



生物資源ゲノム解析拠点 ニュースレター

No. 5

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

2018年3月号

CONTENTS

| | |
|----------------------------------|----|
| 共同利用・共同研究拠点 | |
| 「生物資源ゲノム解析拠点」認定最終年度に向けて | 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 |
| 平成 29 年度 研究発表実績 | 5 |
| 平成 29 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 | |
| 前期新規採択課題 | 9 |
| 後期新規採択課題 | 18 |

■共同利用・共同研究拠点

「生物資源ゲノム解析拠点」 認定最終年度に向けて

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターが平成 25 年度に共同利用・共同研究拠点の認定を受け、5 年が経ちました。当初 6 年間の認定期間ということでしたので、残すところあと 1 年になります。これまでに、国内の 75 研究機関に所属する研究者と 200 を超える共同研究を行ってきました。この間、次世代シーケンサー（NGS）の普及が進み、この装置を用いた手法は様々な研究に取り込まれています。特に RNA-seq は遺伝子機能解析の手法の 1 つとして一般的に用いられるようになり、本拠点の課題でも、RNA-seq の課題が半数近くを占めています。また、NGS の特性を活かしてメタゲノム解析や環境ゲノム解析といった集団としての解析もここ 1、2 年で急速に増えています。その他にも、エピゲノム解析、ChIP-seq など多岐にわたります。

本拠点は、農学分野を中心とした拠点としての役割を担う中で、採択課題の対象となる生物も多岐にわたる一方、モデル生物を用いた基礎的な研究も行うことで、非モデル生物への展開も目指しています。

NGS の技術は生物機能解析のための手段の 1 つとなりましたが、NGS のデータのみで結論をいうのは必ずしも簡単ではありません。そのため、シーケンスデータを得てから、さらにその成果を形にするまでに時間がかかることもあります。本拠点の共同研究課題においても、引き続きその成果が報告されていくことを期待しております。またそれが、農学分野における NGS の重要性のさらなる認識や研究の活性化にも繋がることも期待しております。

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5年が経ちました。本拠点は、学外の研究者との共同研究を通じて、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ることを目指し、現在ではNGSの呼称で幅広く知られるようになった次世代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。

当センターには、Illumina社の次世代シーケンサーが設置されており、ライブラリー調製からシーケンサーのオペレーション、データ解析までを一貫して行える研究員が常勤しています。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多岐にわたる生物種を対象に様々な研究課題に対応できる体制となっています。

平成29年度も、これまで通り多くの研究者の方々から農学分野において重要な生物を対象とした様々な研究課題が申請され、採択件数は初年度から累積すると220件を超えました（図1）。採択課題を生物種別にまとめると、前年に続き今年度もシロイヌナズナや作物、園芸種を含む植物が比較的多く占めることとなりました。一方で、解析手法別にまとめると、これまでと同様にRNA-seq、次いで全ゲノム解析を用いた研究課題が多数となりました（図2）。そして、すでに当センターでは導入済みの技術であるエピジェネティック解析やメタゲノム解析にも取り組みました。このように、様々な研究分野から多様な解析技術が求められており、まさにNGSが分子生物学的な解析技術の一端として普及されていることがうかがえます。

ほかにも、採択課題の一部では、前年度に包括連携協定を締結した国立遺伝学研究所との共同で遺伝情報解析を実施しました。この協定は、円滑に解析を進めることができるだけでなく、より幅広く研究者同士の交流を深め、NGS解析に携わる研究者ネットワークの構築にも貢献できると期待されます。

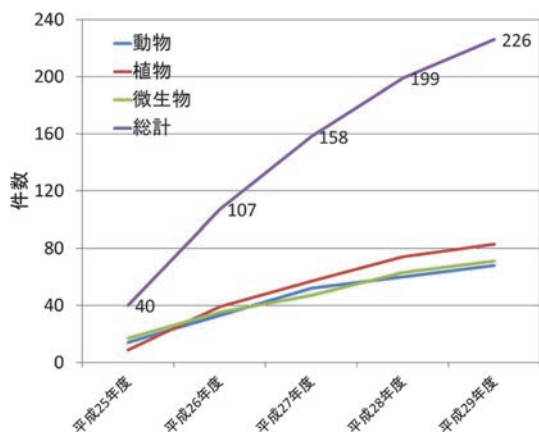


図1 共同利用・共同研究課題件数（累積）

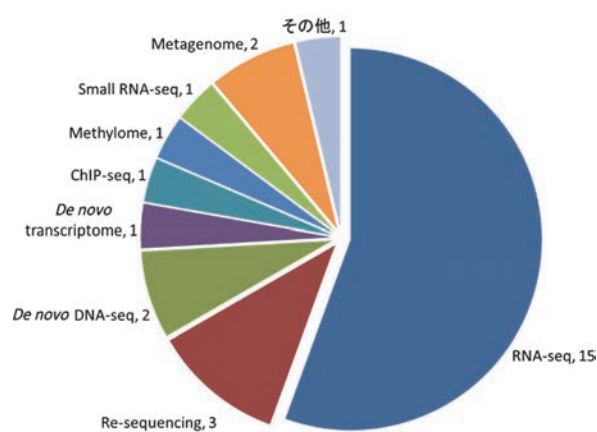


図2 今年度の共同研究課題における解析手法

(生物資源ゲノム解析センター 田中啓介)

■平成 29 年度 研究発表実績

○論文発表

- Kobayashi K, Kanesaki Y, Yoshikawa H.
Surface Sensing for *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 Flagellar Gene Expression on Solid Medium.
Appl Environ Microbiol. (2017) 83: e00585-17.
- Yokoyama E, Hirai S, Ishige T, Murakami S.
Single-Nucleotide Polymorphisms in the Whole-Genome Sequence Data of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7/H- Strains by Cultivation.
Curr Microbiol. (2017) 74: 425-430.
- Yokoyama E, Hirai S, Ishige T, Murakami S.
Application of whole genome sequence data in analyzing the molecular epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H.
Int J Food Microbiol. (2017) 264: 39-45.
- Hirai S, Yokoyama E, Ishige T, Murakami S.
Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 subclade 8b strains in Chiba Prefecture, Japan, produced larger amounts of Shiga toxin 2 than strains in subclade 8a and other clades.
PLOS One. (2017) *in press.*
- Abdelrahman M, El-Sayed M, Sato S, Hirakawa H, Ito S, Tanaka K, Mine Y, Sugiyama N, Suzuki M, Yamauchi N, Shigyo M.
RNA-sequencing-based transcriptome and biochemical analyses of steroidal saponin pathway in a complete set of *Allium fistulosum*—*A. cepa* monosomic addition lines.
PLOS One. (2017) 12(8): e0181784.
- Ugajin A, Uchiyama H, Miyata T, Sasaki T, Yajima S, Ono M.
Identification and initial characterization of novel neural immediate early genes possibly differentially contributing to foraging-related learning and memory processes in the honeybee.
Insect Mol Biol. (2017) *in press.*
- Okude G, Futahashi R, Kawahara-Miki R, Yoshitake K, Yajima S, Fukatsu T.
Electroporation-mediated RNA interference reveals a role of the multicopper oxidase 2 gene in dragonfly cuticular pigmentation.
Appl Entomol Zool. (2017) 52(3): 379-387.
- Ikeda S, Kawahara-Miki R, Iwata H, Sugimoto M, Kume S.
Role of methionine adenosyltransferase 2A in bovine preimplantation development and its associated genomic regions.
Sci Rep. (2017) 19; 7(1): 3800.
- Kanesaki Y, Hirose M, Hirose Y, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe S, Uchida H, Murakami A.
Draft Genome of the Nitrogen-fixing and Hormogonia-inducing Cyanobacterium, *Nostoc* cycadae strain WK-1, Isolated from the Coralloid Roots of *Cycas revoluta*.
Genome Announc. (2018) 6: e00021-18.
- Ono S, Liu H, Tsuda K, Fukai E, Tanaka K, Sasaki T, Nonomura K.
EAT1 transcription factor, a non-cell-autonomous regulator of pollen production, activates meiotic small RNA biogenesis in rice anther tapetum.
PLOS Genetics. (2018) 14(2): e1007238.

○その他

—マスメディア—

2017年9月28日

日本農業新聞にネギ萎凋病の抵抗性に関する遺伝子解析の研究成果が紹介されました。

執行正義（山口大学）

—受賞—

2017年9月

2017年度日本魚類学会年会（函館）において、ポスター発表「“稀な性”と倍数性を越えた遺伝子流動がもたらす3倍体フナの進化と多様性」が優秀賞を受賞しました。

渡辺勝敏（京都大学）

■平成 29 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧

平成 29 年度前期新規採択課題一覧

1. 前川雅彦（岡山大学）
「コムギ種子色を決定する R 遺伝子が制御する休眠関連遺伝子の探索」
2. 大畑樹也（浜松医科大学）
「哺乳類の遺伝子量補償に関わる X 染色体不活性化の制御機構の解析」
3. 長井敏（国立研究開発法人 水産研究・教育機構）
「メタゲノミクスによる黒潮流軸海域等、日本沿岸域における生物多様性の評価」
4. 田岡健一郎（横浜市立大学）
「野生オオムギ *Hordeum bulbosum* の球茎形成に関わる遺伝子群の網羅的解析」
5. 小林括平（愛媛大学）
「退緑・黄化の発症を誘導可能な三種類の遺伝子組換えタバコの発症過程における遺伝子発現変化の比較解析」
6. 上田賢志（日本大学）
「バクテリア群集に潜在する CO₂ レギュロンの実態解明」
7. 森浩禎（奈良先端科学技術大学院大学）
「分子バーコードを用いたヘテロ細胞集団動態の検出」
8. 二橋亮（国立研究開発法人 産業技術総合研究所）
「トンボの変態を制御する分子基盤」
9. 高野哲夫（東京大学）
「トウジンビエの塩耐性機構解明を目指したトランスクリプトーム解析」
10. 志村遥平（国立研究開発法人 国立環境研究所）
「シアノバクテリアがもつ光化学系保護タンパク質の発現を制御する因子の探索」
11. 野尻秀昭（東京大学）
「土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株におけるプラスミド pCAR1 保持・非保持時のトランスクリプトーム解析」
12. 渡辺勝敏（京都大学）
「雌性発生 3 倍体フナ類で迫る脊椎動物の倍数性変化に伴うエピゲノム状態の変化パターン」
13. 星野敦（自然科学研究機構 基礎生物学研究所）
「アサガオの全ゲノムリシーケンスによる葉の形態に関わる突然変異の同定」
14. 植竹淳（コロラド州立大学）
「東京都に飛来するバイオエアロゾルの把握とその影響評価」

