

生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター No.10

NGRCニュース No.14

東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター

2022年度



# 巻頭あいさつ

新型コロナウイルス感染症がパンデミックとなり3年ほど経ちますが、ウィズコロナの考え方のもと、世界的に社会活動が以前の状態に戻りつつあると思います。また、国内における学会活動では、対面での活動が復活し、ハイブリッド、リモートオンリーなども含め、研究の世界でもコロナ禍前の状態に戻りつつあるのではないのでしょうか。2年前には一時停止の状況もあった生物資源ゲノム解析センターでも、学内外からの利用が以前のレベルに戻ってきました。

ゲノム解析センターにおける2022年度最大の関心事は、文科省 共同利用・共同研究拠点認定の中間評価でした。2019年度より認定第二期の活動が始まり2021年度までの3年間分についての中間評価が2022年度に行われました。文科省のホームページには提出した報告書と審査結果が掲載されていますが、おかげさまでS評価を得ることができました。これも、本センターを利用して研究を行い、その成果を国際英文誌に積極的に発表していただいている研究者皆様のご支援、ご協力があった成果です。この書面上をお借りして、関係各位に厚く御礼申し上げます。

通常の活動においては2022年度においても、昨年度より開始をしましたNGRCセミナーをオンラインにて開催しました。詳細は本ニュースレターの他ページをご覧くださいと思いますが、NGSの基礎からRNA-seq解析に加え、メタゲノム解析、シングルセル解析など論文で良く目にする手法を解説しています。このような取組は、コロナ禍前では対面が前提でしたので、学外からの参加者が定期的に参加することは簡単ではなかったと思いますが、オンライン技術はこのような取組を促進することにとっても役立っています。

生命科学のみならず生物を取り扱う関連分野での次世代型シーケンサーの普及により、あらゆる生物のゲノム配列、遺伝子配列がデータベースに登録されるようになってきました。そのようなデータベース（リファレンス配列）の充実を踏まえ、ゲノム解析センターではショートリード型のシーケンサーのみの運用ではあるものの、その特性をフルに活用しています。昨年度導入の新型機も今年度は本格的に稼働し、解析のスピードアップ等にも貢献しています。一方でNGSが普及し民間業者による受託の利用がしやすくなってきています。このような当該技術の広がり、研究分野の発展には欠かせないものです。そのような中で、拠点活動ではNGSの未経験者や若手研究者を支援する取組を進めています。例えば、変異表現型の責任遺伝子の同定をしたいのでRNA-seqを用いる、という提案を目にしますが、必ずしもそれのみでは目的達成には至りません。共同研究者とディスカッションを通してともに実験デザインを組み立て、得られるデータがより効果的に利用できることを目指します。またNGSの利用可能性を知ることで、自身の研究から新たな挑戦的アイデアが生み出される事も期待し、特に拠点活動では挑戦的課題としての採択も行っています。

最近、私たちの生活の身近にあるAI技術を良く見聞きするようになりました。また、専門分野でも蛋白質の立体構造においてはデータベースにある遺伝子配列を網羅する予測構造データベースが立ち上がりました。今後はAI技術とNGSの結果とを活用した研究が進んでいくと予想されますが、そのような研究の流れもとらえつつ、今後もゲノム解析センターの活動を着実に進めていきます。ご支援のほどどうぞよろしくお願い申し上げます。

センター長 矢嶋 俊介

# CONTENTS

巻頭あいさつ	1
<b>生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター</b>	<b>5</b>
生物資源ゲノム解析センターの運用実績	7
生物資源ゲノム解析センター 情報発信活動	8
2022年度 研究発表実績	10
2022年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧	12
リゾクトニア・ソラニ分泌性の新規な抗糸状菌蛋白質	14
ホウレンソウの開花および性発現制御機構の解明	15
インゲンマメの収量および品質関連形質のゲノミック予測モデルの構築	16
無限分裂細胞を用いた原因不明疾患の発病メカニズムの解析	17
バラのトゲ形成を制御する鍵遺伝子の探索	18
原生生物との相互作用による藍藻の形態変化	19
新規突然変異解析による大発生したナナフシの移動分散解析	20
NAD <sup>+</sup> 補充による卵母細胞と受精卵の細胞内エネルギー代謝とレドックス制御の不均衡の解消機構の解明	21
ニワトリ尾羽形態の多様性に関わる遺伝的基盤の解明	22
<i>H19</i> -ICR 変異マウスにおける CTCF および Rad21 の結合解析	23
イネの Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> 輸送体の欠損株において Cs <sup>+</sup> 輸送に寄与する輸送体遺伝子の探索	24
有機栽培水田の微生物叢による水生植物の形態形成制御に関する研究	25
伝統的壺造り純米黒酢醸造の安定性を、黒酢由来酢酸菌の NGS 解析で理解する	26
施肥条件の異なる酸性土壌における植物と根圏微生物叢の応答と関連性	27
植物の貧栄養環境適応を左右する共生細菌の比較ゲノム解析	28
藍藻普遍的な細胞外多糖合成転写制御機構の探索	29
天蚕糸と同等の緑色絹糸を生産する遺伝子組換え家蚕・柞蚕の開発	30
農産現場の課題克服を加速する栽培土壌の微生物叢および化学特性の試験系検討	31
コリネ型細菌における RNase J 欠損により引き起こされる芳香族アミノ酸代謝変化の解明と その植物二次代謝産物生産への応用	32
葉緑体で生成する活性カルボニルによるプログラム細胞死開始メカニズムの解明	33
イネの高温ストレス応答に関する転写因子の機能解析	34
ココロギの休眠制御機構の解明とその応用	35
多検体トランスクリプトーム情報を用いて個体の状態を可視化する	36
難分解性有機フッ素化合物の代謝・分解を担う細菌酵素の探索・同定	37
シクロヘキセン含有エナミド生産に関与する生合成遺伝子の特定	38
ChIP-Seq 解析によるショウガ目植物の動原体 DNA 配列の同定	39
オオムギ花序の外科的切除と二次的花序の発生学的解析	40
新規非ヒト霊長類解析モデルを用いた腸管化学感覚受容メカニズムの解明	41
殺菌剤イソプロチオランの根伸長促進機構の解明	42
イネ極晩生突然変異体のもつ晩生原因遺伝子の特定	43
分離集団に対する DNA マーカー検出の新戦術	44
MiCAPs 法による SSR および SNP の同時取得法の確立 および遺伝的多様性・遺伝構造への解像度評価：新たな縮約ゲノム多型解析法の開発	46



<b>NGRC ニュースレター</b> .....	47
2022 年度 学内公募一覧 .....	49
卵子の発育を支持する卵胞液中の miRNA .....	52
細胞の機能を調整する miRNA の同定 .....	53
高質な胚生産のための培養環境の構築に関する研究 .....	54
増粘多糖類を利用した胚作成方法の開発 .....	55
階層的血管構造を有するヒト組織再構成のための 1 細胞遺伝子発現解析 .....	56
アトピー性皮膚炎モデルラットの皮膚の遺伝子発現解析 .....	57
深海性魚類におけるロドプシン遺伝子の多様性について .....	58
タイリクヒメハナカメムシ ( <i>Orius strigicollis</i> ) の化学感覚受容関連遺伝子の探索 .....	59
ヒメツリガネゴケにおけるキチン誘導性細胞死変異体 <i>ccd1</i> の原因遺伝子探索 .....	60
ワックス量を調整して植物の乾燥・塩・高温耐性を増強させる仕組みを発見 .....	61
昆虫成長制御剤フェノキシカルブのブラシノステロイドシグナルへの効果の解析 .....	62
担子菌酵母 <i>Trichosporon asahii</i> の菌糸生長に関わる遺伝子の探索 .....	63
窒素固定細菌の合成細菌群の接種によるヤマイモ ( <i>Dioscorea alata</i> L.) 固有の根内部および根圏細菌群集の置換 .....	64
過酷な環境から単離した微細藻類の全ゲノム解析 .....	65
微生物における遊離フラビン関与の鉄代謝 .....	66
様々な発酵環境から単離された産業微生物の大規模ドラフトゲノムシーケンス .....	68
発泡スチロールを食する昆虫幼虫の腸内で発現している遺伝子の転写解析の試み .....	69
中央代謝系が関わる枯草菌の増殖相切り替え機構の解析 .....	70
ヒト毛髪に常在する細菌叢の分布および生態の解明 .....	71
藍藻における自律複製領域の探索とそれを利用した高発現ベクターの構築 .....	72
高温メタン発酵法によるポリ乳酸ポリマーの分解過程における微生物学的メカニズムの解析 .....	73
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2) における NO 誘導遺伝子群の探索 .....	74
研究発表実績 .....	75





# 生物資源ゲノム解析拠点 ニュースレター

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター  
2023年3月号





共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」

## 生物資源ゲノム解析センターの運用実績

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、文部科学省の認定による生物資源ゲノム解析拠点の運用を開始してから10年、今年度は2期目入ってから4年目の活動となりました。本拠点は、我が国の農学分野を中心とする新たな研究領域の開拓を図り、本学と学外の研究者間における共同研究を対象に、今日では多くの研究分野で活用されている次世代シーケンサー（NGS）を利用した遺伝情報解析を支援しています。また、この支援活動では、学内-学外間で研究者同士の新たなコミュニティの創成、さらには農学分野で遺伝情報解析を介した研究を担う人材育成に貢献することも目指しています。

当センターは、Illumina社のNGSを5台（HiSeq 2500、NextSeq 1000、NextSeq 500、MiSeq 2台）、解析およびストレージサーバーを6台（総メモリー量6TB、総ストレージ量1PB）設置しており、ライブラリー調製からシーケンサーのオペレーション、データ解析までを一貫して行える研究員が常勤しています。各研究員は、それぞれ専門分野を中心に微生物から高等な動植物まで多岐にわたる生物種を対象に、ゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、メタゲノムなど様々な解析目的の研究課題に対応できる体制となっています。

令和4年度は、32件の研究課題に対して解析支援を実施しましたが、これまで通り多くの研究者の方々から農学分野において重要な生物を対象とした様々な研究課題の申請があり、採択件数は初年度から累積すると340件を超えました（図1）。そして、今年度の採択課題の対象生物種には、動物、植物、微生物、環境サンプルが含まれました。また、解析手法別にまとめると、これまでと同様にRNA-seqをはじめ*De novo* RNA-seqや3' mRNA-seqによるトランスクリプトーム解析を目的とした課題が過半数を占めました。さらに、今年度は当センターが開発した特定のマイクロサテライトモチーフを網羅的に解析することができるMicrosatellite Capture Sequencing法（MiCAPs）を適用し、集団遺伝学解析を目的とした課題に対して非常に効果的なデータを提供することにも務めました。したがって、これまで以上に裾野を広げた解析支援を行うことができるようになったといえます。

今年度は、Oxford Nanopore Technologies社のMinIONを併用した解析を取り入れるなど、さらに多様化する解析技術へ対応するために、解析環境も一段と整備されました。また、昨年度から取り組み始めたオンラインセミナーの開催や当センターの見学案内により、多くの研究者に対してNGS解析に関わる技術や研究紹介を行うことができました。今後も、共同研究や情報発信を通して学内外の研究者間の交流を深め、NGSを用いた研究に貢献できるよう取り組んで参ります。

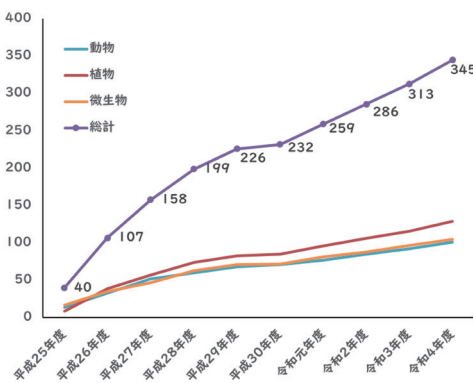


図1 共同利用・共同研究課題件数（累積）



図2 共同研究課題における解析手法

各解析手法の括弧内には、課題件数を示す。ゲノム解析を青字、トランスクリプトーム解析を緑字、メタゲノム解析を紫字、エピゲノム解析を橙字で示す。

(生物資源ゲノム解析センター 田中啓介・細井昂人)

## 生物資源ゲノム解析センター 情報発信活動

当センターでは、解析支援業務のほか次世代シーケンサー（NGS）やデータ解析に関する知見を深めること、および研究者コミュニティの拡大を目的として、セミナー開催などを通じた積極的な情報発信活動を推進しています。今年度も、新型コロナウイルスの蔓延による影響を考慮し、状況に応じて対面とオンラインによりセミナー等の情報発信活動を実施いたしました。

まず、当センターの共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」のオンライン説明会を実施いたしました（図1）。この試みは、これまでNGSに馴染みがなかった研究者に向けた新規応募の獲得にもつながります。今年度は、2022年度（後期）の公募に関する説明会として、2022年7月25日と2022年7月26日に、2023年度（前期）の公募に関する説明会として2022年12月15日と2022年12月20日に、各2回ずつの計4回実施し、それぞれ多数の研究者にご参加いただきました。

また、昨年度から始まった取り組みであるNGRCセミナーを本年度も開催いたしました（表1）。本年度のセミナーの第1回である「NGSと生物資源ゲノム解析センターの紹介（2022年度版）」では、当センターのこれまでの実績や設備について紹介を行いました。続く第2回から第4回ではそれぞれ、メタ16S解析、*De novo* RNA-seq解析およびRAD-seq解析について、本学の分子微生物学科に所属する志波 優准教授および当センター所属研究員が解説しました（図2）。本セミナーは、NGS未経験者やデータ解析のビギナーに向けた内容となっており、解析手法について詳細に説明する他、コマンドの実例を示しながらテストデータを用いて実際に解析を行うなど実践的な内容となりました。セミナーには幅広い学部・学科の学生や、他大学の先生方に多くご参加いただいたことから、NGS関連の技術や情報に多くの関心が寄せられていることがうかがえます。このような活動を通じて、研究者間の交流並びに後進の教育的側面としての役割を担うことができると期待しております。

今年度は、大阪府立国際会議場で開催されたNGS EXPO 2022に3名の当センター所属研究員が参加し、センターの広報を行いました。前年度3月より新型コロナウイルス蔓延防止等重点措置による規制が緩和されたこともあり、対面とオンラインのハイブリッドで開催され、幅広い分野の研究者および企業が参加しておりました。当センターはポスターセッションで参加し、研究実績や設備のPR活動を行った他、当センターに所属する細井研究員並びに輿石研究員が自身の研究成果の発表を行いました。研究会に参加したことにより、当センターではこれまでにほとんど扱ってこなかったシングルセル解析や、ロングリードシーケンスによる解析の需要が高まっていることを実感いたしました。

東京農業大学・生物資源ゲノム解析センターは、今後も遺伝情報解析による支援活動のほか、セミナー開催等を通して情報発信活動を積極的に推進します。

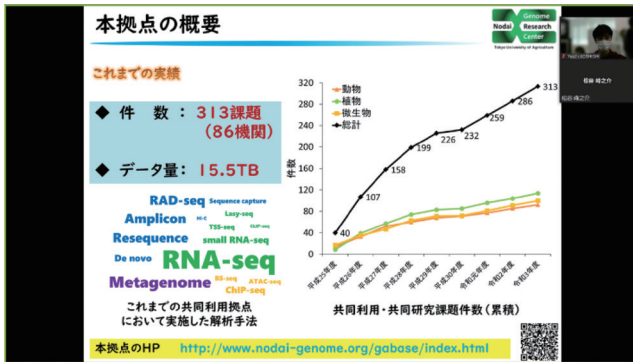


図1 拠点事業公募説明会の様子



図2 第2回 NGRC セミナーの様子

表1 NGRC セミナー

#	テーマ	日程
第1回	NGSと生物資源ゲノム解析センターの紹介	10月28日
第2回	QIIME2パイプラインを使ったメタゲノム(メタ16S)解析	11月4日
第3回	NGRC式! De novo RNA-seq解析術!!	12月16日
第4回	RAD-seq解析を用いた特有家畜の選抜育種計画	1月19日
第5回	特別合同セミナー シングルセル解析の実践例：血管階層性構築過程の解析	2月17日
勉強会	アグリゲノミクス分野におけるNGS活用例	3月2日
第6回	NGRCコミュニティ交流会 -ビギナーズ向け相談室-	3月17日

(生物資源ゲノム解析センター 松谷峰之介・興石雄一)



## 2022 年度 研究発表実績

### 論文発表

- **Akiyama T, Uchiyama H, Yajima S, Arikawa K, Terai Y.**  
Parallel evolution of opsin visual pigments in hawkmoths by tuning of spectral sensitivities during transition from a nocturnal to a diurnal ecology.  
*J Exp Biol.* 225(23):jeb244541. (2022)
- **Hamaoka K, Aoki Y, Takahashi S, Enoki S, Yamamoto K, Tanaka K, Suzuki S.**  
Diversity of endophytic bacterial microbiota in grapevine shoot xylems varies depending on wine grape-growing region, cultivar, and shoot growth stage.  
*Sci. Rep.* 12:15772. (2022)
- **Hirai S, Yokoyama E, Shiwa Y, Ishige T, Ando N, Shimizu T, Murakami S.**  
Clarification of relationship between single-nucleotide polymorphism panels of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H- strains.  
*J Vet Med Sci.* 84(10):1399-1405. (2022)
- **Kabir A, Ieda R, Hosoya S, Fujikawa D, Atsumi K, Tajima S, Nozawa A, Koyama T, Hirase S, Nakamura O, Kadota M, Nishimura O, Kuraku S, Nakamura Y, Kobayashi H, Toyoda A, Tasumi S, Kikuchi K.**  
Repeated translocation of a supergene underlying rapid sex chromosome turnover in *Takifugu* pufferfish.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 119(23):e2121469119. (2022)
- **Kataoka N, Matsutani M, Matsumoto N, Oda M, Mizumachi Y, Ito K, Tanaka S, Kanesaki Y, Yakushi T, Matsushita K.**  
Mutations in *degP* and *spoT* Genes Mediate Response to Fermentation Stress in Thermally Adapted Strains of Acetic Acid Bacterium *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288.  
*Front Microbiol.* 13:802010. (2022)
- **Maruyama T, Sumi S, Kobayashi M, Ebuchi T, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Ueda K, Takano H.**  
Class II LitR serves as an effector of “short” LOV-type blue-light photoreceptor in *Pseudomonas mendocina*.  
*Sci Rep.* 12(1):21765. (2022)
- **Miao Y, Xun Q, Taji T, Tanaka K, Yasuno N, Ding C, Kyojuka J.**  
*ABERRANT PANICLE ORGANIZATION2* controls multiple steps in panicle formation through common direct-target genes.  
*Plant Physiol.* 189(4):2210-2226. (2022)
- **Nishitani K, Hayakawa K, Minatomoto M, Tanaka K, Ogawa H, Kojima H, Tanaka S.**  
*N*-Oleoyldopamine promotes the differentiation of mouse trophoblast stem cells into parietal trophoblast giant cells.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 636(Pt 1):205-212. (2022)

- Oikawa M, Kobayashi H, Sanbo M, Mizuno N, Iwatsuki K, Takashima T, Yamauchi K, Yoshida F, Yamamoto T, Shinohara T, Nakauchi H, Kurimoto K, Hirabayashi M, Kobayashi T.  
Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats.  
*Science*. 376(6589):176-179. (2022)
- Oyama T, Kato Y, Hidese R, Matsuda M, Matsutani M, Watanabe S, Kondo A, Hasunuma T.  
Development of a stable semi-continuous lipid production system of an oleaginous *Chlamydomonas* sp. mutant using multi-omics profiling.  
*Biotechnol Biofuels Bioprod*. 15(1):95. (2022)
- Okumura Y, Masuda Y, Matsutani M, Shiomoto A.  
Influence of oyster and seaweed cultivation facilities on coastal environment and eukaryote assemblages in Matsushima Bay, northeastern Honshu, Japan.  
*Front. Mar. Sci*. 9:1022168. (2023)
- Iwami R, Takai N, Matsutani M, Shiwa Y, Kokubo H, Kasahara K, Kokubo T.  
Epigenetic alteration of TFIIID dependency in mRNA transcription mediated by simultaneous functional loss of Taf1 and Spt3 is Hsp104-dependent.  
*PLoS One*. *in press*

# 2022年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧

## 前期採択課題一覧

1. 原 富次郎（京都大学）  
「新規なリゾクトニア・ソラニ分泌性ポリペプチド型抗糸状菌物質の同種異系株間における発現機構の比較調査」
2. 小野寺 康之（北海道大学）  
「ホウレンソウの開花および性発現制御機構の解明」
3. 山口 直矢（北海道立総合研究機構 十勝農業試験場）  
「インゲンマメの収量および品質関連形質のゲノミック予測モデルの構築」
4. 落合 謙爾（岩手大学）  
「無限分裂細胞を用いた原因不明疾患の発病メカニズムの解析」
5. 河村 耕史（大阪工業大学）  
「バラのトゲ形成を制御する鍵遺伝子の探索」
6. 廣田 隆一（広島大学）  
「原生生物との相互作用による藍藻の形態変化」
7. 兼子 伸吾（福島大学）  
「新規突然変異解析による大発生したナナフシの移動分散解析」
8. 橋本 周（大阪公立大学）  
「NAD<sup>+</sup>補充による卵母細胞と受精卵の細胞内エネルギー代謝とレドックス制御の不均衡の解消機構の解明」
9. 後藤 達彦（帯広畜産大学）  
「ニワトリ尾羽形態の多様性に関わる遺伝的基盤の解明」
10. 原 聡史（佐賀大学）  
「H19-ICR 変異マウスにおける CTCF および Rad21 の結合解析」
11. 菅野 里美（名古屋大学）  
「イネの Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 輸送体の欠損株において Cs<sup>+</sup> 輸送に寄与する輸送体遺伝子の探索」
12. 吉田 明希子（東京農工大学）  
「有機栽培水田の微生物叢による水生植物の形態形成制御に関する研究」
13. 石井 正治（東京大学）  
「伝統的壺造り純米黒酢醸造の安全性を、黒酢由来酢酸菌の NGS 解析で理解する」
14. 小林 佑理子（岐阜大学）  
「施肥条件の異なる酸性土壌における植物と根圏微生物叢の応答と関連性」
15. 西條 雄介（奈良先端科学技術大学院大学）  
「植物の貧栄養環境適応を左右する共生細菌の比較ゲノム解析」
16. 前田 海成（東京工業大学）  
「藍藻普遍的な細胞外多糖合成転写制御機構の探索」
17. 李 允求（学習院大学）  
「天蚕糸と同等の緑色絹糸を生産する遺伝子組換え家蚕・柞蚕の開発」
18. 渡邊 寛子（株）AGRI SMILE）  
「農産現場の課題克服を加速する栽培土壌の微生物叢および化学特性の試験系検討」

（課題番号順）



## 後期採択課題一覧

1. 薬師 寿治 (山口大学)  
「コリネ型細菌における RNase J 欠損により引き起こされる芳香族アミノ酸代謝変化の解明とその植物二次代謝産物生産への応用」
2. 真野 純一 (山口大学)  
「葉緑体で生成する活性カルボニルによるプログラム細胞死開始メカニズムの解明」
3. 溝井 順哉 (東京大学)  
「イネの高温ストレス応答に関する転写因子の機能解析」
4. 後藤 慎介 (大阪公立大学)  
「食用コオロギを低コストで維持管理する方法の開発」
5. 小山 喬 (長崎大学)  
「多検体トランスクリプトーム情報を用いて個体の状態を可視化する」
6. 乾 秀之 (神戸大学)  
「難分解性有機フッ素化合物の代謝・分解を担う細菌酵素の探索・同定」
7. 見崎 裕也 (広島大学)  
「シクロヘキセン含有エナミド生産に関与する生合成遺伝子の特定」
8. 長岐 清孝 (岡山大学)  
「ChIP-Seq 解析によるショウガ目植物の動原体 DNA 配列の同定」
9. 辻 寛之 (名古屋大学)  
「オオムギ花序の外科的切除と二次的花序の発生学的解析」
10. 今井 啓雄 (京都大学)  
「新規非ヒト霊長類解析モデルを用いた腸管化学感覚受容メカニズムの解明」
11. 仲下 英雄 (福井県立大学)  
「殺菌剤イソプロチオランの根伸長促進機構の解明」
12. 一谷 勝之 (鹿児島大学)  
「イネ極晩生突然変異体のもつ晩生原因遺伝子の特定」
13. 林田 信明 (信州大学)  
「分離集団に対する DNA マーカー検出の新戦術」
14. 津田 吉晃 (筑波大学)  
「MiCAPs 法による SSR および SNP の同時取得法の確立および遺伝的多様性・遺伝構造への解像度評価：新たな縮約ゲノム多型解析法の開発」

(課題番号順)



## ほうれん草の開花および性発現制御機構の解明

ほうれん草は栄養価の高い葉菜として、世界中で栽培される作物である。同作物は政府が定める「指定野菜」に含まれており、国内で生産・消費される野菜品目として重要な地位を占めている。葉菜としてのほうれん草は抽苔（花成）前の栄養葉に食品として価値がある。その花成・抽苔は長日条件下で促進されるため、抽苔性（早抽～晩抽性）はほうれん草の栽培地域および作型を決定づける重要な形質である。また、ほうれん草は雌雄異株として知られるが、実際には雌花および雄花を様々な比率で着生する間性株（雌雄異花同株）が存在する。優先的に作付けされるF1品種の生産には、種子親および花粉親に適した雌花率（一株あたりの雌花着生率）を備えた間性系統を用いた経済的F1採種システムが利用されており、F1育種において雌花率は重要な形質となっている。

これまでに、筆者が独自に構築したほうれん草ゲノムアセンブリ SOL\_r1.1（全長 935.7Mb; <http://spinach.kazusa.or.jp/index.html>）を活用して、6連鎖群（LG1～LG6）から成る高密度分子連鎖地図を構築し、抽苔性（花成）および雌花率に関するQTL解析を行なった（図）。抽苔性に関しては3つのQTL（*qBt3.1*、*qBt3.1* および *qBt3.2*）がLG2 および LG3 にマップされた。ゲノムアセンブリ SOL\_r1.1 を参照して、*qBt3.1* および *qBt3.2* 領域にシロイヌナズナ花成促進遺伝子 *Flowering locus T* (*FT*) のホモログが座乗していることが判明した。*qBt3.1*

領域に座乗する *FT* ホモログについては、早抽および晩抽系統間で mRNA の発現量に差異があることが示され、QTL の責任遺伝子である可能性が示された。しかし、*qBt3.2* 領域に座乗する *FT* ホモログは早抽および晩抽系統のいずれにおいても mRNA の発現レベルが非常に低く、責任遺伝子である可能性が低いことが予想された。一方、雌花率については、2つのQTL *qFem2.1* および *qFem3.1* がそれぞれ LG2 および LG3 にマップされた。*qFem3.1* 領域には、以前に筆者が同定した間性決定遺伝子 (*M*) が座乗していた。さらに、両QTLの間には交互作用が見出され、*qFem2.1* は *M* 遺伝子 (*qFem3.1*) の存在下において雌花率の程度を制御する作用を持つことが示唆された。

本研究では、北海道大学・大学院農学研究院、東京農業大学国際食料情報学部および生物資源ゲノム解析センターが連携し、QTL 責任遺伝子の同定に向けて以下に述べる RNAseq 解析を計画した。まず、長日条件下で育成したほうれん草早抽および晩抽系統の地上部組織（明期・暗期）および茎頂の RNAseq 解析を行い、系統間のトランスクリプトームの比較に基づいて抽苔性関連 QTL の責任候補遺伝子を探索することを企てた。さらに、雌花率制御 QTL 責任遺伝子の同定に向けて、雌株（雌花率 100%）、高雌花率間性株（雌花率 80%）および低雌花率間性株（雌花率 10%）の花序のトランスクリプトームの比較解析を計画した。

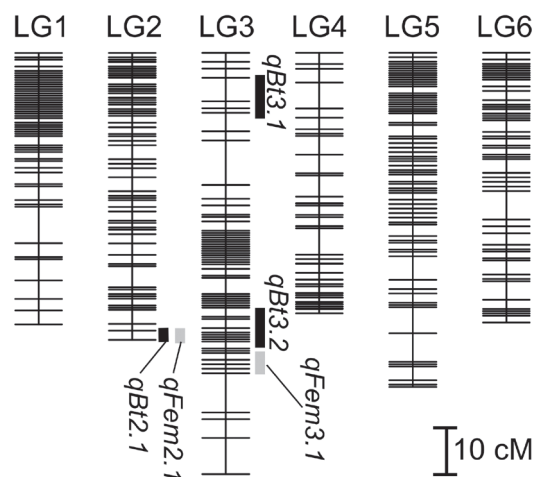


図 ほうれん草高密度連鎖地図  
■抽苔性 QTL；■雌花率 QTL



## インゲンマメの収量および品質関連形質の ゲノミック予測モデルの構築

インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) の中でも代表的な銘柄である「金時」は、北海道で栽培され、赤紫色を呈した子実を持つ。金時は子実の形が良く、食味が優れていることから、煮豆や甘納豆の原料として用いられている。金時は生育期間が短く、同じ豆類のサイズやアズキと比べるとポテンシャル収量が低い。また、近年の気候変動による影響により、干ばつや高温など収量が不安定である。これらの理由から、安定多収の金時品種の開発が必要とされ、効率的に収量選抜できる育種法の開発が必要とされている。近年、次世代シーケンサーの普及により、安価にゲノム全体の一塩基多型 (SNP) を大量に検出することが可能となっている。SNP と表現型データから予測モデルを作成し、育種選抜に用いる「ゲノミックセレクション法」(GS) が開発され、乳牛や果樹等の育種事業で利用され始めている。金時の収量や品質関連形質は、関与する遺伝子の効果が小さい量的形質であるため、GS の利用が期待される。本研究では、金時育種事業で育成中の系統群を用いて、収量や品質関連形質でのゲノミック予測モデルを構築し、その予測精度を検証することを目的とした。また、金時の機能性成分であるポリフェノール含量の解析も進めた。

まず初めに、120 品種系統について、東京農大ゲノム解析センターの RAD-seq 解析により、精度の高い 19,400 点以上の SNP を得た。収量、成熟期、草丈、莢数、百粒重、収穫指数 (収量 / 全重) 等の形質について、2021 年は 76 系統、2022 年は 78 系統のデータを取得し、これらを表現型データとした。SNP と表現型データを用いて、各形質のゲノミック予測を行った。その結果、成熟期、収穫指数は 2 年ともに年次内精度が高かった。収量については、単年で高い精度が得られた。同じデータセット

を用いて、ゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) を行った結果、収量、成熟期で有意な SNP を検出することに成功した。現在、これらの SNP について、更に解析を進めている。

ポリフェノールは抗酸化作用を持ち、特に豆類由来のポリフェノールは肝保護作用や血糖値上昇抑制作用などを持つことが報告されている。金時は一般的にポリフェノール含量が高いことが知られているが、品種間差に関する報告は少ない。近年、消費者の健康意識が高まっていることから、ポリフェノール含量が更に高い金時品種を育成することができれば、新規のニーズ開拓に繋がると考えられる。これまで、小豆、金時、ササゲなどを含めた赤色系の豆類では、ポリフェノール含量と種皮色 (赤色  $a^*$ ) に正の相関関係があることが報告されている。このため、金時品種だけでポリフェノール含量と  $a^*$  値に相関関係が認められれば、 $a^*$  値をポリフェノール含量の選抜指標にでき、ゲノミック予測の対象になり得る。そこで、本研究では、子実色に変異のある系統群を用いて、総ポリフェノール含量の定量分析 (フォーリン・チオカルト法) を行い、 $a^*$  値との関係性を解析するとともに、 $a^*$  値のゲノミック予測の精度を検証している。東京農大で 2021 年産 13 系統、2022 年産 20 系統のポリフェノール含量の定量分析を行った結果、両年ともにポリフェノール含量と  $a^*$  値の間に相関関係は見られなかった。このため、 $a^*$  値を指標にしたゲノミック予測は難しいと考えられた。分析した系統の中から、2 年ともにポリフェノール含量が高い育成系統を 1 点見出した。この育成系統は、基幹品種である「大正金時」よりも 1.4~1.5 倍ポリフェノール含量が高く、今後の育種利用が期待できる。

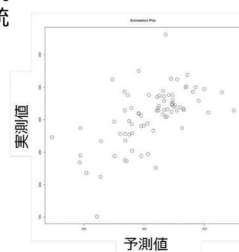


金時  
120品種系統

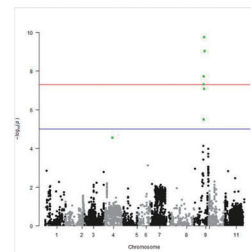
<遺伝子型データ>  
RAD-seq解析  
19,400 SNP

<表現型データ>  
2021年 76系統  
2022年 78系統

ゲノミック予測モデル作成  
ゲノムワイドアソシエーション解析  
(GWAS)



ゲノミック予測の例



GWASの例

山口 直矢 (北海道立総合研究機構中央農業試験場)  
中川 浩輔 (北海道立総合研究機構十勝農業試験場)

共同研究先：中澤 洋三 (生物産業学部)  
田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

## 無限分裂細胞を用いた原因不明疾患の発病メカニズムの解析

培養細胞は腫瘍や原因不明疾患および感染症の研究になくてはならない重要な研究資源である。しかし、検体から採取された初代培養細胞では一定の分裂回数に達すると増殖は停止してしまい、長期間維持することができない。こうした中、Fukuda *et al.* (J. Biotechnol. 176:50-57, 2014) により、がん遺伝子を用いない細胞の株化法 (K4DT 法) が報告され、元の細胞の性質を保持した無限分裂細胞の作製が可能となった。この細胞技術は病理形態学の枠を超えた病態解析を容易とすることから、幅広い疾病研究への応用が期待されている。

