



生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター No. 7
NGRCニュース No. 11

2019年度

CONTENTS

巻頭言	2
生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター	3
<hr/>	
生物資源ゲノム解析センターの運用実績	5
共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」	
生物資源ゲノム解析センター 情報発信活動	6
令和元年度 研究発表実績	7
2019年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧	9
乾燥ストレスにより根組織特異的に発現誘導される転写因子の機能解析	11
アブシシン酸受容体をもたらすコムギ病害抵抗性機構の解析	12
もろみ培地での実用的酢酸発酵を可能にする低栄養発酵培地への酢酸菌株の実験室進化・適応育種	13
イネ生殖細胞特異的 Argonaute タンパク質 MEL1 の標的 RNA の FA-CLIP-seq 法による同定	14
雑穀アワの組換え近交系のリシークエンシング—新規マッピング集団の構築	15
シロイヌナズナ Wt-1 における塩馴化後浸透圧耐性損失因子の遺伝学的解析	16
栄養膜細胞の分化運命決定の分子基盤に関する研究	17
アジア諸国におけるバナナの遺伝的多様性からみた栽培文化の人類学的研究	18
出芽酵母における基本転写因子 TFIID とその類縁複合体 SAGA の機能解析	19
イトマキヒトデの変態を制御する分子基盤	20
メタノール資化能を持つ大腸菌の創製に向けた実験室進化により取得したメタノール・ホルムアルデヒド耐性株のゲノム変異解析	21
ベクターパーティクル：新たな遺伝子伝搬機構の解明	22
アブラナ科自家不和合性の安定性に関わる SRK 受容体ドメイン内アミノ酸残基の網羅的探索	23
真核単細胞紅藻 <i>Galdieria sulphuraria</i> の強酸耐性機構の解析	24
プラスミド由来の H-NS ファミリータンパク質が宿主染色体由来のホモログの結合箇所に与える影響の解析	25
成長段階に応じた葉の形態を制御し作物の生産性を向上させる分子基盤の構築	26
ナミtentウの多様な斑紋を創出する染色体構造の解明と斑紋の操作	27
環境変動が沿岸に生息する水生生物の多様性に及ぼす影響	28
緑藻クラミドモナスの N 欠乏に応答した脂質蓄積制御機構	29
In-vitro 肥大誘導を受けた <i>Brassica rapa</i> のトランスクリプトームの特徴づけ	30
ニンニク遺伝資源における一塩基変異多型用いたコアコレクションの構築	31
様々な重力環境で育成したヒメツリガネゴケにおける発現変動遺伝子の解析	32
NGRC ニュースレター	33
<hr/>	
2019年度 学内公募一覧	35
オルガノイド培養法を用いたマウス消化管内分泌細胞の解析	39
マウス始原生殖細胞における性分化関連マイクロ RNA の役割	41
マルチスケール精神病態の同定を目的としたトランスクリプトーム網羅的解析	43
卵子の発育を支える卵胞液中の miRNA	45
シロイヌナズナの乾燥耐性機構におけるタンパク質リン酸化酵素 ARK の役割	46
ナチュラルバリエーションを利用した植物の環境ストレス耐性の解明	48
植物ホルモン機能の制御による根寄生雑草防除技術の開発研究	49
熟成チーズから分離された好塩・好アルカリ性乳酸菌のゲノムから見える特性	51
国酒酵母の全ゲノムによる系統分類と醸造学的実用化	53
シアノバクテリアにおける DNA 修復酵素に関する研究	55
ミツバチ消化管内乳酸菌の共生関係に関する研究	56
塩生植物シバナの根圏微生物叢の解析	58
ヤマイモに棲息する窒素固定細菌のフローラ解析	59
研究発表実績	60

次世代シーケンサー技術利用の広がりのなかで

平成 30 年度より文部科学省特色ある共同利用共同研究拠点事業が二期目に入っています。共同利用・共同研究のシステムが我が国の学術研究の発展に大きく貢献してきているとの認識のもと、バイオ戦略 2019 が策定される経過の中でも、文科省における主な研究基盤整備の一つとしてゲノム解析センターが取り上げられていました。

また、次世代シーケンサー (NGS) 技術はすでに一般的な技術として利用されるようになり、シングルセル解析、環境 DNA 解析といわれるような様々な周辺技術開発と相まって、遺伝情報解析に必須な手法となり、また新たな研究分野の開拓につながっています。

本ニュースレターでは、2019 年度の生物資源ゲノム解析センターの活動状況を、利用研究者からの研究紹介、報告としてまとめました。当センターの実績としては RNA-seq が研究のほとんどを占めていますが、対象生物は多様です。また、当センターではシーケンスのみならず、データ解析のための講習会なども開催し、できるだけ研究者が自前でデータを取り扱えるようになることも支援をしています。

本学での大学院生の研究にも NGS の手法が広く利用されるようになってきていますが、これからこの技術を利用したいと考えている研究者も多くいると思います。そのような研究者の掘り起こしや、この技術を利用するためのハードルが低くなることを目指して、我々はセンターの活動を続けています。

今後も、学内学外との共同研究を通じて、NGS を利用した研究の発展に貢献できるように努めていきたいと考えております。

(生物資源ゲノム解析センター センター長 矢嶋俊介)

生物資源ゲノム解析拠点 ニュースレター

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

2020年3月号

共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」

生物資源ゲノム解析センターの運用実績

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、文部科学省の認定による生物資源ゲノム解析拠点の運用を開始してから7年、今年度は2期目として再始動しました。本拠点は、我が国の農学分野を中心とする新たな研究領域の開拓を図り、本学と学外の研究者間における共同研究を対象に、今日では多くの研究分野で活用されている次世代シーケンサー（NGS）を利用した遺伝情報解析を支援しています。また、この支援活動では、学内ー学外間で研究者同士の新たなコミュニティの創成、さらには農学分野で遺伝情報解析を介した研究を担う人材育成に貢献することも目指しています。

当センターは、Illumina社のNGSを4台、解析サーバーを9台設置しており、ライブラリー調製からシーケンサーのオペレーション、データ解析までを一貫して行える研究員が常勤しています。各研究員は、それぞれ専門分野を中心に微生物から高等な動植物まで多岐にわたる生物種を対象に、ゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、メタゲノムなど様々な解析目的の研究課題に対応できる体制となっています。

令和元年度は、27件の研究課題に対して解析支援を実施しましたが、これまで通り多くの研究者の方々から農学分野において重要な生物を対象とした様々な研究課題の申請があり、採択件数は初年度から累積すると250件を超えました（図1）。そして、今年度の採択課題の対象生物種には、動物、植物、微生物のほか、環境サンプルも含まれました。また、解析手法別にまとめると、これまでと同様に今年度も網羅的な発現量解析を目的とするRNA-seqを用いた課題が半数を占めました（図2）。一方、その他の解析としてHi-C、Lasy-seq、FA-CLIP-seqを用いた研究課題に初めて取り組みました。さらに、すでに導入していたRAD-seqでは、基礎生物学研究所 重信秀治教授のグループとの共同研究によりFlexible ddRAD-seq法を取り入れ、これまで以上の多サンプルに対応できるようになりました。これらのことから、当センターが対応できる解析手法は、一層増えているといえます。

今年度は、新たな解析サーバーを導入したことで、さらに充実した解析環境へと整備されました。さらに、セミナーの開催や当センターの見学案内により、多くの研究者に対してNGS解析に関わる技術や研究紹介を行うことができました。今後も、共同研究や情報発信を通して学内外の研究者間の交流を深め、NGSを用いた研究に貢献できるよう取り組んで参ります。

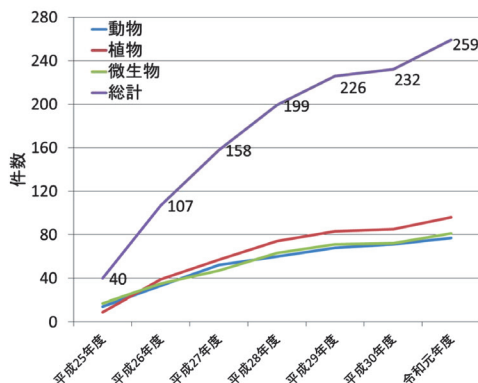


図1 共同利用・共同研究課題件数（累積）

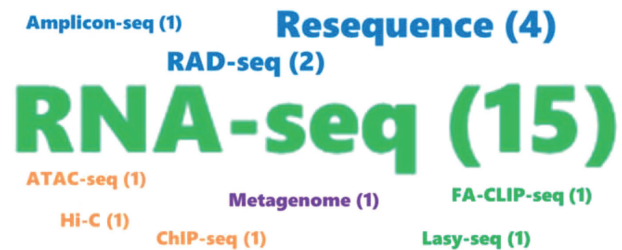


図2 共同研究課題における解析手法

各解析手法の括弧内には、課題件数を示す。DNAベースによる解析を青字、RNAベースによる解析を緑字、メタベースによる解析を紫字、エピゲノムベースによる解析を橙字で示す。

（生物資源ゲノム解析センター 田中啓介）

生物資源ゲノム解析センター 情報発信活動

当センターは、次世代シーケンサー (NGS) やそれに関連する知見を深めること、研究者コミュニティを広げることを目的として、セミナーの開催や施設見学を通して情報発信活動も行っています。

今年度で開催したセミナーでは、3テーマについて実施しました。まず、2019年7月に「解析ソフトウェア講習会」を開催しました。株式会社ワールドフュージョンの岡岳彦博士による、NGS解析用ソフトウェアの一つである CLC Genomics Workbench の使い方を学ぶための、ハンズオントレーニングを行いました。次に、2019年11月に「統合データベース講習会:AJACS 世田谷」をバイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) との共催の下で実施しました。NBDC の八塚茂先生、ライフサイエンス統合データベースセンターの山本泰智先生と仲里猛留先生、国立遺伝学研究所の森宙史先生から、生命科学系のデータベースやツールの使い方等に関してご講演頂きました。そして、2020年1月に「リアルタイムPCRとMIQEガイドライン講習会」を開催しました。プロメガ株式会社の安江優介博士を講師として、リアルタイムPCRの実験での注意点やデータの評価に関してご講演頂きました。これらセミナーには、本学の様々な学科における教員や学生の方々が参加されていたことから、NGSに関連する技術や情報について、非常に興味を持たれている方、必要とされている方が多いことが伺えました。さらに、統合データベース講習会では、学外の研究者も多数参加いただき、研究者交流の場としても役目を果たせたのではないかと考えます。

一方、当センターの施設見学には、今年度も様々な分野や所属機関の方々が訪れました。中でも、遠方からはインドネシア科学院の学生の方々が、そのほか本学の協定校を中心に学生の見学が多くなりました。このことから、当センターは共同利用・共同研究における解析支援の活動紹介だけではなく、NGSをベースとした生物情報学に対する教育の一環として役立つことにもつながればと期待しています。

生物資源ゲノム解析センターは、今後も遺伝情報解析による支援活動のほか、セミナーの開催や施設見学会を通して情報発信活動を積極的に推進します。



解析ソフトウェア講習会



統合データベース講習会：AJACS 世田谷

(提供：科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター)



リアルタイムPCRとMIQEガイドライン講習会



インドネシア科学院から来訪された学生さんの見学

(生物資源ゲノム解析センター 田中啓介)

令和元年度 研究発表実績

○論文発表

- **Abdelrahman M, Hirata S, Sawada Y, Yokota-Hirai M, Sato S, Hirakawa H, Mine Y, Tanaka K, Shigyo M.**
Widely targeted metabolome and transcriptome landscapes of *Allium fistulosum*? *A. cepa* chromosome addition lines revealed a flavonoid hot spot on chromosome 5A.
Sci. Rep. (2019) 9: 3541.
- **Shinkawa H, Kajikawa M, Nomura Y, Ogura M, Sawaragi Y, Yamano T, Nakagami H, Sugiyama N, Ishihama Y, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Fukuzawa H.**
Algal protein kinase, Triacylglycerol accumulation regulator 1, modulates cell viability and gametogenesis in carbon/nitrogen-imbalanced conditions.
Plant Cell Physiol. (2019) 60: 916-930.
- **Abe K, Kanesaki Y, Abdel-Rahman MA, Watanabe S, Zendo T, Chibazakura T, Shimizu-Kadota M, Sonomoto K, Yoshikawa H.**
Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* QU50, a thermophilic lactic acid bacterium capable of metabolizing xylose.
Microbiol. Resour. Announc. (2019) 8: e00413-19.
- **Kosaka T, Nakajima Y, Ishii A, Yamashita M, Yoshida S, Murata M, Kato K, Shiromaru Y, Kato S, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Matsutani M, Thanonkeo P, Yamada M.**
Capacity for survival in global warming: Adaptation of mesophiles to the temperature upper limit.
PLoS One. (2019) 14: e0215614.
- **Kawai K, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Hirasawa T.**
Identification of metabolic engineering targets for improving glycerol assimilation ability of *Saccharomyces cerevisiae* based on adaptive laboratory evolution and transcriptome analysis.
J. Biosci. Bioeng. (2019) 128(2): 162-169.
- **Watanabe K, Kanaoka Y, Mizutani S, Uchiyama H, Yajima S, Watada M, Uemura T, Hattori Y.**
Interspecies comparative analyses reveal distinct carbohydrate-responsive systems among *Drosophila* species.
Cell Rep. (2019) 28(10): 2594-2607.
- **Uchiyama H, Sasaki K, Hinosawa S, Tanaka K, Matsumura K, Yajima S, Miyatake T.**
Transcriptomic comparison between beetle strains selected for short and long durations of death feigning.
Sci. Rep. (2019) 9: 14001.
- **Nihashi Y, Umezawa K, Shinji S, Hamaguchi Y, Kobayashi H, Kono T, Ono T, Kagami H, Takaya T.**
Distinct cell proliferation, myogenic differentiation, and gene expression in skeletal muscle myoblasts of layer and broiler chickens.
Sci. Rep. (2019) 9: 16527.
- **Fukuda W, Yamori Y, Hamakawa M, Osaki M, Fukuda M, Hidese R, Kanesaki Y, Okamoto-Kainuma A, Kato S, Fujiwara S.**
Genes regulated by branched-chain polyamine in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*.
Amino Acids. (2019) 1-13.

- **Kurata M, Fujiwara N, Fujita K, Yamanaka Y, Seno S, Kobayashi H, Miyamae Y, Takahashi N, Shibuya Y, Masuda S.**
Food-derived compounds apigenin and luteolin modulate mRNA splicing of introns with weak splice sites.
iScience. (2019) 22: 336-352.
- **Bogutz AB, Brind'Amour J, Kobayashi H, Jensen KN, Nakabayashi K, Imai H, Lorincz MC, Lefebvre L.**
Evolution of imprinting via lineage-specific insertion of retroviral promoters.
Nat. Commun. (2019) 10: 5674.
- **Seki K, Komatsu K, Tanaka K, Hiraga M, Kajiya-Kanegae H, Matsumura H, Uno Y.**
A CIN-like TCP transcription factor (*LsTCP4*) having retrotransposon insertion associates with a shift from Salinas type to Empire type in crisphead lettuce (*Lactuca sativa* L.)
Hortic. Res. (2020) 7(1): 1-14.
- **Kobayashi T, Kobayashi H, Goto T, Takashima T, Oikawa M, Ikeda H, Terada R, Yoshida F, Sanbo M, Nakauchi H, Kurimoto K, Hirabayashi M.**
Germline development in rat revealed by visualization and deletion of *Prdm14*.
Development. (2020) 147: 4.

2019年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧

1. 関 原明（理化学研究所）
「乾燥ストレスにより根組織特異的に発現誘導される転写因子の機能解析」
2. 岡本 昌憲（宇都宮大学）
「アブシシン酸受容体をもたらすコムギ病害抵抗性機構の解析」
3. 松下 一信（山口大学）
「実用的な低栄養発酵培地において高温酢酸発酵が可能な酢酸菌株の適応育種とその発現解析」
4. 野々村 賢一（国立遺伝学研究所）
「イネ生殖細胞特異的 Argonaute タンパク質 MEL1 の標的 RNA の FA-CLIP-seq 法による同定」
5. 福永 健二（県立広島大学）
「雑穀アワの組換え近交系のリシーケンシング — 新規マッピング集団の構築」
6. 有賀 裕剛（農業・食品産業技術研究機構）
「シロイヌナズナ Wt-1 における塩馴化後浸透圧耐性損失因子の遺伝学的解析」
7. 田中 智（東京大学）
「マウス栄養膜細胞分化を制御する細胞内シグナルの同定」
8. 小松 かおり（北海学園大学）
「アジア諸国におけるバナナの遺伝的多様性からみた栽培文化の人類学的研究」
9. 古久保 哲朗（横浜市立大学）
「出芽酵母における基本転写因子 TFIID とその類縁複合体 SAGA の機能解析」
10. 古川 亮平（慶應義塾大学）
「イトマキヒトデの変態を制御する分子基盤」
11. 平沢 敦（東京工業大学）
「メタノール資化能を持つ大腸菌の創製に向けた実験室進化により取得したメタノール・ホルムアルデヒド耐性株のゲノム変異解析」
12. 千浦 博（東京農工大学）
「ベクターパーティクル：新たな遺伝子伝搬機構の解明」
13. 北柴 大泰（東北大学）
「アブラナ科自家不和合性の安定性に関わる SRK 受容体ドメイン内アミノ酸残基の網羅的探索」
14. 兼崎 友（静岡大学）
「箱根大涌谷から単離された真核紅藻 *Galdieria sulphuraria* の強酸・アルカリ耐性機構の解析」

15. 水口 千穂 (東京大学)
「プラスミド由来の H-NS ファミリータンパク質が宿主染色体由来のホモログの結合箇所に与える影響の解析」
16. 鳥羽 大陽 (東北大学)
「成長段階に応じた葉の形態を制御し作物の生産性を向上させる分子基盤の構築」
17. 安藤 俊哉 (基礎生物学研究所)
「ナミテントウの多様な斑紋を創出する染色体構造の解明と斑紋の操作」
18. 奥村 裕 (水産研究・教育機構 東北区水産研究所)
「環境変動が沿岸に生息する水生生物の多様性に及ぼす影響」
19. 仲宗根 薫 (近畿大学)
「*Burkholderia plantarii* の植物毒素トロポロン生合成とその制御機構の解明によるイネ苗立枯病の防除」
20. 福澤 秀哉 (京都大学)
「藻類における窒素源の変動に応答したトリアシルグリセロール蓄積制御機構の解明」
21. 高野 哲夫 (東京大学)
「In-vitro 肥大誘導を受けた *Brassica rapa* のトランスクリプトームの特徴づけ」
22. 執行 正義 (山口大学)
「ニンニク遺伝資源における一塩基変異多型用いたコアコレクションの構築」
23. 藤田 知道 (北海道大学)
「様々な重力環境で育成したヒメツリガネゴケにおける発現変動遺伝子の解析」

〈課題番号順〉

乾燥ストレスにより根組織特異的に 発現誘導される転写因子の機能解析

地球規模での異常気象による農業生産被害が毎年世界の各地で報告され、それに伴い食糧価格の高騰などが起こりストレス耐性作物に対する社会的ニーズは非常に高い。世界の人口は2050年には100億人に達すると予想されており、国際的農業生産の増加、安定化のためには乾燥ストレスなど不良環境地での農業が必要である。植物のバイオマス・収量の減少無しで植物にストレス耐性を強化する技術の開発が重要で、そのために植物の乾燥ストレス応答の分子機構の全貌解明が必要である。植物の環境ストレス適応機構の解明や耐性植物の作出は、乾燥・高温・低温・塩ストレス応答性遺伝子などの機能解明を通じて行われてきた。しかしながら、従来の解析は主に地上部組織において発現誘導される転写因子などの制御タンパク質や機能タンパク質をコードする遺伝子を対象として研究が進んできた。植物の根は、乾燥ストレスに応答して土壌水分量の低下を検出しその生化学的および代謝的プロファイルを変化させることにより適応しているが、乾燥ストレス適応における根の役割に関しては不明な点が多く残ったままである。本代表者らは地上部組織に加えて根組織における乾燥ストレス条件下でのトランスクリプトーム解析から、根組織特異的に乾燥ストレスにより発現誘導される転写因子などを同定しそれらの機能解析

を進めている(Rasheed et al. 2016, Front. Plant Sci.)。最近、根組織特異的に乾燥ストレスにより発現誘導される新規な転写因子(MYB-AおよびMYB-B)の過剰発現系統が乾燥ストレス耐性を示すことを見出した(図1)。

本研究では、関チームリーダー(理研)と東京農大の太治教授のグループが共同してRNA-seq解析を行い(生物資源ゲノム解析センターの共同研究拠点施設を活用)、MYB-AおよびMYB-Bの下流で機能する遺伝子を同定し、乾燥ストレス適応におけるMYB-AおよびMYB-Bが関与する転写制御ネットワークの解明を目指す。本研究を通して植物の乾燥ストレス適応の分子機構に関する我々の理解が進むとともに、得られる知見は乾燥ストレス耐性作物の分子育種の推進への活用が期待される。

Reference:

Rasheed, S., Bashir, K., Matsui, A., Tanaka, M. and Seki, M. (2016) Transcriptomic analysis of soil-grown *Arabidopsis thaliana* roots and shoots in response to a drought stress. Front. Plant Sci. 7: 180.

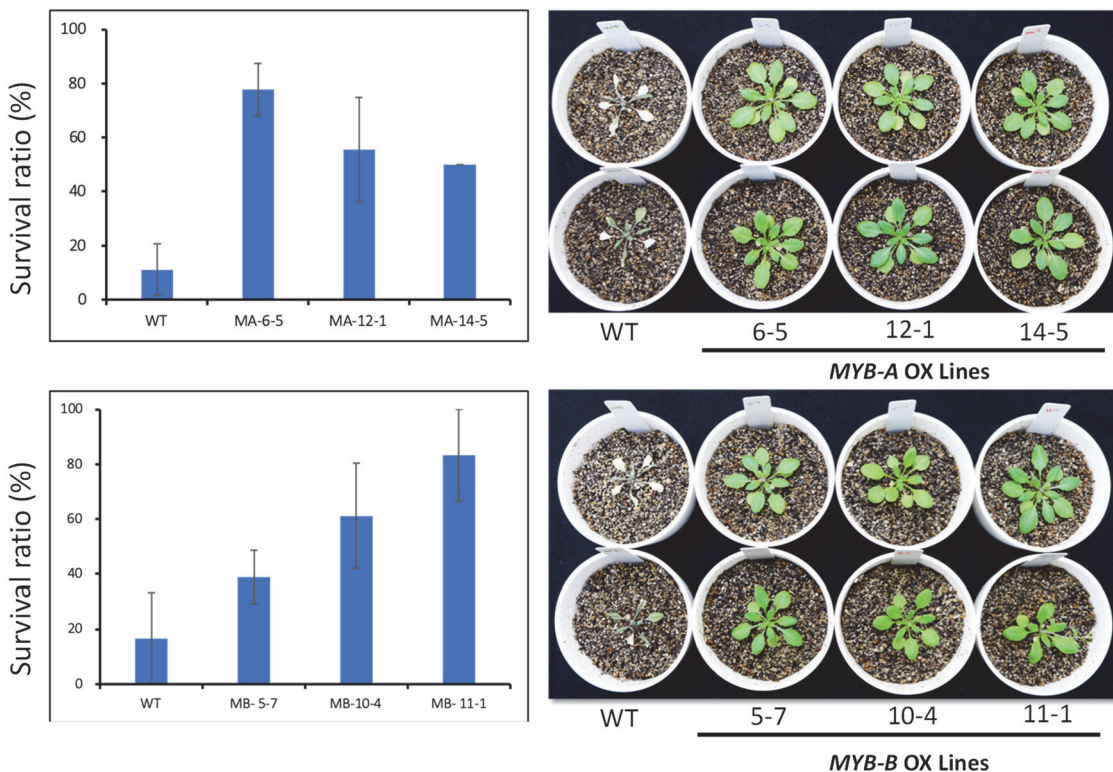


図1 MYB-A および MYB-B の過剰発現は乾燥ストレス耐性を示す。

関 原明 (理化学研究所環境資源科学研究センター)
共同研究先: 太治輝昭 (生命科学部)
篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

アブシシン酸受容体がもたらすコムギ病害抵抗性機構の解析

植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) は、植物の乾燥ストレスや気孔閉鎖、種子休眠性に関わる。ABA の受容体を過剰発現したコムギ (TaPYLox) は、ABA の感受性を向上させることで、耐乾性と節水性を兼ね備えた形質を有する。2015 年に東農大ゲノム解析拠点の共同研究に採択され、作成した TaPYLox が ABA に対して高感受性を示すかどうかをゲノムワイドな観点から検証するため、次世代シークエンス (NGS) によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、乾燥などの環境ストレスにおける非生物ストレス (abiotic stress) 関連の遺伝子よりも、不思議に生物ストレス (biotic stress) が際立って大きく変動していた。当時は、コムギのゲノム解読が進んでいなかったために、それに付随して GO アノテーションが不完全であるために、ABA と関連性の高い abiotic stress 関連が少なく、誤って病害応答性に関連する biotic stress の遺伝子が目立ってしまったのだろうと考えていた。この不思議な現象に関してはあまり触れずに、TaPYLox が ABA 高感受性としての形質を獲得し、耐乾燥性が向上したということを分子レベルで示し、2019 年に論文として発表した。