15. 増田誠司（京都大学）
「抗ガン活性フラボノイドによる遺伝子発現制御機構の解明」
16. 晝間敬（奈良先端科学技術大学院大学）
「トリプトファン由来の二次代謝物によるコレトリカム属の内生糸状菌の感染制御機構の探索」
17. 広瀬侑（豊橋技術科学大学）
「光合成生物の光スイッチの包括同定法の確立」

平成 29 年度後期新規採択課題一覧

18. 高橋昌志（北海道大学）
「簡易迅速診断に向けたウシ子宮外組織における妊娠特異的遺伝子の探索」
19. 上中弘典（鳥取大学）
「既知の受容体を介さない植物のキチンに対する応答機構の解明」
20. 高谷智英（信州大学）
「肉用鶏と卵用鶏の骨格筋芽細胞における遺伝子発現の比較解析」
21. 杉田(小西) 左江子（香川大学）
「イネの収量性を増大させる新規脱粒性遺伝子の単離と種子脱離現象の解明」
22. 堀内裕之（東京大学）
「菌類を用いた脂質生産の基盤となる脂質合成・代謝制御機構の研究」
23. 佐藤拓哉（神戸大学）
「生態系を駆動する遺伝子：徹底的トランスクリプトーム比較による寄生者ハリガネムシの宿主操作遺伝子の特定」
24. 鶴丸博人（鹿児島大学）
「*Chitinophagaceae* 科新種候補株のゲノム解析」
25. 野々村賢一（大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構国立遺伝学研究所）
「イネ種間雑種で生じる減数分裂異常の分子基盤解明に向けた RNA 発現プロファイル解析」
26. 経塚淳子（東北大学）
「イネの粒数を決定する TAWAWA1 遺伝子の分子機能解明」
27. 松橋珠子（近畿大学先端技術総合研究所）
「黒毛和種肥育牛の肥育状態を生体評価する血中バイオマーカーの開発」

〈課題番号順〉

…………… 採択課題研究紹介 ……………

前期新規採択課題

▶▶ コムギ種子色を決定する *R* 遺伝子が制御する
休眠関連遺伝子の探索 ◀◀

コムギは収穫期の降雨により種子が穂についたまま発芽する「穂発芽」という現象が起こりやすい(図1)。一度発芽した種子から小麦粉を作っても種子内の澱粉が分解されていることから、正常なパンを焼くことが出来ない。歴史的に種子の色が種子休眠に関連があることが知られており、種皮に色素が蓄積した赤粒系統は白粒系統に比べて種子休眠が強く、穂発芽しにくい。

種子色は肉眼で観察できることから古くから遺伝マーカーとして用いられ、コムギの種子色素を決定する *R* 遺伝子の存在は古くから知られていた。コムギの種子色素は主にプロアントシアニジンであり、この色素を作るためには複数の酵素が関与している。近年、我々のグループは *R* 遺伝子がこれらの酵素遺伝子の発現を制御している転写制御因子 *Tamyb10* をコードしていることを明らかにした。*R* 遺伝子を持つ赤粒系統は *R* 遺伝子を持たない系統に比べて植物ホルモンの一種であるアブシジン酸(ABA)に対する感受性が強く、ABAを添加することでより発芽が抑えられる(発芽しにくい)ことが明らかになった。この結果から、*R* 遺伝子を持たない白粒系統は同時にABA感受性を失うことで休眠が低下し、穂発芽しやすくなるのではないかと予想された。

本実験では *R* 遺伝子の機能を精密に特定するため、白粒系統(Fielder)に *R* 遺伝子を導入して得られた赤粒系統(G8)を用い、FielderとG8との発達中の種子胚を材料にRNA-seqを行った。発現量に差がある遺伝子が複数見出されたが、ABA

合成および代謝に関わる遺伝子は含まれていなかった。さらに並行してこれらの系統の種子について植物ホルモン定量を行ったところ、両系統のABA量に違いは見られず、RNA-seqの結果と一致した。今後RNA-seqによって見出された遺伝子について調査することで、*R* 遺伝子がどのように種子休眠と関わっているのかが明らかになると期待される。



図1 コムギの穂発芽

前川雅彦 (岡山大学資源植物科学研究所)
氷見英子 (岡山大学資源植物科学研究所)
入来規雄 (農研機構九州沖縄農業研究センター)
栗原志保 (農研機構北海道農業研究センター)
高橋秀和 (秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科)
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)

▶▶ 哺乳類の遺伝子量補償に関わる X 染色体不活性化の制御機構の解析 ◀◀

哺乳類のメスは性染色体である X 染色体を二本有しているのに対して (XX)、オスは一本のみである (XY)。メスの二本ある X 染色体のうちの片方は不活性化し、オスの X 染色体から発現する遺伝子量と雌雄間で等量になるように調節される(遺伝子量補償機構)。この X 染色体不活性化は、X 染色体不活性化を開始する機能的長鎖非コード RNA である *Xist*、*Xist* の全体を覆う形で転写されるアンチセンス RNA であり *Xist* の転写を負に制御する *Tsix* により調節されている。

Tsix の機能を明らかにするために、ドキシサイクリンにより *Tsix* の発現が誘導されるマウスエピプラスト幹細胞 [EpiSC: $X^m \Delta Xist X^p TTGFp$] を作製した(図1)。この細胞にドキシサイクリンを添加すると、*Tsix* の継時的な発現上昇と *Xist* の発現抑制に伴い、*Xist* プロモーター領域における継時的なクロマチン構造変化(ユークロマチンからヘテロクロマチンへのヒストン修飾変化、DNAメチル化上昇、クロマチン構造調節因子である Ctef および Yy1 の解離、プロモーター領域のヌクレオソームポジショニング変化、3Dクロマチン構造の変化など)が観察された。本研究では、次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq 法を用いて、*Tsix* による *Xist* 抑制に伴うクロマチン構造変化の対象をさらに広い範囲である X 染色体活性中心(約 400 Mb)まで広げて解析を行う。

本研究成果により、機能的非コード RNA による条件的ヘテロクロマチンの変換機構の理解が深まることが期待される。また、クローン動物の成功率と遺伝子量補償機構には密接な関係

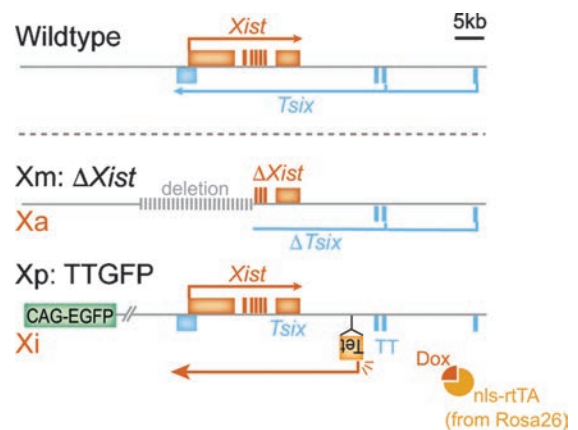


図1 $X^m \Delta Xist X^p TTGFp$ エピプラスト幹細胞 (EpiSC)。ドキシサイクリン (Dox) によって *Xist* が発現している X 染色体より *Tsix* 遺伝子が発現誘導される。

があることが知られており、本研究成果による X 染色体不活性化の制御機構の解明はクローン生物作出向上にも寄与することが期待される。

大畑樹也 (浜松医科大学)
共同研究先: 小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

メタゲノミクスによる黒潮流軸海域等、日本沿岸域における生物多様性の評価

或る海洋空間中にどれだけの種類の生物が存在しているか（生物学的多様性）を把握することは、その環境の物質循環・生物群集構造等の「生物学的ポテンシャル」を理解する上で極めて重要である。従来の光学顕微鏡観察では、その記録が「同定可能な優占種」に限定される上、観察者の習熟度等により結果が異なるという問題がある。特に直径が10 μm より小型のプランクトンなどでは、光学顕微鏡はもとより、電子顕微鏡を用いた観察でも正確な種同定が困難な場合がある。一方、近年の次世代型シーケンサー（NGS）の飛躍的普及により、様々な環境下の微生物相を「形態」ではなく「遺伝子配列」により網羅的に測定するメタゲノム解析技術が急速な拡がりを見せている。メタゲノム解析技術の進展により、体長1 μm 以下の細菌から数mmまでの動物プランクトンを含む数千種の原核・真核生物群について簡易かつ高精度なメタゲノム解析が可能である。現在、これらの技術を用いた新しい海洋生態学の展開が期待されており、メタゲノミクス研究による出現種の分子同定、生物多様性解析、海域間越境移入種の検出や生物群集構造の解析への利用が試みられている。メタゲノム解析により、各サンプル当たり200-400個のOTUs（Operational Taxonomic Units）のレベルで出現種の網羅検出が可能であり、サンプル間や海域間の生物多様性の差異を明らかにすることが可能である（図1）。

本研究では、海水1-3リットル中に出現する真核生物および細菌のメタゲノム解析を、日本列島の最北端（オホーツク海）から広島湾、最南端（石垣島）まで、水温-2~30 $^{\circ}\text{C}$ の範囲、水深0~3,000mの範囲に対して行い、生物種を網羅的に検出

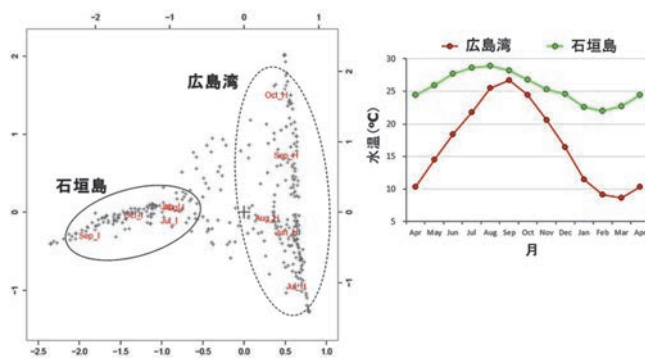


図1 メタゲノム解析によるプランクトン多様性解析の一例

海水500mL中に出現した真核生物をフィルターで捕集し、DNA抽出後、18S-rRNA遺伝子の一部をPCR増幅し、次世代シーケンサーにより配列を取得した後、配列を精査し、多様性解析等を行った。（左図は、広島湾と石垣島における生物多様性の違いを示す。広島湾では、生物の出現に明瞭な季節性があることに対して、石垣島では無いことを示す。右図は、水温の月変化を示す。）