我々は様々な動物の原因不明疾患を対象に、罹患動物由来の無限分裂細胞株の作出を試みている。2021 年度の共同研究では、「若年性牛血管腫症」の症例 (図 1) から作出した無限分裂細胞 (図 2、3) を RNA-Seq により解析した。その結果、ケモカインの発現量低下と、アポトーシスを調節する遺伝子 *Tnfrs6b* の過剰発現が起こっていることを明らかとした。2022 年度の共同研究では、「鶏のグリオーマ (星細胞腫; 図 4)」の解析に取り組んだ。本疾患は鳥白血病ウイルス (ALV) により誘発される腫瘍性疾患で、その病理発生には不明な点が多く、通常の ALV 発がんの概念では説明がつかない。このため、単離した腫瘍細胞の解析が不可欠となっていた。さらに、2010 年に分離された ALV Km\_5666 株 (GenBank accession #AB669896) はグリオーマに加えて心臓横紋筋腫誘発能を獲得したユニークな株で、感染実験により 35 日ヒナの 25% の心臓に異型心筋線維が出現することが証明されている (Nakamura *et al.*, 2014)。しかし、Km\_5666 株の星状膠細胞や心筋細胞への病原性規定因子は現在も不明の

ままである。そこで本研究では、Km\_5666 株感染鶏から星状膠細胞と心筋線維の初代培養細胞を採取し、これらを用いて無限分裂細胞の作出を試みるとともに、樹立した細胞株を対象とした RNA-Seq 解析により原因遺伝子の探索を行い、本疾患の分子メカニズムを解明することを目指した。

Km\_5666 を鶏胚に感染させヒナ (35 日齢) の心臓には左心室壁に小さな褪色領域が観察された。組織学的には、この領域はリンパ球性心筋炎と心筋線維の錯綜からなり、これら病巣にはしばしば大型の異型核を持った肥大心筋線維が出現し (図 5)、筋形質内には ALV 感染を意味する基質封入体が多数観察された。脳では、グリオーマが確認され、腫瘍細胞は免疫組織学的に ALV 抗原に陽性を示した。これらの臓器から初代培養細胞を作製したが、心筋線維は増殖しなかった。一方、脳から作製した初代培養細胞では十分な細胞数が得られたため、変異型 CDK4、CyclinD1 を発現させるベクターを導入し、無限分裂細胞の作成を試みた。得られた細胞はレポーター遺伝子 GFP を発現し、免疫染色ではこれら培養細胞は GFAP 陽性となり星状膠細胞であることがわかった。しかしその後、培養細胞の増殖は 5 継代目で停止したため、RNA-Seq 解析に必要な細胞株を樹立することはできなかった。今後、細胞培養条件の再検討が必要となった。

若年性牛血管腫症の解析から、無限分裂細胞技術は家畜、犬、猫、鳥類の原因不明疾患の発症機序解明や細胞レベルの疾患モデルの作出への可能性が示された。その中で今後も RNA-Seq の応用が期待できる。

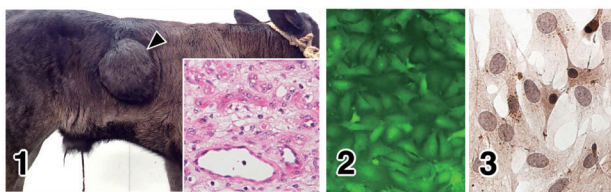


図 1 若年性牛血管腫の肉眼像 (矢頭) と組織像  
 図 2 若年性牛血管腫症由来の無限分裂細胞株 (蛍光像; レポーター遺伝子の発現)  
 図 3 同細胞株の免疫組織化学 (血管内皮マーカー vWF 陽性)

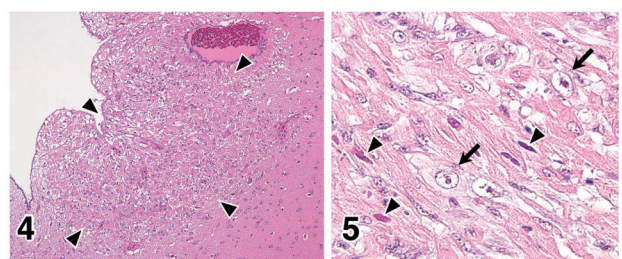


図 4 鶏のグリオーマ (矢頭間)  
 図 5 Km\_5666 摂種鶏でみられた異型心筋線維 (矢印) と多数の基質封入体 (矢頭)



## バラのトゲ形成を制御する鍵遺伝子の探索

バラ（薔薇）はトゲが象徴的な植物であるが、トゲがまったくない「トゲ無し」品種が少数ながら存在する。野生種でも日本のノイバラ (*Rosa multiflora*) のなかに、トゲ無しの個体が存在する。ノイバラのトゲ無し個体は、園芸農家で「台木」として生産され流通している。バラのトゲは、切り花の生産現場では、作業員や生花を傷つけるものとして敬遠される。そこで、交配育種や遺伝子組換え技術等によって、トゲの無いバラを作成することを目標に、バラのトゲ形成を制御する遺伝的な仕組みが研究されてきた。その結果、2倍体のバラ品種やノイバラを使った研究によって、トゲ無し形質は単一の劣性遺伝子座に制御された遺伝形質であることがわかってきた（文献1-3）。すなわち、トゲ形成を制御する「鍵遺伝子」が存在し、その機能が欠損したバラでトゲが無くなっていると推察されている。この鍵遺伝子は、第三染色体上の約10Mbpのゲノム領域に存在すると推定されている（図1）。本研究では、この候補領域をさらに絞りこむため、日本のノイバラ台木生産農家にある大規模交雑集団を使ったNGS解析を実施した。

日本の園芸農家はトゲ無しのノイバラを台木として大量生産している。これらの農家を訪問し、トゲ無しノイバラの葉を遺伝子解析用にサンプリングした。1農家あたり100~200株程度、合計1000株近いサンプルをえた。また、現地のサンプリング時に、数十株に1株程度の頻度で、トゲ有りの個体が混在することを発見し、このトゲ有り個体も比較用にサンプリングした（図2）。台木農家では、自然交配したトゲ無しノイバラから果実を採取し、春先に播種して育成し、トゲ無し個体を選抜して出荷している。自然交配のため、トゲ有り個体が発生していると考えられた。サンプルしたバラ葉からgDNAを抽出し、トゲ無し形質の鍵遺伝子が存在すると推定されているゲノム領域内に設計した複数のプライマーセットを使い、PCRを行った。トゲ有りバラとトゲ無しバラでそれぞれPCR産物をプールしたうえで、塩基配列情報をNGSで網羅的に取得した。リードデータから塩基多型の程度を調べ、トゲ無し集団の遺伝的多型が最も低いゲノム領域を2Mbpの領域まで狭めることができた。同領域

はトゲ有り集団では遺伝的多型が十分見られたため、トゲ無し形質に関わる鍵遺伝子が存在する可能性が高いと考えられた。さらに、候補遺伝子を絞りこむため、トゲ有バラとトゲ無バラのシュート頂端分裂組織の比較RNA-seq解析を行った。現在、両方の解析結果をもとに、候補遺伝子の特定を試みている。

本研究を契機に、バラのトゲ形成を制御する鍵遺伝子を特定することができれば、トゲの無いバラを作製する応用技術の開発につながるだけでなく、植物のトゲ形成の分子機構に関する新たな基礎研究の発展につながることも期待される。バラのトゲは、形態学的には表皮細胞が分化したトリコーム (Trichome) の1種であると考えられている。シロイヌナズナや草本作物 (トマト、ナス) ではトリコーム形成に関与している遺伝子が、転写因子も含めると数十種類すでに特定されている。しかし、草本植物のトリコームを作る仕組みだけで、バラのトゲのような多細胞性で木質化した構造を作る仕組みを説明することは難しいかもしれない。バラのトゲのように、木質化した突起物を形成する植物は、同じバラ科のキイチゴ類だけでなく、ミカン科、グミ科、マメ科など多様な系統に属する農作物にも見られる。この中には、バラのトゲ (Prickle) とは異なり、シュートが分化してトゲ (Thorn) になる例もある。最近、ミカン科作物で、転写因子の *TCP* 遺伝子の機能を欠損させると、トゲ (Thorn) がシュートに戻ることが実証された (文献4)。バラのトゲ (Prickle) も Thorn のように転写因子が鍵遺伝子となっているのか、また、Thorn と Prickle は発生遺伝学的にどのような共通性や相違点を持つのかなど、農学の基礎研究に新たな知見をもたらすきっかけにもなるだろう。

### 引用文献

1. 近藤ら. 2014. 園芸学研究 別冊 2: 286.
2. Hibrand-Saint Oyant *et al.* 2018. Nature Plants 4: 473-484.
3. Zhou *et al.* 2020. Theor. Appl. Genet. 133: 3017-3035
4. Zhang *et al.* 2020. Curr. Biol. 30: 2951-2961

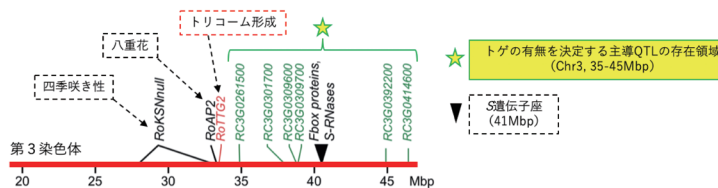


図1 文献2の Fig.4A をもとに作成

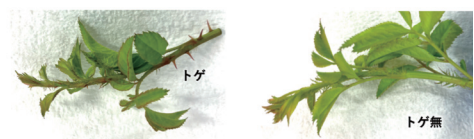


図2 台木生産農家で採取したサンプル例



## 原生生物との相互作用による藍藻の形態変化

藍藻は酸素発生型光合成を行う原核生物であり、遺伝子操作が容易であるため光合成微生物によるバイオプロダクションのシャーシ株として広く研究されている。今後実用化が進められるにあたり、開発された藍藻株の実用スケールでの培養が求められるが、微細藻類の大規模培養では原生生物の捕食による生産性の低下（ポンドクラッシュ）が大きな課題となっている。これまで黄金色藻（*Poteroiochromonas* sp.）等の原生生物が藍藻培養系に類出し、培養を破綻に導くハイリスク捕食者として報告されている。我々も100Lパイロット培養槽を用いた実験において、清浄な環境下であるにもかかわらずこれらの原生生物が出現し、捕食により藍藻の増殖を著しく低下させることをこれまでに幾度となく経験した。しかしながら、原生生物の捕食圧下で培養を継続することで、一定の頻度で捕食から逃れる藍藻細胞が出現し、それらの多くは形状が大きく変化し細胞長が劇的に伸長することを見出した。さらに、その後も培養を継続すると伸長した藍藻株がさらに増殖し、捕食者の存在下でも培養系を優占する現象が確認された。このことから、藍藻は自身の細胞長を変化させ、外敵からの捕食に抵抗する能力を有していると考えられるが、これまでにそのような報告はされていない。

我々はこれまで、淡水性藍藻（*Synechococcus elongatus* PCC 7942）、海洋性藍藻（*Synechococcus* sp. 7002）の系統が異なる2種の藍藻において、捕食圧存在下で細胞形態が著しく変化する現象を見出した。これらの伸長細胞の長さや細胞内構造には単離した変異株によって違いがあり、遺伝的な変異のタイプには複数の種類があると予想された。そこで、変異株のゲノムリシーケンスによって変異点を同定し、形態変化の分子メカニズムの解明を

試みた。また、細胞伸長の度合いは単離株を単一で培養するよりも捕食者共存下の方がさらに長く伸びることや、培養条件（物理的攪拌条件、照度）によって変化することが確認されているため、捕食者存在下、および培養条件を変化させて、どのような遺伝子の発現が変動しているか、トランスクリプトーム解析により副次的に作用する因子の同定を試みた。

ゲノムリシーケンスの結果から、*S. elongatus* 伸長変異株にはアミノ酸変異をもたらす遺伝子変異が複数見出され、その中にはFtsZ, Ftn2, MinEをコードする遺伝子に変異が生じたものが多数見出された。これらはいずれもバクテリアの細胞分裂装置として知られるdivisomeを構成するタンパク質であり、遺伝子変異によって分裂機能に異常がもたらされた結果、細胞形態が変化したと考えられる。また、細胞形態形成への関与が知られていない遺伝子についても複数変異が見られており、現在遺伝子破壊による機能解析を進めている。トランスクリプトーム解析に関しては、捕食者存在下でのサンプル調製に困難を来したため、本計画期間中での実施はできなかったが、条件を整えて別途実施することとした。

今後は、変異が生じた遺伝子と細胞形態の関係について解析を進めつつ、得られた伸長変異株が実用スケールの培養において、高密度培養を容易に完遂できるか、菌体の回収を容易にする性質があるかなどを調べていく予定である。また、このような現象は藍藻の形態進化の観点からも興味深く、変異タンパク質の機能保存性や系統関係についても解析を行いたいと考えている。

（本研究は、本ゲノム解析センター拠点事業の他、JST先端的低炭素化技術開発、科学研究費補助金の支援を受けて行われました。）

## 新規突然変異解析による大発生したナナフシの移動分散解析

植物に擬態した姿で親しまれるナナフシ類は、時に大量に発生し害虫化する事例がたびたび報告されている。近年長野県で大発生が報告されているナナフシモドキについては、韓国で21,000haの森林被害が報告されたこともあり、それらの発生メカニズムや分布拡大の予測は、重要な研究テーマのひとつである。ナナフシの分布拡大に関しては、鳥による受動分散の可能性が近年指摘されている。昆虫は鳥と捕食と被食の関係にあり、捕食された昆虫は、子孫もろとも生存の可能性を失うと考えられる。しかし、ナナフシ類の卵をヒヨドリに摂食、排泄させた場合、その一部が孵化することが実験的に証明されている。昆虫が鳥に食べられても次世代を残すことができるのであれば、親個体の死=鳥による捕食は卵の受動分散につながるだろう。ナナフシモドキの大量発生集団を対象にSSRマーカーによる遺伝子型解析を行なった結果、同一遺伝子型の個体が広域に分布することが確認された。これはナナフシ類における長距離の受動分散を示唆する結果である。しかし、ナナフシ類の分布パターン形成に寄与した長距離の受動分散を把握するには、同一遺伝子型の広域分布がどの程度の速度で達成されたか知る必要がある。もし、ナナフシ類の突然変異率に関するデータがあれば、同一遺伝子型の個体間で観察される新規の突然変異の蓄積に要する世代数や世代あたりの分布拡大速度が推定できるはずである。

近年、次世代シーケンサーと洗練された分析手法の活用によって、親子間で生じる新規突然変異の検出が可能になってきた。近年開発されたMicrosatellite capture sequencing法（以下、次世代SSR解析）では、従来型のマイクロサテライト解析の500倍を超える遺伝子座数が多検体で分析可能であり、通常の動植物でも新規突然変異の検出が期待できる。本研究では、ナナフシ類におけるSSR遺伝子座の突然変異率を次世代SSR解析で実測し、「翅がなく能動的な移動能力に限られるナナフシ類が、どの程度の速さで分布拡大したのか」を問う。本研究では、長野県の安曇野において大量発生し、分布域が変動しつつあるナナフシモドキの集団において、分布拡大の過程を個体間に蓄積する新規突然変異をもとに推定することを目指す。これらの大量発生個体を対象に次世代SSR解析によって、従来型の解析では検出できなかった新規突然変異を検出し、新規突然変異に着目した血縁構造を推定する。同時に、単為生殖によって生まれた次

世代と親世代の次世代SSR解析によって、新規突然変異の発生確率についても推定する。これまでに得られた結果から、新規突然変異の候補遺伝子座が検出されている。従来の解析では単一の遺伝子型しか検出できなかったサンプルセットにおいて、わずかな遺伝的な変異が検出可能であること、対象集団における新規突然変異の候補遺伝子座が示されている。また、これまでモデル生物以外ではほとんど実施されることのなかった新規突然変異の発生確率の直接推定の結果にも期待がかかる。今後、解析と検証をさらに進め、大量発生個体の分布拡大が、どのような時間的、空間的スケールで生じたのか、鳥による受動分散がどの程度寄与しているかを明らかにしていきたい。

### 単為生殖ナナフシの新規突然変異検出

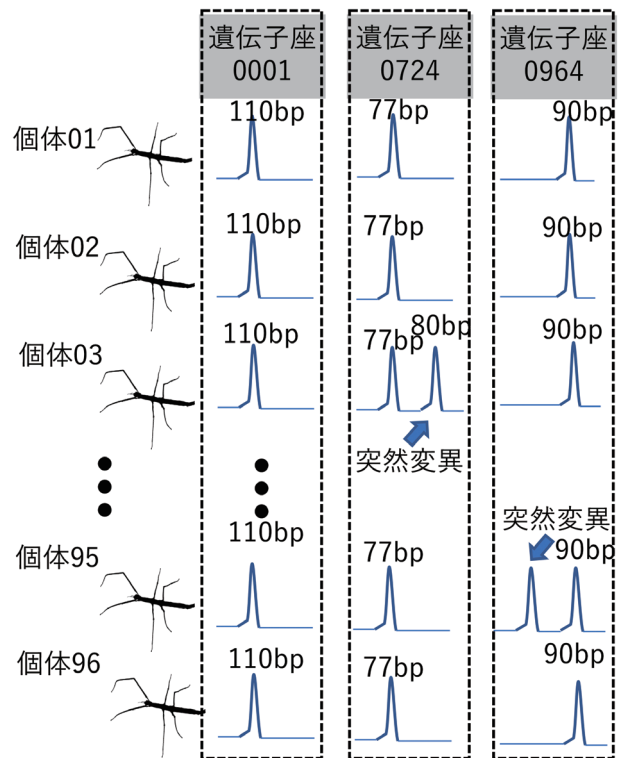


図1 新規突然変異検出イメージ  
遺伝子座0724と遺伝子座0964がマーカー候補となる。

## NAD<sup>+</sup> 補充による卵母細胞と受精卵の細胞内エネルギー代謝と レドックス制御の不均衡の解消機構の解明

母体加齢に伴いニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>) を分解する酵素が細胞内で増加し、卵母細胞をはじめとする細胞内の NAD<sup>+</sup> 量が低下する。また、組織から細胞を単離すると NAD<sup>+</sup> の分解が進む。これらのことから、細胞内の NAD<sup>+</sup> 量を高めることで、老化あるいは体外培養による細胞の生存性低下の緩和が期待さ

れた。NAD<sup>+</sup> 前駆体をウシ卵母細胞の培養液に添加すると、卵母細胞内の NAD<sup>+</sup> レベルが上昇し、卵母細胞の ATP 値と胚盤胞形成率が有意に上昇した。

これらの NAD<sup>+</sup> 補充による卵母細胞の変化の機構を理解するために次世代シーケンサーによる卵母細胞の網羅的な遺伝子発現解析を進めている。

## ニワトリ尾羽形態の多様性に関わる遺伝的基盤の解明

世界の10人に1人が飢餓という食料問題の緩和に向けて、畜産物の増産および高品質化に関する遺伝的基盤を理解することは重要である。一般的に、鶏卵および鶏肉の生産性や品質に加えて、それらを支える形態を決める遺伝的基盤は量的な遺伝様式である。そのため、それら表現型のバリエーションの原因となる多数の遺伝子群を見つけ出そうとする家畜を用いた研究は、畜産物の生産性や品質の向上を目指す上で重要な位置付けにある。

家畜における多様な品種が示す表現型の多様性は、多数の遺伝子座におけるDNA配列の変化（遺伝要因）および、それらを取り巻く外部環境の変化（環境要因）によって説明できる。集団ゲノミクス、量的形質遺伝子座（QTL）解析、ゲノムワイド関連解析（GWAS）等のゲノミクスは、「どのような遺伝子座の効果の組み合わせによって表現型の多様性が生み出されているのか」という生物学的な問いに答えるための方法であり、F<sub>2</sub>等の分離集団を対象にしたゲノミクスによって、表現型の多様性を説明する複数の遺伝子座を実験的に特定することができる。これに並行して、RNA-seq等のトランスクリプトミクスを行えば、表現型の多様性が認められる当該組織において有意な遺伝子発現量の差異を示す遺伝子群を明らかにすることができるため、ゲノミクスのみでは絞り込みが難しい部分に切り込むことができるものと期待される。

我々は、日本鶏品種であるダルマチャボおよびトサジドリの表現型の違いに着目した遺伝学的な研究を進めている。ダルマチャボの尾羽長は、野生型のトサジドリと比較して、有意に短い変異型を示すことが知られている（図1）。そこで、ダルマチャボおよびトサジドリの交配に基づいたF<sub>2</sub>の分離集団を作成し、F<sub>2</sub>世代において尾羽長における量的なバリエーションを確認しており、多数の遺伝子群による支配が強く示唆される結果が得られ



図1 多様な尾羽形態を示す日本鶏2品種  
変異型のダルマチャボ（雌）および野生型のトサジドリ（雌）。

ている（図2）。

これまでに、ダルマチャボ10個体およびトサジドリ10個体の全ゲノム情報を次世代シーケンサーにより解析し、全ゲノム比較（集団ゲノミクス）を行った結果、品種特異的なゲノム領域を高解像度に検出することに成功しているものの、どのゲノム領域が尾羽長に直接関わっているのかは不明の状況である。そのため、F<sub>2</sub>およびF<sub>3</sub>分離集団の250個体を対象に、尾羽長の量的なバリエーション（表現型）と、ゲノムワイドSNPs（遺伝子型）のデータを用いたGWASによって、候補遺伝子の直接的な証拠を得ることを計画している。これに加えて、分離世代において表現型に大きな差異のある2集団（変異型および野生型）のそれぞれ5個体ずつを対象にした成長期の尾部の羽包組織のトランスクリプトミクスによって、当該組織において大きく異なる発現をしている候補遺伝子の探索を行うことで、ゲノミクスおよびトランスクリプトミクスの2つのアプローチの共通項に着目した候補遺伝子のさらなる絞り込みを行うことを計画している。複雑な生命現象の一つである「畜産物の生産性や品質の向上を目指す」上でモデルとなるような本研究を通して、ニワトリが示す表現型の多様性に関わる遺伝的基盤の理解を進めることを目指している。

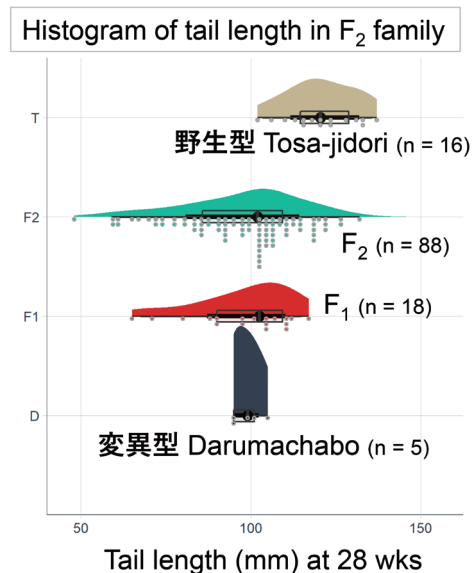


図2 F<sub>2</sub>分離集団の成鶏期（雌）における尾羽長のヒストグラム

野生型が長く、変異型が短く、F<sub>2</sub>分離世代では正規分布様の量的なバリエーションが認められていることから、多数の遺伝子群による支配が強く示唆される。

後藤 達彦（帯広畜産大学グローバルアグロメディシン  
研究センター）

共同研究先：平野 貴（農学部）  
輿石 雄一（生物資源ゲノム解析センター）  
田中 啓介（生物資源ゲノム解析センター）



## H19-ICR 変異マウスにおける CTCF および Rad21 の結合解析

哺乳類には父母いずれかに由来する対立遺伝子（アレル）から選択的に発現するインプリント遺伝子とよばれる遺伝子群が存在し、近傍に存在するインプリンティング制御領域（imprinting control region; ICR）により片アレル性の発現が制御される。ICRにはDNAメチル化をはじめとする父母アレル特異的なエピジェネティック修飾が付加されており、それらはインプリント遺伝子の発現制御に重要な役割を持っている。

マウス7番染色体に存在するインプリント遺伝子 *Igf2* および *H19* は、*H19*-ICR とよばれる父性アレルがメチル化、母性アレルが非メチル化状態のICRにより片アレル性の発現が制御される。このうち母性アレル上の *H19*-ICR（母性 *H19*-ICR）は卵子形成から胚発生を通して非メチル化状態が維持されている。何らかの異常で母性 *H19*-ICR が高メチル化になると、母性アレルからも *Igf2* が発現し、ヒトでは先天性疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群（BWS）の原因となる。このことから、母性 *H19*-ICR が非メチル化状態であることは哺乳類が正常な生命活動を営む上で不可欠といえる。

母性 *H19*-ICR の非メチル化状態には、インスレータータンパク CTCF の結合が重要であることが知られる。CTCF はゲノム中の CTCF 結合部位（CTS）に結合し、遠く離れた CTCF と二量体を形成することで、コヒーシントともにクロマチンループ構造を形成する。実際、母

性 *H19*-ICR に結合した CTCF は、母性アレル特異的なクロマチンループを形成することがわかっている。*H19*-ICR には複数の CTS がタンデムに存在しており（マウス：4箇所、ヒト：7箇所）、すべての CTS を変異させたマウスでは母性 *H19*-ICR が高メチル化され、BWS 様の過成長が認められる。このことから、CTCF およびコヒーシンの母性アレル特異的なクロマチンループが母性 *H19*-ICR の非メチル化状態に重要であることが示唆される。一方で、ヒト *H19*-ICR では転写因子 OCT4 の結合部位（Sox-Oct 結合部位；SOBS）の点変異が BWS の原因になることが報告されている。SOBS はマウスにも存在することから、OCT4 もまた CTCF とともに母性 *H19*-ICR の非メチル化状態に関与していると考えられるが、詳細な分子機構はわかっていない。

本研究では、母性 *H19*-ICR の非メチル化状態を形成・維持する分子機構の全容を解明し、BWS の発症機序を明らかにすることを目的として、CRISPR/Cas9 を用いて SOBS および4箇所の CTS を単独もしくは同時に変異させたマウスを作成し、その表現型や遺伝子発現を解析することで、BWS 様の過成長を引き起こす鍵となる配列の同定を行っている。また、これらの変異マウス胚を用いて ChIP-seq を実施することで、SOBS および CTS の変異が *Igf2*-*H19* 領域内外の CTCF およびコヒーシンの結合に及ぼす影響を解析している。

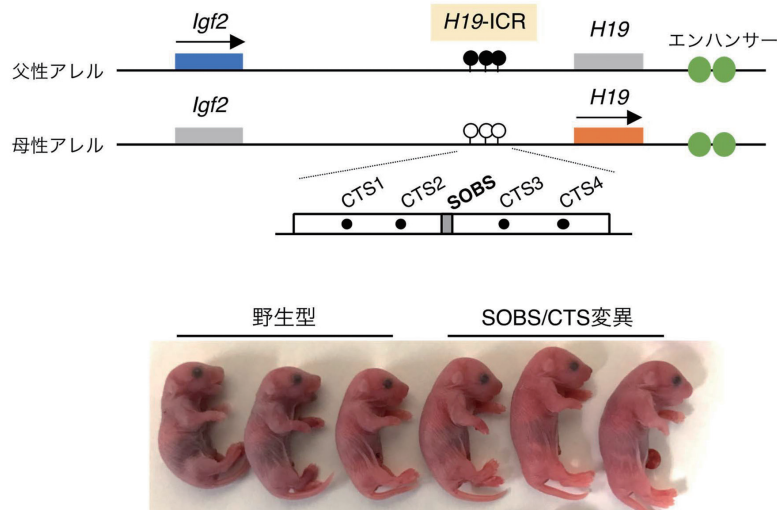


図 *Igf2*-*H19* インプリント領域の概略（上）および Sox-Oct 結合部位（SOBS）/CTCF 結合部位（CTS）変異マウスに認められた BWS 様の過成長（下）

## イネの Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 輸送体の欠損株において Cs<sup>+</sup> 輸送に寄与する輸送体遺伝子の探索

環境中に拡散した放射性セシウム (Cs<sup>+</sup>) の農作物による取り込みは、植物の持つカリウム輸送体とその輸送の中心的な役割を担う。しかしながら植物は多数の K<sup>+</sup> 輸送体遺伝子を持ち、それらの Cs<sup>+</sup> 輸送寄与の全体像は明らかではない。特に土壌が低カリウム (K<sup>+</sup>) 条件である時に働くカリウム輸送体の輸送寄与が高く、K<sup>+</sup> 施肥による土壌の K<sup>+</sup> 濃度の増加によりこれらの輸送体の働きを抑えて Cs<sup>+</sup> 吸収が抑制できることは、実際の農地への対応策として効果を示してきた。しかしながら事故後 10 年以上が経過し、施肥への支援は限定的となることから、今後は田畑への K<sup>+</sup> 施肥の投入量は減少する。ことから、作物の Cs<sup>+</sup> 吸収メカニズムについて理解を深めておくことは農作物生産において必要である。

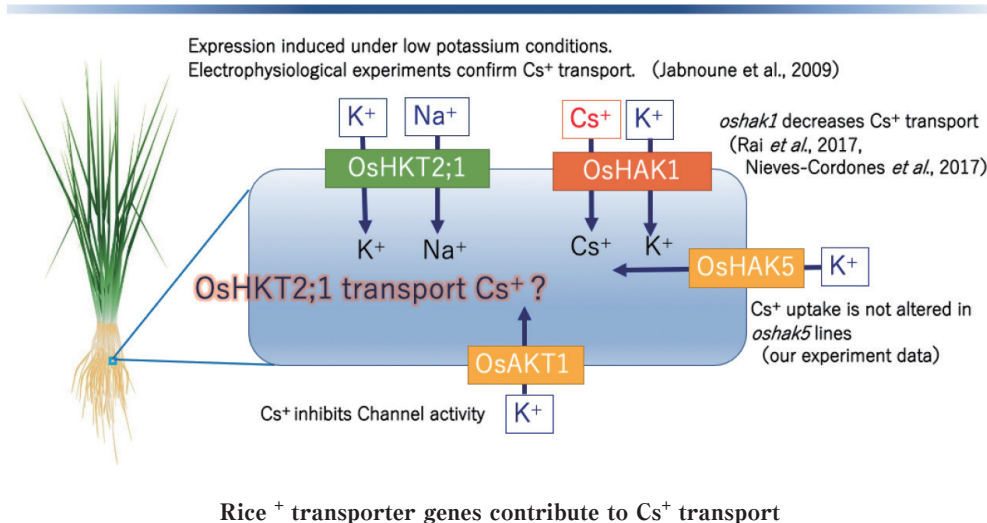
申請者らは、イネのカリウム輸送体のうち Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 共輸送体 *HKT2;1* 遺伝子に注目し Cs<sup>+</sup> 輸送への寄与を調べてきた。この遺伝子は、低 K<sup>+</sup> 条件下で Na<sup>+</sup> と K<sup>+</sup> を共輸送し、高 K<sup>+</sup> 条件下では Na<sup>+</sup> を主に輸送することが報告されている (Huang *et al.*, 2008)。また、アフリカツメガエル卵母細胞を使った電気生理学実験から Cs<sup>+</sup> 輸送が確認されている (Jabnune *et al.*, 2009)。そのため、遺伝子欠損株 (*hkt2;1* 株 ND4057, NC2534) は、Cs<sup>+</sup> 吸収が減少することを想定し、圃場栽培実験を行った。しかしながら予想に反し、Cs<sup>+</sup> 吸収および地上部への輸送は、野生型株よりもイネ *hkt2;1* 株において増加した。この結果から、*HKT2;1* 遺伝子は Cs<sup>+</sup> の直接的な輸送を担うのではないが、Cs<sup>+</sup> 輸送に間接的に寄与していることが示

唆された。また、圃場サンプルの茎葉の元素分析から、*hkt2;1* 株の Na<sup>+</sup> 量が野生型株に比較して減少し、K<sup>+</sup> 量は変わらないという結果が得られたことから、*HKT2;1* 輸送体の有無による植物体内の Na<sup>+</sup> 量の違いが Cs<sup>+</sup> 吸収量に影響することが予想された。

そこで、*HKT2;1* 遺伝子の有無による Na<sup>+</sup> 量の違いと Cs<sup>+</sup> 輸送への影響の仕組みを調べるため、実験室での水耕栽培系を使い異なる Na<sup>+</sup> 量条件下でトレーサ吸収実験を進めた。低 K<sup>+</sup> 条件下において Na<sup>+</sup> 濃度の増加させた場合 (500μM-10mM)、*hkt2;1* 株では、いずれの濃度においても高い Cs<sup>+</sup> 吸収量が保たれているのに対し、野生型株では、培地中の Na<sup>+</sup> の濃度増加と共に Na<sup>+</sup> の吸収が増加し、一方で Cs<sup>+</sup> 吸収は抑制された。このことから、圃場で見られた現象は、植物体内の Na<sup>+</sup> 量によることを確認した。

次に、体内の Na<sup>+</sup> 量によって変動する遺伝子が、Cs<sup>+</sup> 吸収へ寄与すると考えたことから、RNA-seq により輸送体遺伝子の発現を網羅的に解析するため本共同研究を進めた。異なる Na<sup>+</sup> 条件下でイネ野生型株と *hkt2;1* 株での RNA-seq から Cs<sup>+</sup> 輸送へ寄与する新規輸送体の候補を絞り込むことができています。

本研究により、Cs<sup>+</sup> 吸収機構における K<sup>+</sup> と Na<sup>+</sup> の両条件の重要性を明らかにし、作付け前の栽培元素環境の調査への新たな指標の提示や Na<sup>+</sup> による土壌環境改良方法などの応用へ繋げるための基礎的知見を得たい。



菅野 里美 (名古屋大学高等研究院)  
古川 純 (筑波大学アイソトープ環境動態研究センター  
生命環境系)  
李 晨煜 (筑波大学大学院理工情報生命学術院)

共同研究先：中村 進一 (生命科学部)  
田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)



