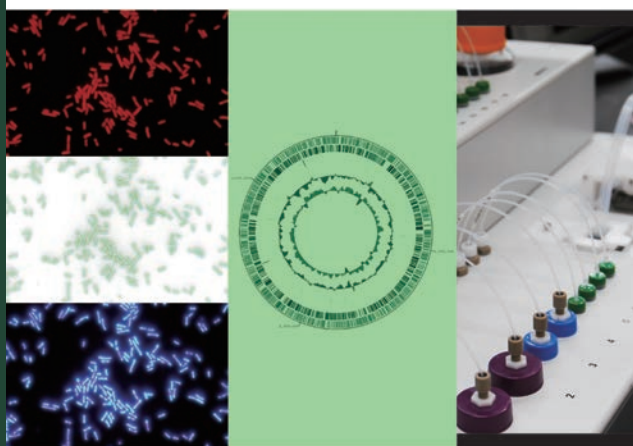


のゲノム解析拠点に

国際シンポジウム「Genome Research」を開催



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

「戦略的研究基盤形成支援事業」の成果を次なる発展へ

次世代シーケンサーが拓く農学新領域の創出



る農学研究の拠点形成

## 東京農大の研究を広げるNGS技術

# NGRC



# ニュース

## No. 9

# CONTENTS

センター長あいさつ	3
文部科学省・私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 最終年度シンポジウム	4
平成 29 年度 学内公募一覧	6
学内公募事業とその成果	10
<hr/>	
▼ 味蕾オルガノイドを用いた味細胞分化メカニズムの解析	10
ボルネオ熱帯雨林の野生動物保全	12
ワカサギの <i>de novo</i> シーケンス解析	14
トランスクリプトーム解析によるマガキ ( <i>Crassostrea gigas</i> ) の遺伝的地域特性の解明	15
マウスモデルを用いたウェルニッケ・コルサコフ症候群におけるビタミン B1 欠乏誘導性記憶障害の分子機構の解明	16
高質な胚生産のための培養環境の構築に関する研究	18
老化がウシの妊孕性に与える影響とその制御に関する研究	19
NGS を用いたニホンウズラの環境応答遺伝子の解析	20
Amplicon sequencing によるニホンウズラ宿主防御ペプチド解析と腸内細菌 metagenome	22
ダイズシストセンチュウ孵化促進物質、誘引物質に関する研究	24
脂肪酸の質的特性とその病態制御機構の解明	25
生後早期の子豚の便微生物叢の継時的変化、ならびに飼料中の抗菌性物質による影響の解析	26
NAK/Nokh ラットの小眼球症に関与する複数の遺伝子	28
ヒト染色体複製開始領域におけるサイクリン A と複製開始因子との相互作用解析	30
マウスの分化初期始原生殖細胞と周辺体細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析	32
牛白血病発症のウイルス学的要因解明を目指した BLV ウイルス遺伝子配列の多様性解析	34
<hr/>	
▼ ダイコンを“遅咲き”にする原因遺伝子の同定	36
遠縁交雑種後代のゲノム組成解析手法 (GISH-seq) の開発	38
イネのジテルペン型ファイトアレキシン生産制御を担う転写因子の機能解明	40
レタスの結球性に関わる遺伝子の同定	42
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	44
水田雑草の起源と進化を解明するための SSR マーカーの開発	46
<i>Brassica juncea</i> 在来品種の系統解析と亜種識別マーカーの開発	48
鉄欠乏時にキュウリ ( <i>Cucumis sativus</i> ) で生成される新規ビタミン B2 誘導體 (4'-ketoriboflavin) の生成機構の解析	50
植物の神経伝達物質の分解酵素が関わる環境適応機構の解明	52
湿生植物の低酸素・温暖環境適応に関するトランスクリプトーム比較解析	53
<hr/>	
▼ 高機能性 <i>Lactococcus lactis</i> ライブラリの構築	54
味噌タンパク質が腸内細菌叢へ与える影響解析	56
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	58
シアノバクテリアから見出された新たな増殖戦略	60
蜂蜜から分離された酵母 <i>Zygosaccharomyces mellis</i> の高糖度耐性に関する研究	63
アミノ酸飢餓への適応機構から見出された枯草菌 RNA ポリメラーゼの新規機能	64
環状リポペプチドの炭素鎖構造を決定する <i>Bacillus</i> 属細菌の遺伝子の特定	66
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	68
畜産物による食品起因感染症の制御のための次世代シーケンサーを用いた食品起因感染症原因菌の進化系統グループの解明	70
ヤマイモに棲息する窒素固定細菌のフローラ解析	72
摂取栄養源によるラット腸内菌叢解析タイトル	74
<i>Nocardioides</i> sp. PD653 株から POPs の新規デハロゲナーゼ遺伝子を発見	76
タンパク質構造変化に関する酵母のペプチジルプロリルイソメラーゼ Fpr1 を介したリボソームタンパク質遺伝子の転写制御機構の解明	78
イネいもち病菌-宿主植物相互作用における新奇病原性制御機構の解明	80
転写因子破壊株を用いたバイオプラスチック高生産大腸菌の創製	82
伝統的な「鹿児島壺造り黒酢」醸造に関わる「壺付き酢酸菌」の探索	84
研究発表実績	86

# ▶ 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」を終えて ～ゲノムセンター設立から 10 年～

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センターが平成 20 年度に設置されてから、10 年が経とうとしています。文部科学省の私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「革新的ゲノム情報解析を用いた生物資源ゲノム解析と農学新領域の創出」遂行のために、当時国内に導入が始まったばかりの次世代シーケンサーを本センターに導入したのが始まりです。その後、平成 25 年度からは同支援事業「生命科学と情報科学の融合による農学研究の拠点形成」の採択を受け、次世代シーケンサーに特化したゲノムセンターとして、解析能力の強化に努めてきました。1 期目の事業では、在来牛、酒米ゲノム解析を中心テーマとしましたが、2 期目では生物種を絞らず、機能解析に重点を置いたテーマ設定としました。これは、次世代シーケンサーの特性をより活かした解析を行うこと、また同技術をめぐる国内外の環境も大きく変化してきていることにも関係します。実際、平成 29 年度の解析手法をみますと RNA-seq が半分近くを占め、また、ChIP-seq、メタゲノム解析など様々な解析手法が用いられています（図 1）。

この 10 年の間に学内でもゲノムセンターの利用は広がり（図 2）、生物産業学部、農学部、応用生物科学部、生命科学部、地域環境科学部、国際食料情報学部、短期大学部とすべての学部にもたがる 16 学科の先生方の研究に用いられました。本学は生物系総合大学として基礎から応用にわたり多種多様な生物を研究対象としています。それらはいわゆる非モデル生物を多く含みますが、次世代シーケンサーの登場により、それらのゲノム情報をもとにした機能解析を大きく進展させることになりました。また、モデル生物においても精密な高次機能解析に必須のツールとなっています。このような状況の下、プロジェクトの成果は、毎年 20 報ほどの学術論文として発表されてきました。

この 10 年のゲノムセンターの活動が、先生方の研究における次世代シーケンサー技術の有用性の認知につながっていれば幸いと考えております。今後も本技術を研究に活用いただき、東京農大の研究力の発信につなげていただくことを期待しております。

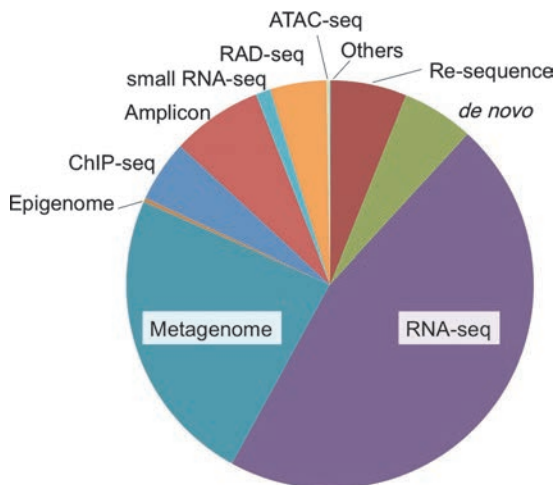


図 1 解析手法ごとのサンプル数の割合

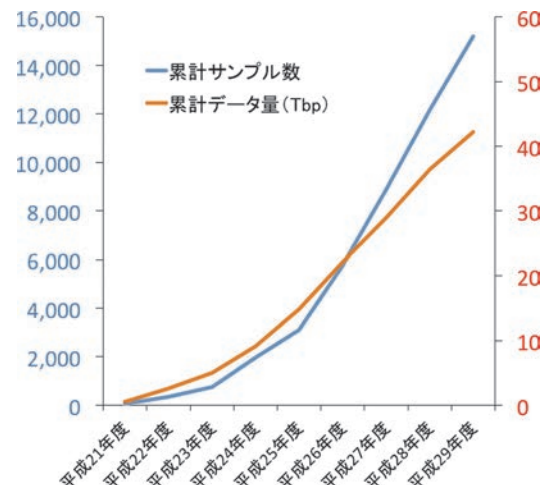


図 2 累計サンプル数 (青) と累計データ量 (赤)



## ▶ 文部科学省・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」 最終年度シンポジウム

平成 30 年 1 月 26 日（金）、東京農業大学世田谷キャンパス 横井講堂にて、標記のシンポジウムを開催した。高野学長による挨拶のあと、次世代シーケンサーを用いた研究成果について、9 名の演者による発表が行われた。植物、動物、微生物を対象とし、それらの機能解析、メタゲノム解析、環境ゲノム解析などを用いた研究や手法の開発が紹介された。農学、生命科学の広い分野にわたる本学における研究でも、次世代シーケンサー技術が非常に有用であることを反映した内容であった。

〈研究成果発表の先生方〉



バチャキル バビル先生（国際農業開発学科）  
「高品質ジネンジョ品種の DNA 識別マーカーの開発」



岩槻健先生（食品安全健康学科）  
「トランスクリプトーム解析による味蕾オルガノイドの性質決定」



田中啓介研究員（ゲノム解析センター）  
「NGS を利用した植物ゲノミクスの多様なアプローチ」



岩田尚孝先生（畜産学科）  
「高質な胚生産のための培養環境の構築に関する研究」





松林尚孝先生（バイオセラピー学科）  
「ボルネオ熱帯雨林の野生動物保全」



遠藤明仁先生（食品香粧学科）  
「フルクトフィリック乳酸菌のゲノム解析から見える環境適応」



内山博允研究員（ゲノム解析センター）  
「NGS による農学分野を中心とした昆虫研究」



兼崎友博士（静岡大学）  
「有用微生物のゲノム解析実績と予想される今後の展開」



石毛太郎研究員（ゲノム解析センター）  
「アンプリコンシーケンスによる動物由来遺伝子解析と腸内細菌メタゲノム」



会場の様子



矢嶋俊介センター長

## ▶平成29年度 学内公募一覧

1. 田村 倫子 (応用生物科学部 食品安全健康学科)  
「蜂蜜から分離された酵母 *Zygosaccharomyces mellis* の高糖度耐性メカニズムに関する研究」
2. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)  
「オルガノイド培養法を用いた内胚葉由来臓器の遺伝子発現解析」
3. 松原 創 (生物産業学部 アクアバイオ学科)  
「淡水産卵ワカサギおよび海水産卵チカの *de novo* シーケンス解析」
4. 松原 創 (生物産業学部 アクアバイオ学科)  
「トラフグおよびニジマスを用いた生殖腺および脳における新規性分化誘導因子のトランスクリプトーム解析」
5. 千葉 晋 (生物産業学部 アクアバイオ学科)  
「リシーケンスによる二枚貝マガキ (*Crassostrea gigas*) の地域種の遺伝的特性の解明」
6. 岩田 尚孝 (農学部 畜産学科)  
「妊娠を支えるエキソソーム由来 miRNA の解明とその制御」
7. 遠藤 明仁 (生物産業学部 食品香粧学科)  
「ミツバチ消化管および花から分離したバクテリオシン生産性乳酸菌のゲノム解析」
8. 安藤 達彦 (短期大学部 醸造学科)  
「大豆発酵食品に含まれるタンパク質が生体に与える影響」
9. 松林 尚志 (農学部 バイオセラピー学科)  
「環境 DNA 解析による塩場およびヌタ場利用野生動物の網羅的モニタリング」
10. 半澤 恵 (農学部 畜産学科)  
「ニホンウズラの腸内細菌叢と免疫応答との相互作用」
11. 平野 貴 (農学部 畜産学科)  
「次世代シーケンサーを用いた黒毛和種の筋肉組織における発現量解析」
12. 樋口 恭子 (応用生物科学部 生物応用化学科)  
「オオムギとトマトの根端の高 pH に対する応答の比較」
13. 伊藤 晋作 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「植物寄生性線虫の宿主認識に関与する根圏微生物群の動態解析」
14. 伊藤 晋作 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「化合物によるストリゴラクトン生合成制御機構の解析」
15. 伊藤 晋作 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤の生理機能の解明」
16. 三井 裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)  
「ダイコンの抽だい抑制機構の解明」
17. 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 ABA 応答における選択的スプライシング制御の解析」

18. 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」
19. 遠藤 明仁 (生物産業学部 食品香粧学科)  
「肉熟成に関与する細菌フローラの解析」
20. パチャキル バビル (国際食料情報学部 国際農業開発学科)  
「Genomic *in situ* hybridization sequence (GISH-seq) 法の開発およびこの技術を用いたサトウキビ×エリアンサス雑種系統における染色体変動の調査」
21. 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」
22. 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 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における DNA 複製開始機構に関する研究」
23. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「渦鞭毛藻 *Nusuttodinium aeruginosum* の盗葉緑体現象における宿主及び共生体の生理的変化の解明」
24. 和田 健太 (生物産業学部 生物生産学科)  
「エミューのゲノム情報の蓄積と、それを用いた家畜育種学的研究」
25. 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」
26. 小林 久人 (生物資源ゲノム解析センター)  
「哺乳動物におけるゲノム刷り込み機構の解析」
27. 辻井 良政 (応用生物科学部 生物応用化学科)  
「ジャスモン酸シグナル関連変異体を用いたターゲット遺伝子の探索および食味成分変化の解析」
28. 丹羽 克昌 (農学部 農学科)  
「RNA-seq 法によるライムギ B 染色体における種子貯蔵タンパク質の転写産物の検索」
29. 小松 憲治 (短期大学部 生物生産技術学科)  
「レタスの結球性に関わる遺伝子の同定」
30. 齋藤 彰宏 (応用生物科学部 生物応用化学科)  
「ミネラルを高蓄積するイネ系統とその近縁系統のゲノムの比較」
31. 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」
32. 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とエピジェネティック修飾の解析」
33. 遠藤 明仁 (生物産業学部 食品香粧学科)  
「高機能性 *Lactococcus lactis* ライブラリの構築」
34. 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」



35. 横田 健治 (応用生物科学部 生物応用化学科)  
「環状リポペプチドの炭素鎖構造を決定する *Bacillus* 属細菌の遺伝子の特定」
36. 足達 太郎 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)  
「環境変化が駆動するシジミチョウの斑紋変化と斑紋進化」
37. 亀山 慶晃 (地域環境科学部 地域創成科学科)  
「水田雑草の起源と進化を解明するための SSR マーカーの開発」
38. 美谷島 克宏 (応用生物科学部 食品安全健康学科)  
「各種の疾患モデル動物を用いた病態感受性に関する遺伝子解析」
39. 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, E と Mcm7 の相互作用解析」
40. 千葉櫻 拓 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「5- アミノレブリン酸によるがん温熱細胞死の分子機構解析」
41. 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」
42. 和久井 健司 (短期大学部 生物生産技術学科)  
「*Brassica juncea* 在来品種の系統解析と亜種識別マーカーの開発」
43. 喜田 聡 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「精神疾患マイクロエンドフェノタイプ同定を目的としたトランスクリプトーム網羅的解析」
44. 小林 朋子 (農学部 畜産学科)  
「牛白血病発症における遺伝子異常の検出」
45. 小林 朋子 (農学部 畜産学科)  
「牛白血病発症のウイルス学的要因解明を目指した BLV ウイルス遺伝子配列の多様性解析」
46. 貝沼 章子 (応用生物科学部 醸造科学科)  
「食酢醸造に関する研究 ―酢酸菌の発酵生理解析および伝統的食酢醸造技術に関する微生物ゲノム解析―」
47. 中村 隆俊 (生物産業学部 生物生産学科)  
「湿生植物の低酸素・温暖環境適応に関する比較トランスクリプトーム解析」
48. 鳥居 恭司 (農学部 畜産学科)  
「畜産物による食品起因感染症の制御のための次世代シーケンサーを用いた食品起因感染症原因菌の進化系統グループの解明」
49. 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)  
「バクテリオシン産生乳酸菌のゲノム解析」
50. 野本 康二 (生命科学部 分子微生物学科)  
「生後早期の子豚の便微生物叢の継時的変化、ならびに飼料中の抗菌性物質による影響の解析」
51. 坂田 洋一 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「シロイヌナズナの種子休眠制御における選択的スプライシングパターンの解析」
52. 新村 洋一 (応用生物科学部 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」

53. 新村 洋一 (応用生物科学部 バイオサイエンス学科)  
「摂取栄養源によるラット腸内菌叢解析」
54. 川崎 信治 (生命科学部 分子微生物学科・バイオサイエンス学科 (兼任))  
「①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  
②花と昆虫に共生する微生物叢のメタゲノム解析」
55. 志和地 弘信 (代表)、田中 尚人 (国際食料情報学部 国際農業開発学科 / 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フローラ解析」
56. 田中 尚人 (生命科学部 分子微生物学科)  
「マウスの乳酸菌摂取による腸内フローラへの影響」
57. 矢嶋 俊介、田中 尚人 (生命科学部)  
「生分解性プラスチックの河川微生物フローラへの影響」
58. 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」
59. 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」
60. 河野 友宏 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「生殖系列細胞における遺伝子発現およびエピゲノム解析による機能評価」
61. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)  
「タンパク質構造変化に関わる酵母のペプチジルプロリルイソメラーゼ Fpr1 を介したリボソームタンパク質遺伝子の転写制御機構の解明」
62. 内野 昌孝 (生命科学部 分子微生物学科)  
「碁石茶の発酵過程における糸状菌の役割解析」
63. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「植物の神経伝達物質の分解酵素に関わる環境適応機構の解明」
64. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「塩生植物の根圏微生物の解析」
65. 足達 太郎 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)  
「*Aporia* (ミヤマシロチョウ属) における分子系統解析の手法を用いた種分化の研究」
66. 齋藤 宏昌 (生命科学部 分子微生物学科)  
「イネいもち病菌-宿主植物相互作用における新奇病原性制御機構の解明」
67. 對馬 誠也 (生命科学部 分子微生物学科)  
「イネもみ枯細菌病の野生株 (S 型株) とコロニー変異株 (R 型株) のゲノム解析」
68. 石井 大輔 (生命科学部 分子生命化学科)  
「転写因子欠株を用いた乳酸ベースポリマー大腸菌のリモデリング」
69. 夏秋 啓子 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)  
「熱帯植物に感染する *Bednavirus* および *Begomovirus* の検出と解析」
70. 中川 純一 (生物産業学部 食品香粧学科)  
「遺伝子欠損株の RNAseq 解析に基づく乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* サーチュインの細胞増殖制御機構の解明」

## ▶学内公募事業とその成果

# 味蕾オルガノイドを用いた 味細胞分化メカニズムの解析

味細胞は再生を繰り返す内胚葉由来の上皮細胞であり、約2週間で再生する。しかし、味細胞分化に関する知見は少なく、ES細胞やiPS細胞から味細胞を作製することは困難である。我々は最近、世界に先駆けて味蕾基底部に味幹細胞を同定し、続いて味蕾オルガノイド培養系の確立に成功した。味蕾オルガノイドは、3次元の状態が生体内の味蕾のように味細胞の再生を繰り返す組織構造体であり、全ての味細胞系列を含む。我々は、同培養系を用いてこれまで不明であった味幹細胞から成熟味細胞への分化メカニズムを解明することを本研究の目的とした。

まず、Lgr5-EGFPの味蕾周辺部よりEGFP陽性細胞を分取し培養することで、味幹細胞からの成熟味細胞への分化過程を観察できると考え、味蕾オルガノイド培養を開始させた。昨年度はFACSによりLgr5-GFP陽性細胞を分取後、培養を開始してからDay 2、4、6、8、10、12、14の各ポイントにおいてRNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いて味蕾幹細胞から成熟味細胞へ分化する際の遺伝子発現変化をリスト化した。今年度は、ヒートマップ解析およびk-meansクラスター解析にて、発現パターンが相関する個々の遺伝子について解析した。

図1にヒートマップ解析とk-meansクラスター解析の結果を示す。ヒートマップでは、D2からD14までのサンプル間で遺伝子の発現量が徐々に変化していくことが確認できた(図1-A)。そこで、

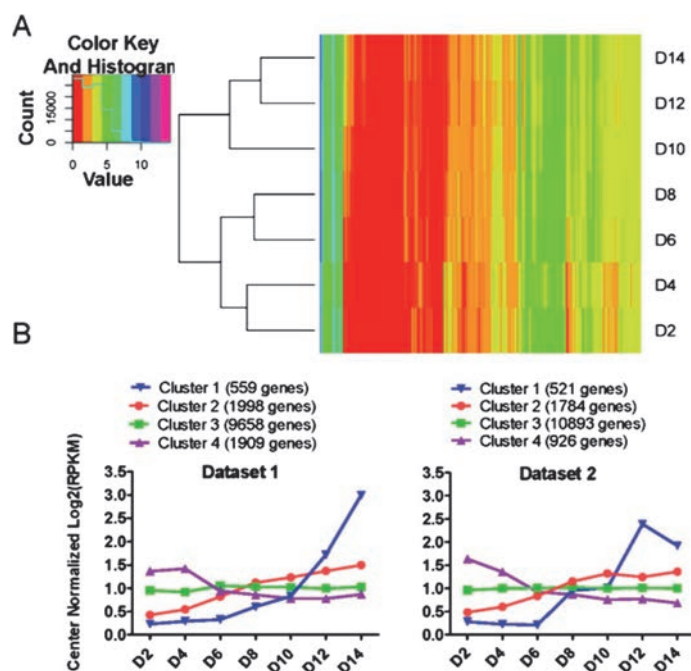


図1 味幹細胞の分化時に発現が変化する遺伝子の解析

A、培養2日目から14日までの各ポイントで発現する遺伝子群のヒートマップ

B、k-meansクラスター解析 (k=4)



k-means クラスタ解析により経日的に変動する遺伝子群を4つのパターンに分けて解析した。その結果、培養日数とともに遺伝子発現が急増するクラスター1（青線）、緩やかに上昇するクラスター2（赤線）、変動しないクラスター3（緑線）、減少するクラスター4（紫線）に分けられることが分かった。クラスター1の遺伝子群には、味覚受容体など成熟した味細胞が発現するマーカーが多く存在した。また、クラスター2の遺伝子群には、味細胞内のシグナル伝達に重要なマーカーや味細胞分化に関わる遺伝子が観察された。クラスター4は分化とともに減少する遺伝子群が含まれることが予想され、実際に細胞周期やDNA複製のための遺伝子群が確認できた。

味細胞の分化に関係するクラスター1と2に含まれる主な遺伝子は下記の通りとなった。

遺伝子クラスター1 : *Tas1r1, Tas1r2, Tas1r3, Tas2r102, Tas2r104, Tas2r105, Tas2r108, Tas2r113, Tas2r115, Tas2r116, Tas2r118, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137, Tas2r138, Gng13, Trpm5, Pkd113, Car4, Trcg1, Gad1.*

遺伝子クラスター2 : *Gustducin (Gnat3), Sonic hedgehog (Shh), Keratin 20 (krt20), Kcnq1, Pkd2l1, Enac channel (Scnn1a, Scnn1b, Scnn1g), Bdnf, Gnb3, Gna14, Ptch1, Wnt11, Kcnj2, Gpr120 (Ffar4), Plcβ2, Ncam1, Pou2f3, Hcn1, Notch3, Dll3, Dll4, and Ntpdase-2.*

遺伝子クラスター2には内胚葉の分化を制御するNotchシグナル関連分子が多く含まれていた。そこで、Notchシグナルの阻害剤であるDibenzazepine (DBZ) をGlutamate decarboxylase 1 (GAD1)-GFPマウスから作製した味蕾オルガノイドに添加し11日間培養後、味細胞分化の効率をGFPの発現により推定した。その結果、DBZ添加群では、味細胞分化が明らかに亢進することが分かり、Notchシグナルが味細胞の分化系でも重要な役割を果たしていることが分かった(図2)。他にもWnt、Shh、BDNFなど味細胞の発生および分化に重要な因子がクラスター1、2に含まれていた。Notchシグナルと同様にこれらの分子は味細胞の発生や分化に影響を与える因子であると予想される。今後、これらの因子とそれを制御する転写因子の関係について解析していきたい。

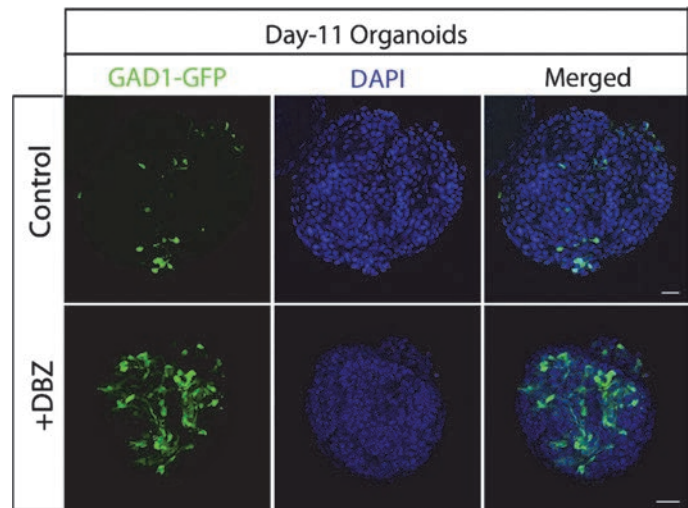


図2 味蕾オルガノイド培養時におけるNotch阻害剤の影響  
GAD1-GFPマウスから作製した味蕾オルガノイドの培養時に、Notch阻害剤であるDBZを培地中に添加し培養後、GFPの発現を調べた。

GAD1陽性細胞(緑)はDBZ添加群で多く観察された。青色は核染色。

岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)  
Peihua Jiang (Monell Chemical Senses Center)  
内山 博允 (生物資源ゲノム解析センター)

## ボルネオ熱帯雨林の野生動物保全

熱帯雨林は生物多様性の宝庫であり、そこに生息する生物は、薬用や実験動物、家畜では失われた形質の保持といった生物資源として高い価値を有している。しかし現在、乱開発や乱獲によって熱帯雨林に生息する哺乳類の4割が絶滅の危機にある。熱帯雨林の野生動物保全を進めるうえでの大きな問題は、生態・遺伝学的な情報が他地域に比べて極端に乏しいことである。それは、生態調査では高温多湿環境やアクセスの悪さ等の調査環境が悪いこと、遺伝調査では試料の入手自体が困難であること、入手できても質が悪いことなどに起因している。

そこで我々は、生態ならびに遺伝調査の問題点を克服するために、最新手法を取り入れて問題解決を試みてきた。ここでは生態調査の効率化を図るための「塩場環境 DNA 解析」ならびに劣化試料からの DNA 抽出と新たな遺伝情報蓄積を図るための「ボルネオバンテンのミトコンドリア DNA (MtDNA) 全ゲノム解析」、二つの結果について報告する。

### 1. 塩場環境 DNA 解析による絶滅危惧種の検出

これまで私は、ボルネオ島マレーシア・サバ州において、植食性哺乳類がエサ植物中にほとんど含まれない塩分を天然の湧水ミネラル源「塩場（しおば）」に求めることに着目、自動撮影カメラを用いて塩場が野生ウシのバンテンやアジアゾウ、オランウータンなどの大型絶滅危惧種のホットスポットであることなどを示してきた (Matsubayashi *et al.* 2007)。それを受けて、2008 年からサバ州森林局は商業林における塩場の保護区化を森林管理に採用するようになった。しかし、動物の種類によって塩場ごとに利用頻度が異なるため、塩場が多種の絶滅危惧種に利用されていることを示すには数ヵ月間のモニタリングが必要であった。

近年、池、湖、河川や海の水域での環境 DNA（生物が環境中に放出する DNA）解析によって、魚類をはじめとした水生生物を検出できることが示され、侵襲的かつ短期間で効率よく結果を出せることから注目されている。そして現在、陸生哺乳類を検出するユニバーサルプライマーが開発 (Ushio *et al.* 2017)、環境 DNA 解析は水域から陸域へと拡大しつつある。そこで我々はこの技術をボルネオ島熱帯雨林の塩場環境 DNA に応用、2016 年に塩場の湧水を試料として高温多湿で微生物活動が高く DNA が分解されやすい熱帯雨林でも利用可能かどうかを検証した。

その結果、バンテンやアジアゾウ、オランウータン、大型のシカのサンバー、ヒゲイノシシ、そしてセンザンコウ、6 種の絶滅危惧種の検出に成功し、塩場ごとの検出傾向は自動撮影カメラの結果と一致していた (表 1)。特に、他の動物種と異なって痕跡を残さないために塩場利用を把握するまでに時間がかかっていたオランウータンを効率よく検出すること、また近縁種やコウモリ類の検出もできた (Ishige *et al.* 2017)。以上から、事前調査に十分な時間が取れない場合や、アクセスが困難な遠隔地の場合において、本手法は特に有効であると考えられた。

### 2. ボルネオバンテンの Mt DNA ゲノム解析

バンテン (*Bos javanicus*) は、絶滅が危惧されている野生ウシである。東南アジア大陸、ジャワ島、そしてボルネオ島に分布し、各々の地域集団はビルマバンテン (*B. j. birmanicus*)、ジャワバン

表 1 検出された 6 種の絶滅危惧種（類似性 >97%）と自動撮影カメラから判明していた塩場ごとの利用傾向

種	IUCN カテゴリー	塩場 1 (2016年8月22日)				塩場 2 (2016年8月23日)			塩場 3 (2016年8月23日)			塩場 4 (2016年8月24日)		
		オランウータンの利用が多い				ゾウが利用			オランウータン、バンテン、ゾウが利用			バンテン、ゾウが利用		
		1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2	3
ボルネオオランウー ( <i>Pongo</i> )	CR	17,668	4,114	8,376	12,639	0	0	0	0	0	0	0	0	0
マレーセンザンコウ ( <i>Manis javanica</i> )	CR	0	0	0	0	0	170	0	0	0	0	0	0	0
アジアゾウ ( <i>Elephas</i> )	EN	0	0	0	0	770	273	588	0	0	0	0	0	51,451
ボルネオバンテン ( <i>Bos javanicus</i> )	EN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	742
サンバー ( <i>Rusa unicolor</i> )	VU	121,743	175,972	150,855	150,434	91,757	1,791	29	62	10,354	84,063	8,883	14	18,044
ヒゲイノシシ ( <i>Sus barbatus</i> )	VU	1,838	375	8,465	1,442	582	0	0	0	64	57	0	160	217
他のシーケンス数		19	4,326	109	583	3,339	4,302	38	0	0	2,228	0	0	0
総シーケンス数		141,268	184,787	167,805	165,098	96,448	6,536	655	62	10,418	86,348	8,883	174	70,454

テン (*B. j. javanicus*)、ボルネオバンテン (*B. j. lowi*) の 3 亜種に分類されている。その中でボルネオバンテンは、飼育個体が存在せず、未だに核型も不明である。外貌は他の亜種と比較して体サイズが小さく、角の形状など形態的な違いが指摘されていた。しかし、ボルネオバンテンは家畜ウシとの交雑が懸念されるに留まり、遺伝情報は皆無であった。これまで我々は、糞由来の *Cytochrome b* および *D-loop* の一部配列を解析し、家畜ウシとの交雑の可能性が低いこと、他のバンテン亜種よりも別種のガウル (*Bos gaurus*) に近縁であることを示したものの (Matsubayashi et al. 2014)、情報量が少ないという問題があった。そこで我々は 2010 年にマレーシア・サバ州で密猟、放棄されたボルネオバンテンの成熟雄頭骨から臼歯を採取、その歯髄からゲノム DNA を抽出し Mt DNA の塩基配列を決定することで、先行研究の結果を検証した。

その結果、16,344 bp のボルネオバンテンの MtDNA を同定、最尤法により系統樹を作成したところ、先の我々の結果を支持するものであった (図 1 ; Ishige et al. 2016)。したがって、対象としたボルネオバンテンは純血種であり、ボルネオバンテンが他の亜種とは遺伝的に離れていることが明確になった。以上から、早急にボルネオバンテン保全対策に取り組むこと、核ゲノム情報も考慮して分類を再検討することの必要性を示した。

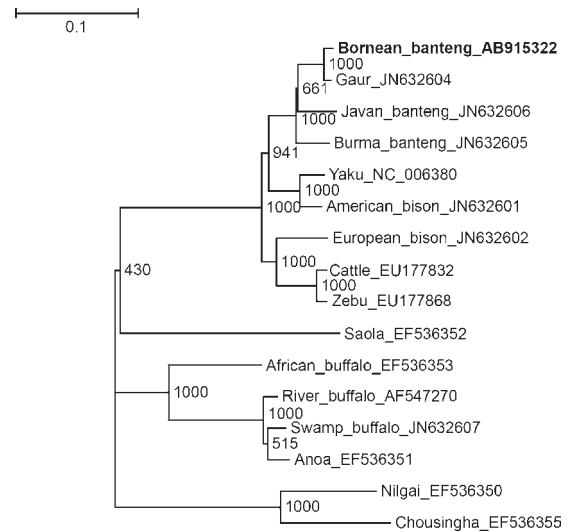


図 1 ボルネオバンテンと近縁種の Mt DNA 系統樹 (Ishige et al. 2016)

- 松林尚志 (農学部 バイオセラピー学科)
- 潮 雅之 (京都大学 生態学研究センター)
- 宮 正樹 (千葉県立中央博物館)
- 半澤 恵 (農学部 畜産学科)
- 覚張隆史 (金沢大学 国際文化資源学研究センター)
- Peter Lagan (マレーシア・サバ州森林局)
- Abdul Hamid (サバ大学 熱帯生物学保全研究所)
- 石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)



## ワカサギの *de novo* シーケンス解析

食用魚、そして釣りの対象として親しまれているワカサギとチカは、形態的に類似するが、腹鰭の位置、脊椎骨数、縦列鱗数、鰓耙数などに差異が認められる。ワカサギは、腹鰭が頭部側に位置し、チカは前者より腹鰭が尾部側に位置する。そこで、腹鰭位置の頭部側移動を解明すべく、受精研究の権威ハワイ大柳町教授らとともにワカサギおよびチカの交雑種 (F1)、ひいて F1 とワカサギ戻し交配種 (N4 まで作製済) を作製した。頭蓋骨の後端に接続する体節から腹鰭基部まで測定したものを腹鰭位置としたところ、F1 における腹鰭位置は、親チカと親ワカサギに対して中間位置を示し、それぞれと有意差が認められた。いっぽう、戻し交配第一世代 N2 の腹鰭位置は、親チカのそれと有意差が認められたが、親ワカサギのそれとは差がなかった。これらのことから、F1 の腹鰭位置はチカ側つまり尾部側に移動するが、ワカサギと戻し交配を重ねた世代は継代ごとに、ワカサギ側つまり腹鰭位置が頭部側に戻ることを示唆された。そこで、ワカサギ・チカ形態形質の遺伝的な差異をあきらかにするため、現在、申請者らは次世代シーケンサーを用いて、ワカサギゲノムの *de novo* シーケンシングを行っている。今後は、ワカサギゲノムの *de novo* アセンブリを行い、ワカサギとチカ交配種の戻し交配種を用いて、QTL-seq 法により、腹鰭位置の頭部側移動に関する新規因子を探索する予定である。本研究の成果は、これまで不明であった腹鰭位置の頭部側移動機構の糸口を掴むことができると期待している。



図1 ワカサギ (上) とチカ (下)

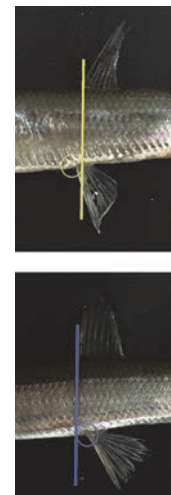


図2 ワカサギ (上) とチカ (下) の腹鰭位置  
ワカサギは腹鰭起部 (黄丸) が背鰭起部直下 (黄線) より頭部側に位置し、チカは腹鰭起部 (青丸) が背鰭起部直下 (青線) より尾部側に位置する。

松原 創 (生物産業学部 アクアバイオ学科)  
 矢嶋俊介 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
 野口英樹 (情報・システム研究機構)  
 川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

