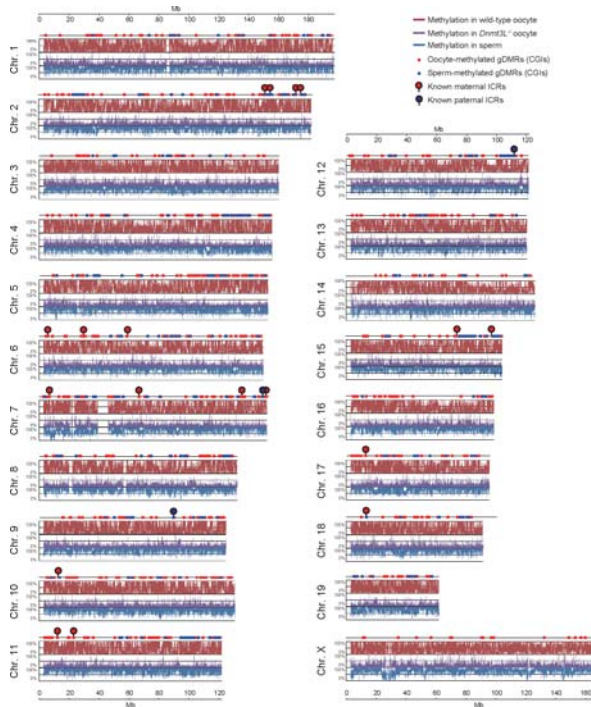


図2 卵子・精子のDNAメチロームマップ

領域 (DMR) と 349 の精子型 DMR を同定しました。さらに同じく次世代シーケンサーを用いた各生殖細胞のトランスクリプトーム解析 (mRNA-seq) の結果、マウス精子において mRNA 転写量と転写開始点のメチル化 (Promoter メチル化) に強い負の相関性が見られる一方、マウス卵子において mRNA 転写量と遺伝子内のメチル化 (Gene-body メチル化) に強い正の相関性が見られました。このようにマウスの精子と卵子間ではまったく異なるメチル化分布を示すことが初めて明らかとなりました。

### DNA メチル化関連因子 *Dnmt3L* の役割

さらに私たちは、卵子型のメチル化インプリントを欠く *Dnmt3L* 遺伝子欠損マウスの卵子の DNA メ

チロームマップとトランスクリプトームマップを作製しました。*Dnmt3L* 欠損卵子では特定のレトロトランスポゾンを除いてほぼ全ゲノムレベルでの低メチル化 (平均メチル化: 5.5%) が見られる一方、トランスクリプトームは野生型の卵子のそれとの大きな違いは見られませんでした。また、野生型卵子で見られた Gene-body メチル化と、ほぼすべての母性ゲノムインプリントは *Dnmt3L* 欠損ではほとんど見られなくなりました。このことから、*Dnmt3L* は受精後に必要となる母性ゲノムインプリントを Gene-body メチル化とともに確立する機構に必須な遺伝子であることが示されました。一方で、*Dnmt3L* に非依存的なレトロトランスポゾンのメチル化は、減数分裂期の染色体対合に必須と考えられます。このように卵子のメチル化は、卵子形成そのものに関わる *Dnmt3L* 非依存的なメチル化と、受精後の胚発生に必須なゲノムインプリント機構に関わる *Dnmt3L* 依存的なメチル化に分けられることが提言できました。

### さらなる生殖細胞の DNA メチローム解析に向けて

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、初期の生殖細胞の DNA メチロームマップを作製しています。精子・卵子における DNA メチル化の詳細な確立機構と役割を明らかにすることは、生殖細胞の新たな評価基準を設ける上でも重要なステップといえます。また、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。

小林久人 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

河野友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

# 次世代シーケンス技術が解き明かす シアノバクテリアのゲノム小進化とDNA複製機構

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

## リシーケンス解析によって明らかになった 亜系株間のゲノム配列の不均一性の問題

過去に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ッカスなどの種のDNA配列情報はデータベースに登録され世界に広く公開されています。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とは局所的に異なるDNA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。こうしたDNA配列の相違の問題は分子生物学的研究をおこなう上で非常に厄介な問題です。そこで我々はシネコシスティス sp. PCC 6803 という株について、次世代シーケンサーを用いた研究室株のリシーケンス解析を実施しました。標準菌株と研究室株とのDNA配列の相違、即ち変異の蓄積によるゲノムの小進化の歴史をゲノムワイドに解明しようという試みです。

その結果、研究室で使われている株、フランスの研究機関で冷凍保存されている株、そしてデータベース上のDNA配列には、予想以上に多数の違いが存在することが明らかになりました(図1)。こ

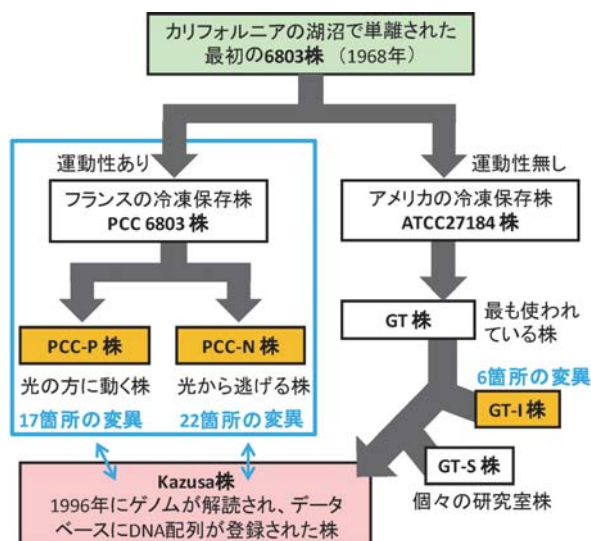


図1 シネコシスティス sp. PCC 6803 の様々な亜系株の歴史的系譜とその変異

橙色の株についてリシーケンス解析を実施した。個々の株が固有の変異を蓄積している実態がゲノムレベルで明らかになった。

の結果は今後のバクテリアを使った分子生物学的研究におけるリシーケンス解析の重要性、必要性を改めて示すものです。また本成果により、リシーケンス解析によるゲノム上の変異部位同定手法の解析技術的基盤も確立できました。本結果は国際誌 *DNA Research* (2012, 19: 67-79) に掲載されました。

## シアノバクテリアのDNA複製機構

細胞が増えるためにはあらかじめゲノムを“複製”、“分配”した後に“分裂”する必要があります。多くの生物は、この一連の現象を厳密にコントロールすることで、細胞あたりのゲノムの数を1セットに維持しています。一方で世の中には細胞あたり複数セットのゲノムを持つ生物も見つかります。シアノバクテリアもその一種です。しかし、シアノバクテリアの複数セットのゲノムがどのように“複製”しているのかは分かっていませんでした。私たちのグループでは、次世代シーケンサーを

使ってシネコッカスというシアノバクテリアの複製機構を明らかにしました。以下に、研究の一部をご紹介します。

次世代シーケンサーはゲノムを読むだけでなく、ゲノム中のそれぞれの領域の DNA 量の増減についても調べることができます。この特徴に注目し、ゲノム複製が開始する領域を見つけました。シネコッカスは光合成で生きているので、明るい場所ではしか増殖しません。新規合成された DNA を標識化合物で標識して DNA の合成活性について調べてみると、DNA の合成も明所で行わないということがわかりました。次に、標識した DNA のみを分離し、これを次世代シーケンサーによって定量的に解析しました。シーケンスによって得られたリード（ゲノム中に新しく取り込まれた標識 DNA に相当します）を参照ゲノム配列上に貼り付けていくと、明所で培養した時のみ特定の領域にリードが集中的に張り付きました（図 2）。一方、暗所で培養した場合には全くピークは検出されません。また、明所で培養する時間を延ばすことで、このピークは高く、幅広くなりました。ピークの位置は複製が起こっている領域、すなわち複製の開始領域を示し、ピークが幅広くなったということは複製が両方向に進むということを示しています。この結果から、シアノバクテリアの複製の開始領域と、複製反応が複製開始領域から両方向に進むという事実が明らかになりました。また、別の研究から複数セットのゲノムは一斉に複製せず、細胞間、ゲノム間で非同調的に複製するという事もわかりました。本研究は、シアノバクテリアゲノムの複製開始点を実験的に証

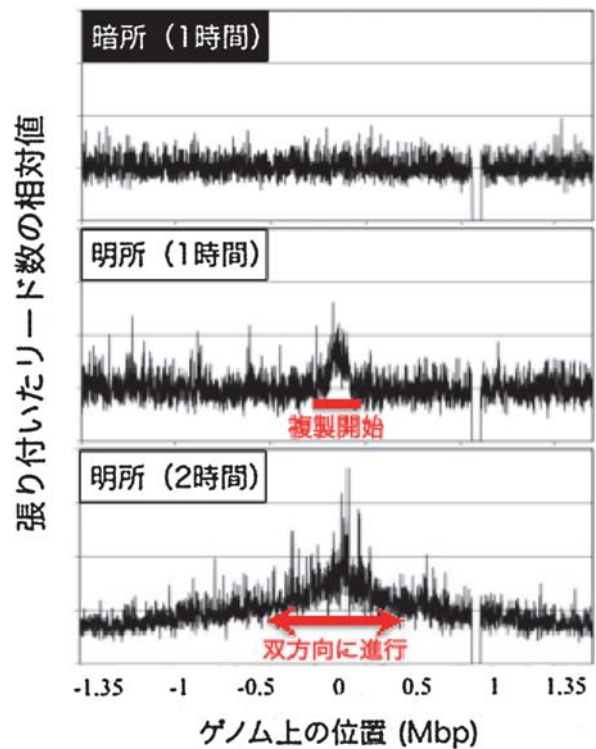


図 2 シアノバクテリアの光依存的な複製

新規合成された DNA を標識後、免疫沈降法により単離し、次世代シーケンサーを用いて解析した。得られた配列をシネコッカスのゲノムにマッピングし、複製開始領域、複製様式を決定した。

明した初めての事例です。本研究成果は国際誌 *Molecular Microbiology* (2012, *in press*) に掲載されました。

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

# 次世代シーケンサーによる 新規微生物ゲノムの解析

生物資源ゲノム解析センターが設置されてからの4年間でシーケンスした微生物サンプルは650に上り、その1/3が新規ゲノムの配列決定です。私たちが解析に用いているイルミナ社のGenome Analyzer IIxでは200-500 bp程度に断片化したDNAの両端を100 bpずつ読み取ることができ、プログラム処理により短い配列情報から元の長い配列を再構築します。ゲノムには多くの繰り返し配列が存在するため、数Mbほどのサイズしかないバクテリアであっても完全に再構築することは難しい状況です。ゲノム配列が決定済みの枯草菌で検証を行うと142本のコンティグにまとめられ、1kbより大きな21本のコンティグでゲノム全体の98.6%がカバーされました(表1)。ゲノムの全体像を把握するにはドラフト配列で十分なことも多く、詳細な解析を進める上で重要な手掛かりになっています。

## 枯草菌ファージ SP10 のゲノム配列決定

ファージとはバクテリアを宿主にするウイルスの総称です。ファージが感染して増殖するとバクテリアは死んでしまいます。納豆やヨーグルトのように

表1 ゲノム配列の再構築

ゲノムサイズ(bp)	4,215,606
コンティグ数	142
コンティグ中の塩基数	4,171,213
最大コンティグ(bp)	1,015,679
1 kb より大きいコンティグ数	21
1 kb より大きいコンティグ中の塩基数	4,154,513

バクテリアを利用する発酵食品の製造工場ではファージによる汚染が深刻な問題となります。

枯草菌に感染するファージ SP10 のゲノム解析を行った結果、約144 kbの配列に236個のORFが見つかりました(図1)。また、枯草菌 Marburg 株が持つ制限系 *BsuMR* の認識配列 (CTCGAG) が SP10 ゲノムに36箇所あることが明らかとなり、*BsuMR* によってファージの感染を阻止していることを確認しました。本研究結果は英文科学誌 *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2011, **75**: 944-952) に掲載されました。

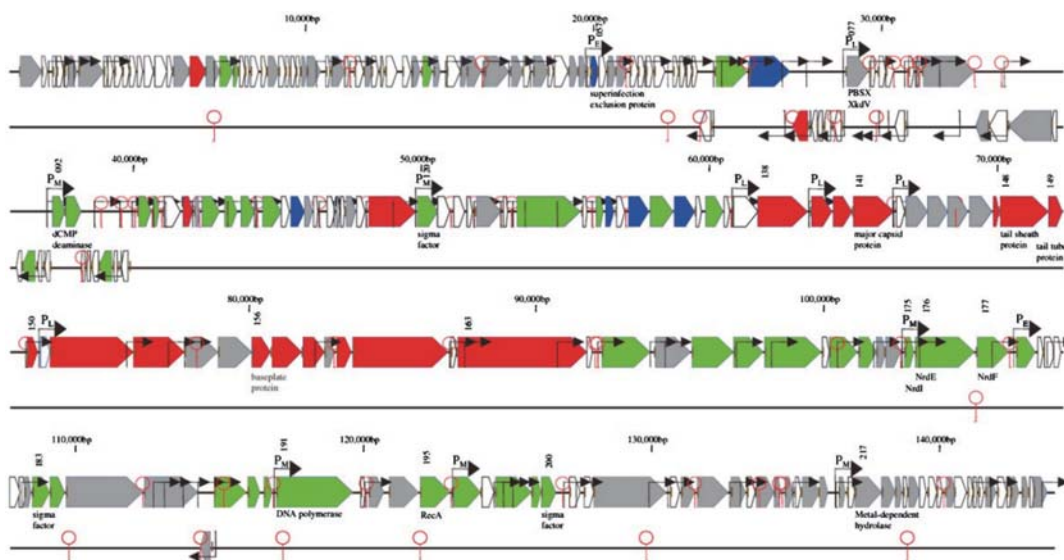


図1 SP10 の ORF マップ

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

## 平成23年度 新規学内公募一覧

1. 桑山岳人 (農学部 畜産学科)  
「ニワトリの就巢行動発現制御遺伝子の特定」
2. 三井裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)  
「ダイコンのゲノム解析と遺伝子データベースの構築」
3. 喜田聡 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)  
「記憶能力向上を示す CREB 活性型変異マウス群のトランスクリプトーム網羅的解析」
4. 中川純一 (生物産業学部 食品香粧学科)  
「食品微生物、生物化学、品質管理学研究室の有用微生物のゲノム解析」
5. 中川純一 (生物産業学部 食品香粧学科)  
「フコイダン分解性の海洋乳酸菌と海洋性細菌の探索」
6. 坂田洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)  
「ヒメツリガネゴケのアブシジン酸応答に関わるシグナル活性化因子の探索」
7. 笠原浩司 (応用生物科学部 アイソトープセンター)  
「出芽酵母をモデルとする真核生物の新規転写開始制御機構の研究」
8. 田村倫子 (応用生物科学部 栄養科学科)  
「酵母のアミラーゼ発現調節機構に関する研究」
9. 貝沼章子 (応用生物科学部 醸造科学科)  
「酢酸菌におけるゲノムスケールでの系統解析の試み」

