



生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成

NGRC



ニュース

No. 6

東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター
2015年3月号

CONTENTS

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業

「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」	3
生物資源ゲノム解析センターの運用実績	4
平成 26 年度 学内公募一覧	5
学内公募事業とその成果	8
次世代シーケンサーを用いたダイコンのゲノム解読	8
<i>Brassica rapa ssp. rapa</i> cv. “77B” の核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子の同定	10
ホップの香気成分生合成に関与する遺伝子群の解析	12
シロイヌナズナ塩馴化能欠損変異株の変異同定	14
オオムギの有用遺伝子を求めて	15
マウス始原生殖細胞における DNA メチル化非依存的な性特異的遺伝子発現	16
新規小眼球症マウスおよびラットにおける順遺伝学的研究	18
サイクリン A によるヒト染色体 DNA 複製開始制御機構の解析	20
ニワトリの就巢行動誘発制御遺伝子の特定	22
老化が牛卵子に及ぼす影響とその制御方法に関する研究	25
ニホンウズラの免疫関連遺伝子の研究	26
ニホンウズラの抗菌ペプチド多様性に関する研究	26
ニホンウズラ熱ショックタンパク質 HSP90AA1 の 熱ショック応答性とスプライシングバリエーションの解析	28
ニホンウズラ主要組織適合性複合体 Mhc Coja クラス IIB 遺伝子群の構造解析	29
ニホンカワウソの系統分類学的位置づけ再検討	32
食酢醸造に用いられる酢酸菌二属のトランスクリプトーム解析	34
蜂蜜から分離された酵母の耐糖性メカニズムに関する研究	36
16s rRNA 遺伝子を標的としたニホンウズラ腸内細菌叢の解析	38
マサバへしこ「米ぬか」中のアミラーゼ生産菌のゲノム解析	40
フルクトフィリック乳酸菌の環境適応・進化に関する研究	41
出芽酵母をモデル生物とする真核生物のリボソーム構成因子の転写制御機構の研究	42
シアノバクテリアにおけるゲノムコピー数制御機構の解明	43
豚由来 <i>Actinomyces</i> sp. Chiba101 株の全ゲノム解析	44
研究発表実績	45

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業**「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」****多様な農学研究分野へのさらなる挑戦**

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、文部科学省の平成20年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業より設置された組織です。以来5年間、動物、植物から微生物まで農学分野を中心とするゲノム解析の研究を推進してきました。例えば、日本在来和牛「口之島牛」や「見島牛」のゲノムを解読することで、これらの在来種に特有なゲノム上の領域を解明しました。また東京農業大学らしい研究対象として、酒米「雄町」「五百万石」「山田錦」のゲノム解読にも成功しました。他にも、学内の先生方の研究により、ダイコン、ホッカイエビ、ウズラなど、農学分野において非常に重要な生物種のゲノム解読や遺伝子発現解析にも出色の成果を出しています。微生物の分野においても乳酸菌やシアノバクテリアなどの多数の有用微生物のゲノム解読や突然変異部位の同定を成功させてきました。

これらの実績により、昨年度より「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」という新たなテーマのもと、再度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業に採択され、現在さらに精力的に研究活動をおこなっております。今回のプロジェクトでは、特に、生殖機能制御、エピジェネティクスによる機能制御、環境適応機構の制御、生物の形態の制御、生物機能の食資源生産への応用、ゲノム情報の保全と進化科学の

6つの分野を柱として、次世代シーケンサーを活用することを目指しています。これは、シンプルなゲノム解読だけに留まらず、RNAやエピジェネティクスといった核酸を取り巻く様々な制御要素の研究分野においても解析の幅を広げて行くということです。このような最先端技術を用いた研究は一般に医学分野や理学分野を中心に発展することが多いのですが、本センターは非モデル生物ばかりの農学分野における国内唯一の農学ゲノム解析拠点として、本学の研究基盤形成を目指しています。

今年度は、畜産学科、バイオセラピー学科、バイオサイエンス学科、生物応用化学科、醸造科学科、食品安全健康学科、栄養科学科、アイソトープセンター、国際農業開発学科、生物生産学科、食品香粧学科、アクアバイオ学科、生物生産技術学科の先生方の利用があり、全学的に広く研究支援を行っています。昨年11月には本学オホーツクキャンパスにて成果報告を兼ねた学内共同研究説明会を実施し、非常に盛況な会となりました。

今後もさらに本学のゲノム研究を支援し、その成果の発信に取り組んでいく所存です。

矢嶋 俊介（生物資源ゲノム解析センター）

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の運営は、本学総合研究所の支援のもと、センター長以下、世田谷・厚木・オホーツクの各キャンパス所属の教員の多大なご協力によりおこなわれています。本センターでは、研究員の他に技術員・事務員などのスタッフにより、機器のオペレーション、情報解析、など研究の進捗をスムーズに進めるための体制を整えています。

現在、本センターでは、Illumina 社の次世代シーケンサー 4 台 (HiSeq2500 1 台、MiSeq 2 台、Genome Analyzer IIx 1 台) と、大規模な情報解析サーバー (全 9 台、総メモリ容量 5 TB、総ディスク容量 425 TB) を整備し、運用しています。これまでに解析した総塩基長を累積すると約 20 Tb に達し、ヒトゲノムに換算すると 6000 人以上を解読したことに相当します。また解析したサンプルの数も累計すると約 5000 サンプルに達しています (図 1)。

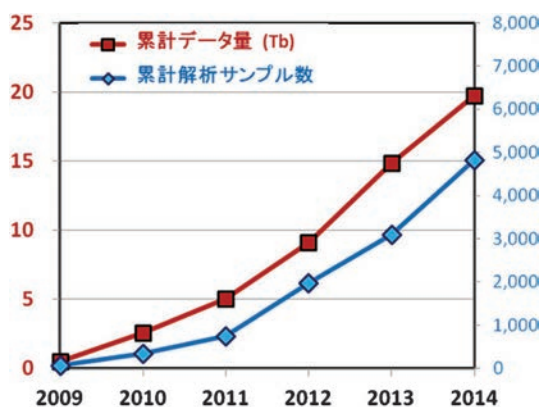


図 1 累計解読塩基長、累計サンプル数

2014 年度のシーケンス解析目的の種別としては、全遺伝子の発現量を網羅的に解析する RNA-seq 解析と、ゲノム中の変異遺伝子座を探索するリシーケンス解析が主流になってお

り、メタゲノム解析、ChIP-seq 解析、エピゲノム解析、*de novo* 解析がそれに続いています。特に農学分野で重要な非モデル生物の RNA-seq 解析や、微生物のリシーケンス解析の件数が多い状況です。この種別分類結果は、当センターのシーケンサーの長所を良く反映しており、利用者間で実験目的と解析機器選択のノウハウが広く理解されて来たことによると考えられます。

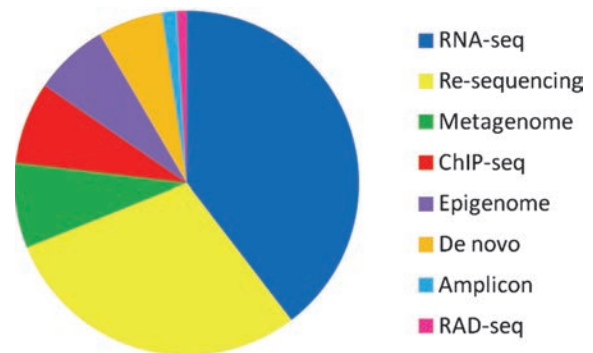


図 2 2014 年度のサンプルの解析種別

解析された塩基配列データは DDBJ (DNA Data Bank Japan) 内のデータベース (DRA) に登録され、研究成果の発表に合わせて順次公開されています。平成 27 年 1 月末現在、72 件の研究プロジェクトが本センターを利用した成果として登録されており、今後さらに増える予定です。

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

●平成 26 年度 学内公募一覧

1. 岩田 尚孝 (農学部 畜産学科)
「加齢の生殖細胞に及ぼす影響とその制御方法」
2. 桑山 岳人 (農学部 畜産学科)
「ニワトリの就巢行動発現制御遺伝子の特定」
3. 半澤 恵 (農学部 畜産学科)
「ニホンウズラ主要組織適合性複合体 *Mhc Coja* クラス IIB 遺伝子群の構造解析」
4. 半澤 恵 (農学部 畜産学科)
「ニホンウズラ盲腸糞由来細菌叢のメタゲノム解析」
5. 半澤 恵 (農学部 畜産学科)
「ニホンウズラ熱ショックタンパク質 HSP90AA1 の熱ショック応答性とスプライシングバリエーションの解析」
6. 半澤 恵 (農学部 畜産学科)
「ニホンウズラの抗菌ペプチドの分子免疫学的解析」
7. 村上 覚史 (農学部 畜産学科)
「食品起因感染症原因菌制御のための次世代シーケンサーを用いた進化系統グループの解明」
8. 佐々木 剛 (農学部 バイオセラピー学科)
「ニホンカワウソ (*Lutra nippon*) の系統分類学的位置づけ再検討」
9. 三井 裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)
「資源・薬用となる野生植物の遺伝学的解析に向けた EST-SSR マーカーの効率的開発」
10. 尾畑 やよい (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「成熟卵母細胞の発生・分化に必須な因子の探索」
11. 川崎 信治 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「過酷な成育環境から単離された微細藻類の環境ストレス耐性機構に関する研究」
12. 川崎 信治 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「花に共生する微生物叢のメタゲノム解析」
13. 河野 友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「メダカ雌雄生殖細胞におけるメチローム解析」
14. 河野 友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ケナガマンモスの全ゲノム解読」
15. 河野 友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「マウス生殖細胞における DNA メチローム解析」
16. 河野 友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「トゲネズミ属 3 種における新規性決定遺伝子の同定」
17. 河野 友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「イノシシおよびブタのゲノム多様性から家畜化および有用形質に関連する遺伝子の探索に関する基礎的研究」

18. 坂田 洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ヒメツリガネゴケを用いた低温順化プロセスの解析」
19. 太治 輝昭 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「シロイヌナズナ塩馴化能欠損変異株の変異同定」
20. 林 隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「スギのピットメンブランを分解する微生物の遺伝子発現」
21. 林 隆久 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「ポプラ木部細胞壁を構成する糖鎖であるキシログルカンの機能」
22. 吉川 博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「高温メタン発酵を安定化する微生物共生機構に関する研究」
23. 吉川 博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「耐熱化ザイモモナス菌の耐熱化機構の解析」
24. 吉川 博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「細胞における増殖停止期の生存戦略ならびに変異蓄積と進化に関する理論構築」
25. 渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
「シアノバクテリアにおけるゲノムコピー数制御機構の解明」
26. 樋口 恭子 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「高 pH 水耕液に応答したオオムギのトランスクリプトームおよび miRNA の解析」
27. 樋口 恭子 (応用生物科学部 生物応用化学科)
「オオムギ由来鉄欠乏誘導性レセプター様キナーゼを導入したイネのトランスクリプトームの解析」
28. 石川 森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)
「好塩性・好アルカリ性乳酸菌 *Marinilactibacillus psychrotolerans* の炭素源代謝関連酵素遺伝子群に着目した RNAseq によるトランスクリプトーム解析」
29. 中山 俊一 (応用生物科学部 醸造科学科)
「RNA-Seq 法による発酵性微生物における高温培養時の網羅的遺伝子発現解析」
30. 中山 俊一 (応用生物科学部 醸造科学科)
「醸造酵母の網羅的遺伝子発現解析による香気・呈味成分生合成機構の解明」
31. 藤本 尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)
「メタトランスクリプトーム解析による環境中からの藻類有用遺伝子の抽出と機能解析」
32. 阿久澤 さゆり (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「マサバ米糠漬け発酵食品「へしこ」の糠床分離菌株のゲノム解析」
33. 田村 倫子 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「耐糖性酵母 *Zygosaccharomyces mellis* の浸透圧耐性メカニズムに関する研究」
34. 笠原 浩司 (応用生物科学部 アイソトープセンター)
「出芽酵母におけるリボソーム RNA の新規転写制御機構の解明」
35. 入江 憲治 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「起源の異なる半矮性遺伝子 *sd-1* を持つイネ同質遺伝子系統における節間および穂のトランスクリプトーム解析」
36. 小塩 海平 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)

「青葉アルデヒドによる果実および野菜の代謝制御機構の解明」

37. 小塩 海平 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)

「ソルビタントリオレート処理によって誘起されるスギ雄花のプログラム細胞死の過程における
トランスクリプトーム解析」

38. 夏秋 啓子 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)

「パパイア輪点ウイルスにおける 2 バイオタイプの類別と宿主内での動態」

39. 小栗 秀 (生物産業学部 生物生産学科)

「ホップの香気成分生合成に関する遺伝子群のトランスクリプトーム解析」

40. 和田 健太 (生物産業学部 生物生産学科)

「次世代シーケンス解析に基づく眼球疾患モデル動物の発症原因遺伝子および修飾遺伝子の同
定」

41. 遠藤 明仁 (生物産業学部 食品香粧学科)

「フルクトフィリック乳酸菌の環境適応・進化に関する研究」

42. 篠原 卓 (短期大学部 生物生産技術学科)

「登熟期間中の高気温によって誘起されるエンドウ種子の生理障害 (Hollow Heart) 発生過程
におけるトランスクリプトーム解析」

43. 和久井 健司 (短期大学部 生物生産技術学科)

「*Brassica rapa* ssp. *rapa* cv. 77B の核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子の同定」

●学内公募事業とその成果

次世代シーケンサーを用いたダイコンのゲノム解読

ダイコンゲノムの解読

私たち日本人にはなじみ深いダイコンは、学名を *Raphanus sativus* L. と言い、アブラナ科の1年生草本です。ダイコンは、首が青くて根が白くまっすぐ円柱状に太る「青首総太系」をイメージされますが、日本では古来より、形、色、成分、作型などがずいぶん異なる在来品種群が育種され、その数は数百あるいは千を超えます。これらは現在、遺伝子資源、さらには文化的資源として再評価されつつあります。このようにダイコンは高い経済的・社会的価値を有するにも関わらず、その分子遺伝学研究はあまり進んでいませんでした。そこで我々は、ダイコンのゲノム配列を解読し、“ダイコンをダイコンたらしめている”形態形成の仕組みや生理機能の分子基盤に迫ることを目指して研究を続けてきました。

まず、主要な栽培品種である青首系ダイコンの純系系統を(株)サカタのタネに提供いただき、ゲノムを決める“モデルダイコン”としました。本学生物資源ゲノム解析センター、農業生物資源研究所、国立遺伝学研究所などと連携して、3機種次世代シーケンサーを用いて得られた膨大なデータを組み合わせて、ゲノム配列を高い精度で構築することに成功しました。構築されたゲノムを用いて、アブラナ科植物とのゲノム比較解析を行った結果、過去に生じたゲノムの構造の大規模な変化が、ダイコンや *Brassica* 属(キャベツ、白菜、カブなど)を含むアブラナ科野菜の多様化を促した可能性が示されました(図1、2)。

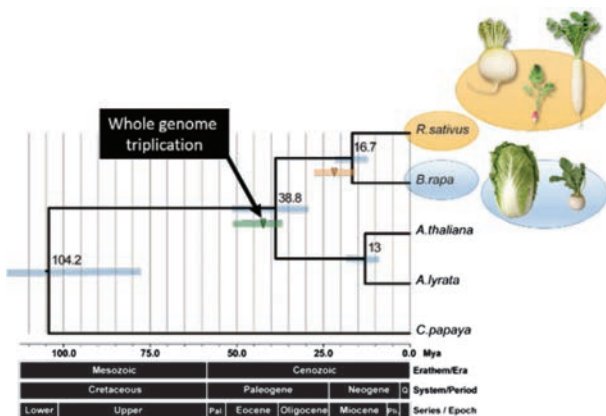


図1 720 遺伝子座を用いたダイコン、ハクサイ、*Arabidopsis*、パパイアの系統関係と分岐年代

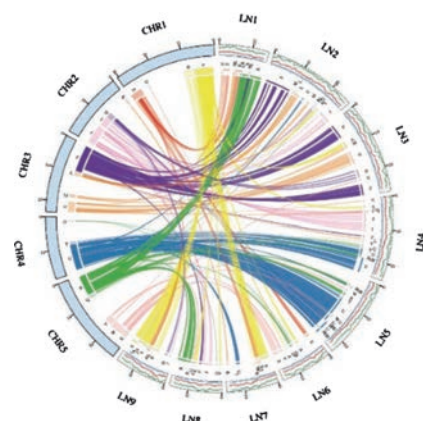


図2 シロイヌナズナ(1~5番染色体: CHR1-5)とダイコン(1~9番染色体: LN1-9)のシンテニー。アブラナ科共通の24個のゲノムブロックを各色で表している

ゲノムから形質の遺伝基盤を探る

ダイコンの生長は、発芽直後の実生期を経て、発芽後2週間ほどで初期肥大が開始、約30日で急速に根が生長する二次肥大期へと移行することがよく知られています(図3)。

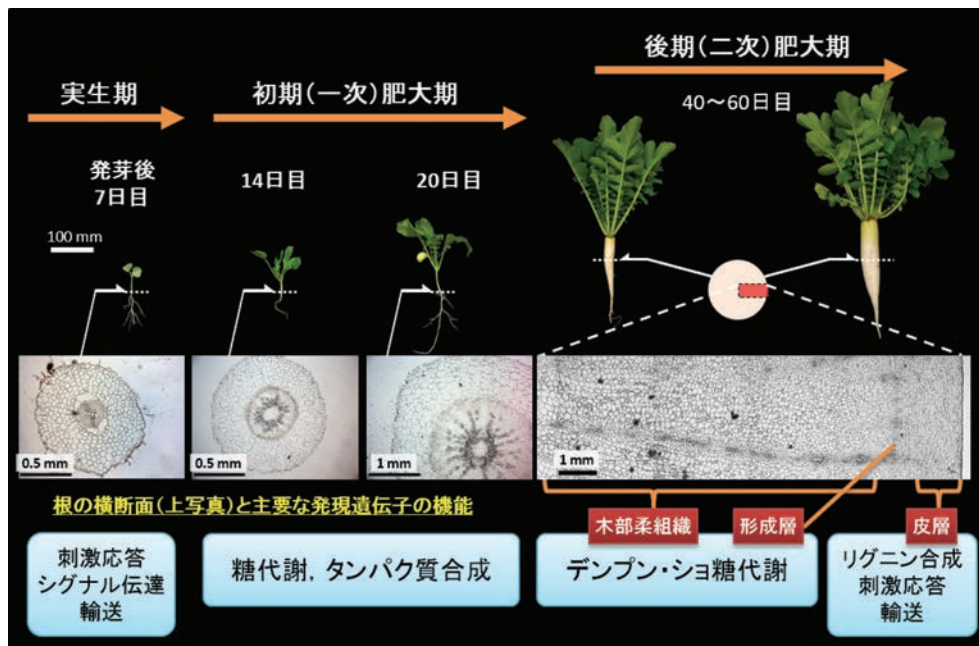


図3 ダイコンの肥大生長ステージ。 各肥大ステージ、組織特異的に発現する主要な遺伝子群とその機能を同定した

これらの生長ステージが切り替わるタイミングでは、遺伝子の発現レベルで一体どんな変化が起こっているのかに注目して、網羅的な遺伝子発現解析を行いました。その結果、肥大時の根部、特に維管束形成層と木部柔組織において糖代謝関連の遺伝子群、なかでもデンプン・ショ糖代謝経路の機能活性化が肥大に主要な役割を果たしていること、それらの経路は一度スイッチが入ると持続的に機能して肥大を進行させていくことが分かってきました。一方で発芽直後の若い根や肥大根の皮の部分における遺伝子の働きは全く異なっていて、主に外部からのストレスや刺激への応答、シグナル伝達、輸送などの機能を中心に行っていると考えられました。