しかし、のちの研究過程で、閉鎖系で偶然に大発生したうどん粉病菌に罹病しにくい形質が TaPYLox にあることを発見した。この発見は、トランスクリプトームの GO 解析時に biotic stress に関連する遺伝子が、TaPYLox において多数向上していることと関連があると予想した。そこで、biotic stress に関連する植物ホルモンのサリチル酸 (SA) とジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) を分析したところ、TaPYLox で SA の内生量がコントロール株よりも 20 倍以上も多く異常蓄積していた (図 1)。SA は植物が寄生菌による感染をうけると、生体内でその内生量を蓄積させ、寄生関係の樹立を阻害するような防御が働き、植物の免疫応答に重要な役割を果たす。一方、SA と拮抗的な関係にある JA-Ile は、腐生菌による感染や虫害に対して抵抗性を示す働きがある。SA と JA-Ile はトレードオフの関係に

あり、拮抗的に作用するとされていた。しかし、SA が過剰に蓄積している TaPYLox では、不思議なことに、JA-Ile の量は減少していなかった。つまり、これまでモデル植物のシロイヌナズナで報告されてきた、ABA と SA の拮抗作用、さらには SA と JA-Ile の拮抗作用が、コムギにおいては認められないことが明らかとなった。

うどん粉病菌は、様々な作物に植物固有のうどん粉病菌が感染し、日本のみならず世界において、主要作物、野菜、園芸果物などの生産と品質の低下をもたらす。今回、我々は、ABA 受容体を多く作らせたトランスジェニックコムギが、耐乾性の向上に加えて、うどん粉病菌に対して抵抗性を示すことを発見した。このうどん粉病菌に対する抵抗性には、内生 ABA 量には依存せず、ABA 受容体タンパク質量に依存して、病害応答に関わる SA が増加したために、病害耐性が向上していると考えている (図 2)。その理由は、TaPYLox とコントロール株の両方で、ABA が増えるような乾燥ストレス処理に関係なく SA 量は一定に保たれているからである。モデル植物のシロイヌナズナで報告されている ABA と SA の拮抗的相互作用の報告では ABA の効果によって、SA の量が減少し、病害抵抗性が低下するといった報告がなされており、我々がコムギで発見した事象とは正反対である。さらに、教科書的には、SA と JA-Ile との拮抗作用が報告されており、SA が増えれば、JA-Ile の量が減少し、虫害抵抗性が弱くなるといったことが記されているが、これらの拮抗作用に関して異なる植物種間で共通であるかどうかは専門家の中で未だ論争が続いている段階である。

現在、コムギにおける ABA 受容体が及ぼすうどん粉病菌の病害抵抗性の分子機構を明らかにするために、うどん粉病菌に感染した葉をサンプリングして、コムギ側とうどん粉病菌の転写物の両方を解析している。本研究を通じて、ABA 受容体を活用することで耐乾性に加えて病害抵抗性の付与がコムギにおいては可能であることを分子レベルで証明したい。

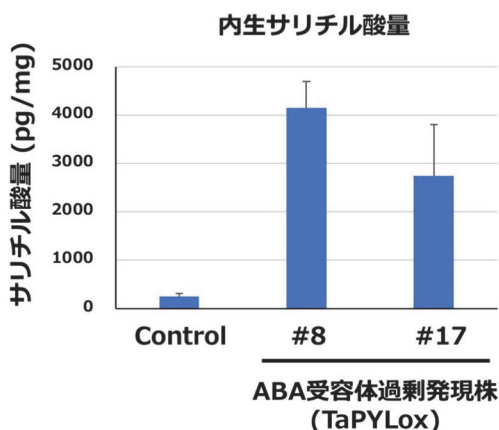


図 1

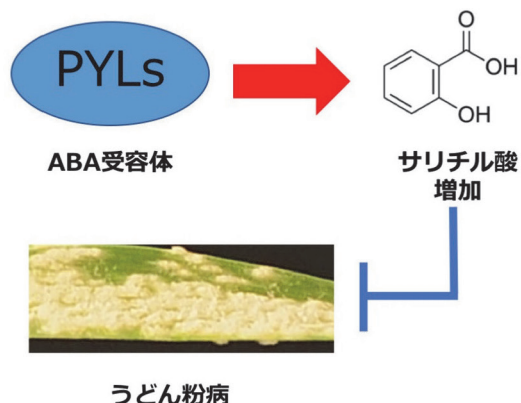


図 2

岡本昌憲 (宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター)
 金 俊植 (理化学研究所環境資源科学研究センター)
 共同研究先: 坂田洋一 (生命科学部)
 篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

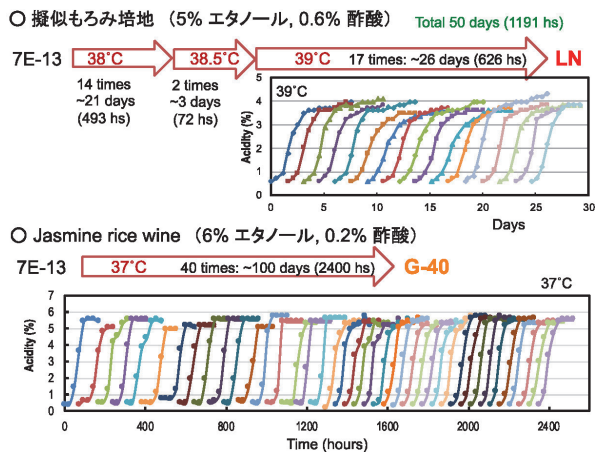
もろみ培地での実用的酢酸発酵を可能にする 低栄養発酵培地への酢酸菌株の実験室進化・適応育種

酢酸菌には「酸化発酵」と言われる特徴的な生理学的特性があり、その特性を利用した多くの産業が展開されている。その「酸化発酵」には、関与する酸化呼吸鎖、酢酸耐性能、菌膜生成能など解明されるべき多くの課題が残されている。これらの特性を理解し、さらなる産業利用に結びつけるためには、関与する遺伝子群の理解と解析が必要である。昨今、多くの酢酸菌ゲノムの解析と公開が進み、産業利用されている酢酸菌株相互のゲノム解析とその比較が可能になってきた。加えて、酢酸菌は比較的容易に適応的なゲノム変異を起こすことがわかり、目的に応じたゲノム育種ができることが明らかになっている。しかしながら、生じた変異による酸化発酵を始めとする形質の変化と遺伝子発現変動との関係については十分に理解できていない。

酢酸菌の酸化発酵の中で最も特徴的な発酵は、「酢酸発酵」である。私達は、酢酸発酵能を有する酢酸菌のストレス耐性能を増加させ、酢酸発酵を安定に行わせることを可能にするために、本菌のゲノム易変異性を利用した適応育種法による耐熱化育種をすすめている。つまり、その生育限界温度を徐々に上げながら継代培養を繰り返すことによって、高温下で安定に酢酸発酵を行うことのできる菌株を育種してきた。しかしながら、実験室的な栄養培地で適応育種された耐熱化株は、実際の食酢醸造を行う低栄養「もろみ」培地では、そのストレス耐性能を十分に発揮することができないことも明らかになっている。

そこで、実際の食酢醸造に用いる「もろみ」培地もしくは栄養的に「もろみ」に近い「擬似もろみ」培地 (YDAE:0.5%Yeast extract, 0.5%Glucose, 0.6%Acetic acid, 5%Ethanol) を用いて、「もろみ」のような実用的培地においても高温下で発酵可能な菌株の適応育種を、以下に示す2つの酢酸菌株で行った。

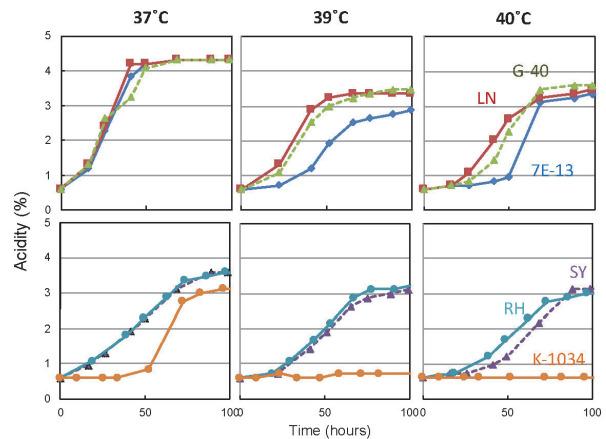
(1) これまでに栄養培地で *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 を適応的に耐熱化した 7E-13 株を「擬似もろみ」培地で 38°C, 38.5°C, 39°C と温度を上げながら育種して LN 株を、それとは別に「もろみ」培地として「Jasmine rice wine」を用い 37°C 定温で長期間育種し G-40 株を得た (下図)。



(2) 一方で、実際に食酢醸造でこれまでに用いられている酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* K-1034 株を「擬似もろみ培地」で 37°C, 37.5°C, 38°C, 38.5°C, そして 39°C と温度を上昇さ

せながら育種し、そこから2種類の菌株(コロニー) RH 株および SY 株を取得した (data not shown)。

これらの育種株は、39°Cもしくは40°Cの高温では、親株が「擬似もろみ」培地で生育が遅れる(7E-13 株)もしくは全く生育・発酵できない(K-1034 株)のに対し、良好に生育・発酵できた(下図)。さらに、これらの育種株は39°Cで「もろみ」培地においても良好に酢酸発酵する能力を有することも確認されている。



これらの株の比較ゲノム解析から、LN 株と G-40 株では、それぞれ5もしくは6遺伝子に、RH 株と SY 株では共通した5遺伝子 (RH 株は別の1遺伝子変異がある) に変異が入っていたが、LN, G-40, RH (SY) 株間では共通した変異は見られなかった。それ故、これらの育種株の低栄養生育もしくは高温発酵に関与する遺伝子変異を特定することは容易ではないが、少なくとも G-40 株の変異遺伝子の1つである *fabG* (プラスミド上に存在するホモログとの間で組換え変異を起こしていた) については、その欠損・相補実験により、その低栄養生育への関与が明らかにされている (Phathanathavorn T et al. 2019)。

今後、低栄養条件、高温に適応して得られた変異株と野生株との遺伝子発現を比較することによって、「低栄養条件下」つまり「獲得エネルギー制限下」においてもストレス耐性能を発揮できるような「代謝制御」を導く機構に関与する遺伝子群およびその発現制御が理解できるようになるとと思われる。

(なお、本研究は、キューピー醸造との共同で行われた。)

Phathanathavorn T, Naloka K, Matsutani M, Yakushi T, Matsushita K, Theeragool G: Mutated *fabG* gene encoding oxidoreductase enhances the cost-effective fermentation of jasmine rice vinegar in the adapted strain of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *J Biosci Bioeng* 127 (6) 690-697

松下一信 (山口大学創成科学研究科)

共同研究先: 石川森夫 (応用生物科学部)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

イネ生殖細胞特異的 Argonaute タンパク質 MEL1 の標的 RNA の FA-CLIP-seq 法による同定

アルゴノートタンパク質 (AGO) は、20-30 塩基長の small RNA (sRNA) をガイド分子として sRNA 配列依存的に標的 RNA と結合し、その分解や翻訳抑制、転写抑制などの遺伝子サイレンシングに寄与する。私たちは過去に、減数分裂前の生殖母細胞特異的 AGO であるイネ MEL1 が、生殖特異的 21 塩基長 sRNA (21-phasiRNA) と結合することを見出した (Komiya et al. 2014, Plant J 78: 385-397)。2017 年度後期の本共同研究では MEL1 特異抗体を用いた sRNA-IP-seq を実施し、葯タペート (体細胞) で減数分裂期特異的に生産される 24-phasiRNA が (図 1)、細胞非自律的に染色体凝縮など減数分裂進行を制御する可能性を提唱した (Ono et al. 2018, PLoS Genet 14: e1007238)。

MEL1 の機能欠損変異体の雌雄生殖母細胞は、減数第一分裂前期における染色体凝縮が非常に早い段階で停止する。しかし、MEL1 および結合 sRNA の減数分裂における機能、そして真の標的 RNA を含めたサイレンシング経路の全体像は掴めていない。その原因の一つに、MEL1 結合 sRNA の種類が膨大で、数塩基のミスマッチ許容を条件にマップすると無数のゲノム領域がヒットする問題がある。例えば 21-phasiRNA の前駆体ノンコーディング座 (21PHAS) は、イネゲノムの 1,000 カ所以上に散在するが、21PHAS 座間で配列を比較すると一部分を除いて互いに配列保存性がなく、21PHAS に由来する 21-phasiRNA は何万種類にも及ぶ。また、これまでは phasiRNA に着目してきたが、MEL1 結合 sRNA の大半はトランスポゾン様配列を含むリピーター由来配列であり (図 1C)、解析が遅れていた。動物では、生殖器官で特異的に機能する AGO が存在し、トランスポゾン不活化によるゲノムの安定的な次世代への伝達に貢献する。

2019 年度共同研究では、MEL1 結合 sRNA の真の標的 RNA を効率よく絞り込む目的で、MEL1 抗体を用いた Formaldehyde Cross-linking Immuno-precipitation (FA-CLIP) -seq 法を提案した。同法では、FA 固定した組織からタンパク質を抽出し、免疫沈降画分を RNase 処理したのちに RNA を回収する。RNase 処理の際、タンパク質と強固に結合

する RNA 部分は分解を免れるため、MEL1 結合 sRNA より長い、標的 RNA 由来の相補鎖が得られる可能性が高く、標的推定の精度向上が期待できる。現在、解読が進行中であり、データ取得後に速やかに解析を実施する予定である。

一般的に、核に局在して転写抑制を行う AGO とは異なり、細胞質に局在する AGO は主に標的 RNA の分解や翻訳抑制による転写後抑制に寄与することが知られる。従って、特に減数分裂移行前 (Premeiosis) の生殖母細胞質で強く局在する MEL1 は、転写後抑制に機能する可能性が高い。

シロイヌナズナの AGO1 と microRNA166/165 の複合体は、莖頂メリステム維持に対する阻害効果をもつが、メリステム周辺 (ニッチ) では AGO10 のデコイ効果、すなわち AGO10 が優先的に microRNA166/165 と結合することで AGO1 機能が抑制され、メリステムが安定に維持されている (Zhu et al. 2011, Cell 145: 242-256)。あくまで推測だが、イネ MEL1 も AGO10 と類似の役割をもつ可能性がある。生殖母細胞を包む葯の体細胞は、恐らく葯壁内層分化を促進する様々な細胞間シグナル因子を分泌しており、21-phasiRNA もその因子の一つと考えられる。このような因子は葯壁の分化には必須だが、それらが減数分裂に向けて発生・分化中の生殖母細胞で核局在する AGO と結合した場合、本来必要な遺伝子発現制御に負の作用をもたらす可能性がある。生殖母細胞質に大量に蓄積する MEL1 は、トランスポゾン由来 sRNA や 21-phasiRNA などの外来因子をトラップし、生殖母細胞への負の影響を未然に食い止める役割を果たすことで、減数分裂特有のクロマチン構造の正常な形成とそれに引き続く減数分裂特異的な染色体凝縮を保証しているのかもしれない。

今回のゲノム解析拠点共同研究が目指す真の MEL1 標的 RNA の網羅的同定は、ほとんどが未解明である植物の生殖母細胞における転写・転写後サイレンシング経路に一筋の光明をもたらすだけでなく、減数分裂組換え位置や頻度など、育種効率にも多大な影響を及ぼす減数分裂染色体に特有のクロマチン構造を明らかにする上でマイルストーンとなり得るチャレンジである。

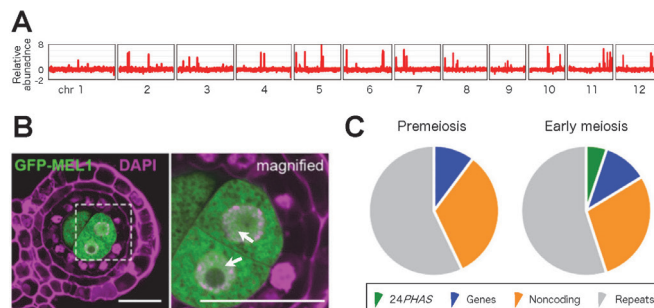


図 1 24PHAS RNA 座のゲノム分布と減数分裂ステージ推移に伴う MEL1 結合 sRNA の変化 (A) 減数分裂開始初期における 24-phasiRNA 相対量 (正常個体 / eat1 変異体) の染色体分布。ほぼ全ての染色体で 24PHAS 前駆体 RNA 座を示す複数の 24-phasiRNA ピークの偏在がみられる。(B) MEL1 プロモーターで MEL1-GFP 融合タンパク質を発現する形質転換イネの葯の輪切り切片像。MEL1-GFP (緑) は葯室中央の雄性生殖母細胞の細胞質に強く局在する。写真の時期は減数分裂初期 (Early meiosis) にあたり、核にも局在できるようになる (矢印)。バーは 10µm。(C) MEL1 結合 sRNA が由来するゲノム領域の割合。減数分裂初期には、それまで検出されなかった 24PHAS 由来の sRNA (EAT1 依存的にタペートで生産される 24phasiRNA) が MEL1 と結合できるようになる。Ono et al. (2018, PLoS Genet 14: e1007238) の図を一部改変して引用した。

野々村賢一 (国立遺伝学研究所)
共同研究先: 佐々木卓治 (総合研究所)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

雑穀アワの組換え近交系のリシーケンシング —新規マッピング集団の構築

穀物というと、イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシ、ソルガム（モロコシ）などが主要なものですが、それ以外にも、アワ、ヒエ、キビ、ハトムギなどのいわゆる雑穀と称されるものが数多く存在します。これら雑穀は必ずしも近い仲間というわけではなく、ひとつひとつがかなり個性的な植物です。われわれが材料にしているアワ (*Setaria italica* (L.) P.Beauv.) は黄河文明の主食であり世界中で重要な作物でありました。新嘗祭でイネと並んで供される作物でもあります。生物学的には、路傍に生えるエノコログサの栽培型であることも興味を引く点です。また、C4植物であることや、ゲノムサイズが小さく、染色体数も少ない ($2n=2x=18$)、栽培も難しくなく、自殖性であるなど遺伝学的な研究にも適していることから2012年には全ゲノム配列が決定されています (Bennetzen *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2012)。

世界的に見ると、かつてはユーラシア全域で栽培されていることがわかっています。中国やインドの半乾燥地では今までの重要な作物で、育種などもなされています。遺伝資源の研究も盛んです。しかしながら、中国の研究グループは中国の品種、イ

ンドの研究グループはインドの品種しか解析しない傾向にあります。我々の研究グループは、1980年代から世界中のアワ在来品種遺伝資源の系統解析を行ってきており研究の蓄積があり、本研究では、われわれが作出してきた日本品種と台湾品種の組換え近交系 (RILs, F10 世代) (図2) について、改変した RAD-seq を用いた詳細な連鎖地図作成を行います。この両親2品種は茎の色、穂の刺毛の形状、胚乳デンプンのアミロース含量などの一遺伝子支配の形質のみならず、さまざまな量的な形質で違いが見られます。2019年の栽培実験では穂の形、出穂期など草丈などについてもかなりの分離が見られました。将来的にはこれらの形質を支配する QTL の検出を行いたいと考えています。

アワの遺伝学はまだまだ分からない事ばかりです。本研究ではまず、比較的遠縁な品種間の実験集団の確立と連鎖地図の作成という基本的なことを行っていきます。これによりアワの遺伝学についての基盤を作り、日本のみならず世界でのアワ育種及びアワの作物進化の研究に貢献したいと思っています。



図1 世界のアワ品種
穂の形や長さなど非常に多様性が高い。

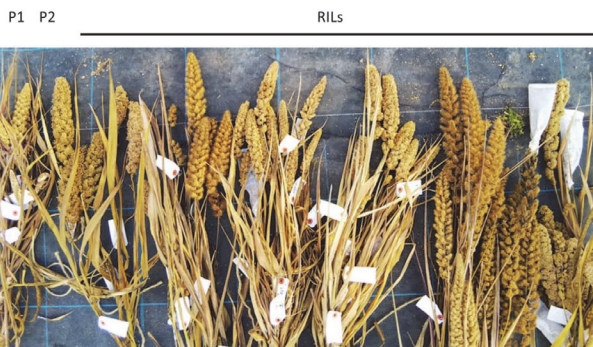


図2 両親品種 (P1 及び P2) とその交雑に由来する組換え近交系 (RILs)

穂の形でかなりの分離が見られる。

福永健二 (県立広島大学生命環境学部)

阿部 陽 (岩手生物工学研究センター)

共同研究先: 河瀬真琴 (農学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

シロイヌナズナ Wt-1 における 塩馴化後浸透圧耐性損失因子の遺伝学的解析

世界中から収集されているシロイヌナズナの自生系統の中には塩ストレスに馴化することで高い浸透圧耐性（馴化後耐性）を獲得する系統が存在する。しかし実験系統である Col-0 は馴化後耐性を示さないことから、馴化後耐性に関する知見はほとんど蓄積していない。

私たちは 179 系統のシロイヌナズナについて馴化後耐性を評価し、その有無を決定する遺伝子の同定を試みた。その結果、馴化後耐性を示さない系統のみに存在する ACQOS が馴化後耐性を抑制することを突き止めた。ACQOS は病原菌の認識に関与する免疫受容体をコードし、ACQOS を持つ系統では塩ストレス条件下でサリチル酸の過剰蓄積や病害応答遺伝子群の発現誘導など、免疫応答の活性化が確認された。このことから ACQOS タンパク質を起点として誘導される過剰な免疫応答が、細胞死や生育抑制をもたらし、馴化後耐性を阻害すると推察された。

馴化後耐性を損なわせる遺伝子は特定できたものの、馴化後耐性を獲得するメカニズムは未だ不明である。そこで私たちは ACQOS を持たないにも関わらず馴化後耐性を示さない系統 Wt-1 の解析を進めている（図 1）。これまでの研究から Wt-1 は、塩に馴化するプロセスに欠陥がある、または塩馴化によって誘導される耐性そのものの程度が低いことが示唆されている。いずれの場合においても Wt-1 の解析は馴化後耐性に関する新たな知見を得る一助になる。

シロイヌナズナの自生系統のゲノムと Col-0 のゲノムとを比較すると、数 kb から数十 kb にわたって塩基配列が大きく異なる領域がしばしば見られる。このような塩基配列の差異が表現

型に大きな影響を与えている例がいくつか報告されている。ACQOS 遺伝子の有無もこのケースであり、Col-0 と馴化後耐性を示す系統との間では 23 kbp に渡ってゲノム構造が異なっていた。Wt-1 の全ゲノムを解読し、馴化後耐性を示す系統、あるいは Col-0 のゲノムと比較することは、Wt-1 における馴化後耐性損失における原因遺伝子の探索・同定に有用である。また、原因遺伝子座絞り込むためには Wt-1 および掛け合わせ相手との間で使用できる遺伝マーカーが必須となるが、全ゲノム情報があればその作成作業は飛躍的に容易となる。

そこで Oxford Nanopore Technologies 社の新世代シーケンサーである MinION を用いて Wt-1 および Bu-5（馴化後耐性を示す系統、Wt-1 との掛け合わせ相手として選出）の全ゲノム解読を行った（図 2）。MinION では 100 kb を超える高分子 DNA を連続して読み出したロングリードデータを獲得できるため、得られたデータをひとつなぎにする『組立て作業（アセンブル）』を高い精度で実行することができる。一方、東京農業大学 生物資源ゲノム解析センターが所有する Illumina 社のシーケンサーで得られるショートリードデータと比較して“AAA”や“GGG”といったリピートの検出感度が著しく低く、リード配列内にエラーが含まれやすい欠点がある。このようなエラーはアセンブルやマーカー作成、遺伝子予測の際に大きな影響を与える。本課題では MinION で得られたロングリードデータをアセンブルした後、Illumina 社のシーケンサーから得られたショートリードデータに基づいて校正し、高精度の全ゲノム情報を得ることを目指している。

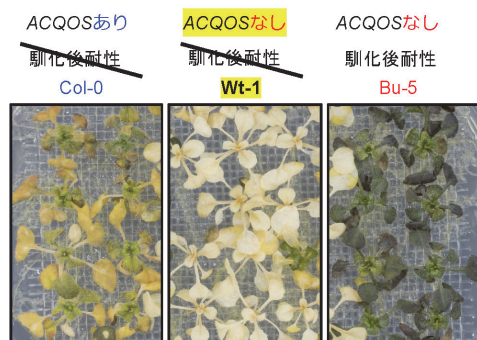


図 1 1 週間の塩馴化処理後、浸透圧ストレスを与えた様子。Col-0 は ACQOS 遺伝子により馴化後耐性が抑制されている。一方、Wt-1 は ACQOS 遺伝子を持たないが、浸透圧ストレスに感受性を示す。

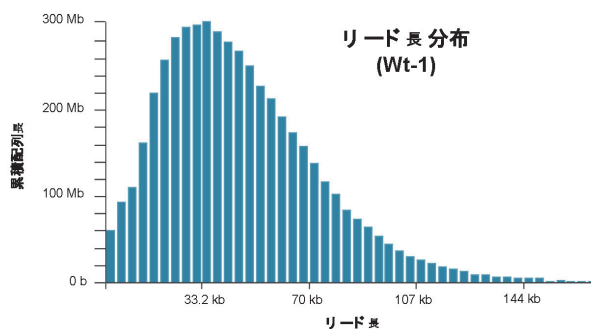


図 2 MinION を使用したゲノムシーケンス Wt-1, Bu-5 とともに 5 Gb（ゲノムサイズの 35 倍以上に相当）のロングリードデータを得た。配列長の加重平均（N50）は両サンプル共に約 42 kbp であった。

有賀裕剛（農業・食品産業技術総合研究機構）
共同研究先：太治輝昭（生命科学部）
篠澤章久（生物資源ゲノム解析センター）

栄養膜細胞の分化運命決定の分子基盤に関する研究

胎盤は、栄養分の供給やガス交換など様々な機能を担う、正常な妊娠、出産に必要な臓器です。そのため、胎盤の形態や機能の異常は胎子の発育遅滞や死産につながります。胎盤の大部分は、栄養膜細胞と呼ばれる、受精卵から作られる細胞で成り立っています。栄養膜細胞は、それぞれの特徴を持つサブタイプに分類されますが、各サブタイプが正しい場所に正しい量だけ存在し機能することが、胎盤の正常な機能の発揮に不可欠です。しかし、栄養膜細胞の幹細胞からの特定のサブタイプへの分化を制御する分子メカニズムは、まだ詳しく明らかにされていません。