## 学内公募その成果

### ▶▶▶ 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。アジア大陸に分布するビルマバンテン (*B. j. birmanicus*)、インドネシア・ジャワ島に分布するジャワバンテン (*B. j. javanicus*)、そしてボルネオ島に分布するボルネオバンテン (*B. j. lowi*) の3亜種に分類されている。森林の伐採やアブラヤシ・プランテーションなどの開発に伴う生息地の消失や分断化、角や肉を目的とした密猟などにより個体数が激減し、国際自然保護連合のレッドリストにおいてバンテンは絶滅危惧種に指定されている。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があると考えられ古くから家畜化も行われており、遺伝資源としての価値も有する。

ボルネオ島北部に位置するマレーシア・サバ州では500頭前後が生息していると推定されている。現在、生息地や個体数の減少問題に加え、家畜ウシとの交雑も懸念されており、地域個体群ごとの遺伝的集団構造や家畜ウシとの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。しかし、これまでバンテンの遺伝子情報はビルマバンテンとジャワバンテンに関するもののみで極めて限定的である。

そこで本研究は、サバ州に生息するボルネオバンテンの遺伝的集団構造の把握と有用遺伝子の検索を行うために、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。

【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：バンテンの髄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。

これまでに、チトクロームbおよびD-loopの塩基配列からそれぞれ3および2種類の対立遺伝子を検出すると共に、ボルネオ亜種は他の亜種よりむしろ他の野生ウシ種との近縁性が示唆される一方、供試したボルネオ亜種個体は家畜ウシと交雑していないことを確認した。また現在、ゲノムセンターにて全ゲノム配列を解析中である。

松林尚志 (Universiti Malaysia Sabah)

半澤 恵 (農学部 畜産学科)

Abdul Hamid Ahmad (Universiti Malaysia Sabah)

覚張隆史 (東京大学)

## ▶▶▶ 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 (HT) を確定した LR-PCR 産物を多数保有し、それらの 1 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：HT 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、組換え領域を推定すると共に、その機序を考察する。また保有する免疫関連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、その多様性を規定する候補領域を検索する。HSP：発現調節候補領域の塩基配列を HT 間で比較する。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。遺伝子重複領域のコンテグ作成に活用した。また、TRIM 亜領域および CD1 亜領域のシンテニーを

確認すると共に、計 5 つの多型マーカーを構築し HT を解析した。

### 【業績】

#### 原著論文

横山佳菜・朝治桜子・鈴木進悟・細道一善・原ひろみ・吉田豊・水谷豊・藤原哲・椎名隆・半澤恵、2012、ニホンウズラ CD1 遺伝子領域の多様性解析、DNA 多型 **20**、印刷中。

#### 学会発表

1. 横山佳菜・朝治桜子・鈴木進悟・細道一善・椎名隆・水谷豊・藤原哲・万年英之・原ひろみ・吉田豊・半澤恵、20110328、ニホンウズラ CD1 遺伝子座の多様性解析、日本家禽学会 2011 年度春季大会 (中止、講演要旨のみ発行) 講演要旨 pp.5。
2. 横山佳菜・朝治桜子・鈴木進悟・細道一善・原ひろみ・吉田豊・水谷豊・藤原哲・椎名隆・半澤恵、2012032X、ニホンウズラ CD1 遺伝子領域の多様性、日本畜産学会第 115 回大会 (於名古屋大学) 講演要旨印刷中

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)

## ▶▶▶ 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 ◀◀◀

加齢による繁殖能力低下は、哺乳動物共通の現象である。ヒトでは繁殖能力低下が 30-40 歳の 10 年以上にわたり起こる。我々は、繁殖寿命が長く、しかも大型の哺乳動物である牛を用いて加齢が卵子に及ぼす影響について検討している。平成 23 年度は、初期胞状卵胞卵子を用いて加齢の影響を検討した。卵子ではミトコンドリア DNA コピー数の低下が観察され、体外発育した卵子の体外受精後の発生能力も低下していた。顆粒層細胞では、グルタチオン含有量の低下が確認された。次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析では、加齢個体由来する顆粒層細胞で発現の異なる遺伝子が多数確認され、その中には、抗酸化関連の遺伝子が含まれていた [1]。また胞状卵胞の顆粒層細胞においても、テロメアの短縮、低メチル化や増殖活性の低下が確認され [2]、抗酸化能力の減退や酸化ストレスの上昇が観察された [3]。胞状卵胞卵子の体外成熟前後、および体外受精後の 8 細胞期胚を対象に次世代シーケンサーを用いて遺伝子解析を行った。その結果、加齢によって発現が異なる遺伝子を多数同定した。これらの中には、本年度に加齢個体由来する卵子や胚で確認された異常 [4] と関連付けられるものが多く含まれており、この結果は第 53 回哺乳動物卵子学会 [5] に発表予定である。

1. Endo M, Kawahara R, Goto H, Monji M, Kuwayama T, Kono T, Iwata H. The Second World Congress in Reproductive Biology (Cairns, Australia)
2. Goto H, Iwata H, Takeo S, Nisinonso K, Murakami S, Monji Y, Kuwayama T. Zygote. 2011 Jul 27: 1-9.
3. 第 53 回哺乳動物卵子学会 (千里ライフサイエンスセンター) 発表予定 竹尾駿、後藤大也、木村康二、岩田尚孝、門司恭典、桑山岳人
4. Goto H, Iwata H, Takeo S, Murakami S, Monji Y, Kuwayama T. The Second World Congress in Reproductive Biology (Cairns, Australia)
5. 第 53 回哺乳動物卵子学会 (千里ライフサイエンスセンター) 発表予定 岩田尚孝、川原玲香、後藤大也、竹尾駿、桑山岳人、門司恭典、河野友宏

岩田尚孝 (農学部 畜産学科)



## ▶▶ ニワトリの就巢行動発現制御遺伝子の特定 ◀◀

就巢性はニワトリに限らず、鳥類が種族保存のためにあまねく保持する母性行動の1つですが、就巢行動の発現は産卵数を減少させるため、長年に亘る選抜育種により一部の卵用鶏種から排除されました。ただ、それらの卵用鶏種からの就巢性の排除は、その発現制御遺伝子を特定することによるものではなく、産卵成績と就巢行動の発現状況の記録による選抜育種によりなされた成果です。従って、それらの選抜育種を実施してこなかった一部の肉用鶏種や七面鳥などでは未だ就巢性が排除されていません。しかし、世界の動物性タンパク質の供給状況を見ると、卵用鶏種ほど就巢性の排除が重要視されなかった家禽においても、動物性タンパク質の供給源としての役割は今後益々増大していくものと考えられます。そこで私たちは、鳥類の就巢行動発現制御遺伝子を特定し、就巢性を排除することにより効率的な家禽の生産性に貢献しようと考えました。

本研究では、まず就巢性を保持しない白色レグホーン種（卵用鶏種）と就巢性を保持する名古屋種（卵肉兼用鶏種）、岐阜地鶏（天然記念物）、烏骨鶏（天然記念物）の全ゲノムの塩基配列を比較し、就巢性を保持しない種に共通する変異、就巢性を保持する種に共通する変異を同定します。ここでは、他品種間の比較となるため、就巢性保持の有無に限らず、他の表現型の違いや品種の違いに由来する変異も同定される可能性があります。

そこで、就巢行動を発現しない個体も存在する名古屋種と岐阜地鶏を用いて、就巢行動を発現する個体と発現しない個体とに分けて比較をすることにより、特異的な変異を同定することが出来れば就巢行動発現にかかわると考えられる変異を同定

できる可能性があります。

さらに、品種間で得られた変異と品種内で得られた変異を比較して、就巢性を保持しない白色レグホーン種のみにある変異の中から、名古屋種や岐阜地鶏において就巢性を保持しない個体に共通している変異を絞り込むなどの解析を行うことで、就巢行動発現に関わると考えられる変異を絞り込んでいく予定です。



岐阜地鶏

川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）  
神作宣男（麻布大学）  
中村明弘（愛知県農業総合研究場）  
吉村 崇（名古屋大学）  
桑山岳人（農学部 畜産学科）

## ▶▶ ダイコンのゲノム解析と遺伝子データベースの構築 ◀◀

ダイコン（学名 *Raphanus sativus*、アブラナ科ダイコン属）は古来より日本人に最も親しまれてきた野菜の一つであり、食用、薬用、救荒作物として全国各地の風土や暮らしと密着して多種多様な品種が栽培されてきた。特に、米文化と結びつくことで、白米や糠と合わせて調理・加工され、和食や郷土食を多彩に発展させた。ダイコンは養分の少ない土地でも育ち、ほぼ周年で栽培可能で、短い栽培期間（1～2カ月）で収穫に至り、食用となる根部・葉ともに栄養価に富むという優れた農作物である。ダイコンは大きく、太く、深く根を地中に下ろす特徴的な植物である。根の伸長が2メートルまで達する守口大根や、直径50センチメートルにも肥大する桜島大根をはじめ、根部の肥大・伸長性には驚くべき多様性が見られる。さらに、含有成分（辛味、糖、デンプンなど）や表皮の色（白・赤・紫・緑・黒・黄）もさまざまであり、生理学、分子生物学、遺伝学、進化学など、生物学的な研究対象としても興味深い。本プロジェクトは、ダイコンのゲノムを世界で初めて解読し、データベースを構築することで、ダイコンのゲノム研究の基盤を確立することを目的としている。

現在、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターと農業生物資源研究所を拠点として、ダイコンの新規ゲノムシーケンスを進めている。代表的な栽培品種である青首系大根の1系統から核DNAを抽出し、イルミナ社とロシュ社の次世代シーケンサーを用いて全ゲノム（約500Mbp）の100倍程度の配列長を得ることを目標としてシーケンスを行っている。参照配列のない新規ゲノムの解読であるため、出力される配列の長さや量の異なる2機種用のシーケンサーを組み合わせて、断片配列をつなぎあわせるアセンブル作業を効率的に行っていく。得られたゲノムのドラフト配列は、すでにゲノム解析が進んでいる近縁なハクサイや、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノムと比較し、遺伝子機能の予測、ゲノムの全体構造の比較、

ダイコンに特徴的な遺伝子群の探索を行う。ゲノム情報が公開されている植物種との網羅的な比較解析を行うデータベースを現在構築しており、平成24年中の公開を目指している。本研究によりダイコンのゲノム解析の基盤が確立されることで、品種・系統間で多様な形態や性質のちがいをうみだす分子メカニズムの解析が飛躍的に進展すると期待される。



三井裕樹（農学部 バイオセラピー学科）  
八田真理（生物資源ゲノム解析センター）  
志波 優（生物資源ゲノム解析センター）  
片寄裕一（農業生物資源研究所）  
下村道彦（三菱スペース・ソフトウェア）  
佐々木卓治（総合研究所）  
和久井健司（短大 生物生産技術学科）

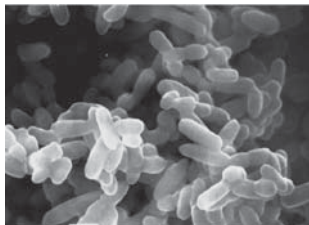
## ▶▶▶ 酢酸菌におけるゲノムスケールでの系統解析の試み ◀◀◀

酢酸菌は、酢酸菌科 (Acetobacteraceae) に属する偏性好気性の  $\alpha$ -プロテオバクテリアの総称である。酢酸菌は、特徴として細胞膜上に多くの脱水素酵素を有しているが、これらの酵素は同じく細胞膜上に存在する電子伝達系と連動しており、細胞外にアルコールや糖が存在した場合、これらを基質とした酸化反応により細胞内に ATP を生成する。この酢酸菌特有のエネルギー代謝により、菌体外には基質の酸化生成物が蓄積されていくが、この現象は一般に酸化発酵と言われ、種々の物質生産に応用される重要な現象となっている。中でも特に基質がエタノール、すなわち生成物が酢酸の場合を酢酸発酵と呼び、これが食酢醸造の原理となっており、酢酸菌を重要な産業微生物たらしめている。

酢酸菌科には、現在、産業上重要な 3 属 (*Acetobacter* 属、*Gluconobacter* 属、*Gluconacetobacter* 属) を含む 28 属が存在する。これらの属は、基本的にはバクテリア分類の定石に則って設置されているが、酢酸菌特有の易変異性という性質のため、一部定石を逸脱し系統に混乱を生じている。一般にバクテリアの分類は、16S rRNA 配列の類似性および各種表現型や DNA-DNA 相同性の結果を総合して行っている。しかし、酢酸菌は他のバクテリアと比較して表現型が変異し易いため、16S rRNA 配列に基づく系統と、表現型や DNA-DNA 相同性との間に乖離を生じ、現在の分類基準では整理困難な部分が発生している。このため、16S rRNA 配列では新種レベルのものが新属として設置されるケースも発生しており、酢酸菌の分類・系統解析に関する方法論を考え直す必要性が生じているのが現状である。

我々は、この解決策として、ゲノム情報に基づいた解析手法の導入を試みた。現在、酢酸菌についてコンプライートゲノム情報が公開されているのは 5 属のみであるため、それ以外の属については本学ゲノムセンターの次世代シーケンサーによる *de novo* sequence を行った。試験的に、16S rRNA での系統上混乱

している位置にある 6 属の解析を行ったところ、いずれもコンティグ数、解析深度、ゲノムサイズ等について良好な結果が得られ、目的とする解析に十分な精度を持つゲノム情報が得られた。これらのドラフトゲノム配列に、公開されている 5 属のコンプライートゲノム配列を加えた計 11 属について、全ての属で共通に保存されているオルソログ遺伝子を抽出し (約 600)、それらを concatenate した配列について 16S rRNA 配列と同様の手法による系統解析を行った結果、表現型を強く反映した系統樹が得られた。この際、bootstrap 値は、全ての分岐点において 100 となり、本系統解析の信憑性が非常に高いことが示唆された。ゲノム情報より、16S rRNA 配列による系統と表現型等に差異が生じる原因についても推測が可能であり、今回用いたゲノムスケールでの手法は、酢酸菌の分類および系統を考える上で非常に有効であった。現在、さらに株数を増やし、より網羅的に酢酸菌のゲノムレベルでの系統解析を進めている。本法による考え方は、酢酸菌科の微生物に留まらず、広くバクテリアの分類および系統解析について一石を投げると考えている。



