

生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター No. 9

NGRCニュース No. 13

東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター

2021年度



Physcomitrium patens

CONTENTS

巻頭言	2
生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター	3
<hr/>	
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	5
生物資源ゲノム解析センター 情報発信活動	6
生物資源ゲノム解析センターによる研究実績	8
2021年度 研究発表実績	10
2021年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧	12
無限分裂細胞技術を用いた疾病メカニズムの解明	14
アマノリ類における RNA-seq 解析	15
酵母リボソーム結合タンパク質の新規機能探索	16
根粒共生における宿主特異性因子の同定	17
大気中二酸化窒素による植物成長促進	18
次世代シーケンサーによるゴルフ場グリーンの微生物叢解析	19
緑藻の炭素、窒素ならびにイオウ欠乏応答に関わるタンパク質	20
アブシシン酸応答を負に制御する SNS1 のクロマチン制御領域の解明	21
プラスミド・宿主染色体間相互作用の構築に重要な核様体タンパク質 Pnd の結合箇所の解析	22
毒腺トランスクリプトーム情報をもとにしたエジプト生息種サソリ毒からの新奇殺虫性ペプチドの探索	23
De novo ゲノム解析と細胞工学を利用したマメ科木本植物イナゴマメの遺伝子機能開発と利用	24
農耕地周辺環境における植物病原性卵菌類の分布特性の解明と病害リスク評価	25
アブラナ科野菜における根茎肥大組織の着色メカニズムの解明	26
ミンクジラ由来の SV40 および変異型 CDK4、サイクリン D、テロメア逆転写酵素を用いた無限分裂細胞の網羅的遺伝子解析	27
枯草菌のグルコースによるマンガニンイオン濃度制御機構の研究	28
「環境循環型メタノール」の実践的活用に向けた高メタノール環境適応型 C ₁ 酵母の戦略的種	29
魚類において非還元配偶子形成を引き起こすゲノム間の構造的異質性の解析	30
活動量の異なる害虫系統間のトランスクリプトームおよび Resequencing 解析	31
Flexible ddRAD-Seq 法によるアワ在来品種及びエノコログサ遺伝資源の多様性解析	32
食品添加物ミョウバン刺激後に腸上皮細胞に侵入して炎症性細胞死を誘導する腸内マイクロバイオームへ抗生剤が与える影響の 16S rRNA メタゲノム解析	33
ステロイドホルモンが惹起する根の形態形成メカニズムの解明	34
霊長類モデルを用いた腸内化学感覚受容メカニズムの解明	35
<i>Gluconobacter japonicus</i> の細胞内代謝工学研究- <i>G. japonicus</i> における細胞内グルコース代謝の理解	36
リンドウ葉枯病菌の感受性誘導に関与する宿主植物因子の探索	37
ジャガイモの有用色素生産代謝変化に資するゲノム変異解析	38
老化がマウス卵母細胞の微小環境を構成する体細胞のトランスクリプトームに及ぼす影響	39
植物の高湿度応答に関わる遺伝子の探索	40
NGRC ニュースレター	41
<hr/>	
2021年度 学内公募一覧	43
精神疾患の分子メカニズムの同定を目的としたトランスクリプトーム網羅的解析	46
霊長類消化管単層培養系を用いたヒト腸内細菌成分が上皮細胞に与える影響の解析	48
機能性評価系として腸管オルガノイドを用いた分岐鎖アミノ酸の新たな機能の解明	50
多糖類を用いた卵子や胚の体外発育培養方法の開発	52
レプチンシグナルに着目したメタボリックシンドロームにおける皮膚機能脆弱化の分子機構の解明	53
マウス栄養外胚葉において <i>Cdx2</i> 発現を制御する新規分子機構の解明	54
<i>Callosobruchus</i> 属マメゾウムシの嗅覚受容に関与する分子群の推定と比較解析	56
マメコガネ (<i>Popillia japonica</i>) の嗅覚受容関連遺伝子の探索	58
MiCAPs 法を用いたゲノムワイドマイクロサテライト解析に基づく日本鶏の集団遺伝学的研究	59
ヒメツリガネゴケにおける赤色光を介した低温順化制御機構の解析	61
長期高温感受性変異株 <i>sloh5</i> の原因遺伝子同定と機能解析	62
日本原産セリ科植物アシタバ (<i>Angelica keiskei</i>) のゲノム解読	64
キチン処理により細胞死するヒメツリガネゴケ変異体 <i>ccd1</i> の原因遺伝子探索のためのゲノムリシーケンス	66
塩生植物の根圏微生物叢の解析	67
<i>Sporidiobolales</i> 目酵母の再分類：ドラフトゲノムデータに基づく系統関係の解明および表現型の探索	68
酢酸菌 <i>Acetobacter pasteurianus</i> の酢酸発酵時における	
エタノール・グルコース資化に関する代謝調節機構の解明	70
シアノバクテリア <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 のゲノム解析 2021	
〜リシーケンスから明らかとなったラボストレインのゲノム多様性〜	72
温泉水からのポリエステル合成好熱菌の取得解析	74
真核生物に保存された FKBP12 タンパク質の転写因子としての機能解明	76
シイタケ腐敗病原細菌の病原因子生合成遺伝子の推定	78
微細藻類の新規な光酸化ストレス防御タンパク質の同定	80
微生物と植物における遊離フラビン関与の鉄代謝	82
研究発表実績	84

巻頭あいさつ

平素より東京農業大学 生物資源ゲノム解析センターの運営にご支援を賜りまして感謝申し上げます。

昨年度のニュースレターでは、コロナ禍の影響を大きく受けることになりました、と書き出しました。その時点では予想がつきませんでした。その後も世界的なコロナ感染の状況は何度かの波を繰り返しながら、現時点でもまだ収まる兆しが見えておりません。しかしながら、その中でどのように社会活動を継続するかについて試行錯誤が続くなか、2021年度はゲノムセンターも研究の推進を止めないことに努めてきました。一方で、本センターの活動で重要な位置を占める拠点活動においては、日本各地の研究代表者の置かれた状況下で、予定通りに研究が進んでいないというご連絡も頂いております。さらに、世界的な物流網の混乱もあり、海外からの輸入に頼る試薬の入手にも影響がでています。

このような逆風の状況下ではありますが、研究に対する皆さんの思いには、今までの遅れも取り戻そうという勢いを感じております。おかげさまで2021年度もニュースレターを取りまとめることができました。ご協力に感謝申し上げます。

次世代シーケンサーが新技術といわれなくなり、一時の新機種ラッシュも収まるなかで、この技術を実験の一部に取り入れることは普通になりました。解説書、実験書も多く出版されています。しかし、未経験であったり、新たにテーマを立ち上げた若手研究者にはそれなりにハードルが高いと考えられることから、共同研究拠点課題の公募では、一部優先的な採択を提供し活動を支援しています。

また、学内では、データ解析においてGUIベースの解析ソフトウェアをセンターにて提供することにより、通常のパソコンソフトウェアを使う感覚で学生にも解析を行ってもらえるようにしています。

さらに、リモートワーク普及の波にのり、本センターでも情報発信活動の一環として、共同研究公募の際にはオンライン説明会を開催する、さらにはNGRCセミナーとして9回にわたる一連の技術セミナーを開催し、学内外から多くの参加を頂きました。

2019年度に再認定をうけ、第二期の活動を始めた特色ある共同利用・共同研究拠点も3年が過ぎ、2022年度には中間審査をうける予定です。このタイミングも踏まえセンターでは今年度に新たにイルミナ社製NextSeq1000を導入し、シーケンス量増大への対応と効率化を図っています。これらの体制構築と共にさらに活動を活性化するためにも、今後も学内外研究の支援とともに技術の普及をはかり関連研究分野の発展に貢献する活動を続けて参ります。引き続き、ご支援のほどよろしくお願い申し上げます。

生物資源ゲノム解析センター長
矢嶋俊介



NextSeq 1000

生物資源ゲノム解析拠点 ニュースレター

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

2022年3月号

共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」 生物資源ゲノム解析センターの運用実績

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターは、文部科学省の認定を受け、生物資源ゲノム解析拠点の運用を開始してから9年、今年度は2期目に入ってから3年目の活動となりました。本拠点は、我が国の農学分野を中心とする新たな研究領域の開拓を図り、本学と学外の研究者間における共同研究を対象に、今日では多くの研究分野で活用されている次世代シーケンサー（NGS）を利用した遺伝情報解析を支援しています。また、この支援活動では、学内ー学外間で研究者同士の新たなコミュニティの創成、さらには農学分野で遺伝情報解析を介した研究を担う人材育成に貢献することも目指しています。

当センターは、Illumina社のNGSを5台（HiSeq 2500、MiSeq 2台、NextSeq 500、NextSeq 1000）、解析サーバーを9台設置しており、ライブラリー調製からシーケンサーのオペレーション、データ解析までを一貫して行える研究員が常勤しています。各研究員は、それぞれ専門分野を中心に微生物から高等な動物植物まで多岐にわたる生物種を対象に、ゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム、およびメタゲノムなど様々な解析目的の研究課題に対応できる体制となっています。

令和3年度は、27件の研究課題に対して解析支援を実施しましたが、これまで通り多くの研究者の方々から農学分野において重要な生物を対象とした様々な研究課題の申請があり、採択件数は初年度から累積すると310件を超えました（図1）。そして、今年度の採択課題の対象生物種には、動物、植物、微生物のほか、環境サンプルも含まれました。また、解析手法別にまとめると、これまでと同様に今年度も網羅的な発現量解析を目的としたRNA-seqを用いた課題が最も多く、次いで全ゲノム中の変異解析を目的としたResequencingを用いた課題が対象となりました（図2）。そのほか、特定の空間における菌叢プロファイリングを目的としたMetagenome、遺伝子発現制御について解析することを目的としたChIP-seq、ゲノム情報が解読されていない非モデル系生物を対象としたDe novo DNA-seqやDe novo RNA-seq、集団遺伝学的な解析を目的としたRAD-seqを用いた課題が対象となり、これまでの解析支援による経験を十分に活かした対応を行うことができました。

今年度は、高い汎用性を伴うシーケンサーNextSeq 1000を新たに導入したことで、さらに充実した解析環境へと整備されました。さらに、オンラインセミナーの開催や当センターの見学案内により、多くの研究者に対してNGS解析に関わる技術や研究紹介を行うことができました。今後も、共同研究や情報発信を通して学内外の研究者間の交流を深め、NGSを用いた研究に貢献できるよう取り組んで参ります。

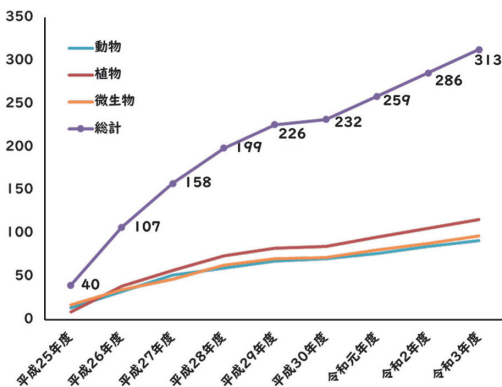


図1 共同利用・共同研究課題件数（累積）

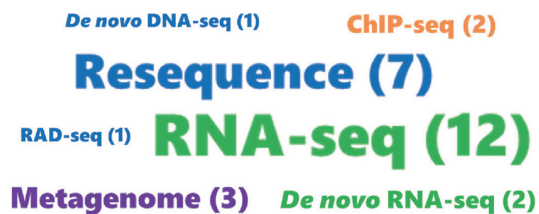


図2 共同研究課題における解析手法

各解析手法の括弧内には、課題件数を示す。DNAベースによる解析を青字、RNAベースによる解析を緑字、メタベースによる解析を紫字、エピゲノムベースによる解析を橙字で示す。

（生物資源ゲノム解析センター 田中啓介）

生物資源ゲノム解析センター 情報発信活動

当センターでは、解析支援業務のほか次世代シーケンサー (NGS) やデータ解析に関する知見を深めること、および研究者コミュニティの拡大を目的として、セミナー開催などを通じた積極的な情報発信活動を推進しています。今年度は、新型コロナウイルスの蔓延により東京都をはじめとした多くの都道府県においてまん延防止等重点措置が発令された影響もあり、昨年度に引き続いて対面ではなくオンラインでのセミナー等の情報発信活動を実施いたしました。

まず、昨年度に続き、当センターの共同利用・共同研究拠点「生物資源ゲノム解析拠点」のオンライン説明会を実施いたしました (図 1)。この試みは、これまで NGS に馴染みがなかった研究者に向けた新規応募の獲得にもつながります。今年度は、2021 年度 (後期) の公募に関する説明会として、2021 年 7 月 13 日と 2021 年 7 月 16 日に、2022 年度 (前期) の公募に関する説明会として 2021 年 12 月 23 日と 2022 年 1 月 11 日に、各 2 回ずつの計 4 回実施し、それぞれ多数の研究者にご参加いただきました。社会情勢等により大人数による対面での説明会が難しい状況ですが、Zoom などの Web 会議システムを活用することにより東京から遠く離れた研究施設および大学に所属する研究者に対しても一定の啓蒙効果があったものと考えております。昨今の状況を鑑みるに、コロナ禍の影響は来年度以降も継続していくと想定されますので、今後も Web 会議システムを活用しながら、積極的に当センターの啓蒙活動を行なっていきたいと考えております。

また、今年度から新たに始めた取り組みとして、主に当センターの研究員が演者となり、2021 年 8 月より約 1 か月おきに計 9 回の NGRC セミナー 2021 を開催いたしました (表 1)。第 1 回から第 3 回までは当センターの概要や NGS の原理などについて紹介を行いました。特に、2021 年 9 月 30 日に開催した第 3 回「ライブラリー作製の選び方と注意点」では、シーケンスを実施するにあたって必要な作業となるライブラリー作製について解説し、さらに Lexogen 社の Ishita Sharma 氏からトランスクリプトーム解析に役立つ製品について、最新のテクノロジーなどを含めて講演いただきました。第 4 回から第 9 回は、データ解析編として当センター所属の研究員の専門分野をふまえた微生物ゲノム解析、メタゲノム解析、トランスクリプトームおよびエピゲノム解析などの NGS により得られる多様なデータに対する解析法を解説しました。

最近、当センター共同利用・共同研究拠点では、菌叢メタゲノム解析に関する応募がますます増えてきました。そこで、本拠点において共同研究を実施される学内の研究者にも理解を深めて頂くことを目指し、2022 年 1 月 13 日に本学生命科学部・分子微生物学科に所属の志波優准教授を講師として「QIIME2 ハンズオンセミナー 2021」を学内向けに開催いたしました。本セミナーは第 4 回 NGRC セミナー 2021 の「QIIME2 ソフトウェアを使ったメタゲノム (メタ 16S) 解析」にて紹介したメタゲノム解析ソフト「QIIME2」を実際に操作しながら解説するハンズオンセミナー (対面およびリモートによるハイブリッド形式) で実施し、多数の本学教員や学生に参加いただきました。対面でのハンズオンの開催を通して、体験学習型の機会を設けることの重要性・必要性が高いことを実感しました。

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



図1 拠点事業公募説明会

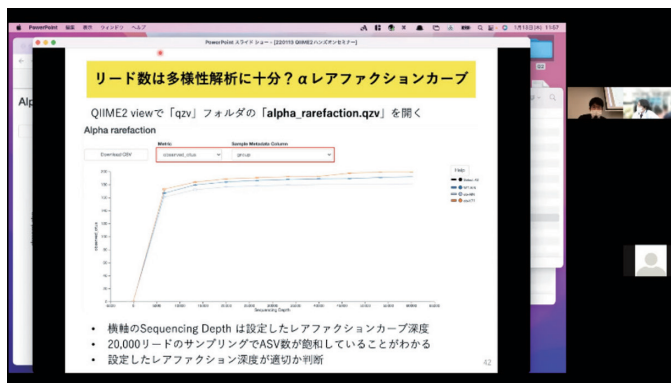


図2 QIIME2 ハンズオンセミナー 2021

表1 NGRC セミナー

回	テーマ	日時
1	NGS と生物資源ゲノム解析センターの紹介	2021年8月6日
2	DDBJ へのシーケンスデータ登録のポイント	2021年9月30日
3	ライブラリー作製の選び方と注意点	2021年10月8日
4	データ解析編 1 QIIME2ソフトウェアを使ったメタゲノム(メタ 16S)解析	2021年10月22日
5	データ解析編 2 CLC Genomics Workbench の使い方	2021年11月12日
6	データ解析編 3 バクテリアゲノム解析の実際 ~アノテーションから ANI の計算まで~	2021年12月17日
7	データ解析編 4 Rを使ったトランスクリプトーム解析	2022年1月28日
8	データ解析編 5 早い・安い・上手い RAD-seq と Microsatellite capture sequencing の紹介	2022年2月25日
9	データ解析編 6 エピゲノム解析の基礎	2022年3月11日

(生物資源ゲノム解析センター 松谷峰之介・隈本宗一郎)

生物資源ゲノム解析センターによる研究実績

当センターでは動物・植物・微生物と多岐にわたる生物種を対象に遺伝情報解析支援および情報発信活動を行うため、それぞれ異なるバックグラウンドをもった研究員が常勤しています。研究員は次世代シーケンサー (NGS) を用いた独自の研究も学内外の研究者と協力し展開しており、本年度も実りある研究活動を実施することができました。ここでは、東京農業大学、埼玉大学、北海道大学および東京農工大学との共同研究成果である「植物が乾燥と冠水という両極端の水環境を感知する仕組み」を明らかにした研究課題について紹介します。

現在、地球規模での異常気象が頻発し、同じ地域で日照りによる乾燥と長雨による冠水が引き起こされることが報告されています。今後、このような状況に置かれる地域の増加が懸念されています。これらの異常気象は作物の収量に甚大な被害を発生させることから、環境変動にも柔軟に対応できる作物育種への期待が高まっています。

そこで、本学及び埼玉大学を中心とする研究グループは、乾燥・冠水を繰り返す過酷な水環境を生き抜くコケ植物 (ヒメツリガネゴケ: 図 1) に着目し、植物が両極端な水利用環境情報を巧みに理解・適応する戦略の解明を試みました。水資源が制限される「乾燥」と植物体が完全に水に覆われる「水没」は、どちらも生命現象に異常をきたし、植物を枯死に導く強力な環境ストレスです。「乾燥」と「水没」に対応する応答機構はそれぞれ独立していると考えられており、乾燥応答は主に植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) を介して、水没応答は植物ホルモンであるエチレンを介して行われます。一方で、我々の研究グループはこれまでの研究において、コケ植物では乾燥と冠水の両応答に関わる因子として、RAF キナーゼ (キナーゼ: 他のタンパク質をリン酸化し情報を伝達するタンパク質) を新規に同定しました。しかし、RAF キナーゼが水環境を感知し、適切に ABA とエチレン伝達系を制御するメカニズムは不明でした。今回、多くの生物に存在し、バクテリアでは外部環境認識センサーとして働くヒスチジンキナーゼ (HK) に類似する構造を持ったエチレン受容体型ヒスチジンキナーゼ (ETR-HK) が RAF キナーゼのリン酸化状態を制御することで、エチレンによる冠水応答の制御のみならず、ABA による乾燥応答も制御することを見出しました (図 2)。すなわち、コケ植物において、ETR-HK/ARK モジュールが乾燥と冠水の両水環境を統合的に制御するメカニズムであることを解明しました。ETR-HK 及び ARK 遺伝子は作物にも存在しているため、今後、本研究の成果が乾燥と冠水の両方に対応可能な作物育種につながることを期待されます。

本研究は国際科学雑誌「*Current Biology*」に掲載されました。さらに本発表のプレスリリースが東京農業大学、埼玉大学、北海道大学および東京農工大学より共同で行われ、それに伴い、「日本経済新聞 電子版」、「日本農業新聞」で本研究に関する記事が掲載されました。各研究員が取り組む研究活動を通して、学内外の研究者の方との知識の共有・向上を促し、今後も NGS を用いて農学分野の発展を目指します。また、メディアを通じ広く一般の方にも当センターで得た知識の共有に貢献していきたいと思っております。



図1 ヒメツリガネゴケ

沼地などで生活する小型のコケ。背丈は数 cm のため、日照りによる「乾燥」と降雨による「水没」に繰り返し晒される厳しい環境を生き抜いている。

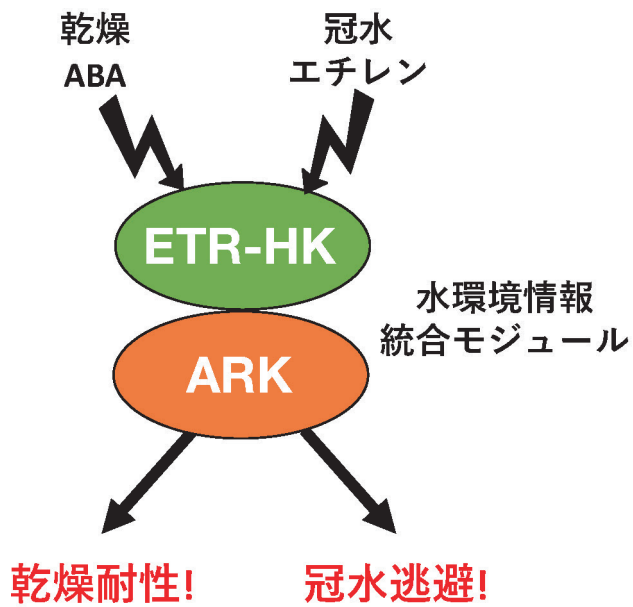


図2 統合的な水環境制御のメカニズム

エチレン受容体様ヒスチジinkinナーゼ (ETR-HK) が ARK を介してエチレン応答のみならず、ABA 応答も制御することを明らかとした。ETR-HK/ARK モジュールは乾燥と冠水という両極端な水環境を制御する統合モジュールとして働く。

(生物資源ゲノム解析センター 篠澤章久)

2021 年度研究発表実績

○論文発表

- **Tanaka K, Sasaki K, Matsumura K, Yajima S, Miyatake T.**
Genomic characterization between strains selected for death-feigning duration for avoiding attack of a beetle.
Sci. Rep. 11:21816. (2021)
- **Saijo Y, Loo E, Tajima Y, Yamada K, Kido S, Hirase T, Ariga H, Fujiwara T, Tanaka K, Taji T, Somssich I, Parker JE.**
Recognition of microbe/damage-associated molecular patterns by leucine-rich repeat pattern recognition receptor kinases confers salt tolerance in plants.
Mol Plant Microbe Interact. Epub ahead of print. (2021)
- **Mishina T, Takeshima H, Takada M, Iguchi K, Zhang C, Zhao Y, Kawahara-Miki R, Hashiguchi Y, Tabata R, Sasaki T, Nishida M, Watanabe K.**
Interploidy gene flow involving the sexual-asexual cycle facilitates the diversification of gynogenetic triploid Carassius fish.
Sci Rep. 11(1):22485. (2021)
- **Tomihara K, Satta K, Matsuzaki S, Yoshitake K, Yamamoto K, Uchiyama H, Yajima S, Futahashi R, Katsuma S, Osanai-Futahashi M, Kiuchi T.**
Mutations in a β -group of solute carrier gene are responsible for egg and eye coloration of the brown egg 4 (b-4) mutant in the silkworm, *Bombyx mori*.
Insect Biochem Mol Biol. 137:103624. (2021)
- **Uetake J, Tobo Y, Kobayashi S, Tanaka K, Watanabe S, DeMott PJ, Kreidenweis SM.**
Visualization of the seasonal shift of a variety of airborne pollens in western Tokyo.
Sci Total Environ. 788:147623. (2021)
- **Kunii H, Kubo T, Asaoka N, Balboula AZ, Hamaguchi Y, Shimasaki T, Bai H, Kawahara M, Kobayashi H, Ogawa H, Takahashi M.**
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and machine learning application for early pregnancy detection using bovine vaginal mucosal membrane.
Biochem Biophys Res Commun. 569:179-186. (2021)
- **Iyama S, Tatsumi H, Shiraishi T, Yoshida M, Tatekoshi A, Endo A, Ishige T, Shiwa Y, Ibata S, Goto A, Nagashima K, Horiguchi H, Fujita C, Ikeda H, Takada K, Nobuoka T, Kamihara Y, Kikuchi S, Sato T, Ohnishi H, Yokota SI, Kobune M.**
Possible clinical outcomes using early enteral nutrition in individuals with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A single-center retrospective study.
Nutrition. 83:111093. (2021)
- **Sakai S, Inoue Y, Tanaka K, Yamamoto Y, Iwata H, Kimura K.**
Hyperthermia alters interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide via endoplasmic reticulum stress in bovine endometrial cells.
J. Cell. Physiol. Online First. (2021)
- **Yoshida A, Taoka K, Hosaka A, Tanaka K, Kobayashi H, Muranaka T, Toyooka K, Oyama T, Tsuji H.**
Characterization of Frond and Flower Development and Identification of FT and FD Genes From Duckweed *Lemna aequinoctialis* Nd.
Front. Plant Sci. 12:697206. (2021)

- Akizawa H, Saito S, Kohri N, Furukawa E, Hayashi Y, Bai H, Nagano M, Yanagawa Y, Tsukahara H, Takahashi M, Kagawa S, Kawahara-Miki R, Kobayashi H, Kono T, Kawahara M.
Deciphering two rounds of cell lineage segregations during bovine preimplantation development.
The FASEB Journal 35:10. (2021)
- Tadokoro T, Tanaka K, Osakabe S, Kato M, Kobayashi H, Hogan BLM, Taniguchi H.
Dorso-ventral heterogeneity in tracheal basal stem cells.
Biol Open. 10:bio.058676. (2021)
- Fujito S, Akyol TY, Mukae T, Wako T, Yamashita K, Tsukazaki H, Hirakawa H, Tanaka K, Mine Y, Sato S, Shigyo M.
Construction of a high-density linkage map and graphical representation of the arrangement of transcriptome-based unigene markers on the chromosomes of onion, *Allium cepa* L.
BMC Genomics 22:481. (2021)
- Seki K, Komatsu K, Hiraga M, Tanaka K, Uno Y, Matsumura H.
Development of PCR-based marker for resistance to *Fusarium wilt* race 2 in lettuce (*Lactuca sativa* L.).
Euphytica 217:126. (2021)
- Ohhata T, Yamazawa K, Miura-Kamio A, Takahashi S, Sakai S, Tamura Y, Uchida C, Kitagawa K, Niida H, Hiratani I, Kobayashi H, Kimura H, Wutz A, Kitagawa M.
Dynamics of transcription-mediated conversion from euchromatin to facultative heterochromatin at the *Xist* promoter by *Tsix*.
Cell Rep. 34:108912. (2021)
- Akanuma G, Kawamura F, Watanabe S, Watanabe M, Okawa F, Natori Y, Nanamiya H, Asai K, Chibazakura T, Yoshikawa H, Soma A, Hishida T, Kato-Yamada Y.
Evolution of Ribosomal Protein S14 Demonstrated by the Reconstruction of Chimeric Ribosomes in *Bacillus subtilis*.
*J Bacteriol.*203(10):e00599-20. (2021)
- Fukunaga K, Abe A, Mukainari Y, Komori K, Tanaka K, Fujihara A, Yaegashi H, Kobayashi M, Ito K, Ohsako T, Kawase M.
Recombinant inbred lines and next-generation sequencing enable rapid identification of candidate genes involved in morphological and agronomic traits in foxtail millet.
Sci. Rep. 12:218. (2022)

2021 年度 共同利用・共同研究拠点採択課題一覧

前期採択課題一覧

1. 落合 謙爾 (岩手大学)
「iPS 細胞技術を用いた動物腫瘍の発癌機構の解析」
2. 二羽 恭介 (東京海洋大学)
「アマノリ類における RNA-seq 解析」
3. 赤沼 元気 (学習院大学)
「酵母リボソーム結合タンパク質の新規機能探索」
4. 川原田 泰之 (岩手大学)
「根粒共生における宿主特異性因子の同定」
5. 高橋 美佐 (広島大学)
「二酸化窒素による植物成長促進機構の解明」
6. 宇城 正和 (埼玉工業大学)
「次世代シーケンサーによるゴルフ場グリーン土壌の微生物叢解析」
7. 福澤 秀哉 (京都大学)
「緑藻クラミドモナスをモデルとした光合成生物の新奇硫黄欠乏応答機構の解明」
8. 梅澤 泰史 (東京農工大学)
「アブシシン酸応答を負に制御する SNS1 のクロマチン制御領域の解明」
9. 水口 千穂 (東京大学)
「プラスミド-宿主染色体間相互作用の構築に重要な核様体タンパク質 Pnd の結合箇所の解析」
10. 宮下 正弘 (京都大学)
「毒腺トランスクリプトーム情報をもとにしたエジプト生息種サソリ毒からの新奇殺虫性ペプチドの探索」
11. 日渡 祐二 (宮城大学)
「イナゴマメの *de novo* ゲノム解析に基づく細胞壁多糖類合成遺伝子の網羅的探索」
12. 日恵野 綾香 (岐阜大学)
「農耕地周辺環境における植物病原性卵菌類の分布特性の解明と病害リスク評価」
13. 高木 宏樹 (石川県立大学)
「アブラナ科野菜における根茎肥大組織の着色メカニズムの解明」

〈課題番号順〉

後期採択課題一覧

1. 福田 智一（岩手大学）
「ミンククジラ由来の SV40 および変異型 CDK4、サイクリン D、テロメア逆転写酵素を用いた無限分裂細胞の網羅的遺伝子解析」
2. 小倉 光雄（東海大学）
「枯草菌のグルコースによる細胞内マンガンイオン濃度制御機構の研究」
3. 中川 智行（岐阜大学）
「C₁ 酵母の高メタノール環境における代謝制御の分子メカニズムの解明」
4. 藤本 貴史（北海道大学）
「魚類において非還元配位子形成を引き起こすゲノム間の構造的異質性の解析」
5. 宮竹 貴久（岡山大学）
「活動量の異なる害虫系統間のトランスクリプトームおよび Resequencing 解析」
6. 福永 健二（県立広島大学）
「Flexible ddRAD-Seq 法によるアワ在来品種及びエノコログサ遺伝資源の多様性解析」
7. 若林 あやこ（日本医科大学）
「食品添加物ミョウバン刺激後に腸上皮細胞に侵入して炎症性細胞死を誘導する腸内マイクロバイオーームへ抗生剤が与える影響の 16S rRNA メタゲノム解析」
8. 大西 利幸（静岡大学）
「ステロイドホルモンが惹起する根の形態形成メカニズムの解明」
9. 今井 啓雄（京都大学）
「霊長類モデルを用いた腸内化学感覚受容メカニズムの解明」
10. 片岡 尚也（山口大学）
「*Gluconobacter japonicus* の細胞内代謝工学研究
-*G. japonicus* における細胞内グルコース代謝の理解 -」
11. 館田 知佳（奈良先端科学技術大学院大学）
「リンドウ葉枯病菌による感受性誘導に関与するリンドウ由来因子の探索」
12. 草野 都（筑波大学）
「ジャガイモの有用色素生産代謝改変に資するゲノム変異解析」
13. 田崎 秀尚（岡山大学）
「老化がマウス卵母細胞の微小環境を構成する体細胞のトランスクリプトームに及ぼす影響」
14. 安田 盛貴（奈良先端科学技術大学院大学）
「植物の高湿度応答に関わる遺伝子の探索」

〈課題番号順〉

◆◆◆ 採択課題研究紹介 ◆◆◆

前期採択課題

▶ 無限分裂細胞技術を用いた疾病メカニズムの解明 ◀

培養細胞は、疾病メカニズムを解析する上で非常に有用な研究ツールである。しかし、検体から直接採取された初代培養細胞では分裂回数が限られ、研究材料を長期間維持することができない。こうした中、Fukuda *et al.* (J. Biotechnol. 176:50-57,2014) により、変異型 CDK4、CyclinD1 とテロメア逆転写酵素の遺伝子を動物細胞に導入することで、元の細胞の性質を保持した無限分裂細胞の作製が可能となった。こうした無限分裂細胞技術は希少動物種の保存に応用されており、細胞の培養や保存が容易なことからこれら細胞の活用が期待されている。

我々は、家畜、犬、猫、鳥類の原因不明疾患の発症機序解明を目指し、無限分裂細胞技術を活用した動物腫瘍の解析を進めている。「若年性牛血管腫症」(図1)は子牛の稀な先天性血管異常で、その病理組織学的分類は曖昧で、発症機序も明らかにされていない。そこで、病理学的解析とともに腫瘍組織から樹立した無限分裂細胞を用いた遺伝子発現解析により原因遺伝子の探索を試みた。

検索に用いた腫瘍組織は、組織学的に大小の血管(図1の点線)を形成する血管内皮細胞と、これらに混在する平滑筋細胞から構成されていた。このことから、腫瘍細胞の由来は血管前駆細胞あるいはこれよりも未熟な中胚葉細胞と推察された。

この腫瘍組織から採取した初代培養細胞に、変異型 CDK4、CyclinD1 を発現させるベクターを導入し、無限分裂細胞を作成した(図2)。この無限分裂細胞を用いた RNA-Seq 解析から、ケモカインの発現量低下(図3)、アポトーシスを調節する遺伝子 *Tnfrsf6b* の過剰発現が明らかになった。これら蛋白質の発現と血管腫症との因果関係は、今後、該当遺伝子や蛋白質を対象とした機能解析が必要である。

以上のように、無限分裂細胞技術は動物疾病、特に稀な動物腫瘍の細胞レベルの解析を容易にする。同様の方法はこれまでの病理形態学の枠を超えた分子生物学的解析を容易とし、ヒトを含む動物の分子標的薬開発などに寄与できることから、今後の応用が期待される。

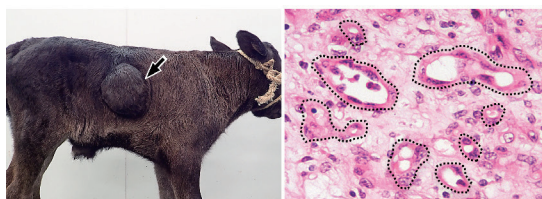


図1. 若年性牛血管腫の肉眼像(左、矢印)と組織像(右、血管(破線)と未熟な細胞の増生)

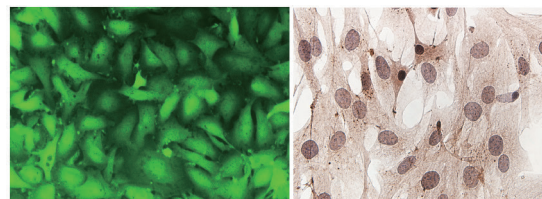


図2. 若年性牛血管腫に由来する無限分裂細胞
左: 蛍光顕微鏡像(レポーター遺伝子の発現)
右: 免疫細胞化学(血管内皮マーカー: vWF)

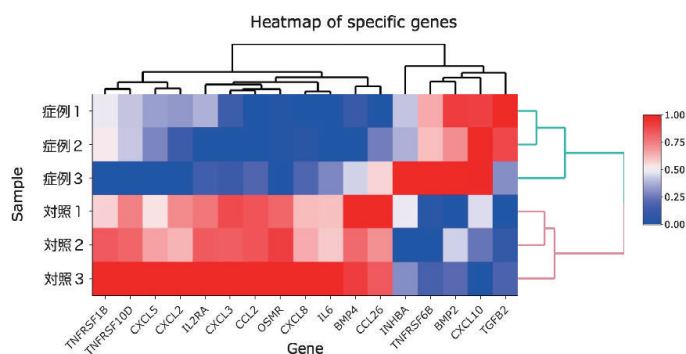


図3. RNA-seqによるヒートマップ

落合謙爾 (岩手大学農学部)
西浦 颯 (岩手大学農学部)
共同研究先: 平野 貴 (農学部)
隈本宗一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ アマノリ類における RNA-seq 解析 ◀

日本で養殖されている魚介藻類の中で、紅藻のノリは最も生産量が多く、そのほとんどは北方種のスサビノリである。しかし、近年、温暖化等の影響により養殖ノリの不作が深刻化している。このため、スサビノリに比べて南方に生育する野生ノリを収集し、育種素材として活用していくことも極めて重要である。

そこで、スサビノリに比べて南方に生育する野生ノリの探索を行ったところ、日本新産種を含めて複数の野生ノリが見つかり、いずれも雌雄異株であった。このうちの1種については、線形で色調の濃い葉状体であった(図 1a と b)。このため、この葉状体から系統保存できる糸状体株に分離し(図 1c)、同一条件下で葉状体を培養したところ、スサビノリの養殖株に比べて高水温耐性の特性を示し、育種素材として有望であることが明らかになった(Niwa et al. 2022)。しかしながら、通常、栽培化される前の野生ノリでは葉状体の稔性は高く、高水温耐性の特性を持った有望種でも同様の傾向が見られた。