マウス栄養膜幹細胞 (mouse trophoblast stem cell, mTSC) は、着床前の胚盤胞から樹立された、栄養膜細胞系譜の幹細胞です。特定の未分化維持因子を添加することで分化を抑え、かつ増殖を維持することが可能であり、また未分化維持因子を除くと、栄養膜細胞サブタイプへの自発分化が誘導されます (図1)。この特徴から、mTSC は栄養膜細胞分化の分子メカニズムを解明するための有用なツールとして活用されてきました。

私たちはこれまで、mTSC を用いた低分子量化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、特定の栄養膜細胞サブタイプへ分化を促進する低分子量化合物を同定しました。そこで本共

同研究では、同定した化合物が引き起こす遺伝子発現変化の全容を明らかにすることを目的とし、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行いました。

解析の結果、mTSC の分化時に化合物を添加することによって、例えば、上皮間葉転換に関わる遺伝子群の発現が上昇することがわかりました (図2)。これは、浸潤能が高い間葉系様のサブタイプへの分化が促進されたことを、遺伝子発現の観点からも示唆しています。また、化合物添加によって、サブタイプ分化に関わる転写因子群の発現に変化が認められ、その変化が、その後の分化運命決定に影響を及ぼした可能性が見出されました。現在、化合物添加によって誘導される細胞内シグナルに着目して RNA-seq データの解析をさらに進めており、特定のサブタイプへの分化に関わるシグナル経路を明らかにしたいと考えています。

正常な妊娠を支える、胎盤形成の分子メカニズムを理解することは、妊娠期疾患の予防や診断、治療法の確立の礎となります。また年々深刻化している家畜の受胎率低下など、家畜繁殖の観点からも胎盤形成の理解は重要です。そのため、本研究によって栄養膜細胞サブタイプの分化運命決定に関わる分子メカニズムが明らかにできれば、医学や畜産分野においても重要な知見が提供できると期待しています。

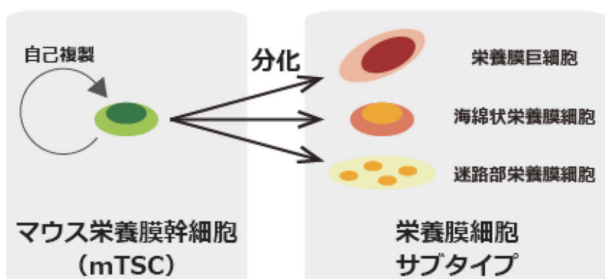


図1 マウス栄養膜幹細胞の概念図

マウス栄養膜幹細胞は、栄養膜巨細胞、海綿状栄養膜細胞、迷路部栄養膜細胞を含む、マウス胎盤を構成する全ての栄養膜細胞サブタイプへの分化能を有しています。

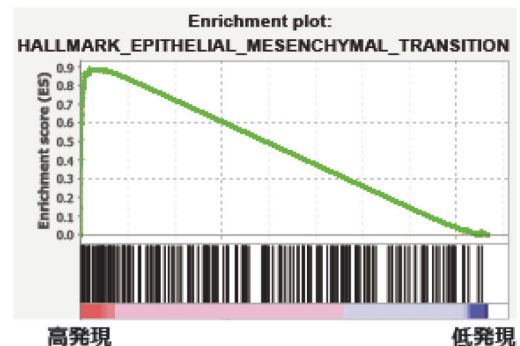


図2 Gene Set Enrichment Analysis

特定の化合物添加によって発現が増加する遺伝子群は上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition) に関わる遺伝子群と正の相関が見られました。

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

アジア諸国におけるバナナの遺伝的多様性からみた 栽培文化の人類学的研究

数千年前に東南アジアからオセアニアに至る地域で栽培化されたバナナは、人類の拡散とともに世界各地にもたらされ、栄養体繁殖によって各地で多くの品種を生み出した (図1)。バナナは、アグリビジネス企業に寡占されるグローバル商品である一方、世界中の湿潤な熱帯と亜熱帯で栽培され、アフリカ、オセアニア、東南アジア、中南米などでは重要な主食作物である。主食、軽食、野菜として食べられる以外にも、酒の原料となったり、植物体が繊維として、葉が皿として利用されるなど、湿潤熱帯の重要な地域内消費作物である。日本では、伊豆・小笠原諸島や沖縄県各地、奄美諸島などで島バナナと呼ばれる在来品種が栽培され、沖縄では芭蕉布を生み出した。

筆者らは、これまでの、アフリカ、東南アジア、オセアニア、日本国内で、各地の品種と利用法、栽培法、地域経済の中の位置に関する情報を、比較対象可能な形式で収集し、熱帯の農業においてバナナ栽培がもつ人類学的、社会的、農学的な意義について研究を進めてきた。その結果、各地の自然・社会条件に適応したバナナ栽培と、それを支える各地の多様な品種群の存在が明らかになった。

そこで本研究は、次なる到達目標として、各地の農民が選択した品種を系統学的に比較し、各地のバナナ栽培の歴史的関係性を明らかにすることを目的としている。まずは、日本とアジアを対象とし、熱川バナナワニ園から提供を受けたアジア各地の品種に加え、沖縄と伊豆・小笠原諸島の品種をサンプルとした。日本とアジア各地の現状では、世界各地のバナナの品種の形質による分類とDNA多型が、国際農業研究組織 Bioversity が運営する The Musa Germplasm Information System (MGIS) 上で共有されている。しかし、

これらの情報は、どの地域で、どのような背景をもつ農民がどのように栽培・利用しているのかという情報と紐付けられていないため、実際には、情報のアーカイブか、機関や企業による新品種創出のためにしか利用されていないのが現状である。本研究のこれまでの知見と収集品種を利用すれば、農民が実際に栽培している品種どうし、また、他地域の品種との遺伝的多様性を把握できるため、自分たちと祖先がどのような選択をしてきたのか農民自身が考える素材とすることが可能である。

本研究は、RAD-seq 法の変法の一つとして超低コスト系である Flexible ddRAD-seq 法を利用した。各品種から抽出したDNAに制限酵素で断片化処理を行い、その両末端にフォークアダプターをライゲーションすることで選択的にシーケンスできるように施した。さらに、サイズセレクションおよびPCR増幅を経て最終的なRADライブラリーとし、NextSeq500を用いてPaired-end read 2 x 150 bpによるシーケンスを実施した。出力されたリードデータの前処理後、*Musa acuminata* (Aゲノム) と *M. balbisiana* (Bゲノム) をリファレンスとしてマッピング、そしてローカルリアライメントを行い、SNPやInDelによる変異情報を基に分子系統解析を行った。結果として、Aゲノムに強く影響を受けるグループ、Bゲノムに強く影響を受けるグループ、どちらのゲノムにも偏らないグループに識別された (図2)。このことから、今回のアプローチでは、ゲノム構成の推定に利用できることが示唆された。現在、これら識別が正確かどうかを判断するために、ploidy analyzer を用いた倍数体測定やリアルタイムPCRによる推定法を検討しているところである。



図1 世界各地で栽培される様々なバナナ

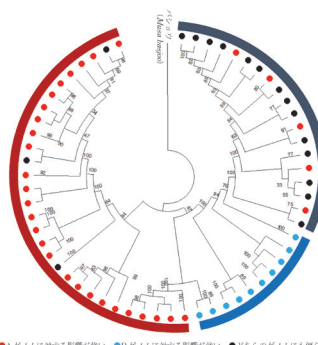


図2 *M. acuminata* (Aゲノム) と *M. balbisiana* (Bゲノム) をリファレンスゲノムとして検出された変異情報を基に構築した最尤系統樹のトポロジーグラフ。各枝の信頼性は、1000反復によるultrafast bootstrap法によって算出した。

小松かおり (北海学園大学人文学部)
 佐藤靖明 (大阪産業大学デザイン工学部)
 小谷真吾 (千葉大学文学部)
 北西功一 (山口大学国際総合科学部)
 四方 簗 (京都大学アフリカ地域研究資料センター)
 共同研究先: 足達太郎 (国際食料情報学部)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

出芽酵母における基本転写因子 TFIID と その類縁複合体 SAGA の機能解析

真核生物のクラス II 遺伝子プロモーターには、TATA ボックスを含むもの（TATA 含有プロモーター；全体の 10～15% 程度に相当する）と含まないもの（TATA レスプロモーター）が存在し、それぞれ主としてストレス誘導性遺伝子やハウスキープ型遺伝子の発現を制御すると考えられている。また 2004 年以降は「基本転写因子 TFIID が TATA レスプロモーターへの TBP 結合を、その類縁複合体である SAGA が TATA 含有プロモーターへの TBP 結合を制御する」と長らく考えられてきたが（図 1）、近年この考え方は誤りであるとの指摘もあり、両者の役割分担については、未だ混沌とした状況にある。

最近我々は、出芽酵母細胞において TFIID 変異 (*taf1-N568Δ* 変異) と SAGA 変異 (*spt3Δ* 変異) を一時的に共存させ、その後 SAGA 変異を除去することにより、*PGK1* プロモーター（解糖系酵素の一つ）の TFIID 非依存的な転写を、塩基配列を改変することなく、エピジェネティックに

TFIID 依存的な転写へとリプログラミングすることに成功した（図 2）。従来 TFIID 依存性の有無はプロモーター配列により決定されると考えられてきたことから、同一構造のプロモーターに対してエピジェネティックに TFIID 依存性を付与できる可能性が示されたことは大変興味深い。

本研究では、ゲノムワイドな RNA-seq 解析を行い、転写モードの切り換え（TFIID 非依存性 ⇄ 依存性）が生じた遺伝子群（プロモーター）の網羅的な同定を試みる予定である。また同定されたプロモーター間の共通性や特徴を詳しく調べることにより、TFIID 依存性付与の分子機構について新たな知見を得たいと考えている。これまでに行った様々な予備実験の結果は、TFIID 変異と SAGA 変異の共存下において生成される未知のリプログラミング因子が *PGK1* 転写に TFIID 依存性を付与する可能性を強く示唆しており、当該因子の同定を通じて、TFIID と SAGA の役割分担の詳細を明らかにしていきたい。

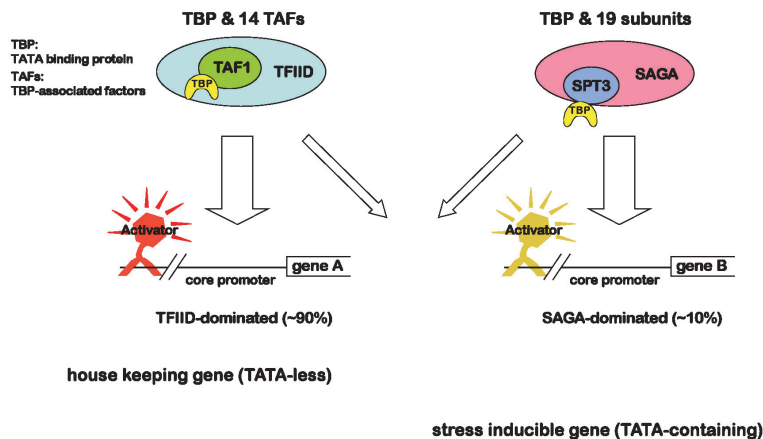


図 1 TBP のコアプロモーター結合過程を制御する二種類の転写因子複合体（TFIID & SAGA）

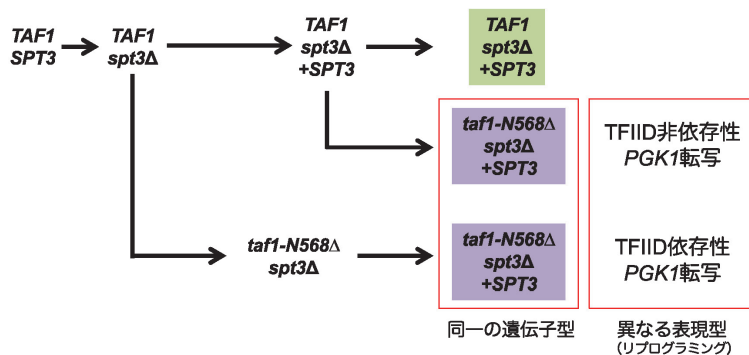


図 2 エピジェネティックな *PGK1* 転写のリプログラミング

古久保哲朗（横浜市立大学大学院生命医科学研究科）
共同研究先：笠原浩司（生命科学部）
志波 優（生命科学部）
松谷峰之介（生物資源ゲノム解析センター）

イトマキヒトデの変態を制御する分子基盤

棘皮動物ヒトデは、潮間帯域の生態系におけるキーストーン捕食者である。潮間帯からヒトデを取り除くと、その生態系に棲む大量の種が絶滅することが実験的に示されている。従って、潮間帯やその周辺環境におけるヒトデの個体数の変動は、生態系における生物多様性に大きなインパクトを与える。実際、オニヒトデの大量発生や北米西海岸における原因不明のヒトデの大量死は、海洋生態系保護の観点から大きな問題になっている。

ヒトデは、浮遊生活を送る幼生期から底生生活を送る成体に変態する(図1)。この過程で幼生の形態は劇的に変化するが、実体顕微鏡による形態観察により、変態過程は5つのステージに分類することができる(図2)。変態初期では、幼生前部の固着器官で基質に完全に固着し、胴体部の退縮が始まる。変態中期になると、胴体部が幼生の半分以下まで退縮して成体原基(図2、矢頭)が覆いかぶさってくる。胴体部のほとんどが退縮し、体全体が成体原基に覆われて円盤型となった時点が変態後期である。その後、成体原基が五角形から五放射型に変化し始める前稚ヒトデ期を経て、体表の凹凸形成が発達するとともに管足(図2、矢印)が伸長して稚ヒトデになる。

ヒトデの変態には、岩場などの基質表面に存在するバイオフィームが必要であることが示唆されており、このバイオフィームの存在を通して底生生活に適切な環境を選択するのだと考えられていた。最近申請者らは、飼育水槽中の濾過砂利から2種類の変態誘起バクテリアを単離、同定することに成功した。興味深いことに、この2種のバクテリアは成体の餌として知られるイガイの変態を誘起するバクテリアと非常に近縁であり、

これらのバクテリアの存在により餌が豊富な生息環境を選択しているのだと推測される。

一方で、バクテリアによる変態誘起機構やその下流のシグナルについてはほとんどわかっていない。最近、ブラキオラリア幼生の飼育海水にレチノイン酸を投与するだけで、変態が100%誘起できることが報告され、バクテリアによる変態誘起シグナルの下流にレチノイン酸シグナル経路が存在することが示唆された。しかし、レチノイン酸経路がどのように活性化されるのか、またその下流にどのようなシグナル経路が存在するのかは未解明である。今回の共同研究課題では、この2点をターゲットとして、イトマキヒトデの変態を制御する分子基盤を明らかにすることを目的としている。まず、バクテリア刺激又はレチノイン酸刺激で誘起した変態初期過程のトランスクリプトームを比較(図2、解析1)し、レチノイン酸経路の活性化機構を探りたい。その下流シグナルについては、変態過程を通じた発現変動遺伝子のネットワーク解析(図2、解析2)により探索していく予定である。

ヒトデに限らず、変態する動物は動物界に広く存在し、我が国の重要な水産資源であるウニやナマコ、多大な経済損失を生じる付着生物であるゴカイ類なども含まれている。それらの大半にバクテリアが関与することはよく知られているものの、その分子メカニズムはほとんどわかっていない。棘皮動物で得られる知見は、その系統進化的位置を反映して他の動物においても保存されている場合が多いため、本共同研究課題によって、有用種の育種や有害種の防除法の開発など、農学・水産学分野にも貢献できる成果が得られることを期待している。



図1 イトマキヒトデのライフサイクル
ブラキオラリア幼生になると変態能を獲得し、岩場などに固着して変態を開始する。実験室では、成体の飼育水槽の濾過砂利で変態を誘起できる。

モード図	ステージ					
	ブラキオラリア	変態初期	変態中期	変態後期	前稚ヒトデ	稚ヒトデ
バクテリア刺激						
レチノイン酸刺激						

□: 解析1 □: 解析2

図2 イトマキヒトデの変態ステージと本共同研究課題で用いるサンプルバクテリア刺激のサンプルは、成体飼育水槽の濾過砂利で変態を誘起している。モード図の網掛部は成体原基(矢頭)を示している。稚ヒトデ期になると、管足(矢印)が発達し、移動するようになる。

古川亮平 (慶應義塾大学文学部)
共同研究先: 志波 優 (生命科学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

メタノール資化能を持つ大腸菌の創製に向けた実験室進化により 取得したメタノール・ホルムアルデヒド耐性株のゲノム変異解析

微生物を用いた有用物質生産においては、これまでセルロースやデンプンなどといったバイオマス資源から得られる糖質を基質として研究開発が行われてきた。バイオマス資源から糖質を得る際には酵素や廃棄物処理などのコストが高いのに加え、一部のバイオマス資源は食糧との競合が問題となることから、バイオマス資源に代わる安価な新たな資源を利用した微生物による有用物質生産の研究開発を推進することが求められている。

申請者らは、安価な資源として注目されているメタノールを用いた微生物による有用物質生産に向けた宿主細胞の創製を行うべく研究を推進している。メタノールを基質とした有用物質生産を行うためには、メタノールを資化する微生物を用いる必要がある。しかしながら、これまで報告されている既存のメタノール資化性微生物の多くは、アルコールや有機酸などの低分子化合物の高い生産力を持たないことが多い。そのため、合

成生物学によりメタノール資化性微生物が持つメタノール資化にかかわる代謝反応を大腸菌などの有用物質生産の実績がある微生物に実装することで、メタノールを基質とした有用物質生産を行うための宿主を創製することが重要であると考えている。

一方、増殖の基質として用いるメタノールや、メタノール資化の過程で生成されるホルムアルデヒドは、細胞に対して毒性を示し、増殖を低下させる。そのため、これら物質に対して耐性を示す細胞の創製は、メタノール資化能の賦与とその向上において非常に重要となる。そこで本研究では、長期間の植え継ぎを繰り返す実験室進化を用いて、メタノールやホルムアルデヒドに耐性を示す大腸菌細胞を取得し、そのゲノムリシーケンス解析を行うことで、耐性獲得に重要となる変異を特定するとともに、耐性を示す菌株の再構築を行う。

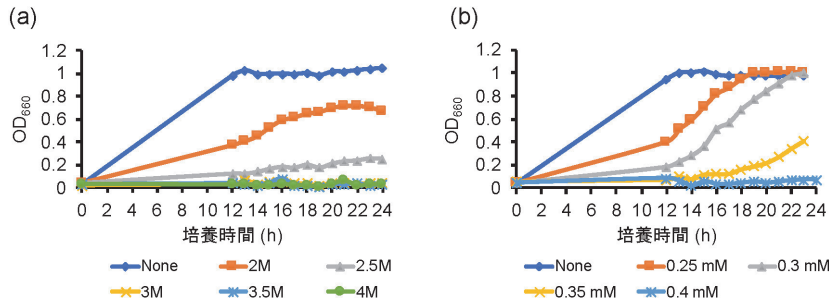


図1 大腸菌の生育に対するメタノール (a) およびホルムアルデヒド (b) の影響
培養開始時に、上記濃度のメタノールあるいはホルムアルデヒドを添加した時の生育曲線を示す。

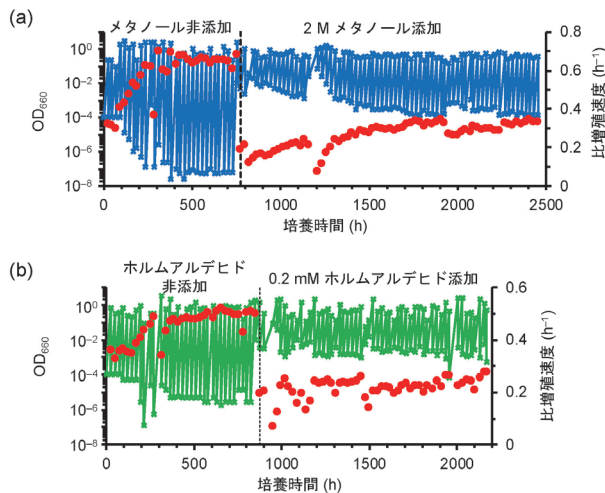


図2 実験室進化によるメタノール (a) およびホルムアルデヒド (b) に耐性を示す細胞の取得
メタノールやホルムアルデヒドを含まない合成培地に対して植え継ぎを繰り返して培養し、比増殖速度が安定した時点で、2M メタノールおよび 0.2mM ホルムアルデヒドを添加し、植え継ぎを継続した。その結果、比増殖速度が上昇した細胞を含む培養液を得ることができた。この培養液についてシングルコロニーアイソレーションを行い、単離した耐性株についてゲノムリシーケンス解析を行うことで、耐性獲得に重要となる変異を特定する。

● : 比増殖速度 ×・× : 生育 (OD₆₆₀)

平沢 敬 (東京工業大学生命理工学院)

共同研究先: 渡辺 智 (生命科学部)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

ベクターパーティクル：新たな遺伝子伝搬機構の解明

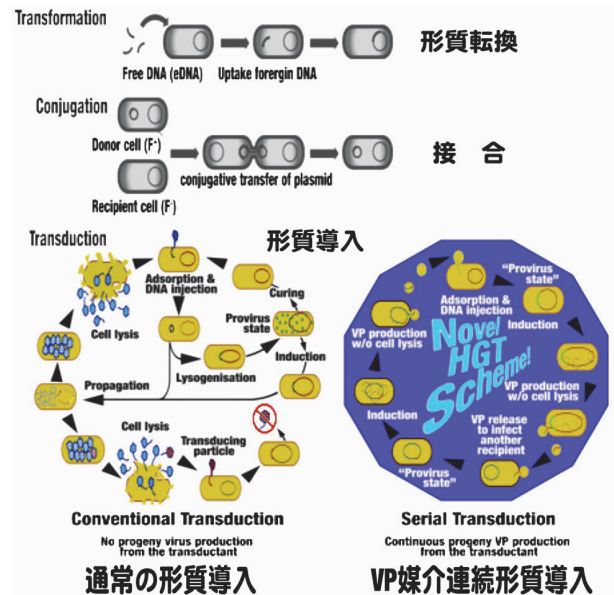
ベクターパーティクル：“広宿主域な遺伝子伝達粒子 (Vector Particle: VP)”という粒子が、「系統的に遠い生物間の遺伝子伝搬」を可能にすることを見出し、報告してきた (右図)。しかし、その存在は電子顕微鏡でしか確認できないこと、VPの回収に大量培養が必要なことなどから、遺伝子構造や粒子生成、伝達の分子機構は未解明である。VPは大きさや形状はウイルスと同様で、電子顕微鏡下でも見分けがつかない。現在までに判明しているVPの主な特徴は以下のようである。

- 1) 粒子はタンパク質・脂質・多糖から構成される外套に宿主染色体断片 (dsDNA、~400 kb)、plasmid、細胞質性物質を詰め、広範囲な宿主域 (真正細菌、古細菌、真核生物間) の受容細胞に転移し、最大 1.2×10^{-2} CFU/VP の高い一般型形質導入頻度を示す。
- 2) 感染に際して、粒子のUV処理に関係なく、最大10%の受容菌致死効果を示す。
- 3) VP媒介形質導入細胞から、「連続形質導入: serial transduction」(Chiura *et al.* FEMS Microbiol Ecol 75: 1-16, 2011) と呼ぶ娘VP生産を引き起こす。
- 4) VP出芽生産は宿主の静止期に開始し宿主細胞の溶菌は伴わない。
- 5) 娘VPは種々の離散粒子径分布を示す。
- 6) VPを明らかにするには、VP媒介形質導入細胞からの電子顕微鏡による出芽観察のみが唯一の手段で、細胞あたりのVP収量は厳密に制御され 3 ± 2 粒子である。

しかし、どのような遺伝子がVP生産を担っているのか、どのような遺伝子が実際には運ばれるのか、どのようにVP感染の実際は起こるのか、どのようにウイルスや membrane vesicle (MV) と違うのか、どの程度の寄与が進化に耐えられたのかなど、多くの分子機構の解明が残されたままである。VPの遺伝子伝播様式の詳細をゲノム規模で注目する必要がある、non-coding 領域や制御領域に関する情報の取得にNGSの採用が不可欠である。三つの研究課題を設定した

- (1) VP粒子生産遺伝子 (PPRG) を決定する。
- (2) VPが伝播する遺伝子の種類と配列特異性をVPの遺伝子解析を行って明らかにする。
- (3) 環境メタゲノムデータベースを用いてVP生産および伝搬遺伝子の検討を行い、自然界での遺伝子伝播に関わるVPの役割を解明する。

温泉硫黄芝を形成する好熱硫黄酸化細菌 (*Aquifex* sp) 由来VPを、門を超えた *E. coli* AB1157 に感染させ、ST EVP (112 ± 17.4 nm; 373.3 ± 23.2 kbp) 粒子を生産するVP媒介形質導入株 (ST Etrans) を得た。VP生産性を獲得した大腸菌はVP粒子生産に関わる遺伝子 (PPRG: Particle Production Responsible Gene) を持っているはずである。次いで、VP生産性高頻度組換型大腸菌 (HfrC) を得るためST EVP (Chiura 2004) を (HfrC; *metB* λ⁻ *Sm*^r) に感染させ、VPを生産する形質導入株 Hfr *met* trans を製作した。次いで、Hfr *met* trans (供与菌) と受容大腸菌 AB1157 (F⁻; *leuB proA hisG argE Sm*^r) を接合させたと、*hisG argE* の接合体生成頻度はVP非感染のHfrCとF⁻を掛け合わせた対照に匹敵したが *leuB* は4桁低下し、*proA* は検出せず、さらに生じた接合体の約半数が粒子生成不能で、受容菌へのVP感染後にPPRGは受容菌染色体に組込まれることが明らかで、また *pro* 以外の標識に連鎖が観察されたことから、*proA-leuB* は *hisG* (45.0') と伝達末端 (13') 間で組換えられPPRGは *proA-leuB* 遺伝子座近傍に組込まれたと考えられた。



