

CONTENTS

ニュースレター発刊にあたって.....	2
日本型イネ品種「雄町」の全ゲノム解読.....	3
日本在来牛「口之島牛」の全ゲノム解読に成功..... 和牛に新たな遺伝情報を提供	4
次世代シーケンサーが拓く微生物ゲノム科学の新展開.....	6
2009年度 活動報告.....	7



口之島牛 (平治物語絵巻 六波羅行幸巻 13世紀作品) p. 4 関連記事
Image: TNM Image Archives Source: <http://TnmArchives.jp/>

ニュースレター発刊にあたって

文部科学省「戦略的研究基盤形成支援事業」の採択を受け、“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”プロジェクトがスタートしました。平成 21 年 2 月に次世代シーケンサー (Genome Analyzer, illumina 社) が納入され、東京農大生物資源ゲノム解析センターが産声を上げました。同 4 月に研究員達が揃い、トレーニングの後、試運転を兼ねてさまざまなトライアルを行ってきました。途中、度重なる装置の不具合にも泣かされましたが、次世代と呼ばれるほど高度な技術で設計されている装置の運転には、何かしらのトラブルを経験しているところが多いようです。会社側の協力もありましたが、研究員達の才能溢れる奮闘により、センターとしての技量は先行機関に負けない成果を出せるまでになったと自負しています。

農学分野のゲノム解析として、トライアルの基幹材料に掲げたのがウシとイネです。日本古来の黒毛和牛の原種を選択し、巨大ゲノム解析の方法論とデータ処理の手法を学びました。ここから高等生物を対象にした研究の可能性と限界について知見を得ることが出来ました。イネについては多くの解析情報が蓄積しているという背景がありますが、こうした蓄積と新技術を融合させる対象として酒米を選びました。多くの醸造関係者を擁する本学としても格好の材料だと思います。中規模ゲノム解析の方法論を習得するとともに、結果を基にしたタイピングアレーの作製にまで見通しを付けました。既に試験場などから結果の公開が待たれています。

ゲノムの小さい微生物では、高速解析技術がもたらす新しい手法をパイロット的に試しました。変異株のリシーケンスや ChIP-seq は、当センターでも

十分解析出来ることを実証し、さらに近縁の既知配列がない de novo アセンブリーに挑戦中です。今後、環境や食糧、医薬といった方面で活躍出来るさまざまな微生物ゲノムを解析対象とする予定です。

これまで何年もかかって解析してきたようなデータが一回に大量に排出されてくるのを目の当たりにすると、時代の進歩を実感せずにはいられません。この驚異的なデータ生産力を多くの人々と共有し、新しい研究の方向性を開拓していければ幸いです。一例として微生物ゲノムの変化を容易に検出できる道が開けたことで、“進化”という現象を実験レベルで追跡することを考えました。有用微生物の育種という、プロジェクトに貢献する目標を遂行しながら、新しい学問分野の創出に繋げていきたいと考えています。

立ち上げから一年近く経ち、センターの業務がほぼ軌道に乗りつつある現状を期に、センターニュースを発刊することになりました。解析業務に追われる中で、どの程度発行出来るか定かではありませんが、研究員達の日頃の活動を少しずつ伝えていければと思います。第 1 号ではこれまでのトライアルを簡単に紹介します。多くの方々が、“次世代”を利用した解析を研究に取り入れ、新しいコンセプトの構築に役立ってくれることを期待しています。

ゲノムセンター世話人

バイオサイエンス学科 教授 吉川 博文
(プロジェクトリーダー)