◀◀◀ 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* (山口大学 松下一信教授提供)

貝沼章子、石川森夫、小泉幸道 (応用生物科学部 醸造科学科)  
吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)  
志波 優 (生物資源ゲノム解析センター)  
松下一信、松谷峰之介 (山口大学農学部)

## ▶▶▶ 酵母のアミラーゼ発現調節機構に関する研究 ◀◀◀

微生物が生産する酵素は、食品工業において広く利用されている。当研究室ではネパールの餅麴からアミラーゼ産生酵母の *Pichia burtonii* を分離した。*Saccharomyces cerevisiae* をはじめとする多くの酵母はアミラーゼ分泌能が無く、これをコードする遺伝子も有さないが、*Saccharomycopsis fibuligera* や *Schwannomyces occidentalis* といった一部の酵母は、グルコアミラーゼや  $\alpha$ -アミラーゼを産生することが知られている。しかし酵母におけるアミラーゼ発現制御については、*S. fibuligera* において制御因子が 1 つ明らかにされているに過ぎず、ほとんど解明されていない。一方、カビ類である *Aspergillus oryzae* の産生するアミラーゼは、古くから酒醸造などで広く利用されており、分子レベルでのアミラーゼ発現制御機構が解析されている。

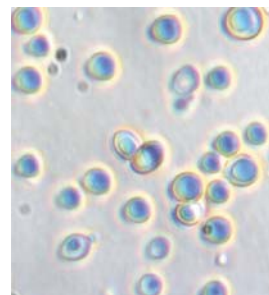
*P. burtonii* が分泌する  $\alpha$ -アミラーゼ (PBA) をクローニングしたところ、全長 494 残基で、*S. occidentalis* と 60%、*A. oryzae* と 47% の相同性であった。また、グルコース培地では PBA を分泌しないが、デンプン培地やマルトース培地で PBA を分泌し、さらにマルトースの 10% をグルコースに置換した培地においても PBA を分泌した。そこで、酵母のアミラーゼ発現制御機構を明らかにすることを目的として、次世代シーケンサーを用いた *P. burtonii* の全ゲノム配列の解読を行った。

解読されたシーケンス配列を対象に、カビおよび酵母における既知のカーボンカタボライト抑制因子に類似した配列をサーチした。*Aspergillus* 属の  $\alpha$ -アミラーゼ発現は、転写促進因子である AmyR と抑制因子である CreA が直接的に遺伝子のプロモーターに結合することで制御されている。しかし *P. burtonii* には両因子に相同性の高い配列は存在しなかった。よって

*Aspergillus* 属とは異なるカーボンカタボライト抑制機構の存在が予測された。*Pichia* 属のカーボンカタボライト抑制機構に着目すると、マルターゼ発現を促進する因子である SUC1.2、1.4、1.5、さらに抑制する因子である MIG1 および MIG2 が染色体上に存在している。MIG1 は広域転写調節因子として知られ、*S. cerevisiae* においてはマルターゼとともにスクラーゼ遺伝子の転写抑制にも関与する。*S. fibuligera* においては  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の発現も抑制する。*P. burtonii* のゲノムには SUC1.5、MIG1、MIG2 に約 70% 類似の配列がそれぞれ存在する。*S. cerevisiae* のマルターゼ、スクラーゼ転写調節は、これらの因子を含めた数十の因子が相互作用することで成り立つことが明らかにされている。今後、*P. burtonii* のゲノム配列をもとに、 $\alpha$ -アミラーゼの転写調節機構を解明したいと考えている。



ネパールの餅麴



*Pichia burtonii*

村 清司 (応用生物科学部 栄養科学科)  
田村倫子 (応用生物科学部 栄養科学科)

## ▶▶▶ 資源生物工学分野における有用微生物のゲノム解読 II

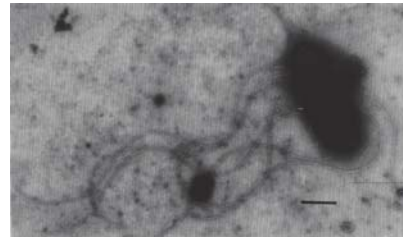
### — 微生物における過酸化還元酵素の多様性 — ◀◀◀

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。酸素は微生物の生育に影響を与える最大の環境要因のため、保有株には多様な活性酸素防御系を持つ菌群が存在する。活性酸素は食細胞の殺菌作用や、シグナル伝達に関与する有用な面もあるが、過剰に存在すると各種疾病の原因となり寿命の決定要素にもなっている。なかでも過酸化水素は、細胞障害性が高いヒドロキシルラジカル(•OH)を生じるため、過酸化分解は生体維持の重要反応である。過酸化分解酵素としては catalase が古くから知られているが、最近では多様な過酸化還元酵素が見いだされている。

本報告ではまず、生化学データを微生物系統樹から検討し、新たにゲノム配列に基づく解析を行った。その結果、好気性菌に多様な過酸化還元酵素 (hem-catalase, 各種 peroxidase, AhpF-AhpC (Prx)) のタンパク、遺伝子分布が観察された。偏性嫌気性菌は酸素存在下で生育が阻害される菌群の総称であるが、同菌群にも好気性菌と異なる多様な過酸化分解酵素が分布している。嫌気性下で生育するが、酸素存在で生育可能菌群を通性嫌気性菌と呼ぶ。この菌群には好気性菌と嫌気性菌に存在する過酸化分解酵素系が多く含まれている。そのなかにはヘムタンパクを欠如するため、独自に進化した過酸化分解酵素 NADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx) が通性嫌気性菌 *Amphibacillus xylanus* に見いだされた。NADH oxidase は、酸素代謝に関与し、さらに AhpC (Prx) タンパクと共同して過酸化分解にも関与し、特異な高速反応性を示した。

*A. xylanus* の過酸化分解酵素系 NADH oxidase (Nox)-AhpC (Prx) 系は、現在の peroxiredoxin reductase ファミリーに属している。本酵素系は酸素還元活性を持つが、同ファミリーには

過酸化アルキル分解酵素として発見された AhpF が含まれており、好気性菌から嫌気性菌まで広く分布している。ヘムタンパク欠如の嫌気性菌、通性嫌気性菌には AhpF, Nox-AhpC (Prx) の他、過酸化分解酵素として、NADH peroxidase (Dolin *et al.*, 1957) Mn-catalase (河野ら, 1983)、嫌気性菌では多酵素複合系による NADH peroxidase 反応系が報告されている。しかし AhpF, Nox-AhpC (Prx) 系を除くと、好気性菌から、通性嫌気性菌、偏性嫌気性菌に存在する酵素系は見いだされなかった。そこで同酵素遺伝子を中心に、微生物系統進化とタンパク進化との関係を解析した。



*Amphibacillus xylanus* 電子顕微鏡写真

望月大地 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

田中尚人 (応用生物科学部 菌株保存室)

石川森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)

遠藤明仁

(Functional Foods Forum, University of Turku, Turku, Finland)

佐藤純一 (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)

新村洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

## ▶▶▶ Fructophilic LAB の糖代謝の特性 ◀◀◀

近年、グルコースよりフルクトースを生育基質として好む乳酸菌 fructophilic Lactic Acid Bacteria (fructophilic LAB) の存在が報告されている<sup>1)</sup>。その1つである *Fructobacillus* 属細菌は花や果実に生息し他の fructophilic LAB とは大きく異なる性質を有することが知られている。それは、グルコースを基質とした際にフルクトースやピルビン酸、酸素等の生育基質以外の生育因子を必須とするという性質や、培養条件によらずエタノールを産生せず酢酸を産生するという性質である<sup>2)</sup>。本属細菌と近縁のヘテロ発酵型乳酸菌は一般に乳酸と共にエタノールも産生する。乳酸菌の糖代謝によるエタノールの産生は NAD/NADH の酸化還元バランスの維持のために重要な役割を果たしているが、エタノールを産生しない本属細菌は独特の糖代謝経路や酸化還元バランス維持機構を有することが考えられた。そこで、ゲノム解析により本属細菌の糖代謝の特性を検討し、乳酸菌の新たな応用利用への可能性を探ることとした。

*Fructobacillus* 属の5種 (*F. durionis*, *F. ficulneus*, *F. fructosus*, *F. pseudoficulneus*, *F. tropaeoli*) の各基準株のドラフトゲノム配列を決定し、近縁の *Leuconostoc* 属の公開ゲノムとの比較ゲノム解析により *Fructobacillus* 属の糖代謝経路の特性を調べた。その結果、本属のゲノムは *Leuconostoc* 属が保持するヘテロ型乳酸発酵に関連する遺伝子の一部が欠失していた。欠失遺伝子の多くは同化反応などにリンクする反応系の遺伝子 (transketolase や pyruvate dehydrogenase 遺伝子) で、さらにその遺伝子がコードしている酵素の基質を ATP 産生に利用する反応系は存在し

た。糖代謝の中間産物のアセチルリン酸の利用も同様で、*Leuconostoc* 属ではアセチル CoA を介しエタノールを産生して NAD/NADH の酸化還元バランスを維持する反応系と ATP 産生を伴う酢酸産生系に利用されるが、*Fructobacillus* 属は後者の遺伝子のみを保持していた。

*Fructobacillus* 属がフルクトースやピルビン酸、酸素といった生育因子を利用して NAD/NADH の酸化還元バランスを維持するための酵素遺伝子を保持するかゲノム情報から調べたところ、mannitol-2-dehydrogenase, lactate dehydrogenase, NADH oxidase の各遺伝子を保持していた。これらは *Leuconostoc* 属も同様に保持していた。

以上のゲノム解析により、*Fructobacillus* 属の糖代謝は他のヘテロ発酵型乳酸菌よりも ATP を効率的に産生する機構となっており、NAD/NADH の酸化還元バランス維持は菌体外の因子に依存的であることが明らかとなった。これはフルクトースなどが豊富な生息環境が影響していると考えられる。また、この特性は特別な機能の獲得によるものではなく進化の過程で近縁の乳酸菌の一部の遺伝子が欠失した結果であると考えられた。本属のゲノム解析により乳酸菌の発酵生産のための資源としての新たな可能性を少なからず見いだされたと思われる。

<sup>1)</sup> A. Endo *et al.*, *Syst. Appl. Microbiol.*, **32**, 593-600 (2009)

<sup>2)</sup> A. Endo, *Jpn. J. Lactic Acid Bact.*, **22**, 87-92 (2011)

岡田早苗 (応用生物科学部 生物応用化学科)

田中尚人 (応用生物科学部 菌株保存室)

## ▶▶▶ ヒメツリガネゴケのแอบシジン酸応答に関わる シグナル活性化因子の探索 ◀◀◀

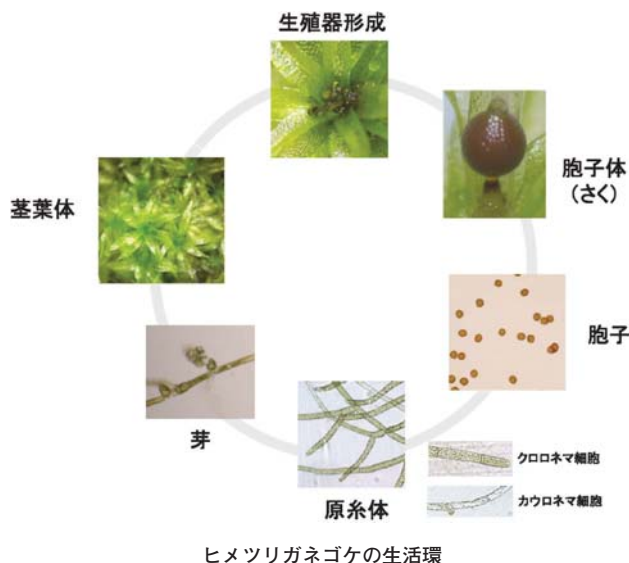
### 陸上植物の ABA シグナル伝達系の進化を紐解く

植物の環境ストレス応答においてアブシジン酸 (ABA) は気孔コンダクタンスの調節や種子休眠、およびストレス関連遺伝子発現制御に関わる重要なホルモンである。細胞の ABA 応答は、ABA が PYL/PCAR 受容体に結合することで特異的なプロテインキナーゼ「SnRK2」が活性化することで開始される。活性化された SnRK2 は、ABA 誘導性遺伝子の発現制御に関わる bZIP 転写因子をはじめ、多彩な細胞内調節因子を活性化する。このことから SnRK2 は ABA 情報伝達の「コア因子」として機能していると考えられているが、その活性化メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、遺伝子ターゲティングが可能であり、全ゲノム解析が完了しているモデルコケ植物である蘚類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) において SnRK2 の活性化に欠損のある ABA 非感受性変異株 AR7 のゲノム解析を通して、SnRK2 活性化に関わる情報因子を同定することを研究の目的としている。

従来、SnRK2 の活性化は、ABA 存在下で負の制御因子 PP2C が機能しなくなることで、単にその自己リン酸化が促進されて起こると考えられてきた。しかし、坂田らによるヒメツリガネゴケ PP2C の完全ノックアウト株の解析により、SnRK2 の活性化には PP2C 以外の未知の活性化因子が必須であることが強く示唆された。一方、ヒメツリガネゴケ AR7 株は他の植物にはない著しい ABA 非感受性表現型を示す変異株として単離された。最近、AR7 株では SnRK2 の活性化がほぼ消失していることが明らかとなり、この変異株が SnRK2 の活性化に関わる情報因子に欠損を持つ可能性が高いことが示唆された。AR7 株の変異遺伝子を特定することは、ABA 応答の初期プロセスを理解する上できわめて重要であると考えられるが、従来のマッピングによるポジショナルクローニングが難しいヒメツリガネゴケでは、ゲノムシーケンシングによる遺伝子の比較解析

が有効であると考えられた。

以上のことから、本研究では AR7 変異株のゲノムシーケンスを解読し、データベース上の野生型ヒメツリガネゴケゲノム配列と比較し、変異箇所を明らかにする。機能に影響しない spontaneous な変異の蓄積が予想されるため、我々が有するヒメツリガネゴケマイクロアレイを用いて、遺伝子発現レベルにおける変異パターンと組み合わせることで、変異株の原因遺伝子特定を試みる。