ノリの葉状体は稔性が低いと多収性の優良形質になるため、野生ノリの稔性を人為的に低下させることが可能になれば、栽培品種として育成しやすくなる。このことからノリの性分化機構を解明することは育種学的にも極めて重要である。ノリの性分化に関する研究については、これまで養殖対象種のスサビノリを用いて一部行われてきたが、本種における性分化の分子機構についての知見はほとんど得られていない。また、スサビノリは雌雄同株のため雌雄分化に関する研究は行われていない。一方、収集した南方系野生ノリは雌雄異株であったことから、ノリの雌雄分化に関する研究に取り組むことが可能である。

本研究では、高水温耐性の特性を持つ雌雄異株ノリを用いて、成熟した雄性葉状体と雌性葉状体から mRNA を精製し、次世代シーケンサーを用いて発現している mRNA の塩基配列を網羅的に調べている。得られたデータから雌雄で異なる mRNA を明らかにし、雄性葉状体を雌性葉状体における生殖細胞の分化に関与する遺伝子群の特定を試みている。

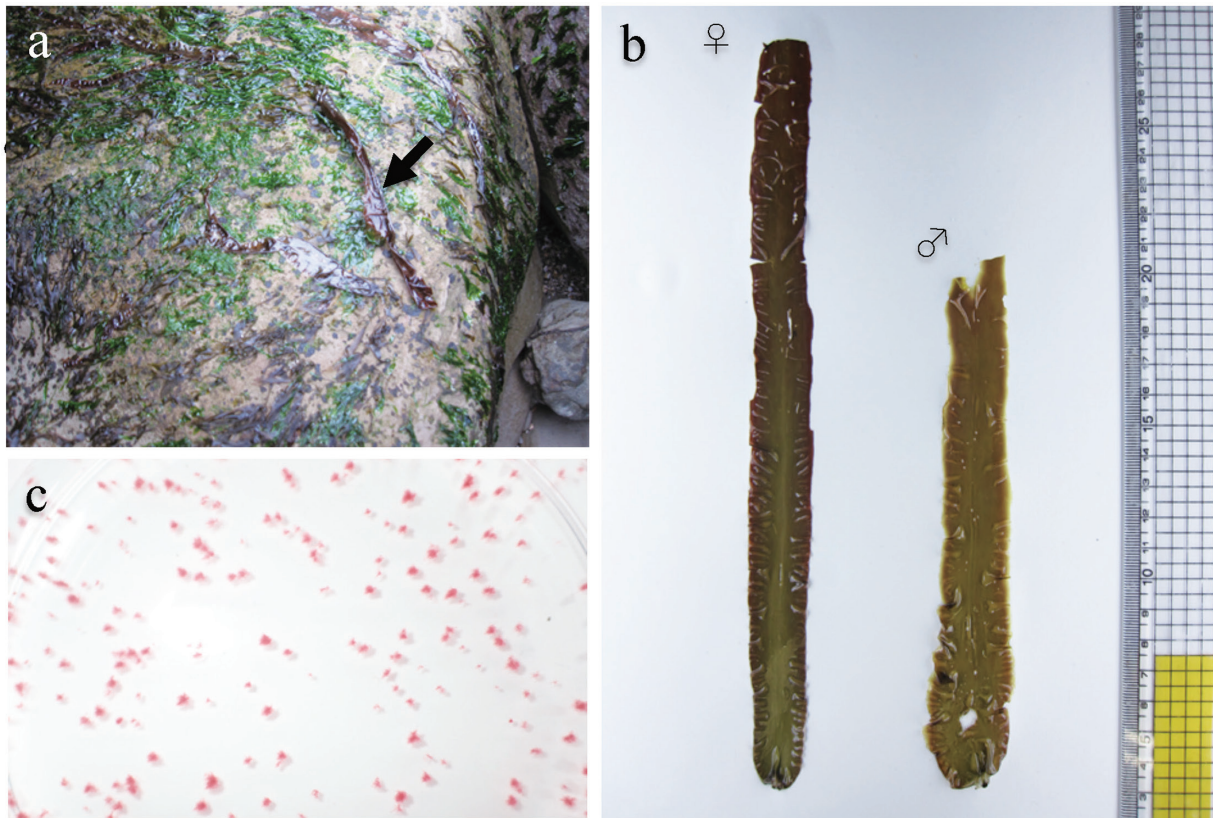


図 1 雌雄異株ノリの葉状体と糸状体

- a: 潮間帯上部に自生する雌雄異株ノリの葉状体 (矢印)
- b: 採集した雌雄異株ノリの葉状体 (左 雌性葉状体、右 雄性葉状体)
- c: 葉状体から分離した雌雄異株ノリの糸状体株

二羽恭介 (東京海洋大学海洋生命科学部)
 高木 優 (埼玉大学理工学研究科)
 高崎寛則 (埼玉大学理工学研究科)
 共同研究先: 市川 卓 (生物産業学部)
 田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 酵母リボソーム結合タンパク質の新規機能探索 ◀

生命活動に欠かせないタンパク質の合成（翻訳）を担うリボソームは、真核生物では4種のrRNAと約80種のリボソームタンパク質から構成され、40Sと60Sサブユニットが会合して翻訳活性を持つ80Sリボソームを形成する。翻訳の基本的な機構やリボソームの複合体構築過程に関しては古くから研究されており、その全容が明らかになってきた。その一方で、リボソームの翻訳活性調節やリボソームタンパク質個々の機能についての関心も高まりつつある。リボソームタンパク質にはパラログが存在するケースがあり、2種のパラログのうち一方がリボソームに結合する。従って細胞の中に存在するリボソームのタンパク質構成はリボソーム毎に異なり、パラログが存在するリボソームタンパク質が増えるほど組み合わせは複雑になる。パラログ同士が異なる機能を持つという報告もあるため、タンパク質の構成が異なるリボソームは活性や翻訳特異性も異なると考えられている。また、リボソームタンパク質が複合体の構造維持や翻訳以外の機能を持つことも分かってきた。例えば、リボソームタンパク質L6はRNAポリメラーゼに作用して転写を調節する機能を持ち、L32はmRNAのスプライシングに関与するという報告がある。細胞が環境ストレスを受けた際には、リボソームの新規構築が一時的に抑制され、過剰に存在するリボソームタンパク質が翻訳外機能を発揮することでストレス耐性を細胞に付与すると予想される。その一方で、細胞は長期的な環境

ストレスに対してリボソームに結合するタンパク質の構成を変化させることで翻訳活性や特異性を制御し、環境に適応するのではないかと考えている（図1）。しかしながら、リボソームタンパク質の構成変化による翻訳制御については、現象を捉えつつもメカニズムの解明には至っていない。また、リボソームタンパク質の翻訳外機能についても報告されているのは氷山の一角である。そこで本研究では、環境ストレスに適応するためのリボソームタンパク質機能を明らかにするため、出芽酵母のリボソームタンパク質の翻訳外機能を含めた個々の機能、特にまだ報告例の少ないDNA複製ストレス応答に関わるリボソームタンパク質を探索し、その機能解明を目指す。

リボソームタンパク質の欠損株では、増殖速度の回復したサプレッサー変異株が取得できる場合が多い。サプレッサー変異の意義を解明することは、欠損したリボソームタンパク質の新たな機能解明につながると思われる。これまでにDNA損傷剤およびDNA複製阻害剤に対して高い感受性を示すサプレッサー変異株を複数種見出すことに成功している。このように、リボソームタンパク質欠損株の増殖速度を回復させる一方で、DNA損傷や複製阻害への耐性が低下するような変異やゲノム構造の変化が、次世代シーケンサーを活用した本研究により明らかになりつつある。現在、サプレッサー変異とリボソーム機能との関係性を明らかにするための解析を進めている。

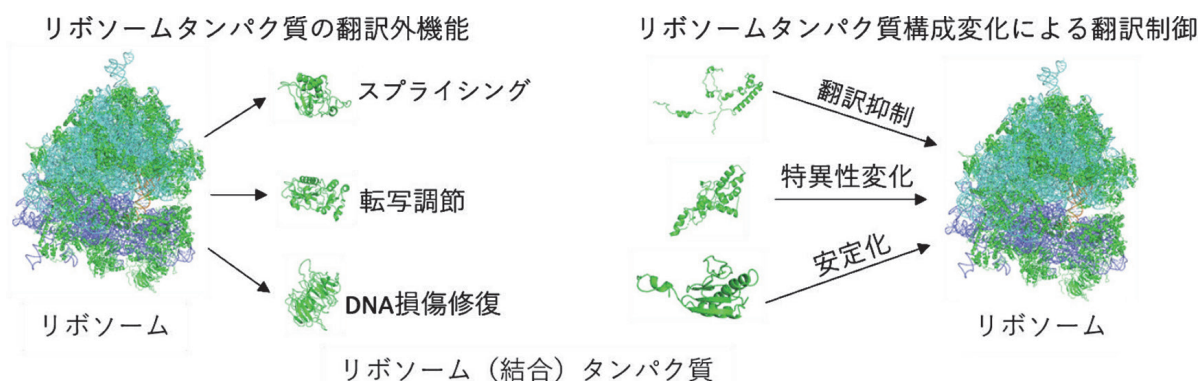


図1. 環境ストレスに適応するためのリボソーム機能

細胞が環境ストレスを受けたとき、遊離したリボソームタンパク質が細胞外機能を発揮する一方、リボソームタンパク質の構成を変化させることで環境に適応する。

赤沼元気（学習院大学理学部）
 共同研究先：渡辺 智（生命科学部）
 松谷峰之介（生物資源ゲノム解析センター）

▶ 根粒共生における宿主特異性因子の同定 ◀

マメ科作物の代表であるダイズは世界的な主要作物の一つであり、日本の食文化においても欠かすことができない原料の一つである。国内のダイズ作の多くは、水田転換畑で行われているため地力窒素の減少に伴う窒素源の確保が課題となっている。

マメ科植物は、土壌細菌の一種である根粒菌との間で共生相互作用を行う特徴をもち、両者間でシグナル分子を介した複数の制御機構によって宿主植物の根に新たな器官である根粒を形成する。そして、この根粒内に共生した根粒菌は大気中の窒素を固定して宿主植物に窒素源を供給し、宿主植物は光合成産物を根粒菌に提供することで互いに有益な相利共生の関係を成立させる。このことから、根粒共生を成立させたマメ科植物(作物)は、低窒素源環境下においても旺盛に生長することが可能である(図A)。つまり、マメ科植物の根粒形成と共生窒素固定の理解は窒素肥料の軽減に繋がる情報であることから、このメカニズムを明らかにすることは基礎研究のみならず農業現場の観点からも重要となっている。

この根粒共生には『宿主特異性』の特徴的な機能が備わっている。これは、宿主植物と根粒菌との双方から共生成立の範囲を限定する仕組みで、マメ科植物と根粒菌が有益な相手と共生を成立させるための機能に起因した現象だと考えられている。しかしながら、この宿主特異性に関わる因子や、その分子メカニズムは、複数の制御機構に依存していることから、不明な点が多くその全貌は未だ見えていない。代表者は、この宿主

特異性の分子メカニズムを明らかにするため、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ(*Lotus spp.*)に対して、その共生相手となる様々な根粒菌を用いた解析を行い、植物側と根粒菌側の双方から原因遺伝子の同定や機能解析を進めてきた。

近年、岩手大学内圃場から分離した根粒菌 *Rhizobium sp. Chiba-1* 株が *L. japonicus* に根粒形成せずに *L. burttii* に根粒形成することから、*Lotus spp.* 間で宿主特異性を持つことが示された(図B)。さらに、これらの植物が示す表現型の遺伝的特性を明らかにするため、両植物種を交配した F₁ と F₂ 植物を用いてその根粒形成表現型を観察したところ、F₁ 植物では全ての個体に根粒形成が確認され、後代の F₂ 植物では根粒形成の有無の個体が約 3:1 に分離することが確認された。これらのデータは、メンデルの法則に伴い根粒形成を有する宿主特異性機構が *L. burttii* の 1 遺伝子座に起因する顕性形質であることが示唆された。そこで本研究では、*Rhizobium sp. Chiba-1* 株に対して宿主特異性を示す宿主植物側の因子を F₂ 植物間の異なる根粒形成表現型を利用して QTL-seq 解析により同定することを目的とした。そして本研究では、岩手大学、岩手生物工学センター、東京農業大学生命科学部と東京農業大学生物資源ゲノム解析センターとが連携し、F₂ 植物の表現型観察、ゲノム DNA 抽出、NGS、データ解析、そして原因遺伝子の同定を実施し、本研究を通して根粒共生の宿主特異性を解明していくことを計画した(図C)。

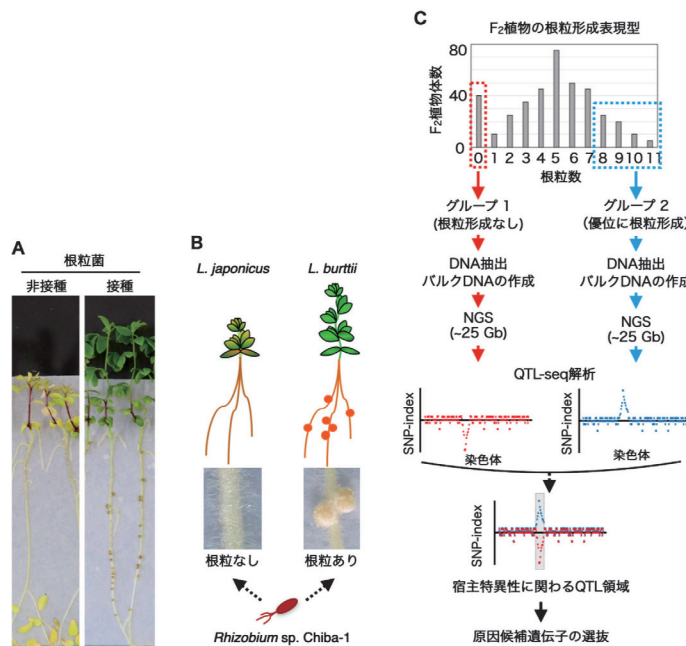


図. 根粒共生における宿主特異性と本研究の概要

A. 窒素飢餓条件下で生育させたミヤコグサ (*Lotus japonicus*)。左は根粒菌非接種、右は根粒菌接種により植物根に根粒が形成。B. *Rhizobium sp. Chiba-1* 株の接種により 2 種の *Lotus spp.* 間で異なる根粒表現型を示す。C. 本研究の概要。

川原田泰之 (岩手大学農学部)
 阿部 陽 (岩手生物工学研究センター)
 共同研究先: 齋藤宏昌 (生命科学部)
 篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 大気中二酸化窒素による植物成長促進 ◀

窒素酸化物 (NO_x と略す。実質的には一酸化窒素 NO と二酸化窒素 NO₂ からなる) は、大気中の窒素が燃焼の際に酸化されて発生する大気汚染物質で、主な発生源は自動車や工場である。光化学スモッグ生成を惹起して、喘息など呼吸器系の疾患の原因となる。我々は、環境レベルの NO_x、特に NO₂ が植物の成長を促進することを明らかにした。

図1に示すのは 150 ppb NO₂ を含む空気中で9週間栽培した *Nicotiana plumbaginifolia* である。栽培開始6週目から対照区 (NO₂ を含まない空気中で栽培した植物) に比べて葉面積が顕著に増加し始め、9週目には対照区比で、葉面積が1.8倍、バイオマスは1.7倍に増加した。無機元素の取り込み、光合成、タンパク質合成も1.5~1.9倍に増加した。この NO₂ の植物成長促進効果はシロイヌナズナやレタス、カボチャ、キュウリ、ヒマワリ、ケナフ、トマトにおいても観察された。50~200 ppb NO₂ で効果があった。成長促進に加えて、果実の収量が増加、花芽形成が促進された。

NO₂ は反応性が高い分子で、タンパク質のチロシン残基のオルト位をラジカル化してニトロ化する。40 ppm NO₂ で8時間処理したシロイヌナズナから抽出したタンパク質について抗ニトリチロシン抗体を用いてタンパク質のニトロ化を調査したところ、PsbO、PsbP および peroxiredoxin II E のタンパク質がニトロ化されていた。MALDI-TOF MS 解析から PsbO の9番目のチロシン残基がニトロ化されることがわかった。4 ppm NO₂ で8時間処理したタバコでは、防御応答マーカである pathogenesis-related (PR) -1、PR-3、PR-5 がニトロ化されていた。これらの結果から、ニトロ化されたタンパク質は限られており、NO₂ がタンパク質得意的にニトロ化することが示された。NO₂ に曝された植物体内では、ニトロ化に加えて、ニトロソ化も生じる。これらのタンパク質修飾が引き金となって植物の代謝が変動して成長が促進されたと考え、NO₂ に応答する代謝系、シグナル伝達系を明らかにして、NO₂ 植物成長促進効果を農作物栽培技術に有効利用することを目指している。

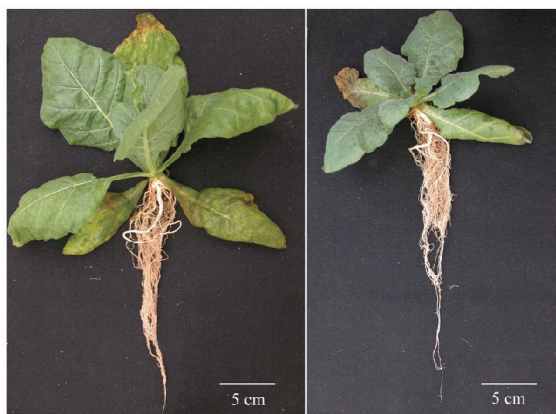


図1 9週間 150 ± 50 ppb NO₂ を含む空気中 (左) と含まない空気中 (右) で生育した *Nicotiana plumbaginifolia*.

高橋美佐 (広島大学大学院統合生命科学研究所)

共同研究先: 小松憲治 (農学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 次世代シーケンサーによるゴルフ場グリーンの微生物叢解析 ◀

日本のゴルフ場は全国で 2200 コースほどあり、一つのゴルフ場における森林占有率は平均約 57%にもなる。かつてゴルフ場は森林破壊の元凶であり、農薬垂れ流しの源であるとの負のイメージが強かったが、現在では生涯スポーツの健全な場であり、生物多様性を維持するサンクチュアリとしての捉え方が強くなってきている。一方では、世界の趨勢であるカーボン・ニュートラルにむけてゴルフ場でも化学物質(肥料・農薬)使用の軽減が図られている。農水省は「みどりの食料システム戦略」で自然界の微生物生態系の働きを最大限活用する、化学肥料・農薬の大幅削減を掲げている。しかし、日本の大学・研究機関には芝草専門の学部、学科が存在せず、特に芝草土壤の微生物解析についてはほとんど皆無に近い。宇城・鏡(2016)は全国ゴルフ場 8カ所のグリーン土壤細菌叢を次世代シーケンサー(NGS)を用いて初めて解析したところ、自然界の土壤微生物群に普遍的に常在する放線菌群(Actinobacteria)やバチルス菌群(Bacilli)は皆無に等しかった(表 1)。限定されたデータであるが、ゴルフ場グリーン土壤の微生物生態系が自然界とは

かけ離れた状態にあることを示唆している。一方、土壤の持つ炭素貯留能力についても注目されている。芝草土壤の場合、リグニン含量の高い芝種ほどカーボンの分解放出量が低いので(図 1)、ノシバやコウライシバなどの *Zoysia* 属芝草土壤が炭素貯留能力の高いことを示唆している。リグニンを分解する菌群は糸状菌の白色腐朽菌と一部の細菌群に限られているが、それらがグリーン土壤に存在しているのかどうか、また、土壤微生物叢の季節的変動も今回の共同研究としてのメタ解析により明らかとなるであろう。

引用文献

1. 次世代シーケンサーによってゴルフ場グリーン土壤の細菌叢を解析する。宇城、鏡。2016 年度日本芝草学会春季大会。
2. Hamido, S., Guertal, E. and Wood, C. (2016) Seasonal variation of carbon and nitrogen emissions from turfgrass. *American Journal of Climate Change*, 5, 448-463. doi:10.4236/ajcc.2016.54033.

表 1. ゴルフ場グリーンの優劣差の違いにおける土壌細菌叢の変動
(網レベルの出現率、 mapped reads%)

Class	GC-348	GC-341	GC-342	GC-343	GC-344	GC-345	GC-346	GC-347	GC-348	Total %
Actinobacteria-6	1.70									1.95
Actinobacteria	2.95	36.20	2.52	24.11	19.00	4.31		13.16	12.02	113.09
Ascomycota			0.54		0.47	3.71	2.50	2.50	11.17	23.79
Asphaprobacteria	5.29	13.05	3.21	2.67	0.47	1.14	0.95		3.59	8.15
Ascomycetes										0.54
Bacilli										0
Basidiomycota	4.38	9.36	0.53	3.80	7.06	33.96	32.99	11.56	13.12	131.01
Basidiomycetes							0.86			0.86
Chloroflexi							0.28	1.10		1.43
Chloroflexibacteria	1.61						5.10		5.04	12.75
Chloroplast							0.50			0.50
Chromista							1.44			2.14
Cytophaga							1.55			3.1
D4692	84.48	11.83	30.75	84.89	31.40	46.54		67.58	25.64	338.92
Deltaproteobacteria	0.90					3.90		3.26		8.64
Erysipelotrichi							1.38			1.38
Firmicutes							6.72			6.72
Gemmatimonadetes	5.60	24.13	0.50	1.00	0.28		7.50	3.50	12.08	68.47
Gemmatimonadetes							0.36			0.36
JGI								1.75		1.75
Korarchaeota							1.87			1.87
Mollicutes							1.36		1.97	3.33
Nitrospira							1.20		4.44	5.73
Oribacter							2.15			4.74
Oscillatorophycyceae							6.83	1.15	1.48	7.18
Piscespharales	1.08									1.08
Planctomycetes							1.70	2.05		3.75
Sarcomphales	7.17	0.50	60.55		1.75		0.20	0.90		6.91
Scorobacteres		2.40	0.50	1.11	1.70					6.26
Spharobacteria	4.57						1.60			8.18
Spharobacteria		0.54					4.35			3.88
Synechococcusphycidae		0.50								0.50
Taxamarchaeota					3.32			3.50		5.24
TM7-1										0
TM7-2				0.60						0.68
Unclassified							2.24			1.24
Total	99.99	100	100.01	100.01	99.99	99.99	99.99	99.99	100	339.96

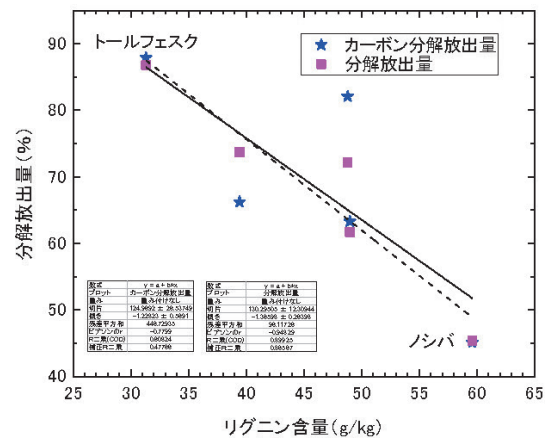


図 1. 芝草 5 種の刈り取りリグニン含量と 46 週間後の刈り取り分解量の関係

宇城正和 (埼玉工業大学先端科学研究所)

共同研究先: 志波 優 (生命科学部)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 緑藻の炭素、窒素ならびにイオウ欠乏応答に関わるタンパク質 ◀

光合成生物は、光や栄養塩などの環境要因の変動を検知し、遺伝子発現を調節することで生育を最適化することで生存を図っている。古くからモデル生物として知られている緑藻クラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* は、単細胞で分裂を続け、遊泳しながら光合成により増殖することから細胞生物学、光合成、鞭毛運動、生殖医学やオプトジェネティクスで研究材料として用いられている。我々はこれまで、C4 回路などの炭素固定を補助する回路を持たないに微細藻類が、水中では枯渇しやすい二酸化炭素 (CO₂) を有効に利用する現象に着目し、CO₂ 欠乏環境で C4 回路に匹敵する CO₂ の利用効率を示す原因を分子遺伝学的に明らかにしてきた。細胞は外環境の CO₂ 濃度の低下を検知して CO₂ 濃縮機構を発動し、CO₂ 固定能を維持して生存する。遺伝子タグをランダムに導入することで CO₂ 要求性変異株を単離し、その変異の原因を探ると、無機炭素 (重炭酸イオンや CO₂) を輸送する膜輸送体や、それらの輸送体の発現を制御するカルシウム結合タンパク質 (CAS) や亜鉛結合性の核タンパク質 (CCM1) が CO₂ 欠乏環境の順化に必要であることが判明している。

この炭素欠乏環境に応答して光合成を維持することと同様に、窒素やイオウの栄養欠乏ストレスに順化することは細胞の生存に必須である。希少な栄養源を細胞内に輸送するとともに、細胞内の余剰なタンパク質を分解して再利用する機構も重要である。クラミドモナスは栄養欠乏ストレス条件に晒されると中性脂質であるトリアシルグリセロール (TAG) やデンプンを蓄積する。炭素源の一種である酢酸存在下で、イオウ欠乏ストレスにより TAG 蓄積が阻害される変異株 *tar1-1* から、TAG 蓄積を制御する因子 TAG Accumulation Regulator 1 (TAR1) を見いだした (Kajikawa 他 *Plant Physiol.* 2015)。TAR1 は動植

物から菌類まで真核生物に広く保存されたキナーゼ DYRK ファミリーの一つで、酵母 YAK1 のオースログであり、陸上植物の TAR1 オースログも栄養欠乏ストレス応答に関与することが知られている。

一方、窒素栄養欠乏条件で TAG を野生株よりも高蓄積するクラミドモナス変異株の解析から、Coiled-Coiled Domain をもつタンパク質 (CCDC) をコードする遺伝子が推定された。また、*ccdc* 変異体は、イオウ欠乏環境でバイオマスの減少が野生株と比べて緩やかであり、イオウ欠乏処理 4 日目には野生株の約 60% のバイオマス増加が認められ、培地あたりの TAG 蓄積量が野生株の約 1.8 倍に増加していた。そこで CCDC が、イオウ欠乏環境における細胞の崩壊と TAG 蓄積量に寄与することが示唆された。

CCDC タンパク質の機能を推定するために、窒素応答遺伝子に加えてイオウ十分条件 (+S) およびイオウ欠乏条件 (-S) で培養した細胞の比較 RNA-seq 解析を行ったところ、野生株と発現量に差異があった遺伝子の中には、硫酸輸送体やイオウ代謝に関わる酵素遺伝子に加えて、哺乳類のアポトーシス制御に関わる因子の遺伝子も含まれていた。緑藻では、栄養欠乏下でアポトーシス様の細胞死が起こることが報告されており、CCDC が S 欠乏下で細胞死を誘導する因子である可能性も考えられるので、今後の研究の展開が期待される。

これまで、農作物の栽培において、イオウ施肥の最適化などを行う上で、植物の S 欠乏応答を理解することは重要である。本研究で緑藻のイオウ欠乏応答を制御することが示された CCDC は、オースログと推定される遺伝子が植物にも保存されているため、クラミドモナスの研究を通じて作物の硫黄欠乏応答の理解が進むことも期待される。

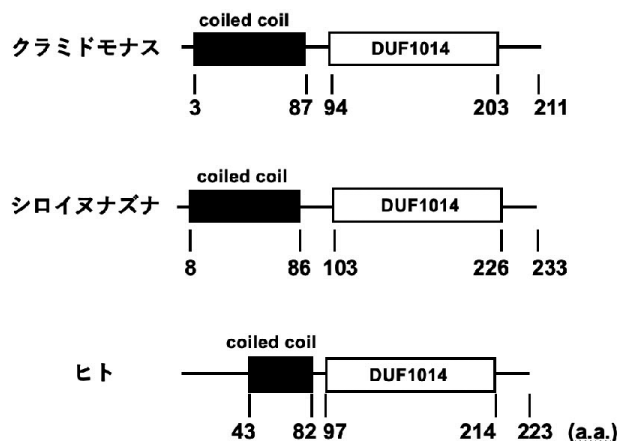


図 真核生物における CCDC の構造比較
Coiled-Coli ドメインを黒四角で、機能未知のドメイン DUF1014 を白四角で示した。

福澤秀哉 (京都大学大学院生命科学研究科)

辻 敬典 (京都大学大学院生命科学研究科)

山野隆志 (京都大学大学院生命科学研究科)

共同研究先: 渡辺 智 (生命科学部)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ アブシジン酸応答を負に制御する SNS1 のクロマチン制御領域の解明 ◀

アブシジン酸（以下 ABA）は植物の乾燥応答において重要な働きを持つ植物ホルモンである。ABA は、気孔の閉鎖や、乾燥耐性遺伝子の発現などを誘導することで乾燥耐性を向上させる。さらに ABA は乾燥耐性だけでなく、シロイヌナズナなどの一年生植物に対して、乾燥条件下での開花促進 (drought escape) などの生長制御にも関わっていることがわかってきた。このような ABA の生理作用とその作用機序を明らかにしていくことは、植物の乾燥ストレス応答を理解する上で重要な課題である。

ABA のシグナル伝達系では、タンパク質リン酸化酵素 SnRK2 が仲介するタンパク質リン酸化経路が重要である。そこで、私たちは SnRK2 によってリン酸化されるタンパク質群に着目し、これらのタンパク質の機能解析を進めてい

る。SnRK2 Substrate 1 (SNS1) は、そのようなリン酸化タンパク質の一つとして、リン酸化プロテオーム解析によって同定された。

これまでの研究で、SNS1 は乾燥条件下で開花を促進することや、ABA を処理した際の生長遅延の緩和を行っていることを見出してきた。従来の研究では、ABA の生理作用として乾燥耐性の誘導に着目してきたのに対し、SNS 1 を介した経路では乾燥条件下における生長調節に関わる点が特徴的である。さらに、SNS 1 はヒストン修飾を制御するタンパク質複合体を構成することが明らかとなった。そこで、本研究では ChIP-seq 解析を行うことにより、SNS1 がヒストン修飾に関わる遺伝子領域を特定することで、ABA による生長制御メカニズムの解明を目指している。

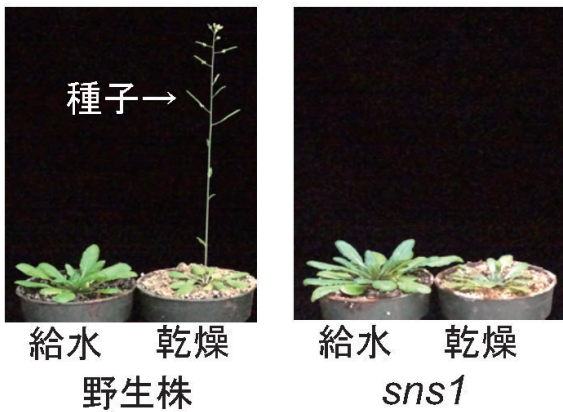


図 乾燥条件下での開花表現型 (上)
ABA 含有培地上での生育 (右)



梅澤泰史 (東京農工大学大学院生物システム応用科学府)
共同研究先: 坂田洋一 (生命科学部)
篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ プラスミド-宿主染色体間相互作用の構築に 重要な核様体タンパク質 Pnd の結合箇所解析 ◀

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、可動性遺伝因子の一種である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ることによって環境中での生存性が低下するなど、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。この影響を生み出す鍵となる因子の一つが核様体タンパク質 (nucleoid-associated proteins, NAPs) である。

NAPs は核様体構造の維持に関与し、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ことから、細菌における「ヒストン様」の因子とも言われる。NAPs は染色体だけでなくプラスミドにもコードされており、過去の調査では既知のプラスミドの約一割に NAPs の遺伝子が存在していた (Shintani *et al.* 2015, *Plasmid*, 80: 32-44)。このようなプラスミドを宿主が獲得すると、染色体由来の NAPs がプラスミド DNA に奪われると同時に、宿主が元々形成していた核様体にプラスミド由来の NAPs が割り込むことになる。

私達は原油中の含窒素芳香族化合物カルバゾールの分解プラスミドである pCAR1 が宿主細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株に接合した場合をモデルとして、pCAR1 由来の NAPs が宿主染色体由来の NAPs の転写制御ネットワークに

与える影響について研究を進めている。pCAR1 には H-NS ファミリータンパク質 Pmr、NdpA ホモログ Pnd、HU ホモログ Phu の 3 種類の NAPs がコードされている (図 1)。H-NS ファミリータンパク質と HU ホモログについては国内外を問わず研究が行われている一方で、NdpA ホモログについては極めて限定的であり、ほとんど何も分かっていないのが現状である。

これまでに私達は、pmr を含む二重破壊株 (pmr と pnd、または pmr と phu) では pCAR1 の安定性が低下することを見出した (Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2015, *Appl. Environ. Microbiol.*, 81: 2869-80) (図 2)。これが pmr 単独破壊株では見られない表現型であることを考えれば、Pnd や Phu が pCAR1 の安定性に重要な役割を果たしていることは間違いないが、特に Pnd については先行研究の少なさから機能を推定することすら難しい状況であった。そこで本共同研究では Pnd の ChIP-Seq 解析を実施し、Pnd のゲノム上の結合箇所を網羅的に同定することを目的とした。これまでの解析から 200 箇所以上の結合箇所の同定に成功し、その多くが数百 bp ~ 数千 kbp と比較的長く、明確なコンセンサス配列を持たないことから、Pnd は DNA に結合する際の配列特異性が低い可能性が示唆されている。今後、生化学的な解析により Pnd の DNA 認識機構や結合時の配列特異性について研究を進めていきたいと考えている。

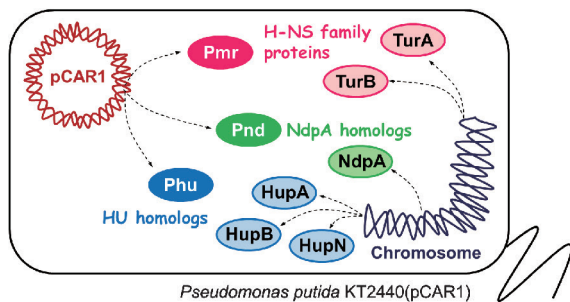


図 1. *P. putida* KT2440 (pCAR1) 株の NAPs

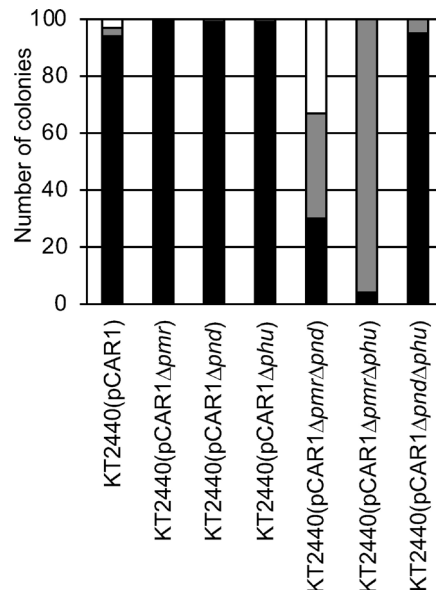


図 2. NAPs 遺伝子破壊株を用いた pCAR1 安定性試験
pCAR1 上の NAPs 遺伝子を破壊したプラスミドを *P. putida* KT2440 株に保持させ、5 日間植え継ぎを行った後に、培養液から形成させたコロニーがどのような状態の pCAR1 を保持していたか調べた。黒色は完全長の pCAR1 (破壊した NAPs 遺伝子は除く) を保持していたコロニーの数を、灰色は pCAR1 上のカルバゾール分解遺伝子を欠損していたコロニーの数を、白色は pCAR1 を脱落していたコロニーの数を示す。(Suzuki-Minakuchi *et al.*, 2015, *Appl. Environ. Microbiol.*, 81: 2869-80 より改変・引用)

水口千穂 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
共同研究先: 渡辺 智 (生命科学部)
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 毒腺トランスクリプトーム情報をもとにしたエジプト生息種サソリ 毒からの新奇殺虫性ペプチドの探索 ◀