することで、季節性や分布範囲の詳細な記載を行い、各水系の生物叢の特徴づけを行うことを目的とする。

長井 敏（水産研究・教育機構中央水産研究所）

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）

野生オオムギ *Hordeum bulbosum* の球茎形成に関わる遺伝子群の網羅的解析

植物の栄養成長から有性生殖成長への成長相転換である花成は、日長変化の刺激によって葉で合成されたFTタンパク質が花成ホルモン（フロリゲン）として機能することで促進される。申請者はイネを用いて、「FTタンパク質がフロリゲン活性化複合体FACを形成し花芽分裂組織遺伝子を活性化することで花成が誘導される」ことを明らかにしている。花成による有性生殖は植物の唯一の繁殖戦略ではなく、例えばジャガイモは地下茎で塊茎（イモ）を形成し栄養生殖によっても繁殖する。この塊茎形成もFTタンパク質によって誘導されることが明らかになっている。野生オオムギの一種である *Hordeum bulbosum* L. は、コムギ・オオムギの主要作物を含むイネ科コムギ連（Triticeae）で唯一、日長依存的に球茎を形成し、栄養生殖もおこなう多年生植物種である（図1）。しかし、*H. bulbosum* のゲノム配列は未公開であるため、球茎形成の分子機構の解析は困難である。

そこで本申請研究では、次世代シーケンサーにより、*H. bulbosum* の植物体の各組織で発現するRNAを *de novo* RNA sequence により網羅的に同定し、球茎形成組織・時期において特徴的に発現変化する遺伝子を同定する。その中から、既知のフロリゲン制御経路因子を参考にしながら球茎形成因子の候補を同定し、球茎形成における役割を明らかにする。以上の研究から、栄養生殖機構の進化的成立要因に迫りたい。また、栄養



図1 日長変化による野生オオムギの球茎形成

生殖器官は養分を蓄積しているため、ジャガイモやタマネギなど農学的に重要な作物となっている。将来的には、これらの栄養生殖器官の形成時期・収量の改良や、多年生作物を作出する分子育種の基盤を確立することも目標としている。

田岡健一郎（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）

ウイルス病害発症分子機構の多様性

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。本研究では、ウイルス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）」によるウイルス病防除を目指し、その基盤となるウイルス病の発症機構を明らかにすることを目的としている。これまでにウイルスタンパク質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タバコやシロイヌナズナを作出し、それらがウイルスタンパク質依存的に退緑・黄化や成長抑制などの病徴様の表現型（SLP）を呈すること、SLP発現過程で病害抵抗性関連遺伝子やストレス応答遺伝子など多様な遺伝子の発現変動が認められたことを明らかにしてきた。また、キュウリモザイクウイルスのYサテライトRNAによる黄化発症や、モモ潜在モザイクウイルスによる退緑に関わることが示された、葉緑体タンパク質遺伝子のサイレンシングについてもウイルスタンパク質発現植物と同様な人為的に誘導可能な遺伝子組換えタバコを作出し、SLPの発現を確認した。これらのモデル系におけるこれまでの知見から、ウイルス病の発症過程では異なるメカニズムによって葉緑体障害が起こり、その結果として活性化される逆行シグナルや光合成能の低下によって生じる栄養欠乏によって、葉緑体機能のさらなる低下や細胞増殖・細胞肥大の抑制が起こるとの仮説を立てた（図）。これまでに樹立した複数のモデル実験系を比較解析することによって、葉緑体障害を引き起こすメカニズムや葉緑

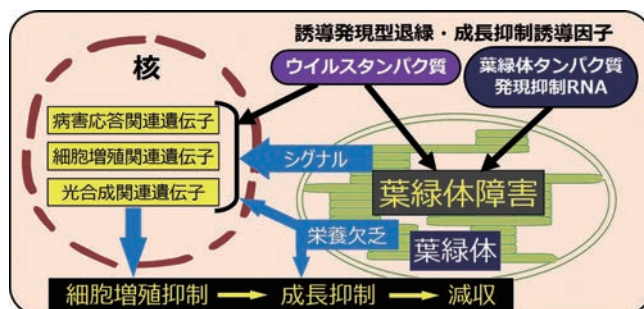


図 誘導発現型遺伝子組換え植物におけるウイルス病徴様表現型の発現機構（仮説）。葉緑体障害に至る分子機構、および葉緑体障害から成長抑制に至る分子機構における各種の環境応答や栄養欠乏の関与が今後の課題である。

体障害に起因する植物の成長抑制のメカニズムについて新たな知見が得られると期待される。現在、この仮説に基づいて遺伝子発現変動の比較解析や、細胞増殖・細胞肥大や植物ホルモンの関与について解析を行っており、栄養条件がSLP発現に及ぼす影響についても検討中である。

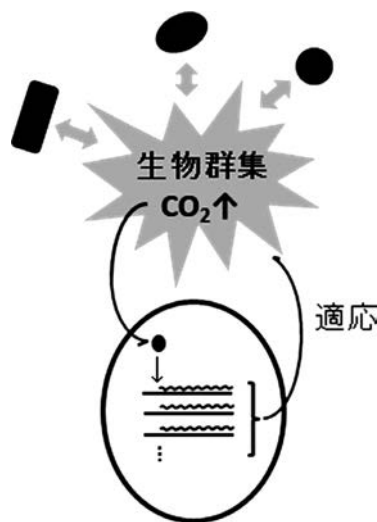
小林括平（愛媛大学大学院農学研究科）
共同研究先：坂本 光（生物産業学部）
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

細菌群集に潜在するCO₂レギュロンの実態解明

微生物には、その増殖に高濃度（数%）のCO₂を要求するものがある。capnophilicと呼ばれるこの性質は、一部の病原菌を中心として古くから観察されていたが、有用微生物探索の現場等では十分な認識がなされてこなかった。CO₂要求性の遺伝的背景には、カルボニックアンヒドラーゼ（CA）の欠損が挙げられる。CAはCO₂とHCO₃⁻の変換を触媒する普遍酵素であり、CAを有する菌は大気中の低濃度のCO₂からHCO₃⁻を生成し、それを要求する一次代謝酵素群（アセチルCoAカルボキシラーゼやカルバミルリン酸合成酵素など）に供給することができる。一方、CAを有さない菌は低濃度CO₂環境では上記のHCO₃⁻に依存する一次代謝が進まず増殖できないが、高濃度CO₂環境下では、物理化学的平衡によって生じるHCO₃⁻を取り込むことで補填し、増殖することができる。

増殖とは独立に、発芽や細胞分化、病原性など特定の形質が高濃度のCO₂によって誘発される事例も観察されてきた。CO₂は環境中の生物活性の有効な指標であり、それが信号となって特異的な機能の発現が誘発されることは想像に難くない。しかし、これまでにCO₂によって誘発される遺伝子とその誘発メカニズムに関する知見は、いくつかの病原菌において調べられているに留まっている。そこで本課題では、複数の細菌について、高濃度CO₂の存在が遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に調査することを計画した。

これまでに、環境中に普遍的で多様な役割を担う*Bacillus*属細菌を中心とする計5株についてRNA-seqを実施し、通常大気下と5%CO₂を含む気相下の間における転写量の違いを網羅的に比較解析した。いずれの菌株においても高濃度CO₂によって転写が顕著に上昇する遺伝子群と逆に低下する遺伝子群が認



められ、その内容は菌株ごとに大きく異なっていた。今後の解析によって、微生物群集におけるCO₂応答の多様性が明確になると期待される。

上田賢志（日本大学生物資源科学部）
共同研究先：吉川博文（応用生物科学部）
渡邊 智（応用生物科学部）
兼崎 友（生物資源ゲノム解析センター）
浜口 悠（生物資源ゲノム解析センター）

▶▶ 分子バーコードを用いたヘテロ細胞集団動態の検出 ◀◀

大腸菌は今から 100 年以上前にドイツで発見された腸内細菌です。通常病原性を持ちませんが、一部 O157 に代表されるような非常に強い毒性を持つ種も存在します。大腸菌という名からは腸内細菌の大半を占めるように思われるかもしれませんが、通常腸内には 0.01% 程度しかいません。ヒト腸内でのこの細菌の貢献はビタミンの供給なども考えられていますが、よくは分かっていないのが現状です。20 世紀の中頃に大腸菌で接合現象が発見されてからは生物学研究、特に遺伝子研究に多くの貢献を果たし、20 世紀後半の分子生物学において遺伝子の概念を作り上げた生物と言っても過言ではありません。これがモデル生物と言われる所以です。

ところで、21 世紀に入り、この細菌を用いて重要な遺伝子の構造・機能の解明が非常に進みました。それが 21 世紀に入り、個々の遺伝子・遺伝子産物がお互いに相互関係を持つことで細胞が行きている、すなわち細胞内・細胞間のネットワーク解明に向けた研究が大きく加速しています。大腸菌というモデル微生物には、20 世紀からの膨大な研究蓄積が存在し、地球上でもっとも研究の進んだ生物種の一つという大きな強みがあります。これを活かし、私たちの研究グループでは、20 塩基の分子バーコードという仕組みを、個々の遺伝子欠失に導入することで、集団中の一細胞毎の変動をシーケンサーによりモニターすることに成功しました。この技術を用いて、どの遺伝子がいつ必要になり、どの遺伝子群がお互いに相互作用しているのか、相互関係解明に向けた最初の一步を踏み出すことができました。この技術を利用すると、培養液に添加した化合物の生体へ

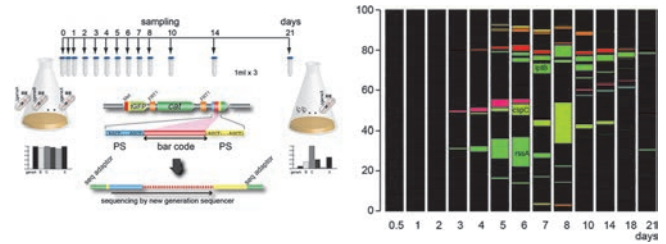


図 培養液中の個々の遺伝子欠失株の変動

左図：実験を模式的に示した。バーコード欠失株ライブラリーを混合培養し、各サンプル取得時間に分取した培養液からゲノム DNA を抽出、バーコード領域の配列解析を行う。右図：各遺伝子欠失株の変動を示した。X 軸はサンプル回収の時間、Y 軸は各サンプル培養液中のそれぞれの欠失株の存在量を % で示したものの。

の影響も全遺伝子を対象に簡便に行うことが可能になりました。多くの生理活性物質の探索や生理機能解明が加速されるものと期待しています。

森 浩禎 (奈良先端科学技術大学院大学データサイエンスセンター)
 武藤 愛 (奈良先端科学技術大学院大学データサイエンスセンター)
 共同研究先：渡辺 智 (応用生物学部)
 兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶▶ トンボの変態を制御する分子基盤 ◀◀