## 有機栽培水田の微生物叢による水生植物の形態形成制御に関する研究

有機農業は化学農薬や化学肥料の節減を通じて脱炭素に直接的に寄与し、かつ環境保全に貢献することから、農業分野において目指すべき目標の一つである。我が国の最重要作物であるイネ生産においても有機栽培が重要である。イネ有機栽培技術として様々な技術が併用されるが、古くからの農家の口伝伝統技術として、浮遊性の水生雑草ウキクサの利用がある。ウキクサを水面に繁殖させ光遮断することで、除草効果、窒素固定効果、水質浄化効果などが得られるのみでなく、イネ有機水田のキーとなるトロトロ層の醸成にも寄与すると考えられ、これらを通じてイネの生育促進、病害虫・雑草からの保護、環境浄化など多面的機能を有する(図1)。これらにはウキクサだけでなく、周縁環境の微生物叢も関与すると想定されるが、それらが具体的にどのように多面的機能を発揮しているかに関する科学的知見は乏しい。そこで、

有機栽培水田におけるウキクサ・微生物叢・イネの3者間相互作用の解明に取り組んでいる。

有機栽培水田の微生物を用いて、無菌ウキクサを生育させたとき、ウキクサ根などの形態変化があることを見出した(図2)。本研究では、無菌ウキクサに微生物を共生させてからの経時的に変化する共生微生物叢と合わせて、共生微生物に応答して形態が変化するウキクサ側の経時的な遺伝子発現にも焦点をあてた解析を行っている。これらの解析により、有機栽培水田における微生物がウキクサに共生した際に観察されるウキクサの形態変化と、共生微生物叢・ウキクサ応答遺伝子動態を記録した分子関連カタログの作成を試みている。さらに応用として、水生植物の生育促進に効果的な水中共生微生物を同定・単離することを目指す。

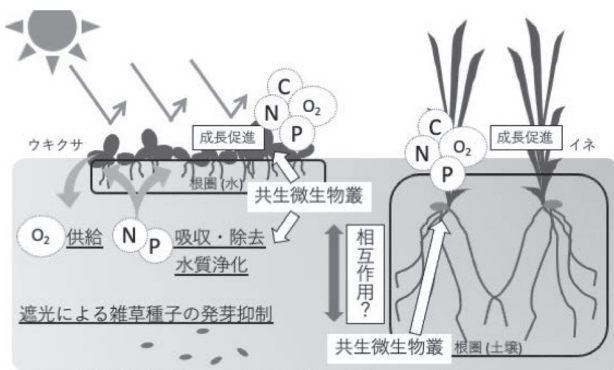


図1 有機栽培水田におけるウキクサの役割



図2 ウキクサに微生物を共生させると根の形態が変化する

吉田明希子 (東京農工大学農学府)

共同研究先: 山本 紘輔 (生命科学部)

田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

## 伝統的壺造り純米黒酢醸造の安定性を、 黒酢由来酢酸菌の NGS 解析で理解する

鹿児島県霧島市福山町では、伝統的手法による壺作り純米黒酢醸造が行われている。本黒酢醸造においては、蒸し米と地下水と麴が壺に仕込まれ、その後は人の手が大きく加えられることはなく、壺内で糖化、エタノール発酵、酢酸発酵が順次進行していく（図）。

仕込み時に麴（混ぜ麴と、やや乾燥度が高く仕込み後に発芽して全体の蓋の役割を果たす振り麴）が添加される以外は、人為的な植菌が一切行われなにかかわらず、麴菌や乳酸菌、酵母、酢酸菌が順次出現、優占化し、きわめて安定的に発酵が進行する。なお、振り麴は発酵開始当初は上述の通り蓋の役割を果たし、結果として雑菌汚染が防止されているが、発酵が進み酢酸発酵が旺盛に進行するような時期になると、発酵液中に沈み込む。この時期になると、麴に代わり酢酸菌の菌膜が発酵液表面を覆うようになる。（余談となるが、肉眼でも見える発酵液表面のこうしたダイナミズムは、微生物を扱うものを虜にってしまう。）

さて、発酵に関わる菌のうち、酢酸菌は壺の内壁に定着し「壺付き酢酸菌」とも呼べる菌に由来することを、我々はこれまでに明らかにしている。壺内壁や初期の発酵液中には様々な種の酢酸菌が見られる。しかしながら、酢酸生成期以降は *Acetobacter pasteurianus* が優占化すること、さらに、人為的に他の酢酸菌種 (*Acetobacter aceti*) を壺に添加しても、*A. pasteurianus* が優占化すること、も我々は示してきた。

このように頑強な *A. pasteurianus* の出現および優占化が安定的な黒酢醸造の基盤となっていると考えられる。なお、これまでに我々は、黒酢由来 *A. pasteurianus* 株（以下、黒酢株）の性状を詳細に解析してきており、黒酢株あるいは *A. pasteurianus* 特有の性質のうち、以下の A～D で述べる事柄が上記優占化に関わるのではないかと着目している。

- A) 酢酸発酵液中に蓄積するエタノールや酢酸に対し、*A. pasteurianus* は *A. aceti* よりも有意に高い耐性を示す。
- B) 乳酸菌との共培養下において、黒酢株は *A. pasteurianus* 標準菌株と比べても高い生育能を示す。また、一般的に乳酸菌はバクテリオシンを分泌することが知られているが、その感受性に関連する遺伝子領域を黒酢株は欠失していることが予備実験で示唆されている。
- C) 黒酢株は *A. pasteurianus* 標準菌株と同様にグリセロール資化経路遺伝子を保存しているにもかかわらず、グリセロール資化能を特異的に欠いている。
- D) 仕込み前の壺は、乾燥状態で長期間置かれ、特に夏場は屋外で太陽光による高温下にさらされるなど、菌の生存には適さない条件にある。一方で黒酢株は、*A. pasteurianus* 標準菌株と比べて高い高温・乾燥耐性を有することを我々は見出しており、これは黒酢醸造の壺内壁での生存に有利な形質であると考えられる。

本課題では、黒酢株のゲノムシーケンシングおよび RNA-seq により、上記 A)～D) について、何故そうなのかを明らかにしていく。さらに得られる事実や推定事項をもとに、黒酢発酵液中で *A. pasteurianus* が高い再現性で出現し、優占化する機構を解明し、さらに、黒酢株に特有の性質が安定的な酢酸発酵の進行に寄与していることの検証を通し、伝統的壺造り純米黒酢醸造が安定的に成立するメカニズムの理解を目指している。

なお、NGS 解析で得られたデータは、発酵液中の化合物への耐性や他種微生物との共生能力など、酢酸菌の発酵・代謝能力と結びつけた深い洞察が必要となる。そこで、東京農業大学生命科学部川崎教授との共同研究を通して、課題解決を図っている。

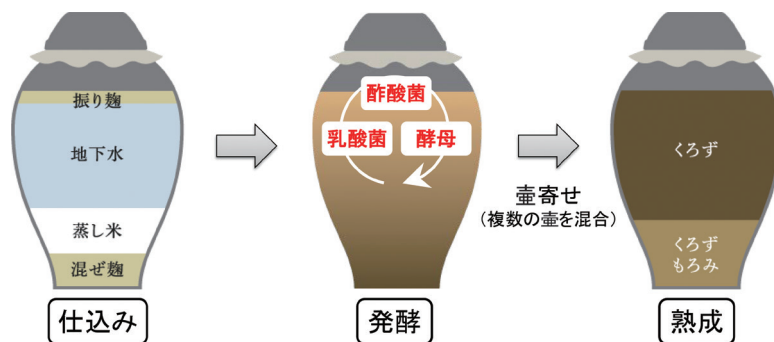


図 伝統的壺造り純米黒酢の醸造過程。壺内で各種微生物により糖化、エタノール発酵、酢酸発酵が進行する。坂元醸造 HP をもとに改変。

## 施肥条件の異なる酸性土壌における植物と根圏微生物叢の応答と関連性

酸性土壌は世界の耕地可能面積の約5割を占め、日本や東南アジアなど経済的貧困国にも広く分布する問題土壌である。そこでは主にアルミニウム (Al) 過剰障害による作物生産性の著しい低下に加え、養分過剰欠乏も生じるため、生産性維持のための大量施肥が必要となるが、資源消費、高コスト化が問題となっている。また、今後の気候変動や過剰な施肥により今後も土壌の酸性化は進むと考えられている。

このようなことから、省エネルギーによる持続可能なバイオマス生産・増産を目指し植物の Al ストレス耐性および品種改良に関する研究が世界中で活発に行われてきた。これまでに、Al に応答した有機酸トランスポーターを介した根圏への有機酸分泌による Al 排除に関する分子メカニズムが明らかにされている (図1)。この有機酸分泌は、作物の Al 耐性と間に強い相関があるため重要な農業形質となっている。また、植物種によって主要な Al 応答性分泌有機酸の種類は異なる。一方で、有機酸分泌は、植物の病害抵抗性に関わる有用微生物の誘引にも関わる (図1)。有機酸以外にも多様な根分泌物や土壌栄養条件は、ストレス耐性や栄養獲得に貢献する根圏の微生物群集の構造に影響を与えることは理解されている。しかし、その微生物叢は農業的に重要であるにもかかわらず、酸性土壌耐性に関する栄養環境、植物応答、

根圏微生物叢の間の関連性の知見は限られている。

一般的に、酸性土壌には  $\text{CaCO}_3$  を含む苦土石灰、炭カル、生石灰や  $\text{CaSO}_4$  を主成分とするジブサム (石膏) が施される。 $\text{CaSO}_4$  は、 $\text{CaCO}_3$  のような強い酸性矯正力はないが、Ca や S の植物への供給により酸性土壌での生育改善に効果があるとされるが、その原因分子は明らかにされていない (図2)。そこで、本研究では酸性土壌における、栄養環境-植物-根圏微生物叢の間の関連性を明らかにすることとした。 $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{CaSO}_4$  またはその組み合わせの施肥条件において、クエン酸分泌型ダイズ、リンゴ酸分泌型コムギ、シロイヌナズナおよびシュウ酸分泌型ホウレンソウを用いて根圏微生物叢の解析を試みる。メダゲノム解析により分泌有機酸や耐性レベルが異なる植物の根圏微生物叢の構造を解析する。また、植物のトランスクリプトーム解析や元素分析、根圏と植物のメタボローム解析も合わせ、植物の応答解析も行うことで、それら栄養環境-植物-根圏微生物叢の関連性を明らかにする。

根の微生物叢は生態学的、農業的に重要であるにもかかわらずその形成要因はまだ十分に理解されていない。本研究により、遺伝子型の間や施肥環境間で微生物群集構造の差異を見出すことができれば、植物の酸性土壌耐性との関連性について普遍化されることが期待される。

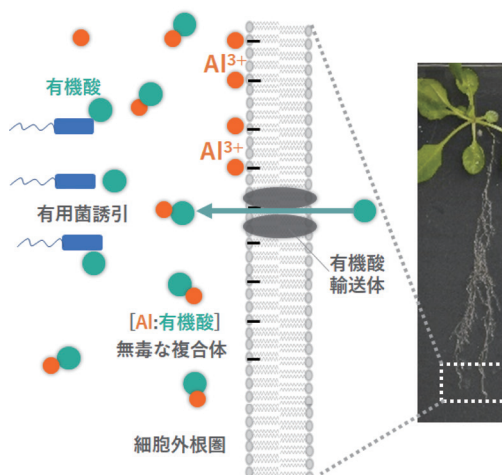


図1 根部で発現する有機酸輸送体を介した根圏への有機酸分泌による Al 無毒化または有用菌誘因

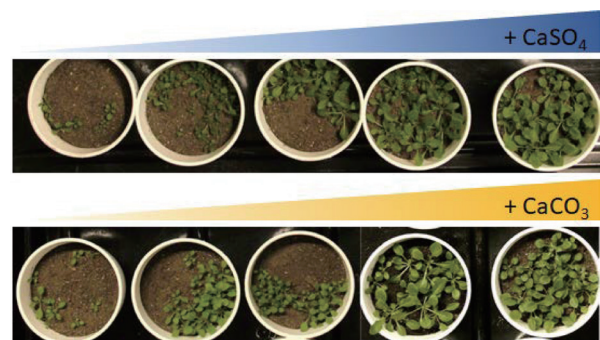


図2 酸性土壌における  $\text{CaSO}_4$  または  $\text{CaCO}_3$  添加によるシロイヌナズナの生育改善



## 植物の貧栄養環境適応を左右する共生細菌の比較ゲノム解析

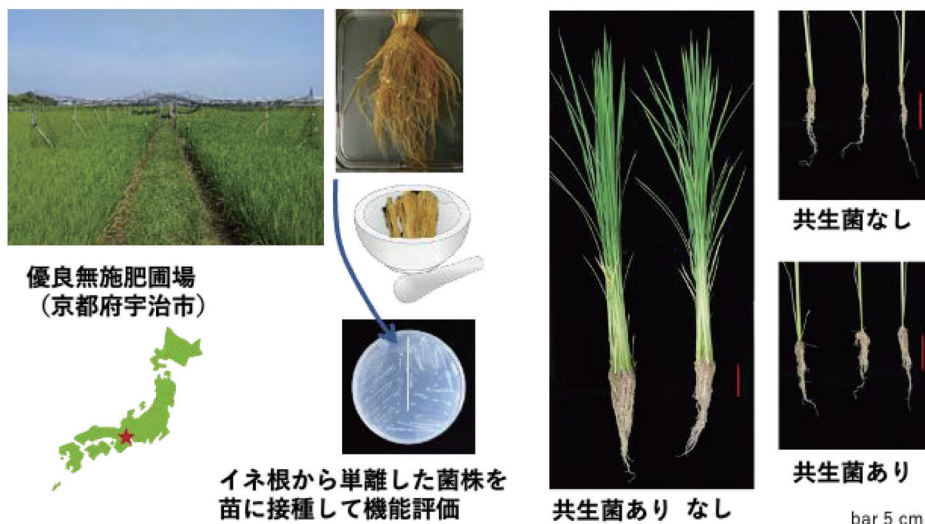
植物は組織内に多様な微生物集団（微生物叢）を宿しており、環境変動に応じてその組成や機能性を変化させて環境適応を進めている。植物の生存・生育に寄与する微生物叢は、環境調和型の農業技術のシーズとしても注目され、メタ DNA シーケンス解析によるプロファイリングや構成菌株の単離は盛んに進められている。しかしながら、大多数の生理機能や動態は依然として不明である上、宿主植物による共生制御メカニズムは不明な点が多い。

植物は成長に必要なリンや窒素などを土壤から吸収する。リン欠乏環境において、根系の形態変化やリントランスポーターの発現など、一連のリン枯渇応答（Phosphate Starvation Response; PSR）を誘導してリン吸収・利用効率を向上させるとともに、微生物共生を推進して適応を図る。私たちは、シロイヌナズナの主要 PSR 制御因子の欠損変異体が、リン欠乏環境のみならず栄養十分土壤においても生育が著しく阻害される一方で滅菌土壤では生育が回復することを見出した。したがって、PSR 制御因子は共生菌の感染制御にも寄与していると推察された。そこで、アブラナ科植物の根から単離した共生細菌株の中で、シロイヌナズナへの接種試験により、野生型とは共生可能ながら PSR 欠陥変異体で生育阻害をもたらす菌株を複数同定した。これらは、宿主の PSR 経路に

よって感染が制御されている共生細菌であり、植物の免疫系と栄養欠乏応答のシグナル統合機構に迫る上で有用なリソースになることが期待される。

イネにおいても、長年にわたって無施肥でありながら高収量を誇る優良無施肥圃場で成立する共生微生物叢の実態や機能性に関して解明を進めている。4 年間にわたる共生微生物叢のメタ DNA 解析から同圃場に特徴的で貧栄養土壤環境への適応に資すると考えられるマーカー細菌グループを特定するとともに、同圃場で栽培したイネ根より単離した細菌株から複数のイネ成長促進菌株を得ることができた。続いて、同属近縁種も含めてイネへの接種効果が異なる様々な共生細菌も単離し、イネ共生細菌の比較機能解析を進めている。

そこで、本支援により、上記のシロイヌナズナ・イネ共生細菌株 30 株のゲノム配列情報の解読・アセンブリを行い、現在、比較ゲノム解析や共生遺伝子基盤の推定も進めている。その過程で Twist Bioscience の多検体用のライブラリ調製キット「Twist 96-Plex Library Prep Kit」を用いたハイスループットライブラリ作成と本プラットフォームにおける NGS を組み合わせ、多検体のゲノム解読を同時に進める手法の有効性を確認することができた。今後、共生のゲノム基盤に関する情報を得て上記の研究や応用展開を加速化したいと考えている。



## 藍藻普遍的な細胞外多糖合成転写制御機構の探索

酸素発生型光合成をおこなう原核生物である藍藻（シアノバクテリア）は、淡水、海水、温泉、陸上といった幅広い環境に生息し地球環境を支えている。多くの藍藻は自然界においてブルーム（水の華、アオコ）や群体、微生物マットなどの多様なバイオフィルムを形成している。これらの藍藻バイオフィルムは藍藻自身のストレス耐性に寄与するだけでなく、環境中の藍藻以外の微生物の住処や栄養源としての役割もあると考えられている。そして、藍藻バイオフィルムの主要構成要素の1つが細胞外多糖（EPS）である。つまり、藍藻 EPS は生態において重要な役割を果たしているといえる。また、藍藻 EPS には有用性が期待されているものがある。これらの多面的な重要性にも関わらず、藍藻 EPS の合成と制御に関わる遺伝子やメカニズムの多くは未解明であった。その主な理由としては、遺伝学的研究が容易なモデル藍藻種の中で EPS 生産株が限られていること、藍藻ゲノム上で EPS 合成関連遺伝子がクラスターを形成せず散在している場合が少なくないこと、1 種に複数の EPS 合成系が存在することなどが挙げられる。そのため、まずは特定の藍藻 EPS の合成に関わる遺伝子群を網羅的に同定することが重要であった。

藍藻には非常に多様な EPS が存在するが、その中でも特に藍藻に特徴的なものが硫酸基で修飾された多糖、硫酸多糖（硫酸化多糖とも言う）である。硫酸多糖は動物や真核藻類によく見られるが、バクテリアにおいては藍藻以外ではほぼ見られない。一方で、藍藻には多様な硫酸多糖が EPS として存在しており、その中には群体などの形成に関わるものが知られている。我々は近年、モデル藍藻の 1 種である *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下 S.6803）が新規硫酸多糖シネカンを蓄積して細胞凝集塊を液面に形成することを発見し、シネカンの合成と制御に関わる遺伝子群 *xss* を網羅的に同定した<sup>1,2</sup>（図 1）。ま

たシネカン合成はセンサーヒスチジンキナーゼ XssS とレスポンスレギュレーター XssR からなる二成分制御系の制御下にある転写制御因子 XssQ が一部の *xss* 遺伝子の転写を制御することにより調節されていた。

*xssQ* は藍藻特異的な遺伝子であり多くの藍藻種に保存されていた。そして興味深いことに、硫酸多糖を持つと推測される藍藻種において *xssQ* ホモログは *xssS*、*xssR* ホモログとセットで保存されているのに対し、非硫酸多糖を持つと推測される藍藻においては *xssQ* ホモログだけが保存されている傾向が見られた。また、後者においてはゲノム上に複数の *xssQ* ホモログが存在し、それぞれ異なる二成分制御系と遺伝子クラスターを形成している種が存在した。これらのゲノム情報から我々は XssQ が藍藻普遍的な多糖合成転写制御因子でありつつ、その入力に相当するシグナル感知 / 伝達系と出力に相当する EPS 合成系が多様化した可能性を考えている（図 2）。本研究では、上記 XssQ のような藍藻に広く保存され EPS 合成制御への関与が推測される遺伝子に着目し、その変異体の RNA-seq 解析を手掛かりとして藍藻普遍的な EPS 合成制御機構の探索を目指す。

近年、藍藻硫酸多糖は有用物質として注目されており、代表例である国産藍藻スイゼンジノリが作る硫酸多糖サクランは既に化粧品材料などの形で産業利用されている。また光合成生物である藍藻とその生産物は低炭素社会実現や SDGs 達成の手段としても期待されている。藍藻 EPS の合成制御機構の解明は生理や生態の理解だけでなく EPS 大量生産等の応用研究にも繋がると考えられる。

- 1) Maeda et al., 2021, *eLife*, 10:e66538.
- 2) <http://www.res.titech.ac.jp/news/research/202210.html>

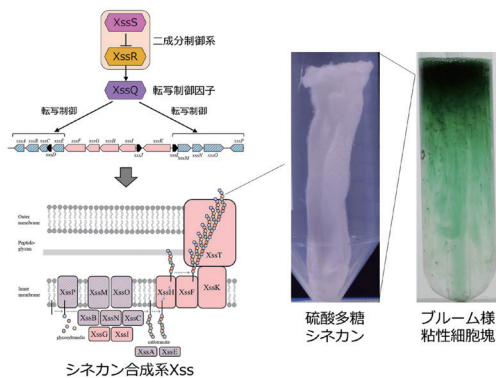


図 1 S.6803 の硫酸多糖シネカン合成制御系

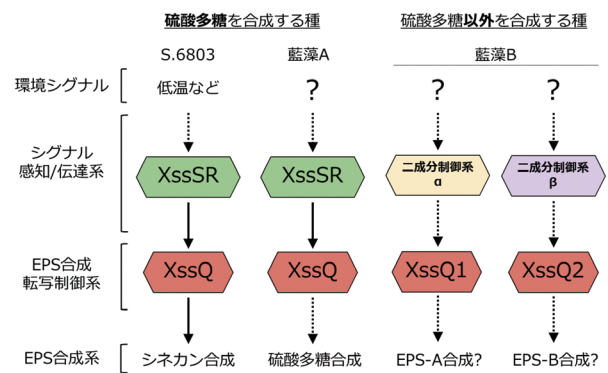


図 2 XssQ を介した藍藻 EPS 合成制御の仮説モデル



## 天蚕糸と同等の緑色絹糸を生産する遺伝子組換え家蚕・柞蚕の開発

天蚕（ヤマムユガ, *Antheraea yamamai*）は、日本固有の遺伝資源であり、天蚕の繭から生産される天蚕糸は、独特の光沢を有する青緑色の色彩をもち、「繊維のダイヤモンド」と称される（図1）。採算に合うスケールでの大量飼育が可能な吐糸性昆虫のうち、天蚕糸のような色彩を有する糸を作る昆虫は、ヤマムユガにおいて他に存在しない。ところが、天蚕飼育は、稚蚕を人工飼育して齢を重ねたのちに野外放飼育する、という体制を取ることが多く、そのために作柄が安定しないという脆弱性を抱えている。ゲノム編集技術を用いて、屋内飼育が可能なカイコ（*Bombyx mori*）や、あるいは天蚕と同じヤマムユガ科に属しつつも天蚕よりも飼育が容易なサクサン（*Antheraea pernyi*）に、天蚕糸と同等の緑色絹糸を生産

させることはできないか、と考えたことが、本研究の出発点である。

しかしながら、我々が天蚕について知り得た情報は少ない。ゲノム配列ですら、2018年に韓国のグループが決定しているものの（Kim et al., 2018）、そのN50は73Mbp、配列数は7723であり、染色体スケールとはほど遠い状態である。天蚕糸を作る遺伝子組換えカイコ、サクサンを作出するという目標を達成するため、まずは染色体スケールの天蚕ゲノムアセンブリを構築することにした。本研究では、National BioResource Project カイコ（野蚕）より分譲を受けた天蚕1個体より高分子DNAを精製し、ロングリード、ショートリードによるハイブリッドアセンブリに加え、Optical genome mapping および Hi-C sequencing による scaffolding をおこなった。その結果、染色体数と等しい配列数を有するゲノムアセンブリが構築できた。

天蚕は、屋内で飼育すると黄色の繭を作り、屋外で飼育すると青緑色の繭を作ることが知られている。また、青色LEDを使用すれば、屋外で飼育した場合と同様、天蚕は青緑色の繭を作ることが明らかになっている（図2）。青色LED下で飼育した個体の絹糸腺と通常の屋内飼育の個体の絹糸腺と比較トランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、青色LED下飼育の個体の絹糸腺において100倍以上高発現している転写物を発見した（図3）。この遺伝子をカイコ、あるいはサクサンの絹糸腺において強制発現することができれば、カイコやサクサンに天蚕糸を作らせることができるのではないかと。現在は、この遺伝子の詳細な機能解析を進めるとともに、カイコ・サクサンをレシピエントとしたトランスジェニック系統の作出を試みている。



図1 天蚕糸の色合い

比較対象として、天蚕と同じくヤマムユガ科に属するムガサン（*Antheraea assamensis*）のシルクを右側に示す。



図2

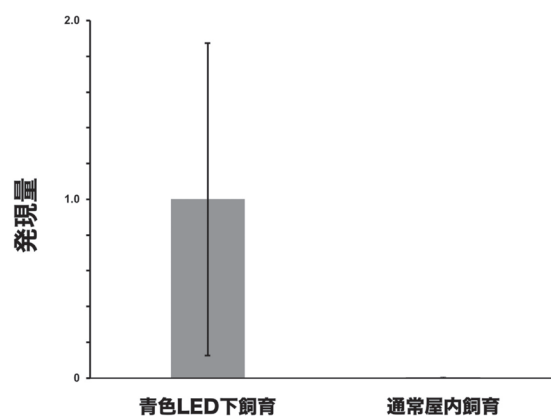


図3



## 農産現場の課題克服を加速する栽培土壌の微生物叢 および化学特性の試験系検討

土壌微生物叢の把握と制御は農作物の生育や品質の向上に貢献することが期待されるが、個々の圃場ごとに微生物叢を制御する手法は確立されていない。個々の圃場で最適な微生物叢制御を行うには、①地質や気候、栽培方法、施用する肥料・農薬・資材といった各因子と微生物叢の構成および作物の収量や品質との関係性を把握し、②微生物叢をコントロールする手段を導入することが求められる。土壌微生物叢の人為的改変には微生物ごとの活動を調節する有機物の添加が有用であるが、腐植酸、糖、有機酸、アミノ酸、植物二次代謝物などの各種有機物の土壌への添加が微生物叢の構成に与える影響は体系的に整理されていない。一方で、それらの有機物や無機物のうち植物の生理状態を改善する機能をもつものは、バイオスティミュラント（BS）と呼ばれる農業資材としての活用が拡大している。BSの活用は、2021年に農林水産省が策定した「みどりの食料システム戦略」においても、気候変動への適応や化学肥料・化学農薬の削減に資する農業資材として取り上げられており、次世代の農業において欠かせない手段となることが見込まれる。

当社は、土壌改良効果や植物免疫賦活作用のあるBSの開発に取り組んでいる。また、土壌微生物叢解析に基づいて個々の圃場に適したBSの施用を提案する土壌改良手法の確立を目指しており、本研究ではその初発段階

として、BS資材の施用による土壌微生物叢への影響を解析する試験系を検討する。近年、アミノ酸や海藻抽出物を含むBS資材に関しては、土壌微生物叢の応答に関する調査が行われたものの、その他のBS成分に関する調査は報告例がない<sup>1)2)</sup>。本研究では、根張りの向上など、植物の生育促進効果のある微生物由来の抽出物を含むBS資材<sup>3)</sup>をモデル資材として選定し、次世代シーケンサーを用い、細菌叢の網羅的解析に用いられる16S rRNA遺伝子をターゲットとしたアンブリコンメタゲノム解析を計画した。アブラナ科野菜の栽培過程において、BSの施用による土壌化学性への影響を捉えるとともに、土壌細菌叢のメタゲノム解析を実施し、植物の栽培およびBSの施用による培土の細菌の $\alpha$ 多様性、 $\beta$ 多様性への影響や、存在比が変動する細菌種を明らかにすることを旨とする。

### 参考文献

1. Marta Acin-Albiac, *et. al.*, *Agriculture* 2023, 13(2), 344
2. Eve Hellequin, *et. al.*, *Sci. Rep.* 2020, 10, 13727
3. アサヒビール株式会社, 北川 隆徳, 他, 根伸長促進剤及びその製造方法, 特開 2005-333980, 2005年12月8日

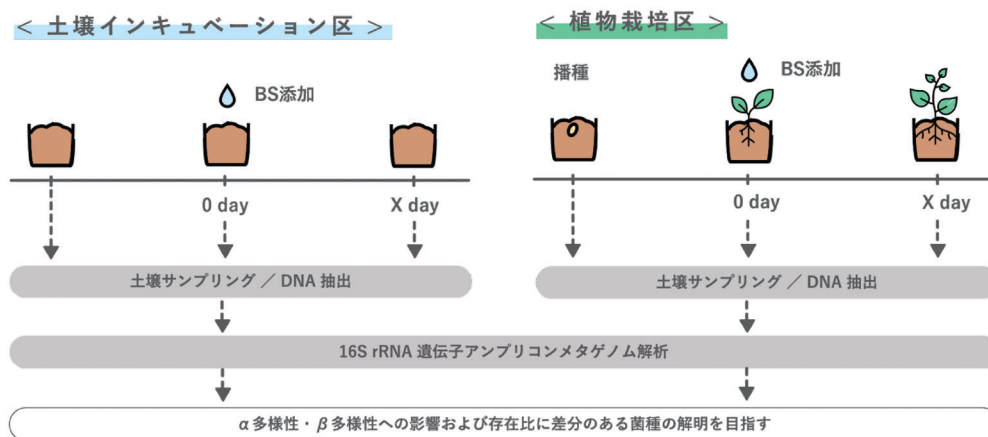


図 バイオスティミュラント（BS）の施用が土壌細菌叢に与える影響の評価

## コリネ型細菌における RNase J 欠損により引き起こされる芳香族アミノ酸代謝変化の解明とその植物二次代謝産物生産への応用

植物が生成する二次代謝産物は、多様かつ様々な生理機能を有する点で、産業的に利用価値が高い化合物群である。一方で、植物での大量生産を考えると、混合物として生産される、生産量が微量である、植物の生長に時間がかかる、といった課題を有している。これら課題を克服する手段の一つとして、微生物による生産が考えられる。本研究における最終目標は、微生物での効率的な植物二次代謝産物の生産技術を開発することである。

微生物での植物二次代謝産物生産の実現には、その代謝経路の機能的な構築に加え、生物毒性の高い植物二次代謝産物に対して耐性を有する宿主の活用が重要となる。代表的なコリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* は、1956年に発見されて以来、長い研究の歴史を持つ細菌である。2003年にゲノム情報が明らかにされ、それを発端に、代謝制御機構に関する報告が多くなされてきた。また、コリネ型細菌は、植物二次代謝産物に多く見られる芳香環を有する化合物に対して潜在的に強い耐性を有しており、本研究における生産宿主として適した特徴を持っていた。そこで、コリネ型細菌を生産宿主に、植物二次代謝産物の生産モデルにフェニルプロパノイド類を選抜し、研究を開始した。

フェニルプロパノイド類は、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr) から数段階の反応を経て生成される。そこで、目的達成の第一歩として、コリネ型細菌で効率的に Phe、Tyr 生産可能な組換え株の構築を試みることにした。二つの芳香族アミノ酸のうち、溶解度の点から操作性に優れていた Phe を最初の標的とした。まず、芳香族アミノ酸合成を担う酵素のフィードバック制御に関する研究の進んでいる大腸菌からフィードバック制御が解除された酵素遺伝子 (*aroH*,

*pheA<sup>FBR</sup>*) を調達し、コリネ型細菌で機能的に発現させるとともに、シキミ酸経路の強化および枝分かれの遮断を施すことで、Phe を生成する組換え株を構築した。ついで、副生する Tyr の炭素流量を Phe に向かわせるべくプレフェン酸脱水素酵素の不活化を試みたところ、サブレッサー変異株が出現した。これを受けて、いくつかのサブレッサー変異株を単離するとともに変異箇所の同定、Phe 生産の評価を行った。その結果、RNase J に不活化の変異が蓄積した株で顕著な Phe 生産の亢進が確認された。その後、ビルビン酸代謝周りの改変を行うことで、比較的高い収量の Phe 生成可能な組換え株を構築するに至った。

ついで Tyr 生産株の作製に着手した。まず、上述の研究で得られた知見である RNase J 不活化が Tyr 生産に及ぼす影響を調査した。Tyr 生産は、代謝制御発酵の戦略で構築された Phe 生産変異株が持つ遺伝子 (*aroG<sup>FBR</sup>*, *csm<sup>FBR</sup>*) を高発現させることで行った。その結果、RNase J の欠損は、Tyr 生産にも有効であることが明らかになり、加えて、シキミ酸経路の中間体である 3-デヒドロシキミ酸、シキミ酸の蓄積を減少させる効果があることが見出された (図)。この結果は、シキミ酸経路を構成する酵素遺伝子の転写産物の安定性に RNase J が関与していることを強く示唆していた。現在、さらなる生産の効率化のための代謝工学を試みている。

上述の結果を受けて、本共同研究では、RNase J 欠損株とその親株の発現解析を行うことで、RNase J の欠損と芳香族アミノ酸代謝制御機構の関係を明らかにしたいと考えている。また、得られる知見を活用することで、コリネ型細菌による植物二次代謝産物の効率的生産を実現したい。(FBR: feedback resistant)

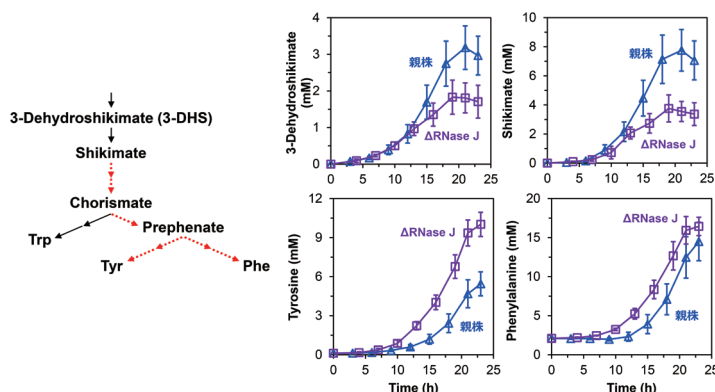


図 コリネ型細菌における RNase J の欠損が芳香族アミノ酸代謝に及ぼす影響

RNase J の欠損により、親株と比較して、3-デヒドロシキミ酸・シキミ酸の生成が減少する一方で、芳香族アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe)・チロシン (Tyr) の生成が亢進した。これらの結果は、左に示す代謝経路の中でも、破線部の化学反応を触媒する酵素をコードする遺伝子の転写産物が RNase J の支配下にあることを示唆していた。

