



# 生物資源ゲノム解析拠点 ニュースレター

2017 No. 4

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」 NGS の普及と本拠点の役割 .....	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
生物資源ゲノム解析拠点シンポジウム “NGS 情報をどう活かすか、基礎から応用まで” 開催 .....	5
平成 28 年度 研究発表実績 .....	7
平成 28 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧 .....	9
採択課題研究紹介 前期新規採択課題 .....	12
後期新規採択課題 .....	24

---

## 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」

# NGS の普及と本拠点の役割

平成 25 年度より始まった生物資源ゲノム解析拠点も今年度で 4 年目となります。6 年の認定期間のうち、すでに折返し点を過ぎました。この間、次世代シーケンサー（NGS）の利用環境も大きく変わりつつあります。生命科学の研究では NGS の利用が一般的な手法となっており、また生態、環境、考古学などの学問領域にも導入が進み、新たな研究分野が展開されています。

本拠点は農学分野における NGS を利用した研究を推進するべく始めました。もともと農学分野の裾野の広さもあり、実際に本拠点での共同研究も、その生物種は多岐にわたっています。また、世界的にゲノム情報が整備されていく流れの中で、研究課題も RNA-seq を中心とした遺伝子機能解析が主流となっています。次ページには、平成 28 年度の研究課題について統計情報をまとめました。

本年度は、「NGS 情報をどう活かすか、基礎から応用まで」と題し、今までの課題採択者による研究報告会を兼ねたシンポジウムを開催しました。このシンポジウムの詳細は、別ページに掲載いたしました。各発表における活発な討論が行われ、もっと時間が欲しかったとの声を沢山いただきました。拠点事業の目的の中には、研究者コミュニティにおける情報交換の場を提供し、その中から新たな研究シーズや展開が生まれることを目指すという役割があります。そのため、今後もこのような機会を設けていきたいと考えています。また、今年度は国立遺伝学研究所と東京農大との間で包括的連携協定が締結されました。本拠点事業がきっかけとなったこの連携は、遺伝情報解析の分野での研究や教育分野での協力を目指しています。

本拠点は、当初、装置へのアクセス（リードデータ取得）とデータ解析の 2 つのハードルを抱えた NGS の利用を広めることも役割の一つとして始めました。最近、NGS の普及とともに、アクセスについてのハードルはだいぶ下がってきたと思われます。本拠点もそのような流れを受け止めつつ、今後の NGS を利用した研究のありかたも考えながら拠点の運営を行っていきたいと考えております。

共同研究代表者の方には、積極的な成果発表をお願いしますとともに、本拠点が農学分野の研究に貢献できるよう努めてまいります。

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、平成25年から“生物資源ゲノム解析拠点”として共同利用・共同研究拠点事業を開始し、今年度で4年目を迎えました。

この4年間、農学分野を中心とする新しい研究領域の開拓を目指し、学外の研究者と共に共同研究に取り組んできました。全国の研究機関から申請があり、毎年40件以上の課題が採択されてきました。拠点事業開始時から数えると課題件数はのべ199件にのびります(図1)。その内訳を対象生物ごとにみると、家畜や昆虫、魚など動物を対象とする課題が60件、作物など植物を対象とする課題が74件、微生物を対象とする課題が63件です。各生物分野で課題数はほぼ同程度となっていますが、近年は植物を対象とした課題がやや多い傾向にあります。

また、各課題の解析手法に注目すると、拠点事業開始当初に比べ、年々手法が多様化してきています。今年度の課題においても、RNA-seqやre-sequencingの割合が多いものの、Metagenome、TSS-seq、RAD-seq、ChIP-seqなどの手法を用いる課題もあり、近年次世代シーケンサーが研究の様々な場面で活用されている状況を反映しているといえます(図2)。

このように様々な生物種や解析手法を用いる各共同研究課題を滞りなく進められるよう、当センターでは、サンプル調製や次世代シーケンサーのオペレーション、データの解析等に携わるスタッフが学内の担当教員と協力して取り組んでいます。また、データ量や課題数の増加にあわせ、毎年少しずつ設備の充実を図り、様々な解析に対応できる環境を整えています。今年は解析サーバーの拡充とメモリ増設、解析ソフトウェアの導入を行いました。

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、今後も共同研究を通して学内外の研究者間の交流を深め、次世代シーケンスデータを用いた研究に貢献できるよう取り組んで参ります。

(生物資源ゲノム解析センター 川原玲香)

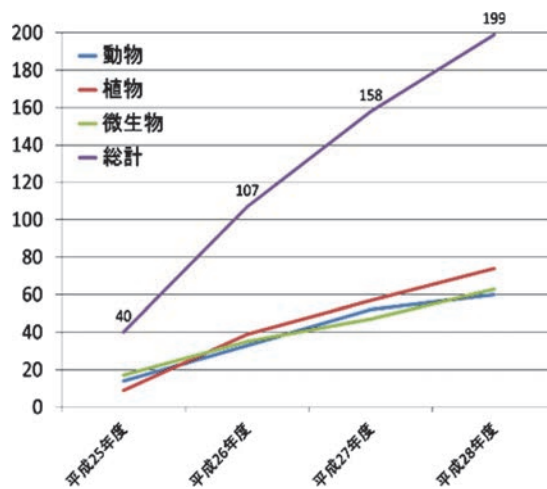


図1 共同利用・共同研究課題件数 (累計)

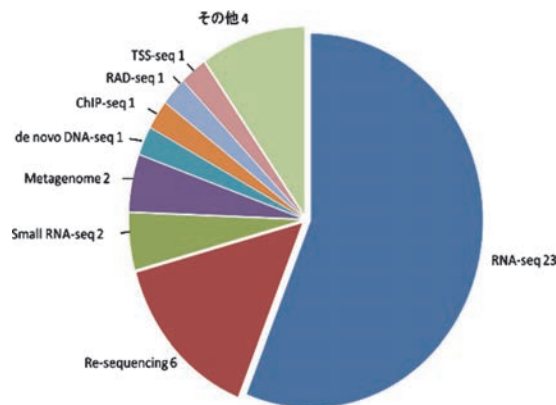


図2 今年度の課題における解析手法

## 生物資源ゲノム解析拠点シンポジウム

### “NGS 情報をどう活かすか、基礎から応用まで” 開催

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターが主催するシンポジウムが、平成 28 年 9 月 6 日東京農業大学世田谷キャンパス横井講堂にて開催されました。本シンポジウムは“NGS 情報をどう活かすか、基礎から応用まで”と題し、NGS 情報を利用した研究分野で最前線にたっておられる研究者 4 名をお招きしてご講演をお願いしました。また、共同利用・共同研



会場の様子

究拠点事業で共同研究を行っている学外の研究者の方々には口頭発表・ポスター発表をお願いしました。当日は天気にも恵まれ、学内外から 130 名の参加がありました。

午前中のセッションでは 7 名の拠点事業の共同研究者の方々に研究成果を発表していただきました。ハルニレ、シロイヌナズナ、ショウジョウバエ、ナシ、トンボ、酢酸菌、オオハマニンニクと、幅広い生物種を対象とした研究内容に、会場からも多くの質問が寄せられました。

昼休みをはさんで行われた講演では、データサイエンス共同利用基盤施設の野口秀樹先生に、NGS データを用いた *de novo* ゲノム解析と解析に関わるツールの開発について、実際のデータを示しながら紹介していただきました。次に慶應義塾大学の榊原康文先生に、納豆菌ゲノムの配列決定や非コード RNA の同定といっ



口頭発表の様子：左上から武井麻美さん（茨城大学）、西條雄介先生（奈良先端科学技術大学院大学）、上村匡先生（京都大学）、竹村圭弘先生（鳥取大学）、二橋亮先生（産業技術総合研究所）、松下一信先生（山口大学）、花田耕介先生（九州工業大学）。



講演の様子：左から野口秀樹先生（データサイエンス共同利用基盤施設）、榊原康文先生（慶應義塾大学）、重信秀治先生（基礎生物学研究所）、田畑啓之先生（かずさ DNA 研究所）。

た、NGS データを活用した解析で明らかになった研究成果をご紹介いただきました。基礎生物学研究所の重信秀治先生は、昆虫の NGS 研究について、“ソシオゲノミクス”と“シンビオゲノミクス”をキーワードに、トランスクリプトーム解析とメチローム解析の研究成果について発表されました。最後にかずさ DNA 研究所の田畑啓之先生から、かずさ DNA 研究所における実用植物の育種基盤構築に向けた取り組みについて、また分子育種分野における NGS データ解析技術の発展の重要性について発表していただきました。

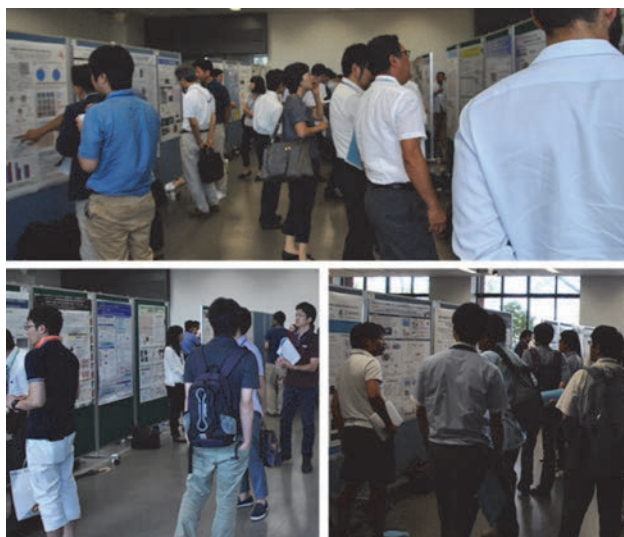
ポスター発表は世田谷キャンパス 1 号館で行われ、拠点事業の共同研究者によって研究成果が紹介されました。45 題のポスターが掲示され、参加者の間で研究成果や解析手法について情報交換が行われました。会場は熱気にあふれ、1 時間の発表時間が短く感じられました。

今回のシンポジウムでは、NGS 情報をどのように活かして研究を進展させるのかという観点で最新の研究成果について学ぶとともに、これまでの活動を振り返り、拠点事業で共同研究を行う学外の研究者や各課題を担当する学内の研究者同士の交流をはかることができました。

拠点事業は来年度で 5 年目を迎えます。

NGS の利用が普及する中で、本拠点の活動が研究者コミュニティにおいて今後、新たな共同研究につながることを期待しております。そのような点からも、このシンポジウムがお役に立ちましたら幸いです。最後になりますが、開催に際してご協力いただいた関係者の皆様にお礼を申し上げます。

(生物資源ゲノム解析センター 川原玲香)



ポスター発表の様子

## 平成 28 年度 研究発表実績

### ○論文発表

●Kusunoki K, Nakano Y, Tanaka K, Sakata Y, Koyama H, and Kobayashi Y.

Transcriptomic variation among six *Arabidopsis thaliana* accessions identified several novel genes controlling aluminium tolerance.

*Plant Cell Environ.* (2017) 40: 249–263.

●Masuta Y, Nozawa K, Takagi H, Yaegashi H, Tanaka K, Ito T, Saito H, Kobayashi H, Matsunaga W, Masuda S, Kato A, and Ito H.

Inducible transposition of a heat-activated retrotransposon in tissue culture.

*Plant Cell Physiol.* (2017) 58: 375–384.

●Ishibashi O, Sakuragi K, Fukutomi Y, Kawakami Y, Kamata Y, Sakurai M, Nakayama S, Uchiyama H, Kobayashi H, Kojima H, and Inui T.

Lip b 1 is a novel allergenic protein isolated from the booklouse, *Liposcelis bostrychophila*.

*Allergy.* (2016) Nov 22. doi: 10.1111/a11.13091. [Epub ahead of print].

●Ogiso-Tanaka E, Tanaka T, Tanaka K, Nonoue Y, Sasaki T, Fushimi E, Koide Y, Okumoto Y, Yano M, and Saito H.

Detection of novel QTLs qDTH4.5 and qDTH6.3, which confer late heading under short-day conditions, by SSR marker-based and QTL-seq analysis.

*Breed. Sci.* (2017) *in press*

●Takei M, Ito S, Tanaka K, Ishige T, and Suzuki Y.

Transcriptomic characterization of gall tissue of Japanese elm tree (*Ulmus davidiana* var. japonica) induced by the aphid *Tetraneura nigriabdominalis*.

*Biosci Biotechnol Biochem.* (2017) Feb 6. doi: 10.1080/09168451.2017.1285685. [Epub ahead of print].

●Wang L, Yamano T, Takane S, Niikawa Y, Toyokawa C, Ozawa SI, Tokutsu R, Takahashi Y, Minagawa J, Kanesaki Y, Yoshikawa H, and Fukuzawa H.

Chloroplast-mediated regulation of CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism by Ca<sup>2+</sup>-binding protein CAS in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* (2016) 113: 12586–12591.

●Kobayashi K, Kanesaki Y, and Yoshikawa H.

Genetic analysis of collective motility of *Paenibacillus* sp. NAIST15-1.

*PLOS Genet.* (2016) 12: e1006387.

●Htwe AZ, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Tsurumaru H, and Yamakawa T.

Draft genomes of *Bradyrhizobium elkanii* strains BLY3-8 and BLY6-1, which are incompatible with *Rj3* genotype soybean cultivars.

*Genome Announc.* (2016) 4: e01169–16.

●Ugajin A, Watanabe T, Uchiyama H, Sasaki T, Yajima S, and Ono M.

Expression analysis of *Egr-1* ortholog in metamorphic brain of honeybee (*Apis mellifera* L.): Possible evolutionary conservation of roles of *Egr* in eye development in vertebrates and insects.

*Biochem Biophys Res Commun.* (2016) 478: 1014–1019.

●Nakahigashi K, Takai Y, Kimura M, Abe N, Nakayashiki T, Shiwa Y, Yoshikawa H, Wanner BL, Ishihama Y, and Mori H.

Comprehensive identification of translation start sites by tetracycline-inhibited ribosome profiling.

*DNA Res.* (2016) 23: 193-201.

●Kojima KK, Furuta Y, Yahara K, Fukuyo M, Shiwa Y, Nishiumi S, Yoshida M, Azuma T, Yoshikawa H, and Kobayashi I.

Population evolution of *Helicobacter pylori* through diversification in DNA methylation and interstrain sequence homogenization.

*Mol Biol Evol.* (2016) 33: 2848-2859.

●Miwa S, Kihira E, Yoshioka A, Nakasone K, Okamoto S, Hatano M, Igarashi M, Eguchi Y, Kato A, Ichikawa N, Sekine M, Fujita N, Kanasaki Y, Yoshikawa H, and Utsumi R.

Identification of the three genes involved in controlling production of a phytotoxin tropolone in *Burkholderia plantarii*.

*J Bacteriol.* (2016) 198: 1604-1609.

## ○その他

### 日本進化学会第 18 回東京大会 最優秀学生ポスター発表賞

交雑起源の無性生殖種のゲノムワイドなアリル発現パターン：遺伝的不和合の補償との関連性  
三品達平、橋口康之、武島弘彦、川原玲香、佐々木剛、遠藤未来美、西田睦、渡辺勝敏

### 招待講演

2016 年 9 月 9 日

IPA ユーザーミーティング（東京）

川原玲香

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターにおける NGS データを用いた IPA 活用事例



---

## 平成 28 年度

# 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧

---

### 平成 28 年度前期新規採択課題一覧

1. 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」
2. 松尾隆嗣（東京大学）  
「テナガショウジョウバエの交尾受容性を制御する遺伝子座の同定」
3. 高野英晃（日本大学）  
「有用微生物群の光環境応答メカニズムに関する研究」
4. Kim, June-Sik（理化学研究所）  
「ゲノムリシーケンスを利用した植物耐乾性を支配する量的形質遺伝子の同定」
5. 正木春彦（東京大学）  
「cAMP に応答してコロニー形成を制御する大腸菌遺伝子の研究」
6. 瀬戸口浩彰（京都大学）  
「多様な花色を有するミスミソウを用いた着色機構の解明」
7. 木村康二（岡山大学）  
「ウシ卵管が分泌するエキソソーム内に存在する miRNA の同定およびその初期胚への機能解析」
8. 山本真紀（関西福祉科学大学）  
「ラン科植物における動原体配列の ChIP-Seq 解析」
9. 土松隆志（千葉大学）  
「近親交配はゲノム進化に何をもたらすか：接合藻類ヒメミカツキモを用いて」
10. 藤原伸介（関西学院大学）  
「超好熱菌の分岐型ポリアミン依存的に発現する遺伝子の網羅的同定」
11. 成川 礼（静岡大学）  
「クロロフィル *d* を持つシアノバクテリア *Acaryochloris marina* の光質応答転写システムの解明」
12. 窪崎敦隆（国立医薬品食品衛生研究所）  
「細菌・真菌同時検出を目指す網羅解析法の構築」
13. 岡田憲典（東京大学）  
「*Oryza* 属のファイトアレキシン生合成遺伝子クラスター領域における発現誘導機構の進化的保存の追究」
14. 仲宗根薫（近畿大学）  
「泡盛黒麹菌ゲノム情報に基づく泡盛製造への応用と古酒熟成化促進」

15. 彦坂晶子 (千葉大学)  
「単為結果性キュウリの果実成長制御メカニズムの解明」
16. 西條雄介 (奈良先端科学技術大学院大学)  
「植物免疫記憶の制御機構に関する ChIP シーケンス解析」
17. 高田達之 (立命館大学)  
「琵琶湖固有種ホンモロコ生殖巣のトランスクリプトーム解析」
18. 奥村 裕 (水産総合研究センター東北区水産研究所)  
「微生物群集に及ぼす津波の影響評価：次世代シーケンサーを用いた環境試料のレトロスペクティブ分析」
19. 榎 真一 (山梨大学)  
「統合オミクス解析による甲州ブドウの特性解明」
20. 佐藤昌直 (北海道大学)  
「カイコの家畜的形質に関与する遺伝子座の同定」
21. 辻 寛之 (横浜市立大学)  
「極微量サンプルによる植物の DNA メチローム・トランスクリプトーム解析による植物改良の基盤技術開発」