昆虫は、現在記載されている生物の半分以上を占め、地球上で最も繁栄している分類群である。昆虫がこのように多様化した背景には、卵、幼虫、蛹、成虫と形態を大きく変化させる「変態」によって様々な環境に適応できるようになったことが挙げられる。昆虫の変態に関わる分子機構は、キイロショウジョウバエとカイコなど蛹の時期を持つ完全変態昆虫を中心に研究が進められてきた。トンボは、変態を行う最も祖先的な昆虫の一つで、幼虫（ヤゴ）のときは水中で生活するのに対して、成虫になると陸上で活動する。水中から陸上への生活環境の変化に伴い、形態や行動も劇的に変化するが、トンボの変態を制御する分子基盤は、世界的に見ても全く研究されていなかった。その理由として、①研究室での大量飼育が難しく、幼虫の脱皮回数や各齢の期間、変態における形態変化などの基本的な情報が欠落していること、②遺伝子の配列や発現情報が不足していること、③遺伝子機能解析系が存在しなかったこと、が挙げられる。申請者らは、①に関してアオモンイトトンボに着目して個別飼育系を立ち上げ、幼虫の生活史や変態時における詳細な形態変化の記載を行った（図 1、Okude *et al.*, 2017 *Zool. Sci.*）。さらに、③に関しては過去の共同研究課題を通じて、複数のトンボでエレクトロポレーションを併用した RNAi 法によって、局所的に遺伝子機能阻害が可能であることを確認した

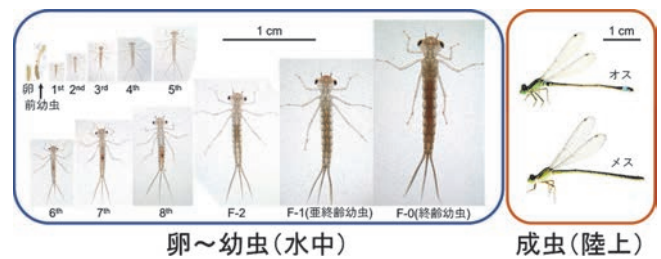


図 1 アオモンイトトンボの各ステージ

(Okude *et al.*, 2017 *Appl. Entomol. Zool.*). 今回の共同研究課題を通じて、アオモンイトトンボにおいて②の遺伝子の配列情報および各ステージ・組織における詳細な発現パターンの情報を得ることができたので、変態と強い関連の見られた複数の候補遺伝子に対して、機能解析を現在進めているところである。

二橋 亮 (産業技術総合研究所生物プロセス研究部門)
 奥出絃太 (東京大学大学院理学系研究科)
 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)

トウジンビエの塩耐性機構解明を目指したトランスクリプトーム解析

トウジンビエ（英名：Pearl Millet、学名：*Pennisetum glaucum*）は、イネ科チカラシバ属に属する一年生草本植物で、世界中で広く栽培される雑穀の一つである。アフリカやインドでは重要な食料および飼料であり、バイオマスが大きいことから近年はバイオエタノールの原料としても注目を集めている。トウジンビエは乾燥、高濃度塩、高温、貧栄養等の不良環境条件に極めて強い耐性を持つので、コムギやトウモロコシを栽培することができない地域で栽培されることが多く、ソルガムよりも高い環境ストレス耐性を示すことが知られている。例えば耐塩性に関しては、250 mM 塩化ナトリウム存在下でも生育可能であるが、塩類腺などの特殊な構造に依存する排塩機構や形態的な特異性を有さないことから、その耐塩性機構が解明できれば、他の作物にも適用可能であると考えられる。国際半乾燥熱帯作物研究所（ICRISAT）などを中心にトウジンビエ品種系統の保存や形質評価、育種が行われていたが、ゲノム情報の整備は遅れていた。しかし昨年トウジンビエの全ゲノム配列が決定され公開されたので（Varshney ら 2017, *Nature Biotechnol.*）、今後はトウジンビエに関する分子生物学的研究が飛躍的に発展すると考えられる。

私たちはトウジンビエの優れた環境ストレス耐性機構の解明に興味を持ち、ICRISAT にコンタクトし、議論を重ねた結果、耐塩性の 3 系統および塩感受性の 2 系統のトウジンビエ系統の分譲を受けることに成功した。それらの系統の発芽率や実験室レベルでの塩耐性について詳細な解析を行い、塩耐性（ICMB-01222）および塩感受性（ICMB-081）のそれぞれ 1 系統を選抜した（図 1）。本研究では、これら 2 系統にストレス処理を施した後に RNA を抽出し、RNA-seq により、耐性系統と感

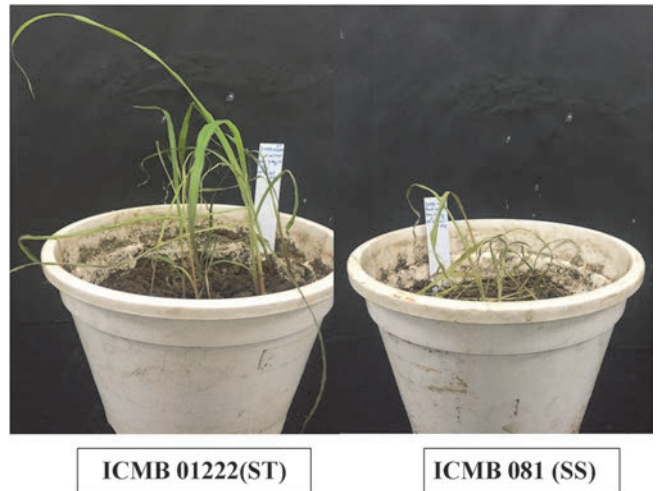


図 1 塩ストレス処理（250 mM NaCl）後 20 日目の耐塩性系統（ICMB-01222、左）および塩感受性（ICMB-081、右）トウジンビエ系統。

受性系統との間で遺伝子発現プロファイルにどのような違いがあるか調べた。トウジンビエの耐塩性に関与する遺伝子を同定し、耐塩性機構の解明を進めていきたい。

高野哲夫（東京大学アジア生物資源環境研究センター）
共同研究先：峯 洋子（農学部）
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

シアノバクテリアがもつ光化学系保護タンパク質の発現を制御する因子の探索

近年、シアノバクテリアの光合成能を利用した物質生産が盛んに研究されているが、屋外での培養を想定した場合、環境変化に強く光合成活性の高い株を用いることが、生産能の向上に繋がると考えられる。モデルシアノバクテリアである *Synechocystis* sp. PCC 6803 は、様々なストレス条件で High Light-Inducible Proteins (HLIPs) を発現させ、刻一刻と変化する環境から光化学系 II 合成中間体を守っている。HLIPs の発現に異常がある変異株は環境変化に対して顕著に弱くなり、光合成活性の低下が見られることから、HLIPs の適切な発現制御は光合成活性の最適化に非常に重要である。*Synechocystis* sp. PCC6803 において HLIPs の発現はヒスチジンキナーゼ Hik33 の制御下にあり、従属栄養条件で Hik33 を欠損させると、HLIPs を蓄積する表現型を示すことから、Hik33 は HLIPs の発現を負に制御すると考えられている。しかし、光栄養条件で Hik33 を欠損させたところ、HLIPs の発現が消失する表現型が得られた（図）。この表現型は、Hik33 遺伝子の相補でも回復しなかったため、HLIPs の発現消失は、Hik33 の欠損に伴うゲノム上の突然変異によると考えられた。この突然変異は、ゲノム上で離れた位置にコードされている複数の HLIPs の発現を恒常的に抑制する変異であり、単一の HLIP 遺伝子のプロモーター領域の変異といった類いのものではない。また、Hik33 と相互作用し遺伝子発現を制御すると考えられているレスポンスレギュレーター Rre26 および Rre31 をコードする ORF にも変

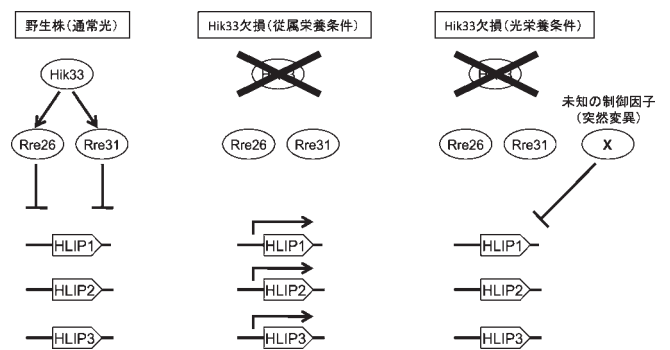


図 *Synechocystis* sp. PCC6803 における HLIPs 遺伝子の発現制御

異は見られなかった。これらのことから、光栄養条件で作製した Hik33 変異株では、未知の HLIPs 発現制御因子上に突然変異が起こっているものと考えられる（図）。本共同研究では、この未知の HLIPs 発現制御因子を明らかにすることで、シアノバクテリアにおける光合成活性の最適化機構の更なる理解を目指している。

志村遥平（国立環境研究所 / つくば市立筑波東中学校）
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）

▶▶ 土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株における プラスミド pCAR1 保持・非保持時のトランスクリプトーム解析 ◀◀

細菌に抗生物質耐性や難分解性物質分解能を付与する遺伝子の多くはプラスミド上に存在する。過去の微生物学では、プラスミドは単に新規形質を宿主に付け加える「遺伝子の運び屋」と捉えられてきた。しかし現実には、プラスミド保持に伴い宿主染色体上遺伝子の多くで転写変動が起こり、環境中での生残性が低下するなど、プラスミド保持は以前に考えられていたより複雑な機構で宿主の振る舞いや生命維持に影響を与えることが明らかとなっている。

プラスミドの中には、細菌の「ヒストン様因子」とも呼ばれる核様体タンパク質 (NAPs) をコードするものが存在する。NAPs は通常、染色体にコードされており、DNA を折り畳み細胞内に収納する機能を持つとともに、DNA の構造を変化させることで多くの遺伝子の転写制御を行う。つまり、NAPs をコードするプラスミドを獲得した細胞内では、プラスミド由来の NAPs が既存の核様体構造や転写制御ネットワークに割り込むことになる。

我々は土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株と芳香族化合物カルバゾールの分解プラスミドである pCAR1 をモデルとして、NAPs の中でも外来遺伝子のサイレンサーとして知られる H-NS ファミリータンパク質に着目して研究を進めてきた。過去の研究では pCAR1 保持株について、H-NS ファミリータンパク質をコードする宿主染色体上の遺伝子 *turA*、*turB* をそれぞれ破壊した株と、同様に pCAR1 上の *pmr* を破壊した株を作製し、これら 3 種の破壊株と pCAR1 保持野生型株のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、これらの遺伝子がコードするタンパク質は相同性が高い (アミノ酸配列が 50 ~ 60% 一致する) にも拘わらず、三者とも異