バイオサイエンス学科 教授 河野 友宏

バイオサイエンス学科 教授 矢嶋 俊介

日本型イネ品種「雄町」の全ゲノム解読

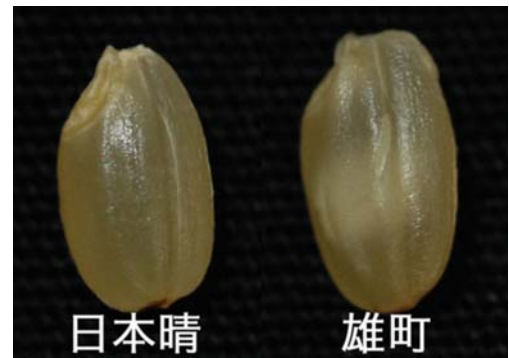
次世代ゲノムシーケンサーの利用により、イネ全ゲノム配列が短期間で解読可能となりました。これにより、従来は難しかった個体間、品種間のゲノム配列の多型を明らかにすることが容易となり、新たな育種法の開発を可能にしています。当センターでは6月より次世代ゲノムシーケンサーを用いた日本型イネ品種「雄町」全ゲノムの解読を開始し、11月にはその解読を終了することができました。得られたゲノム配列情報はイネ育種への活用が期待されます。

日本在来品種「雄町」

「雄町」は安政6年(1859年)に備前国上道郡高島村雄町(現在の岡山市中区雄町)で発見された日本在来品種で、その米は大粒で心白があります。この特徴が酒造りに有利であることから酒米として使われていましたが、害虫に弱く、倒れやすいなどの理由により栽培が難しく、一時は生産量が減少していました。しかし、現在は酒米としての形質の優秀さから生産量が増えつつあります。現在使われている酒米品種の多くは「雄町」の系譜で、有名な「山田錦」は「雄町」の孫にあたります。また、「雄町」は飯米としても栽培されていた過去があり、酒米だけではなく様々な品種作出のための母本としても利用されてきました。このような背景を持つ「雄町」のゲノム配列情報は、現在の育成品種を理解する上で非常に役立つと考えられます。そこで、我々は次世代ゲノムシーケンサーで解読するイネ品種として「雄町」を選択しました。

「雄町」ゲノム配列の解読

「雄町」の葉からゲノムを抽出して次世代ゲノムシーケンサー Genome Analyzer II (GAII、イルミナ社製)で読み取りできる遺伝子断片をつくり、読み取り長75塩基のペアードエンド法(DNA断片の両端の読み取り)で解析しました。GAIIで解読した「雄町」のリード配列223億塩基を「日本晴」ゲノムに照らし合せた結果、核ゲノムに160億塩基、ミトコンドリアゲノムに4億塩基、プラスチ



ドゲノムに6億塩基が一致しました。これは次世代ゲノムシーケンサーでは解読出来ない繰返し配列を除いた「日本晴」ゲノムの98%に相当し、次世代ゲノムシーケンサーによる「雄町」全ゲノム配列の解読を終了することができました。

ゲノム配列の利用

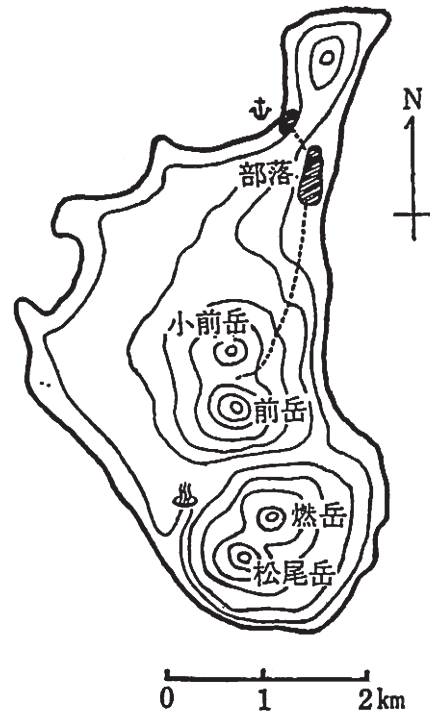
出穂期や食味など、有用な農業形質は複数の遺伝子が関与する量的形質であることが多く、それらの遺伝子の位置をゲノム上の目印であるDNAマーカー(DNAの塩基配列の違い)を使って統計学的に推定するQTL解析は育種に大きく貢献しています。この際、DNAマーカーがゲノム上に多くあるほど高精度に遺伝子の位置を推定することができ、単離、同定へとつなげることができます。また、DNAマーカーは品種を交配して新品種を作出する際、交配後代の個体群から目標とする形質のQTLや遺伝子をもつ個体や系統を選ぶための強力な道具となります。しかし、ゲノムのDNA配列が非常に似ている日本型イネ品種のような近縁品種間では、有効なDNAマーカーがほとんどありませんでした。今回、解読した「雄町」ゲノム配列と「日本晴」ゲノム配列を比較したところ、DNAマーカーの一種である1塩基多型を6万ヶ所以上見いだすことができました。これらを用いて各種形質のQTL解析を進めています。さらに、大量のDNAマーカーの提供は今後のイネ育種に大きく貢献できると期待しています。本研究はイネゲノム研究が盛んな独立行政法人農業生物資源研究所QTLゲノム育種研究センターとの共同で行っています。(吉瀬(新井)祐子)