# トランスクリプトーム解析によるマガキ (*Crassostrea gigas*) の遺伝的地域特性の解明

気候変動下における生物の応答を予測し、効果的に対応していくことは、人類が目指すべき持続可能な開発目標（SDGs）の一つである。例えば、温暖化のような影響は、生物の分布範囲を高緯度方向へシフトさせていくと予測される。このような変化は生物資源においても関係し、各地域ではこれまで利用してきた生物種や遺伝品種からの転換を迫られるかもしれない。農作物等と比較すると水産生物の多くは空間的に（緯度や水深など）広く分布する種が多いため、このような気候変動の影響や、それに応じた対応策については十分に検討されていない。

本研究の最終目的は、マガキ (*Crassostrea gigas*) をモデル生物として、地域集団（局所個体群）の遺伝的特性を明らかにし、地域ごとに効果的な増養殖および保全手法の提案を行うことにある。マガキは亜寒帯から亜熱帯まで広く分布する固着性の二枚貝である。また本種は、日本はもちろんのこと、ヨーロッパや北米においても養殖されており、世界で最も生産されている貝類種でもある。特に、国外での養殖マガキの多くは宮城県産のマガキを原種としている点でも興味深い材料と言える。一見するとこれらの事実は、マガキが様々な環境、あるいは環境変化に対して可塑的に（柔軟に）応答できる能力を備えているように思える。しかしその一方で、気候変動に起因すると考えられる地域的な採苗不良や大量死なども報告されており、マガキの環境応答は分布域を通して一様とは言いがたい。つまり、広く分布する（養殖されている）マガキと言えども、それぞれの環境に対してどのように応答しているか、すなわち可塑的応答なのか、遺伝的变化を伴う適応的（進化的）応答なのかはよく分かっていないのである。マガキを用いてのこの課題解明は、マガキの地域遺伝資源の保全のみならず、効果的な養殖や増殖手法にも大きく貢献するはずである。



網走市に生息する天然マガキ。殻長30 cm を超えるものも多い。

さらに、広い分布域を有する他の貝類や水産有用種にも応用可能な普遍的知見をもたらすだろう。

本研究の最終目的へ向けた第一段階として、マガキの地域的遺伝特性を比較する上で有効なマーカー開発を行った。2017年の夏から解析を始めた段階にすぎないが、そこでは表現型（貝殻形態）の大きく異なる天然マガキを国内の複数の地域から採集し、既に公開されているマガキの全ゲノム配列情報をリファレンスとして一塩基多型（SNP）の探索を行った。その結果、我々の想定以上にマガキには多くのSNPがあることを発見した。この情報を基に、特定の遺伝子を有する個体および個体群を探索するための有用な遺伝マーカーを選抜していく予定である。今後は、日本の北限および南限の天然個体群、海外で養殖されている個体群等も対象に加え、マガキの遺伝的地域変異、特に環境に適応進化した証拠を探索していく予定である。

千葉 晋（生物産業学部 アクアバイオ学科）



## マウスモデルを用いたウェルニッケ・

## コルサコフ症候群におけるビタミン B1

## 欠乏誘導性記憶障害の分子機構の解明

必須栄養素の一つであるビタミン B1 (B1) は糖代謝系や ATP 産生に対する補酵素として機能する。B1 の欠乏による末梢神経の障害として脚気が知られている。重要な点として、B1 欠乏がさらに進行すると、不可逆的な記憶障害を病態とするウェルニッケ・コルサコフ症候群を引き起こす。しかし、B1 欠乏誘導性の記憶障害を導くメカニズムは未だ不明である。我々のグループでは、B1 欠乏による記憶障害の性状とその発症メカニズムを解析してきた。現在までに、B1 欠乏から回復させたマウス (B1 欠乏回復マウス) では、慢性的な海馬依存性記憶形成能力の障害が観察され、この記憶障害が永続的であることから、B1 欠乏回復マウスはウェルニッケ・コルサコフ症候群モデルとなることを示した。続いて、B1 欠乏によりマウス海馬ニューロンの欠落と樹状突起スパイン密度の減少が誘導されることを示し、海馬の変性が B1 欠乏による記憶障害の原因であることを示唆した。現在、B1 欠乏による記憶障害と海馬変性の分子メカニズム解明を目的として、次世代シーケンサーを用いて、B1 欠乏マウス海馬におけるトランスクリプトーム解析を実施している。

野生型マウスに B1 欠乏飼料を 10 日間給餌し、この間 B1 アンタゴニストであるピリチアミンを連日腹腔内投与し、B1 欠乏状態を誘導した (B1 欠乏マウス)。その後、通常飼料を 3 週間以上給餌し、B1 欠乏状態から回復させた。B1 欠乏マウス並びに B1 欠乏回復マウス海馬のトランスクリプトーム解析の結果、最初期応答遺伝子群、グルタミン酸受容体群やスパイン制御因子群を中心とした記憶関連遺伝子群、さらに、炎症関連遺伝子群の発現に異常が起こっていることが示唆された。さらに、定量的 RT-PCR を用いて、詳細な発現解析を行った結果、B1 欠乏マウスでは炎症性サイトカイン群の mRNA 量の有意な発現上昇が観察された。一方、B1 欠乏回復マウス海馬では、神経活動依存的に転写調節因子 cAMP-responsive element binding protein (CREB) を介して発現誘導される最初期応答遺伝子群の mRNA 量の有意な発現低下が観察され、さらに、CREB によって発現誘導される脳由来神経栄養因子の転写も抑制されることが明らかになった。以上の結果から、B1 欠乏により海馬に炎症が誘導され、CREB 情報伝達系に継続的な障害が残り、その結果、記憶能力が低下する機構の存在が示唆された。現在、発現解析を継続し、B1 欠乏誘導性記憶障害の分子機構に迫っている。

さらに、マウス遺伝学的手法を用いて、トランスクリプトーム解析結果の妥当性も検証している。我々は、CREB は記憶形成に必須であることを示し (Nat. Neurosci., 2002)、前脳特異的に活性化型 CREB 変異体を発現したマウス (DIEDML マウス; J. Neurosci., 2011) は高い記憶能力を示すことも明らかにしている。そこで、この DIEDML マウスに B1 欠乏を誘導し、その性状を解析した。その結果、DIEDML マウスでは B1 欠乏を誘導してもニューロン数の減少並びに樹状突起スパイン密度の減少、すなわち、海馬の変性が誘導されないこと、一方、海馬依存性記憶障害も起こらないことが示された。従って、B1 欠乏が CREB 情報伝達系の減退を介して慢性的な記憶障害を誘導するのに対して、CREB 活性化により B1 欠乏誘導性の海馬の変性と記憶障害の進行を阻害できると考えられた。また、DIEDML マウスを用いた解析から、B1 欠乏誘導性記憶障害の原因が CREB 情報伝達の低



下に起因するとの結論が強く支持された。

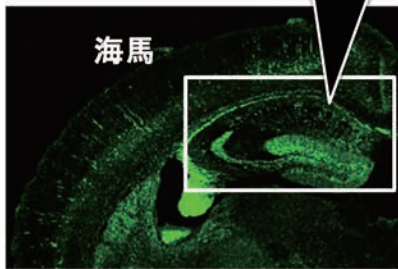
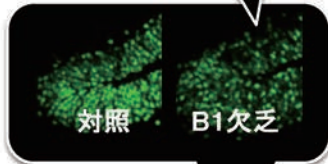
### ウェルニッケ・コルサコフ症候群モデルマウスにおける ビタミンB1欠乏による記憶障害のメカニズム

#### (A) B1欠乏による海馬の変性

樹状突起スパインの減少

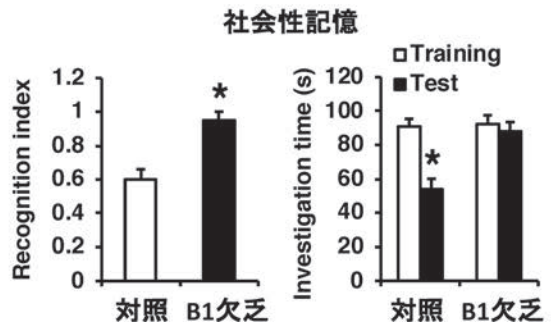
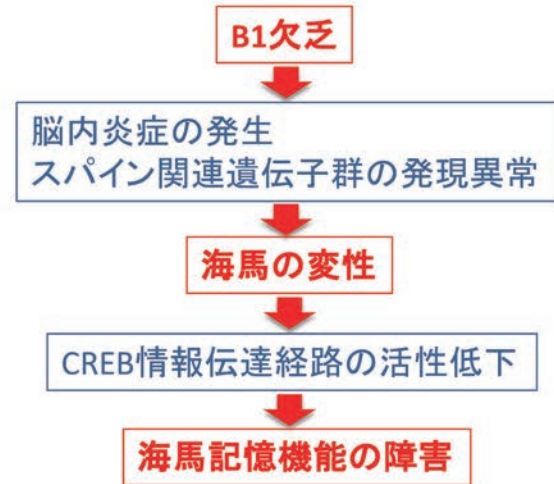


ニューロンの欠落



正常なマウス脳(Thy1-GFPマウス)

#### (B) B1欠乏による海馬変性と記憶障害を導く メカニズム(トランスクリプトーム解析の考察)



喜田 聡 (生命科学部 バイオサイエンス学科)



## 高質な胚生産のための培養環境の構築に関する研究

卵子は周囲を取り囲んだ顆粒層細胞との相互作用の下成長する。この細胞数は加齢や肝疾患を有するなど生理状態が減退した個体の卵胞で減少する。このような個体の卵子は総じて質が悪く、発生能力も低く、卵子成長のマーカーとして用いられる ATP、脂質、卵核胞期のアセチル化状態が低調である。成長時期の異なる卵胞から採取した顆粒層細胞を用いて RNA-seq を行うと顆粒層細胞には解糖の亢進が認められ、卵胞中の酸素状態を模した体外培養系を用いて行った検討からは、細胞増殖には HIF1-VEGF を起点とした AKT-mTOR の活性化が必要であることが分かった。このシグナルはインスリンやグルコースなどの添加物によっても活性化させることができ、この条件下で 2 週間培養した初期卵胞由来の体外発育卵子は、これを取り囲む顆粒層細胞数が増加し、卵子の ATP、脂質含量や、アセチル化状態が高く、発生能力も高いことが分かった。この卵子を取り巻く細胞数と体外発育した卵子のエネルギー状態やその発生能力間の関係は、初期卵胞由来卵子をマトリックスなど異なる培養条件下で培養した実験、または細胞を人為的に卵子顆粒層細胞に追加して増加させた実験によっても確認できた。

卵胞内の顆粒層細胞数を決定している要因の探索として卵胞を満たしている卵胞液を培地に添加して検討を行った。卵胞液の発生支持能力は、卵胞液を回収した卵胞中の顆粒層細胞数と非常に高い相関関係にあった。顆粒層細胞の多いもしくは少ない卵胞の顆粒層細胞を用いて RNA-seq を行うと EGF、IGF1、FSH、cAMP-PKA、GATA4-E2 といった上流因子が同定され、これらは個々に卵胞発育への重要性が示唆されていた物質であった。また上流因子として同定された miRNA は、卵胞液中のエキソソーム分画を用いた small RNA-seq によっても同様に卵胞液への高含有が示されたものであった。さらに発育ステージの異なる卵胞から得た顆粒層細胞を用いて行った RNA-seq では、発現の異なる遺伝子を同定することが出来、これらを用いた IPA によっても上記と同様の miRNA を推定することが出来た。卵胞液を培地に添加した場合、卵子発育は未添加に比べて大きく改善されるがエキソソーム分画を除去した卵胞液ではこの能力は減衰する。このため卵胞液中に存在する miRNA が卵子形成に重要な意義を有していると考えている。今回の検討では、卵子や卵胞の成長には顆粒層細胞の数が非常に重要であり、卵胞液の成分がこれを決定づけている事、さらにこの成分による cAMP-PKA-GATA4-Estradiol シグナルや EGF の下流シグナルの活性化が卵胞の発育と卵子の発生能力の獲得に必要なこと、さらに卵子顆粒層細胞の発育を左右する miRNA を同定することが出来た。

岩田尚孝（農学部 畜産学科）

## 老化がウシの妊孕性に与える影響と

### その制御に関する研究

加齢に伴い動物の卵の能力は低減する。先進国ではライフスタイルの変化に伴い、妊娠に臨む年齢が高齢化し、その低妊孕性の解決は喫緊の課題である。卵子の加齢に伴う低質化の原因探索のため、ヒトと卵胞選抜過程、受精後のゲノムの活性化時期がよく似て、繁殖年限が長く、加齢個体が明確にわかるウシを用いて卵子に起こる変化を詳細に観察した。高齢個体の卵子内ではミトコンドリア数の減少、酸化ストレス関連遺伝子の発現変化、異常授精率の増加が観察された。また卵子を取り巻く細胞数が著しく減少し、その増殖性が低下する。そのため卵子に供給されるエネルギーが減り卵子内脂質含量、アセチル化、そしてATP含量が減少することが明らかになった。また、初期胞状卵胞から未発育卵子を回収しても、同様にミトコンドリア数や体外発育能力の減退が観察され、さらに卵子を取り巻く顆粒層細胞の遺伝子発現プロファイルが退行卵胞様になっていることが分かった。

このような加齢に伴う卵子異常の原因を調べるために、最初に卵子や顆粒層細胞のテロメア長を測定したところ、顆粒層細胞、卵子両者において加齢に伴うテロメア長の短縮が認められ、細胞数が少ない原因の一つと考えられた。また卵子を取り巻く卵胞液の成分では、加齢個体の卵胞液には大量の糖最終産物が含まれていることが分かった。加齢個体から採取した卵胞液や糖最終産物を添加した培養条件では、若齢個体由来の卵子にさえ、加齢様の異常を惹起することが出来た。また加齢個体の卵胞液中ではエストラジオール (E) の濃度が低く、Eは卵胞の形成に重要な役割を持っていること、加齢個体の初期胞状卵胞卵子はEの添加によりその発育が改善しミトコンドリア数が増えることが分かった。このことから加齢卵子は、卵子自身に年齢依存的に蓄積する異常と周りの環境から副次的に惹起される異常があり、後者については培養条件の改変によって改善できることが示された。

卵子そのものに蓄積する異常に対して検討を行ったところ、卵子内ミトコンドリアゲノムに加齢に伴う変異が蓄積することが明らかになった。また卵子内部のミトコンドリア数や質は、品質管理機構に管理されているが、卵子内部のSIRT1活性を上昇させることでこれに介入できることが明らかになった。薬剤を用いてミトコンドリアに障害を与えるとSIRT1の発現上昇と卵子のミトコンドリアの品質管理機構が活性化し、卵子の質が維持されたが、面白いことに加齢個体ではミトコンドリア障害に対する品質管理機構のレスポンスが減退していることが明らかになった。レスベラトロールを用いてSIRT1の活性化を促すと、加齢個体由来の初期胞状卵胞卵子では体外発育後に卵子中のミトコンドリア数が増加し、発育能力が改善すること、周囲の顆粒層細胞の遺伝子発現プロファイルは退行卵胞様から正常卵胞様に変化することが分かった。体外成熟卵子のSIRT1活性化は、異常受精率を減少させた。さらに初期胚に対しては加齢、若齢にかかわらずミトコンドリアの機能を改善し胚の体外発育を改善し、胚に含有される脂質量を減少させた。これらの胚は凍結後の生存率と移植後の受胎率が有意に改善していた。これらの結果より加齢に伴う卵子自身の質低下も、ミトコンドリアの質改善を介して改善させる可能性を示せた。

岩田尚孝（農学部 畜産学科）

## NGSを用いたニホンウズラの環境応答遺伝子の解析

ニホンウズラ (*Coturnix japonica*) は世界で 1500 億羽が飼養されている主要家禽：ニワトリをはじめとする水禽を除く家禽と同じキジ科に属する。さらに早熟・小格で高い産卵能力および産肉能力を有することから、家禽および実験動物としてその有用性は高い。本研究ではニホンウズラの環境応答能、特に優れた抗病性および耐暑性に着目し、関連遺伝子を解析した。具体的には自然免疫に関わる宿主防御ペプチド (Host Defense Peptide; HDP)、獲得免疫に関わる主要組織適合性複合体 (Major Histocompatibility Complex; MHC)、ならびにストレス応答に関わる熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein; HSP) を対象とした。さらに免疫応答との関連も鑑み腸内細菌叢 (Intestinal Flora; IF) も解析し免疫応答、特に HDP との関連についても解析した。腸管は生体内で最大の免疫器官であり、かつ体細胞数に匹敵する数の細菌が共生する。IF は免疫応答に対して積極的な影響を及ぼし、このことが個体の抗病性および炎症・アレルギー反応を左右することが知られている。そこで、抗菌活性を有する HDP、抗体産生を通じて IF を制御する MHC、ならびに炎症時の発熱等のストレス応答に関与する HSP について、それらの遺伝的多様性を把握し、環境適応能の向上に活用することを目的とした。なお HDP と IF の解析については、別稿を参照されたい。また、HSP については HSP90AA1 の Splicing Variant の検出を試みたが、NGS で塩基配列を決定しうる read 長の関係から、その全容を明らかにすることはできなかった。そこで本稿ではニホンウズラ MHC に関する研究成果を紹介する。

ニホンウズラの MHC クラス I  $\alpha$  (*Coja-IA*) およびクラス II  $\beta$  (*Coja-IIB*) 遺伝子座は、他のキジ科鳥類に比べて極めて冗長な重複を示す。また、各々の遺伝子座の数に Copy Number Variation (CNV) が認められ、さらに遺伝子座間に転写量の差異が存在する。以上の成果は、遺伝子座に共通するプライマーで増幅した RT-PCR 産物を Cloning 後、Sanger sequencing (PCS) して得られたものである。PCS では手間や経費の点で転写量の低い遺伝子座を完全に検出しうるデータ量を得ることが困難であった。また共通プライマーで増幅し得ない遺伝子座の存否は確認できなかった。今回はニホンウズラ MHC 領域において極めて多型性に富みかつすべてのハプロタイプに検出される *Coja-IIB* (*DBB1*) を含む 8 遺伝子座のアレルタイピングに基づき決定した 4 種ハプロタイプ：*MhcCoja\*01*、*\*03*、*\*04* および *\*05* を解析対象とした。*Coja-IA* は各 locus / allele を識別しうる可変領域 (exon2: 196bp または 202bp、ならびに exon3: 273bp) をカバーする PCR 産物のサイズが 469bp ないし 475bp であり、NGS にて精度良く全長の塩基配列を決定することが困難である。したがって本研究では、Sanger sequencing で過去に得たデータを、RNA sequencing で MHC に対するプライマーの影響を受けずにすべての転写産物の塩基配列を決定し、その中から塩基配列の相同性に基づき抽出した *Coja-IA* 遺伝子配列を既知配列と比較することで *Coja-IA* 遺伝子座の数と各遺伝子座の転写量の多寡を解析した。一方、*Coja-IIB* は可変領域 (exon2、270bp) をカバーする RT-PCR 産物 (411bp または 441bp) の Amplicon sequencing によって十分なデータ量を得、さらに RNA sequencing のデータから *Coja-IIB* 遺伝子配列を抽出し、その両者を比較することで *Coja-IIB* 遺伝子座の数と各遺伝子座の転写量の多寡を解析した。

表 1 に示すように *Coja-IA* および *Coja-IIB* 共に出現頻度の高い主働遺伝子座および低い微働遺伝

Table 1 Comparison of the apparent frequencies (%) of transcribed *Coja-IA* and *Coja-IIB* alleles among four MhcCoja haplotypes

MHC\HT	Tr level	*05	*01	*03	*04	Com	Tot	Size (bp)
<i>Coja-IA</i>								
Sanger-Seq	Major	2	2	2	4	0	10	469,475
	Minor	1	3	1	2	3	4	469,475
+RNA-Seq	Minor	8	3	3	2	1	15	270±30
Total		11	8	6	8	4	29	
<i>Coja-IIB</i>								
Ampli-Seq	Major	1	2	2	3	0	8	411,441
	Minor	10	10	4	0	1	23	411
+RNA-Seq	Minor	3	2	7	1	3	16	158±16
Total		14	14	13	4	4	47	

HT: haplotype. Tr level: Transcription level. Com: common. Tot: total.

Major & Minor: The apparent frequency of more than 10% is defined as Major, and less than 10% is defined as minor.

子座の数にハプロタイプ間差が認められた。したがって、両遺伝子の構成は極めて多様性に富み、ひいては個体の免疫応答能にも大きな個体差をもたらすことが推察される。これらニホンウズラの MHC 領域の多様性は、最小不可欠 MHC とも呼称されるニワトリ MHC 領域とは対照的である。ニホンウズラの MHC 領域はニワトリ MHC 領域に比べて LINE、LTR および Minisatellite など多様な反復配列、ならびに組換えホットスポットモチーフ配列が検出されており、これらが MHC 領域の CNV を惹起すると考えられる。ニホンウズラは渡り鳥であることから、留鳥であるニワトリに比べて多様な抗原に晒されることに適応して野生ウズラ集団に生じた MHC 領域の多様性が正の選択圧を受けてきた可能性がある。さらに、ニホンウズラはニワトリに比べて家禽としての改良度が低いいため、野生種が保有する遺伝的多様性が家禽化後も残存しているとも考えられる。

また、RNA sequencing で新たに検出された配列はいずれも微働遺伝子であったが、その数は少なくなかった。したがって、RT-PCR で用いたプライマーで増幅し得ない遺伝子座が多数存在することが示唆され、long read の sequencer を駆使したゲノム解析が必要である。

NGS によりニホンウズラ MHC ハプロタイプの概要が明らかとなった。今後、ハプロタイプを固定した個体を用いた IF 解析や免疫応答試験を実施することで、ハプロタイプ間の *Coja-IA* および *Coja-IIB* 遺伝子構成の変異が MHC の抗原提示能に及ぼす影響、ひいてはニホンウズラの免疫学的特性の解明を通じて、家禽の生産性向上の一助となることが期待される。

朝治桜子 (ジェノダイブファーマ)  
 細道一善 (金沢大学 医薬保健研究域医学系)  
 鈴木進悟 (東海大学 医学部)  
 原ひろみ (農学部 畜産学科)  
 平野 貴 (農学部 畜産学科)  
 椎名 隆 (東海大学 医学部)  
 半澤 恵 (農学部 畜産学科)  
 石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)



# Amplicon sequencing によるニホンウズラ

## 宿主防御ペプチド解析と腸内細菌 metagenome

Amplicon sequencing は、特定のゲノム領域にみられる遺伝的変異を解析する高度なターゲット手法である。PCR 産物 (Amplicon) の超 deep sequencing により、効率的な変異検出および特性解明が可能であり、Metagenome 解析、環境 DNA 解析などの Tailed PCR 法と長鎖 (~ 30 kbp) を対象にした Long Range PCR 法との 2 種類がある。

我々は、日本で唯一家畜化されたニホンウズラの抗病性の向上を目的に、自然免疫・体液性免疫のもっとも重要な分子群である宿主防御ペプチド (Host Defense Peptide; HDP) に注目している。他の哺乳類および鳥類では、HDP の遺伝的多様性が抗菌活性や免疫応答に影響を与えることが報告されていることから、HDP は抗病性育種のマーカー変異になりうると考えられる。そこで、本研究ではニホンウズラを対象に、まず鳥類の主要な 4 群 HDPs、すなわち NK-lysin (NKL)、Liver expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2)、cathelicidin (CATH) 遺伝子領域、Avian  $\beta$ -defensin (AvBD) 遺伝子領域の同定・構造解析を実施した。ついでニホンウズラ成熟雄 99 個体を対象に、Amplicon sequencing を用いてこれら HDPs の遺伝的多様性を解析し、NKL および CATH に検出した抗菌領域の合成ペプチドを用いて大腸菌に対する抗菌試験を実施した。さらに NKL および CATH の抗菌領域のアミノ酸配列と Metagenome 解析で検出した盲腸糞由来細菌叢 (Intestinal Flora; IF) との関係进行调查した。

### [構造・多様性]

NKL の抗菌領域に Net charge を変化させるアミノ酸置換 (G31D) を検出した。LEAP-2 の抗菌活性領域のアミノ酸配列はニワトリのそれと一致し、変異は確認されなかった。CATH 遺伝子領域はニワトリのそれと synteny を有し、CATH3、CATH2、CATHB1 および CATH1 の 4 遺伝子座により構成されていた。CATH3 および CATH1 の抗菌活性領域にはアミノ酸置換は検出されなかった。一方、CATH2 の抗菌領域には 6 個のアミノ酸置換 (I140V、I145F、A147T、Q148H、V149I および G150A) が検出され、それらに基づき 3 種類のアミノ酸配列 (IIAQVG、IIAQIG および VFTHVA) が確認された。さらに I145F および Q148H は、ペプチド機能解析 Software: PROVEAN および PolyPhen-2 により機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、CATHB1 の抗菌領域には機能に影響を及ぼす可能性のあるアミノ酸置換 (P245H) が検出された。AvBD 遺伝子領域は基本的にはニワトリのそれと synteny を有し、AvBD13、AvBD12、AvBD11、AvBD10、AvBD9、AvBD8、AvBD101-1~AvBD101-5、AvBD2、AvBD1、AvBD5、AvBD4 および AvBD14 の 12 ~ 16 遺伝子座により構成されていた。しかしニワトリと異なり AvBD3 および 7 が欠損し、一方 AvBD101 の遺伝子座数が 1 ~ 5 個と、ニワトリ (2 または 3 個) に比べて大きな Copy Number Variation (CNV) を示した。さらに AvBD13、AvBD12、AvBD10、AvBD101、AvBD2、AvBD4 および AvBD14 に非同義置換が検出され、AvBD13、AvBD101、AvBD4 および AvBD14 は、抗菌活性の 1 つの指標となる net charge にハプロタイプ間で差があることが確認された。また、これらのうち AvBD13: R33H、AvBD101: V25A、および AvBD4: I1R は抗菌領域の機能に影響を及ぼすアミノ酸置換であることが示唆された。

[抗菌活性]

NKL : 31G は Net charge の低い 31D に比べて強い抗菌活性を示した。また、CATHB1 : 245P は 245H に比べて強い抗菌活性を示した。一方、CATH2 では 3 種類のアミノ酸配列 (合成ペプチド) 間に抗菌活性の差は認められなかった。

[HDP 多型と IF]

全体で菌種に相当する operational taxonomic unit (OTU) は 5233 個検出された。NKL : 31G の *Coriobacteria* 科に分類された 1 個の OTU の出現頻度は 31D に比べて有意に低かった。CATH2 : 3 種類のアミノ酸配列の間で *Lachnospira* 科に分類された 1 個の OTU の出現頻度に有意な差が認められた。CATHB1 : 245P の *Succinivibrionia* 科、*Lachnospira* 科および *Veillonella* 科に分類された各 1 個の OTU の出現頻度は 245H に比べて有意に低かった。また、CATHB1 で出現頻度に有意差が認められた *Lachnospira* 科に分類された OTU は、CATH2 で出現頻度に有意差が認められた *Lachnospira* 科の OTU と同一であった。また、メタゲノム解析では大腸菌は検出されず、同じ *Enterobacteriaceae* 科の *Shigella* 属に属するものが検出された。これは、NKL および CATHB1 の抗菌活性とは逆の結果を示した。

ニホンズウラの主要 4HDPs、NKL、LEAP2、CATHs および AvBDs の遺伝子構造とその多様性を明らかにすると共に、NKL および CATHs の多様性は抗菌活性ならびに腸内細菌叢に影響することを示唆した。本研究の成果は、家禽の抗病性向上ならびに腸内細菌叢の制御を通じた生産性向上に活用しうる。

Table Evaluation of substitution and diversity of net charge in four major quail HDPs

Gene	NKL	LEAP2	CATH				AvBD												
			CATH3	CATH2	CATHB1	CAHT1	AvBD13	AvBD12	AvBD11	AvBD10	AvBD9	AvBD8	AvBD101s	AvBD2	AvBD1	AvBD5	AvBD4	AvBD14	
Evaluation of substitution																			
PROVEAN	N	-	-	D	D	-	D	N	-	N	-	-	-	D	N	-	-	D	N
PolyPhen-2	B	-	-	D	D	-	D	B	-	B	-	-	-	D	B	-	-	D	B
Net charge																			
Min	1.9	3.7	7.0	9.0	8.1	8.0	3.0	3.7	5.5	0.8	3.7	-0.1	6.8	4.7	6.7	1.7	4.8	5.8	
Max	2.9			9.1	8.2		4.9						9.7				5.8	6.8	
PROVEAN :	"N" indicates neutral.		"D" indicates deleterious.																
PolyPhen-2 :	"B" indicates benign.		"D" indicates damaging.																

- 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)
- 石毛太一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

# ダイズシストセンチュウ孵化促進物質、 誘引物質に関する研究

ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines* Ichinohe) は、大豆や小豆、インゲンなど、豆科植物を宿主とする根寄生線虫の一種です。1952年、日本にて新種の植物寄生線虫であることが報告され、命名されました。現在、日本をはじめ、大豆の主要生産国である中国やブラジル、アメリカなどで被害の発生が報告されています。アメリカにおける統計では、大豆生産上、最大の減収要因であると推測されています。本線虫の特徴として、宿主の存在を認識するまで、土壤中でシストと呼ばれる殻に覆われて休眠しており（図1）、乾燥、薬剤に強い耐性があるため、数年間にわたり生存することができます。そのため、輪作の効果が上がりにくく、既存の農薬では防除が難しい状況にあります。一方で、宿主が存在する時には、宿主根から分泌される孵化促進物質を受容することで、移動性の幼虫となり、シストを脱出して根へ移動し、寄生することが知られています。しかし、本線虫がどのようにして孵化するのか、幼虫がどのように根の位置を認識し、行動制御を行っているのか、そのメカニズムは明らかになっていません。本線虫の孵化・誘引行動を解明することで、寄生を防ぐ新しい防除法が確立できると考えられます。そこで我々は、孵化物質、誘引物質を処理した時に、どのような遺伝子が関与するのか、次世代シーケンサーを用いた解析を試みました。

現在までに孵化促進物質としてインゲン根より単離されたグリシノエクレピンが報告されていましたが、その他の報告はありませんでした。そこで、私たちは新たな孵化促進物質を同定するためにケミカルライブラリーをはじめとして種々の化合物からスクリーニングを行い、1,10-phenanthrolineに孵化促進効果があることを見出しました。また、1,10-phenanthrolineはグリシノエクレピンよりも早期に孵化を引き起こすことから、2つの化合物はそれぞれ異なった孵化機構を持つことも考えられます。また、誘引物質に関しても探索した結果、硝酸イオンを含む化合物や、そのアナログに対して誘引活性を示すことが分かりました。



図1 ダイズシストセンチュウのシスト（上）と孵化した二期幼虫（下）

以上のように、私たちは新規孵化促進物質、誘引物質を見出すことができたため、今回、本線虫の孵化機構、誘引機構に関与する遺伝子の同定を目的として、グリシノエクレピン、1,10-phenanthroline、硝酸イオンをそれぞれ処理した時の遺伝子発現変動を、次世代シーケンサーを用いて解析することにしました。また、本線虫はゲノム情報が構築されていなかったため、RNA-seqで得られたリードを用いて *de novo* transcriptome assembly を行いました。しかし、多型やコンタミネーションによるキメラ配列が多数見られたため、まずドラフトゲノムの構築を行うこととしました。現在、MiSeq やロングリードシーケンサーを用いたドラフトゲノムの構築と、遺伝子領域の推定を進めており、今後、各処理群における遺伝子発現変動の解析を行う予定です。

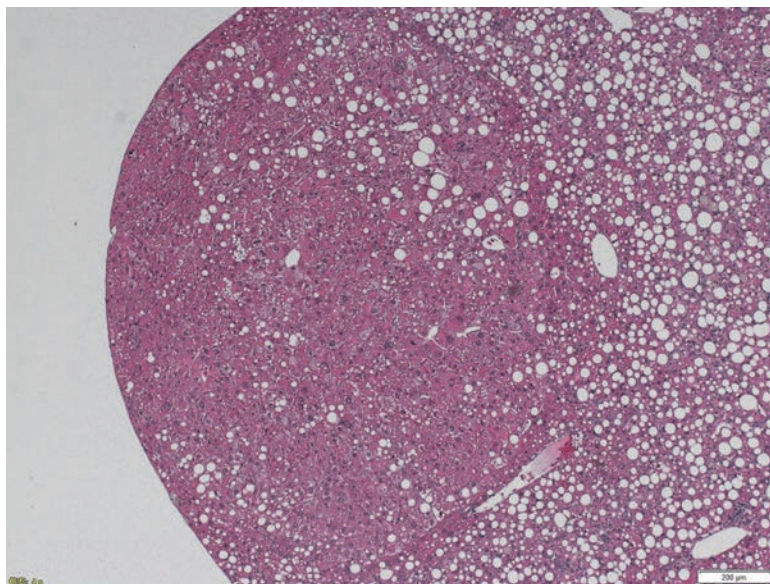
細井昂人（大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻）  
伊藤晋作（生命科学部 バイオサイエンス学科）



## 脂肪酸の質的特性とその病態制御機構の解明

メタボリックシンドロームに高頻度に合併する非アルコール性脂肪性肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis: NASH）は、多飲酒歴が無いにもかかわらず、脂質が肝臓に過剰に蓄積して慢性的な炎症が引き起こされ、肝細胞変性、壊死、線維化と進み、最終的にはがんの進展をもきたすものであり、社会的に大きく問題視されている生活習慣病の一つである。NASHは脂質の代謝異常が深く関わっており、どのような脂質、脂質代謝産物、脂質メディエーター等がリポトキシシティの病態形成因子として働くのかを見極めることは、NASH発症・進展の機序を探る上で重要である。

我々が開発したコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食（CDAA 脂質カロリー比45%）による食餌誘発性NASHモデルマウスにおいて、食事中の脂質原料を様々に変えて、3ヶ月または6ヶ月給餌した後にマウスの表現型を検討したところ、特定の脂質条件でのみ肝臓における増殖性病変が増加し、前がん病変の指標となるサイトケラチン8/18陽性細胞が増加していた。しかし一般的なNASH指標である炎症・酸化ストレス・線維化などといった遺伝子発現は他群とで変化がみられず、全く別のパスウェイが働いていると考えられた。そこで本研究は発現遺伝子をRNA-seqにより調べることで、その差異から関連する遺伝子、ネットワークを網羅的にとらえることを目的とした。現在までのところ、増殖性病変が発症する前段階でフェノタイプを裏付けるようなパスウェイ解析の結果が得られつつあり、その詳細について解析中である。このような知見から、将来的には脂質の摂取とNASH・肝がん発症の関係性について明らかにし、疾病予防のための食生活の一端を提案できればと考えている。



CDAA6ヶ月給餌 マウス肝臓でみられた増殖性病変

煙山紀子（応用生物科学部 食品安全健康学科）  
 美谷島克宏（応用生物科学部 食品安全健康学科）  
 中江 大（応用生物科学部 食品安全健康学科）



## 生後早期の子豚の便微生物叢の継時的变化、 ならびに飼料中の抗菌性物質による影響の解析

畜産領域において、幼若期における飼料への抗菌性物質の添加が通常化している。これは、生後間もない時期の下痢や感染症を予防することにより家畜の健全な生育を図る（生産性を高める）ことを目的としている。一方、飼料への抗菌性物質の添加より家畜（家禽）の常在細菌が薬剤に耐性化して環境に拡散することにより、ヒトにも水平伝播することが懸念される。そのため近年、畜産農家に対する抗菌性物質の適正使用に関する指導や、食品安全委員会による耐性菌の発生リスクの調査結果に基づく抗菌性飼料添加物のリスク管理措置などが実施されている。これに対し、抗菌性飼料添加が家畜の成長過程における腸内フローラに及ぼす影響については、その詳細は未だ不明である。この理由として、極めて多様で複雑な腸内フローラの精度の高い解析方法が確立されていなかったことが考えられる。

本研究は、抗菌性飼料添加が豚の成長期における腸内フローラの構築に与える影響を、分子生物学的手法（定量的 RT-PCR 法、MiSeq）により明らかにすることを目的とする。特に、生後早期から哺乳期以降の子豚の飼料への抗菌性物質の添加が、子豚の腸内フローラに与える影響を継時的に調べる。同時に、腸内フローラの機能的側面として、腸内有機酸濃度を定量的に測定する。腸内フローラ



哺乳中の対象豚（デュロック種、富士農場豚舎内）

の構造および機能の解析の結果と臨床的なマーカー（体重変化、臨床症状、血液生化学マーカー）との相関を明らかにする。この結果から、抗菌剤による子豚の腸内フローラや腸内環境形成のゆがみを明らかにするとともに、特定の微生物因子と子豚の成長の関連を探ることにより、抗菌剤に依存しない健全な腸内フローラの構築（例えば乳酸菌などのプロバイオティクス）による子豚の健康管理法の確立のための基盤となる情報を得る。