坂田洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)  
竹澤大輔 (埼玉大学 大学院理工学研究科)

## ▶▶▶ 乳酸菌の長寿遺伝子を探る ◀◀◀

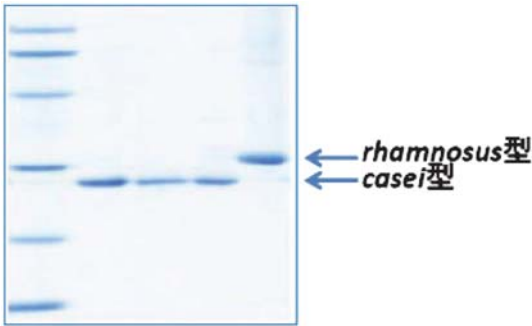
私達が健康で長生きするために働く長寿遺伝子があることが近年明らかになった。それも単なる長生きではなく、メタボリズムを健全にし、癌抑制遺伝子を活発にし、体内時計も調整するというもので、進化の過程で生き残りのために獲得されたと言われている。その本体はサーチュインと呼ばれるタンパク質脱アセチル化酵素である。これを活性化することは健康につながるわけで、赤ワインに含まれるレスベラトロールというポリフェノール成分にその働きがあることも分かった。この遺伝子については人のみならず、ネズミ、ショウジョウバエ、線虫、酵母などゲノム解析の進んでいるモデル真核生物で研究が進んだ。酵素反応の基質として染色体のヒストンタンパク質などがある。

ところで、ゲノムデータベースで検索すると、細菌にもそのホモログが見つかる。そこで、人と共進化したと言われるほどに相性のよい、乳酸菌についてみると、たしかにサーチュインホモログが存在する。この遺伝子は乳酸菌のサバイバルに関与しているのであろうか。染色体を持たない原核生物で酵素は何をしているのであろうか。私達はそれを突き止めようとして研究を始めた。

乳酸菌の中で、*Lactobacillus casei* 菌を選んだのは、チーズから採取された ATCC 基準株に加えて、農大コレクションの中の植物性の姉妹菌株を検討できるからである。

動物性乳酸菌は腸内環境で保護されている箱入り娘、対する植物由来の菌は農家バイトで鍛えられた農大生のように強いとされる。乳酸菌が腸内で活躍できるかどうかを左右する胆汁酸への耐性を比べてみると、植物由来の菌が強い。興味深いことに、レスベラトロールで菌を前処理すると耐性が上がり、サーチュイン阻害剤であるスラミンで前処理すると耐性が下った。そこで、動物性と植物性の菌株の全ゲノム解析をしたところ、ゲノムサイズは1割程度の差があったが、それぞれがサーチュインホモログ遺伝子を保有していた。一つの植物由来菌には *Lactobacillus casei* 型のサーチュインに加えて、*Lactobacillus rhamnosus* 型のホモログが見出された。そこで、これらの株のサーチュインホモログの cDNA をクローニングして DNA 配列を確定したところ、*casei* 型はジーンバンクデータと 99% の相性を示したが、*rhamnosus* 型は 78% であり、それらには人から酵母まで保存されている活性中心のヒスチジン残基が保存されていた。早速大腸菌を用いて組換えタンパク質を生産し、これを精製した。現在酵素解析を進めており、人のサーチュインと同様の脱アセチル化活性を示すことを見出している。

サーチュインの祖先は乳酸菌で何をしていたのか、それは生物界の長寿遺伝子の意義と共通性についての秘密を探る冒険であり、優良なプロバイオティクスを創生するための鍵にもなると考えている。



乳酸菌のサーチュインホモログの組換えタンパク質

学会発表

1. 6th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria (2011, Sapporo, Japan) Hotaka Atarashi, Syuki Fujimura, Naoto Tanaka, Sanae Okada, Junichi Nakagawa. Effect of resveratrol on the cholate-tolerance of lactic acid bacteria.
2. International Genome Research Symposium (2012, Tokyo, Japan) Junichi Nakagawa, Hotaka Atarashi, Yuya Yoshida, Syuki Fujimura, Naoto Tanaka, Sanae Okada. Identification and molecular cloning of sirtuin homolog of the lactic acid bacteria isolated from fermented milk and plant.
3. 日本農芸化学会大会 (2012、京都) 新 穂高、藤村朱喜、田中尚人、岡田早苗、中川純一 乳酸菌のコール酸耐性への resveratrol の効果、及びサーチュインホモログの解析

中川純一 (生物産業学部 食品香粧学科)  
 新 穂高 (生物産業学部 食品香粧学科)  
 岡田早苗 (応用生物科学部 生物応用化学科)  
 田中尚人 (応用生物科学部 菌株保存室)

## ▶▶▶ 出芽酵母をモデルとする真核生物の 新規転写開始制御機構の研究 ◀◀◀

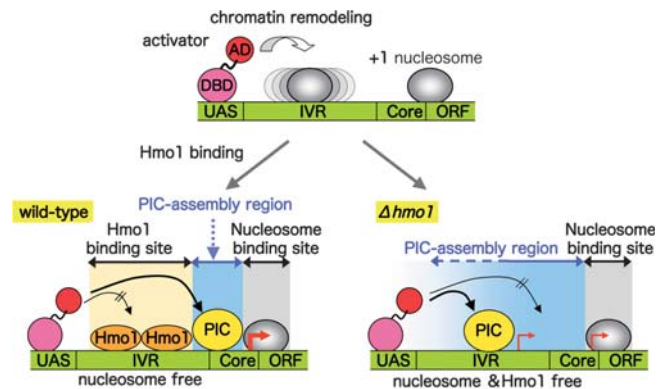
単細胞の真核生物である出芽酵母は、その単純さにもかかわらず、ヒトを含む高等生物にまで普遍的に存在する多くの基本的な生物機能の原型を保持しており、また強力な遺伝学的研究手法を駆使できる利点もあって、過去数十年にわたり真核生物研究におけるモデル生物として多大な役割を果たしてきた。加えてここ数十年間、真核生物の中で最初に全ゲノム配列が解読された生物として、全ゲノムレベルの研究の発展における先導役を果たしてきた。

我々は出芽酵母を材料に、真核生物における遺伝子の転写制御機構に関する研究を行っており、最近の成果として、染色体構造因子 HMGB タンパク質ファミリーの1つ Hmo1 (High mobility group 1) タンパク質が、リボソームタンパク質遺伝子群のプロモーター上において、ヌクレオソームと排他的な領域に結合し、両者に挟まれた領域に RNA ポリメラーゼ II とその基本転写因子群 (TFIIA, B, D, E, F, H) からなる転写開始前複合体 (PIC; pre-initiation complex) の形成を導くことを明らかにした (図)。一般的には、PIC の形成位置は、TATA ボックスなど保存されたコアプロモーター配列を基本転写因子が認識することにより決定されると考えられているが、実際には多くのプロモーターにおいて保存されたコアプロモーター配列が見つかっておらず、これらのプロモーターがどのような仕組みで特異的に認識されるかについては不明な点が多い。我々の研究は、そのような未知の転写開始機構の一端を明らかにしたものと考えている。

今後は、①次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq 解析による Hmo1、ヌクレオソーム、及び PIC の全ゲノム上の正確な結合位置の決定、及び②遺伝学的手法による上記の仕組みに関与する他の因子の同定 (PIC 形成位置に異常が起こる突然変異株の単離とその原因遺伝子の同定)、の二つのアプローチを柱に研究を進めていく予定である。これらのアプローチにおいて

は、ともに次世代シーケンサーを用いた大規模シーケンスの技術が重要な役割を果たすことは疑うべくもなく、それによってリボソームタンパク質遺伝子群という限られた遺伝子において見いだされた PIC 形成位置決定の仕組みが、他の多くの遺伝子でも普遍的に用いられている可能性を検証できるとともに、そのような仕組みの分子レベルでの解明が飛躍的に進むことが期待できる。

現時点では高等真核生物における Hmo1 のオルソログは明らかになっていないが、このような転写開始位置の決定の仕組みは、酵母だけでなく高等真核生物においても形を変えて普遍的に存在しているものと考えている。



Hmo1 and the +1 nucleosome promote PIC assembly at the core promoter by determine the the 5'- and 3'-border, respectively, of the PIC assembly zone.

笠原浩司 (応用生物科学部 アイソトープセンター)

## 研究発表実績

### ●論文発表

- Watanabe S, Ohbayashi R, Shiwa Y, Noda A, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H. Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes. *Molecular Microbiology* (2012) *in press*
- Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T. Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the *Gpr1-Zdbf2* locus is linked to long *cis*-intergenic transcription. *FEBS Letters* (2012) *in press*
- Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet.* 8:e1002440 (2012)
- Kanesaki Y, Shiwa Y, Tajima N, Suzuki M, Watanabe S, Sato N, Ikeuchi M, Yoshikawa H. Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Research* 19: 67-79 (2012)
- Yee LM, Matsumoto T, Yano K, Matsuoka S, Sadaie Y, Yoshikawa H, Asai K. The genome of *Bacillus subtilis* phage SP10: a comparative analysis with phage SPO1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 944-952 (2011)
- Shintani M, Matsumoto T, Yoshikawa H, Yamane H, Ohkuma M, Nojiri H. DNA rearrangement occurred in the carbazole degradative plasmid pCAR1 and the chromosome of its unsuitable host *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Microbiology* 157: 3405-3416 (2011)
- Kawahara-Miki R, Wada K, Azuma N, Chiba S. Expression profiling without genome sequence information in a non-model species, pandalid shrimp (*Pandalus latirostris*), by next-generation sequencing. *PLoS ONE* 6:e26043 (2011)
- Tajima N, Sato S, Maruyama F, Kaneko T, Sasaki NV, Kurokawa K, Ohta H, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Tabata S, Ikeuchi M, and Sato N. Genomic structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 strain GT-S. *DNA Research* 18: 393-399 (2011)
- Nakamura K, Oshima T, Morimoto T, Ikeda S, Yoshikawa H, Shiwa Y, Ishikawa S, Margaret C. Linak, Hirai A, Takahashi H, Md. Altaf-Ul-Amin, Ogasawara N and Kanaya S. Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Research* 13: e90 (2011)

### ●学会，セミナー等での発表

2012年3月27日～30日

日本畜産学会第115回大会 名古屋

河野友宏

最新ゲノム解析から探る和牛肉質のルーツ。公開講演会「『持続的な食糧生産と食の安全を支える新たな動物生産科学の進展』新たな科学でつくる安全で安心な動物性タンパク」

川原玲香

次世代シーケンサーを用いたニホンウズラのゲノム解説。シンポジウム「鳥類バイオサイエンス研究の新たな展開」

2012年3月22日～26日

日本農芸化学会 京都

吉川博文, 渡辺 智, 志波 優, 西田洋巳, 板谷光泰

合成生物学の申し子「シアノバチルス1号」のゲノム機能解析。シンポジウム「ゲノムを知って作る：ゲノムはどこに向かうのか？」

笠原 堅, 志波 優, 田中（福島）早苗, 堀内貴之, 越智幸三, 吉川博文

新しい育種技術「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

枯草菌におけるゲノムワイドな転写開始点解析.

岩田 修, 松本貴嗣, 新谷政己, 高妻篤史, 山根久和, 野尻秀昭

各宿主特異的なプラスミド pCAR1 上の分解遺伝子群の発現を調節する因子の解析

高瀬識之, 能登 優, 高橋裕里香, 松本貴嗣, 吉川博文, 土金恵子, 細山 哲, 藤田信之, 山根久和, 野尻秀昭

プラスミドの負荷を軽減する新規遺伝子の探索.

Yee Lii Mien, 堀寄允文, 土金恵子, 細山 哲, 藤田信之, 松本貴嗣, 吉川博文, 春田 伸, 朝井 計, 五十嵐泰夫, 山根久和, 野尻秀昭

ドリン系農薬分解菌の環境汚染物質分解能の解析と分解関連遺伝子の探索.

2012年3月16日～18日

日本植物生理学会 京都

宮本皓司, 松本貴嗣, 小宮山紘平, 岡田 敦, 中条哲也, 岡田憲典, 吉川博文, 渋谷直人, 野尻秀昭, 山根久和

ChIP-seq 解析によるイネのジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御する bZIP 型転写因子 OsTGAP1 の標的遺伝子の同定.

清水崇史, 宮本皓司, 中条哲也, 松本貴嗣, 吉川博文, 西澤洋子, 南 栄一, 渋谷直人, 岡田憲典, 野尻秀昭, 山根久和

イネの病害抵抗性発現に関与する転写因子 OsWRKY53 の標的遺伝子の探索.

2012年3月13日～14日

第4回高資源ポリマーセンターシンポジウム 東京

兼崎 友

次世代シーケンス技術によるラン藻ゲノム研究の現状と展望.

2012年3月10日～12日

第6回日本ゲノム微生物学会 東京

吉川博文

シーケンスセンターの経験と課題 ～微生物ゲノムを中心に～. シンポジウムならびにパネルディスカッション「我が国の微生物ゲノムと新型シーケンサー」

高瀬識之, 能登 優, 高橋裕里香, 松本貴嗣, 吉川博文, 土金恵子, 細山 哲, 藤田信之, 山根久和, 野尻秀昭

プラスミドの負荷を軽減する染色体因子の発見.

兼崎 友, 志波 優, 田島直幸, 鈴木まり絵, 渡辺 智, 佐藤直樹, 池内昌彦, 吉川博文

Whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains by massively parallel sequencer.

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.

2012年1月21日

“Genome Research: Current Challenges and Future Directions” International Symposium of NODAI Genome Research Center Tokyo

Kanesaki Y, Shiwa Y, Tajima N, Suzuki M, Watanabe S, Sato N, Ikeuchi M, Yoshikawa H.

Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Kanesaki Y, Shiwa Y, Suzuki M, Watanabe S, Yoshikawa H.

Resequencing analysis of the laboratory strains of the cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Matsumoto T, Yoshikawa H.

Genome-wide analysis of transcription start sites in *Bacillus subtilis*.

Shiwa Y, Kanesaki Y, Matsumoto T, Yajima S, Yoshikawa H.

Analysis pipeline for microbial mutation from next-generation sequencing data.

Arai-Kichise Y, Shibata-Hatta M, Shiwa Y, Ebana K, Yoshida S, Yamasaki M, Yoshikawa H, Yano M, Wakasa K.