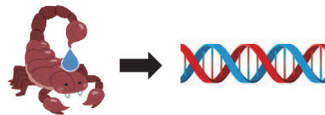
サソリは南極大陸を除くすべての大陸に分布し、これまでに20科2500種以上が砂漠・森林・高山・海岸地域などの幅広い環境において生息している。サソリは毒液を用いて昆虫などの獲物を確実に捕食し、また捕食者に対する防御をおこなうが、このような性質をもつことで過酷な環境下でも生き延びることができたと考えられている。サソリ毒液にはタンパク質、ペプチド、脂質、核酸、無機塩類など様々な物質が含まれているが、そのうちペプチドが主要な活性成分としてはたらいている。毒素ペプチドは昆虫や哺乳動物に対して強い毒性を示すが、これはイオンチャネルへの作用によるものである。特にサソリ毒液由来の殺虫性ペプチドは、昆虫選択的な作用を示すものが多く、新たな農業開発へ向けた活用が期待されている。

一般的に、サソリ毒液には100種類以上のペプチド毒素が含まれているが、2500種ものサソリが存在することを考えると、合計で20万種を超えるペプチド毒素が存在することになる。しかしながら、現在までに詳細な生理活性を評価されたペプチド毒素は1000種程度にとどまっており、サソリ毒液由来のほとんどのペプチド毒素は手つかずのままである。特にエジプトを含む北アフリカ地域にはサソリが多数存在するが、現在においてもそれらの多くについて毒液研究はおこなわれていない。したがって、これらのサソリ毒液からはユニークな構造・活性をもつペプチドの発見が期待できる。私たちのグループでは、日本生息種であるヤエヤマサソリの毒液に含まれる殺虫性ペプチドの単離・同定研究を進めてきた。一般的に、生理活性成

分の探索においては、活性評価と精製を繰り返して成分を絞り込む方法(bioassay-guided fractionation法)が用いられる。この手法は、新奇生理活性化合物の発見が期待できるという利点がある。一方で、微量しか含まれない成分は生理活性評価のために大半の試料を消費してしまい、たとえ活性成分として単離できたとしても構造決定できないという問題があった。しかし、サソリ毒ペプチドの場合、毒腺で発現する全 mRNA(トランスクリプトーム)の配列情報を得ることで、微量成分であってもその同定が可能である。ただし、トランスクリプトーム解析によって得られる情報にはシグナル配列などが含まれており、それらを取り除いた成熟型構造の推定が必要となる。ここで重要となるのが質量分析計によるペプチドレベルでの構造解析である。質量分析計によって得られる情報とトランスクリプトーム解析による情報を組み合わせることで、成熟型構造を決定することができる。ペプチドの構造を決定した後、既知毒素との類似性から生理活性を推測し、最終的に合成して活性を確認する。このような手法はvenomicsとも呼ばれ、生物毒由来の生理活性ペプチドを探索するための重要な手法となりつつある。

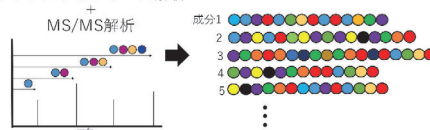
本研究においては、エジプトに生息する3種の未研究のサソリ(*Buthacus arenicola*, *Buthacus leptochelys*, *Compsobuthus vernerii*)の毒液を用い、毒腺トランスクリプトーム解析と質量分析の組み合わせによって新奇殺虫性ペプチドの発見を目指す。

1) サソリ毒腺トランスクリプトーム解析

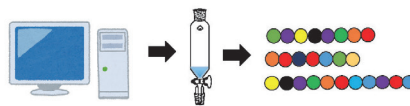


2) 質量分析計を活用した成熟型構造決定

トランスクリプトーム解析



3) 活性成分の予測と化学合成



4) 殺虫活性評価



新奇殺虫性ペプチドの発見を目指す

図 Venomics 手法による新奇殺虫性ペプチドの探索

宮下正弘 (京都大学大学院農学研究科)

共同研究先: 須恵雅之 (応用生物科学部)

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

隈本宗一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ *De novo* ゲノム解析と細胞工学を利用した マメ科木本植物イナゴマメの遺伝子機能開発と利用 ◀

マメ科木本植物イナゴマメ (*Ceratonia siliqua* L.) は、モロッコなどの地中海沿岸地域で自生し、栽培されている多年生の硬葉樹である。イナゴマメの子実体は多糖類の含有量が高く、食材資源として広く使用されている。特に胚乳から抽出されるローカストビーニングガム (LBG) は、ガラクトマンナンを主成分とする多糖類で水溶性と粘性が高く、ゼリーのゲル化剤等として利用されている。LBG は食品添加物として国内の食品製造の現場で多用されているが、日本の気候ではイナゴマメの商業的栽培は難しく、LBG の原料調達は輸入に依存せざるを得ない。食資源としてイナゴマメを利用するためには、その生物学的な特性の理解とともに、生産性の高い品種の育成や LBG の細胞工学的生産法の確立が求められるはずである。また、イナゴマメは基礎科学の分野において環境応答やゲノム進化などの実験材料として使われてきた。例えば、イナゴマメは地中海性気候に適応し、高い乾燥耐性を示すことが知られており、その耐性機構について形態学的な解析や生理学的な解析が行われている。遺伝子解析では、EST 解析による転写産物のカタログ化が行われた。このようにイナゴマメは農学的な有益性のみならず、マメ科木本植物の実験材料として注目されているが、イナゴマメ独自の有用形質を制御する分子機構の理解には至っていない。イナゴマメではゲノム情報が不足し、また形質転換法による遺伝子機能解析系が未整備であるため、生理現象に機能する遺伝子を効率的に同定できないことが、遺伝子機能を開発する上で障壁となっている。

私達は、イナゴマメの農学的、基礎生物学的な利点を生かすためには、イナゴマメのドラフトゲノムアセンブリーを作成することが不可欠であると考えている。最近では、次世代シーケンサーによるゲノム配列決定やトランスクリプトーム解析により、容易に *De novo* ゲノムアセンブリーが決定できるようになってきた。本研究では、次世代シーケンサーに用いてイナゴマメの *De novo* ゲノムアセンブリーの決定を試みており、このゲノム情報に基づいて有用形質の関連遺伝子のゲノムワイドな探索を可能にすることを目指している。一方、細胞工学的な技術として、プロトプラストの単離法や組織培養系は基盤となる手法の1つである。これらの手法は、イナゴマメの代謝産物の生理学的解析やアグロバクテリウムを介した遺伝子導入系には必要であると考えられる。そこで、細胞工学的な研究の端緒とするために、イナゴマメのカルス誘導条件を検討したところ、葉からカルスを誘導し、継代培養できること、さらに、細胞壁分解酵素でカルス細胞から、プロトプラストを調製できることを見出した (図1)。このカルス培養系を用いることで、代謝産物の一斉分析や遺伝子導入系による遺伝子機能改変が可能になると考えられる。今後は、イナゴマメ実験リソースを拡充すべく、*De novo* ゲノムアセンブリーを決定し、ゲノム情報から有用遺伝子群の網羅的探索のパイプラインを構築する予定である。さらに、細胞工学的な技術開発を行い、イナゴマメの遺伝子機能研究の発展に寄与したいと考えている。

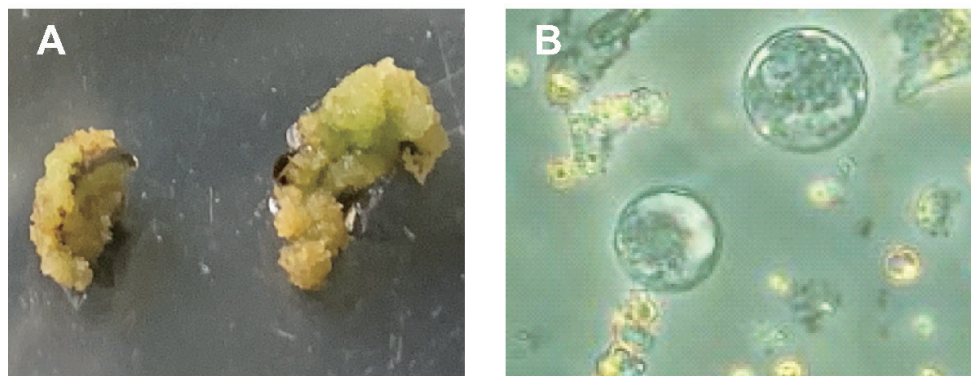


図1 イナゴマメのカルス (A) とカルス由来プロトプラスト (B)

日渡祐二 (宮城大学大学院食産業学研究科)
阿久津光紹 (宮城大学大学院食産業学研究科)
共同研究先: 坂田洋一 (生命科学部)
篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 農耕地周辺環境における植物病原性卵菌類の分布特性の解明と 病害リスク評価 ◀

卵菌類は森林・河川から海洋まで広範囲に生息する微生物群である。卵菌類にとって、降水量が多く温暖なモンスーンアジアは最適な生息環境であると考えられている。卵菌類のなかでも疫病菌 (*Phytophthora* 属菌) は、植物病原菌として農作物や樹木に深刻な被害をもたらしてきた。ジャガイモ疫病菌は、1840年代後半のアイランド大飢饉を引き起こした病原菌であり、その被害があまりに深刻であったため、アメリカへの移民流出が劇的に加速した。疫病菌は農作物だけでなく、樹木の重要病原菌でもある。約20年前に発生したサドンオークデス病菌は、防除が追いつかないほどの速さで欧米諸国を中心に拡大し、森林の枯死衰退を引き起こした。本菌による枯死木が森林火災の拡大に繋がる可能性も指摘されており、森林資源の喪失や生態系への影響が深刻である。

申請者らは5年前に、国内外の研究者らと共同で日本各地における卵菌類の分布調査を開始した。その結果、驚くべきことに、海外で森林の枯死衰退を引き起こすとされている種が、日本の森林土壌や河川水中に生息していた (Jung et al. 2021)。また、農作物への病原性が報告されている卵菌類も複数種類分離され、環境中には病原菌と同種の卵菌類が生息していることが明らかとなった。これらが農耕地に侵入して発病条件が整うと、農作物に被害をもたらす可能性が高いと考えられる。卵菌類の場合、病害防除がたいへん困難である。ひとつの理由は、一般的な糸状菌に適用される殺菌剤は卵菌類に対して効果がないため、卵菌類専用のものを用いなければならないことである。防除に先立って、卵菌類による病害であることを診断しなければならないが、卵菌類の病徴は根腐れや立ち枯れといった特徴のないものが大半を占めている。ふたつめの理由は、卵菌類が遊走子によって水中を泳ぎ、水媒伝染によって急速に拡大することである。例として、降雨の後に圃場全体に広がるサトイモ疫病や、水耕栽培のトマトやトルコギキョウで問題となっている。農業生産への被害を最小限に留めるためには、発病前に先手を打つことがきわめて重要である。

植物病原性卵菌類の分布特性とその病害リスクが明らかになれば、栽培環境の管理によって農耕地への病原菌の侵入を抑える、あるいは品種選定や栽培方法の最適化を行うといった

耕的防除が可能になる。そこで本共同研究では、次世代シーケンサーによるメタバーコーディング解析で、農耕地周辺環境中の卵菌類の種構成を調査している。先行研究で希釈平板法と釣菌 (ベイト) 法 (図1) により土壌中の卵菌類を調査したところ、培地組成、捕捉材料、耐久生存の特性、培養の難易などによって許容できないバイアスがかかってしまい、同様の結果が得られないという問題があった。次世代シーケンサーによるメタバーコーディング解析では、実際の種構成に近い結果が得られることを期待している。2021年の春と秋に、岐阜県内で6箇所の調査地を選定し、林内の植生、樹種の構成、過去の管理方法が異なる森林で、標高や水系などが偏らないように調査を行った。里山に多い樹木 (人工林のスギやヒノキ、針広混交林化で注目されるコナラなど) の株元から土壌サンプルを採取し、湛水して遊走子を形成させ、水中の遊走子をメンブレン濾過により集菌してDNA抽出を行った。また、土壌を採取した森林を水源として農耕地へ流れる河川から、4Lの水を2か所ずつ採取して、同様にDNAを抽出した。これらのサンプルの解析結果から、森林に生息する卵菌類の種構成だけでなく、河川を通じて農耕地へ侵入する可能性についても評価する予定である。さらに、同じ土壌サンプルからベイト法で分離した菌株について、トマトに対する接種試験を行い、植物病原性の評価を進めている。もし病害リスクが明らかになれば、そのリスクをコントロールするために、里山の植生や管理方法との関係についても明らかにしていきたい。

Reference:

Jung, T., Jung, M.H., Webber, J., Kageyama, K., Hieno, A., Masuya, H., Uematsu, S., Pérez-Sierra, A., Harris, A.R., Forster, J., Rees, H., Scanu, H., Patra, S., Kudláček, T., Janoušek, J., Corcobado, T., Milenković, I., Nagy, Z., Csorba, I., Bakonyi, J., Brasier, C.M. (2021) The destructive tree pathogen *Phytophthora ramorum* originates from the laurosilva forests of east Asia. *Journal of Fungi*, 7(3):226, DOI: 10.3390/jof7030226.



図1 釣菌 (ベイト) 法による卵菌類の分離

日恵野綾香 (岐阜大学流域圏科学研究センター)
景山幸二 (岐阜大学流域圏科学研究センター)
共同研究先: 本橋慶一 (国際食料情報学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ アブラナ科野菜における根茎肥大組織の着色メカニズムの解明 ◀

野菜、果物および花卉類の色は、その農作物の市場価値を決定する要因の1つである。カブ (*Brassica rapa*) やダイコン (*Raphanus sativus*) は、根茎肥大部を可食部とするアブラナ科野菜であり、各栽培地域の食文化や環境に合わせて選抜・育種が進んだ結果、多様な着色特性を有する品種・系統が育成されている。これまでに、カブやダイコンの色は、赤色や紫色を呈するアントシアニン類や緑色を呈するカロテノイド類の蓄積によって決定されることが報告されており、各色素の生合成経路についても、様々な植物種と同様の分子メカニズムが保存されている。一方、根茎肥大部の色素蓄積部位に関しては、全体が着色するタイプ、地上部のみが着色するタイプおよび無着色 (全体が白色) など多様な着色タイプの品種が知られているが、どのような機構で着色部位が決定されているのか不明な点が多い。特に、地下部、すなわち、光環境に依存しない部位での着色を決定する分子メカニズムは、ジャガイモなどの限られた植物種でしか報告されておらず、植物種間で保存された機構は見つかっていない。

多くの植物においてアントシアニンの合成は、光刺激によって誘導されることが報告されている。それ故、光依存的にアントシアニンを蓄積する農作物では、葉の剪定、反射板の設置などの人為的な制御に多大な労力を要してきた。また、冬の北陸地域など十分な日射量が得られない環境条件下では、人為的な制御は難しく、着色不良を回避できなかった。本研究では、根茎肥大部における着色形質が多様化しているアブラナ科植物を材料に用いて、『光非依存的なアントシアニン蓄積 (LIA; Light Independent Accumulation of anthocyanin)』に関する分子メカニズムの解明を目的とする。カブやダイコンなどのアブラナ科植物では、根茎肥大組織が、地上部 (光依存)

および地下部 (光非依存) 環境に存在し、同一組織内での着色に対する光依存性の差異を比較できる。それ故、袋がけなどの作業をすることなく光以外の要因を排除でき、他の植物種よりもLIA機構を解析しやすい。

上記目的の達成に向け、まず、全体が着色するタイプのカブ品種「アカマル」に対し、無着色のカブ品種「金沢青カブ」を交配し、交雑後代における遺伝解析を実施した (図1)。F2世代では、様々な着色タイプに分離した個体のうち、地下部まで着色が見られる個体をQTL-seq解析に供試して、光非依存的な着色を決定する遺伝子領域 *qLIA7* が同定された (図2)。*qLIA7* の効果を確認するため、「アカマル」由来の *qLIA7*、着色の有無を決定する *BrMYB2* および蓄積する色素の種類を決定する *Brf3'h* の3つの遺伝子領域を有し、かつ、「金沢青カブ」由来の遺伝背景を有する準同質遺伝子系統 (NIL) を育成した (図3)。しかし、NILの表現型は、地上部のみが着色し、「アカマル」と同様に根茎肥大部における着色を再現するには *qLIA7* 以外の要因が必要であることが示唆された。そこで、NILと「アカマル」のF2世代を育成し、地下部まで着色する個体をQTL-seq解析に供試して *qLIA7* 以外の遺伝的要因の同定を試みたが、地下部着色個体において共通して「アカマル」由来のアリルを有する領域は検出されなかった。それ故、カブにおける光非依存的な着色には、*qLIA7* に座乗する遺伝子だけでなく、エピジェネティックな制御因子の関与が推察された。今後は、DNAメチル解析により、DNAの修飾状況を調査し、LIA機構の全容解明を試みる。本研究により、LIA機構が解明できれば、省力的で栽培環境に依存せず、安定した着色形質を有する農作物の育種や栽培技術の改良が加速すると期待される。

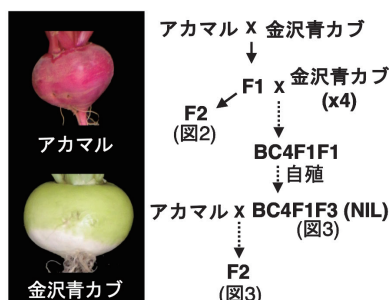


図1 本研究で用いたカブ品種と交雑後代の系譜図

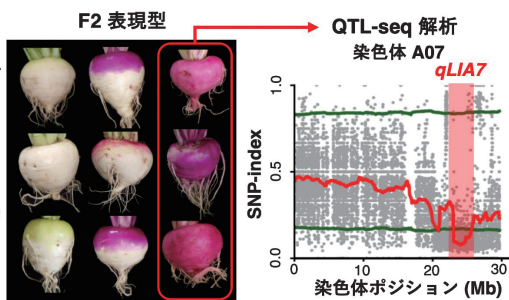


図2 「アカマル」 X 「金沢青カブ」のF2世代における遺伝解析

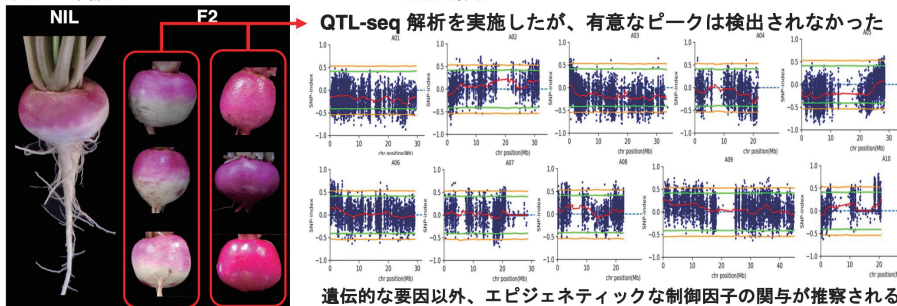


図3 「NIL」 X 「アカマル」のF2世代における遺伝解析

高木宏樹 (石川県立大学生物資源環境学部)
共同研究先: 小松憲治 (農学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

後期採択課題

▶ ミンククジラ由来の SV40 および変異型 CDK4、サイクリン D、テロメア逆転写酵素を用いた無限分裂細胞の網羅的遺伝子解析 ◀

クジラは近年のゲノム解析によって、ウシに比較的進化上近く、鯨偶蹄目という分類が提唱されている。ミンククジラはゲノム構造が解読されている。一方、長い潜水を可能にする仕組み、そして長距離を効率的に泳ぐ仕組みなど、陸上動物とは異なる生理学的特徴には不明な点が多い。鯨類を食することは太古より日本の食文化である。ミンククジラの細胞、生理学的研究は鯨の食文化を持つわが国が行うべき重要な研究である。我々はミンククジラの筋肉組織から初代培養細胞を得ることに成功した。さらにクジラの生理学的特徴を研究するための材料として、無限分裂細胞の作製を行っている。クジラの初代培養細胞は継代操作にとっても弱く、2-3回の継代操作によって分裂を停止してしまう。一方、我々はSV40 ラージ T 抗原およびヒト由来の変異型サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) そしてサイクリン D1、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) の組み合わせによって、2種の無限分裂細胞をミンククジラの無限分裂細胞を得た。

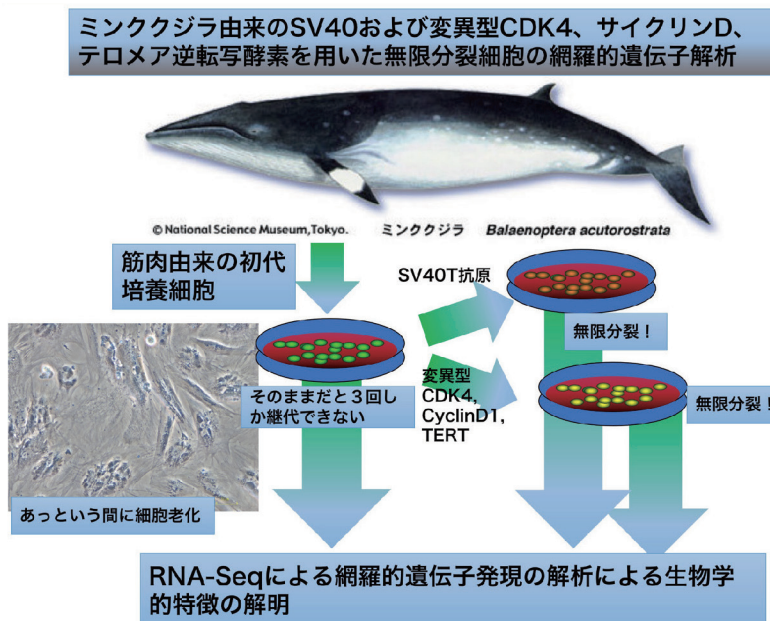
本研究ではミンククジラの野生型細胞、そしてSV40Tによって無限分裂させた細胞 (SV40 細胞)、変異型 CDK4-サイクリン D1-TERT によって無限分裂させた細胞 (K4DT 細胞) を材料に、網羅的に遺伝子発現を検出し、解析する。本研究はミ

ンククジラ由来の無限分裂細胞の生物学的特徴を網羅的遺伝子発現解析によって解明する。

研究代表はヒトだけでなく、ブタ、ウシ、サル、スイギュウ、ハタネズミ (英文発表済み)、ウミガメ (未発表) の多くの動物で元の細胞の性質を保持したまま幅広い動物種で無限分裂細胞へ誘導する技術を開発した。この技術をミンククジラ由来の初代培養細胞に適用する。

遺伝子導入にはレトロウイルスおよびレンチウイルスを使用する。SV40T を発現するレトロウイルスを初代ミンククジラ細胞へ導入した。また、変異型 CDK4、サイクリン D1、TERT を発現するレンチウイルスを用いて初代ミンククジラ細胞へ導入した。

本研究によってミンククジラの生理学的特徴を解明するための無限分裂する培養細胞、特に初代培養細胞と比較してSV40 細胞と K4DT 細胞のどちらが元の細胞の性質に近いのか、全遺伝子の発現レベルで比較し、明らかにする。本研究によってミンククジラ由来の初めての無限分裂細胞が樹立される。研究に容易に使用できるミンククジラの細胞の樹立によって、鯨偶蹄目の動物の進化および生理学的特徴の分子レベルでの解明に貢献する。



福田智一 (岩手大学理工学部)

共同研究先: 平野 貴 (農学部)

隈本宗一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 枯草菌のグルコースによるマンガンイオン濃度制御機構の研究 ◀

枯草菌のグルコース (以下 Glc) 添加条件での遺伝子発現 / 表現型変化を探求し、CshA/YlxR/TsaD からなる feedback loop を見出した (図 1)¹⁾。この系は最終的な output として CshA をアセチル化し、RNA ポリメラーゼと会合させ転写を大規模に変化させる²⁾。この系への Glc シグナル input は、タンパク質安定性を制御する Arg リン酸化の脱リン酸化酵素遺伝子 *ywlE* の転写誘導だった。YwlE は TsaD (tRNA 修飾酵素) とピルビン酸脱水素酵素 PDH を含む標的タンパク質のリン酸化 Arg を脱リン酸化し (リン酸化 Arg は ClpCP プロテアーゼの認識タグとして働く)、タンパク質を安定化に導く。TsaD は PDH を変性から保護し効率的な翻訳に必要である。このため、TsaD 安定化は PDH によるアセチル CoA 生成を促し、ひいては CshA アセチル化を促進する。

YwlE 上流に Mn^{2+} ポンプ相同タンパク質の遺伝子 *ywI* があり、*ywlE* 誘導と酵素の補欠成分となる必須金属イオン Mn^{2+} の関係に注目した。ただし、*ywI* の Mn^{2+} ポンプとしての働きは今の所、検出できていない。 Mn^{2+} が活性化する転写因子 MntR が、 Mn^{2+} 取込みポンプ (MntH, MntABCD) を抑制し、排出ポンプ MneP を活性化して Mn^{2+} 恒常性を維持している。Glc は細胞内 Mn^{2+} 濃度を 2 倍以上増大させ、*mneP* 破壊株では Glc なしでも Mn^{2+} 濃度上昇と *ywlE* 誘導が起きた (図 2)。この観察は、 Mn^{2+} 濃度上昇が *ywlE* を誘導する事を示唆した。*mntHmntA* 破壊株でも Glc 効果はあり、*mntR* 株では Glc なしでも Mn^{2+} 濃度が上昇し *ywlE* が誘導され、Glc を加えると Mn^{2+} 濃度はさらに上昇したので、Glc に応答する未知の Mn^{2+} ポンプの存在が示唆された。なお、*ywlE* 発現は Mn^{2+} 濃度の indicator とみなせるが、濃度との直線性は弱かった。また、既知の MntR 制御ポンプ遺伝子は Glc を加えても発現変動し

なかった²⁾。枯草菌の Arg 生合成系制御因子 AhrC は CcpN 経路で Glc に応答することが知られており³⁾、AhrC は *ywlE* 誘導に対して何らかの役割があると考え、*ahrC* を破壊してみたところ、*ywlE* と Mn^{2+} 濃度の Glc 誘導が消失した。そこで、*ahrC* 破壊株、*mntR* 破壊株で野生株との比較 RNA-seq を Glc 添加条件で行い、それぞれ 500 を超える標的と 158 の共通制御遺伝子を見出した ($>x4$, $<x1/4$)。AhrC 制御かつ Glc に応答したポンプとみられるタンパク質遺伝子の *ywlE* 誘導への効果を検討し、2つの候補 (排出型 ABC 輸送体をコードする *yknUV* と MntR 抑制性の金属イオン取込み family 遺伝子 *ycsG*) を得た。*yknU* や *yknV* 破壊では Mn^{2+} 排出が阻害されたため、*ywlE* 発現は Glc なしでも高い水準だった。*ycsG* は *mntH* パラログで 5-oxoproline 輸送ポンプ *pxpG* と annotate されているが、実験的根拠は弱い⁴⁾。*ycsG* を誘導すると Glc なしでも *ywlE* 発現は誘導された。この結果は、取込みポンプとしての性質と合致する。*yknUV* は Glc で AhrC 依存的に抑制され、*ycsG* は Glc で AhrC 依存的に誘導されたので^{2,5)}、双方が Glc による Mn^{2+} 濃度上昇の原因であると考えられる。また、*ycsG* は MntR 抑制を受けていた。これは MntR の取込みポンプ遺伝子抑制という役割と矛盾しない。現在、 Mn^{2+} 輸送への影響を解析中である。

- 1) Ogura, 2020, *Front in Microbiol* 11:590828.
- 2) Kanasaki and Ogura, 2021, *BMC research notes* 14:1-5.
- 3) Heidrich et al, 2006, *Mol Microbiol* 62:520-36.
- 4) Niehaus et al, 2017, *J Biol Chem* 292:16360.
- 5) Wang et al, 1997, *Genes Dev* 11:2569.

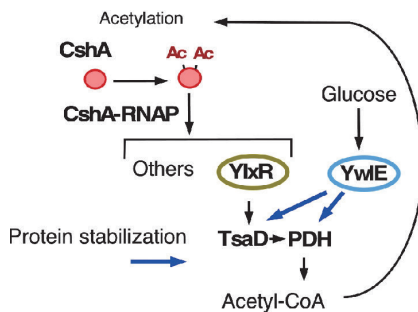


図 1 グルコース反応系

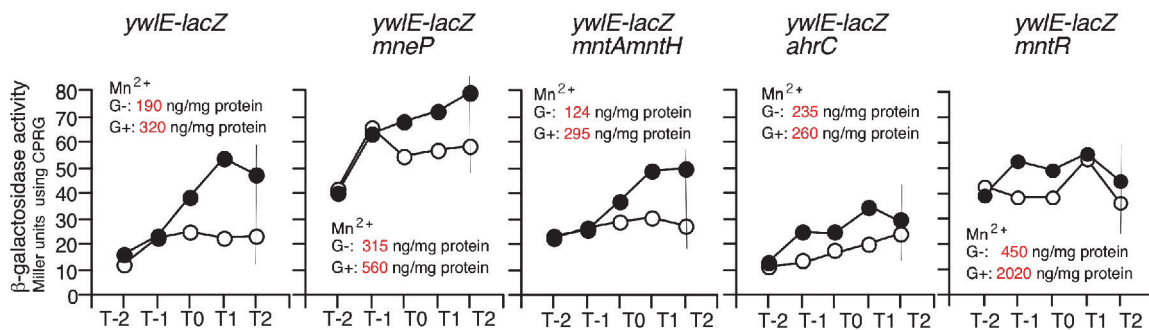


図 2 Mn^{2+} (T2 で 3 回測定と遺伝子発現) ○ Glucose- ● Glucose+

小倉光雄 (東海大学海洋研究所)
 共同研究先: 朝井 計 (生命科学部)
 松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 「環境循環型メタノール」の実践的活用に向けた 高メタノール環境適応型 C₁ 酵母の戦略的種 ◀

2050年のカーボンニュートラルの実現に向けて、日本は温室効果ガスCO₂の削減を目標とした様々な取り組みを、国を挙げて推進している。特に、CO₂・CH₄から直接合成できるメタノールは、最も環境負荷の少ない次世代エネルギーの一つとされる「環境循環型エネルギー」として注目されており、現在、CO₂からの直接的なメタノール合成技術の開発が盛んに行われている。一方、現在、微生物機能を用いた発酵生産系は食料と競合する糖類が発酵原料としているケースがほとんどであり、「環境循環型メタノール」を出発原料にした高生産・高効率な発酵生産系が実現できれば、画期的なカーボンニュートラルな物質循環システムを基盤とした新奇な発酵生産系の構築に貢献できると考えている。

これらメタノールを出発原料とした発酵技術を具現化できる真核生物資源はメタノールを利用できるC₁酵母のみであり、その細胞機能を高メタノール環境下で最大限に活用できれば、革新的な低環境負荷型発酵生産系技術を確立できると考えられる。しかし、C₁酵母は5%を超える高メタノール環境下において強い生育阻害を示すため、「環境循環型メタノール」の効率的活用にはC₁酵母に高いメタノール適応能力を付与する必要がある。私たちは、C₁酵母の高メタノール環境下での生育阻害は毒性メタノール代謝中間体ホルムアルデヒドの細胞内レベルの制御破綻が一つの要因であることを示してきた¹⁾。また、トランスクリプトーム・メタボローム解析からC₁酵母の高メタノール適応機構の解明を行っており、細胞内酸化還元バランスの制御や細胞内脂肪酸組成が高メタノール適応の鍵因子ではないかと推測している(図1)^{2,3)}。

一方、私たちはこれまで馴化培養法にて高メタノール適応型

C₁酵母変異株の育種も進めており、これまで *Komagataella phaffii* の7%メタノールでも生育可能なTK3株、8%メタノールでも生育可能なTK3-2株を獲得してきた。これら高メタノール適応型変異株がどのような変異により新たな形質を獲得したか示すことができれば、C₁酵母の高メタノール適応機構の解明の糸口を得ることができるのみならず、その知見を活用した新たなスーパーC₁酵母の戦略的育種が可能になり、それを用いて「環境循環型メタノール」を出発原料にした高生産・高効率な発酵生産系が実現可能になる。

このような背景から、今回の「生物資源ゲノム解析拠点共同研究」において目指すポイントは、高メタノール適応型C₁酵母変異株のゲノム上の変異点の同定であり、その研究成果はスーパーC₁酵母の戦略的育種とその活用において大きなマイルストーンとなり得るものと考えている。

参考文献

- 1) Wakayama K, *et al.* 2016. Regulation of intracellular formaldehyde toxicity during methanol metabolism of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica*. *J Biosci Bioeng.* 122:545-549.
- 2) Cai HL, *et al.* 2021. Metabolic regulation adapting to high methanol environment in the methylotrophic yeast *Ogataea methanolica*. *Microb Biotechnol.* 14:1512-1524.
- 3) Ma P, *et al.* 2021. Fatty acid composition of the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* grown under low- and high-methanol conditions. *Yeast.* 38:541-548.