H29年6月より開始した観察研究では、農大富士農場で誕生した同腹の子豚（8-10例：抗菌剤含有飼料で飼育）について、生後1週目より開始して生後20週令まで経時的に採取された新鮮便の解析を実施した。その結果、16S rRNA 遺伝子を標的とする MiSeq 解析の結果、子豚の便中フローラは離乳期を挟んで有意に変化することを示唆する結果を得ている。便中の有機酸濃度についても同様の成長に伴う変化が認められている。今後は、末梢血中の生化学検査項目などとの相関解析を実施することにより、子豚の健全な成長に関与する腸内フローラ（環境）因子を明らかにしていきたい。

野本康二（生命科学部 分子微生物学科）

新村洋一（生命科学部 分子微生物学科）

池田周平（農学部 畜産学科）

野口龍生（農学部 富士農場）

笠原浩司（生命科学部 分子微生物学科）

細田浩司（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）

石毛太郎（生物資源ゲノム解析センター）

# NAK/Nokh ラットの無眼球症に関与する複数の遺伝子

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り、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と考えられる。

Nodai aphakia (NAK/Nokh) は東京農業大学生物産業学部において SD 系統から自然発症によって単離された劣性の無眼球ラットであり、兄妹交配により 50 世代以上にわたって系統維持されてきた (図 A、左)。これまでの表現型解析によって、我々は NAK ラットが胎子期の眼球発生異常により無眼球となること (図 A、中央・右)、野生型と比べて増体重および産子数の減少、妊娠期間の延長を示すことを明らかにしてきた。さらに我々は、NAK と一般的なラット系統との戻し交配個体がヒト小眼球症と類似した不均一な病態を示し、さらにそのパターンは交配する系統間によって大きく

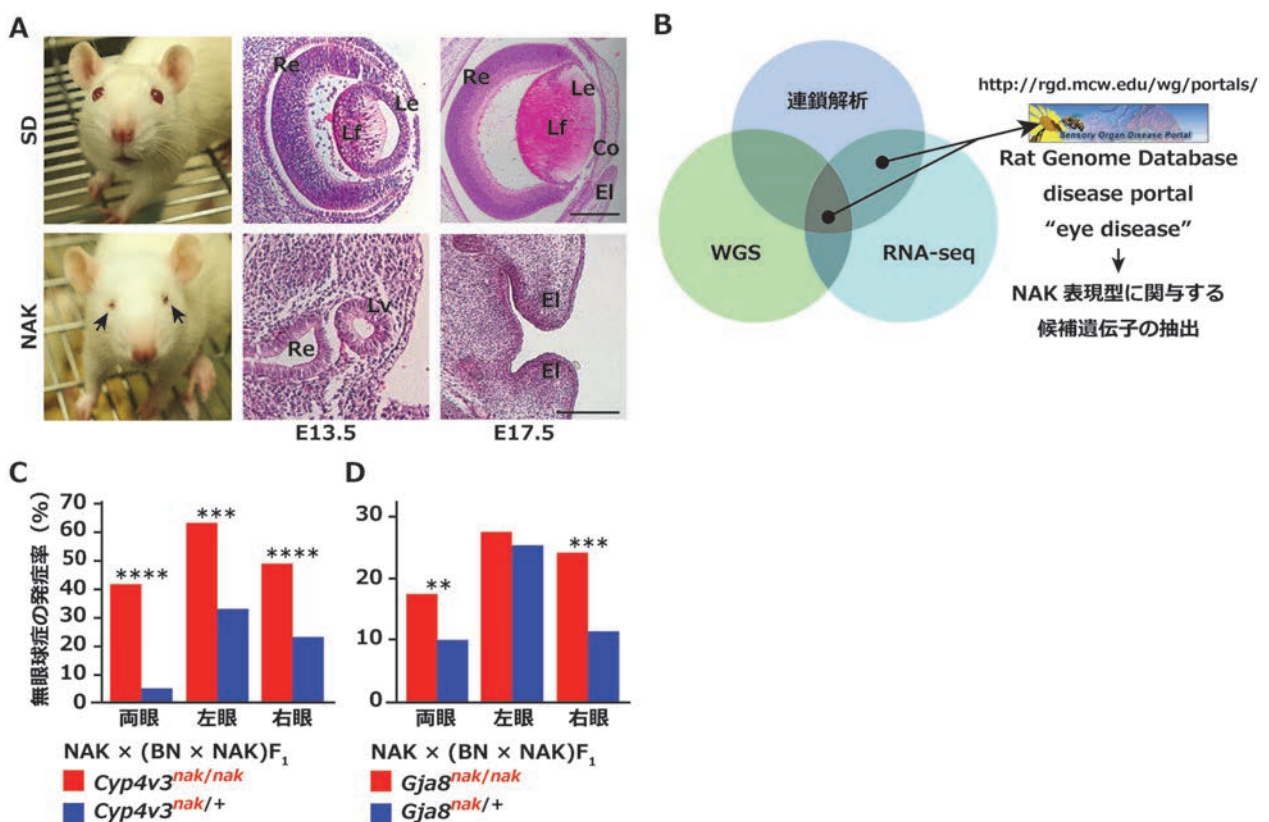


図 NAK ラットの無眼球症に関与する候補遺伝子

(A) NAK ラットの眼球表現型。矢印は完全に欠失した NAK の眼球組織を示す。

Le: 水晶体上皮、Lf: 水晶体繊維、Re: 網膜、Lv: 水晶体胞、Co: 角膜、EI: 瞼。スケールバー = 200 μm。

(B) 連鎖解析、WGS、RNA-seq および *in silico* 解析に基づく NAK 表現型に関与する遺伝子のスクリーニング。

(C と D) 検出された *Cyp4v3* および *Gja8* の変異と無眼球症の発症における関連解析。\*\*\*\*: P < 0.0001, \*\*\*: P < 0.001, \*\*: P < 0.01。

異なることも報告した。このような NAK ラットの眼球表現型は不均一な病態を呈するヒト小眼球症の有用なモデルとなることが期待された。

そこで本研究は、[NAK × (BN × NAK) F<sub>1</sub>] N<sub>2</sub> を用いた連鎖解析により NAK の小眼球症における責任遺伝子の同定を試みた。その結果、高い LOD スコアは第 16 番染色体および第 2 番染色体に検出され、NAK ラットの無眼球症が複数の遺伝的要因によって発症することが確認された。さらに、左眼の無眼球は第 16 番染色体に、右眼の無眼球は 2 番染色体にそれぞれ高いスコアが検出された。我々は、これらの染色体領域にコードされる遺伝子群について、WGS および RNA-seq 解析、ならびにサンガー法による変異解析を行った (図 B)。その結果、いくつかの遺伝子変異は、第 16 番染色体および第 2 番染色体にコードされる複数の遺伝子に検出され、*Tti2* のミスセンス変異、*Cyp4v3* の 3' 領域の大規模な欠失変異、ならびに *Gja8* のミスセンス変異は NAK 表現型に關与する有力な候補遺伝子であることが推測された。

そこで、検出された遺伝子変異と無眼球症の発症率との関連解析を行った結果、*Cyp4v3*<sup>nak/nak</sup> は両眼、左眼および右眼のすべてにおいて有意に無眼球症の発症に關連した (図 C)。一方、*Gja8*<sup>nak/nak</sup> は両眼および右眼の無眼球症と有意に關連し、特に右眼において強い關連を示した (図 D)。さらに、本稿にはデータを示していないが、これら遺伝子変異は、NAK の無眼球症の発症率において相加的な効果を有し、*Cyp4v3*<sup>nak</sup> が *Gja8*<sup>nak</sup> よりも優位に作用するエピスタシスの存在も示唆された。また、RT-PCR および *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果、*Cyp4v3* は眼球を含む多種の臓器に発現が検出され、*Gja8* は眼球に特に強い発現が認められた。以上の結果は、これら遺伝子が NAK の眼球表現型に關与することを強く示唆しており、本研究で得られた結果はヒト小眼球症の不均一な病態を引き起こす遺伝子変異および発症メカニズムの解明に有用な情報を提供することが期待された。

和田健太 (生物産業学部 生物生産学科)  
内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)





# ヒト染色体複製開始領域における

## サイクリン A と複製開始因子との相互作用解析

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* におけるヒト染色体複製開始領域での CycA-Mcm7 相互作用解析を行ってきた。

まず予備的解析として、ヒトがん細胞株 (U-2 OS) のクロマチン画分より、複製開始領域結合因子 Orc2、Mcm7、CycA 各抗体およびコントロール抗体 (IgG) を用いた ChIP-Seq を行い、染色体

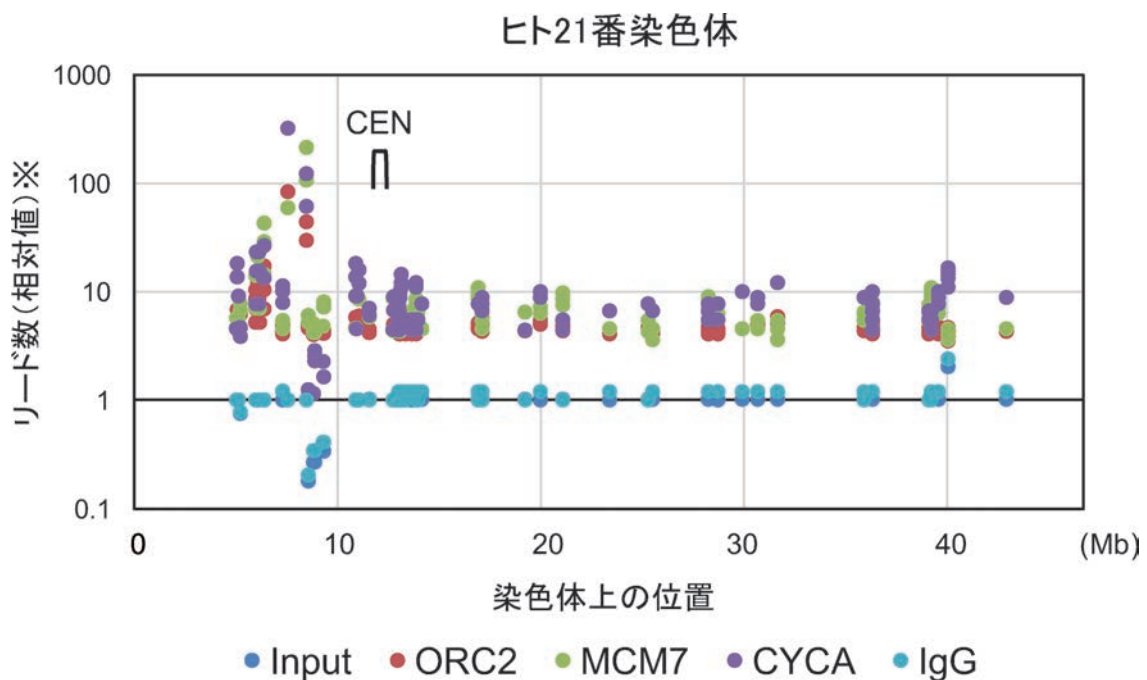


図1 ヒト21番染色体における Orc2、Mcm7、CycA 結合領域のマッピング

Input (免疫沈降前のクロマチン DNA サンプル) のシーケンスリードの平均を 1 とし、染色体上にマップされた各抗体による ChIP サンプルのシーケンスリード数の相対値を算出 (※) し、コントロール IgG サンプル (水色) のリード数と比較して Orc2、Mcm7、CycA 抗体サンプルが 4 倍以上の相対リード数を示す領域を散布図で示す。CEN: セントロメア領域

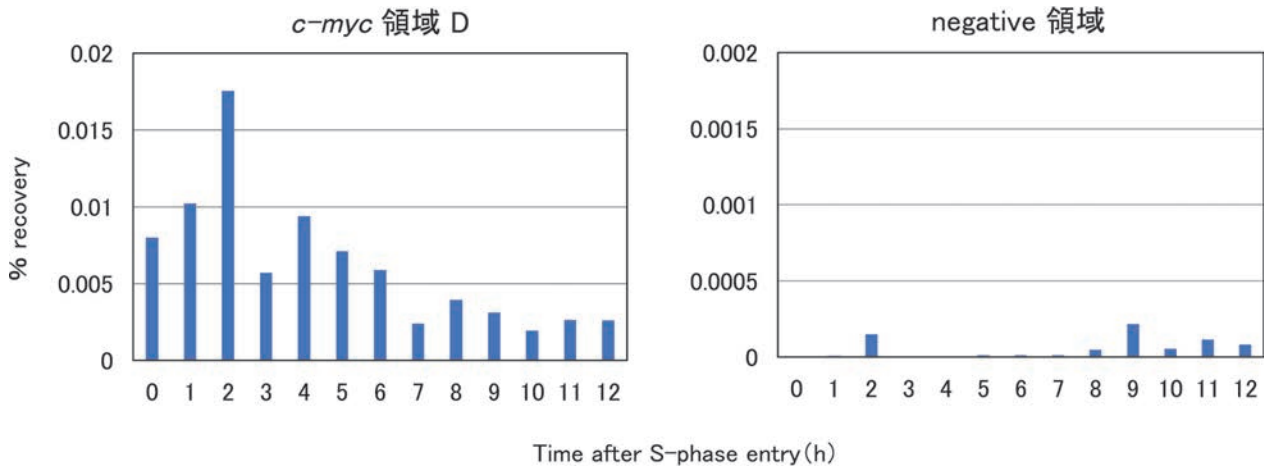


図2 既知の複製開始領域 (*c-myc* 領域 D) と ChIP-Seq 解析での Orc2 非結合領域 (negative 領域) における BrdU 取り込みの継時的変化

U-2 OS 細胞を 2 重チミジンブロック・リリースにより同調的に S 期に進行させ、横軸に示す時間でのクロマチン DNA サンプルを抗 BrdU 抗体で免疫沈降後、上記のそれぞれの染色体領域における BrdU 取り込みを定量的 PCR により測定し、免疫沈降前サンプルの定量値に対する回収率 (%) ; 右パネルは左パネルの 1/10 のスケール) で示す。

上にマップした結果、Orc2、Mcm7、CycA が共通に結合しているヒト染色体領域が複数同定され、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ったが、Orc2、Mcm7、CycA が特異的に結合しているヒト染色体領域が 12 箇所しか同定されず、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非常に少なかった。そこで、コントロール IgG による非特異的な免疫沈降物を最小限にする条件検討を経て ChIP-Seq 解析を再度行なった結果、コントロールとの差が 4 倍以上となる Orc2、Mcm7、CycA の特異的な染色体上結合領域が多数検出された。また、染色体複製開始領域の指標である Orc2 結合領域において、CycA が高頻度で Mcm7 とともに結合していることが示された (図 1 ; 21 番染色体での例)。

しかしながら、以上のデータは複製開始領域として Orc2 結合領域のみを指標としているため、実際には DNA 複製が開始されていない休眠領域も含まれると考えられる。実際の DNA 複製開始領域と比較解析するには、DNA 複製基質のアナログであるブロモデオキシウリジン (BrdU) を *in vivo* で取り込ませた後に BrdU 抗体を用いた ChIP (BrdU-ChIP) を行い、新規 DNA 複製が行われた領域を検出して、Orc2、Mcm7、CycA 各結合領域との相関性を解析する必要がある。そこで、まず上記で得られた Orc2 結合領域のうち既知の複製開始領域である *c-myc* プロモーター近傍領域 (領域 D) と、Orc2 非結合領域 (negative 領域) における BrdU-ChIP 解析を行った。U-2 OS 細胞を G1/S 期境界で同調・リリースして S 期に進行させ、継時的に BrdU を取り込ませ、細胞抽出液を BrdU-ChIP に供した結果、*c-myc* 領域 D ではリリース後 2 時間で BrdU の取り込みがピークとなり、それ以降減少するのに対し、negative 領域では BrdU がほとんど取り込まれなかった (図 2)。これより、*c-myc* 領域 D において DNA 複製開始と Orc2、Mcm7、CycA の特異的な結合が *in vivo* で起きていることが示された。今後は BrdU 抗体を用いた ChIP-Seq 解析を行い、ゲノムワイドで Orc2、Mcm7、CycA 各結合領域との相関性を検証する予定である。

# マウスの分化初期始原生殖細胞と周辺体細胞の 単一細胞トランスクリプトーム解析

生殖細胞は始原生殖細胞（PGC）に起因する。マウスの PGC は中胚葉から発生し、体細胞分化を抑制することでその特性を得る。分化初期段階のマウス PGCs における特異的遺伝子発現に関しては一部報告されているが、詳細なトランスクリプトームによる分化特性は十分に明らかにされていない。また、PGC の分化に重要な意味を持つ周辺の体細胞についてはほとんど情報が得られていない。そこで本研究では分化初期段階（胎齢 7.5 日、E7.5）における PGC およびその周辺体細胞の単一細胞トランスクリプトーム解析を実施し、個々の細胞の分化特性を明らかにしようとした。

E7.5 のマウス胎仔（32 匹）から胚盤葉上層部を切り出し、細胞懸濁液を作製した（図 1 左）。細胞懸濁液を C1 Single-Cell Auto Prep System に供試し（図 1 右）、得られた cDNA ライブラリーにアダプターを付加し、NextSeq を用いて RNA-Seq を行った。

結果 185 細胞個々の良好なトランスクリプトームデータの取得に成功した。これらすべての単一細胞トランスクリプトームデータをクラスタリング解析に供試したところ、大きく 4 つのクラスターに分類された（図 2 左）。それぞれのクラスターごとに発現変動遺伝子を抽出すると左からアポトーシス関連遺伝子（クラスター 1）、内胚葉マーカー（クラスター 2）、外胚葉マーカー（クラスター 3）、ならびに中胚葉マーカー（クラスター 4）の発現変動遺伝子の濃縮が認められた。したがって、得られた単一細胞トランスクリプトームデータは、PGC および周辺の体細胞の集団の構成を的確に

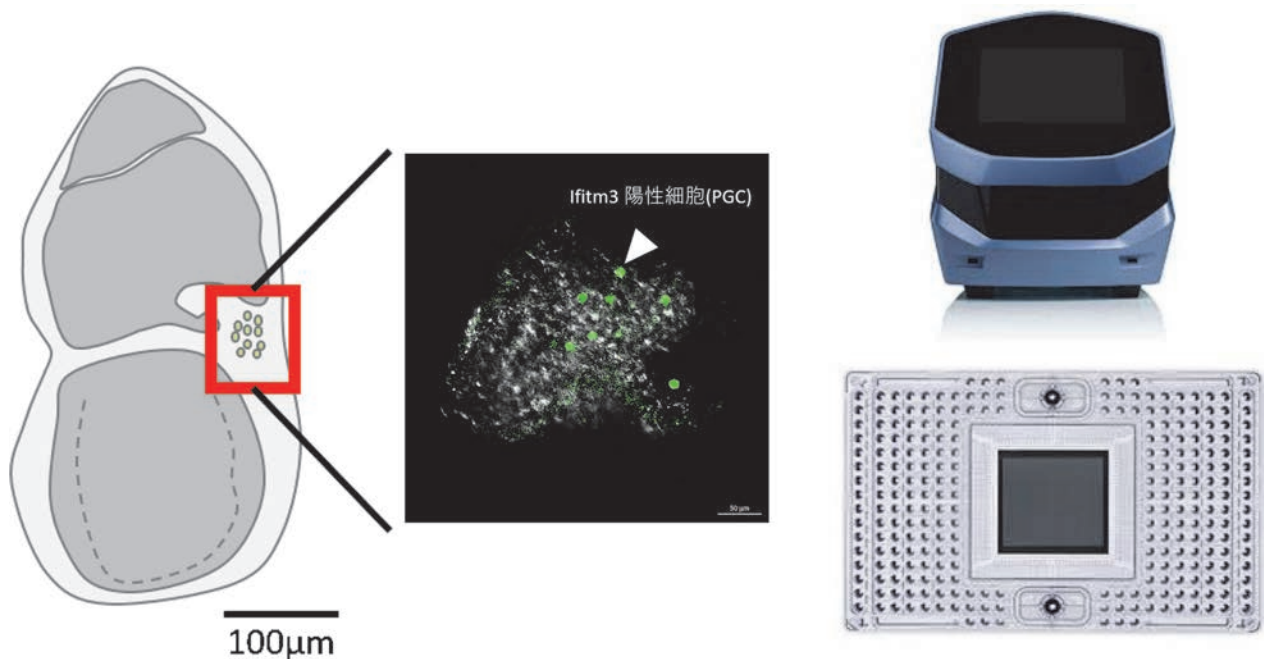


図 1 E7.5 マウス胚盤葉上層部（左）および C1 Single-Cell Auto Prep System（右）



突き止めていると考えられた。さらに、クラスター 4 は 2 つのクラスターに分類され、PGC マーカー遺伝子が多く発現しているクラスター（クラスター 5）を特定することができた（図 2 右）。また、PGC マーカーと知られている遺伝子でヒートマップを描いたところ、クラスター 4 の細胞において多くのマーカー遺伝子の発現が確認できた。この中には、すべての PGC マーカーを発現している細胞が 2 細胞存在し、最も明確に PGC に分化発生を遂げている細胞と判断した。これは PGC が中胚葉に由来するという既存の報告と一致した。この 2 細胞とクラスター 5 の他の細胞との間で発現変動遺伝子を検出したところ 321 遺伝子が検出され、PGC の 2 細胞で発現上昇しているものは 21 遺伝子あった。これらの結果から PGC の新規マーカーの特定および GO タームの特定ができた。これらの結果から、胚盤葉上層部の PGC 分化領域は、様々な分化段階の PGC および体細胞系列の細胞から構成され、PGC の分化発生を調節していることが明らかとなった。本研究で得られた知見は分化初期段階の PGC の特性解明に貢献することが期待される。

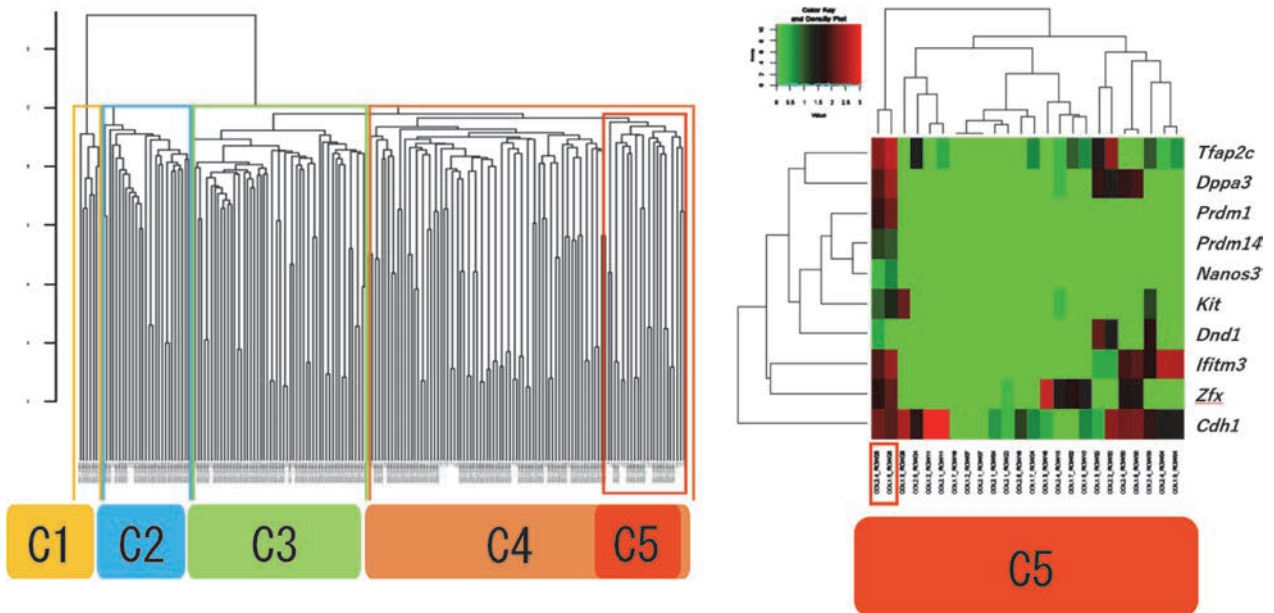


図 2 マウス胚盤葉上層部細胞の遺伝子発現状態

福重光人（大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻）

河野友宏（生命科学部 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）

# 牛白血病発症のウイルス学的要因解明を目指した BLV ウイルス遺伝子配列の多様性解析

牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus: BLV) は、地方病型牛白血病 (enzootic bovine leukemia: EBL) の原因となるレトロウイルスです。BLV に感染すると、一部の牛ではリンパ球が異常に増加するリンパ球増多症を発症し、さらに数%の牛は体表や内臓にリンパ肉腫が形成され、最終的に死亡します。牛白血病は、家畜伝染病予防法により届出伝染病に指定されており、と畜場で発見された場合は全部廃棄の扱いを受けますので、畜産農家にとって経済的損失の大きな疾病です。

BLV は EU 諸国ではほぼ清浄化されていますが、北米、南米、中東、アジアでは高い抗体陽性率を示す国が多く存在します。これらの国々で流行している BLV の配列は、データベース上に報告されていますが、HIV やインフルエンザウイルスの配列と比較すると極めて少なく、系統解析により得られた結果が本当に正確なのか、判断することが困難でした。

私たちの研究室では、日本で流行している BLV の全長配列を次世代シーケンサーにより解析することにより、より詳細な系統解析を行うとともに、BLV がコードする蛋白質ごとの進化速度や、日本に導入された時期の推定を行うことが可能となりました (図 1、2)。我々の時系列系統解析の結果から、BLV は南米、あるいはヨーロッパを起源としており、牛の移動とともにヨーロッパを通じてアメリカ、日本へもたらされたと考えられます。日本で流行している BLV クラスターの最も新しい共通祖先の存在時期 (time to the most recent common ancestor: tMRCA) は 1975 年、1986 年、1990 年、1993 年、2010 年であることから、海外から日本への BLV の侵入は少なくとも 5 回あったと考えられます。また、最も早い tMRCA の存在時期が 1975 年という結果は、日本に牛の生体輸入が開始した年代である 1970 年代とも一致することから、日本の EBL は BLV 感染牛の輸入により持ち込まれた輸入感染症であると考えられます。

これらの結果が明らかになることにより、BLV の生物地理学的な拡散の経路や、日本への侵入過程などについて、これまでになく考察が可能となりました。

私たちの研究室では、その他にも EBL を発症した牛および、BLV に感染しても臨床症状を示さな

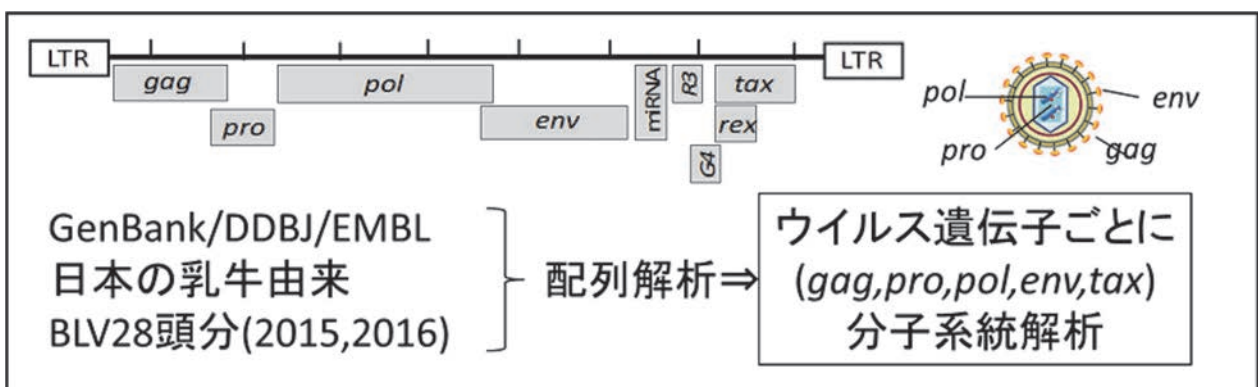


図 1 BLV のゲノム構造と研究の流れ

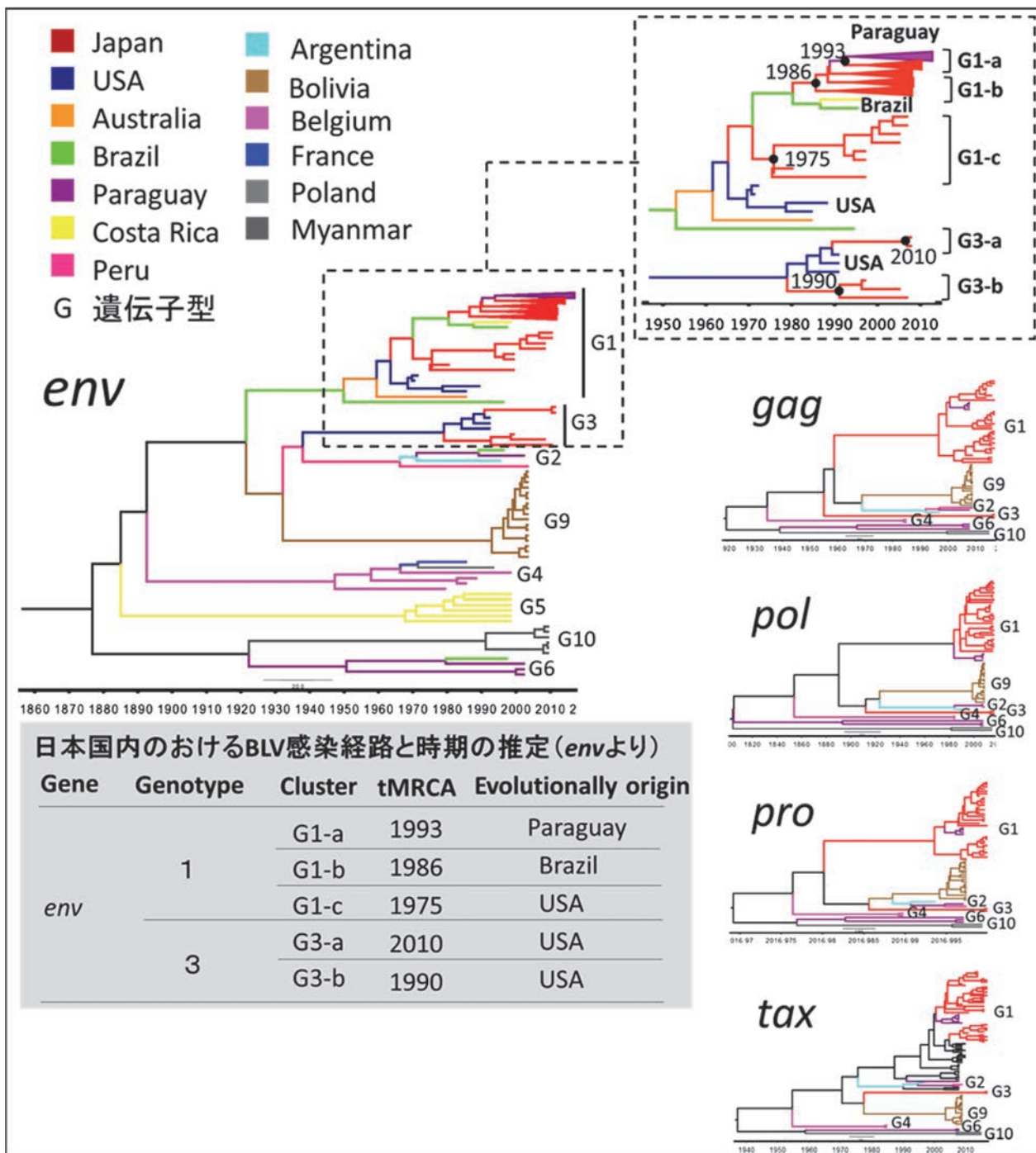


図2 各タンパク質コード領域を用いた系統学的解析結果

かった牛から得られた BLV 配列を比較し、発癌に関わるようなウイルス配列の特徴を明らかにすることも行っています。

このような研究を行うことにより、ウイルス学的にも、EBL 発症の要因となるような因子の特定につながる可能性があります。

小林朋子 (農学部 畜産学科)

西角光平 (大学院農学研究科 畜産学専攻)



## ダイコンを“遅咲き”にする原因遺伝子の同定

植物の開花は、茎頂分裂組織より葉が分化する栄養成長から、花芽が分化する生殖成長への転換、すなわち「花成」から始まります。多くの植物にとって、日長と温度は花成を調節する上でもっとも重要な要因です。これらの環境シグナルを感知して花成を促進する物質は、フロリゲンと呼ばれるタンパク質としてよく知られています。これをコードする *Flowering Locus T (FT)* 遺伝子が 2000 年代のはじめにシロイヌナズナで同定され、さまざまな植物で同様の機能を持った相同遺伝子が見つかっています。

適切なタイミングでの花成は、植物の生存、繁殖を大きく左右するため、*FT* は数多くの因子によって発現抑制を受けています。*FT* の抑制には、*Flowering Locus C (FLC)* タンパク質が中心的な役割を果たしています。花成誘導には *FLC* 遺伝子の発現抑制が必要となり、一定期間の低温刺激がその引き金となります。低温を感受すると、まず、*VIN3* タンパク質が *FLC* 遺伝子に結合して発現を止めます。しかし、季節の変化などで温度が上昇すると、*VIN3* 発現量の急激な低下に伴い再び発現する *FLC* が花成を抑制してしまいます。そこで、Polycomb group と呼ばれる因子が働き、*FLC* のヒストン修飾によるエピジェネティックな発現抑制を継続します。

シロイヌナズナと同じアブラナ科に属するダイコンは、世界中で生産、消費される重要な農作物です。ダイコンには地域に根付いた在来品種が数多く存在し、改良品種も含めるとその数は数千種類になります。そのなかで、開花特性にも幅広い変異が存在します。一般的な秋播きダイコンは、気温が 10℃程度を下回る低温期間が 2～4 週間続くと花成しますが、このような品種を春播きすると、少し寒い日が続くと開花してしまう恐れがあります。一方、「時なし」や「二年子」のような“低温応答性の鈍い”品種では、1 ヶ月以上の低温に晒されても花が咲くことはありません。

本研究では、“低温応答性の強い”青首ダイコンと、“低温応答性の鈍い”時なしダイコンを用いて、低温応答による花成に関連する遺伝子の発現量を RNA-seq 法で網羅的に定量し、“ダイコンを遅咲きにする遺伝子”を探索しました。具体的には、5℃の低温下（0 日、21 日、40 日の 3 つの低温期間を設定）に置いた幼苗を、室温に戻して 10 日後に葉から RNA を抽出し、次世代シーケンサーで解析して発現量を求めました。その結果、*FT* 遺伝子の発現量は青首で低温期間が長いほど上昇し、時なしでは低温 40 日処理でも発現量は低レベルにとどまっていた（図 1）。実際に、青首では低温 21 日処理で 17%、40 日処理で 94% が開花しましたが、時なしではいずれの条件でもまったく開花しませんでした。二つのパラログがある *FLC* 遺伝子の発現量は、低温期間が長くなるほど青首では予想通りに低下しました。興味深いことに、時なしでは *FLC1* の発現量は低温処理で著しく低下したものの、*FLC2* の発現量は中程度の値で維持されていました。また、*FLC* の抑制維持に関わる Polycomb group の遺伝子群の発現量は、低温刺激によって時なしでむしろ上昇する傾向がありました（図 2）。アブラナ科のなかでダイコンを含むアブラナ族植物は、祖先ゲノム全体が 3 倍に重複し、パラログ遺伝子を数多く有します。遅咲きの時なしダイコンでは、一つの *FLC* は通常通り低温刺激による抑制がなされますが、もう一つのコピーが抑制を受けないように進化していたのです。このように、一つの遺伝子で本来の機能を確保しつつ、重複遺伝子で新機能を獲得することが、ダイコンの進化の原動力になっていることが示されました。