また、ダイコンの根にはアブラナ目植物に特有のカラシ油配糖体（グルコシノレート：GSL）が多量に含まれ、この加水分解産物が辛味成分となりダイコンの味と香りを特徴付けています。この辛味成分には脂質分解の促進、冠動脈疾患の改善、抗がん作用があり、注目されています。そこで GSL 生合成に関連する遺伝子を解析した結果、ダイコンで発現する複数の主要な GSL 生合成遺伝子を同定し、これらの転写調節を司る因子を見出すことに成功しました。また、ゲノム情報から GSL を加水分解する酵素遺伝子のコピー数が、シロイヌナズナと比べてダイコンには非常に多いことが分かりました。

現在、ゲノムデータベースの整備を進めており、根の肥大や辛味をコントロールする遺伝子の機能解析や、品種間に見られる有用な形質変異の遺伝的背景の解明に向けて研究を進めています。今後、ダイコンの形態形成や生理機能の分子メカニズムの解明が一層進み、新しい品種の育成や在来品種の遺伝子資源としての活用など、応用的な研究開発へ発展していくことが期待されます。

三井裕樹（農学部 バイオセラピー学科）
 小松憲治（短期大学部 生物生産技術学科）
 片寄裕一（農業生物資源研究所）
 他、多くの方々にご協力いただきました

***Brassica rapa* ssp. *rapa* cv. “77B” の 核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子の同定**

カブ (*Brassica rapa* L. ssp. *rapa*) は、ハクサイ (ssp. *pekinensis*) やミズナ (ssp. *japonica*) などと同種であり、アブラナ科ブラシカ属に分類される日本人にとって馴染み深い野菜のひとつです。漬物や煮物に向くことから日本各地で在来品種が分化を遂げ、多様な色や形の品種が存在しています。私たちの研究室では、これまでに固定種である在来カブの遺伝的類縁関係に関する研究を進める中で、雄性不稔性を示す個体を見出してきました。雄性不稔性とは、植物の生殖器官において雌ずいは正常に機能するのに対して、雄ずいが欠如したり花粉が発育を止めて退化する現象であり、アブラナ科植物をはじめ雑種強勢を利用した一代雑種育種においては、F₁ 種子の効率的な採種技術の確立に用いられる形質です。例えば、母本（種子親）に雄性不稔個体を使うことにより、自家受精を防ぐための除雄作業を省けるため、効率よく F₁ 種子を生産できることになります。

当研究室で見出した雄性不稔性を示すカブ品種 “77B” は、遺伝学的解析から、雄性不稔形質が核の劣性一遺伝子によって支配される核遺伝子型雄性不稔性であることが明らかとなっています。また、本雄性不稔性の表現型は、雄ずいに葯が全くみられないものであり、雄性可稔個体と明瞭に区別できるものでした (Fig. 1)。さらに、蕾の発達過程の組織学的観察より、品種 “77B” の雄性不稔花の花粉は葯内において発達段階初期に消失することが示され (Fig. 2)、その結果として葯全体が退化し消失することが推察されました。

Brassica rapa では 2011 年にハクサイ (ssp. *pekinensis*) の全ゲノム配列が公開されています (Wang et al., 2011 *Nat Genet*)。私たちは、公開ゲノム配列をリファレンスとして次世代ゲノムシーケンサー (NGS) を用いた品種 “77B” および品種 “津田カブ” のゲノム解読を行い、ゲノムワイドな SNP マーカーの獲得を試みるとともに、MutMap 法 (Abe et al., 2012 *Nat Biotech*) を用いた遺伝子同定を目指します。具体的には、“77B” および “津田カブ” 間の F₁ 個体の自殖により作成した F₂ 集団に対し、雄性不稔性を指標にフェノタイピングを行い、可稔個体および不稔個体のバルク集団を作成しました。その集団から得たバルクゲノム DNA に対し NGS を用いた SNP 解析を行い、雄性不稔形質と強い相関を示す SNP の同定を試みます。その後、同定された SNP を含む遺伝子に対し、形質転換体を用いた遺伝子相補を含む証明実験を行い “77B” の核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子を同定します。現在までに、両親個体および各 F₂ バルク DNA のシーケンスを終えており、解析を進めています。

核遺伝子型雄性不稔性は、*B. rapa* 種内においては、亜種が異なる ssp. *pekinensis* および ssp. *chinensis* でわずかに報告されていますが、ssp. *rapa* では私たちによる品種 “77B” の報告のみです。遺伝的雄性不稔性は、核遺伝子のみによって支配される核遺伝子型雄性不稔と細胞質遺伝子の働きで起こる細胞質雄性不稔に大別され、アブラナ科における一代雑種育種においては雄性不稔個体の獲得効率から細胞質雄性不稔のみが用いられますが、その分子メカニズムは十分に分かりません。本研究において核遺伝子型雄性不稔性を支配する遺伝子が同定されることで、当該雄性不稔のみならず細胞質雄性不稔の機構解析の進展が期待できるとともに、植物の花粉形成に関わる分子生物学的機構解明の一助となるものと考えています。



Fig. 1 カブ (*B. rapa* ssp. *rapa*) 品種“77B”の雄性可稔 (左) および雄性不稔個体 (右) の表現型。

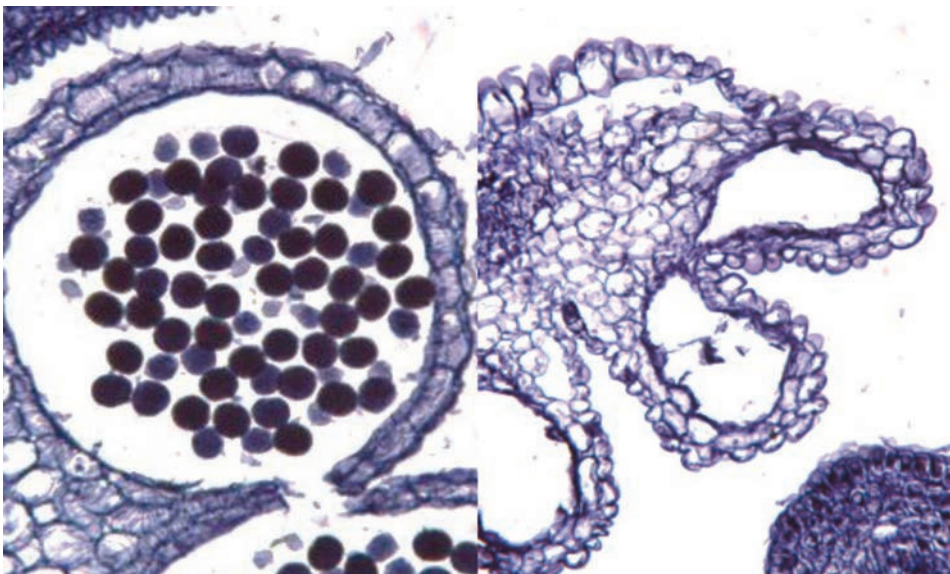


Fig. 2 カブ (*B. rapa* ssp. *rapa*) 品種“77B”の雄性可稔 (左) および雄性不稔個体 (右) における葯組織切片。

和久井健司 (短期大学部 生物生産技術学科)

小松憲治 (短期大学部 生物生産技術学科)

ホップの香気成分生合成に関する遺伝子群の解析

ホップ (*Humulus lupulus* L.) は、雌雄異株のアサ科の多年草植物です。ビールに独特の香気と苦みをもたらす作物であり、ドイツ、チェコ、アメリカを中心に、年間約9万トンが生産されています。ホップは、収穫まで3から5年の栽培期間を要するため、迅速な形質判別のために分子遺伝学的手法の導入が必要とされています。

ホップの品質は苦味成分である α 酸含量を元に評価されてきましたが、消費者の嗜好性の多様化に伴い、近年ではホップの様々な芳香に商品価値が見出されるようになってきました。これらの芳香は、ホップ雌花球果の苞葉の特殊な器官「ルプリン腺」(図1)において作られる精油成分(主にテルペン類)に起因し、特徴的な芳香をもつホップ品種の開発はホップの育種目標の一つにもなっています。ホップ ($2n = 20$) のゲノムサイズはハプロイドあたりイネの4倍に相当する約2,700メガ塩基(27億塩基)と比較的大きく、全ゲノム解読はまだ公開されていません。

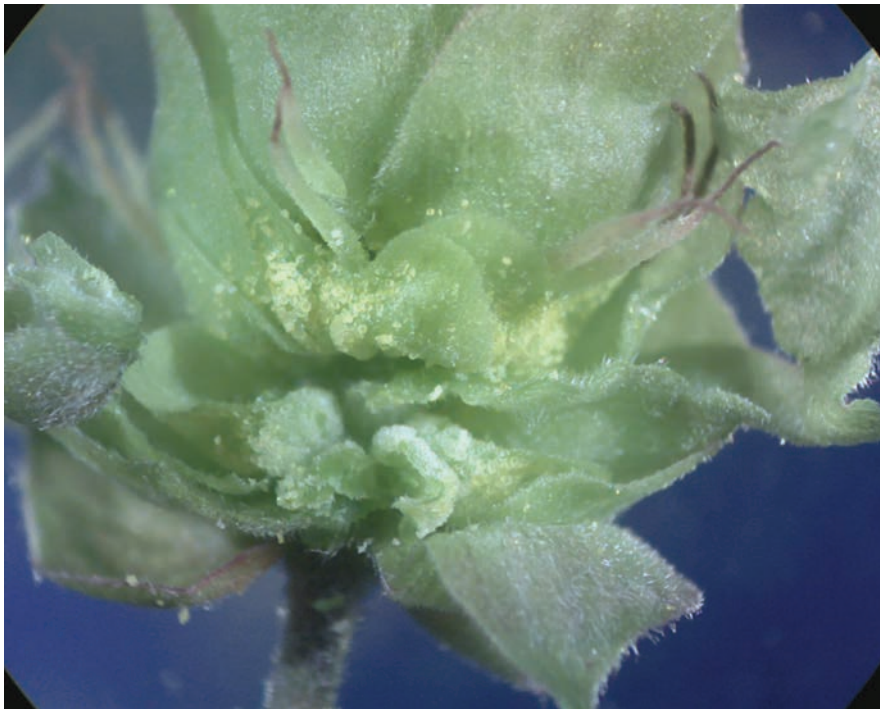


図1 ホップ雌花のルプリン腺 (黄色い粒)

我々は、次世代シーケンサーを用いた遺伝子の網羅的発現解析を用いて、ホップの雌花が多様な成分を生成する分子メカニズムを明らかにする研究を計画しました。収穫期のホップ雌花のルプリン腺からRNA画分を調製し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により、発現している遺伝子を網羅的に解析しました。ホップ全ゲノム長の4倍程度の約10,000メガ塩基の配列解析結果から、ルプリンでは約2万個の遺伝子が発現していると推定されました(イネの遺伝子総数は約2万7千ですので、ほぼ同程度です)。そのうち8割は既知遺伝子と類似性が見出され、機能が推定されました(図2)。今後は、ホップの別の器官や、複数品種との比較から発現遺伝子の特徴を明らかにし、その知見をホップの育種に応用し、優れた香りを持つホップの育種に発展させることを目指しています。

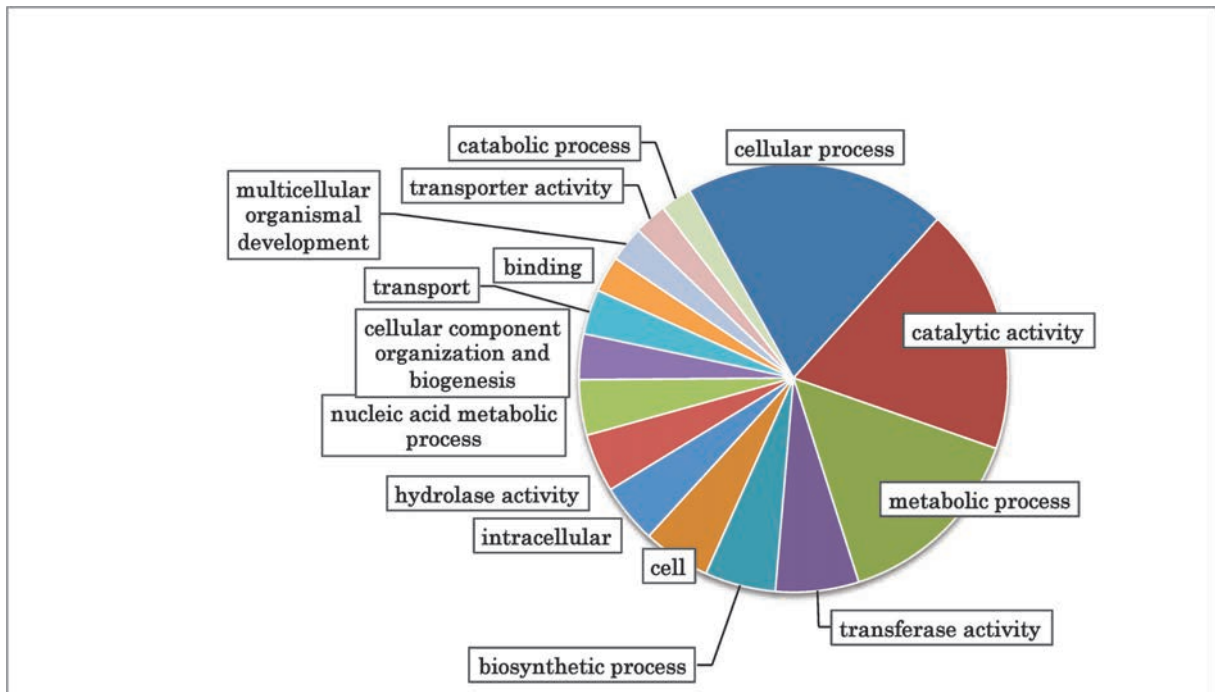


図2 ホップのルプリン腺における遺伝子の機能別発現量

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)
 小栗 秀 (生物産業学部 生物生産学科)
 坂本 光 (生物産業学部 生物生産学科)
 吉田穂積 (生物産業学部 生物生産学科)
 伊藤博武 (生物産業学部 生物生産学科)
 妙田貴生 (生物産業学部 食品香粧学科)
 中澤洋三 (生物産業学部 食品香粧学科)
 上本充大 (サッポロビール)

シロイヌナズナ塩馴化能欠損変異株の変異同定

塩の集積や乾燥ストレスは作物の収量に大きな影響を及ぼします。一方、自然界には、これらのストレスに対して極めて高い耐性を示す植物が存在します。そこで本研究では、特に塩ストレスに環境突破力を示す植物と示さない植物の違いが、どの遺伝子に因るのかを明らかにする研究を進めています。

モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) は、世界中に 1000 種を超える accessions (エコタイプ) が存在すると言われていています。近年の研究により、シロイヌナズナの accessions 間には、様々な表現型に対してバリエーションが存在することが明らかになってきました。私たちの先行研究において、世界中に存在する 350 種のシロイヌナズナ accessions における耐塩性を評価したところ、耐塩性についても非常に大きなバリエーションが見られました。特に高い耐塩性を示した accessions について、その耐塩性メカニズムを生理学的に調べたところ、極めて高い耐塩性を示す accessions は、生育に影響を及ぼさない程度の塩ストレスを一定期間経ることで、海水と同程度の塩（浸透圧）にも耐性を示す「塩馴化能」が優れていることが分かりました。塩馴化能を制御する原因遺伝子座については、これまでの様々な遺伝学的な解析により明らかになりつつあります。しかしながら、塩馴化能獲得に至るメカニズムについては、不明な点が多く残されています。そこで、塩馴化能を有する accession、あるいは塩馴化能を欠損した accession の種子にそれぞれ突然変異処理を施し、前者からは塩馴化能欠損変異株を、後者からは塩馴化能獲得変異株のスクリーニングを行っています。これまでに単離した塩馴化能欠損変異株、*acquired osmotolerance defective mutant 1*, *aod1* について、原因遺伝子のマッピングを行った結果、第一染色体に座乗することが分かりました。原因遺伝子を特定するため、ゲノムシーケンサーを用いて親株である野生型 accession と *aod1* のリシーケンスを行ったところ、マッピングにより絞り込んだ遺伝子領域に、数十塩基の欠損が 1 カ所存在することが分かりました。現在、この遺伝子欠損が塩馴化能欠損の原因か確かめるため、相補試験などの遺伝学的な解析を進めています。

