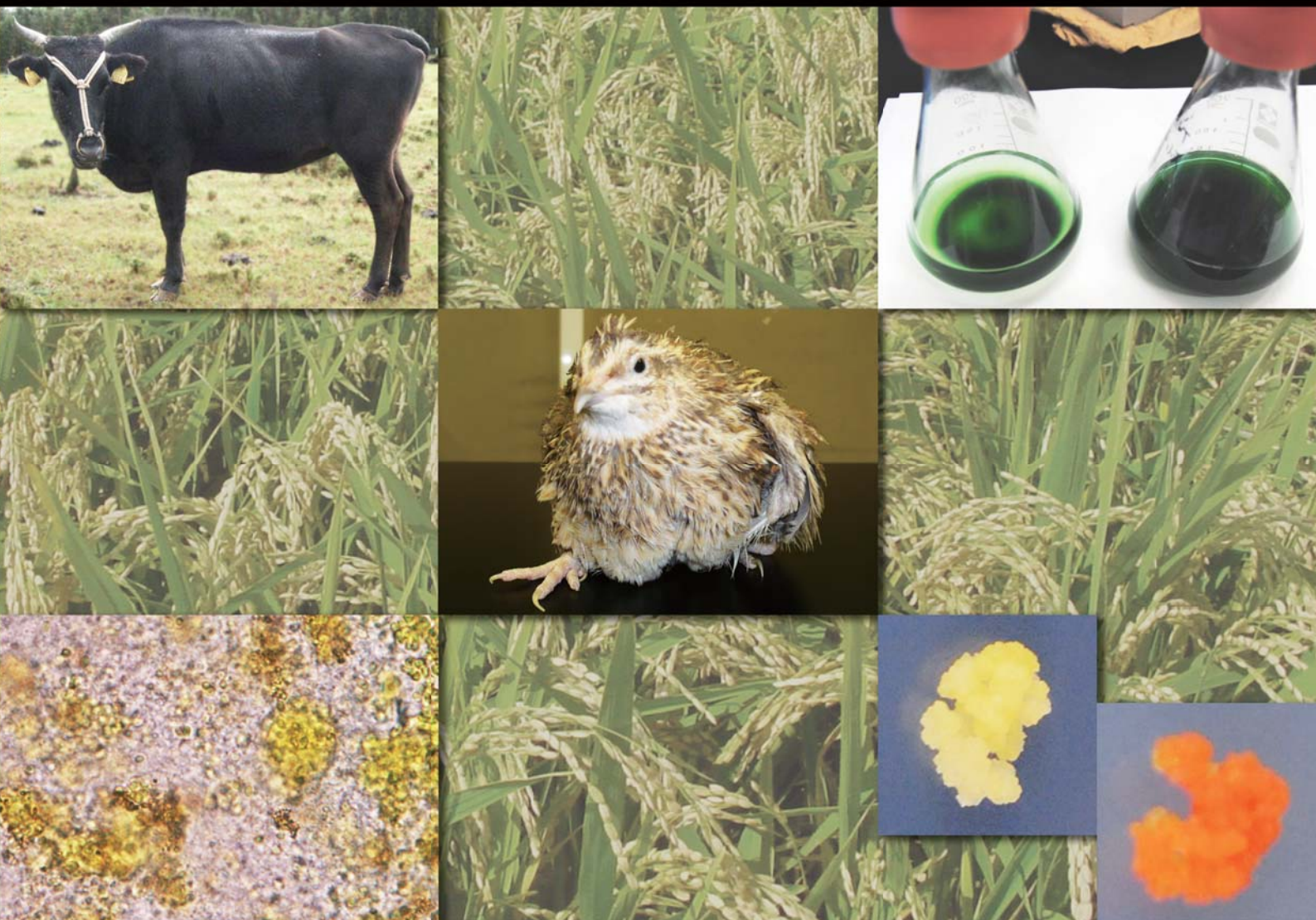


「戦略的研究基盤形成支援事業」の成果を次なる発展へ



表紙の説明

日本稲「日本晴」(全体)、天然記念物見島牛(左上)、培養中のシアノバクテリア(右上)、ニホンウズラ(メス)(中央)、新規に単離した藻類(左下)、イネ野生型カルス(右下 左)、イネオレンジ色変異カルス(右下 右)

CONTENTS

| | |
|---|-------|
| 「戦略的研究基盤形成支援事業」の成果を次なる発展へ | 4 |
| 生物資源ゲノム解析センターの運用実績 | 5 |
| 次世代シーケンサーを用いた多様なイネの解析 | 6-7 |
| 日本在来牛「見島牛」の全ゲノム解析 | 8 |
| ニホンウズラのゲノム解読 | 9 |
| 加齢が卵子に及ぼす影響の解明を目指す トランスクリプトーム解析 | 10 |
| 次世代シーケンサーを用いた生殖細胞系列の 包括的 DNA メチローム解析 | 11 |
| 新しい育種法「不均衡変異導入法」の特徴を探る | 12 |
| 生物の種とは何か？「シアノバチルス」のゲノム解析 | 13 |
| バイオマス生産につながる有用藻類のゲノム情報解読 | 14 |
| ゼンマイ寄生菌類 <i>Mixia osmundae</i> のヌクレオソーム解析 | 15 |
| 貯穀害虫における化学交信システムと種分化に関する解析 | 16 |
| 平成 24 年度 新規学内公募一覧 | 17 |
| 学内公募事業とその成果 | 18-28 |
| 研究発表実績 | 29-32 |

「戦略的研究基盤形成支援事業」の成果を 次なる発展へ

平成 20 年度の施設整備以来、5 年間にわたって実施された本事業ですが、この度、多くの成果を産出して終了できる運びとなりました。当初、新型機器にありがちな不具合が続き、運営が危惧された時期もありましたが、メーカー側の対応も適切で、結果的には順調に解析を進めることが出来ました。いわゆる次世代シーケンサーの能力と運転手法、排出データの規模と解析技術等々、申請時に把握していた知識と現実との間には、最先端機器だけにさまざまなギャップが生じたことは確かです。そうした状況下で、1～3 年目の備品整備は情報解析機器を含めて、事前予測が極めて適切であったと身に染みて感じます。タイミング良く上級機種を購入できたこと、また増大する情報量に対応してサーバーの補填が出来た点等は幸運でした。さらに、同様の機種を導入した他機関と比べて、ランニングコストを計上できたことは大きな優位性となり、高額な試験的実験を怯むことなく遂行できたことで新たなノウハウを獲得できる絶好の機会になりました。こうしたプロセスを経てゲノムセンターの研究員達は、次世代の使い手としてエキスパートとなり、それぞれの分野で評価されるようになると同時に、新しい研究手法・テーマを創出する能力を身につけていきました。

研究課題の設定にあたっては、どのような解析結果が得られるのか不明の初期段階では、まずセンターの基幹プロジェクトとして柱課題を実施する運用方法をとりました。この方針で実施した我が国在来種のウシおよびイネプロジェクトは、結果的に在来種固有の特徴検出に道を開き、特に生物資源研究所との共同で開発したイネタイピングアレイは、我が国で使用されている近縁種米の詳細なタイピングを可能にし、今後の育種に強力なツールを提供することが出来ました。

センターの専任スタッフが装置の扱いと解析手法に慣れてきた時点で、広く学内公募を行い、学外との共同研究も開始しました。学内公募にあたっては、センターで体得したゲノム解析の威力

と新技術の効用について説明会を開き、多くの研究者がその恩恵を蒙れることを紹介することに努めました。その結果、学内の 4 学部、10 学科にわたる延べ 33 件の応募があり、その成果は 2012 年 11 月現在で 23 報の論文発表として表れており、この数は引き続き増え続けています。これらの多くは当該分野における評価の高い国際誌に掲載されています。

対外的にも、本プロジェクトによる取組は高く評価され、度々学会において招待講演者としてゲノム解析の現状を紹介する等、活躍の場が広がっています。数字的にも遺伝学研究所のデータベース登録件数で東大病院と並び、我が国の 2 大機関と位置づけられるまでになりました (図 1)。

“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”は、大きな実績と今後の可能性を秘めて終了致しますが、何らかの形で引き続きゲノム解析における拠点として貢献できるように、努めていく次第であります。

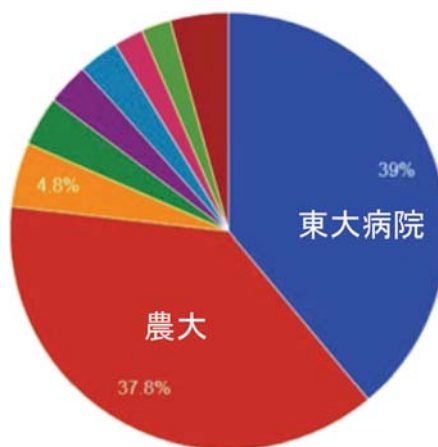


図 1 DDBJ への機関別登録件数
(2012 年 5 月現在)

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運用実績

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

生物資源ゲノム解析センターには、Illumina 社のゲノム解析装置が 2 台設置され、装置のオペレーターならびに情報解析や個別テーマの研究に関わる研究員が常勤スタッフとして活動してきました。

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い、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きました。

本プロジェクトでは 2009 年に Illumina 社の次世代シーケンサー Genome Analyzer IIx を運用し、2010 年秋からさらに大量のデータ量を得ることができる HiSeq 2000 を運用してきました。これら 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、情報解析システムの増強を数回にわたって行いました。最終的に 6 台の

計算機サーバ、総メモリ容量 2TB、総ディスク容量 170TB のスペックまで拡張を行い、増え続けるサンプル数に対応してきました。

塩基配列を解読するサンプル数は年々増え、2012 年 11 月現在で約 150 属、1,600 を超えるサンプル数をシーケンスしてきました (図 1)。その内訳として、ウシ、マウス、ウズラ、昆虫などの動物が 255 サンプル、イネやシロイヌナズナなどの植物が 144 サンプル、残りは微生物のサンプルです。特に微生物のシーケンス数は国内有数の実績です。

これらの得られたデータは、リシーケンス解析 (変異点解析や近縁種のゲノム配列の決定など) を中心に、*de novo* 解析 (ゲノム未知種の配列決定) や RNA-seq (特定条件下における遺伝子発現量の解析) など様々な解析に使われています (図 2)。

また、解析されたデータは国立遺伝学研究所のデータベース (DDBJ DRA) に登録を行いますが、2012 年 11 月時点で未公開のデータを含め 16 の研究内容、83 サンプルを登録しており、今年度 5 月時点では機関別の登録総塩基長が国内で 2 番目に多いという実績を残すことができました (巻頭言参照)。

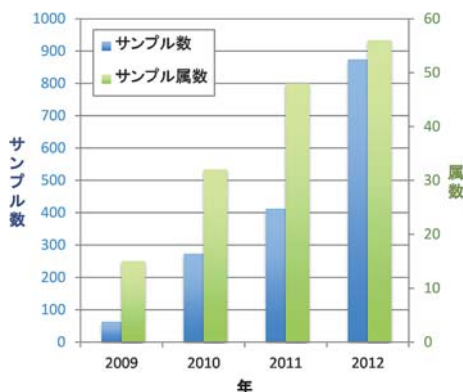


図 1 解読したサンプル数

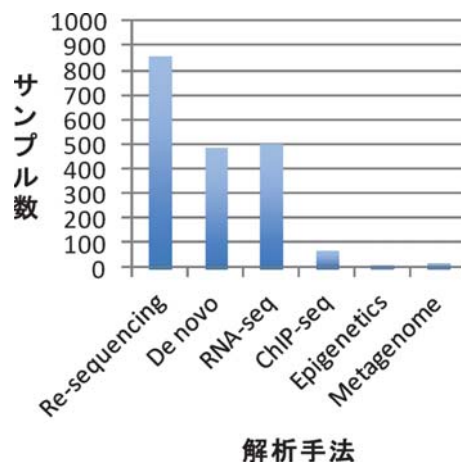


図 2 サンプルの解析種別

今井美咲 (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)

次世代シーケンサーを用いた多様なイネの解析

次世代シーケンサーを用いた

多数のイネ品種の解析

これまでに、次世代シーケンサーを利用して酒米品種「雄町」のゲノム配列を解読し、タイピングアレイを作製しました。そのアレイを用いて、酒米品種の系統樹を作成することができました（図1）。このことから、得られたSNP（一塩基多型）マーカーは酒米品種の分類に有効なマーカーであることが示されました。

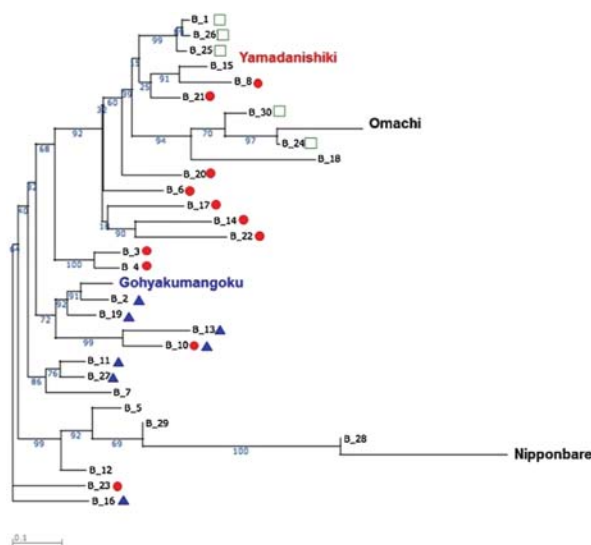


図1 SNP アレイを利用した酒米品種の系統樹

「雄町」に続いて、同じ酒米品種である「山田錦」などの多数の日本型品種を解析しました。「雄町」などの酒米品種は全ゲノム配列が公開されている「日本晴」と同じ日本型イネ（ジャポニカ）に含まれます。日本型イネ品種の中でも日本で栽培されているものは温帯ジャポニカと言われるグループに属していますが、アジア地域には熱帯ジャポニカに属する品種が栽培されています。日本の品種とは遺伝的關係が離れている熱帯ジャポニカの品種についても、「日本晴」の配列を基にして、70%程度のリードが染色体のユニークサイトにマッピングされました。さらに、これより遺伝的關係の離れているフィリピン、中国など様々な国で栽培されているイネ品種についても解析を進めました。これらのイネは、日本型イネとは異なるインド型（インディカ）品種、アウス、香り米などのグループに属します。図

2にその関係を示しました。これらの日本型イネとは離れたイネ品種についても、得られた解析データを基に解析したところ、「日本晴」ゲノムの80%の配列をカバーすることができました。その結果、これらの品種についても多数のSNPや挿入欠失（InDel）を見出すことができました。このように、日本型品種だけでなく異なる生態型に属するイネについても多くの情報を得ることができました。得られた情報を詳細に解析して、酒米や異なるグループのイネがどのようなゲノム領域に共通性と独自性を持っているかなどについて考察を進めています。また、依然として解読できないゲノム領域も存在するため、次世代シーケンサーで得られたリードのうち、未利用のままになっているリードを有効利用するための工夫を行っています。これらの研究は（独）農業生物資源研究所、兵庫県立農林水産技術総合センター、神戸大学の協力を得て行われました。