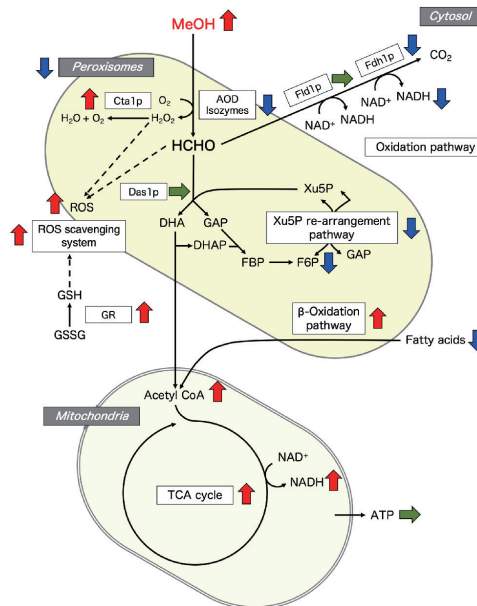


図1. これまで示してきた高メタノール環境におけるC₁酵母の代謝制御
赤矢印、高メタノール環境下で遺伝子発現や細胞内レベルが増加する因子；青
矢印、高メタノール環境下で遺伝子発現や細胞内レベルが低下する因子。

中川智行 (岐阜大学応用生物科学部)
共同研究先：川崎信治 (生命科学部)
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 魚類において非還元配偶子形成を引き起こすゲノム間の構造的異質性の解析 ◀

体外受精を行う魚類では人工授精によって容易に交雑種を誘起することができる。交雑種では親種の組合せが生存性や妊性に大きく影響する。魚類では幅広い分類群において非還元（二倍性）配偶子を形成する交雑種が知られており、これらの交雑種が産する非還元配偶子は高次倍数体やクローン系統の作出に有用である。養殖対象種におけるクローン配偶子の形成は遺伝的に同一な集団を容易に作出できることから、均質な養殖魚の生産に貢献する。また、非還元配偶子は三元雑種の作出にも用いることができるため、これまでに作出されたことがない新品種合成に大きく貢献する可能性を秘めている。

本研究の対象となるドジョウでは、ミトコンドリア DNA と核遺伝子の解析より遺伝的に大きく異なる 2 系統（A 系統、B 系統）が日本国内に分布していることが明らかになっている。国内では B 系統が全国的に分布しており、A 系統は北海道網走管内と石川県の一部地域でのみ発見されており、非常に希少な遺伝的な集団である。さらに、北海道網走管内には減数分裂前の生殖細胞におけるゲノム倍加によって非還元配偶子を産出し、雌性発生によりクローン生殖を行う特殊な個体（クローン系統）が自然分布している。このクローン系統は、分子系統解析と細胞遺伝学的解析から A 系統と B 系統の交雑に起源することが推察されている（図 1）。また、人為的に誘起した系統間雑種においても非還元卵形成が生じる場合が確認されている。すなわち、ドジョウの A 系統と B 系統のゲノムの間には、配偶

子形成を正常に進行することができず、減数分裂前にゲノム倍加を引き起こすゲノム構造的な“違い”の存在が考えられる。

これまでの研究では、ドジョウの各系統のゲノム間の構造的な違いを細胞遺伝学的な物理地図とマイクロサテライトマーカーによる連鎖地図をもとに推定してきた。しかし、これらはゲノム全体における系統間の違いを断片的に示唆する結果であり、各系統のゲノム間の決定的な違いとして検出することはできていない。そのため、両系統間での構造的な違いを明らかにするためには、A 系統と B 系統のドジョウの全ゲノムを高解像度で解読し、それらのゲノムを比較することが非常に有効な手段である。

他の非還元配偶子形成を行う魚類の種間交雑種あるいは属間交雑種では、種間共通の遺伝マーカーの開発が困難であるとともに、全ゲノムを用いた種間の比較では種の違いによる差異を検出する可能性が高く、ゲノム倍加に関係するゲノム間の違いを検出することは困難であると考えられる。一方、ドジョウの場合は系統間の比較であるため、系統間でゲノムの多くの部分は共通していることが予想される。本研究で得られた系統間の差異がゲノム倍加に関連する可能性は比較的高いと考えられる。交雑を経た非還元配偶子形成は生物のゲノム重複の進化の原動力となっている。本研究が魚類における非還元配偶子を形成するメカニズムの解明の嚆矢となることを期待して研究を進めている。

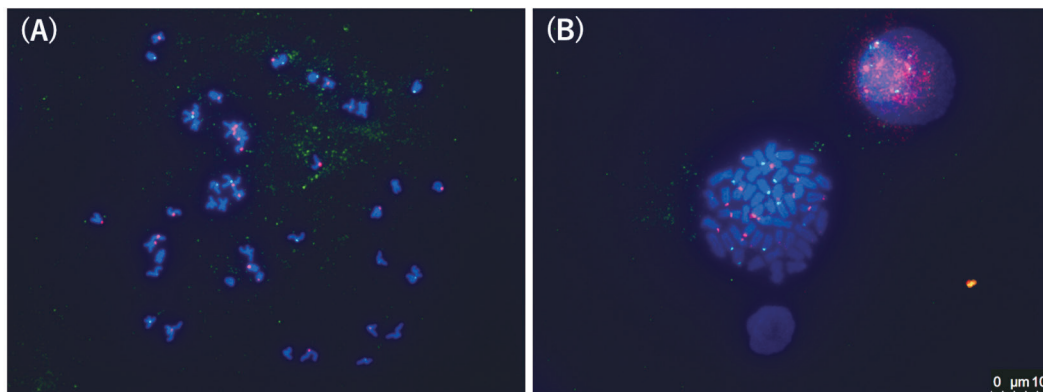


図 1 FISH による系統間雑種 (A) とクローン系統 (B) の染色体識別。A 系統に由来する染色体のセントロメア領域を緑色、B 系統に由来する染色体のセントロメア領域をマゼンタ色のシグナルで特異的に標識している。系統間雑種では A 系統と B 系統の染色体から構成されている。また、クローン系統でも同様に A 系統と B 系統の染色体から構成されている。

藤本貴史（北海道大学大学院水産科学研究院）

柴田季子（北海道大学大学院水産科学院）

共同研究先：黒田真道（生物産業学部）

田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

▶ 活動量の異なる害虫系統間のトランスクリプトームおよび Resequencing 解析 ◀

農薬散布から、あるいは天敵からどのように逃れるかは、害虫の活動性に依存する。歩行活動量を育種し、著しく活動量の高い個体と、ほとんど動かない個体のゲノムを比較することで、害虫の回避能力を操る遺伝子群を明らかにできる。驚くべきことに昆虫の活動性自体を司る遺伝子群を調査した研究はショウジョウバエでわずかに存在するか、害虫を用いて明らかにした研究は我々の知る限り存在しない。

そこで本研究では、害虫の「動き」を制御する遺伝子群をゲノム操作することで、天敵や農薬に対する行動抵抗性メカニズムの全容を明らかにするため、全ゲノムが既知の害虫、コクヌストモドキの活動量を制御する遺伝子群を解明し、将来の新しい害虫防除法の開発に資することにした。害虫（貯穀害虫のコクヌストモドキ）のひとつの集団を用いて、活動量に人為選抜をかけた結果、著しく活動量が高くなった集団と、まったく活動しなくなった集団を確立できた。人為的に実際の害虫の活動量を育種によって確立した集団同士の全ゲノム解析やトランスクリプトーム解析は、新規性があり、かつ実験に用いたコクヌストモドキは全ゲノムが解読されているため、参照ゲノム情報を利用した解析ができる点は重要性が高い。これまでに実際の害虫の活動量に焦点を当てた全ゲノム解析やトランスクリプトーム

解析は行われていないことから独創性が高く、研究テーマは農学部分野との関連性が高い。H 系統と L 系統の RNA-seq 解析およびリシーケンス解析を行うことで、これまで死にまね・活動性シンドロームでは、違いの見られなかった遺伝子パスウェイに RNA-seq 解析による mRNA 発現の違いが検出される遺伝子領域が見つかる予測される。例えば、行動と関係性の深いサーカディアンリズムとこれに関連する内分泌系やドーパミンを含めた神経系における遺伝子群を網羅的に調査している。そこで、RNA と DNA の抽出を行うためのサンプルについて、再度、選抜後の活動量について行動解析を実施する。その上でゲノム解析に最適なサンプルを選定した。現在、申請者はサンプルの送付準備が終了し、順次サンプル送付と解析を行っていく。またこれまでに活動量と不動時刻の異なる系統間でも「動く」と「動かない」戦略に特化した甲虫の集団を 10 年以上も育種によって分け、DNA リシーケンス法で集団間の DNA 変異を比べた。その結果「動く」戦略では 844 個、「動かない」戦略では 3243 個のアミノ酸が異なる変異遺伝子が見つかり、両者で生存に重要なゲノムネットワークの変化（下図）が初めて明らかになった。

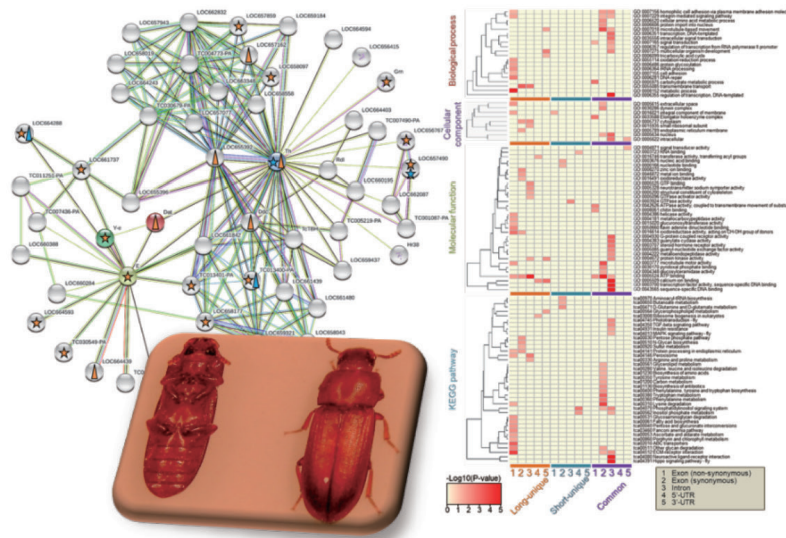


図 DNA リシーケンス法から明らかとなった活動量と不動時刻の異なる系統間のゲノムネットワークの変化

宮竹貴久（岡山大学農学部）
 佐々木謙（玉川大学農学部）
 松村健太郎（香川大学農学部）
 共同研究先：下村健司（生命科学部）
 田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

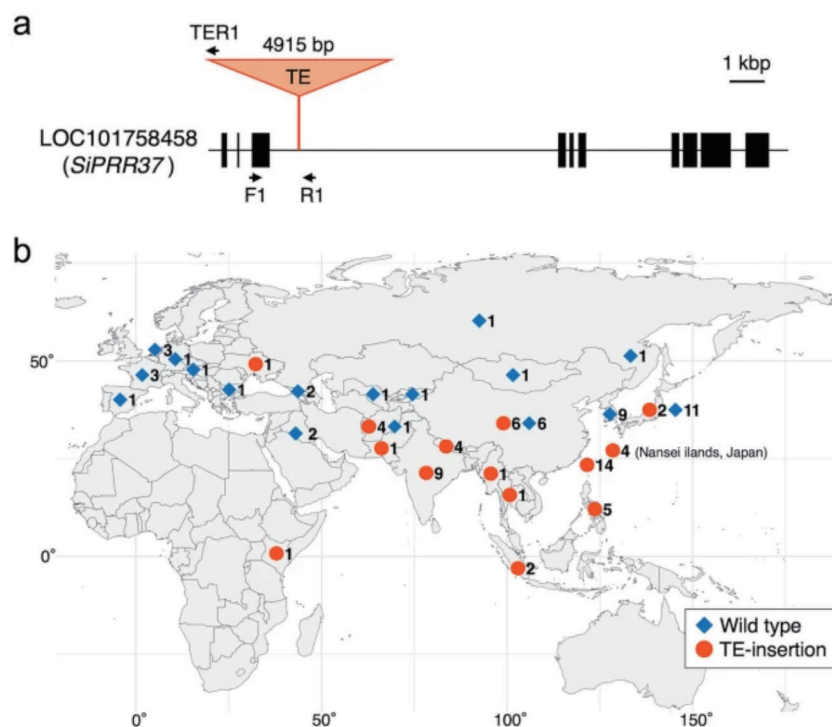
▶ Flexible ddRAD-Seq 法によるアワ在来品種及び エノコログサ遺伝資源の多様性解析 ◀

古代より五穀のひとつに数えられるアワは、イネと並んで新嘗祭のような宮中祭祀に供される穀物であり日本の文化と密接な関係がある。古くは中国の古代文明の主食であったとされ、近代以前はアジアやヨーロッパで穀物として人類を支えてきたものであり、アワがどこからどのように広がったのかということは我々人類の歴史をたどるという意味でも重要である。また、さまざまな環境に適応し、人が栽培することにより形態的にもきわめて多様であり、作物がどのように多様化し分布を広げてきたのかという進化生物学の研究上非常に興味深い材料であるといえる。

日本では、岩手県などで新品種開発も行われており、現在でも農作物としても重要である。モチ性品種では良食味のものも知られ、現在では健康食としても注目されている。さらに、乾燥に強い作物として有望である。近年、アワの祖先野生種であるエノコログサとともに C_4 植物のモデルとしても注目されており、ゲノム解析や実験系の確立が進められており、気候変動で先の見えない温暖化・乾燥化の未来に備えるという意味でも多様性に富んだ重要な植物であるといえる。

本研究では、昨年に引き続き、世界のアワ品種の系統分類、さらに日本品種内の遺伝的な多様性や系統分類を行うことを目的としている。まず世界的なアワ品種コレクションについて系統解析を行いたい。また日本の品種については、これまでの解析では、沖縄を除く日本の品種は、中国北部の品種に近いとされており、沖縄の品種は台湾の品種と遺伝的に近いことが明らかになっているが、日本品種は、大陸の品種と台湾からの品種がまじりあっているのではないかと仮説をたてており、解析を進めている。また、2019年の本拠点共同研究では、アワ品種間で緯度適応に関わる遺伝子を発見しており、その地理的分布も調査している (Fig.1)。適応的遺伝子と品種の系譜との関係も調査したい。

本研究のゴールとしては、1) 世界の代表的なアワ品種の系統解析 2) 日本のアワの系譜の詳細な解析を行いたい。エノコログサも加えて、合計 220 品種 (系統) の解析を予定している。解析としては Flexible ddRADseq のデータにより、系統解析と集団構造解析を予定している。



福永健二 (県立広島大学生物資源科学部)
共同研究先: 河瀬真琴 (農学部)
田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 食品添加物ミョウバン刺激後に腸上皮細胞に侵入して 炎症性細胞死を誘導する腸内マイクロバイームへ抗生剤が与える影響の 16S rRNA メタゲノム解析 ◀

アルミニウム含有化合物であるミョウバン（硫酸アルミニウムカリウム）とアンモニウムミョウバン（硫酸アルミニウムアンモニウム）は、形状保存剤や変色防止剤など食品添加物として広く用いられている。しかし、ミョウバンは、免疫賦活剤である水酸化アルミニウムと同様に免疫賦活作用を有し（P Marrack et al. *Nat Rev Immunol* 2009）、腸管における免疫反応・炎症の原因となる可能性があるもののその詳細は不明である。また、腸管に存在する腸内細菌は、腸管組織細胞のインフラマソームシグナルに作用することにより、ホメオスタシスの維持や炎症誘導・促進に関与する（N Zmora et al. *Mucosal Immunol* 2017）。

こうしたなか我々は、ミョウバンを経口投与したマウスでは腸管における好酸球浸潤が亢進すること、また腸上皮細胞の細胞死が亢進することを見いだした。さらには抗生剤（アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン、メトロニダゾール混合）を予め経口的に与えたところ、ミョウバンによる腸上皮細胞死と好酸球浸潤はより促進した。

そこで2020年度共同研究において我々は、抗生剤処置・非処置マウスにミョウバンを経口投与した際の小腸上皮細胞のトランスクリプトーム解析を行った。発現変動遺伝子（DEG）の遺伝子オントロジー（GO）エンリッチメント解析により、ミョウバンを投与したマウスの小腸上皮細胞においてはグラム陰性細菌のリポポリサッカライド（LPS）に対する反応や炎症反応に関与する *Nfkb2, Casp4, Nos2, Tnf* 遺伝子の発現増加がみられたほか、2型炎症とアレルギーに関与する *Il33* 遺伝子の発現が増加した。また、抗生剤を処置した腸上皮細胞では *Casp6, Casp9* などアポトーシスに関与する遺伝子の発現が増加した。これら抗生剤処置マウスにミョウバンを投与したところ、*Casp6* と *Casp9* のさらなる発現増強に加え、インフラマソーム

活性化に関わる *Nlrp6* 遺伝子の発現が有意に増加した。細胞内 NOD 様レセプターである NLRP6 は、グラム陰性細菌のリポテイコ酸を認識して NLRP6 インフラマソーム形成を促し、IL-18 産生に関与する（H Hara et al. *Cell* 2018）。

こうしたトランスクリプトーム解析の結果より、特定病原体不在の（SPF）環境下でマウスにミョウバンを経口投与した場合は、グラム陰性腸内細菌が優位に小腸上皮細胞に侵入して、炎症性細胞死や IL-33 放出を誘導する可能性が示唆された（図1）。一方、抗生剤処置下では腸内マイクロバイームの構成が著しく変化し、ミョウバン刺激により腸上皮細胞内に侵入したグラム陽性腸内細菌による NLRP6 インフラマソーム活性化を介したピロトーシス、およびアポトーシスによる複合的な腸上皮細胞死が起こり、強度の2型炎症につながる可能性が考えられる（図1）。

そこで今回の共同研究課題では、腸上皮細胞の炎症性細胞死に関わる分子や様式を左右する腸内細菌叢を同定する目的で、①食品添加物ミョウバン刺激により腸上皮細胞内に侵入する腸内細菌の同定、②抗生剤処置による腸内マイクロバイームの変化および腸上皮細胞内に侵入する細菌の変化について、16S ribosomal RNA (rRNA) メタゲノム解析を行う。本研究は、食品添加物および腸内マイクロバイームの制御による、食物アレルギーや好酸球性消化管疾患の予防や緩和への発展の礎となる可能性がある。本共同研究を通じて情報を共有し、食の安全と健康に貢献できれば幸甚である。

謝辞

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの先生方との共同研究の機会をいただきましたこと、厚く感謝申し上げます。

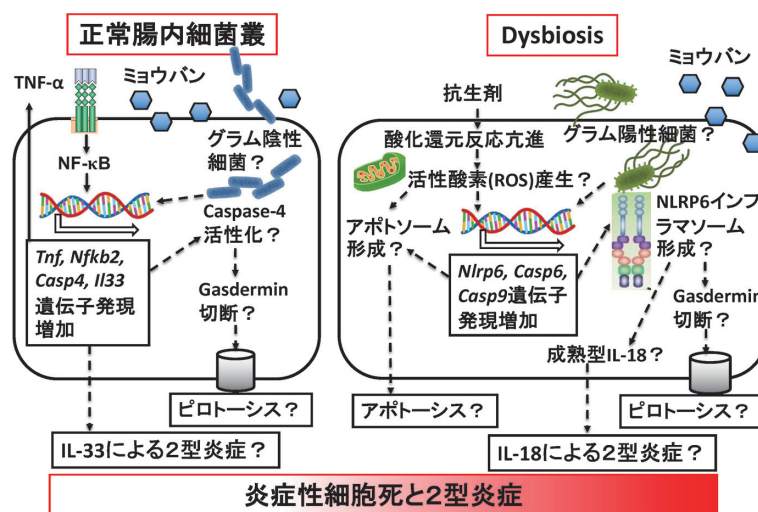


図1. 腸内マイクロバイームが食品添加物ミョウバンの刺激により腸上皮細胞に侵入して炎症性細胞死と2型炎症の誘導に関与する概念図

若林あや子（日本医科大学医学部）
森田林平（日本医科大学大学院医学研究科）
共同研究先：岩槻 健（応用生物科学部）
隈本宗一郎（生物資源ゲノム解析センター）

▶ ステロイドホルモンが惹起する根の形態形成メカニズムの解明 ◀

プロゲステロン (PROG) は、哺乳動物の性ホルモンとして機能するステロイド化合物である。コケやシダなどの下等植物から高等植物に至る広範な植物に PROG が内生することが明らかになった (Iino *et al.*, 2007)。また PROG は、植物の胚軸伸長などの生理活性を示すことも報告され、その作用機構に PROG と特異的に結合する膜結合型タンパク質が受容体として機能することが示唆されている。これらの知見は、PROG が動植物界を超えて生理作用を制御するステロイドホルモンである可能性が高い。動物における PROG の生合成は、短鎖型脱水素酵素 / 還元酵素 (SDR 酵素) が 3 位酸化 / 異性化反応を触媒し、プロゲネロン (PREG) から PROG を生成する (図 1)。そこで、本研究は、PROG が新たな植物ステロイドホルモンであると想起し、モデル植物シロイヌナズナにおける PROG 生合成経路および生理学的機能の解明を目的にしている。本研究ではこれまでに下記について明らかにしてきた。

1) PROG は、胚軸および主根の伸長を促進する。

PROG の植物生長調節因子としての機能をより詳細に解明するために、シロイヌナズナ PROG 生理活性試験を実施した。0.01-0.1 μM PROG 処理によりシロイヌナズナの胚軸および主根の伸長が促進され、10 μM PROG 処理により伸長が抑制された。

2) シロイヌナズナにおける 6 つの SDR 酵素は、PREG から PROG を生成する。

シロイヌナズナデータベースから進化系統樹解析により、相同性を有する 6 つの AtSDR 酵素を選抜した。大腸菌異種発

現系を用いて 6 つの AtSDR 組換え酵素を調製し、基質として PREG を与えて、酵素学的解析を行った。結果、全ての AtSDR 酵素が PREG を基質として 3 位酸化 / 異性化反応を触媒し PROG を生成することを明らかにした (図 1)。

3) AtSDR6 重変異体は側根の伸長抑制を示す。

シロイヌナズナ T-DNA 挿入株およびゲノム編集技術を用いて、6 つの AtSDR 酵素遺伝子を破壊した 6 重変異体を作製した。表現型解析の結果、根の伸長が阻害されていた。このことは、外因性 PROG が主根の伸長を促進することと一致している (図 2)。

以上のように、申請者らが独自に得た知見は、i) AtSDR 酵素がプロゲステロン生成酵素であること、ii) PROG が植物の形態形成を制御する植物成長調節剤である可能性を大いに高めた。特に、PROG は、根の形態形成を制御することから、養分や水分吸収の作用点となる可能性が高く、農業利用への応用が期待できるケミカルツールであるが、PROG を実践的に農業で使用するための資材とするためには、PROG が植物に及ぼす生理作用の分子メカニズムを明らかにする必要がある。次世代シーケンズ (NGS) を用いた網羅的な発現解析により、PROG が植物に及ぼす分子メカニズムの理解と共に、6 重変異体における発現プロファイルを解析することで、PROG が植物の形態形成を制御する新規の植物ステロイドホルモンであることを実証し、PROG またはその類縁体がバイオスティミュラントとして農業現場で実践的利用される基盤データの構築を行いたい。

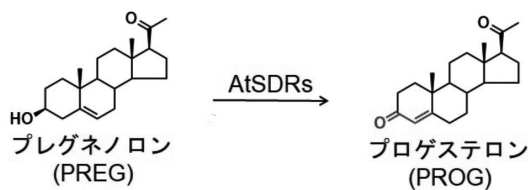


図 1. プロゲステロン生合成

【22°C, 明所 (約 2000 lx), 6 days】

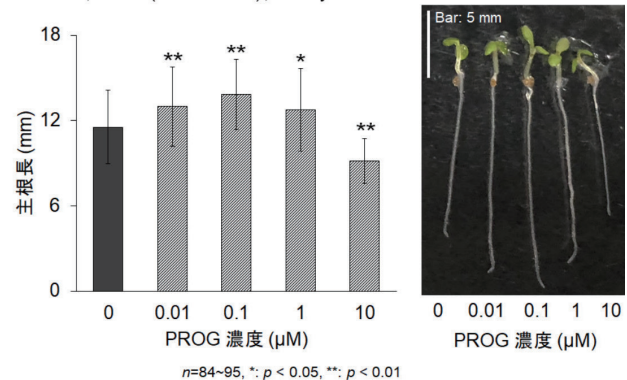


図 2. PROG は濃度依存的に主根の生長を調節する。

大西利幸 (静岡大学農学部グリーン科学技術研究所)
 共同研究先: 伊藤晋作 (生命科学部)
 篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 霊長類モデルを用いた腸内化学感覚受容メカニズムの解明 ◀

腸管は、食物の消化吸収を担い、ヒトを含む動物にとって生命活動に不可欠な器官である。腸管の内腔面を覆う腸管上皮には、それら生体機能を担う細胞が存在しており、消化吸収を行う吸収上皮細胞や消化管ホルモンの産生を行う腸内分泌細胞が知られている。さらに近年、異物認識と免疫応答に関わる細胞として Tuft 細胞が同定された。Tuft 細胞は、口腔の舌上皮に類似した化学感覚受容関連分子を発現しており、受容体を介して、寄生虫や微生物由来の物質を化学的に認識し、生理活性物質を分泌することで免疫細胞の活性化と上皮細胞の新生促進を誘発する [1-3]。口腔からは食物などの有益な物質以外にも、外来の微生物や化学物質など有害な異物も流入することを考えると、腸管 Tuft 細胞はそれら異物を認識して腸内恒常性を担う細胞であると考えられる。Tuft 細胞における化学感覚受容メカニズムの解明は、腸内恒常性の維持や破綻に関わるメカニズムの一端の解明に繋がる重要な研究課題である。

これまで腸管機能の研究はげっ歯類を中心に進められてきた。しかし近年の遺伝子発現プロファイルや生体応答の比較解析により、げっ歯類(マウス・ラット)と霊長類(マカザル・ヒト)の間では免疫系や腸内細菌叢の種差が大きいことが報告されており [4, 5]、種間で異なる体内環境が形成されていることが考えられる。一方で、霊長類の解析系はげっ歯類に比べて乏しいこと、またヒトを対象とする研究は倫理面や安全面から制限が多いことから、ヒトを含む霊長類では Tuft 細胞の機能解析が難航しており、げっ歯類における知見を霊長類に適用できるかは不明である。特に、どのような物質に応答し、どのような生理活性物質を分泌するのかなど霊長類 Tuft 細胞にお

ける詳細な化学感覚受容メカニズムは未解明である。

そこで我々は非ヒト霊長類を用いて、霊長類の新しい *in vitro* 解析系として腸管オルガノイドの樹立に成功した [6]。オルガノイドは、培養下で生体組織の幹細胞から生体組織・器官に類似した立体構造を創出したものであり、発生生物学や創薬研究に至るまで幅広く活用されている。作製したオルガノイドは、*In vivo* の組織をモデル化できるため、特にサルやヒト等の貴重な組織・器官を実験系として扱う際に有用である。共同利用研究では、Tuft 細胞を選択的に増加させたサル腸管オルガノイドの遺伝子解析において、げっ歯類とは異なる遺伝子パターンを示すことを解明した (図 1) [7]。ただし、選択的に増加させたといっても元々数%しかない Tuft 細胞を 10% 程度に増加させただけでは、Tuft 細胞特異的に少量発現している受容体等の遺伝子 [8] を検出することができなかった。今後は Tuft 細胞を分離して、より特異的に発現している遺伝子を探索することにより、食物やその分解物を含めた腸内の化学感覚受容メカニズムの全貌を明らかにできると考えている。

参考文献

- [1] Moltke et al., Nature 2016.
- [2] Gerbe. et al., Nature 2016.
- [3] Billipp et al., Curr. Opin. in Immunol. 2021.
- [4] Beura et al., Nature 2016.
- [5] Nagpal et al., Front. Microbiol. 2018.
- [6] Inaba et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2021.
- [7] Inaba et al., Int. J. Mol. Sci. 2021.
- [8] Hayashi, Inaba et al. Genes and Genomics 2021.

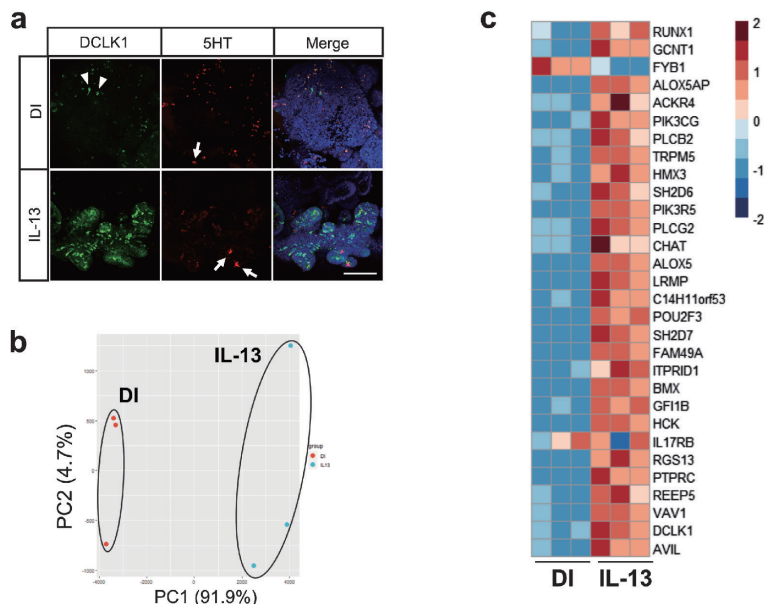


図 1 腸管オルガノイドの分化誘導と RNAseq の結果 (文献 7 より改変)

今井啓雄 (京都大学霊長類研究所)
 稲葉明彦 (京都大学霊長類研究所)
 共同研究先: 岩槻 健 (応用生物科学部)
 隈本宗一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ *Gluconobacter japonicus* の細胞内代謝工学研究 -*G. japonicus* における細胞内グルコース代謝の理解 - ◀

酢酸菌は、グルコースやエタノールといった様々な糖やアルコール類を不完全に酸化するユニークな酸化反応を行う。この酸化反応は酸化発酵と呼ばれ、ビタミンC合成におけるソルボース発酵や食酢の製造といった産業の場で古くから広く利用されてきた。

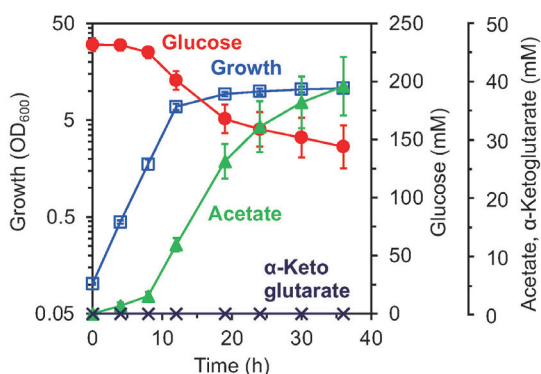
酢酸菌に関する最初のゲノム情報は、*Gluconobacter oxydans* 621Hのもので2005年に開示され、その結果、先の研究で考察されていたように、*G. oxydans*は解糖系のホスホフルクトキナーゼ遺伝子を欠いており、グルコースなどの糖類は細胞内で主としてペントースリン酸経路およびエントナー・ドウドロフ経路で代謝されていることが示唆された。また、*G. oxydans*はクエン酸回路およびグリオキシル酸回路も不完全であることがゲノム情報により明らかにされ、*G. oxydans*の細胞内NADPH/NADP⁺比は高く保持されていると予想された。これらの特徴はその後ゲノム情報が開示された他の*Gluconobacter*属でも同様であったことから、*Gluconobacter*属は、特に、ペントースリン酸経路を構成する化合物を前駆体に還元力を用いて生成される化合物の生産に適していることが考えられた。そこで、我々は、グルコースを出発原料とした*Gluconobacter*属によるシキミ酸経路を介して生成される有用物質の効率的生産を目標に設定し研究を開始した。

材料として、ゲノム情報が完備されており、遺伝子工学ツールの充実していた*Gluconobacter japonicus* NBRC 3271を選抜した。目標達成の第一段階として、細胞内グルコース代謝の活性化に取り組んだ。*Gluconobacter*属は、グルコースの大部分を細胞膜結合型グルコース脱水素酵素(mGDH)によりグル

コン酸へと酸化する。そこで、mGDH不活化株(Δ mGDH)を作製し、グルコースを出発原料とする培地で培養試験を行なった。その結果、グルコン酸の生成は観察されなかったものの、低い糖代謝活性が示され、代謝産物として酢酸が蓄積していた(図A)。酢酸の生成は、シキミ酸経路への炭素流量低下を招くため、 Δ mGDHを親株に酢酸生成の初発酵素であるピルビン酸脱炭酸酵素(Pdc)をコードする遺伝子を欠損した二重欠損株(Δ mGDH Δ Pdc)を作製し、同様の方法で培養試験を行なった。その結果、親株と比較して、大幅な糖代謝活性およびバイオマス量の亢進が観察され、代謝産物として α -ケトグルタル酸が蓄積していた(図B)。これらの顕著な変化は、Pdcの欠損が①親株におけるストレスの緩和、②クエン酸回路への炭素流量の増加、に寄与することを示唆しており、加えて、この変化は、マンニトールを出発原料にした培養では観察されなかったことから、作製した変異株は、*Gluconobacter*属における細胞内グルコース代謝の活性化機構を理解する点で利用価値の高いものと期待された。

これらの結果を受けて、本共同研究では、 Δ mGDHおよび Δ mGDH Δ Pdcのグルコースおよびマンニトール培養条件における発現解析を行うことで、*Gluconobacter*属における細胞内グルコース代謝の活性化により引き起こされるストレス機構やそのストレスに対する潜在的な対抗策の理解に取り組んでいきたいと考えている。また、得られる知見をもとに、*Gluconobacter*属の細胞内代謝工学による有用物質生産を実現したい。

A. Δ mGDH



B. Δ mGDH Δ Pdc

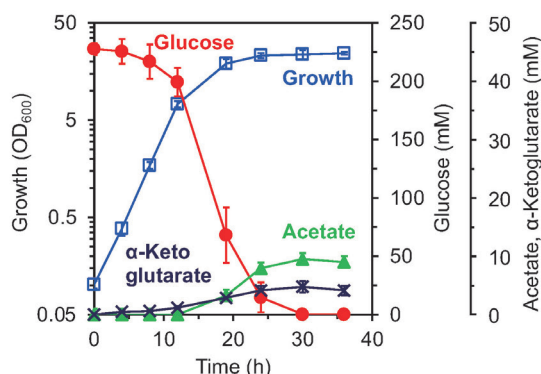


図 Δ mGDH (A) および Δ mGDH Δ Pdc (B) のグルコース培地における生育・代謝物の経時変化。

Δ mGDHでは、生育およびグルコース消費が脆弱であり、代謝産物として主に酢酸の生成が確認された。この時、 α -ケトグルタル酸の生成は確認されなかった。一方で、 Δ mGDH Δ Pdcでは、 Δ mGDHと比較して、グルコースの速やかな消費とそれに伴う生育の亢進が確認された。また、酢酸の生成が抑制された一方で、 α -ケトグルタル酸の蓄積が確認された。これらの結果は、Pdcの欠損が、 Δ mGDHにおけるストレスの緩和およびクエン酸回路への炭素流量の増加を引き起こすことを示唆していると考えられる。

片岡尚也 (山口大学大学研究推進機構)
共同研究先: 石川森夫 (応用生物科学部)
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ リンドウ葉枯病菌の感受性誘導に關与する宿主植物因子の探索 ◀

植物の葉に存在する気孔は、病原細菌や一部の病原糸状菌にとって植物組織内に侵入する入口であり、宿主植物・病原体双方にとって、生存競争の場となる重要な器官です。これまでに、気孔の開閉制御による宿主植物の病害防御機構はよく知られていますが、近年、宿主植物の気孔の数（気孔密度）そのものが病原体の感染の成否を左右する重要な要素であることがわかってきました (Tateda et al. 2019, *MPMI*. 32:428-436.; Dutton et al. 2019, *Plant Cell Environ.* 42:2411-2421.)。

私たちは最近、リンドウ (*Gentiana L.*) の気孔から侵入するリンドウ葉枯病菌 (*Septoria gentianae*) が、リンドウ葉の気孔密度を増加させることで、葉枯病菌自身に有利な生活環境を作り出している現象を発見しました。リンドウ葉枯病菌をリンドウ葉に接種すると、宿主であるリンドウの非感染上位葉（新生葉）の気孔密度が、対照区と比較して有意に増加し、その

新生葉では、リンドウ葉枯病菌の二次感染に対する感受性が增大していました。この現象は、一部の病原菌感染時に、非感染葉において誘導される Systemic induced susceptibility (SIS) の一種であると考えられます。

さらに、リンドウ葉枯病菌感染葉のトランスクリプトーム解析で同定された病原性エフェクター候補因子の中から、この気孔密度操作を介した感受性亢進を誘導する病原菌因子が見出されました。しかし、この病原性因子が、植物内で実際にどのように機能しているのかについては明らかになっていません。また、SIS という現象が、近年報告されつつある特徴的な現象であるため、SIS 誘導に關わる植物因子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、本研究課題では、リンドウ葉でのリンドウ葉枯病菌感染時のトランスクリプトーム解析から、SIS 誘導に關与する宿主植物因子の探索を試みます。

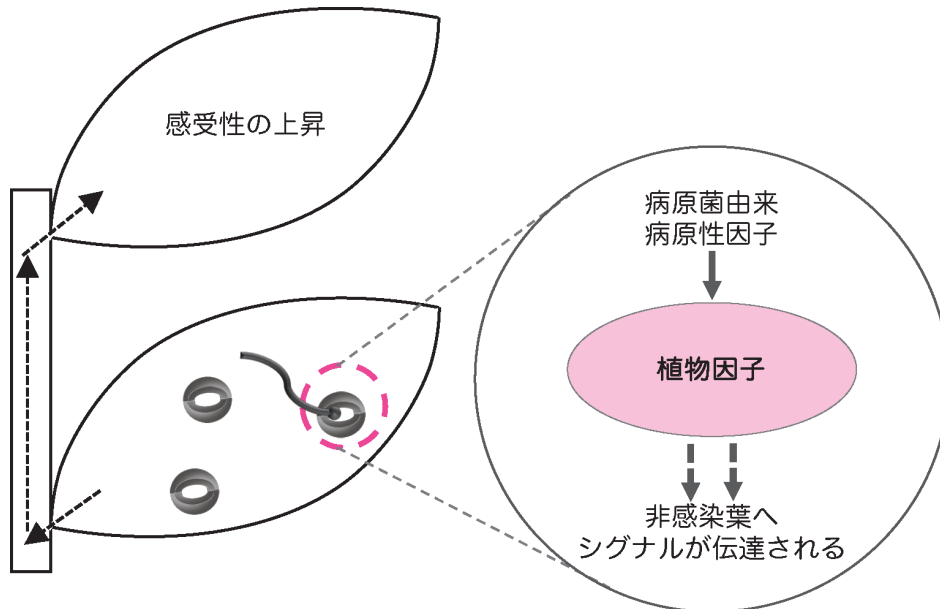


図1 リンドウ葉枯病菌による SIS 誘導モデル

館田知佳 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学研究科)
 共同研究先: 齋藤宏昌 (生命科学部)
 篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ ジャガイモの有用色素生産代謝改変に資するゲノム変異解析 ◀

ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) は世界では4大作物の一つであり、コメ、コムギ、トウモロコシと並ぶ生産量を誇る。ジャガイモは主にデンプンとしてヒトに重要なカロリー源を供給するのみならず、ヒトの健康向上に寄与する抗酸化性を示すカロテノイド類、フラボノール類、アントシアニン類やクロロゲン酸等に代表されるフェノール類を生産する能力を有する。近年、これらの健康増進作用を有する抗酸化性有色色素を多く含む品種の開発が進んでいる。カロテノイド生合成経路はナス科で共通であるが、ジャガイモ塊茎はトマト果実と比較して、高い抗酸化活性を示す脂溶性色素であるリコペンの代わりに白内障予防に効果があるルテインおよびがん細胞の増殖抑制を示すデオラキサンチンを高蓄積することが明らかになったが (Dewi et al., 2018)、この「作り分け」に関する研究は進んでいない。また、ジャガイモでは水溶性色素であるアントシアニン類の高いアシル化率が認められる。アシル化はアントシアニン類の構造的安定性を高めるだけでなく、pH変化の影響を受けにくく、高い抗酸化活性を維持させることができる。アシル化アントシアニン類の生産性を高めることができれば、鮮やかな色を付加させることによるジャガイモの食品としての生産価値の向上のみならず、抗酸化を通じた付加価値を高めることにつながる。しかし、アシル化アントシアニンを含むフェニルプロパノイド生合成経路の複雑な制御機構について知見が乏しいのが現状である。