これまでに塩・浸透圧耐性のナチュラルバリエーションを遺伝子レベルで特定した例はなく、遺伝子座の同定とメカニズムの解明が非常に期待されます。

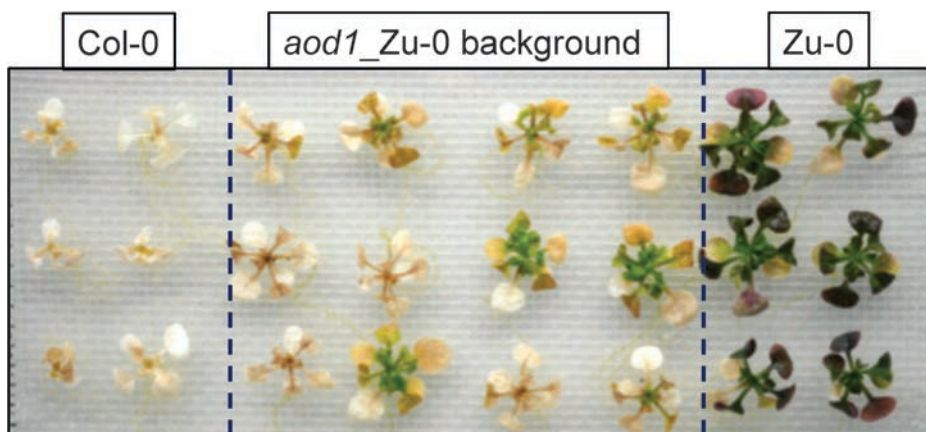


図 塩馴化能欠損変異株 *aod1*

塩馴化能を有する Zu-0 野生株に突然変異処理した種子より得られた *aod1* 変異株は、塩馴化能を欠損した野生株 Col-0 の様に、浸透圧耐性を失う。

太治輝昭 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

オオムギの有用遺伝子を求めて

オオムギは「肥沃な三日月地帯」を起源とし、弥生時代にコムギと共に日本に到達したと言われています。東アジアではもっぱら六条オオムギが食用に栽培されてきました。ヨーロッパや西アジアでは二条オオムギが食用以外にも飼料やビール醸造原料として栽培されています。乾燥地域で進化してきたため乾燥に強く、またオオムギはコムギよりも高い耐塩性を示します。さらにオオムギはアルカリ性土壌で問題になる鉄欠乏に強いことが知られています。私は大学院生の時にオオムギの根における鉄獲得機構に関わるテーマを与えられて以来、オオムギの鉄栄養についての研究を続けてきました。最近では鉄欠乏が発生しやすいアルカリ性という環境条件そのものに対するオオムギの適応についても研究を始めています。

私が農大に奉職して「オオムギはなぜ少ない鉄でも生き延びられるのか」という研究を始めた頃は、網羅的な遺伝子解析というとジーンチップでした。モデル生物やヒトなど研究者が多いものについてはジーンチップを用いた委託解析もずいぶん安くなっていましたが、オオムギのようなマイナー(?)な植物は価格が高く、10年ほど前に網羅的発現解析を行った際はなけなしの研究費で1連でしか解析を行いませんでした。それでもブレークスルーとなる重要な情報を複数得ることができ、それをもとにして現在も研究を展開し、オオムギ固有の形質やそれを支配する遺伝子が見つかってきています。

去年からゲノムセンターでお世話になっているのは「オオムギはなぜアルカリ性の水耕液中でも十分に根を伸長させられるのか」という研究におけるRNA-Seqです。酸性条件における根伸長の阻害についてはよく研究されていますが、アルカリ性条件での植物の生育については先に述べた鉄欠乏のようにアルカリ性で不溶化する必須元素に集中して研究が行われており、植物細胞の伸長には細胞外液が微酸性であることが必須であるにもかかわらず（酸成長理論）、アルカリ性条件での根伸長についての研究例はわずかです。したがってこのテーマについても作業仮説を立てることは難しく、まずは遺伝子発現変動の網羅的解析が手掛かりになると考えています。

オオムギの全ゲノム配列は2012年に公開されましたが、モデル植物のシロイヌナズナやイネとは違い、次世代シーケンサーで読まれた配列をはりつけるレファレンスとしてはまだまだ粗いのでde novoアセンブリを行っていただいたうえで、発現変動の解析を行っています。まだ最近データを頂いたばかりですが、オオムギ根の分裂領域と伸長領域のそれぞれで、pH6の水耕液で栽培した場合に比べpH8で栽培した時に大きく発現量変動する遺伝子が多数検出されてきており今後は楽しみです。

またオオムギの鉄欠乏適応能力に関しては品種間差がかなりあることが分かってきており、品種間で発現パターンを比較したりゲノムの塩基配列の差異を調べるなど、これからもゲノムセンターにお世話になろうと思っています。

アルカリ土壌に対するオオムギの適応



マウス始原生殖細胞における DNA メチル化非依存的な 性特異的遺伝子発現

生殖細胞の起源となる始原生殖細胞（PGC）は、受精後 7.25 日の胎仔尿膜基底部分において体細胞とは全く異なる細胞運命を秘めて出現する。PGC は、受精後 13.5 日までに生殖隆起（精巣・卵巣）への移動期にかけてエピゲノム情報が消去され、未分化性関連遺伝子の発現が活性化される。この未分化様の PGC は生殖巣に定着することで、体細胞の性に依存した性分化を起こすことが報告されている。現在までに、生殖巣において PGC への分化を制御する多数の因子が同定されているが、雌雄始原生殖細胞の特性を全ゲノムレベルでのトランスクリプトーム解析から理解を深める研究は行われていない。本研究では PGC における性分化の分子機構を明らかにすることを目的として、性分化の起点となる E13.5 PGC の RNA-seq による転写産物の網羅的解析を行った。

受精後 13.5 日の *Oct4-GFP* マウス胚の雌雄生殖隆起から細胞懸濁液を作製し、セルソーターを用いて PGC のみを採取した。PGC の RNA を鋳型に逆転写反応を行い、完全長 cDNA を得た。次いで作製した cDNA ライブラリにアダプター配列を付加し、HiSeq2500 シークエンサーを用いて RNA-seq を行った。

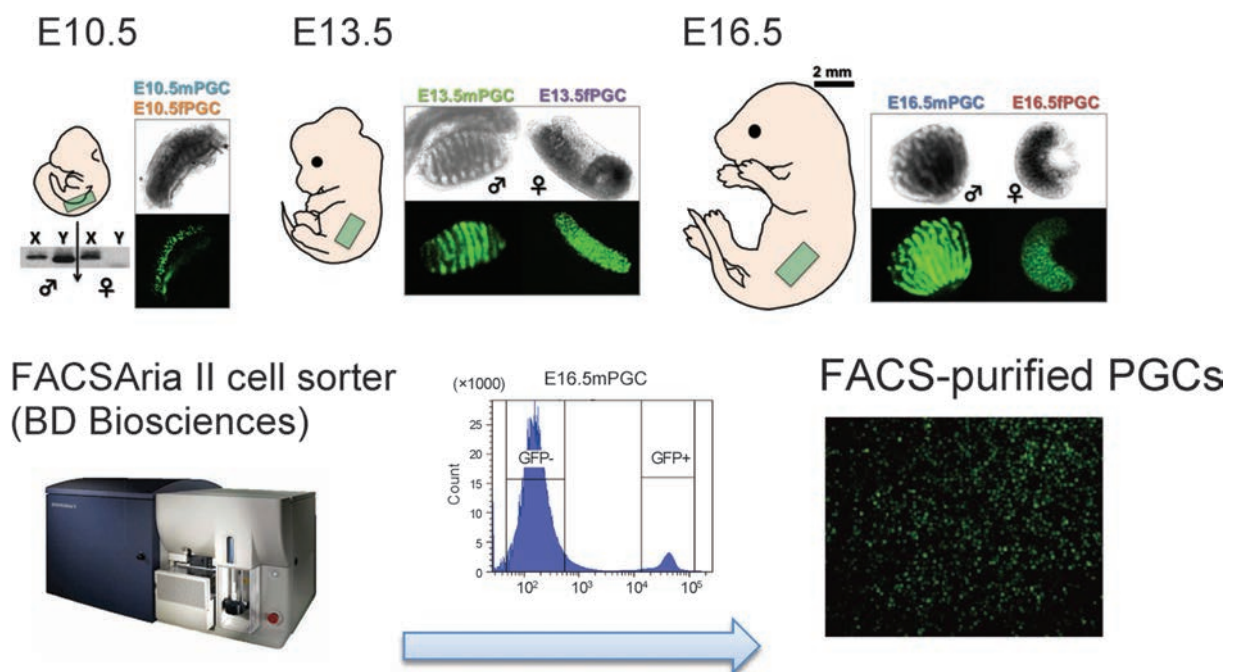


図1 マウス胎齢 13.5 日胎仔 PGC の回収

転写産物の性差に焦点をあて、雌雄間の発現変動遺伝子を抽出した結果、雌雄 PGC に特異的な発現遺伝子を、それぞれ 395 個および 242 個、同定した。この時期の DNA メチル化レベルは低メチル化を示すことが以前の我々の研究によって明らかにされている。したがって、この結果は受精後 13.5 日の胎仔 PGC が、すでに DNA メチル化に非依存的な性特異遺伝子発現機構を獲得していることを示している。さらに、これらの性特異的な発現遺伝子群における生物学的意義を検証するため、Gene network 解析を行った結果、興味深いことに、雌雄それぞれの生殖関連遺伝子群の濃縮と同時に、雌 PGC 特異的な発現遺伝子群では、リンパ球の細胞発達経路およびプログラム細胞死のネットワークが、一方雌 PGC 特異的な発現遺伝子群では、多分化能維持および神経系細胞の細胞発達経路が高い濃縮率をしめていた。この結果は、受精後 13.5 日胎仔 PGC における性分化は、雌雄それぞれの生殖関連遺伝子群の発現誘起だけでなく、PGC の細胞プロセスにも大きな影響を及ぼしていることを示している。本研究で得られた知見は、性特異的な細胞特性獲得機構の解明に貢献することが期待される。

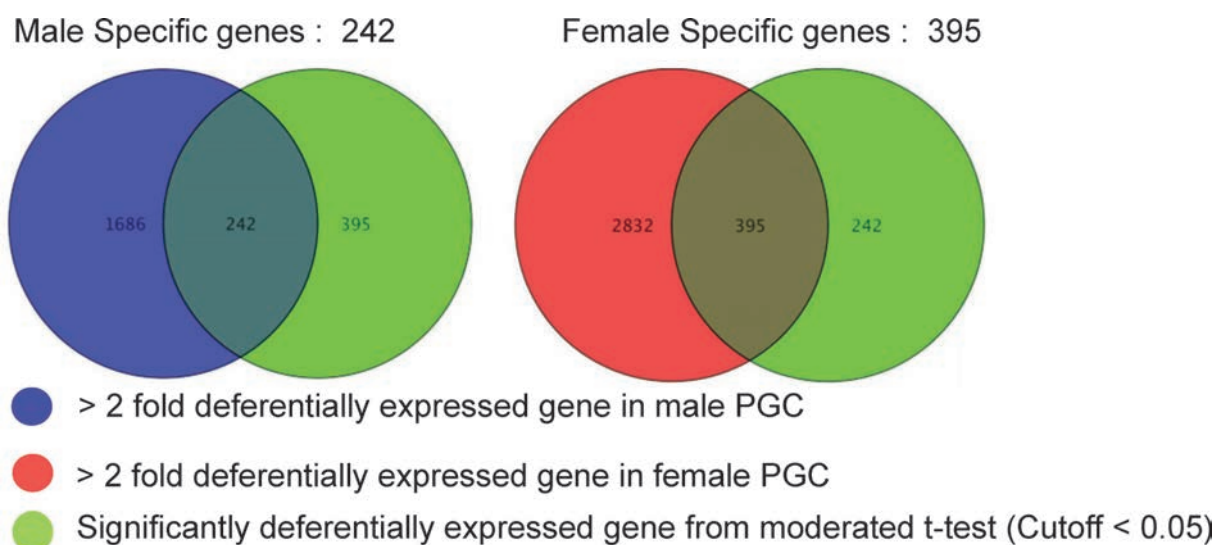


図2 マウス雌雄 PGC 特異的な発現遺伝子の検出

坂下陽彦 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 川畑順子 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 神長裕子 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)
 河野友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

新規小眼球症マウスおよびラットにおける順遺伝学的研究

ヒト小眼球症は 10,000 人に 1 人の割合で発症し、そのほとんどの患者が視力を欠失する極めて重篤な先天性眼球疾患である。これまでに、いくつかの遺伝子の突然変異がその発症原因として同定されているものの、当該疾患にみられる病態の不均一性、発症に関与する複数の遺伝的要因、環境要因、ならびにそれらの相互作用の存在から、多くの症例において発症原因が明らかにされていない。そこで、ヒト小眼球症モデル動物を樹立し、その発症責任遺伝子を同定することは、ヒト小眼球症の発症メカニズムを解明する上で、重要な情報を提供することと考えられる。

我々は小眼球症を発症する KOR1-*miak* マウス (図 1) および NAK/Nokh ラット (図 2) について、主に順遺伝学的手法により発症責任遺伝子の同定を試みてきた。これまでに、我々は KOR1-*miak* マウスの小眼球症の原因は、*Pitx3* 遺伝子のナンセンス変異により引き起こされる PITX3 タンパク質の異常なトランケーションであることを明らかにした (Wada et al. 2014. *Plos One*)。一方、Nodai aphakia (NAK/Nokh) は Sprague-Dawley (SD) 系ラットから自然発症によって単離された無眼球ラットであり、これまでの遺伝学的解析から、NAK と異なる系統との交配家系において片眼性または両眼性の無眼球、あるいは小眼球症など、ヒト小眼球症患者にみられる病態の不均一性を示すことが明らかとなった (図 2)。我々は眼球重量を指標とした連鎖解析により NAK の責任遺伝子の同定を試みた結果、第 16 番染色体にその主要な発症原因遺伝子が存在することを明らかにしたものの、交配する系統によって病態の出現頻度が異なること、および第 16 番染色体上では広大な領域に複数の高い LOD スコアが検出されたことから、NAK に認められる病態の不均一性は複数の遺伝子により引き起こされることと推測された。そこで、NAK と野生型について RNA-seq 解析を行った結果、変異スクリーニングにおいて NAK ラットに 108 個の indel および 225 個の SNP、合計 333 箇所の変異が検出された。また、NAK の責任遺伝子座が存在する第 16 番染色体上の領域では 2 個の SNP および 1 個の欠失変異を検出した。さらに、遺伝子発現解析では 100 種類の遺伝子において有意な発現変動が確認され、そのうち 14 種類の遺伝子では発現量の増加、86 種類の遺伝子では発現

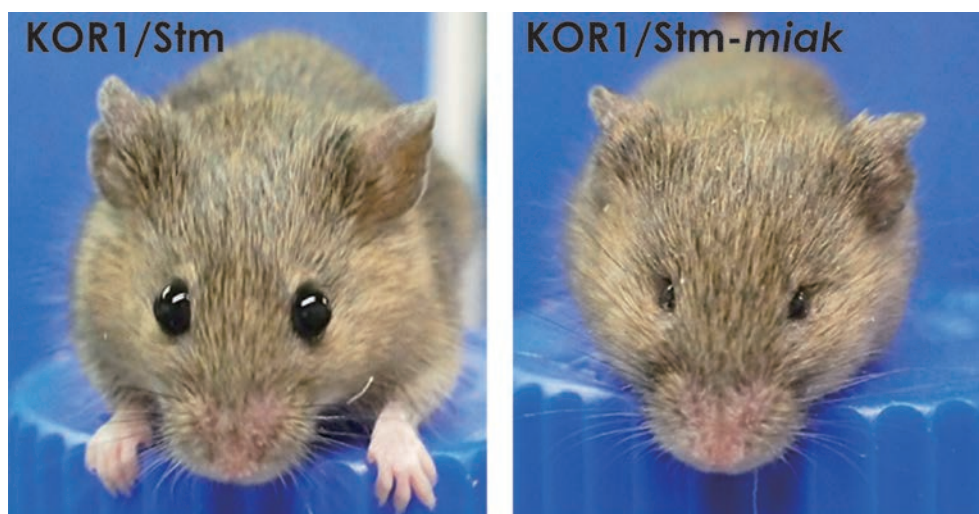


図 1 KOR1 野生型 (左) と KOR1-*miak* (右) マウス
埼玉がんセンター、松島芳文博士から分与

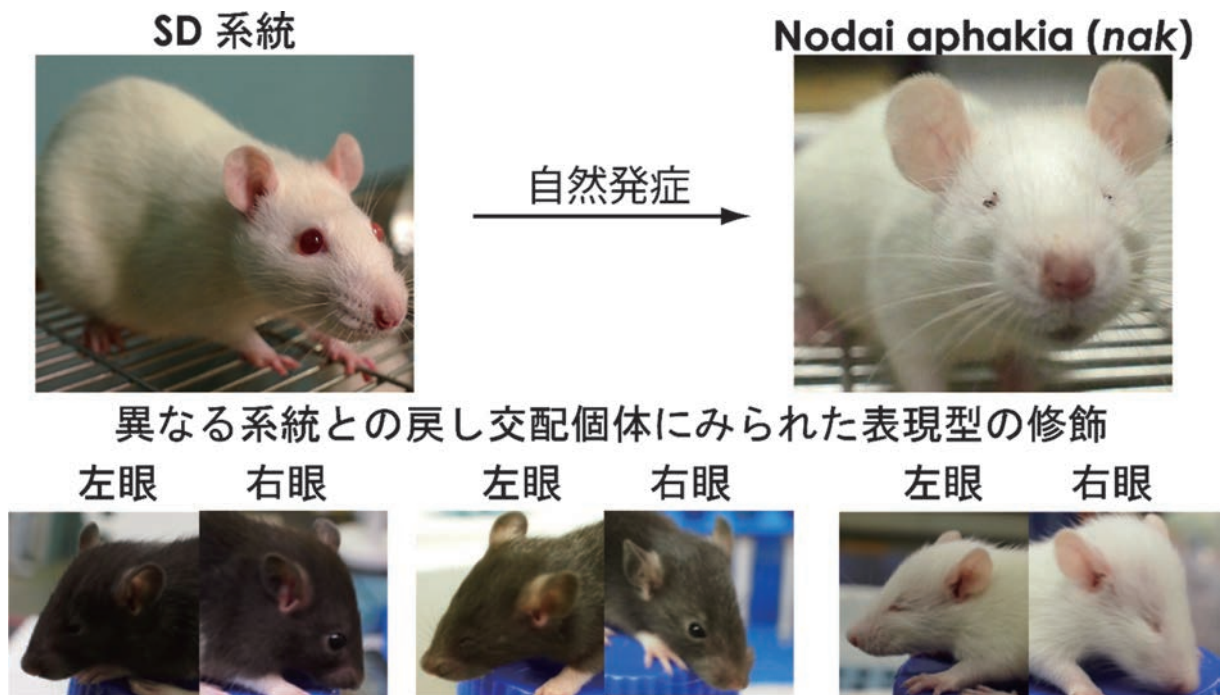


図2 新規小眼球症ラット NAK/Nokh の表現型

量の減少が認められた。また、発現量が減少した遺伝子のうち 25 種類は眼球発生に関与する GO term に分類された。このことから、NAK の無眼球症は眼球発生に必須の遺伝子群における発現量の減少が強く関与することと推測された。さらに、NAK の責任遺伝子座が存在する第 16 番染色体の候補領域では、2 種類の遺伝子について発現量の有意な減少が認められた。現在のところ変異スクリーニングによって検出された 2 種の遺伝子が NAK の小眼球症責任遺伝子であること、また 2 種類の発現変動遺伝子が発症に強く関与すると推測し、その検証を行っている。