Identification and utilization of genome-wide DNA polymorphisms in rice cultivar for sake-brewering.  
Endo M, Kawahara-Miki R, Cao F, Monji Y, Kuwayama T, Kono T, Iwata H.

Effect of age on bovine early antral follicles.

Kawahara-Miki R, Wada K, Azuma N, Chiba S.

Expression profiling without genome sequence information in a non-model species, pandalid shrimp (*Pandalus latirostris*), by next-generation sequencing.

Kawahara-Miki R, Sano S, Kuwayama T, Matsuda Y, Yoshimura T, Kono T.

Genome sequence of the Japanese quail *Coturnix japonica*.

Kawahara-Miki R, Tsuda K, Shiwa Y, Oda S, Ebihara S, Kono T.

Whole-genome resequencing of the Japanese native cattle *Kuchinoshima-Ushi*.

Tsuda K, Kawahara-Miki R, Noguchi T, Kono T.

Whole-genome sequencing reveals many genetic variations in the Japanese native cattle *Mishima-Ushi*.  
Ozaki M, Matsuoka K, Takada T, Ohno T, Tsuda K, Kono T, Yonekawa H, Kikkawa Y.

Identification of susceptibility genes associated atopic dermatitis in NC/Nga.

2011年12月13日～16日

第34回日本分子生物学会年会 横浜

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遺伝子発現解析。

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。

2011年12月2日～3日

ラン藻の分子生物学会2011 千葉

兼崎 友, 志波 優, 田島直幸, 鈴木まり絵, 渡辺 智, 佐藤直樹, 池内昌彦, 吉川博文

*Synechocystis* sp. PCC 6803 substrain のリシーケンス解析から見えてきたこと。

2011年11月1日～2日

植物化学調節学会 宇都宮

宮本皓司, 松本貴嗣, 小宮山紘平, 岡田 敦, 中条哲也, 岡田憲典, 吉川博文, 渋谷直人, 野尻秀昭, 山根久和

イネにおけるジテルペン型ファイトアレキシン生産を制御するbZIP型転写因子OsTGAP1の機能解析。

2011年9月20日～22日

日本遺伝学会第83回大会 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。

2011年9月15日～17日

第104回日本繁殖生物学会大会 岩手

遠藤美和, 川原玲香, 山本千尋, 和田 光, 恒松数磨, 沖 愛弓, 後藤大也, 河野友宏, 岩田尚孝

加齢がウシ初期胎状卵胞卵子に及ぼす影響。

2011年8月24日～25日

グラム陽性菌ゲノム機能会議 福山

松本貴嗣, 吉川博文

Illumina GAII を用いた枯草菌の転写開始点解析。

山下悠美, 横川朋美, 川島秀嗣, 田中 (福島) 早苗, 松本貴嗣, 吉川博文

枯草菌の孢子形成に関与するクエン酸回路因子の新規機能解析。



2011年8月20日～21日

ゲノム微生物学会ワークショップ 仙台

松本貴嗣, 吉川博文

Illumina GAII を用いた枯草菌の転写開始点解析.

岩田 修, 松本貴嗣, 新谷政己, 高妻篤史, 山根久和, 野尻秀昭

カルバゾール分解系制御系遺伝子 *antR* の宿主依存的な発現制御機構の解明.

2011年8月18日～19日

第154回農林交流センターワークショップ 茨城

吉瀬祐子, 若狭 暁

農大発ゲノム研究～酒米ゲノムを中心に～

2011年8月9日～12日

World Congress on Reproductive Biology Australia

Endo M, Kawahara-Miki R, Goto H, Kono T, Iwata H.

Effect of age on bovine preantral follicles.

2011年7月29日～31日

日本進化学会第13回大会 京都

川原玲香, 和田健太, 東 典子, 千葉 晋

ホッカイエビ個体群における遺伝子発現の網羅的比較.

2011年5月28日～29日

次世代シーケンサ現場の会第一回研究会 熱海

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.

2011年4月28日

「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」学内公募テーマシンポジウム 東京

千葉 晋, 川原玲香

次世代シーケンサーを用いたホッカイエビのトランスクリプトーム解析.

### ●招待講演

2011年9月29日

イルミナ社バイオインフォマティクス講習会中級 秋葉原

志波 優

バクテリアゲノム De novo Assembly への挑戦

### ●マスメディア

2012年2月9日

マウスの精子と卵子のDNAメチル化全ゲノム解析の研究結果が、日経バイオテックで紹介されました.

2011年7月18日

雄町米のゲノム解読の研究結果が、山陽新聞で紹介されました.

2011年6月9日

次世代シーケンサーが特定の配列パターンで読みとりエラーを起こしやすい事を解明した研究成果が、日経新聞で紹介されました.

### ●その他

川原玲香 巻頭言：遺伝資源としての日本在来牛. 生物科学 63 (in press)

International Symposium of NODAI Genome Research Center

# Genome Research

Current Challenges and Future Directions



## ABSTRACTS

Jan. 21 / 2012 KOKUYO HALL, Shinagawa, Tokyo

本シンポジウムは文部科学省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「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」による助成を得て行われた。(平成20年度～平成24年度)

## Genome Research: Current Challenges and Future Directions

Jan. 21, 2012 International Symposium of NODAI Genome Research Center

- 9:00–9:05 Welcome address **Kanju Ohsawa** (Tokyo Univ. Agric.)
- 9:05–9:10 Opening remarks **Takuji Sasaki** (Tokyo Univ. Agric.)
- 9:10–9:40 Keynote address 1 **Takashi Gojobori** (NIG)  
*Genome Research with Big Data*  
*~ How can we make "data-driven scientific discovery" possible? ~*
- 9:40–10:20 Keynote address 2 **W. Richard McCombie** (Cold Spring Harbor Lab.)  
*Challenge and opportunities in the application of next generation sequencing technology*
- 10:20–10:35 Coffee break
- 10:35–11:05 Symposium speech 1 **Yoshikazu Sugimoto** (SIAG)  
*New approaches to drive discovery in Bovine Genomics*
- 11:05–11:45 Symposium speech 2 **David W. Burt** (The Roslin Institute)  
*Evolution of Avian Genomes*
- 11:45–12:15 Symposium speech 3 **Takahiro Kikawada** (NIAS)  
*The sleeping chironomid genome project toward understanding molecular context underlying the extreme desiccation tolerance, anhydrobiosis*
- 12:15–13:20 Luncheon Seminar (Illumina K.K.)
- 13:20–14:00 Symposium speech 4 **Aarno Palotie** (Sanger Institute)  
*Identification of human disease genes after the GWAs era*
- 14:00–14:40 Symposium speech 5 **Gavin Kelsey** (The Babraham Institute)  
*Epigenomic approaches to understanding DNA methylation establishment in mice*
- 14:40–15:10 Symposium speech 6 **Ichizo Kobayashi** (The Univ. Tokyo)  
*Evolutionary genome dynamics revealed by microbial genome comparison*
- 15:10–15:25 Introduction of NODAI Genome Research Center
- 15:25–16:15 Poster session
- 16:15–16:55 Symposium speech 7 **Blake C. Meyers** (Univ. Delaware)  
*MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs*
- 16:55–17:25 Symposium speech 8 **Youko Oono** (NIAS)  
*A genome-wide transcriptional analysis by mRNA-Seq of Pi-stressed rice seedlings*
- 17:25–17:55 Symposium speech 9 **Toru Shimada** (The Univ. Tokyo)  
*Genomic studies on the relationship between the silkworm and its food plant, mulberry*
- 17:55–18:00 Closing remarks **Tomohiro Kono** (Tokyo Univ. Agric.)

## Genome Research with Big Data

~ How can we make “data-driven scientific discovery” possible? ~

Takashi Gojobori

Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan (DDBJ), National Institute of Genetics, Mishima, Japan

The Next-Generation Sequencers (NGS) has produced enormous amount of nucleotide sequence data in the genome research and its related research fields. The amount of data is so huge that scientists cannot handle it in a proper way. This is called a problem of “Big Data.” According to the late Jim Gray who used to be a prominent database researcher in Microsoft, we have been confronted by the fourth paradigm “Data-driven scientific discovery.” Jim Gray had claimed that when the first paradigm was the “experiments”, the second and third paradigms were the “theory” and “simulation,” respectively. It is no doubt that genome research is currently under the fourth paradigm and its scientific success relies heavily upon how we can make significant discovery from the Big Data. One of the answers is obviously the database construction. Thus, I would discuss the role of the database in the genome research, taking our experiences as an example. Moreover, the NGS has changed not only the paradigm of genome research but also the perspective of our society. For example, the personalized medicine on the basis of genomic information has become almost realistic. Moreover, the so-called meta-genomics will provide us with environmental monitoring of the marine, the revolutionary approach of intelligent agriculture, and prompt detection of emerging and reemerging viruses and bacteria in the air. In this situation, we should be able to make a proposal of the vision of our future society focusing upon the genome and its related information in particular. Thus, I would like to call it as the “Genome Information-oriented Society (g-Society).”

## Challenges and Opportunities in the Application of Next Generation Sequencing Technology

W. Richard McCombie

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

The rapidly increasing capabilities of next-generation sequencing have led to revolutionary changes in modern biology. This is particularly true in the fields of genetics; both in humans and plant systems. The challenges that one faces in using this technology fall into two large categories. The first of these is how to use the technology to most effectively identify and characterize genetic variation in a way that can be correlated with biological phenotype. The second challenge is using the next-gen sequencing technology to carry out the de novo assembly of complex genomes. Both of these challenges are common to both plant and animal researchers, although in different research contexts. I will discuss how our group is using this technology to approach both of these challenges. I will discuss understanding how genetic variation affects phenotype studies in the context of studies of the genetics of major psychiatric disorders. For de novo assembly I will describe our work on sequencing of plant genomes with next gen technology and approaches both in the lab and computationally to generate higher quality genome assemblies from next-gen data.

## New Approaches to Drive Discovery in Bovine Genomics

Yoshikazu Sugimoto, Takashi Hirano

Shirakawa Institute of Animal Genetics

In our beef industry, renal tubular dysplasia was a serious problem in 1990s, because most of elite sires apparently harbored the causative mutation. We started genetic analysis of the disorder in 1995, and identified a deletion mutation in novel *claudin-16* gene in 1999 by the help of lucks; the deletion spanned 37 kb at 7 kb from the most linked microsatellite marker.

At an intermediate stage, we mapped forelimb-girdle muscular anomaly on BTA 26 with microsatellites in 2007, detected 1,700 SNP candidates by re-sequencing two sires in 2010, and identified one deleterious SNP causing nonsense mutation in 2011.

Last February we mapped weak calf syndrome with the bovine 50K SNP beadchip (Illumina) and identified a deleterious mutation with newly developed exome sequencing technology (NimbleGen) last October. Encouraged by this finding, we have applied this strategy to other genetic disorders. Now 3,000 DNA from calves stillborn or died in 20-days old are at hand. Stillbirth with unknown reasons is the most abundant incidence. In near future exome sequencing in conjunction with family-based phenotypes will partly reduce the incidence.

## Evolution of Avian Genomes

David W. Burt

The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, University of Edinburgh, UK

Our knowledge of avian genomes has increased rapidly over the past few years, culminating in the publication of the chicken genome in 2004, a milestone in avian genetics and evolutionary biology. This was followed by the Zebrafish genome a model for studies in neurobiology. Recent advances in sequencing technology now make it possible to produce draft sequences of any vertebrate genome. This year, we have seen the completion of the genome sequences of the turkey and mallard, and soon other birds will join this list. I will review some of the insights and new directions in avian biological research these new genome resources enable. Comparative analysis of avian genomes reveal the history of genome reorganization, the structure of genes, the diversity of protein coding genes, the nature of gene regulatory regions, etc. These genome sequences promise to be valuable resources for ecological and evolutionary studies of other bird species – in this new genome era.

## The sleeping chironomid genome project toward understanding molecular context underlying the extreme desiccation tolerance, anhydrobiosis

Takahiro Kikawada, Oleg Gusev, Richard Cornette and Takashi Okuda

National Institute of Agrobiological Sciences

To cope with drought stress, organisms have evolved several strategies for surviving. Anhydrobiosis is one of the most extreme strategies. Just after water addition, anhydrobiotic organisms can

revive from complete desiccation. Larvae of the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*, inhabiting semiarid area in Africa are a representative example. Thus far, although genes and molecules involved in anhydrobiosis in the sleeping chironomid have been isolated and characterized, these studies fall short of complete understanding of the molecular context.

To comprehend the molecular mechanisms underlying anhydrobiosis in the chironomid, we started omics research, such as genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. At this time, 1.4 Gb of the genome sequence was determined by 454 next generation sequencer, indicating that estimated coverage equaled to 14-fold of the genome size of *P. vanderplanki* (100 Mb). The obtained sequence was assembled into contigs having an N50 length of 6.1 kb using the Newbler Assembler software. Total length of the contigs reached to 113 Mb, and the largest contig was 71 kb. To fill gaps among the contigs, we planned to exploit another next generation sequencer, such as Illumina Genome Analyzer. Transcriptome analysis is also ongoing. We have already established EST database for the desiccating larvae, and have developed the database for the rehydrating larvae.

Our gene expression studies showed that larvae ability of successfully recovers after anhydrobiosis is directly linked to overexpression of defensive genes, such as antioxidants, heat shock proteins and DNA repair enzymes upon desiccation. Having a relatively small genome size and typical for insects total genes number, the sleeping chironomid is characterized by significant expansion in homologous and obviously paralogous copies of defensive genes, such as major antioxidants of thioredoxin-based cycle, heat shock proteins and protein-repairation methyltransferases. Furthermore, we have observed clear differences in expression patterns of the paralogs in relation to anhydrobiosis. Such differentiation in expression suggests an existence of “dehydration-specific” set of protective genes in this unique species of insect.

