



生物資源ゲノム解析拠点 ニュースレター

2015 No. 3

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

CONTENTS

文部科学省 共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」	
高速 DNA シーケンサーと農学研究の発展	3
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	4
論文発表	5
平成 27 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧	7
採択課題研究紹介	
前期継続採択課題	11
前期新規採択課題	18
後期新規採択課題	27

文部科学省 共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」

高速 DNA シーケンサーと 農学研究の発展

平成 25 年度に始まった生物資源ゲノム解析拠点も 3 年目を終了する時期となりました。東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、平成 20 年に、学内研究の活性化を目的とし運用が始まりました。その後、高速 DNA シーケンサーを用いた研究が広がりを見せる中、非モデル生物を研究対象とする農学分野においてこそ、この技術の利用価値が高まるとの期待のもと、共同利用・共同研究拠点の認定を受け多くの研究者との共同研究を行っています。

毎年 40 ～ 50 件ほどの共同研究課題を採択し、申請者は北海道から九州に至るまで日本全国に渡っています。本ニュースレターでは、平成 27 年度採択課題について研究を紹介頂きました。生物を対象とする研究が、非常に幅広い分野をカバーしていることが伺える興味深い内容であると思います。

一方で、高速 DNA シーケンサーから生成されるデータの解析結果をすぐに成果発表につなげることは容易ではありません。しかし、徐々に論文としての成果が発表されるようになりました。ちょうど今年度は中間評価審査を受ける時期ですが、今までの利用実績や発表された成果をもとに、皆様のご協力を得ながら農学分野の研究発展に資するよう、次の 3 年間に向けて新たに出発できるよう務めていきたいと考えております。

東京農業大学
生物資源ゲノム解析センター
センター長 矢嶋 俊介

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3年を迎えました。本拠点は、農学や生物情報学の専門家を含む運営委員会の下、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、学外の研究者との共同研究を通じて、高速DNAシーケンサーを利用した遺伝情報解析を推進しています。また、共同研究には学内の研究者にも加わって頂き、当センターを中心に学内-学外間で研究者同士の交流を深め、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。

当センターには、Illumina社の高速DNAシーケンサーが設置されており、サンプル調製からこれら装置のオペレーション、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。また、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広範にわたる生物種を対象に様々な研究課題に対応しています。

平成27年度も、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が申請され、採択件数は、初年度から累積すると150件を超えました(図1)。そして、これまでと同じく、全ゲノム解析(De novo DNA-seq、Resequencing)とトランスクリプトーム解析(De novo transcriptome、RNA-seq)を用いた研究課題の申請が多かったため、それに応じて採択件数の8割以上がこれら解析で占めることとなりました(図2)。また、今年度は、初めてTSS-seqやメタゲノム解析を用いた研究課題にも取り組みました。昨年度に導入したRAD-seq、メチローム解析、エクソーム解析に続き、当センターが対応できる解析手法は、着実に増えているといえます。

今年度は、解析サーバーのメモリー増設や新規にソフトウェアやデータベースを導入したことで、当センターは、より充実した解析環境へと整備されました。このことにより、データ解析速度が飛躍的に向上しただけでなく、今まで困難であった高等生物の大規模なゲノム解析が可能となり、また近年の多彩な解析技術にも対応することができるようになりました。今後も、この充実した解析環境の下で様々な研究課題に取り組めることが期待されます。

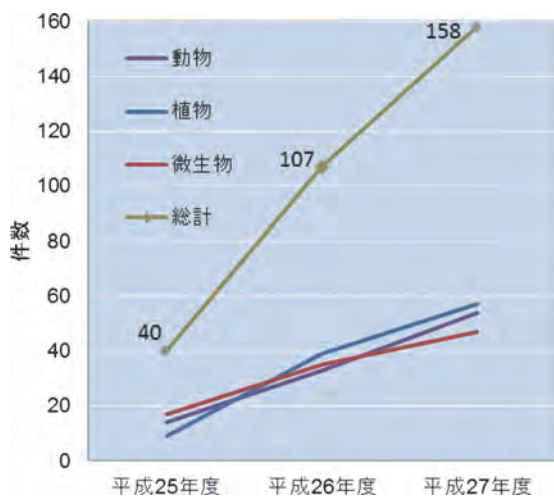


図1 共同利用・共同研究課題件数 (累積)

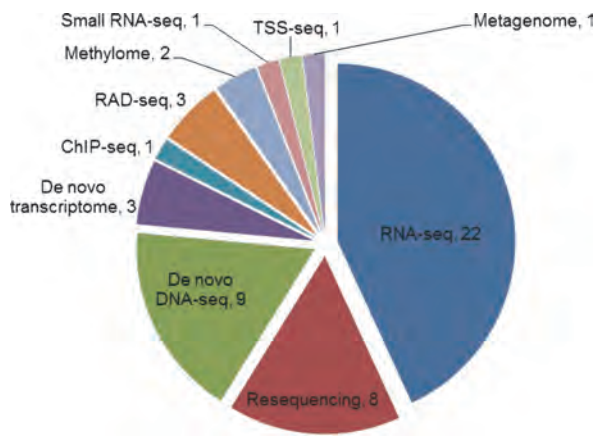


図2 共同研究課題における解析手法

(生物資源ゲノム解析センター 田中啓介)

論文発表

Hirose Y, Fujisawa T, Ohtsubo Y, Katayama M, Misawa N, Wakazuki S, Shimura Y, Nakamura Y, Kawachi M, Yoshikawa H, Eki T, and Kanesaki Y.

Complete genome sequence of cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. NIES-3755.

Genome Announc. in press, doi: 10.1128/genomeA.00090-16. (2016)

Hirose Y, Fujisawa T, Ohtsubo Y, Katayama M, Misawa N, Wakazuki S, Shimura Y, Nakamura Y, Kawachi M, Yoshikawa H, Eki T, and Kanesaki Y.

Complete genome sequence of cyanobacterium *Nostoc* sp. NIES-3756, a potentially useful strain for phytochrome-based bioengineering.

J Biotechnol. 218: 51-52. (2016)

Hirose Y, Fujisawa T, Ohtsubo Y, Katayama M, Misawa N, Wakazuki S, Shimura Y, Nakamura Y, Kawachi M, Yoshikawa H, Eki T, and Kanesaki Y.

Complete genome sequence of cyanobacterium *Fischerella* sp. NIES-3754, providing thermoresistant optogenetic tools.

J Biotechnol. 220: 45-46. (2016)

Kawaguchi M, Nakano Y, Kawahara-Miki R, Inokuchi M, Yorifuji M, Okubo R, Nagasawa T, Hiroi J, Kono T, and Kaneko T.

An evolutionary insight into the hatching strategies of pipefish and seahorse embryos.

J Exp Zool B Mol Dev Evol. in press. (2016)

Osanai-Futahashi M, Tatematsu K-i, Futahashi R, Narukawa J, Takasu Y, Kayukawa T, Shinoda T, Ishige T, Yajima S, Tamura T, Yamamoto K, and Sezutsu H.

Positional cloning of a *Bombyx pink-eyed* white egg locus reveals the major role of cardinal in ommochrome synthesis.

Heredity. 116: 135-145. (2016)

Takahashi J, Wakamiya T, Kiyoshi T, Uchiyama H, Yajima S, Kimura K, and Nomura T.

The complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* (Insecta: Hymenoptera: Apidae).

Mitochondrial DNA Part B. doi: 10.1080/23802359.2016.1144108. (2016)

Furuta Y, Konno M, Osaki T, Yonezawa H, Ishige T, Imai M, Shiwa Y, Shibata-Hatta M, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Kamiya S, and Kobayashi I.

Microevolution of virulence-related genes in *Helicobacter pylori* familial infection.

PLoS One. 10: e0127197. (2015)

Nagaki K, Tanaka K, Yamaji N, Kobayashi H, and Murata M.

Sunflower centromeres consist of a centromere-specific LINE and a chromosome-specific tandem repeat.

Front Plant Sci. 6: 912. (2015)

Sakata T, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Tsurumaru H, and Yamakawa T.

Draft genome of *Bradyrhizobium japonicum* Is-1, which is incompatible with *Rj2* genotype soybeans.

Genome Announc. 3: e01219-15. (2015)

Takemura Y, Kuroki K, Shida Y, Araki S, Takeuchi Y, Tanaka K, Ishige T, Yajima S, and Tamura F.

Comparative transcriptome analysis of the less-dormant Taiwanese pear and the dormant Japanese pear during winter season.

PLoS One. 10: e0139595. (2015)

Toh-E A, Ohkusu M, Li HM, Shimizu K, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, Kawamoto S, Kanesaki Y, Yoshikawa H, and Nishizawa M.

Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*.

Fungal Genet Biol. 80: 19–30. (2015)

Tsurumaru H, Hashimoto S, Okizaki K, Kanesaki Y, Yoshikawa H, and Yamakawa T.

A putative T3SS effector encoded by the *MA20_12780* gene in *Bradyrhizobium japonicum* Is-34 causes the incompatibility with *Rj4* genotype soybeans.

Appl Environ Microbiol. 81: 5812–5819. (2015)

Yamamoto N, Takano T, Tanaka K, Ishige T, Terashima S, Endo C, Kurusu T, Yajima S, Yano K, and Tada Y.

Comprehensive analysis of transcriptome response to salinity stress in the halophytic turf grass *Sporobolus virginicus*.

Front Plant Sci. 6: 241. (2015)

平成 27 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧

平成 27 年度前期継続採択課題一覧

1. 花田耕介（九州工業大学）
「オオハマニンニクのトランスクリプトーム解析」
2. 伊藤秀臣（北海道大学）
「高温ストレス誘導型転移因子の育種への応用」
3. 上村 匡（京都大学）
「害虫を含むショウジョウバエ近縁種を用いた食性依存的な生体応答の比較ゲノミクス」
4. 辻 寛之（横浜市立大学）
「植物生産性を支える幹細胞・分化器官のエピゲノムコミュニケーション」
5. 武田 真（岡山大学）
「オオムギ種子のタンパク質含量を支配する遺伝子群の RNA-seq 解析」
6. 執行正義（山口大学）
「ネギ類の分子育種と機能性開発を目的とした染色体添加系統の遺伝子発現解析」
7. 福澤秀哉（京都大学）
「環境応答遺伝子ネットワークの解明による生産力規定因子の同定」
8. 門多真理子（武蔵野大学）
「乳酸発酵に優れた *Enterococcus mundtii* QU 25 におけるカタボライト抑制メカニズムの解明と解除法の開発」
9. 野尻秀昭（東京大学）
「重要酵素 Rieske oxygenase の機能構造解析のためのゲノム情報基盤の整備」
10. 広瀬 侑（豊橋技術科学大学）
「日本発のシアノバクテリアの新しいゲノムデータベースの構築」

平成 27 年度前期新規採択課題一覧

11. 岡本昌憲（鳥取大学）
「乾燥耐性コムギの包括的分子特徴づけ」
12. 牧野 修（上智大学）
「バクテリオファージ ϕ 29 の感染に抵抗性を持つ枯草菌変異株の探索と解析」
13. 長岐清孝（岡山大学）
「RNA-seq による分散型動原体形成因子の同定」
14. 飯塚 怜（東京大学）
「液滴を利用したシングルセルゲノミクスによる微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の実践」

15. 立石 亮 (日本大学)
「リンゴ果実の収穫後の食感形成に関わる遺伝子群の網羅的解析」
16. 杉田 (小西) 左江子 (香川大学)
「イネ脱粒性遺伝子の栽培化における遺伝子ネットワークの解明」
17. 宮下正弘 (京都大学)
「質量分析データと全トランスクリプトーム情報の融合によるサソリ毒液に含まれる新奇殺虫性ペプチドの効率的探索」
18. 石橋 幸 (大阪府立大学)
「食品や屋内環境を汚染する衛生害虫ヒラタチャタテのゲノミクスに基づく危害性分析」
19. 窪寺恒己 (国立科学博物館)
「次世代シーケンサーを利用した魚類の絶滅種・絶滅個体群の遺伝的多様性解析」
20. 竹内 裕 (東京海洋大学)
「魚類の始原生殖細胞に増殖不全をもたらす遺伝子発現異常の解明～ニベ×シログチ種間交雑魚はなぜ不稔となったのか?～」
21. Diana Buzas (筑波大学)
「DRE2 を介したミトコンドリアと核のエピジェネティックコミュニケーション」
22. 細谷 将 (東京大学)
「性染色体はなぜ移り変わるのか? 誕生直後の性染色体に残された選択の痕跡」
23. 西條雄介 (奈良先端科学技術大学院大学)
「塩馴化処理による植物の免疫応答のプライミング」
24. 高橋遼平 (山梨大学)
「骨資料の損傷と残存 DNA の劣化に関する定量的研究」
25. 山本義治 (岐阜大学)
「シロイヌナズナ、イネの転写開始点解析」

平成 27 年度後期新規採択課題一覧

26. 池田俊太郎 (京都大学)
「ウシ着床前胚において MAT II と相互作用するゲノム領域の探索」
27. 宮本 圭 (近畿大学)
「受精卵の全能性を予測する新技術の開発」
28. 宮竹貴久 (岡山大学)
「貯穀害虫コクヌストモドキ類の対天敵回避行動の系統差を分子レベルで解明する」
29. 平沢 敬 (東京工業大学)
「実験室進化によりグリセロール資化能を賦与した出芽酵母のオミクス解析」
30. 横山栄二 (千葉県衛生研究所)
「牛の腸管出血性大腸菌 O157 保菌制御のための進化系統別変異発生頻度の解析」
31. 酒井達也 (新潟大学)
「根の成長における青色光受容体フォトトロピンの転写制御機構の解析」

32. 野々村賢一 (国立遺伝学研究所)
「イネの生殖器官に特異的な非コード DNA 領域に由来する小分子 RNA の解析」
33. 丹羽隆介 (筑波大学)
「内部寄生蜂感染時の宿主ショウジョウバエのトランスクリプトーム解析」
34. 三上浩司 (北海道大学)
「海産原始紅藻類ウシケノリにおける淡水適応機構のゲノム科学的研究」
35. 川口真理 (上智大学)
「タツノオトシゴの育児嚢の形態形成メカニズム」
36. 門田有希 (岡山大学)
「メタゲノム解析を利用した土壌病害診断バイオマーカーの開発」
37. 山川武夫 (九州大学)
「*Rj₃* ダイズ品種に根粒形成を抑制される根粒菌のゲノム解析」
38. 二橋 亮 (産業技術総合研究所)
「カワトンボの翅色多型の分子基盤」
39. 八丈野孝 (愛媛大学)
「免疫反応を破綻させる植物病原糸状菌エフェクターの同定」
40. 二橋美瑞子 (茨城大学)
「カイコの体色変異体を用いた昆虫の色素合成経路の解明」
41. 田所友美 (横浜市立大学)
「気道の腹側・背側における気道上皮幹細胞の差異」
42. 晝間 敬 (奈良先端科学技術大学院大学)
「リン欠乏条件下におけるコレトリカム属の内生糸状菌による新規植物生長促進機構の解析」
43. 河田雅圭 (東北大学)
「チョウ類のホストレンジを決定する遺伝的基盤の解明」
44. 得平茂樹 (首都大学東京)
「窒素固定型シアノバクテリアを利用したバイオ肥料の開発」
45. 岩上哲史 (筑波大学)
「除草剤抵抗性雑草における急速な除草剤解毒代謝メカニズムの解明」
46. 小林佑理子 (岐阜大学)
「網羅的遺伝子発現ゲノムワイド関連解析を通じたアルミニウム耐性遺伝子群の同定」
47. 佐藤幸恵 (筑波大学)
「ハダニ類における母子交配と血縁構造の解明」
48. 木村 澄 (畜産草地研究所)
「全ゲノム解読データを使用したセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) とニホンミツバチ (*Apis cerana japonica*) の比較ゲノム研究」
49. 鎌田芳彰 (基礎生物学研究所)
「RNAseq 法を用いた細胞内アミノアシル-tRNA の測定法の開発」

50. 渡辺勝敏 (京都大学)

「頻繁な倍数性変化を生じる脊椎動物の遺伝子量補償機構の解明：雌性発生 3 倍体フナのケース」

51. 覚張隆史 (金沢大学)

「東アジアにおける遺跡出土馬の全ミトコンドリア DNA 配列決定」

〈課題番号順〉

採択課題研究紹介

前期継続採択課題

○ オオハマニンニクのトランスクリプトーム解析 ○

ハマニンニク属 (*Leymus*) は、海浜において根茎を形成し、旺盛に生育する多年生植物である。その中でもオオハマニンニクは、バイオマス生産性が高く、乾燥、塩、高温ストレスなどに強いスーパー植物である。これらの形質は、現在の主要穀物では栽培化の過程で失われている重要な形質である。

オオハマニンニクはコムギとの属間交雑が可能であり、オオハマニンニクの染色体を一对保有するコムギ系統（染色体添加系統）が開発された。これらの染色体添加系統には、乾燥耐性および塩ストレス耐性などの有用形質が付与されているものがある。これらの有用形質がどのゲノム領域からもたらされているのかを把握できると、これらの遺伝子を付与した品種を構築することが容易になる。しかしながら、オオハマニンニクのゲノム情報が明らかになっていないために、これらの有用形質がどのような遺伝子によりもたらされているのか明らかにすることは不可能である。そこで、オオハマニンニクの発現遺伝子を利用したマーカー開発を行っている。本研究では、既に把握されている低投入で高生産性を実現する生物的硝化抑制 (BNI)、乾燥耐性および塩ストレス耐性を引き起こす遺伝子が存在するオオハマニンニク染色体 N、I、H を目指す。東京農業大学・生物資源ゲノム解析センターの共同研究では、オオハマニンニク



およびオオハマニンニク染色体 N、I、H が導入されているコムギ系統の全遺伝子の転写配列を決定した。その後の解析で、オオハマニンニク染色体 N、I および H に特異的に発現し、表現形質が強く表れる条件で発現する遺伝子の同定を行っている。

花田耕介 (九州工業大学若手フロンティア研究アカデミー)
共同研究先: 三井裕樹 (農学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

○ 高温ストレス誘導型転移因子の育種への応用 ○

本研究では、あらゆる生物種に広く存在する転移因子 (トランスポゾン) がどのように転移し、いつ増加したのか? というなどを解くために環境ストレスに着目し、環境ストレスがトランスポゾンの活性化の一要因なのではないだろうかという仮説のもと研究を行い、環境ストレスである高温ストレスをシロイヌナズナに与えるとトランスポゾンが活性化することを見つけた。このトランスポゾン「ONSEN」は高温ストレスで転写活性が見られる。また、シロイヌナズナの RNA 干渉を担う遺伝子の変異体では、世代を超えた転移および増殖が観察された。前年度までの共同研究により、次世代シーケンサーを利用したゲノム上の新規挿入領域の特定を行い、ONSEN の特徴として遺伝子内に高頻度で転移することが明らかとなった。このことは、転移先の遺伝子の発現に影響が出る可能性が高いことを示唆している。続いて、シロイヌナズナを用いた再分化個体において次世代シーケンサーを用いた ONSEN の新規挿入配列のマッピングを行った。高温処理したカルスを再分化させたシロイヌナズナ個体の次世代集団の DNA を HiSeq でゲノムを 20x でシーケンスし、無処理のリファレンスシーケンスと比較することで転移先を同定し ONSEN 新規挿入配列についての情報を得ることができた。さらに、ONSEN の転移制御に関わる小分子 RNA を同定するために small RNA seq 解析をおこなった。また、育種上有用な植物であるダイコンを用いて、ONSEN の転移解析を行った。ダイコンでカルス化を誘導し高温処理後に再分化個体を作成した。ONSEN の転移によるダイコンのゲノム構造の変化を HiSeq でゲノムを 20x でシーケンスした。その結果から、トランスポゾンの転移先の特異性について解析した。ONSEN はストレスの有無により人工的に活性化をコントロールすることができる。このトランスポゾンは育種上重要なアブラナ科植

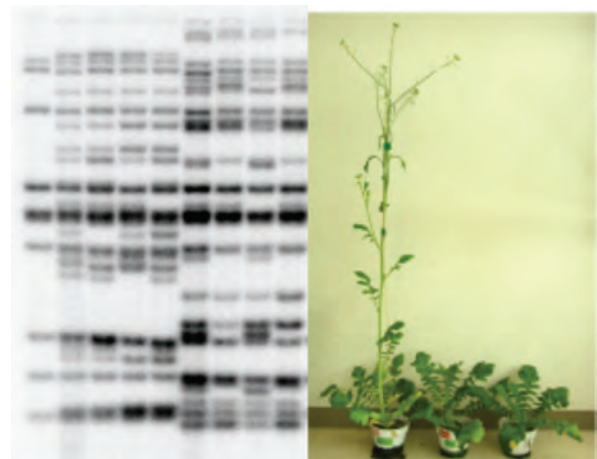


図 再分化個体における ONSEN の転移 (左) と再分化したダイコン (右)

物に広く保存されていることから、ONSEN の転移特性を明らかにすることで ONSEN の作物への応用技術を開発することを目的とした。将来的には ONSEN を利用することで、育種上有用な作物のゲノム改変を誘導し、ONSEN の新たな挿入による新規有用植物の育成につなげる技術の創成を目指している。

伊藤秀臣 (北海道大学大学院理学研究院)
高木宏樹 (岩手生物工学研究センター)
共同研究先: 小林久人 (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)

◎ 栄養バランス変化に適應する生体システムの解明に向けて ◎

キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) は、自然界では全世界の人家近くに生息し、発酵した多種類の果物を食べる広食性の種です。そして、実験室内での飼育では、一時的な絶食などの様々な栄養条件下で発生できます。このような極めて柔軟に発生を調節する能力は、特定の地域にのみ生息し、発酵した単一の植物のみを食べる狭食性のショウジョウバエ近縁種では観察されません。栄養への適應の幅が、種ごとに異なるメカニズムを明らかにするために、私たちは広食性2種と、狭食性3種の食餌依存的な応答を、複数のオミックス解析によって比較しています。

カロリーは同じながら、タンパク質と炭水化物の比が異なる3種類の餌を調製しました。これらの種の幼虫を飼育したところ、広食性種は全てのエサで正常に発生できるのに対して、狭食性種は炭水化物の比率が最も高い餌では、食べてはいるものの蛹まで発生できないことを見出しました。幼虫全身でのRNA-seq解析により、広食性種のみで、炭水化物含有量が高い餌を摂取すると発現上昇する「広食性応答遺伝子」を同定しました。広食性応答遺伝子は、解糖系などの炭水化物代謝経路に属する遺伝子が有意に濃縮していました。また、広食性応答遺伝子の7割近くは、ヘテロクロマチンに分類される領域に位置していました。そこで、広食性種は炭水化物の比率が高いエサに適應して代謝の恒常性を維持するために、食餌依存的にクロマチン構造を変化させる機構を持つものに対して、狭食性種は持たないのではないかと仮説を立てています。実際、幼虫全身の破砕液のGC-MS解析によって代謝産物の食餌間での変化を比較したところ、狭食性の種でのみ、食餌依存的に解糖系など