和田健太 (生物産業学部 生物生産学科)
 大久保咲 (生物生産学専攻博士前期課程)
 内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)
 橋詰良一 (生物産業学部 生物生産学科)

サイクリン A によるヒト染色体 DNA 複製開始制御機構の解析

真核細胞周期進行の中心制御因子サイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体は、その活性制御異常が細胞の増殖・分化制御の破綻を誘導する要因となることから、がん・発生異常・老化等の疾患に深く関わるものとして極めて重要である。哺乳動物細胞において G1/S 遷移期から M 期中期にかけて発現し、細胞周期の最重要ステップである染色体複製と細胞分裂を制御するサイクリン A (CycA) は、多くのがんにおいて発現量が増大または脱制御されており、細胞増殖の加速や染色体不安定化を介して染色体恒常性の破綻、さらにはがん化の初期過程に関与することが示唆されている。しかし、CycA - CDK の活性亢進による S 期移行促進の分子メカニズムについては未だ不明な点が多く、その解明は細胞周期制御と染色体恒常性維持、発がん機構の基礎的理解において重要な課題である。我々は、哺乳動物細胞において CycA が複製ライセンス化因子 Mcm7 との結合を介して S 期移行を促進することを既に明らかにしていたが、両者が染色体上の複製開始領域において相互作用しているかどうかは不明であった。そこで、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) - Seq 解析により、*in vivo* における染色体複製開始領域での CycA - Mcm7 相互作用解析を行った。

ヒト培養細胞のクロマチン画分より、複製開始領域結合因子 Orc2、Mcm7、CycA 各々に対する抗体およびコントロール抗体 (IgG) を用いた ChIP を行い、それぞれに含まれる染色体 DNA の配列を次世代シーケンサーにより解読し、染色体上にマップした。その結果、Orc2、CycA、Mcm7 が共通に結合しているヒト染色体領域が複数同定された (一例を図 1A に示す)。また、それらの ChIP サンプルにおいて結合領域 DNA の定量的 PCR を行ったところ、3 因子の結合の有意性が示された。さらに、これらの結合領域は既報のヒト染色体複製開始領域と重複していた。以上より、CycA と Mcm7 が *in vivo* で染色体複製開始領域において相互作用することが初めて明らかとなり、CycA による複製開始複合体制御の分子的基盤が示された (図 1B)。

しかしながら、データ解析ソフトウェアによりコントロールと有意差がある ChIP ピークとして膨大な数の染色体領域が抽出されたものの、データの目視による確認から、それらの 99% 以上は非特異的なピークであることが判明し、微量な ChIP サンプルに対する解析ソフトウェアの能力不足が示唆された。そのため、現在約 20,000 箇所以上と推定されているヒト全ゲノム複製開始領域数に比べて、実際に特異性・有意差の確認出来た領域は非常に少なく、今後サンプルの調製スケールやソフトウェアの改善を含めた再検証が必要である。

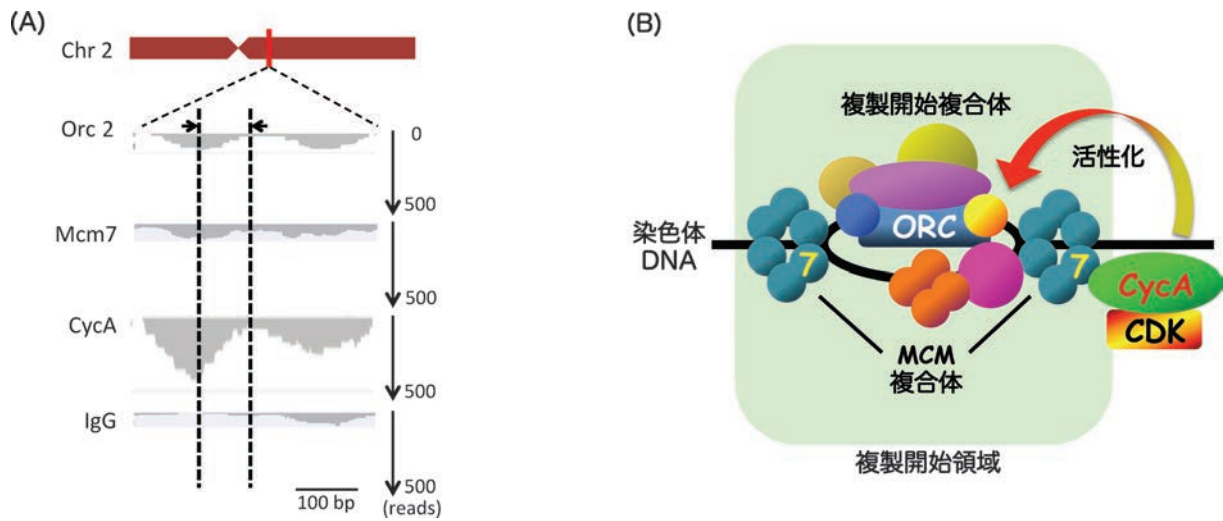


図1 染色体複製開始領域におけるサイクリン A – Mcm7 相互作用

(A) 抗 Orc2、Mcm7、CycA 抗体による ChIP-Seq 解析例。ヒト第 2 染色体上赤線で示した領域にマップされたシーケンスリードのピークを下に示す（縦矢印は 500 リードに相当）。点線領域において Orc2、Mcm7、CycA が染色体 DNA に有意に共結合していることが示された。

(B) サイクリン A – CDK による染色体 DNA 複製開始制御モデル。サイクリン A が Mcm7（MCM 複合体サブユニット）を介して染色体複製開始領域に結合し、複製開始複合体を活性化すると考えられる。

千葉櫻拓（応用生物科学部 バイオサイエンス学科）

ニワトリの就巢行動誘発制御遺伝子の特定

これまでに就巢性形質が完全に排除された白色レグホンと就巢性形質を保持する岐阜地鶏と烏骨鶏の3実験群のシーケンスを解析した。どの群も各個体 20Gb 以上、ゲノムサイズの 15 倍以上のシーケンスデータが得られた (Table 1)。これらのシーケンスデータは、現在公開されているニワトリ (セキショクヤケイ) のゲノムデータベースに白色レグホンの配列をマッピングし、リファレンス更新を繰り返して白色レグホンのゲノム配列を作成した (Fig. 1)。この白色レグホンのゲノム配列に岐阜地鶏と烏骨鶏の配列をマッピングし白色レグホンに対する変異 (SNP, indel) を同定した。その詳細は、岐阜地鶏、烏骨鶏それぞれの品種内で共通の変異が 200 万以上あり、そのうち 2 品種に共通する変異が 100 万ほど存在した。共通する変異のうち、遺伝子領域にあるものが 164,511 あり、さらにアミノ酸を置換するような (非同義置換) 変異が 772 存在した (Fig. 2)。

この非同義置換に注目し、他のゲノム情報が公開されている鳥類のゲノム配列と比較して、この変異が保存されているかどうか調べたところ、61 の変異が 5 種の鳥類 (セキショクヤケイ、シチメンチョウ、ゼブラフィンチ、シロエリヒタキ、アヒル) で共通し、57 の遺伝子に位置していた。(Fig. 3)。

今後、就巢行動発現中の個体と発現していない個体の脳全体のトランスクリプトーム解析や就巢性を保持する品種と保持しない品種との交配試験により更なる就巢行動誘発制御候補遺伝子の絞り込みを諮る。また本学で保有する岐阜地鶏について、それら候補遺伝子の SNP アレイによるスクリーニングを実施し、候補遺伝子の有無と就巢行動発現とが一致する確認する予定である。

Table 1 シーケンス概要

Strain	Sample	Gb
白色レグホン	WL1	41.8
	WL2	37.8
	WL3	41.8
烏骨鶏	Silkie1	31.0
	Silkie2	45.1
	Silkie3	46.8
岐阜地鶏	28	22.6
	29	22.8

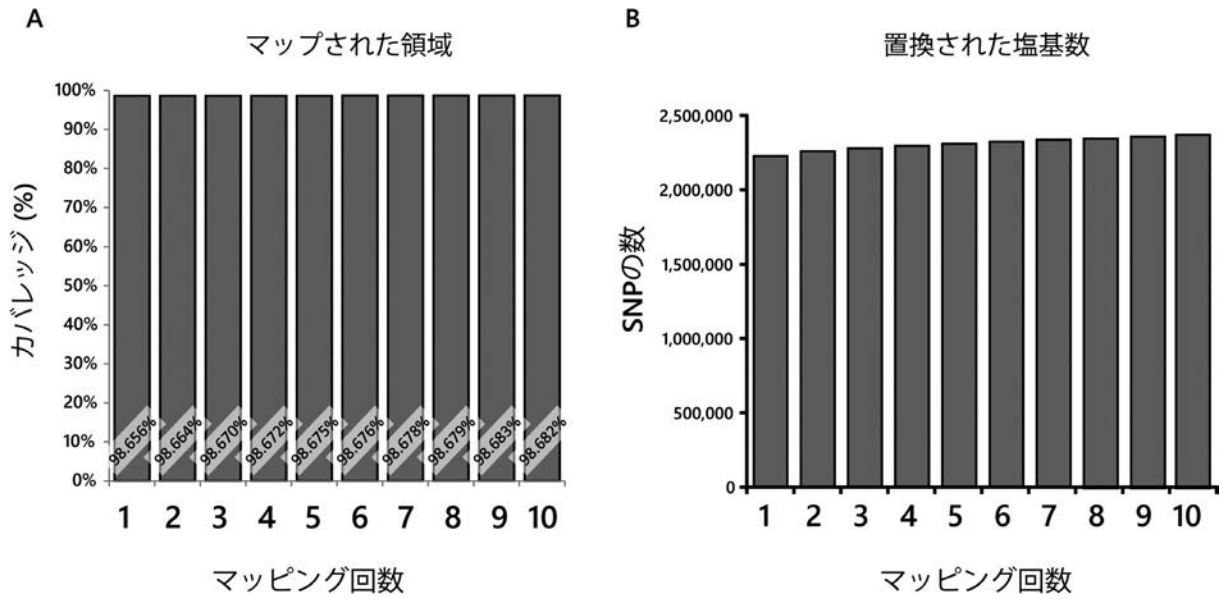
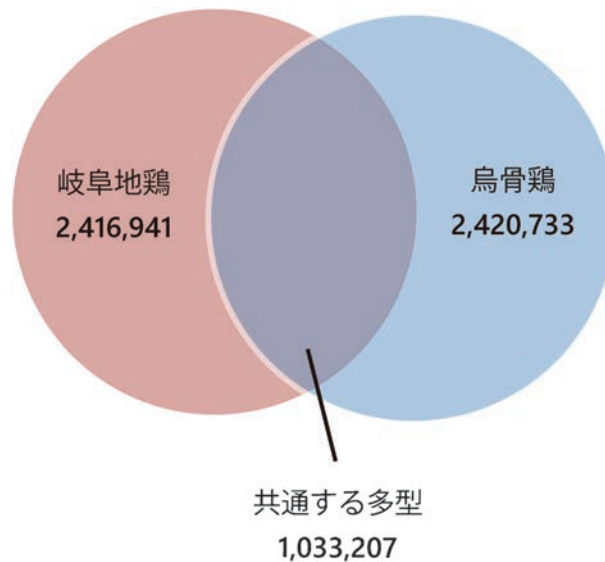


Fig. 1 セキショクヤケイのゲノム情報を基にした白色レグホンのゲノム配列のマップング



領域	多型
遺伝子間領域	814,264
遺伝子上流(5kb)	27,691
遺伝子下流(5kb)	26,741
遺伝子領域	164,511
イントロン	157,671
エキソン (同義置換)	2,584
エキソン (非同義置換)	772
5'非翻訳領域	406
3'非翻訳領域	3,078
計	1,033,207

Fig. 2 白色レグホンに対する岐阜地鶏と烏骨鶏の変異 (SNP, indel)

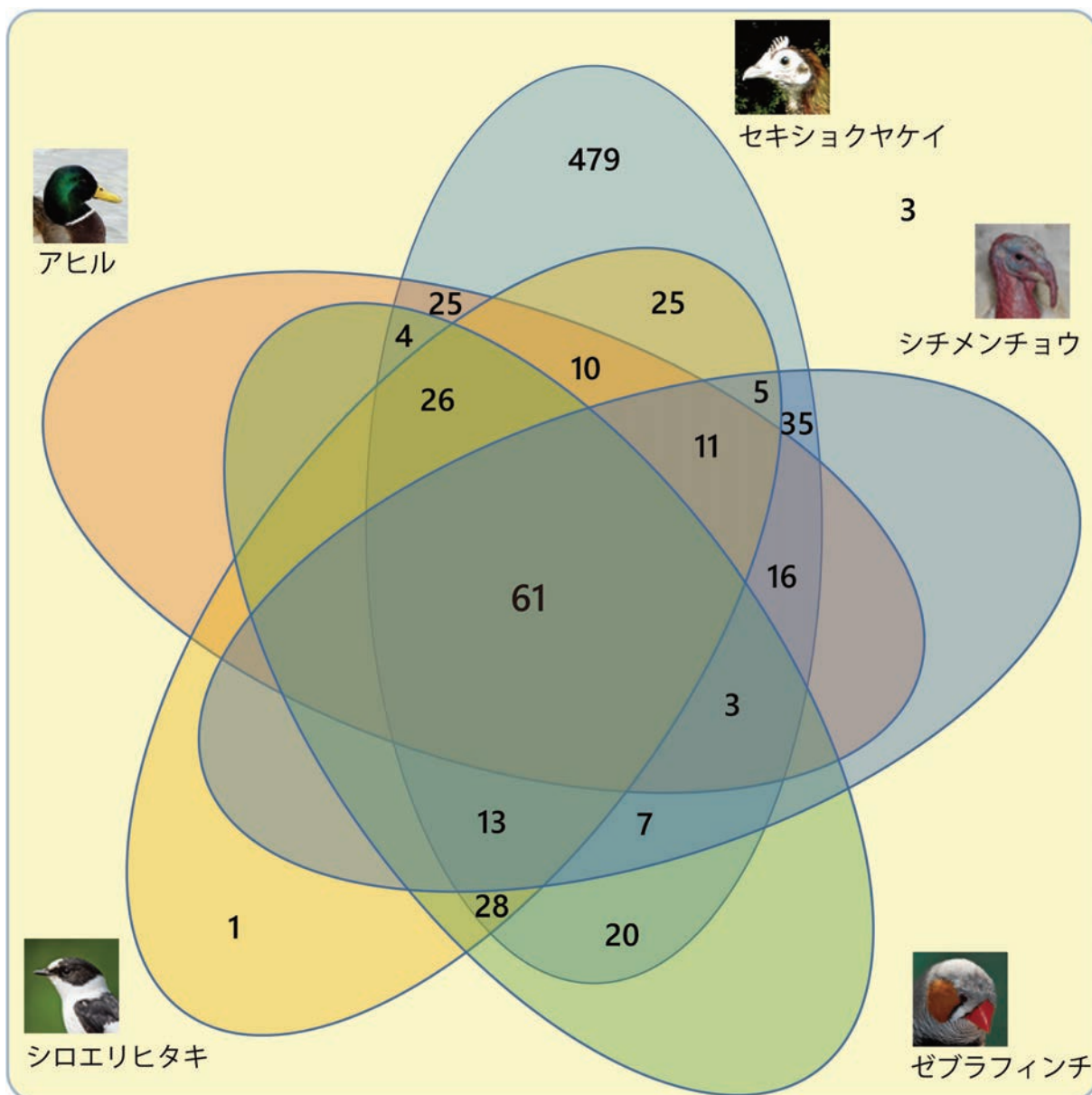


Fig. 3 ゲノム情報が公開されている鳥類との非同義置換 SNP の比較

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)
 神作宜男 (麻布大学)
 河野友宏 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
 桑山岳人 (農学部 畜産学科)

老化が牛卵子に及ぼす影響とその制御方法に関する研究

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

これまで発育が完了した卵子や胚を対象に、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、若齢と老齢間では、ミトコンドリアの電子伝達系や酸化的リン酸化に差があることが明らかにしている。そこで本年度は、発育が完了した卵子のミトコンドリアの品質機構について検討し、卵子の内部では活発にミトコンドリアの除去と合成が行っていることを明らかにした [1]。さらにミトコンドリアの品質管理機構を亢進する為レスベラトロールで卵子を処理すると卵子の内部でのミトコンドリアの合成が増えることや卵子の発生能力が改善することを明らかにした [2]。

一方で、加齢に伴う卵子の能力低下は発育が完了した卵胞卵子でのみ示されており、初期胞状卵胞では報告がない。そこでまず初期胞状卵胞卵子を体外で培養し、加齢に伴う卵子質低下が未発育な卵胞卵子ですでに観察されるのかどうかを検討した。加齢個体に由来する初期胞状卵胞卵子は、発育が完了した胞状卵胞と同様に、発生能力が低く、加齢の影響は初期胞状卵胞において既に観察されることが明らかになった。また次世代シーケンサーを用いた加齢個体の顆粒層細胞の遺伝子発現は退行卵胞様になっていること明らかになった [3]。

卵子のミトコンドリア数は初期胞状卵胞から急速に増加する、そこで、加齢個体から採取した初期胞状卵胞をレスベラトロールで処理したところ、卵子に内包されるミトコンドリアの数が増加し、さらにミトコンドリアの機能や卵子の発生能力も改善することが明らかとなった。さらにレスベラトロール処理は顆粒層細胞の質を改善することが次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析で明らかとなった [4]。

本年度の実験より、加齢個体の卵子の質低下は初期胞状卵胞から観察されること、また初期胞状卵胞卵子のミトコンドリアの質的、量的な低下は品質管理機構を亢進させることで改善させることが明らかとなった。

・学会発表 論文発表リスト

1. 第107回日本繁殖生物学学会 2014.8
卵子中の障害を受けたミトコンドリアは作り変えられる
谷津恵、白砂孔明 桑山岳人 岩田尚孝
2. Sato D, Itami N, Tasaki H, Takeo S, Kuwayama T, Iwata H. Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. PLoS One. 2014 18:e94488.
3. Itami N, Kawahara-Miki R, Kawana H, Endo M, Kuwayama T, Iwata H.
Age-associated changes in bovine oocytes and granulosa cell complexes collected from early antral follicles. J Assist Reprod Genet. 2014 31: 1079-88.
4. 日本繁殖生物学学会大会 2014.8
レスベラトロールが加齢ウシ初期胞状卵胞卵子に及ぼす影響
川名宏典 白砂孔明 桑山岳人 岩田尚孝