## 平成 28 年度後期新規採択課題一覧

22. 加藤明宣 (近畿大学)  
「dsRNA 依存的 RP 法による tail-to-tail 遺伝子相互作用の解析」
23. 福田智一 (岩手大学)  
「リプログラミング 6 因子によるブタ由来 iPS 細胞の RNA-Seq 解析」
24. 和地正明 (東京工業大学)  
「大腸菌 *tolC* 変異株が酸感受性を示す機構の解析」
25. 藤本 龍 (神戸大学)  
「クロマチンリモデリング因子による雑種強勢発現機構の解明」
26. 粟井光一郎 (静岡大学)  
「糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 における新規酸素センサーの探索」
27. 松下一信 (山口大学)  
「酢酸菌の酢酸発酵能に影響を及ぼす適応変異育種株の遺伝子発現解析」
28. 津田雅孝 (東北大学)  
「異種細菌株共存による環境汚染化合物の効率的分解：トランスクリプトーム解析に基づく効率的分解機構の解明」
29. 花田耕介 (九州工業大学)  
「トランスクリプトーム解析から推察されるオオハマニンニク染色体の進化的起源」
30. 小林括平 (愛媛大学)  
「植物ウイルスタンパク質による病徴様表現型誘導時における前初期応答の解析」

31. 野々村賢一（国立遺伝学研究所）  
「イネの減数分裂を促進するエピジェネティック制御機構の解明」
32. 高坂智之（山口大学）  
「ストレス耐性の向上した耐熱性酵母のゲノム内変異解析」
33. 山田 守（山口大学）  
「定常期以降の大腸菌の生存機構の解明」
34. 二橋 亮（産業技術総合研究所）  
「トンボの翅色形成の分子基盤」
35. 山本義治（岐阜大学）  
「シロイヌナズナ自然変異系統の転写開始点解析」
36. 福澤秀哉（京都大学）  
「光合成生物の環境順化におけるゲノム応答」
37. 得平茂樹（首都大学東京）  
「シアノバクテリアにおける窒素固定能獲得機構」
38. 鈴木雅京（東京大学）  
「ハバチ類の新規性決定遺伝子の同定とその害虫防除法への応用」
39. 川口眞理（上智大学）  
「タツノオトシゴの育児嚢の主要構成組織の分子マーカーの探査」
40. 経塚淳子（東北大学）  
「作物の成長段階の移行タイミングを制御し生産性を向上するための分子基盤構築」
41. 高橋秀和（秋田県立大学）  
「Resequencing 法による秋田県在来ダイコンの着色遺伝子の単離」

〈課題番号順〉

## 採択課題研究紹介

### 前期新規採択課題

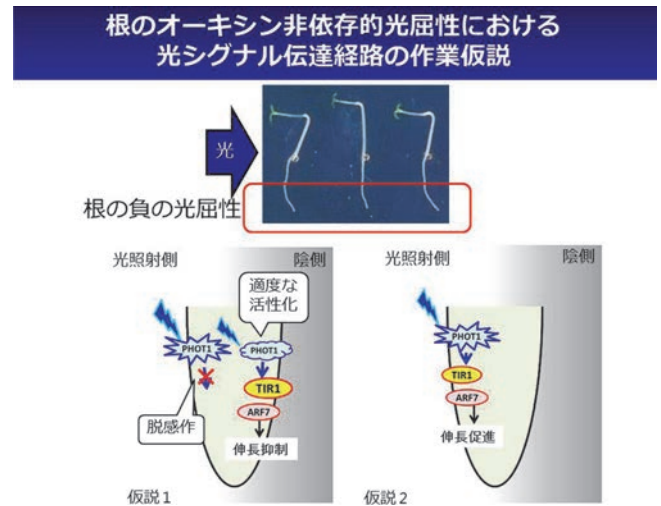
## ◆ 根の成長における青色光受容体 フォトロピンの転写制御機構の解析 ◆

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。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、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示唆する成果を得ている。そこで根の伸長における 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。

本研究において、恒常的活性化型 phot1 発現誘導 4 時間後、発現が 2 倍以上増加もしくは減少する遺伝子をおよそ 30 個同定することに成功した。これらの遺伝子はベクターコントロール株では発現が変化せず、ほとんどの遺伝子が定量的 RT-PCR 法によってその発現変化の再現性を得ることができた。現在これらの遺伝子発現調節が野生型の根においてどのような発現パターンを示すのか、また各遺伝子の根の光屈性における役割について検討を行っている。これらの遺伝子発現が野生型におい

て実際に phot1 下流で調節を受けていることが示されれば、光による根の成長調節研究に画期的な成果になると期待している。



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)

## ◆ テナガショウジョウバエの交尾受容性を制御する遺伝子座の同定 ◆

昆虫ではオスに特異的な形態や行動がよく見られますが、これらの多くが配偶者の獲得に関係しており、性選択によって進化してきたと考えられています。性選択は昆虫の多様性を生み出すとともに、繁殖に及ぼす影響も大きいことから応用上も注目すべきメカニズムです。性選択の過程では、オス側 (選ばれる側) で形質の変異を生み出す遺伝的基盤だけでなく、メス側の好みを規定する仕組みが大きな役割を果たしている、メスがどのような形質を好むかによって進化の方向性が左右されます。すなわち、メスの好みこそが性選択の原動力と言ってよいのです。しかしながらメスの好みは受動的に現れる形質で、オスを介して間接的にしか観察できないので定量的な評価は難しく、そのためメスの好みの進化に関わる遺伝的基盤についてはほとんどわかっていないのが現状です。

そこで本研究ではテナガショウジョウバエ *Drosophila prolon-gata* を用いて交尾受容性に関わる遺伝子座を特定することにより、メスの好みの進化メカニズムを明らかにしたいと考えています。テナガショウジョウバエはキイロショウジョウバエに比較的近縁ですが、顕著な性的二型を示します。特にオスの前脚は着色・肥大化していて、他のショウジョウバエには見られない特徴となっています。求愛行動も独特で、肥大した前脚を用いてメスの腹部を激しく連打する“leg vibration”はテナガショウ

ジョウバエだけに見られる動作です。leg vibration にはメスの交尾受容性を高める効果があり、多くの系統のメスは leg vibration をされなければ交尾を受容しません。ところがある例外的な系統のメスは leg vibration 無しでも容易に交尾を受容することが分かりました。古典的な遺伝学的手法とゲノム配列解析を組み合わせて、この系統間の違いを生み出す原因遺伝子座を探索しています。



図1 テナガショウジョウバエのオス (左) とメス (右) スケールバー = 1 mm

松尾隆嗣 (東京大学大学院農学生命科学研究科)  
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)

## ◆ 非光合成細菌における新しい光応答性遺伝子の同定を目指した RNA-seq 解析 ◆

LitR/CarH ファミリーは、非光合成細菌におけるカロテノイド生産の光誘導 (図1) を担う光センサー型レギュレーターです。LitR/CarH による調節メカニズムの研究は主にモデル細菌群を対象として行われ、その光感知メカニズムはビタミンの一種であるアデノシル B12 をクロモフォアに用いる新規かつ原核生物にユニークなタイプであることから、注目されています。litR 類似遺伝子はグラム陽性・陰性を含む多種多様な細菌群に保存されています。また、それらの生息環境も多様であることから、非光合成細菌も太陽光に由来する光に応答する能力を広く有することが推測されています。また、litR 類似遺伝子はカロテノイド合成能を持たない細菌にも保存されていることから、その役割が多様である可能性が考えられます。

非光合成細菌は LitR/CarH ファミリーに加えて、BLUF、LOV、PYP などの青色光センサーを有していることがゲノム情報からわかっています。しかし、それらがどのような遺伝子の発現制御や細菌機能に関わるかは十分に調べられていません。このように光センサーの多様な分布とは対照的に、研究が進められている生物種は限られていました。そこで、私たちは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 により細菌の光応答性遺伝子を探索しています。ここで対象としている細菌には、環境浄化細菌、納豆菌、植物共生性細菌、海洋性細菌、放線菌などが含まれています。光応答性遺伝子の同定を通じて、新しい光センサーを介した応答機構の発見を目

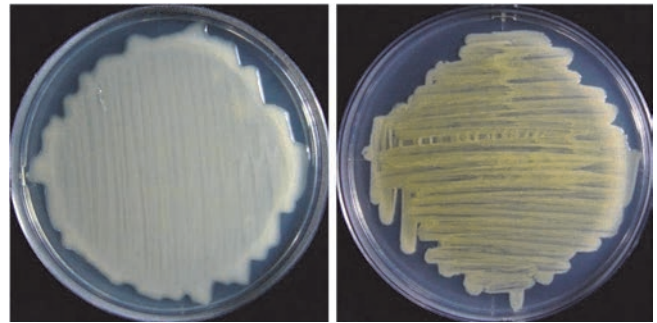


図1 内生胞子形成細菌 *Bacillus megaterium* QM B1551 株におけるカロテノイド生産の光誘導現象 (左は暗条件、右は明条件において培養した様子)

指しています。また、最近注目されているオプトジェネティックの次世代ツールとなり得る光センサーが見つかることを期待しています。

高野英晃 (日本大学生物資源科学部応用生物科学科・生命科学研究所)

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)

## ◆ ゲノムリシーケンスを利用した植物耐乾性を支配する量的形質遺伝子の同定 ◆

シロイヌナズナは分子遺伝学の最先端にあるモデル植物であると同時に、高い環境順応力を以て世界各地の様々な自然環境下でその自生が認められている。異なる各自然環境に適した遺伝的変化を蓄積してきたであろうこれらのエコタイプ (野生系統) は、新たな環境ストレス遺伝子の発見に有用な遺伝資源のプールであると同時に、野生遺伝資源を活用した環境耐性型作物育種のモデルケースとして重要な価値を示す。本研究課題では、異なる耐乾性を示す二つのエコタイプからなる F2 分離集団を材料に、植物が自然と獲得した耐乾性 QTL の探索を行う。

現在世界各地から 1,000 以上のエコタイプが登録されている。赤道に近い島から発見された Cvi-0 は、高緯度の内陸部由来の Got-7 より高い蒸散量を以て体温調節を行っている可能性がある。同環境で生育させた植物の葉面温度を観察した結果、Cvi-0 は Got-7 より低い葉面温度を示した。さらに実際植物の地上部を用いて行った蒸散量 (失水率) の測定からは、確かに Cvi-0 が Got-7 より高い蒸散量を示した。これらの結果を元に、両エコタイプの交配による F2 分離集団 1,000 個体の蒸散量測定を行った。その結果が正規分布を従わない (Shapiro-Wilk test;  $p < 0.05$ ) もの連続した値の分布を示すことから、少数のメジャーな QTL の存在が示唆された。この発見を元に、蒸散量の高低を基準に選抜した各 25 個体に

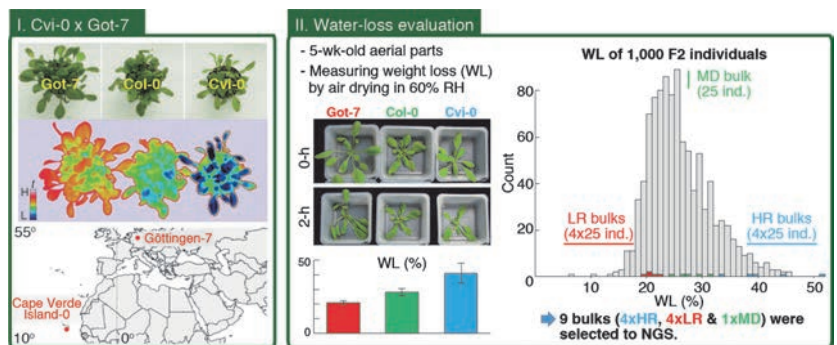


図 Cvi-0 と Got-7 の生息地と葉面温度 (左) F2 分離集団における蒸散量 (WL) の測定結果とバルク集団 (LR、HR、MD) の選抜。Col-0 はレファランス系統である。

構成される 9 個のバルク集団のゲノミック DNA を抽出、NGS を以てゲノムリシーケンスが行われた。現在は各バルクに共通的に現れる塩基多型を調べることで原因 QTL 及び原因遺伝子の同定に向けた解析を進めている。

Kim, June-Sik (理化学研究所環境資源科学研究センター)

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)

共同研究先: 太治輝昭 (応用生物科学部)

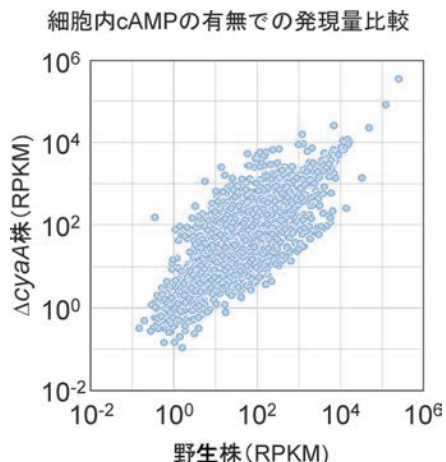
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ cAMP に応答してコロニー形成を制御する大腸菌遺伝子の研究 ◆

目で見て生死の判らないバクテリアはまずコロニーとして分離され、コロニー形成能で生きてると定義されてきた。食品衛生法などの公定法はまさにそうである。一方で天然のバクテリアのほとんどはコロニーを作れない状態にあることが知られている。明らかにコロニー形成は生きていることのうち特殊な生物現象のはずなのに、コロニー形成とは何か、遺伝子の言葉で説明されていない。そこが判れば自然から分離されるバクテリアの世界も一気に増えるのではないか？

色々なバクテリアを低温飢餓に曝すと、生きていた証拠はあっても次第にコロニーを作れない状態に陥る。これは天然のバクテリアがコロニーを作れない現象のモデルと考えられている。低温飢餓で、どういう遺伝子の働きが減衰していくとコロニー形成能がなくなるのか？大腸菌でそれを突きつめていくと、cAMP が重要なシグナルになっていく可能性が出てきた。cAMP がコロニー形成を制御するといっても、「コロニー形成遺伝子」が存在してそれを on/off する訳でもない。cAMP の下流にあるどういう遺伝子（たち）が、どう働くと、あるいは働かなくなると、コロニーとして増殖ができなくなるのか？

cAMP の合成遺伝子を欠失した  $\Delta cyaA$  株と野生株を、RNA-seq で比較してみると、細胞内 cAMP の有無で全遺伝子の 1 割以上もの遺伝子で転写が大きく変わっていた。この中に、cAMP に応答してコロニー形成を制御する遺伝子があるはずだが、酵素活性などを見るのと異なり、多数の候補の中から、低温飢餓に長期間曝したあとのコロニー形成率の変化によってそれを見つけるのは容易ではない。条件の絞り込みが重要となる。



しかしその過程で、 $\Delta cyaA$  株の中から、cAMP があるのと似た挙動をする株が現れた。ゲノム配列を決定してみると、cAMP 受容体 CRP が cAMP に脱感作した点変異体であった。しかしコロニー形成だけは  $\Delta cyaA$  株における応答とほぼ同じだったので、候補の絞り込みに利用できた。早く標的遺伝子を掴まいたい。

正木春彦 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

共同研究先: 矢嶋俊介 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 多様な花色を有するミスミソウを用いた着色機構の解明 ◆

花色に関する研究は古くから行われており、成分やその背景で働く遺伝子の研究は非常に進んでいる。その成果は、例えば「青いバラ」の作成などで実用化されてきた。しかし野生集団において、様々な花色や濃淡を着色するポテンシャルを有する植物が「花色をどのような遺伝的・生理的メカニズムでデザインしているのか？」という複雑な問題は未だ解明されていない。

ミスミソウは昔から「一つの集団内に様々な色の花を咲かせる植物」として、古典園芸で用いられてきた。花色の着色は簡単なメンデル遺伝で説明が付くとされ、花卉園芸の業界では様々な色彩のミスミソウが作出され、販売されている。この様に多様な花色を付けることのできる植物は他種においても例がなく、非常にユニークな特性であり有用な材料である。しかしミスミソウの花色に関する遺伝的背景は全く明らかにされていない。多様な花色を有するために、その着色機構は複雑だと推察されていることが理由の一つであると考えられる。そこで本研究ではまず、DIC カラーガイドを元にふるい分けした4つの色種、白・赤・紫・青を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることで成分ごとにカテゴライズした。結果、アントシアニン系の成分を含まない白 (N型) と、シアニジンを含む赤 (紫) (C型)、そしてシアニジンに加え、デルフィニジンを含む青 (CD型) の三つのタイプが存在していることが分かった (Fig. 1)。アントシアニンの合成経路は種を越えて保存的で (Fig. 2)、ミスミソウのこれらの色種を分けている候補遺伝子が、F3'H や F3'5'H にある可能性が考えられた。そこで本研究では、以上三つのタイプの花色の発現変動遺伝子を RNA-Seq を用いて抽出し、ミスミソウが多様な花色を生み出



Fig. 1 各色型の典型例

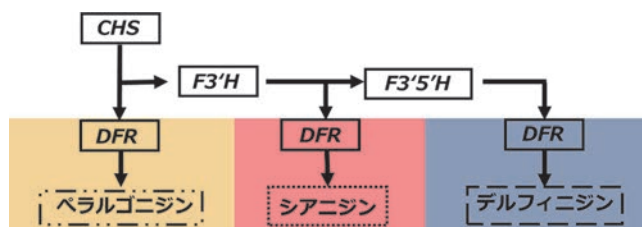


Fig. 2 アントシアニン合成経路 (略図)

す機構を解明する足掛かりとして、原因となる遺伝子候補の特定や、発現量の比較、塩基配列の差等の解析を行う計画である。

瀬戸口浩彰 (京都大学大学院人間環境学研究科)

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)