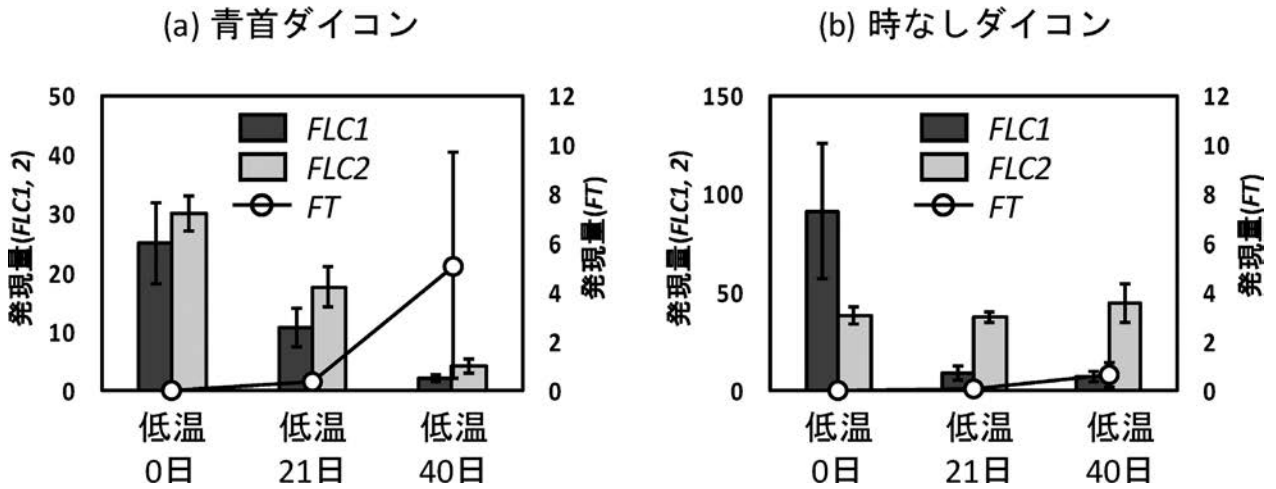


図1 *FLC1*、*FLC2*、*FT* 遺伝子の発現量。(a) 青首ダイコン、(b) 時なしダイコン。バーは標準偏差。

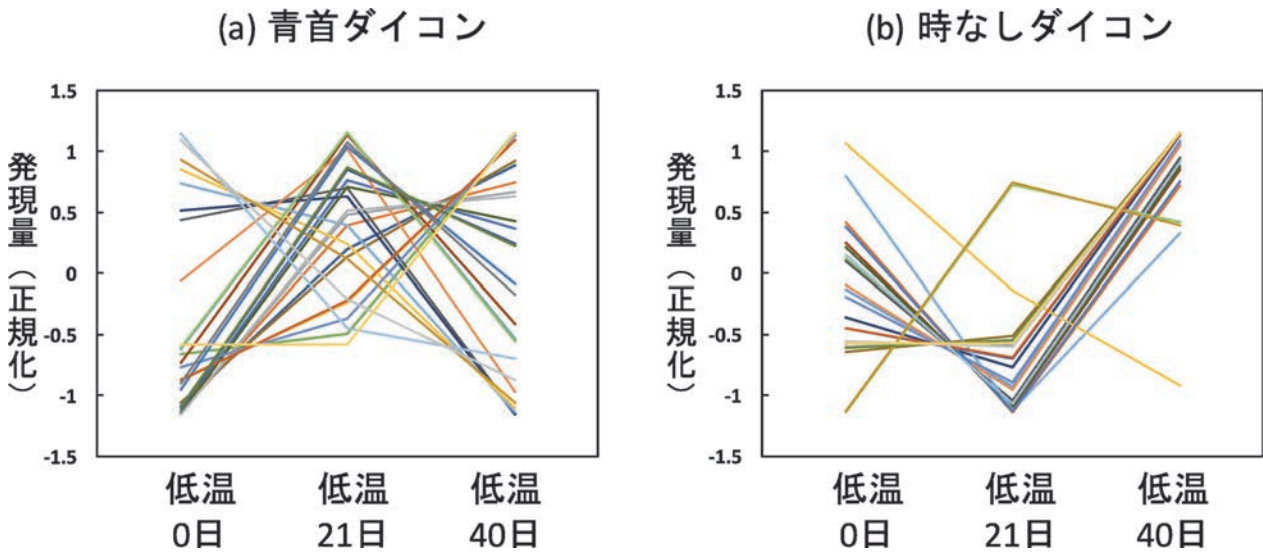


図2 *FLC* 抑制に関与する Polycomb グループの候補遺伝子の発現量。

三井裕樹 (農学部 バイオセラピー学科)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

# 遠縁交雑雑種後代のゲノム組成解析手法 (GISH-seq) の開発

作物の品種改良において、種間または属間レベルの遠縁交雑は、遺伝的変異を拡大するための重要な手法である。ところが、雑種後代においてしばしば染色体脱落や交雑元である両親ゲノムの割合変動を起こすことがあり、世代途中で形質に大きな変化を与えてしまう問題がある。例えば、筆者らが国際農林水産業研究センターとの共同研究の一環として実施してきた、サトウキビ (*Saccharum hybrid spp.*) とエリアンサス (*Erianthus arundinaceus*) の属間交雑により得られた  $F_1$  集団の染色体組成を Genomic *in situ* hybridization 法 (GISH) により解析した結果、系統によりエリアンサス由来染色体数が異なり、エリアンサス由来染色体が多い系統は良好な生育を示すことが観察されている (バビルら、2014)。さらに、属間雑種  $F_1$  系統とサトウキビの戻し交雑により得られた  $BC_2$  集団においてもエリアンサス由来染色体数が変動し、雑種におけるエリアンサス由来染色体数と糖度 (Brix) や一茎重などの農業形質の間に相関関係が観察されている (未発表)。これまで、高次倍数体であるサトウキビのようにゲノム情報がほとんど整備されていない作物を扱う場合、GISH によって脱落した染色体や両親ゲノムの割合が確認されてきたが、得られる情報は非常に限定されていた。そこで、GISH に用いた DNA 配列を解読することができれば、雑種系統における脱落した染色体に含まれる遺伝子や各親系統に由来するゲノム情報も調べることができ、系統評価に対する情報として非常に有用であると考えられる。

そこで本研究では、GISH 情報を配列レベルで調査するために、*in situ* mapping を介した GISH-seq の開発を試みている。この技術では、まず両親系統と  $F_2$  以降で遺伝子プールを共有した集団個体を準備することが想定される。そして、両親個体それぞれから異なるタグ配列を伴うゲノム DNA

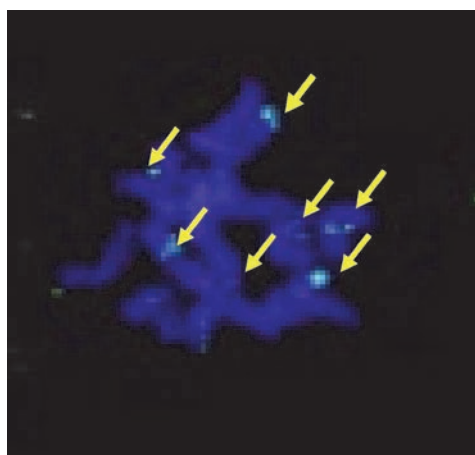


図1 5S rRNA 領域をコードする DNA をプローブとしたオオムギの FISH 画像。染色体は DAPI で青色に染色されている。矢印は染色体上の 5S rRNA サイトを示す。



ライブラリーを構築する。さらに、これらライブラリーに対して異なる蛍光ラベリングを行い、対象の集団個体から作製された染色体標本に対して *in situ* hybridization を行う。蛍光顕微鏡による観測後、hybridization されたプローブを単離および増幅するために、ライブラリーのアダプター配列に対応した共通プライマーを用いて *in situ* PCR を行う。増幅産物を精製後、NGS を用いてシーケンシングを行い、hybridization されたプローブの配列を解読する。その結果、対象の集団個体に対して相同性を伴い、各親個体に特異的な配列、両親共に共有した配列が識別される。そして、これら配列に含まれる遺伝子を探索することによって、ある遺伝子はどちらの親に由来するか推定することが可能になると期待される。現在のところ、予備実験としてオオムギを用いた 5S rRNA をコードする領域からプローブ作成およびライブラリーを構築し、FISH を行ったプレパラート（図 1）から *in situ* PCR 通して得られた増幅産物をシーケンスした。結果として、多様な遺伝子間配列に基づいて、5S rRNA をコードする領域と一致する 163 個の Contig 配列が識別され、本研究で開発したプロトコルの正確性を証明することができた。今後は、同様のプロトコルを用いて、サトウキビとエリアンサスの属間雑種 BC<sub>2</sub> 系統のうち、エリアンサス由来染色体数が異なる系統の GISH プレパラートからシーケンスを実施し、BC<sub>2</sub> 系統間の違いをゲノムレベルで解読する予定である。

パチャキル バビル（国際食料情報学部 国際農業開発学科）  
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）



## イネのジテルペン型ファイトアレキシン

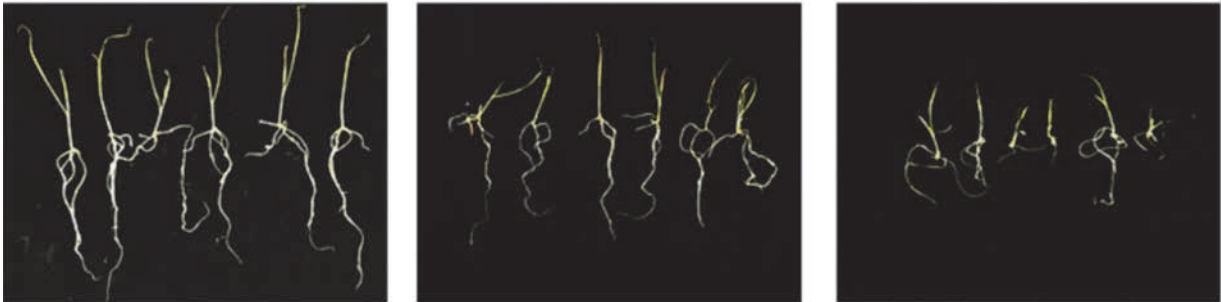
### 生産制御を担う転写因子の機能解明

植物の防御応答のうち、代表的なものとしてファイトアレキシンの生産が挙げられる。ファイトアレキシンは、病原菌感染により植物体内で生合成され蓄積する抗菌性低分子化合物と定義づけられた化合物であり、イネにおいて多くの異なる構造体が報告されている。イネにおけるファイトアレキシン生産は、植物ホルモンのジャスモン酸 (JA) を介した誘導性防御反応の1つであり、これまでに17種類の化合物がファイトアレキシンとして同定されてきた。そのうち16種類がジテルペン型、1種類がフラボノイド型の化合物である。特にジテルペン型のモミラクトン A-B、ファイトカサン A-F、*ent*-10-oxodepressin、およびフラボノイド型のサクラネチンは、高い抗菌活性といもち病菌に対する抗菌性から、主要なファイトアレキシンとされている。

これらのファイトアレキシンのうち、モミラクトンとファイトカサンの生産をになう生合成遺伝子群は、イネ染色体上においてそれぞれ遺伝子クラスターを形成し、ストレスに応答して一過的な発現誘導を示す。キチンエリシター応答性 bZIP 型転写因子 *OsTGAP1* は、これらの生合成遺伝子クラスターおよび生合成上流に位置するメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路遺伝子の転写制御に関与し、ジテルペン型ファイトアレキシン (DP) 生産を誘導する転写因子としてイネ培養細胞から単離・同定された。先行研究における ChIP-seq 解析により、MEP 経路で働く *OsDXS3* 遺伝子上流域に結合が見出される一方で、クラスター内の生合成遺伝子については、多くの遺伝子上流域で明白な結合が認められなかったことから、*OsTGAP1* による DP 生産制御機構の解明には、その他の関連因子の探索を含む、より詳細な解析が必要とされた。また、先行研究ではイネ培養細胞を用いていたため、植物体における *OsTGAP1* の生理機能や組織特異的あるいは誘導時特異的な制御の実態および生物学的ストレスに対する応答などが不明であった。イネ植物体の解析から、*OsTGAP1* が根で強く発現していることが明らかとなり、これまでに報告されている根からの DP の恒常的な滲出の事実と合わせると、*OsTGAP1* が根において重要な機能を果たしていることが考えられた。そこで、*OsTGAP1-Tos17* 挿入変異株の根を用いた JA 処理時の RNA-seq 解析を行うことで、*OsTGAP1* が根においてクラスター内に集結した DP 生合成遺伝子群の発現誘導に及ぼす影響を確認すると共に、*OsTGAP1* により制御を受けるレギュロンを網羅的に解析した。

その結果、2 番染色体と 4 番染色体にクラスターを形成する DP 生合成遺伝子の全ての JA 誘導的な発現が *OsTGAP1* に強く依存していることがわかった。さらに、野生型株で JA 誘導性を示した遺伝子のうち、*OsTGAP1* 依存的に JA による発現誘導が抑制される遺伝子の中には、未解析の MYB 型転写因子、bZIP 型転写因子、Homeobox タンパク質をコードする遺伝子などの制御因子や、シトクロム P450 酸化酵素、フェノール系ファイトアレキシン合成に関与する酵素などの二次代謝産物合成に関わる遺伝子が含まれていた。*OsTGAP1* による DP 生合成遺伝子の転写制御はこれらの転写因子との協調的もしくは拮抗的な作用が存在している可能性や、DP 以外のアレロパシー化合物の根における生産も *OsTGAP1* の制御下にある可能性が考えられる。

## イネと混植したイヌビエの生育



*ostgap1* 変異体との混植

野生型株との混植

*OsTGAP1* 過剰発現体との混植

図1 *OsTGAP1* の根での発現がイヌビエに対するイネのアレロパシー活性において重要な役割を果たしている。*OsTGAP1* 過剰発現体との混植（右パネル）ではイヌビエの生育が顕著に抑制されている。逆に *ostgap1* 変異体との混植ではイヌビエが他と比較して良く成長している。

以上のように、イネの DP 生産制御に関わる転写因子抑制株の RNA-seq 解析により、クラスター内の既知生合成遺伝子のみならず、生合成系路の上流に位置する MEP 経路遺伝子への影響や転写制御のカスケードを構成する可能性のある新規転写制御因子の存在を明らかにすることができ、イネの DP 生産制御機構の全貌解明に向けた新たな展開が期待される成果を得ることができた。また、二次代謝産物の生産変動も予想される結果を得たことから、今後、可食部における食味成分分析に興味を持たれる。

岡田憲典（東京大学 生物生産工学研究センター）  
 吉田悠里（東京大学 生物生産工学研究センター）  
 辻井良政（応用生物科学部 生物応用化学科）



# レタスの結球性に関わる遺伝子の同定

葉の結球性はキャベツ、ハクサイ、レタス等の園芸作物で見られる農業形質である。近年、農業生産、食品加工現場の効率化が進む中で、結球性の制御は重要な育種課題のひとつになっている。生産現場においては、安定的に結球することが生産性を向上させる上で、また食品加工現場では適度な結球性（葉がバラけやすい など）が加工作業を単純化する上で重要である。結球現象に植物ホルモンのオーキシンが関わっているなど生理学的な知見は存在するものの、分子遺伝学的知見は乏しい。申請者は、レタスの根腐病抵抗性に関わる量的形質遺伝子座（QTL）の同定を進める中で、結球性に関わる興味深い遺伝現象を見出した。具体的には、異なる結球型品種同士（A 品種、B 品種とする）の掛け合わせによって作成された後代分離集団（F<sub>2</sub>）の中から、一定の割合で非結球の個体が生じた。詳細な遺伝解析の結果、分離比 15 : 1（結球 : 非結球）の割合で非結球個体が生じたことから、潜性の 2 つの遺伝子座が結球現象に関与することが示唆された。そこで申請者らは、結球性に関わる遺伝子を同定するために、QTL-Seq 法（Takagi *et al.*, 2013）によるゲノムワイドな遺伝子多型解析を試みた（図 1）。その結果、A 品種に由来する遺伝子座として第 5 連鎖群、B 品種に由来する遺伝

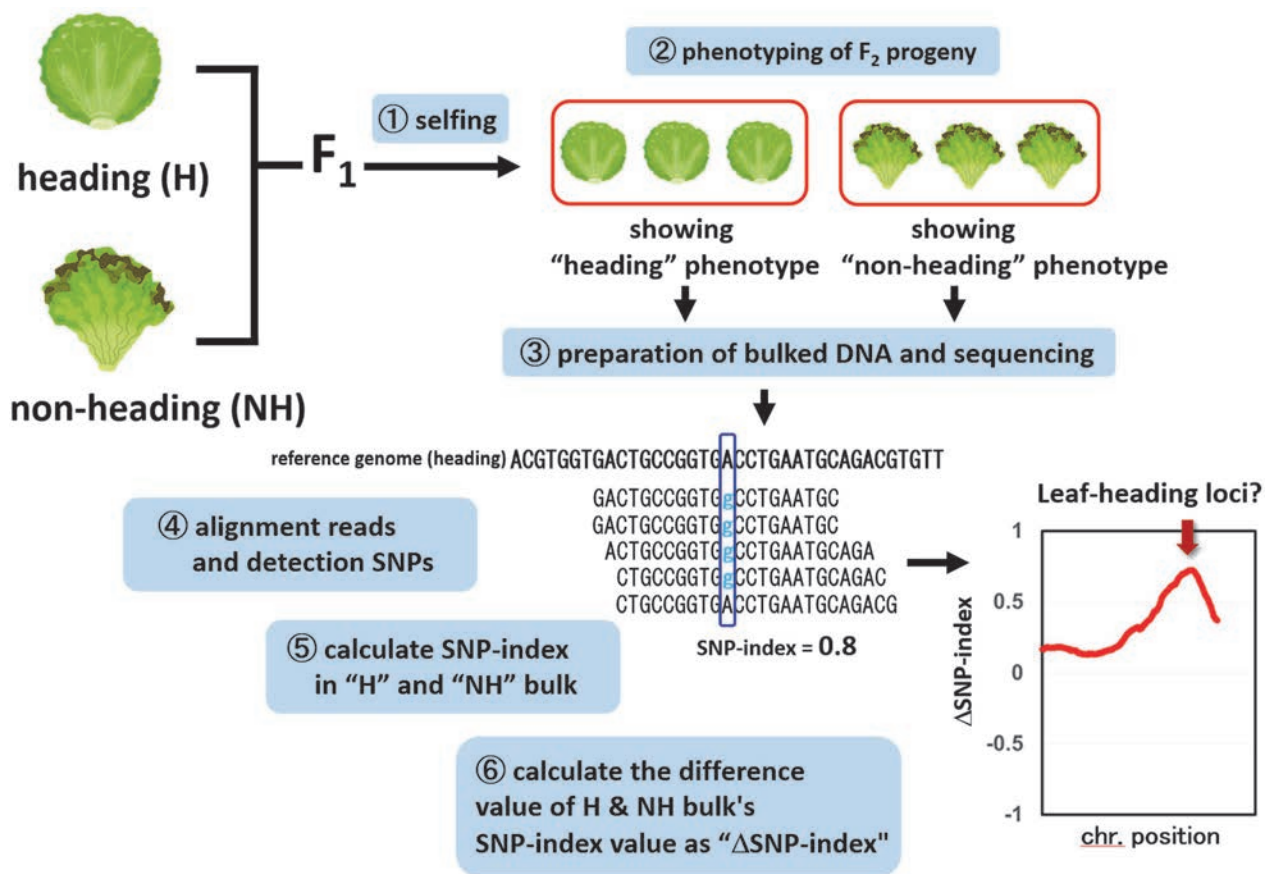


図 1 QTL-seq 解析の概要

子座として第9連鎖群に強い連鎖性が認められた。原因遺伝子の存在が疑われる領域には数十の遺伝子が存在するため、今後さらなる絞り込みを進める必要があるが、現在までの取り組みについて紹介する。

非結球個体の幼苗の葉は、葉縁が結球個体のそれと比べなめらかでかつ、主脈が太くはっきりしている傾向が見られた。これらの表現型はシロイヌナズナのオーキシン輸送に関する変異で見られる傾向であるため、結球性の原因遺伝子としてオーキシン輸送因子、あるいはその制御因子が疑われる。QTL-Seq解析によって限定された領域には、そのいずれも見出されたが、掛け合わせに用いた2品種の間で該当の遺伝子内にアミノ酸置換を伴う多型は認められなかった。またオーキシン輸送因子の分布制御にmiRNAが関与することが知られているが、該当の領域内に既知のmiRNA遺伝子座は認められなかった。リファレンスゲノムをベースとした単純なリーシケンシング解析では、品種固有のゲノム領域が解析対象に含まれない問題がある。そのため、局所的*de novo*アセンブリによる品種固有ゲノム領域のサルベージを進めている。同時に、結球および非結球個体を用いたトランスクリプトーム解析による原因遺伝子へのアプローチも進めている。加えて、ゲノムセンター課題と独立したかたちで、非結球現象が見られるレタス系統の収集とゲノム解析を進めている。これまでに入手した系統のゲノム解析から、第2連鎖群において非結球現象に関わる新たな遺伝子座を見出している。今後、これらの遺伝資源を用いた掛け合わせ実験から各遺伝子座の相互作用について調査を進める予定である。

小松憲治（短期大学部 生物生産技術学科）

# 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

干害・塩害・冷害は、植物が水を吸えなくなるストレス（浸透圧ストレス）により引き起こされる、農業上最も被害の大きな害として知られています。これまでに非常に多くの精力的な研究により、植物が浸透圧ストレスに対してどのように応答するのか遺伝子レベルで明らかとなってきましたが、自然界で浸透圧ストレスに耐性を示す植物がどのようなメカニズムでその能力を獲得してきたのかは不明でした。

モデル植物として広く利用されているシロイヌナズナは、日本にも自生種が数種類あるように、世界中の様々な地域に生息し、その数は2,000に上ります。先行研究においてそのようなシロイヌナズナ地域個体群350グループの耐塩性を調べたところ、高いものから低いものまで耐性には大きなバリエーションがあることを明らかにしました。特に耐性を示すシロイヌナズナの種内グループは、生育に影響を及ぼさない程度の浸透圧（水欠乏）あるいは塩ストレスを一定期間経ることで、極めて高い浸透圧や塩に対する耐性を獲得する「馴化機能」が優れていることを明らかにしました。200種のシロイヌナズナ種内グループを用いた Genome wide association study (GWAS) により、浸透圧（水欠乏）馴化耐性とシロイヌナズナグループ間のゲノム配列上の違い（一塩基多型：SNP）との相関を調べた結果、1つの遺伝子座がシロイヌナズナ間における耐性のバリエーションを制御していることが明らかとなりました。この遺伝子座を浸透圧馴化耐性の英語、ACQquired OSmotolerance

## Bu-5 Background



750 mM sorbitol 5 weeks

より、ACQOS 遺伝子座と命名しました。最近、この ACQOS 遺伝子座の同定に成功しましたが、驚くことに ACQOS は植物の免疫応答に重要な遺伝子でした。① ACQOS を有するシロイヌナズナは病害抵抗性に優れる一方で浸透圧耐性が損なわれること、逆に② ACQOS を失ったシロイヌナズナは高い浸透圧耐性を獲得するものの、病害抵抗性が低下することがわかりました。すなわち、ACQOS 遺伝子の有無が病害抵抗性を取るか浸透圧耐性を取るかの決め手となることが明らかになりました (Ariga *et al.*, 2017 *Nature Plants*)。

一方、どのようにしてこの浸透圧耐性が確立されるのかについては、未解明のままです。興味深いことに、浸透圧応答に重要な役割を果たすことが知られているアブシジン酸 (ABA) の合成を欠損させても、シグナル伝達経路を制限しても耐性を示すことから、ABA 非依存的なシグナル伝達経路による耐性の寄与が考えられました。そこでこの浸透圧メカニズムを明らかにするため、浸透圧耐性 accession の種子に突然変異処理を施し、浸透圧耐性欠損変異株、acquired osmotolerance defective mutant, *aod* 変異株を単離しました (挿入図)。これまでに得られた十数個の *aod* 変異株の内、2 つについては、リシークエンスなどによる変異箇所の同定、および相補試験により、原因遺伝子の特定に成功しています。現在、これらの *aod* 変異株が浸透圧耐性を失うことになった原因を明らかにするため、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析などを進めています。本研究により、浸透圧耐性 accession が有する新奇浸透圧耐性メカニズムの解明、さらには同定した遺伝子群を用いた耐性作物の作出が期待されます。

太治輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)



# 水田雑草の起源と進化を解明するための SSR マーカーの開発

日本の水田生態系は里地・里山の重要な構成要素である。イネの起源や栽培の歴史については多方面から研究が進められており、稲作の起源は 7000～8000 年前の中国・長江流域で、日本への伝来は約 4000 年前の弥生時代とする説が有力である。稲作伝来とともにアジア大陸から日本に侵入・定着した植物は史前帰化植物と呼ばれ、数十種類が想定されている。しかし、その選定根拠は曖昧で、科学的な検証もされていない。

水田生態系は定期的な攪乱と劇的な環境変化によって特徴付けられ、植物の生活史特性としては短いライフサイクル（一年生）、環境に対する可塑性（異形葉形成）もしくは耐性（種子休眠）、自殖による繁殖保証（自家和合性、自動自家受粉、閉鎖花形成）、栄養繁殖（地下茎・走出枝、塊茎・鱗茎、無性芽）などが進化しうる。しかし、水田の種類（乾田と湿田）と管理方法（耕起と不耕起、一期作と二期作、除草剤の有無）は地域によって多様であり、史前帰化植物を含む水田雑草の生活史特性とその進化的背景は不明である。

本研究の究極目的は、水田周辺に生息する植物、特に稲作伝来とともに日本に侵入・定着したとされる史前帰化植物の起源と生活史特性の進化を、人間活動に起因する植物の移動（遺伝子流動）と環境改変（選択圧の変化）という 2 つの視点から解明することである。人間活動に起因する広域的な植物の移動については、狭義の外来生物（AD1500 年以降）を対象としたものが大半であり、史前帰化植物の侵入・定着プロセスを検証した例は極めて少ない。さらに、数千年間に及ぶ人間活動に対



図 1 長野県小谷村伊折集落の無農薬水田。2012 年に再開墾し、現在は地域創成科学科・保全生態学研究室で管理・研究をおこなっている。（撮影：亀山慶晃）

する生活史特性の進化過程を検証した例は皆無である。水田雑草の起源と進化を“人間活動”という視点から検証することは、里山生態系の生物多様性保全という観点からも重要である。

本課題では、この目的を達成する為の必須条件として、水田生態系を代表する植物8種のマイクロサテライト遺伝マーカー（SSR マーカー）の開発を試みた。生態学分野におけるゲノム解析としてはRAD-SeqやMIG-Seqなどが知られているが、欠損データが多く、サンプル数も制限されるため、集団の分岐年代の推定や繁殖様式の解析には不向きである。SSR マーカーはこれらの解析に適した優れたマーカーであり、近年ではNGSを利用したアンプリコン解析によって高速かつ安価にジェノタイピングをおこなう手法も開発されつつある。

選定したのは、ヘラオモダカ（オモダカ科、サジオモダカ属）、オモダカ（オモダカ科、オモダカ属）、タカサブロウ（キク科、タカサブロウ属）、イボクサ（ツユクサ科、イボクサ属）、アゼナ（アゼナ科、アゼナ属）、キカシグサ（ミソハギ科、キカシグサ属）、チョウジタデ（アカバナ科、チョウジタデ属）、コナギ（ミズアオイ科、ミズアオイ属）である。各種1個体のDNAを抽出（1～5μg）し、DNAの断片化（400bp）とライブラリーの作成、シーケンシング（MiSeq、2×300bp、1run：8種を同時アプライ）をおこなった。2018年1月現在、得られたデータのアダプタートリミングとクオリティフィルタリング（ $\geq Q30$ ）まで完了し、今後はQDD解析によるSSRマーカーの設計、マーカーのチェック、実験条件の検討を順次進めていく。これらの作業と並行して、2018年度以降、野外でのサンプリングと生態調査を実施し、先述した研究目的を遂行できればと考えている。



図2 対象種の一つであるオモダカ。旺盛な栄養繁殖能力を持つ強害雑草であると同時に、繁殖生態学のモデル植物でもある。（撮影：武生雅明）

亀山慶晃（地域環境科学部 地域創成科学科）

田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

# Brassica juncea 在来品種の系統解析と 亜種識別マーカーの開発

カラシナ・タカナ類 (*Brassica juncea*) は中央アジアを原産地とするアブラナ科に属する一・二年生草本である。変化に富んだ多くの品種・系統が地域在来品種として国内外に存在し、形質の特性によって野菜用、油料用、香辛料用として利用されている。特に油料用、香辛料用のものはインドとヨーロッパで、野菜用は主に中国で分化が進んだといわれている。日本においても在来品種が存在する一方で、戦後中国より導入された品種が各地域に根ざした品種として栽培されている。こうした国内外の品種・系統は将来的な品種育成のための有用遺伝資源として期待されるものである。

カラシナ・タカナ類は、形態的および生態的特長から、葉カラシナ類・根カラシナ類・タカナ類・多肉性タカナ類・茎用タカナ類・アザミナ類などに分類されており、種内はさらに亜種としてグルーピングされている。しかしながら、その一方で亜種間の差異が明確に示されていないことから、探索・収集により新たに見出されたカラシナ・タカナ類を既存の分類体系に当てはめることは容易ではない。私たちは現在ミャンマーを中心にアジアにおけるカラシナ・タカナ類の遺伝資源収集を進め

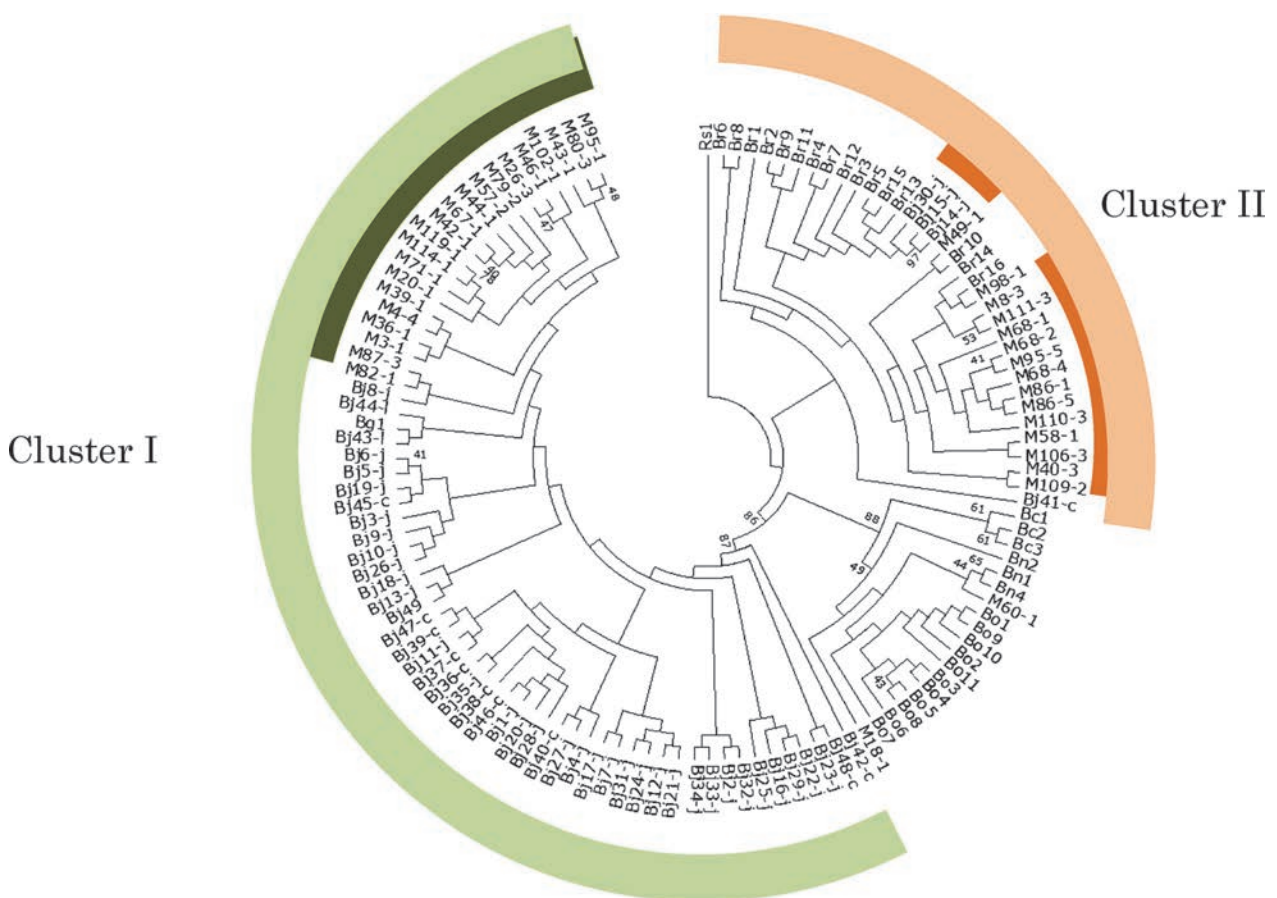


Fig. 1 Neighbor-joining tree depicting the topological relationship of 122 Varieties/line



ており、前述の問題を克服し収集系統を今後効率的に育種現場で利用するために、収集系統の遺伝的差異を評価し系統の違いを簡易に識別する手法の必要性を感じている。そこで本研究は、これまでに収集した品種・系統に対して、分子生物学的アプローチとしてマイクロサテライト領域 (SSR) 由来の系統解析および分子マーカー開発を行うことによって、遺伝的な情報基盤の構築を目指す。

供試材料は、在来カラシナならびにタカナ品種としてジーンバンク保存の 29 品種、市販の 20 品種およびミャンマーより収集した 38 系統の計 87 品種・系統に加え、*B. rapa* 5 亜種 16 品種、*B. oleracea* 6 変種 11 品種、*B. nigra* 1 品種、*B. napus* 3 品種、*B. carinata* 3 品種、*R. sativus* 1 品種の計 122 品種・系統よりそれぞれ 1 個体を用い Rad-Seq を実施した。

その結果、122 個体から SSR を伴う 9860 遺伝子座を検出した。これら SSR 多型に基づいて系統解析を行ったところ、大きく 3 つのクラスターが形成され、そのうち 2 つのクラスター (Cluster I and II) に *B. juncea* 品種・系統が位置づけられた。また、*B. oleracea*、*B. napus* および *B. carinata* の品種はそれぞれの種ごとにまとめ、別クラスターを形成した。Cluster I には材料とした *B. juncea* 87 品種中 68 品種・系統がまとめ、ジーンバンク保存の日本・中国由来の品種および市販品種によるクラスターと、ミャンマーに由来する系統によるクラスターに、クラスター内で分岐した。一方、Cluster II は *B. rapa* と *B. juncea* が混在するクラスターとして形成された。このクラスターに位置付けられた *B. juncea* は、ジーンバンク保存および市販の計 4 品種およびミャンマー由来の 15 系統であるが、前者の 4 品種については、昨年の RAD-seq 解析結果および在来品種に関する諸資料から *B. rapa* である可能性が示唆された。このことから、ミャンマー由来の 15 系統を含め *B. juncea* 特異的な DNA マーカーを用いて多型解析を行ったところ、これら 19 品種・系統は *B. rapa* である可能性が示唆された。以上のことから、ミャンマーより収集の系統には *B. rapa* 系統が含まれていることが示唆されるとともに、*B. juncea* 系統については、日本と中国に由来する品種とは遺伝的に異なることが推察された。

和久井健司 (短期大学部 生物生産技術学科)

入江憲治 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)





# 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

鉄は、植物生育の必須元素であるが、通常は不溶の酸化鉄で存在するため、鉄の還元可溶化は、植物にとって必須の過程である。稲、麦等の単子葉植物では麦根酸が発見され、酸化鉄可溶化研究は飛躍的に発展した。一方、双子葉植物では、鉄可溶化にフラビン類の関与が推定されたが、フラビン類の具体的解析は遅れていた。本研究では、新町等（1994年）の鉄欠乏条件における双子葉植物の遊離フラビン生成報告を基に、双子葉植物で検索を行い、キュウリから未知のフラビン誘導体を見だし、NMRとマスペクトル解析から4'-ketoriboflavinと構造決定した (*Biosci. Biotech. Biochem.*)。

4'-ketoriboflavinは生物界で始めて生成が観察された新規ビタミンB2誘導体で、本鉄欠乏状態でキュウリより生成されるため、強力な鉄還元活性が期待されるが、その生成代謝系は未知である。本申請は、4'-ketoriboflavin生成代謝系の解明を目的とする。

4'-ketoriboflavinは、鉄欠乏条件下で生産されるが、その生成とキュウリ白色化とは、並行して進行する。白色化では、一般に核酸 (DNA、RNA) の分解が知られている。未知代謝系解析にRNA-

