ゲノム科学の総合的推進に向けた
大規模ゲノム情報生産・高度情報解析支援
（ゲノム支援）

221S0002

平成 22 年度～平成 27 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）
（新学術領域研究（研究領域提案型）「生命科学系 3 分野支援活動」）
研究成果報告書

平成 28 年 3 月

領域代表　　小　原　雄　治
情報・システム研究機構　国立遺伝学研究所
系統生物研究センター　特任教授

目　　次

はしがき …… 1

1．研究組織

（1）班員・総括会議委員・審査委員会委員 …… 7

（2）公募支援課題 …… 11

2．交付決定額（配分）…… 24

3．研究発表リスト

（1）雑誌論文

(a) 支援による成果論文 …… 25

(b) 班員による支援高度化等の成果論文 …… 55

（2）学会発表

(a) 支援による成果発表 …… 66

(b) 班員による支援高度化等の成果発表 …… 165

（3）図書 …… 174

4．研究成果による産業財産権の出願・取得状況 …… 180

5．研究成果

（1）ゲノムELSIユニット …… 181

（2）情報解析支援活動における高度化 …… 192

（3）領域企画課題 …… 204

（4）公募支援課題成果のまとめ

① ゲノム医科学 …… 212

② 多細胞生物１ …… 215

③ 多細胞生物２ …… 220

④ 微生物 …… 223

⑤ 情報解析 …… 226

（5）公募支援課題の成果報告書 …… 229

注；公募支援課題に関する支援依頼者毎の目次を次頁に掲載しました。

6．公募課題の支援依頼者から寄せられた活動評価アンケート …… 600

５．研究成果　（５）公募支援課題の成果報告書

支援依頼者作成の公募支援課題の成果報告書は、五十音順に下記の頁に掲載しました。

秋光　信佳 …… 231
阿部　訓也 …… 233
阿部　知子 …… 234
有泉　　亨 …… 235
飯田　哲史 …… 236
生田　哲朗 …… 237
池上　秀利 …… 238
石井　敦士 …… 239
石川　欽也 …… 242
伊藤　隆司 …… 243
稲垣　祐司 …… 244
稲田　利文 …… 245
犬飼　義明 …… 246
井上　　勲 …… 247
井ノ上逸朗 …… 248
猪早　敬二 …… 250
今村　拓也 …… 251
今本　尚子 …… 254
岩瀬　忠行 …… 255
岩間　厚志 …… 256
イン ベイウェン …… 260
植木　尚子 …… 261
上田真由美 …… 263
上野　直人 …… 264
上村　　匡 …… 265
牛田　一成 …… 267
内山　　進 …… 269
漆原　秀子 …… 270
江澤　辰広 …… 271
大隅　典子 …… 272
太田　邦史 …… 275
太田　博樹 …… 276
大坪和香子 …… 277
大西　孝幸 …… 278
大西なおみ …… 279
大政　健史 …… 280
岡　　晃 …… 281
岡崎　　伸 …… 282
岡田　典弘 …… 283
岡田　随象 …… 284
岡村　　均 …… 285
奥野　浩行 …… 286
奥　祐三郎 …… 288
小沼　　健 …… 289
小野寺　淳 …… 290
小野寺康之 …… 292
小野　竜一 …… 295
小保方潤一 …… 296
垣内　　力 …… 297
鏡　　雅代 …… 298
笠原　和起 …… 299
風間　裕介 …… 300
片桐　孝和 …… 301
勝間　　進 …… 303
加藤　　明 …… 304
加藤太一郎 …… 305
加藤　忠史 …… 306
加藤　泰彦 …… 307
鎌形　洋一 …… 308
川上　浩一 …… 309
川口正代司 …… 310
河野　重行 …… 312
河原　行郎 …… 313
河村　正二 …… 315

菊池　潔 …… 317
岸本　健雄 …… 318
木曽　彩子 …… 319
北野　潤 …… 321
木村　亮介 …… 323
清澤　秀孔 …… 324
吉良　潤一 …… 325
工藤　洋 …… 326
國枝　武和 …… 327
久原　篤 …… 328
久保田宗一郎 …… 330
久保田健夫 …… 331
倉橋　浩樹 …… 332
黒岩　麻里 …… 333
黒澤　健司 …… 334
黒柳　秀人 …… 335
桑田　晃 …… 337
桑野　良三 …… 338
桑原　知巳 …… 339
桑山　秀一 …… 340
河内　孝之 …… 341
河野　友宏 …… 342
郷　康広 …… 343
國府　力 …… 344
幸谷　愛 …… 345
後藤　順 …… 346
後藤　眞 …… 347
後藤由季子 …… 348
小林　一三 …… 349
権藤　洋一 …… 351
齊藤　延人 …… 353
佐伯　和彦 …… 354
坂山　英俊 …… 355
笹川　洋平 …… 356
佐々木えりか …… 357
佐々木　洋 …… 358
佐藤　文彦 …… 360
佐藤　康成 …… 361
佐藤　豊 …… 362
佐藤　陽一 …… 363
澤　進一郎 …… 364
澤辺　智雄 …… 366
椎名　隆 …… 368
塩見　邦博 …… 369
執行　正義 …… 370
信濃　卓郎 …… 371
柴田　弘紀 …… 372
柴　博史 …… 373
嶋崎　晴雄 …… 374
嶋田　透 …… 376
島本　整 …… 379
將口　栄一 …… 380
白澤　健太 …… 381
城石　俊彦 …… 382
新蔵　礼子 …… 384
新屋みのり …… 385
末次　正幸 …… 386
菅井　基行 …… 387
菅　裕 …… 388
杉本　真也 …… 389
寿崎　拓哉 …… 390
鈴木　真吾 …… 391
鈴木　勉 …… 392
須田　亙 …… 393
諏訪　裕一 …… 394
瀬川　高弘 …… 395
関本　弘之 …… 396
瀬原　淳子 …… 398
曽田　貞滋 …… 399
平良　眞規 …… 400
高田　豊行 …… 402
高橋　秀尚 …… 404