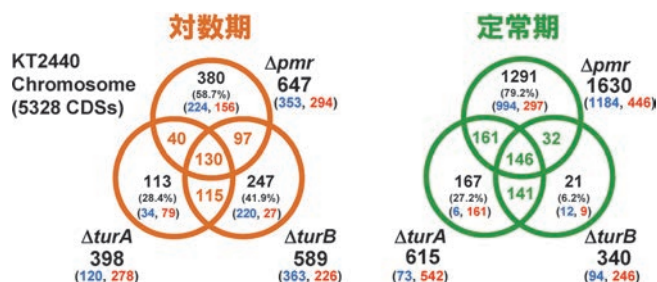


図 5 KT2440 (pCAR1) 株の *pmr*、*turA*、*turB* 破壊株において転写変動した染色体上の遺伝子数。青字が野生型株と比べて転写誘導された遺伝子数を、赤字が抑制された遺伝子数を表す。Yun *et al.*, *AEM*, 82: 832-42 (2016) の Fig. 5 を改変・引用した。

なる遺伝子群の転写制御を行っており、特に Pmr でその違いが顕著であった (図)。本研究では、これらの株に加えて pCAR1 非保持野生型株とその *turA*、*turB* 破壊株を RNA-Seq 解析に供することで、pCAR1 保持に伴う宿主の転写制御ネットワークの変化と、その過程に H-NS ファミリータンパク質が果たす役割を明らかにしたいと考えている。

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: 川崎信治 (応用生物科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶▶ 雌性発生 3 倍体フナ類で迫る脊椎動物の倍数性変化に伴う エピゲノム状態の変化パターン ◀◀

植物では主に異種間雑種に由来する多倍数性の種が多く知られ、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、新たに生じた多倍数体個体には、遺伝子発現の異常や染色体再配置、不稔など様々な問題が生じることが分かってきました。これらの問題を克服する機構として着目されているのが、DNA のメチル化修飾のようなエピゲノム状態の変化です。異数倍数性植物を中心とした近年の研究から、倍数性の変化に伴いゲノムワイドにメチル化修飾のパターンが即時的に大きく変化することが知られます。これによって遺伝子発現の制御や染色体の安定性をもたらされると示唆されています。他方、脊椎動物では多倍数体化を経験した種がまれであるために、多倍数性現象の実態はあまり良く分かっていません。

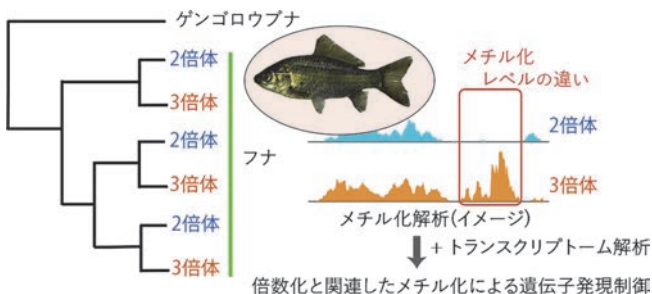


図 1 フナのミトコンドリア系統と多倍数体化 (模式図)

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 *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 倍体が知られています。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。

フナ類でも多倍数体化に伴う問題が生じると考えられますが、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、フナ類においてもエピゲノム状態の変化による制御がなされていると予測されます。そこで、フナ類の複数系統の 2 倍体・3 倍体ペアについてメチル化 DNA 領域濃縮シーケンシング技術を用いたエピゲノム状態の解析と RNA-seq 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。

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)

小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

川原玲香 (生物資源ゲノム解析センター)

▶▶ アサガオの全ゲノムリシーケンスによる 葉の形態に関わる突然変異の同定 ◀◀

アサガオの葉は、中央裂片に2つの側方裂片（翼片）がついた3尖葉が特徴です。その形成の鍵になる遺伝子の同定と機能解明を目指しています。植物の葉の形の多様性に寄与する裂片の形成機構は、主要なモデル植物の葉形が単純なこともあり理解が進んでいません。

アサガオは日本独自の園芸植物で、花の色と模様や、花や葉の形態に関わる突然変異が多数存在します。翼片が失われたり、数が増えたりする突然変異もあり、そのうち丸葉変異は、翼片が失われて葉がハート型になる不完全優性の突然変異です。その原因となる丸葉遺伝子のオーソログは、近縁種では5つの裂片をもつ葉の形成に働いており、アサガオの育種にも利用されています。

一方、アサガオでは突然変異を利用した遺伝学的解析が100年前から行われています。丸葉変異も古くから解析されており、60年前の連鎖地図では、第2連鎖群の獅子変異の近くにマップされています。獅子は花と葉の形態に関わり、原因遺伝子が特定されています。また、私たちはアサガオの全ゲノム配列を解読しています (*Nat. Commun.* 7, 13295 (2016))。そこで、丸葉変異体のリシーケンスと、獅子遺伝子の周辺配列の解析により、



左から、野生型、丸葉変異体、近縁種（アメリカアサガオ）の葉

丸葉変異の同定を試みています。

星野 敦（基礎生物学研究所）
仁田坂英二（九州大学大学院理学研究院）
清水圭一（鹿児島大学農学部）
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）
野口英樹（国立遺伝学研究所）

▶▶ 東京都に飛来するバイオエアロゾルの把握とその影響評価 ～スカイツリーから大気微生物の謎を探る～ ◀◀

大気中には、小さな砂の粒や大気汚染物質など様々な粒子（エアロゾル）が漂っています。この中で生物由来のものもバイオエアロゾルとんでいます。バイオエアロゾルには、ウイルス、バクテリア、菌類の胞子、植物花粉や胞子などが含まれ、そのサイズはナノメートルからマイクロメートルスケール（一ミリメートルの千分の一から百万分の一の大きさ）まで様々です。これらは風に乗って発生源の近くに漂うばかりでなく、上空の気流によって地球全体に広く拡散していると考えられていて、大気から落ちた先の生態系にも影響を与えていると考えられています。ですが、これまでに長期間のモニタリングを行った研究例はほとんどなく、年間を通してバイオエアロゾルがどこからやってくるのか（発生源）、またどのように飛来してくるのか（輸送経路）を理解することは、ほとんどできていませんでした。

そこで、この研究では東京都上空に飛んでいるバイオエアロゾルの実態を調査し、それらの種構成、さらには循環のようすを明らかとすることを目的として、山からの影響を受けやすいと思われる立川市の国立極地研究所屋上、海からの影響を受けやすいと思われる東京スカイツリー上部（458m）で捕集したバイオエアロゾル中のバクテリア、菌類、花粉をターゲットとした遺伝子解析を実施しています。

2-3日ごとに連続的にサンプリングを行い、遺伝子解析することで、多く検出される種（優占種）や種の構成を細かく検出することが可能であり、気象条件（温度、湿度、風速、風向など）や輸送されてきた経路と比較することで、これまでに謎に包まれていた東京都上空のバイオエアロゾルの実態が明らかになると期待しています。



図 東京スカイツリーの地上高458m部に設置した大気観測地点（左：タワー外観と観測地点、右：タワー外壁に設置した空気取り込み口、内部よりポンプでバイオエアロゾルを吸引している）

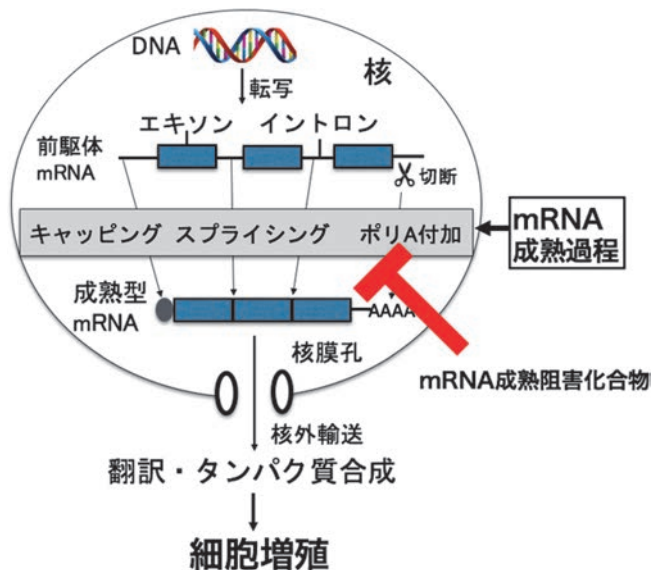
植竹 淳（コロラド州立大学）
金子 亮（国立極地研究所）
當房 豊（国立極地研究所）
共同研究先：渡辺 智（応用生物科学部）
田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

▶▶ 抗ガン活性フラボノイドによる遺伝子発現制御機構の解明 ◀◀

超高齢社会を迎えた現在、日本人の3人に1人は「ガン」によって死亡している。ガン治療には主に手術、化学療法、放射線治療があるが、いずれの治療にも機能障害や副作用を伴う。ゆえに発ガンを防ぐ一次予防が理想的である。しかし「ガンの予防」は医療としては確立しておらず、発見可能な大きさになって初めてガンと診断され治療を行う。特に化学療法は重篤な副作用により治療が中断となるケースも多い。このため、日常的に食品あるいはサプリメントからガンの成長を抑制あるいは予防できる成分を摂取することは、ガンの進行を抑制し生活の質を維持できる期間を延長させることにつながる。また治療可能な状態でのガンの早期発見にもつながり、健康な社会生活を送る上で極めて有用となる。

最近 mRNA 成熟（プロセッシング）過程の阻害因子が、抗ガン剤としての機能を期待されており、mRNA 成熟過程は抗ガン剤探索の有力な標的とされている。したがって mRNA の成熟過程を制御できる化合物は、ガンの成長を抑制あるいは予防できる可能性を持つと期待されている。

このような特性を持つ化合物を食品成分より探索してきた。そのための探索系として mRNA が持つポリ A 鎖を観察する手法を開発した。様々な食品より探索した結果、複数の活性化化合物を同定した。さらに解析を進め、食品由来の特定の構造を持つフラボノイド類が選択的 mRNA スプライシングの制御を通して遺伝子発現を調節することを明らかにした。これらのフラボノイドは、セロリやパセリに一般的に含まれている。次いで細胞内標的の解析を終え、標的が 3' 側のスプライス部位であることがわかってきた。ここでは、個別の遺伝子のスプライシング制御を明らかにするために次世代解析を行い、その分子機構