の代謝産物の変動を検出できました。現在、組織別のRNA-seq解析などによって栄養状態を全身に伝える全身性因子の探索も行っています。

東京農大学生物資源ゲノム解析センターの皆様との共同研究の機会を賜ったことに、厚く御礼申し上げます。

- 上村 匡 (京都大学大学院生命科学研究所)
- 服部佑佳子 (京都大学大学院生命科学研究所)
- 渡辺佳織 (京都大学大学院生命科学研究所)
- 古溝優生 (京都大学大学院生命科学研究所)
- 高橋優喜 (京都大学大学院生命科学研究所)
- 共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
- 内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 植物生産性を支える幹細胞・分化器官のエピゲノムコミュニケーション ◎

植物の地上部全器官は、茎の先端の「茎頂メリステム」と呼ばれる組織から形成される。茎頂メリステムは幹細胞 (自身は未分化性を維持したまま、周囲に分化細胞・組織を提供していく細胞) を含む微小なドーム状組織であり、その活性がいかんによってコントロールされるかによって植物の体制が決定される。すなわち、茎頂メリステムの機能の理解は、器官の発生制御による生産性向上を目指す上で極めて重要な研究対象である。

植物、動物を問わず、幹細胞領域の機能制御を担う重要なメカニズムとして、エピジェネティックな制御機構が挙げられる。中でも重要な役割を果たす制御の一つに、DNAのメチル化修飾を介したシステムがある。DNAのシトシン残基がメチル化修飾を受けると、これを認識するタンパク質が集合してその周辺領域の転写等を抑制する状態を作り出す。DNAがメチル化される仕組みは複数存在するが、特に転移因子のDNAメチル化はsmall RNAを介した仕組みによって生じている。転移因子と配列相同性を有するsmall RNAが、その相同性によってDNAメチル化領域を規定し、DNAメチル化酵素を含む複合体をリクルートするというメカニズムである。

エピジェネティックな解析は発生学の根幹に関わるメカニズムであるため、適切なタイミングに、適切な微小組織を対象に行う必要があった。しかし一般的にこれらの実験は多くの組織

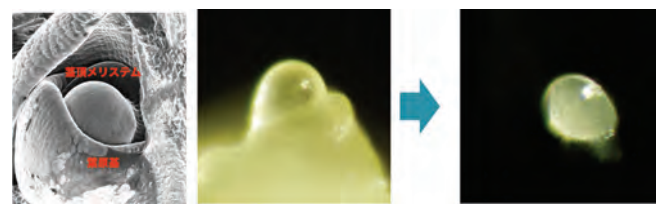


図1 (左) イネ茎頂メリステム (中央のドーム状構造) と葉原基の走査電顕像。(右) 茎頂メリステムのサンプリング技術。

を必要としてきたため、組織特異的な解析は困難であった。

本共同研究では、研究グループがこれまで開発してきた微小組織の解析系を組み合わせ、植物の微小なメリステムを対象としたオミックス解析系を開発する。特に、茎頂メリステムの機能制御とそこからの葉の分化に焦点を合わせ、植物の生産性向上を目指した網羅的・統合的な解析を実施する。

- 辻 寛之 (横浜市立大学木原生物学研究所)
- 共同研究先: 小林久人 (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)

◎ 国産ビールオオムギの高品質化のための遺伝子研究 ◎

ビールの醸造には穂に種子が2列稔る“二条オオムギ”が適しています(図1)。これは種子の粒揃いがよく、発芽が齊一となり良質の麦芽(モルト)が製造できるためです。2千年前の弥生時代に大陸から日本に持ち込まれたオオムギは全て穂に種子が六列稔る“六条オオムギ”で食用には使えても、粒揃いが悪く麦芽製造には適しませんでした。日本人オオムギ育種家達は明治維新以降の百数十年足らずの短期間で日本の高温多湿の風土に適応した実用品種を育成しました。しかし、国産ビールを取り巻く状況は依然厳しく、オオムギ原料価格は国際水準の3倍と高く、これに高い酒税がかかります。生産者も、昨今の気候変動が大きい中、安心して栽培でき、収益のあがる次世代型ビールオオムギ品種の開発を熱望しています。

本研究ではビール品質と関連の深い種子成分である、①フラボノイド色素、②タンパク質および③脂質を制御する遺伝子の特定とそれらの制御遺伝子と相互作用する遺伝子群の解明を目指しています。我々の研究室ではフラボノイド合成系の酵素遺伝子および制御遺伝子の分子実体を次々に明らかにしました。また、穀粒のタンパク質含量を制御する主要な転写因子であるNACエレメント遺伝子の本邦オオムギ品種でのDNA配列変異を解明しました。さらに、オオムギ種子表面に分泌される脂質の生合成がEthylene responsive factor (ERF) 転写因子遺伝子により制御されていることを世界に先駆けて特定しました。このようにオオムギの種子成分を制御する重要な転写因子を多数明らかにしてきましたが、それぞれの転写因子が制御する下流の遺伝子群までは解明できていません。

東京農業大学生物資源ゲノム解析拠点の支援を頂き、RNA-Seqで正常品種と各形質の突然変異系統の発現遺伝子を比較しています。RNAは、受精後2週間目の未熟種子から抽出し、その遺伝子配列を大量に解読・解析して頂きました。膨大な大量データをコンピューターで分析し、遺伝子の発現量が正常型と突然変異体の間で、大きく変動する遺伝子を探索しています。遺伝子がどのように相互作用して、種子の成分量を制御するかを解明し、優良新品種の育成に役立てることを目指しています。



図1 ビール醸造に適した二条オオムギ(左)と食用・飼料用の六条オオムギ(右)の若い穂

武田 真(岡山大学資源植物科学研究所)

共同研究先: 矢嶋俊介(応用生物科学部)

佐々木卓治(総合研究所)

石毛太郎(生物資源ゲノム解析センター)

◎ ネギ属バイオリソースを用いたトランスクリプトーム解析データの活用 ◎

タマネギ (*Allium cepa*)、ネギ (*A. fistulosum*)、ニンニク (*A. sativum*) などの野菜を含むネギ属はゲノムサイズが非常に大きく (タマネギで 15 Gbp)、DNA マーカーの開発、連鎖地図の構築、連鎖地図と染色体の対応付け等の作業に困難を伴うため、それを克服する目的で異種間交雑と染色体倍加を組み合わせたシャロット (*A. cepa* Aggregatum group) 由来単一異種染色体を添加したネギ系統シリーズ (添加系統シリーズ) 等のリソースが開発されてきた。そこで本研究では、開発が進められているネギ属バイオリソースの特徴を活かし、第二世代シーケンサーを用いた RNA-Sequencing を行なうことによりトランスクリプトーム情報を収集し、その情報をメタボロームデータとの統合解析や、ゲノム配列解析に向けた高密度マーカーの開発につなげることを目的として情報整理を行なっている。

まず、我々は、添加系統シリーズを圃場で栽培し、葉身部および葉鞘部 (鱗茎部) の器官別にサンプリングした。これらのサンプルを用いてメタボローム解析を行なうとともに、同じサンプルから RNA を抽出し、Illumina シーケンサーを用いて配列情報を収集した。また、シャロット倍加半数体 (DH) とタマネギ DH の掛け合わせにより作出した F₂ 個体についても、葉身部から抽出した RNA サンプルを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。

添加系統シリーズのトランスクリプトーム解析には、各系統につき 3 サンプルを用い、サンプル毎に 10M reads 以上の配列情報を収集した。得られた配列情報は、昨年度構築したシャ

ロット鱗茎部の unigene セットをリファレンスとしてマップした後に、RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads) 値を算出することにより集計し、整備を進めているネギ属トランスクリプトームデータベース (AlliumTDB) に情報を加えることにより比較解析、統合オミクス解析に応用するための基盤情報として整備した (図 1a)。RPKM データ整理の結果、添加したシャロット染色体に由来すると考えられるシャロットの発現遺伝子の情報や (図 1b)、シャロット染色体の添加により発現誘導されたと考えられるネギ遺伝子の情報を得ることができた。さらに、F₂ 個体のトランスクリプトーム解析では、シャロットとタマネギの DH 系統の掛け合わせにより作出し、連鎖地図作製や QTL 解析に向けたメタボローム情報の収集を進めている分離集団に対してトランスクリプトーム解析を行い、得られた配列情報の SNP パターンを解析することにより、タマネギ由来とシャロット由来の転写産物を区別し、その情報を基に遺伝子型情報を収集することを目的として解析を行った。30 個体を用いたテスト解析より得られた RNA-Sequencing の配列情報をシャロット鱗茎部の unigene セットをリファレンスとしてマップし、塩基多型情報を収集整理することにより、約 5,000 の unigene について遺伝子型情報を得ることができた。この情報は作製中の遺伝子地図情報に統合されメタボローム QTL やゲノム配列解析に向けた高密度マーカーの整備等に活用することができる可能性が示唆された (図 1c)。

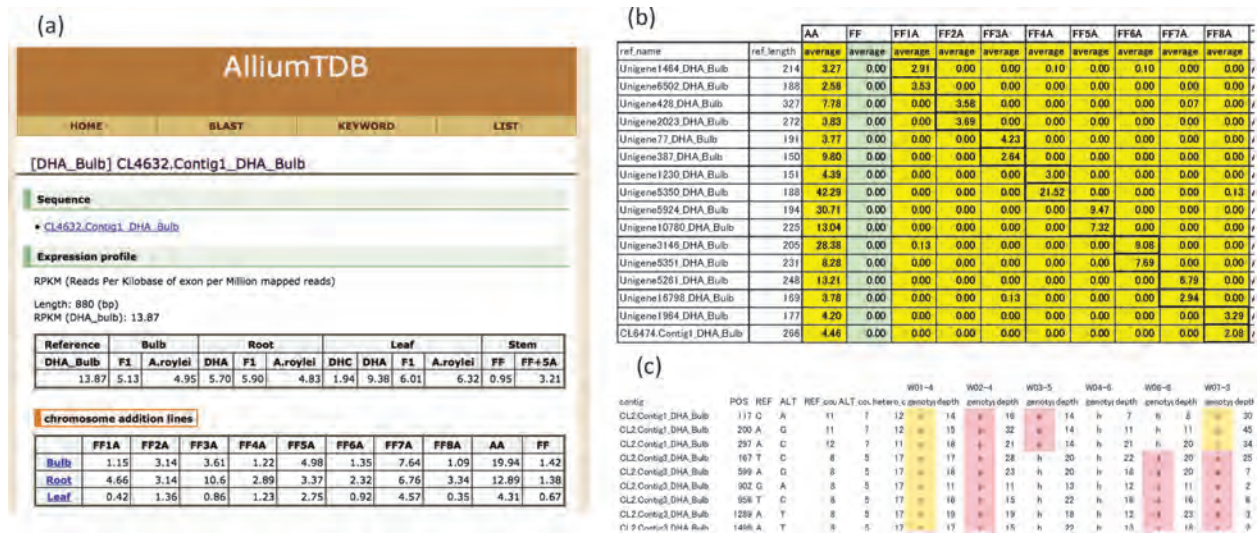


図 1 ネギ属バイオリソースを用いたトランスクリプトーム解析データの活用例
 (a) AlliumTDB にまとめた染色体添加系統の RPKM 値の例
 (b) シャロット由来のリードのみがマップされるコンティグを基にした染色体マーカーの開発例
 (c) F₂ 個体のトランスクリプトームデータを用いた遺伝子型解析例

執行正義 (山口大学農学部)
 共同研究先: 杉山信男 (農学部)
 峯 洋子 (農学部)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 環境応答遺伝子ネットワークの解明による生産力規定因子の同定：
 緑藻の脂質蓄積異常変異体の RNA-seq 解析 ◎

近年、化石燃料資源の有限性や低炭素社会への転換といった社会要請に対して、藻類を用いたバイオ燃料の実用的生産が提起されている。しかしその実現には多くの乗り越えるべき課題がある。なかでも、藻類の脂質代謝経路ならびにその制御系に関する知見は十分ではない。そこで我々は、モデル緑藻であるクラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* で脂質蓄積が異常な変異株を単離し、脂質代謝における制御因子の同定を進めている。これまでに、脂質の染色蛍光強度を指標として、セルソーター分取システムを用いた変異体のスクリーニングをしたところ、窒素欠乏状態で TAG 蓄積が異常になる変異体 *tag accumulation regulator1 (tar1)* を取得した (Kajikawa 他 2015, 下図)。変異体 *tar1* は、酢酸培地を用いた光従属栄養条件で、細胞を窒素飢餓状態にすると、野生型に比べて (1) デンプンは蓄積するが TAG 蓄積レベルが 10 分の 1 に低下し、(2) 細胞分裂が停止し細胞サイズが大きくなり、(3) クロロフィルの分解が遅れて光合成の停止が遅れた。これらの結果から、TAR1 は窒素飢餓に応答した細胞分裂・光合成・脂質蓄積の制御に係わる事が示唆された。TAR1 遺伝子がコードするタンパク質は、酵母の Yak1 と相同性をもつタンパク質リン酸化酵素 Dual-

Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase (DYRK) の一種であった。一方、細胞を光独立栄養条件で窒素欠乏にさらすと、クロロフィルを維持したまま、細胞あたりのデンプンに加えて TAG の蓄積量が野生型より増加した (論文準備中)。本プロジェクトでは、光独立栄養かつ窒素欠乏条件で野生株と *tar1* 変異株における遺伝子発現を RNA-seq で網羅的に解析することで、*tar1* 変異株と野生株との間で発現レベルの差が認められる遺伝子を選び出し、タンパク質リン酸化プロテオーム解析の結果と照らし合わせることで、この TAR1 が介在する TAG やデンプンの代謝制御系を理解する事を目的としている。

文献 1) Kajikawa M, Sawaragi Y, Shinkawa H, Yamano T, Ando A, Kato M, Hirono M, Sato N, and Fukuzawa H*: Algal dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, Triacylglycerol Accumulation Regulator1, regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen or sulfur deficiency. *Plant Physiol.* 168: 752-7764 (2015)

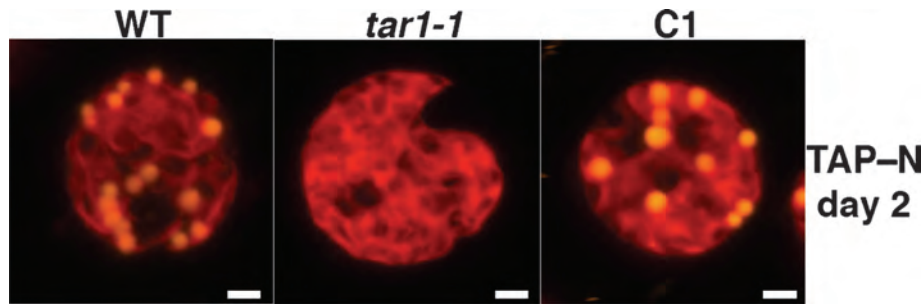


図 1 ナイルレッド染色後の緑藻の蛍光顕微鏡像。野生株 WT、変異株 *tar1-1*、変異相補株 C1。赤色はクロロフィル蛍光、黄色い点が脂肪滴を示す。

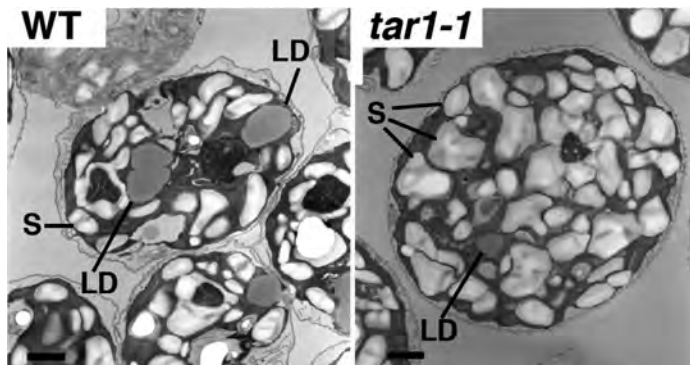


図 2 酢酸を含む窒素欠乏培地に移し替えて 2 日後の細胞切片の電子顕微鏡観察像。デンプン (S)、油滴 (LD)。

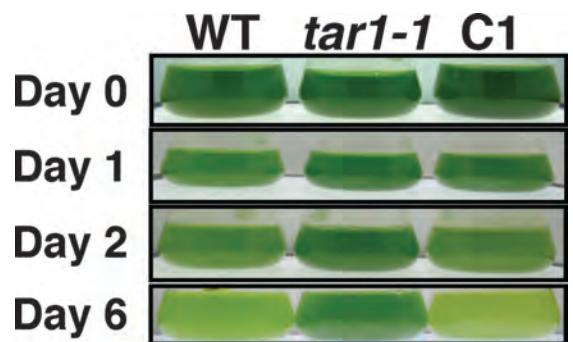


図 3 酢酸を含む窒素欠乏培地での細胞の色調変化。

福澤秀哉 (京大大学生命科学研究科)
 共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 乳酸発酵に優れた *Enterococcus mundtii* QU 25 における カタボライト抑制メカニズムの解明と解除法の開発 ◎

再生可能で食糧と競合しないリグノセルロース系バイオマス資源を原料にした光学活性乳酸の乳酸発酵による物質生産が期待されている。この種のバイオマスを糖化すると、グルコース (Glc)、セロビオース (Cel; Glc が β 1,4 結合した二糖)、五炭糖の Xyl など複数種の糖が生じるが、細菌におけるこの混合糖の資化の際は Glc や Cel が優先的に資化され他の糖の資化が抑制されるカーボンカタボライト抑制 (CCR) のために、キシロースなどの糖の資化が遅れることがしばしば起き好ましくない。

ヤギの糞便から単離された *Enterococcus mundtii* QU 25 株 (QU 25 株) は、Glc を糖源とした場合だけでなく Xyl の場合からもホモ乳酸発酵により光学純度の高い L-乳酸を生産できる。加えて、Cel と Xyl を糖源とした場合には CCR を示さず両糖を

同時に資化する (図 1) という優れた発酵特性を持つ一方で、高濃度の Glc と Xyl を糖源として培養した場合は不完全な CCR を示した (図 2)。また、今までに明らかにした QU 25 株の全ゲノム配列には様々な糖代謝関連遺伝子が見出され、キシロース代謝関連遺伝子の転写解析を行ったところ、CCR のかかる高濃度 Glc と Xyl 共存条件下では、キシロースイソメラーゼ・キシロキナーゼ等のキシロース代謝初期の酵素の遺伝子について転写レベルでの抑制が起きていた。

昨年度に引き続き今年度は、CCR のかかる条件とかからない条件でどのような転写制御がなされているかを知り、今後の培養条件の改良や育種の指標を得るため、各単糖および混合糖で培養し、転写物を経時的に得て RNA-seq 解析を行っている。

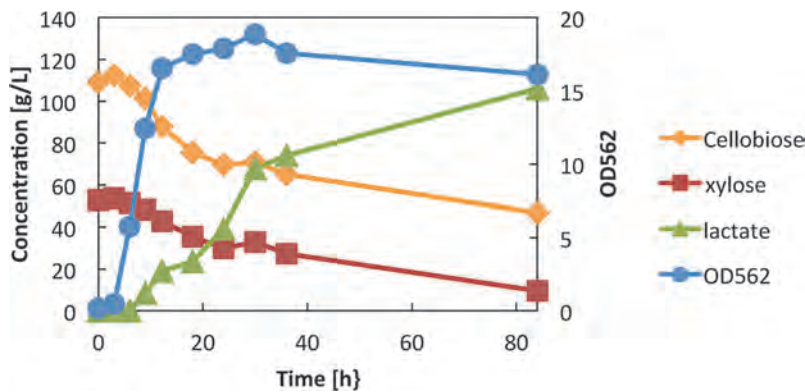


図 1 *E. mundtii* QU 25 株を Cel および Glc を糖源とする培地で培養した時の生育の様子。

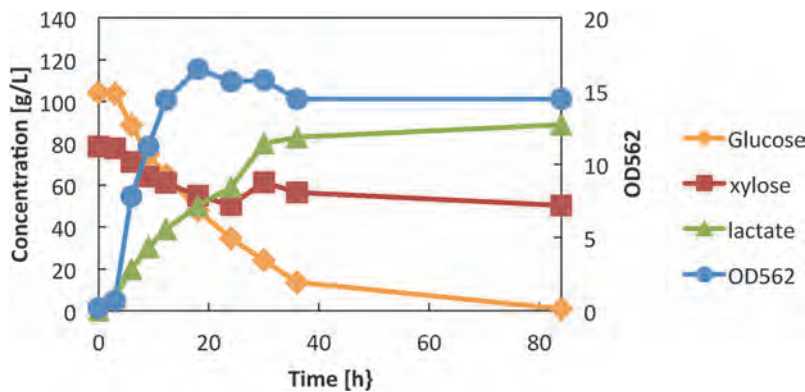


図 2 *E. mundtii* QU 25 株を Glc および Xyl を糖源とする培地で培養した時の生育の様子。

門多真理子 (武蔵野大学環境学部)
園元謙二 (九州大学大学院農学研究院)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 重要酵素 Rieske oxygenase の機能構造解析のためのゲノム情報基盤の整備 ◎

芳香族化合物は微生物により分解・資化されることが古くから知られています。当研究室でもダイオキシン様の構造を持つカルバゾール分解菌の単離と解析を進めており、これまでに活性汚泥から単離された *Pseudomonas resinovorans* CA10 株を初めとする種々の分解菌を単離してきました。カルバゾールの分解は細菌染色体上またはプラスミド上に存在する *car* 遺伝子群により行われますが、その初発酵素は Rieske oxygenase の一種である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO) であることが知られています。CARDO は3つのコンポーネントから成り、フェレドキシンレダクターゼ (Red) が NADH から受け取った電子をフェレドキシン (Fd)、オキシゲナーゼ (Oxy) へと伝達し、Oxy がカルバゾールの二水酸化を行います。当研究室でこれまで解析してきたカルバゾール分解菌は土壌や活性汚泥から単離されたもので、CARDO の各コンポーネントをコードする遺伝子はクラスターを形成していることが知られています。しかし近年、海水から単離されたカルバゾール分解菌が *car* 遺伝子クラスター内に Fd、Red の遺伝子を持たないことが明らかとなり [Maeda *et al.*, 2009, *Curr. Microbiol.*, 59: 154-9]、海水由来のカルバゾール分解菌が持つ *car* 遺伝子群に興味を持たれました。