今後、これらの情報が新しい品種の育成に大きく貢献することが期待されます。一部の解析結果はhttp://www.nodai-genome.org/oryza_sativa_en.htmlにおいて閲覧可能です。情報は今後さらに拡充する予定です。

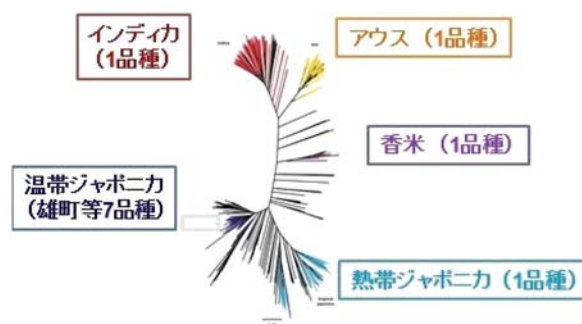


図2 解析したイネ品種の遺伝的關係
Zhao et al., 2010 より改変

次世代シーケンサーを用いて

遺伝子変異を探る

次世代シーケンサーはゲノムの塩基配列の違いを明らかにして大量のSNPやInDelなどのDNAマーカーを得ることに大きな力を発揮しています。しか

し、次世代シーケンサーの利用はそれだけでなく、変異体の原因遺伝子を探ることにも力を発揮します。我々は変異遺伝子の解析の一つとして、図3に示すイネ変異カルの解析を行っています。

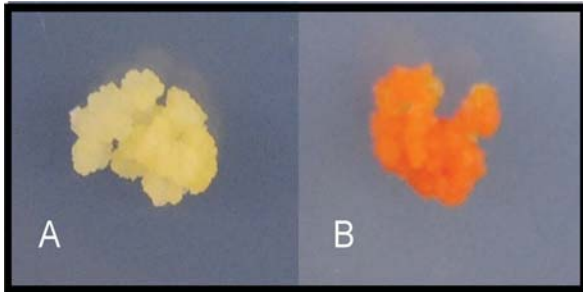


図3 イネ変異カルの形状
A: 野生型カルス
B: オレンジ色変異カルス

このイネカルのオレンジ色変異は、長期間培養を続ける中で出現したものです。このオレンジ色の原因物質を探るとともに、この変異がどのような遺伝子の変異によるものであるかを探っています。先に述べたイネ品種のゲノム解析はイネ植物体からゲノムDNAを抽出して解析しています。今回、変異したイネカルスからゲノムDNAを抽出して解析し、得られたリードを「日本晴」ゲノムにマッピングし

たところ、植物体を用いた場合とは異なるマッピング傾向が現れました(図4)。カルの解析で特徴的であったのは、ミトコンドリアゲノムにユニークにマッピングされるリードの割合が、植物体由来ゲノムでは1%であるのに対し、カルス由来では14%と非常に多くなっている点です。そのため、染色体にユニークにマッピングされるリードの割合は、同じイネ品種であっても、植物体由来ゲノムでは79%であるのに対し、カルス由来ゲノムでは56%と減少していました。しかし、割合は減少していても染色体ゲノム全体の90%以上をカバーできているため、個々の遺伝子の解析には支障はありませんでした。オレンジ色の変異カルスと野生型カルのゲノム配列を「日本晴」の配列と比較したところ、多くのSNPとInDelを検出することができました。その中で、アミノ酸変異をもたらす約150個の遺伝子における変異が、変異カルスに特異的に認められました。これらの遺伝子変異のいずれかがオレンジ色化合物の蓄積をもたらした遺伝子であると考えられます。現在、網羅的発現解析を行い、ゲノム解析の結果と合わせて原因遺伝子の同定を進めています。

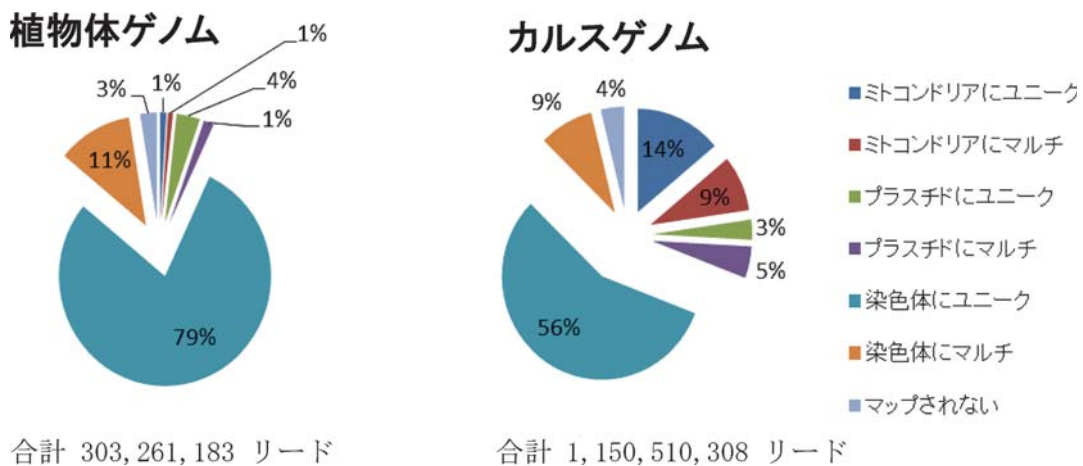


図4 植物体由来ゲノムおよびカルス由来ゲノムのマッピング比率
カルスゲノムは解析量を増やしたためリード総数は増えている

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)

日本在来牛「見島牛」の全ゲノム解析

日本在来牛の見島牛は、本土からはなれた離島（山口県、見島）に役畜として導入されましたが、農業機器の発展に伴い、役畜の役目から離れて外部から他の牛を入れること無く隔離的に飼育されてきました。この牛のゲノムは、和牛作成に関わった多数の遺伝要素を保持していると考えられていて、その遺伝要素はウシのゲノムの多様性を考える為の重要な材料で、彼らの遺伝要素について、詳細な多型の抽出を試みました。

我々は4つの家系から抜擢した8頭の見島牛について次世代シーケンサー（HiSeq2000）を用いて解析を行い、抽出した配列の85.62%をマッピングで参考配列（bosTau6.0）に張りつけることができました。これにより、ゲノム全体の92%を平均11回カバー（depth = 11）し、8頭の見島牛ゲノムから平均733万の一塩基置換（SNPs：Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs）を抽出しました。そこから見島牛に特異的な452の非同義置換（nsSNPs、non-synonymous SNPs）とそれらを保持する331の遺伝子を検出しました。加えて見島牛8個体間の塩基置換率は平均0.155%、1個体につき平均3,406,780の個体間SNPsを持ち、その内約16,000がnsSNPsであることが判りました。さらに過去の報告で用いられている10遺伝子の部分的塩基配列（21,865塩基）で系統樹を作成したところ、見島牛は他の品種から区別出来ることを確認しました。

国際的なゲノム解析計画（HapMap project）において、日本の和牛数十個体がSNP Chipによって54693カ所のSNPの有無について解析にされていますが、非常に近縁な個体間のSNPs抽出に関しては、SNP Chipで抽出するのは難しく、従って本研究で多量のSNPsとnsSNPsを個体間で抽出出来たことは興味深いことです。

見島牛は一時期の個体数の減少から、現在90頭ほどに回復したという経緯があります。その状況からは、見島牛の個体ごとに見られた多くのSNPsは、この個体群において繁殖に関する遺伝子からは淘汰されており、他の遺伝子に多型が集まっていることが考えられます。

これらのSNPsは今後見島牛の繁殖や保存の方法を開発する為の情報となることが期待できます。



図1 日本在来牛・見島牛（天然記念物）

津田 薫（生物資源ゲノム解析センター）
 川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）
 佐野 賢（株式会社ウルヴァニアック）
 今井美咲（生物資源ゲノム解析センター）
 野口龍生（農学部 富士農場）
 稲吉洋裕（山口県農林総合技術センター）
 河野友宏（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

ニホンウズラのゲノム解読

日本で家禽化されたニホンウズラ

ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) は、日本人によって家禽化された唯一の動物種です。室町時代に愛玩用として飼育され始め、第二次世界大戦中にほぼ絶滅しましたが、現在は世界各国で導入され、飼育利用されています。鳥類の代表的なモデル生物の一つとして発生学、神経科学、内分泌学など幅広い分野で実験動物として用いられるとともに、重要な食資源として世界各国で飼育利用されています。また、経済協力開発機構 (OECD) から化学物質の安全性評価のための鳥類のモデル実験動物として推奨されている一方、国際的に通用する標準系統は確立されておらず、分子生物学的研究を進めるにあたって重要な情報であるゲノム配列も解読されていません。

ニホンウズラの全ゲノム解読

そこで我々は、次世代シーケンサーを用いてニホンウズラのゲノム情報の解読に取り組んでいます。配列長が比較的短い次世代シーケンサーでは、鳥類のようなゲノムサイズの大きい高等生物の新規ゲノム配列を決定するのは困難です。そこで、本研究では効率的にドラフト配列を得るため、ウズラの配列情報のみで配列をつなぎ合わせる *de novo* アセンブルの手法に加えて、すでに全配列が決定しているニワトリのゲノム配列情報をもとにウズラの配列を貼り付けるマッピングの手法を用いて解析を行いました。マッピングではニワトリゲノムの 80% 以上をカバーする配列情報が得られ、2つの手法で得られ



図1 ゲノム解析に用いたニホンウズラメス個体

たコンティグを連結することでドラフト配列を取得しました。このゲノム配列から 30,810 の遺伝子の情報が得られました。

ゲノム配列から得られる情報

このドラフトゲノム配列の情報をもとに、7,000 以上のマイクロサテライトリピート領域を同定しました。マイクロサテライトはゲノムに散在する数塩基の繰り返し配列で、その繰り返し回数を個体間で比較することで、親子解析、集団遺伝学的解析、連鎖地図の作製などに有用な遺伝マーカーとして利用されています。本研究では、この同定したリピート領域から 100 のマイクロサテライトマーカーを開発しました。これらを用いて 11 のウズラ系統で解析を行い、各系統の遺伝的背景や系統間の関係を明らかにしました。

本研究においてウズラのドラフトゲノム配列が得られたことにより、モデル生物としてのニホンウズラの重要性が増すことが期待されます。また、近縁種ですでにゲノム配列の解読されているニワトリと比較することで、ウズラに特徴的な形質の遺伝的背景の解明にもつながると期待されます。

本研究は学内公募により、農学部畜産学科桑山先生、名古屋大学、国立環境研究所との共同研究により実施されています。

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

佐野 賢 (生物資源ゲノム解析センター)

吉村 崇 (名古屋大学)

松田洋一 (名古屋大学)

高橋慎司 (国立環境研究所)

川嶋貴治 (国立環境研究所)

河野友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

桑山岳人 (農学部 畜産学科)

加齢が卵子に及ぼす影響の解明を目指す トランスクリプトーム解析

加齢により哺乳動物の卵子の質が低下することが広く知られています。ヒトにおいても、近年では出産年齢が高齢化する傾向にあり、それに伴う卵子の質の低下が妊娠率低下の原因のひとつとして注目されています。不妊治療によって妊娠、出産を行う例が増える一方、妊娠に至らない場合もあり、その原因の特定は困難です。妊娠の成立には卵胞の成熟・減数分裂、卵子・卵丘細胞複合体の排卵、精子との受精、子宮内膜への着床といった過程があり、これらのうち一つでも異常があれば妊娠は成立しません。卵子のもととなる卵胞の初期段階から成熟過程を追いながらその分子機構を理解していくことが不妊の原因を探るために不可欠ですが、ヒト卵子の研究には量や倫理上の制約があるため、ヒトの加齢モデル動物が必要です。

ウシ卵子のトランスクリプトーム解析

ウシは繁殖年限が長く卵子の選抜形態や加齢に伴う内分泌の変化がヒトと類似しており、ヒトの加齢モデル動物として適しています。120ヶ月齢以上の老齢牛と21-50ヶ月齢の若齢牛を比較すると、老齢牛において卵巢中の原始卵胞や胞状卵胞の総量の減少、前胞状卵胞の体外発育能力の低下、体外受精の異常、ミトコンドリア数の減少と機能の変化、初期胚の発育能力の減退など、様々な異常がみられます(図1)。本研究ではこれらの異常をもたらす分子機構を解明するため次世代シーケンサーを使って遺伝子発現解析を行っています。

卵子の様々な発育段階で違いを調べるため、前胞状卵胞、胞状卵胞から採取した未成熟卵子、体外培養後の成熟卵子、体外受精後の初期胚の4段階において遺伝子発現の比較を行いました。どの発育段階においても老齢牛と若齢牛の間で発現量の異なる遺伝子を複数同定することができ、得られた結果はリアルタイム RT-PCRの結果と相関性が高く、信頼性が高いことも判明しました。これらの遺伝子の中には老齢牛卵子の異常と関連付けられるものも含まれる一方、他の生物種でも報告のない新規なものもありました。これらの情報をもとに、卵子に起こる形態や発生の異常の分子機構の解明を目指して研究を進めています。また、卵子の体外培養条件を変えることで遺伝子発現や卵子の質がどのように変化するのか、異常の制御が可能かどうか調べる研究

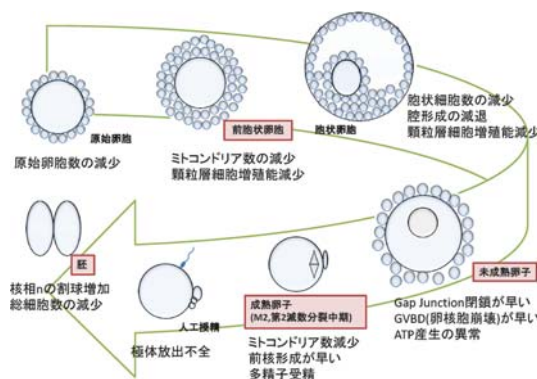


図1 加齢が様々な成熟段階のウシ卵子に及ぼす影響。次世代シーケンサーによる解析に用いたサンプルを赤で示した。

も行っていきます。

ヒト卵子・卵丘細胞のトランスクリプトーム解析

当センターは国立成育医療研究センターとの共同研究により、卵子・卵丘細胞を対象としたトランスクリプトーム解析も行う計画です。卵子・卵丘細胞間のコミュニケーションは卵子の成熟を制御すると考えられていますが、卵丘細胞による卵子成熟制御の分子機構はこれまで明らかにされてきませんでした。我々は不妊治療患者の承諾のもと提供いただいた卵子・卵丘細胞の網羅的遺伝子発現解析から発現量や配列に変異のある遺伝子の探索を行い、ウシ卵子での解析の成果を参考に不妊に関わりのある遺伝子を絞り込んでいく計画です。この研究により、卵子・卵丘細胞に起因する不妊原因の究明とその治療法の開発が進むと期待されます。

ウシ卵子の解析は学内公募により農学部畜産学科岩田尚孝先生との共同研究として実施され、成果の一部は国際誌 *Reproduction* に掲載されました。ヒト卵子・卵丘細胞の解析は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得て行われています。