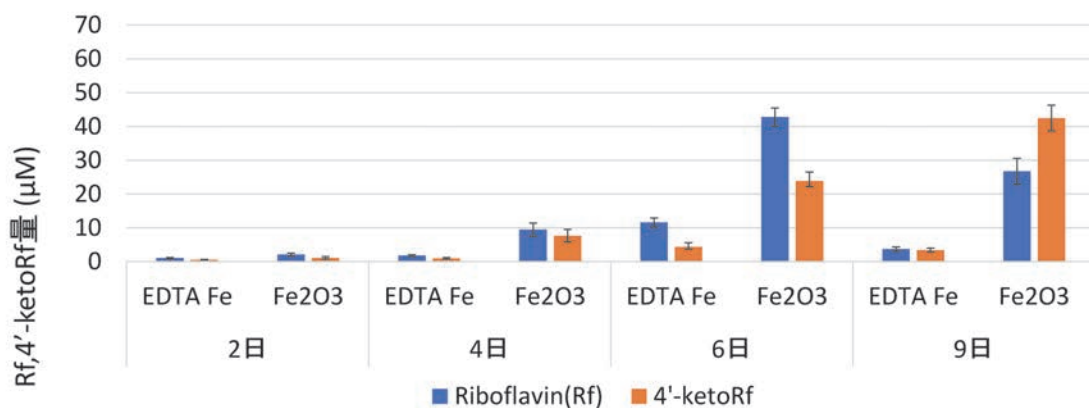
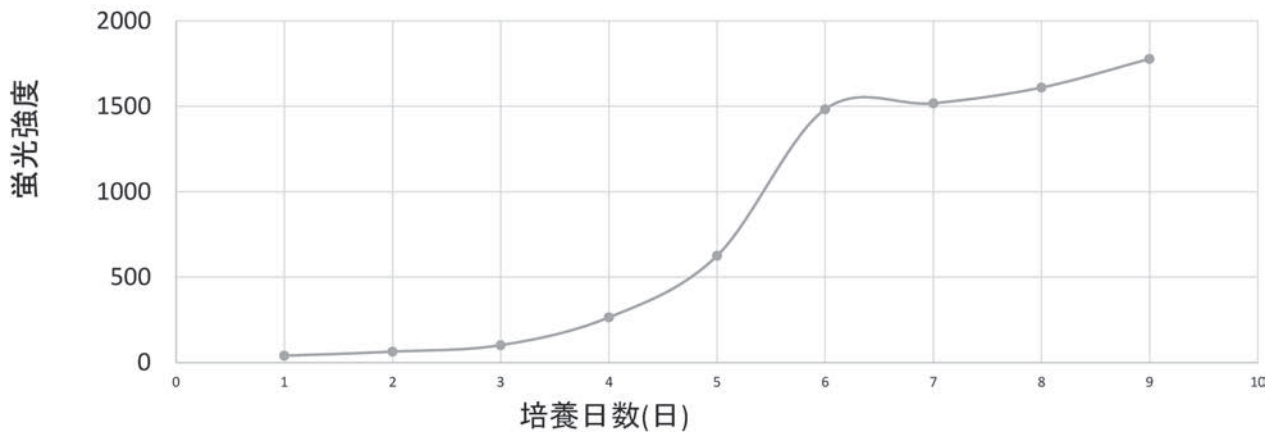


図 キュウリ (Fe-EDTA、Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 培養時のリボフラビン類の生成

Seq 解析は有効であるが、高純度 RNA が必要となる。白色化を防止して高純度 RNA を得るため、以下の検討 1～4) を試み、RNA-Seq 解析を行った。

1) 培養条件の検討：酸化鉄 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) は、通常生物の鉄利用に不適であるが、4'-ketoriboflavin は、強い酸化鉄還元活性が示唆されるため、キュウリの鉄欠乏時添加で、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  還元可溶化が期待される。そこで、鉄欠乏時のキュウリに酸化鉄を添加し正常生育（白色化の防止）と 4'-ketoriboflavin の生成を検討した。

鉄欠乏培養時における 1 ppm  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  添加で、白色化が防止され正常生育することが観察された。さらに、本条件で 4'-ketoriboflavin の生成が観察された。本化合物は鉄十分条件で生成されないため、生成関連酵素遺伝子は、鉄欠乏条件と同様に 1 ppm  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  添加時に発現されると推定された。

2) 迅速なフラビン測定法：4'-ketoriboflavin 検出には、水耕液から HPLC 定量結果を得るまで、約 1 日が必要であった。分析時間の短縮を、培養液の直接蛍光分析と、改良 HPLC 分析（直接の Sepack 処理）の併用により試みた。

培養液の直接蛍光測定から、RNA 抽出時期をラフに決定し、改良 HPLC 分析法による 4'-ketoriboflavin と riboflavin の分別定量から RNA 抽時期の詳細を決定した。

以上の方法を用いた培養時の RNA 調製を試みた。

3) 培養・フラビン分析・RNA 調製：通常培養を 1 ppm Fe (EDTA キレート体)、鉄欠乏培養を 1 ppm  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  添加で両キュウリ培養時のフラビン生成を比較検討した。キュウリの酸化鉄添加後の初期から中期培養で、通常培養に対して 4'-ketoriboflavin が 4 倍以上生成された。そこで、キュウリの根から RNA を抽出し RNA-Seq 解析を試みた。

4) RNA-Seq 解析：RNA-Seq 解析から、通常鉄培養と比較して、鉄欠乏（酸化鉄添加）培養時で増幅される複数遺伝子を検出したが、該当遺伝子は見いだせなかった。さらに前培養と RNA 抽出法を改良し、20,400 遺伝子から 4'-ketoriboflavin 生成時に発現する 51 遺伝子を見いだしている。この中から特に発現量が顕著な 2 遺伝子の発現系を大腸菌で構築中である。4'-ketoriboflavin は新規ビタミン B2 誘導体で、その生成代謝系の詳細は不明のため、構築したタンパク発現系の大腸菌から無細胞液を作成し、riboflavin からの 4'-ketoriboflavin 生成活性を測定する予定である。

$\text{Fe}_2\text{O}_3$  は地殻に多量に存在するが、安定なため、最も生物に利用されにくい鉄化合物の一つである。食用作物から分泌される 4'-ketoriboflavin は、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  有効利用の安全な化合物として期待される。

金子元優（大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻）

鈴木智典（生命科学部 分子微生物学科）

内野昌孝（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）

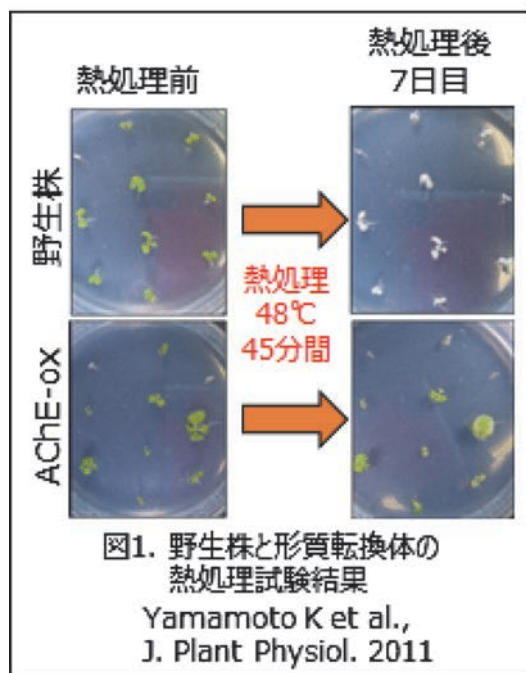
新村洋一（生命科学部 分子微生物学科）

田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

# 植物の神経伝達物質の分解酵素に関わる

## 環境適応機構の解明

動物の神経伝達システムは、アセチルコリン (ACh)、アセチルコリン受容体 (AChR) および ACh 分解酵素 (アセチルコリンエステラーゼ, AChE) の3者からなり、動物の筋収縮に関わる生命維持に必須である。植物の ACh は、現在まで約 65 種の植物から発見されているが、植物の AChE 遺伝子は発見されていなかった。申請者らは、トウモロコシとマメ科牧草サイラトロ幼苗から高純度に AChE 酵素タンパク質を精製し、その部分アミノ酸配列を解析後、完全長植物 AChE 遺伝子の発見に世界で初めて成功するとともに、AChE 遺伝子が植物の耐暑性応答や重力屈性反応を正に制御することを示唆した (図 1、2)。



AChE-ox: AChEの過剰発現体  
AChE-kd: AChEの抑制体



植物 AChE 遺伝子が関わる環境適応機構を解明することで環境ストレスに抵抗性を有する作物の育種に繋がることが期待される。そこで本研究では、本環境適応機構の詳細なシグナル伝達経路を解明することを目的とする。植物 AChE 遺伝子が過剰発現している形質転換植物と野生株に熱ストレスを与え、転写産物の発現量変化を RNA シークエンス (RNA-seq) にて解析した。現在、既知のシグナル伝達因子の発現量変化を形質転換体と野生株間で比較し、植物 AChE が関わるシグナル伝達経路の解明に向けて検証を行っている。

山本紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)



## 湿生植物の低酸素・温暖環境適応に関する トランスクリプトーム比較解析

低酸素土壌環境に生育する湿生植物は、シュートから根へ通じる通気組織を利用し、大気から根へ酸素供給（給気）を行うことで根の生理活性を維持している。しかし、通気組織が発達した湿生植物であっても、十分な酸素供給を維持するのは難しく、根の酸素不足は解消されていないことが指摘されている。一般に根の呼吸速度は温度上昇により指数関数的に高まる。しかし、湿生植物の根では酸素を潤沢に利用できないため、高温下では根における酸素の需要と供給のバランスが崩れ、根の生態生理活性は強い酸素律速状態に陥りやすいと考えられる。温度上昇による酸素律速への応答戦略は、湿生植物における北方種や南方種といったグローバルな温度環境分布を特徴付ける重要な要因となっている可能性がある。こうした視点は、新たな生態生理学的洞察の提供にとどまらず、湿生植物の地球温暖化に対する応答予測においても極めて重要なアプローチであると思われるが、これまで国内外で議論されたことはほとんどない。

先行研究として行った実験では、北方系の湿生植物では地下部のみの高温処理（気温 20℃・水温 32℃）でも著しい生育阻害が生じることを明らかにしており、温度上昇に対する根の生態生理活性への強いインパクトが示唆された。今後の長期的な取り組みとして、温度上昇による湿生植物の根の生態生理学的応答について、北方種と南方種の比較を通じ、酸素の供給から利用に至る一連の挙動を視野に入れた解明を目指している。

そこで当研究課題では、呼吸で得られる ATP 産生の効率や嫌気呼吸活性、根の維持呼吸に関連した ATP 消費プロセスにまず着目する。植物の呼吸経路には、ATP を産生する COX 経路と産生を伴わない AOX 経路が存在し、AOX 経路が活性化するほど呼吸（＝酸素消費）あたりの ATP 産生効率は低下する。また、温度上昇による呼吸速度の上昇は、根維持（主にタンパク質のターンオーバーや

膜の電気化学勾配維持）に関わる ATP 消費の増加が主因とされている。十分な酸素供給を得られない湿生植物の根にとって、呼吸速度の制御機作や ATP 産生効率は、温暖適応能力を左右する重要なパラメータとなる可能性がある。本研究では、こうしたアプローチへと至るスクリーニング（或いは裏付け）として、根圏の酸素環境（酸素飽和 vs. 低酸素）と温度環境（20℃ vs. 35℃）変化における発現遺伝子の網羅的な挙動について、北方系種群（ヤラメスゲ・オオカサスゲ・ホロムイスゲ）と南方系種群（ヨシ・マコモ）の根を対象に把握することを目的としている。



写真 周極地域を中心に分布する北方系の湿生植物ヤラメスゲ

中村隆俊（生物産業学部 生物生産学科）



## 高機能性 *Lactococcus lactis* ライブラリの構築

乳酸菌は古くから食品発酵に利用され、食品長期保存のためのバイオプリザベーションに寄与してきた。近年はその機能性が大きく注目され、プロバイオティクスとして世界各国で利用されている。このように乳酸菌は多方面で利用されるものの、その特徴は菌株レベルで大きく異なり、菌種レベルでは有用性を謳うことは出来ない。本研究では発酵乳から植物表面まで多様な生息域を持ち、その特徴も多様であることが示唆されている乳酸菌 *Lactococcus lactis* 菌株を用いて、産業利用上重要な特徴を広く解析することで、幅広い産業利用のための *L. lactis* ライブラリ構築を目指すことを目的とした。

試験菌株として、筆者らが生食用野菜や果物、生乳、発酵食品等から分離した 51 株の *L. lactis* を用い、糖の発酵性状や生育温度といった一般的な特徴のほか、バクテリオシン、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)、リノール酸からの共役リノール酸といった機能性物質の生産、ムチン接着能、バイオフィーム形成能といった環境中への常在性に関する特徴とともに、溶血性、DNA 分解活性などの食品利用のためのリスクファクターについても解析を行った。その結果、機能性に関する特徴は菌株間で大きく異なり、GABA や共役リノール酸においては、全く生産しない菌株から、産業利用に値する量を生産する菌株まで、結果は非常に多様であった。一方で、リスクファクターとなりえるような特徴は全ての菌株に見られず、食品利用のために特別なリスクはないと考えられた。

次に、これらの菌株のゲノム解析を行ったところ、51 株のゲノムサイズは 2.32 ~ 2.98 Mbp と同一菌種内であるにもかかわらず、菌株間で比較的大きな差が見られた。また、予測された CDS の数も 2173 ~ 2938 と大きな差が見られた。更に、ゲノム情報をもとに、All Nucleotide Identity (ANI) 及び Genome-to-Genome Distance Calculator (GGDC) を用いて決定したところ、51 株に

Table 1 ANI values among reference strains and tested strains

	NBRC 100933 <sup>T</sup>	NBRC 100676 <sup>T</sup>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NBRC 100933 <sup>T</sup>	100 %	87 %
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> NBRC 100676 <sup>T</sup>	87 %	100 %
Tested strains identified as <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (n=42)	97% ≤	85 % < ANI < 88%
Tested strains identified as <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (n=41)	85 % < ANI < 88%	97 % ≤

ANI value of 95 % is widely used to discriminate bacterial species.

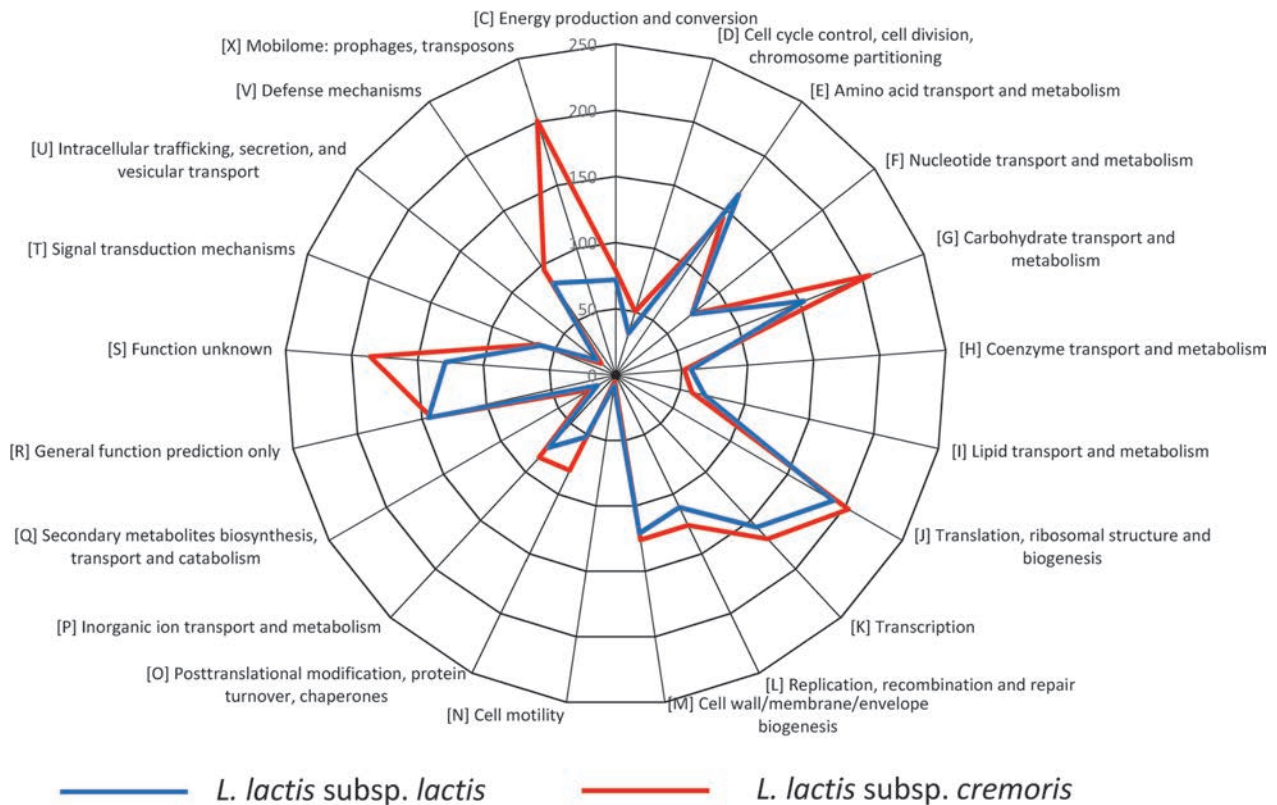


Fig. 1 Comparison of gene content profiles obtained for the two subspecies within *Lactococcus lactis*

はプロバイオティクス等で利用される *L. lactis* subsp. *lactis* が 42 株、チーズや発酵バターフレーバー形成に重要な亜種である *L. lactis* subsp. *cremoris* が 9 株含まれていることが確認された一方で、この 2 亜種は菌種レベルで異なるという事が明らかとなった (Table 1)。次に、表現性状データとゲノムデータの比較を行うと、GABA や共役リノール酸を生産しない菌株でも、鍵となる遺伝子を保持している菌株がいることが明らかとなった。特に、GABA に関しては全ての菌株がグルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子を保持していたものの、前述のように生産量は菌株間で大きく異なっており、鍵となる遺伝子の有無だけでは生産能が推定できないことが明らかとなった。また、近年プロバイオティクスの機能性との関係が示唆されている繊毛合成に関与する遺伝子群は、subsp. *lactis* と同定された 42 株中 31 株が遺伝子群を高い相同性で保持しており、繊毛を合成している可能性が示唆された。一方で、subsp. *cremoris* は上述の遺伝子群のうち 1 個の遺伝子の相同性が著しく低く、繊毛を合成することができない可能性も考えられた。これらについては、今後詳細な解析が必要である。また、見出された全ての遺伝子を機能毎に分類したところ、プロファージやトランスポゾンに関連する遺伝子および糖代謝に関わる遺伝子の数において、二亜種間で明確な違いが見られた (Fig. 1)。ゲノムデータからも、溶血関連タンパク質や DNase などの食品利用のためのリスクファクターとなるタンパク質をコードする遺伝子は全ての菌株で見られなかった。

本プロジェクトにより、*L. lactis* 菌株の表現性状の裏付けをするデータが得られたとともに、これまでの試験では明らかになっていなかった様々な特徴が明らかとなった。そのため、今後の企業等における乳酸菌の利用促進のための重要な知見となると考えられる。

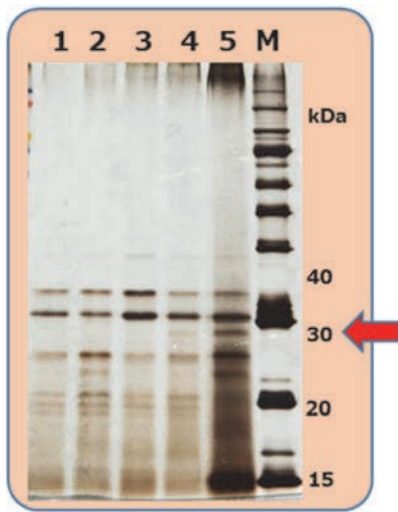
## 味噌タンパク質が腸内細菌叢へ与える影響解析

味噌は和食を作るために欠かせない伝統的な発酵調味料の一つである。味噌の起源は古代中国の「醬」や「豉」が、中国大陸や朝鮮半島を渡って日本に伝わり、独自の発展を遂げ現在の形になったと考えられている。味噌は日本で1300年以上の歴史を持つが、食生活の欧米化に伴い生産量は減少を続けている。そのため、味噌が高い栄養価と機能性を併せ持つ優れた食材であると示すことで、需要拡大が期待されている。これらの味噌の中でも我々は大豆を主原料とする豆味噌に着目した。豆味噌は大豆に麹菌を生育させて麹にした大豆麹と食塩を原料としている。原料を混合して仕込み、加温醸造では4～6カ月程度、天然醸造では6～12カ月あるいはそれ以上の熟成を経て完成する。

豆味噌の主成分である大豆タンパク質の機能として、血中コレステロール濃度の低下作用はよく知られている。また、大豆タンパク質の酵素分解物に免疫調節機能や抗酸化作用を示すペプチドが存在することも知られている。近年では、大豆タンパク質の加水分解物が腸内細菌叢の多様性向上に与える影響が大豆タンパク質よりも大きいことが報告された。このことから、味噌に含まれ微生物の酵素により分解された発酵大豆タンパク質では、大豆タンパク質よりも腸内細菌叢の多様性が向上するのではないかと考えた。しかし、味噌のタンパク質についての機能や生体に及ぼす影響については知見が少ないのが現状である。

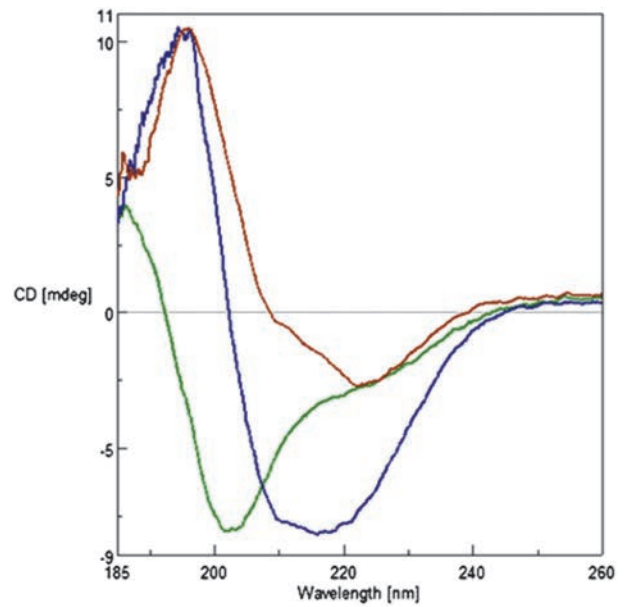
そこで、我々はまず大豆と味噌中のタンパク質の性質の違いを明らかにするために、食物繊維と同等の生理機能を示すタンパク質であるレジスタントプロテインについての研究を行った。レジスタントプロテインは腸管微生物の発酵基質として利用されており、腸内細菌叢へ影響を与える成分として選抜した。我々の研究により、豆味噌がレジスタントプロテインを含有することが明らかになった(図1)。これらのレジスタントプロテインは原料の大豆レジスタントプロテインからの移行が主であったが、28 kDa 付近のバンドは豆味噌のみに存在していた。これは豆味噌熟成過程で大豆タンパク質より生成されたレジスタントプロテインであると判断できる。また、豆味噌のレジスタントプロテインの含有量は大豆よりも高かった。さらに、発酵により味噌タンパク質が変化したことを示すために、大豆タンパク質を麹菌酵素溶液で分解した大豆酵素処理タンパク質を作成した。これと味噌タンパク質、大豆タンパク質の構造を遠紫外領域のCDスペクトルにて測定したところ、大豆タンパク質と味噌タンパク質では異なる挙動を示した(図2)。

そこで、本研究では豆味噌と取得した発酵大豆タンパク質を摂食したラットの腸内細菌叢に与える影響を調べることで、発酵食品の機能の一端を示すことを目的とした。栄養負荷試験としてAIN-93Gを対照食とした高脂肪食を用い、タンパク質の50%を豆味噌もしくは大豆タンパク質に変換した試料を作成した。各試料を摂食させて10週間飼育したラットの腸管を部位ごとに分けし、各区間の細菌叢を次世代シーケンサーにより解析中である。また、腸内細菌叢の変化が代謝に及ぼす影響を、血液や臓器、糞便にて解析している。



- 各試料 人工消化液処理液
- 1 国産大豆
  - 2 アメリカ産大豆
  - 3 国産大豆を使用した豆麴
  - 4 アメリカ産大豆を使用した豆麴
  - 5 豆味噌

図1 大豆・豆麴・豆味噌の SDS-PAGE



- 大豆抽出タンパク質
- 味噌抽出タンパク質
- 大豆酵素処理タンパク質

図2 大豆・豆麴・豆味噌の SDS-PAGE

安藤達彦 (短期大学部 醸造学科)  
 舘 博 (短期大学部 醸造学科)  
 辻 聡 (短期大学部 醸造学科)  
 石浜 峻 (短期大学部 醸造学科)  
 白井智美 (短期大学部 醸造学科)



# 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

水界におけるアンモニア酸化反応は独立栄養微生物により行われる反応であり、窒素循環の重要な一端を担っている。従来アンモニア酸化反応は *Betaproteobacteria* 綱および *Gammaproteobacteria* 綱に属するアンモニア酸化細菌 (AOB) が担うとされてきたが、近年海洋において未培養アーキア系統群 Marine Group I に位置づけられるアンモニア酸化古細菌 (AOA) がアンモニア酸化反応を担うことが明らかになってきた。Marine Group I は *Crenarchaeota* 門に分類される系統である。大西洋においてクロロフィルが最も高い層における *Crenarchaeota* 門の存在は 2 ~ 3% 程度であるが、中層域においては 10% 以上を占めていることが報告されている。また、太平洋の無光層において全菌数の 50% 以上を占めることが報告されている。しかしながら湖沼といった淡水環境における AOA に関する報告は少なく知見が不足している。そこで、本研究では貧栄養ダム湖における硝化の微生物学的メカニズムを解明することを目的として、16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングにより宮ヶ瀬ダムの微生物群集の鉛直分布および季節変化について検討を行った。

16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングにより、表層 (水深 0.5m) と中層 (水深約 40m) で微生物群集構造が異なることが明らかとなった (図 1)。表層において *Actinobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Sphingobacteriia* 綱、*Alphaproteobacteria* 綱が約 60 ~ 80% を占めた。中層では

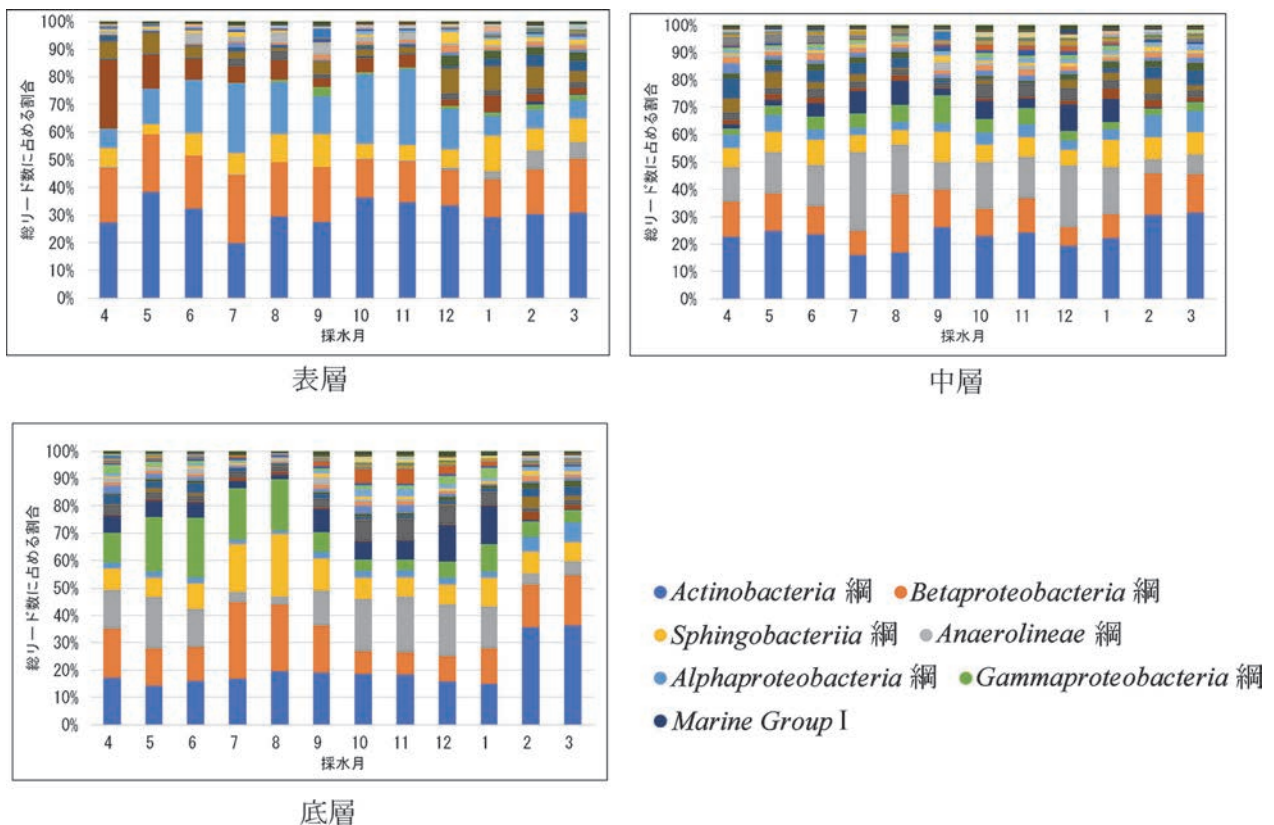


図 1 宮ヶ瀬ダムの微生物群集構造 (2016 年 4 月 ~ 2017 年 3 月)

表層において割合の低い *Anaerolineae* 綱が増加し、*Actinobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Sphingobacteriia* 綱とともに約 50～60% を占めた。底層（水深約 80m）においては中層でもみられた *Actinobacteria* 綱、*Betaproteobacteria* 綱、*Sphingobacteriia* 綱、*Anaerolineae* 綱に加えて *Gammaproteobacteria* 綱が主要な構成微生物であった。

16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシングの解析結果を属レベルで評価したところ、中層および底層で Marine Group I に分類されるアンモニア酸化古細菌の *Candidatus Nitrosoarchaeum* に近縁な OTU (Operational Taxonomic Unit) が検出された。この OTU が総リード数に占める割合は中層で最大 9.8%、底層で最大 14.3% であった。7 月および 8 月は中層において、4、5、9 月は底層において割合が大きく、時期により鉛直分布が異なることが示唆された。また、2、3 月は中層、底層ともに割合が低下した。一方、アンモニア酸化細菌の *Nitrosospira* 属に近縁な OTU は最大で 0.5% であった。このことから、アンモニア酸化反応を担う微生物として AOA が優占していることが示唆された。

古細菌をターゲットとした 16S rRNA 遺伝子のクローニングにより検出されたクローンは全て AOA である *Nitrosoarchaeum koreensis* MY1 に近縁であった。また、系統樹を作成したところ、検出されたクローン (clone M7) は淡水環境の水生植物の根から検出されたクローンと同じ位置に位置づけられた (図 2)。分離株が存在しない新規の AOA であることが示唆された。今後は CARD-FISH 法および定量 PCR による AOA の定量、植物プランクトンの推移と AOA 細胞数の推移の関連性の評価、他の貧栄養ダム湖との微生物相の比較を行っていきたい。

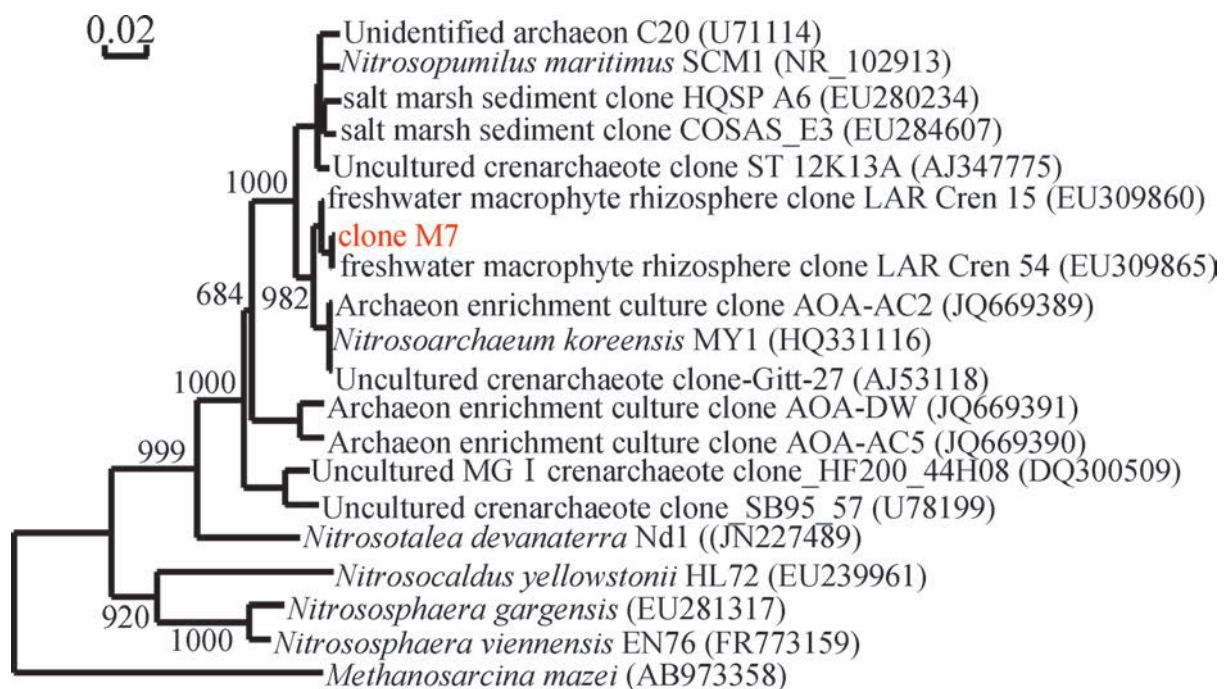


図 2 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹  
近隣結合法により 750 塩基に基づいて作成作成

藤本尚志 (応用生物科学部 醸造科学科)

渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

## シアノバクテリアから見出された新たな増殖戦略

シアノバクテリアは植物と同様の酸素発生型光合成を行う原核藻類です。海洋、湖、土壌、氷河など地球上のあらゆる環境に生息し、太古の昔から地球環境を支えてきました。シアノバクテリアは植物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、最近ではバイオ燃料をはじめとした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、*Anabaena* sp. PCC 7120 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。多くの微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効率的な細胞増殖を実現しており、細胞あたりのゲノムの数を1コピーに維持しています。しかしその一方で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。シアノバクテリアは細胞が増える過程の中でどのように複数コピーのゲノムを“複製”、“分配”し、そして“分裂”しているのでしょうか。私たちのグループでは次世代シーケンサー(NGS)を用いた解析から、シアノバクテリアが一部、他のバクテリアとは異なる機構で増殖することを明らかにしました。

### (1) シアノバクテリアの複数コピーゲノムの複製

*Synechococcus* は光に完全に依存して増殖しますが、複製も同様に光に依存することがわかりました。明るいところではゲノムは複製され、暗いところでは複製は起きません。さらに光合成反応を阻害するとゲノム複製も阻害されることから、*Synechococcus* の複製は光合成反応と密接に関連していることがわかりました(Ohbayashi *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 2013)。さらにNGSを用いてゲノムの複製開始点、複製様式を実験的に証明することに成功しました。環状のゲノム上に単一の複製開始点が存在し、そこから両方向に複製が進行するという点は他のバクテリアと同様でした。しかし、細胞内に存在する複数コピーのゲノムは一斉に複製せず、細胞間、ゲノム間で非同調的に複製するというものを見つけました(図1)(Watanabe *et al.*, Mol. Microbiol., 2012)。その後、海外の研究グループより我々の報告を支持する結果が立て続けに発表され、*Synechococcus* は大腸菌、枯草菌とは異なった複製制御をもつことが明らかとなりました。

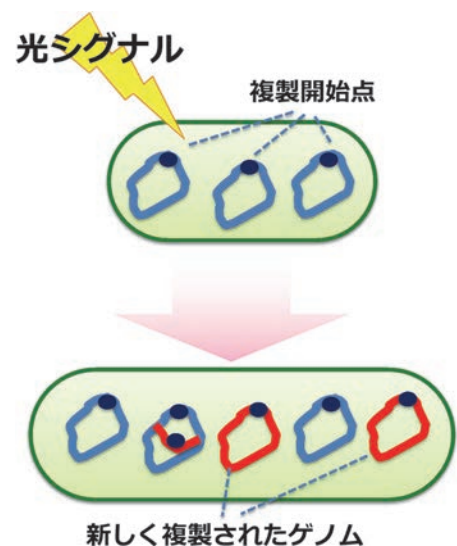


図1 *Synechococcus* の非同調的なゲノム複製



## (2) シアノバクテリアの複数コピーゲノムの分布・分配

複数コピーのゲノムは細胞の中でどのように存在しているのでしょうか。私たちは FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法によってゲノム上のある領域を標識し、顕微鏡下で複数コピーのゲノムの位置を観察しました。その結果、複数コピーのゲノムは細胞の形に沿って均等間隔で局在することがわかりました (図 2) (Watanabe *et al.*, Microbiology, 2018)。また、複数コピーゲノムの分配についても観察したところ、細胞分裂の際にはほぼ均等に分配されることもわかりました。複数コピーゲノムの分布には ParA というタンパク質が関わることも明らかとなり、分布・分配制御のメカニズムについて引き続き研究を進めています。

## (3) 複数コピーゲノムのコピー数の制御

シアノバクテリアはゲノムのコピー数をどのように制御しているのでしょうか。大腸菌は培養条件を整えると複製と分裂のタイミングが同期します。両者の頻度が等しくなるためゲノムコピー数は 1 コピーに維持されます。一方、*Synechococcus* では複数コピーゲノムの複製は分裂と同期しませんでした。つまり、*Synechococcus* では複製と分裂間の制御は厳密ではなく、この違いがゲノムコピー数の増加を引き起こしていることがわかりました (Watanabe *et al.*, PLoS One, 2015)。