当研究室では *car* 遺伝子群の多様性を調べるため、海水から単離したカルバゾール分解菌 16 株の全ゲノム解析を行いました (うち 11 株はゲノム解析拠点で実施)。16 株の 16S rRNA 遺伝子を調べたところ、9 株が *Hyphomonas* 属、4 株が *Erythrobacter* 属細菌であり、*Nocardioideis* 属、*Marinobacterium* 属、*Thalassococcus* 属細菌も 1 株ずつ含まれていました。興味深いことに、*Hyphomonas* 属細菌と *Erythrobacter* 属細菌の *car* 遺伝子クラスター内には Fd 遺伝子候補は存在せず (表)、ゲノムの異なる位置に存在する Fd 候補遺伝子も相同性が低いなど、既知のカルバゾール分解菌とは異なる遺伝子構造の *car* 遺伝子群を持つ可能性が示唆されました。またこれらの株は、カルバゾールの中間代謝産物であるアントラニル酸の分解酵素をコードする既知

表 海水由来カルバゾール分解菌の CARDO をコードする遺伝子

Strains	Oxy	Fd	Red
<i>Erythrobacter</i> sp. KY5	+	-	-
<i>Hyphomonas</i> sp. KY3	+	-	-
<i>Marinobacterium</i> sp. IC961	+	+	+
<i>Nocardioideis</i> sp. S5	+	+	+
<i>Thalassococcus</i> sp. S3	+	+	+

+と-はそれぞれ各酵素をコードする既知の遺伝子の有無を表す。

遺伝子を持たない代わりに、*car* 遺伝子クラスター近傍にアントラニル酸 CoA リガーゼをコードする遺伝子を持つことから、新規なカルバゾール分解経路を持つ可能性も示唆されています。さらに *Thalassococcus* 属細菌でカルバゾール分解菌が報告された例は無く、この菌が持つカルバゾール分解経路にも興味を持たれます。

これまでの解析から、各株の *car* 遺伝子群近傍の GC 含量はゲノム全体の GC 含量に比べて低いことが明らかとなっており、*car* 遺伝子群が水平伝播を通じて獲得されたとしたら、どの祖先から伝播し、どのように各分解菌に馴化し分解力が発揮されるようになったのか、その進化過程に興味を持たれます。今回明らかとなった海水由来のカルバゾール分解菌が持つ *car* 遺伝子群の多様性は、種々のカルバゾール分解菌の進化的繋がりを解明する一端になると期待されます。

野尻秀昭 (東京大学生物生産工学研究センター)
水口千穂 (東京大学生物生産工学研究センター)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 日本発のシアノバクテリアの新しいゲノムデータベースの構築 ◎

シアノバクテリアは光合成を行う原核生物であり、光合成の反応機能、アオコなどの環境中での生態、遺伝子改変によるバイオマス生産といった幅広い研究の材料として利用されている。近年の次世代シーケンサーの普及に伴い、カルチャーコレクションに集積されたシアノバクテリアのゲノムを網羅的に解析する取り組みが、アメリカの Joint genome institute およびフランスの Pasteur culture collection を中心に進められ、世界の研究をリードしている。我々は、国立環境研究所 (NIES) のカルチャーコレクションに寄託されたシアノバクテリア株のゲノム解析を行い、国立遺伝学研究所が運営する CyanoBase と連携してそのデータを幅広く公開する事で、シアノバクテリアを用いた新たなゲノム研究分野の開拓を目指している。これまでに、イルミナ社 MiSeq を用いて、シーケンサーのライブラリを適切に作製し、フィニッシングソフトウェアを用いることで、多検体のシアノバクテリアの完全ゲノム (もしくはそれに準ずる高精度なゲノム配列) を効率よく構築できることを見出した。また、*Nostoc* sp. NIES-3756 を始めとするいくつかのシアノバクテリア株については、論文を発表している (図 1)。

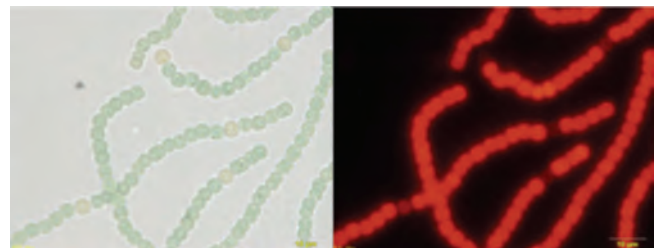


図 1 完全ゲノム配列を決定した *Nostoc* sp. NIES-3756 の光学顕微鏡画像 (左) と蛍光顕微鏡画像 (右)。窒素欠乏条件下で窒素固定細胞 (ヘテロシスト) を分化させ、その細胞ではクロロフィル由来の蛍光が大きく減少している。

広瀬 侑 (豊橋技術科学大学)
河地正伸 (国立環境研究所)
志村遥平 (国立環境研究所)
藤澤貴智 (国立遺伝学研究所)
共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

前期新規採択課題

◎ 乾燥耐性コムギの包括的分子特徴づけ ◎

地球規模で発生する干ばつは、近年より深刻化しており、作物生産に大きな打撃を与えています。一方で、世界の人口増加に伴い、今後より多くの穀物が必要とされ、作物生産に不適な環境が拡大する状況でも、安定的な食料生産を実現させるため、乾燥ストレス耐性作物の創出は世界中で急務となっています。

植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)は高等植物に普遍的に広く存在し、陸上植物の乾燥ストレス耐性に関わる重要なシグナル物質であることが知られています。ABAに関する知見は、主に双子葉植物であるシロイヌナズナのモデル植物で蓄積しているものの、農業市場での主要穀物である単子葉植物、特に巨大なゲノムを持つコムギにおいては理解が乏しいのが現状です。

我々はゲノム情報が高精密に整備されていないコムギからABA受容体の単離に成功し、ABA受容体を過剰発現させたコムギ形質転換体の作成に成功しました。ABA受容体を過剰発現させたコムギ(TaPYLox)は、種子休眠性が向上しているほか、葉からの蒸散量の低下、植物体における糖蓄積量の増加などの耐乾性に特徴的な形質を有していました。さらに、予想に反して、TaPYLoxは水消費量あたりの炭酸固定量の増加を示し、節水しながら生長することができる形質を有している事も判明しました。このようなABA受容体の過剰発現によってもたらされる形質を分子レベルから明らかにするために、次世代シーケンシング(NGS)を使ったトランスクリプトーム解析を行いました。

NGSによるトランスクリプトームの予備的な解析から、コムギから多数のABA応答性遺伝子の同定に成功しました。さらに、TaPYLoxは湿潤な状態でもABA応答性遺伝子の発現が増加しており、乾燥ストレスでこれらの発現がより増加することが明らかとなりました。この結果は、TaPYLoxは乾燥ストレスに遭遇する前に、予め乾燥ストレスに対する抵抗性を高めていると考えられます。さらに、ABA処理の実験から、TaPYLoxがABA高感受性であることが証明されました。また、コムギ



◀ 図1 ABA受容体を過剰発現させたコムギ(TaPYLox)の節水型乾燥耐性試験の様子。コムギが一生涯に消費する水の量を算出するために天秤で重さをモニターしている。

はA、B、Dのサブゲノムをもつ6倍性作物であるために、TaPYLoxにおけるABA応答性遺伝子がどのサブゲノムから転写されているのかを解析しました。その結果、どのサブゲノムからも同様に発現誘導が上昇しているものもあれば、サブゲノム特異的に発現誘導が起きている遺伝子なども見受けられ、コムギの転写制御は単純な転写制御ではないことが明らかとなりました。今後、TaPYLoxとは異なる性質を有する耐乾性コムギ品種とNGSの比較解析を行っていくことで、乾燥耐性コムギの包括的分子特徴づけができると考えています。得られた結果は、耐乾性コムギの創出に大きく貢献することが期待されます。

- 岡本昌憲 (鳥取大学乾燥地研究センター)
- 妻鹿良亮 (鳥取大学乾燥地研究センター)
- 金 俊植 (鳥取大学乾燥地研究センター)
- 安倍史高 (農研機構作物研究所)
- 花田耕介 (九州工業大学若手フロンティア研究アカデミー)
- 共同研究先: 坂田洋一 (応用生物科学部)
- 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

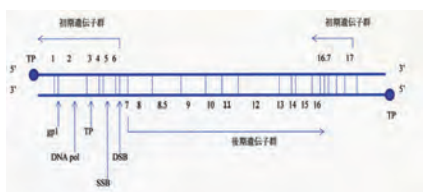
◎ バクテリオファージφ 29 の感染に抵抗性を持つ枯草菌変異株の探索と解析 ◎

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) はグラム陰性細菌のモデル生物として現在まで盛んに研究が行われており、納豆生産や殺虫、殺菌剤、土壌改良剤など工業的にも利用されている。そして、この枯草菌に感染するバクテリオファージφ 29 (図1) はDNAの5'末端にタンパク質を共有結合した約19 kbpの線状二本鎖DNAをゲノムとして持つ (図2)。φ 29は、DNA複製においてタンパク質をDNA合成のプライマーとして利用するプロテインプライミングのモデル機構として研究されてきた。

これまで *in vitro* の実験やφ 29変異体を用いた解析から、φ 29 DNAがコードするタンパク質群による基本的なφ 29のDNA複製機構が明らかにされてきた。しかし近年になって宿主のタンパク質もφ 29のDNA複製に関わることがわかってきた。例



◀ 図1 φ 29とT4ファージの電子顕微鏡写真 (EM by D. Anderson) 中央のファージがφ 29である。



を挙げると、細菌の細胞骨格タンパク質であるMreBがφ 29のDNA複製に必要であること (Muñoz-Espin *et al.* 2010)、枯草菌の胞子形成の制御タンパク質であるSpo0Aがφ 29のDNA複製を阻害すること (Castilla-Llorente *et al.* 2006) などである。φ 29の増殖に関わる枯草菌因子を発見するための一つの方法として、φ 29で溶菌しない枯草菌変異株の変異部位の解析が有効と思われるが、枯草菌のゲノムは約4.2 Mbpあるため変異部位の特定は容易でない。そのため得られた枯草菌変異株の全ゲノム解析を次世代シーケンサーによって行うことで、φ 29の増殖に関わる新たな枯草菌因子の同定を目指した。

現在、φ 29の吸着を阻害したり、φ 29 DNAの増幅効率を減少させるなど、φ 29の増殖効率が低下する枯草菌変異株を78株単離している。ここから数種類の株を選択し、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析をすることで、φ 29 DNAの増幅効率が減少する株は今までφ 29の増殖に正負に関わるという報告がされていない遺伝子に変異を持つことがわかった。今後はこの遺伝子の解析を進めることで、本当にφ 29の複製を阻害しているのかどうかを確かめたい。

- 牧野 修 (上智大学理工学部)
- 竹内 有 (上智大学理工学部)
- 刀禰高広 (上智大学理工学部)
- 小田嶋拓矢 (上智大学理工学部)
- 共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)
- 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

図2 φ 29ゲノムの模式図 Meiler *et al.* 2001より引用、改変

◎ RNA-seq による分散型動原体形成因子の同定 ◎

動原体は細胞分裂時に複製された染色分体を娘細胞に均等分配するための必須の機能体であり、特異的なタンパク質とDNAで構成されている。動原体は通常、染色体のくびれ部分に1染色体あたり1カ所存在する（局在型動原体：図1a）。それに対して、特殊な例として、くびれをもたず染色体全体が動原体として機能する「分散型動原体」をもつ種が、動植物の異なる分類群で報告されている（図1b）。これらの分散型動原体をもつ種の近縁種は局在型動原体をもつことから、これらの分散型動原体は進化の中で独立に生じたと考えられるが、局在型動原体から分散型動原体へのシフトの原因は不明である。我々も、スズメノヤリの近縁種であるルズラを材料に分散型動原体の構成因子および構造を解析してきた。この解析の中で、「局在型では細胞周期の各時期を通じて一定な構成的動原体タンパ

ク質の量が分散型動原体では中期をピークに増減する」特徴を見いだしたが、ルズラでは免疫沈降もうまくいかず分散型動原体の形成因子については不明のままであった。ところが、最近、昆虫の分散型動原体をもつ種のRNA-seq解析から、「分散型動原体をもつ種で特異的に、動原体特異的ヒストンH3（CENH3）およびCENP-C等のヒトや酵母の構成的動原体タンパク質の約半分が発現していない」というブレークスルー的な結果が得られた。この特異的変化は異なる分類群の分散型動原体をもつ全ての昆虫種でみられたことから、昆虫の共通祖先種の中で他の真核生物では必須のCENH3やCENP-Cを含む部分構造を失うことを可能にする変異が生じたと考えられた。しかしながら、この変化は昆虫特異的で、分散型動原体をもつ線虫や植物では昆虫で失われた動原体タンパク質が存在することがわかっている。これらのことから、植物は昆虫とは異なる分散型動原体形成機構をもつことが示唆される。

そこで、本研究ではルズラの分散型動原体形成因子を同定することを目的として、分散型動原体をもつルズラとその近縁種で局在型動原体をもつイグサを材料にRNA-seq解析を行い、これら2種間で動原体を含む染色体構造に関連するタンパク質をコードする遺伝子の発現プロファイルを比較している。

長岐清孝（岡山大学資源植物科学研究所）
共同研究先：小林久人（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）

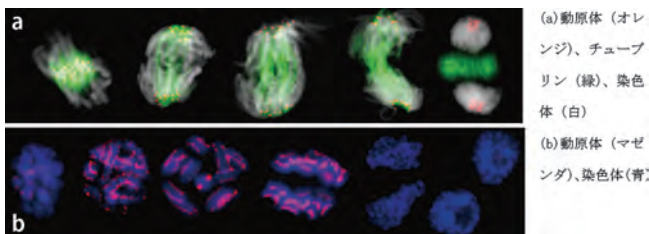


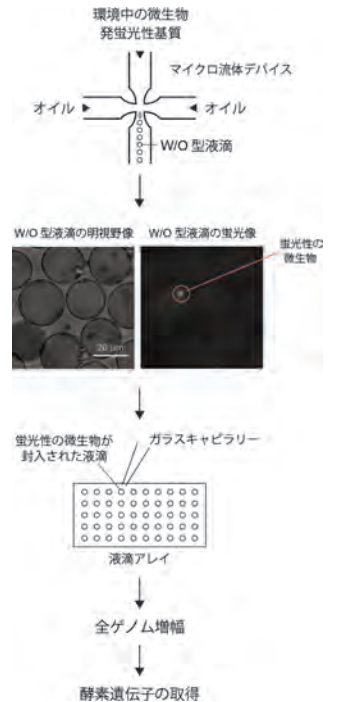
図1 局在型動原体をもつニンニク (a) と分散型動原体をもつルズラ (b) の体細胞分裂

◎ 液滴を利用したシングルセルゲノミクスによる微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の実践 ◎

現在産業利用されている酵素の大部分は微生物由来であり、産業上有用な酵素は新規の微生物から発見されることが多い。これまで酵素遺伝子の取得は、環境中に生息する微生物群集の中から、標的とする酵素を産生する微生物を単離・培養することから行われてきた（この手法を、培養法と呼ぶ）。しかし環境中の99%以上の微生物は、現在の技術では培養が困難な微生物（難培養性微生物）とされている。難培養性微生物が産生する酵素は、新たな酵素資源として非常に大きな可能性を秘めているが、培養法ではそれらにアクセスすることができない。近年、培養法に代わる方法として、メタゲノム法が利用され始めている。メタゲノム法は、微生物の分離・培養を行わずに、環境中に存在する微生物群集のゲノムを抽出し、その中から標的とする酵素遺伝子を取得する方法である。この方法は、培養法では得られない新規の酵素遺伝子が取得できるという利点を有するが、多大な時間・労力・コストを要することに加え、それに見合うだけ成果が得られないことが大きな問題となっている。

我々は、新たな酵素遺伝子取得法として「液滴を利用したシングルセルゲノミクスによる微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法」を考案した（Nakamura *et al.* (2016) *Sci. Rep.* 6, 22259）（図1）。本法ではまず、標的とする酵素に対する発蛍光性基質とともに、環境サンプル中の微生物をシングルセル単位でWater-in-oil (W/O) 型液滴に封入する。標的酵素を発現する微生物が存在すれば、微生物あるいは液滴内部が蛍光を放つようになる。次に、蛍光性の微生物が封入された液滴あるいは蛍光性の液滴を回収し、シングルセル単位で微生物の全ゲノム増幅を行う。最後に、得られたゲノム情報を利用し、標的酵

素遺伝子を取得する。これにより、培養を介することなく、標的の酵素活性を発現する微生物をシングルセル単位でスクリーニング・回収することが可能となり、「難培養性微生物にアクセスできない」という培養法の最大の問題を解決する。また、取得するゲノムを標的の酵素活性を発現する微生物に限定することで、メタゲノム法よりもはるかに少ない時間・労力・コストで酵素遺伝子の探索が可能となる。現在本法を利用して、産業利用できるような酵素遺伝子の取得を試みている。



▶図1 液滴を利用したシングルセルゲノミクスによる微生物培養を介さない酵素遺伝子取得法の概要

飯塚 怜（東京大学大学院薬学系研究科）
共同研究先：吉川博文（応用生物科学部）
兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）

◎ リンゴ果実の収穫後の食感形成に関わる遺伝子群の網羅的解析 ◎

リンゴはカンキツ類とならび日本でも、また世界的にも重要な果樹の一つです。日本で栽培されているリンゴは非常に高品質で、海外にも輸出されています。また一方で、近年では海外からの輸入も増えています。リンゴをはじめ多くの果実類は、未熟な段階では硬く食べることができませんが、成熟することで果肉が軟化し可食状態となります。しかし、単に軟化するだけでなく同時に食感（肉質）の変化も生じます。リンゴの場合、収穫時には“パリッ”とした食感を持っていますが、成熟がさらに進行すると次第に“ぼそぼそ”あるいは“ざらざら”とした食感、いわゆるボケた状態に変化することが知られています。これを“粉質化”と呼び、粉質化によって果実の品質は著しく低下し、消費者に優れた状態の果実を提供する上で大きな問題



図1 粉質化しやすいリンゴ品種 図2 振とう前の果実ディスク

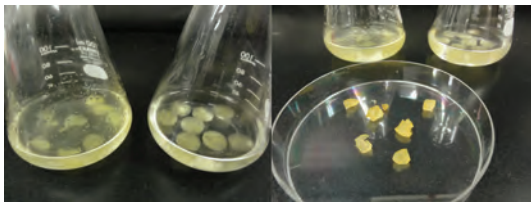


図3 振とう後の様子。粉質性を示す品種（左）と粉質性を示さない品種（右） 図4 粉質性を示すリンゴのディスクは細胞間接着の低下により小さくなる

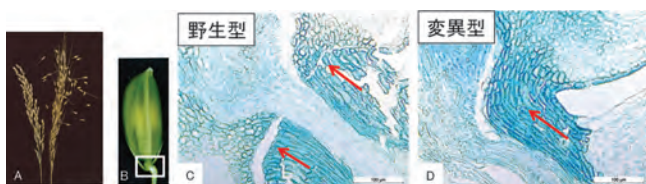
となります。一方、この肉質の変化はリンゴ品種間で著しい差異が認められます。すなわち、粉質化が生じやすい品種と、起こりにくい品種が存在します。このような果実の軟化や食感の変化は果実細胞壁の構造変化がともない、それは構成多糖類の合成と分解のバランスの上に成り立ち、数多くの細胞壁代謝関連酵素が関与しています。これまでの研究で、機械的強度の低下、すなわち果実の軟化と一部の酵素との関係については明らかにされつつあります。一方、軟化現象と並行して起こる食感の変化を引き起こす機構についてはあまりよくわかっていません。粉質化したリンゴでは、可溶性ペクチンにアラビノース側鎖がほとんどみられないことから、アラビノース側鎖の分解が粉質性に関与していると示唆されています。一方で、アラビノースがセルロースに強固に結合しているという報告もあります。粉質性を示すリンゴの果実ディスクを作成し、溶液中で振とうすると細胞同士がバラバラになり、原形をとどめなくなります。細胞壁は細胞同士の接着にも関わっており、粉質化した状態ではこの細胞間接着の低下が認められます。粉っぽく感じるのは、咀嚼時に個々の細胞がバラバラになり、一方、一つの細胞は破壊されないため、果汁が少なく、砂を噛んだような食感を示すと考えられます。このように、細胞壁の構造変化が粉質化を引き起こしていると考えられますが、細胞壁の構造は非常に複雑であり、単一の酵素の働きでその変化を説明することが困難です。本研究では、粉質性を示すリンゴと示さないリンゴにおける発現遺伝子をRNA-seqにより調べることで、その差異から関連する酵素類、またネットワークを網羅的にとらえることを目的としています。このような知見から、将来的にはより美味しい果物の提供に役立てばと考えています。

立石 亮（日本大学生物資源科学部）
河鱈実之（東京大学大学院農学生命科学研究科）
上吉原裕亮（日本大学生物資源科学部）
共同研究先：乗越 亮（農学部）
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

◎ イネ脱粒性遺伝子の栽培化における遺伝子ネットワークの解明 ◎

脱粒性とは、穂から種子が落ちる性質であり、自然界では種子の拡散による繁殖戦略として重要な性質です。一方、作物として考えた場合、強い脱粒性は収穫量の減少につながります。そのため、栽培化の過程で、脱粒性は、古代人によって最初の選抜の対象となった農業形質であると考えられてきました。また、脱粒性は脱穀技術との関連が深いことから、今日でも重要な農業形質の一つであると考えられます。

申請者らは、これまでに、イネの脱粒性遺伝子 *qSH1* を単離し、*qSH1* が離層形成に必須であることを明らかにしました (Konishi *et al.*, 2006)。また、野生イネ由来の別の脱粒性に関与する *sh4* 遺伝子が単離・同定されています (Li *et al.*, 2006)。その後、野生イネや雑草イネを用いて、*qSH1* と *sh4* の遺伝解析が行われています (Ishikawa *et al.*, 2010, Akasaka *et al.*, 2011)。



図A. イネの穂。右が脱粒しやすい品種、左が脱粒しにくい品種。図B. イネの種子。四角で囲んだ部分の縦方向の切片を作成した(図C、D)。図C、D. イネの種子基部の比較。野生型(図C)では、矢印部位の離層が崩壊している。変異型(D)では、矢印部位に離層が形成されず、崩壊も進んでいない。