高橋　秀幸 …… 407
高橋　文雄 …… 408
高畑　信也 …… 409
高濵　洋介 …… 410
滝沢　直己 …… 411
竹井　祥郎 …… 412
竹内　　理 …… 413
竹内　祐子 …… 414
竹田　潤二 …… 415
武田　直也 …… 416
武田　洋幸 …… 417
龍野　一郎 …… 418
田中　知明 …… 421
田中　章景 …… 423
谷　　明生 …… 424
多羽田哲也 …… 425
田村　智彦 …… 426
千葉　和義 …… 428
千葉　親文 …… 429
塚原　達也 …… 432
築山　拓司 …… 433
辻　　省次 …… 434
津田　雅孝 …… 436
筒井　　研 …… 437
常田　　聡 …… 438
程　久美子 …… 439
豊嶋　崇徳 …… 440
藤堂　　剛 …… 442
徳元　俊伸 …… 443
戸田　達史 …… 444
殿城亜矢子 …… 446
豊福　雅典 …… 448
中川　拓郎 …… 449
永田　裕二 …… 450
中永　和枝 …… 451
長宗　秀明 …… 452
中山　浩次 …… 454
中山　二郎 …… 455
成田　一衛 …… 457
新美　輝幸 …… 459
二階堂雅人 …… 462
西　順一郎 …… 464
西田　洋巳 …… 465
西中村隆一 …… 466
西村　欣也 …… 467
西山　智明 …… 468
野崎　久義 …… 469
野澤　昌文 …… 471
長谷川政美 …… 472
長谷部　太 …… 473
長谷部光泰 …… 474
花田　耕介 …… 475
濵﨑　恒二 …… 476
浜本　　洋 …… 477
林　　純一 …… 480
林　　深 …… 481
林　　哲也 …… 483
原　　一雄 …… 485
菱田　　卓 …… 486
尾藤　晴彦 …… 487
廣瀬　伸一 …… 488
廣田　　泰 …… 491
深田　吉孝 …… 493
福井　　学 …… 495
福澤　秀哉 …… 496
福重　真一 …… 497
藤井　穂高 …… 498
藤田　敏次 …… 501
藤田　知道 …… 502
藤田　雅紀 …… 504
藤本　　龍 …… 505
藤原　晴彦 …… 508

布施　直之 …… 511
二又　裕之 …… 512
古澤　　力 …… 513
古田　芳一 …… 514
星野　　敦 …… 516
細　　将貴 …… 517
細道　一善 …… 518
堀田紀久子 …… 522
堀江　恭二 …… 523
堀川　幸男 …… 525
堀家　慎一 …… 526
本郷　裕一 …… 527
本田　賢也 …… 528
前川　清人 …… 529
前田　和彦 …… 530
前田　太郎 …… 531
槇　宏太郎 …… 532
蒔田　直昌 …… 533
牧野　能士 …… 534
増田　誠司 …… 536
松浦　秀幸 …… 537
松岡　邦枝 …… 538
松岡　雅雄 …… 539
松尾　隆嗣 …… 540
松尾　洋孝 …… 541
松尾　亮太 …… 543
松下　智直 …… 544
松島　綾美 …… 545
松田　洋一 …… 548
丸山　治彦 …… 549
丸山　史人 …… 552
丸山　玲緒 …… 555
三浦　史仁 …… 556
三木　哲郎 …… 557
水野　洋介 …… 558
三谷　啓志 …… 559
光永　滋樹 …… 560
三戸　太郎 …… 562
蓑田　　歩 …… 563
三野　享史 …… 564
三村維真理 …… 566
三室　仁美 …… 567
宮崎健太郎 …… 569
宮崎　　亮 …… 570
向　　正則 …… 571
宗景　ゆり …… 572
村上　洋太 …… 573
盛武　　浩 …… 575
守屋　繁春 …… 576
守屋　央朗 …… 577
八木　　健 …… 578
八木田和弘 …… 579
谷口　俊介 …… 580
安田　仁奈 …… 581
安友　康二 …… 582
山岡　吉生 …… 583
山口徹太郎 …… 585
山田　拓司 …… 586
山本　友子 …… 587
山森　哲雄 …… 588
善岡　克次 …… 590
吉澤　　晋 …… 591
吉田　聡子 …… 592
和多　和宏 …… 594
和田　崇之 …… 597
渡部　　裕 …… 598
和田洋一郎 …… 599

はしがき：「ゲノム支援」の経緯と成果概要

１．「ゲノム支援」の経緯

「ゲノム支援」は文部科学省科学研究費新学術領域研究（研究領域提案型）『生命科学系３分野支援活動』に２０１０年度に採択された。提案課題名は「ゲノム科学の総合的推進に向けた大規模ゲノム情報生産・高度情報解析支援」で、「ゲノム支援」と略称する。この支援活動は、特定領域研究の終了を受けて、生命科学系３分野（がん、ゲノム、脳）の今後の支援のあり方について科学技術・学術審議会の科学研究費補助金審査部会で審議が行われ、「従来の３分野に関する特定領域研究における総括班・支援班の果たしてきた役割を何らかの形で継承し、新たに３分野を支援する仕組みを措置すべき」とのまとめ（平成２１年１月３０日）に基づいて設計されたものである。当初５年の計画のところ、１年の延長を経て、２０１５年度末で６年間の活動を終了することになった。本報告書はその成果をまとめたものである。

２．「ゲノム支援」の目的と達成度

【目的】　生命活動はゲノム、遺伝子、エピゲノムと環境との相互作用によって営まれ、その理解のためには DNA 配列解析が以前にもまして重要になった。そして超大量配列解析を可能にした次世代型 DNA シーケンサーは、生命科学に革命ともいえる発展や新たなフロンティアをもたらした。これに対応するためには、実験・情報解析の両面での大規模解析システムの整備が必須であるが、個々の研究者では対応が困難であることから、「ゲノム支援」では従来のゲノム特定領域研究で培ってきた装置、技術、人材を最大限生かして次世代型ゲノム解析システムの拠点整備を行い、これを活用してゲノム科学のピーク作りとすそ野拡大の両方を進めることを目的とした。そして、その過程で解析技術をさらに向上させ、人材を育成し、データ・リソースの適切な共有体制も整備し、ゲノム科学自体の発展（ひいてはゲノム情報に基づいた生命科学全体の発展）を促すことを目的とした。

【達成度】

１）この間、国際的には解析技術が予想以上の速度で進展したが、支援拠点に集約することにより最先端の技術整備と情報解析を含めた技術開発を進めることができた。これをもとに毎年 60-90 件の公募選定課題を支援し、355 報の論文など多数の成果が得られた。支援公募申請のもとになる科研費研究課題はすべての種目、生物系のほぼすべての分科に及び、「ゲノム支援」の活動が生命科学の基盤として重要であること、真に分野横断的であることを示した。支援を受けた研究者からは、個別研究では不可能なことが支援によって可能になったことなど、支援活動の高い効果や継続の必要性についての声が寄せられている。

２）ピーク作りに向けた研究コミュニティとの連携で大きな課題に挑む領域企画課題についても、シーラカンスゲノムなど特筆すべき成果論文が出た。また、困難なゲノム解読の切り札ともなったゲノムソフトウェア Platanus の独自開発にも成功したことなど、支援と解析技術の高度化の