岩田尚孝（農学部 畜産学科）

ニホンウズラの免疫関連遺伝子の研究

●ニホンウズラの抗菌ペプチド多様性に関する研究●

抗菌ペプチドは、自然免疫において微生物の細胞膜を破壊するペプチドであり、COLLECTION OF ANTI-MICROBIAL PEPTIDES (CAMP) には様々な動植物由来のものが 5000 種以上登録されています。抗菌ペプチドは、ディフェンシン (defensin) が植物から動物まで広く多細胞生物に存在する一方、K リシン (NK-lysin, NKL)、カテリシジン (Cathelicidin, CATH) および Liver expressed antimicrobial peptide2 (LEAP2) は脊椎動物のみに存在するように、種・組織特異性の差異、また立体構造や電荷の多様性まで、極めて多様です。一方、様々な生物で抗菌ペプチドの遺伝的多様性と抗菌活性・抗病性との関係が示唆されています。

本研究で用いるニホンウズラは、我が国で唯一家畜化された動物種です。ニワトリと比較し、小型、飼料摂取量が少ない、代謝率、成長ならびに性成熟が早く、産卵能力が高く、孵化日数が短く、強健、光刺激、環境変化の感受性が高く、抗病性が高いことが知られています。そのためニホンウズラは家禽の改良に資する有用遺伝子の宝庫であることが期待されています。そこで本研究は、ニホンウズラの主要な抗菌ペプチド群の分子免疫学的特性とその多様性を明確にし、家禽の抗病性向上の一助となすことを目的としました。

研究方法として、本学農学部畜産学科家畜生理学研究室で維持されている 99 個体のウズラを対象に各種抗菌ペプチドのゲノムおよび cDNA 塩基配列を sanger 法および次世代シーケンサーを用いた amplicon sequence で決定しました。Amplicon sequence は、全ゲノムシーケンスとは異なり、目的の領域だけをシーケンスする方法です。我々は、Family 遺伝子である defensin と CATH は amplicon sequence、単一遺伝子である NKL と LEAP2 は sanger 法を用いて多様性解析を試みています。

その 1 つの成果として、NKL の抗菌活性領域に 1 個の非同義置換を発見しました。そこで、両者のペプチドを合成し、大腸菌に対する抗菌活性の差を調べました。結果として、両者の間には、大腸菌に対する抗菌活性に差があることが示唆されました (図)。また、この領域はニワトリでも非同義置換により抗菌活性に差があることが報告されています。そこで、ニワトリとニホンウズラで比較したところ、ニホンウズラ B 型が、4 種の中で最も高い抗菌活性を示しました (図)。このデータについては、論文投稿準備中です。

このように、抗菌ペプチドの多様性を解析することは、家禽免疫の究明と抗病性の高い家禽作出へ貢献することが期待されます。

本研究は学内公募により農学部畜産学科半澤恵先生との共同研究として実施されました。

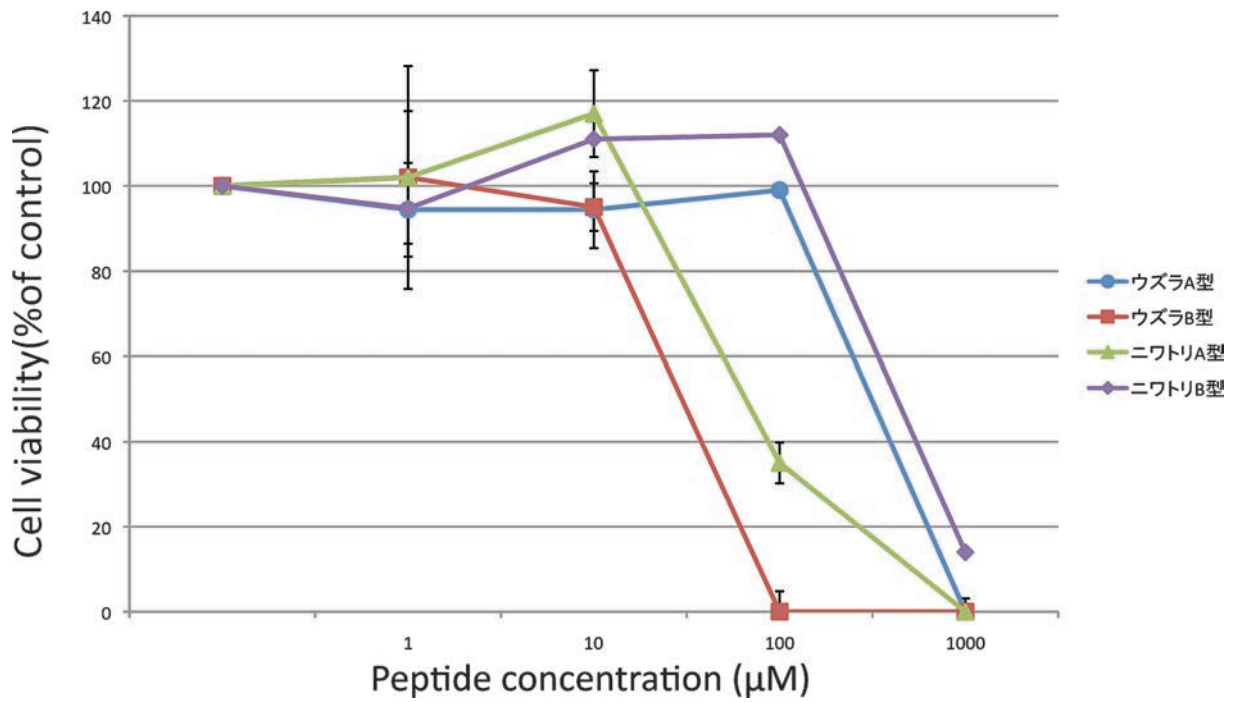


図 ニホンウズラおよびニワトリ NKL の K-12 株 (*E. coli*) に対する抗菌活性

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

原ひろみ (農学部 畜産学科)

平野 貴 (農学部 畜産学科)

半澤 恵 (農学部 畜産学科)

●ニホンウズラ熱ショックタンパク質 HSP90AA1 の 熱ショック応答性とスプライシングバリエーションの解析●

熱ショックタンパク質 (Heat shock protein, HSP) は、そのタンパク質を熱変性から保護することにより、暑熱環境下において生理的恒常性を維持する。したがって熱帯地域や亜熱帯・温帯地域の夏期における家畜家禽の耐暑性を向上させ、暑熱による生産性の低下を改善しうる可能性がある。一般に高能力の産業動物は、比較的冷涼な欧米で改良された品種、系統が多く、地球温暖化に伴う、夏の酷暑化は生産性を低下させる主要因の1つである。特に、ブロイラーは、短期間に大量の飼料を摂取し、40日余りの期間に体重を60倍に増加させうる能力を有する。飼料の消化吸収は熱産生を伴うため、耐暑性の付与は重要な課題である。

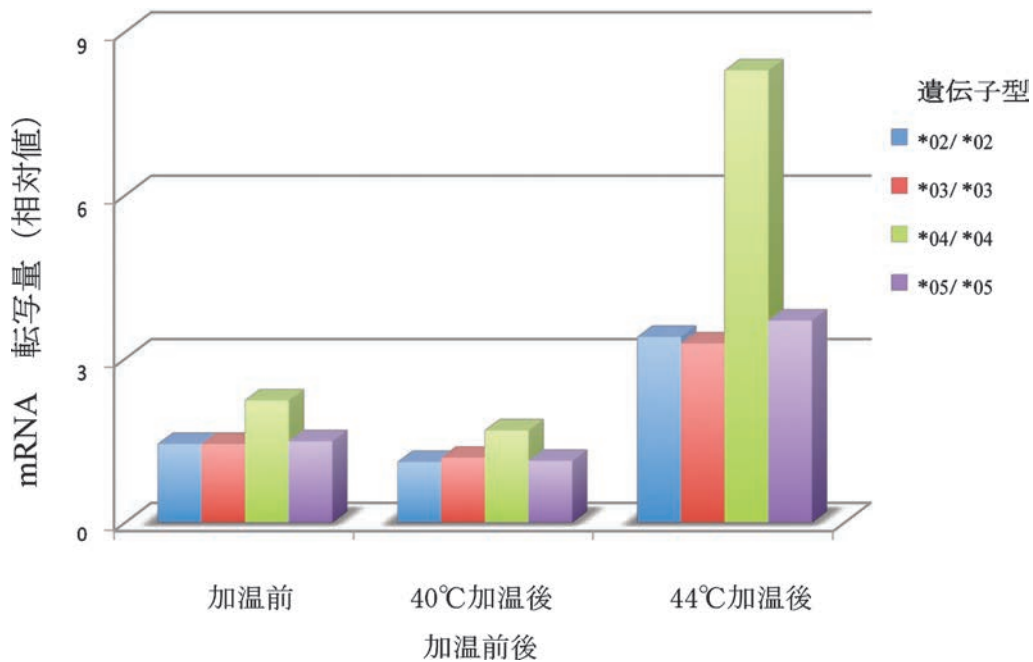
我々はこれまでに、ニワトリの実験動物でもあるニホンウズラの主要な熱ショックタンパク質群、HSP70ファミリーおよびHSP90ファミリーについて、cDNAの同定、遺伝子構造の解析、ならびに*in vitro*での熱ショック応答性の確認を実施した。その中でRT-PCR法により、ニホンウズラCjHSP90AA1が高い熱ショック応答性を有し、またその応答性に対立遺伝子間差があること、ならびに極めて多様なスプライシングバリエーションを有し、しかも熱ショックによりそれらのバリエーションに変化が生じることを示唆した。そこで、本研究では、RT-PCRよりmRNAの定量精度が高いとされるqRT-PCRにより熱ショック応答性の対立遺伝子間差を明確にすると共に、RNA-Seqを用いて、熱ショック応答とスプライシングバリエーションとの関係を、対立遺伝子間で比較し、バリエーションと熱ショック応答との関係を明確にすることを目的とした。

あらかじめ本研究室が所有する5系統、329個体のCjHSP90AA1の遺伝子型をPCR産物のシーケンシングにより、5'UTRに認められる24箇所のSNPsと32箇所のIndelに基づきタイピングし、CjHSP90AA1*02/*02、*03/*03、*04/*04および*05/*05の各ホモ接合体個体を10頭、計40頭、選抜した。ついで、これら個体の末梢血由来単核白血球(おもにリンパ球)を三等分し、このうち一部はただちにRNAを抽出し、cDNAを合成した(対照:Cont)。残りは40°Cあるいは44°Cにて30分間温湯中で加温した後、RNAを抽出し、cDNAを合成した(40°Cおよび44°C処理)。ついでqRT-PCR法によりmRNA量を測定し、加温処理に伴うCjHSPAA1のmRNA転写量の遺伝子型間差を確認した。CjHSP90AA1*04/*04個体のCont、40°Cおよび44°C処理時のmRNA転写量は、他の3つの遺伝子型個体のそれらより、それぞれ有意に高値を示し、これらの遺伝子型間の差異に供試個体の体温および週齢は影響しないことを確認した。mRNA発現量の対立遺伝子型間差異をもたらすシスエレメントを検索中である。

スプライシングバリエーションは、CjHSP90AA1のほぼ全長をカバーする5'末端と3'末端に設計したプライマーを用いたRT-PCR法で検出された。従って、プライマーを設計した位置を含まないバリエーション(cDNA)検出されていない。そこで、CjHSP90AA1の遺伝子型を決定し、それぞれホモ接合体の個体を供試し、それらの末梢血由来単核白血球を44°C(体温の+3~4°C)で30分間加温し、加温前後の血球から抽出したmRNAをテンプレートとする(4型×熱ショック前後=8検体)。テンプレートmRNAを二分し、一方をqRT-PCRに、他方をRNA-Seqに供試した。

RNA-Seqによる解析データからHSP90AA1の転写部位と熱ショック前後の転写量の差異を、対立遺伝子間で比較する。qRT-PCRによる転写量の対立遺伝子間差異との関係を検証する。

さらに、*De novo*シーケンスおよびトランスクリプトーム解析にてHSP90AA1以外の熱ショック応答性遺伝子群を網羅的に抽出する。またこのデータは、免疫応答性関連遺伝子群の発現、ならびにこれらのうち炎症による発熱に伴って転写が誘導される遺伝子の検出に活用する。



原ひろみ (農学部 畜産学科)

平野 貴 (農学部 畜産学科)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

半澤 恵 (農学部 畜産学科)

●ニホンウズラ主要組織適合性複合体 *Mhc Coja* クラス IIB 遺伝子群の構造解析●

哺乳類および鳥類の主要組織適合性複合体 Major histocompatibility complex (*Mhc*) 領域には、獲得免疫においてリンパ球への抗原提示を担う *Mhc* クラス I およびクラス II 遺伝子をはじめ、免疫応答に関わる遺伝子群が極めて高い遺伝子密度で存在する。ニワトリでは *Mhc B* ハプロタイプとマレック病、ラウス肉腫、ニワトリ白血病および鳥インフルエンザなど各種ウイルス性疾患に対する抵抗性との関係が報告され、*Mhc B* ハプロタイプを活用した抗病性改善が期待される。しかるに *Mhc B* 領域内の各遺伝子は強い連鎖関係にある為、*Mhc B* 領域内の上流に位置する *BG1* 対立遺伝子がマレック病感受性に関与することが明らかになったことをのぞき、疾患感受性に関与する遺伝子座 (責任遺伝子) の同定には至っていない。

これに対し、申請者らはニワトリと同じキジ科に属し、ニワトリとの間にキメラや属間雑種が作成可能であり、またニワトリでは感染すると発症し死に至る鳥インフルエンザなどの疾病に対して不顕性感染を示すニホンウズラに着目している。すなわち、ニワトリとニホンウズラ両種間の疾患感受性に差異を及ぼす原因を明確にすることは、家禽の抗病性向上に貢献するものと考えられる。

本研究室では、ニホンウズラの拡張 *Mhc Coja* 領域に 13 マーカー、*TRIM* 亜領域 (60 kb) : *HEP21*、*TRIM39.2*、*BTN1* および *BTN2* ; クラス II 亜領域 : *DCB1-TAPBP-DBB1* ; クラス I 亜領域 (180 kb) : *DMB1*、*DMB2* および *TAP1-TAP2*、ならびに *CD1* 亜領域 : *CD1.1* および *CD1.2*

(40 kb) (Hosomichi *et al.* 2006、Suzuki *et al.* 2013、Yokohama *et al.* 2012) を構築した。11 系統、321 個体のニホンウズラを対象にこれらマーカーの多様性を検索した。その結果、各マーカーの対立遺伝子はいずれも 8 種類 (DMB1 のみ 7 種類) と一定であった。したがって各マーカー (*Mhc Coja* 領域) は、*Mhc B* 領域と同様、ハプロタイプ (HT) ブロックを形成して共進化してきたものとも考えられる。しかるに HT 解析の結果、数%と低頻度ながら HT ブロックとは相反する対立遺伝子の組み合わせが確認された。特に、クラス II 亜領域は、その上流の *TRIM* 亜領域、ならびに下流のクラス I 亜領域との間で比較的高頻度の組換えを起こしている可能性が示唆された。このことは *Mhc B* 領域においてクラス II 亜領域と I 亜領域との間の強固な連鎖が、両亜領域の遺伝子の機能を個別に解析する障害になっていることに反し、*Mhc Coja* 領域では、クラス I 亜領域と II 亜領域の遺伝子の機能を分けて解析しうる可能性を示唆している。

一方、*Mhc B* 領域が最小不可欠 MHC と呼称されるコンパクトな遺伝子構成を有することは対照的に、*Mhc Coja* 領域の *Mhc* クラス I α (*Coja I*) および II β (*Coja IIB*) 遺伝子が冗長な重複を示し、さらに HT 間に遺伝子座数の差異、即ち Copy number variation (CNV) が存在することが示唆されている。そこで、現在の課題は、各 HT の遺伝子構造や各遺伝子座の機能性を明確にすることである (Hosomichi *et al.* 2006, Shiina *et al.* 2004)。しかし、重複遺伝子間の塩基配列の高い類似性のため、サンガー法 (キャピラリー電気泳動法) に基づくシーケンサーにより、遺伝子構造や mRNA 転写量を解析することが困難である。これに対し、*Coja IIB* 遺伝子群に共通なプライマー (ユニバーサルプライマー) を設計し、少なくともこれまでに確認されているすべての対立遺伝子および遺伝子座を PCR 増幅し、これをクローニングした後、シーケンシングすること (PCR, Cloning, & Sequencing: PCS) により、5 つの HT の *Coja IIB* 遺伝子構成の一部と遺伝子座による転写量の多寡、主働遺伝子と微働遺伝子の存在と、主働遺伝子の CNV を確認した (Hosomichi *et al.* 2006)。この際、各試料あたり 100 シーケンスを目標にデータを集積したが、遺伝子間の転写量の差をより正確に把握する為には、数 1000 シーケンスのデータを解析する必要がある。そこで、本研究では cDNA を鋳型とした PCR 産物を次世代シーケンサーで解析し、各 HT の遺伝子構成と転写量の多寡を明確にし、*Coja IIB* 遺伝子群の基本的な特徴を明確にすることを目的とした。

次世代シーケンサーでの解析に先立ち、供試個体を選択するために *MhcCoja* HT を精査した。まず、本研究室が保有する 6 系統、321 個体を対象にクラス II 亜領域に座位する主働 *Coja IIB* 遺伝子のひとつである *DBB1* の遺伝子型を Sequence Based Typing (SBT) により決定し、*DBB1**01、*03、*04、*05 あるいは *06 のいずれかの対立遺伝子をヘテロあるいはホモで有する 30 個体を選抜した。ついでこれらの個体を対象に、*DBB1* の上流に隣接する *TAPBP* のエキソンの Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) の SBT 解析およびイントロンの variable number of tandem repeat (VNTR) のアガロースゲル泳動解析を実施すると共に、クラス II 亜領域の上流、*TRIM* 亜領域 4 遺伝子：*HEP21*、*TRIM39.2*、*BTN1* および *BTN2*、および下流、クラス I 亜領域 3 遺伝子：*DMB1*、*DMB2* および *TAP2* の遺伝子型を SBT により決定した。