### Current trends in identification of human disease gene variants

Aarno Palotie M.D., Ph.D., Professor

The Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK

The Finnish Institute for Molecular Medicine (FIMM) University of Helsinki, Finland

Recent technological advances have boosted the identification of genome regions associated with human diseases. More than 1500 Genome wide association studies (GWAs) have been published covering more than 200 human traits. The GA strategy uses tools that genotype a standard set of variants that are common in the population. This strategy has been especially successful in metabolic and immune mediated traits. The progress has been slower in neurodevelopmental traits, but recently also this field has progressed providing some fundamental new insight in neurological and severe mental diseases, such as schizophrenia and bipolar disease. While GWA is effective to identify genomic regions that are common in the population and have a low effect size, they explain only a modest amount of the heritability of each trait. Thus it has been hypothesized is that a large number of low frequency (population frequency <5%) and rare variants contribute to the disease susceptibility of common traits. The decrease of the sequencing cost has enabled to design

experiments that would identify low frequency and rare variants associated to human diseases. Just as the HapMap project provided a scaffold and fundament for GWA studies, the international 1000 genomes project ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)) aims to provide a similar scaffold for rare and low frequency variant studies. This project aims to sequence the whole genome and catalogue variants of 2500 individuals from different ethnicities.

A number of large scale sequencing studies that aim to identify low frequency and rare variants associated with common traits are in progress. One example is the Wellcome Trust funded UK10K project that aims to sequence 10 000 individuals from UK, 4000 whole genomes from two population cohorts (UKtwins and ALSPAC) and 6000 exomes from three disease groups (2000 extreme obesity, 2000 from 10 rare congenital traits and 3000 autism or schizophrenia cases). The aim is to provide a variant catalogue of the British population and to identify low frequency variants associated with extreme traits.

Population isolates provide a special opportunity to study the contribution of low frequency and rare variants in human traits. The enrichment of rare, Mendelian, mostly recessive diseases in population isolates is well documented and widely studied. The unique population of Finland is one of the prime examples of long lasting isolation and multiple population bottle necks resulting in the enrichment of some 36, mostly recessive, diseases that are extremely rare in other Caucasian populations. The new opportunities for large scale sequencing have stimulated investigators around the world to focus on identification of low frequency variants enriched in the Finnish population. This collaborative sequencing project SISu (Sequencing Initiative Suomi (Suomi is the name of the country in Finnish) combines the effort of the Broad Institute, University of Michigan, UCLA, University of Oxford, University of Lund, Wellcome Trust Sanger Institute, Finnish Institute of Molecular Medicine (FIMM) and The National Institute for Health and Welfare, Finland. By mid 2012 we estimate to have the sequence of about 8000 Finns. This provides a scaffold that should provide more targeted sequencing opportunities for trait association studies using samples in the Finnish National Biobank that houses DNA from 200 000 Finns, representing about 4% of the population.

### Epigenomic approaches to understanding DNA methylation establishment in mice

Sébastien A. Smallwood<sup>1</sup>, Shin-ichi Tomizawa<sup>1</sup>, Felix Krueger<sup>2</sup>, Nico Ruf<sup>1</sup>, Claire Dawson<sup>1</sup>, Natasha Carli<sup>1</sup>, Shun Sato<sup>3</sup>, Kenichiro Hata<sup>3</sup>, Simon R. Andrews<sup>2</sup>, [Gavin Kelsey](#)<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Epigenetics Programme and <sup>2</sup>Bioinformatics Group, The Babraham Institute, Cambridge, UK

<sup>3</sup>National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Centre for Trophoblast Research, University of Cambridge, Cambridge, UK

The mechanisms by which DNA methylation is established in mammalian cells are still poorly understood. Imprinted genes are an important model, as they are methylated in a gamete-specific manner and because in the female germline *de novo* methylation occurs in non-dividing cells arrested in meiosis. We are investigating why germline differentially methylated regions (gDMRs) of imprinted genes become methylated, whereas the great majority of CpG islands (CGIs) remain

unmethylated. We have shown, using the imprinted *Gnas* locus, that transcription through gDMRs is required for their methylation in oocytes<sup>1</sup>. We hypothesise that transcription remodels chromatin at gDMRs to histone modifications permissive to the DNMT3a:DNMT3L methylation complex<sup>2</sup>; for example, transcription may deposit the permissive modification H3K36me3. We are testing whether a similar requirement applies at all maternally methylated gDMRs and whether the same principles also govern methylation of other CGIs in germ cells. A particular challenge in studying methylation in oocytes is the limitation on the number of cells that can be obtained, particularly for genome-wide epigenetic analyses. We are optimizing techniques to profile CGI methylation, transcription and histone modifications in mouse fetal germ cells and oocytes. Consistent with our model, mRNA-Seq analysis of growing oocytes at the onset of *de novo* methylation reveals that gDMRs at all maternally imprinted loci coincide with inactive promoters within active transcription units. Using reduced representation bisulphite sequencing (RRBS), an effective method for providing single base-pair resolution of methylation at CGIs, we identified >1000 CGIs methylated in mature oocytes<sup>3</sup>. These CGIs depend on Dnmt3a and Dnmt3L for methylation, revealing a general role for Dnmt3L beyond imprinting. Methylated CGIs are not discriminating by sequence features, indicating that non-sequence based properties primarily determine their methylation. Instead, methylated CGIs are preferentially located in active transcription units and depleted in H3K4me3, supporting a general transcription-dependent mechanism of methylation<sup>2,3</sup>.

1. Chotalia et al. (2009) Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes & Dev.* 23:105-117.
2. Smallwood and Kelsey, *De novo* DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet.* (in press).
3. Smallwood et al. (2011) Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat. Genet.* 43:811- 814.

## Evolutionary genome dynamics revealed by microbial genome comparison

Ichizo Kobayashi  
University of Tokyo, Japan

Innovation in genome decoding now allows comparison of many closely-related genomes within a species, which reveals dynamics in genome evolution. *Helicobacter pylori* infect half the human population since childhood and causes gastritis, ulcers and stomach cancer. Their genomes rapidly evolve and show wide geographical divergence. We used newly developed comparative methods to follow the evolution of East Asian *H. pylori* genomes using complete genome sequences of Japanese, Korean, Amerind, European, and West African strains.

A phylogenetic tree of concatenated core genes supported divergence of the East Asian lineage from the European lineage ancestor, and then from the Amerind lineage ancestor. The East Asian strains appear to differ greatly from the European strains in host-interaction, cell surface, redox reactions, genome/proteome maintenance, and epigenetics.

Phylogenetic profiling revealed difference in the repertoire of outer membrane proteins. Their sequence comparison led to

discovery of birth and death of genes through DNA duplication associated with inversion (DDAI), in which duplication of a DNA part in a locus to a new locus in inverse orientation is accompanied by inversion between the two loci. This represents a novel mechanism of genome evolution.

Sequence comparison of DNA sequence recognition subunit of a restriction-modification system led to discovery of domain movement (DoMo), movement of an amino-acid sequence between different domains of a protein, which is mediated by recombination at DNA sequences flanking the domain sequences. This represents a novel mechanism of protein diversification. It may switch recognition sequence of DNA methyltransferases and diversify DNA methylation pattern of a genome. Such epigenome diversification, in turn, may lead to diversification in genome-wide gene expression and adaptive evolution.

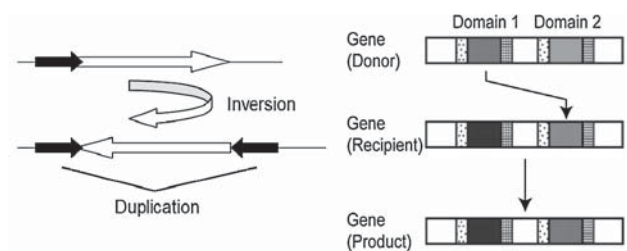


Figure 1. DNA Duplication Associated with Inversion (DDAI)

Figure 2A. Domain Movement within a protein gene (DoMo)

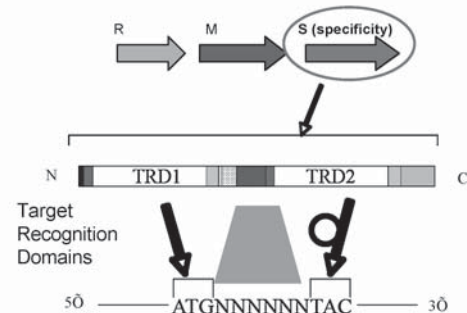


Figure 2B. Specificity subunit of a restriction-modification

1. Kawai, Furuta, Yahara, Tsuru, Oshima, Handa, Takahashi, Yoshida, Azuma, Hattori, Uchiyama, Kobayashi. *BMC Microbiology*, 11:104 (2011).
2. Furuta#, Kawai#, Yahara, Takahashi, Handa, Tsuru, Oshima, Yoshida, Azuma, Hattori, Uchiyama, Kobayashi. *PNAS*, 108: 1501-1506 (2011) (#: Equal contribution).
3. Furuta, Kawai, Uchiyama, Kobayashi. *PLoS ONE*, 6: e18819 (2011).

## MicroRNAs as Master Regulators of the Plant *NB-LRR* Defense Gene Family via the Production of Phased, *Trans-acting* siRNAs

Blake C. Meyers<sup>1</sup>, Jixian Zhai<sup>1</sup>, Dong-Hoon Jeong<sup>1</sup>, Emanuele De Paoli<sup>1</sup>, Sunhee Park<sup>1</sup>, Benjamin D. Rosen<sup>2</sup>, Yupeng Li<sup>3</sup>, Alvaro J. Gonzalez<sup>1</sup>, Zhe Yan<sup>4</sup>, Sherry L. Kitto<sup>1</sup>, Michael A. Grusak<sup>5</sup>, Scott A. Jackson<sup>3</sup>, Gary Stacey<sup>4</sup>, Douglas R. Cook<sup>2</sup>, Pamela J. Green<sup>1</sup>, Janine Sherrier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant & Soil Sciences, University of Delaware, USA

<sup>2</sup>Department of Plant Pathology, University of California, Davis, USA

<sup>3</sup>Institute for Plant Breeding, Genetics and Genomics, University of Georgia, USA

<sup>4</sup>Department of Plant Microbiology and Pathology, University of Missouri, USA

<sup>5</sup>USDA-ARS Children's Nutrition Research Center, Baylor College of Medicine, USA

Legumes and many non-leguminous plants enter symbiotic interactions with microbes, and it's poorly understood how host plants respond to promote beneficial, symbiotic microbial interactions while suppressing those deleterious or pathogenic. *Trans-acting* siRNAs (tasiRNAs) negatively regulate target transcripts and are characterized by siRNAs spaced in 21-nucleotide "phased" intervals, a pattern formed by DICER-LIKE 4 (DCL4) processing. A search for phased siRNAs found at least 114 Medicago loci, the majority of which were defense-related *NB-LRR*-encoding genes. We identified three highly abundant 22-nt miRNA families that target conserved domains in these *NB-LRRs* and trigger the production of *trans-acting* siRNAs. High levels of small RNAs were matched to over 60% of all ~540 encoded Medicago *NB-LRRs*; in potato, a model for mycorrhizal interactions, phased siRNAs were also produced from *NB-LRRs*. *DCL2* and *SGS3* transcripts were also cleaved by these 22-nt miRNAs, generating phasiRNAs, suggesting synchronization between silencing and pathogen defense pathways. In addition, a second example of "two-hit" phasiRNA processing was identified, utilizing miR156-miR172 sites. Our data reveal complex tasiRNA-based regulation of *NB-LRR* that potentially evolved to facilitate symbiotic interactions, and demonstrate miRNAs as master regulators of a large gene family, a new paradigm for miRNA function.

### A genome-wide transcriptional analysis by mRNA-Seq of Pi-stressed rice seedlings

Yuko Oono<sup>1</sup>, Yoshihiro Kawahara<sup>1</sup>, Hiroyuki Kanamori<sup>1</sup>, Hiroshi Mizuno<sup>1</sup>, Harumi Yamagata<sup>1</sup>, Mayu Yamamoto<sup>1</sup>, Satomi Hosokawa<sup>1</sup>, Hiroshi Ikawa<sup>2</sup>, Jianzhong Wu<sup>1</sup>, Takeshi Itoh<sup>1</sup> and Takashi Matsumoto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS)

<sup>2</sup>Institute of the Society for Techno-innovation of Agriculture, Forestry and Fisheries

Phosphorus (P) is a component of key cellular molecules such as nucleic acids, proteins, phospholipids, phytic acid, and ATP in plants. However, P is the most dilute and the least mobile in soil among the major nutrients necessary for plant growth; hence it is often a limiting factor for crop yield. Pi starvation during farming is alleviated by the massive application of fertilizers. However, continuous usage of phosphate fertilizers may have a negative impact on the environment as the rock phosphate in the world is now in short supply and maybe depleted within the next century. On the other hand, massive Pi fertilization is also known to inhibit plant growth and productivity.

Plants have developed several morphological and physiological strategies to adapt to phosphate (Pi) starvation (-P) or Pi over-abundant (++P). The molecular mechanisms by which plants respond to changes in the nutritional Pi concentration are complex but of great importance and could be useful in developing strategies for elucidating the gene networks involved in plant response to various kinds of abiotic stress. We therefore used the massive parallel sequencing technology by mRNA-Seq to elucidate the rice transcriptome under stress due to -P and ++P in order to provide a comprehensive overview of the primary molecular events resulting from phosphate stress.

Fifty-three million reads obtained from 16 libraries under various phosphate stress were uniquely mapped to the rice genome and tagged Rice Annotation Project (RAP: <http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>) transcripts in the roots and shoots. Transcripts identified specifically tagged to 40,574 (root) and 39,748 (shoot) RAP transcripts. We also detected uniquely 10,388 transcripts with no match to any RAP transcript. Totally, we identified ≈7,000 Pi-stress-responsive transcripts in the roots or shoots during -P or ++P.

We constructed transcriptome viewer in GBrowse format to facilitate visualization of all uniquely mapped mRNA-Seq reads in the rice genome under Pi stress, a deeper understanding of the structural and functional features of both annotated and unannotated Pi stress responsive transcripts can provide useful information in improving Pi acquisition and utilization in rice and other cereal crops.

Funding: This work was supported by a grant from the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan (Genomics for Agricultural Innovation, Rice gene expression profiling, RTR-001).