## (4) ゲノム複製制御の多様性

バクテリアの DNA 複製は複製開始因子 DnaA によって厳密に調節されており、大腸菌では *dnaA* 遺伝子のみを欠損することはできません。シアノバクテリアでの *dnaA* の必須性を調べてみると、*Synechocystis* や *Anabaena* では大腸菌とは異なり *dnaA* を欠損しても複製活性や増殖になんら影響を及ぼさないことがわかりました。一方 *Synechococcus* では *dnaA* を簡単に欠損できませんでした。選別を繰り返しながら *dnaA* 完全欠損株を取得し、そのゲノムを解析すると *Synechococcus* のもつプラスミドがゲノム中へと挿入され、その領域より複製を開始していました (図 3)。興味深いことに *dnaA* 欠損株は長期培養での生存率が増加しました。シアノバクテリアは DnaA の依存度を下げることで複製開始の制御を解除し、培養環境に柔軟に適應するためのシステムを構築したと考えられま

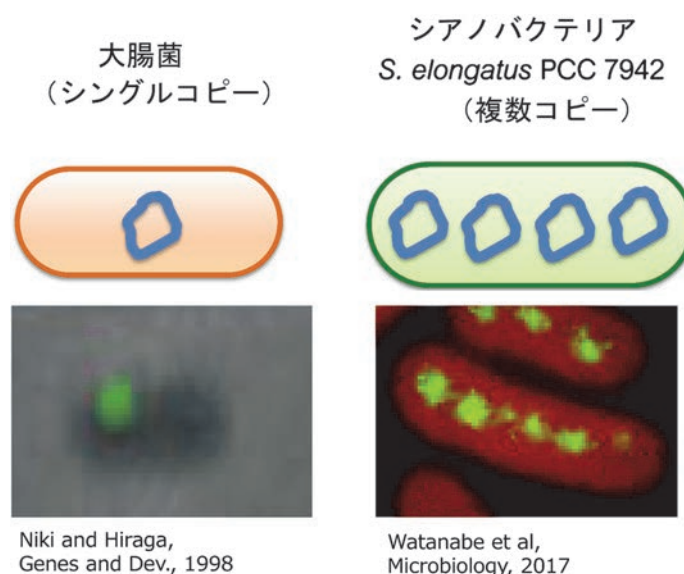
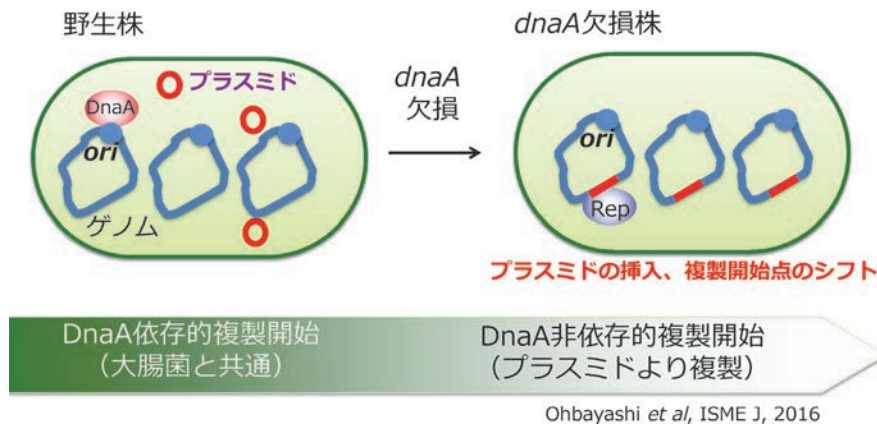


図 2 バクテリアゲノムの分布 (複製開始点近傍を蛍光標識し顕微鏡で観察した)





Ohbayashi *et al.*, ISME J, 2016

図3 *dnaA* 欠損により引き起こされた DnaA 非依存的な DNA 複製開始

す (Ohbayashi *et al.*, ISME J, 2016)。 *Synechocystis* や *Anabaena* が DnaA を用いずにどのように複製を開始しているのか、引き続き研究を進めています。

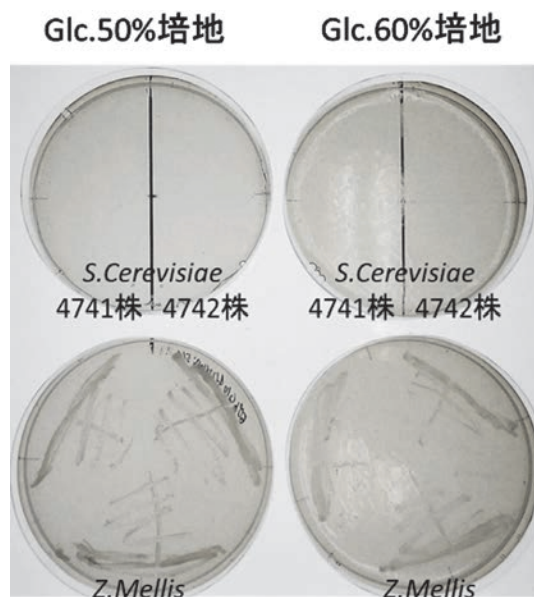
私たちの研究からシアノバクテリアが、大腸菌などの他のバクテリアとは異なる独自の増殖機構を備えていることがわかりました。光合成は光から高効率にエネルギーと糖を生産できますが、同時に DNA を傷つける有害な活性酸素種を副産物として生じます。シアノバクテリアは、複製開始や複製と分裂間の制御を緩めることでゲノムを重複させ、光合成による DNA 傷害を克服していると考えられます。このような基礎的な研究はシアノバクテリアを使った応用研究を発展させる上でも極めて重要です。光から有機物を安価に生産できるシアノバクテリアは有用物質生産における究極のホストと言っても過言ではありません。エネルギーの枯渇や、温暖化など地球レベルでの問題が深刻化する中で、これからシアノバクテリアが果たす役割は大きいと考えられます。今後、シアノバクテリアの基礎と応用を両輪とした研究を進めることで、シアノバクテリアの産業利用の促進、効率化に貢献したいと考えています。

渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
 大林龍胆 (国立遺伝学研究所)  
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)  
 吉川博文 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

## 蜂蜜から分離された酵母 *Zygosaccharomyces mellis* の高糖度耐性に関する研究

蜂蜜は水分活性が 0.75、糖度が約 80%の低水分食品である。本研究室においてカナダ産の蜂蜜から分離・同定した *Zygosaccharomyces mellis* は、蜂蜜やシラップに生育できる高い耐糖能力を有し、保存食品の腐敗や味の劣化原因となる。本研究室では、研究室酵母である *S. cerevisiae* はグルコース 40%存在下で生育が阻害されるのに対して、*Z. mellis* がグルコース 60%存在下でも生育することを確認した。そこで保存食品における微生物の制御を目指し、① *Z. mellis* において高糖度条件下で発現変動する遺伝子の解析、② *Z. mellis* の近縁種である *Z. rouxii* や *S. cerevisiae* との比較ゲノム解析を行い、*Z. mellis* が有する耐糖性メカニズムを明らかにすることを目的とした。

はじめに、1%グルコース含有 YM 培地あるいは 50%グルコース YM 培地で *Z. mellis* を培養し、全 RNA を抽出した。次に次世代シーケンサーを用いて RNA-Seq を行った。その結果、発現量が大きく変動した約 60 遺伝子を得た。その中にはプロトンポンプ、細胞壁合成関連酵素、糖代謝、各種転写調節因子をコードする遺伝子が含まれていた。現在、得られた遺伝子群から高糖度耐性に必須な遺伝子を探索中である。



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



## アミノ酸飢餓への適応機構から見出された

### 枯草菌 RNA ポリメラーゼの新規機能

微生物には、培地中のアミノ酸濃度が低くなると警告物質（アラーム）として核酸小分子 (p)ppGpp を合成・蓄積し、さまざまな適応現象を引き起こす緊縮応答という機構が知られている。一方、その詳細な分子機構は生物種によって少しずつ異なることが知られている。枯草菌においては (p)ppGpp が GTP 合成を直接阻害することで GTP/ATP 量比を低下させるが、このことが細胞レベルの適応現象の引き金となる。なぜなら枯草菌では遺伝子の転写効率が転写開始点 (+1) の塩基に依存しており、GTP/ATP 量比が低下すると、+1 の塩基が G である rRNA オペロン等の発現が抑制される一方で、+1 の塩基が A であるアミノ酸合成関連遺伝子等の発現が促進されるからである。増殖に必須なさまざまな細胞機能の発現を促す rRNA オペロンを抑制し、アミノ酸合成系の遺伝子発現を促進させることで、アミノ酸飢餓に適応することは理にかなっている。我々は (p)ppGpp 合成酵素を欠失した株（以下  $\Delta 3$  株）を作製し、緊縮応答の全体像の解明を目指してきた。

$\Delta 3$  株は、アミノ酸飢餓時に GTP/ATP 量比の制御ができず、最少培地で生育阻害を示す。その生育阻害を抑圧する株を数多く取得し、次世代シーケンサーによるマッピングを行ったところ、複数の株において RNA ポリメラーゼコア酵素をコードする *rpoB*、*rpoC* に抑圧変異が同定された。野生株ではアミノ酸飢餓時に、上述のように (p)ppGpp によって GTP 合成が阻害されるため細胞内 GTP レベルが低下するが、 $\Delta 3$  株ではこの低下が見られない。一方、*rpoB/C* 変異株においても細胞内核酸レベルを HPLC により測定したところ、アミノ酸飢餓時の GTP レベルは低下しないことが分かった。

次に、*rpoB/C* 抑圧変異株において転写開始点の塩基の違い (+1A 又は +1G) が転写活性に与える影響を *lacZ* アッセイにより野生株と比較したところ、*rpoB/C* 変異株は +1A に対し +1G の転写活性が低下していた。したがって RNAP コアの変異により +1 ヌクレオチドに応じて転写活性を変化させているという興味深い現象の存在を示唆した。この現象をさらに検証するため、RNA-seq を行って全ゲノムレベルで解析した。

アミノ酸飢餓時に誘導される遺伝子の多くは転写開始点 +1 が A であることは既に述べたが、これらの遺伝子の緊縮応答時の転写量を野生株 (wt)、 $\Delta 3$  株、*rpoB* 変異株で比較したヒートマップを図 1 に示す。野生株では緊縮応答時に ATP 量が相対的に増大するため、ほとんどの遺伝子の転写量が増加しているが（赤色）、 $\Delta 3$  株ではこの増加が見られない（青色）。一方、*rpoB* 抑圧変異株では  $\Delta 3$  株より多くの遺伝子発現が促進され、野生株に近づいている様子が窺える。反対に、転写開始点 +1 が G である遺伝子群について解析したヒートマップを図 2 に示す。これらの遺伝子は野生株の緊縮応答時には GTP レベルが低下するため抑制されるが、 $\Delta 3$  株では GTP レベルが上昇し、発現も促進されている。また *rpoB* 抑圧変異株では *rpsG/L*、*nusA* 等、多くのリボゾームオペロン遺伝子において  $\Delta 3$  株で見られた促進が見られず、やはり野生株に近づいていることが明らかになった。

これらの結果から、*rpoB* 抑圧変異株では細胞内ヌクレオチドレベルが  $\Delta 3$  株と同様であるにもかかわらず、転写活性は野生株に近づく傾向にあることが分かる。したがって、*rpoB* 抑圧変異株では

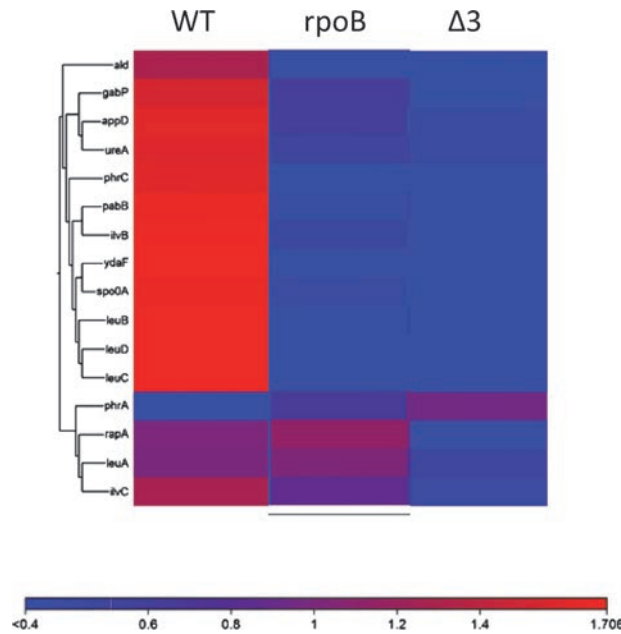


図1 転写開始点+1がAの遺伝子群の発現プロファイル。アミノ酸飢餓誘導後20分の転写量を野生株、 $\Delta 3$ 株、*rpoB*抑制変異株において比較した。

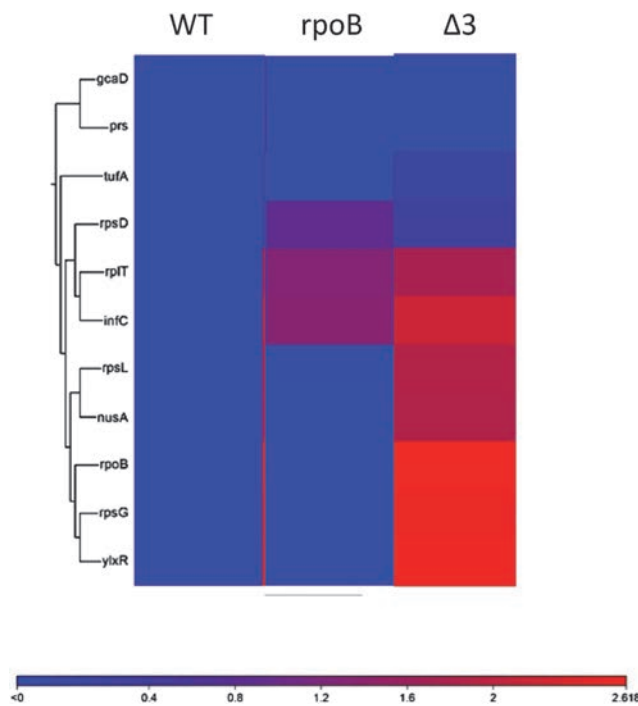


図2 転写開始点+1がGの遺伝子群の発現プロファイル。解析条件は図1と同じ。

緊縮応答時において細胞内 GTP レベルに依存せずアミノ酸飢餓に適応したと考えられる。以上のことは、RNA ポリメラーゼのコア酵素の変異によって、転写開始点のヌクレオチドとの親和性を変化させ、GTP レベルが高くても +1G からの転写開始を抑制するメカニズムを示唆している。

朝井 計 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
 吉川博文 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
 大坂夏木 (大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻)



# 環状リポペプチドの炭素鎖構造を決定する

## Bacillus 属細菌の遺伝子の特定

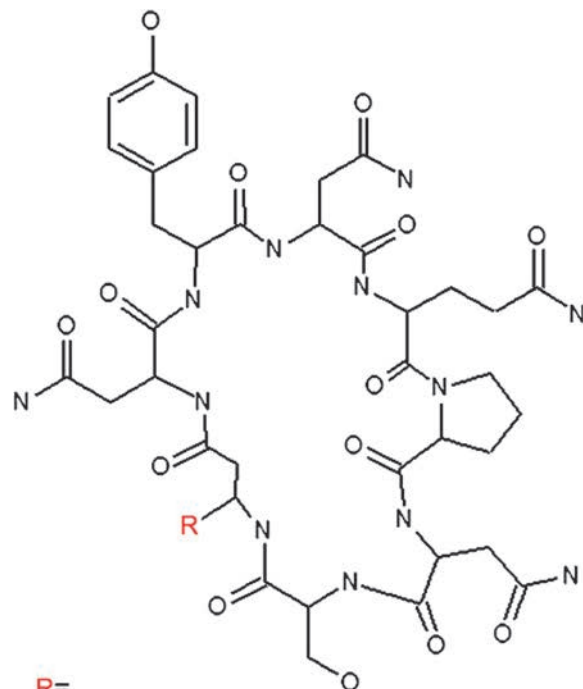
*Bacillus* 属菌の一部の菌株は各種植物病害に対して病害抑制効果を示し、それら病害抑制効果を示す菌株のほとんどが抗菌性環状リポペプチドを分泌する。*Bacillus* 由来の環状リポペプチドは、 $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸 CoA もしくは  $\beta$ -アミノ脂肪酸 CoA をスターター物質として、非リボソーム型ペプチド合成 (NRPS, Non Ribosomal Peptide Synthesis) 酵素によりアミノ酸を伸長後、環化して菌体外へ分泌される。生合成された環状リポペプチドは脂肪酸部位の炭化水素鎖の炭素鎖長や構造異性体、ならびにペプチド部位のアミノ酸の種類により、多様なホモログが存在するが、これらは化学構造上の特徴及び NRPS のオペロンの構造により、iturin、surfactin、fengycin の 3 つのファミリーに分類される。

Iturin A は iturin ファミリーに属する環状リポペプチドの一種であり、各種植物病原性糸状菌を含む広範な真菌類に対して抗真菌活性を示す物質である (図 1)。Iturin A の抗真菌活性は、その  $\beta$ -ヒドロキシ脂肪酸由来の炭化水素鎖長に依存して比活性が異なり、鎖長が長いほど高い抗真菌活性を示すことが知られている。

著者らはこれまでに、iturin A 生産性の *Bacillus* 属菌株について iturin A のホモログ生産比を菌株間で比較し、菌株間で脂肪酸部位の炭化水素鎖長に関するホモログ生産比が異なり、それらは培養条件に影響されずに、炭素数により 2 種類のパターンに分かれることを見出した (図 2)。環状リポペプチドの脂肪酸部位の構造炭化水素鎖長は抗真菌活性に影響することから、植物病害抑制効果にも大きく影響することが予想されることから、強く示唆される。

そこで本研究では、環状リポペプチドの脂肪酸部位の炭化水素鎖長を決定する因子の特定を目的として、*Bacillus* 属菌株のドラフトゲノムを NGS により得て、環状リポペプチド生合成に関与する候補遺伝子の相同性検索を行った。

Iturin A および未知の iturin A 様物質の生産性が確認された *Bacillus* 属 10 菌株について各菌株のドラフトゲノムを取得し、さらに他の研究グループにより公開された surfactin 生産性 iturin 非生産性 *Bacillus* 属 1 菌株を含む合計 11 菌株のドラフトゲノムから、脂肪酸アシル CoA 合成酵素 (FACL) 遺伝子、ならびにペプチド伸長酵素複合体へアミノ酸を転移させるホスホパンテテ



- R=
- C11,  $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$
  - C12-1,  $-(\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
  - C12-2,  $-(\text{CH}_2)_9\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
  - C13-1,  $-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$
  - C13-2,  $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$
  - C14-1,  $-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$
  - C14-2,  $-(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$

図 1 環状リポペプチド iturin A

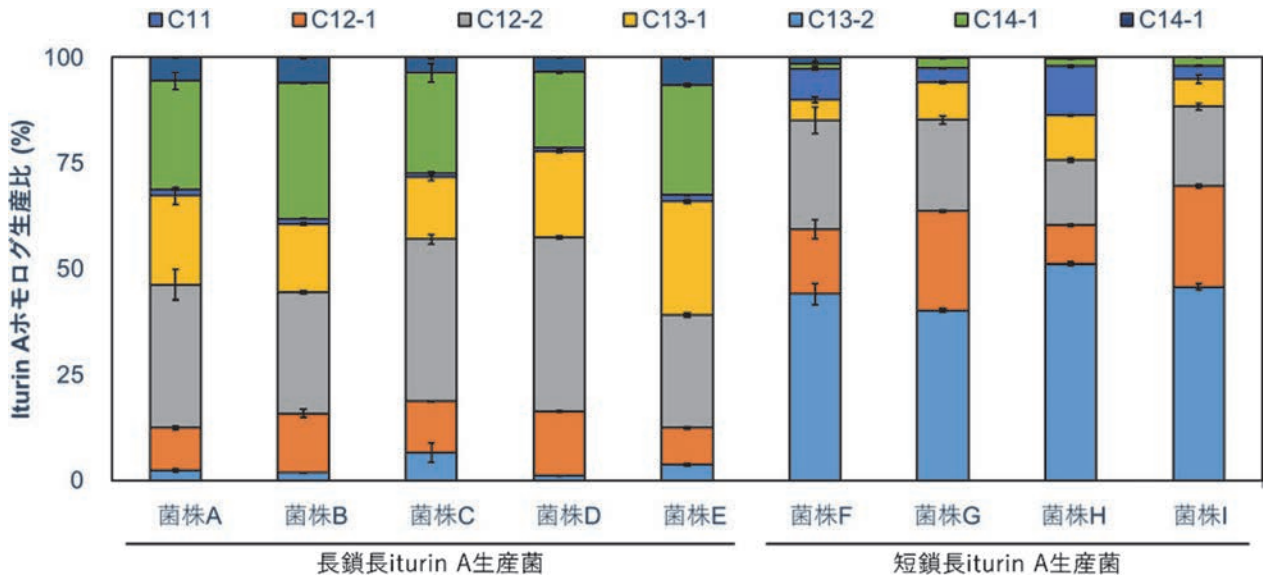


図2 Iturin A ホモログ生産比

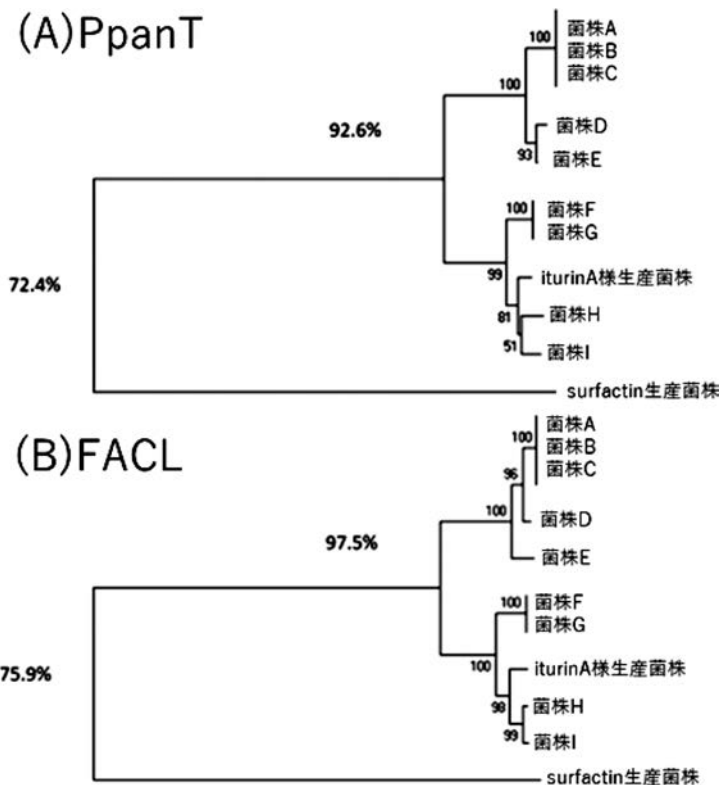


図3 環状リポペプチド生合成遺伝子配列の系統樹

イン酸転移酵素 (PpanT) 遺伝子を対象に菌株間の相同性比較し系統樹を作成したところ、対象遺伝子は何れも、まず surfactin 生産性 1 菌株と iturin 生産性 10 菌株で分かれ、さらに iturin A の炭化水素鎖長の長短により 2 つのクレードに分かれ (図 3)、これらが環状リポペプチドの炭化水素鎖を決定する因子となることが予想された。

今後は iturin A 生産性菌株で遺伝子組換え体を作成し、iturin A の炭化水素鎖長を決定する遺伝子を特定する予定である。

横田健治 (応用生物科学部 生物応用化学科)



## 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

清酒、焼酎、泡盛から分離された国酒酵母（清酒酵母、焼酎酵母、泡盛酵母）は、世界的な酵母分類学書である *The Yeasts a Taxonomic Study* (5版が最新) において、これまで *S. cerevisiae* に分類されている。しかし、醸造業においてはそれらの国酒酵母を醸造試験により、実用上区別してそれぞれの酒類醸造に利用している。また、*The Yeasts* の4版からは種を同定する Key to species に、それまでにはなかった試験が採用されたことにより、国酒酵母は *S. cerevisiae* とは異なる種に同定されるなどの矛盾も生じている。明治期に日本で最初に分離された清酒酵母は、*S. sake*、*S. tokyo*、*S. yedo* などの学名を有しており、泡盛酵母も *S. awamori* とされていた。また、焼酎もろみから分離された酵母には *S. batatae* などの学名も付けられ区別されていたが、1900年のはじめは日本においても微生物学がはじまった頃であり、情報不足などから欧州の酵母分類学において、発酵に利用される類似した酵母は *S. cerevisiae* とされたということも考えられる。また、日本独自の麴を利用する醸造という微生物生態系であるため、国酒の醸造過程から酵母を分離して分類学的な研究を行うということは、当時の海外においては困難であったと考えられる。

当研究室ではこれまで様々な生理、生化学的試験によって、清酒酵母を中心とした国酒酵母が、*S. cerevisiae* とは異なる性質を多く持つことを明らかにしてきた。そして、日本国内で唯一、清酒酵母が *S. cerevisiae* とは異なり独自性があることを提唱し続けている。また、3種類の国酒で利用されるそれぞれの国酒酵母（清酒酵母、焼酎酵母、泡盛酵母）においても様々な特異性をそれぞれの酵母が有し、実用上も汎用されている優良株と醸造過程で分離された野生株で異なる性質を示すなど、それぞれが独自の群を形成する可能性があることが示唆されている。そのため、当研究室に保存

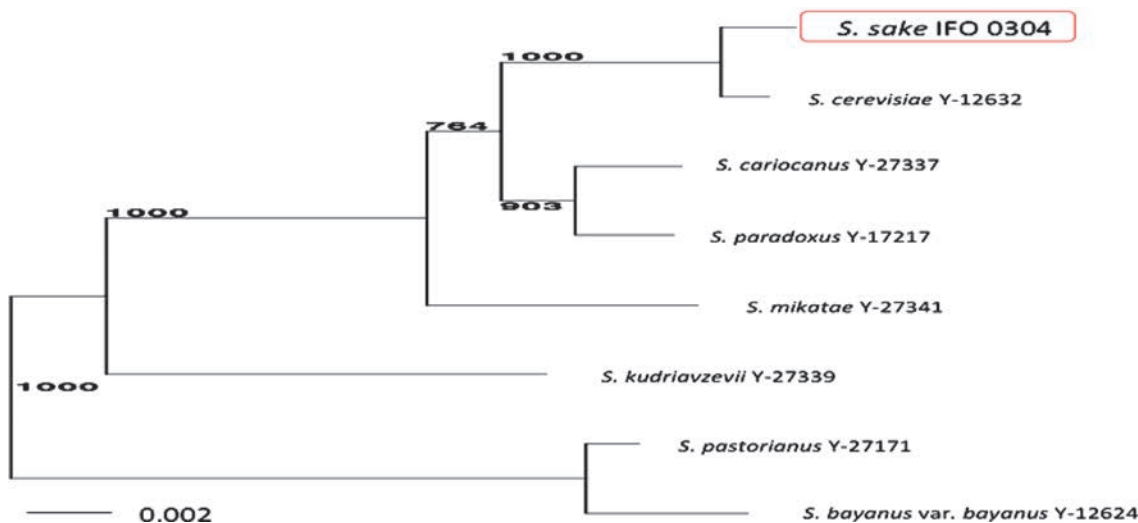


図1 The YEASTS 5<sup>th</sup> の分類指標を用いた *S. sake* の系統解析

されている国酒から分離された酵母や、国内外の菌株保存機関に保存されている国酒関連の酵母を多数用いて、The Yeasts 5版、および研究室の指標である生理学、生化学的試験により分類したところ、国酒酵母は *Saccharomyces* 属の種とは異なる4つの特異的な群を形成することが推察された。そこで、これら4つの群から分離源やオリジナルの学名を考慮した代表株を選抜し、それらの系統解析を行うために全ゲノムを解析することが必要となった。

現在、微生物の分類は遺伝子による分子系統学的解析が主流となっており、The Yeasts 5版における *Saccharomyces* 属の分類も rDNA による系統解析が採用されている。そして、それに倣って酵母の分類に汎用される遺伝子を用いた系統解析を行うと（図1）に示すように清酒酵母の基準株は *S. cerevisiae* と区別される。また、*S. cerevisiae* の産業株（ビール、ワイン、パンなど）の全ゲノム情報が、様々な菌株についてデータベース上に開示され、全ゲノム塩基配列の違いから系統樹も作成されている。その中で、清酒酵母として開示されている株は、どの研究報告においても清酒酵母クレードを形成しており、他の産業株（ビール、ワイン、パンなど）から独立して存在している。しかし、清酒酵母の全ゲノムデータは、清酒醸造において最も実用されているきょうかい7号の全ゲノムがデータベースとして公表されているが、国酒酵母の野生株で異なる性質を示す株のデータは少なく、分類も行われていないため、その特異性と分類学的位置を明確にする必要があると考えられる。

そのため、生理学、生化学的試験において性質が異なる国酒酵母を、きょうかい7号と *S. cerevisiae* を対照として全ゲノム解析を行うことにより、国酒酵母の系統進化の基礎データを得ることができるものと期待される。さらに、国酒酵母の特徴となる遺伝子をゲノム上から抽出できれば、国酒醸造に利用可能な優良な酵母を選抜することが容易となり、醸造業の発展にもつながることが期待される。

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）

数岡孝幸（短期大学部 醸造学科）



# 畜産物による食品起因感染症の制御のための 次世代シーケンサーを用いた食品起因 感染症原因菌の進化系統グループの解明

食品起因感染症原因菌の全ゲノム解析データの集積により、同一の細菌種内で複数の進化グループに細分化され、病原性に差がある進化グループの存在が確認されている。それにより、畜産物に分布する進化グループを把握することで畜産物のヒトへの危害度合いをより正確に推測することが可能となってきたが、家畜・家禽に保菌されている食品起因感染症原因菌の進化グループの関連性について解明されている菌種は少ない。食品起因感染症原因菌は様々なものがあるが、我々は今までにサルモネラおよび腸管出血性大腸菌の進化系統グループについての解明を行ってきたが、今回サルモネラについての結果を報告する。

ヒトにおけるサルモネラ食中毒は鶏肉や鶏卵食品を介して発生するが、わが国では主に鶏卵では *Salmonella Enteritidis*、鶏肉では *S. Infantis* (SI) がその汚染源として重要である。我々はある県の一食鳥処理場において継続的に肉用鶏のサルモネラ調査を行っており、今まで主に SI が分離されていた。しかし、2014 年以降の調査では SI はほとんど分離されず、代わって *S. Agona* (SA) が多くの肉用鶏から分離されるようになった。肉用鶏の種鶏は複数の種鶏場から導入されており、一地域に限定された SA の emerging とは考えにくい。今回の肉用鶏における本血清型の emerging により鶏肉を介したヒトの outbreak のリスクが高まる可能性は否定できない。そこで本研究では調査地域の肉用鶏およびヒトから分離された株、全国の地方衛生研究所および家畜保健衛生所において 2005 ～ 2015 年に分離された株について分子疫学的解析を実施した。

SA の分子疫学的解析はパルスフィールド電気泳動 (PFGE) および次世代シーケンサー (NGS)

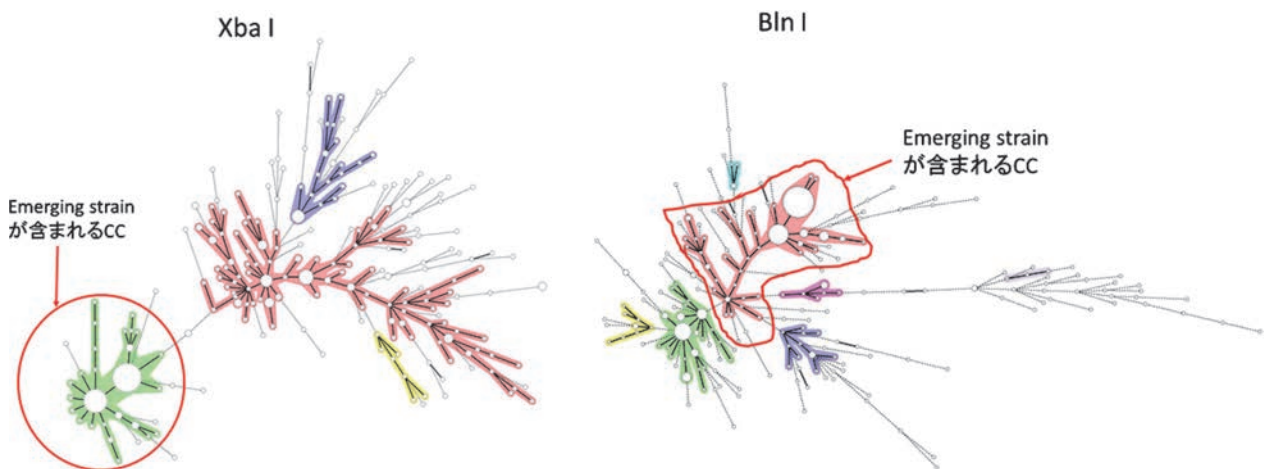


図 PFGE による SA の分子疫学的解析

によって行った。PFGEにおいては、制限酵素は Xba I および Bln I を用いて解析を行い、Minimum spanning tree (MPT) 解析を行って、各菌株の類似度により被験菌株を geno-group に分けた。その結果、制限酵素によっていくつかの clonal complex (CC) に分けられ、調査地域の肉用鶏からの分離菌株は 1 つの CC を形成し、調査地域のヒトから分離された菌株も同一の CC に含まれることが明らかになった。また、関東および関西の一地域から分離されたいくつかの菌株も同一の CC に含まれることが明らかになった。このそれぞれの CC から任意に選択した菌株の NGS 解析の結果を進化系統グループに大別した。その結果、調査地域の肉用鶏からの分離株は 3 つのグループに分かれた。多くの菌株は 2 つのグループに含まれており、調査地域のヒトから分離された菌株は 2 つのグループのうちの 1 つに含まれた。また、PFGE で同一の CC に含まれた関東および関西の一地域から分離された菌株も同一のグループに含まれることが明らかとなった。

分子疫学的解析によって、調査地域で肉用鶏から分離された菌株は同一地域のヒトから分離された菌株と同一クローンであることが示された。また、この菌株は emerging の地域から離れた地方の菌株と同一クローンであることも示された。emerging の地域から離れた地方の菌株は emerging 菌株よりも古い菌株であり、これらの菌株が emerging 菌株と何らかの関係がある可能性が示された。今回 emerging の発生初期について検討が出来た希有な調査となった。今後、この菌株の全国的な emerging があるのか注視していく必要があり、菌株間の病原性とゲノムの関係について検討を行っていく予定である。

村上覚史 (元農学部 畜産学科)

鳥居恭司 (農学部 畜産学科)

横山栄二 (千葉県衛生研究所)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

## 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、新品種の育成過程でダイジョの N511 品種（ヤマイモの一種）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 H29 大学院先導的実学研究プロジェクトの一環である。

供試材料は宮古亜熱帯農場において無施肥条件下で栽培したダイジョ A-19 系統の 1 個体を用いた。先行研究から共生窒素固定細菌の活性が植え付け後 120 日目に最大となる傾向が示されたので、植え付け後 120 日目にサンプリングを行った。ダイジョの葉、茎、根、塊茎 (図 1) をそれぞれ数 g 程度採取し、表面殺菌後クリーンベンチ内にて、滅菌した解剖バサミまたはコルクボーラーを用いて



図 1 解析に供したダイジョの葉、茎、根、塊茎

長さ数 mm に断片化した。その植物片をディスポーサブルホモジナイザーを用いて破碎し、細胞懸濁液から ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit を用いて DNA を抽出した。同一個体の葉、茎、根、塊茎からそれぞれ 3 サンプルの DNA を得た。また、微生物叢の標準試料として 8 種類の既知原核微生物混合物である ZymoBIOMICS Microbial Community Standards から同一 DNA 抽出キットを用いて DNA を得た。得られた DNA から 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーを用いてアンプリコンシーケンシング用のライブラリー調製を行い、Illumina MiSeq による 300bp のペアエンドシーケンスに供した。シーケンス後の微生物群集解析は、オープンソースの統合解析環境である QIIME 2 と Silva 16S rRNA 配列データベースを組み合わせて行った。

予備実験として腸内細菌叢解析でよく用いられる 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域用のプライマーを用いて解析を行った結果、解析対象のリードのうち約 80% が宿主葉緑体由来、約 8% が宿主ミトコンドリア由来であった。そこで本実験では先行研究で葉緑体由来の PCR 産物の増幅を抑えると報告のあった V5-V6 領域用のプライマーを用いて解析を行った。結果、宿主葉緑体由来のリード数が約 47% と減少した一方で、宿主ミトコンドリア由来のリード数が約 38% と増加し、植物共生細菌用のプライマー選択の難しさが示された。一方で、既知 8 種類の原核微生物混合物である標準試料の菌叢解析を行った結果、8 種類全てが検出されたことから、本解析系の精度は担保されていると考えられた。現在、検出された系統情報の詳細な解析を行っている。