を解明していくとともに、ガンの予防において効果を持つかについて検証を進めていく。

増田誠司（京都大学大学院生命科学研究科）

共同研究先：高橋信之（応用生物科学部）

小林久人（生物資源ゲノム解析センター）

▶▶ 内生糸状菌によるアブラナ科植物の生長促進機構の探索 ◀◀

植物は自身の根を介して無数の微生物と相互作用している。しかしながら、植物が様々なストレス環境下で適応する際にこれらの微生物が担う役割についてはその大部分が明らかではない。私達は、糸状菌 *Colletotrichum tofieldiae* (*Ct*) が、栄養枯渇条件下においてシロイヌナズナなどのアブラナ科植物にリンなどの栄養を供給し植物生長を促すことを発見した（図）。*Ct* によるリン輸送や植物生長促進はリン枯渇条件下においてのみ認められ、リン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* と宿主の共生関係は環境のリン濃度に依存することが判明している。さらに、植物の二次代謝物の一種であるトリプトファン由来の二次代謝物の合成能が欠損した植物変異体においては、*Ct* は逆に植物を枯死させる病原糸状菌として振舞う。トリプトファン由来の二次代謝物の一部は抗菌活性を有することから、*Ct* との共生関係を維持するためには、宿主免疫による *Ct* 感染の制御が重要であることが示唆された。他の共生システムと比較して、本菌とシロイヌナズナの系においては、双方に対して遺伝子操作を適応することが容易であることから、未だ謎に包まれている糸状菌による植物生長促進機構や、共生から病原へと多様に変化する糸状菌の植物感染戦略を支える機構を明らかにできることが期待される。



図 リン欠条件下での内生糸状菌 *Ct* による植物生長促進

晝間 敬（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）

▶▶ 光合成生物の光スイッチの包括同定法の確立 ◀◀

生物の特定の生理活動を、光照射によって制御する技術はオプトジェネティクスと呼ばれている。オプトジェネティクスでは、生物の持つ多様な光受容体を、生理応答を制御するためのスイッチとして利用する。これらの光受容体は、これまで様々な生物種から発見されてきたが、特に光合成生物からは多くの光受容体が見つかった。これは、光合成生物が変動する光環境で生存するために、多様な光受容体の遺伝子を進化の過程で集積・進化させてきたことを示唆している。

光受容体は、一般的に生体内の存在量が少ないため、生化学的な手法を用いた単離が難しい。そのため、これまで発見された光受容体の多くが、「特定の生物」の「特定の波長応答」を「人の目」で探索し、その原因遺伝子を特定することによって見出されてきた。この探索手法は、(観測者の観測対象への愛情のために)生物種全体を系統的に適用することが困難であり、(観測者の目に頼ることで)ある程度光照射の影響の大きな応答しか感知できない。そのため、この手法は、近年爆発的に蓄積しつつあるゲノム情報に隠された光受容体を探索するには不向きである。そこで本研究では、定量性・再現性に優れた次世代シーケンサーを用いて、生物の持つ光受容体を網羅的かつ効率的に同定するための独自の手法の開発を目的とした。解析費用のコストを考慮し、ゲノムが小さな光合成原核生物であるシアノバクテリアに着目した。その中から、光照射のための均一な細胞の調製が可能で、遺伝子操作系が確立され、様々な光受容体が見つかった糸状性シアノバクテリアである *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 を解析対象とした。本研究の進展により、オプトジェネティクスをはじめとする先端技術の開発を促

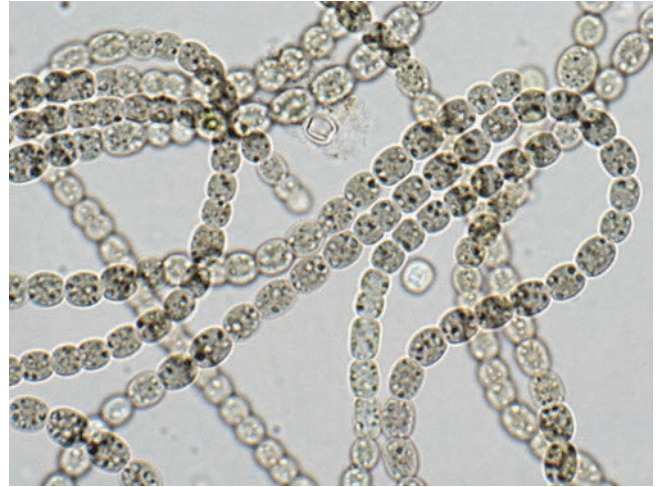


図1 本研究で使用した糸状性シアノバクテリア *Nostoc punctiforme* ATCC 29133

し、将来の我が国の農学分野の発展に貢献できる。

広瀬 侑 (豊橋技術科学大学環境生命工学系)

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)

後期新規採択課題

▶▶ 簡易迅速診断に向けた
ウシ子宮外組織における妊娠特異的遺伝子の探索 ◀◀

ウシの妊娠初期には、インターフェロン τ (タウ) (IFN τ) と呼ばれる反芻動物特有のサイトカインが着床前胚から子宮内に分泌され、妊娠認識 - 着床へと進行する。IFN τ の産生量は授精後 17 から 18 日に最大となる。IFN τ は、I 型 IFN 受容体 1, 2 を介して母体子宮に働き、IFN 誘導性因子 (ISGs) を発現させる。そのため、子宮内膜組織における ISGs の発現を調べることは、子宮内の胚からの IFN τ 分泌を判定する指標となり、不受胎後、最初の発情回帰予定日 (20-22 日前後) が来る前に受胎産物の存在の有無を確定できる。すなわち、不受胎をいち早く発見し、速やかに次の授精を行うための、「非妊娠」判定が可能となる。不受胎牛を早く判別し、早期の授精処理を実施することで近年 50% を下回り、非常に深刻化している受胎率低下対策としての一助につながる。

しかし、妊娠牛の子宮組織の採取は非常に困難であると共に胚への悪影響が懸念される。一方、近年、末梢血の白血球で妊娠時に ISGs 発現の増加が報告され、血液サンプルからの ISGs 発現検出による早期妊娠判定技術の開発につながる画期的手法とされている。しかし、血液採取、処理から解析までの作業や妊娠 - 非妊娠の ISGs 発現量差が数倍程度であると共に、発現量のばらつきが多いなどの懸念があることから、サンプルの採取、解析の簡易化、効率化が依然として求められている。

これまでの国内外の研究展開は、「胚からの IFN τ 」→「子宮」→「血流」→「抹消血液細胞」との傍分泌、内分泌的な伝達を中心に実施されてきた。これに対して、私たちは「子宮」→「頸管」→「外子宮口」の接続基本構造に着目し、子宮頸管および外子宮

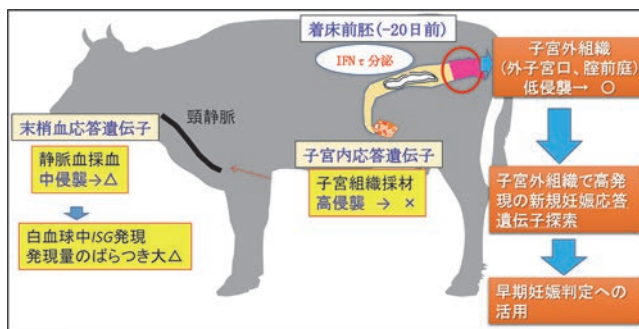


図 牛の妊娠における IFN τ 応答遺伝子の発現・検出と妊娠判定への活用

口周辺部組織にも子宮内に分泌された IFN τ の作用が及ぶ可能性を ISG15、MX1,2 遺伝子の発現上昇確認によって国内外初の知見として見いだした。そこで、本共同研究では、子宮外組織における新たな IFN τ 応答遺伝子群を網羅的に探索し、新たな低侵襲マーカーとして利用することで早期「非妊娠」診断技術開発のための基礎的知見を得ることを目的としたアプローチを進めている。

高橋昌志 (北海道大学大学院農学研究院)

共同研究先: 小川英彦 (応用生物科学部)

小林久人 (生物資源ゲノム解析センター)

浜口 悠 (生物資源ゲノム解析センター)

▶▶ 既知の受容体を介さない植物のキチンに対する応答機構の解明 ◀◀

様々な生理機能をもつ天然の多糖「キチン」は、植物の病害抵抗性を誘導するエリシターとしての機能が広く知られており、植物病理学分野においてキチンに対する応答機構が精力的に研究されてきた。また、キチンを植物に処理することで成長が促進されることも報告されている。高分子キチンは水に不溶であるため研究にそのまま用いることが困難であるが、ナノファイバー化することで水に分散可能になるため、高分子のまま均一に処理することが可能である。これまでに、キチンをナノファイバー化することで、エリシター活性と病害抵抗性誘導能だけでなく (Egusa et al., 2015)、成長促進効果を増強できることを発見した。興味深いことに、キチンナノファイバーによる病害抵抗性誘導能と成長促進効果は既知のキチン受容体 CERK1 の機能欠損変異体においても観察されたが、キチンオリゴ糖処理では観察されなかった。これらの結果は、既知のキチン受容体を介さないキチン認識機構が植物に存在することを強く示唆している。キチンナノファイバーの処理による既知のキチン受容体を介さない反応を利用することで、既知のキチン応答機構とは完全に独立した、植物の新奇キチン応答機構が解明可能であると考えられる。

本研究では、従来のキチン類には無い機能をもつキチンナノファイバーを用い、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、既知の受容体を介さない植物のキチンに対する応答機構を解明することを目的とする。既知のキチン受容体の機能欠損変異体においてキチンナノファイバーによる成長促進効果が検証済みで、かつ既知のキチン受容体や下流のシグナル伝達経路が詳細に解析されているモデル植物のシロイヌナズナを用いた研究を行うことで、既知のキチン受容体を介さない、キチン認識に関わる未知のシグナル伝

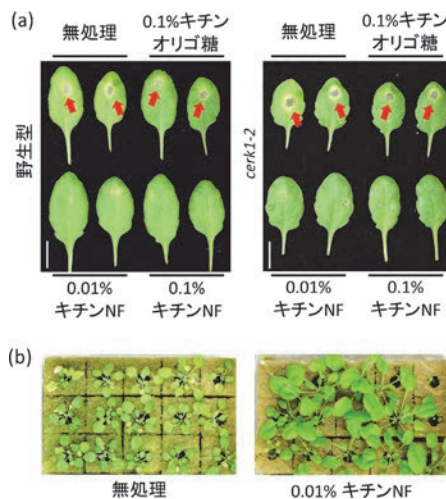


図 キチンナノファイバー (NF) 処理したシロイヌナズナにおける病害抵抗性誘導効果と成長促進効果

(a) アブラナ科黒すす病菌の接種結果 (矢印は病斑を示す)。
cerk1-2: キチン受容体 *CERK1* 変異体。(b) キチン NF 処理後 4 週間の *cerk1-2* 植物の様子。