日本在来牛「口之島牛」の全ゲノム解読に成功 和牛に新たな遺伝情報を提供

現在の和牛は、古くからいた日本の在来種に輸入した西洋種を掛け合わせて作られたもので、その起源は明治時代より後のものです。第二次大戦後に、役用として牛が使われなくなったので、1950年代から肉用としての改良が進み、1962年（昭和37年）に最初の審査基準が定まり、その後何度かの改訂を経ています。現在、その改訂された審査基準を基に品種改良が行われ、体格・肉質の向上を含め、優れた経済形質の獲得を目的として、厳しい選抜が行われています。しかしこの度重なる選抜で、審査をクリアする形質に限られてしまい、優良な形質を残すための種牛の頭数も、雌牛に比べると極端に少ない状態になってしまいました。種牛の精子は大量に凍結保存されるため、生産される牛の遺伝的な形質はかなり限定的になってしまっていると言えます。従って、現状の和牛の遺伝的多様性が減少していることが危惧され、何らかの対応に迫られています。

日本在来牛の「口之島牛」

日本在来牛は、古くは平安時代から飼われていた記録が残っています。平治物語絵巻（国宝）に登場する牛車を引く牛もその様子を表したものです（平治物語絵巻六波羅行幸巻 13世紀作品）。鹿児島県トカラ列島の口之島に生存している「口之島牛」は、古くは明治初期の『口之島記』（『拾島状況録』 笹森儀助 1895年著）にその存在が記録されています。その記述によると、「本島、牛七頭ヲ有シタルモ之ヲ制御スルノ方法ヲ知ラス、故ニ之ヲ農業ニ使用セス。亦肥料ヲ収メス、徒ニ野ニ放飼ス。故ニ自ラ請フテ諏訪ノ瀬ニ送リタルモノ六頭、今ハ唯雌牛一頭ヲ存スルノミ。」となっていて、その時点で既に飼育放棄されていたことが判ります。これ以降の記録を見ても、外国産の牛をはじめ、トカラ列島以外の地域から牛を導入したという事実はありません。従って、口之島には日本古来の牛が外部からの



『口之島記』 笹森儀助（1895）『拾島状況録』

本島、牛七頭ヲ有シタルモ之ヲ制御スルノ方法ヲ知ラス、故ニ之ヲ農業ニ使用セス。亦肥料ヲ収メス、徒ニ野ニ放飼ス。故ニ自ラ請フテ諏訪ノ瀬ニ送リタルモノ六頭、今ハ唯雌牛一頭ヲ存スルノミ。

影響を受けずに野生化した状態で存在していると言えます。この様に野生化の状態の口之島牛ですが、元々は日本在来牛の特徴を保持しているもので、和牛作成の時に経済形質の選抜から漏れたものの、古代から受け継がれてきた未発見の豊富な遺伝的多型を、口之島牛が保持していることは十分に考えられます。

現在西洋種を中心にウシの1塩基多型（SNPs）解析が国際的な計画で進められています。それに伴って参考となる情報も整いつつありますが、何故か和牛はその対象には入っておらず、国際的に公表できる遺伝的情報が無いのです。