## 葉緑体で生成する活性カルボニルによる プログラム細胞死開始メカニズムの解明

葉緑体では光照射下で恒常的に活性酸素種（ROS）が生成しており、環境ストレス条件では ROS 生成が増大する。ROS は葉緑体からのレトログレードシグナルとして核ゲノムに作用し、ストレス耐性関連酵素などさまざまな遺伝子の発現制御に関わるとされている。しかし、葉緑体内で生じた ROS（とくに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と <sup>1</sup>O<sub>2</sub>）のシグナルが核に伝えられる仕組みはほとんど未解明である。

我々はこれまでに、植物において ROS が引き起こす細胞応答（ストレス障害やホルモンシグナル伝達）には、ROS がつくる過酸化脂質の分解産物であるアクロレインなどの α, β-不飽和アルデヒド類（活性カルボニル種；RCS）が関与することを明らかにしてきた。本研究では、RCS が葉緑体レトログレードシグナルを担う化学的実体である可能性を検証する。

シロイヌナズナの変異株 *crl* は、葉緑体へのタンパク輸送複合体形成に関わる CRUMPLED LEAF (CRL) タンパクの欠損により、葉緑体の巨大化（分裂不全）と、光照射下での葉の局所細胞死（local cell death; LCD）を示す。すなわち *crl* 株の葉で見られる LCD は葉緑体レトログレードシグナルが誘発するプログラム細胞死であり、不全葉緑体で生じる ROS またはそれによる酸化生成物がレトログレードシグナルの実体であると推定されている。近年、*crl* の LCD を相補する変異として *fad5* が同定され

た。FAD5 タンパクは葉緑体に局在し、モノガラクトシルジアシルグリセロールの *sn*-2 位の 16:0 脂肪酸を不飽和化する酵素である。*fad5* 欠損により葉緑体の C<sub>16</sub> 不飽和脂肪酸（C<sub>16</sub>PUFA）含量は低下し、*crl-fad5* 二重変異株は LCD を示さない。これは、C<sub>16</sub>PUFA またはその代謝産物が葉緑体レトログレードシグナルとして LCD を誘発したことを示す（図）。我々は、網羅的アルデヒド分析によって、LCD が誘発される *crl* 株は LCD を生じない *crl-fad5* 株に比べて RCS レベルが有意に高いことを最近見出した（未発表）。ここから、RCS がレトログレードシグナルの実体であるとの可能性を検証するため本拠点共同研究を提案した。本研究では、光照射下で LCD が生じる *crl* 株、生じない対照株（*crl-fad5*、野生株、*fad5* 単独欠損株）での光照射初期の RNAseq 解析から、*crl* 株の LCD 開始に特異的に関与する遺伝子群を特定する。植物への RCS 投与により、これらの遺伝子が発現誘導され、LCD が誘発されれば、RCS のレトログレードシグナルとしての作用の立証となる。また RNAseq と並行して RCS 修飾プロテオミクス及びアルデヒドメタボロミクスを行い、これらの統合から、「葉緑体での ROS 生成→RCS 増大→標的タンパク質修飾→細胞死プログラム発動」の過程を記述する。

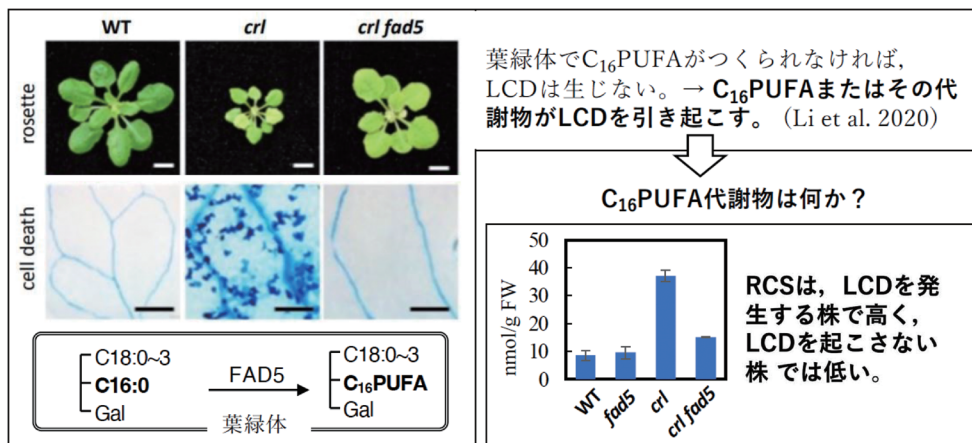


図 *crl* 株の葉に局所細胞死を誘発する葉緑体レトログレードシグナル（RGS）に活性カルボニル種が関与する可能性



## イネの高温ストレス応答に関する転写因子の機能解析

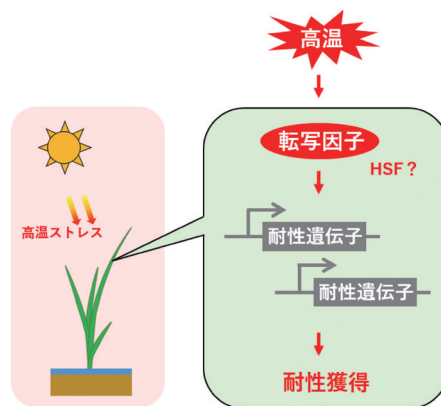
地球規模の環境変動により平均気温の上昇傾向が顕著になっており、世界各地における熱波の発生が毎年のように報告されている。また、熱波による高温ストレスに起因した様々な作物の被害も報告されている。イネ、トウモロコシ、コムギ、牧草類などの主要作物を含むイネ科植物においても高温障害は問題になっており、高温ストレス耐性機構の理解や、高温ストレス耐性作物の開発が求められている。

植物は高温ストレスに対して、個体レベルから細胞レベルまでのいくつかのレベルで応答し、対応している。個体レベルの応答としては、気孔開度を高め、蒸散を盛んにすることで葉面温度を低下させる高温ストレス回避機構が知られている。一方で、細胞レベルの応答としては、ヒートショックタンパク質（HSP）や活性酸素除去酵素群といった耐性タンパク質がつくられ、個々の細胞の高温耐性が上昇する高温ストレス耐性機構が知られている。ここで鍵となっているのが、HSP や活性酸素除去酵素群をコードする遺伝子の発現である（図1）。ストレスに応答した遺伝子発現は、ストレスの種類によって特異的に機能する転写因子が担っているが、高温ストレスにおいては、熱ショック転写因子（HSF）が、高温に応答して耐性遺伝子の発現を活性化させる機能を持ち、植物の高温耐性において中心的な役割を担っている。HSFは酵母や動物を含めた真核生物で保存され高温ストレス応答に機能しているが、酵母や動物が HSF を 1 個ないし数個持つのに対し、植物は HSF を 20 個以上持っている。それぞれが機能的に分化していると考えられるため、各植物において重要な HSF を同定することが重要である。

我々は、イネにおいて鍵となる HSF の候補を見出し、機能解析を行っている。これまでに組織局在性や細胞内局在性、高温誘導性などの基礎的なデータの他、転写活

性や翻訳後調節に関するデータを得ており、その重要性が示唆されている。一方で、イネ植物体の高温ストレス応答におけるこの HSF の役割はまだ明らかにできていない。これまでに、ゲノム編集によってこの HSF の突然変異体を作成し、一部の遺伝子を用いた発現解析から、この変異体では高温誘導性遺伝子の発現が低下している可能性を示した。そこで、本共同研究では、野生型とこの変異体における遺伝子発現を網羅的に比較し、イネの高温ストレス応答におけるこの HSF の役割を明らかにすることを目的とした。実験方法としては RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行って、通常条件および高温ストレス下で、野生型と変異体で発現が変化した遺伝子を見出す。発現が変化した遺伝子に対し、GO エンリッチメント解析によって、この HSF が通常の生育時や高温ストレス時にどのような遺伝子を標的にしているのかを明らかにする。以上から、この HSF の高温応答における寄与度、さらにはこの HSF が制御する下流遺伝子の種類やプロモーター配列の特徴などを明らかにする。また、得られたデータを参考にして、候補 HSF 突然変異体の高温ストレス耐性等の表現型を解析する。以上の解析から、今回着目した HSF のイネにおける高温ストレス応答やそのほかの生理学的プロセスにおける機能を明らかにしたい。

本研究の結果、着目した HSF の高温ストレスにおける役割や制御している下流遺伝子が明らかになれば、HSF による高温応答性遺伝子の発現制御機構の解明が進むことが期待できる。また将来的には、一連の研究によって明らかにした HSF あるいはその制御系をゲノム編集などの技術を用いて改変することで、イネ科作物の高温耐性を高めることが期待できる。



イネには 20 個以上の熱ショック転写因子（HSF）が存在するが個々の標的遺伝子は明らかになっていない

図1 植物の細胞レベルの耐性獲得機構における転写因子の役割

## コオロギの休眠制御機構の解明とその応用

昆虫を含む多くの無脊椎動物は冬のような厳しい環境を乗り切るため、発育を停止した「休眠」という生理状態に入る。この生理状態は、長く厳しい季節を生き延びるのに都合が良い。年に何度も発生する種は、環境条件に応じて休眠に入るか否かを決定する。休眠に入るか否かを自身が決定する昆虫は多いが、母親が決定する昆虫もある。その一つがマダラスズである。

マダラスズは、北海道から九州にかけて見られる小さなコオロギである。長日（日長が長い）条件で育ったメス成虫は、幼虫へと速やかに発育する予定の卵（非休眠予定卵）を産む。一方、短日（日長が短い）条件下で育ったメス成虫は、将来休眠に入る卵（休眠予定卵）を産む。この休眠予定卵は、核が卵の表層に移動して細胞膜を形成した細胞性胞胚期で休眠に入り、発育を停止する。神経も内分泌腺もない「ただの細胞の塊」とも言えるような発育段階で、マダラスズはどのようにして休眠に入るのだろうか？

この謎を明らかにすべく、今回、東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点の支援を受け、マダラスズの休眠予定卵と非休眠予定卵を経時的にサンプリングし、RNA-seq解析を行うことにした。これにより、①母親は将来の胚発生を制御するような特別な RNA を送り込んでいるの

か、②休眠予定卵・非休眠予定卵の遺伝子発現の変化は、いつからどのような形で生じるのかが明らかになる。

本研究は純生物学的な興味からスタートしているが、応用的な展開も見据えている。近年、環境負荷や飼育コストの観点から、食用コオロギが注目されている。この目的で増産されているのは主にフタホシコオロギである。しかし、フタホシコオロギにおける大きな問題は「生体を保存する技術がない」ということである。

植物であれば種子を保存することができる。これは種子が休眠に入っているからである。休眠は長期保存に向く。一方、フタホシコオロギは休眠に入る能力がないため、発育を止めることができない。食用や飼料に適した系統が得られたとしても、高い機能性コオロギが開発できたとしても、その系統を維持するにはひたすら飼育し続けるしかない。そこには莫大なコストがかかる。

本研究によりマダラスズの休眠制御機構を明らかにできれば、フタホシコオロギがなぜ休眠に入ることができないかを明らかにできるのではないか。この知見を応用すれば、フタホシコオロギを人為的に休眠させて、容易にそして簡便に長期間保存できるようになるのではないか。このような展開を見据えて、現在、本研究課題に取り組んでいる。

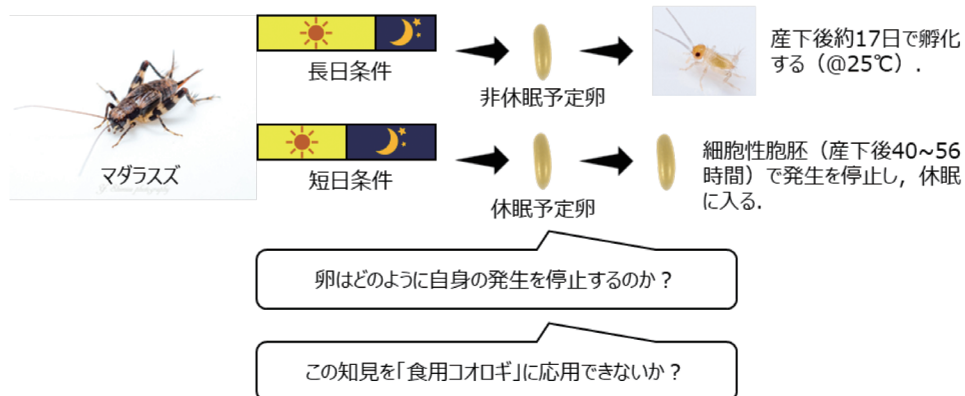


図 マダラスズの休眠制御

後藤 慎介（大阪公立大学大学院理学研究科）  
片岡 孝介（早稲田大学総合研究機構）  
清水 悠太（大阪公立大学大学院理学研究科）

共同研究先： 足達 太郎（国際食料情報学部）  
興石 雄一（生物資源ゲノム解析センター）

## 多検体トランスクリプトーム情報を用いて個体の状態を可視化する

魚病問題は水産養殖産業において避けられない問題であるため、その防除法の研究開発が活発に行われている。しかし、全ての魚病をカバーできる方策は今のところ存在せず、これまでの方策に加えて新たな防除法を模索する必要がある。

一般的に感染症は、

- ① 病原体の標的組織への侵入・定着
- ② 病原体の増殖
- ③ 病原体の宿主免疫系からの回避
- ④ 罹患部位から非罹患部位、または感染個体から非感染個体への病原体の伝播

が繰り返され、感染個体の異常や死亡が認識されることで表面化する（図1）。そのため、魚病発生が表面化した時には、すでに養殖集団全体に蔓延していることも少なくない。しかし、もし感染症発生初期の「病原体の侵入・定着」が高精度に検出できるようになれば、感染個体を含む養殖集団の早期治療や隔離が可能になるため、魚病蔓延を抑制できる。

そこで本研究では魚病発生を非侵襲的かつ早期に検知

する方法を開発することを目標に掲げているが、そのためにはまず、「魚病感染初期」を明確に定義する方法を開発しなければならない。近年、scRNA-seqの一手法であるDrop-seqに類似した構造の3' mRNA-seqライブラリを作製することで、トランスクリプトーム解析が安価（数百円/検体）かつ簡便に行えることが報告された（Alpern et al., 2019）。また、scRNA-seq解析で用いられるUMAP次元削減が、bulk RNA-seqデータに対しても、従来用いられてきたPCAより有効であることが報告されている（Yang et al., 2021）。これらの報告を総合すると、感染組織全mRNA情報を利用してUMAP次元削減を行えば、試験開始後経過時間に替わる、信頼度の高いグループ分け基準が得られると期待される。以上のことから本申請では、感染試験に付した全個体から体液と同時に取り出した標的組織由来トランスクリプトーム情報を多検体mRNA-seqによって取得し、これをUMAP次元削減によりクラスタリングすることで、各個体の病態を分類することを旨とする（図）。

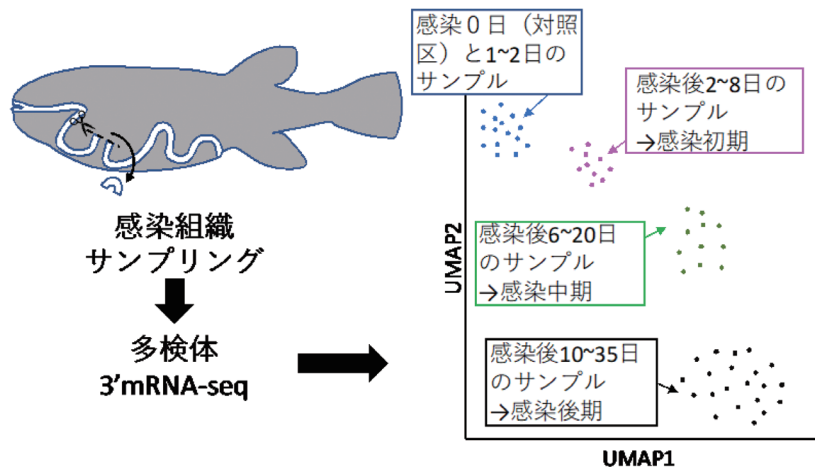


図 本申請の研究の流れ



## 難分解性有機フッ素化合物の代謝・分解を担う 細菌酵素の探索・同定

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) やペルフルオロオクタン酸 (PFOA) を含む有機フッ素化合物 (図1) は、撥水・撥油性という産業的に極めて有用な性質を持つため、泡消火剤、防汚剤等に広く用いられてきた。そのため、河川や海洋に流出して世界規模で汚染が広がっている。有機フッ素化合物は、化学的に非常に安定な C-F 結合を有し、環境中で分解されにくいいため、食物連鎖を介してヒトや野生生物の体内に生物濃縮し、免疫毒性や生殖毒性を引き起こす。したがって、有機フッ素化合物の中でも特に毒性の高い PFOS/PFOA は、製造や使用がストックホルム条約により世界的に規制されることになった。しかし、代替品への転換が難しく、産業製品の生産に依然として使用され、環境汚染は現在も進行している。環境省のモニタリング調査では、地下水や水道水から高頻度・高濃度に検出され、2020 年から水質の要監視項目として PFOS/PFOA の合計の指針値が 50 ng/L 以下と設定された。このような基準値の設定は、PFOS/PFOA の毒性が極めて高く、優先的に浄化する必要があることを強く示唆している。したがって、PFOS/PFOA を環境、そして水道水から取り除くことは喫緊の課題である。

バイオレメディエーションは、生物自身やそれが持つ酵素、すなわち生物機能を利用した汚染物質の浄化方法

の一つで、浄化にかかるコストを低く抑えることができる利点を持つ。しかしながら、PFOS/PFOA は環境中では極めて安定であることから、分解に関わる生物の存在は限られていると考えられる。一方、細菌は環境の変化に応じて様々な遺伝子の発現を活性化することにより、それに対応している。例えば、生育に悪影響のある汚染物質が高濃度に存在する環境下において、汚染物質の分解酵素遺伝子を誘導発現し、無毒な化合物に変換して耐性を獲得する。このような遺伝子発現を変化させることによる環境適応は、細菌が劣悪な環境で生存するために必須である。PFOS/PFOA 汚染環境下でも同様に、これに対抗する遺伝子発現が引き起こされると考えられる。

本研究では、材料として PFOS/PFOA で汚染した河川底質から単離した細菌を用いた (図2)。次世代シーケンス技術により、PFOS/PFOA を分解する可能性がある細菌において発現する遺伝子を網羅的に調べることで、PFOS/PFOA の代謝・分解に関わる遺伝子を探索・同定する。本研究において同定される代謝・分解酵素は、農業用水や水道水の浄化資材としての利用が期待できることから、安全な農作物、安全な水道水の提供を可能にする。

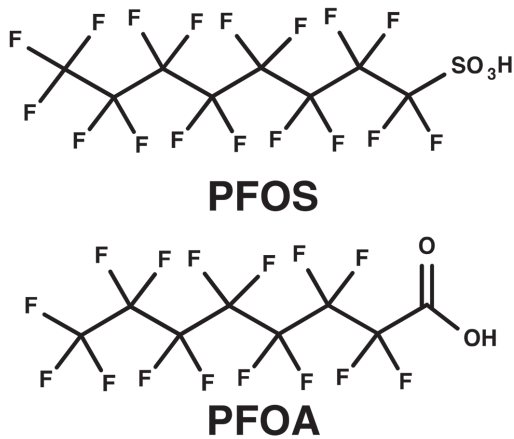


図1 PFOS、PFOA の構造



図2 河川底質のサンプリング

## シクロヘキセン含有エナミド生産に関与する生合成遺伝子の特定

*Streptomyces* 属放線菌は抗生物質や免疫抑制剤、除草剤など多岐にわたる生理活性物質を二次代謝産物として生産することが知られている。その二次代謝産物生産能は一菌株あたり 30 種類近くになると推測されているが、通常の培養条件下では 2~3 種類程度の物質が単離されるのみである。つまり、9 割近くもの二次代謝産物は未発掘のままであると言える (= 休眠二次代謝)。新規抗生物質の発見が減少傾向にある状況下では、これらの休眠二次代謝を活性化させる手法の構築は重要である。*Streptomyces* 属における二次代謝産物の生産は、複数の制御因子により調節を受けている。それを踏まえて、二次代謝制御経路を人為的に改変することで、新規代謝産物の取得を試みてきている。

これまでに研究代表者らは、SARP 型転写活性化因子 SRO\_3163 を強制発現させることにより、親株には見られない新規シクロヘキセン含有エナミド化合物 YM3163-A を検出することに成功している (Misaki *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2022, 図 1)。YM3163-A と類似し

た化合物として、methyl-2- (cyclohex-2-en-1-yliden) acetate が報告されている。本化合物は salinosporamide と生合成中間体を共有している可能性が示唆されている (Groenhagen *et al. ChemBioChem*, 2016)。YM3163-A の場合も、最終生産物の中間体として検出された可能性がある。これまでの研究から、SARP 型転写活性化因子 SRO\_3163 は、グローバルな活性化因子として機能する可能性が示唆されており、ゲノムワイドに生合成遺伝子を探索する必要がある。*S. rochei* 染色体上 (8.36 Mb) には 7568 個の ORF が存在しており、各転写ユニットについて RT-PCR などにより確認することは現実的ではない。そこで、本研究では、YM3163-A の生合成起源および生合成遺伝子クラスターを同定すべく、コントロール株と遺伝子強制発現株の遺伝子発現を RNA-seq 解析により比較することで、生合成に関与する遺伝子の特定を試みる。

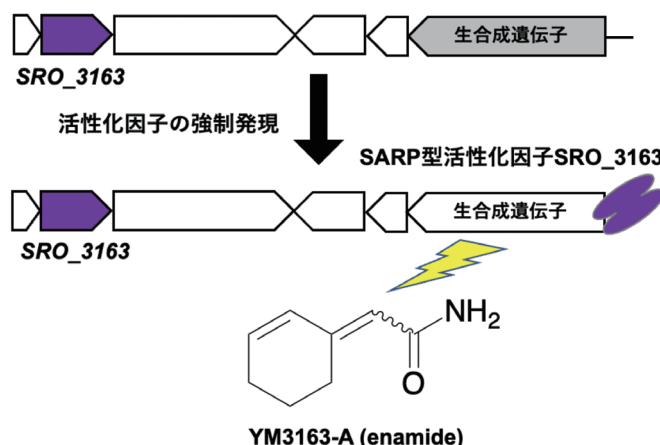


図 1 SRO\_3163 過剰発現株により生産された新規化合物

## ChIP-Seq 解析によるショウガ目植物の動原体 DNA 配列の同定

ショウガ目は、ショウガやウコン等の香辛料および薬用植物ばかりでなく、熱帯地域の主要な炭水化物源であるバナナ、カンナ等や、ゴクラクチョウカ、ゲットウ等のユニークな形状の花をもつ園芸植物を含む多様な資源植物分類群である。この分類群では、二次代謝産物等の生化学的研究や品種改良のための育種・園芸学的研究は多数行われているが、分子細胞遺伝学的解析はほとんど行われていない。その原因として、通常、細胞遺伝学的解析に用いられる根端組織中の細胞の細胞壁分解酵素による分解が困難であったり（図 1A）、細胞中に染色体と類似した染色性を示す二次代謝産物を蓄積した細胞内小器官が存在し、これらが染色体解析の妨げになることがあげられる（図 1C）。

私たちは、これらの問題に起因する展開不十分な染色体標本においても明確な染色体数確認を可能にするためゲットウから動原体特異的ヒストン H3 (CENH3) をコードする遺伝子を根端分裂細胞の RNA-Seq により同定し、この配列を元にペプチド抗体を作製した。作製した抗体は、ゲットウの動原体領域に特異的な免疫染色シグナルを示した（図 1B）。続いて、他種ショウガ目植物 5 科 24 種におけるこの抗体の交差性を調べたところ、シグナル強度に差はあるものの、用いたすべてのショウガ目植物

において動原体特異的シグナルが観察された（図 1C）。この結果は、この抗体がショウガ目植物の動原体マーカーとして広く利用可能であることを示した。

しかし、免疫染色を行うためには、この抗体が必要であり、免疫染色の解析の難易度も一般的に染色体の解析に用いられる蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) に比べて高いので、熱帯地域を含めた世界中の研究者が利用する際の障壁となる。それに対して、FISH は免疫染色に比べてより広く使用されている研究手法であり、この抗体に代わる FISH 用のマーカーが得られれば、それらはショウガ目植物の分子細胞遺伝学的解析を容易にし、栄養繁殖を含む多様な遺伝動態を解明するための有用なツールとなり得る。そこで、本研究では、ショウガ目植物の染色体解析に利用可能な動原体特異的 FISH マーカー作出のための動原体 DNA 配列の同定を目的とした。動原体 DNA 配列は、FISH マーカーとしてばかりではなく、全ゲノムシーケンシングにおける動原体領域マーカーや人工染色体構築のための材料としても有用である。本研究では、5 科 15 種のショウガ目植物由来のクロマチンと抗 CENH3 抗体を用いた ChIP-Seq を行い、これらの種内で CENH3 と共在する DNA 配列（動原体 DNA 配列）を同定する。

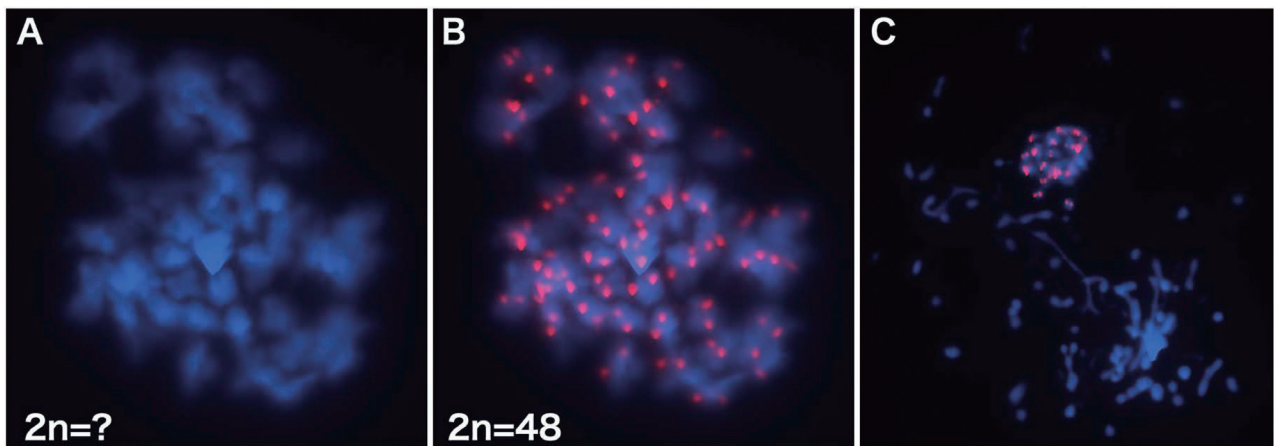


図1 ショウガ目植物の分子細胞遺伝学解析例

ゲットウ染色体の DAPI 染色像 (A) および免疫染色像 (B)：赤色の動原体シグナルを数えることにより正確な染色体数を容易に知る事ができる。

*Calathea lancifolia* の免疫染色像 (C)：赤色の動原体シグナルを付随しているもののみが染色体で DAPI で青く染まって染色体のように見えるのは他の細胞内小器官。



## オオムギ花序の外科的切除と二次的花序の発生学的解析

作物の発生が正常に進行するためには、発生中の組織における位置情報の確立が重要である。この位置情報の確立においてしばしば重要な役割を果たすのが、組織中の異なる領域間で交わされるコミュニケーションである。このコミュニケーションの存在を検証する直接的な方法の一つは、発生中の組織を切除してコミュニケーションを攪乱することである。しかし植物においてこのような実験はほとんどなされていない。その理由は実験技術の困難さにある。例えば、植物の地上部は茎の先端に位置する幹細胞組織「茎頂メリステム (shoot apical meristem, SAM)」に由来する。茎頂メリステムを対象に組織切除の実験を行うためには、(1) 茎頂メリステムだけを露出、切除し、(2) その後の発生の進行を継続させ、(3) 再度茎頂メリステムを観察、分析する必要がある。しかし茎頂メリステムを外科的に切除し、さらに切除後の成長を維持することは困難である。なぜなら茎頂メリステムは直径 50 マイクロメートル程度の微小組織であり、自身の分化した葉原基にくるまれて植物体の深部に存在しているため、植物体へのダメージを最小限にしたまま茎頂メリステムを露出させることが困難だからである。

私達はこれを可能にする微細操作技術を開発することに成功した (図)。私達はイネやオオムギを対象に茎頂メリステムの成長相転換の研究を行ってきたが、この過程で、茎頂メリステムの露出技術、純粋単離技術、および精密な観察技術を独自に開発してきた。これらを組み合わせて茎頂露出・切除技術を新たに開発した。この技術では、オオムギを材料に、葉の基部に直径 500um 程度の「窓」をメスで開けることにより、窓以外には植物体を傷つけることなく、茎頂メリステムと花原基を含む花序を露出できる。露出させた花序を外科的に切断し、その後成長を維持することにも成功し、切断花序に生じる発生

学的変化の観察に成功した。

実験の結果、部分切除したオオムギ花序がその後非常に興味深い発生現象を示すことを見出した。まず窓を開けたオオムギにおける花序の発生を検討した結果、オオムギに窓を開けると花序の発生が一旦停止することがわかった。その後葉原基の成長に伴い窓が閉じると、花序発生は再開した。次に、窓を開けた際に花序の一部を切除し、その後窓が閉じて発生が再開した場合の花序形態を観察した。その結果、驚いたことに、先端を切除した際には切り口がカルス化し、さらに残された茎頂基部側から二次的な茎頂が発生することが観察された。この二次的な茎頂は、葉を作らずいきなり生殖成長相の花序として発生した。このことから、オオムギの花序の特に基部側には二次的な茎頂を生じる能力があるが、この能力は普段は植物地上部の細胞を生み出す幹細胞組織である茎頂メリステムや分化途中の小穂によって抑圧されていることが示唆された。

これらの発見は、オオムギの正常な花序発生においては先端部と基部側がコミュニケーションしており、これによって基部側における二次的な花序発生が抑制されることを示唆している。しかしながら、オオムギの二次的な花序形成の分子レベルにおける特性は全くわかっていない。この特性を解明するためには、二次的花序における遺伝子発現を網羅的に解析し、花序発生を制御する発生の経路 (植物ホルモン、small RNA、転写因子群等) のうちどの経路が影響を受けるのか、もしくは未知の経路が活性化しているのか、を探索する必要がある。これらを踏まえて、本研究では切除に伴い生じた二次的花序を含む花序の RNA-seq を実施し、花序の外科的切除により誘導される現象の分子レベルの特徴づけを進めている。

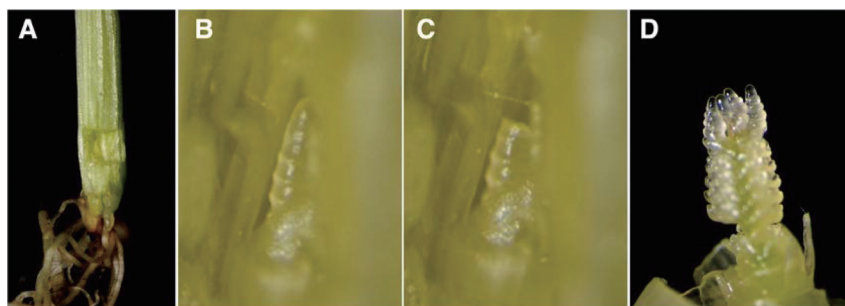


図 オオムギ「窓」あけと花序の外科的切除

A 葉鞘基部に窓を開けたオオムギ。B 窓から露出した花序。  
C 花序の先端を切除。D 切除後1週間栽培し、花序を再度観察。先端部に複数の副次的な花序が発生した。



## 新規非ヒト霊長類解析モデルを用いた 腸管化学感覚受容メカニズムの解明

腸管は、食物の消化吸収を担い、ヒトを含む動物にとって生命活動に不可欠な器官である。特に、腸管の内腔面を覆う腸管上皮には、それら生体機能を担う細胞が存在しており、消化吸収を行う吸収上皮細胞や消化管ホルモンの産生を行う腸内分泌細胞が知られている。さらに近年、異物認識と免疫応答に関わる細胞として Tuft 細胞が同定された。Tuft 細胞は、口腔の舌上皮に類似した化学感覚受容関連分子を発現しており、受容体を介して、寄生虫や微生物由来の物質を化学的に認識し、生理活性物質を分泌することで免疫細胞の活性化と上皮細胞の新生促進を誘発する。口腔からは食物などの有益な物質以外にも、外来の微生物や化学物質など有害な異物も流入することを考えると、腸管 Tuft 細胞はそれら異物を認識して腸内恒常性を担う細胞であると考えられる。したがって、腸管 Tuft 細胞における化学感覚受容メカニズムの解明は、腸内恒常性の維持や破綻に関わるメカニズムの一端の解明に繋がる重要な研究課題である。

これまで腸管機能の研究はげっ歯類を中心に進められてきた。しかし近年の遺伝子発現プロファイルや生体応答の比較解析により、げっ歯類（マウス・ラット）と霊長類（マカクザル・ヒト）の間では免疫系や腸内細菌叢の種差が大きいことが報告されており [1, 2]、種間で異なる体内環境が形成されていることが考えられる。一方で、霊長類の解析系はげっ歯類に比べて乏しいこと、またヒトを対象とする研究は倫理面や安全面から制限が多いことから、ヒトを含む霊長類では Tuft 細胞の機能解析が難航しており、げっ歯類における知見を霊長類に応用できるかは不明である。特に、どのような物質に応答し、どのような生理活性物質を分泌するのかなど霊長類 Tuft 細胞における詳細な化学感覚受容メカニズムは未解明である。

そこで我々は東京農大の岩槻教授らと共同研究体制を組み、優れた霊長類モデルである非ヒト霊長類を用いて、霊長類の新しい *in vitro* 解析系として腸管オルガノイドの樹立に成功した [3]。オルガノイドは、培養下で生体組織の幹細胞から生体組織・器官に類似した立体構造を創出したものであり、発生生物学や創薬研究に至るまで幅広く活用されている。作製したオルガノイドは、生体組織の細胞から、自己複製能力および分化能力を用いて、培養下で自己組織化により形成される。In vivo の組織をモデル化できるため、特にサルやヒト等の貴重な組織・器官を実験系として扱う際に有用である。最近我々は、Tuft 細胞を選択的に増加させたサル腸管オルガノイドの遺伝子解析において、げっ歯類とは異なる遺伝子パターンを示すことを報告した [4]。しかし、霊長類の Tuft 細胞特異的に発現する遺伝子の特定には至っていない。そこで本研究では、アカゲザルの腸管オルガノイドから Tuft 細胞のみをラベルして単離する方法の確立を試みた。

具体的には CRISPR-Cas9 法を用いた遺伝子改変によって、Tuft 細胞マーカーである TRPM5 の遺伝子座へ蛍光物質の遺伝子を導入し、オルガノイド中の Tuft 細胞に対して蛍光標識を行った。オルガノイドへの遺伝子導入実験の結果、ゲノム編集されたクローンを得ることができた (図 1)。今後はこの細胞を FACS 等により単離し、発現遺伝子を RNAseq により網羅的に同定する予定である。

### 参考文献

- [1] Beura *et al.*, *Nature*. 532, 512-516, 2016.
- [2] Nagpal *et al.*, *Front. Microbiol.* 9, 2897, 2018.
- [3] Inaba *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 536, 20-25, 2021.
- [4] Inaba *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7921, 2021.