好循環が進んだ。
これらのことから当初目的は達成されたと考える。以下に活動と成果の概要を記す。

３.「ゲノム支援」の進め方
以下の４つの支援活動（詳細は 10 ページ）の有機的な連携で進めた。２１の大学・研究機関から３９名の班員が参画した。
①総括支援活動
上記の目的のために、総括支援活動において活動全体の企画調整を行うとともに、公募課題審査委員会を設置し、科研費研究課題から公募等により支援課題を選定する。そして、以下の３つの支援活動により実験・情報（ウェット・ドライ）の支援活動を一体的に進めた。ゲノム研究の推進に重要である ELSI（倫理的、法的、社会的問題）を含む社会との接点活動のためには大阪大学医学系研究科にゲノム ELSI ユニットを置き、支援活動のサポートを行った。
以上に加えて、総括支援活動ではゲノム研究コミュニティの発展のために、研究交流・分野融合の場作り、国際連携の窓口機能等を行った。
②大規模ゲノム情報生産及び研究リソース構築支援活動
３つの拠点（国立遺伝学研究所、東京大学新領域創成科学研究科、宮崎大学医学部（最終年度に九州大学医学部に移動）を置き、次世代型 DNA シーケンサを中心としてヒトを含め多様な生物のゲノム DNA の構造、網羅的遺伝子発現プロファイル、エピゲノム解析、メタゲノム解析などのゲノム情報産出を、それぞれの特色を生かして支援した。より高度な支援に向けた技術開発も並行して行った。
③ゲノム医科学支援活動
東京大学医学部附属病院を拠点とし、GWAS 支援グループ（東京大学、九州大学（最終年度に久留米大学へ移動)、新潟大学）と合わせて、ゲノムタイピング・リシーケンシング及びゲノム医学インフォマティクスの支援を行った。ゲノム情報から疾患関連遺伝子を見出すためには、高精度の配列情報を基盤とした多型情報及び臨床情報を統合した高度な情報解析が必要であり、このための技術開発を並行して進めた。
④情報解析支援活動
他の支援活動と連携して、ゲノム配列データのアセンブル、マッピング、アノテーション（生物学的医学的意味付け）などゲノム配列の情報解析の支援、さらには疾患関連遺伝子探索の情報解析技術、遺伝統計学などの高度な情報解析の支援に取り組んだ。これに加えて、今後の高度な支援のための先行技術開発を実験系研究者とも連携して進めた。このために上記拠点での一体的な支援に加え、１１大学・機関から１８名の分担・連携研究者が情報解析支援に参画した。

４．支援課題の公募選定
１）手順：毎年度概ね以下のスケジュールで進めた

3 月　　公募要領 HP 公開
4 月 1 日～　　公募（約 1 カ月：ウェブ上での入力と申請書アップロード）
4 月中旬　　第 1 回審査委員会：課題選定の方針・手順を決定。
5 月　　書面評価
（この間、事務局側で技術・コストの見積もり、倫理問題のチェック）
6 月初中旬　　第 2 回審査委員会：支援課題候補と順位決定
6 月中下旬　　支援課題候補者と支援担当者との支援内容確認協議
7 月　　第 3 回審査委員会（メール審議）：支援課題の確定
支援開始

2）審査基準：以下の基準で審査委員会での審査を行った
・ゲノム科学の発展のために相応しい課題か。
・単なるアウトソーシングではなく、解析技術の向上（人材育成を含む）につながる支援課題か。
・申請者の科研費課題に密接に関連した支援課題であり支援の結果が十分に活かされる体制があるか
・倫理問題への対応、技術的可能性、材料の準備など、実行可能か。
3）採択数：採択課題は HP に掲載しています（詳細は 11 ページ）
2010 年度　69 件　（応募数：166 件）
2011 年度　62 件　（応募数：1 回目：181 件、2 回目（東日本大震災等対応）：56 件）
2012 年度　81 件　（応募数：200 件）
2013 年度　88 件　（応募数：172 件）
2014 年度　91 件　（応募数：161 件）
2015 年度　74 件　（応募数：211 件）
4）採択課題の特色
以下のような特色があり、生命科学全分野に必須、真の分野横断的な支援になったと言える。
・支援課題の科研費課題の分科細目は生命科学分野のほぼ全部をカバーした。
・支援課題の科研費課題の種目は若手 B から基盤 S、特推まですべてをカバーした。
・支援依頼者は４４都道府県の国公私大、国研、独法、地方機関に広がり、ほぼ全国をカバーした。

5.「ゲノム支援」の成果
1）支援の成果論文等
・これまでに、支援の成果論文 291 報（査読つき）、64 報（査読無し）が発表された。また、支援成果の学会発表が 1442 件行われた。関連の図書 42 件、知財権 6 件の成果が得られた。
各支援活動の成果についてはそれぞれの項を参照いただきたい。

2）技術の高度化、企画課題などの成果

・ゲノム解読が難しい生物種や研究コミュニティからの優れた計画要望などについては、複数年で対応する領域企画課題として扱った。これまでに 6 課題を扱った（詳細は 204 ページ）。例えばシーラカンスゲノム解読やアフリカツメガエルの国際共同研究などの成果につながった。これらの課題を通じて技術の開発も進めた。

・上記と重なるが、情報解析については、支援課題から得られた様々な問題解決すべく、新たなソフトウェア開発を進めた（詳細は 192 ページ）。49 本のソフトウェアやツール、データベースが開発された。例えば新たなゲノムアッセンブリソフト Platanus はこのような中から生まれている。実験と情報解析の間の好循環が得られたと言える。

3）データ共有体制の構築

・塩基配列データ（個人ゲノム情報を含まないもの）は、支援依頼者に提供すると同時に、DDBJ あるいは DDBJ が運用する DRA（次世代型シークエンサーのデータ）に仮登録し、論文発表後は直ちに、未発表の場合は事前に協議した時期（支援終了後原則として 1 年以内）に公開するという原則で進めてきた。

・個人ゲノム情報を含むデータについては、NBDC での審査のもとに及び DDBJ の JGA に登録（論文発表までは非共有が可能）することにしている。

4）研究コミュニティ作り

・拡大班会議として、「ゲノム支援」の班員と初年度以来の公募支援課題依頼者との合宿形式での交流の場を設けた。支援依頼者は医歯薬学、生物学、農学、環境、など非常に幅広い分野にわたり、通常の学会、班会議ではできない組み合わせである。このような場の経験を若手に積んでもらうために、若手共同研究者 1 名の旅費を「ゲノム支援」で負担した。