名古屋大設楽フィールドで飼育されている口之島牛の雄
2009年5月（東京農業大学 津田撮影）

日本在来牛のゲノム解析

名古屋大学大学院生命農学研究科附属フィールド科学教育研究センター設楽フィールドで日本在来牛である口之島牛が飼育されています。私たちは彼らの雄から血液を採り、そこから抽出したDNAを用いてDNAライブラリ^{*注1}を作成し、それを基に次世代シーケンサーを使って全ゲノム^{*注2}塩基配列解析を行いました。

その結果、既存の西洋種（ヘレフォード種）の全ゲノム塩基配列に対し、624万箇所にも1塩基多型（SNP）をゲノム間の比較によって発見しました。牛のゲノムサイズは2.9ギガ塩基対（29億塩基対）であることから、既存の西洋種のゲノム配列に対して0.2%の変異があることを表しています。このデータは牛の全染色体の90%を網羅しています。これらの1塩基多型（SNP）は10倍以上のRead Depth^{*注3}という、信頼するに値する数値をもって保証することが出来ました。さらにこれらのSNPsは、データベースであるdbSNPで検索したところ、88%が既存のゲノム配列にない新規のSNPsであることが判りました。この0.2%という数値をヒトに当てはめると、2008年に報告されたアジア人と西洋人の人種間における包括的なゲノム配列の比較を行った結果の数値と同等のものであることが判りました（Jun Wang et al. The diploid genome sequence of an Asian individual Nature 456, 60–65,

2008)。従って、今回の結果は、西洋種と日本在来種という品種間の遺伝的な差を表すものであると考えられます。

得られた口之島牛の全ゲノムデータをさらに詳細な分析に用いるため、私たちは西洋種の配列に当てる形でデータベースを作成しました。これによって、遺伝子間の変異も検出可能になり、今後口之島牛の形質に関わる遺伝子を調査することが可能となりました。口之島牛は、過去、和牛作成の基本形となり、西洋種との交配に使われた日本在来牛の遺伝的な形質を残していると考えられます。今後の口之島牛と西洋牛間の詳細な解析によって、現在の和牛の形質や疾病に関係する遺伝的な要素を検出できる可能性を秘めています。加えて、経済形質の選抜によって失われた遺伝的な因子を検出して、今後の和牛の経済形質作成における遺伝情報に役立てることが期待できます。

なお、この研究は東京農業大学が「文部科学省私立大学戦略的研究拠点形成支援事業」の支援を受け、名古屋大学との共同研究として実施されたものです。

（津田 薫、三木(川原)玲香）

*注1 200塩基（bp）の長さに全て断片化したDNAを集めたもの。

*注2 牛ゲノム全長は29億塩基。ゲノムには、タンパク質のアミノ酸配列をコードするコーディング領域と、それ以外のいわゆるノンコーディング領域があり、次世代シーケンサーではこれら全ゲノムを網羅的に解読できる。

*注3 同じ領域を複数回重複して読み、その重複回数による信頼度

次世代シーケンサーが拓く微生物ゲノム科学の新展開

多様な解析を可能にするプラットフォーム

次世代シーケンサーによる塩基配列決定速度の飛躍的向上とマルチプレックス法という多サンプル同時解析手法の登場により、バクテリアなどゲノムサイズの小さな生物種の研究戦略は今後大きく変わっていくと予想されます。例えば、野生株と突然変異株との間における塩基配列の変異箇所をたった1回のシーケンス作業により全ゲノムレベルで同定可能です。こうしたリシーケンス解析が極めて容易になったことで、遺伝学的解析手法が再評価されるはずです。また、我々が導入しているゲノムアナライザのような短鎖のリードを大量に読むタイプの次世代シーケンサーは定量的な解析にも応用できるので、ChIP-seq 法や遺伝子発現プロファイル比較などに使用できます。これらの解析は従来のタイリングアレイやマイクロアレイと異なり、種特異的な解析プラットフォームを設計することなく実行可能です。つまり次世代シーケンサーを用いることで、ゲノム未知の生物において、従来不可能だったポストゲノム解析の手法をいきなり実施できるわけです。これにより、今後さまざまな有用微生物種の分子レベルでの解析が急速に発展すると思われます。と同時に、それらを統合的に解析するバイオインフォマティクスの分野の発展がさらに必要になるはずです。