せ、VPを生産する形質導入株 Hfr *met* trans を製作した。次いで、Hfr *met* trans (供与菌) と受容大腸菌 AB1157 (F⁻; *leuB proA hisG argE Sm*^r) を接合させたと、*hisG argE* の接合体生成頻度はVP非感染のHfrCとF⁻を掛け合わせた対照に匹敵したが *leuB* は4桁低下し、*proA* は検出せず、さらに生じた接合体の約半数が粒子生成不能で、受容菌へのVP感染後にPPRGは受容菌染色体に組込まれることが明らかで、また *pro* 以外の標識に連鎖が観察されたことから、*proA-leuB* は *hisG* (45.0') と伝達末端 (13') 間で組換えられPPRGは *proA-leuB* 遺伝子座近傍に組込まれたと考えられた。

PPRGは形質導入株のいずれにも共通して存在するはずで、同時にどのようなサイズのどのような遺伝子がどこに導入されたのかについて導入前と導入後の遺伝子の違いから詳細を明らかにすることによって、PPRGを特定化できるだろう。さらに、VPがどのような長さのどのような遺伝子を運び、それをどこに導入するかを明らかにできる。PPRGを明らかにできると、環境での検出用プローブが設計でき、自然界でのVP分布とその働きを明らかにすることを目指している。

千浦 博 (東京農工大学大学院農学府)
 鈴木誠治 (東京海洋大学産学連携施設)
 森山裕充 (東京農工大学大学院農学府)
 共同研究先: 朝井 計 (生命科学部)
 松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

アブラナ科自家不和合性の安定性に関わる SRK 受容体ドメイン内アミノ酸残基の網羅的探索

アブラナ科植物では他殖を実現するための機構の一つとして、自家不和合性と呼ばれる機構を有している。アブラナ科植物の自家不和合性では柱頭因子である *S*-locus receptor kinase (SRK) と花粉因子である *S*-locus cysteine-rich protein / *S*-locus protein 11 (SCR / SP11、以下 SCR) が重要な役割を果たしている。SRK は柱頭の細胞膜に局在する受容体キナーゼを、SCR は花粉表面に沈着するペプチドリガンドをそれぞれコードする。SRK と SCR は種内に多くの対立遺伝子を保持している。またゲノム上の近接した領域に両遺伝子は座乗し、両遺伝子領域間の組換えは高度に抑制されているために、SRK と SCR は一つのセットとして次世代へと遺伝する。このセットを *S* ハプロタイプとよぶ。SRK は同じ *S* ハプロタイプの SCR と相互作用して、自家不和合性反応を起こす。

モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は SRK や SCR に変異があるために自家不和合性である。しかし、シロイヌナズナ近縁種である *Arabidopsis lyrata* の SRK-*b* と SCR-*b* (*S*-*b* ハプロタイプ) 遺伝子を導入すると、シロイヌナズナは自家不和合性になる。この結果は、シロイヌナズナには SRK と SCR 以外の自家不和合性に必要な遺伝子は保存されていることを意味している。シロイヌナズナのライフサイクルの短さや形質転換の容易さは、自家不和合性研究に用いられてきたアブラナ科野菜にはないアドバンテージとなった。

われわれは、SRK の機能発現における SRK 受容体ドメイン

のアミノ酸残基の役割を明らかにすることを目的に研究を行っている。この目的のために、*A. lyrata* SRKb の受容体ドメインをコードする遺伝子領域に PCR 法で変異をランダムに導入した変異 *AISRK-b* 遺伝子を網羅的に作製し、作製した変異 *AISRK-b* 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを作出した (図 1)。

作出した形質転換体のうち 300 個体に関して、通常条件下での自家不和合性の表現型を解析したところ、109 個体は自家不和合性を、1 個体は弱い自家不和合性を示し、190 個体は自家和合性であった。全ての形質転換体に関して、変異 *AISRK-b* 遺伝子の導入を PCR 法により確認したところ、自家和合性であった 190 個体中 158 個体は変異 *AISRK-b* 遺伝子が導入されていることが確認された。これら導入遺伝子には *AISRKb* の機能欠損を引き起こす変異が導入されていると予想される。一方で、自家不和合性を示した 109 個体の形質転換体もつ変異 *AISRK-b* 遺伝子には機能欠損を引き起こすような変異は起きていないと考えられる。さらに、高温栽培条件下等でも自家不和合性が弱まらず、その特性の安定性に関与する変異が生じている可能性も考えられる。そこで現在、本研究課題で変異 *AISRK-b* 遺伝子を形質転換体ごとに増幅し、次世代シーケンサーを利用したアンプリコンシーケンス法により塩基配列を解読し、解析を進めている。これにより、SRK の機能発現に必要なアミノ酸残基の同定を目指している。

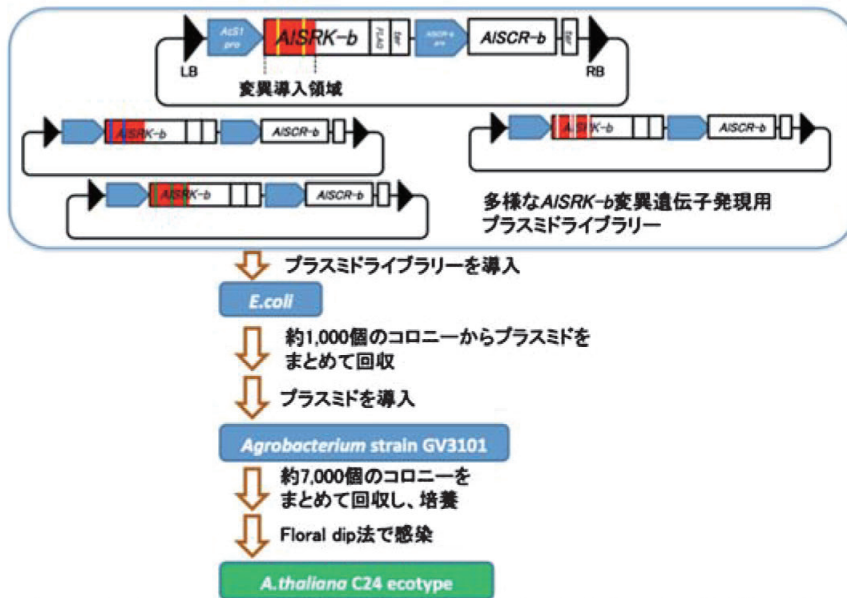


図 1 変異 *AISRK-b* を発現するシロイヌナズナの作製手順

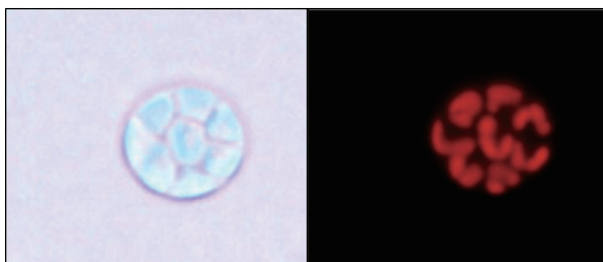
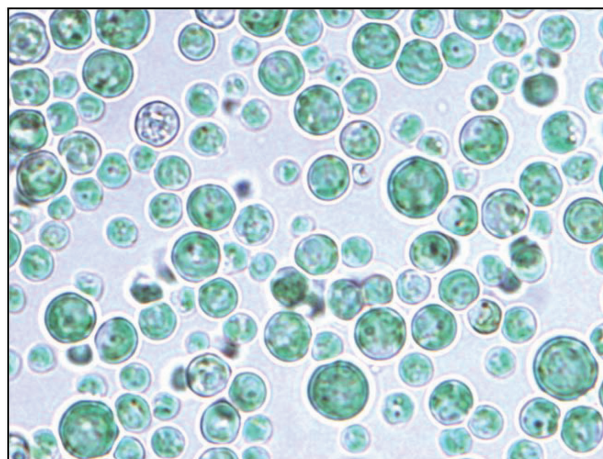
北柴大泰 (東北大学大学院農学研究科)
 山本雅也 (東北大学大学院農学研究科)
 共同研究先: 三井裕樹 (農学部)
 篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

真核単細胞紅藻 *Galdieria sulphuraria* の強酸耐性機構の解析

紅藻とは海苔などを含む真核藻類の一群である。その中でも最も原始的な分類群であると考えられているのが単細胞紅藻イデユコゴメ綱の藻類である。イデユコゴメ綱の藻類は一般的な多細胞紅藻のように赤色の色素を持っていないため緑色を呈している。イデユコゴメ綱は *Cyanidioschyzon*、*Cyanidium*、*Galdieria* の3属が知られており、主に硫酸酸性温泉などの極限環境下に棲息する。しかし、細胞形態、ゲノム配列、分裂様式、栄養的分類など多くの点でこの3属は性質を異にする。特に *Galdieria* はグルコースを始めとする多様な糖や糖アルコールを資化することが可能であり、糖存在下では葉緑体が白化・縮退するが増殖速度は亢進する。このような葉緑体の脱分化とも言える現象が観測できる藻類は極めて限られており、どうしてそのような機構を獲得したのか、また環境中でこの機構が有利に働く状況があるのかなど、非常に興味深い。また緑色植物へとつながる真核植物の進化系統樹から考えると、単細胞紅藻はその樹根に近い位置から分岐した植物と考えられるため、葉緑体の分化制御機構の誕生時期を考察する上でも極めて興味深い生物であると言える。

また近年、藻類を用いたバイオマス物質生産が盛んになってきているが、高い光合成能を有する微細藻類は植物と比べて単位面積当たりのバイオマス生産量が高いため、物質生産のホストとして期待されている。しかし屋外での藻類培養の際には他の生物の混入などが大きな問題となる。藻類を捕食する生物の混入を抑えつつ目的藻類の培養をおこなう上で、pH 2以下の強酸性条件でも問題なく生育可能な単細胞紅藻は開放培養に適していると考えられる。またこのような硫酸酸性温泉は、飲料用水や農業用水などと競合しないため、水資源の有効活用にもつながる。我々が箱根大涌谷のバイオマットから新規単離した *Galdieria sulphuraria* SG 株は強酸性から中性まで幅広く生育可能であるため、良い研究対象になると考えられる。一般に植物細胞では酸性ストレスに対し、プロトン輸送体を発現することで細胞外や液胞へプロトンを排出したり、あるいは適合溶質とよばれる低分子化合物を蓄積したりなどして適応している。イデユコゴメ綱における強酸性ストレス耐性機構の分子レベルでの研究例は極めて限られており、また一般的な分子生物学的研究も *Cyanidioschyzon* 以外の属では非常に限られ

ている。そのため、今後 *Galdieria* に関する研究が進めば単細胞紅藻の種間比較などと併せて様々な知見が明らかになると期待できる。



Galdieria sulphuraria SG 株の光学顕微鏡画像。8個のオートスポア（自生孢子）を内包した細胞とその葉緑体自家蛍光画像（右下）。

兼崎 友（静岡大学グリーン科学技術研究所）

共同研究先：渡辺 智（生命科学部）

松谷峰之介（生物資源ゲノム解析センター）

プラスミド由来の H-NS ファミリータンパク質が 宿主染色体由来のホモログの結合箇所を与える影響の解析

生命科学系の研究者であれば、大半の方が一度はプラスミドを使ったことがあるのではないだろうか。広く認識されているプラスミドとは、「ベクター」という名前で研究室内に存在し、宿主に導入すれば目的の遺伝子が発現する便利な道具である。その身近さ故に、プラスミドを保持させることが宿主にどのような影響を与えるのかに思いを馳せることは無いだろうと思う。

私達はいわゆるベクターではなく、環境細菌由来の天然のプラスミドを対象に上述の疑問を解決すべく研究を進めている。天然のプラスミドは人工的に改変されたベクターとは異なり、プラスミドが宿主内で維持されるために最低限必要な複製・分配に関わる遺伝子以外にも多くの遺伝子を保持しているため、一般にベクターよりもサイズが大きく、数十 kb ~ 1 Mb を超えるものまで存在する。このようなプラスミドは明らかに宿主にとって異物であり、基本的には迷惑なものである。まずプラスミドの複製・分配のためにエネルギーを割かねばならないし、役に立つかも分からない外来遺伝子の発現のために RNA ポリメラーゼやリボソームを奪われることになる。プラスミド上には抗生物質耐性遺伝子や難分解性物質分解遺伝子など、特殊な環境下で細菌が生き残るために必要な遺伝子がしばしば存在するため、そのような環境下ではプラスミド保持細菌が生存競争において有利になることもある。しかし普通は、上述のような理由でプラスミド保持は宿主にとって負荷となることが多い。

細菌はプラスミドのような外来 DNA から身を守る仕組みを持っている。その一つが、細菌の核様体形成に重要な役割を果たす核様体タンパク質の一種、H-NS ファミリータンパク質である。H-NS ファミリータンパク質は結合に必須なコンセンサス配列を持たず、ゲノム上の低 GC 含量領域に結合しやすい性質を持ち、DNA 上で多量体を形成することで RNA ポリメラーゼの働きを阻害する。一般に外来 DNA は宿主染色体より GC 含量が低くなる傾向にあるため、H-NS ファミリータンパク質は外来 DNA に好んで結合する。プラスミドを保持していない細胞内では、染色体上の外来遺伝子領域を中心に H-NS ファミリータンパク質が結合し、細菌の核様体形成に寄与しているが、ここに巨大な外来 DNA であるプラスミドが入ってくると、染色

体に結合していた H-NS ファミリータンパク質がプラスミドに奪われることになる。プラスミド獲得と同時に H-NS ファミリータンパク質の発現量が上がるなどして、十分量のタンパク質が供給されれば問題は無い。だが不足してしまった場合には、プラスミド由来の遺伝子が発現してしまうだけでなく、元々染色体上で H-NS ファミリータンパク質により発現が抑えられていた領域まで転写が始まってしまう、宿主に大きな負荷がかかると考えられる。そうならないように、プラスミドの中には自ら H-NS ファミリータンパク質をコードするものも存在する。プラスミド側から見れば、不足しそうな分は自分の遺伝子から供給し、宿主にかかる負荷を最低限にすることで、自分が排除されないようにする仕組みである。

私達が研究対象としている含窒素芳香族化合物カルバゾールの分解プラスミド pCAR1 にも、H-NS ファミリータンパク質 Pmr がコードされている。pCAR1 は *Pseudomonas* 属細菌を主な宿主としており、私達はこれまで土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株をモデル宿主として使用してきた(図)。KT2440 株の染色体には主な H-NS ファミリータンパク質として TurA、TurB がコードされている。Pmr と TurA、TurB はそれぞれアミノ酸レベルで 50~60% の相同性を示し、ヘテロ多量体を形成することが知られている。TurA、TurB は細胞内で核様体形成に寄与しているはずだが、ここに pCAR1 が入ってくると何が起るだろうか? まず TurA、TurB が pCAR1 に奪われるが、pCAR1 からは Pmr が発現し奪われた分の埋め合わせが行われる。しかしこれまでの研究から、TurA、TurB、Pmr の三者は、DNA への結合力やタンパク質間の親和性、発現の時期が少しずつ異なることが明らかとなっている。つまり Pmr は染色体上で不足した TurA や TurB の完全な埋め合わせにはならず、むしろ Pmr の発現によって元々 TurA と TurB が形成していた宿主の核様体構造が変化してしまうと予想される。本共同研究では、pCAR1 の獲得前と獲得後の細胞において TurA、TurB、Pmr を対象とした ChIP-Seq 解析を行うことにより、TurA、TurB の結合箇所が Pmr の参入によりどのように変化するのかを明らかにしたいと考えている。

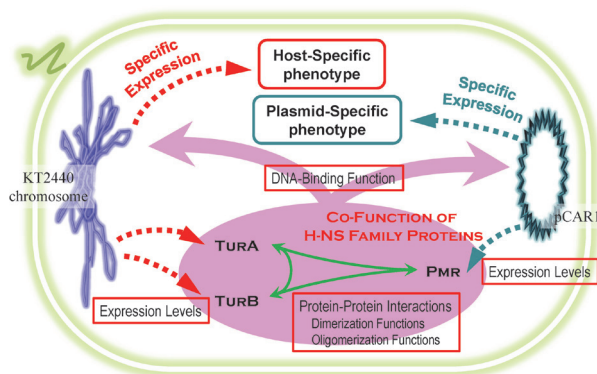


図 *Pseudomonas putida* KT2440 (pCAR1) 株における H-NS ファミリータンパク質 (TurA, TurB, Pmr) の機能

水口千穂 (東京大学生物生産工学研究センター)
共同研究先: 渡辺 智 (生命科学部)
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

成長段階に応じた葉の形態を制御し作物の生産性を向上させる分子基盤の構築

本研究の目指すもの

葉は光合成を行い作物成長に重要な器官であり、葉をどのように伸長させ展開するかは、作物の収量性を決する要因です。葉の形やサイズは、遺伝子の働きによって決まることがよく研究されていますが、作物の品種改良に利用可能な遺伝子の知見は十分ではありません。私たちは、本研究により、イネやイネ科作物の葉の改良を可能とする遺伝的仕組みを解明することを目指しています。特に、作物の初期成長を制御するための分子基盤開発を目指します。

これまでの研究と研究背景

イネの葉の形態は同一個体の中でも、その成長段階によって変化します。その葉の形やサイズの変化が、どのように制御されるのかは、まだほとんど知見がありません。イネの葉は、大きく分けて、「光合成を司る葉身」と「植物体を支持する葉鞘」の二つの領域からなります。イネの成長の初期に形成される第1葉では葉身が全くできず、次に形成される葉から徐々に葉身が大きくなり、葉全体に占める葉身の割合が高くなります(図1)。

このようなイネの葉身：葉鞘割合を制御する機構・遺伝子について、私たちは東京農工大学生物資源ゲノム解析センターとの共同研究(生物資源ゲノム解析拠点平成28年度共同研究課題「作物の成長段階の移行タイミングを制御し生産性を向上するための分子基盤構築」)を通じて、世界に先駆けて新知見を報告することができました。(Toriba and Tokunaga *et al.*

Nature Comm. 2019)

イネにおける葉の形態変化は、*BOP* 遺伝子の働きで制御されることを明らかにすることができ、*BOP* 遺伝子の上流でマイクロRNA156 (miR156) が働き、葉の形を決めていることも明らかにしました(図2)。

その後の研究から miR156 は、*BOP* 遺伝子を介した葉身：葉鞘割合だけでなく、幼若/成熟期に則した葉の形態に関する様々な形質(例えば、葉全体のサイズや葉の成長速度)を制御することも分かっています。そこで、miR156 による葉の形質制御の全体像を把握することにより、作物の生産性向上に向けた葉の遺伝的改変の基礎となる知見が数多く得られると考えています。

本共同研究で明らかにすること

本研究は、miR156 により葉の形態が制御される仕組みの全体像解明を目的としています。miR156 は、転写制御因子 SPL をコントロールすることで葉の形態を支配していることが知られています。本共同研究では、miR156/SPL 経路により決まる葉の形態形成メカニズムの全体像解明を目指し、RNAseq 解析により網羅的に発現変動する遺伝子の同定を進めています。

謝辞

本研究を通じて、東京農工大学生物資源ゲノム解析センターの皆様との共同研究の機会をいただきましたことに、厚く御礼申し上げます。

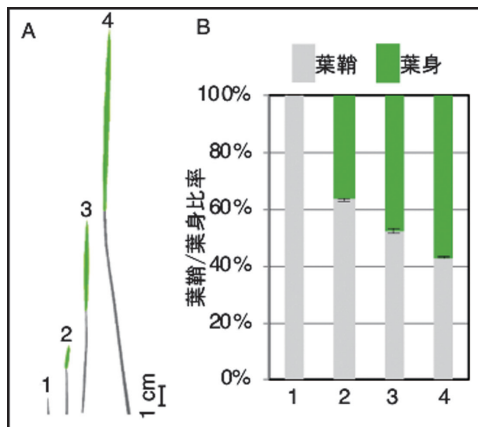


図1 イネ第1葉から第4葉の葉身/葉鞘割合

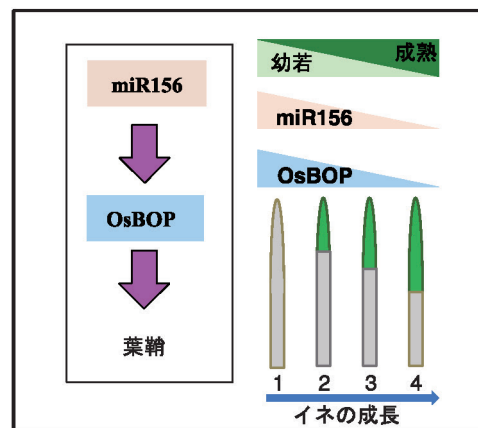


図2 miR156 は OsBOP の上流で葉を制御する

鳥羽大陽 (東北大学大学院生命科学研究科)
 経塚淳子 (東北大学大学院生命科学研究科)
 共同研究先: 太治輝昭 (生命科学部)
 吉瀬祐子 (生物資源ゲノム解析センター)

ナミテントウの多様な斑紋を創出する染色体構造の解明と斑紋の操作

テントウムシはアブラムシやカイガラムシ、ハダニなどの農林害虫に対する生物農薬として古くから着目されている益虫（害虫にとっての天敵昆虫）である。農林害虫の匂いを嗅ぎ取って捕食する野性の本能を利用する為、化学農薬を利用した際に見られる薬剤耐性昆虫出現の問題がない。農薬としての優れた特性を備える一方で、農場や苗床から飛散したテントウムシを捕うために頻りに昆虫を散布し続ける必要がある。また、野外へ逃亡した場合の環境への負荷が大きいことも懸念される。生物農薬としての有効性や汎用性を高めるには、テントウムシを家畜化し、捕食能力や寿命、最低限の飛翔能を維持したまま作物への定着性を向上するとともに、新たな捕食する害虫の対象を拡大した系統を作出することが望ましい。しかし、未だそのような有用系統の作出には至っていない。一方、近年、CRISPR/Cas9 に代表されるゲノム編集技術と組換え技術が急速に発達したことにより、有用な家畜を人為的に設計することが現実味を帯びてきた。特に、ゲノム編集を駆使して大規模に染色体構造を改変することで、作物・家畜や細胞に新機能を付与するゲノム合成技術の開発の機運が高まっている。

本研究では、次世代シーケンス技術とゲノム編集技術を駆使してテントウムシの染色体構造を人為的に設計・改変し、有用な形質を付与する技術の確立を目指す。有用形質の付与を目指して染色体情報を書き換えるには、遺伝子のタンパク質をコードする領域だけではなく、安定的な形質の表出を支える非

コード領域内の遺伝子発現制御配列の実態を理解し、改変する必要がある。そこで、私たちが最近見出したナミテントウの斑紋多型制御遺伝子 *pannier* の巨大イントロン（100 kbp）内の転写制御配列群を表現型操作のモデルとして、技術開発を進めることとした。

ナミテントウには同種内に 200 以上の多様な斑紋型が存在する（図 1）。以前に行われたナミテントウのゲノム解読と遺伝学的連鎖解析から、このような多様な斑紋が生じた一因が単一遺伝子 *pannier* の内部で繰り返し生じた染色体逆位にあることが明らかとなった（図 2）。*pannier* は GATA 転写因子をコードし、蛹の時期にテントウムシの翅の色が黒になるか赤になるかを切り替える司令塔のような働きをする。私たちは、100 kb に及ぶ染色体の構造に表現型（斑紋）を著しく多様化させる秘密が隠されていると睨み、蛹の時期の翅において染色体の活性化状態を理解することを目指した。

近年確立された、転写制御配列の指標となるオープンクロマチン領域を検出する ATAC-seq 法（Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing）をテントウムシの蛹の翅に応用して解析を行った。その結果、*pannier* 遺伝子座において複数のオープンクロマチン領域を再現よく推定することに成功した。今後はゲノム編集による転写制御配列の改変に必要な DNA 配列の設計と、実際に斑紋型を操作する上での遺伝子操作技術の開発を進めていく予定である。

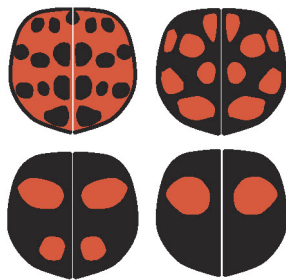


図 1 ナミテントウの前翅の多様な斑紋型。4つの主要な斑紋型を示す。上段左から紅型・斑型・四紋型・二紋型。

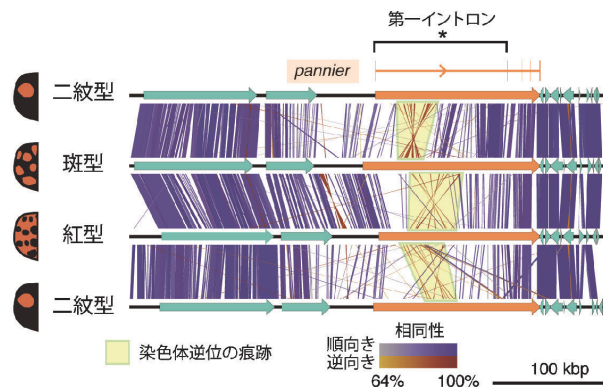


図 2 *pannier* イントロンの染色体逆位を伴う配列の多様化。染色体逆位が生じた領域（黄色）の周辺で斑紋間での相同性が減少している。（Ando et al. 2018, Nat Commun, 9:3843 を改変）