ジャガイモに関するゲノム研究はヨーロッパやアメリカを中心に展開されており、特にジャガイモに対する有用色素生産研究では、カロテノイド生産性に関する研究 (Haynes et al., 2011) アシル化アントシアニンに特化した研究 (D'Amelia et al., 2020) が行われている。前者については、新たな育種材料として2倍体ジャガイモの高カロテノイド蓄積を目指した研究であり、後者はアシル化に関わる転写因子に関する研究である。植物由来の有用物質の多くは二次代謝物または特化代謝物と称されるが、これらの生産能についてはゲノムレベルの変異が代謝に影響を与え、その結果目的とする特化代謝物の蓄積量が変化するという例が多数報告されている。

本研究は、ジャガイモ塊茎に含まれるカロテノイド類およびフェニルプロパノイド類の生合成経路を介した有用色素の「作り分け」の仕組みを明らかにすることを目的とする。そのために、生物資源ゲノム解析センターの共同研究拠点施設を活用し、ジャガイモ研究でリファレンスとして用いられている品種 'Desiree' を対照区とし、カロテノイド高蓄積品種およびアントシアニン高蓄積品種に対するゲノムの全ゲノムリシーケンスを進めている (図1)。リシーケンス解析に基づいたゲノムの機能的な特徴付け解析等を行うことにより、ゲノム変異、生合成経路および色素蓄積に関する知見を得る予定である。平行して筑波大学では抗酸化性を有する色素類の高速かつ簡易に定量を行う分析法を開発した (Aono et al., 2021)。本結果と本研究課題で得られる情報を組み合わせることで、ジャガイモに含まれる

有用色素生産の鍵因子の抽出に迫りたいと考えている。さらに、開発した簡易定量法を応用し、食品として調理された場合を想定したジャガイモの物性試験および色素蓄積変化の定量することで、本取組みを基礎研究の範囲に留めず農学分野の食品科学系の研究においてジャガイモの食資源としての新たな付加価値開拓につなげることができると考えている。

- Aono Y, Asikin Y, Wang N, Tieman D, Klee H, Kusano M (2021) High-Throughput Chlorophyll and Carotenoid Profiling Reveals Positive Associations with Sugar and Apocarotenoid Volatile Content in Fruits of Tomato Varieties in Modern and Wild Accessions. *Metabolites* 11: 398
- D'Amelia V, Villano C, Batelli G, Çobanoğlu Ö, Carucci F, Melito S, Chessa M, Chiaiese P, Aversano R, Carputo D (2020) Genetic and epigenetic dynamics affecting anthocyanin biosynthesis in potato cell culture. *Plant Science* 298: 110597
- Dewi IC, Falaise C, Hellio C, Bourgoignon N, Mouget J-L (2018) Chapter 12 - Anticancer, Antiviral, Antibacterial, and Antifungal Properties in Microalgae. *In* IA Levine, J Fleurence, eds, *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Academic Press, pp 235-261
- Haynes KG, Clevidence BA, Rao D, Vinyard BT (2011) Inheritance of Carotenoid Content in Tetraploid × Diploid Potato Crosses. *Journal of the American Society for Horticultural Science J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 136: 265



図1. 本研究課題で用いるジャガイモ品種とゲノム比較解析および有用色素解析ワークフロー

草野 都 (筑波大学生命環境系)
 共同研究先: 佐藤広顕 (生物産業学部)
 篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

▶ 老化がマウス卵母細胞の微小環境を構成する体細胞の トランスクリプトームに及ぼす影響 ◀

現代社会において、高齢出産を選択する女性が増えているが、不妊症や流産、先天性異常のリスクを高めることが問題視されている。年齢の上昇とともに、卵子の染色体異常性が30～60%に達することが報告されている。また、米国CDCの調査では、高齢女性において若い女性の提供卵子を用いることで、出産の確率が上昇することが明らかとなった。そのため高齢に伴う生殖機能の低下は、卵子に起因することが示唆されており、その発生メカニズムの解明と救済方法の確立が求められている。

生殖年齢後期の卵子やその微小環境は、老化によるダメージを蓄積している。卵巣内で卵子は周囲の細胞と卵胞を構成し、発育するまで休眠状態を数十年以上維持する。これまでに高齢個体において、卵巣組織の線維化や血流の減少、活性酸素種の除去能の低下などの表現型が観察されている。近年、個体老化に伴い発育した卵子と周囲の卵丘細胞で大規模なトランスクリプトーム変化が生じていることが報告された。すなわち、高齢個体における卵子の低質化は、卵子発育をサポートする微小環境の変化に起因する可能性が推測される。しかしながら、環境要因が複雑に絡み合うため低質化要因の特定は困

難である。

卵子発育をサポートする顆粒層細胞の性状は、卵子の質を推測する上で重要な手がかりとなる。これまでに我々は、顆粒層細胞の遺伝子発現プロファイルが卵子の発育に伴い劇的に変動することを確認している。また、体内発育卵と体外発育卵の顆粒層細胞を解析し、得られた遺伝子発現差異を培養系に補うことで、体外発育効率を向上させた。しかしながら、老化が顆粒層細胞の性状にどのような影響を及ぼしているかは明らかではない。

これらの背景から卵子の質は、顆粒層細胞の状態に左右され、老化により顆粒層細胞の性状を調べることは、卵子低質化の要因を明らかにできるのではないかと考えた。そこで本研究では、トランスクリプトーム解析により老化が顆粒層細胞の卵子発育能に及ぼす影響を調べる。さらに体外培養系を用いて解析結果を検証することで卵子低質化の発生メカニズムの全貌を明らかとすることを目的とする。

最後に本研究を通じて、東京農工大学の岩田尚孝教授グループならびに生物資源解析ゲノムセンターの皆様と共同研究の機会をいただきましたことに厚く御礼申し上げます。



図1 卵子低質化をもたらす要因

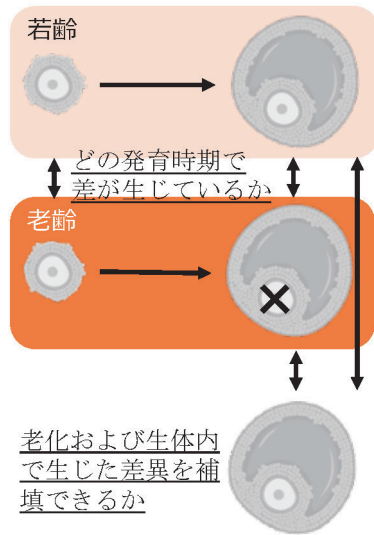


図2 本研究で明らかとすること

田崎秀尚（岡山大学生殖補助医療技術教育研究センター）

共同研究先：岩田尚孝（農学部）

隈本宗一郎（生物資源ゲノム解析センター）

▶ 植物の高湿度応答に関わる遺伝子の探索 ◀

植物のバイオマス量は葉の光合成と蒸散に依存するため、葉の機能を健全に保つことが農作物の収量を増やすうえで重要です。葉には多様な微生物が生息しており、葉圏を形成しています。細菌は葉圏で最も多いバイオマス量を有し、それらの一部は病原細菌として宿主植物に病気をもたらします。病気の発生には宿主植物と病原細菌の遺伝学的関係性に加えて、それらを取り巻く環境が鍵となります。

雨もたらす高湿度環境は、病原細菌による葉の病害を拡大します。気孔などから葉内に侵入した病原細菌は、自身の周囲に水を集め増殖を促進し、強い病原性を示します(図1)。これは水浸漬と呼ばれ、葉の細菌病の初期病徴として幅広い植物種で報告されています。近年、病原細菌はエフェクターと呼ばれるタンパク質を分泌し、宿主植物の生理機能を攪乱することで、水浸漬を誘導することが明らかになりました。一方で、植物がどのようにして病原細菌による水浸漬を防いでいるのか、その実体は不明なままです。

私たちは、アブラナ科植物シロイヌナズナの細胞膜型アクアポリン PIP2;6 を介した水浸漬抵抗性を明らかにしました。高湿度環境に晒されたシロイヌナズナは、受容体様キナーゼ BAK1 依存的に PIP2;6 のリン酸化を誘導し、水輸送活性を高めることで水浸漬を抑制します(図2)。また、高湿度環境下での植物ホルモン ABA (アブシシン酸) の不活化が、水浸漬抵抗性に寄与することも見出しました。その鍵となるのが、高湿度に応じた ABA 代謝酵素 CYP707A の遺伝子発現誘導です(図2)。これらの発見から、シロイヌナズナは高湿度環境を感知することで、病原細菌の水浸漬に対する抵抗性を誘導し

ていることが示唆されました。

次の課題は、シロイヌナズナが高湿度環境にตอบสนองする仕組みの解明です。水浸漬抵抗性の誘導に加えて、高湿度環境に晒されたシロイヌナズナは、寄生菌への抵抗性に関わる植物ホルモン SA (サリチル酸) 応答の抑制、クチクラ層の水透過性の促進など、様々な生理的变化を伴います。しかし、高湿度応答の包括的な基礎情報はこれまでに報告されておらず、順遺伝学および逆遺伝学的アプローチが難しいのが現状です。本共同研究では、高湿度応答のメカニズム解明を推進するため、高湿度環境におけるシロイヌナズナの遺伝子発現プロファイルを取得します。得られた情報から、高湿度環境下で産生されるシグナル分子やその受容体、遺伝子発現を制御する転写因子など鍵因子、また変異体スクリーニングに適用可能なマーカー遺伝子の候補をリスト化し、高湿度応答の解明に向けた基盤を整備します。さらに、トランスポーター・イオンチャネルなど水輸送に関わる因子にも着目し、水浸漬抵抗性のさらなる理解とその活用にも取り組んでいきたい。

地球温暖化による海面温度の上昇は、降水量の増加を引き起こし、農地の高湿度環境化を多発させます。病原細菌による水浸漬誘導は、イネ、オオムギ、トマトなど主要な農作物でも確認されています。したがって、本共同研究で得られるシロイヌナズナの情報を公開することで、アブラナ科以外の植物種における高湿度応答および水浸漬抵抗性の研究が広がり、高湿度環境に対応した農作物防除の実用化に向けた流れを生み出すと期待される。



図1. 病原細菌が誘導する水浸漬

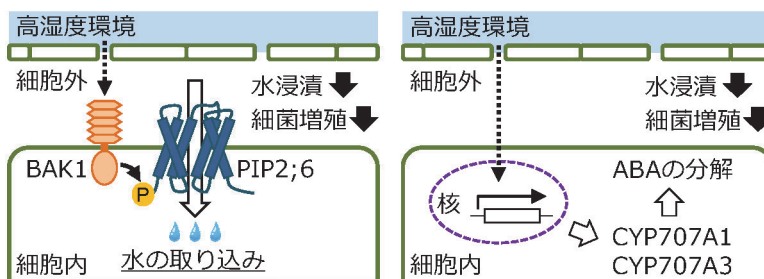


図2. 高湿度環境に晒された葉で誘導される植物の水浸漬抵抗性

安田盛貴 (奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)
共同研究先: 四井いずみ (生命科学部)
篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

NGRC ニュース

東京農業大学生物資源ゲノム解析センター

2022年3月号

2021年度 学内公募一覧

1. 太治 輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「シロイヌナズナの野生型および変異株のリシーケンス」
2. 田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)
「Flexible ddRAD-seq 法を用いた栽培バナナの遺伝的多様性に関する分子遺伝学的研究」
3. 米澤 隆弘 (農学部 動物科学科)
「環境 DNA を用いた流行性病原体の自然環境下における感染経路ネットワーク推定」
4. 高島 昌子 (農生命科学研究所)
「酵母の多様性獲得の仕組みの解明」
5. 樋浦 仁 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「妊娠期の葉酸摂取量が仔の雄性生殖細胞のエピジェネティクスに及ぼす影響」
6. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「乾燥条件とダイジョの共生細菌叢の関連性に関する研究」
7. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「Analysis of Bacterial diversity associated with water yam (*Dioscorea alata* L.) affected by the yam dominant endophytic bacterial inoculation.」
8. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「塩生植物アッケシソウの根圏細菌叢と菌類叢の解析」
9. 半澤 恵 (農学部 動物科学科)
「成熟培養したウマ末梢血単核細胞における赤血球系細胞関連遺伝子の発現遺伝子の調査」
10. 石川 森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)
「各種発酵食品における微生物叢の共通性と特性の検証」
11. 篠原 卓 (国際食料情報学部 国際食農科学科)
「RNA-Seq 解析によるパッションフルーツ成熟前落果発生機構解明」
12. 下村 健司 (生命科学部 分子生命化学科)
「Callosobruchus 属マメゾウムシの嗅覚受容に關与する分子群の推定と比較解析」
13. 高島 昌子 (農生命科学研究所)
「ゲノムデータに基づく酵母の高次分類体系の再構築」
14. 福島 穂高 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「精神疾患の分子メカニズムの同定を目的としたトランスクリプトーム網羅的解析」
15. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「GABA がサル腸管オルガノイドに及ぼす影響の解析」
16. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「ヒト腸内細菌が消化管上皮に及ぼす影響の解析 Part 2」
17. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「腸内細菌が膵管上皮細胞に与える影響の解析」
18. 岩槻 健 (応用生物科学部 食品安全健康学科)
「サルおよびヒト味蕾オルガノイドの性質比較」

19. 櫻井 健志 (農学部 デザイン農学科)
「マメコガネ *Popillia japonica* の嗅覚受容関連遺伝子の探索」
20. 尾畑 やよい (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「体外成長・体外成熟卵母細胞における発生支持能制御因子に関する研究」
21. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「シアノバクテリアにおける巨大プラスミド維持機構の解明」
22. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「原生生物との相互作用による藍藻の形態変化」
23. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「合成生物シアノバチルスの遺伝子発現解析」
24. 廣江 綾香 (生命科学部 分子生命化学科)
「温泉水からのポリエステル合成好熱菌の取得解析」
25. 篠澤 章久 (生物資源ゲノム解析センター)
「ヒメツリガネゴケにおける赤色光を介した低温順化制御機構の解析」
26. 四井 いずみ (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「ヒメツリガネゴケにおけるキチン非感受変異体および ABA 非感受変異体の原因遺伝子座の解析」
27. 川崎 信治 (生命科学部 分子微生物学科)
「微生物の環境ストレス耐性機構と感受性機構に関する研究」
28. 服部 一夫 (応用生物科学部 栄養科学科)
「機能性評価系として腸管オルガノイドを用いた分岐鎖アミノ酸の新たな機能の解明」
29. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)
「胚発生支持能力に影響する miRNA」
30. 菊野 日出彦 (国際食料情報学部)
「令和 3 年度委託事業 (ミャンマー国カレン州における有用植物遺伝資源の機能性分析調査)」
31. 對馬 誠也 (生命科学部 分子微生物学科)
「植物ホルモン「ストリゴラクトン」の土壌処理が土壌微生物相に及ぼす影響評価」
32. 横田 健治 (応用生物科学部 農芸化学科)
「植物病害の生物防除を目的とした有用細菌及び病原菌の網羅的な遺伝子解析」
33. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)
「飼養条件が卵胞液中の miRNA のプロファイルに及ぼす影響」
34. 田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)
「日本原産セリ科植物アシタバ (*Angelica Keiskei*) のゲノム解読」
35. 石川 森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)
「様々な発酵環境から単離された産業微生物の大規模ドラフトゲノムシーケンス」
36. 三浦 大樹 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「ChIP-seq 法の確立」
37. 米澤 隆弘 (農学部 動物科学科)
「環境 DNA を用いた流行性病原体の自然環境下における感染経路ネットワーク推定
2,000,000」
38. 鈴木 智典 (生命科学部 分子微生物学科)
「微生物と植物における遊離フラビン関与の鉄代謝」
39. 米澤 隆弘 (農学部 動物科学科)
「MiCAPs 法を用いたゲノムワイドマイクロサテライト解析に基づく日本鶏の集団遺伝学的研究」

40. 田中 啓介 (生物資源ゲノム解析センター)
「MiCAPs 法を用いた DNA バーコーディングによる遺伝資源管理の検討」
41. 佐々木 剛 (農学部 動物科学科)
「真無盲腸目のゲノム解析～苦味受容体遺伝子の分子遺伝学的研究～」
42. 佐々木 剛 (農学部 動物科学科)
「深海性魚類におけるロドプシン遺伝子の多様性について」
43. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)
「FKBP12 タンパク質の転写因子としての機能の普遍性の解明」
44. 小川 英彦 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「低分子化合物を用いたマウス栄養膜幹細胞の運命転換」
45. 渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「ソテツ珊瑚根での共生に寄与する藍藻の遺伝子群の探索」
46. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「Analysis of the response of bacterial structure of various water yam varieties (*Dioscorea alata* L.) to inoculation with highly dominant endophytic bacteria.」
47. 小川 英彦 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「マウス壁栄養外胚葉における CDX2 発現低下の意義の解明」
48. 山本 紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
「Extraction and Analysis of Microbiomes Associated with Kinandang Patong Rice (*Oryza sativa* L.) Roots and Grains」
49. パチャキル バビル (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「ゴマの品種識別用 DNA マーカーの開発」
50. 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)
「人工環境表面サンプルにおけるショットガン・メタゲノム解析の条件検討」
51. 高島 昌子 (農生命科学研究所)
「担子菌酵母 *Trichosporon asahii* の菌糸生長に関わる遺伝子の探索」
52. 吉川 潤 (応用生物科学部 醸造科学科)
「*Zalaria* sp. Him3 の *de novo* ゲノム解析と *A. pullulans* とのゲノム比較」
53. 岩田 尚孝 (農学部 動物科学科)
「酢酸が動物胚の遺伝子発現に及ぼす影響」
54. 和久井 健司 (農学部 生物資源開発学科)
「小管在来ワサビの遺伝的特徴付けに関する研究」
55. 尾畑 やよい (生命科学部 バイオサイエンス学科)
「卵巣内体細胞および卵母細胞における遺伝子発現プロファイルの経時的解析」
56. 笠原 浩司 (生命科学部 分子微生物学科)
「免疫抑制剤ラパマイシン・FK506 の標的分子 FKBP12 の動物細胞における機能解明」
57. 庫本 高志 (農学部 動物科学科)
「黒毛和種と無角和種を区別するゲノム多型情報の収集」
58. 和久 大介 (国際食料情報学部 国際農業開発学科)
「野生動物の植物食性解明」
59. 加藤 拓 (応用生物科学部 農芸化学科)
「セルロース資材の添加が土壌中のバイオマスリン酸量ならびに微生物叢の多様性に与える影響」

精神疾患の分子メカニズムの同定を目的とした トランスクリプトーム網羅的解析

我々は遺伝子操作により記憶能力が向上または低下したトランスジェニックマウスや、環境要因を再現した PTSD 動物モデルを開発してきた。しかし、これらマウスの脳内でどのような生化学的変化が起こっているかは十分に明らかに出来ていない。そこで、これらゲノム要因と環境要因を再現した動物モデルのトランスクリプトームの網羅的解析を行い、その発現プロファイルを詳細に比較することで、精神病態の分子基盤・病態機序を同定することを目的とした。

恐怖体験の記憶（恐怖記憶）の形成は、ヒトを含めた動物が危険を回避するための本能的な生命現象であるが、恐怖記憶制御機構の破綻は心的外傷後ストレス障害（PTSD）などの重篤な精神疾患を引き起こす。PTSD は世界規模の社会問題であり、我が国では、人口の 1.3% が発症するといわれており珍しくない疾患である。しかし、根本的な治療薬は存在せず、その分子病態メカニズムの解明は急務である。一方、最近の研究から、ヒトと動物の間において恐怖記憶制御機構の共通性が観察され、モデル動物を用いた基礎研究の成果が、PTSD などの精神疾患の新規治療方法開発に繋がると期待されている。

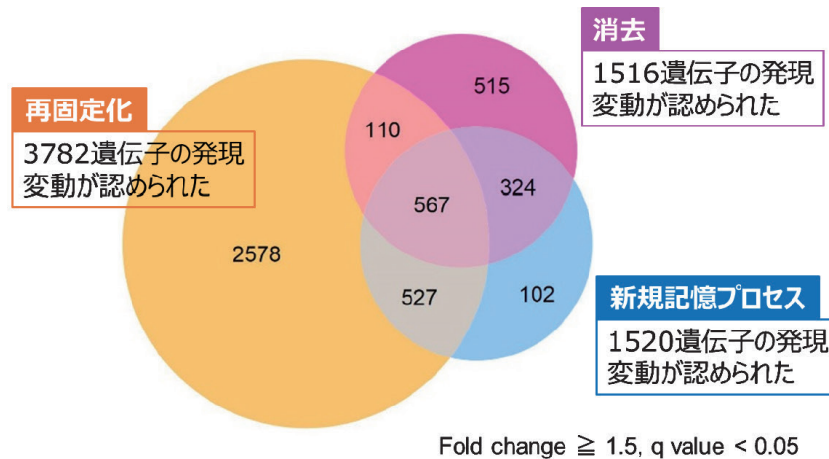
記憶は遺伝子発現依存的な「固定化」のプロセスを経て長期記憶となる。恐怖記憶の場合、記憶が思い出されると恐怖反応を維持・強化する「再固定化」または恐怖反応を軽減する「消去」のプロセスが誘導される。「再固定化」と「消去」のプロセスは、世界的にげっ歯類の PTSD モデルとして捉えられているものの、両者の分子機構の共通性と多様性は不明な点が多く残されている。そこで本研究では、恐怖記憶制御の分子メカニズムを解明する端緒として、「再固定化」と「消去」のトランスクリプトーム解析を行った。

マウスにおける恐怖記憶課題である受動的回避反応課題は、明箱と暗箱に分かれた解析装置を用いる。この課題では、マウスが暗所を好む習性を利用し、明箱から暗箱への移動後に暗箱内で電気ショックを与えること（恐怖体験）により、恐怖記憶を形成させる（条件付け）。この翌日にマウスを再び明箱に入れると（再暴露）、暗箱に対する恐怖記憶が想起されると考えられた。そのため、再暴露を明箱でのみ行った場合は「再固定化」が誘導され、マウスが暗箱へ移動後に電気ショックを与えずに暗箱内に滞在させると、暗箱内が安全であることを再学習し、「消去」が誘導されると予想された。我々は、この仮説に従って、マウス遺伝学的、行動薬理学的、免疫組織学的手法により、「再固定化」と「消去」を区別できる解析系を確立し、両プロセス誘導時に活性化する複数の脳領野を明らかにしてきた (Fukushima et al., *Elife*. 2014, 3)。さらに、各プロセスを誘導するためには、誘導条件の異なる記憶フェーズが存在し、「再固定化」の誘導をキャンセルし、「消去」を誘導するための「新たな記憶プロセス（フェーズ）」の存在を発見した (Fukushima et al., *J Neurosci*. 2021, 41, 1288-1300.)。

現在、これまでの我々の研究結果に基づき、各記憶フェーズ誘導に伴う分子動態を明らかにするために、活性化脳領野のトランスクリプトーム解析を試みている。恐怖記憶制御において脳内で中心的な役割を担う扁桃体を解析した結果（下図）、恐怖反応を維持・強化する「再固定化」誘導時では 3782 遺伝子の発現変動が認められた。一方、恐怖反応を減弱する「消去」誘導時では 1516 遺伝子の発現変動が観察された。さらに、「新たな記憶プロセス」では、1520 遺伝子の発現変動が観察された。恐怖記憶制御には前頭前野や海馬も重要な役割を担っているため、今後、これら脳領野も解析し

ていく予定である。

一方、興味深いことに、「再固定化」誘導時に扁桃体を薬理的に不活性化すると、本来は活性化（遺伝子発現が誘導が誘導）される海馬において、遺伝子発現マーカーである初期応答遺伝子の発現が認められなかった。従って、扁桃体は海馬よりも上位の脳領域として機能し、海馬と機能的な神経ネットワークを形成することで、海馬における遺伝子発現を制御することが示唆された（Fukushima et al., *Mol Brain*. 2021, 14, 44.）。今後、どのような分子メカニズムによって脳領域間の機能的な神経ネットワークが記憶を制御しているのかも解析していく予定である。



図：恐怖記憶想起後の記憶プロセス誘導に伴うマウス扁桃体の遺伝子発現プロファイル
1.5倍以上の発現変動が認められた遺伝子数は、「再固定化」誘導時が最も多かった。

福島穂高（生命科学部 バイオサイエンス学科）

霊長類消化管単層培養系を用いたヒト腸内細菌成分が 上皮細胞に与える影響の解析

消化管は常に外界と接し、様々な食品因子や細菌、寄生虫に晒されている。そのため、腸管上皮細胞には栄養を吸収するだけでなく、異物を認識し排除する機能が求められる。最近、消化管上皮細胞の中で tuft 細胞は寄生虫の感染時に免疫反応を引き起こす細胞であることがわかり、寄生虫以外に対しても反応し生体防御の要となるのではと期待されている。しかし、消化管上皮の1%に満たない数しか存在しない tuft 細胞を生体内で特定し解析することは不可能に近い。また、味覚受容体のリガンドに対する特異性の解析実験から、これまで我々が研究に用いてきたげっ歯類と我々ヒトでは、味覚感受性の違いが大きいことが判明し、研究成果をヒトに外挿するためにはヒトと同じ霊長類の細胞を研究に用いることが求められるようになってきた。

そこで本研究では、げっ歯類よりも遥かにヒトに近い霊長類より消化管オルガノイドを作製し、*in vitro* において異物に対する反応を観察することにした。通常、消化管オルガノイドは球体として維持されるので、受容機構系を構築した上で、異物としてヒト腸内に存在する細菌を暴露し細胞の起こる mRNA の変化を解析することを目的とした。まず、3次元で培養されているオルガノイドの内腔側を露出した腸管上皮細胞の単層培養系の構築に取り組んだ (図1)。

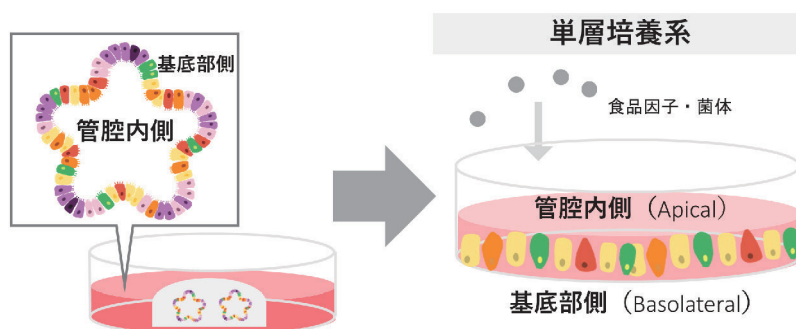


図1 霊長類消化管オルガノイドの通常培養 (左) と単層化オルガノイド培養 (右) の概略図

オルガノイドをシングルセル化し、マトリゲルをコートしたプレートに播種することで単層化オルガノイド培養を行ったところ、タイトジャンクションマーカの免疫組織化学染色などにより、単層培養化の内腔 - 基底側の細胞極性が形成された (図2)。

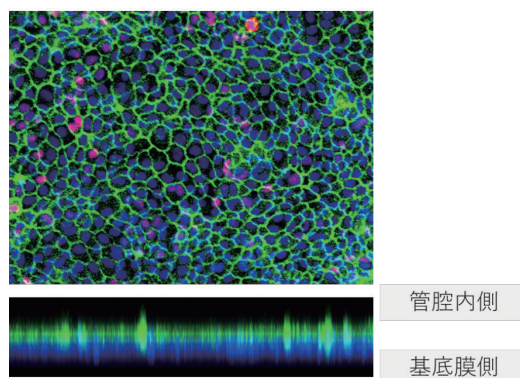


図2 単層化オルガノイドの免疫組織化学染色像 (上部)

緑：タイトジャンクションマーカ (ZO-1) 赤：細胞増殖マーカ (Ki67) 青：核染色 (DAPI)

上部の染色像を真横から解析した図 (下部) 細胞核の上部にタイトジャンクションマーカの染色がー列に確認できる。よって、管腔内腔を上に向けた方向性を持つ単層培養が形成されている。

上記の単層培養化したオルガノイドに、17種類の菌体混合物（死菌体と培養液の混合物）を24時間添加し、遺伝子の発現の変化をRNA-seqにて網羅的に解析した。その結果、主にケモカインやインターロイキンなどの炎症関連遺伝子の発現量がコントロール群に比べ有意に増加した（図3）。

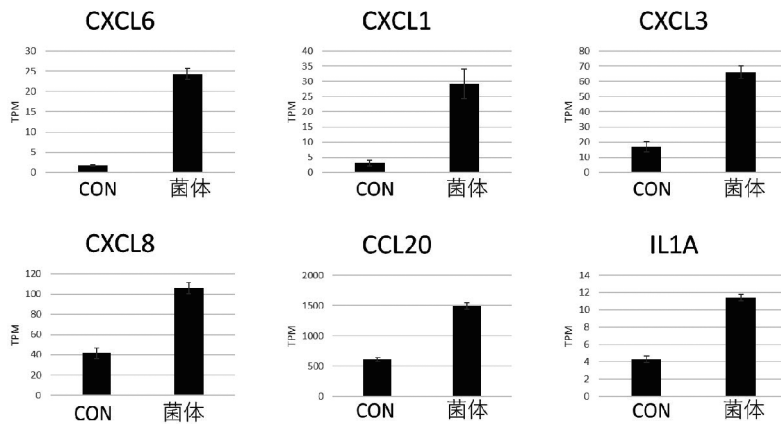


図3 菌体添加によって発現が増加した遺伝子

このことから、腸管上皮細胞は菌体成分を認識し、生体防御機能を惹起することが示唆された。これまで、小腸の免疫系はM細胞の近くにあるパイエル版や粘膜固有層に存在する免疫細胞が担当していると考えられていたが、今回の結果から、通常の消化管上皮細胞にも外来因子を認識し、免疫系を惹起する能力があることが示唆された。

今後、本研究において構築された単層培養がバイオジェニックス食品などをはじめ、新規機能性食品や新薬開発へと貢献することを期待する。

謝辞：本研究は京都大学霊長類研究所の共同研究・共同利用制度を利用しサンプルを提供していただいた。この場をお借りして今井啓雄教授および霊長類研の皆様には感謝いたします。

岩槻 健（応用生物科学部 食品安全健康学科）
 有永理峰（応用生物科学部 食品安全健康学科）
 田中啓介（生物資源ゲノム解析センター）

機能性評価系として腸管オルガノイドを用いた 分岐鎖アミノ酸の新たな機能の解明

我々は、腸管オルガノイドを用いて、カビ毒、サイトカイン、食品成分が腸管幹細胞に及ぼす研究に取り組んできた (Saito et al. *Biochem Biophys Res Commun* 474, 161-7, 2016; Hanyu et al. *Toxins* 12, 610, 2020; Saito et al. *Cytotechnology* 72, 479-88, 2020; Saito et al. *Cytotechnology* 73, 669-82, 2021)。食品成分に関しては、必須アミノ酸のうち、メチオニン (Met) の欠乏が、腸管オルガノイドの増殖を低下すること、内分泌細胞への分化を促進することを見出し、Met が腸管幹細胞の維持や機能に重要な役割を果たしていることを報告した。一方で、バリン (Val) 欠乏が腸管オルガノイドの増殖に影響を及ぼすことも見出していた。しかし、腸管幹細胞に対して Val がどのような影響を及ぼすのかについての情報は無い。そこで、腸管幹細胞に及ぼす Val の影響を明らかにすることで、食品成分で腸管幹細胞の機能を制御するという新しい視点を食品機能学研究にもたらしることができるのではないかと考えた。また、Val だけでなく、同じ分岐鎖アミノ酸 (BCAA) であるロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile) にも着目し、各 BCAA が腸管幹細胞に及ぼす影響を比較検討することで、その機能解析の深度を増すことができると考えた。そこで本研究では、各 BCAA の欠乏が腸管幹細胞の増殖や分化に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

幹細胞に及ぼす影響を評価するために、BCAAs 欠乏後のオルガノイド形成効率、幹細胞数、細胞増殖活性、幹細胞におけるアポトーシスを評価した。その結果、ロイシン欠乏 (-Leu)、イソロイシン欠乏 (-Ile) においては有意な変化は認められなかったのに対し、バリン欠乏 (-Val) においてオルガノイド形成効率、幹細胞数 (図 1A)、細胞増殖活性が有意に低下し、幹細胞におけるアポトーシス陽性幹細胞数は有意に増加した。以上のことから、BCAAs の中でも -Val が自己複製能低下とアポトーシス誘導により幹細胞数を減少させることが示唆された。

次に、分化に及ぼす影響を評価するために、BCAAs 欠乏後の各分化細胞数の割合の変化を調べた。その結果、-Val、-Leu においては有意な変化は認められなかったのに対し、-Ile において内分泌細胞数が有意に増加した。以上のことから、BCAAs の中でも -Ile が幹細胞から内分泌細胞への分化を促進することが示唆された。

さらに、BCAAs 欠乏によって認められた腸管オルガノイドの変化に対するメカニズムの解析のために RNA-seq を行った。各群の DEGs を反映させたヒートマップは、BCAAs の中でも -Val が特徴的な遺伝子発現の変動パターンを有することを示した (図 1B)。また、-Val は特異的 DEGs 数の変化が最も著しかった。今後は、Val 欠乏が関与している経路や因子の解析を進めて行く予定である。

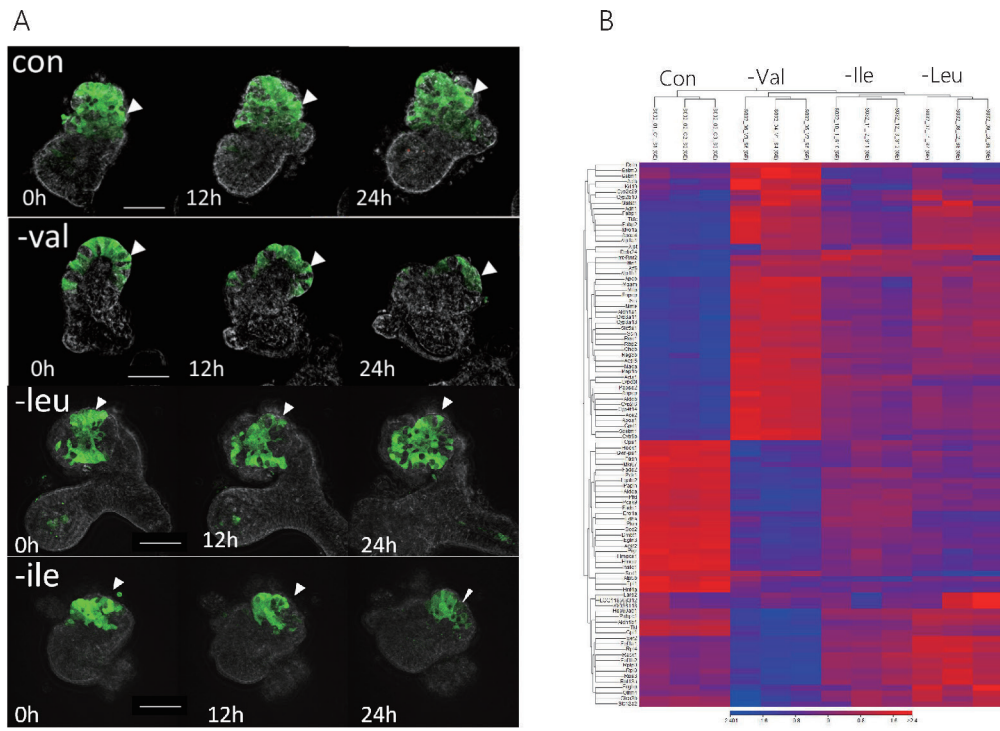


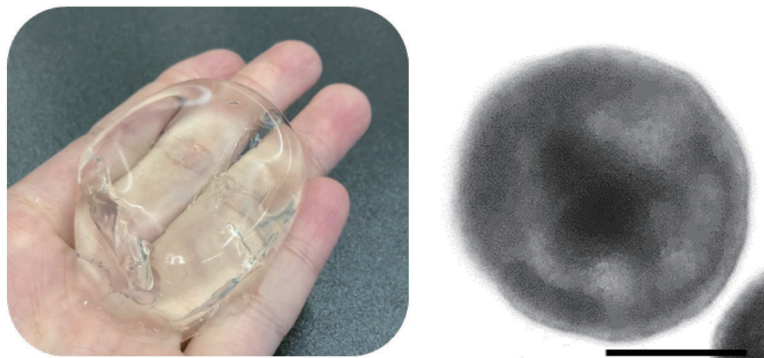
図 1. BCAAs 欠乏培地で培養した腸管オルガノイド中の幹細胞の変化と RNA-seq の結果 (一部)