また、野生イネのイントログレッション系統を用いた解析により、新規の脱粒性遺伝子 *SHAT1* が同定され、*AP2* 様転写因子であることが報告されています (Zhou *et al.*, 2012)。そして、*qSH1* 遺伝子のパラログである *SH5* が、離層の形成に関与しているとの報告も行われています (Yoon *et al.*, 2014)。さらに、野生イネより、新規脱粒性遺伝子 *qSH3* が単離されました (Htun *et al.*, 2014)。このように、近年、脱粒性に関与する遺伝子が複数単離され、各遺伝子間の相互作用や離層形成への関与について、少しずつ明らかになってきています。その一方で、最初に単離・同定された作用力の大きい野性イネ由来の *sh4* 遺伝子と *qSH1* 遺伝子との関係や作用のタイミング、離層形成およびその後の離層の崩壊についての詳細な分子機構に関しては、野生イネ由来の遺伝子の解析の難しさもあり、不明な点も多く残っています。そこで、本研究では、脱粒性遺伝子 *qSH1* の準同質遺伝子系統である NIL (*qSH1*) を用いてガンマ線照射を行った突然変異系統と野生型の後代で表現型に差がでた個体を野生型バルクおよび変異型バルクにして塩基配列を解析することで、両者間の多型部位を検出し、遺伝解析と組み合わせることによって脱粒性の原因となる変異の絞り込みを行い、新規遺伝子の探索を行って、脱粒性の遺伝子ネットワークの解明を目指しています。

杉田（小西）左江子（香川大学農学部）
田中 剛（農業生物資源研究所）
共同研究先：佐々木卓治（総合研究所）
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 質量分析データと全トランスクリプトーム情報の融合による サソリ毒液に含まれる新奇殺虫性ペプチドの効率的探索 ◎

サソリは有毒生物の一つであり、その毒液からは様々な生理活性を持つ毒素ペプチドが数多く発見されている。サソリ毒は低濃度かつ選択的に作用するのが特徴であり、なかでも昆虫選択的毒素は生物農薬として有望視されている。我々は日本に生息する2種のサソリ（ヤエヤマサソリ、マダラサソリ）を生物材料として、新奇毒素の探索に取り組んできた。その結果、特にヤエヤマサソリから、これまでに発見されたことのないユニークな構造をもつペプチドを見いだすことに成功している。

これらのペプチドの配列決定は、エドマン分解法と質量分析法を組み合わせることによって行ってきた。しかしながら、この手法によって完全に配列決定できるのは比較的量の多い成分に限られ、微量成分の場合は難しい。このような場合、高感度分析の可能な質量分析法に遺伝子情報を組み合わせるのが最も効果的である。しかしながら、ヤエヤマサソリのようなマイナーな生物種の場合、ゲノム情報は現時点ではもちろん存在せず、一つ一つ遺伝子をクローニングして決定するのは非効率的である。この問題を解決するのが、次世代シーケンサーによって得られる全トランスクリプトーム情報である。つまり「質量分析」+「次世代シーケンサー」によってサソリ毒液成分の網羅的な構造決定が短期間で可能になるものと考えられる。

本手法によって見いだされるであろう新奇殺虫性ペプチドは、生物農薬の候補化合物として有用であるだけでなく、その作用機構研究からは殺虫剤の新たな作用標的を見いだすことが期待できる。

宮下正弘（京都大学農学研究科）
中川好秋（京都大学農学研究科）
北中淳史（京都大学農学研究科）
共同研究先：須恵雅之（応用生物科学部）
内山博允（生物資源ゲノム解析センター）

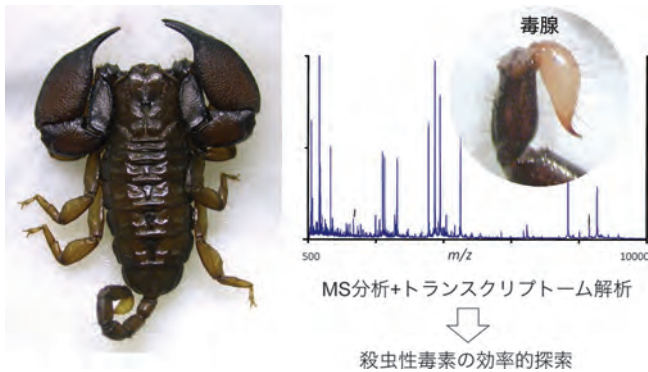


図1 ヤエヤマサソリ

◎ 衛生害虫かつ食品害虫であるヒラタチャタテの全ゲノム解析 ◎

チャタテムシはチャタテムシ目（嚙虫目）に属する昆虫で、日本国内では概ね20科100種が存在するとされている。チャタテムシの大部分の種は野外でカビや地衣類を餌として生活している。ただし、コナチャタテ科に属するものは屋内を主な生息場所としており、工場や倉庫の他、住宅や学校といった我々にとって身近な建築物の内部にも生息している。これらは、温度・湿度等が一定の条件を満たした環境下では、皮膚落屑、フケ、古い書籍など多様な有機物を食糧として爆発的に繁殖することがあり、いわゆる不快害虫として位置づけられている。共同研究者の川上らは、東京都内の住宅中の塵埃に含まれるチャタテムシを調査した結果、その大半がヒラタチャタテ *Liposcelis bostrychophila* (図1) であることを明らかにした。また、同じく共同研究者の福富らによって、ヒラタチャタテが喘息患者の新たな吸入性アレルゲンであることが明らかにされた。さらに、ヒラタチャタテは、穀物粉などの貯蔵穀物や乳製品も食糧として繁殖することから、経口性アレルゲンとしての可能性も検討する必要があると思われる。つまり、ヒラタチャタテは、従来考えられてきた不快害虫や貯蔵害虫の枠に留まらず、室内および食物中にて繁殖した虫体の吸入・経口摂取により、アレルギーを引き起こし得る衛生害虫として認識する必要がある。また屋内環境にはヒラタチャタテの近縁種も混在して生息していることから、アレルゲンとして、近縁種の解析も含めて比較ゲノム学的に明らかにしていく必要がある。

本研究では、ヒラタチャタテを対象に次世代シーケンサーを用いた全ゲノム塩基配列決定を行い、ヒラタチャタテが有する遺伝子についてゲノムワイドに解析し、ゲノミクスとプロテオミクス、トランスクリプトミクスを組み合わせたトランスオミクスでの解析に繋げる。



◀図1 ヒラタチャタテ (Kawakami, Y. et al. 2014)

現在までにHiSeq 2500の1レーンのシーケンスを行い、さらにイルミナ社の合成ロングリード (Truseq Synthesis Long Read) を加えアセンブリを行い、ドラフトゲノム配列を得た。今後はドラフトゲノム配列の評価と修正を行い、既に公開されているRNA-seqのリードデータ情報を用いてアノテーションを行う。

石橋 宰（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）
乾 隆（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）
川上裕司（エフシージー総合研究所暮らしの科学部）
福富友馬（国立相模原病院診断・治療薬開発研究室）
鎌田洋一（岩手大学農学部共同獣医学科）
櫻木和磨（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）
共同研究先：小島弘昭（農学部）
小林久人（生物資源ゲノム解析センター）
内山博允（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 次世代シーケンサーを利用した魚類の絶滅種・ 絶滅個体群の遺伝的多様性解析 ◎

生物多様性の喪失は地球規模で加速の一途を辿っており、生物資源の絶滅を回避するためには、現在ならびに過去の DNA データの復元と、データ解析による将来予測が重要な課題であると考えられます。国立科学博物館には 150 万点以上におよぶ魚類標本が所蔵されています。これらは国立科学博物館の前身である教育博物館（明治 10 年設立）の時代から収集が始まったもので、大部分の標本は 10%ホルマリンで固定されたのちに 70%エタノールに浸された「液浸標本」として保管されています。保管されている標本の中には日本の高度経済成長期の影で絶滅してしまった「ミナミトミヨ」や「リュウキュウアユ沖縄島個体群」、絶滅が危惧されている「アカメ」など、とても貴重な標本が残されています。これらの貴重な標本群の DNA データが復元できれば、生物多様性の保全や生物資源の持続的利用に大きく貢献できると考えられます。

液浸標本の DNA は、固定に使用したホルマリンや保管中に浴びた紫外線などの影響で、断片化や化学修飾といったダメージを受けています。液浸標本の DNA から、従来の PCR とサンガー・シーケンスによる塩基配列決定技術で遺伝的データを取得するためには、膨大な労力・時間・費用が必要でした。近年の次世代シーケンサーと DNA ライブラリ作製技術の進歩によって、液浸標本のようなダメージを受けた DNA のデータ復元がコスト的にも現実的なものになってきました。

本研究では、魚類の絶滅種や絶滅個体群の DNA データを復元し、絶滅前の遺伝的多様性や系統縁関係、個体群関係を明らかにすることを目的として、博物館に保管された液浸標本からミトコンドリアゲノムを復元する方法を確立させることを目指しています。絶滅した種や個体群の遺伝的多様性が明らかになれば、現生の種や個体群がどの程度まで遺伝的多様性を失ったときに絶滅の危機に瀕するのを実データに基づいて高精度に生物資源の将来を予測することが可能になると期待されます。大まかな工程は、ダメージを受けた DNA の抽出、微量 DNA の増幅、ミトゲコンドリアゲノムを濃縮した効率のよい



図 1 1931 年に採集されたミナミトミヨの標本。1960 年代に絶滅したと考えられている。

シーケンシング、得られた配列データからミトコンドリアゲノムの復元と進むこととなります。これら全ての工程で液浸標本由来の DNA であるが故の難しい問題が立ちはだかります。現在は、これらの問題をひとつひとつ解決しながら DNA データの復元方法の確立を進めています。

窪寺恒己（国立科学博物館）
千葉 悟（国立科学博物館）
武島弘彦（総合地球環境学研究所）
共同研究先：佐々木剛（農学部）
川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 魚類の始原生殖細胞に増殖不全をもたらす遺伝子発現異常の解明 ～ニベ×シログチ種間交雑魚はなぜ不稔となったのか?～ ◎

「サバにマグロを産ませよう!」という研究をご存知でしょうか? クロマグロなど産卵させるのが難しい魚の卵や精子を、飼育の容易な近縁種の体内(=生殖腺内)で生産させる方法で、“代理親魚技術”や“魚の借り腹”と呼ばれています(図1)。実際には、増やしたい魚(ドナー)の卵や精子のもととなる生殖細胞(例:始原生殖細胞、精原細胞、卵原細胞)を、近縁種(宿主)の体内に移植し、宿主の生殖腺内に取り込ませることで、その後、宿主が性成熟した際に、卵や精子として産卵あるいは排精してもらうというものです。すでに、淡水魚ではサケ科、コイ科、メダカ科、海産魚ではニベ科、サバ科、アジ科、フグ科など、多くの水産有用魚種で移植実験の成功例が報告され、この技術を使って、養殖用稚魚の生産や、絶滅危惧種の保全などが行われています。

この技術を成功に導く鍵の一つは、宿主魚自身の卵や精子を作らせないための工夫です。つまり、「サバもマグロも産むサバ」ではなく、「マグロしか産まないサバ」の作出を目指すことです。受精卵のハンドリングが比較的容易な淡水魚では、受精卵の低温処理による3倍体化や、モルフォリノオリゴ等を胚盤へ顕微注射する遺伝子ノックダウンにより不稔(不妊)化魚を生産し、宿主として用いることが可能です。さらに、これらの不稔化宿主がドナー由来の配偶子のみを生産することも証明されています。しかし、海産魚では卵の直径が1mm以下と小さく、ハンドリングストレスにも弱いため、淡水魚で実施されてきたような発生工学的手法を用いた不稔化魚の生産は非常に困難でした。最近、私たちの研究室ではニベ科魚類を用いて、異属間の種間交雑(ニベ卵とシログチ精子の人工授精)により、生殖腺内に生殖細胞を全く持たない不稔化雑種魚を作出できる

ことを発見しました(図2)。さらには、この雑種魚を宿主として生殖細胞移植を行ったとき、ドナー生殖細胞に由来する正常な精子が生産されることも判明しています。これらの発見により、発生工学的なハンドリングが困難な海産魚においても、人工授精による種間交雑のみで不稔化宿主を量産できるようになったことから、現在、代理親魚技術をさらに多くの海産魚に普及させることを目的として、ニベ科魚類以外の海産魚種においても、交雑による不稔化雑種に挑戦しています。

本採択課題では、次世代シーケンサーを用いて、ニベ科雑種魚の生殖腺内で起きたどのような遺伝子発現の変化が、始原生殖細胞の増殖阻害を引き起こし、個体の不稔化をもたらしたのかを明らかにする取り組みを行っています(図2)。ウマとロバの交雑種であるラバのように様々な動物種で、交雑個体が不稔性を示すことは知られています。しかし、雑種不稔の多くは、減数分裂時の異常による配偶子形成不全に起因するとされており、本研究の実験材料であるニベ科交雑魚のように、始原生殖細胞自身の増殖能が欠失することで不稔化が起るという現象は非常にユニークです。そこで、このニベ科雑種の両親種であるニベとシログチおよび交雑魚の各々の始原生殖細胞での遺伝子発現の違いをRNA-seqにより網羅的に解析することで、ニベ科雑種で見られた不稔化機構を分子レベルで解明したいと考えています。不稔化の鍵となる遺伝子群が解明され、それらの遺伝子発現を指標に、あるいは、それらの遺伝子の発現を人為的に阻害することで、他魚種でも不稔化雑種を作ることができるになれば、代理親魚技術を応用できる魚種の範囲がさらに拡大していくものと期待されます。

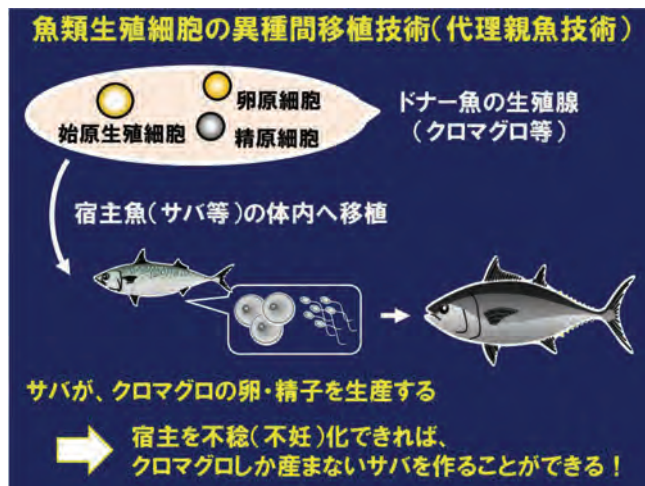


図 1



図 2

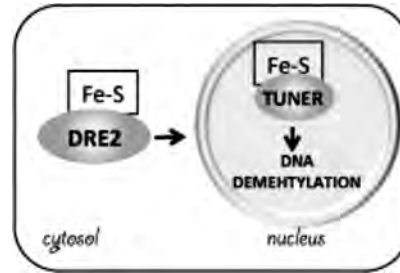
竹内 裕 (東京海洋大学先端科学技術研究センター)
林田貴雄 (東京海洋大学海洋科学部)
共同研究先: 松原 創 (生物産業学部)
川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ DRE2 を介した核ゲノムのエピジェネティック制御 ◎

DNA のシトシン残基のメチル化は、エピジェネティックな遺伝情報を担い、遺伝子発現に重要な働きをしています。また、その DNA の脱メチル化はエピジェネティックなプログラミングに必須なプロセスであり、動・植物のゲノムインプリンティングや発生プログラムの初期化、組織・器官分化過程などに重要な働きをしています。我々は、シロイヌナズナの DNA 脱メチル化により活性化されるインプリント遺伝子 *FWA* を指標にして、DNA 脱メチル化に酵母からヒトまで保存された DRE2 が必要であることを明らかにしてきました (Nakamura M. *et al.* New Phytol. 2013, Buzas D. *et al.* PNAS 2014)。

DRE2 はこれまでに、アポトーシスの抑制、細胞質における Fe-S クラスターの生成に関与することなどが酵母やマウス、ヒトの研究から明らかとなっていました。また、タンパク質の N 末端にメチル基転移酵素に共通して存在する S- アデノシルメチオン結合部位に類似の配列が存在することから、エピジェネティックな機能が予想されていましたが、実験的確認は得られていませんでした。

シロイヌナズナのインプリント遺伝子 *FWA* が活性化されない突然変異体の解析から *AtDRE2* (*Arabidopsis thaliana* DRE2 遺伝子) が DNA 脱メチル化に必要であることを証明しました。*AtDRE2* 遺伝子が機能しなくなった突然変異体では、インプリント遺伝子 *FWA* の活性化が起これなくなっていました。また、



◀ 図 1 細胞質に存在する DRE2 が核へ移行して DNA 脱メチル化のファインチューニングを担っているモデル

複数の遺伝子の DNA 脱メチル化が起これなくなっていることも突き止めました。

さらには、*AtDRE2* はインプリント遺伝子の制御だけではなく、様々な植物組織で発現しており、とりわけストレスにตอบสนองして高発現することが明らかになっています。また、ストレス条件下では核へ移行することが観察されています。そこで、今回の共同研究では、ゲノムワイドに *AtDRE2* が標的としている領域を同定するためにメチローム解析を行っています。

Diana Buzas (筑波大学生命環境系遺伝子実験施設)

木下 哲 (横浜市立大学木原生物学研究所)

共同研究先: 小林久人 (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)

◎ 性染色体はなぜ移り変わるのか? 誕生直後の性染色体に残された選択の痕跡 ◎

脊椎動物の性決定研究は、哺乳類の性決定遺伝子 *Sry* を起点とした機構をモデルとし、極めて保存性が高いものと考えられてきました。しかし、最近になって、多くの動物種で非保存性を示す証拠が次々と報告され (図 1)、「近縁種間で急速に進化する機構」という視点で脊椎動物の性決定機構を捉え直すべきという考えが広がっています。性決定遺伝子が移り変わる動因については、「性拮抗遺伝子が新しい性決定遺伝子の誕生を促す」といった仮説がいくつか提唱されていますが、実証研究はほとんどありません。検証に必要な、「祖先状態から派生状態への移行期にある集団」が入手困難だったからです。

我々はこれまでに、トラフグの性決定遺伝子 *Amhr2Y* を発見していますが、近縁種のショウサイフグで新旧の性決定遺伝子が移行中であること発見しました (図 2)。すなわち、本種の 1% は未だに祖先型の性決定遺伝子 *Amhr2Y* を保持しているものの、残りは異なる染色体上に獲得した新たな性決定遺伝子が性を決定していたのです。本種を用いれば、誕生直後の性染色体に加わった進化の痕跡の解析などを通じて、理論仮説を検証できると期待しています。

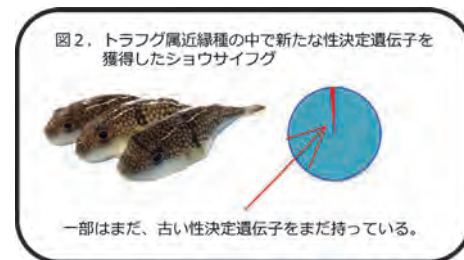


図 2. トラフグ属近縁種の中で新たな性決定遺伝子を獲得したショウサイフグ

一部はまだ、古い性決定遺伝子をまだ持っている。

本研究では、ショウサイフグの新たな性決定遺伝子の同定を目指します。また、その遺伝子の周辺領域から選択の痕跡を探し出します。これにより、ある遺伝子が新たに性決定システムの頂点に上り詰めるまでに、どのような進化的プロセスを経たのかを探ります。具体的には、「性拮抗遺伝子が新しい性決定遺伝子の誕生を促す」といった仮説を検証します。

本研究により、脊椎動物、特に魚類や両生類において遍性が疑いようのない「性決定遺伝子が移り変わる現象」のメカニズムが明らかとなれば、生物進化の謎をひとつ解き明かすことが出来ます。また、水産魚類には、白子の取れる雄の方が雌よりも付加価値が高いトラフグや雄よりも雌の成長が早いヒラメのように、雌雄で商品価値や成長特性の異なる種が多く存在します。未知性決定機構の解明は水産業にとって貢献度の高い研究課題です。

細谷 将 (東京大学水産実験所)

菊池 潔 (東京大学水産実験所)

小山 喬 (東京大学水産実験所)

家田梨櫻 (東京大学水産実験所)

共同研究先: 小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

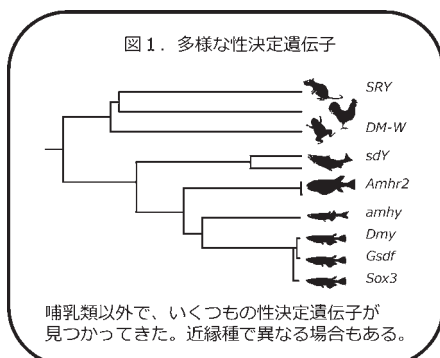


図 1. 多様な性決定遺伝子

哺乳類以外で、いくつもの性決定遺伝子が見つかった。近縁種で異なる場合もある。

◎ 塩馴化処理による植物の免疫応答のプライミング ◎

植物は細胞表面にパターン受容体と呼ばれる免疫センサーを配置し、微生物に特有の因子 (MAMPs) や内生の免疫制御シグナル因子 (DAMPs) を検出することで病原体の侵入や感染を認識する。シロイヌナズナの代表的な MAMP 受容体として FLS2 (細菌のフラジェリンを認識) や EFR (細菌の伸長因子 EF-Tu を認識)、DAMP 受容体として PEPR1/PEPR2 (内生の Pep ペプチドを認識) が知られる。これらの受容体は細胞外にロイシンリッチリピート (LRR) ドメインを有し、それぞれ特定のリガンドを認識すると共受容体 BAK1 と複合体を形成して細胞内へのシグナル伝達を開始する。その結果、大規模な遺伝子発現のリプログラミングを含む、さまざまな防御応答経路が活性化されることで抵抗性の発動に至る。その過程を担う重要なシグナル制御因子や律速となるシグナル制御ステップについて徐々に明らかになりつつある。しかしながら、植物の免疫システムが、野外では往々にして病害を拡大する環境ストレスからどのような影響を受けるかについてはほとんど研究が進んでいない。DAMP は非生物学的な環境ストレスによっても産生される上、私たちの研究からも PEPR シグナル系と環境ストレス応答との密接な関連性が推察された。そこで、塩ストレスの存在下で Pep 応答性の遺伝子発現プロファイルを得ることを試みている。予備的知見からは、植物が軽微の塩ストレスなど環境ストレスに曝されると、当該ストレスへの耐性のみならず植物免疫も強化される可能性が示唆されている。

Yamada K., Yamashita-Yamada M., Hirase T., Fujiwara T., Tsuda K., Hiruma K., and Saijo Y. (2016) Danger peptide receptor signaling in plants ensures basal immunity upon pathogen-induced depletion of BAK1. *EMBO J.* **35**, 46-61.