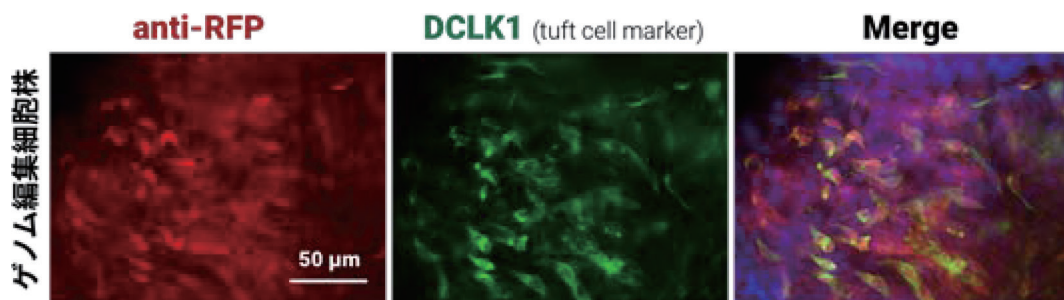


図 1 ゲノム編集により Tuft 細胞が蛍光標識されたオルガノイド

今井 啓雄 (京都大学ヒト行動進化研究センター)  
稲葉 明彦 (京都大学ヒト行動進化研究センター)

共同研究先：岩槻 健 (応用生物科学部)  
輿石 雄一 (生物資源ゲノム解析センター)

## 殺菌剤イソプロチオランの根伸長促進機構の解明

植物の根が成長する仕組みは根端メリステム（分裂組織）での細胞分裂および上部での細胞伸長によるが、近年は、複雑な根端メリステで細胞分裂が制御されている構造体（幹細胞ニッチ）についても、その形成と各細胞の機能解析が進んできている。それらの制御に関わる多数の植物ホルモンおよびシグナル分子の機能、その下流で細胞機能を制御している転写因子等についても研究が急速に進んできている。これらの研究は通常の生育状態において進められているが、実際には根は土壌成分からの物理的なストレスや様々な生物・非生物ストレスを受けており、状況に応じて細胞分裂の促進等が起こっている。しかし、根が外界から受ける刺激については再現困難なものが多いため、ストレス等の外界からの刺激と受容が細胞レベルでの緻密な制御機構に及ぼす影響は不明である。

イネいもち病の防除に使用されている殺菌剤イソプロチオラン（IPT）は、植物成長調整剤の活性も有し、イネの生育改善に活用されている。これまでの作用解析研究から、IPTはイネおよびシロイヌナズナの根の伸長を促進する作用を有することがあきらかになっているが、この作用はIPT濃度が12.5 μg/ml程度で最大になり、高濃度では根の伸長は抑制される。シロイヌナズナを用

いた解析から、IPT（12.5 μg/ml）処理による根の伸長促進は根端での細胞分裂の促進によるものであることが明らかになっている。更に、変異体を使用した解析から、IPTによる根の伸長促進には、エチレン（ET）及びジャスモン酸（JA）が関与していることも示されている。ET及びJAは根の成長抑制に働く植物ホルモンであるが、IPTの作用においては何らかの未知の機能が働いている可能性がある。

そこで、RNA-seq解析により、IPT処理によってシロイヌナズナの根端で誘導される遺伝子の探索を行う。IPTの効果が表れないETシグナル変異体 *ein2* 株およびJA関連変異体 *jar1* 株での遺伝子発現をシロイヌナズナ野生株（Col-0）と比較することにより、細胞分裂促進においてETまたはJAシグナルの下流で機能する遺伝子、ETまたはJAの合成やシグナルの活性化に至るシグナル伝達に機能する遺伝子を見出すことを目指している。IPTによって誘導される遺伝子について、通常の生育やIPT処理による発現パターンの解析、表現型における機能、発現する細胞の特定、を実施することによって、IPTの作用機構の詳細、根の細胞増殖制御機構の解明を進めていく予定である。

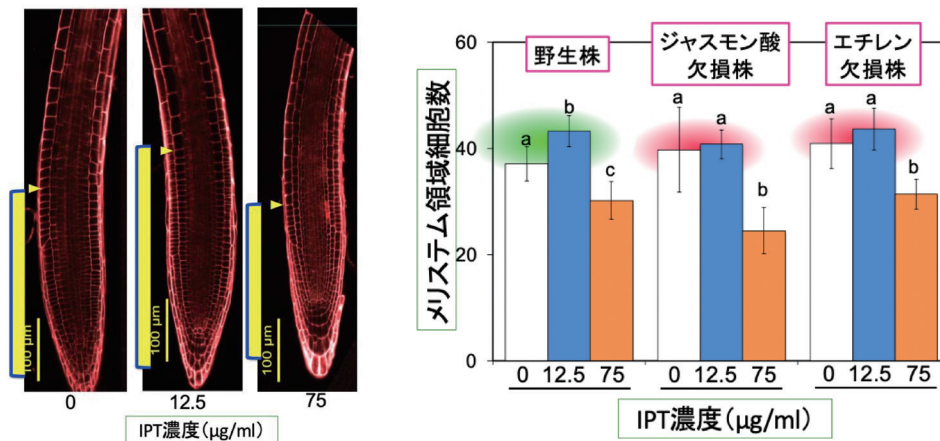


図 IPTによるシロイヌナズナ根端領域の細胞分裂の促進

## イネ極晩生突然変異体のもつ晩生原因遺伝子の特定

イネにおいて、出穂期は地域適応性や収量性を支配する重要な形質の一つである。筆者らはイネ品種 台中 65号 (T65) へのイオンビーム照射によって、T65 よりも約 2ヶ月遅く出穂する晩生突然変異体を複数得ており、そのうちの 2系統 KGM26, KGM27 については、晩生の原因が劣性 1 遺伝子であること、原因遺伝子がそれぞれ第 8 および第 9 染色体に座乗することを明らかにしている (Ichitani et al. 2014)。これ以外に未発表の KGM25 も有しており、同じく晩生の原因は劣性 1 遺伝子であること、KGM25 の原因遺伝子は第 9 染色体に座乗し、KGM27 の遺伝子とは非対立であることを明らかにしている (一谷 未発表データ)。しかし、原因遺伝子の特定には至っていない。また、イオンビームがゲノム全体に与える影響についても分析が進んでいない。そのため、次世代シーケンサーによって全ゲノム情報を取得し、解析することとした。取得したデータは、一谷の研究室のコンピュータにインストールされている CLC Genomics Workbench で解析する。これまで連鎖分析によって絞り込んだ染色体領域において、参照ゲノムと原品種の差、参照ゲノムと突然変異系統の差を比較することで、晩生の原因となる箇所を特定する。また、ゲノム全体においても同様のことを行い、イオンビームによる変異箇所をゲノム全体で網羅する。これまでの予備的な解析では、連鎖分析で絞り込んだ染色体領域に変異が認められており、研究が順調に進んでいると感じている。

イオンビーム照射では 1 塩基からメガベース単位の欠失がよく起こることが知られている。従来のサンガー法では、仮に変異の原因がメガベース単位の欠失であった場合に、それを明らかにするのに極めて多大な労力がかかる。次世代シーケンサーを用いると、そのような欠失を検出するのが容易である。また、ゲノム全体における

変異箇所を検出することができるので、イオンビームによる変異箇所をゲノム全体で網羅し、過去の知見と比較することや、DNA 断片の大きな欠失に着目して、遺伝子機能評価のための新たな実験材料となる可能性がある。

本研究の突然変異系統の原品種 台中 65号 (T65) は、イネ遺伝学でよく用いられる品種である。特に出穂期遺伝子については、様々な突然変異系統や同質遺伝子系統が育成されている。遺伝的背景が T65 に揃っているため、特性の比較が容易であり、系統間交雑によって新たな遺伝子の組合せをもつ系統を育成し、遺伝子間相互作用を評価することも容易である。本研究で供試する極晩生突然変異体が、そのゲノム情報とともにイネ遺伝・育種学に貢献することを期待している。

### 謝辞

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター「生物資源ゲノム解析拠点」共同研究に採択していただき、懸案であった上記材料の晩生原因遺伝子の特定につながる研究が進められることに御礼申し上げます。また、イオンビーム照射は原子力機構施設利用共同研究制度により高崎量子応用研究所イオン照射研究施設 (TIARA) で行われた。

### 参考文献

Ichitani K, Yamaguchi D, Taura S, Fukutoku Y, Onoue M, Shimizu K, Hashimoto F, Sakata Y, Sato M. Genetic analysis of ion-beam induced extremely late heading mutants in rice. *Breed Sci.* 2014, 64:222-30. doi.org/10.1270/jsbbs.64.222

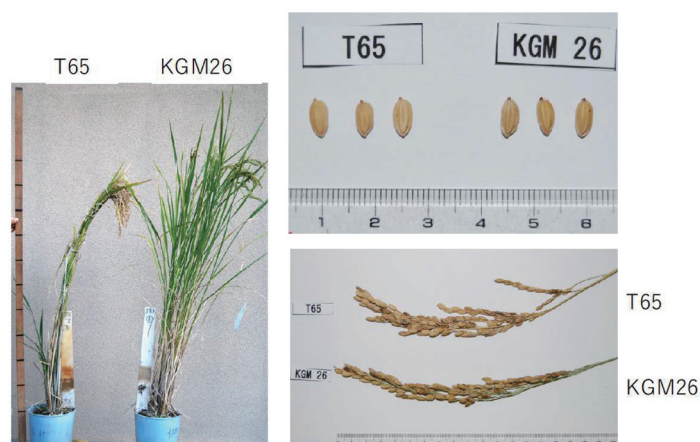


図 イネ極晩生突然変異体 KGM26 の外観



## 分離集団に対する DNA マーカー検出の新戦術

農業上有用な形質を支配する遺伝子の探索は、育種学研究においては必須の命題である。その試みは、DNA マーカーの登場と QTL 解析の開発によって飛躍的に加速した。そして、特定された遺伝子情報を活用する次世代の育種戦略として、有用遺伝子に隣接する有害遺伝子（リンケージドラッグ）との連鎖を断ち切ったり、さまざまな形質を支配する多数の原因遺伝子を自在にチョイスして組み合わせたりする、精密育種やデザイン育種といった概念が提唱された。しかし残念ながら、シロイヌナズナやマウスなどのモデル生物に比べると、野菜や果物のような農作物を対象とした多くの研究では注目する形質に関連する低解像度の染色体領域や、かろうじて遺伝子座と呼べるものの列挙に止まる例が多く、原因の遺伝子そのものを特定したという研究はまだ稀である。このため、精密育種やデザイン育種が提唱されて久しいが、いまだに絵に描いた餅の感を拭いきれないのが現状である。

遺伝子探索研究の多くが原因遺伝子の特定ではなく遺伝子座の観測に留まっている原因の一つに、分離集団の解析の際の各個体の両親由来の遺伝子型の判定、すなわち DNA マーカーの検出が高価で煩雑で非効率である事があげられる。ハクサイやレタスなどの実用農作物では、代表系統のゲノムの概要配列（ドラフトシーケンス）がようやく整備されつつあるような状況で、さまざまな交雑集団に使える汎用の DNA マーカーは整備されていない。それどころか、その概要配列ですら未だに連鎖地図との矛盾が見出されるようなレベルである。近年、次世代シーケンサーの普及によって RAD Seq などの手法が実用的なものとなり、この状況はやや改善されつつある。しかし、RAD Seq はサンプルの調製が煩雑で高額になりがちであり、その多型は主に SNPs であるため、その後の PCR マーカーへの展開に困難が伴う。これに対し、より多くの情報が手に入る全数リシーケンシングという荒技も登場したが、あまりに高額なためにこの方

法の適用は共同利用の CSSLs などに限られている。また、安直に着手できる PCR は、次世代シーケンサーに比してこの 20 年間で費用がほとんど変化しておらず、仮に RAD Seq と同じだけのマーカー数を同じだけの分離集団の全個体に対して行うと、人件費も含めてむしろ膨大な経費となってしまう。このような背景から、ゲノムが読まれた代表系統ではなく、さまざまな育種系統や実用系統を用いて新たな分離集団を作る度にゲノム全域の遺伝子型の検出に気楽に使え、さらに遺伝子座の発見から原因遺伝子の特定に進んでファインマッピングを実施する際に必要となる数千個体のサンプルの解析を行っても大きな経費負担や作業負担を伴わないような、遺伝子型の判定戦術の開発が望まれている。

そこで本研究では、農大ゲノムセンターが開発した Microsatellite Capture Sequencing (MiCAPs, <https://www.intechopen.com/chapters/58432>) に着目し、RAD-Seq よりも手軽で全数リシーケンスよりも安価に多数の個体のゲノム全体の遺伝子型を把握し、ファインマッピングにも十分な高密度でかつ PCR マーカーへの展開も視野に入れた遺伝子型判定戦略の開発を目指している。MiCAPs は、断片化したゲノム DNA から SSR を含む断片を選択的にシーケンスする手法で、これまでは主に SSR マーカーを準備する目的で使われてきた。SSR マーカーはそれ自体が既に PCR マーカーの一種と言えるので、SNPs よりもファインマッピングに適している。本研究では、これを交雑後代 ( $F_2$ ) の集団の各個体のゲノム全体の SSR 多型の調査に直接的に使用して、QTL 解析からファインマッピングまで進む事を試みる。さらに、図 2 に示すように不明の部分の補完 (imputation) するような工夫を施すことで、1 個体当たりの読み取り量を減らして経費を圧縮し、実用的な戦略となり得るかを検証したい。



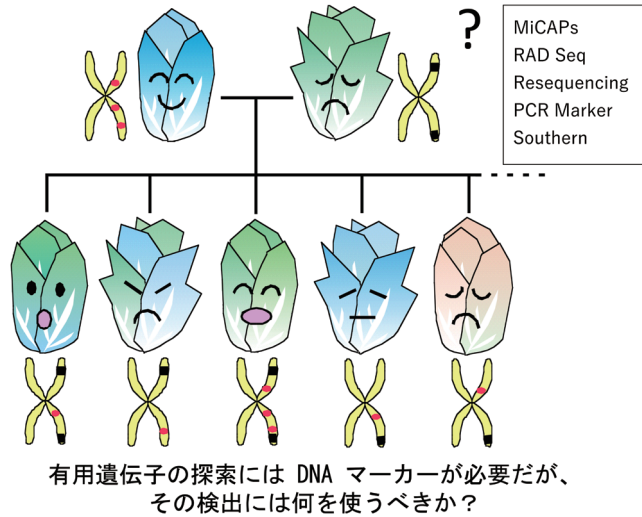


図1 交雑系譜とその遺伝子型のイメージ

交雑親が持つ有用遺伝子をマッピングし、それと連鎖する DNA マーカーを使用するために、様々なマーカー検出手法が使われてきた。

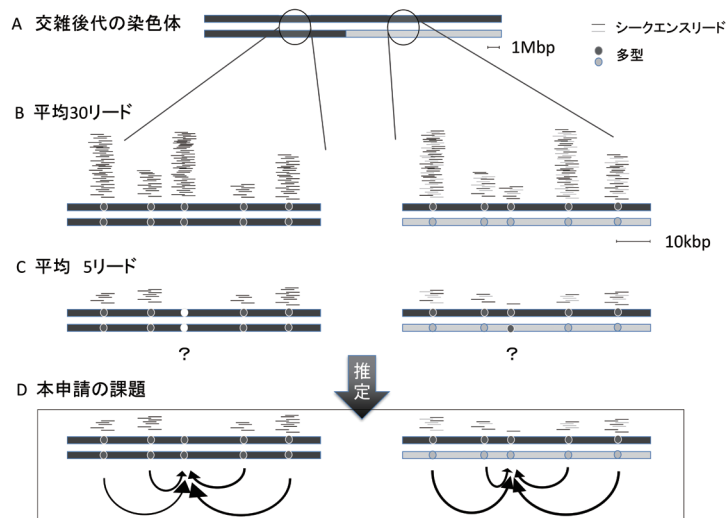


図2 遺伝的組換えと、DNA 多型の NGS 検出の概念図

- A, F2 集団や CSSRs などの交雑後代の染色体のイメージ。片方の親由来のゲノムを黒、もう片方の親由来のゲノムを白で表し、黒ホモの部分とヘテロの部分で分けて考える。
- B, 従来の多型検出法で標準的な 30 リード (depth = 30) のイメージ。各多型の読み取り回数は (他のバイアスがなければ) 確率分布に従うため、できるだけ多くの多型を確実に読み取るためにこれだけしっかりと読んでいる。
- C, 節約のため、読み取り回数を減らした場合。全くリードが得られない部位やヘテロなのにホモ型のように見える部位が生じる。
- D, 本研究で開発・検証する手法。遺伝的組換えに対して十分に小さい領域では、データが足りない部分を周辺の情報で補填・推定しても良いか、検証を行う。

## MiCAPs 法による SSR および SNP の同時取得法の確立 および遺伝的多様性・遺伝構造への解像度評価： 新たな縮約ゲノム多型解析法の開発

次世代シーケンサー（NGS）やゲノム・遺伝解析技術の急速な進展により、技術的には遺伝子～個体～集団～生態系レベルで遺伝的多様性評価はこれまでになく高解像度に評価できるようになった（津田 2021）。特に全ゲノム解析ほど完全ではないが、研究目標達成には十分な一塩基多型（SNP）情報をゲノム上から広範囲に取得する縮約ゲノムを対象にした多型検出法は、全ゲノム解析に比べ、コスト面で大きな利点がある。そのため、その代表的手法である RAD-seq 法（Baird et al. 2008）を筆頭に、DaRTseq 法（Kilian et al. 2012）、Mig-seq 法（Suyama and Matsuki 2015）、Gras-Di 法（Hosoya et al. 2019）、ISSRSeq 法（Sinn et al. 2021）などが開発され、昨今これら手法は農学分野の様々な研究で大きく活用されている。一方、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの田中啓介助教らは、NGS を用いて、RAD-seq 法などの制限酵素法を応用し、ピオチン化した単純反復配列（SSR、マイクロサテライト）をプローブに用いることで、ゲノムから広く SSR を大量検出する MiCAPs 法（Tanaka et al. 2017, 田中ら 2021）を開発した。本研究で着目したのは MiCAPs 法では、その実験行程の前半が RAD-seq 法と同様のため、SSR だけでなく、実験の副産物として理論的には SNP も NGS の同じラン結果から得られるという点である。SNP は突然変異率が遅く、SSR の突然変異は早いため、両タイプの遺伝的変異を同時取得できれば、単に遺伝構造の解像度を高めることができるだけでなく、進化速度に着目した遺伝的多様性評価が可能になる。そのため、MiCAPs 法を改変することで、世界にアピールできる新たな縮約ゲノム多型検出法を開発できると期待できる。

縮約ゲノムからの SNP 情報（1000 遺伝子座以上）と従来法による SSR 情報（10～20 遺伝子座）を用いて遺

伝構造などの解像度を両者で比較し、前者の解像度が高いことを示す論文が多く報告されている（Attard et al. 2018）。これら比較研究ではそもそもデータ間で遺伝子座数が大きく異なるため、これら結果は当然といえる。一方、SNP と SSR でどちらも 1,000～10,000 遺伝子座以上など、遺伝子座が同等の場合、どちらの解像度が高いかなどは未だ評価されていない。理論的には遺伝子座数が同等の場合、ホモプラシーの影響は考慮する必要があるが、マルチアレルの SSRの方が、特に最近形成された遺伝構造や集団動態はより鋭敏に評価できると期待できる。また縮約ゲノムの SNP 多型検出では欠損データの扱いなどデータのフィルタリングが、結果に大きく関係していることが以前から指摘されている（Paris et al. 2017）。一般に、集団遺伝学的解析などでは個体あたりの欠損データ許容は 20% までという“80% ルール（Paris et al. 2017）”が一般化しつつある。しかし、場合により、欠損許容率を 20% 以上に上げることが必要な場合もあるが、このような場合でも遺伝子座数と欠損率が同じであれば、マルチアレルの SSRの方が、より情報量のある遺伝データを取得できると考えられる。

そこで本研究では MiCAPs 法を改変することで、1) SSR および SNP 検出のための 2 倍体および多倍体生物の遺伝子型決定法の確立、2) データフィルタリング・バイオインフォマティクスの確立およびデータ欠損率を考慮した SSR および SNP の遺伝的多様性および遺伝構造の解像度の比較評価などを行うことを目的としている。またこれに必要な DNA の濃度、質も評価する。最終的に改変 MiCAPs 法による SSR および SNP の同時取得というこれまでにないユニークな縮約ゲノム多型情報取得法を確立し、農学分野で実践的・普遍的に活用されるようにしたいと考えている。

### 縮約ゲノム多型情報

全ゲノム解析ほど完全ではないが、研究目標達成には十分な一塩基多型（SNP）情報をゲノム上から広範囲に取得可能

RAD-seq法 (Baird et al. 2008)、DaRTseq法 (Kilian et al. 2012)、Mig-seq法 (Suyama and Matsuki 2015)、Gras-Di法 (Hosoya et al. 2019)、ISSRSeq法 (Sinn et al. 2021)

農学分野でも広く活用されている

### 本研究のモチベーション

MiCAPs法 (Tanaka et al. 2017, 田中ら2021) を改変し、縮約ゲノムからSNPだけでなく単純繰り返し配列 (SSR) の2種の遺伝データを大量取得する方法を開発する

⇒突然変異率に着目した、遺伝構造、集団動態の評価を可能にする (突然変異率：SNP 遅い、SSR 速い)  
⇒欠損データと遺伝子座数が同程度の場合、マルチアレルのSSRの方が遺伝構造解像度は高い？

### 主な目的

- 1) MiCAPs法に資するDNA濃度などの基本情報の評価
- 2) SSRおよびSNP検出のための遺伝子型決定法の確立
- 3) データフィルタリング・バイオインフォマティクスの確立
- 4) データ欠損率を考慮したSSRおよびSNPの遺伝構造の解像度の比較評価

植物、哺乳類、昆虫など様々な生物で取り組み中

### ユニークな縮約ゲノム多型検出法の確立&ワークショップなど

ゲノムクス技術が第一産業や農林水産業にうまく活用されていないという世界的な農学・農業問題 (Galla et al. 2016) の解決にも貢献



# NGRC ニュース

---

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター  
2023年3月号





## 2022 年度 学内公募一覧

1. 川崎 信治 (生命科学部 分子微生物学科)  
「花と訪花昆虫に生息する嫌気性細菌に関する研究」
2. 高島 昌子 (総合研究所)  
「担子菌酵母 *Trichosporon asahii* の菌糸生長に関わる遺伝子の探索」
3. 四井 いずみ (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「ヒメツリガネゴケにおけるキチン非感受変異体の原因遺伝子座の解析」
4. 大西 章博 (応用生物科学部 醸造科学科)  
「高温メタン発酵法によるポリ乳酸の分解過程における微生物学的研究」
5. 田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)  
「多座マイクロサテライトフィンガープリンティング法の構築」
6. 田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)  
「階層的血管構造を有するヒト組織再構成のための 1 細胞遺伝子発現解析」
7. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「Analysis of the response of bacterial structure of various water yam varieties (*Dioscorea alata* L.) to inoculation with highly dominant endophytic bacteria.」
8. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「塩生植物シバナの根圏細菌叢の解析」
9. 豊島 拓樹 (生命科学部 分子微生物学科)  
「過酷な環境から単離された微細藻類の全ゲノム解析」
10. 鈴木 智典 (生命科学部 分子微生物学科)  
「微生物における遊離フラビン関与の鉄代謝」
11. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)  
「卵管内 miRNA がウシ初期胚の発生に及ぼす影響」
12. 石川 森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)  
「様々な発酵環境から単離された産業微生物の大規模ドラフトゲノムシーケンス」
13. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「シアノバクテリアにおける巨大プラスミド維持機構の解明」
14. 樋浦 仁 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「妊娠期以降の葉酸摂取量が仔の雄性生殖細胞のエピジェネティクスに及ぼす影響」
15. 和久井 健司 (農学部 生物資源開発学科)  
「カブの核遺伝子型雄性不稔の機構解明及び育種への応用」
16. 大西 章博 (応用生物科学部 醸造科学科)  
「醸造環境中のバクテリオファージのドラフトゲノム解析」
17. 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)  
「土壌・植物・食品・微小粒子状物質中のメタ 16S/ITS 解析」

18. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)  
「加齢オスマウスの胚の遺伝子発現に及ぼす影響」
19. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)  
「ルミナツプ給与がルーメン内の細菌叢に及ぼす影響」
20. 佐々木 康幸 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「*Streptomyces coelicolor*A3 (2) における一酸化窒素誘導遺伝子群の探索」
21. 高島 昌子 (総合研究所)  
「Sporidiales 目酵母のゲノムデータの高品質化」
22. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「Extraction and Analysis of Microbiomes Associated with Kinandang Patong Rice (*Oryza sativa* L.) Roots and Grains」
23. 福島 穂高 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「モデルマウスを用いた精神疾患の分子病態解析」
24. 庫本 高志 (農学部 動物科学科)  
「アトピー性皮膚炎モデルラットの皮膚の遺伝子発現解析」
25. 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の解析」
26. 和久 大介 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)  
「野生動物生態解明のためのアンプリコンシーケンス」
27. 煙山 紀子 (応用生物科学部 食品安全健康学科)  
「タンパク質の構造による腸内細菌叢の変化」
28. 四井 いずみ (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「Micro-Tom における miRNA のトランスクリプトーム解析」
29. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)  
「Transcriptional change in monkey taste organoids upon interleukin stimulation」
30. 伊藤 晋作 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「昆虫成長制御剤 fenoxycarb のブラシノステロイドシグナルへの効果の解析」
31. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「塩生植物シバナ由来植物生育促進性根圏細菌の全ゲノム解析」
32. 中山 俊一 (生命科学部 分子微生物学科)  
「清酒酵母特異的な *EHL* 遺伝子の解析」
33. 朝井 計 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「枯草菌のグルコースによるマンガンイオン濃度制御機構の研究」
34. 佐々木 剛 (農学部 生物資源開発学科)  
「真無盲腸目の味覚に関する分子遺伝学および組織形態学的研究」
35. 佐々木 剛 (農学部 生物資源開発学科)  
「深海性魚類におけるロドプシン遺伝子の多様性について」

36. 櫻井 健 (農学部 デザイン農学科)  
「タイリクヒメハナカメムシの化学感覚受容関連遺伝子の探索」
37. 櫻井 健 (農学部 デザイン農学科)  
「ヒメカメノコテントウの化学感覚受容関連遺伝子の探索」
38. 太治 輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「シロイヌナズナの野生型および変異株のリシーケンス」
39. 渡邊 康太 (応用生物科学部 醸造科学科)  
「ヒト毛髪に常在する細菌糞の分布および生態の解明」
40. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)  
「病原性酵母 *Candida glabrata* のリボソームタンパク質遺伝子の転写制御機構の解明」
41. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「極限環境藻類 *Galdieria* の pH ストレス に関する研究」
42. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「ジブチ土壌の細菌叢解析」
43. 太治 輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「シロイヌナズナ長期高温感受性変異株の RNAseq 解析」
44. 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)  
「発泡スチロールを食する昆虫幼虫の腸内で発現している遺伝子の転写解析」
45. 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)  
「人工環境表面サンプルにおけるショットガン・メタゲノム解析の条件検討」
46. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
「有機質肥料並びに化学肥料施肥下での細菌接種がヤムイモ生育並び  
共生細菌叢に与える影響」
47. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)  
「FKBP12 タンパク質による転写促進の分子機構に関する研究」
48. 篠澤 章久 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「東京都伝統野菜 寺島ナスのゲノム解析」
49. 篠澤 章久 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「植物の湛水・水没応答に応答する遺伝子の網羅的解析」
50. 尾畑 やよい (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
「CDM により分化した卵巣および卵胞の特性解析」



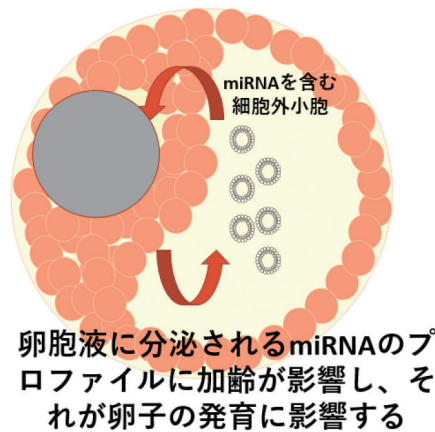
## 卵子の発育を支持する卵胞液中の miRNA

卵子の発育は卵胞内で行われる。この卵胞は卵胞液という粘性を持った体液で満たされている。卵胞液中には多くの miRNA が存在し卵子の発育を左右することを我々は示した (J Assist Reprod Genet. 2020 37:2569-2579)。一方、加齢に伴い、卵子の質が低下することが広く知られている。そこで、卵子の質低下の原因に、加齢によって変化する miRNA が関与しているのではないかと仮定した。この研究では、ウシを加齢のモデルとして用い、若齢と加齢のウシの卵巣から卵胞液を回収し small-RNA-sequence によって若齢と加齢で差のある miRNA を探索した。その結果、高い濃度で存在し、しかも若齢個体が多い miRNA として miR-19b が見つかった。この miR-19b は卵子と顆粒層細胞複合体を体外で培養した培地からも高濃度で検出できた。卵子の体外発育のモデルとして初期胞状卵胞から未成熟な卵子と顆粒層細胞を回収し、体外での発育培地に miR-19b を添加した。その結果、体外発育卵子の直径やその後の卵子の発生能力が miRNA の添加によって大きく改善することがわかった。これまで、miRNA の効果を考察する研究では、特定の miRNA が機能しているのかどうかを評価するにはターゲットとしている miRNA に由来するタンパク質の発現低下や、Dual-Luciferase Assay 等を用いてターゲット配列を持つ

たプラズミドに由来する遺伝子発現低下で当該 miRNA が機能していることを評価している。しかし、本来 miRNA は数百からのターゲット遺伝子を持っているため、1 つや 2 つのタンパク質の変動を観察するだけでは、どの程度機能しているのかを評価するのは難しかった。本研究では、miR-19b の添加効果を RNAseq にて評価し、その変動遺伝子群から予測される Pathway と miR-19b がターゲットにしている遺伝子群から予測した Pathway がほぼ重複することを明らかにした。さらに、変動遺伝子の Ingenuity Pathway Analysis から予測した有意な上流因子に miR-19b が予測されることも明らかになった。このことは、従来インシリコで予測している miRNA の作用が予測どおりの広範な遺伝子に作用して影響を及ぼしていることを意味している。今回の研究では、加齢に伴う miRNA の変化が卵子の発育に影響していることを示すことができた。

### 参考文献

Nagata, S., Inoue, Y., Sato, T., Tanaka, K., Shinozawa, A., Shirasuna, K., & Iwata, H. (2022). Age-associated changes in miRNA profile of bovine follicular fluid. *Reproduction* (Cambridge, England), 164 (5), 195-206.







## 細胞の機能を調整する miRNA の同定

生殖細胞の発育が miRNA に影響されることを我々は示している。胚の発育は卵管中で行われるが、実際に胚の発育を制御している miRNA があるのかどうかについては既報がなかった。本研究では、卵管内に存在している miRNA を同定し、これらが胚の発育を改善するかどうかを検討した。

排卵から数日後のウシの卵管を回収し卵管液を集めた。卵管液から細胞外小胞を集め、ここから回収した RNA を対象に small RNA-sequence を行い卵管液中に存在する miRNA を同定した。次に体外で発育した胚と体内で発育した胚の RNAseq から変動遺伝子を見つけここから Ingenuity Pathway Analysis で体内胚にとって Activated な有意な上流因子としての miRNA を解析した。2つの miRNA 候補群を比較することで胚に作用して卵管中に存在する miRNA を選定した。

結果として選定した miR-17-5p は、胚の発生培地に外挿すると有意に胚の発育を促すことが明らかになった。また miR-17-5p のターゲットとしているタンパクの発現

が低下することと、利用した miR-17-5p が予測ターゲットの配列に作用することを Dual Luciferase Assay で確認した。さらにこの miR-17-5p の添加で変動する遺伝子群を RNAseq で同定し、これらから miR-17-5p が影響する Pathway を予測した。この Pathway はインシリコで miR-17-5p がターゲットにしていると考えられている遺伝子群を用いて予測した Pathway とほぼ重複し、変動遺伝子の上流因子解析では miR-17-5p が有意な因子として推測された。このことから、miR-17-5p は広範な遺伝子群を対象に作用し、胚の発生を改善することが明らかになり、卵管液中の miRNA が胚発育に重要な働きを有していることを示すことができた。

### 参考文献

Aoki, S., Inoue, Y., Shinozawa, A., Tanaka, K., Shirasuna, K., & Iwata, H. (2022). miR-17-5p in bovine oviductal fluid affects embryo development. *Molecular and cellular endocrinology*, 551, 111651.