## ◆ ウシ卵管が分泌するエクソソーム内に存在する miRNA の同定 およびその初期胚への機能解析 ◆

我が国ではウシの胚移植技術により年間数万頭の子牛が生産されている。移植に供される胚の大部分は雌牛をホルモン処置により多排卵誘起し、子宮の洗浄より得られた生体由来胚が占めている。一方、食肉センター由来の卵巣から未成熟卵子を回収し、体外で成熟・受精・発生させた体外受精胚の生産も行われているが、その利用はわずかである。

体外受精胚が胚移植にあまり利用されない理由の一つはその受胎率の低さにある。農林水産省の統計によると、体外受精胚の移植後の受胎率は体内由来胚のそれに比べて5～10ポイント低い。また、体外受精胚の場合移植後、産子が過大となり分娩事故が多発するなどの問題も指摘されている。これらの問題の多くは体外における培養環境に起因し、実際、体外受精胚は体内由来胚と比べ遺伝子の発現が異なることが知られている。従って体外培養技術の改良は体外受精胚の現場利用に大きく貢献すると期待される。

哺乳動物の卵子は卵巣内の卵胞で成熟し排卵されると、速やかに卵管の中に取り込まれ受精する。受精後も受精卵は卵管の中で発育し、数日後子宮に移動して着床する。これまでの研究の中で卵管が分泌する様々な因子が胚の発育に影響を及ぼすことが知られているが、その因子や詳細なメカニズムに関する研究は進捗していない。一方近年細胞が脂質二重膜に包まれた小胞（エクソソーム）を放出し、さらにその中にはタンパク質、mRNA または miRNA などの物質が含まれ、遠隔の標的細胞に取り込まれて機能することが知られるようになった。卵管にお

いてもエクソソームの産生が行われ、その膜上に存在する Ca<sup>2+</sup> ATPase 4 が精子膜内に取り込まれて受精能獲得に関与することが報告されている。以上のように卵管はエクソソームを放出し、卵管内の生殖細胞に影響を及ぼすことがあきらかとなっているが、これら卵管由来のエクソソーム内に含まれる miRNA の同定についての報告は皆無であり、またそれらが胚発生にどのように影響を及ぼしているかは全く解明されていない。本課題では卵管由来エクソソーム中に含まれる miRNA の同定とそれらが胚機能や胚品質に及ぼす影響について明らかにし、体外受精胚の品質の向上や受胎性向上技術開発に繋げる。

今回の生物資源ゲノム解析センターとの共同研究により、研究が大きく伸展することを期待している。

木村康二（岡山大学大学院環境生命科学研究科）  
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）



ウシ卵管上皮細胞

## ◆ ラン科植物における動原体配列の ChIP-Seq 解析 ◆

ラン科植物は被子植物の10%を占め、世界中に2万5千種が分布しているが、その染色体解析やゲノムレベルの解析は他の植物に比べて遅れている。私たちはこれまで、単軸性のラン科植物の3属 (*Neofinetia*, *Vanda*, *Rhynchostylis*, 全て  $2n=38$ ) を中心とし、それらの人為雑種の分子細胞学的な解析を行ってきた。ラン科植物では属間雑種が容易に得られ、3つ以上の属からなる多元雑種も珍しくないことから、交配のバリアーが低くゲノムの柔軟性が高いことがうかがえる。本研究に至るまでに、3属の染色体の大きさや動原体付近のヘテロクロマチンの分布が属によって異なることを明らかにし、多元雑種について核内でゲノムの区画化が行われていることが GISH (genomic *in situ* hybridization) 解析でわかったため、ラン科ゲノムの柔軟性と減数分裂時の染色体動態との関連を調べるために、動原体構成要素に着目した分子細胞遺伝学的解析を開始した。それに伴って岡山大学資源植物科学研究所の長岐准教授らと共同研究を開始し、*Neofinetia falcata* (フウラン) の抗 CENH3 抗体を得て、この抗体を用いた免疫染色 (図1) では本解析で使用する全ての種で動原体特異的のシグナルが得られた。人工染色体を作成するには、動原体機能に関連する動原体 DNA 配列を属別に解明する必要があるため、CENH3 を用いて ChIP (クロマチン免疫沈降) で精製した DNA のクローンの解析を進めてきたが、得られる情報は少なく、精製された DNA の全体像をつかむことが難しかった。

そこで本研究により、我々が材料としているラン科植物の動原体 DNA 配列を ChIP-Seq により網羅的に解析して動原体配列の全体像を把握することをめざしている。ChIP を用いて動原体 DNA 配列を単離して次世代シーケンサーにより塩基配列を明らかにし、ChIP-Seq で得られた配列情報をもとに動原体 DNA 候補配列について染色体上の局在を FISH で確認する。動原体 DNA と認められた配列を属間で比較し、それぞれの動原体に特徴的な

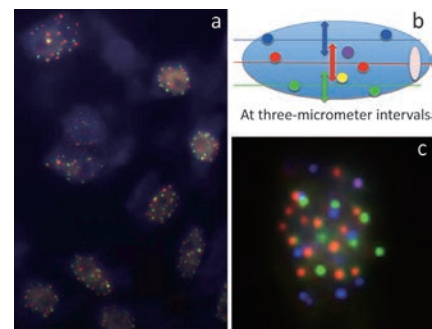


図1 *Neofinetia falcata* の抗 CENH3 抗体を用いた免疫染色像  
a) *Neofinetia falcata* ( $2n=38$ ) の中期核に対して同種の抗 CENH3 抗体を使用して動原体特異的タンパク質 (CENH3) を検出した免疫染色像。UV 励起、B 励起、G 励起の3種類のフィルターごとに焦点を変えてシグナルを取り込み、それぞれ青色、緑色、赤色の疑似カラーを付けて重ね合わせた画像。b) a) の核の垂直断面の模式図。各フィルターで得られたシグナルがどのような疑似カラーになるかを示した。1つのフィルターの焦点深度には一定の幅があるので (図中両矢印)、2種類のフィルターで捉えられたシグナルは、両方の疑似カラーの混色 (紫色や黄色) で検出される。c) a) と同一標本の核の拡大像。

構造を解析していく。

山本真紀（関西福祉科学大学）  
長岐清孝（岡山大学資源植物科学研究所）  
向井康比己（大阪教育大学）  
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）

## ◆ 近親交配はゲノム進化に何をもたらすか： 接合藻類ヒメミカヅキモを用いて ◆

自家交配（自殖）は植物における普遍的な生殖様式であり、動物・菌類でもしばしば見られる近親交配の一種である。分子系統学的な研究から、自殖を行う種は他殖を主に行う種から何度も繰り返し進化してきたことが知られる。自殖は、交配相手がなくとも確実に子孫を残せる等の短期的な有利さの一方で、有害突然変異が蓄積しやすくなる、遺伝的多様性が低下するなど、長期的には集団の絶滅リスクを上げる「デッドエンド」と言われてきたが、実証的な裏付けは依然として少ないのが現状である。本研究では、自殖の進化がゲノム全体に具体的にどのような変化をもたらすのかを明らかにするために、単細胞の緑藻、ヒメミカヅキモ (*Closterium psl* complex) を用いた集団ゲノム解析を行う。ヒメミカヅキモは接合藻であり、+型、-型と呼ばれる二種類の性（交配型）を持つ。通常のヘテロタリック系統においては、有性生殖は異なる交配型でのみ可能だが、ホモタリックと呼ばれる系統では同一クローン間での交配が可能であり、これらは自殖可能な自家和合型系統である（図1）。本研究ではまず、次世代シーケンサー Illumina HiSeq 2500 を用いたリシーケンス解析をホモタリック・ヘテロタリック合計 18 系統について行った後、ゲノム全体の塩基多様度、有害突然変異の総数、トランスポゾンのコピー数等に注目したゲノム多型の網羅的比較解析を行う。ホモタリック系統は独立に繰り返し進化したことが知られており、これらの系統間で共通してみられるゲノム進化の普遍的傾向を見出すことで、自殖が進化のデッドエンドになりうるのか、ゲノムレベルからの総合的な考察を行う。

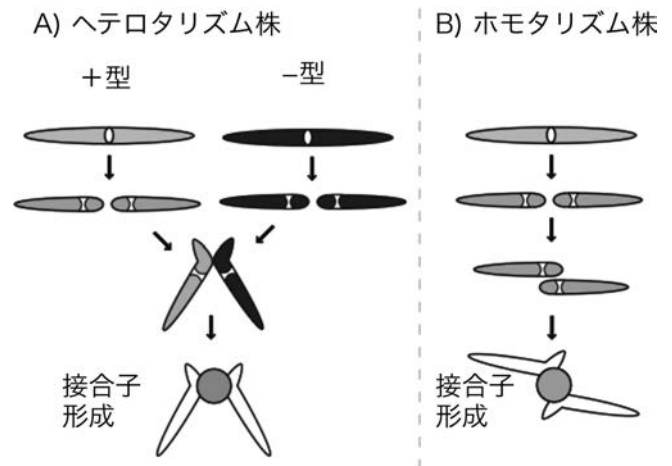
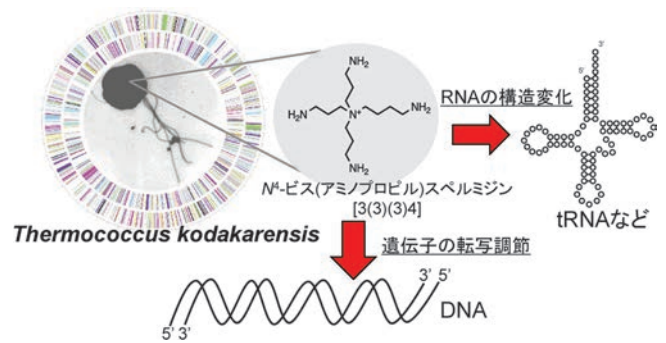


図1 ヒメミカヅキモ (*Closterium psl* complex) のヘテロタリズム株 (A) には +/- という交配型があり、交配型間でのみ有性生殖を行い接合子を形成する。ホモタリズム系統 (B) には交配型の区別がなく、クローン細胞間で接合子を形成する。

土松隆志 (千葉大学大学院理学研究科)  
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)

## ◆ 超好熱菌の分岐鎖ポリアミン依存的に発現する遺伝子の網羅的同定 ◆

ポリアミンは、一分子中にアミノ基を二つ以上含む脂肪族化合物で、すべての生物に普遍的に存在している。長鎖分岐鎖ポリアミンは(超)好熱菌にのみ見られる。これらはそれぞれDNAやRNAの高温における構造安定化に寄与している。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、スペルミジンや分岐鎖ポリアミン  $N^4$ -ピス (アミノプロピル) スペルミジンを主に有する。本菌の  $N^4$ -ピス (アミノプロピル) スペルミジンは、新規アミノプロピル基転移酵素 *Tk-BpsA* の二段階の触媒作用によりスペルミジンから  $N^4$ -アミノプロピルスペルミジンを経て生成される。*Tk-BpsA* 遺伝子が破壊された *bpsA* 破壊株は、*T. kodakarensis* 野生株の至適生育温度 85℃では野生株と同等に生育するが、野生株の生育上限温度 93℃では生育しない。これは、分岐鎖ポリアミンが *T. kodakarensis* の高温ストレス下での生育に必須であることを示唆している。しかし、(超)好熱菌における分岐鎖ポリアミンの生理的な機能は不明である。大腸菌において、ポリアミンはRNAに結合し、構造を変化させることで特定のタンパク質合成を翻訳レベルで促進する。その多くは転写制御因子であることから、ポリアミンは多くの遺伝子発現を調節し、細胞機能の維持に必要である。一方、ポリアミンはDNAに対する凝集効果を有する事から、遺伝子発現の調節に関与するクロマチン様構造が分岐鎖ポリアミンにより形成する可能性も考えられる。本研究では、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq 法) を行い、転写量が野生株と比べて *bpsA* 破壊株で顕著に増加及び減少した



分岐鎖ポリアミン依存的に発現する遺伝子の RNA-Seq 解析による網羅的同定

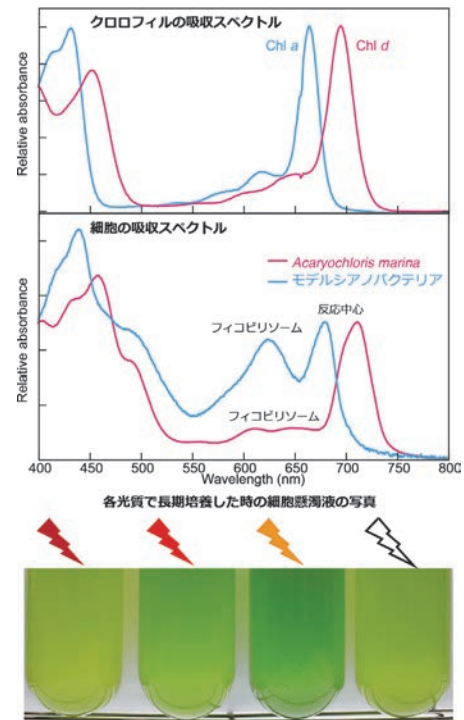
遺伝子を解析し、分岐鎖ポリアミンに依存して発現する遺伝子の網羅的同定を行った。今後、個々の遺伝子の転写における分岐鎖ポリアミンの作用機序を明らかにしたい。

藤原伸介 (関西学院大学理工学部)  
秀瀬涼太 (関西学院大学大学院理工学研究科生命科学専攻)  
濱川匡史 (関西学院大学大学院理工学研究科生命科学専攻)  
共同研究先：貝沼章子 (応用生物科学部)  
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)



## ◆ ユニークなシアノバクテリア *Acaryochloris marina* の 光順化・適応機構の解明 ◆

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物であり、植物の葉緑体と起源を同一にするため、植物や光合成のモデル生物として古くから研究されている。植物やシアノバクテリアは光合成を行う上で、光合成の反応中心色素としてクロロフィル *a* を利用しているが、我々が研究対象としているシアノバクテリア *Acaryochloris marina* は例外的に、クロロフィル *d* という色素を利用している。クロロフィル *a* が 660 nm 程度の赤色光を主に吸収するのに対し、クロロフィル *d* は 700 nm 近い遠赤色光を主に吸収している (図・上)。つまり、*A. marina* は他の光合成生物よりも長波長の光質を利用していると言える。一方、多くのシアノバクテリアは光合成の反応中心に加えて、主に橙色光を吸収するフィコビリソームという超複合体を有し、クロロフィル *a* があまり吸収できない光質を吸収し、その光エネルギーを反応中心に伝達することで、弱光下でも効率良く光合成を行うシステムを備えている。*A. marina* においても他のシアノバクテリア同様、フィコビリソームを持つが、その蓄積度は低く詳細な制御メカニズムも明らかにされていない (図・中)。本研究においては、*A. marina* を異なる光質 (橙色光、赤色光、遠赤色光) 下で培養し、次世代シーケンサーを利用した解析を通じて、光質依存的な順化・適応機構の解明を目指している。短期の順化機構を解明するために、各光質下での RNA-seq による遺伝子発現解析を進行中である。また、長期の適応機構を解明するために、細胞を各光質下で長期継代培養した結果、異なる色を呈した細胞が得られている (図・下)。中でも橙色光培養では、フィコビリソームの高蓄積が確認された。高蓄積の分子機構を理解するために、今後はリシーケンス解析を進めていく。

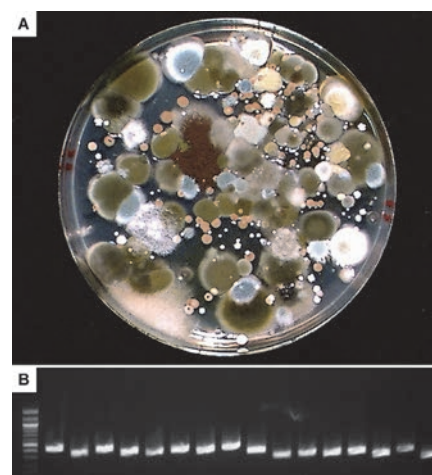


成川 礼 (静岡大学理学部生物科学科)  
共同研究先: 渡辺 智 (応用生物科学部)  
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 細菌・真菌同時検出を目指す網羅解析法の構築 ◆

食品製造などの現場では、環境モニタリングや製品の品質保全の為に使用可能な迅速試験法の構築が求められている。その一つとして、核酸解析の技術革新や能力向上に伴い、一度に大量の DNA を解析できる次世代シーケンサー (NGS) の活用が期待されている。NGS を用いた塩基配列決定による網羅解析技法は、1 塩基の精度で大量のデータを取得出来ることから、微生物菌属および菌株の同定による、汚染源や混入経路の推定に威力を発揮できると考えられている。現在までに、微生物群叢を簡便に理解する方法として、標的領域を増幅し、その比率を計測する解析法が提案されている。具体的には、細菌の 16S リボソーム RNA (16S rRNA) を標的とした 16S メタ解析などであり、ヒトや動物の腸内細菌叢や土壌細菌叢の理解に活用されている。しかし、真の微生物叢を理解するという意味では、16S rRNA を持つ細菌だけではなく、酵母・カビなどの真菌に関しても解析する必要があるが、現段階では、衛生試験に活用できる真菌核酸を指標とした迅速測定技術の開発は遅れている。

そこで、本研究では、細菌と真菌を同時に検出出来る、真の意味の微生物群集解析技法の確立を目指すことを目標に、(1) 細菌・真菌からの適切な DNA 精製法の確立 (2) 細菌 16S rRNA および、真菌の Internal Transcribed Spacer 領域を標的とした新規ライブラリ作成プライマーの設計 (3) 混合プライマーによる非標的増幅の有無確認 (4) 細菌・真菌混合サンプルの次世代シーケンサーによる塩基配列決定 (5) データ解析



◀ 図 1  
(A) 従来法である真菌の培養試験  
(B) 真菌の菌属・菌株によって異なる Internal Transcribed Spacer 1 の長さ