2011 年 12 月大阪（200 名参加）、2012 年 8 月御殿場（246 名参加）、2013 年 8 月神戸（298 名参加）、2014 年 8 月神戸（303 名参加）、2015 年 8 月京都（298 名参加）

・また、技術の普及のために要望の高い情報解析講習会を開催した。

2012 年 3 月＠東京、京都、2013 年 11 月＠三島、2015 年 2 月＠三島、2015 年 11 月＠三島

5）人材育成

ゲノム支援における若手研究者育成の取組は以下の 4 点により推進した。

・雇用した若手研究員や研究室内学生のみならず、支援依頼者の研究室に所属する学生も受け入れ On the Job Training (OJT)形式にて、支援依頼者、支援研究者が一体となり、支援課題を通じて総数 32 名の教育指導にあたった（東工大 8 名、宮崎大学（現、九州大学に移動）21 名、かずさ DNA 研 1 名、東大 2 名）。

・特に人材が不足している情報解析分野においては、実験生物学、数学、量子力学、制御工学な

ど異分野出身の博士研究員も積極的に雇用し、OJT 形式にて基礎から応用にいたるバイオインフォマティクスを学ばせた。その結果、それら異分野出身の研究員も支援課題の論文化に大きく貢献するとともに、学会賞を受賞するなど本分野を支える貴重な人材となった。

・若手人材育成促進のために、基礎から応用までを合宿形式で学ぶことができる情報解析講習会を 3 回開催した。

・ELSI の人材については、特任教員・研究員を雇用し人材育成の拠点とした。倫理支援の実務的活動とともに ELSI に関する調査・分析研究活動も行い ELSI 専門家としての実績を積めるように運営を行った。国際学会への積極的な参加を推奨しデータ共有等の国境を越えた倫理問題にも対応する人材を育成することに努めた（191 ページ参照）。

６．課題

以上のように、「ゲノム支援」の活動は生命科学分野において必須のものになったが、課題も出てきている。

第一に支援依頼内容の急増であり、特に 1 件当りの支援希望が盛り沢山になったことである。解析試料数を多く取りたいことは研究上当然であるが、このために支援件数を増やせなくなる。さらに輸入試薬が多いゲノム分野では円安効果で消耗品コストが 1.5 倍程度に上昇したこともあり、平成 27 年度は件数、解析数とも減らさざるをえなかった。広く支援できる方策が必要である。

第二は、民間での受託解析が活発化し、一般的な解析はこなせるようにもなってきたことである。「ゲノム支援」ではすそ野拡大とピーク作りの両方を対象にしているが、すそ野部分では民間でもできる内容（一般化）も増加した。すそ野拡大の支援はまだまだ必要ではあるが、この部分は研究者も増えているので、全てを支援することは不可能である。適切な仕分けが必要である。

第三は、ゲノム解析技術の進展がますます速度を上げていることである。ハイスループット化では HiSeq4000 が従来機の 4 倍になり、長鎖解読では PacBio が 20Kb 以上のリードを可能にした。さらに 1 分子マッピングシステム Irys が実用化され、染色体巨構造解明が進むと思われる。1 細胞解析は前処理機として C1 system が稼働して現実化している。これらは 5 年前には想定できなかったことであり、2-3 年の短期間で技術革新が起こっている。これらに適切に対応しないと国際競争に太刀打ちできなくなる。

７．今後に向けて

「ゲノム支援」の効果なども受けて、文部科学省では新たな仕組みとして新学術領域研究『学術研究支援基盤形成』が立ち上がった。「ゲノム支援」としては支援依頼者等から継続発展の要望が高いことから、上記の課題などを整理し、「先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム」として応募し採択に至った。その骨子は以下の通りである。

１）先端技術開発と試行部分での支援を重点化する。

２）すそ野支援は継続するが、一般化した解析支援は量的バランスを図る。

３）ゲノム科学は今後情報解析が中核になることから、情報解析支援への充実を図る。
具体的には：

・今回公募の方針を踏まえて分野別（医学、微生物等）支援を廃止し、技術別支援に移行する。
・大規模配列解析拠点ネットワークと高度情報解析支援ネットワークの２活動に大括りする。
・シーケンシング支援は拠点集中化し一層の効率化と高度化を推進する。
・情報解析支援は人材育成が重要であるので大学等に分散型で広げる。個々の配分額は小さくなるが、定期的な情報交換会を開き、一体的活動を行う。
・技術の急速進展に対応し、最先端技術の整備・提供・試行の支援をできる限り取り入れる。
・一般化した解析支援の量的バランスを図るために、利用者からの経費一部負担を検討する。
・データ公開/共有体制を充実させる。そのためのシステム開発も積極的に行う。

本報告書の内容や課題などが次期計画に活かされることが望まれる。

最後に、「ゲノム支援」の活動の成果は関係各位のご協力の賜物であり、ご協力に対し、深くお礼申し上げる。

2016 年 3 月

「ゲノム支援」領域代表・小原雄治

＊本報告書は領域ホームページで公開予定です。

１．研究組織

（１）班員・総括会議委員・審査委員会委員・組織体制

（所属・職名は部分参加の場合、参加期間の最終年度のものとした）

班員　（2016 年 3 月現在）

研究代表	小原雄治	国立遺伝学研究所・特任教授	
研究分担者	加藤和人	大阪大学大学院医学系研究科・教授	
連携研究者	山縣然太朗	山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授	
連携研究者	武藤香織	東京大学医科学研究所・教授	
連携研究者	位田隆一	同志社大学大学院グローバル・スタディーズ研究科・特別客員教授	
連携研究者	増井徹	慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター・教授	
連携研究者	栗山真理子	独立行政法人国立成育医療研究センター　・共同研究員	(2012～14 年度)
連携研究者	高木利久	東京大学大学院理学系研究科・教授	
連携研究者	藤山秋佐夫	国立遺伝学研究所・教授	
研究分担者	豊田　敦	国立遺伝学研究所・特任准教授	
研究分担者	黒木陽子	東北大学東北メディカル・メガバンク機構・非常勤講師	
研究分担者	菅野純夫	東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授	
研究分担者	鈴木　穣	東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授	
連携研究者	服部正平	早稲田大学理工学術院・教授	
研究分担者	黒川　顕	東京工業大学地球生命研究所・教授	
研究分担者	林　哲也	九州大学大学院医学研究院・教授	
連携研究者	小椋義俊	九州大学大学院医学研究院・准教授	
連携研究者	徳永勝士	東京大学大学院医学系研究科・教授	
研究分担者	山本　健	久留米大学医学部・教授	
連携研究者	桑野良三	新潟大学脳研究所・フェロー	
連携研究者	大橋　順	東京大学大学院理学系研究科・准教授	
研究分担者	辻　省次	東京大学医学部付属病院・教授	
研究分担者	井ノ上逸朗	国立遺伝学研究所・教授	
研究分担者	森下真一	東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授	
連携研究者	伊藤武彦	東京工業大学大学院生命理工学研究科・教授	
研究分担者	中村保一	国立遺伝学研究所・教授	