安藤俊哉（自然科学研究機構・基礎生物学研究所）
共同研究先：下村健司（生命科学部）
吉瀬祐子（生物資源ゲノム解析センター）

環境変動が沿岸に生息する水生生物の多様性に及ぼす影響

自然の環境変化として地球温暖化や津波などがありますが、地球温暖化はモデル解析により植物プランクトンから魚類に至る海洋生態系に今後影響を及ぼすと推察されています。しかし、海洋調査は長くても100年程度（多くは数十年）で、実際に海洋生態系に及ぼす影響は断片的にしかわかっていません。また、震災による津波の影響として、海底に堆積していた貝毒原因プランクトン（渦鞭毛藻の一部）のシスト（種）が津波により巻き上がったのが原因で震災前より貝毒が発生したと報告されています。一方、植物プランクトンの中でも珪藻など別の分類群については、震災前後で種組成や春のブルーム時期の変化は認められなかったという報告があります。自然災害は予測できず震災前のデータが限定されているため、分類群により津波影響が異なった要因は良くわかっていません。通常、問題が発生してから過去に遡って調査することは難しいと考えられますが、DNA試料であれば数万年前にも遡って分析できることもあります。また、分解しやすい植物色素の試料などに比べ、DNA試料は保存が比較的容易です。そのため、あらかじめ保存することを前提として試料を採取したり、堆積年代が既知の海底柱状泥などを用いたりすれば、遺伝子解析により過去の生物群集を把握することができると考えられます。

本共同研究では、今までに採取した海水や底泥の保存試料から、宮城県沿岸域における水生生物の出現状況を把握することを目的としました。現在、以下のテーマについて進めています。

1. 柱状コアから検出する水生生物の痕跡と長期変動



採泥用に海上に設置した櫓

堆積年代が既知の柱状試料があれば、層ごとに塩基配列を調べることで、当時の環境を知ることができます。形の残る植物プランクトンなど特定の種類のみを調べるのではなく、DNAシーケンスにより食物連鎖でより高次の水生生物について出現状況を把握できないか検討しています。堆積年代における環境変化と比較することができれば、温暖化などが水生生物の多様性や種の遷移に及ぼす影響を把握できるのではないかと考えています。

2. 松島湾の海水から検出される微生物の経時変化

松島湾ではマガキやノリなどの水産業が行われています。一方で、観光業も盛んで周囲の人口密度は高く、複雑な海洋環境となっています。震災後、竹で組まれたカキ養殖施設がコケムシにより食べられ朽ちやすくなったと言った漁業者の話もあります。しかし、震災前の状況はよくわかっていません。震災前に採取した海水ろ過試料を保存していることもあり、震災後数年間にわたり採取した海水ろ過試料と18SrDNA配列を比較することで、松島湾における微生物の経時変化を把握したいと考えています。

3. 貝毒原因プランクトンの出現

2018年には麻痺性貝毒がそれまで数十年にわたり問題とならなかった海域で大発生しました。大発生した要因を探るため、宮城県内の異なる沿岸で採取した表層海底泥から、麻痺性貝毒原因プランクトンについてITS領域の配列を調べ、宮城県内で大発生した麻痺性貝毒原因プランクトンがどこから流入してきたか推定できないかと考えています。



半割した柱状泥（保存試料の一部）

奥村 裕（水産研究・教育機構東北水産研究所）
共同研究先：塩本明弘（生物産業学部）
吉瀬祐子（生物資源ゲノム解析センター）

緑藻クラミドモナスの窒素欠乏に応答した脂質蓄積制御機構

藻類を利用したバイオ燃料の生産は、単位面積当たりの生産量が多く、食糧生産と競合しないというメリットがあり次世代バイオの研究が期待されている。しかし、まだ生産コストが高いなどから実用化には至っていない。藻類バイオ燃料の実用化のためには、遺伝子工学や育種による生産量の増大や、大量培養と精製にかかるコストの削減など、様々な面で改善が必要である。

屋外培養系では、環境条件（光、温度、栄養塩の濃度など）を厳密に制御することは難しい。そのため、藻類は常に変動する環境に応答し、自身の代謝を常に最適化しながら生育する。多くの藻類は、窒素（N）やリンなどの栄養欠乏に応答し、バイオディーゼルの原料となるトリアシルグリセロール（TAG）を蓄積することが知られている。藻類によるTAGの蓄積は、栄養欠乏下における生存戦略のひとつと考えられるが、細胞が環境中の栄養塩の変化を感知してTAG蓄積を誘導するメカニズムに関しては不明な点が多い。これまでに、モデル緑藻のクラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* では、窒素欠乏下でTAG蓄積を制御する因子として、複数のタンパク質キナーゼや転写因子などが同定されてきた。我々は、dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase (DYRK) 型タンパク質キナーゼであるTAG Accumulation Regulator I (TAR1) が、N欠乏下でのTAG蓄積を制御することを明らかにした。酢酸とCO₂を炭素源とする混合栄養条件下では、N欠乏時にTAR1が光合成を抑制し、同時に酢酸の資化を促進することでTAG蓄積を誘導する。一方で、CO₂のみを炭素源とする光

独立栄養条件下では、5%以上の高CO₂条件かつN欠乏下において、光合成とTAG蓄積を抑制する（図1A; Kajikawa *et al.*, *Plant Physiol.*, 168: 752-764, 2015, Shinkawa *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 60: 916-930, 2019）。つまりTAR1は、栄養条件に応じてTAG蓄積を正・負の両方に制御する因子であることが分かった。TAR1は、Target of Rapamycin Kinase 複合体 (TORC1) を起点としたシグナル伝達経路の一部に属すると推定されているが、リン酸化カスケードの階層構造は明らかにされていない（図1B; Kajikawa & Fukuzawa, *Front. Plant Sci.*, <https://doi.org/10.3389/fpls.>）。

我々は、クラミドモナスのTAG蓄積制御機構の理解を目指し、薬剤耐性DNAカートリッジ（タグ）を、新しく開発した高頻度形質法（Yamano *et al. Methods Mol Biol.* 2050: 155-161, 2020, Yamano 他 *J. Biosci. Bioeng.* 115: 691-694, 2013）により野生型クラミドモナスに形質転換し、ランダムにタグが挿入された変異体ライブラリ75,000株から *tar1* 変異体と同様にC/Nストレス条件下でTAGを高蓄積する変異体をスクリーニングした。その結果、コイルドコイルドメイン含有タンパク質を欠損した株や、タンパク質脱リン酸化酵素を欠損した株が、*tar1* 変異株以上に、TAGを高蓄積することを見出した。本研究計画では、これらの新規変異体のトランスクリプトームが、野生株や *tar1* 変異体とどう異なるのかについて比較解析することで、TAG蓄積制御機構の全体像を解明しようと共同研究を進めている。

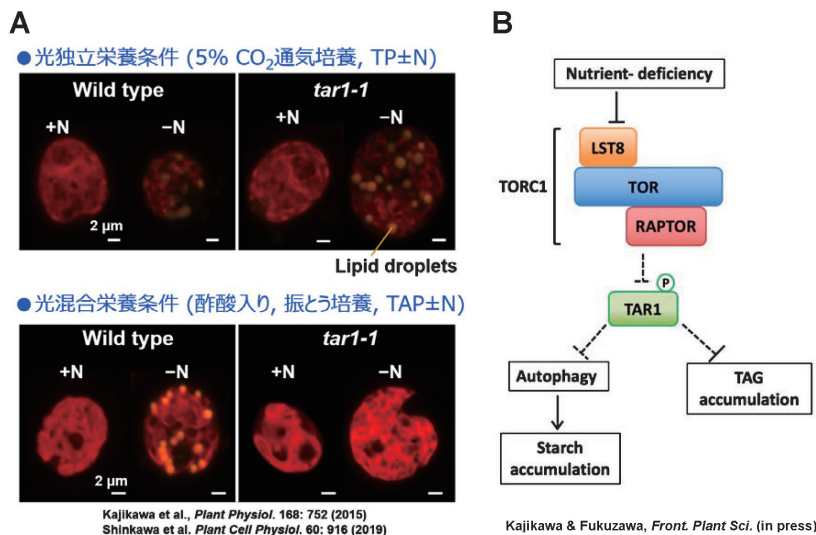


図1 緑藻クラミドモナスの *tar1* 変異体 (*tar1-1*) の表現型と、TAR1 による TAG 蓄積制御のモデル (A) 窒素栄養 (N) 充足条件および N 欠乏条件における TAG (油滴) の蓄積。NileRed で染色された油滴は黄色で、クロロフィル自家蛍光は赤色で示す。(B) TAR1 を介したシグナル伝達の推定モデル。

福澤秀哉 (京都大学大学院生命科学研究科)
 新川はるか (京都大学大学院生命科学研究科)
 梶川昌孝 (京都大学大学院生命科学研究科)
 山野隆志 (京都大学大学院生命科学研究科)
 辻 敬典 (京都大学大学院生命科学研究科)
 共同研究先: 渡辺 智 (生命科学部)
 松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

In-vitro 肥大誘導を受けた *Brassica rapa* の トランスクリプトームの特徴づけ

Brassica rapa はアブラナ科に属する草本植物種であり、その変種には、チンゲンサイ、ハクサイ、カブ、コマツナなど、多くの野菜が含まれる。胚軸や葉が著しく肥大することは *B. rapa* の特徴であり、それらが野菜として選抜され利用されるようになった要因でもあると考えられる。ダイコン (*Raphanus sativus*) は *B. rapa* に近縁であり、その貯蔵根の形成においては糖や植物ホルモン・サイトカイニンが重要な役割を果たすことが知られている。しかし、*B. rapa* の肥大における糖や植物ホルモンの役割に関しては不明な部分も多く、肥大を誘導・促進する遺伝子も同定されていない。

申請者らは、種々の培地を用いてカブ、チンゲンサイ、ハクサイ、コマツナを培養し、それらの胚軸を著しく肥大させる培地を見出した (図1)。この培地に幼植物体を移植させると、その数日後には目視で肥大が確認できるようになる。

このような人為的な肥大誘導系は、*B. rapa* 肥大開始後初期に起こる変化を捉えるのに有用であると考えられる。本研究の目的は、カブ、チンゲンサイ、ハクサイをこの系により肥大させた際の遺伝子発現の変動を網羅的に明らかにすることである。

本研究により、*B. rapa* の肥大の制御に関わる遺伝子や代謝経路を推定することができ、糖や植物ホルモンの役割も推定することができる。肥大開始の引き金となる遺伝子は、*B. rapa* のみならず肥大器官を持つ他植物種においても同定されていないが、本研究によりそのような遺伝子についても手掛かりが得られる可能性がある。これらは、*B. rapa* の肥大の分子メカニズムに関する理解を深め、*B. rapa* の肥大パターンへの制御・改変を行うことに役立つ可能性がある。



図1 In-vitro 肥大誘導を受けた *B. rapa*

高野哲夫 (東京大学アジア生物資源環境研究センター)
共同研究先: 峯 洋子 (農学部)
篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

ニンニク遺伝資源における一塩基変異多型用いた コアコレクションの構築

機能性代謝物の宝庫であるニンニクの遺伝資源を活用するためには、それらの遺伝情報を把握することが一つの重要なポイントとなる。しかし、ニンニクはゲノムサイズが～16 Gbpと大きいと、ゲノムDNAを対象とした比較解析は効率的ではない。そこで、トランスクリプトーム解析を遺伝情報収集の手法として用いることとし、代表系統に対する大規模解析によりリファレンスとなる unigene セットの配列情報を構築するとともに、コアとなる遺伝資源のトランスクリプトーム解析を実施して SNP 情報の整備を行なう必要がある。手始めに、我々はニンニク遺伝資源解析の代表系統として‘ホワイト六片’を選択し、葉、根、バルブの3組織からRNAを抽出し Illumina NextSeq シーケンサーを用いて配列解析を行なった。得られた配列情報を PRINSEQ と FastX-toolkit により精査した後、Trinity v2.5.1 を用いてアセンブルを実施しニンニク unigene セットを構築した。ニンニク遺伝資源から採取地域の情報や栽培形質の情報を基にニンニク遺伝資源 80 系統から 37 系統を選抜し、葉の組織より抽出した RNA サンプルを用いて配列解析を行ない、得られた RNA-seq リードを RSEM1.3.0 で unigene セットのリファレンス配列にマッピングすることにより、ニンニクコア系統の SNP 情報の収集・整理を行なった。以上の実験の結果、‘ホ

ワイト六片’の各組織から3億リードを超える配列情報が得られ、配列情報をアセンブルすることにより、69,112 コンティグからなるニンニク unigene セットの整備が完了した。次に、unigene セットのアノテーションを行なうとともに、得られた unigene セットのリファレンス配列に対して各組織のリードをマッピングすることにより、3種類の組織での発現量を RPKM 値として集計し、ニンニク unigene の基本情報として整理した。さらに、37系統のトランスクリプトーム解析を実施した結果、各系統について2千万リード前後のデータが収集され、これらの配列情報をニンニク unigene をリファレンスとしてマッピングすることにより供試系統の SNP 情報を収集・整理することができた。本支援で利用する遺伝資源は、残り43系統のうち16系統とする。本研究では、ネギ類転写産物データベース (AlliumTDB) にニンニクの解析データを統合し、転写産物に関するビックデータの収集・整備を目指す。転写産物解析データに関しては、Transcriptome-based genotyping により各ニンニク系統の1,000座以上のSNPを一挙に決定し、遺伝資源がもつ遺伝的多様性を最大限含む最小の系統セット、すなわちコアコレクションをDNAマーカー遺伝子型に基づいて選定する。

ニンニク: 香辛野菜として世界中で親しまれている。

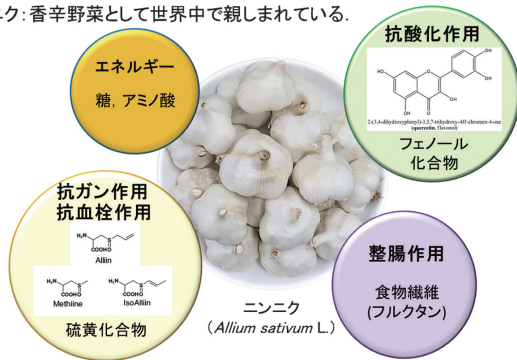


図1 ニンニクがもつ健康機能性

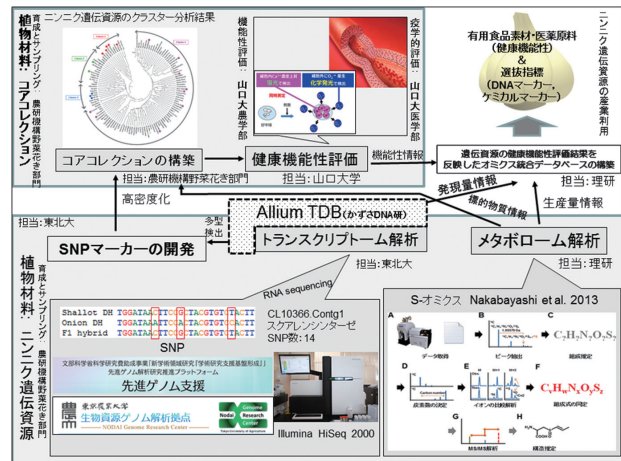


図2 ニンニクオミクス研究の概要

執行正義 (山口大学大学院創成科学研究科)
 佐藤修正 (東北大学大学院生命科学研究所)
 共同研究先: 峯 洋子 (農学部)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

様々な重力環境で育成したヒメツリガネゴケにおける 発現変動遺伝子の解析

地球上において重力は最も変動しにくい環境要因の1つであり、陸上植物の形態形成は一定の重力環境を前提として行われている。たとえば被子植物では、重力屈性（重力の方向に応じて屈曲する現象）や抗重力反応（重力の大きさに応じて体を支えつづくる現象）のしくみが研究されてきた。重力屈性はオーキシンの偏差分布を制御するしくみが重要でありその分子機構がシロイヌナズナ等のモデル被子植物において明らかになってきた。一方、抗重力反応のしくみは細胞骨格や細胞壁合成が重要であることがわかってきたが、それ以外の大部分はまだよくわかっていない。被子植物以外の陸上植物においても、重力応答反応は重要だと考えられるが、そのしくみはまだよくわかっていない。植物は水中から陸上へと進化してきたがその過程でどのように重力に対する応答性を獲得し、それが成長や形態形成にどう関わっているのか、またそのしくみはどの程度陸上植物間で共通なのかを理解することも大切である。

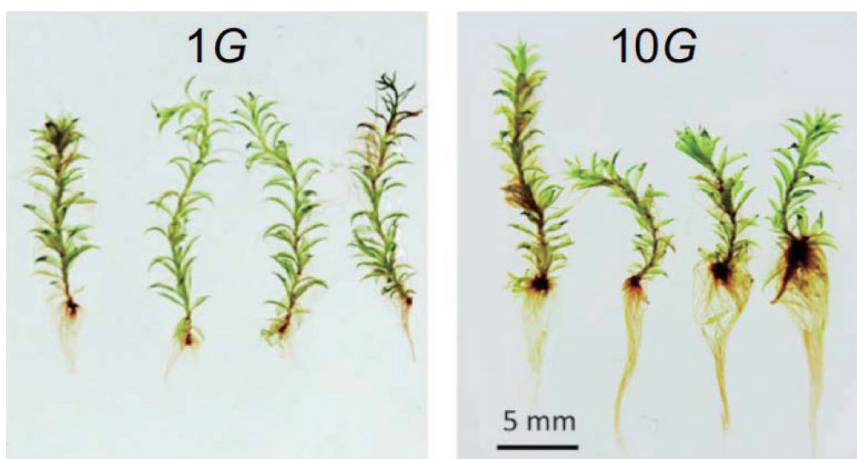
そこで私たちは、光を照射し植物を長期間培養できる過重力植物栽培装置を開発し、地上で1Gよりも大きな重力（過重力）が植物の成長や形態に与える影響を調べることにした。そのためにモデルコケ植物であるヒメツリガネゴケに注目した。ヒメツリガネゴケを過重力植物栽培装置により2～10Gの過重力環境下で1ヶ月間栽培した。その結果、予想外にも過重力によりヒメツリガネゴケの成長速度が上がり成長量（バイオマス）が増えることを見出した（Takemura et al. 2017）。また過重力によりヒメツリガネゴケの形態や器官数が増え、光合成活性も増加することなどがわかった。

一方、過重力で見出したこのような変化が、1Gを境としてそれより小さな重力下では、どのような応答になるのだろうか。シロイヌナズナなどごく一部のモデル被子植物では国際宇宙ステーション（ISS）における宇宙環境、すなわち微小重力環境

（ μG ）下における成長や遺伝子発現が調べられている。しかしISS内での植物栽培容器は5～10cmと小型であり、成長するにつれてシロイヌナズナの各器官が容器に接触し健全に長期間栽培することは困難である。したがって、微小重力が成長や形態形成に与える影響を正確に評価することは難しい。一方、ヒメツリガネゴケは背丈が1cm程度と小型であることから、ISS内での長期宇宙栽培実験に適している。そこでコケ植物を用いた宇宙実験を宇宙航空研究開発機構（JAXA）に提案し、2019年7月と12月の2度にわたりISS「きぼう」実験棟でヒメツリガネゴケを1ヶ月間栽培する機会に恵まれた。こうして μG 下で培養したサンプルをそれぞれ無事地上に回収することにも成功した。

現在これらのサンプルについて成長、形態、光合成、遺伝子発現等の解析を開始している。地上における過重力栽培実験と宇宙空間における微小重力栽培実験の結果を統一的に捉え、様々な大きさの重力に植物がどのように応答するのかを包括的に明らかにしたい。過重力により植物の成長量が増加することは初めての発見であり、本研究を通じて重力に依存した植物の成長制御の鍵となる未知の分子メカニズムを明らかにし、植物の抗重力反応の理解に迫りたい。また得られた科学的知見は地上だけでなく、月や火星など宇宙空間における植物の新しい成長制御技術にもつながるものと期待している。

Takemura, K., Kamachi, H., Kume, A., Fujita, T., Karahara, I., and Hanba, Y.-T. (2017) A hypergravity environment increases chloroplast size, photosynthesis, and plant growth in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Research*, 130, 181-192.



藤田知道（北海道大学大学院理学研究院）
共同研究先：坂田洋一（生命科学部）
篠澤章久（生物資源ゲノム解析センター）

NGRC ニュース

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

2020年3月号

2019年度 学内公募一覧

1. 石川 森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)
「16S rRNA メタゲノム解析を適応した熟成チーズの細菌相解析」
2. 平山 博樹 (生物産業学部 北方圏脳学科)
「抗ミューラー管ホルモンがウシ雌性生殖器機能に及ぼす影響」
3. 山根 拓実 (応用生物科学部 食品安全健康科)
「メタボリックシンドロームによる皮膚機能の脆弱化メカニズムの解明」
4. 太治 輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「イネ APO1・APO2 遺伝子による穂のサイズ制御におけるトランスクリプトーム解析」
5. 樋浦 仁 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「マウス卵母細胞を用いた ChIL-seq 法の確立」
6. 樋浦 仁 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「フタル酸エステルの母体暴露が世代を越えて精子形成異常を引き起こすエピ変異の解明」
7. 樋浦 仁 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「マウス始原生殖細胞における性差に関わる micro RNA の標的遺伝子の探査」
8. 米澤 隆弘 (農学部 動物科学科)
「化石試料由来の DNA 解析に基づくマダガスカル産絶滅走鳥類エピオルニスの集団動態学的研究」
9. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「シアノバクテリアゲノムに刻まれた起源的 DNA 複製開始機構の解析」
10. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「単細胞性真核紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* 10D における DNA 複製開始領域の同定」
11. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「食品添加物が消化管上皮に与える影響の解析」
12. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「日本米由来の機能成分が味蓄機能に及ぼす影響の解析」
13. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「消化管免疫および口腔内免疫機構に関する研究」
14. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「in vitro における膵臓の発生と再生研究」
15. 大西 章博 (応用生物科学部 醸造科学科)
「醤油乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* に感染するファージのゲノム解析」
16. 福島 穂高 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「マルチスケール精神病態の同定を目的としたトランスクリプトーム網羅的解析」
17. 遠藤 明仁 (生物産業学部 食香粧化学科)
「ミツバチ消化管内乳酸菌の共生」

18. 樋浦 仁 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「マウス生殖細胞および初期胚におけるインプリント遺伝子の DNA メチル化解析」
19. 半澤 恵 (農学部 動物科学科)
「ニホンウズラ宿主防御ペプチドの多様性と腸内細菌叢の関係」
20. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「霊長類オルガノイドを用いた味覚・消化感覚の解析」
21. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「遺伝子改変マウスを用いた膵臓再生メカニズムの解析」
22. 井上 順 (応用生物科学部 農芸化学科)
「スルフォラファンによる腸内フローラへの影響」
23. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「圃場栽培試験における作物へのナノバブル水効果の検証」
24. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「塩生植物シバナの根圏微生物叢の解析」
25. 山本 祐司 (応用生物科学部 農芸化学科)
「マウスの乳酸菌摂取による腸内フローラへの影響」
26. 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)
「ヤマイモに棲息する窒素固定細菌のメタゲノム解析」
27. 田中 尚人 (生命科学部 分子微生物学科)
「有用菌株の機能性遺伝子探索とその発現ネットワーク解析」
28. 田中 尚人 (生命科学部 分子微生物学科)
「有用菌株の機能性遺伝子探索とその発現ネットワーク解析 (追加分)」
29. 田中 尚人 (生命科学部 分子微生物学科)
「生分解性プラスチックの河川微生物フローラへの影響」
30. 門倉 利守 (応用生物科学部 醸造科学科)
「国酒酵母 (清酒酵母・焼酎酵母・泡盛酵母) の全ゲノムによる系統解析と特異性の検出と利用」
31. 藤本 尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)
「ダム湖における微生物群集の鉛直分布および季節変化の解析」
32. 藤本 尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)
「PMA-PCR 法を用いた浄水場処理工程水の細菌相解析」
33. 千葉櫻 拓 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「ヒト染色体複製開始領域におけるサイクリン A と Mcm7 の相互作用解析」
34. 鈴木 司 (応用生物科学部 農芸化学科)
「AMPK キナーゼが選択的スプライシングに及ぼす影響の解析」
35. 中村 進一 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「アブラナの重金属動態を変えるタンパク質の構造と機能の解析」
36. 坂田 洋一 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「シロイヌナズナの乾燥耐性機構におけるタンパク質リン酸化酵素 ARK の役割」
37. 坂田 洋一 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「カドミウム高感受性変異体を用いた植物の重金属ストレス応答機構の解明」