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

次世代シーケンサーを用いた生殖細胞系列の包括的 DNA メチローム解析

次世代シーケンサーの登場：

エピジェネティクス解析からエピゲノム解析へ
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“エピゲノム解析”です。エピゲノムとは、DNA のメチル化状態、ヒストン修飾状態、ヌクレオソーム配置などのエピジェネティックな修飾をゲノムワイドに解析した情報のことを指します。近年でもっとも大きな注目を浴びている人工多能性幹細胞：iPS 細胞も、元の細胞のエピゲノムをどれだけ「リセット」できたかを調べる研究と言えるでしょう。このように、エピゲノム解析は現在もっともホットな研究分野といえます。

生殖細胞と DNA メチローム解析

DNA のメチル化とは、DNA 配列の変化を伴わずに遺伝子機能を変化させるエピジェネティックな修飾であり、細胞機能を調整する重要な分子機構として、生命現象に深く関与することが知られています。人間を含む哺乳類の生殖細胞（精子・卵子）が形成される過程で DNA メチル化がダイナミックに変化することが知られており、内在性レトロウィルスの抑制や、ゲノムインプリントの確立など、正常な生殖細胞の形成に不可欠な役割を果たします（図 1）。始原生殖細胞は本センターでは、昨年（2011 年）度に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

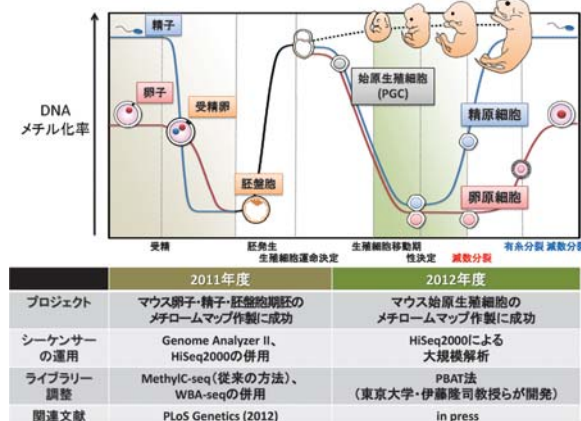


図 1 本研究プロジェクトの進捗状況

しました。

作製されたメチロームマップの解析により、数多くの生殖細胞間メチル化差異領域の同定と、Genebody メチル化とゲノムワイドな転写との間の有意な相関を証明することができました。研究成果はオンライン科学雑誌「PLoS Genetics」に掲載されました。

DNA メチロームマップの比較と今後の展望

本年度はさらに、精子・卵子の起源となる始原生殖細胞のメチル化プロファイリングを行い、マウス生殖細胞の包括的な DNA メチロームマップ（ゲノム広範囲にプロファイリングされた DNA メチル化情報）の作製に成功しました（図 1、図 2）。これらの得られた情報は今後 web 上で公開する予定です。精子・卵子が形成される過程における DNA メチル化の詳細な確立機構と役割を明らかにすることは、生殖細胞の新たな評価基準を設ける上でも重要なステップといえます。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はなく初期腫瘍や特定部位の細胞などの解析が極めて困難な検体の解析にも貢献するでしょう。

注）この研究は東京農業大学が基盤研究（S）補助金の支援により実施しました。

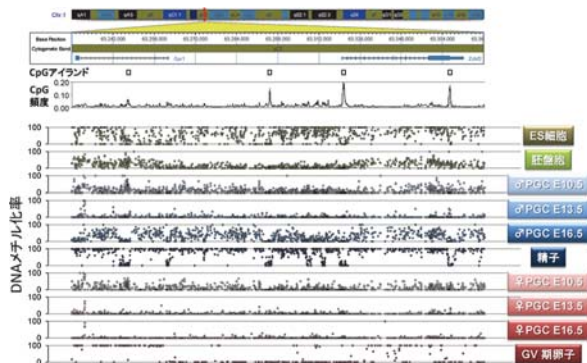


図 2 マウス 1 番染色体上のインプリント遺伝子座における生殖細胞の DNA メチロームマップ

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）

新しい育種法「不均衡変異導入法」の特徴を探る

生物による有用物質生産

古くから私たち人類は、微生物の持つ様々な機能を利用してきました。醤油、味噌、納豆、チーズ、ヨーグルトなどの発酵食品、醸造によるアルコール・食酢の生産をはじめ、近年では抗生物質や有用なタンパク質など医薬品の原料、アミノ酸などの生産に微生物が活躍しています。しかしながら、自然界から分離された微生物はそのままでは有用物質を大量に生産してくれません。そこで、微生物を改良する「育種」が様々な方法で行われています。微生物の主な育種方法として、DNA に突然変異を入れる手法があります。物理的に DNA を傷つける紫外線や X 線照射、化学的に DNA を傷つける変異剤処理がよく行われています。これらの手法は幅広い微生物に適用できる反面、細胞にダメージを与えるため変異をたくさん導入できないという欠点があります。

新しい育種法「不均衡変異導入法」

最近注目されている育種法の一つに不均衡変異導入法があります (E.Y. Park ら、2011)。生物が DNA を複製する際には、たまに間違いを起こしますが、それを直す「校正機能」のおかげでほぼ正確に複製できます。二本鎖である DNA の複製は、リーディング鎖とラギング鎖という二つの鎖に分かれて行われますが、リーディング鎖に比べて複製機構が複雑なラギング鎖の方が間違いを起こしやすいと言われています。不均衡変異導入法はラギング鎖複製の主役である DNA ポリメラーゼ δ を改変し、間違いを直せなくすることで DNA に突然変異を入れる手法で、従来の方法では難しい育種が成功している多くの実績があります (図 1)。しかし、実際

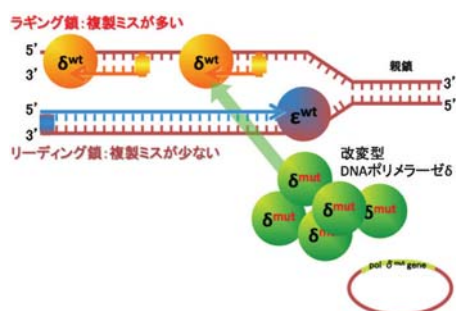


図 1 DNA 複製の模式図

に導入された突然変異の特徴については検証例が少ない状況でした。

多様な変異が見られる「不均衡変異導入法」

本研究では不均衡変異導入法の突然変異の特徴を探るため、よく研究されている出芽酵母 (パン酵母) に、一般的な変異処理剤であるエチルメタンサルホン酸 (EMS) と不均衡変異導入法による変異処理を行い、次世代シーケンサーによるゲノムワイドな変異解析を行いました。

EMS で処理すると DNA の 4 種類の塩基のうち、G または C の塩基が A または T の塩基に偏って変化することが知られていましたが、今回の解析でもその傾向が確認できました。一方、不均衡変異処理株では塩基の偏りは少なく、多様な塩基置換が見られました (図 2)。塩基の置換はタンパク質のアミノ酸配列に影響を与える場合があります。実際、EMS 処理よりも不均衡変異の方が高い頻度で多様なアミノ酸置換を引き起こしていました。

つまり、不均衡変異の有効性は、従来手法と比較して効率良く多様な変異を導入できる点にあることが示唆されました。本研究は、株式会社ネオ・モルガン研究所との共同研究として実施されました。また本成果は国際誌 *International Journal of Evolutionary Biology* (2012, 2012:860797) に掲載されました。

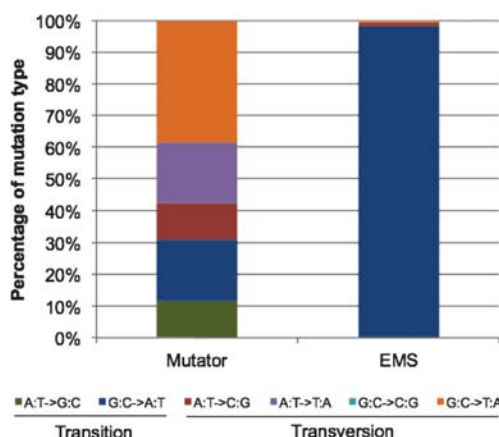


図 2 EMS と不均衡変異導入法 (Mutator) での変異比較

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)

生物の種とは何か？「シアノバチルス」のゲノム解析

ゲノムの柔軟性と「水平伝播」

地球に暮らす生物は例外なく細胞からなり、その中に必ずゲノムを持っています。ゲノムにはその生物を規定する全ての遺伝情報が記されています。生物にとってゲノムを正確に子孫に伝えることは、種を維持する上で必要不可欠です。しかし、正確さが過ぎると、激しい環境の変化に対応できず絶滅してしまうかもしれません。DNAの変化を受け入れる柔軟性は生物の多様性を生み出す原動力です。

微生物では、異なる種のDNAが侵入してゲノムに付加される「DNAの水平伝播」という現象が日常的に起こっており、これが微生物の多様性を生む原動力であると考えられています。一方、組換えDNA技術が確立した現在では、人工的に水平伝播を起こすことができます。これを私たちはクローニングと呼んでいます。

ゲノム丸ごとクローニング「シアノバチルス」

それでは人工的な水平伝播（クローニング）はどこまでできるのでしょうか。その最長記録が、枯草菌 *Bacillus subtilis* BEST7003 のゲノムの中にシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム（350万塩基対）を全て組み込んだ「シアノバチルス1号」です（図1）。シアノバチルスは、慶応大学、先端生命研究所の板谷光泰教授らのグループによって、7年の歳月をかけて作られました。シアノバチルスは枯草菌のゲノムの中にシアノバクテリアのゲノムが同居しているにも関わらず、現時点において、その生き様は枯草菌そのものです。シアノバクテリアの様に光合成は行いませんし、色も枯草菌のままです。これは枯草菌の中でシアノバクテリアのゲノムが機能していないことが原因であると考えられます。

私たちはシアノバチルスの中にあるシアノバクテリアゲノムをどうすれば活性化できるか、つまり、シアノバチルスに光合成を行わせるにはどうすれば良いか、ということについて研究を行っています。そのためには、まずシアノバチルスのゲノム中にシ

アノバクテリアのゲノムがきちんとクローニングされているか確認する必要がありました。私たちは次世代シーケンサーによって得られた塩基配列を再構成し、シアノバチルス1号と、その親株である枯草菌 *Bacillus subtilis* BEST7003 のゲノムを解読しました。シアノバチルス1号には、シアノバクテリアのゲノムがきちんと導入されており、クローニングされた領域には重篤な変異は見つからないことを確認しました。

全てのゲノムが入っているのに、なぜシアノバチルスは枯草菌のままなのでしょう？ 現在、得られたゲノム情報を基により詳細な解析を薦めています。種の壁を超えるには、もうひと工夫する必要があります。

本研究は、慶応大学、先端生命研究所の板谷光泰教授との共同研究として実施されました。また本成果は国際誌 *Journal of Bacteriology* に掲載されました。

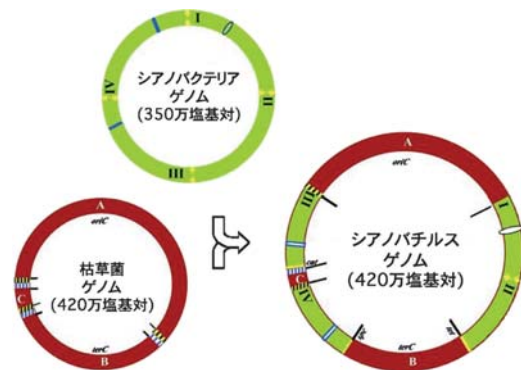


図1 シアノバチルスのゲノム構造



図2 枯草菌、シアノバクテリア、シアノバチルスの形態（慶応大学先端生命研、板谷先生より提供）

渡辺 智（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）

吉川博文（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

バイオマス生産につながる有用藻類のゲノム情報解説

化石燃料依存度を下げ、かつCO₂を削減できるシナリオの用意は、我が国の国家的急務です。植物の光合成を利用したバイオ燃料生産は、その候補として急速に開発されていますが、一方でトウモロコシのような食用作物を用いたバイオエタノール生産には、食糧としての作物利用と競合することから社会的な批判も出ています。これに対し、藻類や光合成微生物を中心とする水生バイオマス生産系は、食用作物の転用や耕地利用との直接的な競合が無く、また潜在的培養コストも極めて低いなど、大きな優位性が指摘されています。特に日本のように、雨や湧水、温泉などのほぼゼロコストの水資源に恵まれる国家においては、藻類・光合成微生物バイオマス生産系には大きな将来性があると言えます。しかし、これらの藻類・光合成微生物には多様な種が存在しており、バイオマス生産に有用な種の探索自体がまだまだ始まったばかりです。重油を作るボトリオコッカスや軽油を作るシュードコリスティスといった藻類は既に広く知られていますが、今後のさらなる探索により、環境ストレスに強い種や、有用物質生産能が極めて高い種が発見される可能性があります。

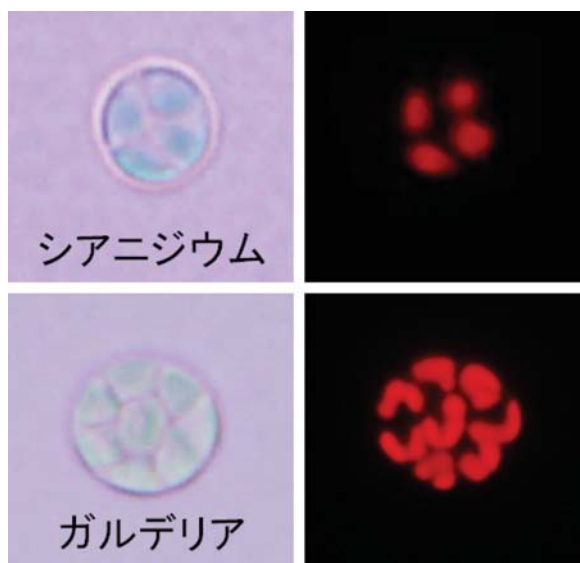
近年のゲノム解読技術の高速化により、こうした有用藻類のゲノム情報の収集が極めて容易になっており、このような探索のスピードが加速することが予想されています。東京農業大学生物資源ゲノム解析センターでは、バイオマス物質生産に関わる種々の有用藻類のゲノム解析を実施しています。例えば、多量の細胞外多糖を生産するシアノバクテリア (*Nostoc* 属、*Aphanothece* 属、*Cyanothece* 属) や、高温強酸性で重金属濃度が高い温泉にも棲息する下等紅藻類 (*Cyanidium* 類) などです。

シアノバクテリアは海水、淡水、陸上など極めて多様な自然環境に棲息しており、彼らが細胞外に多量に放出する多糖類はバイオエタノール生産の原料や吸水性ポリマー素材として利用可能です。しかし、多量の細胞外多糖を生産するシアノバクテリアのゲノム情報は整備が遅れており、また細胞外多糖

の生合成や細胞外放出に関わる遺伝子は未だに不明という問題があります。我々が明らかにしたドラフトゲノム情報から今後こうしたメカニズムの一端が解明できるかもしれません。

また、下等紅藻類であるシアニジウム類は、極限環境微生物として広く知られており、環境ストレス耐性のメカニズムの解明のためのモデル生物でもあります。厳しい環境下でも棲息可能な藻類を用いた工業排水などのバイオレメディエーション (生物環境浄化) などが期待されています。ここでも我々が明らかにしたドラフトゲノム情報が今後こうした研究開発の基盤情報として役立つはずで