パイプラインの構築と解析結果の妥当性などを慎重に検討して、従来の培養法に変わる次世代型の試験法の構築に取り組んでいる。

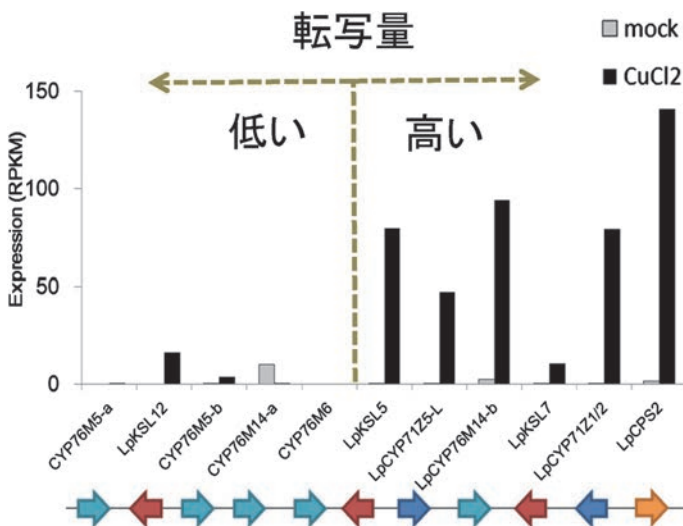
窪崎敦隆 (国立医薬品食品衛生研究所)  
渡辺麻衣子 (国立医薬品食品衛生研究所)  
共同研究先: 佐々木剛 (農学部)  
石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 野生イネのファイトアレキシン遺伝子クラスター領域の転写動態 ◆

植物は、生物学的および非生物学的ストレスに対する防御応答の一つとして、抗菌性低分子化合物であるファイトアレキシンを生成する。栽培イネ *Oryza sativa* では17種のファイトアレキシンの生産が確認されており、このうち主要なジテルペン型ファイトアレキシンであるファイトカサン類とモミラクトン類は、それらの生合成遺伝子群がそれぞれ染色体上にクラスターを形成している。最近、栽培イネの祖先種である野生イネの研究から、*Oryza* 属のファイトアレキシン生産能は育種前の野生イネにおいて生合成遺伝子クラスターの構築と共に既に獲得されていたことが明らかとなった。本研究は、野生イネの生合成遺伝子クラスター領域におけるストレス処理時の遺伝子発現動態とファイトアレキシン生産制御を担う転写制御因子に着目し野生イネから栽培イネへの進化を追究することにより、遺伝子クラスターの転写制御機構への理解を深めることを目的として進めている。

先行研究で、栽培イネ *O. sativa* では、塩化銅処理によりファイトアレキシン生合成遺伝子の発現が誘導された後、ファイトアレキシンが蓄積することが示されていた。その際、生合成遺伝子クラスター内のほぼ全ての遺伝子が同調的に発現誘導を受ける。そこで、野生イネの葉身における塩化銅処理後72時間のファイトアレキシン生産誘導を経時的にLC-MS/MSで分析した。野生イネとしては *Oryza* 属の4種 *O. rufipogon*、*O. punctata*、*O. officinalis*、*O. brachyantha* と近縁他属の *Leersia perrieri* を用いた。その結果、生合成遺伝子クラスターを保持する野生イネの種では、塩化銅処理によってファイトカサン類およびモミラクトン類が誘導的に生産されることが確認された。次に、これらの野生イネを用いたRNA-seq解析を行うことで、クラスター領域におけるファイトアレキシン生合成遺伝子の発現動態を調べた。その結果、モミラクトンとファイトカサンの両方を誘導的に生産する *O. rufipogon* では、それぞれの生合成遺

子クラスターに存在する生合成遺伝子群の全てが育種型イネ *O. sativa* の場合と同様に同調的な転写誘導を受けていることがわかった。さらに興味深いことに、モミラクトンのみを生産する *O. punctata* に関しては、モミラクトン関連遺伝子の転写誘導が起こると同時に、不完全な遺伝子が配置されたファイトカサン生合成遺伝子クラスター様（ファイトカサンを生産しないため、不完全なクラスターと考えている）領域の一部の遺伝子にも明確な転写誘導が認められた。同様な現象は、既知のファイトアレキシンを生産しない *O. brachyantha* の両ファイトアレキシン生合成遺伝子クラスターが存在するべき領域に座乗する cytochrome P450 酸化酵素遺伝子の発現においても認められ、ファイトアレキシンの生産や完全型の遺伝子クラスターを構築していない野生イネにおいても、その領域の転写誘導がアクティブであることが判明した。また、*Oryza* 属に対し近縁他属の *L. perrieri* は、ファイトカサン生産能を持ち遺伝子クラスターの存在もわかっていたが、そのクラスター内遺伝子の発現には、特徴が認められた。すなわち、図1に示すように、発現量の指標となるRPKM値で見ると、遺伝子クラスター領域の右側の遺伝子群の発現誘導が顕著に高いことがわかるが、左側に存在する遺伝子は殆ど発現誘導を示していない。このことは、生合成遺伝子クラスター領域に発現誘導の“潮目”のような部分が存在することを示唆しており、ゲノムレベルでのクラスター領域発現制御機構の解明につながるヒントになるのではないかと考えている。このような発見は、非モデル生物におけるRNA-seq解析の威力の賜物であることは疑う余地がない。今後は、RNA-seq解析から得られた情報を有効利用しつつゲノム情報と照らし合わせながら、複数の野生イネにおける各遺伝子のプロモーター配列の保存部位などの解析を通して、イネのファイトアレキシン生合成遺伝子クラスターの制御機構の全容解明を目指して行きたいと意気込んでいる。



◀ 図1 *L. perrieri* の第2染色体クラスターにおける塩化銅処理時の遺伝子発現にはゲノム領域の位置に依存した強弱が見られる。

岡田憲典 (東京大学生物生産工学研究センター)  
 富山詩歩 (東京大学生物生産工学研究センター)  
 共同研究先: 小塩海平 (国際食料情報学部)  
 川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

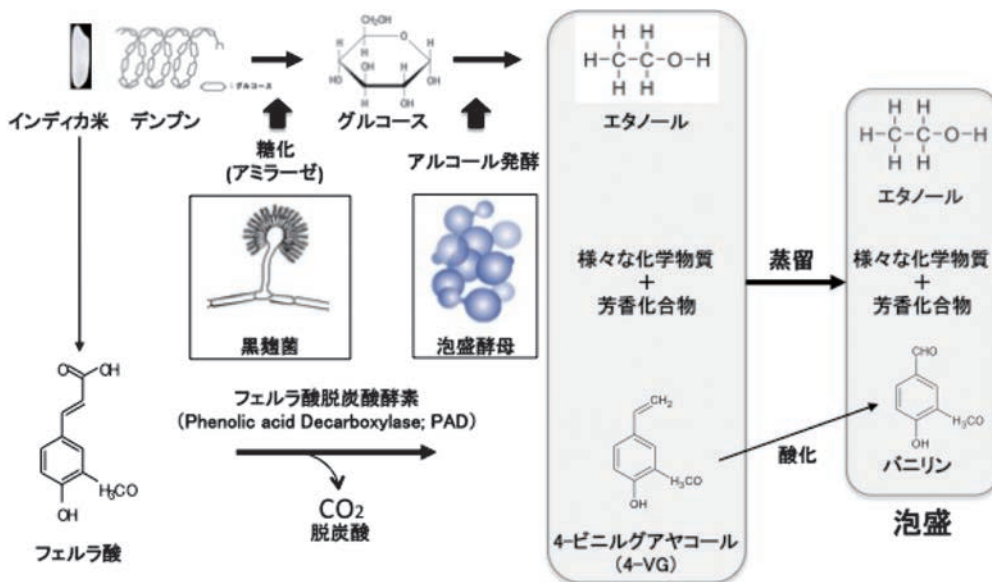
◆ 泡盛黒麹菌ゲノム情報に基づく泡盛製造への応用と古酒熟成化促進 ◆

泡盛はインディカ米を原料とし黒麹菌と泡盛酵母が発酵に関与する、沖縄の蒸留酒です。蒸留された新酒を最低3年熟成させ「古酒」と呼ぶことができ、年月を経た古酒ほど商品の価値が高く、その味わいはまろやかなものになります。泡盛（古酒）を特徴付ける芳香成分の一つにバニリン（V）があります。これは原料米中のフェルラ酸（FA）がフェノール酸脱炭酸酵素（Phenolic Acid Decarboxylase；PAD）により4-ビニルグアヤコール（4-VG）へ変換され酸化により生成します。従って泡盛の芳香生成におけるPADの重要性が示唆されますが、本酵素がどの微生物由来なのか？は明らかにされてきていません。またこの酵素遺伝子を制御し4-VG生成を促進させ、新酒の段階でも古酒に近い泡盛を製造できる可能性も示しています。

昨年、筆者らのグループで発表した実験室用黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis* NBRC4314 株) のゲノム上に PAD 遺伝子の存在を見だし、また泡盛酵母ゲノム（筆者研究室；非公開）には存

在しないことを確認しました。従って黒麹菌によるこの芳香生成の重要性が示唆しましたが、今後の分子育種を目指すには実用黒麹菌のゲノム情報が必要です。実際の泡盛製造においては2種の黒麹菌をブレンドし発酵を行っており、本共同研究では、このような2種の実用黒麹菌 (*A. luchuensis* KBN2012 株、*A. saitoi* KBN2024 株) のドラフトゲノム解析を実施し、泡盛製造における芳香の改良と古酒熟成の効率化を目指しました。

ゲノム解析センターにより明らかにされた2種の黒麹菌ドラフトゲノム情報を利用し、実験室黒麹菌との比較に加え、系統分類の指標となる遺伝子群の解析、黒麹菌の栄養要求性と泡盛を特徴付ける芳香生産に関与する遺伝子に着目し解析を進めています。これらの黒麹菌にも上記PAD遺伝子が見いだされ、生化学及び遺伝子発現機構等に関する解析も進めつつあります。これら黒麹菌の分子育種終了後は、複数の泡盛酒造所と協力しながら泡盛芳香の改良を目指したいと思えます。



仲宗根 薫 (近畿大学工学部化学生命工学科)  
 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)

## ◆ 単為結果性キュウリの果実成長制御メカニズムの解明 ◆

一般に、果菜類や果樹では短期間に多くの果実が着果すると養分が一部の果実に分配され、残りの果実は落果する現象がみられる。この原因は葉や果実間での養分競合といわれているが、光合成産物が十分にある場合でも光合成産物の不均一な分配生じることから、このメカニズムには、果実間での相互作用が関係すると考えられる。

これまで申請者らは、着果節位や着果数を自由に設定できる(すべての節が雌花となる)多雌花性キュウリ品種の複数の果実成長を解析し、果実間の養分競合モデルを確立した(Hikosaka・Sugiyama, 2003; 2004; 2005)。このモデルでは、すべての果実は以下の図の3パターンのいずれかに分類でき、また着果負担の制御によって人為的に各成長パターンを再現することができる。

3パターンとは、①開花後すぐに成長を開始する果実(成長果)、②開花後すぐに成長が一時的に停止し、先に肥大した果実がある期間内(開花後約10日)に収穫されると成長が再開する果実(停滞→回復果)、③成長が再開せず、黄化・落果する果実である(停滞→落果)。

同時期に着生している複数の果実の成長の成否を分けるのが、図中に丸囲みした分岐点AとBである。この分岐点の前後で、果実間の内生ホルモンおよび遺伝子発現にどのような差異があるのかを明らかにすれば、一部の果実へ光合成産物を供給する(しない)メカニズムが明らかにできると考えた。

これまで申請者は、①成長果、②停滞→回復果、③停滞→落果

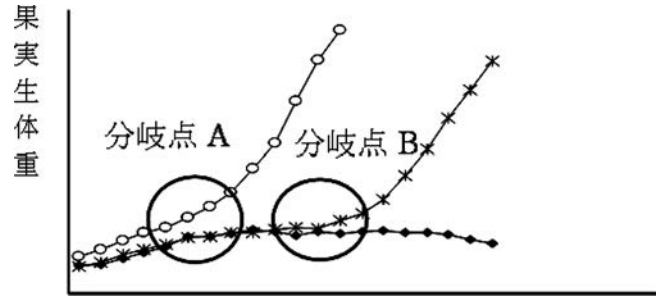


図 単為結果した場合のキュウリ果実の成長パターン (模式図)

に含まれる14種類の内生ホルモン濃度について測定し、3つの成長パターンと10種以上の内生ホルモン濃度が関係している可能性を示唆する結果を得ている。そこで本研究では、果実成長を制御するメカニズムや、果実間での内生ホルモン濃度の差が生じる理由を解明すべく、果実成長パターンごとの遺伝子発現を網羅的に解析し、複数の代謝の経時的変化や、関連酵素などに関する知見を集積する。

彦坂晶子 (千葉大学園芸学研究所)

共同研究先: 峯 洋子 (農学部)

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ ポリコーム群タンパク質を介した植物免疫プライミング成立機構 ◆

植物が病原体感染を認識すると、認識部位だけでなく、長距離移行シグナルを介して全身で防御応答遺伝子の発現を誘導し、免疫が活性化される(全身獲得抵抗性)。その際に誘導された防御応答は記憶化され、植物は二次刺激に対する防御応答を速やかにあるいは強力に活性化する準備が整ったプライミング状態となる。これまでの研究から、プライミングにはヒストンH3の修飾を介したエピジェネティックな制御機構が存在することが示唆されている。しかし、様々なヒストン修飾がどのように協調して働き、プライミングを成立させているのかについては明らかではない。

私たちは、転写促進性ならびに転写抑制性のクロマチン状態の保持にそれぞれ働くH3K4me3修飾とH3K27me3修飾の関与について特に焦点を当てて研究を進めている。これらの修飾を担うヒストン修飾酵素(ポリコーム群タンパク質複合体など)の変異体植物では、全身獲得抵抗性そのものや、全身獲得抵抗性の誘導に伴って防御応答関連遺伝子座に起こるH3K4me3修飾やH3K27me3修飾に影響が見られた。これらの結果から、H3K4me3修飾やH3K27me3修飾がプライミングに重要であることが示唆された。現在、本共同研究において、これらのヒストン修飾動態に関するChIPシーケンス解析を行っており、プライミングとゲノムワイドなヒストン修飾動態との関連性を調べている。本研究で得られた知見を手がかりとして、植物免疫応答の記憶化を制御する分子基盤の解明につなげたい。

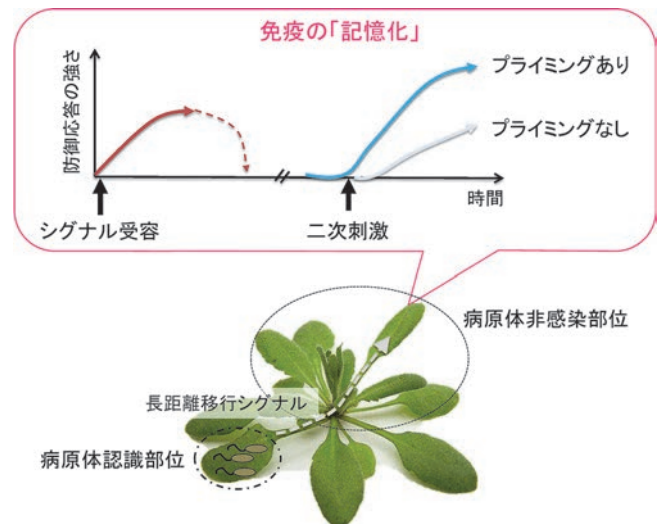


図 防御応答のプライミングの概念図

西條雄介 (奈良先端科学技術大学院大学)

田島由理 (奈良先端科学技術大学院大学)

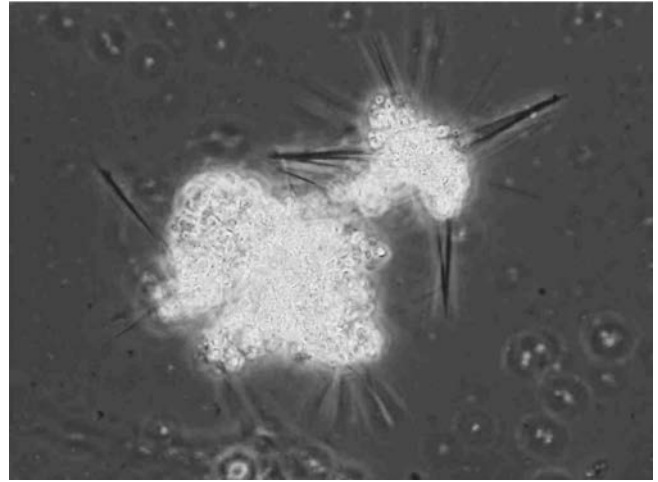
共同研究先: 太治輝昭 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 琵琶湖固有種ホンモロコ生殖巣のトランスクリプトーム解析 ◆

琵琶湖は、近畿圏 1400 万人の生活を支える重要な水源であると共に世界有数の古代湖であり、多くの固有種が生息することが知られている。亜種を含め約 60 種類の固有種が確認されており、このうち 17 種類を魚類が占めている。しかし、近年、琵琶湖固有魚の生息数が急激に減少し、現在その多くが絶滅危惧種に指定されている。特にコイ科に属する小型の琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) は、ごく近い将来、野生での絶滅の危険性が極めて高いとされる絶滅危惧種 IA 類に指定されている。ホンモロコはコイ科で最も美味とされる食用魚であり、古くから貴重なタンパク質源として、地域特有の食文化を形成してきた。すなわち食料資源としても重要な生物であるため、その絶滅は生物資源としてのみならず地域食文化の喪失も意味する。