志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)

田中尚人 (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)



## 摂取栄養源によるラット腸内菌叢解析タイトル

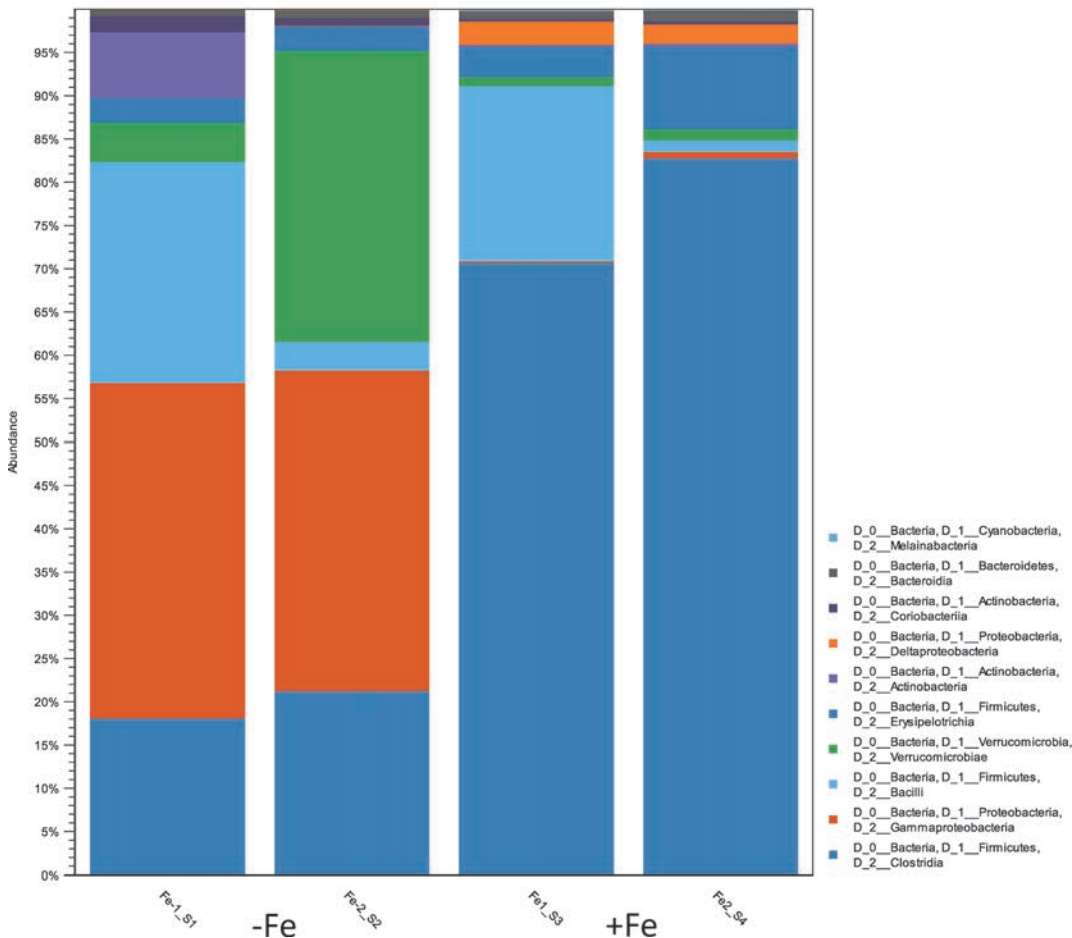
ヒト腸内には、7兆の微生物が菌叢を形成して健康維持の要となっている。

菌叢に影響を与える因子として、種々の多糖、オリゴ糖、有機酸、pH が研究され、最近では嫌気度（酸素の有無）が腸内菌叢形成の因子として注目されている。酸素は利用性と毒性の両刃の剣であり、この2面性は鉄により支配されるが（酸素利用＝酸化鉄還元可溶化反応、酸素毒性＝還元鉄フェントン反応）、その実態は不明である。井上らは、ラットの鉄欠乏飼育条件を確立し、ラット臓器の生理活性変化を解析している。昨年度申請では、ラットの鉄欠乏飼育と通常飼育時の糞便菌叢の関係をメタゲノム的手法による解析を試みた。鉄欠乏飼育では通常飼育に比較して、Fermicutes 門が顕著に減少し、Proteobacteria 門の顕著な増加が観察された（図参照）。Fermicutes 門にはバチルス門、Proteobacteria 門には腸内細菌門が知られており、申請者らは、両門の細菌の鉄代謝に遊離フラビンとその還元酵素系が関与することを見いだしている。本年度は、ラットの鉄欠乏飼育と通常飼育時の糞便菌叢解析の再現確認を行うと共に、昨年度に観察された2門細菌の酸素・鉄代謝解析を試み、腸内菌叢形成に及ぼす酸素・鉄の影響解明を目指したい。

腸内に存在する主な細菌群として、酸素耐性嫌気性菌と通性嫌気性菌が知られている。酸素耐性菌は呼吸鎖を欠如し、好気条件下で生存あるいは生育する嫌気性菌である。それに対して通性嫌気性菌は呼吸鎖を有し、酸素存在下では酸素を利用して生育する嫌気性菌である。本申請では、先の2門に属し酸素と鉄に対して同等の要求性を示す酸素耐性嫌気性菌（Fermicutes 門）として *Amphibacillus xylanus*、通性嫌気性生菌（Proteobacteria 門）として *E. coli* を選択した。*A. xylanus* は好気・嫌気条件で同等に良好生育するグラム陽性菌で、呼吸鎖を欠如するが、細胞乾燥重量あたり、大腸菌に匹敵する酸素吸収力を有す。フラビン（FAD、FMN）は一般的に酵素に結合し機能するが、*A. xylanus* には、タンパク質非結合性フラビン（遊離フラビン）が存在<sup>[1]</sup>、遊離 FAD 存在下で活性化されるフラビン酵素 NADH oxidase-Prx 系<sup>[2]</sup>、NAD(P)H oxidoreductase<sup>[3]</sup> が酸素代謝に関与している。一方、*E. coli* において、Imlay らはフラビン還元酵素遺伝子ノックアウト株と野生株の呼吸鎖への電子の流れを KCN で制御し、両株で Fe<sup>2+</sup> 生成を観察し、両株の DNA 損傷と菌体生残性から、*E. coli* における鉄還元への遊離フラビンの関与を提案した（Imlay ら、2002, *J. Biol.Chem.* 277）。*A. xylanus* の酸素代謝系への電子制御は KCN では難しく、好気培養から嫌気培養への迅速切り替え法を確立し、代謝解析を試みた。

- ①鉄欠乏、通常飼育ラット腸内菌叢比較解析：鉄欠乏飼育条件が確立され（井上ら）、昨年度、鉄欠乏下におけるラット腸内菌叢解析から、鉄欠乏状態で Fermicutes 門の顕著な減少、Proteobacteria 門の顕著な増加が観察された。本年度は個体数を増加させたところ、再現を得ることに成功した。そこで両門に属す2供試菌を選択し、下記の実験を行った。
- ②好気培養から嫌気培養への迅速切り替え培養法：8 L ミニジャーファメンターにて、好気培養し、対数増殖中期に 100% N<sub>2</sub> 吹き込みにより、嫌気培養に切り替えた（完全無酸素培養）。N<sub>2</sub> 吹き込み直前、後 30 分、4 時間の生菌数（好気平板培養法）を観察した。
- ③細胞内遊離フラビン定量、Fe<sup>2+</sup> の分析：遊離フラビンは菌体をフレンチプレス破碎後、超遠心、膜による分子量分画後に、HPLC 分析（ODS カラム、蛍光検出法）、細胞内 Fe<sup>2+</sup> は、蛍光顕微鏡

## 大腸内菌叢は、鉄なし、有りで顕著に変化する



にて解析した。

*A. xylanus* は、0 ~ 80% 酸素存在下で同等の良好生育し、完全嫌気下から好気培養への切り替えに対応して生育する。本菌は自己酸素吸収で無酸素条件を確立し、嫌気的な生育が可能である。しかし、本報告の好気培養から嫌気培養への迅速切り替えでは、生育阻害が観察された。切り替え培養後30分では生菌数に変化はなかったが、生菌数は4時間後に1/30以下に減少した。現在、酸素、鉄動態、RNA-Seqにより代謝機構を解析中である。

[1] Ohnishi, K.*et al.*, 1994, *J. Biol.Chem.* **269**, 31418. [2] Nishiyama, Y.*et al.*, 2001, *J. Bacteriol.* **183**, 2431. [3] Mochizuki, D. *et al.*, 2014, *Microbiology* **160**, 340.

- 有馬治人 (大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻)
- 大野由依 (大学院農学研究科 バイオサイエンス専攻)
- 井上博文 (応用生物化学部 食品安全健康学科)
- 鈴木智典 (生命科学部 分子微生物学科)
- 内野昌孝 (生命科学部 分子微生物学科)
- 新村洋一 (生命科学部 分子微生物学科)
- 石毛太一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

## **Nocardioidea sp. PD653 株から POPs の 新規デハロゲナーゼ遺伝子を発見**

2017年、マリアナ海溝の水深6,000～11,000mに生息する深海生物体内にPCB (polychlorinated biphenyl) を始めとする大量の残留性有機汚染物質 (POPs) が含まれる事実が発表され、従来人類の影響から隔絶された領域と考えられてきた深海の認識を覆すものとなった<sup>1)</sup>。また、欧州におけるシャチの集団からPCBが検出されており、この地域における個体群の生殖機能への影響・絶滅が危惧されている<sup>2)</sup>。これらの研究から人類が地球環境へもたらした深刻かつ長期的ダメージの一端が垣間見える。

我々が研究対象とする HCB (hexachlorobenzene; C<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>) と PCP (pentachlorophenol; C<sub>6</sub>HCl<sub>5</sub>O) はともにストックホルム条約にて POPs に指定されており、我が国を含む締約国ではこれらの製造・使用禁止および早急な無害化処理が求められている。しかしながら、高度に塩素化されたこれらの有機化合物は環境中で極めて安定性を示し、自然環境中ではこれら化合物の分解代謝系が十分に確立されておらず、環境中に蓄積する結果となっている。

本研究では東京農大学生物資源ゲノム解析センターの支援の下、世界初の好氣的 HCB 脱塩素分解菌である *Nocardioidea* sp. PD653 株<sup>3)</sup> と、HCB 分解能に欠陥を持つナチュラルオカレンスの PD653-B2 株 (図 1B) との比較ゲノム解析により、HCB から PCP への脱塩素・水酸基置換反応を触媒する酵素をコードする *hcbA* 遺伝子群<sup>4)</sup> を世界で初めて同定した (図 1C)。また、HCB 存在下・非存在下における PD653 株の発現プロファイルを RNA-seq によって網羅的に比較することにより、PCP から TCHQ (2,3,5-trichloro-6-hydroxy-*p*-benzoquinone; C<sub>6</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) への 2-step hydrolytic dechlorination を触媒する酵素をコードする *hcbB* 遺伝子群<sup>5)</sup> を同定した (図 1D)。推定アミノ酸配列および構造遺伝子の解析から、HCB・PCP 分解代謝に関与するタンパク質はフラビンと O<sub>2</sub> を基質として反応を行う two component-flavin diffusible monooxygenase family (TC-FDM) である可能性が高いことが推察された。

これまで生体触媒による HCB の脱塩素反応は哺乳類の肝臓に存在する cytochrome P450<sup>6)</sup> や、*Pseudomonas putida* 由来 CYP101 の F87W/Y96F/L244A/V247L 変異体<sup>7)</sup> による研究例があり、好気条件下における HCB の脱塩素反応は cytochrome P450 monooxygenase が担う可能性が考えられていた。しかしながら本研究の発見はこれらの認識とは異なり、細菌が保有する TC-FDM タンパク質が有機塩素系化合物の分解代謝において重要な役割を担うことを示す新たな知見となった。

また、PCP 分解代謝に関与する細菌由来の遺伝子はこれまで一部のグラム陰性細菌でのみ単離・同定されており、PD653 株を含むグラム陽性細菌ではグラム陰性細菌のものとは異なる分解メカニズムの存在が示唆されてきたが、本研究によってグラム陽性細菌由来では世界初の新規 PCP 代謝遺伝子群 (*hcbB*) の発見に至った。さらに、新規 PCP 分解酵素をコードする *hcbB3* は PCP 分解代謝物である tetrachloro-*p*-hydroquinone (TeCH) で誘導される (発現量が約 200 倍) ことが明らかとなった。

今後、細菌による HCB・PCP 分解メカニズムの機構解明および TeCH 等誘導基質を用いた PCP 汚染環境中での分解能の向上を目指した応用研究に向けた基盤となることが期待される。

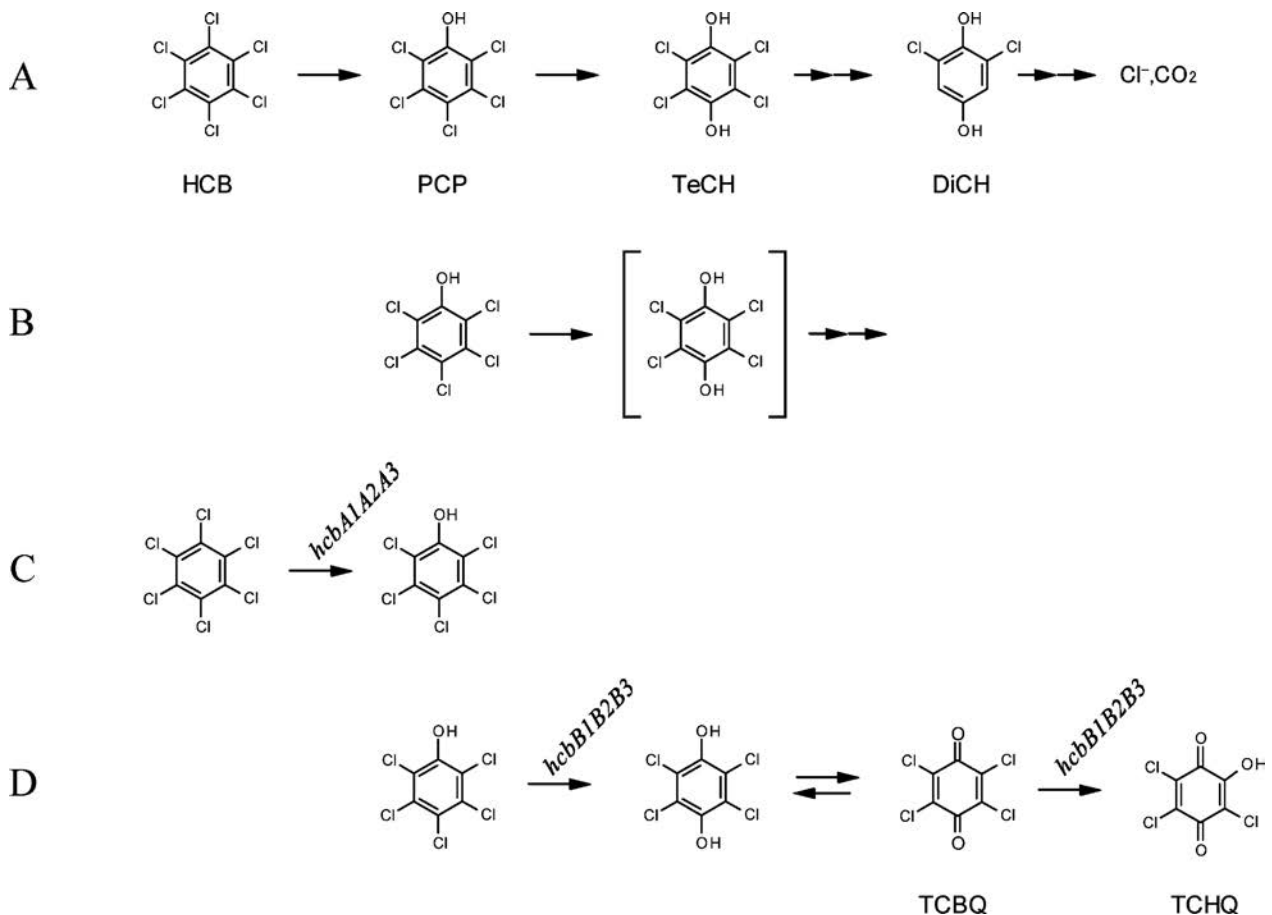


図1 (A) PD653株の好氣的HCB分解代謝経路。(B) 初発のHCB脱塩素能に欠陥を持つPD653-B2株の推定分解代謝経路。(C) *hcbA* 遺伝子群を導入した組換え大腸菌によるHCBからPCPへの脱塩素・水酸基置換反応。(D) *hcbB* 遺伝子群を導入した組換え大腸菌によるPCPの2段階の脱塩素・水酸基置換反応。

参考文献：

- 1) Jamieson AJ *et al.* (2017) *Nat. Ecol. Evol.* 1: 0051.
- 2) Jepson PD *et al.* (2016) *Scientific Reports.* 6: 18573.
- 3) Takagi K *et al.* (2009) *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 4452-4458
- 4) Ito K *et al.* (2017) *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e00824-17.
- 5) Ito K *et al.* (2018) *J. Pestic. Sci.* (in press)
- 6) Harihara M *et al.* (1975) *J. Agric. Food Chem.* 23: 261-265
- 7) Jones JP *et al.* (2001) *Eur. J. Biochem.* 268: 1460-1467.

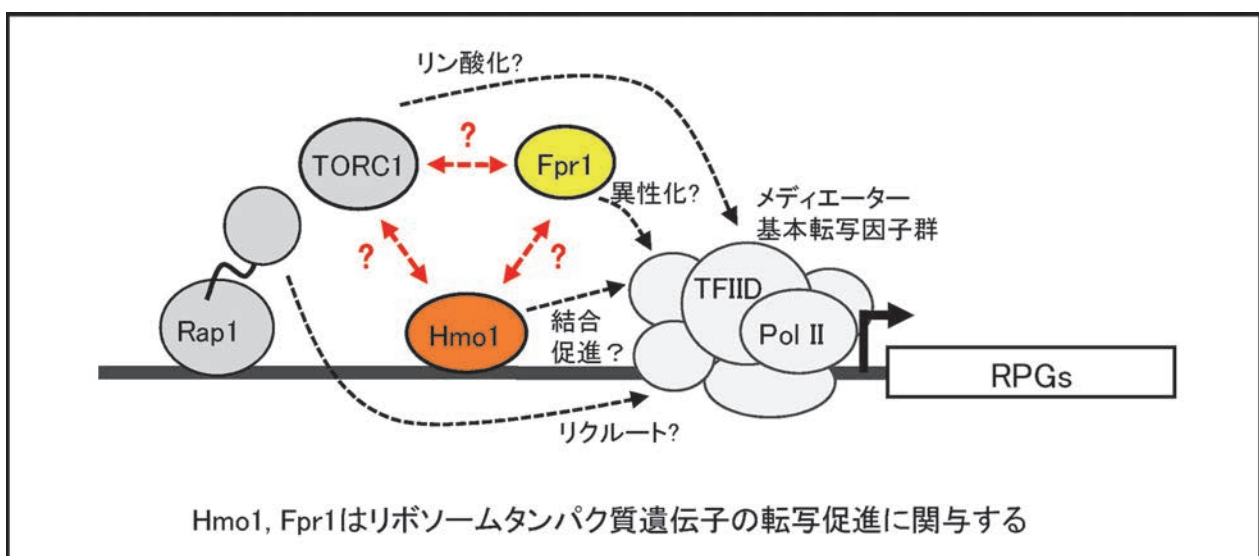
高木和広 (農研機構 農業環境変動研究センター 有害化学物質研究領域)  
 田中尚人 (生命科学部 分子微生物学科)  
 伊藤虹児 (大学院農学研究科 農芸化学専攻)  
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)



# タンパク質構造変化に関わる酵母の ペプチジルプロリルイソメラーゼ Fpr1 を介した リボソームタンパク質遺伝子の転写制御機構の解明

出芽酵母 Fpr1 は、高等真核生物の FKBP12 (FK506 binding protein 12) のオルソログであり、タンパク質の構造変換に関わるペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPIase) 酵素群の一つである。FKBP12 は、FK506 (別名: タクロリムス) やラパマイシンなどの薬剤と複合体を形成し、カルシニューリン (FK506) や TORC1 (ラパマイシン) などの酵素活性を阻害する。これらの薬剤の臨床及び基礎研究における重要性もあり、その作用機構が解明されたのは 20 年以上前のことである。ラパマイシンの作用は当初、FKBP12 のリボソーム合成における本来の働きを修飾・顕在化させたものと考えられたが、それを積極的に支持する証拠は無く、以後、薬剤という人為的な条件下での偶然の作用と考えられ、薬剤のない本来の状況における FKBP12 の役割については、リボソーム合成への関与を始め、現在も多くが不明である。

我々は Fpr1 タンパク質の遺伝子変異を、リボソーム構成因子の協調的な産生制御に関わると考えられている出芽酵母 Hmo1 タンパク質の遺伝子破壊株の生育異常を増強する変異として再発見し、そのリボソーム構成因子の生合成における役割について研究を行ってきた。FPR1 と HMO1 の二重破壊株 ( $\Delta fpr1 \Delta hmo1$ ) は著しい生育遅延の形質を示し、ノザン解析により、リボソーム RNA やリボソームタンパク質遺伝子 (RPG: ribosomal protein gene) の転写を大きく減少させることが明らかとなった。本結果は RNA-seq によるトランスクリプトーム解析によっても裏付けられ、Hmo1 に加え、Fpr1 がリボソーム構成因子の転写に関わることが強く示唆された。変異解析の結果、Fpr1 による RPG 遺伝子の転写活性化にはその PPIase 活性を必要としないことも明らかとなり、その具



体的な働きに興味を持たれる。

生物のタンパク質生産工場であるリボソームの合成に費やされる細胞資源とエネルギーは膨大であり、細胞の分裂や成長、エネルギー消費など様々な生物機能に密接に関与することが明らかになりつつある。そのため、その構成因子群の遺伝子の転写は細胞内外の環境に応じて動的かつ多様な制御を受けると考えられるが、その全容は未だ不明である。我々の研究は、少なくとも酵母においては、FKBP12が生理的条件下でリボソームの生合成に積極的に関与することを世界で始めて示すものであり、その役割の解明は、リボソーム生合成制御の新たな作用機構の発見に繋がると共に、臨床及び基礎研究における重要な薬剤の作用機構の正確な理解と、より効果が高く副作用の少ない薬や治療法の開発に繋がるものと期待される。

笠原浩司 (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)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

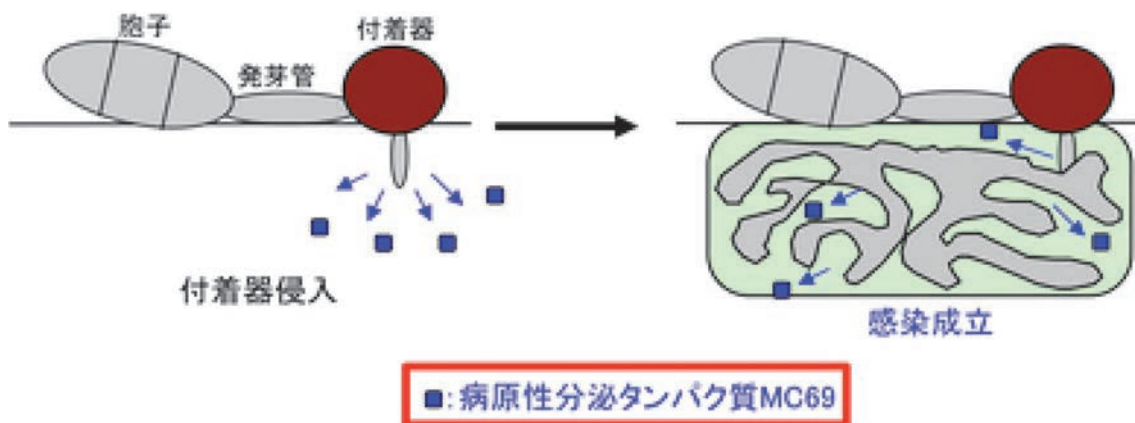
石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

# イネいもち病菌－宿主植物相互作用における 新奇病原性制御機構の解明

いもち病菌によって引き起こされるイネの最重要病害であるイネいもち病は、世界の食料安全保障にとって脅威となっている。イネいもち病は毎年世界の6千万人以上分の食料となるイネの減収をもたらす原因となっている。イネといもち病菌の全ゲノム配列は両方とも既に公開されているため、イネいもち病は植物－病原糸状菌相互作用研究のモデルとなっている。いもち病菌の胞子は水滴の中で発芽し、発芽管の先端に形成された付着器から宿主組織に侵入後、侵入菌糸を形成する。その際に、いもち病菌は、エフェクターと呼ばれる低分子のタンパク質群を分泌して宿主の防御反応や生理機能を操作することでイネへの感染を成立し、大きな減収をもたらす。また、いもち病菌から分泌されるアンモニアは、感染部位の環境を変化させて宿主の防御反応を打破し、いもち病菌が宿主組織で生育しやすくなるようにしている。

申請者らは、イネいもち病菌由来エフェクターを探索するために SuperSAGE 解析によって感染初期に発現する遺伝子を選抜し、そのうち78個の推定分泌タンパク質遺伝子について大規模破壊解析を行った。大多数の遺伝子破壊はいもち病菌の病原性に影響を及ぼさなかった。一つだけ例外があり、その遺伝子をMC69と名付けた。mc69変異株は、イネとオオムギへの病原性において著しい低下を示した。また、実際に、MC69がいもち病菌から分泌されていたことから、MC69はイネいもち病菌の病原性に必須のエフェクターであることがわかった（挿入図参照；Saitoh *et al.*, 2012 *PLoS Pathogens*）。いもち病菌の病原性に必須のエフェクターは、今日までにMC69、Slp1、lug6およびlug9の4個のみが同定されている（Saitoh *et al.*, 2012; Mentlak *et al.*, 2012 *Plant Cell*; Dong *et al.*, 2015 *PLoS Pathogens*）。また、いもち病菌がアンモニアを生産して宿主葉表面のpHを変化させるという報告は1例のみである（Landraud *et al.*, 2013 *PLoS One*）。

これまで、宿主上の病原菌の遺伝子発現解析を行うにあたり、感染組織から抽出したRNAには宿



主由来の RNA が多量に含まれていたため、病原菌由来遺伝子の発現量を正確に捉えにくいという問題があった。オオムギ品種 Nigrate の幼植物は、イネいもち病菌に対して高い感受性を示し、子葉の裏面表皮を容易に剥離できるため、感染葉サンプル中の宿主組織の比率を減らすことが可能である。そこで、いもち病菌の孢子懸濁液を Nigrate の子葉裏面に接種後、12、24、36、48 時間目に剥離した裏面表皮およびいもち病菌孢子（接種源）から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。得られた RNA-seq データを活用し、いもち病菌の感染初期にその発現が上昇し、且つ予想分泌タンパク質をコードする遺伝子群を選抜できれば、その遺伝子群の中から多くの新規エフェクター遺伝子が単離できると期待される。また、アンモニア合成に関わる酵素をコードする遺伝子群およびそれらの発現制御に関わる予想転写因子をコードする遺伝子群も同定できるであろう。今後は、これら、いもち病菌の病原性に必須の新規遺伝子を単離し、各遺伝子産物の機能を調べることにより、イネいもち病菌－宿主植物相互作用における新奇病原性制御機構が解明されるであろう。

齋藤宏昌（生命科学部 分子微生物学科）





# 転写因子破壊株を用いたバイオプラスチック

## 高生産大腸菌の創製

再生可能なバイオマス为原料として微生物合成される多元ポリ乳酸は、生分解性を有することから炭素循環システムに組み込まれる環境調和型プラスチック素材である。これまで、バイオプラスチック生産性の増大や質的向上を目指し、(1) 遺伝子発現システムの強化、(2) 酵素進化学、(3) 代謝工学、(4) 培養工学などが、主要戦略として取り組まれてきた。さらに、これら戦略を組み合わせ、バイオプラスチックの生産性向上が図られてきた。このような背景の下、多元ポリ乳酸合成に優良な形質の探索を目指して、大腸菌を対象にトランスポゾン変異をゲノムワイドに導入したところ、複数の高生産変異株が取得できた。その中でも特に生産量の向上した変異株は、野生株の1.4倍の生産量を示した(野生株: 5g/L、変異株 7g/L)。この結果は、バイオプラスチック合成に正の影響をもたらす変異がゲノム上に複数存在することを示唆している。

大腸菌には約4,000の遺伝子が存在するので、それらを網羅的に解析していくことは現実的ではない。そこで、転写因子に着目した。一つの転写因子は複数の遺伝子発現制御を行っている。全ての転写因子変異株でポリマー生産量解析を行うことで、ほぼすべての遺伝子のバイオプラスチック生産

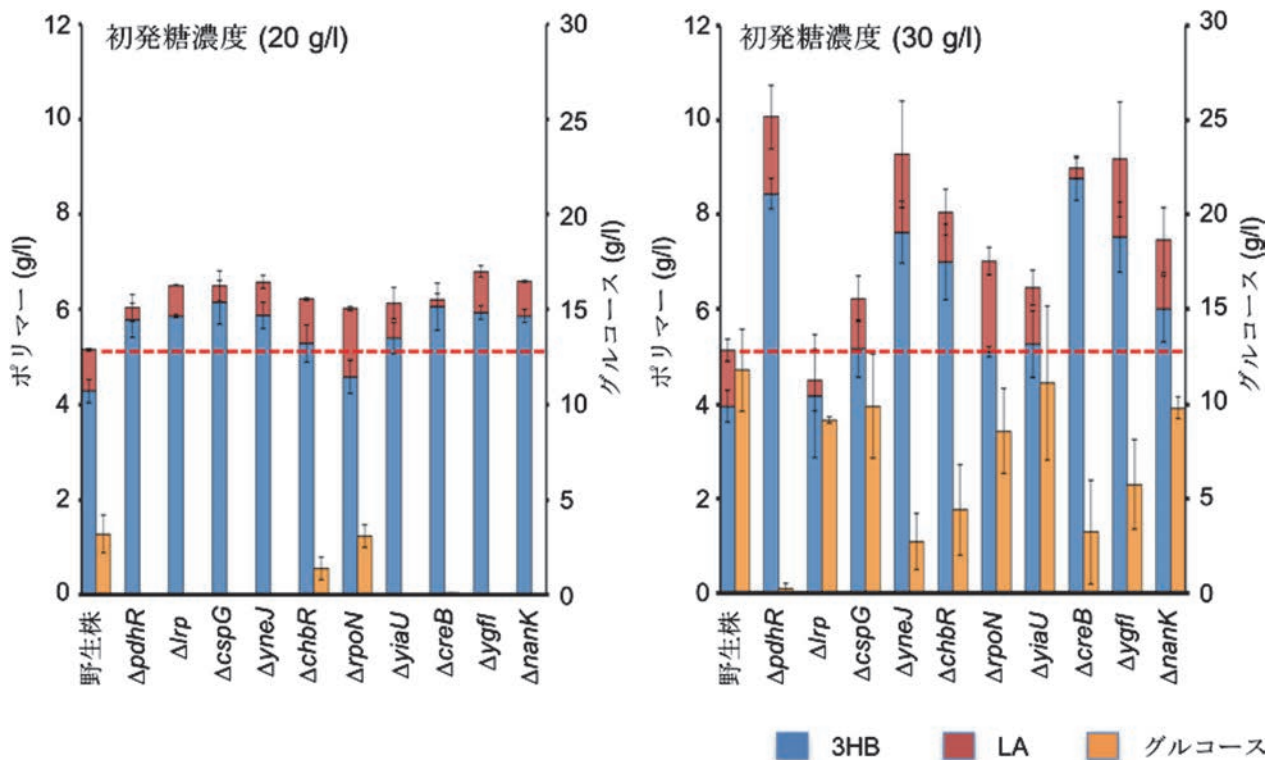


図1 転写因子破壊株の多元ポリ乳酸生産とグルコース消費

への影響を網羅的に解析できると考えた。大腸菌遺伝子データベースより転写に関わる遺伝子群の検索を行った結果、312 存在した。一遺伝子欠失株コレクション (KEIO コレクション) から該当株を選抜後、多元ポリ乳酸合成酵素をコードしたプラスミドを導入する。多元ポリ乳酸合成経路を持った各転写因子破壊株と野生株の多元ポリ乳酸生産量を測定した結果、9 株で生産量が増加していた。多元ポリ乳酸生産量は、最も生産量が高い株で野生株の 2 倍 (野生株: 5 g/L、転写因子破壊株: 10 g/L) を示した。

多元ポリ乳酸生産量が向上した転写因子には *pdhR* や *creB* 等多元ポリ乳酸生合成代謝系に直接関与、ないしは、基質となる糖代謝に関与するものが見出された。その一方、多元ポリ乳酸生産への関与が未知のものも存在する。その中で特に注目した転写因子は *yneJ* である。*yneJ* は機能未知転写因子であり、どのような遺伝子群の発現制御を行っているかは明らかではない。*yneJ* 欠失株で多元ポリ乳酸生産量が向上した原因を明らかにするためには、*yneJ* 制御下の遺伝子群を全て明らかにし、細胞内遺伝子発現制御をシステムチックに考える必要があるのではないかと考えた。そこで多元ポリ乳酸生産および非生産時における *yneJ* の制御遺伝子群を RNA-Seq により明らかにし、野生株での遺伝子発現パターンと比較する。RNA 発現量が増減した遺伝子に対し、一遺伝子破壊株 (KEIO コレクション) ないしは、一遺伝子過剰発現株 (ASKA コレクション) を用い、バイオプラスチック生産量を確認する。これら一連の実験により多元ポリ乳酸生産量向上に関与する遺伝子が明らかになると予想する。

本研究により、大腸菌ゲノム上に存在する多元ポリ乳酸生産に正の影響をもたらす遺伝子群が明らかになると考えられる。これら多元ポリ乳酸生産に対する優良変異を顕在化して利活用することは多元ポリ乳酸微生物合成の新しい戦略になると考えられる。

門屋亨介 (生命科学部 分子生命化学科)

石井大輔 (生命科学部 分子生命化学科)



## 伝統的な「鹿児島壺造り黒酢」醸造に関わる 「壺付き酢酸菌」の探索

鹿児島県霧島市（福山地方）には、江戸時代より伝わる製法で造られる「鹿児島壺造り黒酢」と言われる食酢がある。これは、鎌倉時代から和泉国で造られていたという「いずみ酢」の流れを汲むと考えられる伝統的な製法で造られており、独特の黒みがかかった色合いから単に黒酢とも呼ばれている。2015年から始まった国の地理的表示保護制度（GI制度）の認証も受けており、わが国の大切な知的財産ともなっている食品である。

「鹿児島壺造り黒酢」の製法は、陶器製の壺の中に蒸し米・麴・汲み水を仕込み、あとは蓋をして静置しておくというものである。壺は、約200年前の発祥当時に使われたものが現在も多く使い続けられており、薩摩焼のものを中心に数種類ある。通常の食酢醸造は、まず原料をアルコール発酵させ、生成した酒に種酢或いは酢酸菌を接種して行なわれるが、本法では（麴由来の麴菌以外は）製造工程において一切の微生物添加を行なわない。仕込み後、時間の経過とともに自然と壺中の菌叢が変遷し、糖化→アルコール発酵→酢酸発酵が自動的に進行する。酢酸発酵後、複数の壺について壺寄せを行って内容物を併せ、そこから長期熟成を行なって製品としている。この一連の過程を経て、他の食酢には見られない特徴的な色合いと独特の風味・まろみを有するようになり、この製法から本製品は「壺酢」と呼ばれることもある。

以上のように、製造中に微生物添加を伴わないにもかかわらず発酵が起こることが本法の大きな特徴であるが、発酵を起こす微生物がどこから来るかについては、現時点では明確な報告はなされてい



図1 鹿児島壺造り黒酢の壺畑

ない。多孔質の壺の内壁に生息し、其々の微生物にとっての環境が整った時点で活発に活動を行ない、壺内の環境の変化に伴って菌種も変遷していくというモデルが有力であるが、詳細については未知の部分が多い。また、メーカーが製造に使用している数多くの壺に関し、全て同系統の菌株により発酵が行なわれているのか、それとも壺によりランダムな菌株のバリエーションがあるのかについても不明である。私たちは、食酢醸造の主役である酢酸菌に注目し、伝統的な製法により造り続けられてきた長い時間の中に、メーカー固有の株として全ての壺で等しく醸造に関わるようになっている菌株、いわゆる清酒蔵における「蔵つき酵母」のような「壺つき酢酸菌」が存在するのか否かについて、種々のゲノム科学的なアプローチにより検証を行なっている。

壺畑と呼ばれる屋外にたくさんの壺を並べ（図1）、特別な菌株管理も行なわずに、壺の中で自然に起こる発酵により造られる伝統的な鹿児島壺造り黒酢。一見、偶然の産物のように見えるこの製法を支えている酢酸菌の正体は一体何なのか、そしてそれは江戸時代から200年という長い時間を経てなお繋がりを続けているのか。醸造をめぐる謎とロマンに挑戦中である。

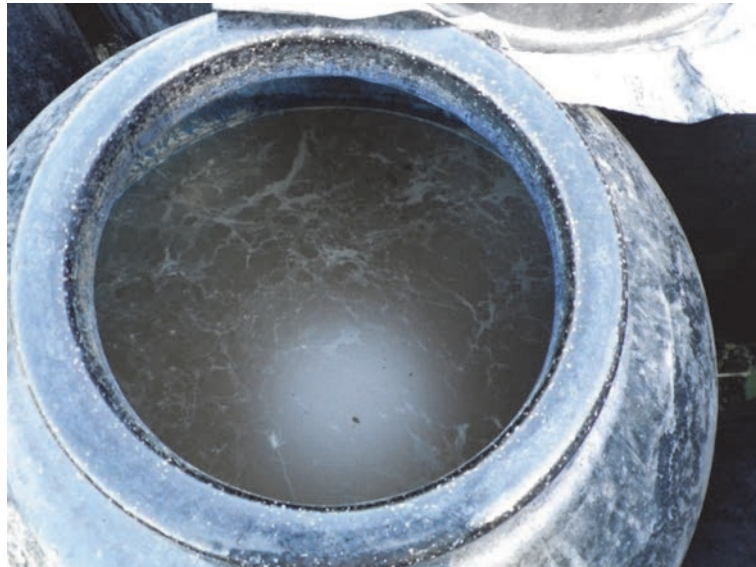


図2 壺の中で酢酸発酵中の酢酸菌の菌膜

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）  
窪田将之（大学院農学研究科 醸造学専攻）  
長野正信（坂元醸造株式会社）  
藤井 暁（坂元醸造株式会社）  
兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）



## ＝ 研究発表実績 ＝

### ●論文発表

**Kobayashi I, Watanabe S, Kanesaki Y, Shimada T, Yoshikawa H, Tanaka K.**

Conserved two-component Hik34-Rre1 module directly activates heat-stress inducible transcription of major chaperone and other genes in *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

*Mol Microbiol.* 104: 260-277. (2017)

**Munakata Y, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**

Polyacrylamide gel as a culture substrate improves in vitro oocyte growth from porcine early antral follicles.