今後、*Coja IIB* 遺伝子の塩基配列の中で抗原認識に関わる超可変領域を含み、極めて多型性に富む exon2 を共通に増幅するユニバーサルプライマーにより、末梢リンパ球由来 cDNA を RT-PCR 増幅し、増幅産物 (約 410-bp) の塩基配列を決定するために MiSeq (600 cycle) にて 1 個体につき 10 万リードを目安に解析する。得られた Read1 と Read2 をマージし、各 HT における *Coja IIB* 遺伝子の構成ならびに発現量の差による各遺伝子の機能性：主働遺伝子座および微働遺伝子座を検証する。

ニホンカワウソの系統分類学的位置づけ再検討

ニホンカワウソは 20 世紀初頭まで日本全国に生息していたが、1979 年に高知県の新荘川で目撃されたのを最後に目撃情報は無くなった。そして 2012 年に環境省はニホンカワウソを絶滅種として認定した。ニホンカワウソの分類は Imaizumi and Yoshiyuki (1989) が形態に基づき本州・四国の個体群を独立種 *Lutra nippon* と分類した。さらに愛媛県産ニホンカワウソ 1 個体のミトコンドリア DNA シトクローム b 配列 224 塩基を決定した研究 (Suzuki *et al.*, 1996) でも、近縁種とされているユーラシアカワウソ *Lutra lutra* と比較し、ニホンカワウソはユーラシアカワウソの姉妹群となることから、独立種とする意見を支持した。以上のような研究があるが、環境省は本州四国産のニホンカワウソを *L. l. nippon* として扱い、ユーラシアカワウソの一亜種としている。

筆者らは高知県産、神奈川県産のニホンカワウソ標本から試料を入手し、これを解析に用いた。高知県産は 1977 年に採取されたもので、標本として残っているものとしては最も新しい。一方、神奈川県産は大正 4 年ごろに狩猟されたもので、ほぼ 100 年前の試料である。試料からゲノム DNA を抽出・次世代シーケンサーで解析をした。高知県産、神奈川県産のリードから De Novo assembly によってそれぞれ 16,319bp (103X)、16,316bp (584X) の配列を得た (タンデムリピートは除く)。また、ユーラシアカワウソをリファレンスとしてマッピングしたところ、それぞれ 16,539bp と 16,536bp のコンセンサス配列を得た。De Novo assembly とマッピングで得られた配列を比較したところ tRNA、rRNA、タンパクコード領域は 100% 一致した。そこで、これらの領域を用いて最尤法による系統解析と分岐年代推定をおこなった。

最尤系統解析の結果、図 1 に示した系統樹が得られた。神奈川県産個体はユーラシアカワウソと単系統群を作り、中国産ユーラシアカワウソと最も近い関係にあったが韓国やサハリンのユーラシアカワウソとは姉妹群となり、比較的遠縁だった。神奈川県産個体に対して、高知県産個体はユーラシアカワウソと神奈川県産個体を作る単系統群と姉妹群となった。

最尤系統解析で得られた系統樹をもとにベイズ法を用いて分岐年代を推定したところ、高知県産個体の祖先は 166 万年前に現生ユーラシアカワウソの祖先と分岐したことが推定された。神奈川県産



神奈川県産ニホンカワウソ
(横須賀市自然・人文博物館所蔵)

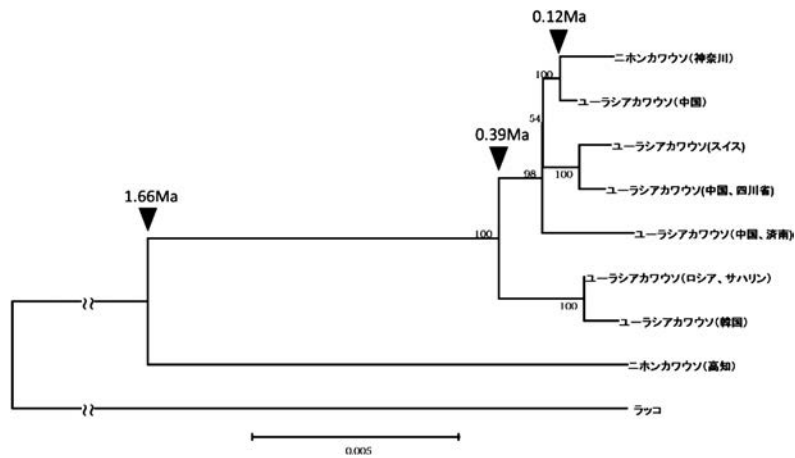


図1 ニホンカワウソとユーラシアカワウソの系統類縁関係と分岐年代

個体の祖先は約12万年前に中国のユーラシアカワウソと分岐したことが推定された。これらの結果から神奈川県産のニホンカワウソはユーラシアカワウソであることが強く支持された。そして高知県産のニホンカワウソは現生のユーラシアカワウソとは別の系統であり、ユーラシアカワウソとの遺伝的差異も3%を越えているため別種と考えられる。

今後は日本全国から試料を収集し解析個体数を増やすことで、ニホンカワウソ集団がどのような遺伝的多様性を有していたのかを解明し、その系統進化を明らかにする。

- 米澤 隆弘 (中国 復旦大学)
- 瀬川 高弘 (国立極地研究所)
- 甲能 直樹 (国立科学博物館)
- 佐々木 浩 (筑紫女学園大学)
- 石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)
- 村井 仁 (富山市ファミリーパーク)
- 植田 美弥 (横浜市立よこはま動物園)
- 佐々木 剛 (農学部 バイオセラピー学科)

食酢醸造に用いられる酢酸菌二属のトランスクリプトーム解析

食酢は酢酸菌の行なう酢酸発酵により製造される。酢酸発酵とは、細胞膜上に存在する脱水素酵素と電子伝達系の連動により、細胞外に存在するエタノールを酢酸へ酸化して ATP を生成するという、酢酸菌独特のエネルギー代謝活動のことである。この特徴的な生理により、酢酸菌は生育中、常にエタノール・アセトアルデヒド・酢酸のようなストレス因子に晒され、また活発な電子伝達系の活動による活性酸素種にも晒されていることが推測される。発酵熱による温度上昇も常時観察されており、発酵中の菌体は、生育至適温度から外れた環境下で生育し続けている。即ち酢酸菌は、酢酸発酵中、常に上記のような様々なストレス条件下で生育している訳であり、菌体はそれらに対して耐性を有していることになる。また、酢酸菌は菌体内に通常の基幹代謝経路も有しており、これを介したエネルギー代謝も行なうことができる。このため、状況により酢酸発酵系／基幹代謝系の切り替え或いは併用を行なって菌体は対応しており、これにより自らの発酵により生成した酢酸を菌体内基幹代謝経路で完全酸化するという過酸化現象も示す。

酢酸発酵とは、酢酸菌の持つこれら特殊な生理全体の複合的なバランスの上に成立している現象であり、食酢醸造はこの生理により初めて可能となっている技術である。即ち、食酢醸造技術の改良を目指す場合、従来のように単に細胞膜上の脱水素酵素および電子伝達系の部分のみに着目していても達成が難しく、細胞内に発現する全因子を視野に入れて考える必要がある。これを解決するためには、今日ではトランスクリプトーム解析が第一候補となる。

酢酸菌は、分類上は酢酸菌群を形成し、現在 17 属が報告されているが、このうち食酢醸造に用いられるものは、*Acetobacter* 属と *Komagataeibacter* 属（旧 *Gluconacetobacter* 属）の二属のみである。いずれも、エタノールから酢酸を生成する能力に優れているが、発酵特性には違いがあり、*Acetobacter* 属酢酸菌は伝統的な静置発酵に、*Komagataeibacter* 属酢酸菌は近代的な深部通気発酵に用いられることが多い。本研究では、この二属の酢酸菌の発酵性能の共通点および相違点について解析し、より至適化した発酵条件の設定や発酵技術の開発を目的として、本学生物資源ゲノムセンターを利用した RNA-seq 解析により、酢酸菌の大規模トランスクリプトーム解析を行なっている。菌株としては、静置発酵用酢酸菌として、代表的な二株である *A. pasteurianus* NBRC3283 と *A. aceti* NBRC14818 を、深部通気発酵用酢酸菌として *K. medellinensis* NBRC3288 を解析に供した。現在、これら三株について、培養炭素源および生育段階の異なる菌体の RNA-seq 解析を行い、得られた結果を KEGG orthology system 準拠で整理を行なって、代謝系および非代謝系の両面から発現遺伝子の特徴を解析している。

これにより、酢酸発酵に共通する根本原理全容の洗い出し、および株ごとの発酵特性に寄与する生理の解明が可能となり、酢酸発酵ひいては食酢醸造技術の改良・開発に資する知見が得られると期待している。

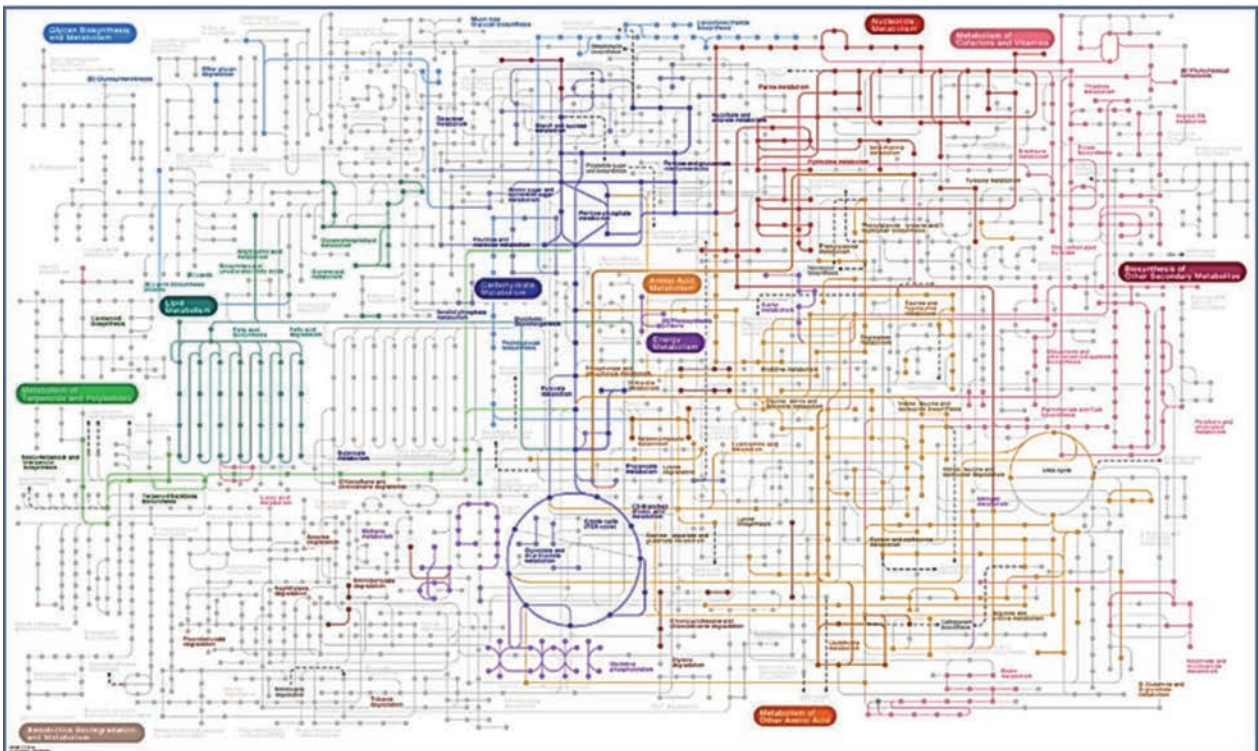


図1 ゲノムからみた *A. pasteurianus* NBRC3283 推定代謝マップ
色付き実線部分が遺伝子保有部分を示す。

- 貝沼章子 (応用生物科学部 醸造科学科)
- 石川森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)
- 小泉幸道 (応用生物科学部 醸造科学科)
- 吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)
- 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

蜂蜜から分離された酵母の耐糖性メカニズムに関する研究

浸透圧の高い食品に生育する酵母が知られている。食塩濃度の高い醤油諸味などからは *Zygosaccharomyces rouxii* や *Candida versatilis* などの耐浸透圧性酵母が分離される。これらは醸造食品の特徴的な香味形成に関与する一方で、塩蔵品や糖蔵品の品質を劣化させる原因ともなる。

当研究室ではカナダ産蜂蜜から分離した *Zygosaccharomyces mellis* が、80%グルコース培地において生育することを確認した。そこで、*Z. mellis* の耐糖性メカニズムを検討するため、1%グルコース培地と50%グルコース培地とで生育させた *Z. mellis* の RNA-Seq を行った。以前我々は、*Saccharomyces cerevisiae* の浸透圧耐性メカニズムとして知られる HOG (high osmolality glycerol response) 経路に関わる遺伝子群の *Z. mellis* における発現変動を解析した。HOG 経路は細胞外の浸透圧の変動をリン酸化・脱リン酸化によりシグナル伝達する経路であるが、HOG 経路に関わる遺伝子群の発現量は、50%グルコース下でも影響されないことがわかった。一方、フルクトース 1,6-ビスフォスファターゼ (FBP) およびホスホグルコノムターゼ (PGM) をコードする遺伝子は発現が down-regulate され、RT-PCR の結果でも再認められたことから、高グルコース下では糖新生の遺伝子発現が抑制されることがわかった。

そこで今回は、*Z. mellis* に特徴的な糖浸透圧応答因子を明らかにすることを目的とし、シークエンス解読された 9672 遺伝子のうち、total gene reads 100 以上かつ sequence reads 400 bp 以上かつ 50%グルコース添加により fold change 2.5 以上となった遺伝子を抽出し、その詳細を調べた。糖により up-regulate された遺伝子で annotation を帰属することができた遺伝子は 32 遺伝子、down-regulate された遺伝子は 9 遺伝子であった。Up-regulate された遺伝子のうち、上位 10 遺伝子の中には、細胞周期に関わるプロテアソーム調節サブユニットや APC/C アクチベータータンパク質、電子伝達系のシトクロム C オキシダーゼ、細胞壁の形成に関連した酵素の遺伝子などが含まれた (表 1)。一般に、浸透圧ストレスによる応答では、Hog 経路が活性化し、糖代謝、グリセロール生合成、イオン恒常性、HSP などストレス応答に関わるタンパク質が合成されることが知られている。今回の解析では、糖の代謝に関わる遺伝子というよりむしろ、細胞周期や細胞壁に関わる遺伝子が up-regulate されたことから、*Z. mellis* は、細胞分裂を抑制し細胞壁の生合成を調節することで細胞の大きさや壁の剛性を変化させて浸透圧に応答することを示唆した。また、以前の解析結果、および ATP 依存型トランスポーターが 32 遺伝子の中に含まれていたことから、解糖系や TCA サイクルなどで生じた ATP を利用してトランスポーターが機能し、浸透圧に応答したのではないかと推測された。

表1 50%グルコース培地において up-regulate された遺伝子

Query	Accession	Fold Change	Description
G50_1494_c0_seq1	XP_002497395	5.2	26S proteasome regulatory subunit
G50_16902_c0_seq1	XP_002496124	4.2	Similar to restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)
G50_15375_c0_seq1	CCW77435	4.0	Cytochrome c oxydase, subunit 1 (mitochondrion)
G50_8215_c0_seq1	XP_002497988	3.9	ARF GAP effector protein 1
G1_6632_c0_seq1	CDF90728	3.8	Prefoldin
G50_5309_c0_seq1	XP_002494545	3.8	Chitin synthase CHS2
G1_5272_c0_seq1	XP_002495143	3.7	Ammonium transporter MeaA
G50_300_c0_seq1	XP_002494436	3.6	Related to SUN4-Protein involved in the aging process; related to glucanases
G50_4411_c0_seq1	XP_002496272	3.6	APC/C activator protein, cell division control protein
G1_13232_c0_seq1	CAQ43237	3.6	Mitosis inhibitor protein kinase SWE1

一方、down-regulate された遺伝子にはタンパク質合成を調節する NRD1、グリシン開裂系 T タンパク質、ヘリカーゼなどが含まれた (表2)。NRD1 やグリシン開裂系 T タンパク質は、*S. cerevisiae* を 20%グルコース培地で生育させた際にも down-regulate されることが知られているが、ガラクトースをグルコースに変換するガラクトース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ遺伝子については、糖浸透圧ストレスによる変動は知られておらず、今回高糖度ストレス下の *Z. mellis* で初めて見出された。今後、これら *Z. mellis* に特異的に発現変動した遺伝子について RT-PCR で確認を行い、より詳細な浸透圧耐性メカニズムの解明に迫りたい。

表2 50%グルコース培地において down-regulate された遺伝子

Query	Accession	Fold Change	Description
G1_1809_c0_seq1	XP_002494598	3.3	Outer mitochondrial carnitine acetyltransferase
G1_2159_c0_seq1	XP_002494524	3.0	Glycine cleavage system T protein
G50_28992_c0_seq1	XP_002497691	2.8	DNA mismatch repair protein MutS
G50_6346_c0_seq1	XP_002494553	2.8	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase
G1_2665_c0_seq1	XP_002495544	2.7	Helicase SEN1
G50_8553_c0_seq1	XP_002494504	2.5	Ureohydrolase
G1_8351_c0_seq1	XP_002498263	2.5	Exodeoxyribonuclease V alpha chain
G1_444_c0_seq1	EWS73078	2.5	ATP-dependent helicase Lhr
G1_2018_c0_seq1	XP_002497899	2.5	NDR1

林 清司 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
 田村倫子 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
 石毛太一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

16s rRNA 遺伝子を標的としたニホンウズラ腸内細菌叢の解析

～腸内細菌叢～

腸内細菌は、腸内に生息する細菌の集団のことで、糞便 1g 当たり 10^{11} 個の菌数で、ヒト消化管全体で 10^{14} 個の菌が生息しています。腸内細菌と健康との関係は広く認識されるようになり、直接的に病原細菌の増殖制限因子になると共に、自然免疫系を刺激して腸内免疫を活性化します。そのため、腸内細菌叢は、抗病性に重要な影響を持つと考えられます。これまで、腸内細菌叢の把握は、光岡法などの培養法が用いられるのが一般的でした。しかし、腸内細菌叢を構成する細菌の中には真性嫌気性菌のように難培養性の細菌が存在し、しかも腸内細菌叢を構成する細菌の種類は極めて多いため、培養法によって細菌叢の全容を把握することは困難でした。ところが、次世代シーケンサーの登場により腸内細菌叢のゲノム DNA を解析することが可能となり、謎であった腸内細菌叢の全容を把握することが可能となりました。その後、腸内細菌叢が積極的に病態に影響することが示されています。更に、ある種の疾患では特定の菌が関与する可能性も示されています。