す。東京農業大学ではこれら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。



極限環境に棲息する下等紅藻、シアニジウムとガルデリアの顕微鏡写真 (左) と葉緑体自家蛍光写真 (右)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

ゼンマイ寄生菌類 *Mixia osmundae* のヌクレオソーム解析

MNase-seq による

ヌクレオソーム位置の決定

真核細胞の DNA はヒストンタンパク質に巻き付き、ヌクレオソームと呼ばれる構造を形成しています (図 1)。ヌクレオソームを基本単位として、より高次のクロマチン構造が形成され、DNA はコンパクトに折り畳まれます。ヒトの染色体 DNA は全長 2m に及びますが、直径わずか 10 μm (0.01 mm) ほどの細胞核に収められています。

ヌクレオソームの形成位置やヒストンタンパク質の化学修飾は遺伝子発現に影響するため、ゲノムワイドな解析が盛んに行われています。次世代シーケンサーを用いた MNase-seq はヌクレオソームの位置を網羅的に決定する手法です。MNase (Micrococcal Nuclease) は DNA 分解酵素の 1 種で、ヌクレオソーム間のリンカー DNA を分解しますが、ヒストンに巻き付いたヌクレオソーム DNA は分解することができません (図 1)。MNase で処理した細胞から DNA を抽出し、電気泳動にかけるとヌクレオソーム DNA のラダーが観察されます (図 2)。ゼンマイ寄生菌類 *Mixia osmundae* の解析ではモノヌクレオソーム DNA 及びジヌクレオソーム DNA のシーケンスを行いました。

ヌクレオソーム DNA の配列特性

モノヌクレオソーム DNA の中心位置はヒストンタンパク質に結合している領域であり、ジヌクレオソーム DNA の中心位置はリンカー領域です。各配列の特徴を調べたところ、ヒストン結合領域では AT, TA の頻度が高いのに対し、リンカー領域は CC, CG, GC, GG の頻度が高く、AT, TA の頻度は低いことが分かりました。この 2 塩基頻度の傾向はヒトのヌクレオソーム研究で報告されている結果と一致しており、真核生物の進化の過程において DNA 配列とヒストンタンパク質の相互作用が広く継承されてきたことを示しています。

本研究で解析対象とした *M.osmundae* は発見記載から 80 年余りの間、子囊菌類に分類されてきましたが、1995 年に担子菌類へ分類し直された系統学的にユニークな酵母です。ここで紹介したヌクレオソーム解析の他にゲノム DNA と RNA の解析を実施し、研究成果は国際誌 *Open Biology* (2012, 2: 120043) に掲載されました。

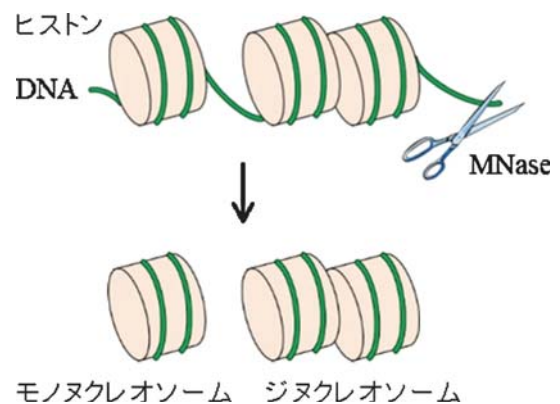


図 1 MNase によるリンカー DNA の分解

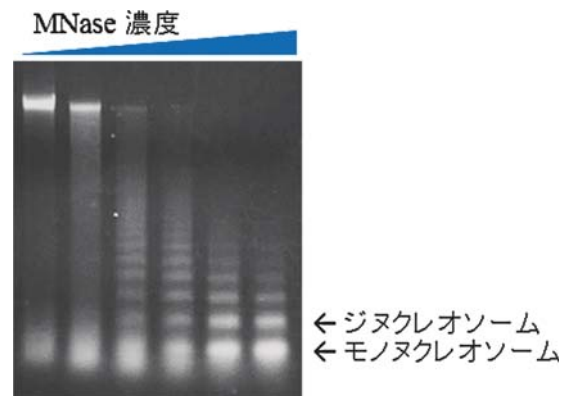


図 2 MNase 処理後の電気泳動写真

松本貴嗣 (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)

貯穀害虫における化学交信システムと種分化に関する解析

昆虫の行動には化学交信システムにより規定されるものが多く存在します。たとえば生殖行動においては一般に、メスが出す揮発性の性誘引性フェロモン (Sex attractant pheromone) が、オスの触角で匂い物質結合蛋白質 (odorant binding protein; OBP) に結合し、受容体に運ばれ、オスはメスの居場所を認知します。フェロモンおよび OBP について詳細に研究が行われている鱗翅目において、種間ではフェロモンおよび OBP に構造的な違いが見いだされ、種特異的な生殖行動に寄与しています。一方で、その近縁種間では、フェロモンの構造とそれに対応する OBP の構造は、それぞれにおいてお互いが非常に類似しており、進化の過程でわずかな変化することで種特異性を保ってきたと考えられます。また、複数のフェロモン化合物の混合比を変えることで、種特異性を変えてきています。

我々のグループでは、貯穀害虫であるマメゾウムシ (*Callosobruchus*) における性誘引性フェロモンおよび OBP の解析を行ってきました。その結果 *Callosobruchus* 属の 4 種のマメゾウムシ由来フェロモンを同定したところ、互いに近縁種であるにもかかわらずその化学構造が大きく異なる 2 つのグループに分かれました。一方、その 4 種のうちの 3 種について触角に発現している蛋白質から OBP を単離したところ、アミノ酸配列もフェロモン構造に対応した 2 つのグループに分かれました。

一般にフェロモン構造と OBP の構造が適応しない変異は、オス・メス間の化学交信を阻害することから種の保存に不利と考えられます。そこでこのような近縁種間における劇的な変化がどのように適応して起こったのか、そのメカニズムの解明を分子レベルで行い、種分化の要因を明らかにすることを目指しています。次世代シーケンサーの登場によりゲノム解析が以前にくらべ格段に容易になりましたが、マメゾウムシのような既知のゲノム情報がほとんど無い非モデル生物への適用はまだ試行錯誤が多い状況です。そこで、まず触角について網羅的 RNA シーケンス (RNA-seq) を行うことで、化

学交信に関わる遺伝子種の同定、発現レベルの解析を行うこととしました。現在のところ、すでに同定した OBP 遺伝子以外の関連遺伝子発現が確認されました。今後の詳細な解析により、近縁マメゾウムシ種間における化学交信システムと種分化メカニズムの解析につなげていく予定です。



アズキマメゾウムシの成虫、オス (左) とメス (右)

矢嶋俊介 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)
岡田 潔 (生物資源ゲノム解析センター)

//// 平成 24 年度 新規学内公募一覽 ////

1. 阿部尚樹 (応用生物科学部 栄養科学科)
「*Trichoderma* sp. USF-2690 における sorbicillinol 生合成ポリゲチド合成酵素の遺伝子学的解析」
2. 藤本尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)
「メタトランスクリプトーム解析による環境中からの藻類有用遺伝子の抽出と機能解析」
3. 尾畑やよい (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「卵母細胞成長過程で確立するインプリントに必須な因子の探索」
4. 半澤恵 (農学部 畜産学科)
「東アジア地域における遺跡出土馬のミトコンドリアゲノム配列決定」
5. 松原創 (生物産業学部 アクアバイオ学科)
「淡水産卵ワカサギおよび海水産卵チカの *de novo* シーケンス解析」
6. 松原創 (生物産業学部 アクアバイオ学科)
「トラフグおよびニジマスを用いた生殖腺および脳における新規性分化誘導因子のトランスクリプトーム解析」
7. 林隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「酸性土壌に固定されたリンを獲得するポプラ細胞壁の機能」
8. 村上覚史 (農学部 畜産学科)
「腸管出血性大腸菌 O157 (EHEC O157) の全ゲノム解析による clade 再定義に有効な SNP 検索及び新たな進化モデルの構築」
9. 林隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「地震の揺れにより誘導される植物の形態形成、及び発現するタンパク質についての解析」
10. 夏秋啓子 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「パパイア輪点ウイルスにおける 2 バイオタイプの類別と宿主内での動態」
11. 林隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「放射性物質によるイネの細胞遺伝的、形態的变化」
12. 中里厚美 (応用生物科学部 醸造科学科)
「醸造酵母 VI 番染色体の相違について」
13. 梶川揚申 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「運動性乳酸桿菌の免疫学的特性と応用」

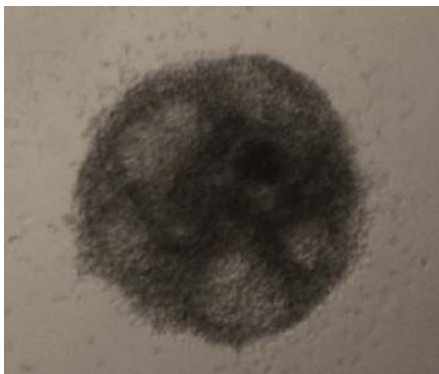
////// 学内公募事業とその成果 ////

◆ 老化が牛卵子に及ぼす影響とその制御方法に関する研究 ◆

加齢により哺乳動物の卵子の質は低下する。我々は加齢黒毛和種牛の卵子の質低下のメカニズムとこれを制御する方法を検討している。

これまで様々なステージの卵子や胚を対象に、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、若齢と老齢間では、ミトコンドリアの電子伝達系や酸化的リン酸化に差があることが明らかになった。また、現在体外受精に用いられている胞状卵胞より未熟な初期胞状卵胞のステージに行においても、卵子を取り巻く顆粒層細胞の遺伝子発現プロファイルが、すでに退行卵胞様になっていることも示された。これらの結果を裏付けるように、加齢個体由来の卵子では、胞状卵胞でも初期胞状卵胞でも卵子のミトコンドリア DNA コピー数が減少し、卵子中の活性酸素量が増加し、一方で GSH 含量が低下していることが示された。さらに加齢個体由来の卵子を受精させて得た、初期胚でもミトコンドリア数が若齢に比べて少なくなることで、加齢個体の卵子の質改善のためには、初期胞状卵胞から卵子中のミトコンドリアの質や量を改善する要因を探索する必要があると考えている。

そこで卵胞の発育に重要な役割を持ち、しかも加齢個体で血中濃度が減少するエストラジオールの卵子発育に持つ意義について検討した。体細胞ではエストラジオールがミトコンドリアの新生を促すことが報告されている。そこで初期胞状卵胞を様々な濃度で培養したところ、エストラジオールは初期胞状卵胞の発育を有意に促し、ミトコンドリア数を増やす効果があることが示唆された。さらに顆粒層細胞においてはテロメア長の短縮を抑制す効果も確認できた。そこで、エストラジオールがもつ初期胞状卵胞の発育促進効果の分子メカニズムを調べるため次世代シーケンサーにて遺伝子発現解析を行った。その結果、エストラジオールは、顆粒層細胞の遺伝子発現プロファイルを正常な卵胞のそれに近づける効果があること、さらに卵子の体外培養中に起こる事象と関連した遺伝子群の発現動態も明らかになった。



加齢ウシ（220ヶ月齢）の初期胞状卵胞

学会発表

1. 日本胚移植研究会 2012.9.26 エストラジオールがウシ初期胞状卵胞の体外培養に与える影響。岩田尚孝、遠藤美和、川原玲香、桑山岳人、門司恭典
2. 日本繁殖生物学会大会 2012.9.9 加齢がウシの初期胚の分割率及びミトコンドリア数に及ぼす影響 石川智望、大里志穂、竹尾駿、桑山岳人、門司恭典、岩田尚孝
3. Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction 2012.9.1. Effect of estradiol on atrum formation, oocyte growth and gene expression within in vitro cultured bovine early antral follicles. M Endo, R.M. Kawahara, M Monji, T Kuwayama, T Kono, H Iwata.
4. 日本哺乳動物卵子学会 2012.5.27 ウシの加齢が卵子と初期胚のヒストンのアセチル化状態、遺伝子発現そして体外発育能力に及ぼす影響。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
5. 日本哺乳動物卵子学会 2012.5.27 加齢が牛初期胞状卵胞に及ぼす影響。遠藤美和、川原玲香、門司恭典、桑山岳人、岩田尚孝

論文発表

1. Endo M, Kawahara RM, Cao F, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H. Estradiol supports *in vitro* development of bovine early antral follicles. *Reproduction* 2012 Nov Accepted
2. Endo M, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H Effect of estradiol during culture of bovine oocyte-granulosa cell-complexes on the mitochondrial DNA copies of oocytes and telomere length of granulosa cells. *Zygote* 2012 Oct Accepted.
3. Effect of Maternal Age on the Ratio of Cleavage and Mitochondrial DNA Copy Number in Early Developmental Stage Bovine Embryos. Takeo S, Goto H, Kuwayama T, Monji Y, Iwata H. *J Reprod and Dev* 2012 Dec Accepted
4. Tasaki H, Iwata H, Sato D, Monji Y, and Kuwayama T. Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology* 2012 Dec Accepted

岩田尚孝 (農学部 畜産学科)
川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

◆ ニホンウズラの免疫応答遺伝子群のシーケンス解析 ◆

ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) はニワトリと同じキジ家禽であり、小型・早熟である上、ニワトリが発症する幾つかのウイルス性疾患に対し不顕性感染を示すため、キジ科家禽の抗病性向上の基礎研究に有用である。そこでウズラの免疫系を体系的に理解するため、自然免疫：抗菌ペプチド (DEFB、NK-lysin)、自然免疫抗原受容体分子 (TLR) および獲得免疫：主要組織適合性複合体 (MHC) の遺伝子群を含むゲノム DNA の塩基配列とその多様性を解析している。

DEFB 領域および NK-lysin は、それぞれを含むコスミドクローンの塩基配列をサンガー法および次世代シーケンサーによる高密度シーケンシングを必要に応じて組み合わせて決定した (未発表)。現在、決定した塩基配列と cDNA 配列との比較等により遺伝子構造を解析中である。

TLR 遺伝子群については、特に鳥類特有で認識するリガンドが多岐にわたり、抗菌性が指摘されている TLR15 に着目し、その抗原認識領域のアミノ酸置換と血漿中の IgG 量との関係を解析している (下山ら 2012)。一方、血漿中の IgG 量と腸内乳酸菌の多寡との関係を示す予備データを得ている。そこで現在、TLR15 による細菌抗原の認識と、血漿 IgG 量および腸内細菌叢との関係を究明するために、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析を計画中である。

11 系統、321 個体を対象に拡張 MHC 領域：セントロメア側より TRIM 領域、MHC 領域および CD1 領域のハプロタイプを多型マーカーにより検索したところ、主要 8 ハプロタイプを検出した (横山ら 2012a, b, Suzuki *et al.* in press)。これらハプロタイプ間では、MHC class I α 、MHC class II β 、MHC class IV および NK receptor の遺伝子座の数に差異 (CNV) が検出され、重複領域も多数存在する。したがって、各ハプロタイプの遺伝子構造を決定するのが困難である。また、各遺伝子群では、遺伝子座毎の mRNA 転写量に遺伝子座間差 (主働、微働遺伝子、並びに擬遺伝子) および細胞種間差が認められる。そこでこれら 4 種類の遺伝子群を対象に、各遺伝子座からの mRNA の発現量比を次世代シーケンサーで決定し、各ハプロタイプの特徴を明確にする予定である。さらにマイナーハプロタイプは主要 8 ハプロタイプ間の組換えにより生じたことを示唆する