我々は、この絶滅の危機にある琵琶湖固有種ホンモロコを保存することを目的とし、生殖サイクル、生殖幹細胞の凍結保存、*in vitro* 精子・卵子分化、および配偶子形成メカニズムに関する研究を行ってきた。これまでにホンモロコ精原細胞の凍結保存、およびその *in vitro* 培養により受精可能な精子を作る完全 *in vitro* 分化系を開発している。また、ホンモロコの精巣、卵巣、受精卵から内在性核内レセプターを発現する細胞株を樹立し、外因性内分泌攪乱物質が抗雄性ホルモン効果を有することを見いだした。さらに、RNA-seq によりホンモロコ生殖巣の季節変化をトランスクリプトーム解析し、固有種の生殖サイクル、精子形成過程の情報化を行っている。得られた結果を培養系に



フィードバックし、精原細胞の維持培養、永続的な *in vitro* 精子分化培養による固有種の新たな保存戦略の構築を目指している。

高田達之 (立命館大学薬学部)

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)

## ◆ 微生物群集に及ぼす津波の影響評価:

### 次世代シーケンサーを用いた環境試料のレトロスペクティブ分析 ◆

東北地方太平洋沖地震により発生した津波は、東北沿岸域に様々な被害をもたらしました。カキ筏は流出し (植物プランクトン捕食者減少の可能性)、沿岸域の下水処理場は破壊・停止し (局所的な富栄養化による植物プランクトン増殖の可能性)、海底泥が攪乱し (貝毒プランクトンなどシストからの発芽)、海底泥が流失しました (底泥からの栄養塩溶出量が減少する可能性)。その結果、貝毒プランクトンが大発生する一方で、栄養塩は一時的に枯渇に転じ、夏場の植物プランクトンが減少するなど、プランクトンの出現状況は不安定になりました。カキなどの貝類は植物プランクトンを餌とするため、東北沿岸域の主要水産業である無給餌養殖の復興には、震災による餌料環境 (植物プランクトンの種組成など) の変化を把握する必要があります。しかし、東北沿岸域では震災前の植物プランクトン群集に関する知見が乏しいため、津波により植物プランクトンの群集構造が変化したのか調べるのが難しいとされていました。

また、一部海域では震災以前から夏場に貧酸素が発生したり、震災後付着生物によるカキの大量斃死が起こるなどカキ養殖にとって不適な環境も報告されました。そのため、貧酸素の発生要因の特定や付着生物の発生時期の把握などが生産者から求められていました。

今回、仙台湾で採取し、放射性炭素年代測定法により堆積年代が既知の柱状海底泥や、震災前の 2007 年以降定期的に採取し冷凍保存した海水ろ過試料から DNA を抽出し、PsbA (光化学系 II 反応中心である D1 タンパク質をコードする) 遺伝子を



◀ 図 1 仙台湾で採取した柱状試料 (筒の長さは 1 m)、2 cm ごとにスライスし、堆積年代を測定した後、DNA 抽出を行った。

対象に PCR を行い、次世代シーケンサーで解析することで植物プランクトンなど微生物群集の地史の変遷や震災前後の変化などを明かにしたいと考えています。すでにシーケンスは終えており、配列情報を基に主座標分析 (Pcoa) を行い、グラフ上の分布パターンから、津波により植物プランクトンなど微生物群集の多様性がどのように変化したかなど現在解析を進めています。

奥村 裕 (水産研究・教育機構東北区水産研究所)

荒川久幸 (東京海洋大学学術研究院海洋環境学部門)

共同研究先: 塩本明弘 (生物産業学部)

石毛太郎 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 統合オミクス解析による甲州ブドウの特性説明 ◆

ブドウ品種「甲州」は、遙か昔に欧州から伝来し、日本に根付いたとされる日本唯一の産地固有品種です。近年、その起源は欧州系ブドウ (*Vitis vinifera*) と東アジア系野生種との交雑によることが明らかになっています。「甲州」は果皮が特徴的な薄いピンク色を示し(第1図左)、食用だけではなくワイン醸造用に広く使用されています。「甲州」ワインは国際的な賞を数多く受賞し、その価値が評価され始めており、「甲州」は日本ワイン産業において非常に重要な品種です。「甲州」を用い、ワイン品質の重要な要素である色、香りの研究は行われているものの、「甲州」は未だに全成分がわかっておらず、その特性さえも曖昧なのが現状です。

申請者らは、「甲州」の遺伝学的、生理学的特性を明らかにし、それらを「甲州」の栽培やワイン醸造に活かすことを目的とした、甲州ゲノムプロジェクトを行ってきました。甲州ドラフトゲノムを構築し、ブドウで唯一全ゲノム配列が解読されている「ピノ・ノワール」(第1図右)との比較ゲノム解析の結果、「甲州」は植物成長に関する植物ホルモン合成経路や香り等に関する脂肪酸代謝経路において特徴的な遺伝子が多いことが示唆されています。

本採択課題では、先行プロジェクトに続き、次世代シーケンサーを用いたRNA-seq(トランスクリプトミクス)解析による、甲州特徴的な代謝経路における未知の遺伝子を含む発現遺伝子の網羅的解析を行う予定です。また現在までに完了しているメタボロミクス、フェノミクス解析の情報を統合することで、遺伝子発現、代謝産物、形質の面から見た、より詳細な「甲州」の特性を明らかにすることを目的とします。これら統合オミク



第1図 本採択課題で用いるブドウ品種  
(左) *Vitis vinifera* cv. Koshu (甲州)  
(右) *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir (ピノ・ノワール)

ス解析による、より深い「甲州」の特性説明の成果は、「甲州」に適した栽培技術の確立や「甲州」ワインの高品質化などに繋がり、ひいては農業、ワイン産業分野に大きく貢献できることが期待されます。

榎 真一 (山梨大学ワイン科学研究センター)

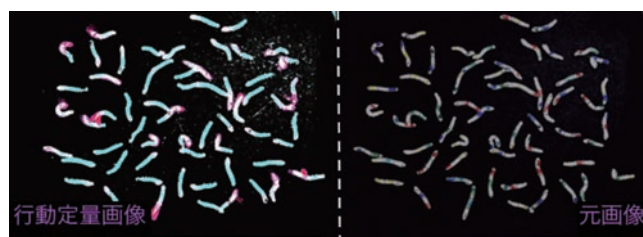
共同研究先: 藤澤弘幸 (農学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ カイコの家畜的形質に関する遺伝子座の同定 ◆

養蚕には5000年以上の歴史があり、養蚕のために選抜された家蚕(カイコ、*Bombyx mori*)は人間による飼育に完全に依存した唯一の家畜昆虫である。カイコの祖先は野蚕(クワコ、*Bombyx mandarina*)と推定されており、カイコ・クワコ間での交雑系統は生殖能力を失わないなど両者はほぼ同種といえる関係にあるが、飛翔能力や接触忌避の喪失など人為的・大量飼育に必要な形質に大きな違いがある(以後、カイコが示すこれら形質を家畜的形質と呼ぶ)。先行研究では低カバレッジながらカイコ・クワコのゲノムを複数系統について解析することにより、カイコの家畜化過程で354遺伝子座が選択されたと推定している(Xia Q. et al. Science 2009)。しかし、これら遺伝子座の家畜的形質への関与について実験的検証はなされておらず、カイコ家畜化に関わる遺伝子座の同定には至っていない。

我々はカイコ、クワコ、及び両者を交配して得られた後代個体幼虫の行動を定量的に分析する方法を開発しており(図:過去5秒間に動きのある領域を暖色、動きが無い領域を寒色、そして色の濃さで行動の有無の程度を示している)、家畜的形質の原因遺伝子座の同定を目指している。本申請研究では、カイコ・クワコ交配後代におけるassociation mappingを行い、これまで未解明だったカイコの家畜化に関わる遺伝学的基盤を解明したい。



昆虫は有用形質を持つ農業資源として期待されるが、産業的に有用で大規模飼育が可能な昆虫はカイコやミツバチなどの限られた種類の昆虫を除いて例が無い。有用な形質や遺伝子(タンパク質)を持つ昆虫も多く、昆虫は未開拓の産業資源である。カイコ家畜化に関わる遺伝学的基盤の解明を通じ、有用昆虫の家畜化可能性の検討、そして昆虫資源の活用・新たな農業のシーズ確立につなげていきたい。

佐藤昌直 (北海道大学大学院農学研究院)

共同研究先: 長島孝行 (農学部)

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。その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、メリステムの単離と核酸抽出方法を検討することで単一のメリステムによるRNA-seqを行うことに成功した。また、DNAメチローム解析についても従来150個以上のメリステムを数ヶ月かけてサンプリングしたところを、新しい方法によって5個程度（30分）まで短縮することに成功した。今後はこれらの方法を活用し、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）

## 後期新規採択課題

### ◆ dsRNA 依存的 RP 法による tail-to-tail 遺伝子相互作用の解析 ◆

細菌ゲノムでは、整然・密な“オペロン群”の傍で、逆向きに隣接した tail-to-tail (→←) 遺伝子配座領域も頻繁に認められる (図 1)。これは単に、遺伝子のオペロン整列化と細菌ゲノムの小型効率化の副産物なのか。我々は現在、堅牢な病原性・薬剤耐性調節を示すサルモネラ菌ゲノムでの tail-to-tail 遺伝子相互作用に着目し、新規な転写翻訳・微調節機構の解明を目指している。延いては、ストッパーモデル『細菌の共役した転写翻訳過程で、リボゾーム一時停止の際に現れる、2本鎖 RNA (dsRNA) 形成が tail-to-tail 遺伝子相互作用を引き起こす』の普遍性について、開発途上の dsRNA 依存的リボゾームプロファイリング (RP) 法により包括的に解析、証明しようというのである。

実際、これまでに、代表者は tail-to-tail (→←) 遺伝子配座領域におけるオペロンの3'端にコードされるタンパク質のみが、反対向き遺伝子の転写依存的に抑制される現象の一例を見出している。また、そこにリボゾームの停止とそれを回避するレスキュー機構が重要な役割を担っていることが分かりつつある。しかし、細菌では転写・翻訳過程が高度に共役しているが、上記モデルは本当に可能なのか、その普遍性はどうか。そこで我々は、従来 RP 法の一部を改良し、dsRNA-モノソーム複合体を濃縮する工程を加えた dsRNA 依存的 RP 法の開発を行い、それをサルモネラ菌ゲノムの解析に適用している。現在、dsRNA 依存的に濃縮されたモノソームが得られ、そこから、

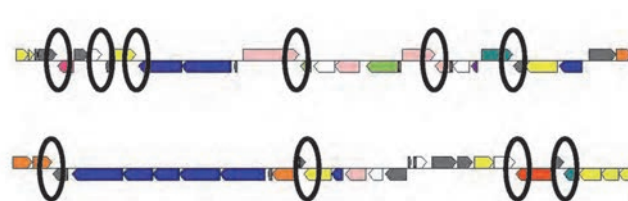


図 1 サルモネラ菌ゲノムに見られる tail-to-tail 遺伝子配座の例 (太字丸) 全体の約 1.2% 領域 (60 kb) のみを示す。(単純計算でも 800 例程)

RT/PCR にて増幅されたりリボゾーム・フットプリント断片を次世代シーケンサーにて解析している。これにより、リボゾーム停止が dsRNA 依存的に長期化する mRNA 領域の分布が視覚化でき、ストッパーモデルの普遍性が証明されるものと期待される。また、従来 RP 法が抗生物質の効き方を解析する上で有用であるように、dsRNA 依存的 RP 法もある種の抗生物質の効き方を解析するアプローチとなる可能性が高い。

加藤明宣 (近畿大学農学部)

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)

### ◆ リプログラミング 6 因子によるブタ由来 iPS 細胞の RNA-Seq 解析 ◆

我々は独自に山中 4 因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) に加えて Nanog および Lin28 の 2 遺伝子を加えた 6 遺伝子を用いて、今までに報告されていない高い品質のブタ由来人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作成した (図 1 参照)。この細胞を用いて、今まで不明であったブタの多能性に関連する遺伝子の構造および発現情報を明らかにする。我々の作成したブタ由来 iPS 細胞の高い品質は、X 染色体の活性化や内源性テロメラーゼ活性の活性化によって検出されている。我々の作成したブタ iPS 細胞はマウスの胎児由来線維芽細胞 (MEF) 由来のフィーダー上で維持されている。このために様々な遺伝子発現の解析を行う上で、マウス由来の遺伝子がある一定割合で混入してしまう。一方、次世代シーケンサーを使用することによって検出される配列から、cDNA がマウス由来のものであるか、ブタ由来のものであるか判別が可能である。これらの配列をベースに同一サンプル中で遺伝子を分類することは次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq のみが可能であり、マイクロアレイでは不可能である。またブタは近年まで胚性幹細胞 (ES 細胞) が報告されておらず、ブタにおける幹細胞の多能性に関与する cDNA 構造は不明な点が多い。マウスおよびヒトとの相同性によって、Ref-Seq のように予想配列がデータベース上で登録されているが、実際の検体において網羅的にシーケンシングし、確認された研究はない。本研究提案は今までサンプルの制限によって確認できなかったブタの多能性維持に関する遺伝子構造を網羅的に明らかにする。これによってブタ、ヒト、マウスの幹細胞の多能性維持に関する種差が明らかになる可能性がある。またブタの幹細胞の多能性を維持する遺伝子構造が明らかになれば、将来的にブタのゲノム編集技術の応用のための重要な基礎データ

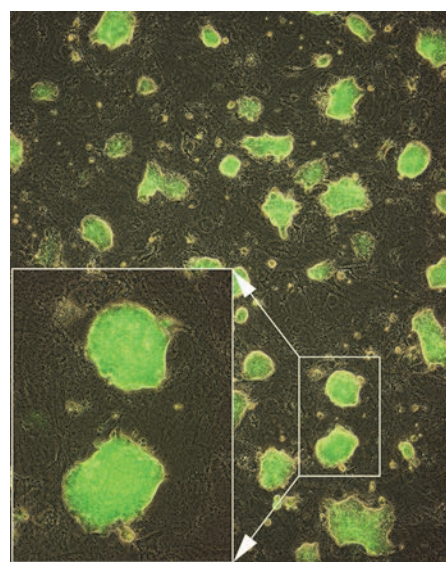


図 1 リプログラミング 6 因子によって作成されたブタ由来 iPS 細胞

ベースの構築に貢献する。本研究はブタの幹細胞の遺伝子を網羅的に解析し、その生物学的特徴を遺伝子の発現および遺伝子構造で明らかにする。

福田智一 (岩手大学理工学部 / 連合農学研究科)

共同研究先: 平野 貴 (農学部)

小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)



## ◆ 大腸菌 *tolC* 変異株が酸感受性を示す機構の解析 ◆

大腸菌の TolC タンパク質は、外膜を貫通するチャンネルタンパク質である。TolC チャンネルは内膜のポンプタンパク質と共役して、外部から流入した薬剤やポルフィリン等の代謝物等の排出システムとして機能する。これまで TolC 依存的排出ポンプは薬剤耐性の面で重要視されてきた。しかし当研究室では、大腸菌 *tolC* 変異株が酸感受性を示すことを見出し、TolC タンパク質が酸耐性能にも関与している可能性を示した。*tolC* 変異株では、pH2.5 に1時間晒した際の生菌率が、野生株の約 1/10 程度になっている。大腸菌は5つの酸耐性システムを有することが知られているが、*tolC* 変異株では Gad (Glutamic acid decarboxylase dependent acid resistance) システムの発現に異常があることが見出された。Gad システムはグルタミン酸の脱炭酸に伴い細胞内 H<sup>+</sup> を消費する機構であり、強酸性の胃酸 (pH1.5 ~ 3.5) に耐える上で必須であることが知られている。Gad システムは GadA/B/C の3つのタンパク質により構成されており、転写アクチベーターである GadE が中心的な制御因子として機能している。*tolC* 変異株では野生株に比べて *gadA* mRNA が顕著に減少していた。さらに、*gadE* mRNA 量を測定したところ、野生株の約 1/5 程度であった。以上の結果より、*tolC* 変異株では *gadE* 遺伝子の転写抑制により、Gad システムの発現が阻害されている可能性が考えられた。Gad システムの発現制御は非常に複雑で、これまでに GadE の上流に 20 以上のタンパク質と 4 つの small non-coding RNA が制御因子として見出されている (図)。そこで本研究では、次世代シーケンサーを用いて、野生株と *tolC* 変異株の mRNA 量を網羅的に解析し、大腸菌 *tolC* 変異株における Gad システムの抑制の原因を特定

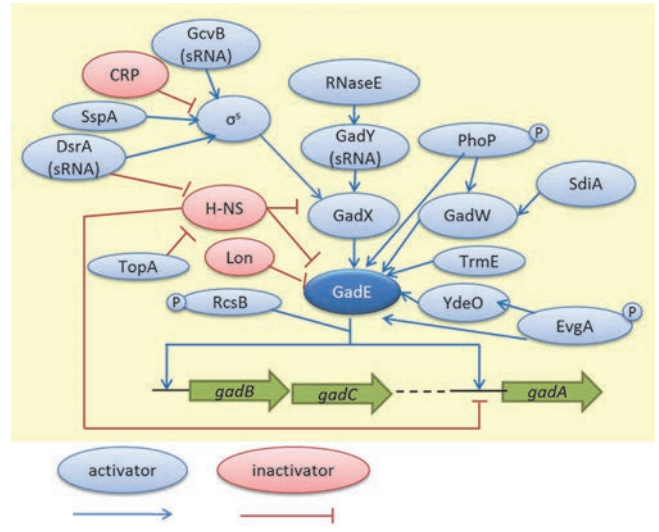


図 Gad システムの発現制御因子

することを目的とした。

和地正明 (東京工業大学生命理工学院)  
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)