Ross, A., Yamada, K., Hiruma, K., Yamashita-Yamada, M.,

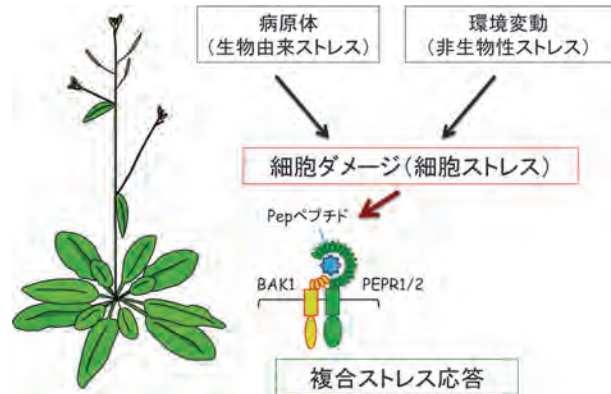


図1 PEPR シグナル系を始めとした DAMP シグナル系を介した植物の複合ストレス応答の概念図。

Lu, X., Takano, Y., Tsuda, K., and Saijo, Y. (2014) The Arabidopsis PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *EMBO J.* **33**, 62-75.

Tintor, N., Ross, A., Kanehara, K., Yamada, K., Fan, L., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Tsuda, K., and Saijo, Y. (2013) Layered pattern receptor signaling via ethylene and endogenous elicitor peptides during Arabidopsis immunity to bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 6211-6216.

西條雄介 (奈良先端科学技術大学院大学)

共同研究先: 太治輝昭 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 骨資料の損傷と残存 DNA の劣化に関する定量的研究 ◎

野生原種から家畜 (家禽) が作出される「家畜化」は、ヒトの生活様式の変化や食糧の安定確保に関わる重要なイベントである。アジアや太平洋域では、資源の乏しい環境へのヒトの移動の成功に家畜の存在が強く寄与した可能性も指摘される。家畜がいつ、どこで、どのように生まれ広まったかを探る家畜史研究は、それらを持ち運んだヒトの移動・交流史の解明に繋がるほか、現代の家畜の管理や改良にも貢献できる可能性を秘めている。近年の家畜史研究では、遺跡から出土した動物遺存体 (特に骨や歯) を用いた ancient (古代) DNA 解析が盛んに行われている。古代 DNA 解析は遺跡が利用された当時の個体の遺伝情報を扱うため、現生集団との比較などを通じて対象種の起源や拡散を議論できる利点を持つ。しかし遺跡出土の骨に残る DNA は一般的に損傷を蓄積している事が多く、解析成功率の低さが大きな問題となっている。この DNA の劣化は遺跡から出土した後の資料の保管方法にも影響されると言われ、水や紫外線、温度などが要因として挙げられている。しかし、どの要因が DNA を最も劣化させるのか? 保管時に最も留意すべき点は何か? といった疑問に定量的に答えられる研究は少なく、骨資料の保管方法は確立されていない。

そこで本研究ではリュウキュウイノシシ (*Sus scrofa riukiuanus*) の下顎骨から複数の骨片を切り出し、そのうちの1つから直ちに抽出した DNA (標準試料) と半年間の損傷期間を経た残りの骨片から抽出した DNA (損傷試料) を比較する事で、残存 DNA の劣化の様子を探っている。比較の際は次世代シー



ケンス解析を活用し、DNA の断片化や脱アミノ化などの損傷の有無、コンタミネーションなどによる解析成功率の変化を評価する。これまでに標準試料の解析を終え、現在は水中や紫外線照射下、高温下などで保管した損傷試料の解析を進めている。解析を通じて DNA 劣化に関わる要因を探り、発掘現場や博物館などにおける骨資料の保管の改善に貢献していきたい。

高橋遼平 (山梨大学医学部法医学講座)

覚張隆史 (金沢大学人間社会研究域)

共同研究先: 黒澤弥悦 (教職・学術情報課程)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 植物の転写開始点解析 ◎

植物のプロモーター領域には転写の方向、転写開始点、転写頻度に関わる情報が含まれており、また、環境因子や発達状態によって転写頻度が調節される遺伝子についてはその制御についての情報も含まれる。プロモーターの構造は転写開始点を基準に認識する必要があるため、私たちの研究室では転写開始点 (TSS) を大規模実験により同定し、植物のプロモーター研究に役立っている。

TSS のゲノムワイドな同定は Cap-Trapper 法による転写開始点タグ (完全長 cDNA の 5' 末端タグ) の調製と NGS によるランダムシークエンシングにより行っている (Yamamoto *et al.*, Plant J 60: 350, 2009 など)。一つのプロモーターに TSS が一つだけ、ということではなく、数十塩基程度の幅の中で TSS が散在している。このため、TSS を定量的に評価し、ひとつのプロモーターに含まれる最も強い TSS を決定する必要がある。また、一つの遺伝子に対してプロモーターが複数存在することも珍しくない。この場合も定量評価により遺伝子ひとつに対して最も強いプロモーターを同定する必要がある。プロモーターと遺伝子モデルとの対応付けは TSS タグのペアエンド解析により行っている。

こういった作業によりゲノム中のプロモーターの位置が決定

され、それに続くバイオインフォマティクス解析によりゲノム配列からのコアプロモーター配列、転写制御配列の抽出と抽出配列のゲノム配列へのマッピングが行われ、プロモーターアノテーションの情報が充実していくことになる。得られた研究成果 (転写開始点情報、プロモーター構造) は研究室で運営している植物プロモーターデータベース ppdb (<http://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp>, Hieno *et al.*, Nucleic Acids Res 42: D1188, 2014) において順次公開されている。

これまでの私たちの研究では、プロモーターは遺伝子上流にあり下流へ向けて転写が生じるタイプのもの (genic promoter) だけではなく、遺伝子内部にあるもの (intragenic promoter)、遺伝子に対して逆向きのも (antisense promoter)、対応する遺伝子モデルがないもの (orphan promoter)、があることを明らかにしている (Yamamoto *et al.*, Plant J 60: 350, 2009)。これらの観察から、ゲノム中においては不必要な転写活性があちこちからリークしているような状況が想像されている。

プロモーター情報は発生及び環境適応の中心部となる遺伝子発現制御解析や、作物の品種間差の解析、集団遺伝学においては regulatory SNP の理解、進化研究、などに活用されている。

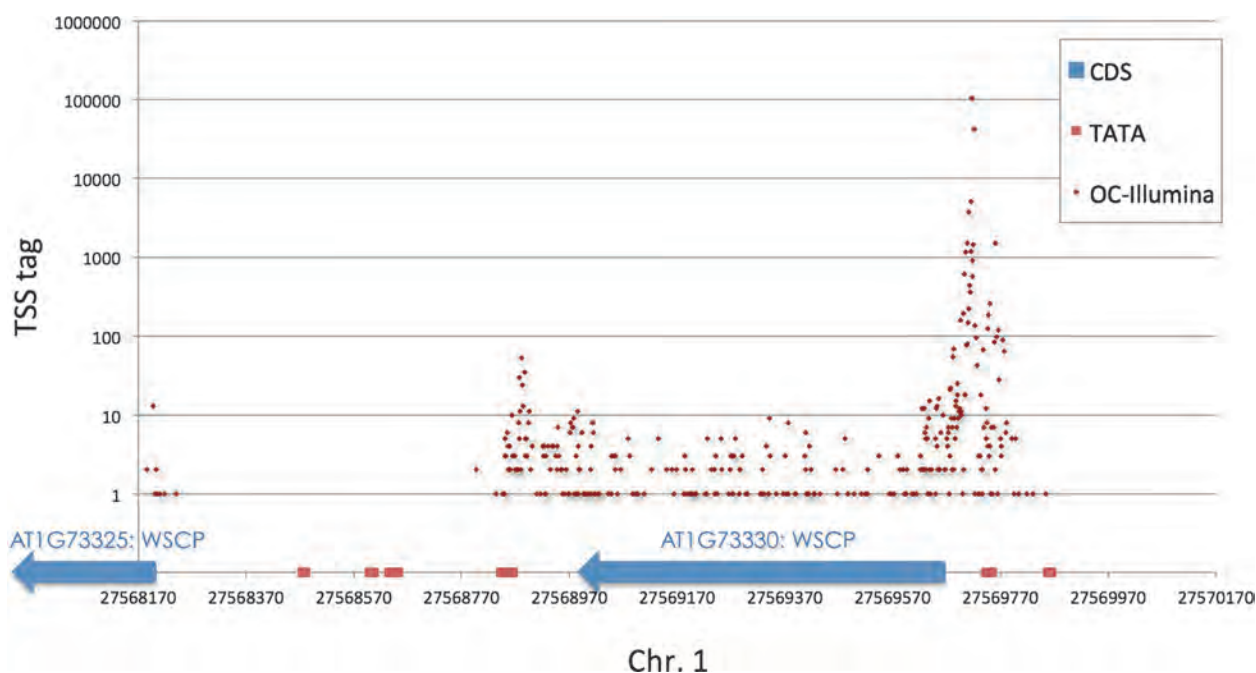


図1 シロイヌナズナ Water Soluble Chlorophyll-Binding Protein (WSCP) の転写開始点の分布

山本義治 (岐阜大学応用生物科学部連合農学研究科)

時澤陸朋 (岐阜大学連合農学研究科)

楠 和隆 (岐阜大学連合農学研究科)

共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

後期新規採択課題

○ ウシ着床前胚において MATII と相互作用するゲノム領域の探索 ○

哺乳動物の受精直後の着床前胚発生は、エピジェネティクスの主要な機構である DNA やヒストンのメチル化がダイナミックに変化する時期であり、環境要因によるエピジェネティック修飾の変化を受けやすい時期と考えられています。アミノ酸の一つであるメチオニンは、DNA やヒストンのメチル化の際の唯一のメチル基源、S-adenosylmethionine (SAM) の前駆物質であり、エピジェネティック修飾に密接に関与しています。実際、妊娠の初期に、メチオニンやその代謝経路に含まれる栄養素の不足に曝された母体から生まれた産子では、組織における DNA のメチル化の変化が起こっており、成長や脂質代謝、糖代謝が変化することが報告されています。着床前胚発生期における栄養環境が、出生後の形質にまで影響を与え、その背景にはエピジェネティック修飾が関与していることが示唆されます。しかし、栄養環境の変化によってエピジェネティックな変化が起こる遺伝子と形質との間に因果関係があるのか、その変化は着床前胚においてすでに起きているのか、なぜ胚全体を覆う栄養環境の変化が、全ての遺伝子ではなく特定の遺伝子に発現の変化をもたらすのかが不明であり、これらの疑問に対して答えを見出すことは、栄養によるエピジェネティクスの制御を示す概念であるニュートリエピジェネティクスの基盤を形成することに資すると考えられます。また、ニュートリエピジェネティクスは、着床前胚を取り巻く環境の制御による、家畜の健康や生産形質の素因の形成(プログラミング)の可能性を内包しています。

上述の通り、DNA やヒストンのメチル化においては、SAM が唯一のメチル基源であることから、メチオニンの SAM への代謝はニュートリエピジェネティクスの根幹に関わっていると予想されます。そこで本研究では、着床前胚発生を通じて発現し、メチオニンを SAM に変換する酵素、methionine adenosyl-

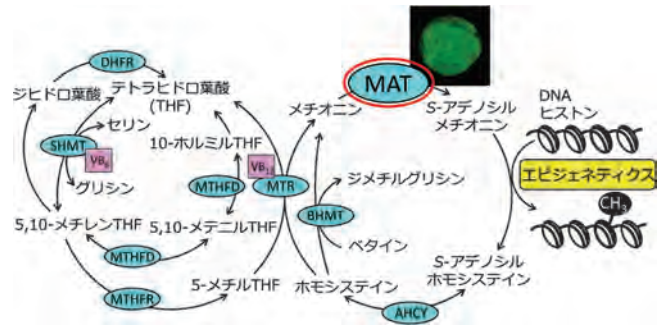


図1 メチオニンの代謝とエピジェネティック修飾の関係(本文参照) 写真はウシ桑実胚における MATII の免疫蛍光染色像

transferase II (MATII) に着目しています。MATII はヒストンメチル化酵素と複合体を形成し、特定の遺伝子領域のクロマチンに結合することが知られています。本研究ではウシ着床前胚において MATII が相互作用する遺伝子をまず明らかにし、メチル基栄養環境の調節や関連代謝酵素の活性制御によりそれらの遺伝子の発現を制御することによって、子畜の長期にわたる健康や生産形質のプログラミングに応用する方策を探るための基盤を構築することを目的としています。現在、ウシ胚盤胞において MATII が相互作用するゲノム領域を探索するために ChIP-seq を行っています。

池田俊太郎 (京都大学大学院農学研究科)
共同研究先: 岩田尚孝 (農学部)
川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

○ 受精卵の全能性を予測する新技術の開発 ○

卵子は全ての細胞へと分化できる分化全能性を受精によって獲得します。受精卵の持つ全能性という極めて特殊且つ重要な能力を体外で維持するため、卵子の体外受精技術及び体外培養技術が発展し、家畜繁殖学、生殖医療及び幹細胞学は大幅な進歩を遂げました。一方で、体外受精した全ての卵が発生するのではなく、一部の受精卵は胚発生初期の段階でその発生を停止します。しかし、正常に発生が進行するであろう受精卵のみを選定する有効な方法は存在しません。そこで本研究では、受精直後のマウス卵に着目し、その後発生するであろう受精卵を非侵襲的に選別する新手法を、シングルセル RNA シークエンシング (single cell RNA-seq) 及び網羅的クロマチン解析技術を用いて開発します。

卵子は見かけ上均一で、大幅な異常を示す卵以外、形態学的に発生能を判別することは困難です。現在まで、受精後の初期胚のイメージングや胚細胞の DNA 解析を通じて、発生能力の高い胚を選別する研究が行われてきました。本研究では特に、卵子由来の転写産物に着目し、受精卵の発生能と相関関係がある転写物の同定を目指します。卵子に存在する転写物は受精後の胚発生に必須であることが知られていますが、実際に胚の発生能に影響を与える特定転写物を同定した例はほとんどありません。また、卵子に存在する転写物は不均等分裂の結果生じる極体中に分配されることも知られており、RNA シークエンシングによって卵細胞質と極体の転写物が類似していることを示した報告もあります。以上より、本研究では極体の転写物を調べ、その極体に相当する卵子を追跡調査することにより、受精

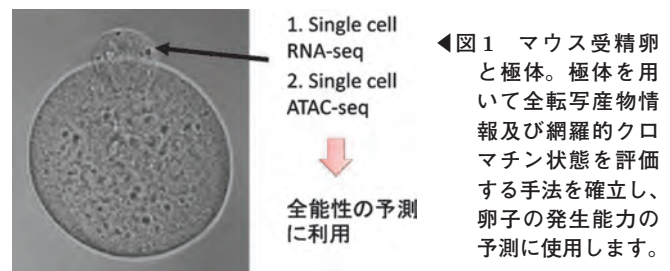


図1 マウス受精卵と極体。極体を用いて全転写産物情報及び網羅的クロマチン状態を評価する手法を確立し、卵子の発生能力の予測に使用します。

卵の発生能に影響を与えずに、発生能力と相関のある卵内(極体内)転写物を探索します(図1)。極体を用いて single cell RNA-seq を行い、発生能力と相関関係がある転写物あるいは転写パターンをバイオインフォマティクス解析により同定します。

卵内転写物に加えて、転写に関連したクロマチンの状態を1細胞から網羅的に解析する方法も発展させ、転写情報との統合解析により、卵子の全能性に影響を与えるクロマチン状態についても評価します(図1)。最終的に、高い発生率と相関のある転写物あるいはクロマチン状態を指標に、卵子の発生能を受精前あるいは受精直後の段階で予測できるシステムの確立を目指します。

宮本 圭 (近畿大学生物理工学部)
塚口智将 (近畿大学生物理工学部)
共同研究先: 河野友宏 (応用生物科学部)
小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)
神尾明日香 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 貯穀害虫コクヌストモドキ類の対天敵回避行動の系統差を分子レベルで解明する ◎

生物が生存していくために重要なことは「食う・食われる」の関係と、どう向き合うかです。天敵を利用して農業害虫を防除する際にも、天敵と餌生物の間には、「食う・食われる」の関係が存在します。このとき、餌生物が天敵からどのように逃げののかを知っておくことは、天敵の有効な利用においてとても重要な知見となります。私たちは、米や小麦粉に繁殖する貯穀害虫のコクヌストモドキを被食者モデルとし、アダンソンハエトリグモとコメグラサシガメを捕食者モデルとして、「食う・食われる」の関係を調べてきました。

とくに、被食者が天敵をやり過ごす方法として有効である「死んだふり」の持続時間に、20世代以上の人為選抜を施し、外部からの刺激にตอบสนองして、長く死にまねを行うロング系統（以降、L系統）と死にまねをほとんど行えないショート系統（S系統）を確立しました。これまでの研究で、S系統はL系統の個体に比べて、普段から多動性を示し、オスではメスとの出会い回数が多くなるため、より交尾のチャンスが得られますが、よく動き回るため捕食者にも見つかりやすく、食べられやすいことが明らかになっています。

またL系統とS系統の間で、ドーパミン、オクトパミン、チラミンといった生体アミンの行動への作用が見られていて、死にまねをできず普段から動き回る系統では、ドーパミンの発現量が多いことがわかっています。さらに最近では、ドーパミンアクチベータであるカフェインを経口摂取させることで、死にまねを長いあいだ続けるコクヌストモドキ・ロング系統の死にまね持続時間を短縮する作用があることも明らかになりました。つまり、行動発現の違いを支配している標的はドーパミン合成酵素系・ドーパミンレセプター遺伝子等の遺伝子にほぼターゲットが絞られているわけですが、これらの遺伝子が選抜

されたのか、あるいは他の選抜された遺伝子がこれらの作用に影響を与えているのかは未解明でした。選抜した系統間の遺伝子発現を次世代シーケンサーによるRNA sequence (RNA Seq.) 法で比較することで、これは明らかになると予想できます。コクヌストモドキはモデル昆虫であり、すでにあるゲノム情報が利用できます。そのため本共同研究では、次世代シーケンサーおよびハイオインフォマティクス解析を行います。

本研究の解析の結果、生物が敵から逃げる手段として、死んだふりをすることや、より早く逃げ回る戦術に直接、関与している遺伝子（あるいは遺伝子群）の実態が明らかになると考えられます。これらはドーパミン等の生体アミンレセプター遺伝子（群）であると考えられますが、それはおそらく多くの生物に共通する「活動性」を支配する遺伝子（群）だと推察されます。そのような遺伝子が特定されれば、たとえば生物農薬（天敵）による防除において、敵からうまく逃げる生物が発現させている遺伝子の特定にも有効となると考えられます。



図1 モデル被食者として用いたコクヌストモドキの成虫

宮竹貴久（岡山大学大学院環境生命科学研究科）

佐々木謙（玉川大学農学部）

共同研究先：矢嶋俊介（応用生物科学部）

内山博允（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 実験室進化によりグリセロール資化能を賦与した出芽酵母のオミクス解析 ◎

資源枯渇や地球温暖化などの問題から、化石資源に依存しない循環型社会の形成が求められている。そして、循環型社会の形成に向けて、化石資源に依存しないものづくり技術の開発の重要性が増している。このような背景のもと、生物の力を利用したものづくり技術の開発が求められている。

カーボンニュートラルな燃料として注目されているバイオディーゼルは、主に植物由来の油脂（トリアシルグリセロール）のエステル交換反応により生成されるが、その過程で原料の10%に相当するグリセロールが副生成物として大量に生じる。このグリセロールは有効な用途はなく、未利用資源としてのグリセロールを有効活用する技術の開発が求められている。グリセロールは多くの微生物が炭素源として利用可能な化合物であり、微生物の代謝機能を活用したグリセロールからの有用物質生産プロセスの開発に期待が集まっている。

古くからアルコール醸造などの有用物質生産に用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はグリセロールを資化する代謝経路を保有しているものの、実際には唯一の炭素源として増殖する能力がほとんどなかった。そのため、出芽酵母を宿主としてグリセロールから有用物質生産を行うためには、グリセ

ロールを資化する能力の賦与およびその向上が必須となる。

近年、細胞に外的環境の負荷を与えながら継代培養を繰り返すことで、与えられた負荷に対して適応した細胞を得る実験を行い、細胞が適応するプロセスを解析することで、実験室レベルで生物進化のプロセスを明らかにしようとする試みがなされている。このような実験室レベルでの進化実験は、有用物質生産研究に応用することも可能である。すなわち、設定した目的に合う負荷を与えながら植え継ぎを繰り返し、負荷に適応するように進化した細胞を取得する。そして、進化した細胞の細胞内部状態を解析し、与えられた環境に適応した状態を生物細胞内に再構成することで、生物細胞を用いた有用物質生産に有用な表現型が賦与された宿主細胞を創製することができると期待される。

我々は、グリセロールを炭素源とした最少培地において出芽酵母 *S. cerevisiae* W303-1B を培養する実験を行った。独立10系統の培養実験を行ったところ、培養開始から10日以上は細胞の増殖が見られなかったが、いくつかの系列で細胞の増殖が見られるようになった。増殖が見られた系列について植え継ぎ操作を繰り返すと、高い増殖速度を維持して増殖を続けることができることを見いだした（図1）。このことは、細胞がグリセロールを炭素源として増殖する環境に適応し、実際に増殖することが可能な状態に進化したことを示している。また、進化した細胞を、グルコースを炭素源として継代培養した後、グリセロールを炭素源とする培地に植え継いだところ、元々グリセロール存在下で示していた増殖速度とほぼ同じ増殖速度を示した。我々はグリセロールを資化して増殖できるように進化した細胞のトランスクリプトーム解析を行い、グリセロールを資化するという特性に関連のある遺伝子発現の変化を特定するとともに、その遺伝子発現の変化を実現するような細胞を再構成することで、出芽酵母のグリセロール資化能の向上に現在取り組んでいる。