データを得ているため、組換え領域の塩基配列を特定すると共に、組換え体個体の作出とそれを利用した各遺伝子座の機能解析も計画中である。

学会発表

日本家禽学会 2012 年度秋季大会 (高松) 2012.9.6,7 ニホンウズラ TLR15 遺伝子の多様性解析 下山拓哉、原ひろみ、平野貴、半澤恵

日本組織適合性学会第 21 回大会 (御茶ノ水) 2012.9.16,19 ニホンウズラ CD1 遺伝子の基礎的解析 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、権名隆、半澤恵

論文発表

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、権名隆、半澤恵 ニホンウズラ CD1 遺伝子領域の多様性解析 DNA 多型 20、30 ~ 35 (2012)

鈴木進悟、細道一善、横山佳菜、津田薫、原ひろみ、吉田豊、藤原哲、水谷誠、権名隆、河野友宏、半澤恵 Primary analysis of DNA polymorphisms in the TRIM region (MHC subregion) of the Japanese quail, *Coturnix japonica* *Animal Science Journal*, in press



◀ニホンウズラヒナ

原ひろみ (農学部 畜産学科)
石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)
鈴木進悟 (東海大学)
権名 隆 (東海大学)
半澤 恵 (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 ◆

これまでに、就巢性が完全に排除されている卵用鶏種白色レグホーン種 (実験群 1) と就巢性を保持する愛玩鶏種の烏骨鶏 (実験群 2) と卵肉兼用種である名古屋種の就巢行動を発現する個体 (実験群 3) と発現しない個体 (実験群 4) を 3 個体ずつシーケンスし、どの個体も 30 Gb 以上、各実験群で 110 Gb 以上のシーケンスデータを得た。

ニワトリのゲノムデータは既に公開されているセキショクヤケイのデータを基に、まず白色レグホーン種の配列をマッピングし、リファレンス更新を繰り返して白色レグホーン種のゲノム配列を作成した (実験群 1)。

次に白色レグホーン種のゲノム配列に烏骨鶏 (実験群 2) と名古屋種 (実験群 3) と名古屋種 (実験群 4) の配列をマッピングしたところ、どの鶏種も白色レグホーン種のゲノム配列と 80% 以上の配列で一致していた。

それぞれの実験群ごとに SNP リストを作成し、実験群ごとに 200 万弱の SNP が同定された。それらは、烏骨鶏 (実験群 2) と名古屋種 (実験群 3) と名古屋種 (実験群 4) の 3 つの実験群の 3 個体に共通に存在する SNP であり、現在これらの実

験群特異的な SNP と、就巢性を保持する烏骨鶏 (実験群 2) と名古屋種の就巢行動を発現する個体 (実験群 3) に共通して存在する SNP に注目して、それらの SNP がどんな遺伝子の近傍にあるのか調査を進めている。



白色レグホーン♂

烏骨鶏♀

名古屋♀

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、中村和久 (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)

◆ ウシゲノム DNA 解析 ◆

1. 野生ウシのミトコンドリア (Mt) DNA 解析

バンテンはガウル、コープレイと共に家畜ウシに近縁の野生ウシである。総個体数は5千頭以下と推定される絶滅危惧種で、マレーシアでは半島部の個体群は絶滅し、ボルネオ島のサバ州に500頭前後が生息するのみである。開発に伴う生息地の分断・孤立に加え、地域によっては家畜ウシとの交雑による遺伝的な攪乱も問題となっている。そのため、地域個体群の遺伝的多様性や遺伝的攪乱の把握は、本種の域内保全を考えるうえで重要である。また、野生ウシの強健性は家畜ウシの改良に活用しうするため、バンテンの遺伝資源としての価値は極めて高い。本研究ではバンテン（ボルネオ亜種）のMtゲノムDNAの塩基配列を決定し、ボルネオ亜種の遺伝的多様性を明確にすると共に家畜ウシを含む近縁種との類縁関係を探る。さらに、環境適応、抗病性など家畜ウシの改良に資する遺伝形質を検索する。これまでのところ、チトクロームb (227 bp) およびDループ (225 bp) の部分塩基配列の解析よりそれぞれ2種類のハプロタイプを同定すると共に、用いたサンプル個体では家畜ウシとの交雑は確認されなかったこと、系統解析によりボルネオ亜種は他の2亜種：ビルマ亜種、ジャワ亜種より、ガウルに近縁であ

ることが示唆された。現在、Mt全ゲノムDNA配列の比較解析を計画中である。



◀野生バンテン

松林尚志 (マレーシア・サバ大学)
Abdul Hamid Ahmad (マレーシア・サバ大学)
平野 貴 (農学部 畜産学科)
半澤 恵 (農学部 畜産学科)

2. 和牛の真核ゲノム解析

黒毛和種牛はWagyuとして世界的に認知された品種であり、またその成立に最も深く関わったと考えられる日本在来牛は見島牛である。これらの全ゲノム配列は、我が国の貴重な遺伝資源に関する情報であるとして、一般への公開は見合せられている。一方、世界的に高い評価を受けているマーブリング（霜降）形質やその味覚に深く関わる脂肪酸、アミノ酸の組成に影響を及ぼす遺伝子、ならびに高度な選抜・改良故に問題となる単独あるいは複数の対立遺伝子が関係すると考えられる遺伝病に関する情報は着実に蓄積されつつある。このような状況の中で、家系を用いたQTL解析によって検出されたマーブリング増加

効果を持つハプロタイプ (Q) または効果のないハプロタイプ (q) を保有する個体の筋組織をバイオプシで採取し、各種遺伝子由来の mRNA の発現量を次世代シーケンサーによる網羅的な解析により明らかにし、マーブリングに關与する対立遺伝子を明確にすることを計画している。

平野 貴 (農学部 畜産学科)
原ひろみ (農学部 畜産学科)
半澤 恵 (農学部 畜産学科)

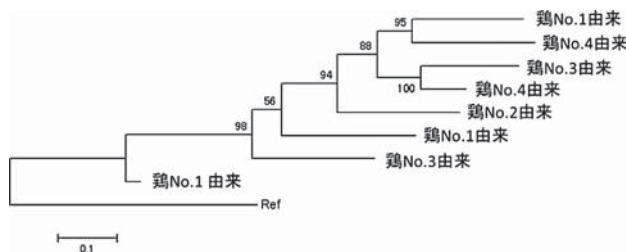
◆ 鶏における *Salmonella Infantis* の体内分布とその変異状況の解析 ◆

Salmonella Infantis は鶏肉から高率に分離され、ヒトの食中毒の原因となる公衆衛生上重要な細菌種である。これまでにパルスフィールド・ゲル電気泳動解析によって、鶏に保菌されている *S. Infantis* は unique clone の emerging によって分布拡大して高率に鶏群で保菌されるようになったことが指摘されているが、鶏体内における *S. Infantis* の分布状況と変異状況についてはほとんど解析されていない。

そこで、6農場から4羽ずつの鶏を供試し、*S. Infantis* の体内分布を調査したところ、実質臓器や腸管から *S. Infantis* が分離された。分離した *S. Infantis* の変異状況を調べるため、生物資源ゲノム解析センターに依頼して whole genome sequence 解析を行い、SNPs および DIPs の有無を調査している途中である。これまでに1農場の鶏由来 *S. Infantis* の解析が終了したが、reference sequence である *S. Infantis* str. SARB27 株と比較すると5万個以上のSNPs およびDIPs が確認された。しかし、鶏由来 *S. Infantis* 株間に限ると、s-SNP が450個程度、ns-SNP が200個程度、DIPs が100個程度にまで限定された。これら全ての変異に基づき系統解析を行ったところ、同一の鶏から分離された *S. Infantis* であっても変異していることが認められた (図参照)。しかし、今回の系統解析は supermatrix アプ

ローチによるものであり、heterotachy の影響が懸念されるため、より適切な系統解析法について検討しているところである。

今後、ヒト由来 *S. Infantis* についても同様に解析し、*S. Infantis* の分化状況を調査することで我が国に分布する *S. Infantis* の特徴を把握出来る可能性があり、その情報を *S. Infantis* による食中毒の予防に活用することが期待される。



鶏由来 *S. Infantis* の最尤法による系統解析

村上寛史 (農学部 畜産学科)
横山栄二 (千葉県衛生研究所)

◆ 次世代シーケンス技術を用いた眼球疾患モデル動物の

発症メカニズム解明への展望 ◆

白内障および小眼球症などの眼球疾患は失明を伴うことから、極めて深刻な QOL の低下を引き起こす。そのため、これら疾患の治療および予防法の開発は眼科領域における重要な課題の 1 つとなっているが、その発症には強い遺伝的要因が関与しているものの、その浸透率や病態および発症時期については個人の遺伝的背景に加えて強い外部環境の影響を受けるため、それらに関わる遺伝的要因ならびに発症メカニズムの解明が困難な現状にある。そこで我々は白内障や小眼球症を自然発症する疾患モデル動物から、順遺伝学的手法による発症原因遺伝子の同定を足がかりとして、これら疾患の発症メカニズムの解明を目指している。

白内障モデルマウス *rct* の発症原因遺伝子のポジショナルクローニング

我々は、先天性白内障モデルである Rinshoken cataract (*rct*) マウスにおいて、*Foxe3* の眼球特異的エンハンサーエレメントの欠失を見出し、その突然変異が *Foxe3* の遺伝子発現量を大幅に減少させることを明らかにした (図 1)。*Foxe3* は眼球形成時に重要な役割を担う転写因子をコードしており、ヒトにおいてこの遺伝子の突然変異は様々な眼球形成異常を引き起こすことが報告されている。このことから、FOXE3 に発現制御され、正常な水晶体の形成ならびに維持に機能する複数の遺伝子群の存在が示唆される。しかし、FOXE3 が水晶体形成に重要な役割をもつにもかかわらず、それに直接的に発現制御される遺伝子群については明らかにされていない。さらに、*rct* マウスにおいて同定された眼球特異的エンハンサーエレメントに作用する転写因子についても不明のままである。今後は RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析および ChIP-Seq による FOXE3 結合領域の同定など、次世代シーケンス技術を取り入れたハイスループットな解析方法により、FOXE3 を中心とした水晶体形成ならびに白内障発症のカスケードを明らかにしていきたいと考えている。

加えて現在、我々は生物産業学部において新規に単離された白内障マウスおよび無眼球ラットについて発症原因遺伝子のポジショナルクローニングを試みている (図 2)。今後はこれら突然変異体において、エキソームシーケンス解析などにより効率的な主要発症原因ならびに修飾遺伝子の同定を進めていきたい。

学会発表

第 51 回日本白内障学会総会。シンポジウム 3 「水晶体の分化と白内障に関する遺伝子の最新情報」 (東京) 2012.12.6.15 ~ 17 水晶体における FOXE3 下流活性化制御因子の探索 和田健太、吉川欣亮

第 9 回北海道実験動物研究会 (HALAS) 学術集会 2012 (札幌) 2012.7.14 マウス *Foxe3* 突然変異体を用いた水晶体形成に関与する遺伝子のスクリーニング 高橋 剛、原田千鴻、斎藤潤一、曹 峰、河野友宏、吉川欣亮、和田健太

The 26th International Mammalian Genome Conference (Florida) 2012. 10.21~24 Gene expression profiling of the lens in *Foxe3*-deficient *rct* mice Kenta Wada, Gou Takahashi, Chihiro Harada, Saki Okubo, Yoko Okumoto, Yo Obara, Cao Feng, Junichi Saitou, Tomohiro Kono, Yoshiaki Kikkawa

論文発表

Watanabe, K., Wada, K., Ohashi, T., Okubo S., Takekuma K., Hashizume R., Hayashi, J., Serikawa, T., Kuramoto, T., Kikkawa, Y. A 5-bp insertion in *Mip* causes recessive congenital cataract in KFRS4/Kyo rats. *PLoS ONE* 7 (11): e50737 (2012).

Wada K., Maeda, Y.Y., Watanabe, K., Oshio, T., Ueda, T., Takahashi, G., Yokohama, M., Saito, J., Seki, Y., Takahama, S., Ishii, R., Shitara, H., Taya, C., Yonekawa, H., Kikkawa, Y. A deletion in a cis-element of *Foxe3* causes cataracts and microphthalmia in *rct* mice. *Mammalian Genome* 22, 693-702 (2011)

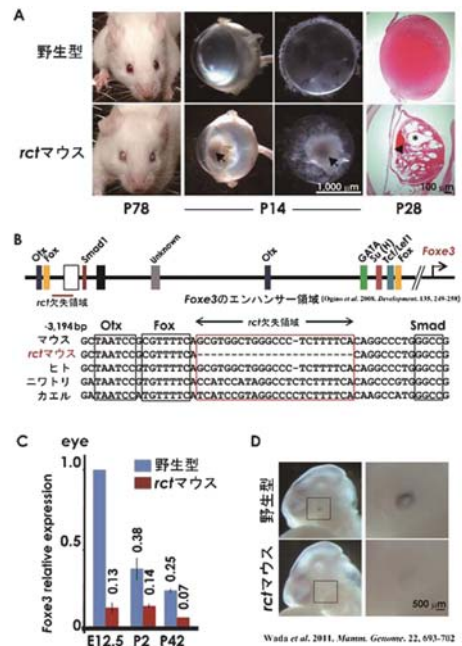


図 1 白内障モデルマウス *rct* における発症原因突然変異の同定。(A) *rct* マウスの表現型。水晶体前極部の顕著な混濁 (矢印)、水晶体線維の空胞 (アスタリスク) および水晶体上皮と線維間のギャップ結合の消失 (矢頭)。(B) *rct* マウスに認められた *Foxe3* のエンハンサーエレメントの欠失変異。(C, D) *Foxe3* の遺伝子発現解析。*Foxe3* の qRT-PCR 解析 (C) およびホルマウント *in situ* hybridization 解析 (D)。



図 2 新規無眼球症ラット *nak* の表現型

和田 健太 (生物産業学部 生物生産学科)
橋詰 良一 (生物産業学部 生物生産学科)

◆ 在来馬の起源の解明に関する研究 ◆

我が国には8種の在来馬が存在している。その起源は古墳時代にまで遡るが、互いの類縁関係については、大きく2つ説があり結論を得ていない。即ち、四国・九州の小型在来馬は中国南部から九州に渡来したが、本州・九州の中型在来馬は中国北部から朝鮮半島を経て渡来したとする2経路説、ならびにすべての在来馬はモンゴル系馬が朝鮮半島を経て渡来し、南下と共に小型化し、各在来馬品種に分化したとする1経路説である。中国産馬は、北部・南部を問わず、いずれもモンゴル系馬由来

であると考えられるが、中国、朝鮮半島の各地域の在来馬に特有の遺伝子変異は検出されていない。また在来馬は、民族の歴史的に複雑な変遷と共に移動してきたと考えられる。しかし東アジア各地域で過去・現在、共に在来馬の遺伝的多様性に関する情報が極めて不十分であることは否めない。そこで、以下の2つのプロジェクトを実施する機会を得たので、貴センターの次世代シーケンサーを使用した解析を実施することとした。