研究分担者	田畑哲之	かずさDNA研究所・所長	
連携研究者	平川英樹	かずさDNA研究所・研究員	
研究分担者	久原　哲	九州大学大学院農学研究院・教授	
連携研究者	野口英樹	国立遺伝学研究所・特任准教授	
研究分担者	岩崎　渉	東京大学大学院理学系研究科・准教授	
研究分担者	瀬々　潤	産業技術総合研究所・主任研究員	
研究分担者	高橋弘喜	千葉大学真菌医学研究センター・准教授	
研究分担者	浅井　潔	東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授	
研究分担者	笠原雅弘	東京大学大学院新領域創成科学研究科・講師	
研究分担者	榊原康文	慶應義塾大学理工学部・教授	
連携研究者	松岡　聡	東京工業大学学術国際情報センター・教授	
連携研究者	小笠原直毅	奈良先端科学技術大学院大学・学長	
連携研究者	中村建介	前橋工科大学生命情報学科・教授	
研究分担者	矢田哲士	九州工業大学大学院情報工学研究院・教授	
連携研究者	浜田道昭	早稲田大学理工学術院・准教授	
連携研究者	金谷重彦	奈良先端科学技術大学院大学・教授	(2010～11年度)

総括会議委員

領域外委員

安西祐一郎	慶應義塾学事顧問・慶應義塾大学理工学部教授	(2010～11年度)
岡田清孝	龍谷大学・教授	
榊　　佳之	静岡雙葉学園・理事長	
高久　史麿	日本医学会・会長	
豊島久真男	理化学研究所・研究顧問	
中村　桂子	ＪＴ生命誌研究館・館長	
堀田　凱樹	(財)井上科学振興財団・理事長	
吉田　光昭	(財)がん研究会・理事	
米澤　明憲	千葉工業大学人工知能・ソフトウェア技術研究センター・所長	
吉川　寛	大阪大学/奈良先端科学技術大学院大学・名誉教授	(2010～13年度)

領域内委員

小原雄治	国立遺伝学研究所・特任教授
菅野純夫	東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授
辻　省次	東京大学医学部付属病院・教授
小笠原直毅	奈良先端科学技術大学院大学・学長

高木利久　　東京大学大学院理学系研究科・教授

審査委員会委員

領域外委員

榊　　佳之	静岡雙葉学園・理事長	
岡田清孝	龍谷大学・教授	
吉田　光昭	(財)がん研究会・理事	
猪子　英俊	東海大学医学部・教授	(2010～12 年度)
戸田　達史	神戸大学大学院医学研究科・教授	
稲澤　譲治	東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授	
五條掘　孝	国立遺伝学研究所・教授	(2010～11 年度)
漆原　秀子	筑波大学教授・名誉教授	
武田　洋幸	東京大学大学院理学研究科・教授	
城石　俊彦	国立遺伝学研究所・教授	
伊藤隆司	九州大学大学院医学研究院・教授	
佐藤　矩行	沖縄科学技術大学院大学・教授	
米澤　明憲	東京大学大学院情報理工学系研究科・教授	(2010～11 年度)
松田　秀雄	大阪大学大学院情報科学研究科・教授	
五斗　進	京都大学化学研究所・准教授	(2012 年度～)
津田　雅孝	東北大学大学院生命科学研究科・教授	(2012 年度～)

領域内委員

菅野純夫	東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授
辻　省次	東京大学医学部付属病院・教授
井ノ上逸朗	国立遺伝学研究所・教授
加藤和人	大阪大学大学院医学系研究科・教授
小笠原直毅	奈良先端科学技術大学院大学・学長
林　哲也	九州大学大学院医学研究院・教授
田畑哲之	かずさ DNA 研究所・所長
久原　哲	九州大学大学院農学研究院・教授
高木利久	東京大学大学院理学系研究科・教授