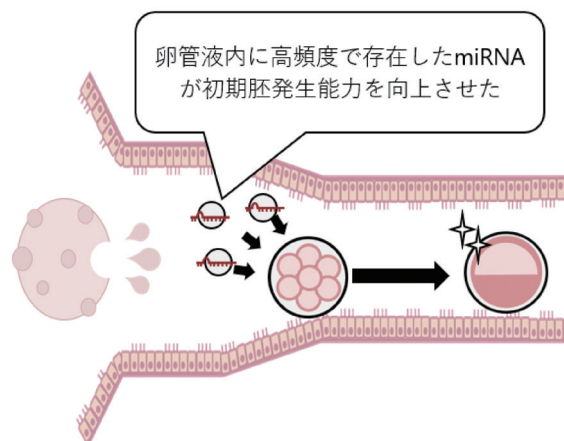


図 発情前後の卵管



## 高質な胚生産のための培養環境の構築に関する研究

胚は子宮内で発育後、子宮の上皮と相互作用を行う。これをとおして胚の存在を母体が確認し、着床が行われる。子宮内で、胚が分泌すると考えられる因子については様々な方向から研究と評価が進んでいるが、胚もしくは子宮側からの一方方向の推測であるため、候補が多く信頼性が低い。

本研究では、胚と子宮の両方向からの推測を同時に行い、ウシにおける胚と子宮のコミュニケーションを支える因子を推測した。

体内環境によって遺伝子が変動を受けていると仮定し、体内発育胚と体外発育胚の RNA-sequence から変動遺伝子を同定し、体内胚の Activated な上流因子を Ingenuity Pathway Analysis で推測した。次に過剰排卵処置後、人工授精を行う、行わない条件で、胚が存在する子宮上皮と、しない子宮上皮を作って集め、この RNAseq から、胚の存在によって変動する遺伝子群を同定した。さらにここから胚が存在する子宮上皮にとっての Activated な上流因子を Ingenuity Pathway Analysis で推測した。2つの因子群の重なり合いから、子宮と胚の相互作用を担う因子として leukemia inhibitory factor, interleukin 6,

fibroblast growth factor-2, transforming growth factor beta-1, and epidermal growth factor 等があることを見いだした。さらにこの条件では人工授精という外部要因が存在するため、富士農場にて通常の過剰排卵と採胚を行い、偶然胚が沢山採取できた子宮の上皮細胞と、胚が採取できなかった子宮上皮を集め RT-PCR を行った。これらの検証作業から IL1B は、胚が子宮存在する場合に低発現になることが明らかになり、これが相互作用のマーカーとして利用できることを示した。

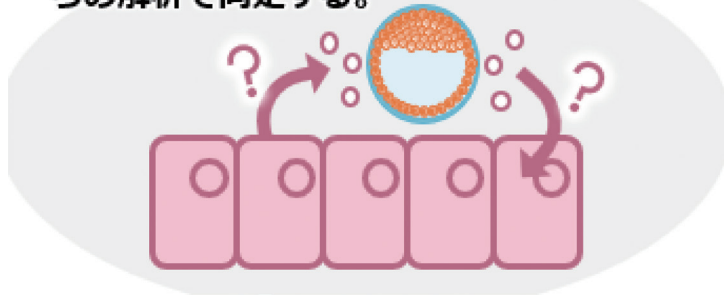
### 参考文献

Noguchi, T., Hayashi, T., Inoue, Y., Hara, S., Shirasuna, K., & Iwata, H. (2022). Predicting of molecules mediating an interaction between bovine embryos and uterine epithelial cells. *The Journal of reproduction and development*, 68 (, 318-323.

原駿介、岩田尚孝、野口龍生

ウシ胚と子宮内膜上皮細胞の相互作用に関する因子の探索 胚移植研究会誌 印刷中

### 子宮や卵管と胚を仲介する物質を胚側と子宮側のRNAseqと得られた変動遺伝子からの解析で同定する。



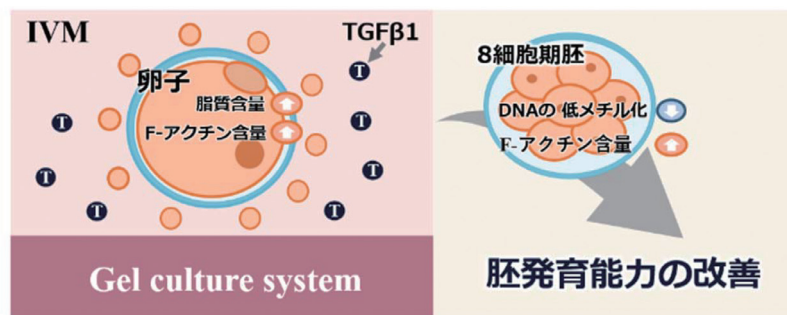


## 増粘多糖類を利用した胚作成方法の開発

キサントガムとローカストビーンガムは食品に使われる増粘多糖類である。これらを利用してゲルを作成し、柔らかい基質として卵子や胚の発生に用いると有効であることを我々は示してきた (Mol Reprod Dev. 2021 88: 516-524, Reprod Domest Anim. 2020 55:1124-1131)。一方でどのような機序で胚の発生が改善されるのかが不明であった。そこで本研究では、胚作成において最も一般的に行われる卵子の体外成熟培養の基質としてこのゲルを用いて胚を作成した。また、卵子と卵丘細胞のRNAseqを行い、基質によって変動する遺伝子群を同定した。変動遺伝子かえは、このゲル基質が細胞外マトリックスや細胞骨格や接着に働きかけることが明らかになった。またこの変動を引き起こす要因の探索のため、この遺伝子群を用いて Ingenuity Pathway Analysis を行い有意な Activated 上流因子を同定した。増粘多糖類で培養した細胞でも卵子でも Estradiol や TGFβ1 は最上位の上流因子であり両者に重複していたため、これらの因子を単独で卵子の体外成熟培地に添加し同様の効果が認められ

るのかを検討した。最初にゲル基質で卵子を培養した場合、培地に含有されるエストラジオールと TGFβ1 の濃度が有意に上昇することを確認した。さらに TGFβ1 は、ゲル基質を利用したときと同様に、卵子の重合アクチンと脂質含量を増やした。面白いことに、成熟培養にゲルと用いた場合、胚性ゲノムの活性化時期である 8 細胞期の DNA の脱メチル化を促進するが、TGFβ1 にも同様の効果があり、胚の発生を改善することが明らかになった。このことからゲル基質は TGFβ1 の分泌促進を介して、胚の発育を改善することが明らかになった。成果は International Journal of Molecular Science に掲載された。

Beneficial Effect of Polysaccharide Gel Made of Xanthan Gum and Locust Bean Gum on Bovine Oocytes Shunsuke Hara, Yuki Inoue, Sogo Aoki, Keisuke Tanaka, Koumei Shirasuna and Hisataka Iwata. International Journal of Molecular Science. 2023, 24: 3508



多糖類で作成したゲル基質を卵子のIVMに使うと、TGFβ1分泌促進を介して胚発育が改善する。



## 階層的血管構造を有するヒト組織再構成のための 1 細胞遺伝子発現解析

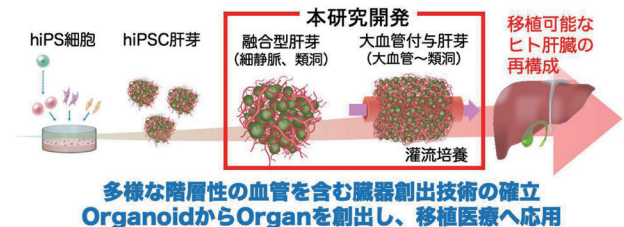
臓器移植は現在のところ臓器不全症に対する唯一の根本的治療法であるが、移植先進国である米国においてもドナー不足のために未だ移植待機患者数が移植実施数を大幅に上回っている状況が続いているのが現状である。全世界的にはさらにドナー不足が深刻であることは明らかであり、この問題を解決可能な人工臓器創出技術の開発が期待されている。山中教授による2007年のヒト人工多能性幹細胞 (hiPSC) の開発により、ヒト ES 細胞が抱えていた倫理的問題は大幅に低減され、人工ヒト臓器創出技術実現への期待は高まっている。実際に、日本でも加齢黄斑変性症への移植など数々の hiPSC 由来細胞・組織の移植術が実施されている。2000年代後半からは3次元組織構造を模倣可能なオルガノイド培養技術が上皮細胞オルガノイドを中心に発展してきた。組織は上皮細胞のみでなく間葉系組織、血管が組み合わさった複雑な構造を有するため、間葉系組織を含むオルガノイドが開発され、さらに移植後に宿主血管と吻合可能な“血管化オルガノイド創出技術”が開発された。血管化オルガノイドは画期的技術であるが、宿主血管との吻合には数日を要し、臓器移植のように即時に血流にアクセス可能で機能を発揮するという段階にまでは到達していない。この技術を元に、本研究グループは、*in vitro* 条件下で細小静脈及び毛細血管レベルの太さの血管構造を含む再構成肝組織の創出に成功しており、「iPS 細胞を用いた代謝性臓器の創出技術開発拠点」において肝硬変治療用材料としての開発が進められている。本研究においては多様な血管を含む再構成肝組織創出技術を発展させ、血管吻合移植により即時に機能を発揮可能な大血管をオルガノイドに付与する技術を確立してきた。

血管階層性には、大きさ的な階層性、質的階層性の2つの階層性があり、5~20 μm 程度の毛細血管レベルの血管と100~200 μm 程度の細小動静脈レベルの血管を有するオルガノイドにmmレベルの大血管を付与することにより大きさ的な階層性は実現できた。この次に、我々は血管の質的階層性の実現に取り組むことにした。肝臓は腸から吸収された栄養や毒素などを含む血液が門脈より運搬され、毛細血管レベルの太さの類洞血管に流入し、類洞内皮細胞に特徴的な小孔を通じて周囲の肝細胞により代謝が生じ、代謝産物が中心静脈へと流れ、肝臓外へ運搬される。門脈周囲の肝細胞と中心静脈周囲の肝細胞とは異なる代謝機能を有し、Liver zonation と呼ばれる。Rocha らによって中心静脈に多く発現する Wnt シグナル

経路関連因子の RSPO3 を血管特異的にノックアウトしたマウスにおいて Liver zonation が消失することが示されており、Liver zonation は大血管からのシグナルにより保持されることが示唆されている [Rocha AS *et al.*, Cell Rep, 2015]。従って、我々の開発する大血管付与オルガノイドを用いることにより、Liver Zonation の再現が可能と考えた。

ヒト iPSC 肝臓オルガノイドを用いた Liver zonation 再現に向けて、初めに門脈血管と中心静脈血管の作製を試みた。それぞれに特異的な血管内皮細胞の分化誘導を行う際の評価マーカーとして、既報のマーカーでは特に門脈内皮細胞の情報が不十分であったため、今回、血管階層性を区別可能なマーカー開発のための1細胞遺伝子発現解析 (scRNA-seq) を実施した。マウス肝臓より CD31 陽性血管内皮細胞をセルソーターで分取した後、10x Genomics 社の Chromium を用いてセルバーコーディングおよび cDNA ライブラリー作製を行った。そして、Illumina 社の NextSeq 1000 を用いてシーケンスを実施した。データ解析では、Cell Ranger パイプラインツールを用いて、細胞ごとの遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、門脈・中心静脈特異的なマーカーの抽出に成功した。このマーカーを用いて我々の開発したヒト iPSC 門脈内皮細胞とヒト iPSC 中心静脈内皮細胞の特性解析を行い、分化誘導系の確立に成功した。さらに、シングルセル RNA シークエンスからは、門脈・中心静脈内皮細胞特異的な分泌タンパク質も複数発見されており、これらタンパク質による Liver zonation 形成・維持メカニズムについても現在解析を進めているところである。

これら結果を基に、今後はそれぞれの培養条件の至適化や大血管を通じた還流培養系を組み合わせることで、ヒト組織の空間的違いを再現可能な組織再構成に挑戦していきたい。これが実現すると、優れた *in vitro* 薬物代謝アッセイ系構築による創薬への応用が見込まれ、また将来的にはヒト移植臓器の代替が可能となると考えられる。







## アトピー性皮膚炎モデルラットの皮膚の遺伝子発現解析

アトピー性皮膚炎（AD）は、かゆみを伴う湿疹を主病変とする疾患である。患者の多くは、アレルギー性疾患の家族歴・既往歴をもつ。また、IgE抗体を産生しやすい体質をもつ。さらに、皮膚バリアの機能障害が、ADの発症に深く関わっている。我が国では、国民の約1割が罹患していると推定されている（厚労省リウマチ・アレルギー対策委員会）。治療は、抗炎症剤を用いた対症療法が主体であり、完治は難しい。ADのリスクファクターのうち最大のもは家族歴である。この遺伝的要因を明らかにすることで、ADの発症機能の解明や新しい治療法の開発が期待されている。

ADの原因遺伝子を同定する手法として、動物モデルを用いた方法がある。KFRS4ラットは、約6か月齢で、ダニなどの感染なしに、引っ掻き行動を伴う重篤な皮膚炎を自然発症する。また、血中IgEの上昇、皮膚バリアの機能障害が観察される。このように、KFRS4の皮膚炎は、ヒトADに類似しており、ADのモデルとして、発症機構の解明、薬や治療法の開発に貢献すると期待されている（Kuramoto et al., 2015）。

我々は、KFRS4の皮膚炎の発症機序を明らかにするため、薬理学的研究を行っている。具体的には、ヒトのAD治療薬である保湿剤、ステロイド、カルシニューリン阻

害剤（タクロリムス）、及びJanus Kinase（JAK）阻害剤をKFRS4ラットの頸部に塗布し、皮膚炎の抑制効果を評価した。その結果、保湿剤は皮膚炎を抑制しなかったものの、ステロイド、カルシニューリン阻害剤、JAK阻害剤は皮膚炎を顕著に抑制した。このことから、KFRS4ラットの皮膚炎発症には免疫反応が関与していることが示唆された。本研究では、治療試験で得られた皮膚サンプルを対象に遺伝子発現解析を行い、ADモデルにおいて、AD発症、治療に関与する遺伝子・シグナルパスウェイを同定することを目的とする。

無処置、保湿剤、ステロイド、カルシニューリン阻害剤、JAK阻害剤、いずれも3例ずつを用いてRNA-seq解析を行った。主成分分析では、無処置群は他の群に比べ明確に判別できた。無処置群を対照とした場合、発現量が変化していた遺伝子の数は、保湿剤では2309、ステロイドでは2962、カルシニューリン阻害剤では807、JAK阻害剤では2470であった。今後これらの遺伝子を用いてパスウェイ解析等を行い、AD発症、治療に関与する遺伝子・シグナルパスウェイを同定する。本研究の成果により、AD発症を制御する新たな分子経路及び新規分子マーカーの発見が期待できる。

庫本 高志（農学部 動物科学科）

岩田 尚孝（農学部 動物科学科）

ホアン・ヒエウ（大学院農学研究科 動物科学専攻）

井上 裕貴（大学院農学研究科 動物科学専攻）



## 深海性魚類におけるロドプシン遺伝子の多様性について

地球の表面積のおよそ70%が海洋であり、海底面積の93%を水深200m以深の深海が占めている。つまり地球の環境の多くの部分は深海で構成されていると言っても過言ではない。そのような状況の中で日本列島という地理に目を向けると日本が世界有数の深海保有国であることがわかる。日本列島の太平洋側沖合には太平洋プレートが沈み込んでできた日本・千島・カムチャツカ海溝が南北に伸びている。これは世界の主要な超深海（水深6,000m以深）23箇所のうち第1位の領域面積271,228km<sup>2</sup>をほこり、第2位のアリューシャン海溝104,409km<sup>2</sup>に2倍以上の大差をつけている（Priede, 2017）。

深海に生息する生物の特徴として、微弱な光環境への適応が挙げられる。太陽から海に降り注いだ光は水深100mでおよそ1%に減少する。水深200mから1,000mの薄明帯に生息する生物はそのわずかな光を利用して進化を遂げてきた。深海での光受容に大きな役割を担うのが網膜の視細胞外節に発現するロドプシン（RH1）遺伝子である（図1A, B）。RH1は微弱な光に反応する感度の高いセンサーでその光波長の吸収極大の範囲も450~500nmと薄明帯に到達する太陽光の青色波長（430~510nm）と合致する。光などはほぼ感じられない薄明帯で視覚を利用する生物は、このRH1遺伝子配列を変化させ、吸収極大波長のチューニングを行い、感度を上げることで深海の厳しい環境に適応し多様化してきた。さらにMusilova et al. (2019)は深海魚類の一部の系統でRH1遺伝子が遺伝子重複し、個々のコピーが突然変異を介して吸収極大波長をチューニングし、青色波長の広い範囲をカバーする多重RH1遺伝子群による視覚を獲得したことを明らかにした。この視覚を有する魚類ではRH1を利用した青色の色覚を獲得し、生物発光と太陽光の違いを見分け、効果的な捕食につなげている可能性が示唆され

た。これは地表の恒常的暗所（洞窟など）に生息する生物でも見られない進化であり、それは生物発光の利用と薄明帯の存在といった深海ならではの特異な光環境がもたらした稀有な生命現象と言える。そしてこの我々にとって稀有な現象は深海生物生態の特別な事例というより、多様で奇抜な生態のごく一端を垣間見たに過ぎないと考えられる。深海は広大でまだまだ未知の部分が多い。今後も深海生物の多様性を探究していくことで、我々が初めて目にする奇想天外な現象がさらに発見されるのではないか。深海研究によって見出される未知の生命現象は我々の知的好奇心を満たすだけでなく我々人類にとって未知の有用な生体材料の発見や生物模倣技術の開発の機会をもたらすと期待される。

本研究は深海性魚類の生態と進化を解明する目的で、それらの網膜上で発現するロドプシン遺伝子の網羅的解析をRNA-seqを用いて行う。材料となる深海魚は静岡県沼津市戸田漁港のトロール船で混獲される未利用魚を漁船に同乗して採集した（図1C）。収集後すぐに研究室に持ち帰り貴重な深海RNAを抽出して解析に用いた。解析に用いる種として、身体に発光器を有している、眼が大きく生態的に視覚を重視している種などを候補に選抜した（図1D）。今後のRNA-seq解析で深海魚の網膜上でのロドプシン遺伝子の発現プロファイルが明らかとなり、それらの光利用に関わる生態の解明が期待される。

### 引用文献

- Priede, I. G. 2017. Deep-sea fishes. Cambridge university press, Cambridge, 492pp.  
Musilova, Z. et al. 2019. Vision using multiple distinct rod opsins in deep-sea fishes. Science 364: 588-592.

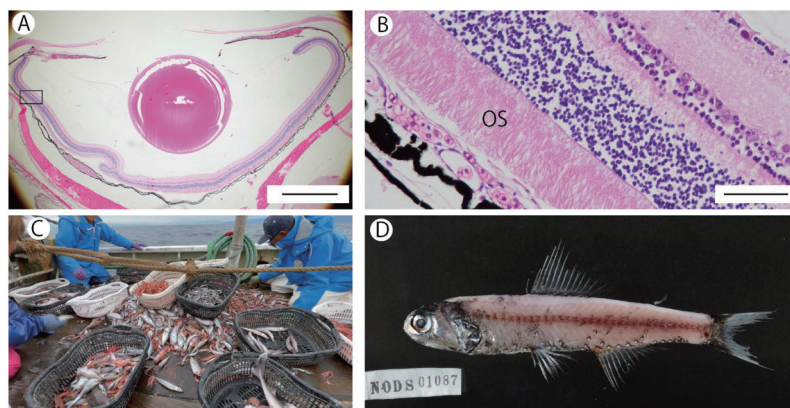


図1 深海魚採集と研究標本

A: ハダカイワシ眼球の組織切片。パネルBで拡大した箇所を四角で囲い示す。右下にスケール1mmを示す。B: パネルAの四角囲い部分の拡大写真。光受容体が発現する外節（OS）を図中に示す。右下にスケール50 $\mu$ mを示す。C: 船上でのサンプリング風景。D: 深海魚ハダカイワシ類の写真。



## タイリクヒメハナカメムシ (*Orius strigicollis*) の 化学感覚受容関連遺伝子の探索

タイリクヒメハナカメムシ (*Orius strigicollis*) はカメムシ目、ハナカメムシ科に分類される体長が約 2mm の小型のカメムシの一種である。ハナカメムシ類は、農業害虫であるアザミウマ類を捕食する天敵昆虫として知られている。特にタイリクヒメハナカメムシはハナカメムシ類の中でも冬期の休眠性が低く、短日条件下でも有効に働くことからアザミウマ類に対する生物農薬として実用化され、果菜類の栽培に利用されている。生物農薬の利点として、化学農薬で問題となる環境に対する影響、農薬の残留、人畜に対する毒性、害虫の薬剤抵抗性の獲得が起こらない点が挙げられる。すなわち、天敵昆虫を利用した生物農薬は環境負荷が低い持続可能な農業において重要な役割を果たすと考えられる。

一方で、生物農薬の欠点の一つとして、圃場への定着が困難であり農薬としての安定性に欠けることが挙げられる。例えば、餌となる害虫の密度が低下すると、生物農薬として放飼した天敵昆虫は圃場から別の場所へと流出してしまう。そのため、生物農薬を恒常的に安定して利用するために、個体の行動を制御する技術開発が望まれている。

タイリクヒメハナカメムシは他の多くの昆虫と同様に、多様な場面における行動選択に化学感覚情報を利用して

いる。そのため、本種の個体が環境中の化学物質の情報を受容、識別するメカニズムを解明できれば、化学物質を利用した行動制御法の確立への道が拓かれる。しかしながら、これまでにタイリクヒメハナカメムシでは化学感覚受容に関連する遺伝子の単離・解析がほとんど行われておらず、その分子機構はほとんどわかっていない。そこで本研究では、タイリクヒメハナカメムシの行動制御技術の開発に向けて、RNAseq による触角、および口器を含む頭部を対象としたトランスクリプトーム解析により化学感覚受容に関与する遺伝子配列を網羅的に同定することを目的とした。

これまでにタイリクヒメハナカメムシの成虫頭部から雌雄別に total RNA を抽出し RNAseq に供試した。今後、得られる RNAseq のデータから化学感覚受容に関連する嗅覚受容体遺伝子、イオントロピック受容体遺伝子、味覚受容体遺伝子、匂い結合タンパク質遺伝子を網羅的に単離するとともに、これらの遺伝子群の機能同定を行い、タイリクヒメハナカメムシの化学感覚受容機構の解明を進めていく予定である。

なお本研究は、内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（管理法人：生研支援センター）によって実施されたものである。



図 本研究で用いたタイリクヒメハナカメムシの成虫



## ヒメツリガネゴケにおけるキチン誘導性細胞死変異体 *ccd1* の原因遺伝子探索

植物は、微生物に共通した構成成分 (Microbe-associated molecular patterns: MAMP) をパターン認識受容体 (PRR) により認識することで MAPK リン酸化カスケードや防御関連遺伝子の発現を活性化することで基礎的抵抗性を発揮する。これまでに、被子植物では MAMP の一つである真菌細胞壁成分のキチンを認識する PRR として CERK1 が報告されている。さらに、基部陸上植物ヒメツリガネゴケにおいても、キチンにより一連の免疫応答が CERK1 を介して誘導されることが報告され、CERK1 を介したキチン応答システムはコケ植物から被子植物の陸上進化過程で普遍的に保存されていることが示唆された。

我々は、被子植物と比較して遺伝的な冗長性が低く、単純な構造からなるヒメツリガネゴケを用いることにより、PRR 下流で機能する因子の同定を目指して研究を進めてきた。これまでに、ヒメツリガネゴケ標準種である Gransden エコタイプ (Gd) に紫外線を照射し、キチン処理後に成長阻害や褐変化などの免疫応答を指標として、WT と比べて成長阻害や褐変化を示さない変異体を複数単離した。WT と比べてキチン処理による淡い褐変化を示し、キチン処理 12 時間以降に細胞死が観察された chitin-induced cell death mutant1 (*ccd1*) の遺伝学的な解析結果について報告する。

ヒメツリガネゴケにおいて、ゲノム情報が公開されている標準種 Gd は自家受精が優先的に行われるので Gd 背景の変異体と他のエコタイプとの掛け合わせは困難であり遺伝学的な解析基盤はほとんど整備されていない。近年、交配能が高いエコタイプとして Reute (Re) が報告され Gd 背景の変異体との交配が可能になった。そこで昨年度 Re ゲノムの解読を行い、今年度は得られた配列情報に基づいてヒメツリガネゴケが保有する 27 本の染色体において、合計 61 セットの Gd と Re を区別するための InDel マーカーを設計した (図 1)。昨年度までに得られていた *ccd1* に Re を 1 回掛戻した個体を用いて、今年度はさらにもう 1 回掛戻し交配を行い、変異形質を示す 150 個体 (*ccd1*BC1F1) を単離した。掛戻しにより Gd 由来の遺伝子領域は全ゲノムの 25% に絞られた。*ccd1*BC1F1 を用いてマッピングを行った結果、第 12 染色体の 5880565 から 6432700 の領域に低い組換え価を得た。5880565 から 6432700 の領域、約 550kb には 48 遺伝子が存在し、昨年度行った *ccd1* ゲノムのリシーケンスによ

り非同義置換を生じる遺伝子が 2 つ存在していた。さらに、今年度は新たに *ccd1* の原因遺伝子探索のために、イネにおける突然変異形質の原因遺伝子を全ゲノム解析により迅速に同定する技術として報告された MutMap 解析を行った。上述の *ccd1* に Re を 2 回掛戻した 150 個体からゲノムを抽出し、均一に混合したゲノム DNA をバルクシーケンスに供し、得られた 75~100 塩基を Re ゲノムにアライメントすることにより共通して Re と異なる原因 SNP をもつ箇所の同定を試みた。シーケンスの結果、35Gb のデータ量を得ることができ、原因遺伝子座位として候補に挙げられた 11 種のコンティグを得ることに成功した。しかしながら、5880565 から 6432700 の領域内の遺伝子には共通した原因 SNP は同定されなかった。この理由として、コケ植物の生活環は半数体の配偶体世代が優勢であり、今回 MutMap 解析には半数体のヒメツリガネゴケ原糸体を使用しているため、150 個体という数が少なかった可能性が考えられた。さらに、ヒメツリガネゴケゲノムは 450Mb であるので、今後はゲノムサイズの 10 倍から十数倍程度のデータ量を得ることで原因 SNP の同定が可能になることを期待したい。

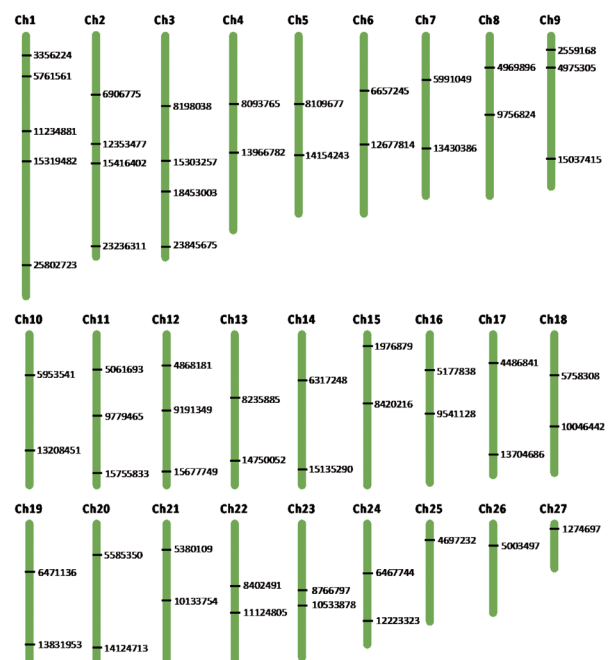


図 1 作成した InDel マーカー



## ワックス量を調整して植物の乾燥・塩・高温耐性を 増強させる仕組みを発見

### 研究背景

近年、世界中で干ばつ・塩害・日照り（高温障害）が多発しており、農業生産に甚大な被害が生じています。これまでに多くの研究者が植物の環境ストレス耐性を向上させるための基礎研究、さらにはその成果を利用した作物育種に取り組んできたものの、未だに応用面で十分な成果が得られていません。その一因として、実際の圃場ではこれらの環境ストレスが複合的に生じるため、単一のストレス耐性増強では不十分であり、幅広い環境変動に適応させる育種戦略の必要性が考えられます。研究グループはこれまでに、数百のシロイヌナズナ野生系統を比較することで、水不足に耐性を示す野生系統を見出し、その水不足耐性の多様性を決定する遺伝子を同定しました (Ariga et al., 2017 Nature Plants)。しかしながら水不足耐性を示す野生系統の耐性メカニズムは不明でした。

### 研究成果

今回、研究グループは水不足耐性を示す野生系統に突然変異処理を施し、水不足耐性が損なわれた突然変異株、*aod2* を単離しました。*aod2* 変異株は野生株と比較して、乾燥・塩・高温と幅広いストレス耐性が損なわれていました。その原因遺伝子を特定したところ、極長鎖脂肪酸合成に寄与するエノイル-CoA 還元酵素をコードする *CER10* 遺伝子であることが分かりました。植物は乾燥や外部からの物理刺激から身を守るために、葉・根・茎をはじめとする植物体全身がクチクラワックス（以後、ワックス）で覆われています。*aod2* 変異株は野生株と比較してワックスが著しく減少していました。

一方、研究グループは数百の遺伝子を個別に過剰発現

させたシロイヌナズナのトランスジェニック植物系統より、水不足耐性が向上したトランスジェニック植物系統のスクリーニングを行いました。その結果、酸化還元酵素のシトクロム P450 をコードする *KLU* 遺伝子を過剰発現させた植物（以後、*KLU* 過剰発現株）が、乾燥・塩・高温耐性を著しく向上させることが分かりました。*KLU* 過剰発現株の葉が野生型と比較して明らかな光沢を示すことから、電子顕微鏡にて植物体表面のワックス構造を確認したところ、野生株と比較して高次なワックス構造を有していることが分かりました。ワックス構成成分である長鎖・極長鎖脂肪酸を定量した結果、野生株と比較して、*aod2* 変異株では減少し、逆に *KLU* 過剰発現株では増加していることが明らかとなりました。またタンパク質の三次元構造予測モデルより、*KLU* は長鎖脂肪酸を基質とし得ることが示唆されました。以上の結果より、植物の乾燥・塩・高温耐性にワックスが必須であること、さらに *KLU* 遺伝子の発現調節によりワックスを増加させて植物の乾燥・塩・高温耐性を増強できることが明らかとなりました。

### 今後の展望

これまでにワックスが乾燥からの水分損失を防ぐことは知られていたものの、本研究により、塩・高温耐性にも寄与することが明らかとなりました。さらに *KLU* 過剰発現株については他のグループから様々な病原菌に抵抗を示すことが報告されています。*KLU* 過剰発現株は発現量に依っては生育遅延を示すため、発現量の厳密なコントロールが求められますが、*KLU* 遺伝子の発現調節によって、幅広い環境変動に適応する作物育種への応用が期待されます。

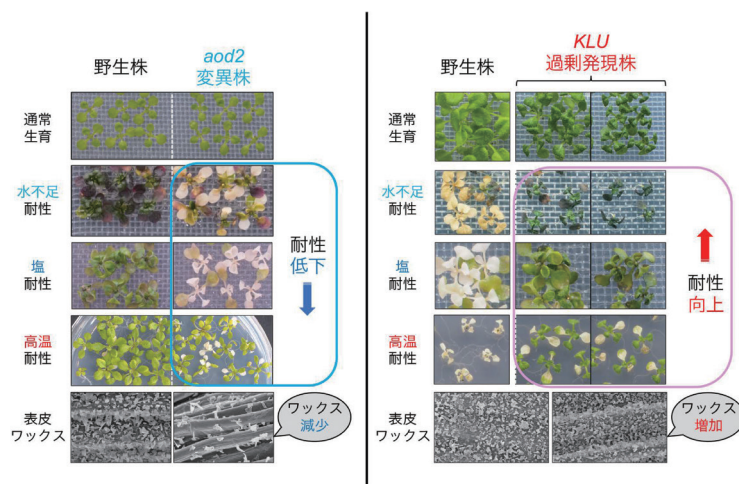


図1 *aod2* 変異株と *KLU* 過剰発現株の水不足・塩・高温耐性評価

左：*aod2* 変異株は、ワックスが減少するため、水不足・塩・高温耐性が野生株と比較して低下する。  
右：*KLU* 過剰発現株は、ワックスが増加するため、水不足・塩・高温耐性が野生株と比較して向上する。

## 昆虫成長制御剤フェノキシカルブの ブラシノステロイドシグナルへの効果の解析

幼若ホルモン (JHs) はほとんどの昆虫において変態や生殖、休眠、行動などの幅広い生理学的プロセスの制御に重要な役割を担っている。フェノキシカルブ (図1) は幼若ホルモン様活性を示す物質として見出され、JH 受容体のアゴニストとして機能する昆虫成長制御剤である。我々はこれまでに種々の生物活性物質の植物における効果を検討してきた。その中でフェノキシカルブが高濃度ではシロイヌナズナに対して暗所での胚軸伸長抑制効果を示すことを見出した (図2)。この伸長抑制効果は同じ JH 受容体のアゴニストとして知られているピリプロキシフェン (図1) では観察されなかったことから、JH 活性ではなく、フェノキシカルブの構造が伸長抑制に重要であることが考えられた。伸長抑制に関わる植物ホルモンとしてジベレリンおよびブラシノステロイドが知られていることから、フェノキシカルブと共処理したところ、