1. 日本在来馬ゲノム DNA のシーケンス解析

中国陝西省およびモンゴル中部の約3300年前および日本の古墳・古代の遺跡出土馬の遺骨からDNAを抽出し、Mtゲノムの塩基配列を決定し、東アジアにおける家畜化初期の馬のハプロタイプ頻度および分布を基に、東アジアの古代馬と現存する日本在来馬8品種との類縁関係について歴史的に考察する予定である。



遺跡出土馬の遺骨

覚張隆史、米田 穰 (東京大学)
 菊地大樹、丸山真史、松井 章 (奈良文化財研究所)
 本郷一美 (総合研究大学院大学)
 高濱 秀 (金沢大学)
 劉 呆雲 (陝西省考古研究院)
 植月 学 (山梨県立博物館)
 太田博樹 (北里大学)
 半澤 恵 (農学部 畜産学科)

2. 日本在来馬ゲノム DNA のシーケンス解析

次年度以降の(公財)競理研との共同研究として計画中である。日本在来馬8品種を対象に、そのMtゲノムおよび核ゲノムDNAの全塩基配列を決定し、詳細に比較解析することにより、在来馬間の類縁関係を明確にし、その起源を考察することを目的としている。すでに家畜ウマ(*Equus caballus*)のMtゲノムDNAの全塩基配列(NC_001640.1)および核ゲノムDNA全塩基配列(GCA_000002305.1)は、GenBankに登録されているため、これらをリファレンスシーケンスとして、今回解析する塩基配列をマッピングし各品種特異的な塩基置換等を明確にする予定である。

平野 貴 (農学部 畜産学科)
 原ひろみ (農学部 畜産学科)
 側原 仁 (公財法人競走馬理化学研究所)
 廣田桂一 (公財法人競走馬理化学研究所)
 梶 裕永 (公財法人競走馬理化学研究所)
 戸崎晃明 (公財法人競走馬理化学研究所)
 半澤 恵 (農学部 畜産学科)

◆ 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/RCAR 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 型転写因子をはじめ、多彩な細胞内調節因子を活性化させる。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 による抑制が解除されることで、自己リン酸化の促進が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、遺伝学的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。

そこで我々は、次世代シーケンサーを用いた AR7 株の全ゲノム配列の解読を行い、変異箇所の同定を試みた。AR7 株のゲノムは 20 倍を超える高いカバー率で解読された。AR7 株の元株となる野生型株 (WT) には、機能に影響しない自然発生的な変異の蓄積が予想されたため、WT 株のリシーケンスデータを取得し、自然発生的変異を解析から除外する行程を挟んだ。その上で WT 株と AR7 株の配列比較を行った結果、AR7 株に特異的な 2068 の変異箇所が同定された。その中で、非同義置換を伴う変異は 47 箇所であった (下表)。これらの変異を含む遺伝子には、プロテインキナーゼなどリン酸化シグナル伝達関連因子をコードする遺伝子も含まれていた。現在、これら変異箇所に対して、サンガー法による確認作業を進めている。非同義置換が生じていた遺伝子は、いずれも既知の遺伝子ではなかったことから、AR7 株の ABA 非感受性形質は、未知の ABA 関連遺伝子への変異によってもたらされたと考えられる。

AR7株 変異の内訳

| | 全て | 非同義置換 | Splice site | 5' UTR | 3' UTR |
|-------|------|-------|-------------|--------|--------|
| SNV | 1481 | 39 | 0 | 5 | 8 |
| MNV | 334 | 7 | 0 | 3 | 2 |
| InDel | 253 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Total | 2068 | 47 | 0 | 9 | 10 |

SNV (single-nucleotide variant)
MNV (multi-nucleotide variant)
InDel (insertion or deletion)

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)
小松憲治 (短期大学部 生物生産技術学科)

◆ 地震・放射能を被った植物の遺伝子発現解析—東日本震災プロジェクト— ◆

昨年三陸沖で生じたプレートのずれは、大地震となり、津波や原発事故といった大惨事を引き起こした (東日本大震災 2011 年 3 月)。地震のゆれを受けとめた樹木はどのように応答したのか、放射能汚染を受けたイネの胚の遺伝子発現は変化するのか、基礎的な研究データの集積を研究目的とした。

まず、地震に模した揺れを定期的にポプラに与えて発現される遺伝子、構成的に誘導されるタンパク質解析 (プロテオミクス) をして木質構造の変化を解析する。その中で、樹木がどのような環境応答を成しているのかを明らかにしたい。このことは、植物の形態形成のみならず、環境適応メカニズムに知見を与えると考えられる。

日本人の主要穀物であり、穀類の中でもゲノムサイズが小さく、全ゲノム配列が解読されているイネを用いる。ここでは、福島県のような地域で収穫された放射性セシウム汚染米を用い、放射能汚染が遺伝子発現に与える影響を RNA-seq によって解析する。具体的には胚から幼植物体への発達の中で、転写レベルで違いがみられるか、精査・解析したい。これにより、生物に対する放射性セシウムの安全性を解析する。

東北地方の酸性土壌において、リンはアルミニウムと結合し、利用できない不溶性の塩として固定されている。しかしながら森林では、樹木は、リン肥料の施肥がなくても成長している。一方、根にアルミニウムが蓄積していることから、細胞壁糖鎖がリン酸アルミニウムからリンを獲得していることが推察された。福島原発事故後放出された放射性セシウムは、細胞壁糖鎖によるリン獲得機構にどのように作用しているのか、ここではモデル樹木であるポプラを用いて遺伝子発現を解析する。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析により、震動・発生・吸収の動きを転写レベルで把握することで、東日本大震災を被った樹木・草本植物の環境応答を分子レベルで明らかにすることを旨とする。

学会発表

第 62 回日本木材学会大会 (札幌) 2012.3.15 ~ 17 アルミニウムが結合する細胞壁糖鎖 板倉正晃、大島宏之、太治輝昭、坂田洋一、林隆久



◀地震に模した揺れにさらされたポプラ (上図) と制振剤の上に置かれたポプラ (下図、コントロール)

林 隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
長縄憲治 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
河合絵里 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
板倉正晃 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

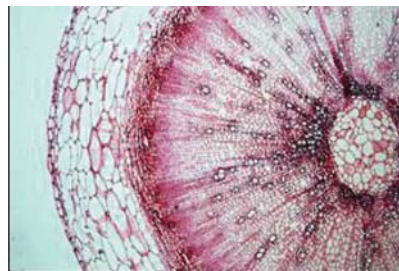
◆ ダイコンのゲノム解読と肥大根のトランスクリプトーム解析 ◆

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と密着して多くの品種が栽培されてきた。なかでも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(辛味成分、糖、デンプンなど)や表皮の色(白・赤・紫・緑・黒・黄)の変異もたいへん大きい。本プロジェクトは、ダイコンのゲノム配列を解読し、それを基盤として形質変異の分子メカニズムに迫ることを目的としている。

食用ダイコンの代表的な品種である青首系ダイコンの染色体倍加系統を用いて、次世代シーケンサーによるゲノムシーケンスを行った。より長いコンティグ(DNA断片をつないだ連続配列)とコンティグ同士を結合したスキュフォールド(間にギャップを含む配列)を作成するため、複数のゲノム断片(300・500・700・8k・20k・40kbp)のライブラリをシーケンスした。構築されたゲノムの総延長は3億4319万塩基となった。フローサイトメトリーを用いた総ゲノム量推定では、ダイコンのゲノムサイズは5億4742万塩基となったことから、約60%のゲノムが復元されたことになる。ダイコンゲノムには重複構造があり、類似配列の分離が難しいため復元率が低いと考えられる。今回の結果は、近縁種であるハクサイのゲノム解析結果とほぼ一致し、アブラナ科野菜の複雑なゲノム構造を反映するもので

ある。約20万本のコンティグとスキュフォールドが形成され、半数以上が数万塩基以上の長さをもつことから、マーカー作成、有用遺伝子の単離や機能解析への応用が可能である。

ゲノム配列情報をもとに、異なる発生ステージおよび部位で発現する遺伝子の網羅的な解析を現在行っている。特に、複数の肥大期の根部で、肥大組織(形成層、木部柔組織)、非肥大組織(皮層、根端)の発現遺伝子を同定・発現量を比較するRNA-seq解析を行い、根の肥大に関わる原因遺伝子の分析を行っている。



ダイコン根部の横断面。細胞の大きい表皮組織の内側に、リング状に赤く染まった形成層がある。

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)
今井美咲 (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)
下村道彦 (三菱スペース・ソフトウエア)
並木信和 (三菱スペース・ソフトウエア)
片寄裕一 (農業生物資源研究所)
佐々木卓治 (総合研究所)

◆ パパイア輪点ウイルスの宿主はどう決まるか ◆

パパイア (*Carica papaya*) は中米原産の熱帯果樹で、日本では沖縄県などで、また、世界的には熱帯・亜熱帯気候の地域で広く栽培され、果樹あるいは野菜として利用されている。このパパイアの生産阻害要因となるのが、パパイア輪点ウイルス (*Papaya ringspot virus*; PRSV) である。Potyvirus属に属するPRSVはアブラムシ伝染性で、パパイアにモザイク、輪点、奇形などを生じる。さらに、PRSVは各種のウリ科作物にも発生し、葉や果実にモザイク症状を呈するが、日本の本州などパパイアの生産の無い地域では、むしろウリ科作物の病原として問題となっている。

このPRSVには宿主域の異なる2つのバイオタイプ(以下、タイプPおよびタイプW)が存在する。タイプPはウリ科作物に感染するが、ウリ科とは分類学的には遠いパパイアをも宿主域とする。一方、タイプWは、パパイアには感染しない。様々な研究により、本来はウリ科作物に発生していたPRSVの祖先ウイルスが、新たな宿主であるパパイアとアジアで出会い、パパイアへも宿主域を拡げたと考えられている。しかし、どのような変異、そして変異の定着によって宿主域をパパイアにまで拡げたのか、そのメカニズムは分かっていない。また、自然界ではほとんどの場合、ウリ科からはタイプWが検出され、タイプPは少数派として観察される。そこで、この2バイオタイプがパパイアへと宿主域を拡げたメカニズム、また、野外におけるウリ科植物内あるいはパパイア内での両バイオタイプの動態を理解するために、両方のタイプを同時にウリ科作物であるズッキーニに人工的に感染させ、次世代シーケンサーを用いて植物体内に感染したウイルスのメタゲノム解析を行うことにした。両タイプを類別するウイルスゲノムの塩基配列はすでに知られていることから、リシーケンス解析により植物体内におけるウイルスのタイプの存在比を推定できると考えられた。現在、宿主植物内における両タイプの特異的配列を持つリード配列を時系列に従って検出して、その増減を観察している。

研究ははじまったばかりであるが、このような試みは他に例が見当たらないことから、本研究はPRSVの宿主分化、遺伝的多様性を理解するために必須であり、早期診断や弱毒ウイルスの開発の為にも有用であると考え、間もなく得られる成果に期待している。



◀ 東南アジアで発生し、パパイア葉を細く糸状になるまで奇形化する深刻なウイルス PRSV による被害



◀ パパイア果実に輪紋を生じ、商品価値を下げる PRSV による被害

吉田沙樹 (農学研究科 国際農業開発学専攻)
志波 優 (生物資源ゲノム解析センター)
川崎信治 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
夏秋啓子 (国際食糧情報学部 国際農業開発学科)

◆ 嫌気性菌ビフィズス菌の O₂ 感受性に関する原因酵素の同定 ◆

我々は代表的な嫌気性菌であるビフィズス菌の O₂ 感受性に関する分子機構の解明を目的として研究を行っている。ビフィズス菌は一般的に動物の腸管に生息し、それらは O₂ に対して高い感受性を示す。当研究室では大気 O₂ 濃度 (21% O₂) 下での液体振盪培養でも良好に生育するウシルーメン由来の *Bifidobacterium boum* (微好気性) を始めとして、属を代表するタイプ株の *B. bifidum* (O₂ 感受性)、ヨーグルト製造に用いられる *B. longum* (O₂ 感受性)、また例外的にミツバチから単離された歴史を持ち、高い O₂ 耐性能力を有する *B. asteroides* (O₂ 耐性) などを供試菌として研究を進めており、これまでに数種のビフィズス菌株のゲノムを生物資源ゲノム解析センターで解読した。

ビフィズス菌は好気性菌が有する H₂O₂ 分解酵素のカタラーゼを保持していないが、ミツバチから単離された *B. asteroides* は属内で唯一カタラーゼ活性が検出される。23 年度修士修了の林らにより *B. asteroides* のカタラーゼ活性を指標にタンパク質の精製に成功し、N 末端アミノ酸シーケンスを行った結果、ヘム型のカタラーゼであることが判明した。生物資源ゲノム解析センターにて解読した *B. asteroides* のドラフトゲノム配列から、N 末端アミノ酸部分と 100% 同一性を示すタンパク質をコードする遺伝子が発見され、全長遺伝子を含む周辺領域の取得に成功した。本報告はビフィズス菌属内で初めてカタラーゼの存在性を証明した報告として、*Microbiology* 誌に受理された。

また我々は関連研究として、ミツバチから単離されたビフィズス菌が花に由来することを推定し、2006 年から花の嫌気微生物叢の解析を行っている。本研究の過程において新種の乳酸菌 *Lactobacillus ozensis* や *Lactobacillus floricola* を単離し、これらはグルコースとフルクトースのみを資化するという微生物生態学的に希少な糖資化スペクトルを示した。現在は 2 新種をゲノム解読に供し、生理特性との相関性を解析している。また本学先端研究の一貫として、植物体に生息する微生物叢の解明を目的とした次世代シーケンサーによるメタゲノム解析の技術開発を進めており、植物体や花、さらには蜜蜂に存在する新規な嫌気微生物叢のさらなる解明を期待している。

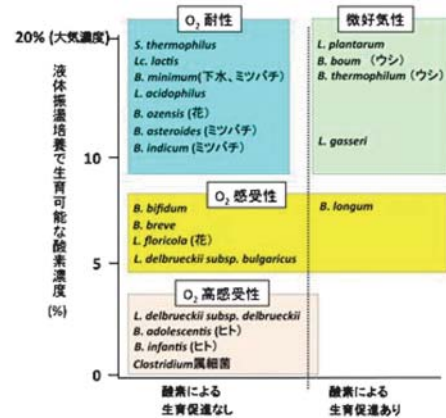
学会発表

日本乳酸菌学会 2012 年度大会 (筑波) 2012.7.12、13 花に生息する嫌気性菌に関する研究 菅原麻美、黒沢佳奈、宮崎真努華、新村洋一、川崎信治

日本乳酸菌学会 2012 年度秋期セミナー (明治大学) 2012.11.30 嫌気性菌と酸素 (0 ~ 21% の様々な O₂ 濃度における微生物生態) 川崎信治

論文発表

Hayashi, K. I. Maekawa, I. Susumu, K. Tanaka, T. Satoh, Y. Shiwa, Y. Niimura, and S. Kawasaki Purification and characterization of oxygen-inducible heme catalase from oxygen-tolerant *Bifidobacterium asteroides*. *Microbiology*, 159: 89-95 (2013)