組織体制

図１-１に示した構成で、活動した。

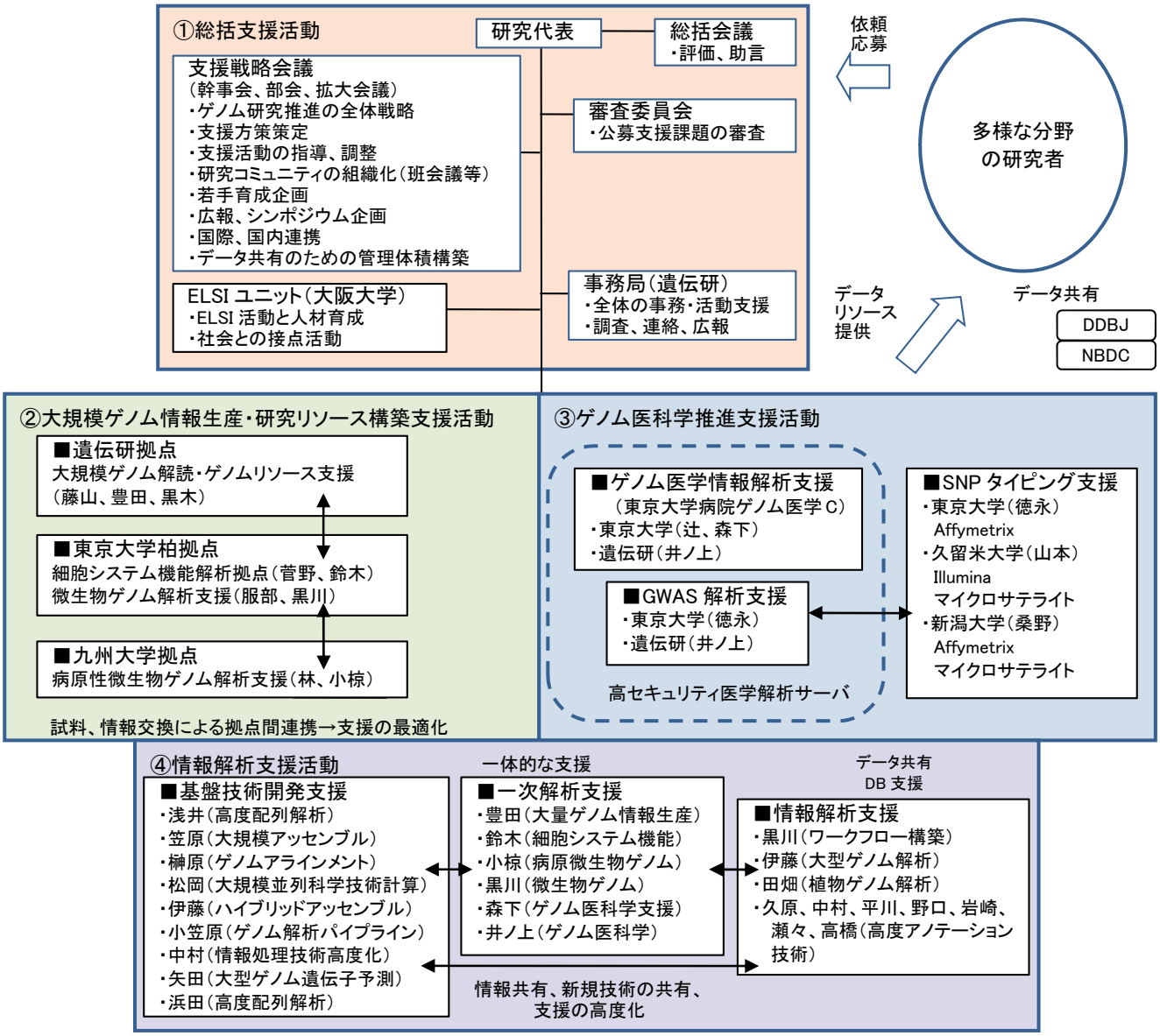


図１-１．「ゲノム支援」の構成

このうち②③及び④の一次解析支援グループと情報解析支援は支援活動及びそのための技術開発研究に特化している。一方、基盤技術開発支援グループは将来のゲノム情報解析技術、ハード開発及びそのための人材育成に向かうために、連携をもちつつ、それぞれの研究を推進することにした。

(2) 公募支援課題

氏名	所属	科研費		採択年度					
		種目	課題名	2010	2011	2012	2013	2014	2015
秋光信佳	東京大学	新学術	RNA分解を介した核局在型高分子非コードRNA作用マシナリーの制御機構の解明			○	○		
		基盤Ｂ	長鎖ノンコーディングＲＮＡによる自然免疫応答制御機構の解明						○
阿部訓也	理化学研究所	特定	マウス多能性胚細胞・生殖細胞の発生プログラム制御に関する研究			○			
阿部知子	理化学研究所	最先端	高エネルギー量子ビームによる次世代突然変異育種技術の開発			○			
有泉 亨	筑波大学	若手Ｂ	トマト変異体バイオリソースの育種的利用による果実肥大特性の包括的評価		○	○			
飯田哲史	東京大学	挑戦	次世代シークエンサーを用いたゲノム損傷抑制機構の解明					○	
生田哲朗	海洋研究開発機構	基盤Ｃ	始原的新口動物Hox/ParaHox遺伝子群の包括的研究		○				
池上秀利	福岡県農林業総合試験場	若手Ｂ	イチジクの連続着果性を制御する花成分子機構の解明				○		
石井敦士	福岡大学	若手Ｂ	小児交互性片麻痺の分子病態の解明		○	○	○		
石川欽也	東京医科歯科大学	新学術	優性遺伝型脊髄小脳変性症のハイスループット遺伝子変異探索			○			
伊藤隆司	東京大学	基盤Ｂ	酵母をモデルとした機能性RNA探索戦略の開発	○					
稲垣祐司	筑波大学	挑戦	原始真核生物を求めて：新奇真核微生物の形態・発現遺伝子・ミトコンドリアゲノム解析	○					
稲田利文	東北大学	基盤Ｂ	新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストにおけるRACK1の機能解明	○※					
		新学術	遺伝子発現の正確性を保証するmRNA品質管理機構		○				
犬飼義明	名古屋大学	基盤Ｂ	イネの耐乾性に寄与する側根形成遺伝子の機能とネットワークの解明				○	○	
井上 勲	筑波大学	挑戦	ハテナ・アレニコラの次世代シーケンスを用いた核ゲノム解析	○					
井ノ上逸朗	国立遺伝学研究所	基盤Ａ	大規模GWASで得られた脳動脈瘤感受性遺伝子の病態への関与	○					
		新学術	HLAアレルと強く関連する薬剤副作用の惹引分子同定と作用機序		○				
猪早敬二	東京工業大学	基盤Ｃ	Ｗｎｔシグナルを介したフロアープレートによる脊椎分節機構の解析		○				
今村拓也	九州大学	基盤Ｂ	偽遺伝子挿入による種特異的非コードRNA獲得に基づく遺伝子スイッチ制御の多様化			○			
		挑戦	マウス初期胚エピゲノム変換に資するプロモーター非コードＲＮＡ機能の解明				○		
		新学術	遺伝子配列特異的エピジェネティック制御によるマウス腹内側核の機能的性差形成					○	
今本尚子	理化学研究所	最先端	ストレス応答時に機能する新規核ー細胞質間輸送経路の解明によるシャペロン機能の発掘			○			
		基盤Ａ	核ー細胞質間輸送因子Hikeshiの機能:基礎的解析から高次生命機能の理解						○
岩瀬忠行	東京慈恵会医科大学	若手Ｂ	パプアニューギニアの高地に住む人々の低タンパク食適応における腸内細菌叢の役割	○					
岩間厚志	千葉大学	新学術	癌幹細胞の特性維持に関わる長鎖非蛋白コードRNAの同定と新規治療標的としての検討		○				
		基盤Ａ	エピジェネティック異常による造血器腫瘍の発症機構の解明			○	○		