*Mol Reprod Dev.* 84: 44-54. (2017)

**Kin A, Kansaku K, Sumiya M, Itami N, Sirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**

Effect of aging on telomere lengths in bovine oocytes and granulosa cells.

*J Mamm Ova Res.* 34: 37-43. (2017)

**Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, Hanzawa K.**

Characterization of the cathelicidin cluster in the Japanese quail (*Coturnix japonica*).

*Anim Sci J.* 88: 1249-1257. (2017)

**Hirano T, Nishimura S, Hara H, Sugimono Y, Hanzawa K.**

Mapping of calf death in Japanese black cattle.

*Anim Biotechnol.* 28: 242-247. (2017)

**Ohbayashi R, Yamamoto JY, Watanabe S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Miyagishima SY, Yoshikawa H.**

Variety of DNA replication activity among Cyanobacteria correlates with distinct respiration activity in the dark.

*Plant Cell Physiol.* 58: 279-286. (2017)

**Akashi M, Harada S, Moki S, Okouji Y, Takahashi K, Kada S, Yamagami K, Sekine Y, Watanabe S, Chibazakura T, Yoshikawa H.**

Transposition of insertion sequence IS256 *Bsu1* in *Bacillus subtilis* 168 is strictly dependent on *recA*.

*Genes Genet Syst.* 92: 59-71. (2017)

**Kanesaki Y, Ishige T, Sekigawa Y, Kobayashi T, Torii Y, Yokoyama E, Ishiwata H, Hamada M, Tamura T, Azuma R, Murakami S.**

Whole-genome sequences of two closely related bacteria, actinomyces sp. strain chiba101 and actinomyces denticolens DSM 20671<sup>T</sup>.

*Genome Announc.* 14: e00126-17. (2017)

**Takeo S, Kimura K, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**

Age-associated deterioration in follicular fluid induces a decline in bovine oocyte quality.

*Reprod Fertil Dev.* 29: 759-767. (2017)

**Tanaka K, Ohtake R, Yoshida S, Shinohara T.**

Effective DNA fragmentation technique for simple sequence repeat detection with a microsatellite-enriched library and high-throughput sequencing.

*BioTechniques.* 62: 180-182. (2017)

**Takahashi G, Hasegawa S, Fukutomi Y, Harada C, Furugori M, Seki Y, Kikkawa Y, Wada K.**

A novel missense mutation of *Mip* causes semi-dominant cataracts in the *Nat* mouse.

*Exp Anim.* 66: 271-282. (2017)

Ishige T, Miya M, Ushio M, Sado T, Ushioda M, Maebashi K, Yonechi R, Lagan P, Matsubayashi H.

Tropical-forest mammals as detected by environmental DNA at natural saltlicks in Borneo.

*Biol Conserv.* 210: 281–285. (2017)

Kadoya R, Kodama Y, Matsumoto K, Ooi T, Taguchi S.

Genome-wide screening of transcription factor deletion targets in *Escherichia coli* for enhanced production of lactate-based polyesters.

*J Biosci Bioeng.* 123: 535–539. (2017)

Ogawa S, Kawahara-Miki R, Miyamoto K, Yamane H, Nojiri H, Tsujii Y, Okada K.

OsMYC2 mediates numerous defence-related transcriptional changes via jasmonic acid signalling in rice.

*Biochem Biophys Res Commun.* 486: 796–803. (2017)

Iwata H.

Age-associated changes in granulosa cells and follicular fluid in cows.

*J Reprod Dev.* 63: 339–345. (2017)

Ren W, Aihara E, Lei W, Gheewala N, Uchiyama H, Margolskee R, Iwatsuki K, Jiang P.

Transcriptome analyses of taste organoids reveal multiple pathways involved in taste cell generation.

*Sci Rep.* 7: 4004. (2017)

Tezaki S, Iwama R, Kobayashi S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Ohta A, Horiuchi H, Fukuda R.

$\Delta$ 12-fatty acid desaturase is involved in growth at low temperature in yeast *Yarrowia lipolytica*.

*Biochem Biophys Res Commun.* 488: 165–170. (2017)

Ito K, Takagi K, Iwasaki A, Tanaka N, Kanesaki Y, Martin-Laurent F, Igimi S.

Identification of the *hcb* gene operon involved in catalyzing aerobic hexachlorobenzene dechlorination in *Nocardioides* sp. strain PD653.

*Appl Environ Microbiol.* 83: e00824–17. (2017)

Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.

Differential effects of mitochondrial inhibitors on porcine granulosa cells and oocytes.

*Theriogenology.* 103: 98–103. (2017)

Wakame K, Komatsu KI, Nakata A, Sato K, Takaguri A, Masutomi H, Nagashima T, Uchiyama H.

Transcriptome analysis of skin from SMP30/GNL knockout mice reveals the effect of ascorbic acid deficiency on skin and hair.

*In Vivo.* 31: 599–607. (2017)

Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K.

Age-associated mRNA expression changes in bovine endometrial cells *in vitro*.

*Reprod Biol Endocrinol.* 15: 63. (2017)

朝治桜子、石毛太一郎、鈴木進悟、原ひろみ、平野貴、細道一善、椎名隆、半澤恵

RNA-seqによるニホンウズラの機能的な主要組織適合性複合体遺伝子座の多様性解析

*DNA 多型.* 25: 47–51 (2017)

Hirooka S, Hirose Y, Kanesaki Y, Higuchi S, Fujiwara T, Onuma R, Era A, Ohbayashi R, Uzuka A, Nozaki H, Yoshikawa H, Miyagishima SY.

Acidophilic green algal genome provides insights into adaptation to an acidic environment.

*Proc Natl Acad Sci USA.* 114: E8304–E8313. (2017)

**Tanikawa N, Seno K, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K.**

Interferon tau regulates cytokine production and cellular function in human trophoblast cell line.  
*J Interferon Cytokine Res.* 37: 456-466. (2017)

**Abe T, Kawahara-Miki R, Hara T, Noguchi T, Hayashi T, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**

Modification of mitochondrial function, cytoplasmic lipid content and cryosensitivity of bovine embryos by resveratrol.  
*J Reprod Dev.* 63: 455-461. (2017)

**Wakame K, Komatsu K, Uchiyama H, Nagashima T.**

Silk fibroin works as a treatment-accelerating for atopic dermatitis induced by an extract of *Dermatophagoides farinae* in NC/Nga Mice.  
*Int J Wild Silkmoth & Silk.* 20 · 21: 43-48. (2017)

**Kansaku K, Itami N, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**

Differential effects of mitochondrial inhibitors on porcine granulosa cells and oocytes.  
*Theriogenology.* 103: 98-103. (2017)

**Ehira S, Shimmori Y, Watanabe S, Kato H, Yoshikawa H, Ohmori M.**

The nitrogen-regulated response regulator NrrA is a conserved regulator of glycogen catabolism in  $\beta$ -cyanobacteria.  
*Microbiology.* 163: 1711-1719. (2017)

**Kansaku K, Takeo S, Itami N, Kin A, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**

Maternal aging affects oocyte resilience to carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone -induced mitochondrial dysfunction in cows.  
*PLoS ONE.* 12: e0188099. (2017)

**Chibazakura T, Asano Y.**

Defective interaction between p27 and cyclin A-CDK complex in certain human cancer cell lines revealed by split YFP assay in living cells.  
*Biosci Biotechnol Biochem.* 81: 2360-2366. (2017)

**Itami N, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H.**

Promotion of glucose utilization by insulin enhances granulosa cell proliferation and developmental competence of porcine oocyte grown *in vitro*.  
*Zygote.* 25: 65-74. (2017)

**Hirokawa Y, Kanasaki Y, Arai S, Saruta F, Hayashihara K, Murakami A, Shimizu K, Honda H, Yoshikawa H, Hanai T.**

Mutations responsible for alcohol tolerance in the mutant of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (SY1043) obtained by single-cell screening system.  
*J Biosci Bioeng.* in press. (2017)

**Koshiishi Y, Wada K.**

A simplified protocol for molecular sexing in the emu (*Dromaius novaehollandiae*).  
*Poult Sci.* doi: 10.3382/ps/pex427. (2017)

**Wada K, Saito J, Yamaguchi M, Seki Y, Furugori M, Takahashi G, Nishito Y, Matsuda H, Shitara H, Kikkawa Y.**

*Pde6brd1* mutation modifies cataractogenesis in *Foxe3rct* mice.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 496: 231-237. (2018)

**Watanabe S, Noda A, Ohbayashi R, Uchioke K, Kurihara A, Nakatake S, Morioka S, Kanesaki Y, Chibazakura T, Yoshikawa H.**

ParA-like protein influences the distribution of multi-copy chromosomes in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

*Microbiology*. 164: 45-56. (2018)

**Watanabe S, Ozawa H, Kato H, Nimura-Matsune K, Hirayama T, Kudo F, Eguchi T, Kakinuma K, Yoshikawa H.**

Carbon-free production of 2-deoxy-scylo-inosose (DOI) in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

*Biosci Biotechnol Biochem*. 82: 161-165. (2018)

**Nishimura I, Shiwa Y, Sato A, Oguma T, Yoshikawa H, Koyama Y.**

Comparative genomics of *Tetragenococcus halophilus*.

*J Gen Appl Microbiol*. 63: 369-372. (2018)

**Endo A, Sasaki F, Maeno S, Kanesaki Y, Hamaguchi Y, Torres GA, Tomita S, Nakagawa J.**

In vitro and in silico characterisation of *Lactobacillus paraplantarum* D2-1, a starter culture for soymilk fermentation.

*Int J Food Sci Nutr*. 68: 1-13. (2018)

**Kadoya R, Matsumoto K, Takisawa K, Ooi T, Taguchi S.**

Enhanced production of lactate-based polyesters in *Escherichia coli* from a mixture of glucose and xylose by Mlc-mediated catabolite derepression.

*J Biosci Bioeng*. in press. (2018)

**Uchiyama H, Maehara S, Ohta H, Seki T, Tanaka Y.**

Elevenin regulates the body color through a G protein-coupled receptor NIA42 in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*.

*Gen Comp Endocrinol*. 258: 33-18. (2018)

石毛太郎

鳥類の宿主防御ペプチドの多様性

*動物遺伝育種研究*. 45: 31-45 (2018)

**Tajima N, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Kurokawa K, Asayama M, Sato N.**

Complete genome sequence of *Limnothrix/Pseudanabaena* sp. ABRG5-3, a non-heterocystous cyanobacterium isolated from Japanese freshwater.

*Genome Announc*. in press. (2018)

**Matsuura A, Ishima T, Fujita Y, Iwayama Y, Hasegawa S, Kawahara-Miki R, Maekawa M, Toyoshima M, Ushida Y, Suganuma H, Kida S, Yoshikawa T, Iyo M, Hashimoto K.**

Dietary glucoraphanin prevents the onset of psychosis in the adult offspring after maternal immune activation.

*Sci Rep*. 43: 58: 00. (2018)



●学会・セミナー等での発表

○国内

2017年5月22-24日

第5回 NGS 現場の会 (仙台)

内山博允、浜口悠、矢嶋俊介

MiniON ロングリードと Illumina ショートリードを使った昆虫ゲノムのハイブリッドアセンブル  
小林久人

マウスのゲノム包括的なアレル特異的 DNA メチローム解析

渡辺智、兼崎友、河村富士夫、板谷光泰、吉川博文

NGS を利用した合成生物シアノバチルススのゲノム・発現解析

兼崎友、樋山智恵美、宮澤和己、渡辺智

長期高温培養によるシアノバクテリア新規高温適応株の取得

2017年5月25-27日

第64回 日本実験動物学会総会 (郡山)

和田健太、宗形春花、内山博允、大久保咲、渡邊真、阿部明弘、吉川欣亮

NAK/Nokh ラットの無眼球症に関する遺伝子群の探索

2017年6月1-2日

日本食品化学学会 第23回総会・学術大会 (伊勢志摩)

煙山紀子、松坂賢、美谷島克宏、島野仁、中江大

マウス非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 病態に Eicosapentaenoic acid (EPA) と Docosahexaenoic acid (DHA) が及ぼす異なる影響

2017年6月29-30日

JAH 第24回総会・学術集会発表 (東京)

岩槻健

オルガノイド培養系を用いた味蕾および消化管の機能解析

2017年7月8日

第14回 北海道実験動物研究会 総会・学術集会 2017 (網走)

古屋薫実、宗形春花、内山博允、大久保咲、渡邊真、吉川欣亮、和田健太

NAK/Nokh ラットの小眼球症に関する遺伝子群の変異解析

古郡真宗、関優太、設楽浩志、島貫碧、斎藤潤一、吉川欣亮、和田健太

*Pde6<sup>brd1</sup>* が水晶体に及ぼす遺伝子発現プロファイルの変化

2017年7月10-12日

第44回日本毒性学会学術年会 (横浜)

煙山紀子、池端香織、山下卓也、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大

食餌性コリン欠乏アミノ酸食による非アルコール性脂肪性肝炎のマウスモデルの開発

2017年7月19-21日

第36回日本糖質学会年会 (旭川)

小栗秀、宮崎沙織、中津川友章、田中啓介、坂本光

チョウセンアサガオ (*Datura stramonium*) 種子に含まれるイソレクチンの構造

2017年8月19日

第0回生命科学系フロンティアセミナー (東京)

門屋亨介、田口精一

実バイオマスを用いたバイオプラスチック生産

2017年8月23-25日

第32回発癌病理研究会 (滋賀)

煙山紀子、池端香織、山下卓也、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大

食事成分の異常による生活習慣病と内因性発がんのマウスモデルの開発

**2017年8月25-26日****2017年度グラム陽性菌ゲノム機能会議（熱海）**

渡辺智、川口毅、坂巻裕、朝井計、河村富士夫、板谷光泰、吉川博文

枯草菌—シアノバクテリア間の“種の壁”を利用したシアノバクテリアゲノム編集系の確立

門屋亨介、児玉悠、松本謙一郎、大井俊彦、田口精一

転写因子欠失株を用いたバイオプラスチック生産大腸菌のリモデリング

**2017年8月26日****第62回日本生殖医学会学術講演会・総会（下関）**

徳久杏奈、岡野真佑、梶谷嶺、伊藤武彦、豊田敦、川原玲香、河野友宏、黒木陽子、水島秀成、黒岩麻里

アマミトゲズミ (*Tokudaia osimensis*) ゲノム配列における性差領域の解析

**2017年8月26日****「生合成リデザイン」第2回若手シンポジウム（草津）**

渡辺智

枯草菌—シアノバクテリア間の“種の壁”を利用したシアノバクテリアゲノム編集系の確立

**2017年8月29-31日****第35回日本植物細胞分子生物学会（さいたま）**

磯野一帆、田中啓介、坂田洋一、太治輝昭

シロイヌナズナ accession 間にみられる高温耐性ナチュラルバリエーションの遺伝学的解析

齋藤雄一、星川健、江面浩、田中啓介、矢嶋俊介、坂田洋一、太治輝昭

トマトの高温ストレス下における RNAseq 解析および HsfA1 過剰発現トマトの作出

成島純平、有賀裕剛、田中啓介、矢嶋俊介、坂田洋一、太治輝昭

シロイヌナズナにおける ABA 非依存経路を介した塩馴化後浸透圧耐性寄与遺伝子群の同定

佐藤瑛梨奈、有賀裕剛、中村浩太郎、Luis Barboza、田中啓介、矢嶋俊介、坂田洋一、太治輝昭

高温耐性シロイヌナズナ Da (1)-12 と高温感受性 Ei-2 間におけるトランスクリプトーム解析と Ei-2 型感受性 accession の単離・解析

内田康平、田中啓介、矢嶋俊介、野澤樹、長谷純宏、鳴海一成、坂田洋一、太治輝昭

耐塩性 *Arabidopsis thaliana* Bu-5 を用いた塩馴化後浸透圧耐性欠損変異株の単離と遺伝学的な解析

**2017年8月29-31日****環境微生物系学会合同大会 2017（仙台）**

兼崎友、樋山智恵美、宮澤和己、渡辺智、吉川博文

シアノバクテリアにおける高温適応進化実験の試み

**2017年9月2日****2017年度農芸化学会関東支部大会（筑波）**

渡辺智、川口毅、坂巻裕、朝井計、河村富士夫、板谷光泰、吉川博文

枯草菌—シアノバクテリア間の“種の壁”を利用した革新的シアノバクテリアゲノム編集系の確立

**2017年9月6-7日****日本畜産学会第123回大会（長野）**

原翔太、平野貴、原ひろみ、半澤恵

脂肪交雑 QTL (BTA21 40cM) の効果検証とファインマッピングの試み

石井梓、石毛太郎、平野貴、原ひろみ、半澤恵

ニホンウズラ腸内細菌未同定菌の検索と週齢に伴う変化

**2017年9月8-11日****日本哺乳類学会 富山大会（富山）**

石毛太郎、宮正樹、潮雅之、佐土哲也、Peter Lagan、松林尚志

コップ1杯の水からオランウータンを検出

石毛太郎

環境 DNA を用いたボルネオ熱帯雨林の塩場利用哺乳類の検出

**2017年9月11-14日**

**第69回日本生物工学会大会（東京）**

佐々木大樹、石川森夫、鈴木敏弘、今井健太郎、山本有紀、松原拓哉、兼崎友、吉川博文、貝沼（岡本）章子  
Acetobacter 属酢酸菌の TCA サイクル周辺経路を中心とした酢酸過酸化能発現メカニズム  
門屋亨介、児玉悠、松本謙一郎、大井俊彦、田口精一  
転写因子欠失株を用いたバイオプラスチック生産大腸菌のリモデリング

**2017年9月12-14日**

**第69回日本生物工学会大会（東京）**

菅原卓也、鎮西真理子、川又透、田島直幸、兼崎友、中平洋一、吉川博文、佐藤直樹、朝山宗彦  
新奇糸状性シアノバクテリアの SigB 相同性因子の特徴付けと発現解析  
山元翔太、池下実咲、清啓自、久保田恵理、兼崎友、鈴木健一朗、門倉利守、中山俊一  
有機酸生成低減変異株 DNPR89 の網羅的遺伝子発現解析  
西村友里、山元 翔太、久保田恵理、兼崎友、鈴木健一朗、門倉利守、中山俊一  
高リンゴ酸・低酢酸生産性変異株 DNPR38 の網羅的転写解析  
佐々木大樹、石川森夫、鈴木敏弘、今井健太郎、山本有紀、松原拓哉、兼崎友、吉川博文、貝沼（岡本）章子  
Acetobacter 属酢酸菌の TCA サイクル周辺経路を中心とした酢酸過酸化能発現メカニズム

**2017年9月21-23日**

**日本動物学会第88回大会（富山）**

内山博允、浜口悠、横井翔、若宮健、高橋純一、野村哲郎、古川力、矢嶋俊介、芳山三喜雄、木村澄  
Illumina ショートリードと合成ロングリード、MiniION ロングリードを使ったニホンミツバチゲノムのハイブリッドアセンブリ

**2017年9月25-27日**

**日本味と匂学会第51回大会（神戸）**

岩槻健  
マウスとサルの味蕾オルガノイド培養系

**2017年9月28-30日**

**第76回日本癌学会学術総会（横浜）**

煙山紀子、池端香織、山下卓也、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大  
A mouse model of nonalcoholic steatohepatitis using a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid-defined diet.

**2017年9月30日**

**環境微生物系学会合同大会 2017（仙台）**

川口毅、渡辺智、成川礼、板谷光奏、吉川博文  
シアノバクテリアにおけるフィコビリソームの人工改変  
栗原亜実、大林龍胆、吉川博文、渡辺智  
シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における SSB タンパク質の DNA 傷害ストレス応答機構の解析  
石田真由、藤本尚志、大西章博、蔣紅与、渡辺智、兼崎友、石毛太一郎  
貧栄養ダム湖におけるアンモニア酸化古細菌の鉛直分布および分子系統

**2017年10月7-8日**

**日本育種学会 第132回講演会（岩手）**

小松憲治、尾関未帆、田中啓介、大竹留未、和久井健司  
Brassica rapa ssp. rapa cv. 77B における核遺伝子型雄性不稔性遺伝子座の同定  
田中啓介、吉田沙樹、小野寺将文、西川綾美、野原大知、畠中麻里安、大竹留未、入江憲治、和久井健司  
マイクロサテライト領域に基づく *Brassica juncea* の系統解析と変種識別マーカーの開発

**2017年10月21日****遺伝研研究会（三島）**

渡辺智、川口毅、坂巻裕、朝井計、河村富士夫、板谷光泰、吉川博文  
枯草菌-シアノバクテリア間の“種の壁”を利用したゲノム編集系の確立

**2017年10月21-22日****日本熱帯農業学会第122回講演会（香川）**

篠原卓、本多俊介、吉田沙樹、五十嵐大造、田中啓介  
SSR マーカーによるジャボチカバの系統識別

**2017年11月10-12日****日本動物遺伝育種学会大18回大会（厚木）**

原翔太、平野貴、原ひろみ、半澤恵  
脂肪交雑 QTL (BTA21 40cM) の効果検証とファインマッピングの試み  
石毛太一郎、平野貴、原ひろみ、半澤恵  
ニホンウズラにおける *cathelicidin* (CATH) 遺伝子の多様性  
高橋剛、長谷川清香、関優太、吉川欣亮、和田健太  
マウス半優性白内障を引き起こす *Mip* の新規ミスセンス変異  
奥石雄一、内山博允、福村啓文、木村望、岡部智史、大久保倫子、平山博樹、相馬幸作、和田健太  
エミュー (*Dromaius novaehollandiae*) における新規遺伝マーカーの開発と、その特性評価

**2017年11月16-17日****第62回日本生殖医学会学術講演会・総会（下関）**

植田愛美、伊丹暢彦、宗像祥久、白砂孔明、桑山岳人、岩田尚孝  
卵胞液は卵子の質と顆粒層細胞数を決定する

**2017年12月1-2日****藍藻の分子生物学2017（木更津）**

渡辺智、大林龍胆、兼崎友、吉川博文  
複数コピー染色体を持つシアノバクテリアの DNA 複製・修復機構  
辻出巨寛、大林龍胆、兼崎友、吉川博文、廣田隆一、渡辺智  
シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における増殖相・リン酸欠乏に応じた染色体  
コピー数制御  
沼倉萌、大竹祥太、Claudia Steglich、Wolfgang R. Hess、渡辺智  
UV ストレスに応答するシアノバクテリア RNase E の発現制御機構の解析  
青柳智大、栗原亜美、大林龍胆、兼崎友、渡辺智  
シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における RecA タンパク質の機能解析  
川口毅、渡辺麻衣、池内昌彦、成川礼、渡辺智  
フィコビリソームの人工改変による細胞の色調制御  
栗原亜実、大林龍胆、吉川博文、渡辺智  
*Synechococcus elongatus* PCC 7942 における SSB タンパク質の酸化ストレス応答の解析

**2017年12月6-9日****第40回日本分子生物学会年会（神戸）**

赤池康範、渡辺開智、千葉櫻拓  
ヒト細胞株における cyclin A-CDK 活性の亢進による M 期停滞機構の解析  
米谷達哉、河崎優太郎、松下風沙、美根崇志、千葉櫻拓  
がん細胞における p27 機能抑圧因子の探索  
朝治桜子、石毛太一郎、鈴木進悟、細道一善、椎名隆、原ひろみ、平野貴、半澤恵  
RNA-Seq によるニホンウズラ Mhc クラス IIB 遺伝子座の多様性解析  
徳久杏奈、岡野真佑、梶谷嶺、伊藤武彦、豊田敦、川原玲香、河野友宏、黒木陽子、水島秀成、黒岩麻里  
SRY 遺伝子をもたないアマミトゲズミにおける雄特異的領域の解析



辻出亘寛、大林龍胆、兼崎友、吉川博文、廣田隆一、渡辺智

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における増殖相・リン酸欠乏に応じた染色体コピー数制御

沼倉萌、大竹祥太、渡辺智

UV ストレスに応答するシアノバクテリア RNase E の発現制御機構の解析

### 2018年1月25-26日

#### 第34回日本毒性病理学会総会および学術集会（沖縄）

煙山紀子、池端香織、山下卓也、宇野絹子、張舜恵、小川秀治、渡邊厚、美谷島克宏、中江大

改変コリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食誘発マウス非アルコール性脂肪性肝炎様病態に対するトランス脂肪酸と代替品の影響

### 2018年2月9日

#### ゲノム未来会議（鶴岡）

渡辺智

BGM ベクターを利用したシアノバクテリアゲノム編集系の確立

### 2018年3月5-7日

#### 第12回ゲノム微生物学会年会（京都）

川口毅、渡辺麻衣、池内昌彦、成川礼、渡辺智

フィコビリソームの人工改変による細胞の色調制御

青柳智大、栗原亜美、大林龍胆、兼崎友、渡辺智

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における RecA タンパク質の機能解析

大竹祥太、沼倉萌、渡辺智

UV ストレスに応答するシアノバクテリア RNase E の発現制御機構の解析

山崎脩平、大林龍胆、荷村（松根）かおり、兼崎友、渡辺智

シアノバクテリア *Synechocystis* sp PCC 6803 における複製開始機構の解析

坂巻裕、伊藤晋作、渡辺智

シアノバクテリアを用いたストリゴラクトン生産系構築の試み

### 2018年3月8-10日

#### 日本植物分類学会 第17回大会（金沢）

田中啓介、浜口悠、矢嶋俊介

大気中の花粉を対象とした環境 DNA メタバーコーディング技術の展開

### 2018年3月14-18日

#### 第65回日本生態学会大会（札幌）

中村隆俊、本間陽平、藤原拓也、中村元香

湿生植物の根における給気状況の評価と温度応答 一根内の空隙率と酸素濃度の変化—

石毛太一郎、宮正樹、潮雅之、佐土哲也、Peter Lagan、松林尚志

ブロッキングプライマーは希少種を検出できるか？ —ボルネオ島塩場の環境 DNA—

### 2018年3月15-18日

#### 日本農芸化学会 2018 年度大会（名古屋）

金子元優、佐藤純一、越野広雪、田中啓介、久保田恵理、大竹留未、勝田亮、武田晃治、志波優、川崎信治、額田恭郎、新村洋一

生物の代謝産物として植物で初めて見つかったリボフラビン（ビタミン B2）誘導体（第2報）

窪田将之、石川森夫、鈴木敏弘、兼崎友、藤田信之、藤井暁、長野正信、貝沼（岡本）章子

鹿児島島の壺造り黒酢の醸造に関わる「壺付き酢酸菌」存在の有無に関する検証

小林ゆかり、石川森夫、鈴木敏弘、松谷峰之介、新村梨恵、矢吹岳、海野祥子、志波優、松下一信、貝沼（岡本）章子

ゲノム情報に基づいた *Acetobacter* 属酢酸菌群の系統分類に関する一考察

佐々木大樹、石川森夫、鈴木敏弘、今井健太郎、山本有紀、松原拓哉、兼崎友、貝沼（岡本）章子

*Acetobacter* 属酢酸菌の酢酸過酸化時における TCA サイクル周辺経路の機能解析

塚田泰之、石川森夫、鈴木敏弘、大西直人、傳寶雄大、吉田将也、兼崎友、福崎英一郎、貝沼（岡本）章子

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸代謝におけるメチルクエン酸経路およびピルベートフォスフェートジキナーゼの機能

栗原亜実、大林龍胆、吉川博文、渡辺智

DNA 傷害ストレスにより誘導されるシアノバクテリア SSB タンパク質の局在化に関する研究

辻出巨寛、大林龍胆、兼崎友、吉川博文、廣田隆一、渡辺智

シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942 における DNA 複製とリン酸代謝間の相互作用解析

大野由依、木俣真弥、有馬治人、石毛太一郎、兼崎友、志波優、石川森夫、藤田信之、武田晃治、川崎信治、新村洋一

好気培養から嫌気培養への急激な転換は、酸素耐性菌 *Amphibacillus xylanus* 細胞内の遊離 Fe<sup>2+</sup> を増加させる。

### 2018年3月27-30日

#### 日本畜産学会第124回大会（東京大）

原翔太、平野貴、原ひろみ、半澤恵

脂肪交雑 QTL (BTA21 40cM) の責任遺伝子の検索

石井梓・石毛太一郎・平野貴・原ひろみ・半澤恵

ニホンウズラ腸内細菌叢の加齢に伴う変化

石毛太一郎、志波優、原ひろみ、平野貴、半澤恵

ニホンウズラの宿主防御ペプチド (HDP) のアミノ酸配列と腸内細菌叢との関係

### 2018年3月28-30日

#### 第51回日本植物生理学会年会（札幌）

伊藤晋作、細井昂人、広藤光季、田中啓介、佐々木康幸、浅見忠男、矢嶋俊介

ジベレリンによるストリゴラクトン生合成制御機構の解析

#### ○国際

### 2017年7月9-13日

#### FEMS Microbiology Congress 2017 (Valencia)

Endo A, Maeno S, Nakagawa J, Salminen S, and Dicks L.

Fructophilic Lactic acid Bacteria: Taxonomy, Biochemical and Genomic Characteristics and Possible Application.

Maeno S, Tanizawa Y, Kanesaki Y, Kubota E, Kumar H, Dicks L, Salminen S, Nakagawa J, Arita M, and Endo A

Genomic characterization of a fructophilic bee symbiont *Lactobacillus kunkeei* reveals its niche-specific adaptation.

### 2017年7月16-21日

#### 36th International Society for Animal Genetics Conference (Dublin)

Hirano T, Nishimura S, Hara H, Sugimono Y, and Hanzawa K.

Mapping of calf death in Japanese Black cattle.

Ishige T, Hara H, Hirano T, and Hanzawa K.

Diversity analysis of *AvBD* gene region in Japanese quail.

### 2017年8月23-27日

#### The 33th annual meeting of the ISCE/APACE 2017 (Kyoto)

Uchiyama H, Matsubara I, Shimomura K, and Yajima S.

Antennal transcriptional analysis of seed beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).

**2017年9月27-29日**

**the 4th World Congress of Reproductive Biology 2017 (Okinawa)**

Munakata Y, Takeo S, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Exosome-free follicular fluid has differential ability to support granulosa cells and oocyte development.

Shirasuna K, Tanaka H, Ohtsu A, Nakamura Y, Kawahara-Miki R, Iwata H, and Kuwayama T.

Inflammatory-related factors are activated depending on aging in bovine oviduct epithelial cells.

Noguchi T, Kawahara-Miki R, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Gene expression analysis of bovine blastocysts developed *in vivo* and *in vitro*.

Tanikawa N, Ohtsu A, Kawahara-Miki R, Kimura K, Matsuyama S, Iwata H, Kuwayama T, and Shirasuna K.

Inflammation, interferon signaling, and cell cycle-related genes are changed with aging in bovine endometrial cells.

**2017年10月2-4日**

**19th International Conference on Agriculture and Horticulture (London)**

Hanzawa Kei.

Identification and diversity analysis of the four major host-defense peptide families in quail.

**2017年10月14-15日**

**The 11th Congress of the Pacific Society for Reproductive Medicine (PSRM2017) (Osaka)**

Kin A, Kansaku K, Kawahara-Miki R, Shirasuna K, Kuwayama T, and Iwata H.

Aged-associated increases in Mitochondrial DNA mutations in bovine oocytes.

**2017年10月16-20日**

**The 5th International Entomophagous Insects Conference (Kyoto)**

Tajima H, Sugano K, Nagashima T, and Uchiyama H.

Sensory genes identification and comparison in ladybird beetles by head transcriptome analysis.

**2017年12月1日**

**Ludwig-Maximilians-Universität München (Munich)**

Chibazakura T, Iida T, Takahashi K, Ogura S, Nakajima M, and Tanaka T.

*In vitro* and *in vivo* studies on 5-aminolevulinic acid-enhanced hyperthermic cell death of cancer cells.

**2018年1月12-17日**

**The Plant and Animal Genome XXVI Conference (San diego)**

Uchiyama H, Hamaguchi Y, and Yajima S.

Hybrid assembly of short and long reads for de novo genome assembly in insects using MinION.

**●その他**

**=マスメディア=**

**2017年4月**

川原玲香 巻頭言：ニワトリ、セキショクヤケイ、それらをつなぐ在来家禽。

生物科学 68 193-193

**2017年5月**

岩槻健先生の霊長類味蕾オルガノイド培養系の構築について、以下の新聞で紹介されました。

日本経済新聞

**2017年6月**

岩槻健先生の味細胞の発現する遺伝子群を特定したことについて、以下の新聞で紹介されました。

日本経済産業新聞

**2017年6月、7月、8月、11月、12月**

松林尚志先生の塩場環境 DNA 解析の研究成果について、以下の新聞で紹介されました。

スポニチアネックス・NEWSSALT・朝日新聞・KIDSASHI・日本経済新聞・朝日小学生新聞

**=受賞=**

**2017年**

**日本農芸化学会 2017 年度大会トピックス賞受賞**

岩槻健、難波みつぎ、熊木竣佑、大木淳子、今井啓雄、山根拓実、大石祐一

霊長類味蕾オルガノイド培養系の確立

**2017年**

**36th International Society for Animal Genetics Conference (2017) Poster Award**

Ishige T, Hara H, Hirano T, and Hanzawa K.

Diversity analysis of *AvBD* gene region in Japanese quail.

**2017年**

**日本哺乳類学会 2017 年度大会 優秀ポスター賞**

石毛太一郎、宮正樹、潮雅之、佐土哲也、Peter Lagan、松林尚志

コップ1杯の水からオランウータンを検出

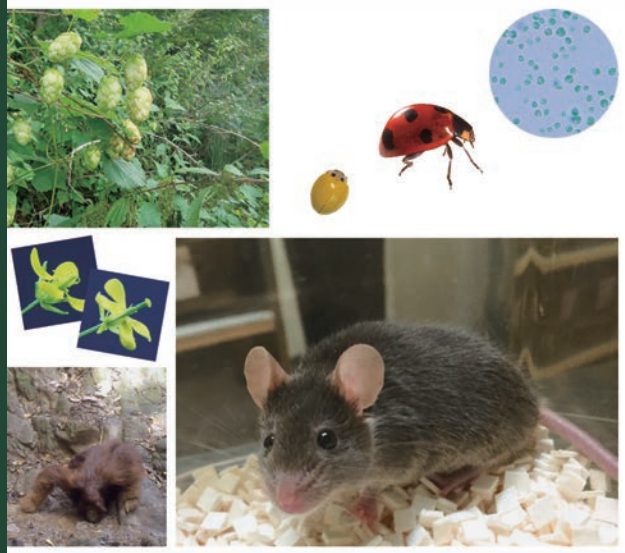




農学解析支援の更なる充実へ



農大ゲノムセンターを農



NGSの普及とさらなる挑戦



生命科学と情報科学の融合に