ジベレリンでは胚軸伸長の抑制が回復しなかったが、ブラシノライドにより胚軸伸長が一部回復した。また、ブラシノステロイドシグナルが恒常的に活性化した *bill-D/bzr1-D* 変異体ではフェノキシカルブによる胚軸伸長の抑制が一部解除されたこと、フェノキシカルブ処理により、ブラシノステロイド応答遺伝子の一部の発現量が変化していたことから、フェノキシカルブはブラシノステロイドシグナルになんらかの作用をしていることが示唆された。そこでフェノキシカルブによるブラシノステロイドシグナルへの影響を解析するため、野生型および *bill-D/bzr1-D* 変異体におけるフェノキシカルブ応答遺伝子の取得を目指して RNAseq による網羅的遺伝子発現解析を行った。現在、まだ解析途中ではあるが、解析をすすめることでフェノキシカルブによる植物生長制御機構が明らかになると考えている。



図1 フェノキシカルブ (左) とピリプロキシフェン (右) の構造

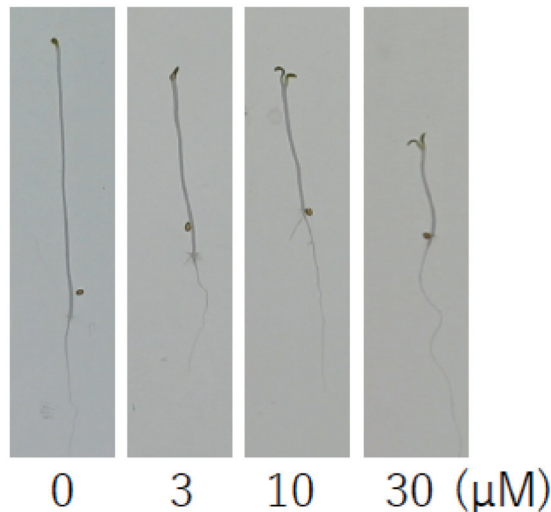


図2 フェノキシカルブによる暗所胚軸伸張抑制効果

## 担子菌酵母 *Trichosporon asahii* の 菌糸生長に関わる遺伝子の探索

酵母の中には、同一の菌でありながら自然環境や周辺の栄養条件の変化に応じて‘酵母型’と‘菌糸型’という二つの異なる形態をとるものがある。菌糸型の生長は、二次代謝産物の生成や、交配、植物やヒトへの病原性等との関連が報告されており、二形性の研究は基礎研究から応用研究に至る重要な課題である。加えて二形性の研究は、酵母型-菌糸型-子実体という菌類の組織形成・分化の課題にとどまらず、菌類の分類体系の中での酵母の位置を解明し、酵母の分類と糸状菌の分類の融合・調和を行っていくためにも重要である。このような重要な課題であるにもかかわらず、二形性の研究には酵母型と菌糸型を自由に遷移することができる菌株が必要であるため担子菌酵母ではあまり行われてこなかった。

*Trichosporon asahii* は、菌類の形態観察で一般的に用いられる YM 寒天培地や YM 液体培地において酵母型と菌糸型の両方の形態をとる二形性の担子菌酵母である。しかし、本株の酵母型と菌糸型の遷移機構の理解や各型での遺伝子の発現状態などはまだ解明されていない。当研究室においては今までに、*T. asahii* の基準株 (JCM 2466) の菌糸生長が富栄養培地に比べて減少する培地条件として Sabouraud 液体培地 (4% グルコース、1% バクトペプトン) を独自に見出した (青木ら、投稿中)。Sabouraud 液体培地の中で菌糸が十分に生長するために必要

な生育因子を酵母窒素ベースの内容物から探したところ、硫酸マグネシウムの添加により菌糸が十分に誘導されることを見つけた (青木ら、投稿中)。マグネシウムは、細胞内のシグナル伝達やミトコンドリア機能などに関わるため細胞にとって欠くことのできないミネラルであり、中でも RNA ポリメラーゼの機能に関与することが報告されているため、培地に硫酸マグネシウムを加えたことにより、菌糸の生長に関わる遺伝子の発現を促進した可能性が考えられた。

本研究では、*T. asahii* JCM 2466 を 1) Sabouraud 培地、2) Sabouraud 培地に硫酸マグネシウムを加えた培地、3) Sabouraud 培地に硫酸マグネシウムを除いた酵母窒素ベースを加えた培地 (硫酸マグネシウム以外の補因子を培地に加えたコントロールサンプル) の 3 種類の条件で培養した後、細胞から RNA を抽出して RNA-seq 解析を行った。その結果、発現が有意に変動した遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子の機能から、硫酸マグネシウムを添加することによって、マグネシウムイオンが何らかの経路で細胞膜や細胞壁の構成遺伝子の発現を変化させ、その結果、菌糸が伸長すると考えられた。菌糸の伸長に関わるタンパク質は新規な抗真菌薬のターゲットになり得るため、基礎研究だけでなく応用的にも発展が期待される。

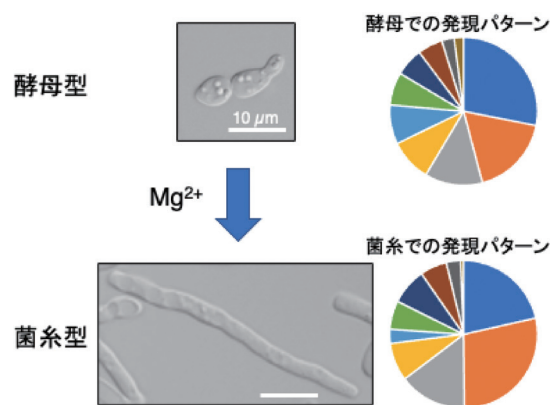


図 *T. asahii* の遺伝子発現の変化の概念図

高島 昌子 (総合研究所 酵母多様性生物学・分類学研究室)  
青木 敬太 (総合研究所 酵母多様性生物学・分類学研究室)  
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

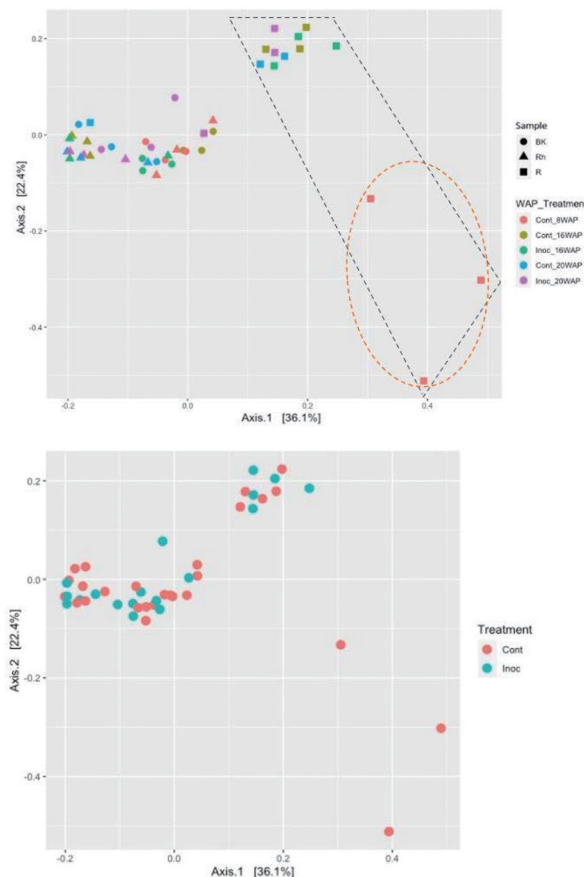
杉田 隆 (明治薬科大学 微生物学研究室)  
田中 尚人 (生命科学部 分子微生物学科)

## 窒素固定細菌の合成細菌群の接種によるヤマイモ (*Dioscorea alata* L.) 固有の根内部および根圏細菌群集の置換

植物成長促進細菌 (PGPB) は、化学肥料がもたらす富栄養化の環境問題に対する持続可能な解決策として関心を集めている。しかし、PGPB が宿主植物に常に共生するとは限らず、植物の定常細菌叢として定着せず、植物の成長促進効果を発揮しない場合がある。この問題を解決するために、先行研究でヤマイモから分離され、ヤマイモの細菌叢で 1% 以上の優占的な存在量を示した属に属する 5 種の窒素固定細菌 (NFB-SynCom) を選択し、それらの植物成長促進効果を検討した。ヤマイモ (*Dioscorea alata* L. cv. A-19) は、温室条件下で植え付け後 10 週目と 12 週目で NFB-SynCom を 2 回接種した。その後、根、根圏、およびバルク土壌サンプルの細菌群集は、16S rRNA アンプリコン シーケンスで解析した。細菌無接種植物と比較して、NFB-SynCom を接種した植物は主に属レベルで、細菌構造が変化した。細菌叢に与える接種効果は、植え付け後 16 週目の根の細菌叢で明らかに見られ、細菌無接種植物と比較して、NFB-SynCom の属が上位 35 属で見られ、優占していた。しかし、成長パラメーターまたは窒素含有量のいずれにも細菌無接

種植物と比較して、有意差は観察されなかった。植え付け後、20 週目で、接種された根において、NFB-SynCom にも含まれている *Stenotrophomonas* の優占度が低下し、接種効果の低下が示された。興味深いことに、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* clade のみがすべてのサンプルで優占属 (>1% 相対存在量) であり、この clade に関連する細菌がヤマイモの成長に不可欠なコアバクテリアであることを示唆している。本研究は、NFB-SynCom をヤマイモに接種することで、ヤマイモの固有の細菌群集中に NFB-SynCom が加わり、接種後数週間でその改変群集中の *Stenotrophomonas* の影響が減少することを示す。

Liswadiratanakul *et al.*, (2023) Replacement of Water Yam (*Dioscorea alata* L.) Indigenous Root Endophytes and Rhizosphere Bacterial Communities via Inoculation with a Synthetic Bacterial Community of Dominant Nitrogen-Fixing Bacteria. *Front. Microbiol.* 14:1060239.



山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)  
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)  
志和地弘信 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)



## 過酷な環境から単離した微細藻類の全ゲノム解析

通常の光合成生物は強光照射下で乾燥や高塩分、高温などの環境ストレスに晒されると、光酸化ストレスにより活性酸素種の発生が促進され、枯死に至る。当研究グループでは通常の植物が生存できない砂漠環境などの過酷な環境から微細藻類を単離し、そのストレス耐性能について調査している。農大前の真夏のアスファルト表面から単離した新種の微細藻類 *Coelastrella astaxanthina* は光酸化ストレス環境下で、真核光合成生物からは未発見であった水溶性アスタキサンチン結合タンパク質 AstaP を生産し、長期間生存した (Kawasaki et. al. *PCP* 2013, Kawasaki et. al. *Phycol. Res.* 2020)。さらに本藻類は、同ストレス環境下にありながら光合成活性を回復させる能力を有していた (Toyoshima et. al. *Algal Res.* 2020)。我々は、これら単離藻類のユニークな生存戦略に興味を持ち研究を進めている。

非モデル生物、特に自然界から単離した新種などは遺伝学的情報が整備されておらず、解析手段が限られている。そこで、本学ゲノムセンターにご協力いただき、これまでに RNA-seq データと CLC genomics workbench を併用した de novo の cDNA ライブラリの作成を試みてきた。取得された cDNA 情報から *astaP* 遺伝子の全長配列が明らかとなり、近縁藻類に分布しているオルソログに関して、同様に配列が取得されてきた (Kawasaki

et. al. *commun. Biol.* 2020, Toyoshima et. al. *Marine Drugs* 2021)。その解析の中でこれら藻類に特徴的な *astaP* 遺伝子と協奏的に発現する機能未知遺伝子群が検出され、その発現制御系に興味を持たれた。一方でその配列情報は部分的なものも多く、詳細な解析には至っていない。そこで本研究では、当研究グループで単離した *AstaP* 生産藻類 3 株の全ゲノム解読を目指した。

通常、真核藻類はそのゲノムサイズやリピートの多さから、ドラフトゲノムであっても登録されている生物種が限られているのが現状である。そこで本学ゲノムセンター所有のショートリードシーケンサー illumina NextSeq、及び生命科学部分子微生物学科所有のロングリードシーケンサー Nanopore GridION を用いて取得したデータをハイブリッドアセンブリにてドラフトゲノムを構築した。その結果、単離株 3 株の推定ゲノムサイズは、約 120 Mbp、遺伝子数は約 20,000 個と既報の近縁藻類と類似した結果を得た。また、今回の解析により一部の株では 1 種類しか生産しないと考えられていた *astaP* 遺伝子がゲノム上に複数存在し、過去に取得した RNA-seq データと照合したところ、それらが光酸化ストレスにตอบสนองして発現していることが明らかとなった。現在は得られたゲノム情報を元にプロモーター領域の解析や、近縁藻類のストレス感受性藻類との比較ゲノム解析を進めている。

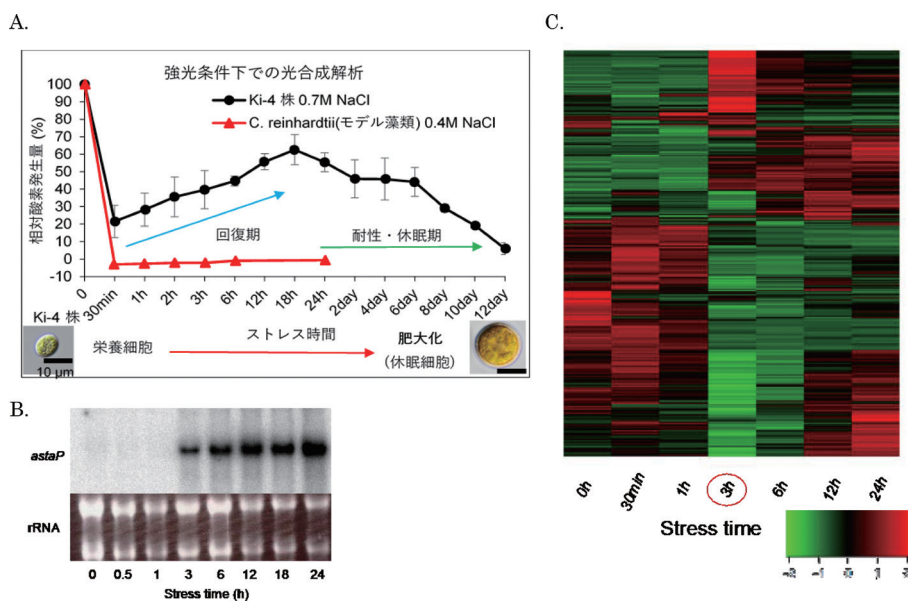


図 *Coelastrella astaxanthina* Ki-4 の光酸化ストレス耐性能と遺伝子発現変動

- (A) Ki-4 とモデル藻類の光合成活性測定 (相対値)。Ki-4 の光合成活性はモデル藻類が失活する環境でも回復維持される。  
 (B) Ki-4 *astaP* mRNA 発現解析。  
 (C) Ki-4 のトランスクリプトーム解析。*astaP* を含む遺伝子群がストレス 3 時間で顕著に発現上昇される。

## 微生物における遊離フラビン関与の鉄代謝

鉄は、生物の生育に必須の元素であるが、不溶の酸化鉄（水酸化）で自然界に存在する。そのため鉄の還元可溶性が生物の必須反応となる。還元 2 価鉄は、強毒性ヒドロキシルラジカルを生成するため、鉄還元反応は、鉄利用と鉄毒性の 2 面性を持つ（図 1）。通常のフラビン（FAD, FMN）は酵素に結合して機能するが、遊離フラビンの鉄還元反応が報告されており<sup>1)</sup>、遊離フラビンの原核生物から真核生物までの存在が報告されるが<sup>1)</sup>、鉄還元への寄与は不明である。解析が難しい理由として、鉄が呼吸鎖に寄与して生存に必須のため、鉄利用と鉄毒性の分別解析の難しさが挙げられる。

2002 年、Imlay らは *E. coli* フラビン還元酵素遺伝子ノックアウト株の呼吸鎖への電子の流れを KCN で制御し、鉄還元への遊離フラビンの関与を提案した。申請者らは、KCN は呼吸鎖以外にも阻害活性を示すため、阻害効果の解析が難しいと考え、更に *E. coli* にフラビン還元酵素と命名される以外の複数の遊離フラビンを還元する酵素を見いだしている<sup>2)</sup>。そこで、以下の 2 視点から“微生物における遊離フラビン関与の鉄代謝解明”を試みる。

- ・実験系：KCN を使用しない呼吸鎖の阻害効果（余剰電子発生）として、好気培養から嫌気培養への切り替え培養を用いる。
- ・供試菌：NADH を電子供与体とする単一の遊離フラビン還元酵素を持つ *Amphibacillus xylanus*（図 2）を用いる。

*A. xylanus* は好気・嫌気条件で同等に良好生育する酸素耐性菌嫌気性菌で、呼吸鎖を欠如するが、好氣的生育に鉄を要求し、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<sup>3)</sup>。*A. xylanus* では、遊離フラビン還元活性を有する NADH oxidase-Prx 系<sup>4)</sup>が鉄・酸素代謝に関与している<sup>3)</sup>。本菌は好気・嫌気の両条件下で過剰電子を生成しない 2 代謝系を有するため、両条件下で良好に生育し、嫌気から好気条件への切り替え培養でも良好生育を維持するが、好気から嫌気条件へでは、著しい生育低下“嫌気ストレス”が観察され（図 2）、切り替え

培養後に著しい遊離 Fe<sup>2+</sup> の増加、生育回復時に遊離 Fe<sup>2+</sup> の減少が観察された。本菌はアルカリ性菌で糖源褐変のため、培養時に糖添加を行っている。グルコース添加時に遺伝子発現変化が観察され、糖添加後の切り替え培養 RNAseq 解析から糖代謝系の変動を観察した（図 3）。鉄関連遺伝子との相関解析中である。

*E. coli* を好気から嫌気へ切り替え培養を行った結果、増殖曲線、生菌数共に増加傾向が観察された。*E. coli* には、鉄をキレートするシデロフォアや過酸化脂質を分解する AhpC 系を持つため鉄による生育障害が発生しなかったのではと推定した。シデロフォア遺伝子、*ahpC* 遺伝子をノックアウトした欠損株、 $\Delta entC$ 、 $\Delta entF$ 、 $\Delta ahpC$  の培養を行い増殖曲線と生菌数の実験を行った（図 4）。その結果、野生株と同様の増殖曲線と生菌数の増加傾向が観察され、表現系としての生育障害は観察されなかった（図 5）。

“嫌気ストレス”を受ける *A. xylanus* と“嫌気ストレス”を受けない *E. coli* の比較から、遊離フラビンと鉄代謝（鉄利用、鉄毒性）の機構解明を試みたい。

- (1) T. Suzuki *et al.*, Free flavin participates in iron and also oxygen metabolism in bacteria. *J. Bacteriol. Parasitol.*, **11**, 1-7 (2020)
- (2) J. Satoh *et al.*, Free flavins accelerate release of ferrous iron from iron storage proteins by both free flavin-dependent and -independent ferric reductases in *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **65**, 308-315 (2019)
- (3) S. Kimata *et al.*, Intracellular free flavin and its associated enzymes participate in oxygen and iron metabolism in *Amphibacillus xylanus* lacking a respiratory chain. *FEBS Open Bio*, **8**, 947-961 (2018)
- (4) T. Arai *et al.*, NADH oxidase and alkyl hydroperoxidase reductase subunit C (peroxiredoxin) from *Amphibacillus xylanus* form an oligomeric assembly. *FEBS Open Bio*, **5**, 124-131 (2015)

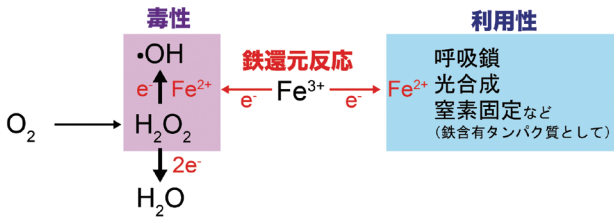


図1 鉄還元反応の2面性

供試菌	生育		呼吸鎖	好気→嫌気 生育阻害	遊離フラビン
	好気	嫌気			
酸素耐性嫌気性菌 <i>A. xyloxydans</i>	+	+	-	+	+
通性好気性菌 <i>E. coli</i>	+	+	+	-	+

図2 *A. xyloxydans* と *E. coli* の特徴

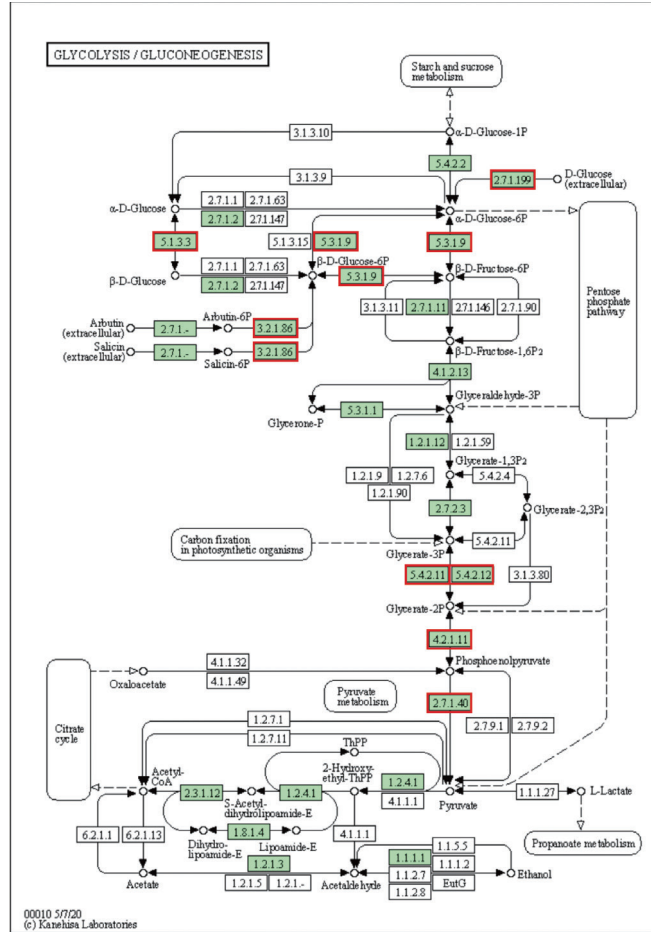


図3 “嫌気ストレス” 解糖系遺伝子変化

緑色は *A. xyloxydans* ゲノム上に遺伝子が予測された酵素。  
 赤色は糖添加後の切り替え培養で発現量の変動に有意差が見られた酵素。

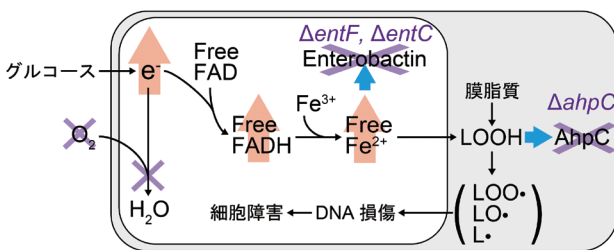


図4 *E. coli* 遺伝子欠損株

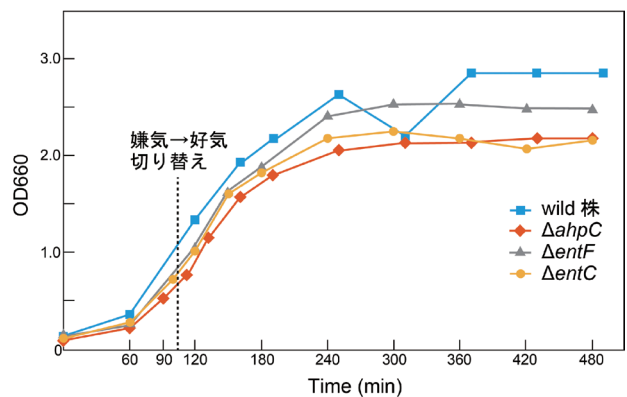


図5 “嫌気ストレス” 時の *E. coli* 遺伝子欠損株の生育



## 様々な発酵環境から単離された産業微生物の大規模ドラフトゲノムシーケンス

*Latilactobacillus sakei* は清酒醸造における生酛系酒母中で有用な働きをする乳酸菌である。一方で、本菌は酒母以外にもキムチや食肉などの多様な食品にも存在しており、本研究室でも自家製梅干しから分離されてきている。梅干しは酒母と比べ糖質の構成やクエン酸をはじめとする有機酸量などが大きく異なる。そのため、本菌は分離源の環境に適合した生理を発現している可能性が考えられる。そこで本研究では梅干し由来株と酒母由来の基準株および東京農業大学応用生物科学部菌株保存室 (NRIC) の登録株を比較する事で異なる環境から分離された同種間における生理・ゲノムの特徴について検討した。

炭素源が異なる培地で嫌氣的に 48 時間培養後、HPLC を用いて培養液中の有機酸量を測定し、株ごとの各炭素源に対する資化能を検討した。その結果、炭素源がグルコースまたはフルクトースの場合、全株がホモ乳酸発酵により乳酸のみを生成した。また、炭素源がリンゴ酸の場合では全株がマロラクティック発酵により乳酸を生成した。一方で、炭素源がクエン酸の場合では、梅干し由来株についてのみ顕著なギ酸および酢酸の生成が観察され、クエン酸 1 mol 当たり約 1 mol のギ酸と 2 mol の酢酸を生成した (図 1)。また、全ての酒母由来株がクエン酸を代謝しなかった要因として、クエン酸代謝によって生じるジアセチルによるツワリ香が酒質を害する事から、清酒醸造に適さない株が淘汰された為と推察した。

有機酸の生成 mol 比および、梅干し由来株のゲノム情報に基づきクエン酸利用に関わる代謝経路を予測した。その結果、本菌梅干し由来株は citrate lyase および malate dehydrogenase (oxaloacetate decarboxylating) によりクエン酸を酢酸およびピルビン酸に変換し、さらに、pyruvate - formate lyase、phosphate acetyltransferase、acetate kinase により酢酸および ATP 生成を行う代謝経路が機能する可能性が考えられた。また、推定された代謝

経路では本来乳酸菌が嫌気条件で糖類の炭素源を代謝する際の  $NAD^+ / NADH$  を補酵素とする酸化還元反応が存在しないという特徴があった。一方で、酒母由来株では NRIC 登録株の一部は citrate lyase や malate dehydrogenase の遺伝子を保持していなかったが、基準株や他の NRIC 登録株は同経路を構成する遺伝子群を保持していた。そのため、本菌のクエン酸資化能の有無は、主に転写および発現調節または発現後調節に依ることが推察された。

現在の分類体系において、*L. sakei* は subsp. *sakei* と subsp. *carneus* の 2 つの亜種で構成されている。そこで、上記菌株についてゲノム公開株を含めた *L. sakei* のオルソログ遺伝子の配列に基づく分子進化系統図を作製した (図 2)。その結果、*L. sakei* subsp. *sakei* の基準株を含むクレードは漬物等の植物質からの分離株と酒母由来株が含まれ梅干し由来株はこのクレードの端に位置した。一方で、*L. sakei* subsp. *carneus* の基準株を含むクレードには食肉 (製品) 由来株が多く含まれていた。興味深いことに一部の酒母由来株は両亜種の中間的位置に存在しており、酒母由来株は種内で多様な系統群を構成した。本結果を受け、現在、清酒酒母という生育に係る環境条件を同じくする酒母由来株のゲノムの相同性や差異についての解析を進めている。

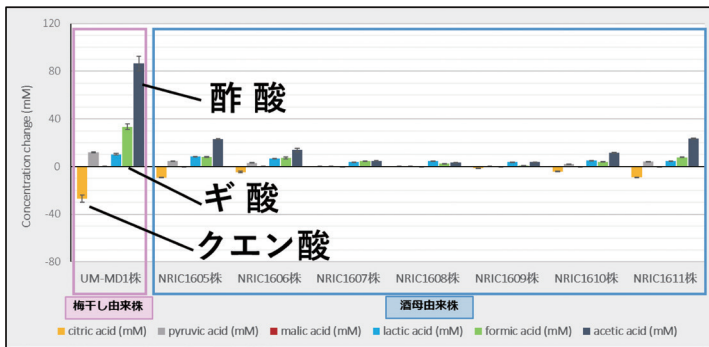


図 1 *Latilactobacillus sakei* 梅干し由来株および酒母由来株のクエン酸資化能

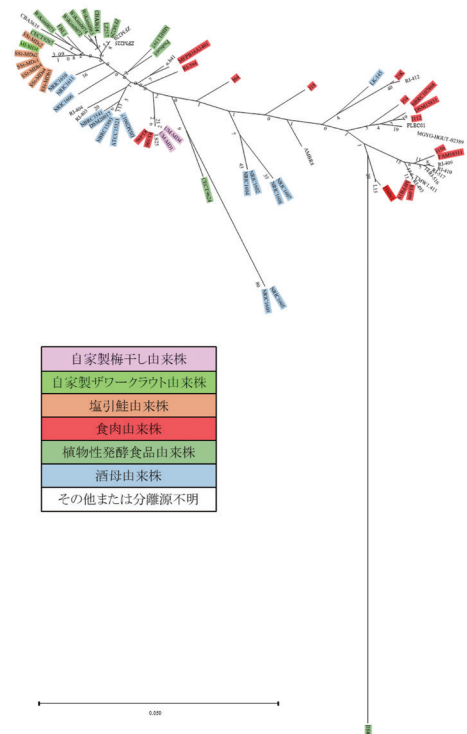


図 2 *Latilactobacillus sakei* のゲノムオルソログ遺伝子に基づく系統樹



## 発泡スチロールを食する昆虫幼虫の腸内で 発現している遺伝子の転写解析の試み

### 【研究背景と目的】

自然界で分解されにくいプラスチックを人類が大量製造・大量廃棄し、それが地球上の海洋やその他の地域を汚染し、その場に居る生物の生存を脅かしている。この事実から脱却するために、自然界で分解されるプラスチックを開発する・プラスチックを使わない、等が提案されている。しかしこれらを実行したところで既に汚染されてしまった環境が元に戻るわけではない。現在地球上に存在する自然界で分解されにくいプラスチックを分解する手段を見つけなければ、プラスチックの環境汚染の真の解決にはならない。

甲虫のチャイロコメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor* Linnaeus) やツヤケシオオゴミムシダマシ (*Zophobas atratus* Fabricius) の幼虫が、自然界で分解されにくいプラスチックの一つで、高分子化合物であるポリスチレンを主成分とする発泡スチロールを食べ養分としているとの報告がある (Y. Yang *et.al.*, Environ. Sci. Technol. 49:12080-12086, 2015; Y. Yang *et.al.*, Science of the Total Environment 708:135233, 2020)。昆虫の幼虫の消化管内で、ポリスチレンが低分子に分解され、体内に吸収されていることになる。このことは、昆虫の幼虫・その腸内生物・腸内微生物のいずれかが、ポリスチレンを低分子に分解する酵素の遺伝子を持ち、発現して発泡スチロールを分解していると考えられた。

これまでに、*T. molitor* の幼虫の腸内細菌に注目し、発泡スチロールを与えて飼育後、民間の受託サービスを使ったメタ 16S 解析を行ったが、腸内細菌の種類・総数ともに少なく、期待される結果は得られなかった。また、同様の方法で幼虫サイズが大きく腸管部分を解剖で取り

出せる *Z. atratus* の幼虫腸管に生息する細菌のメタゲノム解析がオーストラリアのグループにより 2022 年に報告されたが、分解を担う微生物や酵素を明らかにできていない (J. Sun *et.al.*, Microbial Genomics 8:000842, 2022)。

そこで、我々は幼虫個体そのものや腸内生物を含めた発現遺伝子を網羅的に解析することが必要と考えるに至った。今年度はサイズが大きい *Z. atratus* の幼虫 (Jiant Meal Warm) を用い、発泡スチロールを食べた場合のみ発現する遺伝子を次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing 法を用いて網羅的に解析することにした。

### 【材料と方法】

フスマを餌として *Z. atratus* 幼虫の予備飼育を行い、その後ガラスピーカーに 5 匹ずつを入れ、2022 年 9/7~9/24 の期間に室温 27℃・高密度・集団飼育の条件で次の 3 試験区 a) ~ c) で飼育した。飼育期間中に、a) コムギフスマ + 水、b) 発泡スチロールブロック + 水、c) 水のみ。生育状況を知るため、実験区ごと 5 匹まとめて体重測定をした。9/24 に解剖にて腸管部分を取り出し -80℃ 保存した。Maxwell RSC simplyRNA Cells/Tissue Kit を用いて RNA 抽出を行い、平均濃度 209 ng/μl、RINe 値 8.6 の高品質な RNA が得られた。得られた Total RNA から Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit を用いてライブラリー調製を行った。

### 【今後の方針】

NextSeq 500 でシーケンス後、発泡スチロールを餌とした実験区のみで発現している遺伝子の探索を試みる。



図 発泡スチロールブロックで飼育している *Z. atratus* の幼虫

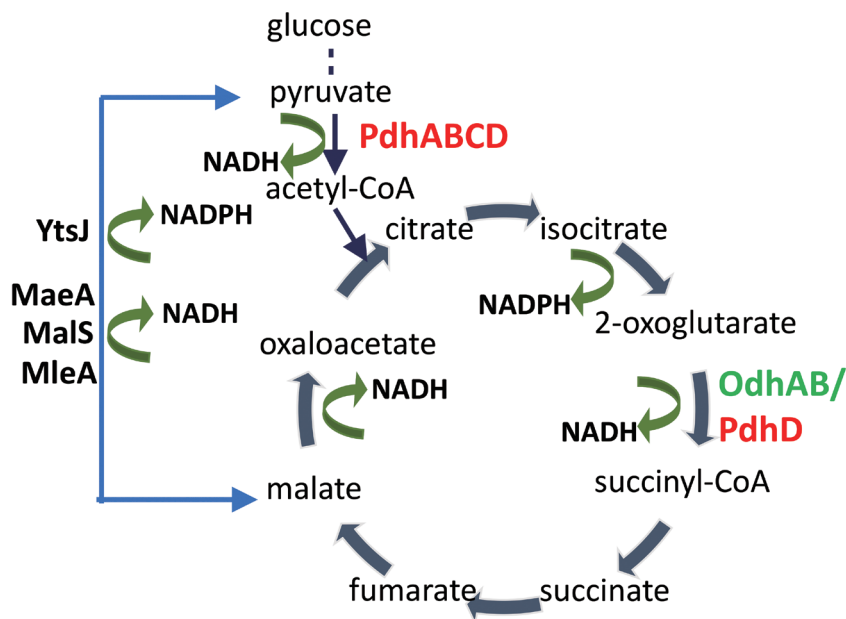
## 中央代謝系が関わる枯草菌の増殖相切り替え機構の解析

真核生物、原核生物を問わず細胞の増殖と分化は連続的な過程だが、切り離して解析されることが多く、細胞内で生じる何らかの変化が両過程の切り替えを促しているはずだが、その機構は未解明と言っても過言ではない。未分化で無限増殖能を持つ多能性幹細胞や、脱分化し異常増殖するがん細胞では、解糖系が活性化している。一方、分化した非増殖細胞ではクエン酸回路・電子伝達系により効率的にエネルギーを得ている。すなわち増殖から非増殖の切り替わりは、解糖系とクエン酸回路という中央代謝の切り替わりと言い換えることができる。