## ◆ クロマチンリモデリング因子による雑種強勢発現機構の解明 ◆

動植物では、同一種内のある組合せの両親系統間の交雑によって得られた一代雑種 (F<sub>1</sub>) 個体が、両親の特性よりも優れた形質を示す雑種強勢 (ヘテロシス) という現象が知られている。雑種強勢は、農作物の育種改良 (高収量性等) において重要な遺伝現象であり、現在、数多くの農作物において、一代雑種品種が育成されているが、その分子機構は未だ明らかとなっていない。そこで、我々は、モデル植物であるシロイヌナズナ及び、同じアブラナ科に属し国内で主要な野菜の一つであるハクサイを用いて、雑種強勢の分子機構の解明を目指して研究を進めている。

シロイヌナズナを用いた研究では、Col 系統と C24 系統の F<sub>1</sub> に着目し、今まで、F<sub>1</sub> では、シュート (地上部) において、顕著な雑種強勢が見られ、それは、生育初期 (播種後 4 日以降) から現れることを明らかにした。雑種強勢に関わる遺伝子を同定する為に突然変異体を利用した研究を進めている。Col 系統バックグラウンドと C24 系統バックグラウンドの両者で同一遺伝子の突然変異体が存在すれば、それらを掛け合わせた F<sub>1</sub> の雑種強勢の発現を調べることで、目的遺伝子や目的遺伝子が制御する現象と雑種強勢との関連性を調べることができる。エピジェネティックな制御に関わる遺伝子のうち、24nt-siRNA の生成に関わる Pol IV の構成因子である *NRPD1a* 遺伝子や、クロマチンリモデリング因子で DNA の維持メチル化に関わる *DDM1* 遺伝子について調べた結果、*nprpd1a* では雑種強勢が野生型と同程度に見られたのに対して、*ddm1* では雑種強勢の程度

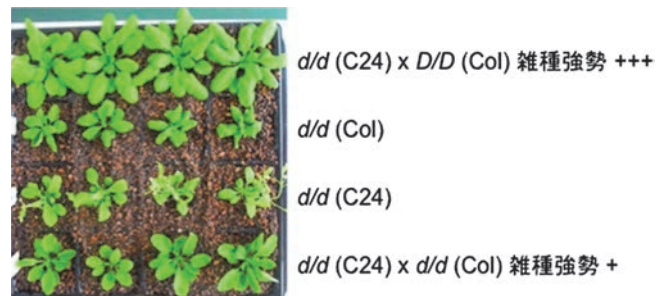


図1 DDM1 の機能喪失により、雑種強勢レベルが低下する。

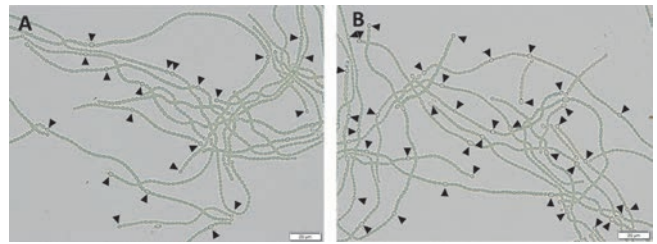
が低下した (図1)。よって、DDM1 によって制御される DNA のメチル化等のエピジェネティックな制御が、雑種強勢を安定的に発揮させるのに重要である可能性が示唆された。現在、DDM1 の機能と雑種強勢との関連性を明らかにするため、エピゲノム解析等を実施している。

藤本 龍 (神戸大学大学院農学研究科)  
関 原明 (理化学研究所環境資源科学センター)  
宅野将平 (総合研究大学院大学先端科学研究科)  
清水元樹 (岩手生物工学研究所ゲノム育種研究部)  
共同研究先: 小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 糸状性シアノバクテリア *Anabaena* sp. PCC 7120 における 新規酸素センサーの探索 ◆

糸状性シアノバクテリアの代表種である *Anabaena* sp. PCC 7120 では、窒素欠乏条件になると、ヘテロシストと呼ばれる細胞を栄養細胞から分化させ、窒素固定を行うことが知られている。窒素固定反応を担うニトロゲナーゼは酸素感受性であることから、ヘテロシストでは光合成活性が減少し、呼吸活性が増加するが、それに加え、細胞外からの酸素の流入を阻止するためのバリアの形成が見られる。このバリアは超長鎖脂肪アルコールにグルコースが結合した糖脂質 (Hgl: heterocyst specific glycolipid) で構成されており、バリアの形成が阻害されると、窒素固定反応が進まないことがわかっていた。つまり、バリア形成はヘテロシスト内に低酸素状態に保ち、窒素固定反応を円滑に進めるのに必須である。そこで、通常よりも酸素濃度が濃くなった場合、バリア形成にどのような影響がみられるかを調べた。

これまでに、酸素濃度の高い密閉容器内でヘテロシスト形成能を持つシアノバクテリアを生育すると、ヘテロシストの Hgl バリア層が肥厚することが報告されていた。そこで、*Anabaena* sp. PCC 7120 を用い、通気培養に利用する気体中に含まれる酸素濃度を上げたところ、高酸素条件で培養した株では生育速度に大きな影響は見られないものの、ヘテロシスト形成頻度の上昇がみられた (およそ 1.5 倍、図参照)。一方、脂質組成を調べたところ、およそ 3.5 倍の Hgl が蓄積していたことから、ヘ



酸素濃度によるヘテロシスト形成頻度の変化 (A) 通常培養条件 (21% O<sub>2</sub>) (B) 高酸素条件 (42% O<sub>2</sub>)。矢頭はヘテロシストを示す。

テロシスト当たりの Hgl 量が増加していることがわかった。近年、ヘテロシスト形成と Hgl 合成はそれぞれ別の経路で制御されていることがわかってきており、今回見られた高酸素条件での現象は、未知の酸素センサーによって制御されていることが期待された。本プロジェクトでは、この酸素センサーを明らかにすることで、ヘテロシスト形成メカニズムのバリア形成制御機構の解明を目指している。

粟井光一郎 (静岡大学大学院理学領域)  
共同研究先: 渡辺 智 (応用生物科学部)  
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 高酸度生成・酢酸菌の高温適応育種にもなう 遺伝子変異と遺伝子発現との相関 ◆

酢酸菌には「酸化発酵」と言われる特徴的な生理学的特性があり、その特性を利用した多くの産業が展開されている。なかでも「酢酸発酵」は食酢醸造に利用されている代表的な酢酸菌を利用する発酵である。私達は、比較的容易にゲノム変異を起こすことができる酢酸菌の特性を利用して、実験室進化に基づく適応育種、特に耐熱化育種、を進めている。今回は、伝統的な米酢発酵槽から単離された高酸度生成・酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株を用いた耐熱化育種について、紹介する。

NBRC3288 株を酢酸発酵条件下かつ生育限界温度下で継代培養を繰り返すことによって、最終的に ITO-3 株を得た (図 1A)。適応育種の途中で単離された ITO-1、ITO-2 株を含め、その耐熱性と酢酸発酵能を親株と比較したところ、ITO-1 は 34°C で、ITO-3 は 35°C で、顕著な生育の上昇が見られた (図 1B)。ゲノムリシークエンスによって、適応育種株の変異箇所を全ゲノムレベルで解析した結果、ITO-3 株には 8 箇所の変異が見出された。これらの変異のうち、3 箇所が ITO-1 で、6 箇所が ITO-2 で見出され、これらの塩基置換の蓄積によって耐熱性と発酵能が向上したと考えられた。このうち、適応初期 (ITO-1) で変異している 3 つの遺伝子については、その機能と耐熱化への寄与についての実証的な検証を進めている。しかしながら、蓄積した遺伝子変異をもつ適応育種株の耐熱性と発酵能の向上に寄与する遺伝子については未だ不明である。そこで、Illumina 社のゲノムシークエンサを利用したトランスクリプトーム解析を行い、適応変異遺伝子と遺伝子発現との相関解明を目指している。継代培養を繰り返すことによって得られた適応育種変異株と野生株との遺伝子発現の比較を行うことで、酢酸発酵能と耐熱性の原理解明が進むことが期待される。

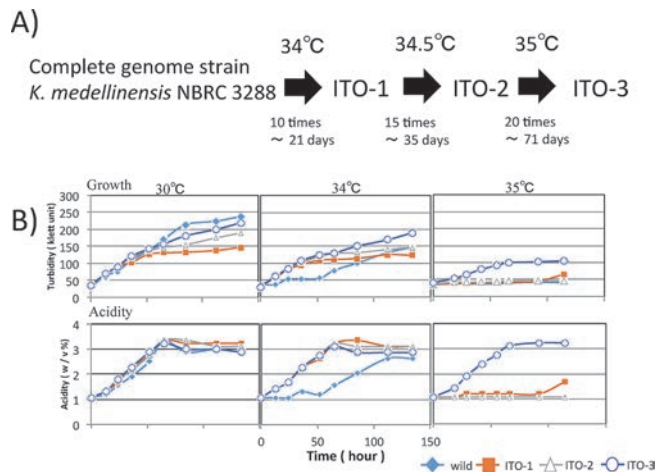


図 1 酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株からの高温適応株 ITO-1、2、3 株の連続的適応育種 (A) と育種株の各温度での生育及び酢酸発酵能の比較 (B)。

松下一信 (山崎大学大学院創成科学研究科中高温微生物研究センター)  
松谷峰之介 (山崎大学大学院創成科学研究科)  
片岡尚也 (山崎大学大学院創成科学研究科中高温微生物研究センター)  
薬師寿治 (山崎大学大学院創成科学研究科中高温微生物研究センター)  
共同研究先: 貝沼章子 (応用生物科学部)  
兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ 異種細菌株共存による環境汚染化合物の効率的分解： トランスクリプトーム解析に基づく効率的分解機構の解明 ◆

有害化合物汚染環境の微生物による浄化をめざし、当該物質分解細菌株が数多く単離され、詳細な実験室系解析がなされてきた。しかし、複合生物系の実汚染土壌では2種以上の特定細菌関与による効率的汚染物質分解が推定される例も少なくないが、その詳細は不明である。代表的汚染化合物フェナントレン(Phn)を含む有害化合物汚染土壌のPhnによる集積培養で、*Mycobacterium* 属と *Burkholderia* 属の細菌を含む数種細菌群で構成されるPhn分解コンソーシアム MixEPa4 を得た。そして、Phn完全分解能発揮 *Mycobacterium* 属 EPa45 株と非分解 *Burkholderia* 属 Bscr1W 株を含む MixEPa4 での効率的Phn分解にはEPa45株のほか共存非分解菌株の重要性が示唆できた。さらに、EPa45株とBscr1W株の単独並びに共培養解析で、EPa45株はPhnで生育阻害を受けるが、本阻害はBscr1W株共存で緩和されるSuppression of Growth Inhibition (SGI)現象(図1)を見出した。また、汚染土壌非由来の別Phn分解 *Mycobacterium* 属株もPhnで生育阻害され、多様なPhn非分解 *Burkholderia* 属細菌株(例えば、*B. multivorans* ATCC 17616株)もSGI現象を示す一般性も見出した。EPa45株とATCC 17616株を用いて、現在SGI現象の詳細を種々検討している。この中でも、Phn添加で転写量が大幅変動するEPa45株遺伝子群、そして、EPa45株とATCC 17616株の共存時にPhn添加で転写量が大幅変動する両株遺伝子群のRNA-seq解析による提示は、PhnによるEPa45株生育阻害とATCC 17616株のSGI効果発揮に関与する遺伝子群の同定に繋がると期待している。

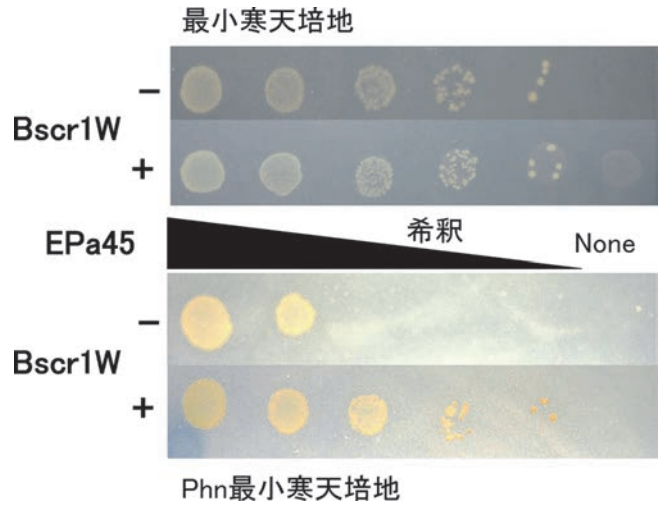


図1 Phn存在でのEPa45株生育阻害とBscr1W株による阻害緩和。EPa45株を10倍ずつ希釈接種(左→右)。+:一定数の *Burkholderia* Bscr1W株をEPa45株接種場所に接種。 -: Bscr1W株を接種せず。Phn最小寒天培地でBscr1W株のコロニーは目視できない。

津田雅孝(東北大学大学院生命科学研究所)  
共同研究先:吉川博文(応用生物科学部)  
石毛太郎(生物資源ゲノム解析センター)

## ◆ トランスクリプトーム解析から推察される オオハマニンニク染色体の進化的起源 ◆

野生植物には、様々な厳しい環境で生育するものがあり、その遺伝子資源を作物開発に用いることは重要である。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とが知られている。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傾向にある重要な形質である。オオハマニンニクとコムギとの分岐年代は約1000万年前と、近縁種であるため、属間交雑が可能であり、オオハマニンニクの染色体を1対保有するコムギ系統(染色体添加系統)が開発されたている。これらの染色体添加系統はコムギとほぼ同等の形態であるが、オオハマニンニクの性質の一部を持ち合わせており、乾燥耐性、高リン酸吸収性、アルミニウム耐性、高温耐性などの有用形質が付与されていた。これは、オオ

ハマニンニクにコムギに有用形質を与えることができる遺伝子を保有していることを示している。オオハマニンニクが属するハマニンニク属は、異質倍数性であるが、*Psathyrostachys* のゲノムからなる7個の染色体と、起源が不明な麦類のゲノムからなる7個の染色体から成り立つ。そこで、ハマニンニク属の進化的起源を明らかにするために、既に構築しているオオハマニンニクのA,E,F,I,J,K,L,N染色体添加コムギ系統、および、複数の麦類のトランスクリプトーム解析から、A,E,F,I,J,K,Nのオオハマニンニクの各染色体が、どのコムギ類に進化的な由来をもつかを明らかにすることを目指す。

花田耕介(九州工業大学)  
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)

## ◆ 誘導発現型遺伝子組換え植物を用いた ウイルス病害発症機構の解明 ◆

植物病害は農業生産の主要な減収要因であり、特にウイルス病は有効な防除薬剤がないことからその防除が世界的に重要な課題となっている。植物ウイルス病の防除には抵抗性品種が広く用いられているが、ウイルスの変異によって抵抗性が打破されるケースが散見され、これに代わる新たな防除戦略が望まれる。その候補として病原体が増殖していても病徴を全く示さないか、あるいはごく軽微な病徴しか示さない「トレランス（狭義の耐病性）」の利用が考えられる。本研究はウイルスの病原性関連因子を人為的に誘導可能なプロモーターの支配下に発現する遺伝子組換え植物を用いて病害発症の分子機構を明らかにすることによって、トレランス作物開発の基盤を形成することを目的とする。カリフラワーモザイクウイルスの病原性因子である Tav タンパク質を発現させたタバコでは、発現誘導処理の2日後にはクロロフィル量の有意な低下が認められ、7日後にはモザイク様の黄化症状が観察された。このことからこの植物はウイルス病における黄化発症機構を研究する良いモデルになると考えられる。遺伝子発現解析、および Tav の欠失変異体を用いた解析から、Tav の病原性因子機能に対する植物の応答が黄化発症に関与することが示唆された。一方、シロイヌナズナでは Tav タンパク質発現誘導後に著しい成長抑制が認められ、ウイルス病における矮化発症のモデルとして有用であると考えられる。また、キュウリモザイクウイルスの Y サテライト RNA による黄化発症、およびモモ潜在モザイクウイルスによる退緑が、抗ウイルス/ウイルス siRNA を介した葉緑体タンパク質遺伝子のサイレンシングに起因することが報告されたのを受け、それらの標的遺伝子に対する人工マイクロ RNA やヘアピン RNA を誘導発現する遺伝子組換えタバコを作成し、



図1 Tavの発現によってモザイク様の黄化症状を呈した遺伝子組換えタバコ。

退緑・黄化症状を誘導できることを明らかにした。これらモデル系について網羅的遺伝子発現解析等を行い、ウイルス病発症に与る分子機構を明らかにしたい。

小林括平（愛媛大学大学院農学研究科）  
共同研究先：坂本 光（生物産業学部）  
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

## ◆ イネの減数分裂を促進するエピジェネティック制御機構の解明 ◆

減数分裂は、2回の連続した分裂により半数性細胞を作り出す特殊な細胞分裂です。その初期過程では、相同染色体認識・対合を介して、染色体異常や異種染色体の排除などゲノム安定性維持に寄与する一方で、減数分裂組み換えによるゲノム多様化にも貢献しており、この性質は交雑育種にも広く利用されています。私たちは減数分裂を促進する遺伝的機構について、単子葉モデル植物であるイネを用いて研究しています。

本共同研究では、相同染色体の対合・組み換えを含む減数分裂初期過程の開始・促進メカニズムを明らかにするため、同過程に重要な因子である MEL2、MEL1、TTM の3つの蛋白質に着目しました。MEL1は減数分裂染色体のエピジェネティックな修飾変化に関与する small RNA 結合蛋白質、TTMは減数分裂染色体の正常な凝縮などを促進する転写因子です。減数分裂細胞で特異的に発現する MEL1とは異なり、TTMは減数分裂細胞では発現せず、隣接する葯の体細胞組織（タペート）でのみ発現します。MEL2は減数分裂の開始に重要な RNA 結合蛋白質ですが、興味深いことに減数分裂細胞とタペート細胞の両方で発現します。すなわち、雄性減数分裂細胞とタペート細胞との間に何らかのシグナル伝達が介在するのは明らかです（図1）。実際に、TTM 依存的にタペートで生産される small RNA の一部が、細胞間移動により減数分裂細胞の MEL1 と結合する可能性を示唆する結果が得られています。