～鳥類の腸内細菌叢～

鳥類は、他の脊椎動物と同様に糞便 1g 当たり 10^{11} 個の菌数が存在します。ニワトリをはじめとする 8 種で次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢が解明され、興味深いことに、鳥類の腸内細菌叢は、門レベルでは乳類と似た構成を示し、同様に腸の部位、餌、飼育状態によって変化することが解明されてきました。しかし、腸内細菌叢と免疫の関連性は解明されていません。

ニホンウズラはニワトリでは死に至る疾病に不顕性感染を示すなど、極めて興味深い特徴を有します。そのためニホンウズラの腸内細菌叢は、ニワトリとは異なる可能性が考えられ、両者の腸内細菌叢を比較することにより、腸内細菌叢と抗病性との関連性を解明できる可能性があります。

～ニホンウズラ腸内細菌叢の解析～

本年度は、DNA 抽出法、プライマー選択および解析の条件検討を行いました。

DNA 抽出法では、他の生物種と同様に酵素法での抽出が、DNA の収量を高め、多様な菌叢を捉えられることが分かりました。プライマーについても他生物種と同様 V1-2 領域を増幅することにより、多様な菌叢を捉えられることが判明しました。

今後は、100 検体を目途にニホンウズラ盲腸糞由来腸内細菌叢を解析し、系統、週齢および免疫遺伝子の allele および haplotype などにより腸内細菌叢の構成および個々の菌の出現率に差があるかを調べていく予定です。更に、腸内細菌叢と免疫との関係だけでなく、腸内細菌叢を利用した疾病予防への応用研究も期待されます。

本研究課題は、学内公募により農学部畜産学科半澤恵先生との共同研究として実施されています。



野生羽色

panda 羽色

dark 羽色

図 腸内細菌叢解析に用いたニホンウズラ

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)
原ひろみ (農学部 畜産学科)
平野 貴 (農学部 畜産学科)
半澤 恵 (農学部 畜産学科)

マサバへしこ「米ぬか」中のアミラーゼ生産菌のゲノム解析

福井県の伝統食品に「へしこ」という塩漬けしたマサバを米ぬかに1年間漬け込んで、発酵熟成させて食す水産発酵食品があり、保存食として重宝されています。また、マサバの他にもイワシ、ニシン、イカ、フグなどを材料にして、各地方の郷土料理として伝えられています。「へしこ」は、米ぬかを落とさずにかるく煮る、または生のまま刺身として食べられています。米ぬかは「ぬか床」としての役割が大きく、発酵後の米ぬかは、乾燥した粉体からペースト状に変化したとはいえ、一般に私たちが食べることが無い食素材（米ぬか）を「へしこ」とともに食べられていることから、米ぬかの性状解析と関与する微生物の解析を行いました。単離したアミラーゼ生産菌株のうち、5株を選択してDNAを抽出してシーケンス解析を行い、16S rRNA 遺伝子塩基配列を用いて系統樹を作成しました。また、分離菌株の近縁種についてはDDBJより取得しました。5株の中に、近縁種からも澱粉を資化できる菌種が見られず、澱粉の資化性やアミラーゼに関する研究報告がほとんどない菌種などが分離されたことがわかりました。一方、*Oceanobacillus picturae* として同定された菌株が生産する菌体外生産酵素について検討した結果では、MALDI-TOF TOFによるペプチド断片の質量およびそのアミノ酸配列の解析結果より、maltogenic amylase (*Bacillus halodurans*) と neopullulanase (*Bacillus thuringiensis*)、neopullulanase (*Bacillus thuringiensis*) のアミノ酸配列と一致するペプチド断片が検出され、これらの酵素に極めて近い構造を持つタンパク質の存在が明らかとなりました。

この *Oceanobacillus picturae* のゲノム情報を KEGG automatic annotation server (KAAS) によるドラフト配列解析の結果、89 コンティグ（約 3.9 Mbp）が決定され、3,915 の CDS を予測しました。この中の CDS 下に記載された対応するタンパク質の名称や機能から、糖質関連酵素と考えられた名称や機能をみたところ、40 の CDS が選択抽出され、その中に neopullulanase (*Oceanobacillus picturae*)、pullulanase/extracellular (*Oceanobacillus picturae*) も含まれていました。今後は、ターゲットを絞って酵素を精製単離し、N末端アミノ酸解析を行い、得られたゲノム情報と対応させて酵素の特性を検討したいと考えています。

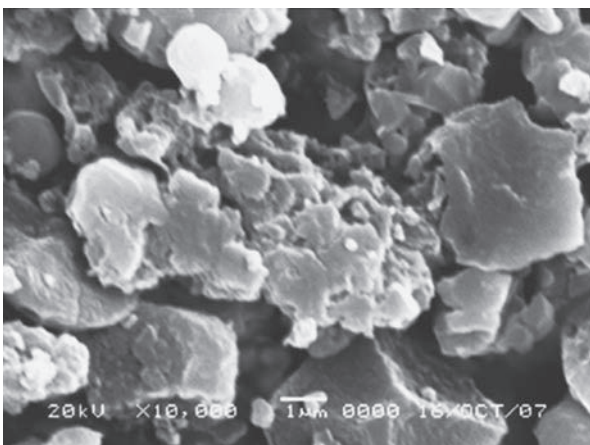


図1 へしこ米ぬかから分離した消化された米澱粉

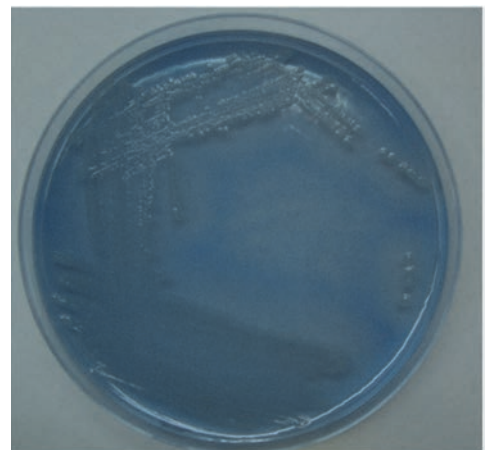


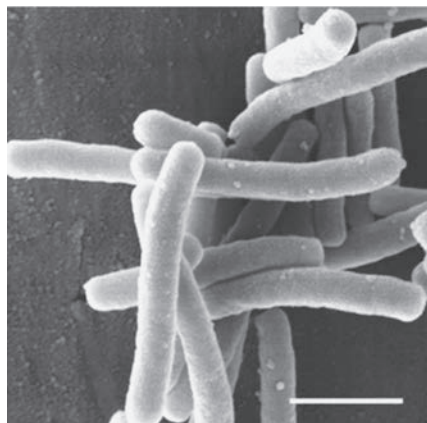
図2 分離同定された *Oceanobacillus picturae*

阿久澤さゆり (応用生物科学部 食品安全健康学科)
 鈴木智典 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

フルクトフィリック乳酸菌の環境適応・進化に関する研究

乳酸菌は一般的に生育のための基質としてグルコースを好む細菌群であり、グルコースを代謝することが出来ない乳酸菌は非常に限られている。しかし、筆者が花や果物などから見出した乳酸菌は、通常時にグルコースを代謝することが出来ず、生育基質としてフルクトースを好むという特徴を有していた。これは乳酸菌がフルクトース豊富な花や果物といった環境に適応することで獲得した特徴であると考えられ、このような特異な乳酸菌をフルクトフィリック乳酸菌 (FLAB) と命名した。また、我々及び他研究者の更なる研究により、この FLAB はハチ消化管の最優勢菌群の一つであることが見いだされたことから、FLAB は様々なフルクトース豊富な環境に適応していることが推察された。ハチは自然界で植物の受粉を行う有益虫であり、アメリカだけで年間 150 億ドル以上の作物がハチによって受粉されていると報告されている。一方で、ハチは蜂群崩壊症候群という原因不明の現象により近年大きく数を減らしており、この対策として FLAB によるハチプロバイオティクスの開発が注目されている。

FLAB には *Leuconostocaceae* 科に属する *Fructobacillus* 属細菌と *Lactobacillaceae* 科の *Lactobacillus kunkeei* が主に知られている。*Fructobacillus* 属細菌は属する 5 菌種すべてが FLAB であるのに対し、その他の *Leuconostocaceae* 科の乳酸菌でフルクトフィリックな特徴を有する菌種は報告されていない。そこで、*Fructobacillus* 属細菌のゲノム遺伝子の構成を *Leuconostocaceae* 科に属する他の細菌と比較することで、*Fructobacillus* 属細菌がフルクトース豊富な環境へ適応する過程でどのように進化をしていったのかを明らかにすることを目的としている。現在までのところ、*Fructobacillus* はゲノムサイズが非常に小さいこと、ORF 数が少ないこと、代謝面で重要な幾つかの遺伝子群を欠損させていることなどが明らかになっている。これは発酵乳酸菌などで報告されているのと同様に、環境適応からくる退行的進化により、不要な遺伝子群を欠落させていったためと考えられる。また、この他にも幾つかの FLAB のゲノム解析を進めており、今後は菌種レベル、菌株レベルでの比較ゲノム解析を行うことで、FLAB 全体の環境適応を明らかにしていく予定である。得られたゲノムデータは進化学的な側面だけでなく、FLAB を乳酸菌スターターやプロバイオティクスとして利用していくうえでも非常に有用なデータとなることが想定される。



フルクトフィリック乳酸菌 *Fructobacillus durionis* の電子顕微鏡写真 Bar: 1 μ m

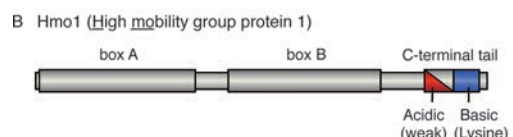
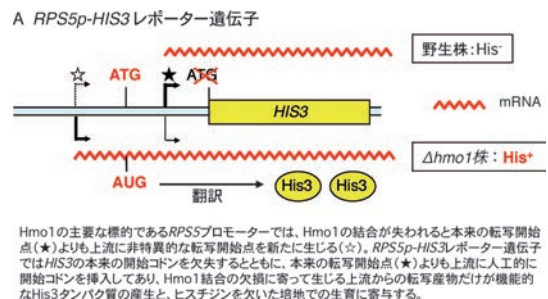
出芽酵母をモデル生物とする真核生物の リボソーム構成因子の転写制御機構の研究

真核生物のリボソームは4種類のリボソームRNA (rRNA) と約80種類のリボソームタンパク質 (RP) からなる巨大複合体であり、その生合成は3種類のRNAポリメラーゼ (Pol I, Pol II, Pol III) の協調的な活性と、膨大な細胞資源を必要とし、細胞の成長や分裂など様々な生物機能に密接に関与することから、その制御は極めて重要である。本研究ではリボソーム構成因子の協調的な生合成に関与すると考えられている Hmo1 の標的遺伝子への結合を制御する仕組み、及びそれに関わる因子の同定を目指し、遺伝学的探索を行った。

Hmo1 は RP 遺伝子プロモーター中の低ヌクレオソーム領域に結合し、そこからの非特異的な転写開始を抑制している (*Nucleic Acids Res.* 39, 4136-4150 (2011))。そこで、Hmo1 結合の欠損により生じる非特異的な転写産物に依存して酵母が生育するようなレポーター遺伝子を構築し (図 A)、このレポーター遺伝子を持つ酵母に変異を導入し、生育可能なコロニーを単離することにより Hmo1 の DNA 結合に欠損を持つ変異株の単離を試みた。その結果、ゲノムライブラリーからの探索や次世代シーケンサーによるゲノム解析により4つの遺伝子の変異を同定した (*hmo1*, *sui1*, *sui3*, *cbf2*)。Sui1, Sui3 はタンパク質の翻訳開始に関わる因子であり、目的とする因子ではないと考えられた。Cbf2 はセントロメアに結合し、染色体分配に関わる因子である。本探索において *cbf2* 変異が同定された理由は不明であるが、Hmo1 との物理的相互作用も見出しており、現在も解析を継続中である。一方、最も多くの変異が Hmo1 そのものに見出された。Hmo1 は HMG モチーフ様の二つのドメイン (box A, box B) と機能不明な C 末テール領域からなる (図 B)。その中で、従来 DNA 結合への関与が不明であった box A 領域に見出された変異に着目した。Box A に人為的に様々な変異を導入し、その DNA 結合における役割を詳細に調べたところ、Hmo1 は box A を介して多量体を形成すること、DNA 結合能を失った box A 変異体は多量体形成能を失っていることを見出した。また box A を欠失させ、box B を複数持たせた変異体は DNA 結合能を回復することから、Hmo1 は box A を介して多量体を形成し、複数の box B を介して標的 DNA に安定に結合することが明らかとなった。さらに現在までに、C 末テール領域も同じく DNA 結合に必須であることを明らかにしている。Hmo1 は異なる転写系によって転写される rRNA、及び RP 遺伝子に共に結合し、その転写を促進する一方、栄養飢餓をミミックするラパマイシンの添加によりこれら標的遺伝子から速やかに解離することから、その DNA 結合が環境に応じたリボソーム構成因子の動的、かつ協調的な産生に重要であることが強く示唆されている。本研究を通して Hmo1 の DNA 結合の動態や制御についてより詳細な理解を目指していきたいと考えている。

(1) Higashino A *et al*, *Biosci Biotechnol Biochem* (in press)

笠原浩司 (応用生物科学部 アイソトープセンター)
吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)



シアノバクテリアにおけるゲノムコピー数制御機構の解明

シアノバクテリアは植物と同様に光合成を行う原核藻類です。シアノバクテリアは植物や真核藻類と比べて増殖速度が速く、培地のコストも安価であることから、物質生産のホストとしての利用が期待されています。中でも *Synechococcus elongatus* PCC 7942、*Synechocystis* sp. PCC 6803 といった淡水性シアノバクテリアは遺伝子組換えが容易であり、全ゲノム情報が公開されていることから、現在の物質生産研究においても中心的な役割を担っています。にもかかわらず「シアノバクテリアの細胞がどうやって増えているのか」はよく分かっていませんでした。

細胞が増えるためにはあらかじめゲノムを“複製”、“分配”した後に“分裂”する必要があります。多くの生物は、この一連の現象を厳密にコントロールすることで、細胞あたりのゲノムの数を1コピーに維持しています。一方で世の中には細胞あたり複数コピーのゲノムを持つ生物も見つかっています。シアノバクテリアもその一種です。私たちのグループではこれまでに *Synechococcus* のゲノムの“複製”について研究を行い、ゲノムの複製開始機構、複製様式を明らかにしました。さらに複数コピーのゲノムは一斉に複製せずに細胞間、ゲノム間で非同調的に複製するということを明らかにしました。

研究を進めた結果、*Synechococcus* のゲノム数は増殖のステージ毎に異なることがわかりました。ゲノム数が異なるということは“複製”と“分裂”の頻度が異なるということを示します。特に分裂が始まる前の誘導期にゲノムのコピー数が顕著に増加したことから、*Synechococcus* は誘導期にゲノムをたくさん作っておいて分裂期に備えているのではないかと考えられました。これはゲノムを1コピーもつ微生物にはみられない、シアノバクテリア特異的な増殖機構です。それでは、ゲノムの“複製”と“分裂”の頻度はどうやって制御されているのでしょうか？現在、ゲノム数を変動させるメカニズムの解明を目指し、次世代シーケンサーを用いて転写産物の網羅的解析（トランスクリプトーム解析）を行っています。

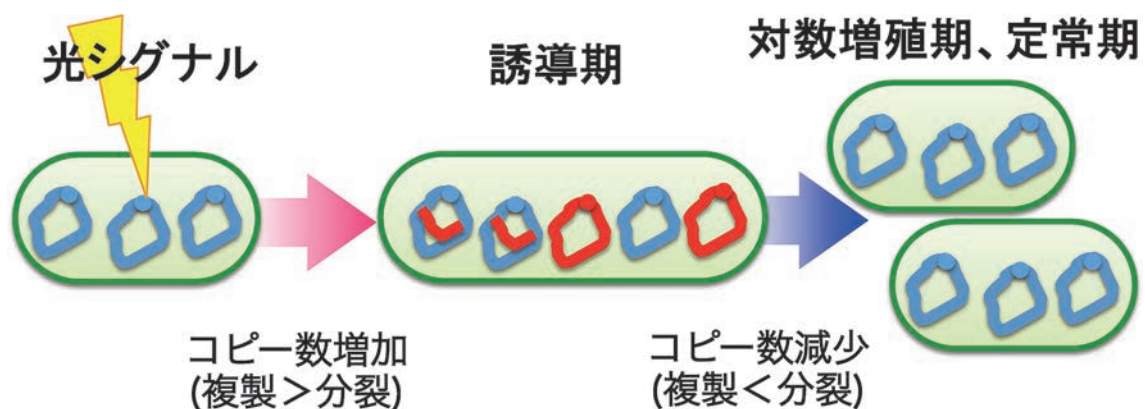


図 シアノバクテリア S. 7942 の増殖モデル

青：ゲノム DNA、赤：合成された直後のゲノム DNA

渡辺 智 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

吉川博文 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)

豚由来 *Actinomyces* sp. Chiba101 株の全ゲノム解析

Actinomyces 属菌とは

Actinomyces 属菌は放線菌科に属するグラム陽性菌桿菌で、ヒトを含め動物の口腔内に常在し、内因感染を起こして化膿性病変を形成することから医学及び獣医学上重要な細菌です。

豚から分離された *Actinomyces* sp. Chiba101 株

元農大教授の東によって豚から *Actinomyces* sp. Chiba101 株（以下、Chiba101 株）が分離されました。その後、この株と同種と考えられる放線菌は豚の扁桃からも分離され、豚に病原性が確認されています。一方、牛の歯垢から *A. denticolens* という放線菌が分離されていますが、牛には病原性は確認されていません。豚の放線菌性病巣から分離される *Actinomyces* は牛から分離される以前に *A. suis* と命名されていました。Chiba101 株を含む豚扁桃分離株の生化学的性状は *A. suis* 及び *A. denticolens* と一致します。しかしながら Chiba101 株を代表とする豚分離の放線菌を *A. denticolens* と割切ってよいのかという疑問が残ります。

Chiba101 株の全ゲノム解析による種同定

そこで我々は、Chiba101 株と *A. denticolens* の全ゲノム解析を、PacBio により行いました。そして、*de novo* assembly により作製した Chiba101 株の全ゲノム配列について、MiGAP によるアノテーションを行いました。