岩本和也	東京大学	挑戦	精神疾患患者死後脳におけるレトロトランスポゾン転移活性の検討		○※				
イン ベイウェン	筑波大学	基盤Ｃ	極限貧栄養環境下で増殖する細胞の創出						○
植木尚子	岡山大学	基盤Ｂ	ウイルス・宿主共存機構：宿主個体群構造ダイナミクスの生理生態学的・数理学的解析					○	
		新学術	大型二本鎖DNAウイルス：多因子・多層制御による宿主感染機序の理解を目指して						○
上田真由美	京都府立医科大学	基盤Ｂ	ＳＪＳ／ＴＥＮの発症機序解明および発症予測に向けた先駆的研究			○			
上野直人	基礎生物学研究所	新学術	細胞形態・運動を基盤とした器官形成のロジック		○	○			
上村 匡	京都大学	基盤Ａ	成体型神経回路へのリモデリングと一生を通した維持機構の解明		○				
		新学術	遺伝学的摂動を用いた樹状突起ジオメトリーの 演算原理の追究					○	
牛田一成	京都府立大学	基盤Ｂ	宿主との共進化をメルクマールとした家畜用プロバイオティクスの選抜と機能開発				○	○	
内山 進	大阪大学	基盤Ａ	FIB/SEMを用いたヌクレオソームトモグラフィーによる染色体内部構造の解明						○
梅園良彦	徳島大学	新学術	プラナリアの再生原理の探求	○	○				
漆原秀子	筑波大学	新学術	細胞性粘菌におけるアロ認証機構の解明	○					
江澤辰広	北海道大学	基盤Ｂ	植物絶対共生菌の革新的遺伝子サイレンシング法が開く菌根共生の分子基盤					○	
大隅典子	東北大学	基盤Ｂ	胎生期神経前駆細胞内mRNA長距離輸送に関わるRNA結合タンパクの探索と機能解析					○	
		挑戦	マウス音声コミュニケーションの神経生物学的基盤の解析					○	
		挑戦	仔マウスの行動に 対する雄生殖細胞の次世代継承エピゲノム変化に関する研究						○
太田邦史	東京大学	基盤Ａ	長鎖非翻訳RNAを介したクロマチン／染色体機能の制御	○					
太田博樹	北里大学	基盤Ｂ	愛知県保美貝塚出土資料による考古学・人類学のコラボレーションモデルの構築と展開						○
大坪和香子	東北大学	挑戦	コガタルリハムシ腸内共生乳酸菌の機能生態の解明					○	
大西孝幸	横浜市立大学	若手Ｂ	高温登熟による胴割れ米発生に対する分子育種的解決策の開発						○
大西なおみ	北海道大学	挑戦	タンパク質の高次構造情報に基づく医薬分子設計に向けた基盤的技術の創出					○	
大政健史	徳島大学	基盤Ｂ	細胞内品質管理プロセスを用いた次世代蛋白質生産システム創製				○		
岡 晃	東海大学	基盤Ｃ	ゲノムワイド関連解析から得た顎顔面変形症感受性領域のハプロタイプ同定						○
岡崎 伸	東京農工大学	若手Ｂ	根粒菌３型分泌系によるマメ科植物共生シグナルの活性化機構		○	○			
岡田典弘	東京工業大学	基盤Ｓ	新種の出現：種分化と大進化の分子機構	○	○				
岡田随象	東京医科歯科大学	若手Ａ	HLA imputation法を用いた自己免疫疾患のバイオマーカーの同定						○
岡村 均	京都大学	特推	分子時計による体内リズムの統合機構の解明	○					
奥野浩行	京都大学	基盤Ｂ	シナプス活動依存的遺伝子Ａｒｃの可塑性調節機能の解明				○		
		新学術	新規環境認知により活性化される単一ニューロン種のトランスクリプトーム解析					○	
		基盤Ｂ	シナプス可塑性関連因子Ａｒｃによる認知機能調節機構の解明						○
奥祐三郎	鳥取大学	基盤Ｃ	エキノコックス感染初期(虫卵から多胞化嚢胞)における遺伝子発現の推移				○		

小沼 健	大阪大学	若手Ｂ	オタマボヤをもちいた発生遺伝学の展開に向けた遺伝学技術の導入と発生現象の調査						○
小野寺淳	千葉大学	若手Ｂ	ポリコーム／トライソラックス複合体による免疫細胞記憶制御機構の解明		○		○		
小野寺康之	北海道大学	基盤Ｃ	ホウレンソウにおける性決定遺伝子コード候補領域の絞り込み		○		○		
		基盤Ｂ	ホウレンソウ性決定遺伝子座の構造決定および進化過程の解明						○
小野竜一	国立医薬品食品衛生研究所	若手Ｂ	レトロトランスポゾン由来の遺伝子Peg10による哺乳類胎生機構獲得の検証	○					
小保方潤一	京都府立大学	新学術	ミトコンドリア･色素体以外の共生オルガネラ成立過程の解明				○	○	
垣内 力	東京大学	基盤Ｂ	新規RNA結合タンパク質群による細菌の病原性発現機構の解明						○
鏡 雅代	国立成育医療研究センター	基盤Ｂ	１４番染色体インプリンティング遺伝子の生理学的機能と発現調節機構の解明			○			
笠原和起	理化学研究所	若手Ａ	哺乳類におけるメラトニンおよびその前駆体の生理学的意義の解明		○				
風間裕介	理化学研究所	若手Ｂ	植物性染色体を利用した重イオンビーム照射による染色体切断機構とLET効果の解析	○					
片桐孝和	金沢大学	若手Ｂ	ＨＬＡアレル欠失現象を利用したヒト造血幹細胞制御分子の同定			○			
		若手Ｂ	発作性夜間血色素尿症（PNH）形質を利用したヒト造血幹細胞動態の解明						○
勝間 進	東京大学	基盤Ｂ	高次宿主制御を司るバキュロウイルス組織トロピズムの分子解剖					○	
加藤 明	東京工業大学	基盤Ｂ	真骨魚類の淡水・海水適応を担うイオン輸送体の解析						○
加藤太一郎	鹿児島大学	基盤Ｃ	ホタルルシフェリン生合成経路の解明とキラルフリー発光システムへの応用					○	
加藤忠史	理化学研究所	挑戦	高速シーケンスによる一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝子変異の探索	○					
加藤泰彦	大阪大学	若手Ｂ	環境による性決定遺伝子の発現調節メカニズムの解明―甲殻類ミジンコをモデルとして―					○	
要 匡	国立成育医療研究センター	基盤Ｃ	頭蓋骨早期癒合疾患の次世代遺伝子一括診断システムの確立と治療標的分子の探索					○	○
鎌形洋一	産業技術総合研究所	基盤Ａ	地下圏内メタン生成・消費活動に関わる未知微生物群の分離培養と動態解析ツールの開発	○					
川上浩一	国立遺伝学研究所	基盤Ｓ	トランスポゾンを用いたＧａｌ４エンハンサートラップ法による脊椎動物初期発生研究	○※					
		基盤Ａ	トランスポゾンを用いた方法論に基づく脊椎動物フェノーム解析の基盤形成				○	○	
川口正代司	基礎生物学研究所	新学術	アーバスキュラー菌根共生系から根粒共生系への進化基盤の解明		○	○			
河野重行	東京大学	基盤Ｂ	藻類における雌雄非対称性の成立とオルガネラ遺伝の方向を決める形態と構造の探索			○			
		基盤Ｂ	免疫サブトラクション法による藻類の雌雄非対称性の成立に関与する形態と構造の探索				○	○	
河原行郎	大阪大学	新学術	ALSの病態解明に向けたRNA結合蛋白質TDP-43及びFUSの網羅的機能解析		○	○			
		新学術	ALSと脊髄小脳変性症に共通した発症病態の解明				○		