38. 坂田 洋一 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「コケ植物の乾燥耐性に関わる遺伝子群の発現解析」
39. 尾畑 やよい (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「卵母細胞の発生支持能を制御する因子の解析」
40. 川崎 信治 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「微生物の環境ストレス耐性機構と感受性機構に関する研究」
41. 川崎 信治 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「花と昆虫に共生する微生物叢のメタゲノム解析」
42. 朝井 計 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「細胞における転写翻訳装置の新規機能と増殖停止期の生存戦略ならびに実験進化と合成生物」
43. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)
「出芽酵母リボソームタンパク質遺伝子群の新規転写制御機構の解明」
44. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)
「出芽酵母における基本転写因子 TFIID とその類縁複合体 SAGA の機能解析」
45. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)
「分裂酵母の細胞周期阻害剤プリュッシンの作用機構の解明」
46. 伊藤 晋作 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「イネにおけるプロゲステロンおよび TIS108 応答遺伝子の解析」
47. 太治 輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「シロイヌナズナの野生型および変異株のリシーケンス」
48. 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)
「ヤムイモに棲息する窒素固定細菌のメタゲノム解析 (追加分)」
49. 太治 輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「ナチュラルバリエーションを利用した植物の環境ストレス耐性の解明」
50. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)
「卵子の発育を支持する卵胞液中の miRNA」
51. 煙山 紀子 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「非アルコール性脂肪性肝炎に対する脂質代謝変動の網羅的解析」
52. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)
「培養基質の性状とそれに制御される miRNA を用いた総合的な卵子発育培養システムの開発」
53. 伊藤 晋作 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「大豆シスト線虫の孵化時に関与する遺伝子の探索」
54. 相根 義正 (生物産業学部 食香粧化学科)
「各種ボツリヌス菌のゲノム解析」
55. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「ヤムイモ 2 品種の根圏微生物叢の解析」
56. 太治 輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「ナチュラルバリエーションを利用した植物の環境ストレス耐性の解明 (追加分)」

57. 岩田 尚孝（農学部 動物科学科）
「細胞の機能を調整する miRNA の同定」
58. 渡辺 智（生命科学部 バイオサイエンス学科）
「亜リン酸を用いたロバスト且つ封じ込めを可能とする微細藻類の培養技術開発」
59. 坂田 洋一（生命科学部 バイオサイエンス学科）
「植物の ABA 応答に必須のセンサーヒスチジンキナーゼに制御される遺伝子群の発現解析」
60. 米澤 隆弘（農学部 動物科学部）
「環境 DNA を用いたヌタ場中の微生物群集の推定」
61. 新村 洋一（生命科学部 バイオサイエンス学科）
「鉄欠乏時にキュウリ (*Cucumis sativus*) で生成される新規ビタミン B2 誘導体 (4'-ketoriboflavin) の生成機構の解析」
62. 服部一夫（応用生物科学部 栄養科学科）
「小腸オルガノイドを用いたデオキシニバレノールの影響評価」

オルガノイド培養法を用いたマウス消化管内分泌細胞の解析

マウス消化管上皮細胞は3-4日で再生を繰り返す細胞であり、クリプトに存在する幹細胞によりこの再生が支えられている。これまで、消化管上皮細胞の初代培養は容易でなく、再生メカニズムの解析や機能評価は困難であった。2009年にSatoらが開発したオルガノイド培養法を用いることで、*in vitro*において消化管上皮細胞の再生や分化の様子が詳細に観察できるようになった。同手法により小腸から作製したオルガノイドは、吸収上皮、杯細胞、パネート細胞、タフト細胞、内分泌細胞などの消化管上皮に分化することが分かっていたが、オルガノイド培養系が完全に生体内を反映するのか、各細胞のアイデンティティーは*in vitro*においても保たれるかなど、不明な点が多く、オルガノイド培養系を導入する上での不安材料となっていた。そこで、本研究では、約1%未満しか存在しない内分泌細胞に着目し、オルガノイド培養系においても生体内と同様の内分泌細胞が観察されるかを、生体組織と比較しながら調べることを目的とした。

まず、内分泌細胞を可視化するため、内分泌前駆細胞に一過的に発現する転写因子Ngn3陽性細胞が緑色蛍光を発するNgn3-GFPマウスより小腸オルガノイドを作製した。オルガノイドについては、三次元の状態に固定し、GIPおよびGLP-1抗体を用いた免疫染色に供した。組織については、固定後、凍結切片を作製し、上記と同様に免疫染色に供した。その結果、十二指腸、空腸およびそれらの臓器由来のオルガノイドの双方においてGFP、GIP、GLP-1の発現が確認された(図1)。GFP陽性細胞の中には、GIPあるいはGLP-1を発現するものが観察された。このことから、オルガノイドにおいても生体内と同様に内分泌細胞が観察できることが分かった。しかしながら、以前から報告されていたように、内分泌細胞の割合は組織においてもオルガノイドにおいても非常に低く、このままの状態では解析が難しいことが予想された。

そこで、少ない割合の内分泌細胞を濃縮し、濃縮画分に有意に存在する遺伝子群を調べることにした。十二指腸および空腸由来のオルガノイドをトリプシンで消化後、セルソーターにより、Ngn3-GFP陽性細胞を分取し、非陽性画分を対象にしたRNA-Seq解析を行なった。Volcano plotをもとに、発現が有意に変化しているものを調べた結果、十二指腸および空腸で1000以上の遺伝子がNgn3陽性細胞群で有意に発現が上昇(Fold change ≥ 2 , $\text{padj} \leq 0.01$)することが分かった(図2)。これらの遺伝子の中には、内分泌細胞を規定する転写因子、ホルモン、分泌関連タンパク質などが含まれていた。

以上より、消化管オルガノイドに存在する内分泌細胞は、生体内の内分泌細胞と非常に似た性質を持っていることが推定された。今後は、消化管オルガノイドを用いて、未だ解明されていないホルモンの放出機構や、内分泌細胞への分化に関わる因子の解析を行なっていきたい。

掲載論文

Ohki J, Sakashita A, Aihara E, Inaba A, Uchiyama H, Matsumoto M, Ninomiya Y, Yamane T, Oishi Y, Iwatsuki K. Comparative analysis of enteroendocrine cells and their hormones between mouse intestinal organoids and native tissues. *Biosci Biotechnol Biochem.* *in press*

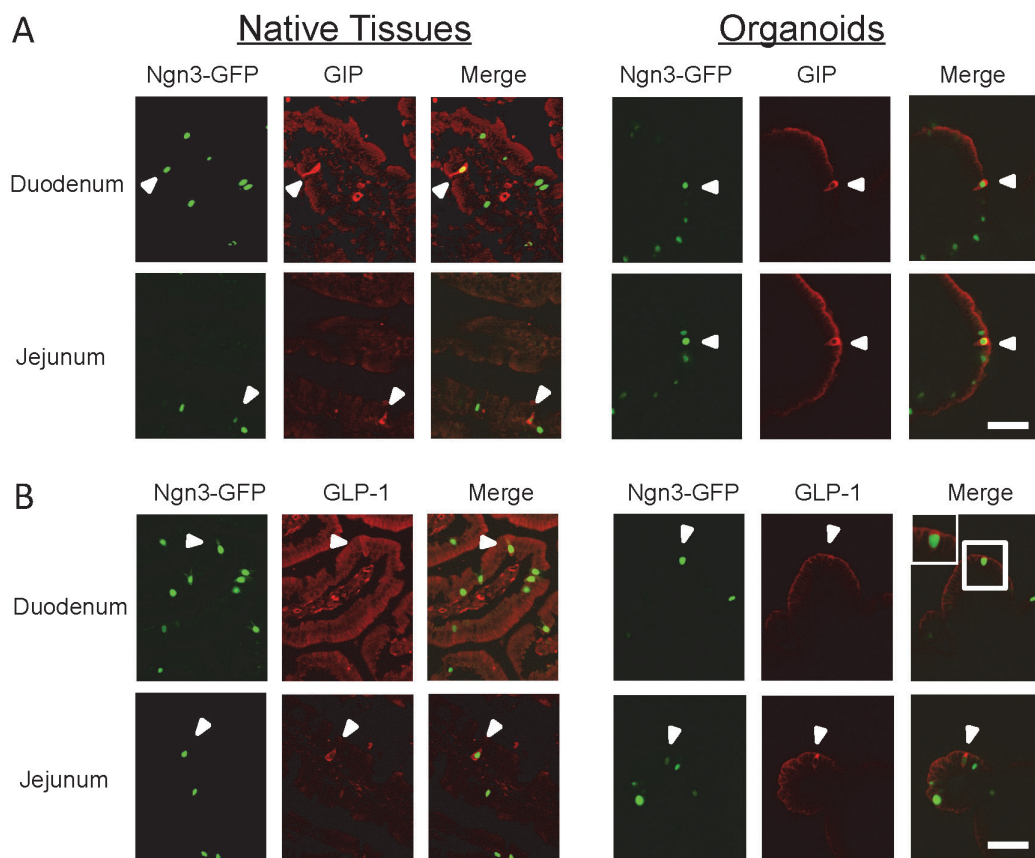


図1 組織とオルガノイドにおける Ngn3-GFP, GIP(A) および GLP-1(B) の発現解析 Scale bar: 50 μ m

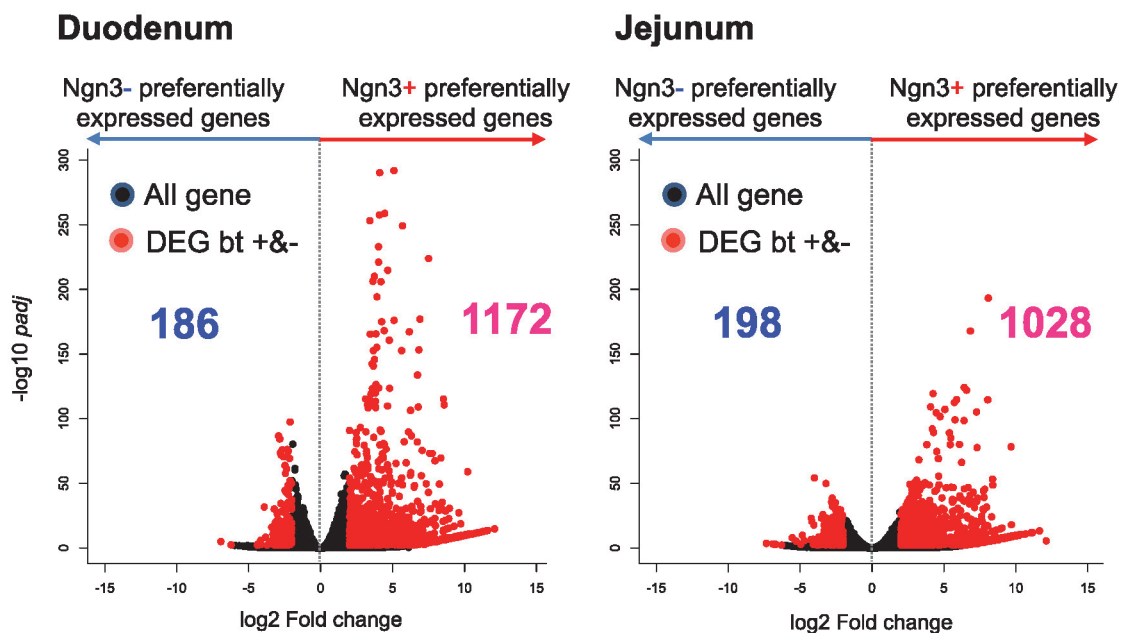


図2 セルソーターで分取した Ngn3 陽性細胞と非陽性細胞を RNA-Seq 解析し、
発現が有意に変化した遺伝子を赤色で示した。
(Fond change ≥ 2 , $padj \leq 0.01$, Binominal (Wald) test with Benjamin-Hochberg correction) .

大木淳子 (応用生物科学部 食品栄養学専攻)
坂下陽彦 (シンシナティー小児病院)
岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)

マウス始原生殖細胞における性分化関連マイクロRNAの役割

始原生殖細胞 (PGC) は雌雄生殖細胞の起源となる性的未分化細胞である。マウスでは胎齢 11.5 日 (E11.5) の生殖隆起において、Y 染色体上の *Sry* 遺伝子の発現によって生殖巣の性決定が行われる。これに従って PGC は雌雄両生殖細胞への分化能が消失し、精子形成または卵子形成に向けた性特異的な分化を開始する。この過程には遺伝子発現の変化のほか、エピゲノムの大規模な変換など様々な分子機構が関与すると考えられているが、その全容は未だ明らかにされていない。マイクロRNA (miRNA) は 22 塩基程度の small non-coding RNA であり、mRNA の安定性および翻訳の抑制による転写後制御を担うエピジェネティクス機構の一つである。miRNA は Argonaute ファミリータンパク質 (AGO) に取り込まれて RISC を形成し、自身の 5' 末端から 2 番目から 8 番目の配列 (seed 配列) と相補性の高い配列を有する mRNA へのガイドとして機能する。seed 配列と mRNA は必ずしも完全に相補的である必要はないことが知られており、miRNA の標的遺伝子の特定は困難を極める。本研究では、PGC の性特異的な分化過程における miRNA の役割を明らかにするために、性分化中の E13.5 マウス PGC を AGO2-Ribonucleoprotein Immunoprecipitation (RIP) -Seq 法によって解析することによって *in vivo* で機能している miRNA およびその標的遺伝子を探索した。

AGO2-RIP-Seq によって得られた上位 10 個の miRNA を雌雄で比較した結果、10 個中 9 個が一致しており、雌雄共通した miRNA の役割が示唆された。その中で miR-290 cluster miRNA が多く見出され、得られたリードのおよそ半数に及んだ。さらに、miR-290 cluster 内の個々の miRNA の割合は雌雄で類似していた (図 1)。miR-290 cluster miRNA は幹細胞の多能性の維持に必須であり、マウス E13.5 生殖隆起中では PGC 特異的な発現を示すことから、miR-290 cluster miRNA が生殖細胞形成を制御する miRNA であると示唆された。雌雄共通して濃縮することが見出された遺伝子群について GO 解析を行った結果、転写制御やクロマチン修飾に関する GO term が強く濃縮されていたことから、雌雄 PGC において miRNA は遺伝子発現パターンの変換に大きく影響を及ぼしていることが示唆された。

他方で、AGO2-RIP-Seq によって雄で多く見出される miRNA を 8 種、雌で多く見出される miRNA を 10 種特定した (図 2)。これらの miRNA の標的遺伝子を推測するために、標的遺伝子予測プログラムおよび AGO2-RIP-Seq で得られた mRNA を雌雄で比較した結果、雄において miRNA の標的候補として 23 遺伝子を特定した。これらの遺伝子は卵母細胞の減数分裂に必須であるため、雄では miRNA の転写後抑制機構によって精原細胞への分化を促進していることが示唆された。その一方で、雌ではわずか 2 遺伝子しか見出されず、PGC の卵母細胞への分化過程においては miRNA の役割が限定されていることが示唆された。

これまでの結果は miRNA が PGC の性分化過程に役割を有する可能性を示唆しているが、未だ予測の域に過ぎない。今後、AGO2-RIP-Seq で見出された遺伝子を miRNA が真に標的としているかを検証することによって、マウス生殖細胞形成過程における miRNA の生物学的な意義を明らかにすることを目指す。

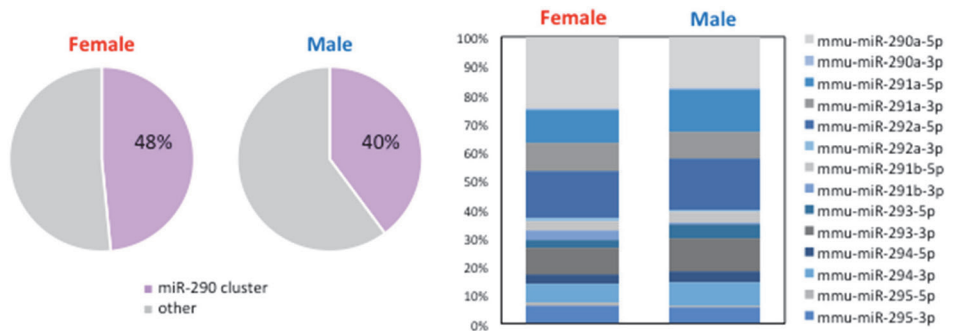


図1 (左) miR-290 cluster miRNAs は RIP により得られた miRNA リードの大部分を占めた。
 (右) RIP における miR-290 cluster miRNAs の割合は雌雄で類似しており、miR-290a-5p/
 miR-292a-5p seed family が高発現であった。

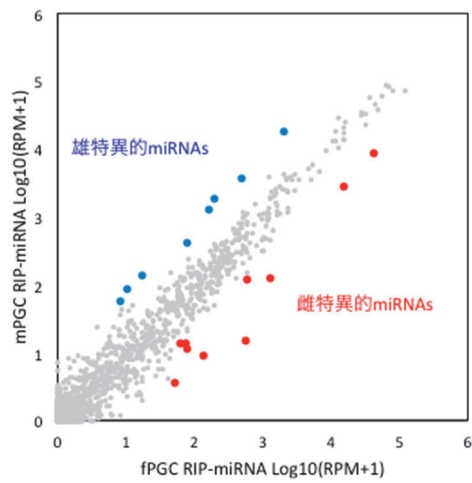


図2 RIP で得られた miRNA を雌雄で比較し、RPM 値に 4 倍以上の差があったものを性分化関連 miRNAs とした。

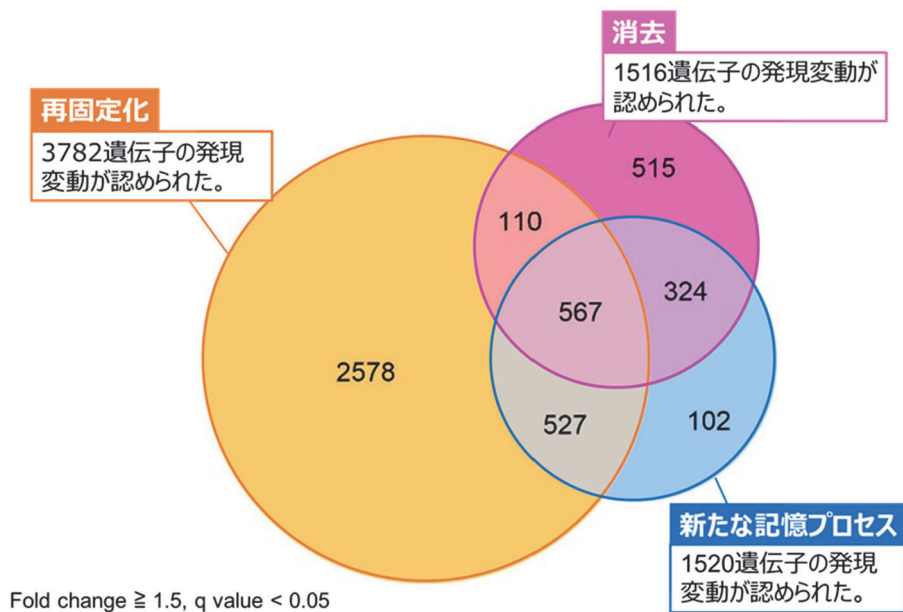
樋浦 仁 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

マルチスケール精神病態の同定を目的とした トランスクリプトーム網羅的解析

我々は、遺伝子操作により記憶能力が向上または低下したトランスジェニックマウスや、環境要因を再現した PTSD 動物モデルをこれまでに開発しています。しかし、これらマウスの脳内でどのような生化学的変化が起こっているかは十分に明らかに出来ていません。そこで、これらゲノム要因と環境要因を再現した動物モデルのトランスクリプトームの網羅的解析を行い、その発現プロファイルの詳細に比較することで、マルチスケール精神病態の分子基盤・病態機序を同定することを目的としています。

五感を通じて獲得された情報は、まず数分から数時間程度しか保持されない不安定な短期記憶となり、その後、新規遺伝子発現を必要とする固定化のプロセスを経ることで安定な長期記憶となります。固定化された恐怖記憶が思い出し（想起）されると、恐怖反応を維持・強化する再固定化が誘導され、一方、長時間または繰り返し恐怖記憶が想起されると、恐怖反応を軽減する消去が誘導されます。このように、恐怖記憶が想起されると恐怖反応を強化あるいは減弱する正反対の記憶プロセスが誘導されます。「再固定化」と「消去」は世界的に記憶のアップデートと関係していると考えられているものの、再固定化と消去の両方のプロセスを解析可能な実験系を確立している研究グループは世界的に少ないことから、両者の分子機構の共通性と多様性は不明な点が多く残されています。そこで本研究では、恐怖記憶制御の分子メカニズムを解明する端緒として、再固定化と消去を制御する中心脳領野を標的としたトランスクリプトーム解析を行いました。

マウスにおける恐怖記憶課題である受動的回避反応課題は、明箱と暗箱に分かれた解析装置を用います。この課題では、マウスが暗所を好む習性を利用し、マウスが明箱から暗箱への移動後に暗箱内で電気ショックを与えること（恐怖体験）により、恐怖記憶を形成させます（条件付け）。この翌日にマウスを再び明箱に入れると（再暴露）、暗箱に対する恐怖記憶が想起されると考えられます。そのため、再暴露を明箱でのみ行った場合は「再固定化」が誘導され、マウスが明箱から暗箱へ移動後に電気ショックを与えずに暗箱内に滞在させ続けると、暗箱内が安全であることを再学習し、「消去」が誘導されると予想されました。我々は、この仮説に基づいて、マウス遺伝学、行動薬理学、免疫組織学的手法を用いた解析を行い、再固定化と消去を区別できる実験系を確立し、さらに、再固定化と消去のプロセスを制御する脳領野及び遺伝子群を明らかにしてきました（Fukushima *et al.*, 2014）。特に、この研究では、遺伝子発現及びタンパク質分解が記憶プロセス誘導の分子マーカーであることを実証することができました。そして、現在、これまでの我々の研究結果に基づき、「再固定化」または「消去」の誘導に伴う特定脳領野のトランスクリプトーム解析を試みています。まず、恐怖記憶制御において中心的な役割を担うと考えられている扁桃体領域を解析しました（下図）。その結果、恐怖反応を維持・強化する再固定化誘導時では約 3700 遺伝子の発現変動が認められました。一方、恐怖反応を軽減する消去誘導時では約 1500 遺伝子の発現変動が観察されました。さらに、この実験系を用いたことで発見した「新たな記憶プロセス」も同時に解析した結果、この記憶プロセスでは約 1500 遺伝子の発現変動が観察されました。恐怖記憶制御には前頭前野や海馬も重要な役割を担っているため、今後、これら脳領野も解析していく予定です。



図：恐怖記憶想起後の記憶プロセス群誘導に伴うマウス扁桃体領野の遺伝子発現プロファイル
1.5倍以上の発現変動が認められた遺伝子数は、再固定化誘導時が最も多かった。

福島穂高 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

卵子の発育を支える卵胞液中の miRNA

良質な卵子の作成には、非侵襲的な指標を用いて卵子の質を推測することが非常に大事である。卵胞液や顆粒層細胞は卵子の発育を支える唯一の環境や支持細胞であり、その成分や特性は卵子発育の決定要因が内包されている。

良質な卵子を作成するため卵子の能力を決定している要因をその支持細胞と卵胞液に求めて実験を行った。最初に卵子の能力と支持細胞の数間に相関がある事を見だし、細胞の RNAseq を行い、卵胞細胞が多くなる要因を変動遺伝子上流因子から推測することができた (1)。またこの卵胞液を卵子の成熟や発育培地に添加することで卵子の発育能力が飛躍的に改善することが明らかになったことから (2)、推測した因子の多少がこれらの卵子の質を決定していると考えた。推測された因子の中に miRNA が多く含まれていたが、卵胞液中にはサイトカインの他細胞外 DNA も大量に含まれている。卵胞液の miRNA の解析に合わせて一方でどのような DNA が卵胞液に含まれているのか、その簡単な測定方法はなにか、卵子の能力とどのような関係にあるのかに取り組んだ。

卵胞液中の DNA と RNA を次世代シーケンサーを用いて解析し、まず卵胞液の細胞外 DNA の由来を明らかにし、その情報を基に構築したリアルタイム PCR 法を用いて簡単に細胞外 DNA の組成を測定することが出来る方法を確立した。この方法を用いて、ブタの卵子を胞状卵胞から回収し、発育能力が高い卵子は卵子が含まれていた卵胞液の細胞外 DNA が少ないことを明らかにした。次に卵胞液に含まれる細胞外 DNA が卵子の質を損なうのかという課題に取り組み、卵胞液に含まれる細胞外 DNA の多少が卵胞液の卵子の成熟促進能力に影響せず、直接抽出した DNA を添加しても発育能力が変わらないことから、卵胞液の細胞外 DNA は卵子そのものには悪影響を与えないことを明らかにした (3)。次に、細胞外 DNA と卵子の発育との関係に取り組み卵子の体外発育培地に含まれる細胞外 DNA の量が多い場合体外発育卵子の能力が低いことを明らかにした。またこの細胞外 DNA 量は細胞のアポトーシスと相関があることから、卵胞において卵子に負の事象が発生した場合細胞外 DNA が多くなると推測された (4)。さらにこの実験で確立した細胞外 DNA の評価方法を用いて顆粒層細胞が細胞外 DNA を放出するメカニズムにミトコンドリアの品質管理機構やオートファジーなどが含まれていることを示すことが出来た (5, 6)。

1. J Assist Reprod Genet 2018. 35, 1809-1819
2. Reprod Med Biol 2019, 18 (3), 256-262
3. Reprod Med Biol 2020 inpress
4. J Reprod Dev 2019. 65 (2), 171-175.
5. Zygote, 27 (5), 272-278 2019
6. J Reprod Dev, 64 (3), 261-266 2018

岩田尚孝 (農学部 動物科学科)