孢子形成土壌細菌の枯草菌はグラム陽性細菌として、大腸菌と並び表されるモデル細菌である。枯草菌では図のように、解糖系においてピルビン酸からアセチル CoA を生じる反応を触媒するピルビン酸脱水素酵素複合体は *pdhABCD* 遺伝子にコードされている。また、クエン酸回路において、2-オキソグルタル酸からサクシニル CoA を生じる反応を触媒する 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体は *odhAB* 遺伝子にコードされている。両複合体のうち、PdhD は共通に使われているタンパク質であり、解糖系からクエン酸回路の切り替えは、PdhD を介した両複合体の切り替えが重要であることが予想される。それらのタンパク質の中で 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体のコアタンパク質である OdhB をコードする *odhB* 遺伝子の欠損は、増殖停止後に定常期に突入した直後に細胞が死滅し溶菌するという、顕著な表現型を示したため、その現象に関わる分子機構を詳細に解析することとした。

2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体の反応によって生じた還元力 NADH のプロトンが ATP 合成に使われる。従って、*odhB* 欠損によりエネルギー不足が細胞内に生じるため、細胞死が起きることが予想される。様々な解析の結果、枯草菌が持つ、リンゴ酸をピルビン酸に変換する 4 つの酵素 (YtsJ, MaeA, MalS, MleA) の働きにより、*odhB* 欠損株においても、リンゴ酸を培地に添加することによって、NAD (P) H が供給され、還元力が回復することがわかった。しかしながら、リンゴ酸添加により、定常期における細胞死は、部分的にしか回復しなかった。このことは、OdhB の機能が、細胞内の還元力・エネルギー恒常性の維持に働く以外に、定常期の細胞の生存を維持する、何らかの機構に関与していることを示唆していると考えた。

その仮説をもとに、*odhB* 欠損株の培養中にリンゴ酸を添加した条件で、定常期の細胞死を回避する、抑圧株の取得を試み、数週間の継代培養により、いくつかの株の取得に成功した。直ちに、次世代シーケンサーによるリシーケンスにより、抑圧に関与することが予想される変異部位を解析した。現在解析中だが、予想と反して、アミノ酸代謝に関係する遺伝子の機能喪失変異が散見された。増殖から非増殖の切り替えには、エネルギー代謝の変換だけでなく、そのエネルギー代謝に関わる OdhB のような一部のタンパク質が、別の代謝経路も連動させる働きをもつ、ち密なネットワークが存在していることが示唆された。



朝井 計 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
 松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

## ヒト毛髪に常在する細菌叢の分布および生態の解明

人体の様々な部位に細菌は棲息しており、特に口内や腸内では微生物叢の解析が広く行われている。また、人の皮膚でも表面に棲息する細菌の微生物叢が詳細に解析されており、採取部位によりその構造が異なることが明らかとなっている。

我々はこれまでにヒト毛髪の毛幹部と毛根部、および頭皮に付着する細菌に着目し、毛髪表面のSEM観察(図1)やコピー数定量(図2)、細菌叢解析を行ってきた。その結果、皮膚や腸内といった他の人体部位同様、ヒト毛髪にも一定量の細菌が常在し、頭皮常在細菌とも関連する個人に特異的で安定な細菌叢を形成していることを明らかにしつつある。さらに、毛髪細菌叢データおよび生活習慣に関するアンケート調査結果を組み合わせた解析により、毛髪細菌叢は2つのクラスターに分類され、性別の他にヘアワックスやヘアカラー剤使用の有無といった生活習慣がクラスター形成に影響することも分かってきた。しかし毛髪細菌の存在や細菌叢に影響する要因が明らかとなってきた一方で、頭皮・毛髪と毛髪細菌との

相互作用については未解明である。そのため現在、毛髪付着細菌の分布と定着様式を広く調査し、生態の解明を目的とした研究を進めている。

本研究の発端となった研究である、犯罪調査におけるヒト脱落毛に付着する細菌群のT-RFLP法による解析では、洗髪等に対してT-RFLPの強度やパターンは安定で、6ヶ月後に採取した毛髪および脱落毛を用いた場合でも8割以上で異同識別が可能であることが明らかとなっている。毛髪は一般的に頭上部を中心に生育しているものの、これまでに報告されてきた細菌叢解析では、頭頂部の毛髪のみが対象とされている。頭部でも頭頂部と額付近、側頭部では皮脂分泌量が異なることが分かっており、毛髪細菌叢に影響を与えることが考えられた。そのため現在、複数の部位から毛髪サンプルを採取しqPCR法による細菌コピー数定量とNGSによる細菌叢解析結果を組み合わせ、採取部位間での変動について解析を進めている。

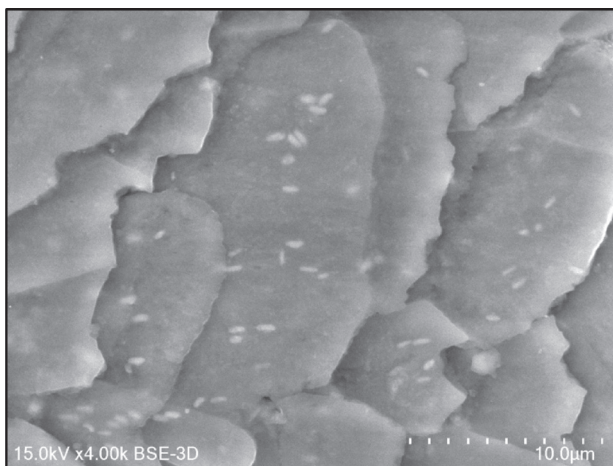


図1 SEMによる毛髪毛幹表面に付着する細菌観察

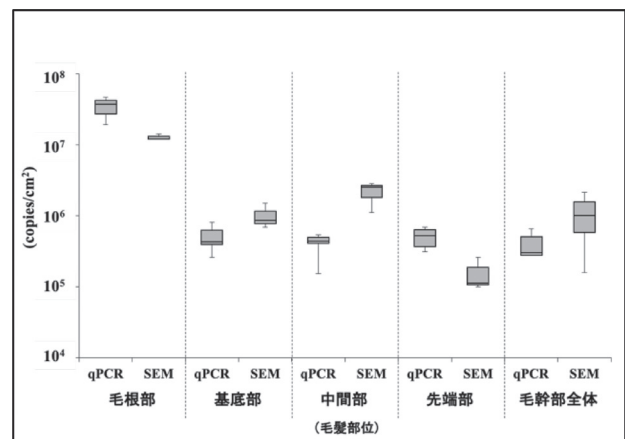


図2 qPCR法およびSEM観察による細菌数定量





## 藍藻における自律複製領域の探索と それを利用した高発現ベクターの構築

CO<sub>2</sub>を固定しつつ炭素化合物を合成する藍藻はカーボンニュートラルな次世代の有用物質生産ホストとして期待できる。これまで産業微生物では遺伝子改変により目的に応じた形質を付与することで、人工代謝経路や所望の形質の導入が行われてきたが、藍藻では利用可能な遺伝子工学ツールが限られているのが現状である。特に藍藻はベクターとして利用可能なプラスミドについての情報が乏しく、その複製機構についても未だに不明な点が多い。

我々は、染色体に加え7つのプラスミドを有するモデル藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 を材料として研究を実施し、新たにプラスミド複製に関わる因子を同定した。

### 1. AR-seq (Autonomous Replication sequencing) 法の確立

藍藻における自律複製領域を網羅的かつ効率的にスクリーニングする手法として AR-seq 法を確立した。PCC 6803 のゲノムライブラリーを構築し、これを異種藍藻である *Synechococcus elongatus* PCC 7942 に形質転換することで、PCC 7942 においても自律複製活性を有する領域をスクリーニングした。その結果、PCC 6803 のプラスミド pCC5.2 に高い複製活性を持つ領域を同定した。本領域には 4600 bp の機能未知遺伝子が含まれており、この遺伝子産物が複製因子 Rep としての機能を有すると考えられた。

### 2. Rep 様タンパク質の系統分類

AR-seq より得られた候補遺伝子に相関した遺伝子を探索した結果、この遺伝子は PCC 6803 や PCC 7942 のみならず、幅広い藍藻において保存され、大きく二つの分類群に大別されることがわかった。そのため、このタンパク質を CyRepA (Cyanobacterial Rep protein A) と命名し、より多くの藍藻種に含まれる系統を CyRepA1、マイナーな系統を CyRepA2 とした。CyRepA 分子系統樹と AlphaFold2 により予測された立体構造を図に示す。AR-seq により取得された遺伝子は CyRepA2 に属しており *Synechocystis*, *Microcystis*, *Crocospaera* など一部の藍藻にのみ保存されることから、CyRepA1 と共通の祖先型 CyRepA より派生

したグループであることが示唆された。

### 3. CyRepA2 の自律複製活性の評価

次に藍藻細胞内における CyRepA2 の自律複製活性を評価した。CyRepA2 と薬剤耐性遺伝子、GFP レポーター遺伝子を連結したベクター pYS を構築し、これを複数の藍藻種にそれぞれ形質転換した。GFP の蛍光やプラスミドの構造により自律複製活性と安定性を解析した結果、pYS は PCC 7942 や PCC 6803 だけでなく、海洋性モデル藍藻である *Synechococcus* sp. PCC 7002 や糸状性藍藻である *Anabaena* sp. PCC 7120 においても安定的に保持されることが示された。特に PCC 7942 では GFP を指標とした場合、染色体での発現系に比べ 10 倍以上の高い発現量が観察された。

このように、CyRepA2 をベースとして構築した pYS ベクターは幅広い藍藻種で維持できるだけでなく、外来遺伝子を高発現にも極めて有用であることが示された。現在は CyRepA1 についても研究を進めており、これら藍藻の Rep についてさらに詳しく研究を進めることで、藍藻のプラスミド複製の基本原則が明らかにできるだけでなく、藍藻工学を促進するための新たなツールの開発が期待できる。

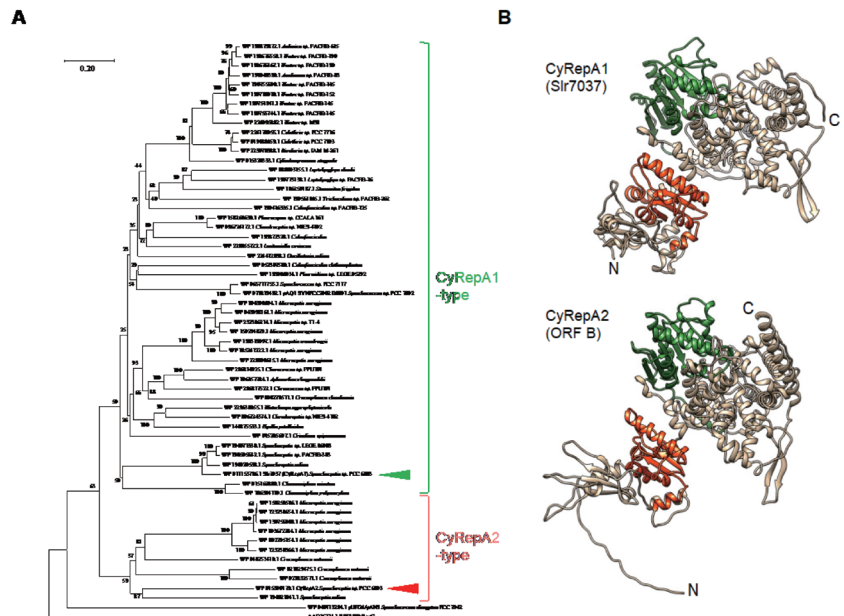


図 CyRepA1 (Sir7037) と CyRep2 (ORF B) の系統樹 (A) と予測構造 (B) CyRepA1 (Sir7037) と CyRepA2 を矢頭で示す。立体構造は AlphaFold2 を用いて予測した。橙色は DUF3854 ドメインを、緑色は DEXDc ドメインを示す。

渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)  
荷村 (松根) かおり (生命科学部 バイオサイエンス学科)

坂巻 裕 (生命科学部 バイオサイエンス専攻)



## 高温メタン発酵法によるポリ乳酸ポリマーの分解過程における微生物学的メカニズムの解析

石油由来のプラスチックの代替としてバイオマス由来のBBP (Bio-based Plastic) または微生物による分解が可能なBDP (Biodegradable plastic, 生分解性プラスチック) など様々な種類のバイオプラスチック (Bio-plastic) の利用が世界的に注目されている。BDPであるPLA (ポリ乳酸) の世界の生産能力は約45万トン/年で、2027年には、PLAの世界年間生産能力は200万トンに達すると推定されている。高温メタン発酵 (TMF) はPLAの処理処分に適した技術とされている。TMFによるPLA分解過程は、ポリマーが解重合による低分子化を受けて単量体の乳酸が生じ、これを従属栄養性の嫌気性細菌群が乳酸、酢酸、水素、二酸化炭素、などに分解し、それらをメタン生成古細菌がメタンガスに変換するものと考えられる。しかしながら、未だその主要な微生物と個々の役割などの微生物学的なメカニズムは明らかになっていない。本研究はTMFによるPLA分解過程における微生物学的な側面を明らかにすることを目的としている。

既に社会実装され食器類などに加工されて利用されているPLA製品とそれらの原料となる高純度PLAをTMFに供し、PLAの分解及びメタン生成特性を評価した。PLA製品 (スプーン、ナイフ、フォークなどの食器類) 53gを破碎後TMFに供した結果、合計15000mlのメタンが生成し、PLA製品の分解率は約95%に達した。次に、微生物の影響を排除したPLAの高温処理と、微生物活性を有するTMFによるPLA処理を比較し、PLA分解に及ぼす物理化学的側面と微生物の寄与度を評価した。高純度のPLAペレットのTMFによる分解特性はPLA製品と同様であった (図1)。一方で、乳酸の蓄積はPLA分解効率の低下に帰着することが強く示唆された。PLA分解過程で乳酸が速やかに消費されることはPLAの物理化学的解重合反応による低分子化速度の維持に重要であることが示唆され、これらを担う乳酸資化性の嫌気性細菌の理解が重要であると考えられた。次に、PLAの分解過程に寄与する微生物群集を分子生物学的手法により解析した。主なメタン生成古細菌は *Methanothermobacter* 属であった。*Methanothermobacter* 属は水素資化性のメタン生成古細菌であることから、PLA分解過程では乳酸分解により生成する水素とCO<sub>2</sub>を消費し、メタンを生成することが示唆された。主要な細菌群は約15属で形成されており、古細菌群の群集構造に比べて高い多様性を示した。また、乳酸塩を基質とした集積培養過程の細菌群集構造との比較から、乳酸分解過程に関わると考えられる特徴的な細菌群は *Defluviitoga* 属、*Anaerostipes* 属、*Tepidimicrobium* 属と *Jonquetella* 属であることを明らかにした。これらはPLAの解重合後に生成

する乳酸を消費し、水素やCO<sub>2</sub>および酢酸などを生成している可能性が考えられた。本研究では培養法によりこの微生物群から *Tepidimicrobium xylanilyticum* を単離し、EN5CB1株とした。過去の知見では *T. xylanilyticum* には乳酸資化性が無いことが示されていたことからEN5CB1株の生理化学特性を詳細に解析した結果、EN5CB1株は *T. xylanilyticum* の基準株と異なり高い乳酸資化性を示した。また、この時の代謝産物は酢酸、水素、二酸化炭素だった。メタン生成古細菌は主に、水素と二酸化炭素を利用するタイプと、酢酸を利用する二つのタイプに分かれることから、*T. xylanilyticum* EN5CB1株はPLA分解過程で乳酸を消費して両タイプのメタン生成古細菌に基質を供給することができる重要な微生物であると考えられる。本研究で明らかになった *Tepidimicrobium* 属の乳酸資化性と水素および酢酸生成能は、TMFの微生物生態系解析の新たな考察に寄与すると考えられる。また、*Tepidimicrobium* 属を用いたPLA分解の高速化やメタン変換効率の改善などの応用技術開発も期待できる。現在、*T. xylanilyticum* EN5CB1株のゲノム解析を実施し、乳酸を含む炭素源の代謝経路と主要遺伝子について解析中である。

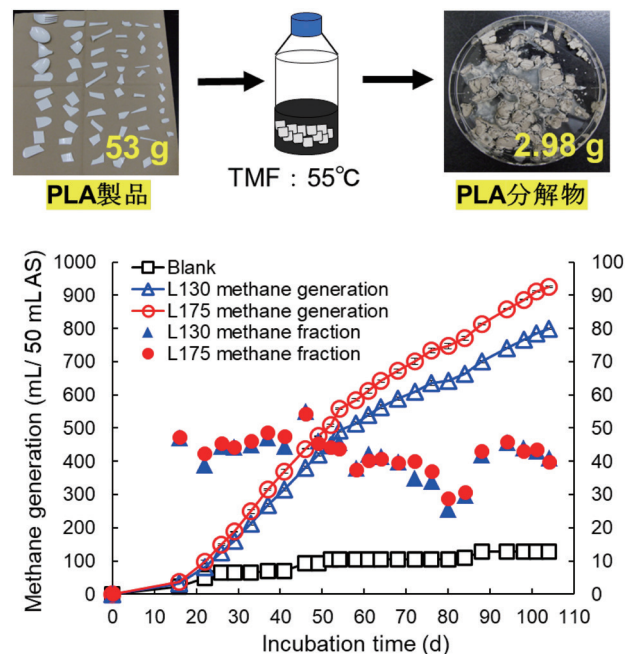


図1 高温メタン発酵によるPLA製品と高純度PLAの分解特性

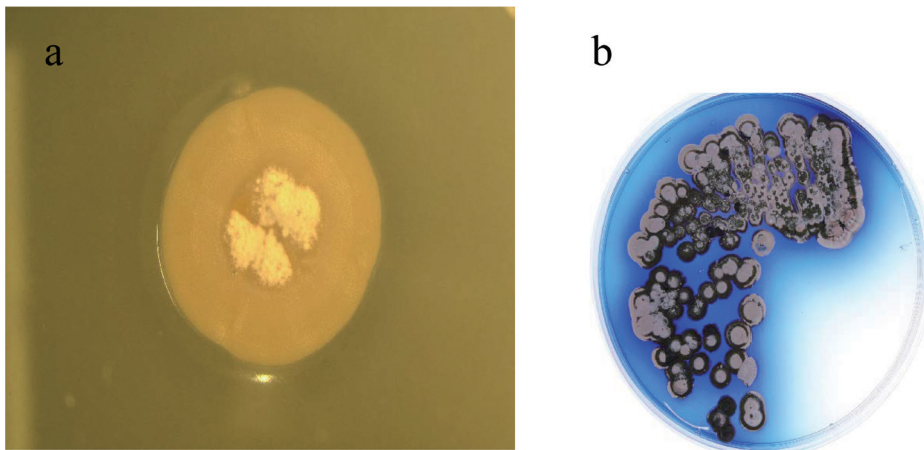
## *Streptomyces coelicolor* A3 (2) における NO 誘導遺伝子群の探索

*Streptomyces coelicolor* は土壤中に生息する放線菌の一種であり、グラム陽性菌に分類される真正細菌である。本菌の特徴としては、原核生物でありながら菌糸や胞子を形成するカビに似た生育形態を持つ。またこれまでに明らかになった抗生物質のうち大部分は放線菌に由来することが知られており、このような多種多様な 2 次代謝産物の生産と複雑な形態分化の 2 大特徴を持つ。そのため放線菌は基礎研究、応用研究の両面において非常に興味深い菌群に位置付けられている。

近年、遺伝学的に特徴が判明している種である放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3 (2) M145 は、硝酸還元酵素 (Nar) と一酸化窒素 (NO) ジオキシゲナーゼ Flavohe-

moglobin (Fhb) を介して硝酸、亜硝酸、NO を生産する窒素酸化物代謝サイクルが見出された。NO はシグナル分子として恒常的に用いられており、これまでの研究により放線菌の形態分化や抗生物質生産を制御することが明らかとなった。しかし NO 生産能およびそのシグナリング機能はほとんど報告がなく細胞内 NO 濃度の制御メカニズムの詳細は不明である。

本研究では、NO 低生産株を用いて培養初期、中期、後期の菌体から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析を実施している。現在、各培養段階で特異的に変動する遺伝子を抽出し、NO 依存性遺伝子の特定を試みている。



a: *Streptomyces coelicolor* A3 (2) の胞子形成  
b: *Streptomyces coelicolor* A3 (2) の抗生物質生産

## 研究発表実績

### 論文発表

- Aoki S, Inoue Y, Shinozawa A, Tanaka K, Shirasuna K, Iwata H.  
miR-17-5p in bovine oviductal fluid affects embryo development.  
*Mol. Cell Endocrinol.* 551:111651. (2022)
- Fukuda N, Oshima Y, Ariga H, Kajino T, Koyama T, Yaguchi Y, Tanaka K, Yotsui I, Sakata Y, Taji T.  
*ECERIFERUM 10* Encoding an Enoyl-CoA Reductase Plays a Crucial Role in Osmotolerance and Cuticular Wax Loading in Arabidopsis.  
*Front Plant Sci.* 13:898317. (2022)
- Hirota R, Katsuura ZI, Momokawa N, Murakami H, Watanabe S, Ishida T, Ikeda T, Funabashi H, Kuroda A.  
Gatekeeper Residue Replacement in a Phosphite Transporter Enhances Mutational Robustness of the Biocontainment Strategy.  
*ACS Synth Biol.* 11 (10):3397-3404. (2022)
- Ito S, Braguy J, Wang JY, Yoda A, Fiorilli V, Takahashi I, Jamil M, Felemban A, Miyazaki S, Mazzarella T, Chen G-TE, Shinozawa A, Balakrishna A, Berqdar L, Rajan C, Ali S, Haider I, Sasaki Y, Yajima S, Akiyama K, Lanfranco L, Zurbruggen MD, Nomura T, Asami T, Al-Babili S.  
Canonical strigolactones are not the major determinant of tillering but important rhizospheric signals in rice.  
*Sci Adv.* 8 (44):eadd1278. (2022)
- Jahan A, Yamazaki Y, Islam M, Ghosh TK, Yoshimura N, Kato H, Ishizaki K, Shinozawa A, Sakata Y, Takezawa D.  
Differential regulations of abscisic acid-induced desiccation tolerance and vegetative dormancy by group B3 Raf kinases in liverworts.  
*Front Plant Sci.* 28:13:952820. (2022)
- Kajino T, Yamaguchi M, Oshima Y, Nakamura A, Narushima J, Yaguchi Y, Yotsui I, Sakata Y, Taji T.  
KLU/CYP78A5, a cytochrome P450 monooxygenase identified via FOX hunting, contributes to cuticle biosynthesis and improves various abiotic stress tolerances.  
*Frontiers in Plant Science.* 13: 904121. (2022)
- Kihara S, Yamamoto K, Hisatomi A, Shiwa Y, Chu CC, Takada K, Ouyabe M, Pachakkil B, Kikuno H, Tanaka N, Shiwachi H.  
Bacterial Community of Water Yam (*Dioscorea alata* L.) cv. A-19.  
*Microbes Environ.* 37 (2):ME21062. (2022)
- Mitsui Y, Sato C, Chiba S, Tsuchiyama T, Fuchino K, Asano Y, Tanaka K, Miyamoto F.  
Development and Characterization of EST-SSR Markers for *Tephroses furusei* (Kitam.) B. Nord. (Asteraceae) and Cross-species Amplification.  
*Acta Phytotaxon. Geobot.* 73 (1):87-92. (2022)

- **Nagata S, Inoue Y, Sato T, Tanaka K, Shinozawa A, Shirasuna K, Iwata H.**  
Age-associated changes in miRNA profile of bovine follicular fluid.  
*Reproduction*. 164 (5):195-206. (2022)
- **Noguchi T, Hayashi T, Inoue Y, Hara S, Shirasuna K, Iwata H.**  
Predicting of molecules mediating an interaction between bovine embryos and uterine epithelial cells.  
*J. Reprod. Dev.* 68 (5): 318-323. (2022)
- **Suzuki D, Sasaki K, Kumamoto S, Tanaka K, Ogawa H.**  
Dynamic Changes of Gene Expression in Mouse Mural Trophectoderm Regulated by *Cdx2* During Implantation.  
*Front Cell Dev Biol.* 10:945241. (2022)
- **Uchida K, Yamaguchi M, Kanamori K, Ariga H, Isono K, Kajino T, Tanaka K, Saijo Y, Yotsui I, Sakata Y, Taji T.**  
MAP KINASE PHOSPHATASE1 promotes osmotolerance by suppressing PHYTOALEXIN DEFICIENT4-independent immunity.  
*Plant Physiol.* 189 (2):1128-1138. (2022)
- **Unno R, Suzuki T, Osaki Y, Matsutani M, Ishikawa M.**  
Causality Verification for the Correlation between the Presence of Nonstarter Bacteria and Flavor Characteristics in Soft-Type Ripened Cheeses.  
*Microbiol Spectr.* 10 (6):e0289422. (2022)
- **Wakinaka T, Matsutani M, Watanabe J, Mogi Y, Tokuoka M, Ohnishi A.**  
Ribitol-Containing Wall Teichoic Acid of *Tetragenococcus halophilus* Is Targeted by Bacteriophage phiWJ7 as a Binding Receptor.  
*Microbiol Spectr.* 10 (2):e0033622. (2022)
- **Yoshikawa J, Matsutani M, Maeda M, Kashiwagi Y, Maehashi K.**  
*De novo* genome assembly and analysis of *Zalaria* sp. Him3, a novel fructooligosaccharides producing yeast.  
*BMC Genom Data.* 23, 78. (2022)
- **Liswadiratanakul S, Yamamoto K, Mastutani M, Wattanadatsaree V, Kihara S, Shiwa Y, Shiwachi H.**  
Replacement of water yam (*Dioscorea alata* L.) indigenous root endophytes and rhizosphere bacterial communities via inoculation with a synthetic bacterial community of dominant nitrogen-fixing.  
*Front. Microbiol.* 14:1060239. (2023)
- **Hara S, Inoue Y, Aoki S, Tanaka K, Shirasuna K, Iwata H.**  
Beneficial Effect of Polysaccharide Gel Made of Xanthan Gum and Locust Bean Gum on Bovine Oocytes.  
*International Journal of Molecular Science.* 24:3508 (2023)
- **Nakanishi N, Osuka S, Kono T, Kobayashi H, Ikeda S, Bayasula B, Sonehara R, Murakami M, Yoshita S, Miyake N, Muraoka A, Kasahara Y, Murase T, Nakamura T, Goto M, Iwase A, Kajiyama H.**  
Upregulated Ribosomal Pathway Impairs Follicle Development in a Polycystic Ovary Syndrome



Mouse Model: Differential Gene Expression Analysis of Oocytes.

*Reprod Sci. in.press*

- Watanabe S, Stazic D, Georg J, Ohtake S, Sakamaki Y, Numakura M, Asayama M, Chibazakura T, Wilde A, Steglich C, and Hess WR.

Regulation of RNase E during the UV-stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

*mLife.in press*

## 学会・セミナー等での発表

### 2022年8月21-25日

#### 17th International Symposium on Phototrophic Prokaryote (Liverpool)

Yuataka Sakamaki, Kaisei Maeda, Kaori Nimura-Matsune, Taku Chibazakura, Satoru Watanabe  
Development of gene overexpression system based on the broad host range vector in cyanobacteria.

### 2022年8月27日

#### 2022年度日本農芸化学会関東支部大会（東京）

石崎楓佳、荷村（松根）かおり、河野暢明、前田海成、志波優、荒川和晴、渡辺智

藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 ラボストレインにおけるゲノム - プラスミド構造の比較解析

駒形遥、内田小百合、坂巻裕、浦井誠、兼崎友、渡辺智

スピルリナ凝集体形成時に確認されたアルカリバチルス出現メカニズムの解析

坂元和貴、吉川佳奈子、神戸博江、田中寛、渡辺智

単細胞紅藻における自律複製ベクター系の開発

大串航世、末崎裕寛、荷村（松根）かおり、大林龍胆、渡辺智

藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 への DnaA-oriC システムの導入

佐藤瑞穂、川口毅、前田海成、渡辺麻衣、成川礼、池内昌彦、渡辺智

光合成アンテナ色素タンパク質フィコビリソームの人工改変

### 2022年9月15、17-19日

#### 日本植物学会第87回大会（京都）

市橋武、安部優希、太治輝昭、坂田洋一、四井いずみ

ヒメツリガネゴケにおけるキチン誘導性細胞死変異体 (ccd1) の解析

### 2022年10月18-19日

#### NGS EXPO 2022（大阪）

輿石雄一、内山博允、和田健太

新規家禽エミューにおける遺伝マーカーの開発

田中啓介、志波優、矢嶋俊介

東京農業大学 生物資源ゲノム解析センターの活動紹介（2022年度）

細井昂人、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作

ダイズシストセンチュウの宿主認識に関する遺伝子の探索

**2022年10月29日**

**第20回微生物研究会（千葉）**

坂元和貴、吉川佳奈子、神戸博江、田中寛、渡辺智

単細胞紅藻における自律複製ベクター系の開発

駒形遥、内田小百合、坂巻裕、浦井誠、兼崎友、渡辺智

スピルリナ凝集体形成時に確認されたアルカリバチルス出現メカニズムの解析

大串航世、末崎裕寛、荷村（松根）かおり、大林龍胆、渡辺智

藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 への DnaA-oriC システムの導入

山内あずさ、川島玉稀、兼崎友、渡辺智

極限環境藻類ガルデリアの pH ストレス耐性メカニズムに関する研究

**2022年11月30日-12月2日**

**第45回日本分子生物学会年会（千葉）**

青木敬太、松谷峰之介、山本紘輔、眞鍋理一郎、大熊盛也、杉田隆、田中尚人、高島昌子

*Trichosporon asahii* の菌糸の初期生長に関わる因子群の解析

**2022年12月9-10日**

**藍藻の分子生物学 2022（千葉）**

坂巻裕、前田海成、荷村（松根）かおり、千葉櫻拓、渡辺智

藍藻における自律複製領域の探索とそれを利用した高発現ベクターの構築

坂巻裕、高市真一、梅野太輔、伊藤晋作、渡辺智

シアノバクテリア-酵母を用いたストリゴラクトンの効率的生産プラットフォームの構築

佐藤瑞穂、川口毅、前田海成、渡辺麻衣、成川礼、池内昌彦、渡辺智

光捕集タンパク質複合体フィコビリソームの人工改変

石崎楓佳、荷村（松根）かおり、河野暢明、前田海成、志波優、荒川和晴、渡辺智

藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 ラボストレインにおけるゲノム-プラスミド構造の比較解析

駒形遥、内田小百合、坂巻裕、浦井誠、兼崎友、渡辺智

スピルリナ凝集体形成時に確認されたアルカリバチルス出現メカニズムの解析

大串航世、末崎裕寛、荷村（松根）かおり、大林龍胆、渡辺智

藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 への DnaA-oriC システムの導入

今村優香、佐藤瑞穂、渡辺麻衣、渡辺智

フィコビリソームロッドと光化学系 I 超複合体の人工構築の試み

**2022年12月27日**

**Biothermology Workshop（静岡）**

太治輝昭

植物の高温に対する体温調節とレジリエンス機構

**2023年3月10-17日**

**第64回日本植物生理学会年会（宮城）**

市橋武、安部優希、太治輝昭、坂田洋一、四井いずみ

*Physcomitrium patens* におけるキチン誘導性細胞死 (ccd) 変異体の単離および解析

**2023年3月14-17日****日本農芸化学会 2023 年度大会 (オンライン開催)**

小林裕樹、栢森綺音、青木敬太、志波優、藤田信之、杉田隆、田中尚人、高島昌子

ゲノム情報に基づいた担子菌酵母 *Cutaneotrichosporon cavernicola* の種分化の解析

**マスメディア****2022年6月**

太治輝昭

砂漠環境でも育つ植物遺伝子の研究成果が日本経済新聞電子版（2022年6月24日付）に掲載されました。

<https://www.nikkei.com/article/DGXZQOUC23A9JOT20C22A6000000/>

**2022年11月**

石川森夫

American Society for Microbiology

Microbiology Spectrum 誌に掲載された研究論文 ‘Causality verification for the correlation between presence of non-starter bacteria and flavor characteristics in soft-type ripened cheeses’ がアメリカ微生物学会のプレスリリース記事（2022年11月15日付）に選ばれました。

<https://asm.org/Press-Releases/2022/November/New-Discoveries-Could-Improve-Cheese-Production-an>







2023年3月発行

---

**生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター No.10**

学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析拠点

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

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

E-mail : [kyoten-g@nodai.ac.jp](mailto:kyoten-g@nodai.ac.jp) URL : <http://www.nodai-genome.org>

---

**NGRC ニュース No.14**

学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

TEL : 03-5477-2769 FAX : 03-5477-2377

E-mail : [nodaigc@nodai.ac.jp](mailto:nodaigc@nodai.ac.jp) URL : <http://www.nodai-genome.org>