農大生物資源ゲノム解析センターでは、これまでにシアノバクテリアや枯草菌、乳酸菌などのリシーケンス解析や ChIP-seq 解析をおこなっており、今後さらに多様な微生物種のゲノム解析を進める計画です。以下に、これまで当センターで解析をおこなった枯草菌や根粒菌のゲノム解析の例を紹介します。

次世代シーケンサーによる枯草菌ゲノム解析

モデル微生物として確立している枯草菌について、研究室で維持している野生株のゲノム解析をおこないました。その結果、1997年に発表されたゲノム配列と比較すると、数多くの塩基置換や挿入欠失領域が見つかりました。このことから、バクテリアのゲノムは想像以上に短期間に変化することが明

らかになりました。また対数増殖期と定常期のゲノム解析をおこなったところ、ゲノム中の一定領域ごとのリード数の差が、複製起点 (ori) と終点 (ter) を見事に反映していました (図1)。この興味深い事実は、ゲノム未知のバクテリア種においても次世代シーケンサーを用いることで複製起点の同定が容易に可能であることを示しています。

有用微生物のゲノム解析

我々の皮膚や腸管といった身近なところから、人間が立ち入ることさえできない極限環境まで、微生

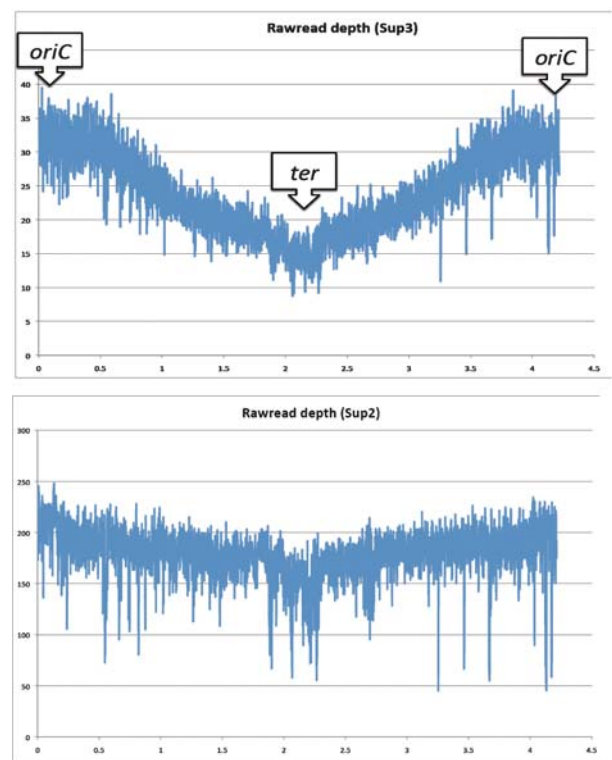


図1 枯草菌のゲノム解析例。枯草菌ゲノムを対数増殖期(上)と定常期(下)の細胞から抽出し、ゲノムアナライザで解析した。既知のリファレンス配列に対して、ランダムに解読した35baseのリード配列の貼り付け(マッピング)をおこない、ゲノム上の位置を横軸に、領域ごとに貼り付いたリード配列数を縦軸にプロットした。対数増殖期ではDNA複製途中の細胞が多くなることから、複製起点(ori)付近のほうが終点(ter)付近よりもDNA量比が多くなり、結果的にチャート上では複製起点が山となり、終点が谷となる。一方、定常期ではDNA複製をおこなっている細胞数が少ないため、リード数のチャートは水平に近くなる。

物は地球上のあらゆる場所に生息しています。それ故、極めて多様な特性を有しており、多くの微生物が産業的に利用されています。例えば、発酵食品の製造には酵母や麹カビ、乳酸菌などが使われ、洗剤に配合される酵素はアルカリ環境で育つ微生物に由来しています。これまでは自然変異により有用形質が強化された菌株を単離しても、その原因を明らかにすることは非常に困難でした。しかし、次世代シーケンサーを用いた解析では変異箇所を網羅的に同定できるため、変異と形質を関連付けた効率的な育種を行うことが可能になります。一例として、窒素循環に働くゲノム既知の根粒菌の変異株を解析したところ、約 9 Mb の染色体に 70 個程度の変異が