シロイヌナズナの乾燥耐性機構における タンパク質リン酸化酵素 ARK の役割

<背景・目的>

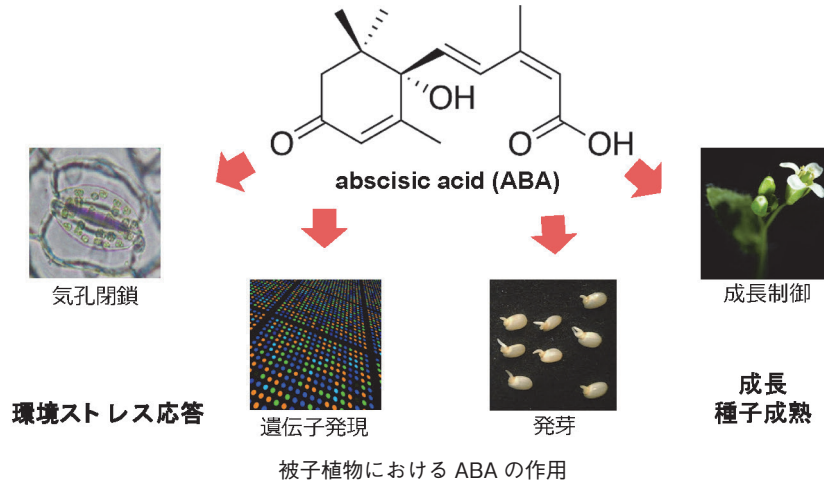
植物は生育環境の変化や病原菌の感染など様々なストレスに曝される。根を下ろした土壌から自由に移動することができない植物は、これらのストレスに対して適応し耐える能力を獲得してきた。乾燥や塩害といった水分ストレスにおいて、植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) は植物の耐性獲得に中心的な役割を果たしている。ABA は水分ストレスにより蓄積が誘導され、気孔閉鎖を迅速に誘導し水分蒸散を防ぐとともに、遺伝子発現制御を介して水分ストレスから細胞機能を保護する役割を果たしている。ABA シグナル伝達機構はタンパク質リン酸化酵素 SnRK2 を介した下流因子のリン酸化により制御される。現在のモデルでは、SnRK2 は ABA 非存在下で脱リン酸化酵素 PP2C と結合し自己リン酸化活性が抑制された状態にある。水分ストレスにより蓄積した ABA は受容体 PYR/PYL/RCAR と結合し、受容体と PP2C の相互作用を促進し、結果として SnRK2 と PP2C の相互作用が解除され、自己リン酸化により活性化した SnRK2 が下流因子のリン酸化を行うことにより ABA シグナル伝達系が活性化されると考えられている。しかしながら、浸透圧ストレスにตอบสนองした SnRK2 活性化機構については未だ明らかになっていない。

一方、我々の研究グループでは、基部陸上植物ヒメツリガネゴケを用いて、ABA シグナル伝達系および浸透圧ストレス応答において SnRK2 の上流で働く B3-MAPKKK (ARK; ABA and abiotic stress responsive RAF-like kinase) を初めて同定した。ARK は陸上植物間で保存されており、シロイヌナズナにおける B3-MAPKKK は 6 遺伝子から成る遺伝子ファミリーを構成する。そこで、シロイヌナズナ B3-MAPKKK が ARK と同等の機能を有しているか調査するため、これら 6 遺伝子をヒメツリガネゴケ ARK 機能欠損株 (*ark*) へ一過的に導入した。その結果、3 遺伝子 (AtARK1, AtARK2, AtARK3 と名付けた) が *ark* 変異体の ABA 応答性を回復させ、ARK 機能を相補できることが明らかとなった。

本研究では ARK を介した SnRK2 の活性化機構が陸上植物に普遍的に保存されているかを明らかにすることを目的に、Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) から AtARK1/2/3 それぞれの遺伝子に T-DNA が挿入された株 (SALK_082710, SALK_004541, SALK_025685) の種子を入手し、それらの自家受粉により得られた次世代個体から DNA を抽出し、特異的プライマーを用いたゲノム PCR により T-DNA 挿入ホモ個体を選抜した。得られた T-DNA 挿入ライン同士の掛け合わせにより、AtARK1/2/3 を全て欠損するシロイヌナズナ三重欠損株 (TKO) を作出した。生理学的解析から、シロイヌナズナ ARK は発芽後初期段階の植物体において、ABA および浸透圧ストレス応答に重要な役割を持つ事が示唆された。そこで、シロイヌナズナにおいて ABA および浸透圧応答のマーカー遺伝子として使用される複数の遺伝子について、TKO 株における発現を定量的 RT-PCR により解析を行ったところ、浸透圧応答性マーカー遺伝子については QKO 株において野生型株と比較して優位に低下していたが、ABA 応答性マーカー遺伝子については有意な変化が観察されなかった。そこで、ゲノムワイドな遺伝子発現への影響を解析するために、RNAseq 法を用いて QKO のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、野生型株の浸透圧応答性遺伝子群のおよそ 15% が QKO 株において発現低下が生じていた。一方、野生型株の ABA 応答性遺伝子についてはほとんど影響が検出されなかった。これらの結果は、ARK はシロイヌナズナの浸透圧にตอบสนองしたシグナル伝

達経路で主に働くことが示唆された。

今後は、TKO 株における気孔閉鎖の解析や、ARK による SnRK2 リン酸化の生化学的解析を通じて、シロイヌナズナにおいても ARK が SnRK2 の上流キナーゼとして機能しているかの解析を進めていく予定である。



坂田洋一 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

ナチュラバリエーションを利用した植物の環境ストレス耐性の解明

植物が同じ種内でもストレス耐性を持つ植物と持たない植物に分かれてきた進化的要因や、その背景でどんな遺伝子が働いているのかに関しては多くが不明である。私達のグループでは数百のシロイヌナズナ accession (エコタイプ) を利用して高温耐性の多様性に関する研究を行っている。本研究課題では、シロイヌナズナに見られる高温耐性の遺伝的多様性から植物のストレス適応メカニズムを理解することを目的に、多様性に寄与する鍵遺伝子の同定、および鍵遺伝子を中心とする耐性メカニズムの解明を目指した。長期的な高温ストレスに対して耐性を示すシロイヌナズナ Col-0 と、同ストレスに感受性を示す Ms-0 間における耐性の違いについて遺伝学的手法により解析を進めた結果、両者の高温耐性の違いを説明する原因遺伝子の特定に至った (論文準備中)。当該遺伝子については、植物・動物・微生物の幅広い生物種においてオーソログ遺伝子が存在する。動物のモデル生物である線虫にもオーソログ遺伝子が存在することから、久原篤博士 (甲南大学理工学部) との共同研究において、線虫における当該オーソログ遺伝子破壊株における高温耐性を調べて頂いたところ、植物同様、線虫でも当該遺伝子の欠損が高温感受性を誘導することが明らかとなった。生物種を越えて普遍的に高温耐性に関わる遺伝子であることが示唆された。そこで、線虫の当該遺伝子欠損株が高温耐性を損なうに至ったメカニズムが植物同様であるのかを調べるため、高温下におけるトランスクリプトーム解析を実施することにした。また、長期的な高温ストレス応答機構を明らかにするために、長期的な高温ストレスに高感受性を示す変異株、*sensitive to long-term heat (sloh)* の単離を行った。原因遺伝子の特定を進めるため、遺伝学的な解析を進める一方、ゲノムシークエンスによる非同義置換を誘導する変異の同定を進めている。

以上の研究により、高温耐性の多様性を制御するメカニズムが解明され、特定した遺伝子によってはそれを応用することで高温耐性作物の作出に繋がることが期待される。

1. 太治輝昭 稲のことは稲に聞け～モデル植物を用いた集団ゲノミクス～ 生物工学 96 (4) 214 (2018)
2. Ariga H et al. NLR locus-mediated trade-off between abiotic and biotic stress adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Plants* 3: 17072 (2017).
3. Higashi Y U et al. HsfA1d, a protein identified via FOX hunting using *Thellungiella salsuginea* cDNAs improves heat tolerance by regulating heat-stress-responsive gene expression. *Mol. Plant* 6: 411-422 (2013).

太治輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

植物ホルモン機能の制御による根寄生雑草防除技術の開発研究

根寄生雑草は植物の根に寄生し栄養を奪うことで生長する植物です。世界中に分布しており、日本でも春から梅雨にかけての時期にクローバーの近くに図のような根寄生雑草を見かけることがあります。一方、ストライガやオロバンキと呼ばれる根寄生雑草の一部は農作物に寄生し、収量を激減させる厄介な生物として知られています。特にアフリカに生息するストライガはアフリカの主要穀物であるソルガムやトウモロコシ、ミレット、イネなどに寄生しアフリカの農業生産上最も有害な雑草として知られています。年間被害額は100億ドルに上るとも試算されており、アフリカ農業を発展させるためには根寄生雑草の防除が必須の課題の一つとなっています。

根寄生雑草は植物に寄生しないと生存できないため、寄生先の宿主植物を効率的に認識するために植物が生産、分泌する物質を受容することで発芽します。その物質はストリゴラクトンと呼ばれており、根寄生雑草の発芽を促進する他に、植物ホルモンとして植物の枝分かれの制御や、土壌中の微生物との交信にも使われている物質です。私たちはこのストリゴラクトンの植物内での合成を抑える薬剤を見出すことで根寄生雑草の発芽を抑え、作物収量の増加に貢献できるのではと考えました。そこで様々な化学物質の中から植物のストリゴラクトン分泌量を抑えるものを探したところ、動物において黄体ホルモンとして知られているプロゲステロンがストリゴラクトンの合成を抑えることがわかりました。実際に根寄生雑草の感染を抑えるか調べたところ、ストライガに汚染された土壌で育てたイネはストライガに栄養を奪われることで生育不良を起こしましたが、プロゲステロンを処理した場合はストライガに寄生されず正常に生育したことからプロゲステロンが根寄生雑草の防除に有用であることがわかりました。一方、これまでにプロゲステロンは植物において複数の論文でその存在が確認されているため、植物においてもホルモンとして何らかの働きを持つ可能性が考えられますが、その機能は全く知られていませんでした。そこで私たちは次世代シークエンサーを用いて応答遺伝子の解析を行うことで植物におけるプロゲステロンの働きを推測しようと試みました。現在解析途中ではありますが、ストリゴラクトンの生合成遺伝子の多くの発現量が減少していることからプロゲステロンによるストリゴラクトンの分泌量の抑制はストリゴラクトン生合成遺伝子の発現制御によることがわかりました。また、複数の植物ホルモンの生合成やシグナル伝達に関わる遺伝子の発現も変化しており、プロゲステロンが様々な植物ホルモンと協調して働いている可能性が考えられました。今後シークエンスで得られた情報をもとにして植物でのプロゲステロンの効果を明らかにするとともに、植物におけるプロゲステロン応答シグナルの改変による根寄生雑草防除技術の開発を行っていきたいと考えています。



図 上用賀公園にてクローバーに寄生したオロバンキ（白矢印）

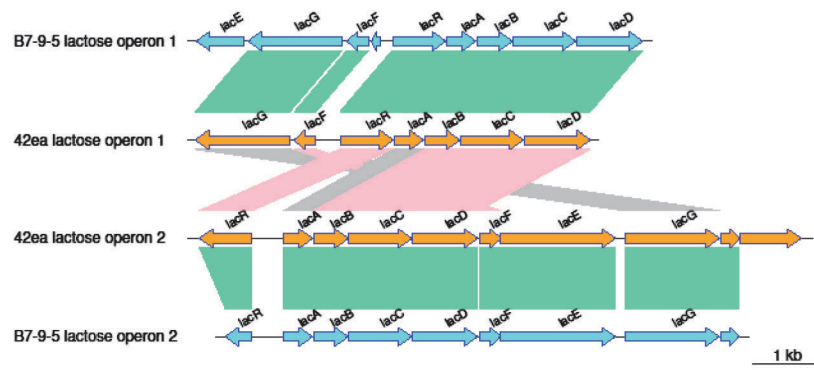
伊藤晋作（生命科学部 バイオサイエンス学科）

熟成チーズから分離された好塩・好アルカリ性乳酸菌の ゲノムから見える特性

ナチュラルチーズは言うまでもなく、原産国や種類、製法が多様であるが故、それらに包含される揮発性物質をはじめとする成分組成も多様である。一方で、熟成時のチーズには多様な細菌群が存在し、それらは製造中に人為的に添加されることなく自然発生的に増殖する。これら細菌群の存在は、チーズの個性となる成分の生成に深く関わっていることが想起されるが、チーズの品質と細菌相の相関については未解明な点が多い。そのため、我々は各種熟成チーズの 16S rRNA メタゲノム解析を行い、得られた細菌相解析結果と成分分析結果の相関について検証を行ってきた。統計的手法を適用した各種解析の結果、非スターター乳酸菌 (*Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*)、好塩性・好アルカリ性の非スターター乳酸菌 (*Marinilactibacillus*, *Alkalibacterium*, *Vagococcus*)、グラム陰性の海洋細菌 (*Halomonas*, *Marinobacter*, *Psychrobacter*) がそれぞれ異なる成分の生成に寄与することが明らかになった。これらの結果はチーズに自然発生的に存在する固有の細菌群がチーズの特徴的な風味の形成に関与することを示唆しており、チーズ製造の理論の構築の一助となるものと考えている。

一方で、これらの細菌群が熟成時のチーズ中でどのように生育を可能としているのか？についての知見は少ない。これについての手掛かりを得ることを目的とし、熟成チーズから分離された好塩性・好アルカリ性乳酸菌 *Marinilactibacillus psychrotolerans* B7-9-5 株のドラフトゲノム解析を行い、海洋環境から分離された基準株 (M13-2 株) およびチーズから分離されたゲノム公開株 (42ea 株) の間でゲノム情報を比較した。これら 3 株のゲノムの構成は類似しており、各株の protein-coding genes の 7 割に当たる約 1,600 遺伝子それぞれの株間のアミノ酸類似度は 90% を超えていた。一方で、チーズ分離株 (B7-9-5 および 42ea 株) のみが保持する、特徴的な遺伝子クラスターの存在も明らかになった。それらは、ラクトースを sugar phosphotransferase system によって細胞内に取り込み、解糖系に至るタガトース 6-リン酸経路を構成する遺伝子群 (図 1-A) とクエン酸がオキサロ酢酸を経てピルビン酸に変換する経路を構成する遺伝子群である (図 1-B)。前者はチーズの原料乳に含まれるラクトースを利用するために不可欠であり、後者はチーズ熟成時にラクトースがスターター乳酸菌によって消費され、枯渇した後、真菌が生成したクエン酸の利用を可能とする。これらのことは、チーズ分離株のみがチーズという環境での生育を可能とする遺伝子群を保持していることを示す証左と考えられる。さらに、ラクトース利用に関する遺伝子クラスターは *Marinilactibacillus* と系統的に近縁な乳酸菌には存在しなかったが、スターター乳酸菌 (*Lactococcus*, *Streptococcus*) やチーズに存在する非スターター乳酸菌 (*Enterococcus*, *Bavaricoccus*) が保持するオルソログ遺伝子と 99% 以上の高いアミノ酸相同性を示した。このことから、本遺伝子クラスターは上記の乳酸菌間で水平伝播した可能性が示唆され、チーズという棲息場所を同じくする乳酸菌群がそこでの生育を可能とするために外来遺伝子を獲得した結果と考えられた。すなわち、これらの乳酸菌群は「同じ釜の飯を喰う」ための術を共有した、とみなすことも出来るだろう。今後、さらに検討を進めることによりチーズに存在する細菌群のチーズ熟成への寄与について、より明確な知見を得るための検討を継続していきたいと考えている。

A



B

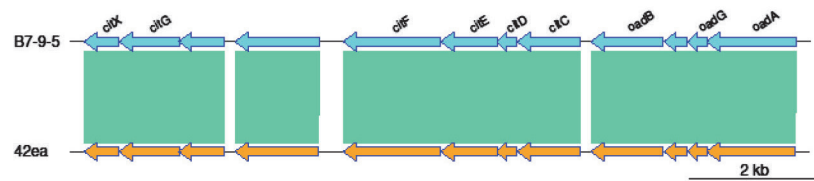


図 1 チーズから分離された *Marinilactibacillus* に存在するラクトース利用に関する遺伝子クラスター (A) とクエン酸利用に関する遺伝子クラスター (B)

石川森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)

鈴木敏弘 (応用生物科学部 醸造科学科)

志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

国酒酵母の全ゲノムによる系統分類と醸造学的実用化

分類とは知り得た物が山積したとき、それらを定義付けして整理し、一定の基準により体系立てて直観的に区別し、人が認知し易く活用できるようにすることである。従って、それらは元来実用的であり、人による便宜上の区別でもあった。そのため、分類を扱う博物学や分類学は、分類の基準を明確に定義して扱うすべての物を体系化し、その方法を論じるものであるため、科学の進歩により過去の分類が人為的などと揶揄されることもある。しかし、それらの分類も多くの人々が認知し、利用してきたものである。

生物についての分類は、古代ギリシアの哲学者アリストテレスが、動物と植物に分類したことにはじまり、18世紀には博物学者リンネが、「自然の体系」における生物の種概念を定義し、自然界の物を動物、植物、鉱物に区別して階層的な分類体系を確立した。20世紀に入るとダーウィンやメンデルの影響で進化のしくみが理論立てられ、分類学に大きな影響を与えることになり、細胞への理解が深まって行くと、生物学者ホイタッカーは五界説を提唱し、一般的な生物の分類となった。さらに、20世紀末には微生物学者ウーズが、三ドメイン説を提唱したことにより、分子系統進化に基づいた生物の区別が、より生物の類縁関係に従った自然分類であるとされていった。従って、現在の微生物分類学である酵母の分類においても、1970年代頃より系統学が取入れられるようになっていった。微生物分類学においても、元々は系統進化とは異なるため人為的な分類とも言われるが、系統学的な分類においても、数理的、統計的な推定により行われているため、未知の微生物が発見されて微生物の数や認識が変化することにより、微生物の分類が大きく変化する可能性も十分にある。

NGRC ニュース No.9 でも述べたが、日本の国酒醸造に用いられる国酒酵母である清酒酵母、焼酎酵母、泡盛酵母は、酵母の分類学書である *The Yeasts, a Taxonomic Study* において、ビール、ワインなどの醸造酵母とともに *S. cerevisiae* に分類されている。しかし、実際の日本の国酒醸造業においては、それらの国酒酵母を実用上区別して利用しているのが現状である。つまり、醸造学のような応用的な学問において、系統学的な分類だけでは利用面にそぐわないということでもある。これは最近の清酒醸造業では、自然界から多くの清酒酵母を分離して清酒醸造が試みられているが、分類学の *S. cerevisiae* の指標によって分離して上手く行かない例からもわかる。そのため、分類学は科学の発展に伴って変化したが、かつて主流とされてきた形態学、生理・生化学や、分子化学、分子系統学など相互の学問による体系的、総合的な判断が求められる。

その分類学書 *The Yeasts* 5版では特定の遺伝子による系統解析から、醸造酵母を含む *Saccharomyces* 属は *Saccharomyces sensu stricto* から構成され、系統学的に遠縁の *Saccharomyces sensu lato* は他属へ移された。これにより、*Saccharomyces* 属は極めて近縁の種により構成されるようになり、ハイブリット（雑種）などの種の相互関係からも、種としての認定が行われるようになった。このハイブリット概念は、生物史的に *Saccharomyces* 属内で多く種の交雑が行われてきたということであり、非常に似通った種であることから、統計的に供試する菌株や、その菌株数によって変化が起こる可能性があるということでもある。しかし、かつて試験株として *The Yeasts* では清酒酵母が供試されていたが、現在では使用されなくなってしまった。そのため、多くの由来の異なる国酒酵母を用いて系統を解析することにより、新たな知見が得られるものと考えられる。そして、系統学的な分類から逸脱しない利用面に則した区別法を構築することが、醸造学にとって大いに意義があると考え

られる。

そこで本研究では、学科創設以来、研究室に保存されている由来の異なる国酒酵母の多くを用いて、全ゲノムによる系統解析を行ったところ、図1に示すように国酒酵母の一群が、ビール、ワインなどの醸造酵母 *S. cerevisiae* と区別される可能性が見えてきた。しかし、用途や性質で異なる各国酒酵母の区別は反映されなかった。そのため、各国酒酵母の特徴となる遺伝子をゲノム上から抽出し、系統を反映した区別法を確立する必要があると考えられる。

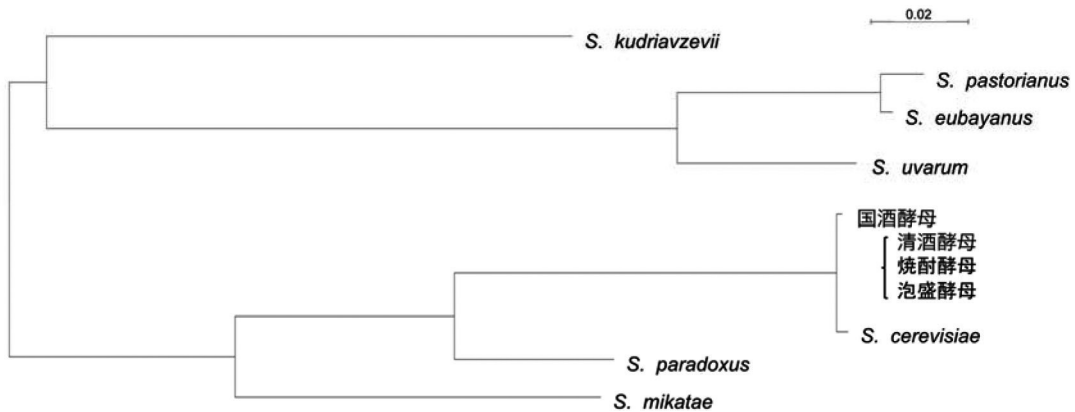


図1 全ゲノム (525 オートログ遺伝子) による *Saccharomyces* 属における国酒酵母の系統解析

門倉利守 (応用生物科学部 醸造科学科)

森谷千星 (応用生物科学部 醸造科学科)

シアノバクテリアにおける DNA 修復酵素に関する研究

遺伝情報を子孫に正しく伝えることは生物にとって必要不可欠な機能である。遺伝情報は DNA にコードされているが、細胞内外からのストレスによって DNA は容易に損傷する。そのため、すべての細胞は DNA を修復するためのタンパク質を有している。DNA 修復の主要な反応は RecA ファミリータンパク質が主な役割を果たす。RecA ファミリーは原核生物において高度に保存されており、大腸菌では *recA* 遺伝子の発現は LexA リプレッサーによって厳密に制御される。UV 照射やマイトマイシン C (MMC) により DNA 損傷が引き起こされると RecA は LexA リプレッサーを分解し SOS 応答のレギュロンを誘導する。

酸素発生型の光合成を行う原核藻類であるシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 は細胞あたり複数コピーの染色体を有し、シングルコピー生物である大腸菌に比べ高い UV ストレス耐性を示す (Domain *et al.* 2004)。しかし、*Synechocystis* では UV 照射による *lexA*、*recA* の発現誘導は起こらず (Domain *et al.* 2004、Patterson-Fortin *et al.* 2006)、*lexA* を欠損させても SOS 遺伝子の発現には影響しないことが報告されている (Kizawa *et al.* 2017)。これらの知見からシアノバクテリア RecA は大腸菌とは異なる発現制御や役割をもつと考えられる。我々はシアノバクテリアにおける RecA の特異的な機能の解明、およびその応用を目指して研究を進めている。

まず *Synechocystis* における RecA タンパク質の発現量について解析した結果、通常培養条件下においても RecA は高発現しており、これは光合成タンパク質 PsbB と同レベルであることが示された。また DNA 損傷を引き起こす MMC や H_2O_2 を添加した際の発現レベルを比較したところ、RecA の発現量は通常培養時と変わらず一定であった。*lexA* 部分破壊株においても RecA タンパク質量は変わらないことから *Synechocystis* における *recA* の制御は大腸菌とは異なることが示された。次に *recA* 遺伝子の破壊株を取得し、その生育を比較したところ、弱光条件では野生株と同程度であるのに対し、通常光条件では野生株に比べ生育が遅延した。NGS を用いた RNA-seq 解析より、*recA* 破壊株は野生株と比較して酸化ストレス関連遺伝子の発現量が顕著に増加した。光合成を行うシアノバクテリアの細胞内は一重項酸素 (1O_2) や過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種が発生しやすく、シアノバクテリアは常に酸化ストレスに曝されている。シアノバクテリアは酸化ストレスや、それにより引き起こされる DNA 損傷から細胞を保護するために常に RecA の発現を高レベルに維持していると考えて、シアノバクテリアにおける RecA の機能についてさらに研究を進めている。

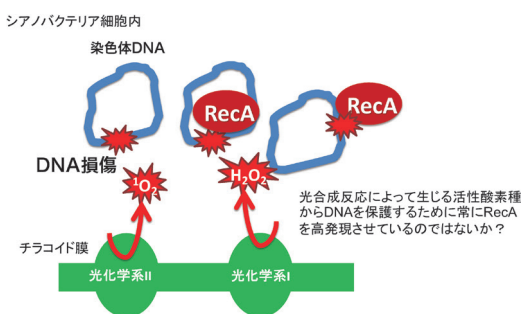


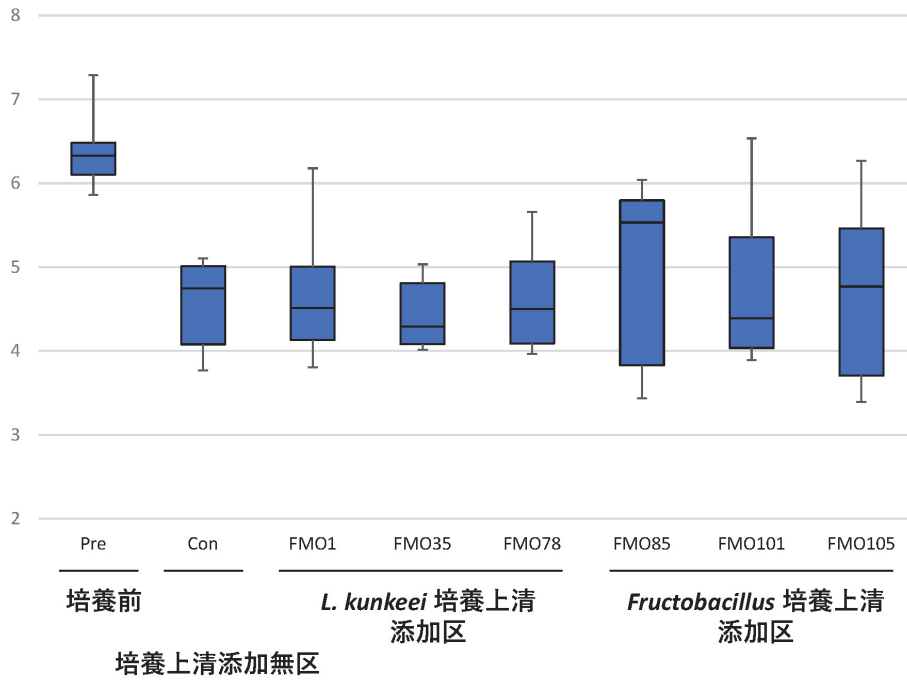
図 シアンバクテリアにおける RecA タンパク質の機能モデル

渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
 荷村(松根)かおり (生命科学部 バイオサイエンス学科)
 兼崎 友 (静岡大学グリーン科学研究所)