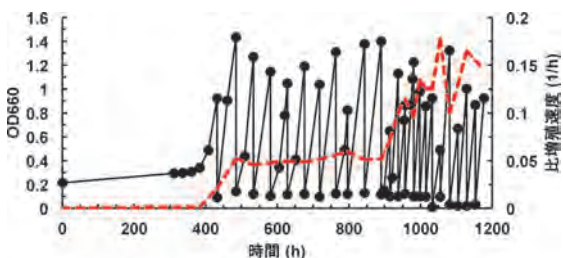


図1 グリセロール炭素源下における出芽酵母の植え継ぎ培養実験培養中の培養液の濁度（●）と比増殖速度（---）の経時変化を示す。植え継ぎを繰り返すことで、比増殖速度が上昇し、グリセロールを炭素源として増殖するという環境に適応できるようになったと考えられる。

平沢 敬（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

共同研究先：吉川博文（応用生物科学部）

兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 牛の腸管出血性大腸菌 O157 保菌制御のための 進化系統別変異発生頻度の解析 ◎

腸管出血性大腸菌 O157 (以下「O157」) の進化系統グループ (PG) を平成 26 年度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」共同研究により調査したところ、従来一つの PG と思われていたものが複数に分割したり、その逆に複数の PG が一つの PG となる、といったように PG の再定義が必要であることが判明した。そこで PG の再定義を行ったところ、PG 間で変異の発生頻度が異なる可能性が示唆された。一般的に生物は多様性があると環境等からの様々なストレスが発生した場合に生き残りやすくなることから、優勢に分布しやすくなる。従って変異しやすい O157 の PG が存在すると、O157 の保菌が問題となっている牛からの駆除が困難となるうえに、牛の飼育環境中からの排除が困難になる恐れがあ

る。これまでの O157 の変異発生に関する研究では特定の菌株を使用した研究のみが行われており、PG との関連性に着目した研究はない。

そこで本研究では、O157 の変異の発生頻度および発生 site と PG の関連性について調査を行うこととした。これまでに variable number of tandem repeat の変異発生状況を参考にして菌株を選択し、その 3 継代分の DNA を採取し、次世代シーケンサーによる解析を NGRC に依頼中である。

横山栄二 (千葉県衛生研究所)

共同研究先: 村上寛史 (農学部)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 根の成長における青色光受容体フォトトロピンの 転写制御機構の解析 ◎

芽生えの初期生育過程は、植物の生存とそれに続く成長や発達に重大な影響を与える。種子が発芽 (幼根出現) した後、種子の栄養貯蔵に依存しない成長が始まるまでの芽生えの確立期は、植物の生存にとって決定的な時期である。例えば畑では、トウモロコシ芽生えの約 10-55%、ダイズの 48-70% がこの段階で死滅すると言われている。芽生えの確立においては根の成長発達には特に重要で、例えば地上部子葉・本葉が展開し光合成を始めたとしても、根の成長が悪ければ後に個体全体の成長は悪くなり、時に個体の死を招く。芽生えの確立における根の成長は外部環境刺激に鋭敏に反応し、重力、光、水分、接触、温度によって、成長速度、成長方向が変化することが知られている。しかしながら、未だ根の環境刺激に反応した遺伝子発現制御と成長パターン表現型の関係の理解には至っていない。そこで本研究は、芽生え確立期の根の、特に光環境応答に着目し、遺伝子発現調節を網羅的に解析し、環境に適応する植物の生理システムの包括的な理解を目指すことにした。

シロイヌナズナの根は、横から光を照射すると青色光受容体フォトトロピン 1 (phot1) 依存的に、光照射を避けるように負の光屈性成長を示す。我々はこれまでの研究によって、シロイヌナズナの根の光屈性はオーキシン不均等勾配形成が起きないこと、オーキシン生合成及び輸送活性に依存しない光屈性誘導機構が働くこと、を明らかにした (未発表)。しかしながら、オーキシン関連転写因子 ARF7、ARF19 は根の光屈性に関与することも突然変異体の解析から明らかにした (未発表)。これらの結果は、オーキシンを介さない遺伝子発現調節によって根の光屈性が誘導されていることを強く示唆した。すなわち、phot1 の光による活性化が、オーキシン不均等勾配形成を誘導することなしに、遺伝子発現調節によって根の伸長制御を行っているのではないかと、という根の光屈性誘導機構の新しい仮説を得るに至った。

そこで本研究は根の伸長における phot1 の遺伝子発現調節を網羅的に明らかにすることを目的に、phot1 シグナル有り無し

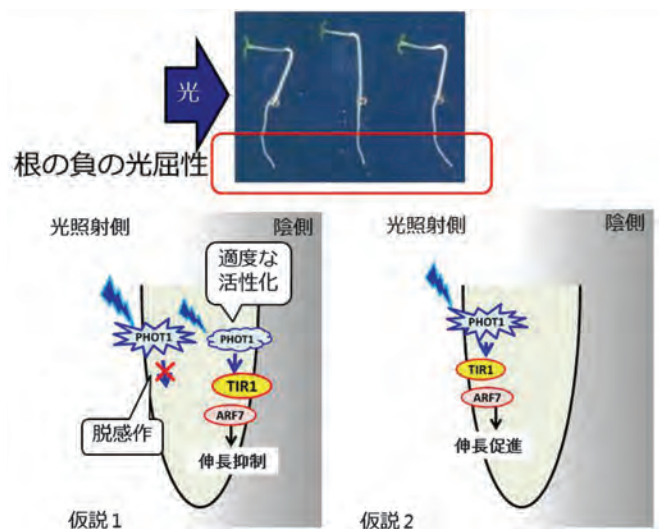


図 1 根のオーキシン非依存的な光屈性における光シグナル伝達経路の作業仮説

の違いによる遺伝子発現変化を RNA-seq 法による遺伝子発現プロファイリングによって行うことにした。遺伝子発現の違いを大きく示す遺伝子群が観察されれば、根の phot1 シグナル活性化に反応したそれらの遺伝子の生体内の機能を解析していく計画である。

酒井達也 (新潟大学自然科学研究科)

木村太郎 (新潟大学自然科学研究科)

共同研究先: 坂田洋一 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ イネの生殖器官に特異的な非コード DNA 領域に由来する小分子 RNA の解析 ◎

私たちは遺伝・育種の根幹をなす生命現象である減数分裂について、植物における制御機構を研究しており、その過程でイネ生殖細胞で特異的に発現する Argonaute 遺伝子 MEL1 を同定しました。Argonaute は、20-30 塩基長の small RNA をガイド分子として標的 RNA と結合し、転写制御あるいは転写後制御を介して個体発生やウイルス防御などで重要な役割を担う蛋白質です。イネ MEL1 機能を欠損した個体は、減数分裂が初期段

階で停止して種子不稔となります。私たちは、(1) MEL1 は主に 21 および 24 塩基長 RNA と結合すること、(2) MEL1 と結合する small RNA の前駆体 RNA コード領域は遺伝子間領域の 1,000 カ所以上に分布し、生殖器官特異的に転写されること、(3) 24 塩基長 RNA が、生殖細胞を包む体細胞組織で減数分裂の直前に生合成され、その一部は MEL1 と結合し得ること、などを明らかにしてきました。

上記の結果から、減数分裂前にイネの生殖器官で豊富に蓄積する 24 塩基長 small RNA は細胞間を移動するシグナル分子であり、生殖細胞で MEL1 と結合して減数分裂の進行に寄与する可能性に加え、生殖細胞と周辺体細胞の発生の同調化にも重要な役割を果たす可能性が示唆されます。

本課題では、東京農大生物資源ゲノム解析センターと国立遺伝学研究所の共同研究により、MEL1 と small RNA の減数分裂における関連性をより詳細に明らかにするため、mRNA および small RNA について生殖細胞発生ステージ別の次世代シーケンス解析を行います。本課題の結果から、植物の減数分裂進行に必須のエピジェネティックな制御機構の一端の解明が期待できます。

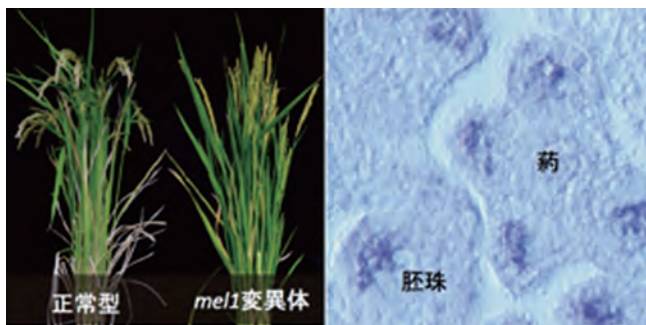


図1 イネの生殖細胞で特異的に発現する MEL1 遺伝子
(左) MEL1 遺伝子の機能欠損型変異体 (mel1 変異体) では種子稔性が完全に欠損する。
(右) MEL1 遺伝子は、葯 (雄性器官) および胚珠 (雌性器官) の生殖細胞で特異的に発現する。青く染まった部分が MEL1 mRNA の発現部位。

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

◎ 内部寄生蜂感染時の宿主ショウジョウバエのトランスクリプトーム解析 ◎

地球上には、ある種の個体を宿主としてその体内に侵入し、宿主から得られる栄養を資源として成長する「捕食寄生者」が存在します。特に、昆虫では多くの捕食寄生者が独立に進化しており、その種数は全生物種の 10% 以上を占めると言われています。捕食寄生者がどのようにして宿主を乗っ取る形で自身の発生を進行させるのか、またその際にどのような遺伝子が関与するのかを解明することは、生物間相互作用の分子メカニズムを理解する上で本質的な課題です。また、昆虫を宿主とする捕食寄生者は農業害虫の天敵として利用可能な場合があり、捕食寄生者と宿主の関係性の理解は応用科学的にも重要視されています。しかしながら、従来の捕食寄生者の研究のほとんどが生態学的あるいは生理学的研究に留まっており、遺伝子レベルでの研究はあまり実施されていません。

本研究では、分子遺伝学の優れたモデル昆虫であるキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* と、これを宿主とする捕食寄生者 (内部寄生蜂) *Asobara japonica* に注目し、上述の問題にチャレンジすることを計画しています。*A. japonica* は、ショウジョウバエの幼虫に針を刺して体内に卵を産み付けます。卵は宿主幼虫体内で孵化し、約 17 ~ 18 日間かけて成虫まで発生します。そして最終的には、ハエの蛹からハチの成虫が羽化します。数多く存在する内部寄生蜂の中から、私たちが *A. japonica* に着目する理由は、分子生物学的・発生学的研究において優れた以下の 2 点の特徴を有するからです。(i) *A. japonica* には、他の寄生蜂ではほとんど知られていない単為生殖系統が存在します。この系統を用いれば雌雄の交配の必要性がないため、日常的な系統の維持も、また感染実験系の構築も容易かつ安定的です。(ii) 我々の感染実験系において、それぞ

れ適切な個体数の *A. japonica* とショウジョウバエ幼虫を同じ飼育容器内で同居させれば、ほぼ 100% に近い感染率を実現することができます。他の寄生蜂においては見られない高い感染率は、*A. japonica* を利用する大きなメリットです。高い感染率があればこそ、感染個体と非感染個体を正確に区別したサンプリングが可能となります。

以上を踏まえて本研究では、*A. japonica* の感染時と非感染時のショウジョウバエのトランスクリプトームの変化を解析し、*A. japonica* 感染が宿主に与える影響を分子レベルで解析する予定です。また、*A. japonica* 遺伝子情報を *de novo* アセンブリーによって整備することも検討しています。



図2 キイロショウジョウバエ幼虫に卵を産みつける寄生蜂 *Asobara japonica*

丹羽隆介 (筑波大学生命環境系)
島田 (丹羽) 裕子 (筑波大学生命領域学際研究センター)
竹股ひとみ (筑波大学大学院生命環境科学研究科)
共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ 海産原始紅藻類ウシケノリにおける淡水適応機構のゲノム科学的研究 ◎

原始紅藻類は、波打ち際、すなわち環境変動が激しい潮間帯に生息しているため、温度や塩類濃度の変化に対する応答性や適応性が高いと考えられる。しかし、実際にどのような環境ストレスに対してどの程度の耐性を持つのかは不明である。我々は、海藻の柔軟な環境応答の制御機構を解明することで海藻生物学を進展させ、その成果の利活用により海藻のみならず穀類や野菜類などの陸上植物の環境耐性を向上させることを目指している。

本研究では、海産原始紅藻類ウシケノリ *Bangia fuscopurpurea* を取り上げ、そのゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を通してその高い環境ストレス耐性能の解明を試みる。我々はこれまでに、ウシケノリが淡水中で生存可能であること（現時点では淡水中で生存できる唯一の海産原始紅藻類である）、その場合細胞形態を変化させること、そのような変化が可逆的であること、など淡水適応において形態的可塑性を示すことを明らかにしている。特に注目されるのは、細胞が縦方向につぶれたように変化することであり（図1）、低浸透圧条件下で細胞が収縮することは、浸透圧調節の一般常識から外れた極めて特殊な応答である。また、淡水ストレスは陸上植物が通常経験できない環境変化である。これらのことより、ウシケノリの淡水適応能を解明することは、植物の環境応答機構の理解を深化させる重要な試みと考えている。

現在、原始紅藻類のゲノム解析は、アマノリ属ササビノリ *Pyropia yezoensis* 以外では進んでいない。そのため、ウシケノリが持つ特殊な淡水適応能を理解するためには、そのゲノム解析を行い、既存の環境ストレス応答関連因子をコードする遺伝子の有無とそれらの発現制御機構を明らかにすることが必要となる。以上を踏まえ、本研究ではウシケノリのゲノム解析を行い、トランスクリプトーム解析の結果を統合することでウシケノリ

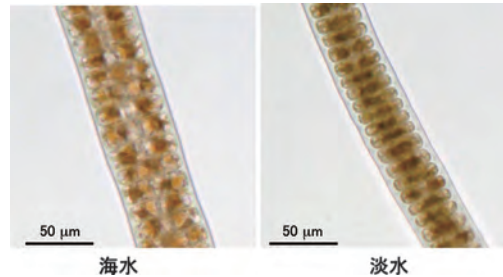


図1 ウシケノリの淡水適応に伴う細胞形態の変化

の淡水適応能の分子機構を解明していくことを目的とする。なお、本研究はウシケノリ属紅藻類を用いる世界初のゲノム解析となる。

農学分野では、水産養殖品種や陸上資源植物において環境耐性向上を介した有用品種の育種を可能にすることが期待されており、今後の植物学の大きな使命として、食資源の高品質化とその生産持続性の確保があげられる。本研究により、ウシケノリの特殊な淡水適応に関わる未知の制御機構の存在が明らかになれば、将来的にその解明を通して得られる遺伝子情報を活用することで、水産養殖海藻や陸上食資源への新規機能の導入や環境耐性向上による生産の規模拡大と持続性を確保できるようになるであろう。特に、ゲノムに存在しない海藻特異的な環境耐性関連遺伝子の導入による陸上植物への新規機能の付加は、新規の方法として期待できる。

三上浩司（北海道大学大学院水産科学研究院）

共同研究先：高橋 潤（生物産業学部）

田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

◎ タツノオトシゴの育児嚢の形態形成メカニズム ◎

タツノオトシゴを含むヨウジウオ類は、他の魚にはない特殊な「子育て」器官である育児嚢をもっています。メスが産んだ卵をオスが精子を放出して受精させた後に、卵はオスの子育て器官である育児嚢で発生します。その後、孵化した稚魚をオスが出産します。育児嚢の形態は魚種ごとに異なっており、タツノオトシゴでは袋状の育児嚢をしているのに対し、トゲヨウジやイシヨウジは腹側に卵を付着させているのみで、卵の一部は外界に露出しています。

卵は一般に、外界からの保護の役割を担う卵膜で覆われています。卵膜は厚く強靱な構造物なので、孵化時に胚自らが孵化酵素を分泌して卵膜を分解して孵化します。袋状の育児嚢内で保護されたタツノオトシゴの卵と外界に一部が露出しているト

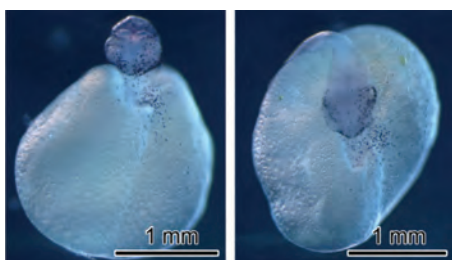


図1 タツノオトシゴ胚における孵化酵素遺伝子の発現局在

ゲヨウジやイシヨウジの卵とでは、卵膜による胚の保護する度合いが異なっています。そこで、卵膜の厚さを3魚種間で比較したところ、タツノオトシゴの卵膜はトゲヨウジやイシヨウジに比べて薄くなっていることがわかりました。これらの魚が属する正真骨魚類では卵膜を分解する孵化酵素として、2種類HCEとLCEがあり、両者の共同作用により卵膜を分解することが知られています。HCEは卵膜を部分分解により軟化させ、LCEがそれを可溶化します。3種の魚から孵化酵素遺伝子のクローン化を試みた結果、トゲヨウジとイシヨウジからはそれぞれHCEとLCEの2種類のcDNAがクローン化できたのに対し、タツノオトシゴからはHCE遺伝子しかクローン化できませんでした。そこで、次世代シーケンサーを用いてタツノオトシゴのゲノム配列を決定し、LCE遺伝子を探索したところ、LCE遺伝子の断片配列のみが見つかり、偽遺伝子していることがわかりました。これらの結果から、卵を育児嚢内部で保護しているタツノオトシゴでは外界から胚を保護する役割を担う卵膜の必要性が低下して卵膜が薄くなっており、孵化時には卵膜を軟化させるHCEのみの作用で孵化できると考えられます。

川口眞理（上智大学）

共同研究先：河野友宏（応用生物科学部）

川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）

◎ メタゲノム解析を利用した土壌病害診断バイオマーカーの開発 ◎

サツマイモ立枯病は放線菌 (*Streptomyces ipomoeae*) により引き起こされる土壌病害である。この病気に感染すると葉は黄化した後枯死し、根には病斑が生じる。一方、サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) は有害線虫であり、根部に寄生し、根こぶを形成する。茎葉部では黄化・萎縮、塊根部では裂開・奇形が発生する。よってこれらは作物の収量、外観品質に重大な被害を及ぼす。長年薬剤散布による防除対策が行われてきたが (立枯病にクロロピクリン、ネコブセンチュウに D-D) 近年では感染地域の拡大、薬剤消毒による周辺住民への刺激臭、コストの問題等が指摘されている。抵抗性品種は極めて限られるため、有効かつ画期的な防除法の確立が急務とされている。

最近の研究結果から、土壌より回収された DNA を対象に線虫由来の配列をリアルタイム PCR 法により解析することで線虫の進行度合いを診断可能なことが報告された (佐藤ら., 第 27 回いも類研究会 2013)。このようなバイオマーカーを使えば、農作物作付け前に発病度合いを把握できるため、効果的に土壌を選択できる。しかし、現時点ではマーカーとして利用できる配列は極めて少なく、立枯病に関しては利用可能な配列が存在しない。またそもそもこれら病害あるいは有害線虫が土壌環境・生態系に及ぼす影響をマイクロレベルで詳細に解析した例はない。土壌病害は一度発病すると毎年発生する。そのため土壌環境・生態系は何らかの影響を受け、変化していることが想定される。また、線虫の発生あるいは抑制に土壌微生物相が大きく影響することも示唆されている。しかしながら、それを立証する科学的な知見は極めて少ない。

近年高速シーケンサー (以下 NGS とする) を利用し、土壌や海水、ヒトの消化器官等に存在する多種多様な微生物を網羅的に解析する「メタゲノム解析」が盛んに行われている。この手法では環境試料から回収されたゲノム DNA を直接解析する

ため、従来解析困難であった難培養性微生物種も解析可能である。また NGS の高いデータ出力を活かし多数の微生物種を一気に特定できる。

そこで本研究では、立枯病およびネコブセンチュウの発病・非発病土壌を対象にメタゲノム解析を行い、含まれる微生物相を網羅的に解析することとした。これまでの予備的な研究結果から、ネコブセンチュウ発病・非発病土壌間で微生物相に明らかな違いがあることが示されている (Monden *et al.*, unpublished data)。

興味深いことにマルチ被覆の有無でも違いが見られ、土壌中の微生物相はさまざまな環境条件に影響を受けることが示唆された。現在、立枯病発病・非発病土壌等のメタゲノム解析、ならびにネコブセンチュウ解析用土壌を用いたより詳細な解析を進めている。これにより病害感染が土壌環境・生態系に及ぼす影響の全貌を明らかにし、発病・非発病土壌間で明らかな差のある DNA 配列を利用することで土壌病害診断バイオマーカーの開発を試みる。

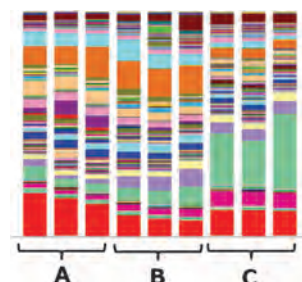


図1 ネコブセンチュウ発病・非発病土壌における微生物相の比較結果

A: 発病土壌、マルチ被覆有、
B: 発病土壌、マルチ被覆無、
C: 非発病土壌、マルチ被覆無

門田有希 (岡山大学大学院環境生命科学研究科)

共同研究先: 横田健治 (応用生物科学部)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ *Bradyrhizobium japonicum* Is-34 のゲノム解析 ◎

Bradyrhizobium japonicum は、ダイズに“根粒”を形成する細菌 (根粒菌) です。根粒内では、*B. japonicum* が、空気中の窒素をアンモニアに変換し、ダイズに供給しています。一方、ダイズは、根粒菌 *B. japonicum* に光合成産物を供給しています。

こうしたダイズと根粒菌の共生関係は、ダイズが保有する *Rj* 遺伝子によって制御されていることが知られており、現在までに、8種類 *Rj* 遺伝子が同定されています (表1)。例えば、ダイズ品種フクユタカが持つ *Rj4* 遺伝子は、*B. japonicum* Is-34 などの根粒形成を抑制します。日本の栽培品種の中で、フクユタカが最も栽培されていることなどは、ダイズ栽培において、*Rj4* 遺伝子が重要な役割を担っている可能性を示しています。近年、*Rj4* 遺伝子産物が、タウマチン様タンパクであることが示されました (Tang *et al.* 2015. *Plant Physiology* doi:10.1104/pp.15.01661)。現在までに、*Rj3* 遺伝子産物を除く全ての *Rj* 遺伝子産物が同定されています。