達経路を効率的に明らかにできると期待される。

上中弘典 (鳥取大学農学部)

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)

肉用鶏と卵用鶏の骨格筋芽細胞における遺伝子発現の比較

健康志向の高まりなどから、日本の鶏肉生産量は増加傾向で推移しているが、国内で市販されている鶏肉の98%はブロイラーであり、その原種鶏はほぼ100%を輸入に依存している。鶏肉の安定供給という点で、我が国は危機的状況にあり、有用な国産鶏（地鶏）の開発が喫緊の課題となっている。

食肉となる骨格筋は、組織内に存在する幹細胞が活性化し、筋芽細胞と呼ばれる前駆細胞の増殖と分化によって形成される。白色レグホンなどの卵用鶏と比べ、ブロイラーなどの肉用鶏では、骨格筋線維の成長速度は2-3倍にも達する。このような顕著な筋形成の違いは、すなわち筋芽細胞の増殖・分化能力の違いによるものと考えられる。

我々は、肉用鶏および卵用鶏の骨格筋組織から採取した筋芽細胞の初代培養系を用いて、各筋芽細胞の性質を検討した。その結果、卵用鶏と比較して、肉用鶏の筋芽細胞は高い増殖・分化能力を示すことが明らかになった（図）。また、定量的PCRの結果、肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞では、骨格筋幹細胞の維持・分化に関与する複数の遺伝子の発現量が異なることもわかってきた。

本プロジェクトでは、肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞における遺伝子の発現を、筋分化の時系列を追って網羅的に定量し、肉用鶏で特徴的な発現パターンを示す遺伝子群を同定する。同定した遺伝子群は、地鶏の品質検定に有用なマーカーとなることが期待される。これらの情報が、肉用鶏のさらなる飼料効率の改善や、新品種の育種・開発につながればと考えている。

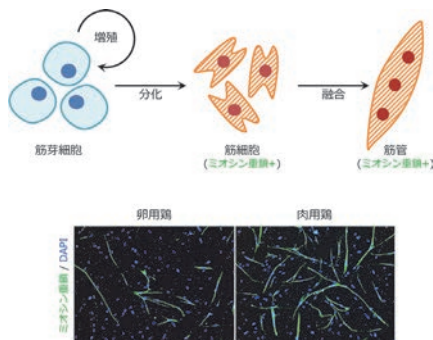


図 肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞の分化能の比較

また、肉用鶏の旺盛な筋形成に関わると予想される遺伝子群は、ヒトの加齢性筋萎縮（サルコペニア）の予防や治療にも重要な知見をもたらすと予想される。本プロジェクトの成果から、分野横断的な研究テーマも発展させていきたい。

高谷智英（信州大学農学部）
 鏡味 裕（信州大学農学部）
 二橋佑磨（信州大学大学院総合理工学研究所）
 共同研究先：河野友宏（応用生物学部）
 小林久人（生物資源ゲノム解析センター）

イネの収量性を増大させる新規脱粒性遺伝子の単離と種子脱離現象の解明

イネの脱粒性とは穂から種子が脱粒する性質であり、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ある。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るから、重要な農業形質の1つであると考えられる。本研究では、イネの脱粒性遺伝子 *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で脱粒性の原因となる新規な変異の絞り込みを行うことを目的とした。

新規イネの脱粒性遺伝子の単離を行うため、次世代シーケンサーを用いて、野生型と難脱粒性突然変異型との多型部位の検出を行い、候補遺伝子の絞り込みを行った。ハイオインフォマティクス解析の結果、マッピング率は85-87%という比較的高いマッピング率であった。Referenceと野生型が同じ多型を示し、突然変異体4系統が多型を示すサイトに注目したところ、野生型と変異型の22,996個の多型部位を検出することができた。染色体毎に見ると、約1,500個から

2,000個とかなり散在していることが分かった。ゲノム全体のカバー率は97%を示していることから、かなりの領域をカバーできたことが分かった。次にreference genomeのアノテーションデータを用いた多型の影響を考慮し、遺伝子領域内や exon-intron boundary に落ちる多型について抽出したところ、493箇所まで絞りこむことができた。今後、野生型と難脱粒性突然変異型とのF2個体を用いたMut-map解析を行うことで標的領域の絞り込みを進めていきたい。

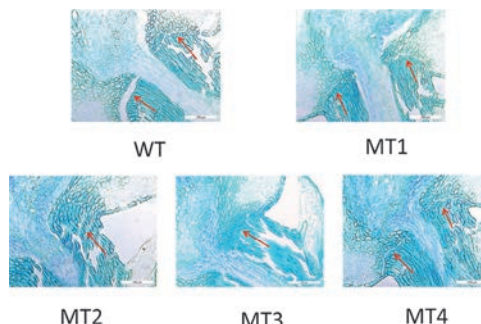


図2 野生型と難脱粒性変異体の離層部位の比較

NIL (*qSH1*) の野生型と難脱粒性変異体の種子基部の縦軸方向の切片を作成し、離層部位の比較を行った。野生型 (WT) では、赤矢印で示した部位に離層の形成が起こり、その後、離層が崩壊した様子が観察された。難脱粒性変異体 M2 および M3 では、赤矢印で示した部位に野生型で生じた離層が全く形成されていなかった。難脱粒性変異体 M1 および M4 では、赤矢印で示した部位に離層の形成が見られた。しかし、野生型に見られるような離層の崩壊は見られなかった。

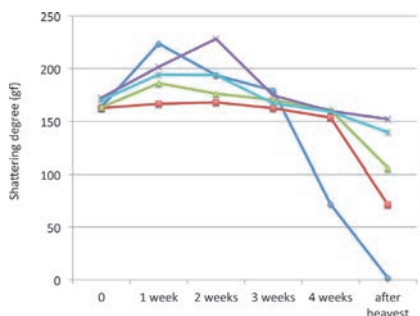


図1 野生型と難脱粒性変異体の種子脱粒性の経時的な変化

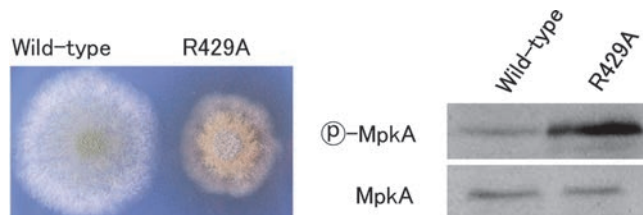
NIL (*qSH1*) の野生型 (WT) と難脱粒性突然変異体 (MT1~MT4) の経時的な種子脱粒性の変化を調べた。出穂から1週間毎に穂を1穂収穫し、穀粒脱粒性試験装置を用いて先端の10粒について種子が外れるときの引っ張り強度を調べた。数値が小さいほど脱粒しやすいことを示す。

杉田(小西) 左江子（香川大学農学部）
 田中 剛（農研機構・次世代作物開発研究センター）
 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）

▶▶ 菌類を用いた脂質生産の基盤となる脂質合成・代謝制御機構の研究 ◀◀

脂質には、栄養・保健食品、医薬品、化学工業の原料などとして多様な用途があり、強力な脂質生産能を持つ糸状菌や酵母等の菌類を用いて有用脂質の生産の試みがなされている。脂質の高生産には膜に対するストレスの発生が伴うことから、より効率的な脂質生産系の構築のためには、脂質の合成と代謝を理解するだけでなく、様々な膜ストレスに対する応答と脂質合成、代謝関連遺伝子の制御機構を解明し、それをコントロールする必要がある。菌類における脂質の合成と代謝の制御機構に関しては、モデル酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において詳細な解析が行われているが、糸状菌や他の酵母においては未解明な点が多い。*S. cerevisiae* は、脂質を合成する能力や蓄積する能力が低く、また脂質の合成と代謝の制御に関しては他の多くの菌類とは異なる機構を持つことから、菌類を用いて脂質生産を図る場合には、実際に脂質生産に用いる菌類において脂質の合成と代謝制御機構を解析する必要があると考えられる。

本研究では、菌類を用いた有用脂質生産系の基盤となる知見を得るため、脂質生産の宿主としての可能性を持つ糸状菌のモデルである *Aspergillus nidulans* において、①様々なストレスに応答するシグナル伝達経路で中心的な役割を果たすプロテインキナーゼ C (PKC) の制御下にある脂質合成関連遺伝子の RNA-seq 解析による網羅的同定と解析、②リン脂質合成欠損株において発現が変動する遺伝子の RNA-seq 解析による同定と解析を行う。また、*n*-アルカンの生物変換および脂質生産に実績がある油糧酵母 *Yarrowia lipolytica* において、③ *n*-アルカンに対する応答と *n*-アルカンに対する吸着に関わる転写因子の制



活性化型プロテインキナーゼ C を高生産できる *Aspergillus nidulans* 株 (R429A 株) の表現型

(左) R429A 株の生育 (右) 細胞壁の完全性を維持する経路において PKC の下流で機能する MAP キナーゼ (MpkA) のリン酸化レベル R429A 株では PKC 活性の人為的な亢進により生育に遅れがみられ、下流で働く MAP キナーゼのリン酸化レベルにも亢進がみられる。

御下にある遺伝子の RNA-seq 解析による同定と解析、④ *n*-アルカンに対する応答と *n*-アルカンに対する吸着に欠損を持つ変異株およびその復帰変異株の変異点のゲノムリシーケンシングによる特定を行う。これらの解析により、菌類における脂質の合成と代謝の制御機構とその意義を明らかにしたいと考えている。

堀内裕之 (東京大学大学院農学生命科学研究科)

共同研究先: 志波 優 (生命科学部)

兼崎 友 (生物資源ゲノム解析センター)

▶▶ 生態系を駆動する遺伝子：徹底的トランスクリプトーム比較による寄生者ハリガネムシの宿主操作遺伝子の特定 ◀◀

今日地球上で知られている生物種の約 40% は、他の生物に寄生して生活している、いわゆる「寄生生物」である (Dobson *et al.* 2008 PNAS)。それら寄生生物については、既存の農学研究では、人類にとって有用な農林水産生物に寄生して負の影響を及ぼす病原生物として扱われることがほとんどである。しかし、自然界で、寄生生物が農林水産生物に及ぼす影響は、多様な生物間相互作用を介して規定されており、必ずしも負の影響だけではない。