### Genomic studies on the relationship between the silkworm and its food plant, mulberry

Toru Shimada<sup>1</sup>, Takaaki Daimon<sup>1,2</sup>, Tsuguru Fujii<sup>1</sup>, Yan Meng<sup>1,3</sup>, Huabing Wang<sup>1</sup>, Hiroaki Abe<sup>4</sup>, Akio Onuma<sup>5</sup>, Takashi Kiuchi<sup>1</sup>, Susumu Katsuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan

<sup>3</sup>Anhui Agricultural University, Hefei, China

<sup>4</sup>Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Japan

<sup>5</sup>Institute of Sericulture, Ami-machi, Ibaraki, Japan

The mulberry contains 1-deoxynojirimycin and other sugar-mimic alkaloids in the latex. The alkaloids inhibit glucosidases in insects, and accordingly act as defense substances for herbivores. The silkworm, *Bombyx mori*, is one of the mulberry specialists. We have been studying why the silkworm is tolerant to the toxic alkaloids in the mulberry, and found that two  $\beta$ -fructofuranosidase (FFase) genes on chromosome 17 of the silkworm<sup>1</sup>. In general, the metazoan animals use  $\alpha$ -glucosidases as sucrases and do not have FFases. We compared the FFase genes among lepidopterans and other organisms, and concluded that they had been acquired through a horizontal gene transfer from eubacteria to ancient lepidopterans, and that the mulberry specialists such as *Bombyx* and *Glyphodes* (a mulberry-specific pyralid) have evolved to achieve high expression of FFases in their midguts.

To understand the mechanism of food selection, we utilize the "polyphagous" mutants of *B. mori*, which feed not only mulberry but also the beet and other plant leaves. We succeeded in the positional cloning of two mutants, *spli* and *Bt* mapped on the Z chromosome, and found that both are allelic mutations of *Bmacj6*, a gene encoding a transcription factor with the POU-homeo domain. Recently, we found that the *spli* and *Bt* mutations do not affect not only food preference but also pheromone preference. Although the normal male adult is attracted by the female sex pheromone "bombykol" ((10E,12Z)-hexadecadienol), the *spli* male is attracted by the aldehyde derivative, "bombykal" ((10E,12Z)-hexadecadienal)<sup>2</sup>. It indicates that *Bmacj6* controls both the food preference in the larval gustatory neurons and pheromone preference through transcriptional regulations. To further understand the function of *Bmacj6*, we are performing transcriptome analysis based on next-generation sequencing.

1. Daimon, T., Taguchi, T., Meng, Y., Katsuma, S., Mita, K., and Shimada, T. (2008)  $\beta$ -fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: Insight into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex. *J. Biol. Chem.* 283: 15271-15279.
2. Fujii, T., Fujii, T., Namiki, S., Abe, H., Sakurai, T., Ohnuma, A., Kanzaki, R., Katsuma, S., Ishikawa, Y., and Shimada, T. (2011) Sex-linked transcription factor involved in a shift of sex pheromone preference in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 18038-18043.



## Poster session

No.	Title Presenter
P1	DNA methylomes and transcriptomes in mouse germ cells Hisato Kobayashi (Tokyo Univ. of Agric.)
P2	Identification of a novel large intergenic non-coding RNA at the imprinted <i>Gpr1-Zdbf2</i> locus Hisato Kobayashi (Tokyo Univ. of Agric.)
P3	Memory enhancement by up-regulation of CREB Hotaka Fukushima (Tokyo Univ. of Agric.)
P4	Identification of susceptibility genes associated atopic dermatitis in NC/Nga Mao Ozaki (Tokyo Univ. of Agric.)
P5	Effect of age on bovine early antral follicles Miwa Endo (Tokyo Univ. of Agric.)
P6	Expression profiling without genome sequence information in a non-model species, pandalid shrimp ( <i>Pandalus latirostris</i> ), by next-generation sequencing Ryouka Kawahara-Miki (Tokyo Univ. of Agric.)
P7	Genome sequence of the Japanese quail <i>Coturnix japonica</i> Ryouka Kawahara-Miki (Tokyo Univ. of Agric.)
P8	Whole-genome resequencing of Japanese native cattle <i>Kuchinoshima-Ushi</i> Ryouka Kawahara-Miki (Tokyo Univ. of Agric.)
P9	Whole genome sequencing shows many gene variations in Japanese native cattle <i>Mishima-Ushi</i> Kaoru Tsuda (Tokyo Univ. of Agric.)
P10	Identification and utilization of genome-wide DNA polymorphisms in rice cultivar for Sake-brewing Mari Shibata-Hatta (Tokyo Univ. of Agric.)
P11	<i>De novo</i> genome sequencing of the Japanese radish "Daikon" Yuki Mitsui (Tokyo Univ. of Agric.)
P12	Genome sequence of a hydrogen producer <i>Clostridium</i> sp. Sa44 Akihiro Ohnishi (Tokyo Univ. of Agric.)
P13	Distribution of enzymes to protect from oxygen toxicity and utilize oxygen by facultatively anaerobic bacteria based on biochemical and genomic analysis Daichi Mochizuki (Tokyo Univ. of Agric.)
P14	Identification and molecular cloning of Sirtuin homolog of the lactic acid bacteria isolated from fermented milk and plant Junichi Nakagawa (Tokyo Univ. of Agric.)
P15	Genome analysis of fructophilic lactic acid bacteria Naoto Tanaka (Tokyo Univ. of Agric.)
P16	Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes Satoru Watanabe (Tokyo Univ. of Agric.)
P17	Genome-wide analysis of transcription start sites in <i>Bacillus subtilis</i> Takashi Matsumoto (Tokyo Univ. of Agric.)
P18	Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of the cyanobacterium, <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Yu Kanesaki (Tokyo Univ. of Agric.)
P19	Resequencing analysis of the laboratory strains in the cyanobacterium, <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 Yu Kanesaki (Tokyo Univ. of Agric.)
P20	Analysis pipeline for microbial mutation from the next generation sequencing data Yuh Shiwa (Tokyo Univ. of Agric.)

## P1 DNA methylomes and transcriptomes in mouse germ cells

Hisato Kobayashi<sup>1</sup>, Takayuki Sakurai<sup>1</sup>, Misaki Imai<sup>2</sup>, Nozomi Takahashi<sup>1</sup>, Atsushi Fukuda<sup>1</sup>, Yayoi Obata<sup>1</sup>, Shun Sato<sup>3</sup>, Kazuhiko Nakabayashi<sup>3</sup>, Kenichiro Hata<sup>3</sup>, Yusuke Sotomaru<sup>4</sup>, Yutaka Suzuki<sup>5</sup>, Tomohiro Kono<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of BioScience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan <sup>3</sup>Department of Maternal-Fetal Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan, <sup>4</sup>Natural Science Center for Basic Research and Development, Hiroshima University, Hiroshima, Japan, <sup>5</sup>Graduate School of Frontier, The University of Tokyo, Chiba, Japan

Genome-wide dynamic changes in DNA methylation are indispensable for germline and embryonic development in mammals. Here, we report single-base resolution DNA methylome and transcriptome maps of mouse germ cells, generated using whole-genome shotgun bisulfite sequencing and cDNA sequencing (mRNA-seq). Our results show a significant positive correlation between gene transcription and gene-body methylation in the wild-type oocytes. However, the intragenic methylation was not observed in *Dnmt3L*<sup>-/-</sup> oocytes, which showed genome-wide hypomethylation. Along with the identification of a large number of *Dnmt3L*-dependent germline differentially methylated regions, *Dnmt3L*-mediated intragenic methylation was found to be required for the establishment of oocyte-specific methylation marks.

## P2 Identification of a novel large intergenic non-coding RNA at the imprinted *Gpr1-Zdbf2* locus

Hisato Kobayashi<sup>1</sup>, Takayuki Sakurai<sup>1</sup>, Shun Sato<sup>2</sup>, Kazuhiko Nakabayashi<sup>2</sup>, Kenichiro Hata<sup>2</sup>, Tomohiro Kono<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of BioScience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Department of Maternal-Fetal Biology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

We previously identified an imprinted gene cluster containing two paternally expressed genes, *Gpr1* and *Zdbf2*, and the opposite imprinted-methylated regions. Here, we identified a novel imprinted large intergenic non-coding *Zdbf2* variant (*Zdbf2linc*) which transcribed from the maternally methylated *Gpr1* DMR during blastula- and gastrula-stages. Furthermore, the *Gpr1* DMR displayed complete-biallelic methylation and the *Zdbf2linc* expression was rarely observed in post-gastrula-stage, despite of positive correlation between methylation of paternally methylated *Zdbf2* DMRs and mono-allelic original *Zdbf2* variant transcription. Our finding illuminates the rule of the large non-coding RNA for the establishment of secondary DMRs by intergenic *de novo* methylation after implantation

## P3 Molecular mechanisms of memory enhancement by up-regulation of CREB

Hotaka Fukushima, Shunsuke Hasegawa, Ryouka Kawahara-Miki, Satoshi Kida

Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, CREST, JST

Memory Consolidation is a gene expression-dependent process to generate a long-term memory (LTM). Previous studies have shown that

loss-of-CREB-function by inhibiting CREB-mediated transcription impairs LTM without affecting short-term memory (STM), indicating that CREB-dependent gene expression is required for memory consolidation. Thus previous studies have suggested that CREB is a positive regulator for memory consolidation. To understand effects of gain-of-function of CREB on memory performance, we generated and analyzed four lines of transgenic mice expressing a dominant active CREB mutant (CREB-Y134F or CREB-DIEDML) in forebrain. Expectedly, Y134F-A transgenic mice displaying the lowest expression of transgene among all transgenic lines exhibited enhanced long-term memory but normal STM. These observations indicated that up-regulation of CREB-mediated transcription resulted in enhanced formation of long-term memory without affecting STM. Expectedly, our observations strongly suggested that CREB positively regulates memory consolidation.

Interestingly, Y134F-C mice displayed enhanced 2 hrs STM but normal 30 min-STM. Similarly, two lines of DIEDML mice displayed enhancement of even 30 min-STM but displayed normal 5 min-STM. These observations indicate that up-regulation of CREB activity led to enhancement of STM without affecting memory encoding or learning.

To understand molecular mechanisms by which up-regulation of CREB leads to the enhancement of STM and LTM, we are trying to analyze transcriptional profiles of hippocampus of these transgenic lines displaying enhancement of LTM and STM

## P4 Identification of susceptibility genes associated atopic dermatitis in NC/Nga

Mao Ozaki<sup>1,2</sup>, Kunie Matsuoka<sup>2</sup>, Toyoyuki Takada<sup>3</sup>, Tamio Ohno<sup>4</sup>, Kaoru Tsuda<sup>5</sup>, Tomohiro Kono<sup>5</sup>, Hiromichi Yonekawa<sup>6</sup>, Yoshiaki Kikkawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioproduction, Tokyo University of Agriculture, <sup>2</sup>Mammalian Genetic Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, <sup>3</sup>Mammalian Genetic Laboratory, National Institute of Genetics, <sup>4</sup>Division of Experimental Animals, Graduate School of Medicine, Nagoya University, <sup>5</sup>NODAI Genome Research center, Tokyo University of Agriculture, <sup>6</sup>Basic Technology Research Center, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

NC/Nga (NC) is a model of atopic dermatitis (AD) originated from Japanese fancy mice. NC mice develop human AD-like skin lesions spontaneously in an air-unregulated conventional circumstance and shows elevated levels of serum IgE. We previously reported that the locus for the major determinant (*derm1*) was mapped to a 5.5 Mb region on mouse chromosome (Chr) 9. However, application of a hapten, such as 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), also evokes an AD-like lesion in NC. In this study, we examined responsible gene regulating DNFB-induced AD in NC. To perform linkage analysis, we selected C57BL/6J (B6) strain that did not develop AD by carnage of DNFB and generated 96 N<sub>2</sub> by backcrossing between [NC x B6] F<sub>1</sub> and NC. By inducement using by DNFB, 67 N<sub>2</sub> mice showed severe or mild dermatitis. Whole genome scanning using 111 microsatellite markers revealed two loci on Chr 3 (24 Mb interval) of and Chr 9 (30 Mb interval) associated for onset of AD in NC. Moreover, we performed QTL analysis based on epidermal thickness because affected mice showed a thickened epidermis. By this analysis, a trait was mapped on a 30 Mb region on Chr 9. Although this position was corresponding with AD-linked map position, it significantly differed with spontaneous AD-linked *derm1* region. Therefore, these result suggested that onsets in spontaneous AD and DNFB-induced AD were associated with different genes in NC genetic background. As another approach, we resequenced NC genome on the next generation sequencer. 1,787,559,018 reads were mapped B6 reference sequence giving and average ~14x coverage, total ~49.36 Gbp of NC genome. By this analysis, we detected 4,916 and 7,577 SNPs between NC and B6 mice in coding regions on

chromosomes 3 and 9, respectively.

## P5 Effect of age on bovine early antral follicles

Miwa Endo<sup>1</sup>, Ryouka Kawahara-Miki<sup>2</sup>, Feng Cao<sup>3</sup>, Yasunori Monji<sup>1</sup>, Takehito Kuwayama<sup>1</sup>, Tomohiro Kono<sup>3</sup>, Hisataka Iwata<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of animal science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>Department of Bio-Science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

Present study demonstrates that bovine follicle numbers are affected by aging. When the early antral follicle of old cows were cultured, rate of antral formation and the quality of the blastocysts derived from these in vitro grown oocytes was lower than those derived from young cows. Furthermore, there were differentially expressed genes in the granulosa cells between the two age groups. In addition, oocytes enclosed in the early antral follicle of old cows had different characteristics compared with those of young cows. Collectively, quality of oocytes and granulosa cells has already affected by aging at the early antral follicle stage.

## P6 Expression profiling without genome sequence information in a non-model species, pandalid shrimp (*Pandalus latirostris*), by next-generation sequencing

Ryouka Kawahara-Miki<sup>1</sup>, Kenta Wada<sup>2</sup>, Noriko Azuma<sup>2</sup>, Susumu Chiba<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

This study explored the utility of next-generation sequencing technologies for studying phenotypic variations between 2 populations of a non-model species, the Hokkai shrimp (*Pandalus latirostris*; Decapoda, Pandalidae). First, we examined the genetic and phenotypic differentiation between the populations. Then, by transcriptome analysis, a total of 13.66 Gb was obtained and used for de novo assembly. Two approaches were used to analyze these assembled contigs; both approaches identified 29 sequences that were considered to be differentially expressed genes. The present study provides a strategy for identifying sequences showing significantly different expression levels between populations of a non-model species, using only short-read sequence data.

## P7 Genome sequence of the Japanese quail *Coturnix japonica*

Ryouka Kawahara-Miki<sup>1</sup>, Satoshi Sano<sup>1</sup>, Takehito Kuwayama<sup>2</sup>, Yoichi Matsuda<sup>3</sup>, Takashi Yoshimura<sup>3</sup>, Tomohiro Kono<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Department of Animal Science, Tokyo University of Agriculture, Kanagawa, Japan, <sup>3</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan, <sup>4</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

The Japanese quail (*Coturnix japonica*) has long been an excellent model organism used in a range of scientific disciplines, including studies of development, behavior, physiology, and genetics. It is also valued for its eggs and meat. We aspired to decode the whole-genome sequence of the Japanese quail using

only next-generation sequencing (NGS), and obtained 86 Gb of sequence data. In addition to *de novo* assembly analysis, we also performed mapping analysis using chicken genome sequence as a reference; the obtained quail sequences covered almost 80% of the chicken genome. This study demonstrates the feasibility of using aligning and assembling strategies to derive the whole-genome sequence of the Japanese quail.