ダイズは、農業上重要な作物なので、ダイズと根粒菌の共生関係は、農業微生物分野でも、盛んに研究が行われてきました。しかし、*Rj* 遺伝型ダイズとの根粒形成に関与する「根粒菌側の遺伝子」は、まだ同定されていませんでした。我々は、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターと共同して、*B. japonicum* Is-34 のゲノム解析 (Tsurumaru *et al.* 2015. *Genome Announc.* doi: 10.1128/genome.A.01316-14) を行い、また、*Rj4* 遺伝型ダイズに根粒形成できるようになった Is-34 株の Tn5 変異株の解析を行うことで、Is-34 株の *MA20_12780* 遺伝子を、*Rj4* 遺伝型ダイズによる根粒形成抑制を引き起こす「根粒菌側の原因遺伝

子」として同定しました (Tsurumaru *et al.* 2015. *Appl. Environ. Microbiol.* 81: 5812-5819)。

我々が行ったバイオインフォマティクス解析結果は、「Is-34 株が、III 型分泌システムと呼ばれる装置を利用して、*MA20_12780* タンパクをダイズ体内に打ち込むこと。これを *Rj4* 遺伝型ダイズが、病原性因子として認識するために根粒形成抑制が起こること」などの可能性を示唆しています。今後は、これらの可能性を証明する実験を行う必要があります。

表1 *Rj* 遺伝型ダイズと根粒菌の関係^a

<i>Rj</i> 遺伝子	<i>Rj</i> 遺伝型ダイズ		根粒菌
	制御内容	ダイズ側の遺伝子 (<i>Rj</i> 遺伝子産物)	
<i>rj1</i>	ほぼ全ての根粒菌の根粒形成を抑制	Nod factor receptor	不明
<i>rj5, rj6</i>	全ての根粒菌の根粒形成を抑制	Nod factor receptor	
<i>rj2</i>	根粒形成数の増加	Autoregulation of nodulation (AON)	
<i>Rj1</i>	<i>E. fredii</i> USDA 257 の根粒形成抑制	関連タンパク	不明
<i>Rj2</i>	<i>B. japonicum</i> Is-1 の根粒形成抑制	病原抵抗性タンパク	不明
<i>Rj3</i>	<i>B. elkanii</i> USDA 33 の根粒形成抑制	不明	不明
<i>Rj4</i>	<i>B. japonicum</i> Is-34 などの根粒形成抑制	タウマチン様タンパク (病原抵抗性タンパク?)	不明

^a Hayashi *et al.* 2012. *Breed Sci* 61:544-553 を参考にして作成。

山川武夫 (九州大学農学研究科)

鶴丸博人 (東北大学大学院生命科学研究科)

橋元祥吾 (九州大学大学院生物資源環境学部)

沖崎光平 (九州大学大学院生物資源環境学府)

共同研究先: 吉川博文 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ カワトンボの翅色多型の分子基盤 ◎

トンボは基本的に視覚で相手を認識することから、種内や近縁種間で体色や斑紋に著しい多様性が見られる。また、体色は生息環境に適応するように進化してきたと考えられる例も多く、乾燥化や温暖化に伴って種の構成が変化しつつある例も知られており、環境変化を表すバロメーターとしても保全生態学の観点から着目されている。一方で、昆虫の体色や紋様に関わる分子機構は、そのほとんどがハエ目昆虫とチョウ目昆虫で行われており、トンボの体色形成に関する分子機構は現時点でもほとんど明らかにされていない。トンボは成熟過程で体色や行動を著しく変化させる種が多く、さらに種内に多型が存在してオスに擬態するメスや、メスに擬態するオスが存在する種も知られている。これらの種は、動物の繁殖戦略を考える上での教科書的な材料となっているが、多型を産み出す分子メカニズムは現時点で全く不明である。

ニホンカワトンボ *Mnais costalis* およびアサヒナカワトンボ *Mnais pruinosa* には、オスに有色翅（橙色～褐色）と無色翅（メスに擬態）の2型が存在し（図1-2）、有色翅が優性の1遺伝子座のメンデル遺伝に従うことが知られている。また、カワトンボ属の翅色多型は、自然免疫の強さや縄張り行動の違いにも関わるなど、遺伝子の多面的な効果を調べる上で良い材料である。さらに、日本には近縁な2種（ニホンカワトンボとアサヒナカワトンボ）が生息し、2種の共存具合や生息環境の日照度に応



図1 アサヒナカワトンボの交尾（オスは有色翅のオス）



図2 アサヒナカワトンボの交尾（オスは無色翅でメスに擬態）

じて翅色多型の組み合わせが変化するなど、種分化や生物地理を考える上でもうってつけの材料と考えられている。そこで、本研究課題では、2種それぞれで国内の複数地域のサンプルを用いてRAD-seq解析とRNA-seq解析を行うことで、翅色多型の原因遺伝子と関連遺伝子を解明することを目指している。

二橋 亮（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）
共同研究先：矢嶋俊介（応用生物科学部）
川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 免疫反応を破綻させる植物病原糸状菌エフェクターの同定 ◎

植物は、病原菌の細胞壁などの生体構成物質を細胞外受容体で認識してパターン誘発型免疫という免疫反応を誘導して侵入を阻止する。それに対して病原菌は、エフェクターと呼ばれる病原性タンパク質を宿主細胞へ多数送り込み、免疫反応を攪乱して感染を成立させる。抵抗性植物においては、細胞内免疫受容体がエフェクターを認識することにより、プログラム細胞死や活性酸素の発生などのエフェクター誘発型免疫という強力な免疫反応を引き起こして病原菌を封じ込めて防御する。しかしながら、種々の病原菌の数多くあるエフェクターをすべて認識できる細胞内免疫受容体が存在するわけではないことに加え、認識を免れるような変異型エフェクターも出現し、抵抗性が打破されるに至っている。近年、病原糸状菌の変異株が出現し、これまで長らく抵抗性品種として栽培されてきたコムギの抵抗性を打破して病害が世界規模で拡大しており深刻な問題となっている。オオムギにおいても同様の問題に悩まされているが、機能獲得型変異 *mlo* が効果的な遺伝資源としてこれまで重宝されてきた。*MLO* 遺伝子は、7回膜貫通型ドメインを持つタンパク質をコードしており、変異によりカルモジュリンとの結合が失われると抵抗性を負に調節する機能が低下する（Kim et al., Nature 2002）。その結果、菌の侵入部位に物理的な障壁を形成することで菌の侵入を阻止するようになる。ところが *mlo* 変異による侵入抵抗性さえも克服してしまう病原糸状菌が見つかっており、その原因は菌が分泌する変異型エフェクターなのではないかと推測されているが、その実体は不明である（Grell et al., Physiol. Mol. Plant Pathol. 2005）。現在、*mlo* 変異による侵入

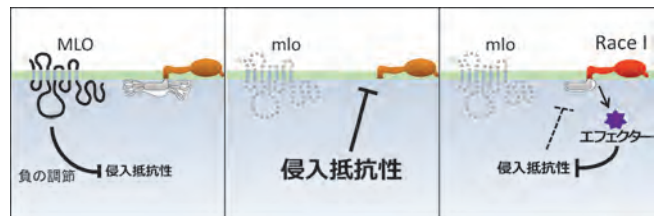


図1 オオムギうどんこ病菌 Race I 株は、*mlo* 変異による侵入抵抗性を打破する

抵抗性を乗り越えるオオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) Race I 株に特徴的なエフェクター候補タンパク質群の探索を進めている。本菌はオオムギの表皮細胞に接触すると発芽し付着器を形成するが、その先端から細胞壁に孔を開けて侵入する。本研究により付着器分泌型エフェクター遺伝子の同定及び菌株間の多型解析が可能となり、病原性機能の解明を強力に推進させられると期待できる。

八丈野孝（愛媛大学農学部）
香口智宏（愛媛大学農学部）
中神弘史（理化学研究所）
共同研究先：坂本 光（生物産業学部）
兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）

◎ RNAseq を活用した昆虫の色素合成遺伝子の解析 ◎

オモクローム系色素とメラニン色素は、ほとんどの昆虫の赤、茶、紫、黒の体色に関わる主要な色素であり、多彩な生物機能にも関与しています。昆虫の色素合成に関する分子基盤は、ショウジョウバエの遺伝学から得られた知見が中心ですが、他の昆虫で使われている色素の中には、ショウジョウバエには存在しないものも多く、ショウジョウバエ以外の昆虫を用いた解析が今後重要になると考えられます。また、昆虫の体色に関わる分子機構の解明は、遺伝子組換えマーカーの開発にも直結します。

私たちは、最近 RNAseq を用いた解析により、カイコの *pe* (*pink-eyed white egg*、淡赤眼白卵) 変異体の原因遺伝子の解明に成功しました。野生型のカイコは、複眼が黒く、卵が紫色ですが、これらの色は複数のオモクローム系色素の混合物に由来します。*pe* の複眼は明るい赤色、卵は白またはピンク色で、オモクローム系色素の合成に異常があり、中間前駆体の 3-ヒドロキシキヌレン合成後の反応が止まっていることが考えられました。*pe* の原因遺伝子を同定するために、卵の着色時期前後である産卵当日、1日後、2日後、3日後で野生型と *pe* の卵を材料に、HiSeq 2500 を用いた RNAseq により連鎖解析の絞り込み範囲内を中心に遺伝子発現パターンと SNP の解析を網羅的に行いました。その結果、*Bm-cardinal* という遺伝子が、卵の着色直前に発現し、*pe* 特異的な変異があることから有力な候補遺伝子であることが分かりました。そこで RNAi および TALEN による遺伝子ノックアウトを行ったところ、変異体の表現型を再現することに成功しました (図 1、2)。さらに、ノックアウト個体と変異体の相補性試験により *Bm-cardinal* が *pe* の原因遺



図 1 蛹の時期に片眼 (右) だけ *Bm-cardinal* を局所的 RNAi した個体。



図 2 TALEN により *Bm-cardinal* をノックアウトした当代の個体。複眼の色が赤と黒のモザイク状になっている。

伝子であることを直接的に証明することができました。カイコの色素解析や組織ごとの遺伝子抑制の結果から、キロショウジョウバエの遺伝学から想定されていた以上に、*Bm-cardinal* は多くのオモクローム色素の合成を媒介する重要な色素合成酵素であることが考えられました。なお、この結果の詳細は、2015年9月に *Heredity* 誌で発表しました。カイコには、他にも複数の興味深い卵色、体色変異体があり、現在 RAD-seq、RNAseq による原因遺伝子の解明を進めています。

二橋美瑞子 (茨城大学理学部)
共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)
内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

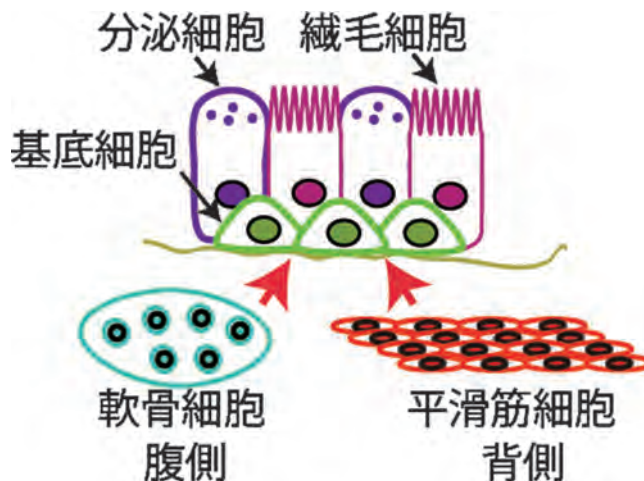
◎ 細胞外環境により生み出される気道上皮幹細胞の違い ◎

農作業に由来するアレルゲン (植物性・動物性の粉塵、花粉やカビ胞子、化学物質) によって、喘息の症状が引き起こされることが知られています。喘息では、慢性の気道炎症によって気道のリモデリングと呼ばれる構造的変化、すなわち分泌細胞の増加・気道平滑筋の増大が起こります。気道上皮は繊毛細胞と分泌細胞から成り、分泌細胞から分泌される粘液によって外部からの有害物質を捕捉し、繊毛細胞が気道の外に押し出すことでバリアとして機能しています。

この気道上皮の幹細胞として働いているのが基底細胞で、気道上皮が損傷すると速やかに増殖し、繊毛細胞と分泌細胞に分化して気道上皮を修復します。我々は、気道上皮を裏打ちする間葉系の細胞によって基底細胞の分化や増殖がコントロールされていることを示し、気道上皮幹細胞における細胞外環境の重要性を明らかにしてきました。

気道上皮の細胞外環境について考えてみると、気道は腹側を軟骨に覆われていて、背側は平滑筋に裏打ちされているという違いがあります。そこで、気道上皮自体も腹側と背側で異なるのではないかと疑問が出てきました。実際、気道上皮幹細胞の性質に違いがありそうです。これから東京農業大学生物資源ゲノム解析センターとの共同研究でさらにこの違いについて解明しようとしている最中です。

また、将来的には喘息などの病態における裏打ち細胞の変化と気道上皮の関係について研究を進めることによって、病気の治療に役立つ知見が得られると期待しています。



田所友美 (横浜市立大学医学部)
共同研究先: 小林久人 (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)

アブラナ科植物の内生糸状菌による植物生長促進機構の解析

近年、次世代シーケンサーの進歩に伴い、野生に自生する植物の根圏及び葉圏に存在する糸状菌(カビ)の構成が明らかになりつつある。しかしながら、これらの糸状菌が植物の生存戦略に与える影響はこれまで殆ど明らかではない。

私たちは、野生に自生する健康なシロイヌナズナから分離された *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*) がシロイヌナズナや近縁アブラナ科植物の根に感染する内生糸状菌であることを発見している。*Ct* は、リン枯渇条件下において、菌糸を介して宿主植物にリン酸を輸送し植物生長を促す(図)。興味深いことに、*Ct* によるリン酸輸送や植物生長促進はリン酸枯渇条件下においてのみ認められ、リン酸が豊富に供給される栄養条件下においては植物生長を促さないことから、*Ct* と宿主の共生型の相互作用は環境のリン酸濃度に依存することが判明している。一方で日本のダイコンから分離された *Colletotrichum* 属菌は、*Ct* と同一クレードに属する極めて近縁な種であるにもかかわらず、シロイヌナズナの根に感染し生長を著しく阻害する病原菌であることが判明した。これら菌の比較ゲノム解析より、両者は大部分のゲノム領域を共有していることが判明した。病原菌と進化的に極めて近い糸状菌が、何故、病徴を引き起こさずに感染できるか、さらに植物の生長を促せるかについては、*Ct* に限らず全く明らかではない。私たちは、モデル植物シロイヌナズナに感染する同属で近縁な病原菌と内生菌を有するメリットを活かし、病原性と共生性の違いを規定する分子機構の解明に取り組んでいる。

本研究では、*Ct* による植物生長促進のメカニズム解明に向け、

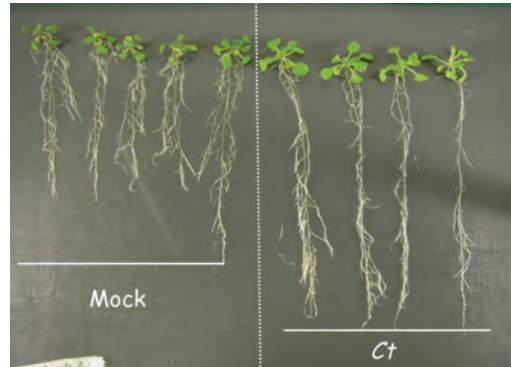


図 リン欠条件下での内生糸状菌 *Ct* による植物生長促進

Ct が根に感染中の宿主・菌双方のトランスクリプトーム情報を RNA シーケンス法にて取得することを目的としている。特に、*Ct* による植物生長促進効果が弱まるシロイヌナズナ変異体と野生型植物から得られたトランスクリプトーム情報を比較解析することで *Ct* による新規植物生長促進機構の一端が解明できると考えている。

晝間 敬(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)
共同研究先: 太治輝昭(応用生物科学部)

田中啓介(生物資源ゲノム解析センター)

チョウ類のホストレンジを決定する遺伝的基盤の解明

生物の利用できる資源の幅広さ(ホストレンジ)がどのように決定されているか、特に、植食昆虫のホストレンジが遺伝的基盤によって決定されているかは、農学的にも進化学的にも重要な問いである。

現生の植食昆虫の大半は、限られた分類群の植物しか利用しないスペシャリスト種であり、一方、非常に幅広い分類群にわたる植物を利用できるジェネラリスト種は少数である。チョウ類でも限られた食草しか利用できないスペシャリストが多いが、中には非常に多岐にわたる食草を利用できるジェネラリストも存在する。このようなホストレンジの種間差は様々な要因によって生じていると考えられる。中でも、幼虫が食草を食べて成長する能力と、成虫が食草を認識して産卵する能力の有無は特に重要である。しかし、実際にどのような遺伝子が各種のホストレンジを決定しているかについては、未だに不明な点が多い。

チョウ類のメスは、産卵の直前に前脚を使って食草表面の化合物を知覚し、その化合物が一定の条件を満たせば最終的に産卵を行う。そのため、脚における化学受容機構の差異がホストレンジ(産卵選好性)の種間差を生み出している可能性が高い。そこで本研究では、ホストレンジを決定する遺伝的基盤の候補として、味覚受容体遺伝子(GR 遺伝子)ファミリーに着目した。GR 遺伝子を含む化学受容体遺伝子ファミリーは、遺伝子数も多く遺伝子間の配列相同性が低いので、近年までゲノム配列が解読された種でしか調べることができなかったが、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行うことでゲノム情報がない生物でも研究を行うことが可能になった。

GR 遺伝子とチョウ各種のホストレンジとの関係について考察するため、メスの脚で発現する GR 遺伝子を同定し、発現す

る GR 遺伝子の数やレパートリー、発現量を得て比較を行う。具体的には、タテハチョウ族(図1)のホストレンジの異なるキタテハ、アカタテハ、ヒメアカタテハの3種を選別し、メスの前脚から RNA を抽出し、ライブラリを作

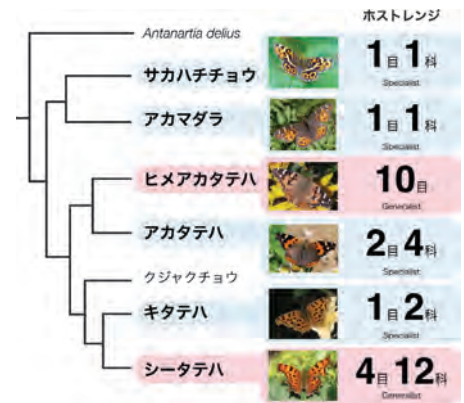


図1 タテハチョウ族の系統樹とホストレンジ

成し、RNA-seq を行う。シーケンスは MiSeq と HiSeq 2500 の両方を用い、MiSeq はアセンブル用として HiSeq 2500 はアセンブルと発現定量用として用いる。現在までにライブラリの作成が完了し、シーケンスを行っており、近いうちにこれらの結果が明らかになるだろう。

河田雅圭(東北大学生命科学研究科)

尾崎克久(JT 生命誌研究館)

鈴木 啓(東北大学生命科学研究科)

牧野能士(東北大学生命科学研究科)

共同研究先: 矢嶋俊介(応用生物科学部)

内山博允(生物資源ゲノム解析センター)

◎ 窒素固定型シアノバクテリアを利用したバイオ肥料の開発 ◎

現在の農業においては、ハーバー・ボッシュ法による化学的な窒素固定により合成された窒素肥料（アンモニア）が大量に使用されている。化石燃料の数%は化学的窒素固定によるアンモニア生産に利用されており、その生産には膨大なエネルギーが必要だけでなく、その過剰散布による環境汚染も問題となっている。

酸素発生型の光合成を行うシアノバクテリアは、様々な環境において第一次生産者として生態系を支える細菌である。また、*Anabaena* 属や *Nostoc* 属のシアノバクテリアを始めとする多くのシアノバクテリアは窒素固定を行うこともでき、炭素源だけでなく窒素源の供給者としても重要な役割を果たしている。*Anabaena azollae* はアカウキクサ（アゾラ）に共生し、宿主に窒素源を供給していることが知られている。*Anabaena* -アゾラの共生系は、緑肥として中国、ベトナムを始めとするアジア各地で稲作に利用されている。シアノバクテリアの窒素固定は太陽光をエネルギー源とし、さらに二酸化炭素も同時に固定するため、環境への負荷が非常に小さい持続可能なシステムである。このように窒素固定型シアノバクテリアは、実際にバイオ肥料としての有用性が示されているが、その利用範囲は限られている。

数百の細胞が繋がった糸状性シアノバクテリアである *Anabaena* や *Nostoc* は、糸状体の一部の細胞を窒素固定に特殊化した細胞に分化させ、窒素固定を行う（図）。この細胞はヘテロシストと呼ばれ、環境中の窒素化合物が不足すると細胞分化が誘導される。我々はヘテロシストの形成および代謝の制御機

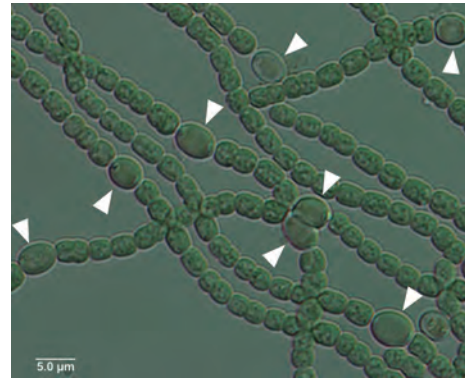


図 糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120
窒素化合物を含まない培地では、分化細胞ヘテロシスト（矢印）を形成し、窒素固定を行う。

構の解明を目指し、研究を行っている。このような研究の成果は、窒素固定型シアノバクテリアを利用したバイオ肥料の開発への展開が期待できる。

得平茂樹（首都大学東京理工学研究科）
共同研究先：吉川博文（応用生物科学部）
兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 除草剤抵抗性雑草における急速な除草剤解毒代謝メカニズムの解明 ◎

現代農業における雑草防除では、除草剤は省力的かつ効率的な技術として必要不可欠なものになった。ところが除草剤に依存した雑草防除の結果、除草剤の効かない抵抗性型の雑草が出現し、世界的に大きな問題となっている。抵抗性雑草が拡散した場合、これらは作物と養分・光・水などを競合し、作物の収量や品質を大きく低下させるため、農業生産におよぼす影響は極めて大きい。したがって防除対策の策定や雑草管理の基盤となる抵抗性分子機構の解明が急務となっている。雑草の除草剤抵抗性においてその分子機構がほとんど明らかにされていない現象として、除草剤の急速な解毒代謝（不活化）による抵抗性がある。植物には除草剤の解毒代謝に関連する酵素遺伝子（シトクロム P450 など）が存在するが、その多くが極めて大きな遺伝子ファミリーを形成するため、ゲノム情報のない雑草ではその解析が困難であり、除草剤解毒代謝抵抗性に関与する遺伝子は数例しか知られていない。