酸素濃度に応じたニッチの推定。

JCM もしくは DSM カルチャーコレクションのタイプ株を使用した。

川崎信治 (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)
鈴木一平 (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)

◆ ゲノムシーケンスを活用した乳酸菌の鞭毛遺伝子構造解析 ◆

乳酸菌は炭水化物を利用し、エネルギーを生産する過程で乳酸を生産する細菌の総称である。1942 年に北原は乳酸菌の定義としてグラム陽性、桿菌もしくは球菌、カタラーゼ陰性、消費したグルコースから 50% 以上の乳酸を生産するといった特徴を提唱した。1990 年代に入り、それまでの表現性状試験、生理生化学的試験、化学分類学的試験などによる分類に加えて 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく分子系統分類がなされるようになってきた。この解析により、従来、乳酸菌として認識をしていた細菌群は *Firmicutes* 門、*Bacilli* 綱、*Lactobacillales* 目に位置していることが明らかになった。

このような乳酸菌は一般的に運動性を有さない (鞭毛を持たない) とされている。しかし、これまでに一部の乳酸菌に例外が確認されており、*Lactobacillales* 目の中でも約 160 種から構成される代表的な乳酸菌である *Lactobacillus* 属にも有鞭毛乳酸菌が 14 種 (株レベルで鞭毛を有する菌種を含む) 確認されている。病原性細菌をはじめとする他の細菌では鞭毛に関する研究が数多く行われており、遺伝子構造や免疫学的機能など多くの知見が得られている一方で、乳酸菌の鞭毛は菌株が持つ、一つの特徴としてとらえられているがそれ以上の研究がほとんどなされていなかった。

しかし、2011 年に有鞭毛乳酸菌の研究として *Lactobacillus ruminis* を用いた研究論文が発表されている。この研究では *L. ruminis* ATCC 27782 のフルゲノムシーケンスから、鞭毛形成関

連遺伝子群は 54 遺伝子、45 Kbp 以上からなることが明らかになっている。この研究から乳酸菌の鞭毛に関する知見が得られているものの、有鞭毛乳酸菌のほんの一部について明らかにしたにすぎない。

そこで、本研究ではまず、ゲノムシーケンスによって、*Lactobacillus* 属乳酸菌の鞭毛形成関連遺伝子群の構造を明らかにする。得られた情報をもとに有鞭毛乳酸菌や他の有鞭毛細菌と比較を行い、系統的関係との比較を行う。これにより、乳酸菌の分子進化がどのようにして起こったかを明らかにしていきたいと考えている。ゲノムシーケンスによって得られる遺伝子情報は、乳酸菌の鞭毛について詳細な研究を進めていくうえで、有用な情報 (ツール) になることが期待される。



◀ 乳酸菌の鞭毛

Lactobacillus sucicola
NRIC 0736^T (=JCM 15457^T) の鞭毛を戸田法にて染色

入澤友啓 ((独) 理化学研究所)
田中尚人 (応用生物科学部 菌株保存室)

◆ 蜂蜜から分離された酵母の浸透圧耐性に関する研究 ◆

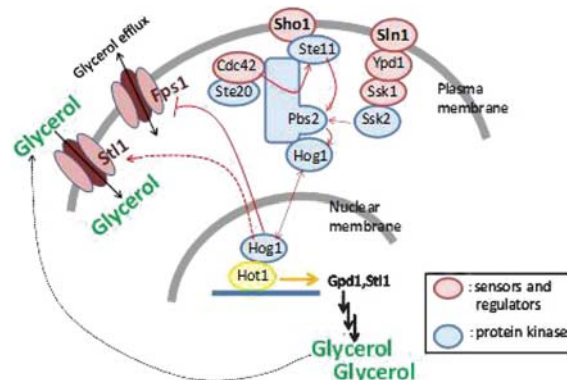
浸透圧の高い食品に生育する酵母が知られている。食塩濃度の高い醤油諸味からは *Zygosaccharomyces rouxii* や *Candida versatilis* などの酵母が分離される。これら抗浸透圧酵母は醸造食品の特徴的な香味形成に関与しているが、塩蔵品や糖蔵品の品質を劣化させる原因ともなる。

Saccharomyces cerevisiae において、塩に対する浸透圧耐性メカニズムが詳しく検討されている。*S. cerevisiae* は一定濃度以上の NaCl にさらされると、HOG (high osmolarity glycerol response) 経路により MAP キナーゼ (MAPK) を活性化することで高浸透圧環境に適応する。HOG 経路には、その上流に Sho1 経路と Sln1 経路の 2 種類の浸透圧センサー経路が存在する (図)。センサー Sho1 は MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAPKKK) の Ste11、センサー Sln1 は MAPKKK の ssk2/22 を活性化し、次いで共通の MAPKK である Pbs2、MAPK である Hog1 を順次活性化する。活性化された Hog1 は細胞核に移行して転写因子をリン酸化することでグリセロール生合成に関わる酵素 (Gpd1) やグリセロール輸送体 (Fps1、Stl1) の転写を誘導する。現在、塩に対する耐性は分子レベルでのメカニズムが解明されているが、糖に対する耐性メカニズムは検討例が少なく、塩と同様な機構が働くかどうかは明らかでない。

当研究室ではカナダ産蜂蜜から *Zygosaccharomyces mellis* を分離した。*Z. mellis* は分類上 1990 年に *Z. rouxii* から独立した酵母である。両者の浸透圧耐性を比較するため、YM 培地に高濃度の NaCl またはグルコースを添加して培養したところ、NaCl 添加においては *Z. rouxii* が 20% NaCl 存在下でも生育したのに対して、*Z. mellis* は 10% 存在下で生育が阻害された。一方、グルコース添加においては *Z. mellis*、*Z. rouxii* ともに 80% グルコース存在下で生育した。このように、*Z. mellis* は、NaCl に対する耐性は見られなかったがグルコースに対しては *Z. rouxii* と

同等の耐性を示したことから、糖に特異的な応答機構があることが示唆された。そこで、*Z. mellis* の耐糖性メカニズムの検討を目的として、次世代シーケンサーを用いた *Z. mellis* の全ゲノム配列の解読を行った。

解読された塩基配列を対象に、*Z. rouxii* および *S. cerevisiae* における既知の浸透圧耐性関連遺伝子に類似の配列をサーチした。Hog1 に類似の配列が *Z. mellis* にも存在し、アミノ酸に置換した際、*Z. rouxii* との相同性は 99%、*S. cerevisiae* とのそれは 95% であった。しかしながらグリセロールトランスポーターである Fps1 様遺伝子においては、*Z. rouxii* とは 73%、*S. cerevisiae* とは 53% の相同性であった。今後、*Z. mellis* のゲノム配列をもとに浸透圧応答遺伝子群のプロファイリングを得て、耐糖性のメカニズムを解明したいと考えている。



出芽酵母の浸透圧応答経路

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

◆ メタゲノム解析による環境中からの藻類有用遺伝子の抽出と機能解析 ◆

世界人口増加に伴い確実に訪れる食糧不足を克服するために、次世代農業においては作物の生産性向上が要求される。現状では農耕地の更なる拡大は望めないことから、作物の単位収量を向上させる技術の開発は必要不可欠である。植物の生長量はどれだけ光合成を行えるかが鍵となる。光合成経路のうち光化学反応の効率は理論値に近く、光合成の律速段階はカルビン回路である。このカルビン回路を触媒する酵素は作物を含む陸上植物においてはほぼ共通であり、その経路は厳密なフィードバック制御がかかっている。一方、光合成生物として独自の進化を遂げてきた藻類には、陸上植物には見られないタイプの酵素などが存在することが明らかになりつつある。このような酵素であれば、陸上植物の持つカルビン回路のフィードバック制御を受けることなく、カルビン回路の増強が期待できる。これまで草木湖、宮ヶ瀬湖、相模湖をフィールドとして、藻類の中でも細胞径が 0.2 ~ 2 μm のピコプランクトン (ピコシアノバクテリア) の分離および生物相解析を行ってきたが、分離・培養できないものが多いことがわかっている。本研究では草木湖、宮ヶ瀬湖、相模湖等の水域から採取した環境試料についてメタゲノム解析を行い有用遺伝子の情報を取得すると共に、その効果について迅速な評価が可能なモデル生物を用いて検証する。

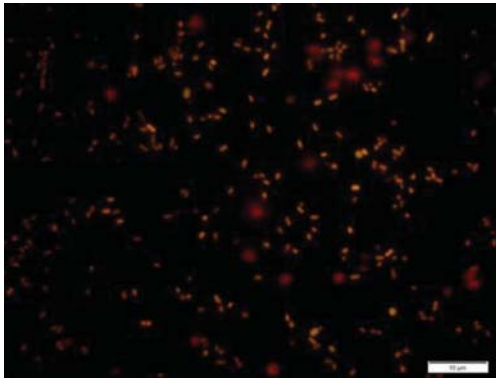
2012 年 7 月 2 日に群馬県草木湖 (写真 1) の表層水を採取した。落射蛍光顕微鏡により観察したところ、ピコプランクトンの中でもピコシアノバクテリアの PE-type が多く存在し (写真 2)、細胞数は 2.2×10^5 cells/ml と 1 年の中でも最大値に近かった。ダム管理所内の実験室においてピコシアノバクテリアの細

胞を孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターにより集菌し、研究室に持ち帰り DNA の抽出を行った。得られた DNA を次世代シーケンサーによって解析した結果、草木湖に生息する微細藻類のメタゲノム情報の取得に成功した。カルビン回路の代謝酵素に着目し、候補遺伝子のクローニングを進めている。

尚、本申請課題は平成 24 年度 東京農業大学戦略研究プロジェクト「藻類の有用遺伝子導入による環境ストレス耐性植物の成長速度の促進」の一環として行っている。



写真 1 草木ダム。独立行政法人水資源機構草木ダム管理所のご協力により、右手に見えるダム堰堤より採水した。



◀写真2 2012年7月2日に草木湖で採取したピコ植物プランクトンの落射蛍光顕微鏡写真。黄色の自家蛍光はピコシアノバクテリアの PE-type、赤い自家蛍光は真核ピコ植物プランクトン (CH-type)、白いバーは 10 μm。

坂田洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 藤本尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)
 渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 小松憲治 (短期大学部 生物生産技術学科)

◆ *Trichoderma* sp. USF-2690 の産生する 生理活性物質 sorbicillinoid 類生合成の鍵となる sorbicillinol 産生ポリケチド合成酵素遺伝子の探索研究 ◆

ポリケチド化合物並びにその関連化合物は天然物における一大グループを形成しており、このグループに含まれる化合物の中からは、テトラサイクリンやマクロライドのような抗生物質、あるいは、スタチンなど生活習慣病改善薬として臨床で重要な働きをする医薬品も数多く見つかっている。これらの物質が示す生理活性は、その分子構造と密接に関連することから、ポリケチド化合物がその生合成により織りなす多彩な分子構造は新たな生理活性に導く大きな可能性を有しており、多くの研究者の興味を引く魅力ある研究テーマとなっている。ポリケチド化合物を生合成する酵素はポリケチド合成酵素 (polyketide synthase, PKS) とよばれ、大きく I 型から III 型に分類されている。中でも糸状菌の PKS は、分子量 200 kDa 前後の iterative 多機能タイプ I 型ポリケチド合成酵素として知られているが、その機能解析は module タイプ I 型酵素に比べ遅れていた。近年になりその研究が精力的に進められ、ポリケチド鎖長の決定や環化反応について酵素の分子構造からの解析が進んできている。

我々のグループは、静岡県産の土壌より分離した *Trichoderma* sp. USF-2690 株の産生する化学的反応性の非常に高いポリケチド化合物である新規物質 sorbicillinol の存在を明らかにし、この化合物を起源とした構造的多様性を有する化合物群である sorbicillinoid 類およびその二量体化合物群である bisorbicillinoid 類に関する生物有機化学的研究を行ってきた。その過程で安定同位体 ¹³C ラベル酢酸を用いた取り込み実験から、アセチル化により安定化された単一の sorbicillinol isotopomer のみが生合成され、また、5-epihydroxyvertinolid の存在も明らかとなったことから、ヘキサケチド鎖から生合成される sorbicillinol が PKS により環化を受ける前に酸化反応により構造修飾を受けている可能性が強く示唆された。PKS は、その分子中に必須構成ドメインである β-ketoacyl synthase (KS)、acyl transferase (AT)、acyl carrier protein (ACP) を含むほか、keto-reductase (KR) や dehydroase (DH) のような酵素特有の修飾ドメインを含むものが知られているが、これまでに酸化酵素活性を触媒するドメインを含む PKS の報告はない。

本研究において我々は、本学ゲノムセンターの次世代シーケンサーによる RNA-seq 法によるシーケンスを行った結果、PKS の必須構成ドメインをもつコンティグを 6 個検出し、その内訳は還元型 PKS と非還元型 PKS が半数ずつであった。なかでも 3 個の非還元型 PKS コンティグのうちの 1 個のコンティグは、ACP ドメインの下流に monooxygenase のドメイン構造が含まれていたことからこのコンティグが sorbicillinoid 類生合成

の鍵となる sorbicillinol 産生 PKS 遺伝子である可能性が高いと予想し、現在詳細な機能解析を行っている。

日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台) 2013.3.24 ~ 28
Trichoderma sp. USF-2690 における sorbicillinoid 生合成に関するポリケチド合成酵素遺伝子 森岡陽、志波優、清水寛之、加藤達也、菅谷紘一、小野瀬淳一、阿部尚樹



Trichoderma sp. USF-2690 の菌糸



Trichoderma sp. USF-2690 の培養液

阿部尚樹 (応用生物科学部 栄養科学科)
 小野瀬淳一 (応用生物科学部 栄養科学科)
 菅谷紘一 (応用生物科学部 栄養科学科)
 志波 優 (生物資源ゲノム解析センター)

◆ 酢酸菌研究におけるゲノム情報および次世代シーケンサー ◆

酢酸菌は、細胞膜上の脱水素酵素による細胞外のアアルコールや糖の酸化反応を電子伝達系と連動させることにより ATP を生成する特殊な代謝生理を有し、細胞外の物質がエタノールである場合、酸化生成物として酢酸を蓄積する。これは特に酢酸発酵と呼ばれ、食酢醸造に用いられている。我々は、長年食酢醸造と酢酸菌の研究に携わっているが、次世代シーケンサーの導入により、以下のような種々の課題の解決への糸口が見え始めている。

1. 酢酸菌システムの整理および見直し

酢酸菌ゲノムは IS が多く、またマイクロサテライトの高い反復伸縮速度のため、概して変異し易いことが知られている。このため 16S rRNA 配列と DNA-DNA ハイブリダイゼーション・表現型間の相関に統一性が見られず、これが新属や新種の矢継ぎ早な設置を招いて、現在システムは混乱している。この部分を解決してシステムに関する見解を整理するには、ゲノム情報に基づく以外に方法が無い。我々は、酢酸菌 15 属 63 種について大規模ゲノム解析を行い、それより抽出した全オルソログコンカテマーのシステムを調べることで、この問題の解決を試みている。現在解析中であるが、対象株数を絞った予備検討においては良好な結果が得られており、有効な見解が得られると考えている。