その結果 Chiba101 株の分類学的位置は *A. denticolens* と異なるわけですが、獣医学上、本種の病原性は牛にはなく、豚で明らかに存在し、また先人が与えた *A. suis* という名称を考慮すると必ずしも妥当ではないことが明らかとなりました。これまでに、感染力のある放線菌の全ゲノム解析はほとんど行われておらず、今回得られたデータは分類学的な利用だけではなく、放線菌の生物学的情報としても有用になると考えられます。



豚から分離された *A. sp* Chiba 101 株. グラム染色 × 1,000

小林朋子（農学部 畜産学科）

関川由里子（農学部 畜産学科）

横山栄二（千葉県衛生研究所）

村上覚史（農学部 畜産学科）

研究発表実績

●論文発表

- **Akanuma G, Kobayashi A, Suzuki S, Kawamura F, Shiwa Y, Watanabe S, Yoshikawa H, Hanai R, and Ishizuka M.**
 Defect in the Formation of 70S Ribosomes Caused by Lack of Ribosomal Protein L34 Can Be Suppressed by Magnesium.
J Bacteriol. 196 (22): 3820–30. (2014)
- **Chibazakura T, Toriyabe Y, Fujii H, Takahashi K, Kawakami M, Kuwamura H, Haga H, Ogura S, Abe F, Nakajima M, Yoshikawa H, Tanaka T.**
 5-aminolevulinic acid enhances cell death under thermal stress in certain cancer cell lines.
Biosci Biotechnol Biochem. in press (2014)
- **Ehara A, Suzuki H, Kanesaki Y, Yoshikawa H, and Amachi S.**
 Draft genome sequence of strain q-1, an iodide-oxidizing alphaproteobacterium isolated from natural gas brine water.
Genome Announc. 2 (4): e00659-14. (2014)
- **Higashino A, Shiwa Y, Yoshikawa H, Kokubo T, and Kasahara K.**
 Both HMG boxes in Hmo1 are essential for DNA binding *in vitro* and *in vivo*.
Biosci. Biotechnol. Biochem. in press (2014)
- **Itami N, Kawahara-Miki R, Kawana H, Endo M, Kuwayama T, Iwata H.**
 Age-associated changes in bovine oocytes and granulosa cell complexes collected from early antral follicles.
J Assist Reprod Genet. 31 (8): 1079–88. (2014)
- **Masuda H, Shiwa Y, Yoshikawa H, and Zylstra GJ.**
 Draft Genome Sequence of the Versatile Alkane-Degrading Bacterium *Aquabacterium* sp. Strain NJ1.
Genome Announc. 2 (6): e01271-14. (2014)
- **Miyamoto K, Matsumoto T, Okada A, Komiyama K, Chujo T, Yoshikawa H, Nojiri H, Yamane H, and Okada K.**
 Identification of target genes of the bZIP transcription factor OsTGAP1, whose overexpression causes elicitor-induced hyperaccumulation of diterpenoid phytoalexins in rice cells.
PLoS One. 9 (8): e105823. (2014)
- **Nindita Y, Cao Z, Yang Y, Arakawa K, Shiwa Y, Yoshikawa H, Tagami M, Lezhava A, Kinashi H.**
 The *tap-tpg* gene pair on the linear plasmid functions to maintain a linear topology of the chromosome in *Streptomyces rochei*.
Mol Microbiol. in press (2014)
- **Shiwa Y, Yanase H, Hirose Y, Satomi S, Araya-Kojima T, Watanabe S, Zendo T, Chibazakura T, Shimizu-Kadota M, Yoshikawa H, Sonomoto K.**
 Complete genome sequence of *Enterococcus mundtii* QU 25, an efficient L-(+)-lactic acid-producing bacterium.
DNA Res. 21 (4): 369–77. (2014)
- **Shiwa Y, Yoshikawa H, Tanaka T, and Ogura M.**
Bacillus subtilis degSU operon is regulated by the ClpXP-Spx regulated proteolysis system.
J Biochem. in press. (2014)
- **Tadano R, Nunome M, Mizutani M, Kawahara-Miki R, Fujiwara A, Takahashi S, Kawashima**

T, Nirasawa K, Ono T, Kono T, Matsuda Y.

Cost-effective development of highly polymorphic microsatellite in Japanese quail facilitated by next-generation sequencing.

Anim Genet. 45 (6): 881-4 (2014)

• **Takada H, Morita M, Shiwa Y, Sugimoto R, Suzuki S, Kawamura F, and Yoshikawa H.**

Cell motility and biofilm formation in *Bacillus subtilis* are affected by the ribosomal proteins, S11 and S21.

Biosci Biotechnol Biochem. 78 (5): 898-907. (2014)

• **Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, Iwata H.**

Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes.

J Reprod Dev. 60 (2): 92-9. (2014)

• **Wada K, Matsushima Y, Tada T, Hasegawa S, Obara Y, Yoshizawa Y, Takahashi G, Hiai H, Shimanuki M, Suzuki S, Saitou J, Yamamoto N, Ichikawa M, Watanabe K, Kikkawa Y.**

Expression of truncated PITX3 in the developing lens leads to microphthalmia and aphakia in mice.

Plos One. 9 (10): e111432. (2014)

• **Watanabe S, Sato J, Imamura S, Ohnuma M, Ohoba Y, Chibazakura T, Tanaka K, Yoshikawa H.**

Stable expression of a GFP-reporter gene in the red alga *Cyanidioschyzon merolae*.

Biosci Biotechnol Biochem. 78 (1): 175-7. (2014)

• **Yokoyama E, Murakami K, Shiwa Y, Ishige T, Ando N, Kikuchi T, and Murakami S.**

Phylogenetic and population genetic analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis strains isolated in Japan using whole genome sequence data.

Infect Genet Evol. 27: 62-8. (2014)

●学会セミナー等での発表

……国内……

2015年3月27-30日

日本畜産学会 第119回大会 (宇都宮)

石井文弓、石毛太郎、佐野賢、松嶋孝典、平野貴、原ひろみ、半澤恵

ニホンウズラ腸内細菌叢解析の条件検討

石毛太郎、原ひろみ、平野貴、半澤恵

ニホンウズラ Nk-lysin (CjNKL) のアミノ置換 (Gly31Asp) の抗菌活性への影響

川原玲香、神作宜男、河野友宏、桑山岳人

品種間の比較ゲノム解析によるニワトリの就巢行動発現制御に関わる変異の探索と絞り込み

2015年3月26-29日

日本農芸化学会 2015年度大会 (岡山)

今井健太郎、石川森夫、吉田将也、山本有紀、松原拓哉、兼崎友、吉川博文、小泉幸道、貝沼 (岡本) 章子

Acetobacter 属 2 種における基幹代謝経路の動作機序の比較解析

兼崎友、重信直人、小田しおり、齋藤夏帆、宮澤和己、渡辺智、吉川博文 (シンポジウム)

高温、強酸性温泉からの極限環境紅藻の新規単離と有用形質の探索

太治輝昭 (シンポジウム)

ナチュラルバリエーションを利用した植物の高温耐性付与遺伝子の探索

西沢正文、兼崎友、吉川博文、東江昭夫

病原性真菌 *Cryptococcus neoformans* の PHO 遺伝子の発現制御

松原拓哉、石川森夫、兼崎友、Cristina Andres Barrao、吉川博文、小泉幸道、貝沼 (岡本) 章子

RNA-seq 法による酢酸菌 3 種の酢酸発酵時における代謝戦略の比較研究

三輪瞬平、吉岡誠訓、紀平絵梨、仲宗根薫、五十嵐雅之、波多野和樹、吉川博文、兼崎友、江口陽子、内海龍太郎

イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* における三成分制御系 TroK, TroR1, TroR2 によるトロポロン合成制御システム

2015年3月26-28日

第59回日本応用動物昆虫学会（山形）

内山博允、石毛太一郎、矢嶋俊介、野田隆志、村路雅彦、前田太郎、日本典秀、上樂明也、霜田政美
捕食性カメムシ類の RNA sequencing によるトランスクリプトーム解析

2015年3月20-23日

日本藻類学会第39回大会（福岡）

牧しづか、兼崎友、佐藤晋也、神谷充伸、大城香、岡島麻衣子、金子達雄、吉川伸哉
Cyanothece sp. Viet Nam 01 株と *Cyanothece* PCC7822 の細胞外多糖の生産能と化学的性質

2015年3月16-18日

第56回日本植物生理学会年会（東京）

内山純爾、船水健斗、兼崎友、吉川博文、太田尚孝
シアノバクテリアの酸性順化株が発現するタンパク質の同定
田島直幸、兼崎友、佐藤修正、吉川博文、丸山史人、黒川顕、太田啓之、田畑哲之、高根澤陽、西澤智康、朝山宗彦、佐藤直樹

Limnothrix sp. ABRG5-3 株のゲノム解読と他種のシアノバクテリアゲノムとの比較

兼崎友、重信直人、田しおり、齋藤夏帆、渡辺智、吉川博文

有用形質を持つ極限環境紅藻の新規単離と環境ストレス応答遺伝子の解析

2015年3月6-8日

第9回日本ゲノム微生物学会年回（神戸）

山本達也、尾花望、兼崎友、大竹留未、吉川博文、野村暢彦、中村幸治
枯草菌 NonA によるファージ不稔感染に関与する遺伝子の探索と解析
渡辺智、大林龍胆、兼崎友、齋藤菜摘、千葉櫻拓、曾我朋義、吉川博文
シアノバクテリアにおける増殖相に依存したゲノムコピー数制御機構

2014年11月25-27日

第37回日本分子生物学会年会（横浜）

青木敬太、志波優、吉川博文、仁木宏典

核構造の維持に必要な Pim1/RCC1 の解析

朝治桜子、石毛太一郎、鈴木進悟、細道一善、平野貴、原ひろみ、椎名隆、半澤恵

ニホンウズラ主要組織適合性複合体 Mhc Coja クラス II B 領域のハプロタイプ解析

遠藤里佳子、針谷香澄、岡田康太郎、吉川博文、千葉櫻拓

高温ストレス下におけるがん細胞の細胞周期・細胞死制御機構の解明

川上茉莉子、高橋究、桑村晴菜、小倉俊一郎、安部史紀、中島元夫、田中徹、吉川博文、千葉櫻拓

5-アミノレブリン酸によるがん温熱細胞死増強機構

川原玲香、河野友宏、神作宜男、桑山岳人

比較ゲノム解析によるニワトリの就巢行動発現に関わる変異の探索

河野暢明、吉川博文、板谷光泰

ゲノム構造と複製挙動の関係

小林久人、坂下陽彦、若井拓哉、小池佐、佐野賢、河野友宏

マウス生殖細胞・初期胚の DNA メチローム解析

船水健斗、内山純爾、兼崎友、浅倉良介、岩田直也、吉川博文、太田尚孝

ラン色細菌 *Synechocystis* sp. PCC 6803 酸耐性順化株における低分子タンパク質の解析

松井求、池田幸樹、牧野岳都、志波優、兼崎友、吉川博文、富田勝、金井昭夫、中東憲治

Hfq とデグラドソーム変異による sRNA と mRNA 翻訳への影響

吉澤康博、和田健太、下井岳、亀山祐一、福田勝洋、橋詰良一

Fgf5 の 1 塩基欠失変異はシリアンハムスターの雄優性的長毛を引き起こす

和田健太、松島芳文、多田智記、長谷川清香、小原央、吉澤康博、日合弘、島貫碧、鈴木沙理、斎藤潤一、渡部桂、吉川欣亮

マウスの小眼球症および無水晶体症を引き起こす PITX3 のナンセンス変異

渡辺智、大林龍胆、兼崎友、斎藤菜摘、千葉櫻拓、曾我朋義、吉川博文

シアノバクテリアにおける増殖相に依存したゲノムコピー数制御機構

2014年10月31日-11月11日

日本動物遺伝育種学会第15年次大会（和光）

平野貴、石毛太郎、原ひろみ、杉本喜憲、半澤恵

RNA-Seq による Marbling-2 および脂肪交雑形成に関連する遺伝子の探索

2014年10月24-25日

平成26年度 細菌細胞の増殖と代謝研究会 ～細菌細胞増殖の多様性～（三島）

渡辺智

シアノバクテリアの細胞増殖

2014年10月18日

日本農芸化学会関東支部2014年度支部大会（埼玉）

遠藤里佳子、針谷香澄、岡田康太郎、吉川博文、千葉櫻拓

高温ストレス下におけるがん細胞の細胞周期・細胞死制御機構の解明

川上茉莉子、高橋究、桑村晴菜、小倉俊一郎、安部史紀、中島元夫、田中徹、吉川博文、千葉櫻拓

温熱条件下での5-アミノレブリン酸によるがん細胞死増強機構の解析

山本純也、大林龍胆、得平茂樹、千葉櫻拓、渡辺智、吉川博文

暗所におけるシアノバクテリアの代謝とDNA複製制御

渡辺智、大林龍胆、兼崎友、斎藤菜摘、千葉櫻拓、曾我朋義、吉川博文

シアノバクテリアにおける増殖相に依存したゲノムコピー数制御機構

2014年9月12-14日

日本植物学会第78回大会（川崎）

内山純爾、兼崎友、田崎理澄、船水健斗、大隅貴史、朝倉良介、吉川博文、太田尚孝

Synechocystis sp. PCC 6803 の酸性適応に関する遺伝子の同定

宇塚明洋、廣岡俊亮、兼崎友、吉川博文、宮城島進也

藻食の単細胞生物における光合成酸化ストレスへの対応機構の解析

廣岡俊亮、広瀬侑、兼崎友、吉川博文、宮城島進也

好酸性緑藻 *Chlamydomonas eustigma* のゲノム・トランスクリプトーム解析

2014年9月9日-11日

日本生物工学会第66回大会（札幌）

貝沼（岡本）章子、勝木浩平、今井健太郎、石川森夫、志波優、吉川博文、小泉幸道

Acetobacter pasteurianus NBRC3283 株のエタノール培養条件下における電子伝達系／ROS 除去系酵素の発現挙動

2014年8月21日-24日

第107回日本繁殖生物学会大会（帯広）

川名宏典、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝

レスバトロールが加齢ウシ初期胎状卵胞卵胞に及ぼす影響

谷津恵、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝

卵子中の障害を受けたミトコンドリアは作り変えられる。

2014年7月26日

北海道実験動物研究会（HALAS）平成26年度総会（札幌）

長谷川清香、高橋剛、吉川欣亮、和田健太

ミスセンス変異に起因する新規劣性白内障モデル *Mip^{nat}*

和田健太、松島芳文、多田智記、長谷川清香、小原央、吉澤康博、日合弘、島貫碧、鈴木沙理、斎藤潤一、渡部桂、吉川欣亮

トランケート型 PITX3 の発現はマウスの小眼球症および無水晶体症を引き起こす

2014年5月17-18日

第55回日本卵子学会（神戸）

岸靖典、川原玲香、松井大輔、齊藤隆和、小林久人、河野友宏、齊藤英和

網羅的遺伝子発現解析による加齢が卵丘細胞に与える影響の探査

2014年5月15-17日

第61回日本実験動物学会総会（札幌）

布目三夫、只野亮、中野幹治、川原玲香、河野友宏、高橋慎司、川嶋貴治、藤原哲、葦澤圭二郎、水谷誠、松田洋一

マイクロサテライトマーカーと mtDNA を用いたニホンウズラの遺伝的特性の解析

大久保咲、吉野猛郎、三瓶早穂里、橋詰良一、吉川欣亮、和田健太

無眼球症ラット NAK/Nokh の眼球発生異常と原因遺伝子座の特定

高橋剛、原田千鴻、福富友紀子、吉川欣亮、和田健太

nat マウスは *Mip* ミスセンス変異に起因する初めての劣性発症モデルである

和田健太、渡部桂、斎藤潤一、奥本容子、島貫碧、設楽浩志、吉川欣亮

Foxe3^{ret} マウスの白内障発症の早期化・重篤化に対する *Pde6b^{rd1}* の修飾効果の実証と他の修飾因子存在

……国際……

2015年3月4-5日

International symposium: Tokyo Tech-HHU Dusseldorf Joint Symposium on Photosynthesis as a New Chemical Resource (Yokohama, Japan)

Watanabe S

DNA replication of cyanobacterial multi-copy chromosomes

2014年10月19-23日

10th Asian Pacific Poultry Congress (Jeju, Korea)

Nunome M, Tadano R, Nakano M, Kawahara-Miki R, Kono T, Takahashi S, Kawashima T, Fujiwara A, Nirasawa K, Mizutani M, Matsuda Y.

Genetic Differences among Wild, Laboratory, and Commercial Populations of the Japanese Quail Estimate by Microsatellite DNA Markers.

2014年9月7-11日

9th European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria (Texel, Netherlands)

Watanabe S, Ohbayashi R, Kanesaki Y, Saito N, Hirota R, Shigenobu N, Chibazakura T, Soga T, and Yoshikawa H.

Control of chromosome copy number depending on growth phase in cyanobacteria.

2014年9月2-4日

International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells” (England, Edinburgh)

Kobayashi H

High-resolution DNA methylome analysis of mouse germ cells

2014年8月18-24日

26th International Ornithological Congress (Tokyo, Japan)

Nunome M, Tadano R, Nakano M, Kawahara-Miki R, Kono T, Takahashi S, Kawashima T, Fujiwara A, Nirasawa K, Mizutani M, Matsuda Y.

A tentative analysis of genetic differences between wild and laboratory populations of

Japanese quails using microsatellite DNA markers

Kawahara-Miki R, Kono T, Kansaku N, Suzuki S, Kuwayama T.

Comparative genomic analysis for identification of polymorphisms associated with the chicken broodiness trait.

2014年7月27日-8月1日

34th International Society for Animal Genetics Conference (Xi'an, China)

Kawahara-Miki R, Kono T, Kansaku N, Suzuki S, Kuwayama T.

Comparative genomic analysis for identification of polymorphisms associated with the chicken broodiness trait.

●その他

著書

兼崎友、志波優、吉川博文

微生物研究での次世代シーケンサーの有効活用

遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発 p176-182. 技術情報協会刊 (2014)

2015年3月27日

日本農芸化学会 2015 年度大会 (岡山)

兼崎友 (座長)

遺伝子・発現制御・トランスクリプトーム

2014年7月26日

第13回微生物研究会 (東京)

兼崎友 (招待講演)

次世代シーケンス技術の発展から考える微生物ゲノム研究の行方

2014年6月4-5日

2014 アジレントゲノミクスフォーラム (東京)

小林久人 (招待講演)

マウス生殖細胞の全ゲノム包括的 DNA メチローム解析