## P8 Whole-genome resequencing of the Japanese native cattle *Kuchinoshima-Ushi*

Ryouka Kawahara-Miki<sup>1</sup>, Kaoru Tsuda<sup>1</sup>, Yuh Shiwa<sup>1</sup>, Sen-ichi Oda<sup>2</sup>, Shizufumi Ebihara<sup>2</sup>, Tomohiro Kono<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Aichi, Japan, <sup>3</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

Because the Japanese native cattle *Kuchinoshima-Ushi* is isolated on a small island, it is assumed that numerous genomic variations are conserved in this breed. In this study, genetic features of *Kuchinoshima-Ushi* were evaluated by whole-genome sequencing. A total of 64.2 Gb of sequence was generated, and the number of mapped reads corresponded to 15.8-fold coverage. From these data, we identified 6.3 million single nucleotide polymorphisms (SNPs), of which more than 5.5 million (87%) were found to be new. Out of the SNPs annotated in the bovine sequence assembly, 20,432 were found in protein-coding regions containing 11,713 nonsynonymous SNPs in 4,643 genes. Furthermore, phylogenetic analysis showed that *Kuchinoshima-Ushi* is distinct from European domestic breeds.

## P9 Whole-genome sequencing reveals many genetic variations in the Japanese native cattle *Mishima-Ushi*

Kaoru Tsuda<sup>1</sup>, Ryouka Kawahara-Miki<sup>1</sup>, Tatsuo Noguchi<sup>2</sup>, Tomohiro Kono<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Fuji Experimental Farm, Tokyo University of Agriculture, Shizuoka, Japan, <sup>3</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

The Japanese native cattle *Mishima-Ushi* may possess numerous peculiar and valuable genetic variations in their genome. In this study, we evaluated the genetic features of 8 *Mishima-Ushi* cattle by whole-genome sequencing. We identified approximately 7 million SNPs; of these, 678 non-synonymous SNPs occurring in 462 genes were shown to be polymorphisms specific to 8 *Mishima-Ushi* cattle. We found that 4 genes were related to the *Mishima-Ushi*-specific phenotype. These results provide a framework for further genetic studies in the *Mishima-Ushi* population, and facilitate research into molecular mechanisms underlying the phenotypic variation in economically important traits of domestic cattle breeds.

## P10 Identification and Utilization of Genome-wide DNA Polymorphisms in Rice Cultivar for Sake-brewing

Yuko Arai-Kichise<sup>1</sup>, Mari Shibata-Hatta<sup>1</sup>, Yuh Shiwa<sup>1</sup>, Kaworu Ebana<sup>2</sup>, Shinya Yoshida<sup>3</sup>, Masanori Yamasaki<sup>4</sup>, Hirofumi Yoshikawa<sup>1,5</sup>, Masahiro Yano<sup>2</sup>, Kyo Wakasa<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Natl. Inst. Agrobiol. Sci., <sup>3</sup>Hyogo Pref. Agric. Res. Cent., <sup>4</sup>Grad. Sch. Agric., Kobe Univ., <sup>5</sup>Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.

DNA markers are of growing importance in molecular breeding approaches. However, DNA markers are often unsatisfied between closely related cultivars, because of their genetic relatedness. To obtain informative DNA markers for distinction between japonica rice cultivars, we performed whole-genome analysis of an ancestral cultivar of japonica rice, Omachi, using next-generation sequencing. As a result, we discovered numerous SNPs, insertions, and deletions that differed between the two japonica rice cultivars. A high-throughput array for genotyping by the identified SNP sites was then developed. Genotyping of japonica cultivars by this array provided information on their pedigree.

## P11 De novo genome sequencing of the Japanese radish “Daikon”

Yuki Mitsui<sup>1</sup>, Yuichi Katayose<sup>2</sup>, Michihiko Shimomura<sup>3</sup>, Takuji Sasaki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Tokyo University of Agriculture, <sup>2</sup>National Institute of Agrobiological Sciences, <sup>3</sup>Mitsubishi Space Software Co., Ltd.

Radish is a useful vegetable crop with a long cultivation history, and is grown around the world. Radish is a very important ingredient, especially in Japan, China, and Korea. In Japan, more than 700 varieties of radish, called as “Daikon” (large root), are cultivated and diverse local races have differentiated in each region. Compared with the other root crops, radish has distinct variation in root characteristics, e.g., shape, size, color and the materials contained within root such as starch, sugar and pungent component.

Cultivated radish is included in the genus *Raphanus* (*R. sativus*: 2n=18) in Brassicaceae family. The closest relative of *Raphanus* is the genus *Brassica*, another important group of crops. The genomic researches of *Brassica* species are rapidly progressing, however, there is limited information of radish genome despite its importance for diverse gene resources.

We aim to firstly determine the whole genome sequence of the Japanese radish (the genome size is approximately 500 Mbp) using the Roche 454 GS-FLX Titanium and the Illumina HiSeq 2000 sequencers. To construct the contigs and scaffolds as long as possible, single read, short-insert and long-insert (more than 20 kb) paired end reads are used for the assembly. The project has just launched and we would like to present the background of the project and the progress. By establishing the genome database of radish, it is possible to investigate the genetic basis of diverse root traits. Furthermore, the origin of domestication and history of diversification of the cultivated radish are expected to be revealed by molecular phylogenetic analysis based on the genomic data.

## P12 Genome sequence of a hydrogen producer *Clostridium* sp. Sa44

Akihiro Ohnishi<sup>1</sup>, Yukiko Bando<sup>1</sup>, Yuh Shiwa<sup>2</sup>, Naoshi Fujimoto<sup>1</sup>, Masaharu Suzuki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

In this study, we obtained 8 stable hydrogen fermentation microflora using Beer Lees. Composition of microflora and hydrogen productivity of main bacterium were analyzed by culture -independent and -dependent methodologies. *Clostridium* sp. Sa44 was the most useful bacterium in hydrogen fermentation from Beer Less. In addition, genome sequencing of *Clostridium* sp. Sa44 was carried out with the GAI (Illumina) in NODAI Genome Research Center (NGRC). A total of 10,560,940 reads of an average length of 80 bp were assembled by using Velvet algorithms. This resulted in 223 contigs, with the largest contig encompassing 333,773 nucleotides.

## P13 Distribution of enzymes to protect from oxygen toxicity and utilize oxygen by facultatively anaerobic bacteria based on biochemical and genomic analysis.

Daichi Mochizuki<sup>1</sup>, Naoto Tanaka<sup>2</sup>, Morio Ishikawa<sup>3</sup>, Akihito Endo<sup>4</sup>, Junichi Sato<sup>1</sup>, Sinji Kawasaki<sup>1</sup>, Youichi Niimura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of agriculture, Tokyo Japan, <sup>2</sup> NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>3</sup>Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>4</sup>Functional Foods Forum, University of Turku, Turku, Finland

As oxygen has a big impact positively or negatively for bacterial growth, enzymes to protect from oxygen toxicity and to utilize oxygen must be related to the growth properties of bacteria. We first revealed the distribution of peroxide-scavenging and oxygen metabolic enzymes in facultative anaerobes, in the general bacterial based on biochemical data. In order to confirm the distribution, we had a genomic analysis using genome information publicly available in database. Based on the data analyzed, we finally try to compare the distributions of the enzymes with bacterial phylogenetic taxonomy.

## P14 Identification and molecular cloning of Sirtuin homolog of the lactic acid bacteria isolated from fermented milk and plant.

Junichi Nakagawa<sup>1</sup>, Hotaka Atarashi<sup>1</sup>, Shuki Fujimura<sup>1</sup>, Naoto Tanaka<sup>2</sup>, Sanae Okada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Cosmetic Science, Tokyo University of Agriculture, Hokkaido, Japan, <sup>2</sup>Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

Cholate is the major component of bile acid causing stress to intestinal bacteria. *Lactobacillus casei* strain NRIC 0644<sup>T</sup>, originally isolated from cheese, showed sensitive phenotype to cholate, while strains NRIC 1917 and NRIC 1981, isolated from compost and sugar cane wine, respectively, were more resistant to it. Pre-treatment of these strains with resveratrol, a polyphenol known to stimulate Sirtuin, helped their survival. Furthermore,

whole genome analysis revealed existence of the ORFs encoding Sirtuin homolog in these strains. Following cDNA cloning, recombinant Sirtuin homolog proteins have been generated to examine the role of the putative ancestor of the master epigenetic regulator.

### P15 Genome analysis of fructophilic lactic acid bacteria

Naoto Tanaka<sup>1</sup>, Yo Oikawa<sup>2</sup>, Sanae Okada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>NODAI Culture Collection Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan,

<sup>2</sup>Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

Lactic Acid Bacteria (LAB) are facultative anaerobes and most of them grow by the fermentation of glucose under aerobic and anaerobic conditions. Fructophilic LAB inhabiting flowers and fruits, however, cannot grow anaerobically on media containing glucose as a sole carbon source, but grow anaerobically on fructose-containing media. Also, unlike general LAB, they surly produce lactate and acetate from glucose. To study their unique characteristics, we analyzed *Fructobacillus* genomes, representative fructophilic LAB and compared them with their close LAB genomes. As a result, it was revealed gene deletion in the evolutionary process might result in the unique energy metabolism of *Fructobacillus*.

### P16 Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes

Satoru Watanabe<sup>1</sup>, Ryudo Ohbayashi<sup>1</sup>, Yuh Shiwa<sup>2</sup>, Asuka Noda<sup>1</sup>, Yu Kanesaki<sup>2</sup>, Takayuki Sakurai<sup>1</sup>, Taku Chibazakura<sup>1</sup>, Hirofumi Yoshikawa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

While bacteria such as *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* harbor a single circular chromosome, some freshwater cyanobacteria have multiple chromosomes per cell. The detailed mechanism(s) of cyanobacterial replication remains unclear. We show here the replication origin (*ori*), form, and synchrony of the multi-copy genome in freshwater cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Mapping analysis of nascent DNA fragments using a next-generation sequencer indicated that replication starts bidirectionally from a single *ori*, which locates in the upstream region of the *dnaN* gene. In addition, the replication is initiated asynchronously not only among cell populations but also among the multi-copy chromosomes. Our findings suggest that replication initiation is regulated less stringently in *S. 7942* than in *E. coli* and *B. subtilis*.

### P17 Genome-wide analysis of transcription start sites in *Bacillus subtilis*

Takashi Matsumoto<sup>1</sup>, Hirofumi Yoshikawa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan, <sup>2</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

*Bacillus subtilis* strain 168 is one of the best-studied prokaryotes. Its genome of 4.2 Mb is comprised of 4422 genes.

To understand the regulatory mechanism underlying the expression of each gene, the transcription start sites (TSSs) have been identified one by one. According to the database, 930 TSSs for 578 transcription units have been determined so far. We aspired to perform global analyses of TSSs using massively parallel sequencing. Because intact prokaryotic RNAs possess a 5'-tri-phosphate and processed or degraded RNAs display a 5'-mono-phosphate, we were able to identify more than 1000 novel TSSs by selective sequencing of the 5'-tri-phosphate ends.

### P18 Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803

Yu Kanesaki<sup>1</sup>, Yuh Shiwa<sup>1</sup>, Naoyuki Tajima<sup>2</sup>, Marie Suzuki<sup>3</sup>, Satoru Watanabe<sup>3</sup>, Naoki Sato<sup>2</sup>, Masahiko Ikeuchi<sup>2</sup>, and Hirofumi Yoshikawa<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, <sup>2</sup>Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, <sup>3</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture

The cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803, was the first photosynthetic organism for which the whole-genome sequence was determined, in 1996. It thus plays an important role in basic research on the mechanism, evolution, and molecular genetics of the photosynthetic machinery. However, it is known that there are a lot of substrains with distinct phenotypes that are supplied and used as wild-type strains in different laboratories. We deciphered the genome of 3 substrains of *Synechocystis* sp. PCC 6803, i.e. PCC-P, PCC-N, and GT-I, to reconstruct the bioinformatics basis for molecular biological research on *Synechocystis* sp. PCC 6803. By massively parallel sequencing, we identified a number of substrain-specific SNPs and indels, which differ from the reference sequence. Especially, determination of the genome sequence of PCC substrains will contribute widely to cyanobacterial research making use of the frozen stock cells supplied by the Pasteur Culture Collection Center.

### P19 Resequencing analysis of the laboratory strains in the cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Yu Kanesaki<sup>1</sup>, Yuh Shiwa<sup>1</sup>, Marie Suzuki<sup>2</sup>, Satoru Watanabe<sup>2</sup>, and Hirofumi Yoshikawa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agriculture, <sup>2</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture

It is empirically known that cyanobacteria easily give rise to spontaneous mutations on their genome sequences. These differences of genotype and phenotype between laboratory strains and the sequenced reference strain sometimes cause great difficulty on post-genomic analyses. Here, we carried out resequencing analysis of the laboratory strain of a cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Using mapping analysis, we identified 7 SNPs and a large continuous deletion of a 48.7 kb region in the laboratory strain. These results highlight the importance of resequencing analysis in the bacterial genome research.

## **P20 Analysis pipeline for microbial mutation from next-generation sequencing data**

Yuh Shiwa<sup>1</sup>, Yu Kanesaki<sup>1</sup>, Takashi Matsumoto<sup>1</sup>, Shunsuke Yajima<sup>1,2</sup>, Hirofumi Yoshikawa<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>NODAI Genome Research Center, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan,

<sup>2</sup>Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan

Multiplexing sequencing can enable sequencing of many dozens of samples at a time, accelerating the analysis of bacterial mutation. However, it is necessary to use a variety of software tools for alignment, *de novo* assembly, detection of structural variants, functional annotation, and genome browsing. To expedite bacterial data analysis, we have developed a suite of automated tools—NODAI Sequence Annotation Pipeline (NSAP). We also have developed the Variation Annotator software, which can annotate variations detected by NSAP. NSAP has been successfully integrated with several tools for alignment, *de novo* assembly, and detection of structural variants. This pipeline markedly shortens analysis time.