検出されました。これらの変異はゲノム上の様々な遺伝子座に散らばっており、その多くは機能未同定の遺伝子でした。これまでの育種分野の研究は特定の代謝系遺伝子の変異についてのみ解析する例が多かったのですが、こうしたゲノム再解析の手法の普及により、予想外の遺伝子が目的物質の代謝に関与している事例が明らかになると考えられます。

農大生物資源ゲノム解析センターでは今後さらに、薬品・食品・エネルギー資源といった分野での有用物質の生産や、有害な化学物質の分解による環境浄化などで重要な役割を担う微生物種のゲノム解析を進め、様々な農学分野の発展に貢献していきたいと考えています。（兼崎友、松本貴嗣、志波優）

2009 年度 活動報告

2009 年 4 月 研究員が着任し、本格的に始動。およそ月 2 回のペースで Genome Analyzer のランを行い、テストとデータ収集を実施。

2009 年 12 月 厚木およびオホーツクキャンパスにワークステーションを設置。今後、Genome Analyzer のデータにアクセス可能に。また、これまでの実績を基に、厚木・オホーツクを結んで、世田谷から報告会と学内プロジェクト募集説明会を開催。

2010 年 3 月 次世代シーケンサーを使用したプロジェクトとして 3 キャンパスの先生方から高等動物を対象とする 6 課題、微生物を対象とする 4 課題を提案頂いた。新年度より先生方と共同して順次開始予定。

研究発表実績

2009 年 4 月 「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」キックオフシンポジウム開催（東京ガーデンパレス）

9 月 「グラム陽性菌ゲノム機能会議」にて発表

12 月 「ラン藻の分子生物学 2009」にて発表

「第 32 回日本分子生物学会年会」にて発表

2010 年 3 月 「第 4 回日本ゲノム微生物学会年会」にて発表

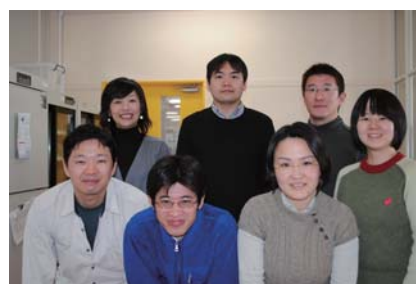
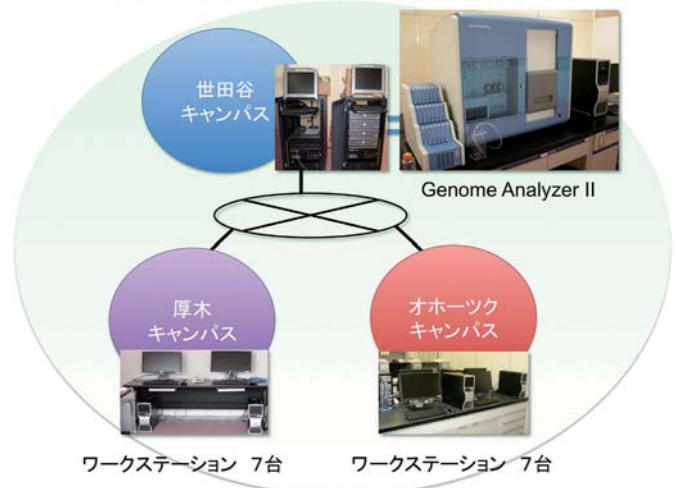
「日本畜産学会第 112 回大会」にて発表

「日本育種学会第 117 回大会」にて発表

「日本農芸化学会 2010 年度大会」にて発表

「日本植物生理学会 2010 年度大会」にて発表

3 キャンパスを結ぶ 東京農大生物資源ゲノム解析センター



常勤スタッフ

NGRC ニュース No. 1 (創刊号) 2010年3月発行
学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター
〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1
TEL 03-5477-2769 FAX 03-5477-2377
E-mail nodaigc@nodai.ac.jp