米国カリフォルニアで大きな問題となっているイネ科水田雑草タイヌビエの多剤抵抗性型は、アセト乳酸合成酵素（ALS）阻害型除草剤やアセチル CoA カルボキシラーゼ（ACCase）阻害型除草剤などの 5 種類の作用機構の除草剤に抵抗性を示すことが知られている。我々は、その中で P450 の関与が推定されていた ALS 阻害型除草剤の抵抗性について解析し、ALS 阻害型除草剤を解毒代謝する 2 つの P450 の高発現が抵抗性の主要因であることを明らかにしてきた。一方、本タイヌビエにおける ACCase 阻害型除草剤フェノキサプロップの抵抗性では異なる除草剤解毒酵素の関与が強く示唆されているが（図 1）、その分子実体は不明である。

本研究では雑草種における解毒代謝型の除草剤抵抗性分子機

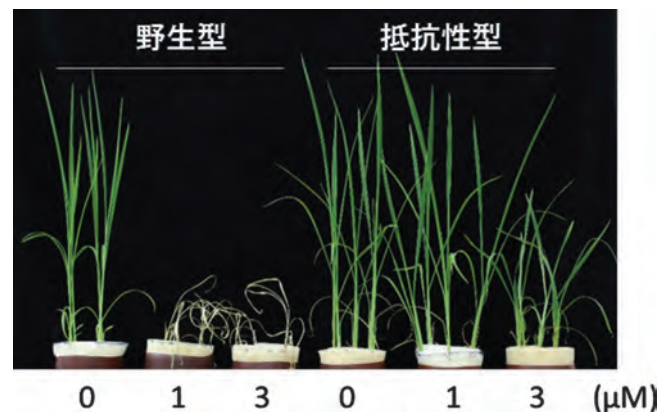


図 1 除草剤抵抗性型タイヌビエにおけるフェノキサプロップ反応
抵抗性型タイヌビエは除草剤フェノキサプロップを急速に解毒代謝するため、フェノキサプロップを散布されても枯死せずに生育する。

構の解明に向け、NGS データを用いて参照トランスクリプトームを構築し、それを基盤としたトランスクリプトームおよびプロテオーム解析の両面から、フェノキサプロップの解毒代謝に関わる遺伝子を同定することを目的とする。

岩上哲史（筑波大学生命環境系）
小松節子（作物学研究所）
共同研究先：田中 聡（地域環境科学部）
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 網羅的遺伝子発現ゲノムワイド関連解析を通じたアルミニウム耐性遺伝子群の同定 ◎

酸性土壌で可溶化する過剰なアルミニウム (Al) は、植物の生育を著しく阻害し、収量を低下させます。このような酸性土壌は世界の耕地面積の約 50% に達し、食料安全保障の達成に困難をとまなう開発途上国の熱帯・亜熱帯地域にも広く分布しています。それゆえ、Al ストレスは、農業生産上最も重要な制限因子のひとつとなっています。このことから、植物の Al ストレス耐性を育種ターゲットとした研究が世界中で活発に行われていますが、Al 耐性制御機構は複雑であり、画期的な品種改良にはいたっていません。そこで、私たちは Al ストレス耐性を獲得するために必要な遺伝子群やその分子機構を明らかにすることを目的として研究を進めています。

世界中に分布しているシロイヌナズナ野生株には、ゲノム塩基配列に蓄積された自然変異により、アクセッション間で環境応答性が大きく異なることが知られています。私たちはこれまでに、シロイヌナズナの酸性土壌耐性がアクセッション間で大きく異なることを明らかにしてきました (図 1)。また、Al 耐性遺伝子リンゴ酸トランスポーターを含むストレス耐性関連遺伝子の発現量差異は、耐性差異の原因となっていることが多くの植物種で報告されています。このことから、耐性遺伝子の発現量制御は重要な育種ターゲットであると考えられます。そこで本研究では、シロイヌナズナの多数のアクセッションを用いて Al ストレス下の RNA-seq 解析を行い、得られた全遺伝子発現データを用いたゲノムワイド関連解析を行うことで、遺伝子発現量に量的差異がある Al 耐性関連遺伝子群と遺伝子発現制御関連遺伝子群の同定を行います。本研究により、Al ストレス耐性の分子機構や分子進化に関する理解が深まるだけでなく、

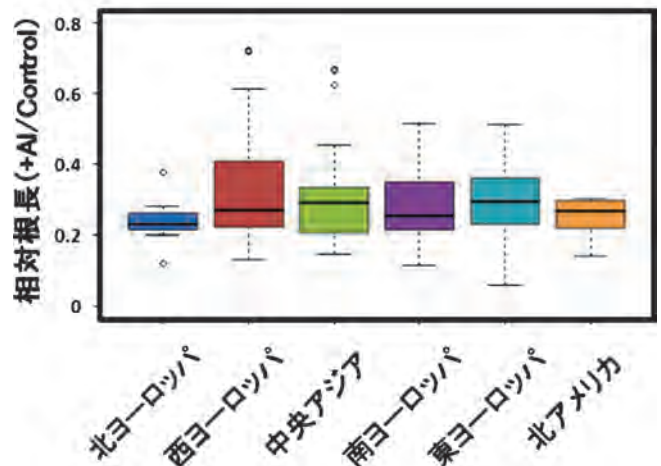


図 1 シロイヌナズナ野生株の SNP データにもとづく分集団とアルミニウム耐性

主要作物での品種改良につながる耐性遺伝子群や耐性制御機構が同定されることが期待されます。

小林佑理子 (岐阜大学応用生物科学部)
 共同研究先: 坂田洋一 (応用生物科学部)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

◎ ハダニ類における母子交配と血縁構造の解明 ◎

人間だけでなく動物の世界においても、協力やいやがらせ、親切や裏切り、誠実や騙し、といった様々な行動や戦略が見られます。個体間の協力や対立行動の進化の説明として、血縁選択説は広く受け入れられており、かつては単純に個体間の血縁度が高くなるに従って協力行動が進化しやすく、対立行動は進化しにくくなると考えられてきました¹。しかし近年の理論的研究により、集団の平均血縁度と対立行動 (いやがらせ行動) の関係は非線形 (ドーム型) になる、すなわち平均血縁度が高くても低くても対立行動は進化しにくく、適度に血縁者と非血縁者が混合している集団で進化しやすいことが示されています^{2,3}。本研究では、体長 0.5mm 未満の植食性節足動物であるススキスゴモリハダニ (クモ綱ダニ目ハダニ科) (*Stigmaeopsis miscanthi* (Acari: Tetranychidae)) を対象に、この近年の血縁選択説を検証しています。本種は北海道本島を除く日本全国に広く分布しており、ススキに寄生し、集団で共同営巣します (図)。雄は同種の雄に対して強い攻撃性を示し、巣をめぐって殺し合い (=対立行動) をし、ハーレムをつくります。この殺し合いの頻度は個体群間で異なり、寒い地域では殺し合いの頻度は低いが、温かい地域では高くなり、さらに温かい地域では再び低くなるといった、冬の寒さと雄の攻撃性のドーム型の関係が、近年の研究により発見されました⁴。本種では寒冷な地域では母子交配 (=近親交配) が起こりやすく、冬の寒さは集団の平均血縁度の指標となるため、この雄の攻撃性の地理的変

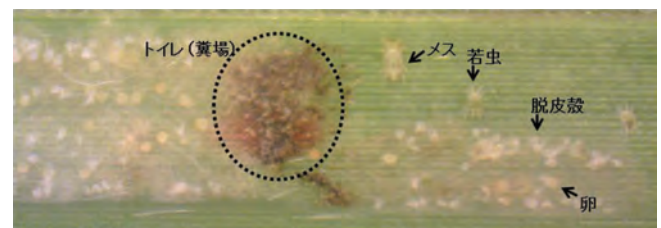


図 ススキスゴモリハダニの巣内の様子

異は近年の血縁選択説を支持する数少ない事例だと考えられます。しかし実際には、本種の遺伝的集団構造は調べられていないため、本プロジェクトにより、次世代シーケンサーを利用した RAD シークエンスでもって、SNP を遺伝マーカーとした血縁度の推定や集団構造の解析を行っています。

¹Hamilton (1964) *Theor Biol* 7: 1-52; ²Reinhold (2003) *Proc R Soc Lond B* 270: 1171-1175; ³Gardner & West (2004) *J Evol Biol* 17: 1195-1203; ⁴Sato *et al.* (2013) *Ecol Evol* 3: 2661-2669

佐藤幸恵 (筑波大学生命環境系)
 津田吉晃 (筑波大学生命環境系)
 共同研究先: 足達太郎 (国際食料情報学部)
 内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

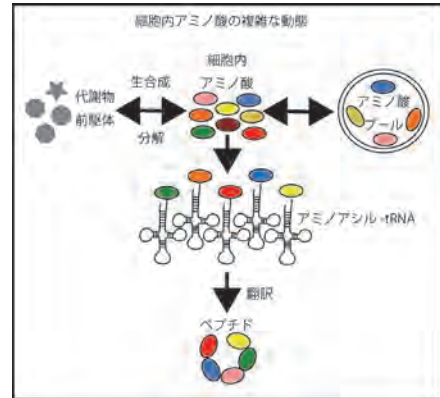
◎ RNAseq 法を用いた細胞内アミノアシル-tRNA の測定法の開発 ◎

窒素源（アミノ酸）はタンパク質の材料として、炭素源（グルコース）と並び必要不可欠な栄養源である。そのため、アミノ酸栄養環境を感知するシステムは重要な細胞機能のひとつであり、アミノ酸センシングの解明は生命現象の基本的な理解に直結する。しかしながら、アミノ酸センシングの研究の進展は大きく遅れている。その理由は、アミノ酸が20種類と多岐に亘ること（20種類のアミノ酸センサーがあるのか、もしそうならそれらを統合する因子はなにか?）、細胞内で合成・代謝・アミノアシル-tRNA など変幻自在の存在様式をしめすこと（細胞は何を「アミノ酸シグナル」として捉えているのか?）、リソソーム/液胞などのアミノ酸プールの存在（細胞質内アミノ酸濃度の正確な評価を妨げる）など、様々な因子が絡み合う複雑なネットワークを形成しているためと推測される（図）。

その複雑なアミノ酸の動態は、メタボローム技術の発達によって少しずつ明らかにされてきた。しかしながら、アミノアシル-tRNA はペプチドになる直前の材料であるため、「翻訳可能なアミノ酸」としてその測定が重要であるにもかかわらず、現在のメタボローム技術では測定が不可能である。

私たちは、Ribosome profiling 法を応用してアミノアシル-tRNA を解析する方法を思いついた。Ribosome profiling 法はRNAseqを応用してRibosomeに結合した（＝翻訳途中の）mRNAを同定・定量する方法であるが、同様にして細胞からアミノアシル-tRNAに結合する翻訳因子eEF1Aを免疫沈降し、それに結合したアミノアシル-tRNAをRNAseqを用いて解析する方法である。

本研究では、出芽酵母を研究材料として、細胞内アミノアシル-tRNA 定量法を開発し、その挙動を追跡することを目的と



する。この定量法によって明らかになると推測されることは、①「翻訳可能なアミノ酸」アミノアシル-tRNAの定量を通じて、タンパク質合成に直接関わる細胞内アミノ酸栄養状態を把握できる。②アミノ酸と結合するtRNAの分子種が明らかになるため、複数種存在するtRNA（例えば、ロイシンCAAコドンには10種の、TAAコドンには7種のtRNAが存在する）の使い分けも明らかにできる。③そしてこれらの解析により、複雑な細胞内アミノ酸環境についてシステムの理解、特に20種類のアミノ酸シグナルが相互に作用しあってネットワークを形成する仕組みを明らかにする手がかりが導かれると期待される。

鎌田芳彰（基礎生物学研究所多様性生物学研究室）

共同研究先：中山俊一（応用生物科学部）

兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 頻繁な倍数性変化を生じる脊椎動物の遺伝子量補償機構の解明：

雌性発生3倍体フナの場合 ◎

有性生殖を行う種の多くは2倍体ですが、植物では主に異種間雑種に由来する多倍数性の種も多く知られ、6倍体パンコムギのように作物の栽培化や品種改良を通して、われわれの生活を支えてきました。一方、脊椎動物における多倍数性現象の実態は不明な点が多く、その育種への応用も一部の3倍体養殖魚を除けばあまり進んでいません。この主な要因の一つとして、脊椎動物では多倍数体化すると、アレル数の均衡が崩れることに起因する異常（遺伝子量補償の問題 gene dosage imbalance）を引き起こすことが挙げられます。

そのような中で、脊椎動物では極めて例外的に頻繁な倍数性の変化を経ているのが、日本人には身近で水産的にも有用な淡水魚のコイ科フナ属魚類 *Carassius* です。フナ類には、古くから有性の2倍体と無性（雌性発生）の3倍体が知られます。さらに、近年の集団遺伝学的研究により、3倍体系列が2倍体集団から比較的頻繁に出現することが示唆されています（図1）。

フナ類でも多倍数体化する際に遺伝子量補償の問題が生じると考えられます。遺伝子量補償に関する知見は異質倍数性植物で蓄積されつつあり、一部の遺伝子座において一方のゲノムのみが活性をもち、他方の相同なアレルがサイレンシングされることで「機能的2倍体化」を効率的に実現することなどが知られています。同様に、日本全国の河川で3倍体フナ類が健全に繁栄していることから、フナ類においても何らかの効果的な遺伝子量の補償がなされていると考えられます。そこで、フナ類

の複数系統の2倍体・3倍体ペアについてRNAseqによる発現解析を進め、この機構を解明しようというのがわれわれの計画です。こうした研究は、いまだ知見が乏しい脊椎動物における多倍数体化機構の理解につながり、将来的には効率的な魚類倍数体品種の作出などに貢献できると期待しています。

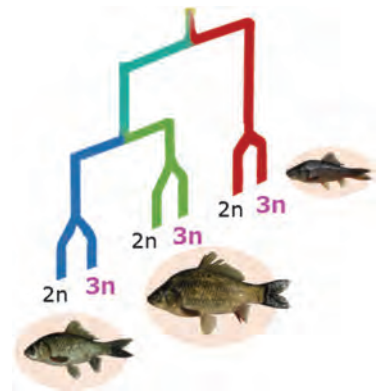


図1 フナ類のmtDNA系統と多倍数体化（模式図）

渡辺勝敏（京都大学大学院理学研究科）

三品達平（京都大学大学院理学研究科）

武島弘彦（総合地球環境学研究所）

橋口康之（大阪医科大学）

共同研究先：佐々木剛（農学部）

川原玲香（生物資源ゲノム解析センター）

◎ 東アジアにおける遺跡出土馬の全ミトコンドリア DNA 配列決定 ◎

遺跡から出土する動物の骨や歯から DNA を抽出し、分子遺伝学的解析をする古 DNA 分析は、各時代における家畜・家禽の起源、毛色や歩法などを復元するうえで強力なツールとなっています。これまで、DNA の保存状態が比較的良好、欧米の寒冷地や洞穴から出土した動物骨を中心に牽引されてきた古 DNA 分析は、近年、従来の寒冷地や洞穴のみならず、温暖湿潤な地域における開地遺跡出土動物骨の分析方法を確立することが課題となってきました。特に、寒冷地や洞穴において分析成功例が増加しつつある全ミトコンドリア DNA 配列決定の可否は、古 DNA 分析の成功例として学術誌に報告するための国際基準となっています。このため、東アジアの温暖湿潤地域にある遺跡から出土した骨から、全ミトコンドリア DNA 配列を決定することは、温暖湿潤地域の試料が今後分析可能であることを示すことにつながります。また、この技術の確立は、東アジアの家畜・家禽の起源や伝播経路に関する研究を大きく飛躍させる起点になると期待されます。そこで本研究では、寒冷地において応用されてきた古 DNA 分析法を、温暖湿潤な東アジアの遺跡出土馬に転用可能か評価するとともに、温暖湿潤地域の遺跡資料に対する新たな古 DNA 分析法を開発し、従来法との比較を試みるものです。

本研究では、従来の古 DNA 分析で応用されてきた DNA 抽出法と NGS ライブラリ作成法を改善することで、遺跡出土骨中に含まれるウマ DNA 配列の取得効率を向上させました。DNA 抽出において、約 35bp の低分子 DNA の回収率を向上さ

せるため、従来のシリカ吸着法から限外濾過法に変更しました。また、NGS ライブラリ作成において、ピーズサイズセレクションに基づいて、低分子 DNA を選択的にライブラリ化しました。500 年以上前の古 DNA 分子は 150bp 以下に断片化すると欧米の先行研究で報告されており、150bp 以下の DNA を選択的にライブラリ化することで、コンタミネーションとなる現代由来の長い DNA 分子を除去することにもつながります。

これらの分析手法に基づいて、東アジア遺跡出土馬の NGS ライブラリを作成しました。現在までに、日本の古墳時代の遺跡出土馬（兵庫県神戸市吉田南遺跡、神戸市教育委員会提供）や、国際共同研究協定によって中国陝西省考古研究院から提供された咸陽市閻家寨遺跡出土馬について、NGS ライブラリを作成しました。その結果、従来法ではウマ DNA 含有率（マッピング率）は 0.01% でしたが、改訂した方法ではマッピング率が 3.5% に達しました。先行研究において、東アジアの温暖湿潤地域における開地遺跡出土骨のマッピング率は 1% を超えるものはありませんでしたが、本分析ではマッピング率が大きく改善されたことを示しています。また、これらの NGS ライブラリは、全ミトコンドリア DNA 配列決定のために、ウマ全ミトコンドリア DNA プロンプを用いたキャプチャーを実施し（ダブルキャプチャー法）、平均カバレッジとデプスを向上させているところです。今後、キャプチャーで得られた配列を解析し、東アジアの温暖湿潤地域における古 DNA 分析結果を報告する予定です。



◀ 図 1 兵庫県神戸市吉田南遺跡出土骨
(神戸市教育委員会提供)

覚張隆史（金沢大学人間社会研究域）

鶴間和幸（学習院大学文学部）

太田博樹（北里大学医学部）

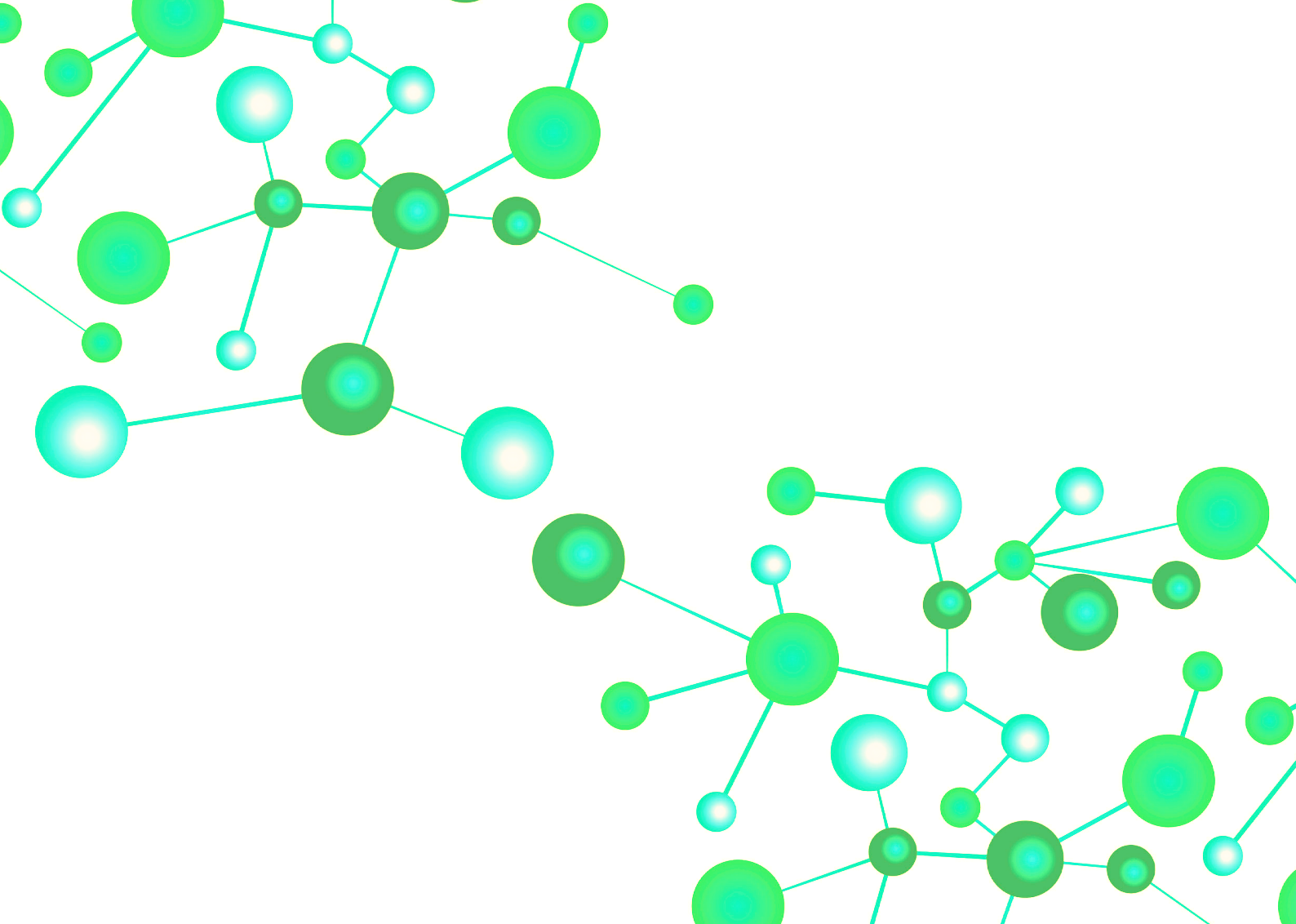
菊地大樹（京都大学人文科学研究所）

丸山真史（東海大学海洋学部）

共同研究先：半澤 恵（農学部）

河野友宏（応用生物科学部）

石毛太郎（生物資源ゲノム解析センター）



学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析拠点

〒156-8502 東京都世田谷桜丘1-1-1

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

E-mail kyoten-g@nodai.ac.jp

URL <http://www.nodai-genome.org>