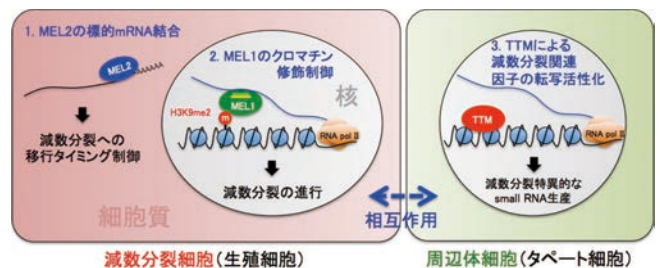


図1 減数分裂期におけるイネ MEL2・MEL1・TTM の細胞内局在性と役割

上記の知見を踏まえて本共同研究では、1) MEL2の制御を受ける標的 mRNA の同定、(2) MEL1が減数分裂核内で標的とする DNA 配列の同定、(3) TTM 転写因子の下流遺伝子の同定を目指し、生物資源ゲノム解析拠点の支援により、mRNA-seq、クロマチン免疫沈降 (ChIP)-seq、RNA IP-seq 解析を行っています。

野々村 賢一（国立遺伝学研究所 実験園場）  
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）

## ◆ ストレス耐性の向上した耐熱性酵母のゲノム内変異解析 ◆

我々は、現在 30℃ 付近あるいはそれ以下で実施されている発酵による物質生産を 40℃ 程度の高温で実施する高温発酵を提案しています。高温発酵は、冷却エネルギー削減、発酵運転の安定化及び簡素化、発酵の迅速化、雑菌混入の防止などのメリットが見込まれ、省エネルギー及び CO<sub>2</sub> の排出削減を可能にする次世代発酵技術になると期待されています。この高温発酵を実施するには、耐熱性を有する発酵微生物が必要であり、我々は耐熱性酵母の一つである *Kluyveromyces marxianus* に着目し、この酵母の育種とそのストレス耐性機構の理解を目指しています(図 1)。この酵母は高温において、一般に利用されている酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と比べエタノール生産性に優れており(図 2)、非常に有望です。しかし、酢酸、エタノールそしてグルコースに対する耐性がそれほど高くないことから、それぞれの物質に対して高い耐性をもつ菌株の獲得もしくは開発が実際に高温発酵を実現するために求められています。

近年、適応育種という方法がゲノム解析が行えるようになったことで基礎研究を含めて適用範囲が広がってきました。具体的には、あるストレス環境下に菌株をさらしておくと、ゲノム内の変異が蓄積し、その変異によって進化した細胞が獲得できるという方法です。ゲノム解析により、ストレス耐性化機構の理解が可能となっており、この知見を活かせばさらなる有用株の開発が可能です。

そこで、本研究では *K. marxianus* DMKU3-1042 から各種ストレス耐性株の獲得とそれぞれのゲノム内変異の解析を行うことにより、発酵現場で高温発酵の実施が可能な菌株を開発するとともに、*K. marxianus* のストレス耐性向上機構を明らかにすることに取り組みます。本研究により、非常にストレス耐性に優れた *K. marxianus* を得ることができれば、高温発酵によるエタノール発酵の実施に目処がただけでなく、さらに有用な菌株の開発が期待されます。

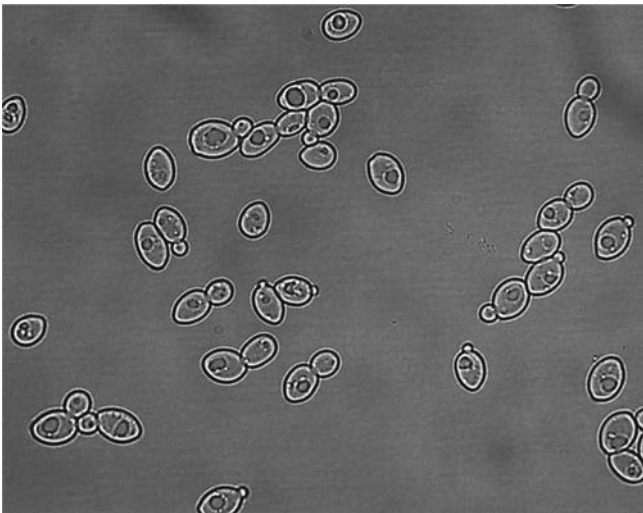


図 1 耐熱性酵母 *K. marxianus*  
高温での生育と様々な糖の資化性を有する

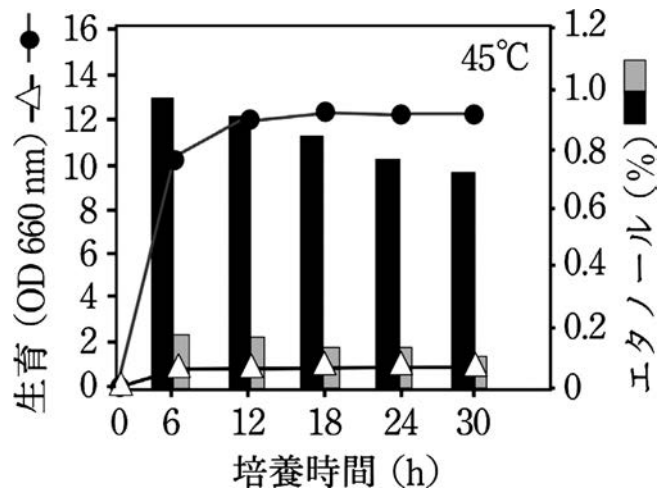


図 2 高温 (45℃) での *K. marxianus* (●、■) と *S. cerevisiae* (△、□) の生育とエタノール生産

高坂智之 (山口大学大学院創成科学研究科)  
山田 守 (山口大学大学院創成科学研究科)  
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)

## ◆ 定常期以降の大腸菌の生存機構の解明 ◆

自然環境下において生存する微生物は、刻々と変わる状況に即座に応答し細胞内の状態を変化させることにより生存しています。この環境応答のメカニズムとして、タンパク質の発現や構成を変化させることはそれほど想像に難くないですが、実際の微生物は集団の遺伝的多様性を増加させて生き延びていることがわかってきました。つまり、微生物には遺伝情報を変化させ、さらに集団を環境に合わせて維持していく機構が備わっていることとなります。モデル微生物である大腸菌を栄養培地で培養した際、新たな栄養源を追加せずとも、細胞が数年間生き残ることが知られています(図1)。また、大腸菌は死滅期を経た後長期定常期と呼ばれる生育期に入り、その期間においては生菌数が大きく変動していること、死滅期以降で変異率が上昇すること、そして、野生株に対して生育が優位になった菌株 GASP (Growth Advantage in Stationary Phase: 定常期生育優位株) が出現することが明らかになっています(図1)。この GASP 株のゲノムには変異が導入されており、その変異の一つは定常期に活性化して細胞のストレスやエネルギー枯渇に対する耐性を強化する遺伝子 (*rpoS*) に生じていることがわかっています。また、このような GASP 株の出現は連続して起こり、次の世代の GASP 株が培養液の中で出現すると考えられています(図1)。つまり大腸菌は、遺伝的変異が導入された細胞が

次々と入れ替わり新しい集団が出現することで長期定常期を生き延びていると考えられているのです。しかし、*rpoS* 以外の遺伝子への変異はないのか、変異を増加させる機構はどうなっているのかなど多くの疑問がまだ残されています。

一方、大腸菌の死滅には温度が関係することも知られています。我々の解析では、36℃や37℃だと長期に生存しますが、47℃ではすぐに死滅してしまいます。つまり熱は細胞の生存戦略に大きな影響を与えることが示唆されています。我々は、長期定常期における変異の多様性を明らかにしたいと考えており、さらには高温での生存を可能にする変異もその中に含まれていると推察しています。

そこで本研究では、まず死滅期から長期定常期において生存する大腸菌集団の遺伝的多様性を分析することで、GASP 株の検出と新規なゲノムへの変異を明らかにします。一方、微生物の死滅期において導入される変異によって、より高温で生き残る菌株が出現するのか、さらにはどのような遺伝子に変異が導入されているかを分析します。これらの解析により、大腸菌がもつ生存戦略と遺伝的な変化の関係性、さらにはその多様性が明らかとなり、そして、食品などの微生物残存性に対抗する手法の発見や、発酵微生物分野での菌株の開発やその制御を行う上での重要な知見になると期待しています。

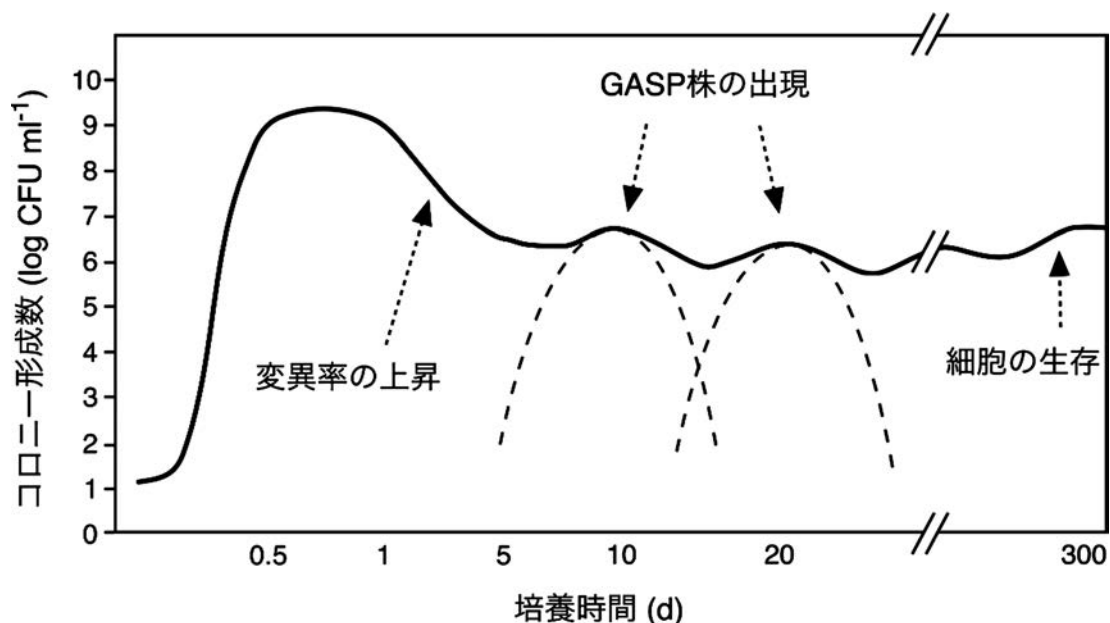


図1 大腸菌の生存とイベント

生存数の指標であるコロニー形成数は、定常期後に劇的に減少し、その際にゲノム内の変異数が増加すると考えられている。GASP は点線に示すように細胞数が変化していると考えられており、細胞は長期的に生存する。

山田 守 (山口大学大学院創成科学研究科)  
 高坂智之 (山口大学大学院創成科学研究科)  
 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)

## ◆ トンボの翅色形成の分子基盤 ◆

トンボは、チョウと並んで体色の鮮やかな昆虫として知られており、基本的に視覚で相手を認識することから、体色の重要性は生態学的、行動学的な側面から研究されてきた。また、種内で体色多型の見られる種も多く、多くの場合はメスに2型が存在し、片方がオスに擬態していると考えられている(図1)。一方で、トンボの体色形成や体色多型に関与する分子基盤は、ほとんど解明されていない。本研究課題では、チョウトンボやコフキトンボなど翅色多型の見られる種を用いて、翅の模様ごとのRNA-seq解析から、翅色形成、翅色多型を産み出すメカニズムを解明することを目指している。電子顕微鏡観察の結果から、チョウトンボでは、翅の多層膜構造の違いが、青紫色と緑色の翅色多型の原因となっていることが考えられていた。この原因を産み出すメカニズムを調べるため、チョウトンボのオス、通常メス、オス型メスの間でRNAseq解析により網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、オス型メスの翅で特異的に発現する遺伝子を1種類同定することに成功した。興味深いことに、この遺伝子は通常メスのゲノムには存在せず、オス型メスのみが保有していることが明らかになった。また、エレクトロポレーション法を併用したRNAi法によって、トンボの遺伝子の機能を局所的に阻害する系の立ち上げに成功し(論文投稿中)、この系を用いた解析結果から、今回チョウトンボで見つかった遺伝子が、翅色多型の原因遺伝子であることが強く示唆



図1 チョウトンボとコフキトンボの翅色多型

された(論文執筆中)。さらに、コフキトンボにおいては、翅の斑紋と強い相関のあるメラニン合成遺伝子を複数見出すことに成功しており、これらの遺伝子が翅色多型に関与していることが考えられた。

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)

## ◆ シロイヌナズナ自然変異系統の転写開始点解析 ◆

転写開始点情報はプロモーター構造を認識する上で不可欠な情報であり、完全長 cDNA の 5' 末端領域 50bp 程度をランダムにシーケンシングすることで得られる。岐阜大山本らはこれまでこの情報をもとに、プロモーター構成配列(例えば TATA ボックスや転写制御配列など)の *ab initio* 抽出、プロモーター構造認識、マイクロアレイデータをもとにした転写制御配列予測とその実証、などの解析を方法論の開発と並行して進めてきた。

今回の共同研究においては、南ヨーロッパ、中央アジアより採集されたシロイヌナズナの野生型アクセッション4種類を用いて、プロモーター進化についての解析を行う。用いる系統は、申請者のこれまでの研究により、遺伝的背景が近いが強光・低温ストレス耐性及び強光・低温ストレスに対する複数の遺伝子発現応答に大きな違いが見られる、ということが明らかとなっているペアを2通り(2×2=4)選んだものである。選ばれた4系統はすべて全ゲノムリシーケンシングが完了しており(Cao

et al, Nat. Genet. 2011)、TSS タグのマッピングが可能であるだけでなく、プロモーター配列の配列多型と発現多型、転写開始のポジションの多型との関連解析を行うことが可能である。

上記4系統の転写開始点情報を用いて、1) プロモーター配列と発現量・転写開始点との相関解析、2) 低温・強光ストレス応答を支配する転写ネットワークの部分的同定、を試みる。前例のない新規の取り組みであり、必要となるバイオインフォマティクスツールを整備しつつ、実際にどこまで解明できるのかを明らかにしていきたい。全く同じアプローチがイネやダイズ、トマトなどにも適用可能であり、作物の品種間差の解明へ向けて応用することを期待している。

山本義治 (岐阜大学応用生物科学部)  
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)

## ◆ トランスクリプトーム解析により見えてきたカルシウム結合タンパク質 CAS を介した葉緑体による CO<sub>2</sub> 濃縮の制御機構 ◆

植物にとって光合成に必須な CO<sub>2</sub> を効率よく細胞内に取り込むことは、その生存に必須である。陸上植物は大気中の CO<sub>2</sub> を拡散によって取り込み利用しているが、水中に生息する藻類は CO<sub>2</sub> の拡散速度が大気中の 10,000 分の 1 と低い環境で光合成する必要がある。CO<sub>2</sub> は水と反応して重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) の形で多く存在することからも、藻類は CO<sub>2</sub> 欠乏環境に曝されており、その環境に順化するために、能動的な HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 輸送を伴う無機炭素濃縮機構 (Carbon-Concentrating Mechanism : CCM) を持つ。これまで我々は、CCM の分子機構を解明するために、緑藻クラミドモナスをモデル生物として、CO<sub>2</sub> 欠乏応答性遺伝子を「手作りのメンブレン cDNA マクロアレイ」を用いたトランスクリプトーム解析で同定し、その中に HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 輸送体の候補因子を見出した。さらに HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 輸送体の候補因子の変異株を解析することで、細胞膜に局在する ABC 輸送体 HLA3 と葉緑体包膜に局在するアニオンチャネル LCIA が協調して HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 輸送に関わることを明らかにした (Yamano et al. PNAS 2015)。また、低 CO<sub>2</sub> 条件下で生育が遅延する高 CO<sub>2</sub> 要求性変異株の大規模スクリーニングにより、HLA3 と LCIA の蓄積が低下した変異株 H82 を単離し (Wang et al. Photosynth Res 2014)、その変異原因遺伝子がシロイヌナズナで発見された葉緑体チラコイド膜に局在するカルシウム結合タンパク質 CAS のオルソログ遺伝子であることを示した (Wang et al. PNAS 2016)。今回、当支援による RNA-seq 解析によって、CAS が HLA3 と LCIA を含む 44 個の低 CO<sub>2</sub> 誘導性遺伝子を制御することを明らかにし、核内における CCM 関連遺伝子の発現が CAS を介した葉緑体から核へのレトログレードシグナルによって維持されるモデルを提唱した (図 1, Wang et al. PNAS 113: 12586, 2016)。今後は、このレトログレードシグナルの実態や CAS の元で働く因子の機能を解明することで、藻類の光合成維持に必要な CCM

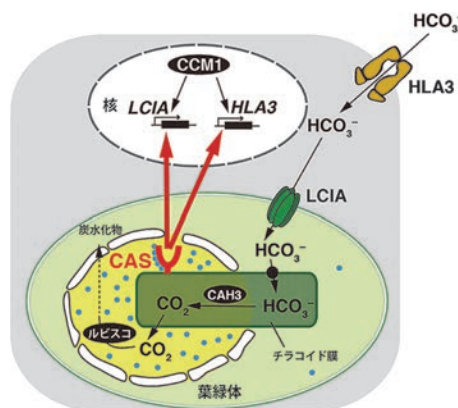


図 1 緑藻クラミドモナスの CCM 制御機構のモデル。細胞外の重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) は、チラコイド膜内腔に輸送された後に、脱水反応で CO<sub>2</sub> に変換されて固定酵素 (ルビスコ) 付近に濃縮される。核にコードされる 2 つの HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 輸送体遺伝子 HLA3 と LCIA の発現は、CCM のマスター調節因子 CCM1 によって CO<sub>2</sub> 欠乏条件下で誘導される。ただし、その mRNA の維持には、葉緑体チラコイド膜に局在するカルシウム結合タンパク質 CAS から核へのレトログレードシグナル (赤矢印) が必要であることが判明した。青丸はカルシウムイオンを示す。