私たちは、ハリガネムシ類 (寄生生物) が陸生昆虫 (終宿主) の入水行動を生起して河川に飛び込ませると、終宿主がサケ科魚類 (水産重要魚種) の極めて重要な餌資源になるという生態現象を発見し (Sato *et al.* 2011 Ecology; 図 1)、寄生生物が生態系において果たす新たな役割として世界に先駆けて発信してきた。先行研究では、ハリガネムシの宿主操作時期と対応した宿主の異常行動・正の走光性の発現、およびそれらと関連するタンパク質の存在が報告されている (図 1)。したがって、私たちが発見した生態現象を駆動する陸生昆虫の入水行動が、ハリガネムシ類の遺伝子発現要素に起因することは、ほぼ間違いない。

そこで本研究では、ハリガネムシ類 (*Chordodes fukuii*) の室内飼育系を確立し、入水行動の生起前・中・後に (図 1)、ハリガネムシとその宿主 (チョウセンカマキリ *Hierodula patellifera*) で発現量に変化する遺伝子を網羅的に探索することで、宿主操

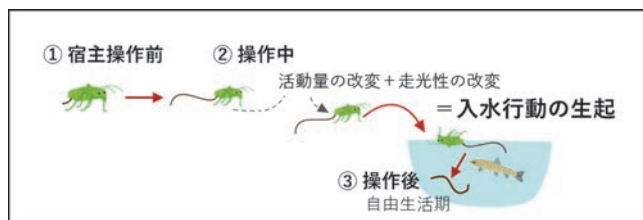


図 1 ハリガネムシによる宿主操作の概念図

先行研究では、異常行動による活動量の上昇と正の走光性の発現によって、入水行動が生起されると推察されているが、その因果関係を示した研究はない。

作の分子メカニズムの解明を進める。本研究が進展すれば、寄生生物の有する遺伝子の発現が、宿主との生物間相互作用の成立を介して、水産重要魚種の大型魚の創出や個体数維持といった高次の生態現象に帰結する仕組みを理解する道を拓く、大きな手掛かりになると期待される。

佐藤拓哉 (神戸大学大学院理学研究科)

共同研究先: 佐々木剛 (農学部)

内山博允 (生物資源ゲノム解析センター)

▶▶ イネの種子数を決定する TAW1 遺伝子の分子機能解析 ◀◀

植物は、成長ステージを切り替えながら成長する。特に、栄養成長期から生殖成長期への切り替えは劇的な転換であるが、これ以外にもさまざまな成長ステージの切り替えが起こっている。成長ステージ切り替えのタイミングは植物の形態を決定する重要な要因であり、したがって繁殖を左右する。私たちは、成長ステージ切り替えメカニズムに興味をもち、イネを研究対象にし、成長ステージ進行と形態とをつなぐ遺伝子の機能を解析してきた。

イネ穂の形成においては、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。TAW1 (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1)。TAW1 は DNA 結合タンパク質をコードしており、転写因子として機能すると考えられているが、実際にどのような遺伝子 (直接の標的遺伝子) の転写を制御するのかわかっていなかった。私たちは TAW1 の分子機能を解明するためには直接の標的遺伝子の単離が不可欠であると考え、この点に関して東京農業大学との共同研究を進めている。2017 年度には、生物資源ゲノム解析センターにおいて、ChIP-seq 法により TAW1 が結合する DNA 領域の網羅的配列決定を行った。その結果、TAW1 が 5,000 以上のゲノム領域に結合することが明らかになり、DNA 結合タンパク質であることを証明できた (図2) さらに、枝分かれを促進する遺伝子と花芽形成を促進する遺伝子の両方に結合し、前者に対しては発現を促進し、後者に対しては発現を抑制することにより、

穂形成において成長ステージを引き延ばす方向に働くことが示された。また、TAW1 の直接の標的遺伝子には興味深い機能をもつものが多く、この成果をもとにさらに TAW1 の機能解析が進展するものと期待される。



◀ 図1 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。

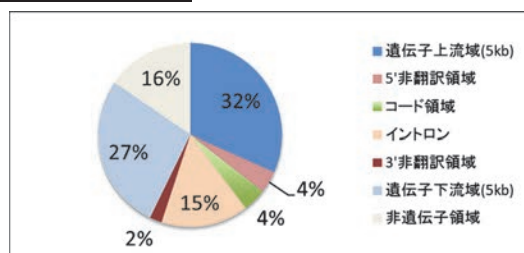


図2 TAW1 結合配列の分類。TAW1 はイネゲノム上の 5000 以上の領域に結合する。これら結合配列の 80% 以上が遺伝子領域 (遺伝子上流域と下流域を含む) に存在することが分かった。これは、TAW1 が下流遺伝子の転写を制御するという予測を支持する。

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)

▶▶ 黒毛和種肥育牛の肥育状態を生体評価する血中バイオマーカーの開発 ◀◀

米国などとの二国間交渉 (FTA) や新たな枠組みの TPP の発効が現実的になる中で、外国産牛肉に負けない国産牛肉の生産体制を構築するため、高品質な和牛肉の安定的な生産を保障する新たな技術の開発が求められている。脂肪交雑に代表される黒毛和種の優れた産肉成績は、個体の遺伝的能力と農家の飼養管理とによって生み出される。しかし多くの農家は、枝肉になるまで肥育牛の出来具合 (肥育状態) を知る事が出来ない。もし牛の肥育状態を肥育期間中に把握することができれば、農家は需要に沿った肥育状態の牛の選択的出荷や、肥育状態に基づいた飼養管理の改善が可能になり、高品質な牛肉を安定的に生産できるようになると期待される。

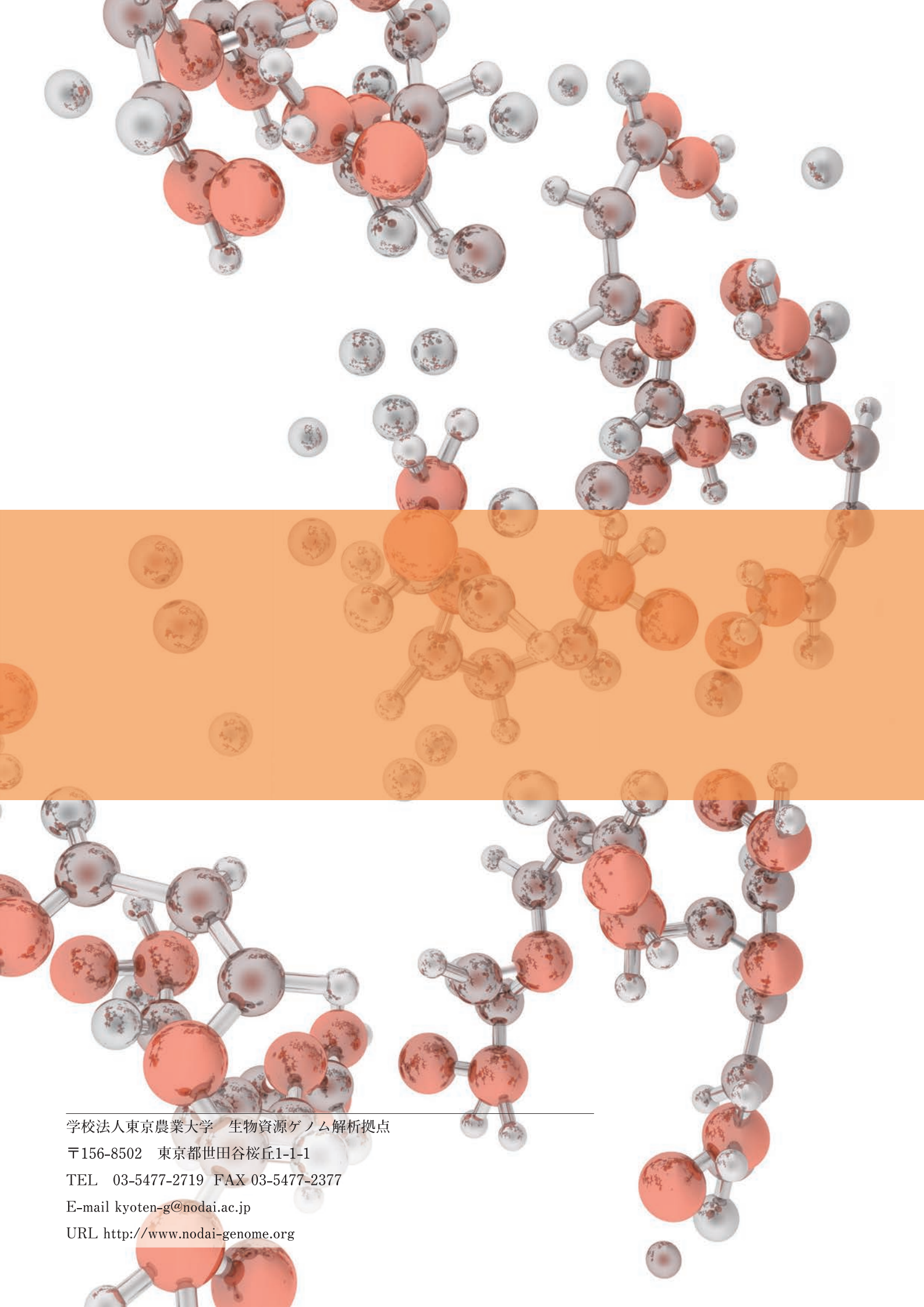
そこで申請者らは、牛の肥育状態を生体評価する肥育バイオマーカーの開発を目的に、血中のエクソソームに含まれるマイクロ RNA に着目して研究を開始した。マイクロ RNA は、ゲノム上の非コード領域から合成される比較的新しく見つかった短鎖 RNA であり、共通配列を持つ複数の伝令 RNA (mRNA) に結合してその発現を制御する。特にがん研究ではがん細胞の種類によって特徴的なマイクロ RNA が合成され細胞外に分泌されることから、新たな生体内バイオマーカーとして注目され、既に一部はがんマーカーとして実用化されている。本研究では、黒毛和種から肥育期間中に経時採血した血液を用いてマイクロ RNA の網羅的解析を行い、黒毛和種の枝肉成績と関連する血中マイクロ RNA の同定を目指す。肥育前期、肥育中期および時期間の血中マイクロ RNA 量やその変化に着目して、枝肉形



図 黒毛和種去勢肥育牛

質と関連するマイクロ RNA を探索する。肥育状態を反映する肥育バイオマーカーマイクロ RNA が特定されれば、肥育牛の生体評価により時期出荷の判断や飼養管理の改善が可能となり、将来的には安定的かつ効率的な高品質和牛肉生産システムの構築が期待される。

松橋珠子 (近畿大学先端技術総合研究所)
松本和也 (近畿大学生物理工学部)
大林賢伍 (岐阜県畜産研究所)
共同研究先: 平野 貴 (農学部)
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>