ミツバチ消化管内乳酸菌の共生関係に関する研究

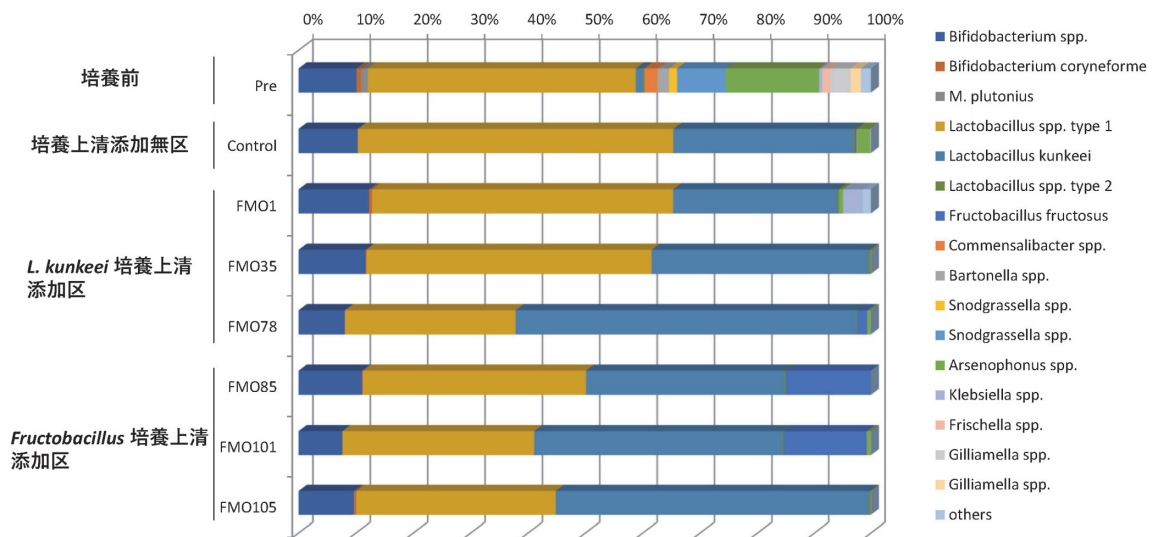
動物消化管には多様な細菌種によって構成された複雑なマイクロバイオータが形成されており、そのマイクロバイオータは動物種によって大きく異なる。消化管マイクロバイオータは多様な機能を持っており、食餌成分の消化補助、外来性食中毒細菌の消化管からの排除、免疫調節、短鎖脂肪酸を筆頭とした有用代謝産物の産生など宿主の健康と密接に関わっており、このマイクロバイオータの dysbiosis は宿主の健康に大きな悪影響を及ぼすことが知られている。そのため、消化管マイクロバイオータを正常に保つことはヒトだけでなく、全ての動物において重要である。

ミツバチは管理・飼育され、ハチミツやローヤルゼリーなどの生産に用いられるために家畜として扱われているが、ミツバチが我々にもたらす最も重要な役割は作物の受粉である。ミツバチの食糧生産における貢献度については様々な報告があるが、例えば、アメリカの年間 150 億ドル以上の作物の受粉を行っている、世界の食糧生産の約 35% の役割を担っている等と言われており、我々の食糧生産には欠かすことができない昆虫である。一方で、ミツバチは蜂群崩壊症候群により世界中で大きくコロニー数を減らしており、例えばアメリカにおいては過去 70 年間でコロニー数が半数以下に減っていることが報告されている。このコロニー数減少の理由には生息地の減少、地球温暖化、病原性細菌による疾病など、様々な原因が推測されている。そこでミツバチの腸内細菌を活性化することで、ミツバチの健康を増進し、コロニー減少の一助とすることが世界的に検討されている。筆者らが花や果物から見出したフルクトフィリック乳酸菌 (FLAB) の *Lactobacillus kunkeei* や *Fructobacillus fructosus* は、ミツバチ消化管上部の優勢菌であることが知られており、FLAB の代謝産物はミツバチ消化管下部の *Lactobacillus* 属細菌の生育を促進する可能性がこれまでに示唆されている。そこで我々はこの共生関係を詳細に検討するため、ミツバチ消化管を取り出してその内容物を適当な培地に接種し、そこに様々なミツバチ由来 FLAB の代謝産物を加えて培養した。そして、その培養物から DNA を抽出してメタ 16S 解析を行い、培養前および FLAB 代謝産物を加えずに培養したコントロールと比較を行った。その結果、培養前の消化管内マイクロバイオータと比較し、培養後は系統的多様性が低下していた (Fig. 1)。これは培養により特定の細菌群 (特に *Lactobacillus* 属細菌) が著しく増殖したためであると考えられた。マイクロバイオータを種レベルで比較すると、培養前は全コミュニティの 1% 程度であった *L. kunkeei* の相対存在比が、培養後は 28-60% にまで上昇した (Fig. 2)。特に、*L. kunkeei* の培養液を添加した群よりも、*Fructobacillus* 属細菌の培養上清を添加した群において、*L. kunkeei* の相対存在比の大幅な増加がみられた。さらに、*Fructobacillus* 属細菌の培養上清は、*F. fructosus* の大幅な増加も導いた。一方で、培養前の腸管サンプルからわずかに検出されていたミツバチ幼虫腐蛆病病原菌は、培養後には全く検出されなかった。これらの結果から、FLAB の代謝産物はミツバチ消化管で FLAB 自身の生育を促進することが示唆され、その生育によって病原菌の生育を抑制する可能性が考えられた。今後はさらに詳細に研究を進めることで、FLAB とミツバチやミツバチ消化管内細菌との共生関係を明らかにし、ミツバチの健康増進による個体維持と持続的な食糧生産に貢献するために研究を進めていきたいと考えている。



各群で6匹分の消化管サンプルを使用し、平均データを示した

Fig 1 各群におけるミツバチ消化管内マイクロバイオータの系統的多様性



各群で6匹分の消化管サンプルを使用し、平均データを示した

Fig. 2 ミツバチ消化管内マイクロバイオータのメタ 16S 解析結果

遠藤明仁 (生物産業学部 食香粧化学科)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

塩生植物シバナの根圏微生物叢の解析

塩生植物は、高塩濃度環境に適応するために、植物体の塩適応機構に加え、根圏微生物叢が重要であることが報告されている。しかし、塩生植物の根圏微生物叢に関する報告数は少ないのが現状である。近年、塩生植物アッケシソウおよびウミミドリの根圏細菌叢を解析し、塩生植物種により根圏微生物叢が異なり、それぞれ特有の耐塩性植物生育促進微生物を有することを報告した (図 1, Yamamoto *et al.*, *Front. Microbiol.* 2018)。

今年度の研究では、根圏微生物叢が解析されていない塩生植物シバナに着目し、北海道道東の汽水湖 (ノトロ湖およびトウツ湖) から本植物を回収し、非根圏土壌・根圏土壌・根の細菌叢の解析を行った。主座標分析から、非根圏土壌・根圏土壌・根の各部位で特有の菌叢を有していることが観察された (図 2)。

今後、引き続き多様性・菌叢解析を行うと共に、各自生地の土壌の化学性も解析し、その土壌特性の差が根圏微生物叢に及ぼす影響についても検討予定である。

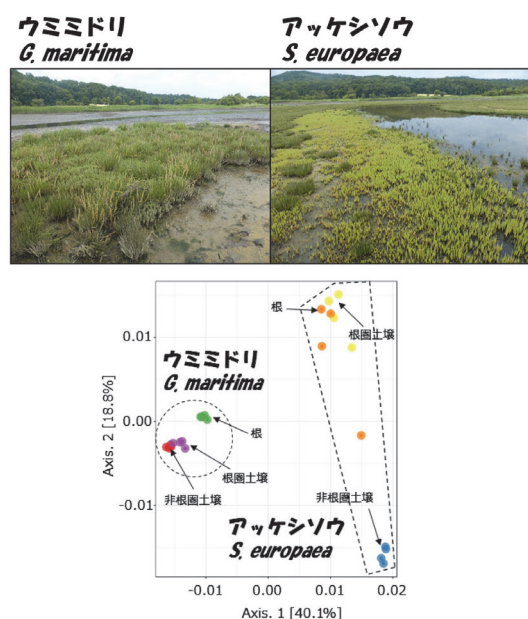


図 1 ノトロ湖 アッケシソウ・ウミミドリの自生地の様子と weighed UniFrac 距離に基づく主座標分析結果

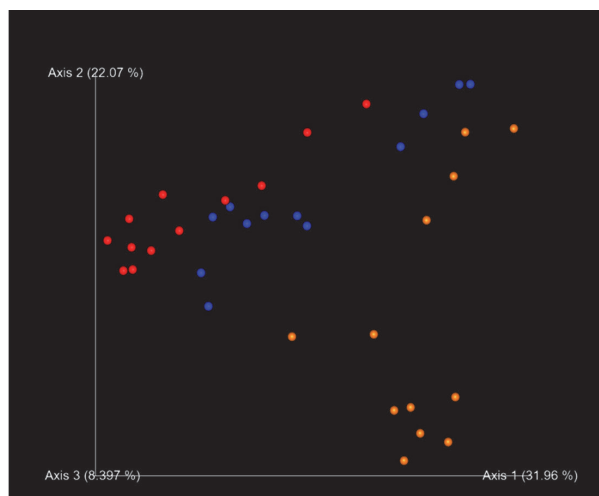


図 2 Weighed UniFrac 距離に基づく主座標分析結果 (赤：非根圏土壌、青：根圏土壌、オレンジ：根)

山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)

志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)

坂本 光 (生物産業学部 北方圏農学科)

ヤマイモに棲息する窒素固定細菌のフローラ解析

ヤマイモ (*Dioscorea* spp.) の生産性改善に関する研究を本学の宮古亜熱帯農場やナイジェリアで行い、これまでに新しい増殖方法や機械化栽培技術などを開発し、技術移転を行ってきた。そして、ヤマイモの一つであるダイジョの新品種育成過程で N511 品種（新コードで A-19）は窒素肥料が全くない土壌でも良く生育することが明らかになり、窒素固定細菌と共生していることが世界で初めて確認され、その窒素固定寄与率は 38% と非常に高いことが明らかになった (Takada *et al*, 2016)。ダイジョの窒素固定細菌を分離・同定したところ、多種多様な菌種が検出され、他のヤマイモの多くの種・品種にも窒素固定細菌が内生することが示唆された (Rezaei *et al*, 2017)。しかし、いまだ明らかにされていない共生生態を検討するには、さらに主要菌種やフローラの変遷を網羅的に解析する必要がある。そこで本研究ではヤマイモと共生する細菌のメタゲノム解析を目的とした。本研究は本学 2019 年度大学院先導的実学研究プロジェクト「ヤマイモに内生する窒素固定細菌の解明と利用」の一環である。

2017 年度の研究において、宮古亜熱帯農場において栽培したダイジョ A-19 系統の個体を用いてメタゲノム (メタ 16S) 解析系を確立した (NGRC ニュース No.9 にて報告)。今年度は、ナイジェリアにある国際熱帯農業研究所 (International Institute of Tropical Agriculture: IITA, 東京農大と MOU 締結済み) で栽培されているホワイトヤマ 6 系統を用いてメタゲノム解析を行った。サンプルは 2 条件 (施肥・無施肥)、3 部位 (バルク土壌・根圏土壌・根)、3 反復の計 108 サンプルを用いた。抽出した DNA を用いて 16S rRNA 遺伝子の V5-V7 領域を PCR で増幅し、MiSeq によるアンプリコンシーケンスを行い、得られたシーケンスデータをメタ 16S 統合解析ソフトウェア QIIME2 で解析を行った。主座標分析の結果から、バルク土壌・根圏土壌・根の各部位で特有の菌叢を有していることが確認された (図 1)。引き続き品種ごとの多様性や菌叢の差異等について詳細な解析を行っている。

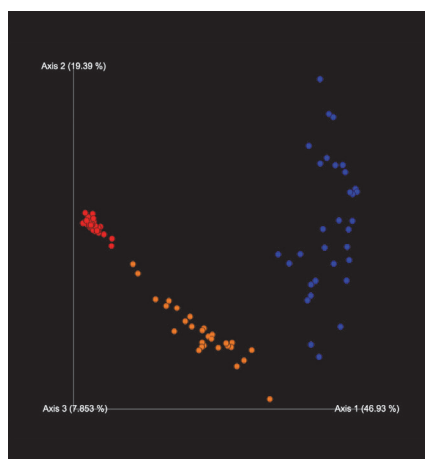


図 1 Weighed UniFrac 距離に基づく主座標分析結果
(赤：バルク土壌、青：根、オレンジ：根圏土壌)

志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)
山本紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
菊野日出彦 (国際食料情報学部 宮古亜熱帯農場)
志和地弘信 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)

= 研究発表実績 =

○論文発表

- Hamada K, Naito A, Hamaguchi Y, Kanesaki Y, Kasahara K, Taguchi A, Omura N, Hayashi Y, Usui T.
Ubr1p-Cup9p-Ptr2p pathway involves in the sensitivity to readthrough compounds negamycin derivatives in budding yeast.
Biosci. Biotechnol. Biochem. 83(10): 1889-1892. (2019)
- Itaya M, Nagasaku M, Shimada T, Ohtani N, Shiwa Y, Yoshikawa H, Kaneko S, Tomita M, Sato M.
Stable and efficient delivery of DNA to *Bacillus subtilis* (*natto*) using pLS20 conjugational transfer plasmids.
FEMS Microbiol. Lett. 366(4): fnz032. (2019)
- Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.
Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of in vitro cultured oocytes.
J. Reprod. Dev. 65(2): 171-175. (2019)
- Fujiwara T, Hirooka S, Mukai M, Ohbayashi R, Kanesaki Y, Watanabe S, Miyagishima SY
Integration of a galdieria plasma membrane sugar transporter enables heterotrophic growth of the obligate photoautotrophic red alga *Cyanidioschyzon merolae*.
Plant Direct 3(4): e00134. (2019)
- Itaya M, Sato M, Watanabe S, Yoshikawa H, Tomita M, Sato R.
Stable mutants of restriction-deficient/modification-proficient *Bacillus subtilis* 168: hub strains for giant DNA engineering.
J. Biochem. 166(3): 231-236. (2019)
- Ohbayashi R, Nakamachi A, Hatakeyama TS, Watanabe S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H, Miyagishima SY.
Coordination of polyploid chromosome replication with cell size and growth in a cyanobacterium.
mBio 10(2): e00510-19. (2019)
- Shibahara H, Ishiguro A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.
Follicular factors determining the developmental competence of porcine oocyte.
Reprod. Med. Biol. 18(3): 256-262. (2019)
- Nabeta K, Watanabe S, Chibazakura T, Zendo T, Sonomoto K, Shimizu-Kadota M, Yoshikawa H.
Constitutive expression of phosphoketolase, a key enzyme for metabolic shift from homo- to heterolactic fermentation in *Enterococcus mundtii* QU 25
Biosci. Microbiota Food Health 38(3): 111-114. (2019)
- Gärtner K, Klähn S, Watanabe S, Mikkat S, Scholz I, Hess WR, Hagemann M.
Cytosine N4-methylation via M.Ssp6803II is involved in the regulation of transcription, fine-tuning of DNA replication and DNA repair in the cyanobacterium *Synechocystis* Sp. PCC 6803.
Front. Microbiol. 10: 1233. (2019)
- Shiwa Y, Kanesaki Y, Ishige T, Mura K, Hori T, Tamura T.
Draft Genome Sequence of *Zygosaccharomyces mellis* CA-7, Isolated from Honey.
Microbiol. Resour. Announc. 8(26): e00449-19. (2019)

- **Satoh J, Kimata S, Nakamoto S, Ishii T, Tanaka E, Yumoto S, Takeda K, Yoshimura E, Kanesaki Y, Ishige T, Tanaka K, Abe A, Kawasaki S, Niimura Y.**
Free flavins accelerate release of ferrous iron from iron storage proteins by both free flavin-dependent and -independent ferric reductases in *Escherichia coli*.
J. Gen. Appl. Microbiol. 65: 308-315. (2019)
- **Maeno S, Tanizawa Y, Kajikawa A, Kanesaki Y, Kubota E, Arita M, Dicks L, Endo A.**
Pseudofructophilic *Leuconostoc citreum* strain F192-5, isolated from satsuma mandarin peel.
Appl. Environ. Microbiol. 85(20): e01077-19. (2019)
- **Kansaku K, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**
Mitochondrial Cell-free DNA secreted from porcine granulosa cells.
Zygote. 27(5): 272-278. (2019)
- **Lambrecht SJ, Kanesaki Y, Fuss J, Huettel B, Reinhardt R, Steglich C.**
Interplay and Targetome of the Two Conserved Cyanobacterial sRNAs Yfr1 and Yfr2 in *Prochlorococcus* MED4.
Sci. Rep. 9(1): 14331. (2019)
- **Torii Y, Yokoyama E, Seki M, Shigemura H, Ishige T, Yanagimoto K, Uematsu K, Ando N, Fujimaki T, Murakami S.**
Genetic characteristics of emerging *Salmonella enterica* serovar Agona strains isolated from humans in the prior period to occurrence of the serovar shift in broilers.
J. Vet. Med. Sci. 81(8):1117-1120. (2019)
- **Shimizu T, Kacprzak SM, Mochizuki N, Nagatani A, Watanabe S, Shimada T, Tanaka K, Hayashi Y, Arai M, Leister D, Okamoto H, Terry MJ, Masuda T.**
The Retrograde Signaling Protein GUN1 Regulates Tetrapyrrole Biosynthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 116(49): 24900-24906. (2019)
- **Uzuka A, Kobayashi Y, Onuma R, Hirooka S, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Fujiwara T, Miyagishima SY.**
Responses of unicellular predators to cope with the phototoxicity of photosynthetic prey.
Nat. Commun. 10(1): 5606. (2019)
- **Hasegawa S, Fukushima H, Hosoda H, Serita T, Ishikawa R, Rokukawa T, Kawahara-Miki R, Zhang Y, Ohta M, Okada S, Tanimizu T, Josselyn SA, Frankland PW, Kida S.**
Hippocampal clock regulates memory retrieval via Dopamine and PKA-induced GluA1 phosphorylation.
Nat Commun. 10(1):5766. (2019)
- **Noguchi T, Aizawa T, Munakata Y, Iwata H.**
Comparison of gene expression and mitochondria number between bovine blastocysts obtained in vitro and in vivo.
J. Reprod. Dev. 66(1): 35-39. (2020)
- **Ohki J, Sakashita A, Aihara E, Inaba A, Uchiyama H, Matsumoto M, Ninomiya Y, Yamane T, Oishi Y, Iwatsuki K.**
Comparative analysis of enteroendocrine cells and their hormones between mouse intestinal organoids and native tissues.
Biosci. Biotechnol. Biochem. In press
- **Ichikawa K, Shibahara H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**
Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes.
Reprod. Med. Biol. in press

● Matsutani M, Matsumoto N, Hirakawa H, Shiwa Y, Yoshikawa H, Okamoto-Kainuma A, Ishikawa M, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K.

Comparative genomic analysis of closely related *Acetobacter pasteurianus* strains provides evidence of horizontal gene transfer and reveals factors necessary for thermotolerance.
J. Bacteriol. in press

●学会・セミナー等での発表

○国内

2019年5月26－30日

日本地球惑星科学連合 2019年大会（千葉）

渡辺智、岩崎拓海、坂巻裕、兼崎友、大森正之

食用藍藻スピルリナが生産する細胞外高分子物質 EPS の機能評価

2019年6月24－26日

第19回日本蛋白質科学学会、第71回日本細胞生物学学会 合同年次大会

太治輝昭

植物の高温ストレス適応機構の解明

2019年7月25－28日

第42回 日本神経科学会（新潟）

福島穂高、芹田龍郎、喜田聡

リアルタイム Ca²⁺ イメージングによる恐怖記憶再固定化時および消去時の海馬神経活性動態

2019年9月11－13日

微生物生態学会 2019年度大会（山梨）

前野慎太郎、谷澤靖洋、梶川揚申、志波優、兼崎友、久保田恵理、有田正規、遠藤明仁

フルクトフィリック乳酸菌の環境適応

遠藤明仁、前野慎太郎、梶川揚申、谷澤靖洋、兼崎友、久保田恵理、有田正規、Leon Dicks

シュードフルクトフィリック乳酸菌 *Leuconostoc citreum* F192-5 株の菌株特異的な

環境適応

2019年9月15－17日

日本植物学会第83回大会（仙台）

安田麟太郎、清水隆之、島田友宏、田中寛、増田建、渡辺智

単細胞性紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* におけるヘム結合タンパク質のプロテオーム解析

向井瑞梨、兼崎友、宮澤和己、渡辺智

紅藻 *Galdieria sulphuraria* の白化・再緑化機構の解析

2019年9月16－18日

第71回 日本生物工学会大会

海野良輔、志波優、佐藤実穂、鈴木敏弘、石川森夫

オミクスアプローチを適用した熟成チーズの細菌相多様性解析

2019年10月11－13日

第49回 日本神経精神薬理学会（福岡）

福島穂高

海馬神経新生エンハンサーを用いた恐怖記憶忘却方法の開発と PTSD 治療方法開発への展望

2019年11月6－9日

第63回宇宙科学技術連合講演会（徳島）

渡辺智、坂巻裕、兼崎友、大森正之

食用藍藻スピルリナが生産する細胞外高分子物質 EPS の機能評価

2019年12月3－6日

第42回日本分子生物学会年会（福岡）

渡辺智、山崎脩平、青柳智大、松根（荷村）かおり、兼崎友、大林龍胆

DnaA-oriC に依存しないシアノバクテリアのDNA複製機構

2020年2月29－3月3日

日本植物分類学会第19回大会（岐阜）

田中啓介、小松かおり、佐藤靖明、Mintah Lemuel Ohemeng、小谷真吾、北西功一、四方篤、足達太郎

Flexible ddRAD-seq 法を用いた国内外における栽培バナナの分子系統解析

2020年3月19－21日

第61回日本植物生理学会年会（大阪）

番場康介、四井いずみ、坂田洋一、太治輝昭

シロイヌナズナ accession 間における浸透圧耐性の多様性メカニズム解明

山口将弘、内田康平、有賀裕剛、田中啓介、四井いずみ、坂田洋一、太治輝昭

塩順化後浸透圧耐性欠損株 aod13 の機能解析

小野雅晃、中村浩太郎、四井いずみ、坂田洋一、太治輝昭

短期および長期高温ストレスにおける ROS 消去能の寄与

月本亮、磯野一帆、四井いずみ、坂田洋一、太治輝昭

長期高温感受性変異株の単離解析

佐藤清史、中村浩太郎、四井いずみ、坂田洋一、太治輝昭

開放系高温耐性試験を用いたシロイヌナズナ高温耐性の多様性解析

齋藤雄一、星川健、藤田美紀、磯野一帆、田中啓介、有賀裕剛、江面浩、篠崎一雄、坂田洋一、太治輝昭

HsfA1 は熱形態形成や気孔開口による蒸散促進といった高温回避運動を制御する

2020年3月25－28日

日本農芸化学会2020年度大会（福岡）

森谷千星、門倉利守、中山俊一、松谷峰之介、兼崎友、藤田信之、鈴木健一朗

全ゲノムに基づく国酒酵母の系統学的検討

田中啓介

Microsatellite capture sequencing 法を用いた *in silico* 多型解析パイプラインの構築

○国際

2019年7月14－18日

International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions (Glasgow, Scotland)

Kosuke Yamamoto, Yuh Shiwa, Taichiro Ishige, Hikaru Sakamoto, Keisuke Tanaka,

Masataka Uchino, Naoto Tanaka, Suguru Oguri, Hiromasa Saitoh, Seiya Tsushima

Bacterial diversity associated with the rhizosphere and endosphere of two halophytes:

Glaux maritima and *Salicornia europaea*

2019年9月4－5日

“The 10th International Symposium of Advanced Energy Science

～ Beyond the Decade of Zero Emission Energy ～ (Kyoto)”

T. Kawaguchi, M. Koseki, K. Maeda, R. Narikawa, M. Watanabe, M. Ikeuchi,

S. Watanabe

Artificial modification of cyanobacterial phycobilisome

2019年11月1－2日

The 18th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (ISMNTOP2019) (Fukuoka)

Ken Iwatsuki


Generation of endocrine cells using organoid culture system

=マスメディア=

2019年10月

遠藤明仁

Applied and Environmental Microbiology 誌に発表した論文が、HP 上で紹介されました。



2020年3月発行

生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター No. 7

学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析拠点

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

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

E-mail kyoten-g@nodai.ac.jp URL <http://www.nodai-genome.org>

NGRCニュース No. 11

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 nodaige@nodai.ac.jp URL <http://www.nodai-genome.org>