服部一夫 (応用生物科学部 栄養科学科)

多糖類を用いた卵子や胚の体外発育培養方法の開発

体外発育した大型動物の卵子や胚は、体内で発育したものに比べ質で未だ劣っている。ヒトの生殖医療でもウシやマウスの胚作成でも一般にプラスチックシャーレを培養基質として用いている。本研究では培養条件中で培養シャーレの底面の堅さに着目し、安全で食品添加物にも利用するキサンタンガムやローカストビーンガムなどの多糖類を用いて柔軟な培養基質を作成し、その効果と分子機序を明らかにすることを目的とした。

ウシの初期胞状卵胞を卵巣から切り出しキサンタンガムとローカストビーンガムを混合して作成したゲルで16日間培養した。卵子周囲の顆粒層細胞はゲル上では球体を形成して発育し、発育後の卵子の直径は有意に大きくなった。この卵子を体外成熟後に受精に供すると受精率も有意に高いことがわかった。ゲル上で体外発育した卵子はミトコンドリアの含量や脂質含量も有意に多かった。卵子の体外発育には顆粒層細胞の性状が大きく関わっているため、これらの細胞をRNAseqに供したところ変動遺伝子がFocal adhesion、Phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt、Hippo signaling や Regulation of actin cytoskeleton signaling pathway に関与している事やTGFB1が上流因子であることが明らかになった。またゲル上で培養された顆粒層細胞は、プラスチック状で培養された顆粒層細胞とは異なるmiRNAを産生していることやそれらを培養液に分泌していることも明らかになった。これらの成果の一部は *Mol Reprod Dev.* 2021;88:516-524 に掲載された。同様にこのゲル基質を胚の培養にも応用した。ゲルを卵子の体外成熟時の基質に用いると、卵子の受精や胚盤胞期胚への発生率を有意に改善した。ゲル上で核成熟した卵子は脂質含量が多くさらにアクチンフィラメントの重合が顕著に亢進していることが認められた。顆粒層細胞のRNAseqでは多くの変動遺伝子が得られたが、IPA解析の結果TGFB1が上流因子として機能しており、TGFB1の添加はゲル上で培養した卵子に観察されたものと同様の変化を引き起こすことが明らかになった（日本繁殖生物学会2021・京都）。我々はこの多糖類ゲルを胚の発育に応用した場合、胚のアクチンフィラメントの重合を促し胚盤胞期胚への発生率を改善することが示している *Reprod Domest Anim.* 2020;55:1124-1131。そのため安全で柔軟な多糖基質で作成したゲルを培養に用いることで良質な胚を効率よく作成できること、この効果は細胞骨格に作用することを明らかにすることができた。



作成したゲル（左）ゲル上で球体となって発育した卵子顆粒層細胞複合体
Sugimoto A1, Inoue Y1, Tanaka K2, Sinozawa A2, Shirasuna K1, Iwata H1

岩田尚孝（農学部 動物科学科）

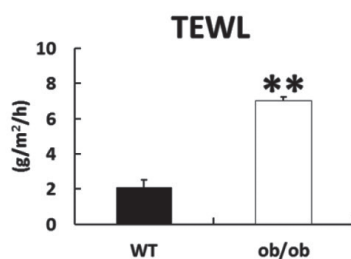
隈本宗一郎（生物資源ゲノム解析センター）

レプチンシグナルに着目したメタボリックシンドロームにおける皮膚機能脆弱化の分子機構の解明

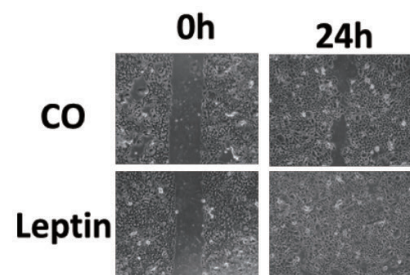
我が国では、メタボリックシンドロームは、40歳以上の男性では約50%以上が患者及び予備軍に該当する深刻な問題である。メタボリックシンドローム罹患者は肥満、糖尿病、脂質異常症等の様々な疾病を生じ、死亡率を著しく増加させることが報告されている (*Circulation*, 109, 433-438, 2004)。さらに、皮膚においてもバリア機能の低下、創傷治癒の遅延やアトピー性皮膚炎の発症リスクの増大が深刻である (*Br. J. Dermatol.*, 166, 498-504, 2012)。しかしながら、メタボリックシンドローム罹患者でこのような皮膚の機能障害が引き起こされる分子メカニズムは不明である。

メタボリックシンドローム罹患者は生体内でレプチン抵抗性を生じることが知られている (*Front. Med.*, 7, 207-222, 2013)。レプチンはアディポサイトカインの一種であり、食欲抑制作用やエネルギー消費促進作用に参与している (*Nature*, 372, 425-432, 1994; *Science*, 269, 546-549, 1995)。レプチン受容体 (Ob-R) には、いくつかのアイソフォームが存在し、様々な組織で発現している (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 7001-7005, 1997)。レプチン受容体アイソフォームの一つである Ob-Rb のシグナル阻害は、メタボリックシンドローム発症の主要な要因であると考えられている (*Cytokine*, 121, 154735, 2019)。これまでに、申請者は *leptin* 遺伝子に変異しており、メタボリックシンドロームモデルの *ob/ob* マウスにおいて皮膚のバリア機能が著しく悪化していることやレプチン添加により表皮角化細胞の遊走が促進することを見出している。

そこで本研究では、メタボリックシンドロームによる皮膚バリア機能の脆弱化に関してメカニズムを解明するため、レプチン受容体アイソフォームの一つである *Ob-Rb* の遺伝子に変異している *db/db* マウスを用いて解析を行う。その結果をもとに Ob-Rb 依存的なレプチンシグナルで調節されている皮膚機能関連分子を遺伝子及びタンパク質レベルで明らかにする。



ob/ob マウスでは TEWL (皮膚からの水分蒸散量) が増加する。
※値が高いことはバリア機能の低下を意味する。



レプチンは表皮角化細胞の遊走を促進する。

山根拓実 (応用生物科学部 食品安全健康学科)

マウス栄養外胚葉において *Cdx2* 発現を制御する 新規分子機構の解明

着床は哺乳類において特異的かつ最重要な発生のプロセスである。着床期の胚である胚盤胞は将来胎仔になる内部細胞塊 (ICM) と将来胎盤などの胚体外組織になる栄養外胚葉 (TE) から構成され、TE はさらに ICM に接した polar TE と ICM に接していない mural TE に区分される。マウス胚盤胞では mural TE から着床が進行するが、これは子宮への接着・浸潤能を獲得するように mural TE が分化することに起因する。しかしながら、マウス胚盤胞においていつどのように mural TE が分化するかは未だに明らかにされていない。

我々はこれまでに、マウス TE 由来の幹細胞である栄養膜幹細胞において、未分化マーカー遺伝子 *Cdx2* が未分化状態の維持に重要であることを明らかにした (Suzuki et al., 2019)。そこで、着床に向けた mural TE の分化について解析するために、着床前 (胎齢 3.5 日) 及び着床期胚盤胞 (胎齢 4.0, 4.5 日) における *Cdx2* の発現解析を実施した。その結果、胎齢 3.5 日胚盤胞では polar TE と mural TE の間で *Cdx2* 発現に差異が見られなかったものの、胎齢 4.0, 4.5 日と着床の進行に伴い、mural TE 特異的に *Cdx2* 発現が低下していくことが明らかとなった。以上のことから、着床に向けた mural TE の分化は *Cdx2* の発現が低下することで誘導されると考えられた。そこで本研究では、mural TE で *Cdx2* 発現が低下するメカニズムの解明を目指し、胎齢 3.5, 4.0, 4.5 日の mural TE をサンプルとして、RNA-seq 解析を実施した。

mural TE の遺伝子発現変化に焦点を当てるため、マイクロマニピュレーターと Bio-Cut Blade (FEATHER) を用いて、胚盤胞を polar TE 側と mural TE 側に切り分けて、mural TE を回収した。16 個の mural TE を 1 サンプルとして、胎齢 3.5, 4.0, 4.5 日それぞれ 3 サンプル分ずつ回収した。RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) による RNA 抽出後、SMART-Seq HT PLUS Kit (TAKARA) を用いて cDNA 合成・ライブラリ調製を行った。調製した cDNA ライブラリは東京農業大学生物資源ゲノム解析センター所有の NextSeq 500 を用いた RNA-seq 解析に供試した。

初めに、栄養膜細胞の分化に関連する遺伝子の発現変動パターンを解析したところ、これまでの結果と同様に着床進行に伴って *Cdx2* 発現が低下していく一方で、栄養膜細胞分化とともに発現が上昇することで知られる *Ascl2* 等の発現が着床進行に伴って上昇していくことがわかった。さらに、発現変動遺伝子をもとに k-means クラスタリングによる多群間解析を実施したところ、胎齢 4.0 日目に接着・浸潤に関連する遺伝子群、胎齢 4.5 日目に代謝に関連する遺伝子群が発現上昇することがわかった。以上のことから、着床期の mural TE はわずか 24 時間という短い期間に、細胞分化に伴って性質がダイナミックに変化していると考えられた。今後、得られた知見をもとに、mural TE で *Cdx2* 発現が低下するメカニズムを解明するために、さらなる詳細な解析を続けていく。

References:

Suzuki, D., Morimoto, H., Yoshimura, K., Kono, T., & Ogawa, H. (2019). The differentiation potency of trophoblast stem cells from mouse androgenetic embryos. *Stem cells and development*, 28(4), 290-302.

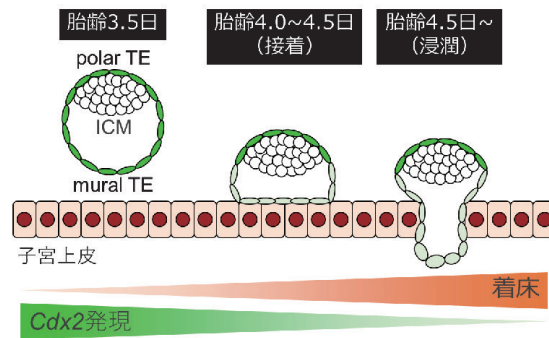


Figure. 1 mural TE の分化と着床の進行

着床を進行させるために mural TE は分化し、接着・浸潤能を獲得する。また、着床進行に伴って *Cdx2* の発現が低下する。

E3.5からE4.0で発現上昇する遺伝子群

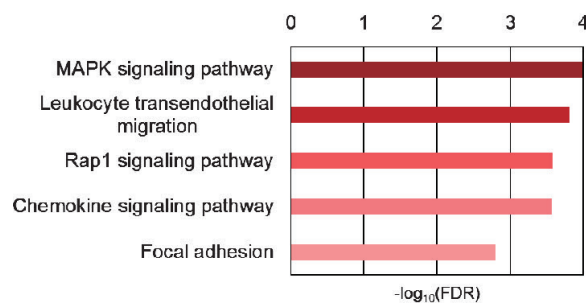


Figure. 2 発現変動遺伝子群の KEGG Pathway 解析結果

E3.5 から E4.0 にかけて発現上昇する遺伝子群について KEGG Pathway 解析を行った結果、接着・浸潤を制御する Pathway への優位な濃縮が見られた。一方で、E4.0 から E4.5 にかけて発現上昇する遺伝子の多くは代謝に関連していた。

小川英彦 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

鈴木大介 (農学研究科 バイオサイエンス専攻)

隈本宗一郎 (生物資源ゲノム解析センター)

Callosobruchus 属マメゾウムシの嗅覚受容に 関与する分子群の推定と比較解析

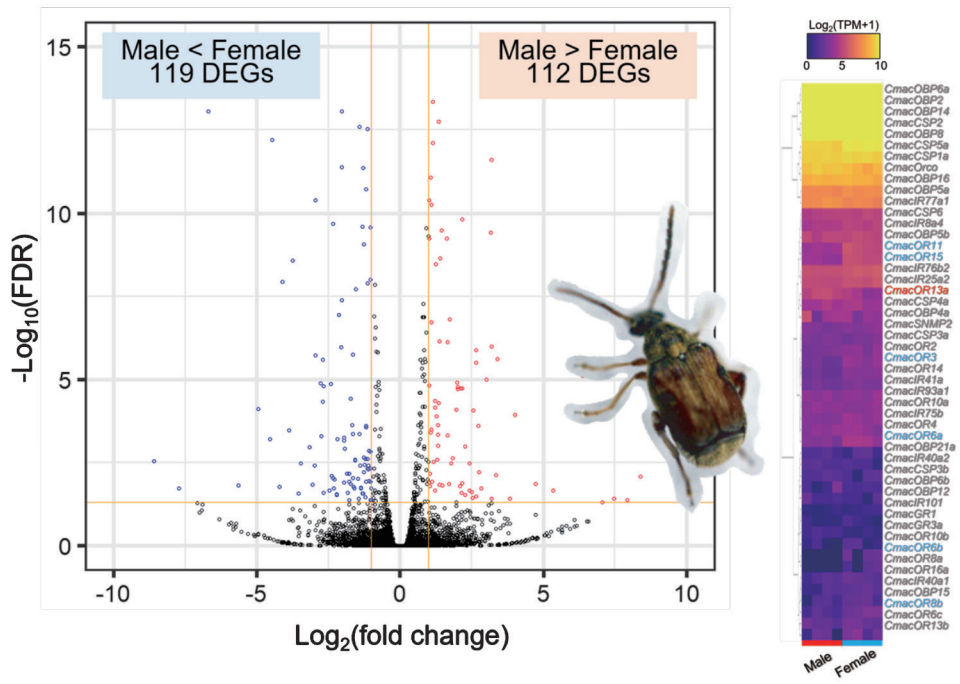
昆虫は、地球上に生息する動物の中で最も多様化した多細胞生物であり、動物種の約 75% を占めると言われ、その数は 110 万種にも及ぶ。昆虫が進化・種分化の過程において、何故このような多様化を成し遂げることができたのかを明らかにしていくことは、生態学や生理学のような基礎科学研究から害虫防除や生物資源としての利用など、応用研究を行う上でも非常に重要だと考えられる。

多くの昆虫は、その外部環境（食餌源・配偶者・産卵場所・天敵の存在など）を認識するにあたり、嗅覚シグナルを利用してきた。嗅覚シグナルを受容するため、昆虫は触角の感覚子上に存在する olfactory receptor neuron (ORN) からなる受容システムを発達させてきた。昆虫における嗅覚受容に関与する分子として、これまでに odorant receptor (OR)・gustatory receptor (GR)・ionotropic receptor (IR) の 3 種類の受容体ファミリーと、その他に sensory neuron membrane protein (SNMP)・odorant-binding protein (OBP)・chemosensory protein (CSP) の存在が明らかとなっている。

申請者は、これまでに嗅覚シグナルの内、特に生殖行動に関与する性フェロモンに着目し、鞘翅目昆虫である *Callosobruchus* 属マメゾウムシの性フェロモン構造を明らかにしてきた。その結果、同属近縁種間の性フェロモンに関し、その化学構造に跳躍的な進化 (saltational evolution) が生じていることが明らかになってきた。性フェロモンを介する生殖システムは、雌（もしくは雄）が分泌する性フェロモンを雄（もしくは雌）が受容することで成立するシステムであり、種分化過程における性フェロモン構造の跳躍的な進化（変化）は、受容者側にとって非常に大きなコストとなることが想定されるため、その跳躍的な構造変化に対し、どのように適応してきたのかを明らかにしていくことは、昆虫の多様性・繁栄を考える上でも大変興味深い。

本申請では、この跳躍進化の適応機構解明の足掛かりとして、*Callosobruchus* 属マメゾウムシの 1 種であるヨツモンマメゾウムシ (*C. maculatus*) に着目し、本マメゾウムシ触角由来のトランスクリプトーム解析を実施した。De novo RNA-seq の結果、17 個の OR、2 個の GR、10 個の IR、1 個の SNMP、12 個の OBP、7 個の CSP を推定した。更に、未交尾雌雄触角間での DEG 解析の結果、雄触角で 112 の発現上昇している遺伝子と、雌触角で 119 の発現上昇している遺伝子の存在が明らかとなった。更に qRT-PCR の結果から、1 つの OR が雄触角で発現上昇がみられ、4 つの OR が雌触角で発現上昇がみられ、前者は性フェロモンの受容に関与している可能性が、後者は寄主植物由来のにおい物質の受容に関与している可能性が示唆された。

今後は、本申請課題で同定された OR を中心とする嗅覚受容分子のリガンドの同定を含む機能解析と、同属近縁種の触角由来トランスクリプトーム解析を含めた比較解析を実施し、*Callosobruchus* 属マメゾウムシの嗅覚受容に関する跳躍進化の適応機構を明らかにしていく。



下村健司 (生命科学部 分子生命化学科)

マメコガネ (*Popillia japonica*) の嗅覚受容関連遺伝子の探索

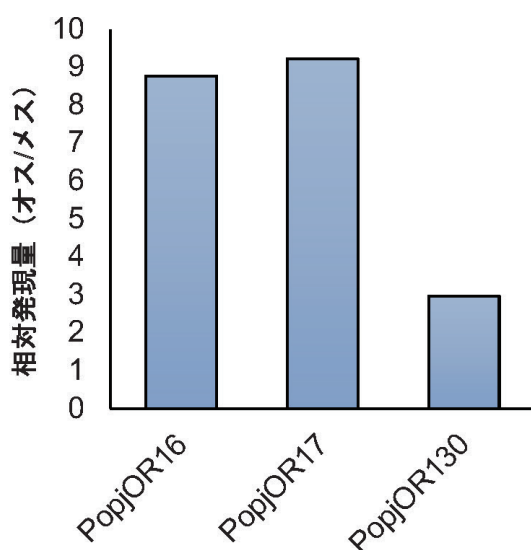
マメコガネ (*Popillia japonica*) はコウチュウ目、コガネムシ科に分類される甲虫の一種である。日本全土に分布し、マメ科植物、ブドウ類、ヤナギ類などのさまざまな植物を食草とする広食性昆虫であり、農作物や園芸植物を食い荒らす重要な農業害虫とされている。本種は1916年頃に日本から北米に移入し、米国では「Japanese beetle」と呼ばれ甚大な被害を及ぼしている。さらに近年ではヨーロッパへの移入も報告されており、世界的に重要な農業害虫とされている。

農業害虫の防除法の一つとして、性フェロモンを利用した発生予察、交信攪乱が挙げられる。マメコガネのメスはジャポニルアー [(R,Z)-(-)-5-(1-decenyl) oxacyclopentan-2-one] と呼ばれる性フェロモンを放出し、オスを誘引することが知られている。ジャポニルアーは1つの不斉炭素を有する光学活性なラクトン構造をもち、天然体である (R) 体は誘引効果を示す一方で、非天然体の (S) 体が1% 混入するだけで (R) 体の効果は半減する。

ごくわずかな (S) 体の混入が (R) 体の誘引効果を阻害する分子機構の解明は、マメコガネのオスの誘引と忌避を制御する仕組みの理解につながり、より効率的な誘引剤または忌避剤に開発にきわめて有用であると考えられる。しかしながら、これまでにマメコガネでは嗅覚受容に関連する遺伝子の単離・解析がほとんど行われておらず、フェロモン受容・識別の分子機構はほとんどわかっていない。

そこで本研究では、マメコガネのフェロモン受容、匂い受容の分子機構の解明に向けて、RNAseqによるマメコガネ触角のトランスクリプトーム解析を行い、嗅覚受容に関連する遺伝子群を網羅的に単離することを目的とした。

マメコガネ成虫の雌雄それぞれの触角についてトランスクリプトーム解析を行い、ホモロジー検索により、昆虫の嗅覚受容関連分子である嗅覚受容体、イオントロピック受容体、味覚受容体、匂い結合タンパク質、化学感覚タンパク質をコードする遺伝子を多数推定することに成功した。これらのうち、匂いやフェロモンの受容・識別に最も中心的な役割を果たすことが知られている嗅覚受容体遺伝子について DEG 解析を行った結果、メスと比較してオスの触角で顕著に発現量が高い遺伝子を複数見出した (図)。これらの嗅覚受容体遺伝子はオスで特に重要な機能を持つことが推測され、本種の性フェロモン受容体をコードする可能性がある。



今後は上記の嗅覚受容体遺伝子を中心に、今回明らかになった遺伝子群について qPCR による DEG 解析結果の検証を行うとともに、ヘテロ発現系を用いた機能同定を行い、マメコガネのフェロモン受容や匂い受容の分子機構を明らかにしていく予定である。

これらの研究は研究室学部4年生の今井信太郎氏、ゲノムセンターの田中啓介博士と共同で行った結果である。

櫻井健志 (農学部 デザイン農学科)

オス優勢的に発現する嗅覚受容体遺伝子

MiCAPs 法を用いたゲノムワイドマイクロサテライト解析に基づく日本鶏の集団遺伝学的研究

わが国で古くから（弥生時代～江戸時代）確立した鶏の品種群を日本鶏と呼ぶ。日本鶏はおよそ 50 品種から構成される。全世界での鶏の品種の総数が 300~400 品種と見積もられていることを考慮すると、日本鶏は品種の多様性が極めて高いことがうかがい知れる。その一方で日本鶏の起源と進化史については統一見解が得られていない。小穴（1951）は、形態学的・文献学的知見に基づき日本鶏が、それぞれ異なる年代にわが国に伝来した地鶏、小国、軍鶏の三系統から作出されたという説を提唱している。小穴（1951）によると地鶏は弥生時代に朝鮮半島もしくは中国から稲作とともに伝来し、その後、小国が平安時代に観賞用として中国から、そして軍鶏が江戸時代に闘鶏用としてタイから伝来し、これらの三系統から独自に、あるいは系統間の交雑により多様な日本鶏が作出されたとしている。

小穴（1951）の仮説は魅力的であり、一定の合理性があるものの、分子遺伝学的見地からは十分に検証が進められてこなかった。この理由として鶏の集団遺伝学的・系統地理学的研究は主にミトコンドリア DNA もしくは核遺伝子のマイクロサテライトマーカーにより行われているが、前者は母系遺伝であるため、雄の形質が重要視される家畜の歴史を十分に反映していないこと、後者は、これまでサンガーシーケンサーによるフラグメント解析が主として行われており先行研究のデータとの直接比較が厳密には行ないためである。そこで本研究では農大生物資源ゲノム解析センターの田中啓介助教が独自に開発を進めている MiCAPs 法を用いて次世代シーケンサーによる多型解析を行う。本手法は次世代シーケンサーが出力する塩基配列データからマイクロサテライトの多型情報を取得するため、先行研究で得られた全ゲノムデータとの直接比較も可能になる。

本研究では、多様な日本鶏の基層を形成すると考えられる地鶏に着目した。なお地鶏とは品種名ではなく、鶏の野生原種となった赤色野鶏の形質を多く保持する未改良の品種群の総称である。本研究では、土佐地鶏（高知県原産）、岐阜地鶏（岐阜県原産）、伊勢地鶏（三重県原産）、岩手地鶏（岩手県原産）、徳地地鶏（山口県原産）、会津地鶏（福島県原産）、芝地鶏（新潟県原産）、対馬地鶏（長崎県原産）、佐渡髭地鶏（新潟県原産）、チャーン（沖縄県原産）、琉球古地鶏（沖縄県原産）の 11 品種を用いた。筆者の知る限り本研究は現存する地鶏の品種を最も広く網羅した分子遺伝学的研究である。特に琉球古地鶏は、沖縄県国頭郡今帰仁村の山間集落で半野生状態で飼育されていた集団であり、2020 年に報告されたばかりの品種である（高田，2020）。琉球古地鶏は、かつて沖縄県で放し飼いで飼育されていた雑多な鶏であるファートゥヤーと考えられるが、これが他の地鶏とどのような進化的関係にあるのかは不明である。

本研究では MiCAPs 法に先立ち、RAD-seq 法による塩基多型の解析を行った。その結果、全長 15,291,317bp のアラインメントが取得された。このうち多型サイトとして 287,723 SNP が得られた。このアラインメントに基づく最尤系統樹を図 1 に示す。11 品種の地鶏は大きく 5 つの系統に分かれた。まず岩手地鶏、対馬地鶏、チャーンの系統（岩手地鶏グループ）。伊勢地鶏、芝地鶏、佐渡髭地鶏の系統（伊勢地鶏グループ）、土佐地鶏、琉球古地鶏のグループ（土佐地鶏グループ）、会津地鶏、徳地地鶏のグループ（会津地鶏グループ）そして岐阜地鶏、龍神地鶏のグループ（岐阜地鶏グループ）である。

肉髯のかわりに毛髯を持つ対馬地鶏とチャーンの近縁性が指摘されたのは興味深い。先行研究

(Hata et al. 2020) では同様に毛髭を持つ佐渡髭地鶏がチャーンと近縁であることを示唆しているが、本研究では佐渡髭地鶏は同じ新潟県原産の芝地鶏に内包された。本研究では佐渡髭地鶏は2個体しか使われていないため、今後のさらなる検証が必要である。芝地鶏は、伊勢地鶏と単系統群を形成した。両品種は猩々色の羽装に特徴があり、両者の近縁性を指摘する意見もあったが(岡村, 2006)、本研究の解析結果はこの仮説を支持する。琉球古地鶏は土佐地鶏と系統群を形成した。両品種は地鶏の中でも小型で赤笹の羽装など、赤色野鶏の形質を特に多く残しており、地鶏の進化史を理解するうえで重要な品種であると考えられる。ではこれらの地鶏がいつ、どこから日本に伝来したのだろうか? これを知るためには中国を中心としたアジアの在来鶏との比較が必要不可欠である。今後のさらなる研究が期待される。

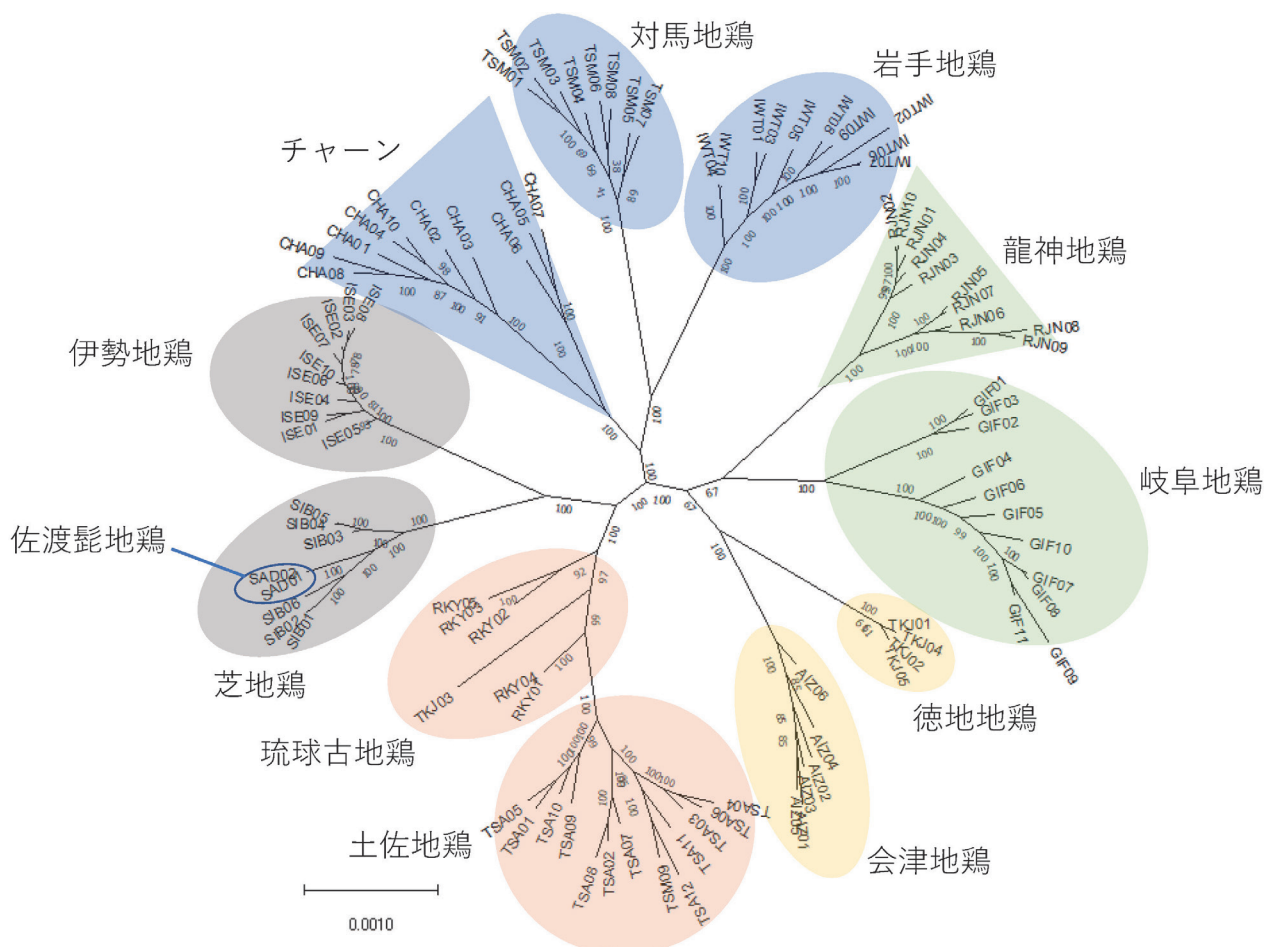
引用文献

Hata et al. (2020) Geographic origin and genetic characteristics of Japanese Indigenous chickens inferred from mitochondrial D-loop region and microsatellite DNA markers. *Animals (Basel)*. 10: 2074.

小穴 彪 (1951) 日本鶏の歴史 (増補版). 鶏の研究社. 東京

岡村 守 (2006) 芝地鶏歴史考. 郷土記録誌「ふるさと三条」14: 51-59

高田 勝 (2020) ファートゥヤー (仮称 琉球古地鶏) の紹介. 家畜資源研究会報 19: 6-7



米澤隆弘 (農学部 動物科学科)

ヒメツリガネゴケにおける赤色光を介した 低温順化制御機構の解析

冬になると外気は0℃以下まで低下する。このような条件下では植物細胞内の水は徐々に氷へと変化し細胞膜を損傷することで細胞の死を招く。植物は凍結ストレスに対抗するための応答機構を兼ね備えており、この応答機構は低温順化と呼ばれるプロセスを介して行われる。これまでに、農業利用の観点からモデル被子植物シロイヌナズナを用いて精力的に研究が行われてきた。低温に曝された植物は、低温順化プロセスの過程で遺伝子発現を介し、可溶性糖を含む適合溶質や細胞膜損傷を防ぐタンパク質を増大させることで凍結ストレスから細胞膜を保護する。凍結耐性能を増大させる目的で恒常的に低温応答遺伝子を高発現させたシロイヌナズナは、通常生育条件下において高い凍結耐性能を示す一方で、著しい生育遅延を示した。このことは、植物体の成長と凍結耐性の増加はトレードオフの関係にあり、詳細な遺伝子発現制御機構の理解が凍結耐性能を高めた作物育種において重要である事を示唆している。近年、低温条件下において刻一刻と変動する外部環境を認識するために温度および赤色光を統合的に理解し、凍結耐性能を最適な状態に保つメカニズムが明らかとなってきた。しかし、シロイヌナズナは様々な組織構造を持つゆえ、制御機構が複雑化しており詳細な解明には未だ至っていない。

低温順化プロセスを介した凍結耐性の増加は、基部陸上植物に属するコケ植物でも観察されている。また、コケの生活環は、比較的単純な組織構造で構成されており、細胞レベルで生命現象を理解できる利点を持つ。そこで我々の研究グループは、モデルコケ植物ヒメツリガネゴケの凍結耐性獲得機構を調査した。ヒメツリガネゴケの凍結耐性獲得機構における光の役割を明らかにするため、幅広い温度において赤色光、青色光、暗黒下で凍結耐性能を調査した。その結果、赤色光のみ、凍結耐性獲得が阻害された。すなわち、コケ植物では赤色光が凍結耐性獲得の阻害因子であることが明らかとなった。



図 コケの原糸体細胞のコロニー
フィラメント状の原糸体細胞は同調培養が可能であり、ほぼ均一な細胞集団として実験に供する事ができる。

そこで、ヒメツリガネゴケにおいて、赤色光に制御される低温応答遺伝子の制御ネットワーク解明を目指し、赤色光及び青色光で処理したヒメツリガネゴケを用いてトランスクリプトーム解析を行うこととした。本研究により、植物の赤色光を介した凍結耐性制御機構の理解の前進と共に、凍結耐性獲得機構の進化プロセスや多様性についての知見が得られる事も期待される。

篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

長期高温感受性変異株 *sloh5* の原因遺伝子同定と機能解析

植物は短期的な厳しい高温ストレスにさらされることもあれば、数日間連続で長期高温にさらされることもある。先行研究において、シロイヌナズナ accession を用いて短期的に厳しい高温ストレス (42°C, 50 分)、および長期間続く高温ストレス (37°C, 5 日間) に曝したところ、それぞれの高温耐性に大きな多様性が認められることが明らかとなった。興味深いことに、短期高温ストレスを示す accession が必ずしも長期高温ストレス耐性を示さず、それぞれの耐性は独立したメカニズムによることが示唆された。これまでに報告されている植物の高温応答メカニズムは、そのほとんどが短期的な高温ストレスに対するものであり、長期的な高温ストレス応答については、ほとんど明らかになっていない。シロイヌナズナにおける長期高温耐性メカニズムの解明を目的とし、比較的強い長期高温耐性を示すシロイヌナズナ accession である Col-0 種子をエチルメタンサルホン酸 (EMS) 処理により突然変異誘発させ、その M2 種子を用いて長期高温ストレスに高感受性を示す、*sensitive to long term heat* (*sloh*) 変異株をスクリーニングし、*sloh5* 変異株について原因遺伝子座の特定・解析を行った。

1) 長期高温感受性変異株 (*sloh*) の単離および原因遺伝子の同定

sloh5 は長期高温ストレスに高感受性を示す一方、短期高温ストレス (42°C, 50 分) に対しては野生株と同等であった。また、短期高温応答のマーカー遺伝子である *Heat Shock Factor* (*HSF*) や、*Heat Shock Protein* (*HSP*) の発現量についても WT と *sloh5* 間で有意な差は認められなかった。さらに浸透圧・塩・酸化ストレスに対する耐性試験をおこなったが、いずれも有意な差は認められなかった。これらのことから、*sloh5* は長期高温ストレス応答特異的に欠損を示す変異株であることが明らかとなった。

sloh5 の原因遺伝子を同定するために、Col-0 と同等の長期高温耐性を示す Da (1) -12 と *sloh5* を交雑した F2 種子を用いて遺伝子マッピング、および *sloh5* のゲノムシーケンスを行った。その結果、マッピング領域内の 1 遺伝子にのみ非同義置換を発見した。原因遺伝子を同定するために、この遺伝子を WT からクローニングし、*sloh5* に遺伝子導入することで相補性試験を行った。その結果、当該遺伝子を導入することで *sloh5* の長期高温耐性が回復 (相補) したことから、原因遺伝子を特定することに成功した。この遺伝子は、*ELONGATED MITOCHONDRIA 1* (*ELM1*) として知られている遺伝子であり、*DYNAMIN-RELATED PROTEIN3A* (*DRP3A*)、*DRP3B* と共にミトコンドリアの分裂に寄与することが報告されていた。

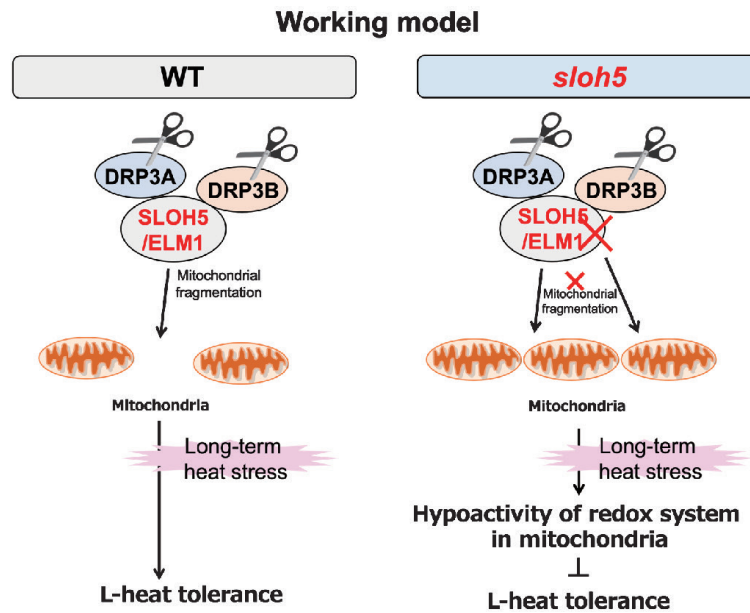
2) 長期高温ストレス下におけるミトコンドリアの形状観察

sloh5 の原因遺伝子である *ELM1* および *DRP3A*、*DRP3B* の遺伝子欠損については、通常生育条件においてミトコンドリアの分裂が機能せず、数珠状になることが知られていた。そこでミトコンドリアを染色する Mito tracker を用いて、*sloh5* のミトコンドリアを共焦点顕微鏡で調べたところ、報告通り数珠状のミトコンドリアが観察された。しかしながら、長期高温ストレスに曝した *sloh5* のミトコンドリアにおいては、数珠状のミトコンドリアは観察されなかった。