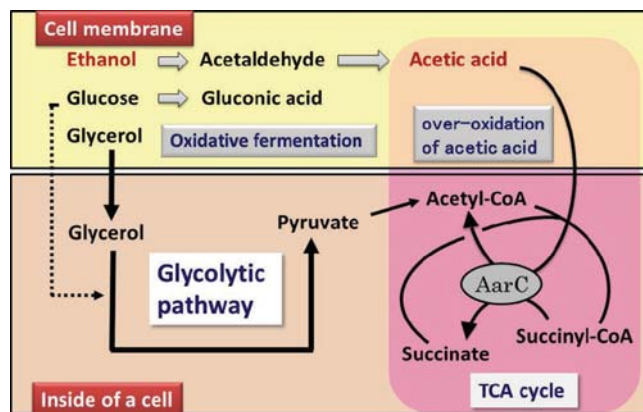
2. 酢酸菌におけるリボソームサブユニット準拠の MALDI-TOF MS によるシステムの有効性の検証

近年、バクテリアの迅速同定法として MALDI-TOF MS による手法が注目を集めており、実用化されてきている。これに付随して、MALDI-TOF MS より得られたピーク準拠の系統解析も試みられており、いくつかの報告も成されている。しかし、これらのシステムの意味合いや有効性については、殆んど議論されていない。我々は、提唱されている MALDI による系統解析法のうち、リボソームサブユニットタンパク質準拠の方法について検証を行っている。Acetobacter 属酢酸菌について、ゲノム情報より全リボソームサブユニット配列を抽出し、その配列の差異によるシステムの意味や MALDI-TOF MS のピークマッチングによるシステムの有効性等について検討を行っており、得られた見解を基に提言を行えればと考えている。

3. RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析

発酵の効率化を図るためには、発酵時の代謝経路や遺伝子の発現制御機構を解明することが必要である。我々は、酢酸発酵開始に関与すると考えられる新規の転写制御因子を見出したが、本因子の破壊株を作製して性質を調べたところ、本因子は発酵開始のみならず、酢酸発酵生理全体に亘り多くの遺伝子を制御している可能性が示唆された。そこで現在、RNA-seq 法を用いて親株と破壊株の間で転写量に差が出る遺伝子を解析中である。これにより、当該因子の制御メカニズムの全体像および酢酸発酵制御の一端が解明できることを期待している。

このように、次世代シーケンサーを用いたゲノムベースの種々の解析は、酢酸菌研究における様々な壁に対するブレイクスルーを提供し、新たなステージへの大きな推進力となっていると感じている。今後、これらの手法は益々有用性を増していくと考えている。



Acetobacter pasteurianus NBRC3283 の基幹代謝経路

学会発表

日本農芸化学会 2012 年度大会 (京都) 2012.3.22 ~ 26 次世代シーケンサーを用いたゲノムスケールでの酢酸菌分類の試み 貝沼 (岡本) 章子、海野祥子、石川森夫、志波優、吉川博文、松谷峰之介、松下一信、山上圭吾、小泉幸道

日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台) 2013.3.24 ~ 28 Acetobacter 属酢酸菌におけるリボソームサブユニット準拠のシステムに関する比較考察 貝沼 (岡本) 章子、松谷峰之介、伊佐地麻代、石川森夫、志波優、吉川博文、薬師寿治、松下一信、小泉幸道

Acetobacter 属酢酸菌における AarC の機能の検証 貝沼 (岡本) 章子、山本有紀、石川森夫、志波優、吉川博文、伊藤公一、小泉幸道

酢酸菌 Acetobacter pasteurianus NBRC3283 株における GntR の機能 貝沼 (岡本) 章子、石川泰平、石川森夫、志波優、吉川博文、伊藤公一、小泉幸道

- 貝沼章子 (応用生物科学部 醸造科学科)
- 石川森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)
- 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 (山口大学 農学部)
- 松谷峰之介 (山口大学 農学部)

研究発表実績

●論文発表

Suzuki S, Hosomichi K, Yokoyama K, Tsuda K, Hara H, Yoshida Y, Fujiwara A, Mizutani M, Shiina T, Kono T, Hanzawa K.

Primary analysis of DNA polymorphisms in the TRIM region (MHC subregion) of the Japanese quail, *Coturnix japonica*. *Animal Sci.* (2012) *in press*

Shiwa Y, Fukushima-Tanaka S, Kasahara K, Horiuchi T, Yoshikawa H.

Whole-Genome Profiling of a Novel Mutagenesis Technique Using Proofreading-Deficient DNA Polymerase δ . *Int. J. Evol. Biol.* 2012: 860797 (2012)

Kanesaki Y, Imamura S, Minoda A, Tanaka K.

External light conditions and internal cell cycle phases coordinate accumulation of chloroplast and mitochondrial transcripts in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* 19: 289-303 (2012)

Suzuki M, Eda Y, Ohsawa S, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Tanaka K, Muramatsu Y, Yoshikawa J, Sato I, Fujii T, Amachi S.

Iodide oxidation by a novel multicopper oxidase from α -proteobacterium strain Q-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 3941-3949 (2012)

Nishida H, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki Y, Yoshikawa H, Taylor TD, Sugiyama J.

Characteristics of nucleosomes and linker DNA regions on the genome of the basidiomycete *Mixia osmundae* revealed by mono- and dinucleosome mapping. *Open Biol.* 2: 120043 (2012)

Watanabe S, Ohbayashi R, Shiwa Y, Noda A, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H.

Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes. *Mol. Microbiol.* 83: 856-65 (2012)

Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Kono T.

Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the *Gpr1-Zdbf2* locus is linked to long *cis*-intergenic transcription. *FEBS Lett.* 586: 827-833 (2012)

Endo M, Kawahara-Miki R, Cao F, Kimura K, Kuwayama T, Monji Y, and Iwata H. Estradiol supports *in vitro* development of bovine early antral follicles. *Reproduction.* 145: 85-96 (2013)

Watanabe S, Shiwa Y, Itaya M, Yoshikawa H.

Complete Sequence of the First Chimera Genome Constructed by Cloning the Whole Genome of *Synechocystis* Strain PCC 6803 into the *Bacillus subtilis* 168 Genome. *J. Bacteriol.* 194 (24): 7007 (2012)

Akanuma G, Ishibashi H, Miyagawa T, Yoshizawa R, Watanabe S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Ushio K, Ishizuka M.

EliA facilitates the induction of lipase expression by stearyl alcohol in *Ralstonia* sp. NT80. *FEMS Microbiol. Lett.* Nov 22. (2012)

Hayashi K, Maekawa I, Tanaka K, Ijyuin S, Shiwa Y, Suzuki I, Niimura Y, Kawasaki S.

Purification and characterization of oxygen-inducible heme catalase from oxygen-tolerant *Bifidobacterium asteroides*. *Microbiology.* 159: 89-95 (2013)

Kato H, Shiwa Y, Oshima K, Machii M, Araya-Kojima T, Zendo T, Shimizu-Kadota M, Hattori M, Sonomoto K, Yoshikawa H.

Complete genome sequence of *Lactococcus lactis* IO-1, a lactic acid bacterium that utilizes xylose and produces high levels of L-lactic acid. *J. Bacteriol.* 194 (8): 2102-3. (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 Res.* 19: 67-79. (2012)

●学会、セミナー等での発表

2013年3月24-28日

日本農芸化学会 2013 年度大会 (仙台)

松本貴嗣, 吉川博文

枯草菌における熱ショック応答と転写開始点の網羅的な解析

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

イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産に関与する MEP 経路遺伝子 *OsDXS3* の転写制御機構の解析

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

染色体因子によりプラスミドの負荷が軽減した自然変異株の解析

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

ドリ系農薬分解菌の分解関連遺伝子の探索

岩田 修, 松本貴嗣, 新谷政己, 高妻篤史, 岡田憲典, 山根久和, 野尻秀昭

プラスミド由来分解系のマスター転写制御因子遺伝子の異なる宿主における発現様式変化

志波 優, 築瀬弘明, 広瀬 侑, 児島友子, 星野英章, 渡辺 智, 善藤威史, 千葉櫻拓, 園元謙二, 門多真理子, 吉川博文

L-乳酸高生産菌 *Enterococcus mundtii* QU25 株のゲノム解析

2013年3月21-23日

第 54 回日本植物生理学会 (岡山)

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

イネの bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* による MEP 経路遺伝子 *OsDXS3* の転写制御機構の解析

杉田千恵子, 田中惟睦, 米谷一樹, 香村吉洋, 松本貴嗣, 吉川博文, 杉田 護

前駆体 tRNA のプロセッシングに働く PPR タンパク質

柴田 (八田) 真理, 吉瀬 (新井) 祐子, 江花薫子, 矢野昌裕, 吉川博文, 若狭 暁

次世代シーケンサーを用いたインディカ・アウス・香り米の全ゲノム塩基配列解析

2012年12月11-14日

第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡)

川原玲香, 佐野 賢, 桑山岳人, 布目三夫, 新村 毅, 松田洋一, 吉村 崇, 河野友宏

次世代シーケンサーを用いたニホンウズラのゲノム配列解析

志波 優, 吉川博文

“COVA: Comparison of variants and functional annotation for next-generation sequencing data”

津田 薫, 三木 (川原) 玲香, 佐野 賢, 今井美咲, 野口龍生, 稲吉洋裕, 河野友宏

次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析によって日本在来牛見島牛で見つかった相当数の遺伝的多様性

兼崎 友, 吉川博文

Genome analyses of the EPS-producing cyanobacteria

2012年11月14日-11月18日

Chick 7: Avian Model Systems (Nagoya, Japan)

Kawahara-Miki, R.

“Genomic sequence and analysis of Japanese quail”

2012年11月5日

第 33 回 GCOE 談話会 (東京)

兼崎 友

「バクテリアのリシーケンス解析から見えてきたこと」

東京大学グローバル COE プログラム 「ゲノム情報ビッグバンから読み解く生命圏」

2012年10月1日-10月2日

2nd Annual Next Generation Sequencing Asia Congress (Singapore)

Shiwa Y, Fukushima-Tanaka S, Kasahara K, Horiuchi T, Yoshikawa H.

“Whole-Genome Profiling of a Novel Mutagenesis Technique Using Proofreading-Deficient DNA Polymerase δ .”

2012年9月15-17日

第76回日本植物学会 (姫路)

兼崎 友, 吉川博文

細胞外多糖生産性ラン藻のゲノム情報

シンポジウム「ラン藻の作る細胞外多糖：生理的機能，ゲノムからのアプローチ，物性と応用の可能性まで」オーガナイザー

2012年9月14-17日

日本鳥学会 2012 年度大会 (東京)

Round Table Discussions “New technology and regional topics for avian phylogeny”

Kawahara-Miki R

“Genomic sequence and analysis of Japanese quail.”

2012年9月4-6日

酵母遺伝学フォーラム第45回研究報告会 (京都)

岩間 亮, 小林 哲, 志波 優, 吉川博文, 堀内裕之, 福田良一, 太田明德

Yarrowia lipolytica における n-アルカンでの遺伝子発現変動とその制御

2012年8月30日-9月2日

4th Congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction (Osaka, Japan)

Endo M, Kawahara-Miki R, Monji Y, Kuwayama T, Kono T, Iwata H.

“Effect of estradiol on antrum formation, oocyte growth, and gene expression in *in vitro* cultured bovine early antral follicles.”

2012年8月30日-9月1日

グラム陽性菌ゲノム機能会議 (焼津)

志波 優, 吉川博文

次世代シーケンサーにおける微生物ゲノム変異解析の実例：どのような種類の変異が何個検出されるのか？

角美有紀, 村上絢野, 志波 優, 吉川博文, 吉田健一

Geobacillus kaustophilus HTA426 の *iol* 変異株とそのサプレッサーの全ゲノム解析

渡辺 智, 松本貴嗣, 志波 優, 板谷光泰, 吉川博文

シアノバチルス 1 号のゲノム機能解析

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参与するクエン酸回路因子の新規機能解析

矢野晃一, 和田哲也, 松本貴嗣, 川口康弘, 増田健太, 関根里恵, 難波恵理, 鈴木祥太, 田上和美, 佐藤勉, 吉川博文, 河村富士夫

枯草菌 *rnn* オペロンのコピー数効果の分子遺伝学的解析

2012年8月5-10日

International Symposium of Phototrophic Prokaryotes 2012 (Porto, Portugal)

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

“Whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803 substrains”

Watanabe S, Ohbayashi R, Shiwa Y, Noda A, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H.

“Light-dependent and asynchronous replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes”

Ohbayashi R, Watanabe S, Kanesaki Y, Narikawa R, Chibazakura T, Ikeuchi M, Yoshikawa H.

“Regulation mechanism of DNA replication in cyanobacteria *Synechococcus elongatus* PCC 7942”

2012年8月3-5日

第30回日本植物細胞分子生物学会 (奈良)

大石和彦, 石原 亨, 渡辺 智, 吉川博文, 若狭 暁

カロテノイドを蓄積するイネ変異カルスの解析

大野貴紀, 松田史生, 柴田 (八田) 真理, 吉瀬祐子, 渡辺 智, 吉川博文, 若狭 暁

芳香族アミノ酸合成の新規制御系探索に向けたシアノバクテリア変異体の解析

2012年6月6-9日

The 12th Asian Conference on Transcription (ACT12) 韓国

Watanabe S, Ohbayashi R, Shiwa Y, Noda A, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H.

“Light-dependent and Asynchronous Replication of Cyanobacterial Multi-copy Chromosomes”

2012年6月5-9日

10th International Symposium on Avian Endocrinology, (Gifu, Japan)

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

“Genomic sequence and analysis of Japanese quail by using the chicken genome sequence as a framework.”

2012年5月26-27日

第53回日本哺乳動物卵子学会 (大阪)

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

ウシの加齢が卵子と初期胚のヒストンのアセチル化状態、遺伝子発現、そして体外発生能力に及ぼす影響

遠藤美和, 川原玲香, 門司恭典, 桑山岳人, 河野友宏, 岩田尚孝

加齢がウシ初期胎状卵胞に及ぼす影響

2012年5月23-25日

第2回 NGS 現場の会 (大阪)

津田 薫, 川原玲香, 佐野 賢, 今井美咲, 野口龍生, 稲吉洋裕, 河野友宏

次世代シーケンサーを用いた日本在来牛「見島牛」の全ゲノム解析と他系統には見られない非同義置換とその変異を持つ遺伝子の抽出

石毛太一郎, 志波 優

ゲノムセンターにおける大量サンプルプレップの経験から～自動化と Mate-Pair ～

松本貴嗣, 吉川博文

枯草菌における転写開始点の網羅的な解析

川原玲香

次世代シーケンサーを用いたニホンウズラの新規ゲノム配列解読

兼崎 友, 志波 優, 松本貴嗣, 柴田真理, 川原玲香, 津田 薫, 今井美咲, 石毛太一郎, 佐野 賢, 若狭 暁, 河野友宏, 矢嶋俊介, 吉川博文

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの紹介

●マスメディア

2012年3月

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、日本経済新聞に紹介されました。

●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: 193 (2012)