の制御機構の全貌が明らかになることが期待される。

福澤秀哉 (京都大学大学院生命科学研究所)  
 山野隆志 (京都大学大学院生命科学研究所)  
 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)

## ◆ シアノバクテリアにおける窒素固定能獲得機構 ◆

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。ある種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。数百の細胞が一行につながった *Anabaena* 属のシアノバクテリアは、一部の細胞を窒素固定に特殊化した細胞 (ヘテロシスト) へと分化させ、窒素固定を行う。*Anabaena azollae* はアカウキサ (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。アゾラ-*Anabaena* 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。このように窒素固定型のシアノバクテリアは生態学的に重要であるだけでなく、農業にも利用される有用微生物である。

本研究では、シアノバクテリアが自律的に窒素固定を行うために必要な遺伝子群およびその制御機構の解明を目指す。窒素固定を触媒する酵素ニトロゲナーゼは、極めて酸素に弱い酵素である。酸素発生型の光合成を行うシアノバクテリアは、窒素固定と光合成という相容れない 2 つの反応を両立させるための特殊なシステムを備えていると考えられる。窒素固定に特殊化した細胞であるヘテロシストはその一例である。本研究では、様々なシアノバクテリアを用いて、窒素固定能の発現制御機構を比較解析する。それらの解析により、シアノバクテリアが窒素固定能を発現するのに必須の要素を明らかにすることを目指す。

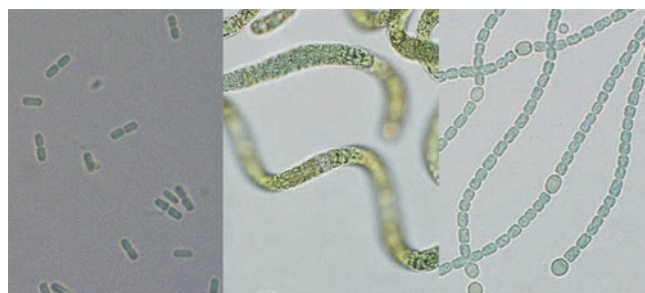


図 本研究で実験材料として用いるシアノバクテリア  
 (左) *Synechococcus* sp. PCC 7002、(中) *Arthrospira platensis* NIES-39、(右) *Anabaena* sp. PCC 7120

す。これらの結果は、シアノバクテリアを始めとする光合成生物に窒素固定能を付与する戦略の構築につながると期待できる。

得平茂樹 (首都大学東京)  
 共同研究先: 渡辺 智 (応用生物科学部)  
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)



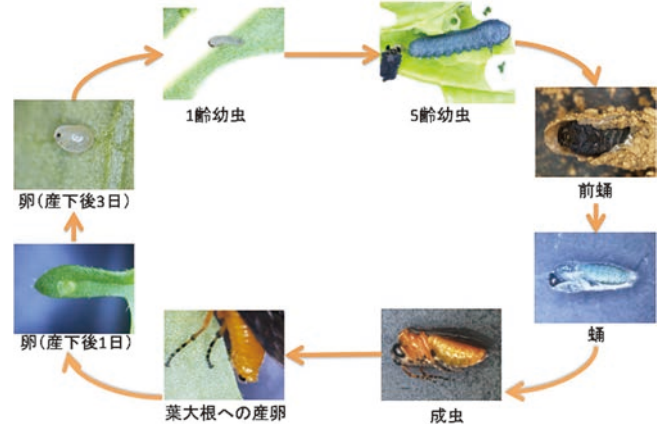
## ◆ ハバチ類の新規性決定遺伝子の同定とその害虫防除法への応用 ◆

ハバチ類はミツバチやスズメバチと同じ膜翅目昆虫に属するが、その幼虫はチョウやガの幼虫に酷似したイモムシ型で、園芸植物や農作物の葉を食害する代表的な農業害虫として数えられている。春から秋にかけて連続的に発生し、時折大発生することで農作物や重要樹種が深刻な被害を受けることもある。

性と生殖は密接に関連しており、性決定遺伝子の発現を人為的に制御することができれば、対象害虫の発生を防除することも可能となる。この点に着目し、本研究ではハバチ類のモデル昆虫としてカブラハバチを実験材料として供試し、この昆虫種における性決定遺伝子の同定とその機能解析を研究の目的とした。さらに、これらの性決定遺伝子が創農薬ターゲットとしてのポテンシャルをもつか、また不妊虫放飼法や優性致死系統放飼法 (RIDL 法) へ応用利用可能か否かという点について評価することを究極的な目標とした。

性決定遺伝子は、一般に個体の性が決まる胚発生の初期に雌(もしくは雄)でのみ高発現する。したがって、RNA-seq により性決定時期における雌雄の遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較し、性特異的に発現する遺伝子を探し出すことで性決定遺伝子として有力な候補遺伝子を見つけ出すことができる。我々はカブラハバチの受精後の性決定時期を突き止めており、この時期の雌雄で特異的に発現する遺伝子の中から性決定遺伝子の候補を選び出すことが本研究の狙いである。さらに、それらの候補遺伝子について RNAi によるノックダウンを行い、性転換などの表現型が得られるかを確認することで性決定能をも

カブラハバチ (*Athalia rosae*) のライフサイクル



つ遺伝子を特定する。

鈴木雅京 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)

峰翔太郎 (東京大学大学院新領域創成科学研究科)

畠山正統 (農業・食品産業技術総合研究機構)

共同研究先: 上原 巖 (地域環境科学部)

内山博允 (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主要構成組織の分子マーカーの探査 ◆

タツノオトシゴのオスは、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。タツノオトシゴの成長に伴って育児嚢がどのようにして形成されるのかを明らかにすることを目的に、私たちは種々の発達段階のオスの育児嚢を観察しました。まず、育児嚢の組織学的な特徴を理解するために、繁殖期の成熟したポットベリード・シーホースの育児嚢の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色、マッソントリクローム (MT) 染色、鍍銀染色を行いました。その結果、真皮層は MT 染色で青く染まる膠原線維で主に構成され、胎盤様構造は鍍銀染色で黒色に染色される細網線維で主に構成されることが分かりました。さらに、体表上皮は粘液腺が多数観察されたのに対し、育児嚢の内腔上皮には粘液腺は見られず、形態が異なっていることが分かりました。次に、育児嚢の発達過程を通して形態観察した結果、腹部の表皮が盛り上がるようにして育児嚢が形成されてくることが分かりました。さらに、形成初期の育児嚢の上皮細胞は育児嚢の内腔と体表には違いがみられず、どちらにも多数の粘液腺が観察されました。私たちはすでに育児嚢で発現している遺伝子をいくつか見出しています。その中から C 型レクチン遺伝子 (CTL1, 2) の局在を調べてみると、成熟個体の育児嚢では CTL1 は体表と内腔上皮どちらにも局在しているのに対し、CTL2 は内腔上皮特異的に局在することが分かりました。そこで、形成初期の育児嚢で CTL1 と CTL2 の局在を調べてみると、CTL1 は育児嚢内腔および体

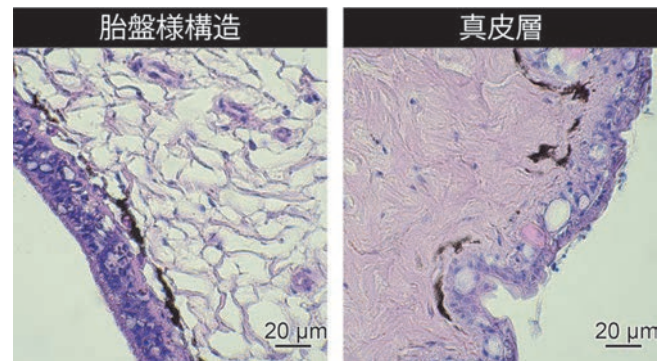


図 HE 染色による胎盤様構造と真皮層の組織観察

表の上皮で検出されるが、CTL2 は検出されませんでした。これらの結果から、育児嚢の形成に伴って内腔は体表皮から内腔特異的な上皮に置き換わることが示唆されます。今後は育児嚢の主要構成組織の分子マーカーを用いて育児嚢の形成過程を明らかにしていきたいと考えています。

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)

## ◆ 作物の成長段階の移行タイミングを制御し 生産性を向上するための分子基盤構築 ◆

植物は遺伝子発現パターンを適切に変化させながら、発芽から結実までの発生段階を経る。発生段階が切り替わるタイミングは植物の形態に影響する重要な要因である。そこで本研究では、イネの葉と穂を研究対象にし、発生プログラム進行と形態とをつなぐ遺伝子を明らかにすることを目的とする。

イネの葉は基部の葉鞘と先端側の葉身に分けられる。葉鞘と葉身は異なる機能を果たしており、葉鞘と葉身の比率は成長に従い適切に制御される(図1)。イネでは、発芽後最初に展開する第1葉は葉鞘だけからなり、その後展開する葉では葉身の割合が徐々に増す。私たちは、成長段階に合わせてタイミングよく葉鞘/葉身の割合を変化させるメカニズムに興味をもち、これまでに葉鞘/葉身比決定の鍵遺伝子候補を見出した。そこで本

課題では、その下流で働く遺伝子群を単離し葉鞘/葉身決定遺伝子ネットワークの全貌の理解をめざしている。穂形成時にはまず穂の骨格となる枝分かれ構造が形成され、それぞれの枝に花が形成され結実する。したがって、枝分かれ形成から花芽形成へと切り替わるタイミングが穂の枝分かれパターンを決定し、穂の形態を決定する。TAWAWA1 (TAW1) 遺伝子は穂の枝分かれを促進する遺伝子である。TAW1の発現が上昇した優性変異体では穂の枝分かれが増加し一穂の粒数が増加する(図2)。TAW1は転写因子をコードしており、TAW1の機能を分子レベルで理解するためにはTAW1の直接の標的遺伝子を解明することが不可欠である。

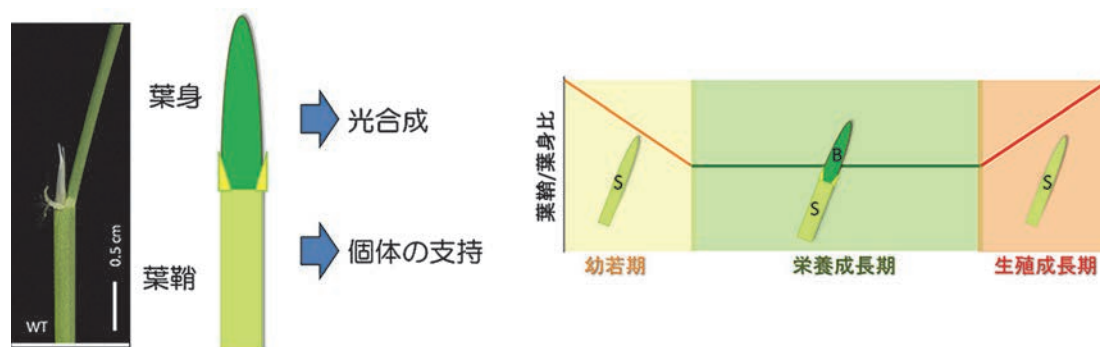


図1 イネの葉では先端側に葉身が、基部側に葉鞘が形成される(左)。葉鞘・葉身比は成長段階に応じて変化する。



◀図2 野生型(左)と *taw1-D2* 変異体(右)の穂。  
*taw1-D2* 変異体では TAW1 遺伝子の発現が上昇しており、その結果、枝分かれが増え、一穂粒数も増加する。

経塚淳子(東北大学生命科学研究科)  
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)

## ◆ Resequencing 法による秋田県在来ダイコンの着色遺伝子の単離 ◆

秋田県農業試験場は、根色が紫色の辛味ダイコン‘あきたおにしぼり紫’を育成した。‘あきたおにしぼり紫’は、秋田県伝統野菜の一つ‘松館しぼり’の集団から選抜した個体由来するF<sub>1</sub>品種で、生育が旺盛で形質の斉一性に優れるものの、数%の頻度で根色が白色の個体が混在することが分かっている。

同様の現象は市販の着色品種においてもみられるが、頻度がそれほど高くないため問題にはならないようである。例えば、中国の原産の根色が白色で根内部が赤色の‘紅心大根’では根色と根内部が白色の個体が現れる。また、松永種苗育成の根色と内部が赤色の‘紅くるり大根’においても白色の個体が現れる(写真1)。この着色品種から現れた根色が白色の個体を人為的に自家受粉して採種し、次代を栽培するとそれらの根色は全て白色であった。‘紅心大根’と‘紅くるり大根’が持つ根色の赤色の発現制御に関わる遺伝子が同じ遺伝子座であるかは未検定のため不明であるが、ともにトランスポゾンが転移したこ

とが原因とみられる。さらに、‘あきたおにしぼり紫’の片親は‘紅心大根’との交雑後代から選抜されたことから、‘紅心大根’と同様にトランスポゾンが挿入された状態とみられる。

一方、多数の相互交配実験の結果から(写真2)、根色が着色したF<sub>1</sub>個体の中に数%の頻度で白色の個体が現れること、この頻度が着色の親系統でみられる白色の出現頻度の10倍高いことを見出している。このことから、‘あきたおにしぼり紫’でみられる特異な現象ではなく、F<sub>1</sub>化によってメチル化レベルが低下し、トランスポゾンの活性化が促進したことが原因とみられた。

在来ダイコンであっても、日本で栽培されるダイコンの多様性はそれほど高くないため高密度にDNAマーカーを作ることが出来ない。そこで本研究では、東京農業大学で構築したダイコンのリファレンス配列に対してショートリード配列をアライメントすることで、着色遺伝子の同定を進めることとした。



写真1 ‘紅くるり’から現れた混色が白色の個体

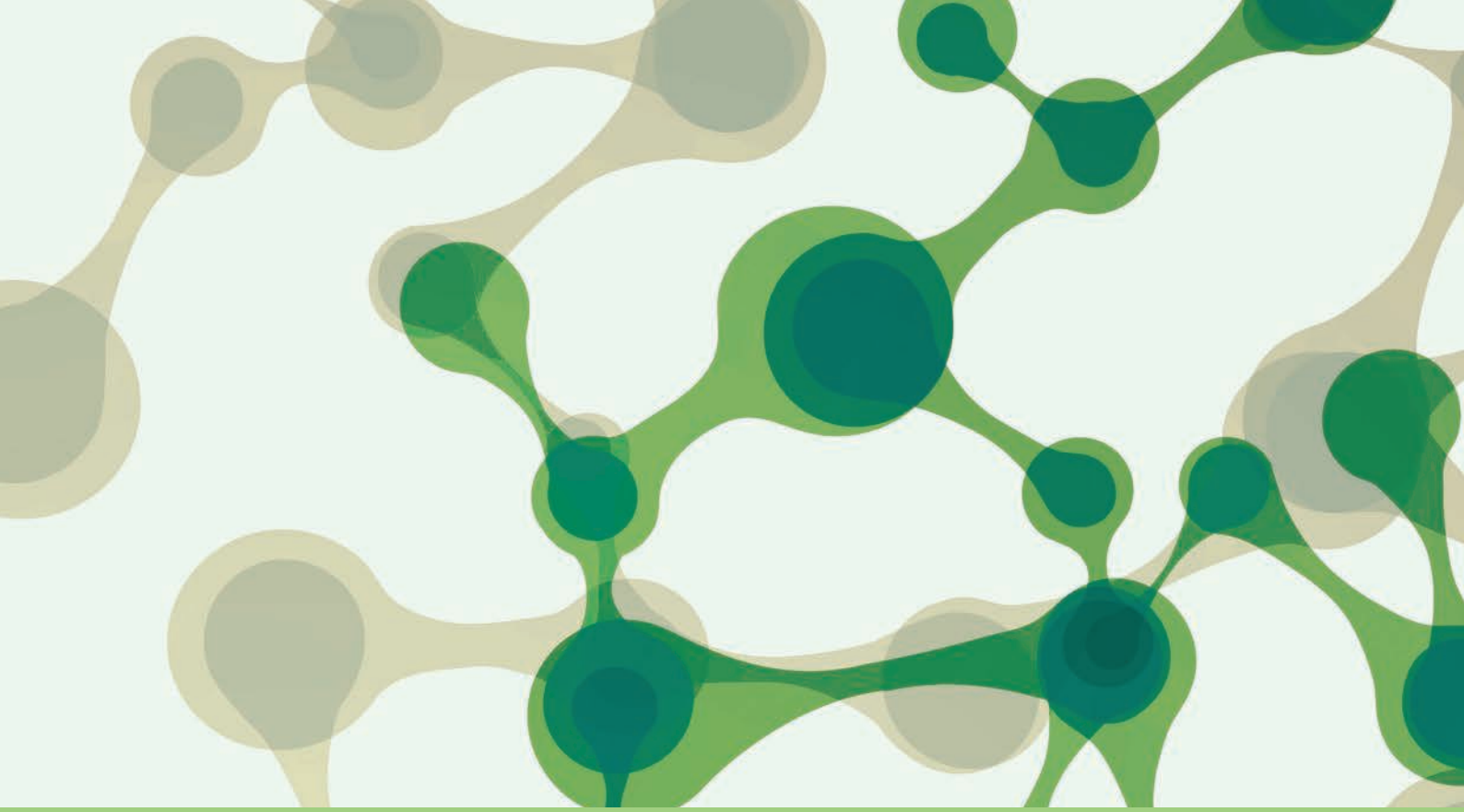


写真2 相互交配実験による着色の評価

高橋秀和 (秋田県立大学生物資源科学部)

共同研究先: 小松憲治 (短期大学部)

田中啓介 (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](mailto:kyoten-g@nodai.ac.jp)

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