3) 長期高温ストレス応答におけるミトコンドリアの関与について

SLOH5/ELM1 がミトコンドリアの分裂に寄与することから、ミトコンドリアの流動を抑制し、その機能・形態異常を誘導することが知られているミオシン ATPase 阻害剤 (*butanedione monoxime*;

BDM) を用いて、長期高温ストレス耐性におけるミトコンドリアの関与を調べた。通常生育条件下で10日間生育させたWT植物体を通常生育培地、あるいはBDM添加培地に移植し、それぞれ長期高温ストレスに曝した。その結果、BDM添加培地にて長期高温ストレスに曝したWT植物は、通常生育培地と比較してBDM濃度依存的に高温感受性を示すことが明らかとなった。この結果から、長期高温ストレス耐性におけるミトコンドリア機能の重要性が示唆された。



図：SLOH5の長期高温ストレス下における役割
 SLOH5/ELM1は長期高温ストレス下においてミトコンドリアの機能維持に重要な役割を果たす

太治輝昭 (生命科学部 バイオサイエンス学科)

日本原産セリ科植物アシタバ(*Angelica keiskei*)のゲノム解読

セリ科シシウド属のアシタバ (*Angelica keiskei*) は、房総半島から紀伊半島と伊豆諸島の太平洋岸に自生する日本原産植物の一つである (図 1)。この植物は、江戸時代から伊豆諸島を中心に食用あるいは民間薬として利用されてきた。現在、主に伊豆諸島や小笠原諸島における東京都の島嶼部の特産物として栽培されている。アシタバは、茎が切られると黄汁がにじみ出る特徴をもち、その黄汁が独特な風味を持つことから天ぷらやおひたしとして食されることが多い。また、健康食材として知られていることから、葉を乾燥させハーブティーに使われるほかに、粉末化して蕎麦や菓子類など多岐にわたる加工食品にも利用されている。先行研究において栄養成分が分析されたところ、緑黄色野菜と比べビタミン、ミネラルが豊富に含まれているほか、ポリフェノール的一种であるカルコン類やクマリン類が多種類存在していることが明らかとなっている。また、これらは有効成分として、抗がん、抗エイズ、血栓防止等の薬理作用を与えることも報告されている。そのため、アシタバは健康維持や増進が期待できる「スーパーフード」として注目されている。ところが、生命の一次情報とも言える DNA 配列に関して、全ゲノムの解読に至っておらず、その上 GenBank では 70 個ほどの配列情報が登録されている状況である。したがって、アシタバの遺伝情報は、ほとんど未開拓な状態である。そこで本課題は、次世代シーケンサー (NGS) を利用し、「ロングリード」と「染色体立体配座捕捉法 (Hi-C 法)」によるシーケンスを実施し、アシタバのコンプリートゲノムの構築を目指す。

現在のところ、Oxford Nanopore Technologies 社の NGS を用いたロングリードシーケンス、Illumina 社の NGS を用いた Hi-C シーケンスに成功し、いくつかのアセンブラーを用いてメガベース規模の scaffold 構築を行っている。また、構築したゲノム情報と共にアシタバの代謝系を明らかにするために、メタボローム解析も実施した (図 2) その結果、茎には黄汁と共通する代謝産物が検出された。また、葉と茎の間でそれぞれ異なる主要な代謝産物が多数存在することが示唆された。今後は、これら代謝産物のデータをアシタバゲノムのアノテーション付けの際に活用したい。

我が国におけるアシタバの市場取引は、東京都だけで国内全体の 95% を占める。そのため、東京卸売市場の取引実績が、現状での生産・消費の関係性を投影していると言える。ところが、昨年の取引量によると、ピーク時の 1/5 以下となっており、農業人口の減少に伴いアシタバは消えゆく作物になっている。以前より農林水産省では「伝統野菜」の保護や復活を推進しており、これは遺伝資源の管理や有効利用が狙いでもある。アシタバは言わば東京都が代表する伝統野菜であり、優れた機能性成分を有することからも保護していくべき重要な作物と言える。アシタバそのものは絶滅危惧種ではないため、現状では強力な保全策が必要というわけではないが、例えば九州・沖縄のような他の熱帯・亜熱帯地域における栽培の拡大化を図ることが有効であると考えられる。その際に、本研究のアシタバのゲノム解読によって遺伝情報基盤が形成されていれば、新たな土地での栽培化計画や必要に応じて分子育種、さらに機能性評価のために、この遺伝情報が十分に役立つだろうと考えられる。



図1 本研究で用いたアシタバ

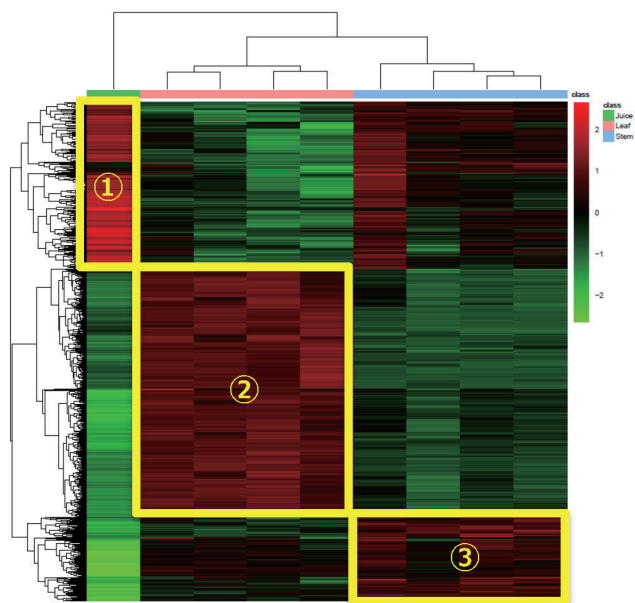


図2 メタボローム解析結果

横軸は、左から黄汁 (n=1)、葉 (n=4)、茎 (n=4) を示す。縦軸は、プロファイリングされた代謝産物のクラスタリング結果を示す。①茎とアシタバ黄汁で主に検出されたグループ、②葉で主に検出されたグループ、③茎で主に検出されたグループ

田中啓介 (生物資源ゲノム解析センター)
 吉瀬(新井)祐子 (生物資源ゲノム解析センター)
 志波 優 (生命科学部 分子微生物学科)

キチン処理により細胞死するヒメツリガネゴケ変異体 *ccd1* の原因遺伝子探索のためのゲノムリシーケンス

植物は、微生物に共通した構成成分 (Microbe-associated molecular patterns: MAMP) をパターン認識受容体 (PRR) により認識することで MAPK リン酸化カスケードや防御関連遺伝子発現を活性化することで基礎的抵抗性を発揮する。これまでに、被子植物では真菌細胞壁成分のキチンを認識する PRR として CERK1 が報告されている。近年、基部陸上植物ヒメツリガネゴケにおいても、キチンによる MAPK の活性化や防御関連遺伝子の発現誘導が CERK1 を介して誘導されることが報告された。このことから、CERK1 を介したキチン応答システムはコケ植物から被子植物の陸上進化過程で普遍的に保存されていることが示唆された。ヒメツリガネゴケ原系体はキチン処理により成長阻害や褐変を示す。この応答は *CERK1* 欠損株では消失するが、MAPK の上流キナーゼである *MAPKKK* 欠損株はキチン処理による褐変を示さないが成長は阻害されることから、キチン誘導性の成長阻害は CERK1 を介するが MAPK カスケードとは独立していると考えられた。そこで、本研究はキチン認識から生育阻害と褐変へと至るプロセスの分子機構を順遺伝学的アプローチにより明らかにすることを目的とする。ヒメツリガネゴケ標準種である Gransden エコタイプに変異源として紫外線照射し、キチン処理後に成長阻害や褐変の表現型が WT と比べて減少した変異体の単離を試みた。これまでに変異体を複数単離することに成功し、その内の一つは WT と比べてキチン処理による淡い褐変を示したが、MAPK の活性化や防御関連遺伝子の発現誘導は WT と同程度であった。興味深いことに、キチン処理 12 時間以降に細胞死が観察されたことから、*chitin-induced cell death mutant1* (*ccd1*) として解析を進めている。

細胞死は植物細胞が病原菌に侵入された際に周りの細胞を感染から守るために誘導される。生きた宿主から栄養を摂る病原菌 (バイオトロフ) には有効だが、死んだ宿主から栄養を摂る病原菌 (ネクロトロフ) には有効ではない。WT においてはキチン濃度を高くしても細胞死は誘導されないので、*ccd1* の原因遺伝子の同定はヒメツリガネゴケにおけるキチン誘導性細胞死の誘導調整のメカニズムを明らかにすることにつながると期待する。

これまでに *ccd1* の原因遺伝子の探索するために *ccd1* ゲノムのリシーケンスを行った。その結果、11146 個の変異を同定した。さらに、CDS 内のアミノ酸置換が起こる遺伝子は 270 個であった。*ccd1* とエコタイプ Reute との掛け合わせにより、原因遺伝子の絞り込みを行う予定である。

四井いずみ (生命科学部 バイオサイエンス学科)
市橋 武 (生命科学研究科 バイオサイエンス専攻)
篠澤章久 (生物資源ゲノム解析センター)

塩生植物の根圏微生物叢の解析

塩生植物は、沿岸の生物多様性維持のために重要な植物である。しかし、環境の変化に弱く、多くが絶滅危惧・準絶滅危惧種に指定されている。日本でもアッケシソウ (*Salicornia europaea* L.) は、絶滅危惧Ⅱ類の指定されており、保全の対象となっている。

植物の保全を行う上で、自生地の土壤理化学性・生物性を把握することが重要とされている中、塩生植物の自生地という特殊な環境の土壤理化学性・生物性の報告が少ないのが現状である。そこで、本研究ではアッケシソウの自生地の土壤理化学性および土壤生物性として微生物叢を解析することを目的とした。



北海道ノトロ湖でのアッケシソウの様子

上図の北海道ノトロ湖にあるアッケシソウ自生地から土壌および植物をサンプリングし、土壤理化学性および微生物叢の解析を行う予定である。

山本紘輔 (生命科学部 分子微生物学科)
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)
坂本 光 (生物産業学部 北方圏農学科)

Sporidiobolales 目酵母の再分類：ドラフトゲノムデータに基づく系統関係の解明および表現型の探索

Sporidiobolales 目は担子菌サビキン亜門 (Pucciniomycotina) に位置し、*Rhodotorula toruloides* (旧名 *Rhodosporidium toruloides*) や *R. sphaerocarpa* (同 *Rhodosporidium sphaerocarpum*) など油糧酵母として有名な種を含む菌群である。The Yeasts, A Taxonomic Study 第5版 (2011、以降 The Yeasts) には、本目の酵母としてテレオモルフ2属 (*Rhodosporidium* 属および *Sporidiobolus* 属) およびアナモルフ2属 (*Rhodotorula* 属および *Sporobolomyces* 属) が収載されている。テレオモルフの2属間、およびアナモルフの2属間は分生子である射出胞子の形成能により区別されており、すなわち The Yeasts における *Rhodosporidium* 属および *Rhodotorula* 属は射出胞子を形成せず、*Sporidiobolus* 属および *Sporobolomyces* 属は射出胞子を形成する性質を持つ。科学技術の進歩により塩基配列に基づく系統解析が容易になり、射出胞子を形成する酵母と形成しない酵母は系統樹上では混在することが明らかとなり、これは本目以外の分類群においても同様であったため、射出胞子形成能の分類学的意義について疑問視する見解が多く報告されていたが (e.g. Takashima et al. 2001)、2011年発行の本書には反映されていなかった。また、rRNA 遺伝子等に基づく系統解析から、特にアナモルフの属が多系統であることも示されていた。

2011年の国際植物会議をうけて、国際藻類・菌類・植物命名規約 (メルボルン規約 <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>, 2012) が発効し、多型的生活環を有する高等菌類 (子囊菌および担子菌) に認められていた二重命名法が廃止され統一命名法に移行したため、学名の移行作業に世界中の酵母分類学者が分担して携わった。多系統であったアナモルフの属の整理も並行して行われた。その結果、Sporidiobolales 目は数個の遺伝子の連結系統樹に基づき3つの属に再分類された (Wang et al. 2015)。The Yeasts で本目に含まれていた種の学名および主な表現性状は表1のようになっている。

この再分類はまだ属内の表現型にいくつかの問題点を残している。例えば、子囊菌酵母では系統関係とよい一致を示すとされている主要ユビキノンは、*Sporobolomyces* 属は全種 Q-10 であるが、*Rhodotorula* 属と *Rhodosporidiobolus* 属では Q-9 の種と Q-10 の種の両方が同一属内に存在する。別の分類群でもこのように混在する場合があったが、ゲノムデータに基づく系統樹により、新属であることが明らかとなり整理された例 (Takashima et al. 2019) もあるため、本目においても確認が必要と思われる。また、有性時代の形態をみると、*R. toruloides* のテリオスポアは角張った形をしており (Banno 1967)、他の Sporidiobolales 目の種の球形から楕円形とは異なっている。系統解析においては、*R. toruloides* は遺伝子の選び方やデータセットに用いる菌株により、現在の *Rhodotorula* 属とクラスターを形成する場合もあるが、*Rhodosporidiobolus* 属に位置する場合もあり、そのいずれでも高いブーツストラップ値は得られない、すなわち、系統学的位置が不安定な種とこれまでも報告されている。数個の遺伝子の系統樹 (Wang et al. 2015) では *Rhodotorula* 属の根に近いところに位置している。

本研究ではこれらの問題点を解決し分類体系を再構築することを目的に、ゲノムデータに基づく系統解析を行い系統分類の骨格を作るとともに、各属を特徴付ける表現型を探索する。

Takashima M, Deak T, Nakase T. 2001. Emendation of *Dioszegia* with redescription of *Dioszegia hungarica* and two new combinations, *Dioszegia aurantiaca* and *Dioszegia crocea*. J Gen Appl Microbiol. 47: 75-84. doi: 10.2323/jgam.47.75.

Takashima M, Manabe RI, Nishimura Y et al. 2019. Recognition and delineation of yeast genera based on genomic data: Lessons from Trichosporonales. Fungal Genet Biol. 130: 31-42. doi: 10.1016/j.fgb.2019.04.013.

Wang QM, Yurkov AM, Göker M et al. 2015. Phylogenetic classification of yeasts and related taxa within Pucciniomycotina. Stud Mycol. 81: 149-189. doi: 10.1016/j.simyco.2015.12.002.

表1 Sporidiobolales目の種と分類学的性質

現在の学名	再分類前の学名	主要ユビキノン*	射出胞子形成能*	テリオスポアの形態*	
<i>Rhodotorula</i>					
テレオモルフ	<i>R. babjevae</i>	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	10	-	球形、壺球形
	<i>R. diobovatum</i>	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	10	-	球形、倒卵形、ビン形
	<i>R. kratochvilovae</i>	<i>Rhodosporidium kratochvilovae</i>	10	-	球形、逆洋ナシ形
	<i>R. paludigenum</i>	<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	10	-	球形
	<i>R. sphaerocarpum</i>	<i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i>	10	-	球形、壺球形、まれに楕円形
アナモルフ	<i>R. toruloides</i>	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	9	-	角ばった楕円形、不規則形
	<i>R. araucariae</i>	<i>Rhodotorula araucariae</i>	10	-	n
	<i>R. dairenensis</i>	<i>Rhodotorula dairenensis</i>	10	-	n
	<i>R. glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	10	-	n
	<i>R. graminis</i>	<i>Rhodotorula graminis</i>	10	-	n
	<i>R. mucilaginoso</i>	<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>	10	-	n
	<i>R. pacifica</i>	<i>Rhodotorula pacifica</i>	10	-	n
<i>Rhodosporidiobolus</i>					
テレオモルフ	<i>R. azoricum</i>	<i>Rhodosporidium azoricum</i>	10	-	球形、楕円形
	<i>R. fluviale</i>	<i>Rhodosporidium fluviale</i>	n	-	球形
	<i>R. lusitaniae</i>	<i>Rhodosporidium lusitaniae</i>	9	-	球形
	<i>R. microsporus</i>	<i>Sporidiobolus microsporus</i>	n	+	球形
	<i>R. ruineniae</i>	<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	10	+	球形
アナモルフ	<i>R. colostri</i>	<i>Rhodotorula colostri</i>	9	-	n
	<i>R. nylandii</i>	<i>Sporobolomyces nylandii</i>	10	+	n
	<i>R. odoratus</i>	<i>Sporobolomyces odoratus</i>	n	+	n
	<i>R. poonsookiae</i>	<i>Sporobolomyces poonsookiae</i>	10	+	n
<i>Sporobolomyces</i>					
テレオモルフ	<i>S. johnsonii</i>	<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	10	+	球形
	<i>S. longiusculus</i>	<i>Sporidiobolus longiusculus</i>	n	+	球形、楕円形
	<i>S. metaroseus</i>	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	10	+	楕円形
	<i>S. pararoseus</i>	<i>Sporidiobolus pararoseus</i>	10	+	楕円形
	<i>S. salmonicolor</i>	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	10	+	球形
アナモルフ	<i>S. bannaensis</i>	<i>Sporobolomyces bannaensis</i>	10	+	n
	<i>S. beijingensis</i>	<i>Sporobolomyces beijingensis</i>	10	+	n
	<i>S. blumeae</i>	<i>Sporobolomyces blumeae</i>	10	+	n
	<i>S. carnicolor</i>	<i>Sporobolomyces carnicolor</i>	10	+	n
	<i>S. jilinensis</i>	<i>Sporobolomyces jilinensis</i>	10	+	n
	<i>S. patagonicus</i>	<i>Sporobolomyces patagonicus</i>	n	+	n
	<i>S. phaffii</i>	<i>Sporobolomyces phaffii</i>	10	+	n
	<i>S. roseus</i>	<i>Sporobolomyces roseus</i>	10	+	n
	<i>S. ruberrimus</i>	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	n	+	n
	<i>S. salmoneus</i>	<i>Sporobolomyces salmoneus</i>	n	+	n

*, "The Yeasts, A Taxonomic Study 5th edition (2011)"より。
+, positive; -, negative; n, no data

高島昌子 (農生命科学研究所)

青木敬太 (農生命科学研究所)

田中尚人 (分子微生物学科)

大熊盛也 (理化学研究所バイオリソース研究センター
微生物材料開発室)

酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸発酵時における エタノール・グルコース資化に関する代謝調節機構の解明

食酢は酢酸菌の働きにより、エタノールを原料として製造される。食酢醸造は一般的にエタノールを生成するためのアルコール発酵の工程と酢酸を生成する酢酸発酵工程に分けられる。アルコール発酵の工程では、原料となるグルコースから酵母のアルコール発酵によってエタノールを生成し、酢もともろみと呼ばれるエタノールを主成分とした発酵液を製造する。これに続く酢酸発酵工程では、酢もともろみに多量の酢酸菌を含む種酢を加える。すなわち、酢酸発酵は酢酸を生成するための炭素源であるエタノールの他に酢もともろみと種酢に含まれるグルコースや酢酸など、複数の炭素源が共存した条件下で行われる。

食酢醸造に用いられる酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* は細胞膜上に局在するデヒドロゲナーゼにより、酸化発酵と呼ばれるエタノールやグルコースの不完全酸化を行う。また、本菌は解糖系や TCA 回路などの細胞内の基幹代謝経路も有し、炭素源利用に関する多様な代謝経路を使い分けて生育している。しかし、複数種の炭素源が共存する食酢醸造条件下において、炭素源資化の順序ならびにそれを決定づける代謝調節機構には不明な点が残されている。そのため現在、エタノール・グルコース共存下における炭素源資化に関する代謝調節機構の解明を目的とした研究を進めている。

酢酸菌 *A. pasteurianus* の *de novo* シークエンスを基に、細胞膜上に局在し、ピロロキノリンキノン を補酵素としてエタノールを酸化するアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) をコードする遺伝子を破壊した酢酸菌株 (*adh* 破壊株) を構築した。獲得した *adh* 破壊株を用いて、エタノール・グルコース存在下における生育挙動を親株と比較した結果、親株では酢酸発酵による旺盛なエタノールの消費と酢酸の生成、ならびにグルコン酸発酵の抑制を観察した (図 1)。一方、*adh* 破壊株については酢酸の生成を伴わないエタノールの減少、旺盛な菌体増殖とグルコン酸発酵能を観察した (図 1)。

同生育条件下における両株の転写挙動の比較を RNA-seq 法で行った結果、*adh* 破壊株では TCA 回路などの基幹代謝経路、電子伝達系の NADH オキシドレダクターゼの発現が亢進していた (図 2)。また細胞質に局在し、NAD⁺ を補酵素とするアルコールデヒドロゲナーゼおよびアルデヒドデヒドロゲナーゼの発現亢進も認められた。これらにより、*adh* 破壊株は、エタノールの細胞内酸化による酢酸の生成および基幹代謝経路と電子伝達系による酢酸の完全酸化能が促進し、酢酸生成を伴わないエタノールの減少や旺盛な菌体増殖が起こることが強く示唆された。さらに、*adh* 破壊株では細胞膜上に局在するグルコースデヒドロゲナーゼの発現が亢進し、これにより旺盛なグルコン酸発酵が見られることが示唆された。

これらの結果から、エタノール・グルコース共存下において *A. pasteurianus* (親株) が酢酸発酵を優先させるのは、エタノールの細胞内資化経路ならびにグルコン酸発酵の転写レベルでの抑制に依ることが強く示唆された。そのため、現在いくつかの特徴的な挙動を示す因子に着目し、解析を進めている。

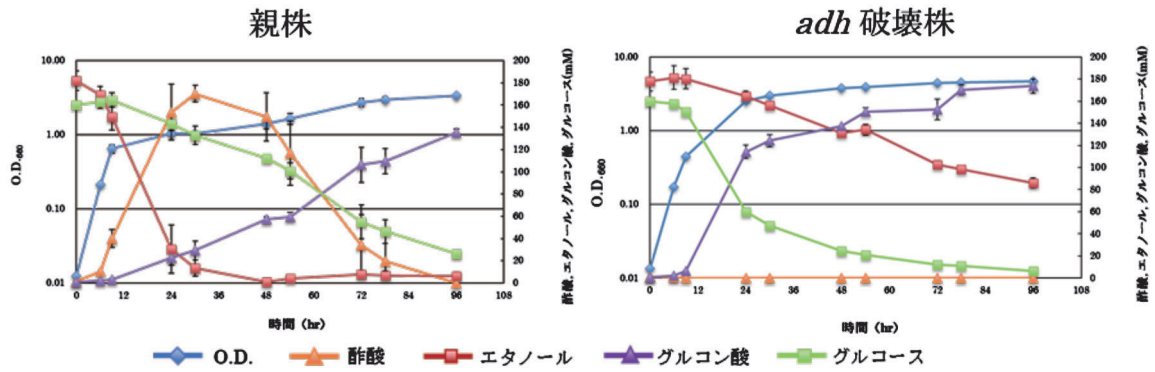


図1 エタノール・グルコース共存下における *A. pasteurianus* 親株および *adh* 破壊株の生育挙動

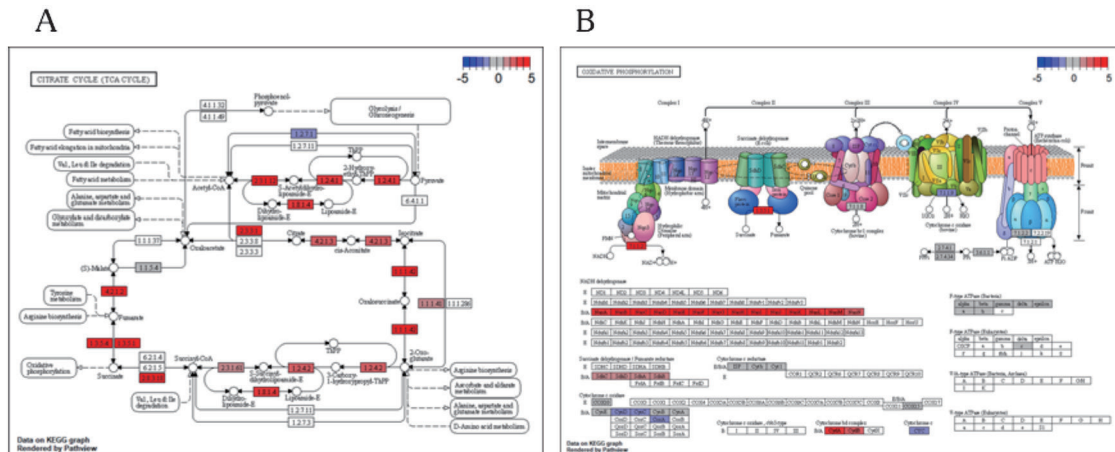


図2 RNA-seq によるエタノール・グルコース存在下における *A. pasteurianus* 親株および *adh* 破壊株の転写挙動比較
A, TCA サイクル; B, 電子伝達系
赤、*adh* 破壊株で発現が亢進、親株で転写抑制

石川森夫 (応用生物科学部 醸造科学科)
鈴木敏弘 (応用生物科学部 醸造科学科)
松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 のゲノム解析 2021 ～リシーケンスから明らかとなったラボストレインのゲノム多様性～

Synechocystis sp. PCC 6803 は、かずさ DNA 研究所によって最初にゲノム配列が完全解読されたシアノバクテリアであり、光合成研究のモデル生物として世界中で研究されてきた。しかし、*Synechocystis* 6803 には表現型の異なる複数の野生株（ラボストレイン）が存在しており、研究に用いる際に注意が必要である。最初にゲノムが解読された *Synechocystis* 6803 GT (Glucose tolerant) 株はグルコース資化能を有し運動性を示さない (Williams, 1988)。一方、*Synechocystis* 6803 原種近い特徴を持つとされる PCC-P 株はグルコース感受性であり走光性を示す (Yoshihara et al., 2001)。また PCC-P 株は *Synechocystis* 6803 特異的な硫酸多糖シネカンを細胞外に蓄積してブルーム様の粘性細胞塊を形成するが、この現象は GT 株では見られない (Maeda et al., 2021)。このようなラボストレイン間の差異は何に起因するのだろうか？

これまでにショートリード型 NGS を用いて GT 株、PCC-P 株を含めた複数の *Synechocystis* 6803 系統株がリシーケンスされ、それぞれの株が持つ固有の変異が示された (Tajima et al., 2011, Kanesaki, et al. 2012, Trautmann et al., 2012, Morris et al., 2014, Ding et al., 2015)。しかし、表現型の違いの原因となる遺伝的要因は未だ同定されていない。そこで我々は各ラボストレイン間のゲノム構造や遺伝子発現を調べ比較した。

Synechocystis 6803 ゲノムは主染色体に加えて4つの巨大なプラスミド (pSYSM、pSYSX、pSYSA、pSYSG) により構成されている。この主染色体とプラスミドの各所にはトランスポゾン等の全く同一の配列が散在しているため、従来のショートリードシーケンスでは *Synechocystis* 6803 のゲノム構造を正確に解析することは困難である。そこで本研究においては、10 kbp 以上のロングリードを大量に取得できる Nanopore シーケンスを利用して、東京農大で保有する *Synechocystis* 6803 GT 株、PCC-P 株のリシーケンスを行った。同時に RNA シーケンスにより二者の遺伝子発現の違いを解析した。その結果、GT 株と比較して PCC-P 株では pSYSM にコードされるシネカン合成遺伝子群や CO₂ 取り込みに関わる遺伝子など、表現型の違いを説明できる遺伝子発現量の変化が確認された。また PCC-P 株では巨大プラスミドの pSYSM が pSYSX と融合していることが新たに示された。このようなゲノム構造の変化が GT 株と PCC-P 株間の表現型に大きく影響していると考え、研究を進めている。

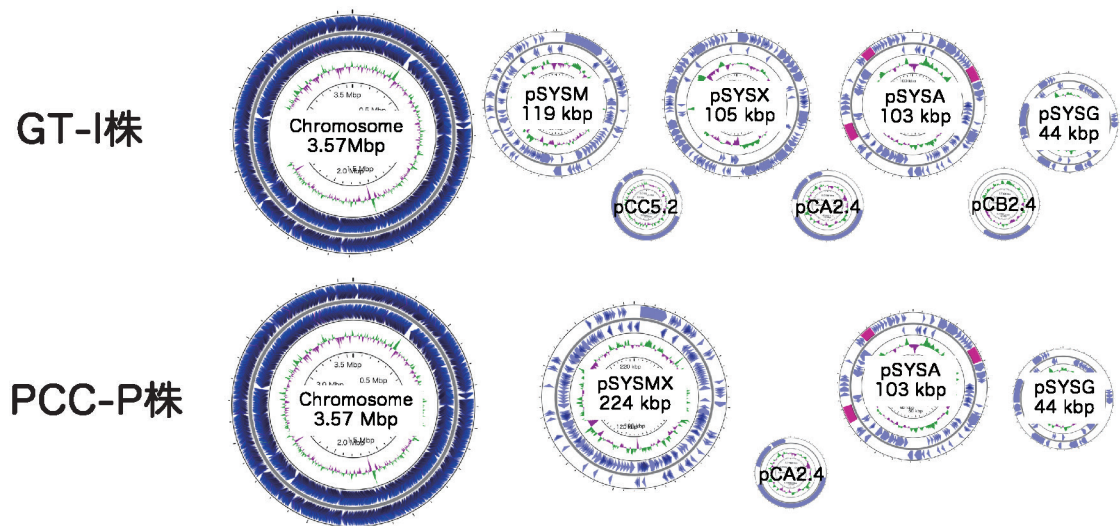


図 ロングリードシーケンスから明らかとなったシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 ラボストレインのゲノム構造

渡辺 智 (生命科学部 バイオサイエンス学科)
 前田海成 (東京工業大学 化学生命科学研究所)
 荷村(松根)かおり (生命科学部 バイオサイエンス学科)

温泉水からのポリエステル合成好熱菌の取得解析

日本は、世界一の源泉水を誇る温泉大国であり、2万7千の源泉から多様な泉質の温泉水が毎分260万リットル湧き出している。火山帯に沿うように点在する温泉地は、熱源に事欠かず、42℃以上の高温泉が47%を占めている。温泉水中の生物に目をむけると、好熱菌と呼ばれる微生物が存在している。好熱菌は、一般に最適生育温度が45℃以上、あるいは生育限界温度が55℃以上の微生物を指す。例えば、*Thermus thermophilus* は、1968年、大島康郎博士らによって伊豆の峰温泉から採取された好熱菌である。*T. thermophilus* は、高度好熱菌のモデル生物として、2022年1月現在約3500報の論文が報告され、高温下での生命システムについて知見を提供してくれる。本申請課題では、好熱菌の中でも、ポリエステル合成能を有するものに焦点をあて、その取得解析を行った。

ここでいうポリエステルとは、ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) を指し、微生物が細胞内で合成するエネルギー貯蔵物質のことである。細胞内に蓄積したPHAを取り出して、加工成形するとフィルムや繊維、成形体などいわゆるプラスチック材料として利用することができる。PHAは、糖や脂肪酸といったバイオマスから合成可能であり且つ生分解性を有することから、低環境負荷プラスチックとしての利用が推進されている。一方、PHAは汎用プラスチックと比べて耐熱性や強度が劣っており、材料物性に課題がある。この材料物性の制限は微生物が合成できるポリエステルの分子構造に一定の制限があることに起因している。また、既報研究におけるPHA合成微生物のほとんどが常温菌であり好熱菌の知見が乏しい状況である。

私たちは、昨年度より日本各地の温泉水を日本健康開発財団の支援を受けご提供頂き、ポリエステル合成好熱菌の探索を行ってきた。また縁あって温泉地にも足を運ばせて頂いた (図1A)。大分県竹田市の温泉水からは、ポリエステル合成好熱菌として① *Caldimonas manganoxidans*、② *Pseudomonas* sp. SG4502、③新種微生物が単離された。① *C. manganoxidans* はポリヒドロキシブタン酸 (P (3HB)) などの硬質系ポリエステル合成能を有していた (図1B右)。一方、② *P. sp.* は、軟質系ポリエステル合成能を有しており (図1B左)、また高分子鎖の側鎖構造内に芳香環を許容することもわかってきた。将来的に主鎖構造に芳香環を導入することができれば、微生物で合成できるプラスチックの構造が飛躍的に広がるため、ブレイクスルー技術となることが期待される。③の新種微生物では、3-ヒドロキシ4メチル吉草酸 (3H4MV) を含むPHAを合成できることがわかった。これは現在工業生産されているPHBHと同等の材料物性を示し、原料に安価な糖を利用できる点がメリットである。

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターにて、取得したポリエステル合成好熱菌のゲノム解析を依頼し、現在ポリエステル生産の鍵酵素であるPHA重合酵素を中心に詳細解析を共同で進めさせて頂いている。好熱菌で新規構造を有するプラスチックを合成できるのか、今後も継続して検証を行っていく予定である。

謝辞

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの先生方と共同研究の機会を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。

(A)



(B)



図 1 (A) 温泉水の採水所 (大分県竹田市)、山からの引き湯が道路横で採水できる
(B) 好熱菌から抽出した軟質系ポリエステル (左) と硬質系ポリエステル (右)

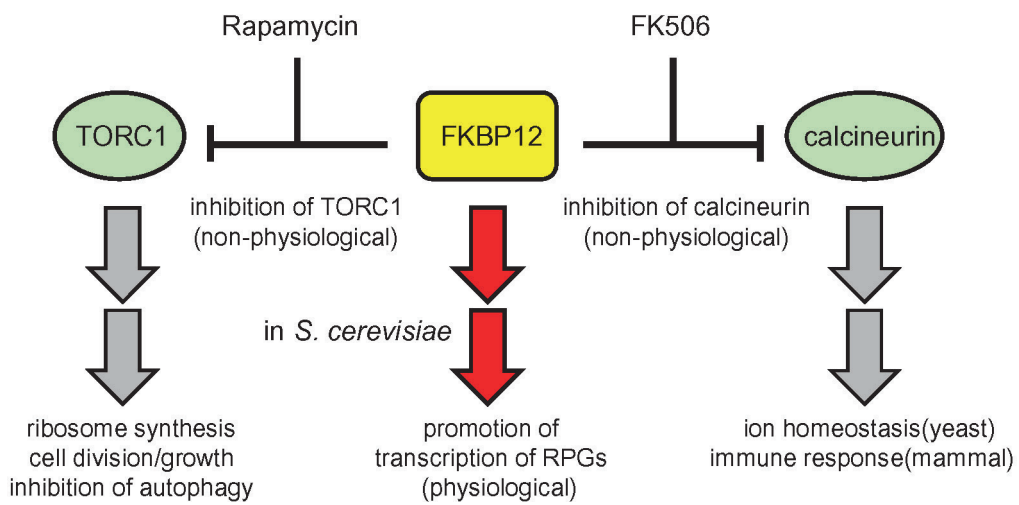
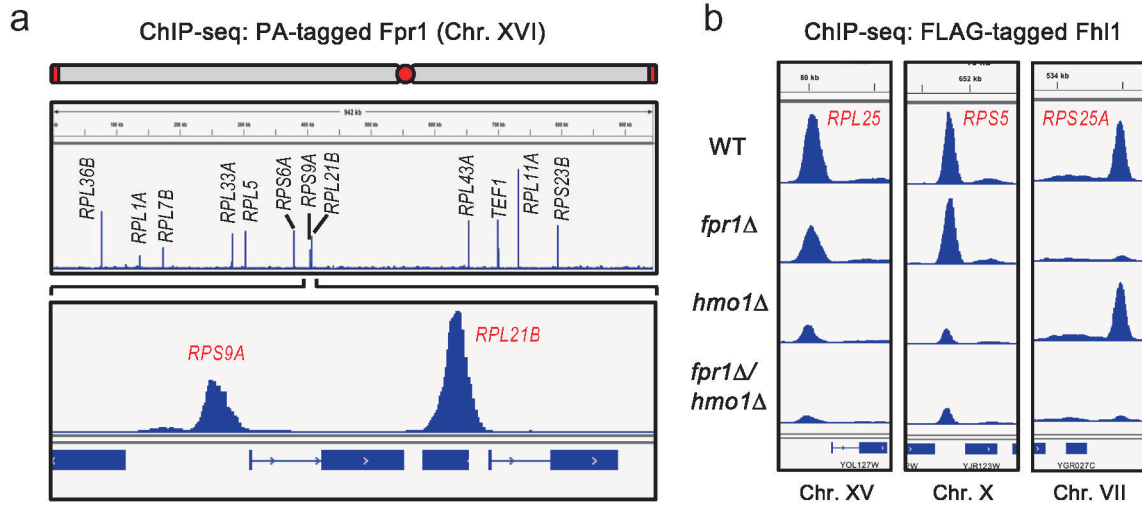
廣江綾香 (生命科学部 分子生命化学科)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

真核生物に保存された FKBP12 タンパク質の 転写因子としての機能解明

放線菌から単離された免疫抑制剤であるラパマイシンやFK506は、標的タンパク質であるFKBP12 (FK506 binding protein 12kDa) と複合体を形成し、それら複合体の形でそれぞれTORC1、カルシニューリンなどの重要酵素を阻害することにより薬効を発揮することが早くに明らかにされていたが、一方で薬剤のない生理的環境でのFKBP12の働きについては未だ不明な点が多い。我々は出芽酵母を材料に、リボソーム構成因子の転写制御について、リボソームRNA及びリボソームタンパク質遺伝子（以下RPG: ribosomal protein gene）の協調的な転写制御に働くと考えられているHMGBタンパク質Hmo1の機能の解明を中心に研究を行ってきた。そのなかでHMO1遺伝子と、出芽酵母のFKBP12オルソログをコードするFPR1遺伝子の二重破壊が著しい生育遅延を引き起こすことが明らかとなり、両タンパク質が生育にとって重要な役割を共有することが示唆された。以後、ゲノムセンターの協力を得て行った各種解析（ゲノム解読、ChIP-seq、RNA-seq）を元に、我々はFpr1がRPGプロモーターの大部分に極めて特異的に結合すること、さらにFpr1がHmo1と協調的に、あるいは独立に、RPGの転写に重要なFhl1/Ifh1コアクティベーター複合体をプロモーター上にリクルートすることにより、転写を促進することを明らかにした。HMO1、FPR1の遺伝子破壊がFhl1のRPGプロモーターへの結合に及ぼす影響をChIP-seq解析により詳しく調べた結果、Fhl1は全RPGの約38%にはHmo1のみに依存して、また約17%にはFpr1のみに依存して結合すること、さらに約11%にはHmo1、Fpr1の両者に依存的に、残りのRPGには両者に非依存的に、結合することが明らかとなった。リボソームは全ての構成因子が1:1でリボソームを構成することから、全てのRPGが一様の転写制御を受けることが効率のよいリボソーム合成において合目的的であると考えられるが、実際には転写因子の種類やその結合様式が異なるいくつかのタイプに分かれることは興味深い。本研究は、少なくとも出芽酵母においては生理的条件下においてもFKBP12がRPGの転写に積極的に関与することを示した初めての成果であるとともに、RPGの転写因子に十数年ぶりに新規のメンバーを加えるものとなった。

以上を踏まえ、今後の研究の柱の1つとして、FKBP12の転写因子としての役割が、ヒトを始め他の真核生物でも保存されているのか、あるいは一部の真菌のみで保存されているのか、を明らかにしていきたいと考えている。もし前者であれば、免疫抑制剤として用いられているFK506やラパマイシンなどは、FKBP12の転写因子としての機能を阻害することで副作用を引き起こしている可能性も考えられる。一方、後者の場合、FKBP12を標的とすることで特定の真菌類の生育を選択的に阻害する薬剤の開発につながる可能性が考えられる。我々は出芽酵母と進化的には遠い分裂酵母、出芽酵母と近縁の病原性酵母である*Candida glabrata*、及びヒト細胞（HEK293）において、それらのFKBP12が何らかの遺伝子の転写因子として働いている可能性を、RNA-seq、ChIP-seqなどの手法を駆使して検証したいと考えている。現在、これらの生物でFKBP12、その他の関連タンパク質に免疫沈降用のタグを付加して発現した株や遺伝子破壊株を作製し、一部については解析を実施している。



笠原浩司 (生命科学部 分子微生物学科)

シイタケ腐敗病病原細菌の病原因子生合成遺伝子の推定

シイタケ腐敗病は、グラム陰性細菌 *Ewingella americana* が原因菌となる細菌病害の一種である。本病原菌はシイタケ以外の食用キノコ全般に対して病原性を示すことから、国内外を問わず、様々な種類のキノコ類での病害が報告され、生産者に深刻な被害を与えている。

キノコの細菌病害の病原菌には、本病原菌以外にも *Pseudomonas tolaasii* などが挙げられ、*P. tolaasii* については、その病原因子として環状リポペプチド tolaasin が同定されている。一方で、*E. americana* については、キチナーゼを分泌し、それが病原因子であると予想されているものの、その証明は成されていない。

そこで本研究では、本菌の病原因子の特定を目的として、国内でシイタケ子実体の病斑から分離された *E. americana* の分離菌株について、ゲノム解析を行い、病原因子と予想されるキチナーゼの特定と既報のキチナーゼとの相同性、ならびに病原因子の候補となる二次代謝産物の生合成遺伝子の推定を行った。

E. americana の分離菌株のゲノム DNA について NGS を行い、62 の contig からなる 4.49Mbp のドラフトゲノム配列情報を得た。データベース上の本菌のゲノムサイズは 4.7Mbp 程度であるので約 96% に相当した。

RAST により、ドラフトゲノムのアノテーションを行ったところ、キチナーゼと推定される 3 つの ORF が見出され、*Eachi1*、*Eachi2*、*Eachi3* と名付けた。それら推定キチナーゼの内、*Eachi1* は前述の本菌の病原因子と予想されるキチナーゼの塩基配列と 98.0% の相同性を示した。さらに、データベース上に登録されている *E. americana* 5 菌株のゲノム配列情報と比較したところ、3 菌株で全ての推定キチナーゼを保有しており、その相同性は 94.0 ~ 98.0% と高いものであった (図)。病原因子と予想される *Eachi1* について、N 末端 His-tag 融合型の組換えタンパク質として発現、精製し、解析したところ、キチナーゼ活性は認められたが、シイタケ子実体を使用した生物検定において、病原性が確認されなかった。この結果は、これまで本菌の病原因子として予想されてきたキチナーゼは病原因子ではなく、他の推定キチナーゼ、もしくは二次代謝産物などが真の病原因子として存在することが強く示唆された。

取得したドラフトゲノムについて、antiSMASH により二次代謝産物の生合成遺伝子を探索したところ、シデロフォアやポリエン系の抗真菌活性物質の生合成遺伝子が見出された。

今後は、*Eachi2* と *Eachi3* について、各々、組換えタンパク質を発現、精製し、その病原性を評価することと、併せて、病原性を指標とした二次代謝産物の単離精製を行い、病原因子を特定する。

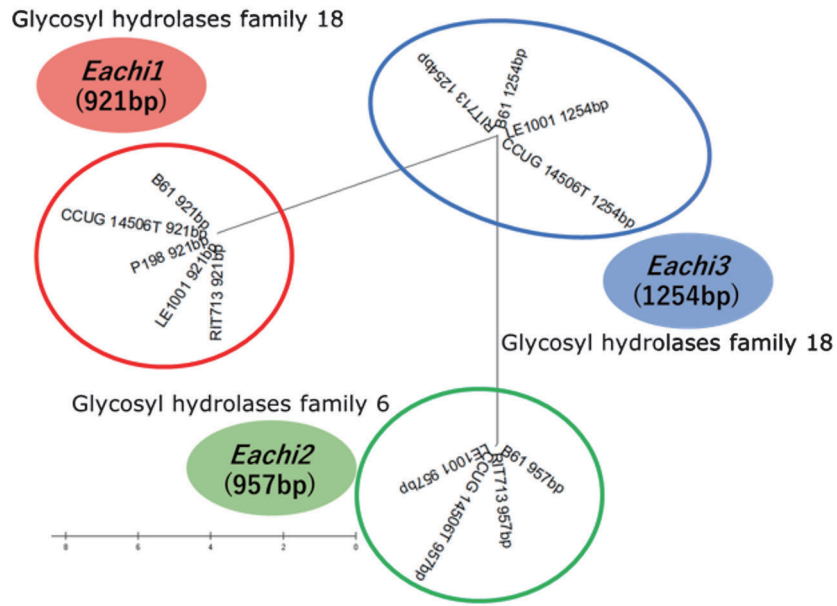


図 *E. americana* 分離菌株のドラフトゲノムから見出された3種の推定キチナーゼ遺伝子とデータベース上のゲノム配列情報から見出された推定キチナーゼ遺伝子との相同性

横田健治 (応用生物科学部 農芸化学科)

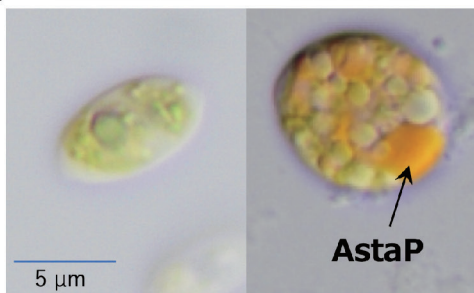
微細藻類の新規な光酸化ストレス防御タンパク質の同定

次世代シーケンサーは非モデル生物の分子解析ツールとして活躍している。研究室では非モデル生物（自然界から単離した微生物）を主に扱っており、本学のゲノムセンターでは、これまでに多くの解析にご協力いただいた。特に RNAseq と CLC を併用した cDNA の *de novo* ライブラリ作製ツールは、とても重宝して使用している。本レターでは、これまでにを行った解析の一例として、当研究室で発見・命名した微細藻類由来の水溶性のアスタキサンチン結合タンパク質（AstaP）の生物分布調査に関して紹介する。

光合成生物にとって光エネルギーは必要不可欠であるが、強光環境下で乾燥や塩ストレスなどの環境ストレスが付随すると、“光”は強い毒性を発揮する。このストレスは光酸化ストレスと呼ばれ、本ストレスへの耐性には、光や活性酸素を防御するための生命反応の保持が重要になる。我々は一般植物の生育が難しい強光が付随する過酷な環境（真夏のアスファルト、真夏の海岸、砂漠など）からサンプリングを行い、強光耐性を持つ微細藻類の収集・解析を行ってきた。保存株の中で、農大前の真夏のアスファルトから単離した真核の微細藻類は、強光が付随する長期間の水分欠乏下でも赤色化を伴いながら生命を維持する。この赤色化の原因物質を調査中に、光合成生物では報告例の無い水溶性のカロテノイド結合タンパク質を同定し、油のアスタキサンチンを結合していたことから AstaP と命名した (PCP 2013)。

AstaP の他生物における分布は不明であったことから、次世代シーケンサーを用いて、これまでに単離したストレス耐性能が高い微細藻類株や、世界各地のカルチャーコレクション株などを用いて分布調査を行ってきた。進化系統樹を参考にして供試株を選抜し、それぞれの株に光酸化ストレスを付与後に cDNA ライブラリを作製する。RNAseq 解析後の生データを CLC の *de novo* 解析ツールにて *in silico* での mRNA 配列の作製を試みる。解析時のパラメータを調整すると、一株あたり平均で 3~5 万本の contig 配列が得られる。本手法にて、これまでに数種の AstaP オルソログを検出した。本オルソログはバクテリアや海洋生物にも分布が確認され、光利用性やカロテノイドを持つ種に限定して存在するタンパク質であることが判明しつつある。また同定したタンパク質をコードする遺伝子配列の取得にも欠かせないツールとなっている。他株から精製した AstaP は、等電点が大きく異なったり、色調が異なったりと多様な性質を示す。これらのオルソログをコードする遺伝子の完全長 cDNA 配列も、cDNA ライブラリのシーケンス情報を利用して速やかに取得された (*Commun. biol.* 2020, *Marine Drugs* 2021)。本ホモログは真核微細藻類のみならずラン藻や色を持つ好熱性バクテリア、海洋動物に分布することから、現在はこれら機能未知遺伝子の同定や発現解析にも利用させて頂いている。

(1) 通常細胞 → 強光+塩



色素を生産した沖縄藻Oki-4N株

(2)



AstaP-orange AstaP-pink1

図 1. 真核の微細藻類から同定した AstaP

(1) 光酸化ストレス付与後に AstaP を大量に蓄積した沖縄から単離した真核微細藻類 *Scenedesmus obtusus* Oki-4N 株、(2) 色が異なる AstaP のオルソログ。

川崎信治 (生命科学部 分子微生物学科)

高市真一 (生命科学部 分子微生物学科)

石毛太一郎 (公益財団法人競走馬理化学研究所)

松谷峰之介 (生物資源ゲノム解析センター)

微生物と植物における遊離フラビン関与の鉄代謝

鉄は生物の生育に必須の元素であるが、不溶の酸化鉄（水酸化）で通常存在するため、鉄の可溶化効率が生物の生育律速となっている。一方、酸化鉄が還元された2価鉄は、活性酸素中で最も強毒性のヒドロキシルラジカルを生成し、細胞障害原因となる。従って、全ての生物生育に、鉄の2面性（鉄利用＝酸化鉄還元可溶化反応、鉄毒性＝還元鉄フェントン反応）関与が考えられるが、細胞内の両反応関係は不明である。フラビン（FAD, FMN）は一般的に酵素に結合し機能するが、私たちは遊離フラビン（FAD, FMN）（図1）の両反応への関与を報告¹⁾しており（図2）、本年度申請では、以下2項目：1. 植物の鉄還元可溶化、2. 微生物における還元鉄フェントン反応における、遊離フラビン2反応性を鉄動態とRNA Seq から解析を試みた。

1. 植物における鉄還元可溶化：4'-ketoriboflavin (4-ketoRf) 代謝：

4'-ketoriboflavin は生物界で始めて生成が観察された新規ビタミン B2 誘導体²⁾、その動態と代謝は不明である。4'-ketoriboflavin が既知 riboflavin より鉄可溶化能が高く、鉄欠・好気条件での高発現が観察されたため、鉄欠培養開始と4-ketoRfが発現する直前4日目を中心にRNA Seq解析を行ったRiboflavin合成系の5箇所での優位な発現上昇を観察したため、本解析データによる鉄代謝遺伝子の推定を試みている。

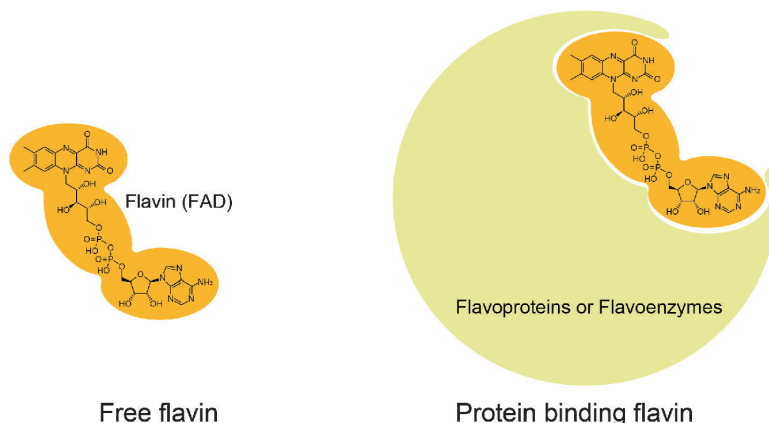


図1. 遊離フラビンとタンパク質結合フラビン
出典：T. Suzuki et al. (2020)

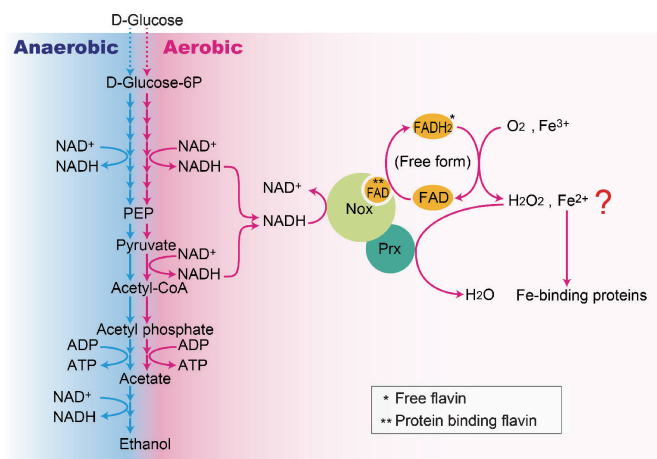


図2. *Amphibacillus xylanus* 遊離フラビン関与の代謝系
出典：T. Suzuki et al. (2020)

2. 微生物における還元鉄フェントン反応：遊離 FAD, FMN 代謝：

供試菌 *Amphibacillus xylanus* は好気・嫌気条件で同等に良好生育する酸素耐性菌嫌気性菌で、呼吸鎖を欠如するが、好氣的生育に鉄を要求し、細胞乾燥重量あたり、大腸菌に匹敵する酸素吸収力を有す³⁾。*A. xylanus* には、遊離 FAD 存在下で活性化されるフラビン酵素 NADH oxidase-Prx 系⁴⁾ が酸素・鉄代謝に関与している³⁾。好気・嫌気の両条件下で過剰電子を生成しない 2 代謝系を有すため、両条件下で良好に生育し、嫌気から好気条件への切り替え培養でも良好生育を維持するが、好気から嫌気条件への切り替え培養では、著しい生育低下“嫌気ストレス”が観察された。蛍光顕微鏡により、嫌気条件切り替え培養後に著しい遊離 Fe²⁺ の増加、生育回復時に遊離 Fe²⁺ の減少が観察された。さらに、同条件の培養菌体メスバウアー分光分析では、遊離 Fe²⁺ (34%) の増加が確認された。

RNA-seq 解析 (ゲノム：2.6Mb, ORF:241) から、切り替え後に嫌気代謝系は発現しないが、解糖系は継続発現することが見いだされた。本菌はアルカリ性菌のため糖源の褐変が同時進行する。そこで糖添加条件を加味した RNA-seq 解析を試みたい。

呼吸鎖を有す通性好気性菌 *E.coli* BW25113 株を供試菌として、同様の切り替え培養を試みたところ、“嫌気ストレス”は観察されなかった。そこで、嫌気条件切り替え菌体のメスバウアー分光を試みたところ、Fe²⁺ (16%) 増加は観察されたが、遊離 Fe²⁺ は観察されなかった。私たちは、供試菌 *E.coli* BW25113 株細胞内に嫌気条件下での生成電子を Fe³⁺ に伝達可能な遊離フラビンとその還元酵素系⁵⁾ を見いだしている。そこで、“嫌気ストレス”を受ける *A. xylanus* に加え、“嫌気ストレス”を受けない *E. coli* における RNA-seq 解析を比較検討し、遊離フラビンと鉄代謝 (鉄利用、鉄毒性) の機構解明を試みたい。

- (1) T. Suzuki *et al.*, Free flavin participates in iron and also oxygen metabolism in Bacteria, *J. Bacteriol. Parasitol.*, 11, No:1000377 (2020)
- (2) J. Satoh *et al.*, *Cucumis sativus* secretes 4'-ketoriboflavin under iron-deficient conditions, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 80, 363-367, (2016)
- (3) S. Kimata *et al.*, Intracellular free flavin and its associated enzymes participate in oxygen and iron metabolism in *Amphibacillus xylanus* lacking a respiratory chain, *FEBS Open Bio*, 8, 947-961 (2018)
- (4) T. Arai *et al.*, NADH oxidase and alkyl hydroperoxide reductase subunit C (peroxiredoxin) from *Amphibacillus xylanus* form an oligomeric assembly, *FEBS Open Bio*, 5, 124-131 (2015)
- (5) J. Satoh *et al.*, Free flavins accelerate release of ferrous iron from iron storage proteins by both free flavin-dependent and -independent ferric reductases in *Escherichia coli*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 65, 308-315 (2019)

鈴木智典 (生命科学部 分子微生物学科)

= 研究発表実績 =

○論文発表

- **Kawasaki S, Yamazaki K, Nishikata T, Ishige T, Toyoshima H, Miyata A.**
 Photooxidative stress-inducible orange and pink water-soluble astaxanthin-binding proteins in eukaryotic microalga.
Commun Biol. 3(1):490. (2020)
- **Richard Albert J, Au Yeung WK, Toriyama K, Kobayashi H, Hirasawa R, Brind'Amour J, Bogutz A, Sasaki H, Lorincz M.**
 Maternal DNMT3A-dependent de novo methylation of the paternal genome inhibits gene expression in the early embryo.
Nat Commun. 11(1):5417. (2020)
- **Tenagy, Iwama R, Kobayashi S, Shiwa Y, Yoshikawa H, Horiuchi H, Fukuda R, Kajiwara S.**
 Acyl-CoA synthetases, Aal4 and Aal7, are involved in the utilization of exogenous fatty acids in *Yarrowia lipolytica*.
J Gen Appl Microbiol. 67(1):9-14. (2020)
- **Tsukimoto R, Isono K, Kajino T, Iuchi S, Shinozawa A, Yotsui I, Sakata Y, Taji T.**
 Mitochondrial Fission Complex is Required for Long-Term Heat Tolerance of Arabidopsis.
Plant Cell Physiol. . Epub ahead of print. (2021)
- **Inaba R, Kawahara-Miki R, Shinozawa A, Yasuhara T, Fujii T, Koyama K, Murata-Okubo M, Souma K, Hirayama H.**
 Impaired placentomal interferon signaling as the possible cause of retained fetal membrane in parturition-induced cows.
J Reprod Dev. Epub ahead of print. (2021)
- **Sugimoto A, Inoue Y, Tanaka K, Sinozawa A, Shirasuna K, Iwata H.**
 Effects of a gel culture system made of polysaccharides (xanthan gum and locust bean gum) on in vitro bovine oocyte development and gene expression of the granulosa cells.
Mol Reprod Dev. 88(7):516-524. (2021)
- **Isono K, Tsukimoto R, Iuchi S, Shinozawa A, Yotsui I, Sakata Y, Taji T.**
 An ER-Golgi Tethering Factor SLOH4/MIP3 Is Involved in Long-Term Heat Tolerance of Arabidopsis.
Plant Cell Physiol. 62(2):272-279. (2021)
- **Takahashi S, Okubo R, Kanesaki Y, Zhou B, Takaya K, Watanabe S, Tanaka K, Imamura S.**
 Identification of Transcription Factors and the Regulatory Genes Involved in Triacylglycerol Accumulation in the Unicellular Red Alga *Cyanidioschyzon merolae*.
Plants (Basel). 10(5):971. (2021)
- **Kido Y, Maeno S, Tanno H, Kichise Y, Shiwa Y, Endo A.**
 Niche-specific adaptation of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from malt whisky and dairy fermentations.
Microb Genom. 7(4):000560. (2021)
- **Kimura-Nakajima C, Sakaguchi K, Hatano Y, Matsumoto M, Okazaki Y, Tanaka K, Yamane T, Oishi Y, Kamimoto K, Iwatsuki K.**
 Ngn3-Positive Cells Arise from Pancreatic Duct Cells.
Int. J. Mol. Sci. 22(16):8548. (2021)

- **Inaba A, Arinaga A, Tanaka K, Endo T, Hayatsu N, Okazaki Y, Yamane T, Oishi Y, Imai H, Iwatsuki K.**
Interleukin-4 Promotes Tuft Cell Differentiation and Acetylcholine Production in Intestinal Organoids of Non-Human Primate.
Int. J. Mol. Sci. 22(15):7921. (2021)
- **Nagata S, Tatematsu K, Yamaguchi H, Inoue Y, Tanaka K, Tasaki H, Shirasuna K, Iwata H.**
Effect of docosahexaenoic acid on in vitro growth of bovine oocyte.
Reprod. Med. Biol. 20(4): 485-493. (2021)
- **Xi R, Montague J, Lin X, Lu C, Lei W, Tanaka K, Zhang YV, Xu X, Zheng X, Zhou X, Urban JF Jr, Iwatsuki K, Margolskee RF, Matsumoto I, Tizzano M, Li J, Jiang P.**
Up-regulation of gasdermin C in mouse small intestine is associated with lytic cell death in enterocytes in worm-induced type 2 immunity.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 118(30):e2026307118. (2021)
- **Toyoshima H, Miyata A, Yoshida R, Ishige T, Takaichi S, Kawasaki S.**
Distribution of the Water-Soluble Astaxanthin Binding Carotenoprotein (AstaP) in Scenedesmaceae.
Mar. Drugs. 19(6):349. (2021)
- **Shinohara T, Honda S, Yoshida S, Oho K, Igarashi D, Wakui K, Ohtake R, Tanaka K.**
Development of Simple Sequence Repeat (SSR) and Morphological Markers to Identify Jaboticaba Cultivars.
Trop. Agr. Develop. 65(2):68-74. (2021)
- **Matsutani M, Wakinaka T, Watanabe J, Tokuoka M, Ohnishi A.**
Comparative genomics of closely related *Tetragenococcus halophilus* strains elucidate the diversity and microevolution of CRISPR elements.
Frontiers in Microbiology. 12:687985. (2021)
- **Unno R, Suzuki T, Matsutani M, Ishikawa M.**
Evaluation of the Relationships Between Microbiota and Metabolites in Soft-Type Ripened Cheese Using an Integrated Omics Approach.
Frontiers in Microbiology. 12: 681185. (2021)
- **Ishige T, Hara H, Hirano T, Kono T, Hanzawa K.**
Genetic diversity of Japanese quail cathelicidins.
Poult Sci. 101046. (2021)
- **Inaba A, Kumaki S, Arinaga A, Tanaka K, Aihara E, Yamane T, Oishi Y, Imai H, Iwatsuki K.**
Generation of intestinal chemosensory cells from nonhuman primate organoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 15:20-25. (2021)
- **Koshiishi Y, Uchiyama H, Murata-Okubo M, Tanaka K, Kameyama Y, Hirayama H, Wada K.**
Development of 49 novel microsatellite markers from Next-generation sequencing data and a robust method for parentage tests in the emu (*Dromaius novaehollandiae*).
Gene. 145238. (2021)
- **Endo A, Koizumi R, Nakazawa Y, Shiwa Y, Maeno S, Kido Y, Irisawa T, Muramatsu Y, Tada K, Yamazaki M, Myoda T.**
Characterization of the microbiota and chemical properties of pork loins during dry aging.
Microbiologyopen. 10(1):e11157. (2021)

● **Takahashi S, Fukushima H, Yu Z, Tomita H, Kida S.**

Tumor necrosis factor α negatively regulates the retrieval and reconsolidation of hippocampus-dependent memory.

Brain Behav Immun. 94: 79-88. (2021)

● **Fukushima H, Zhang Y, Kida S.**

Interactions between the amygdala and medial prefrontal cortex as upstream regulators of the hippocampus to reconsolidate and enhance retrieved inhibitory avoidance memory.

Mol Brain. 14: 44. (2021)

● **Fukushima H, Zhang Y, Kida S.**

Active Transition of Fear Memory Phase from Reconsolidation to Extinction through ERK-Mediated Prevention of Reconsolidation.

J Neurosci. 41: 1288-1300. (2021)

● **Tanaka K, Shimomura K, Hosoi A, Sato Y, Oikawa Y, Seino Y, Kuribara T, Yajima S, Tomizawa M.**

Antennal transcriptome analysis of chemosensory genes in the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.).

PLoS One 19(17):e0262817. (2022)

● **Toriyama T, Shinozawa A, Yasumura Y, Saruhashi M, Hiraide M, Ito S, Matsuura H, Kuwata K, Yoshida M, Baba T, Yotsui I, Taji T, Takezawa D, Sakata Y.**

Sensor histidine kinases mediate ABA and osmostress signaling in the moss *Physcomitrium patens*.

Current Biology 32(1):164-175. (2022)

● **Hirose Y, Ohtsubo Y, Misawa N, Yonekawa C, Nagao N, Shimura Y, Fujisawa T, Kanesaki Y, Katoh H, Katayama M, Yamaguchi H, Yoshikawa H, Ikeuchi M, Eki T, Nakamura Y, Kawachi M.**

Genome sequencing of the NIES Cyanobacteria collection with a focus on the heterocyst-forming clade.

DNA Res. in press

● **Bairagi N, Watanabe S, Nimura-Matsune K, Tanaka K, Tsurumaki T, Nakanishi S, Tanaka K.**

Conserved Two-Component Hik2-Rre1 Signalling is Activated Under Temperature Upshift and Plastoquinone-Reducing Conditions in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Plant Cell Physiol. in press

● **Wakinaka T, Matsutani M, Watanabe J, Mogi Y, Tokuoka M, Ohnishi A.**

Ribitol-containing wall teichoic acid of *Tetragenococcus halophilus* is targeted by bacteriophage Φ WJ7 as the irreversible binding receptor

Microbiol. Spectr. in press

● **学会・セミナー等での発表**

2021年6月20-24日

World Microbe Forum (オンライン開催)

Satoru Watanabe, Masataro Hosomura, Yu Kanesaki, Kaori Nimura-Matsune
Hirofumi Yoshikawa, Kei Asai, and Mitsuhiro Itaya

Gene expression profile of *CyanoBacillus*, carrying chimeric genome of *Bacillus subtilis* and cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803.

2021年7月3-4日**第75回 日本栄養・食糧学会大会（オンライン開催）**

坂口恒介、中嶋ちえみ、稲葉明彦、今井啓雄、山根拓実、大石祐一、岩槻 健
 霊長類腸管オルガノイドを用いた tuft 細胞分化誘導系の開発

2021年9月8-10日**日本遺伝学会第93回年会（東京・オンライン開催）**

渡辺智
 シアノバクテリアの非典型的なゲノム構造と複製開始機構
 山本圭一、荷村（松根）かおり、板谷光泰、朝井計、渡辺智
 枯草菌細胞における広宿主域接合伝達ペクターの発現解析
 神戸博江、吉川佳奈子、堀米心香、田中寛、渡辺智
 真核紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* における自律複製配列の探索

2021年9月16-19日**日本植物学会第85回大会（八王子）**

市橋武、安部優希、太治輝昭、坂田洋一、四井いずみ
 キチン処理により細胞死するヒメツリガネゴケ変異体の解析
 篠澤章久、鳥山士、猿橋正史、平出真由桂、竹澤大輔、四井いずみ、太治輝昭、坂田洋一
 エチレン受容体様ヒスチジinkinナーゼ（ETR-HK）による ABA およびエチレンシグナル制御機構の解析

2021年9月21-24日**第114回日本繁殖生物学会大会（オンライン開催）**

鈴木大介、隈本宗一郎、田中啓介、小川英彦
 着床期におけるマウス壁栄養外胚葉の分化と遺伝子発現ダイナミクス

2021年10月27-29日**第73回 日本生物工学会大会 2021（沖縄、オンライン開催）**

海野良輔、大崎友美加、松谷峰之介、鈴木敏弘、石川森夫
 白カビ熟成チーズの細菌相と成分の相関と非スターター菌種の風味形成能の検証
 松谷峰之介、ティーラゲール ガンジャンナ、薬師寿治、松下一信、石川森夫
 酢酸菌におけるセルロース生産に関わる遺伝子の欠失と復帰変異（シンポジウム）

2021年10月30日**藍藻ゲノム交流会 2021（東京）**

渡辺智
Synechocystis sp. PCC 6803 のゲノム解析 2021
 ～リシーケンスから明らかとなったラボストレインのゲノム多様性～

2021年10月31-11月2日**日本微生物生態学会第34回大会（オンライン開催）**

久保日南子、野中成耕、松谷峰之介、坂本光、加藤拓、齋藤宏昌、對馬誠也、山本紘輔
 異なる干潟環境に自生する塩生植物シバナ (*Triglochin maritimum* L.) の土壌理化学性と根圏細菌叢の比較

2021年11月16-17日**第17回 日本食品免疫学会 学術大会（オンライン開催）**

有永理峰、稲葉明彦、田中啓介、今井啓雄、山根拓実、大石祐一、岩槻健
 霊長類消化管オルガノイドを用いた tuft 細胞の機能解析

2022年3月2-4日**第16回日本ゲノム微生物学会年会（東京・オンライン開催）**

前田海成、奥田祐紀子、榎本元、渡辺智、池内昌彦
 単細胞性藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 における新規硫酸多糖シネカンの合成・制御機構

渡辺智、前田海成、河野暢明、石崎楓佳、志波優、荒川和晴、荷村（松根）かおり
リシーケンスにより示された藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 実験室株のゲノム構造多様性
大串航世、末崎裕寛、荷村（松根）かおり、大林龍胆、渡辺智
藍藻 *Synechocystis* sp. PCC 6803 への DnaA-oriC システムの導入

2022年3月4-6日

日本植物分類学会第21回大会（神奈川・オンライン開催）

田中啓介、小松かおり、佐藤靖明、Mintah Lemuel Ohemeng、小谷真吾、Kitalong Christopher、
Yin Yin Nwe、北西功一、四方篤、足達太郎
改良型 ddRAD-seq 法を用いた栽培バナナの分子系統解析

2022年3月15-18日

日本農芸化学会 2022年度大会（京都、オンライン開催）

坂口恒介、稲葉明彦、山根拓実、大石祐一、今井啓雄、岩槻健
霊長類腭管オルガノイドを用いた tuft 細胞の新たな生体防御機構の解明
有永理峰、石原理沙、岩村美緒、佐藤南帆、稲葉明彦、田中啓介、今井啓雄、山根拓実、大石祐一、岩槻健
霊長類消化管オルガノイド単層培養系の構築とヒト菌体成分に対する応答の解析
大崎友美加、海野良輔、鈴木敏弘、石川森夫
模擬的熟成による非スターター菌種のチーズフレーバー生成能の検証
松尾弥俊、鈴木敏弘、松谷峰之介、石川森夫
酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* の酢酸発酵時におけるエタノール・グルコース資化に関する代謝調節機構の解明
坂巻裕、高市真一、梅野太輔、千葉櫻拓、伊藤晋作、渡辺智
シアノバクテリア酵母を用いたストリゴラクトンの効率的生産プラットフォームの構築
佐藤瑞穂、川口毅、前田海成、渡辺麻衣、成川礼、池内昌彦、渡辺智
シアノバクテリアの集光アンテナ色素改変による利用光波長の拡張
鈴木智典、糸田侑花、野口龍生、植松悠、石塚雄一、村崎友彦、渡邊昭夫、野村佳歩、阿部晃、新村洋一、
内野昌孝
過酸化脂肪酸を還元する *Lactobacillus plantarum* P1-2 株によるプロバイオティクス資材の開発
鈴木智典、奥山貴人、相本健吾、松永一太、渡邊昭夫、武田晃治、野村佳歩、阿部晃、新村洋一、内野昌孝
L. plantarum P1-2 株の酸化ストレス防御機構に関する研究
鈴木智典、加藤紗弥、木俣真弥、酒井陽一、高山努、中本忠宏、中島聖也、福島多一、武田晃治、吉村悦郎、
野村佳歩、阿部晃、新村洋一、内野昌孝
酸素耐性嫌気性菌 *Amphibacillus xylanus* と通性好気性菌 *E. coli* における“嫌気ストレス”に関する研究

2022年3月22-24日

第63回日本植物生理学会年会（オンライン開催）

Takeru Ichihashi, Yuki Ambe, Teruaki Taji, Yoichi Sakata, Izumi Yotsui
Physiological analysis of chitin-induced cell death mutant (*ccd1*) of *Physcomitrium patens*
太治輝昭
植物の高温に対するレジリエンス機構
篠澤章久、鳥山士、猿橋正史、平出真由桂、竹澤大輔、四井いづみ、太治輝昭、坂田洋一
Sensor histidine kinases regulate both ABA and ethylene signaling pathways in the moss
Physcomitrium patens

マスメディア

2021年11月

坂田洋一、篠澤章久
植物が水環境を感知する仕組みを解明した研究成果が日本経済新聞 - 電子版・日本農業新聞に掲載されました。

2022年3月発行

生物資源ゲノム解析拠点ニュースレター No. 9

学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析拠点

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

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

E-mail kyoten-g@nodai.ac.jp URL <http://www.nodai-genome.org>

NGRCニュース No. 13

学校法人東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

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

E-mail nodaigc@nodai.ac.jp URL <http://www.nodai-genome.org>

表紙の説明

ヒメツリガネゴケ茎葉体の顕微鏡写真