河村正二	東京大学	基盤Ａ	霊長類の自然集団に注目した感覚関連遺伝子の多様性の探索と適応進化の検証	○	○				
		特定	色覚オプシンの種内多様性と環境適応	○					
康 東天	九州大学	基盤Ａ	癌、糖尿病、老化の病態解析と診断に向けた先端的ミトコンドリア機能検査法の開発	○※					
菊池 潔	東京大学	基盤Ｂ	トラフグ性決定遺伝子の遺伝学的同定とその応用				○		
岸本健雄	お茶の水女子大学	特定	卵細胞における細胞周期の開始機構	○					
木曽彩子	情報システム研究機構	新学術	エピゲノム構造異常によって引き起こされるマウス亜種間の生殖隔離の解析			○	○		
		新学術	シス調節配列多型に依存するマウス亜種間雑種のトランスクリプトーム解析					○	
北野 潤	国立遺伝学研究所	若手Ｂ	トゲウオ科魚類における種分化の遺伝機構	○					
		基盤Ａ	トゲウオ淡水進出の鍵形質の遺伝基盤						○
木村信忠	産業技術総合研究所	挑戦	海洋無脊椎動物共生微生物系のケミカルバイオロジー			○※			
木村亮介	琉球大学	若手Ａ	顔面形態における三次元デジタル解析およびゲノムワイド関連解析	○					
清澤秀孔	高知大学	新学術	Ｕｂｅ３ａ遺伝子座における超長鎖非コードアンチセンスＲＮＡの構造・機能解析			○	○		
		基盤Ｂ	全ての転写産物を網羅したゲノム刷り込み領域の多元的解析					○	
吉良潤一	九州大学	基盤Ｂ	遺伝子間相互作用と膜蛋白ミクロアレイ解析に基づいた多発性硬化症の分子標的療法の開発			○			
工藤 洋	京都大学	最先端	遺伝子発現の季節解析にもとづく植物気候応答の機能解明と予測技術開発				○		
國枝武和	東京大学	新学術	極限環境耐性動物クマムシが獲得した耐性メカニズムの解明	○					
久原 篤	甲南大学	若手Ａ	線虫の神経回路における相反性シナプス伝達の分子メカニズム			○			
		新学術	神経と多臓器間で制御される温度適応メモリーの解析						○
久保田宗一郎	東邦大学	基盤Ｃ	次世代シーケンシングによるヌタウナギの生殖細胞と体細胞の比較ゲノミクス					○	
久保田健夫	山梨大学	挑戦	レット症候群一卵性双生児のゲノム・エピゲノム比較解析に基づく発達障害遺伝子の同定	○					
		挑戦	精神発達分子同定のための次世代シーケンサーを用いた一卵性双生児ゲノム比較解析			○※			
倉橋浩樹	藤田保健衛生大学	基盤Ｂ	父親に特異的に由来する染色体構造異常発生メカニズム		○				
		基盤Ｂ	複製ストール依存性・非依存性染色体構造異常の発生機序			○※			
黒岩麻里	北海道大学	新学術	SRYをもたない哺乳類における新しい性決定遺伝子の同定					○	
黒澤健司	神奈川県立こども医療センター	基盤Ｃ	ヒトの発生異常としての多発奇形・精神遅滞の病因解析					○	○
黒柳秀人	東京医科歯科大学	新学術	転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセシングの共役機構の解明				○		
		基盤Ｂ	mRNA前駆体の組織特異的転写後プロセシングの制御機構の解明						○
桑田 晃	水産総合研究センター	基盤Ｂ	珪藻の進化・繁栄の謎を握る未知の藻類:パルマ藻の生物学					○	

桑野良三	新潟大学	新学術	パーソナルゲノムの高次構造に基づくアルツハイマー病発症病態の解析	○					
桑原知巳	香川大学	基盤Ｃ	腸内細菌による病原細菌の病原性発現抑制機構の解明と応用				○		
桑山秀一	筑波大学	挑戦	遺伝子解析によるソリトン波の形成・維持メカニズムの解明					○	
河内孝之	京都大学	挑戦	基部陸上植物苔類ゼニゴケを用いた順遺伝学研究手法の確立	○					
河野友宏	東京農業大学	基盤Ｓ	次世代シークエンサーを用いた生殖系列のエピゲノム修飾とトランスクリプトーム解析	○		○			
郷 康広	自然科学研究機構	若手Ｂ	ヒトとチンパンジーの比較トランスクリプトーム・メチローム研究	○					
國府 力	大阪大学	新学術	初期発生におけるクロマチン制御のリアルタイム解析	○	○				
		新学術	発生・分化における細胞核内３次元ゲノム構造の役割			○			
幸谷 愛	東海大学	新学術	ｍｉＲＮＡはＢ細胞運命決定において転写因子を超えられるか？					○	
後藤 順	国際医療福祉大学	基盤Ｃ	次世代シーケンサーを用いた封入体筋炎筋発現プロファイルによる炎症と変性の病態解明					○	
後藤 眞	新潟大学	基盤Ｃ	新規遺伝子変異によるIgA腎症病態モデル						○
後藤由季子	東京大学	新学術	胎生期大脳新皮質神経幹細胞による多様な細胞の産生機構の解析	○	○	○		○	
小林一三	東京大学	新学術	比較ゲノミクス・メチロミクス・トランスクリプトミクスでのエピゲノム駆動進化の実証					○	○
権藤洋一	理化学研究所	基盤Ａ	超高速ゲノム解読に基づくマウス生殖細胞誘発変異検出と微量変異原リスク評価法の確立					○	○
齊藤延人	東京大学	基盤Ｂ	脳卒中関連遺伝子に関する研究				○	○	○
佐伯和彦	奈良女子大学	基盤Ｃ	共生遺伝子群最小セットの同定を目指すミヤコグサ根粒菌共生アイランドの最小化		○				
坂山英俊	神戸大学	若手Ｂ	陸上植物の２倍体多細胞体制の起源をシャジクモ藻類の遺伝子から探る	○					
		基盤Ｃ	シャジクモ藻類の比較ゲノムと遺伝子機能解析から探る植物の多細胞体制進化						○
笹川洋平	理化学研究所	挑戦	多数の1細胞から定量性のある網羅的遺伝子発現情報を取り出すための基盤技術の開発				○		
佐々木えりか	実験動物中央研究所	基盤Ａ	標的遺伝子ノックダウンによる霊長類ヒト疾患モデルの作出	○					
佐々木洋	大阪大学	基盤Ａ	Hippoシグナル経路による細胞間コミュニケーションの分子基盤					○	
		新学術	線維芽細胞における細胞競合機構とその発生学的意義						○
佐藤文彦	京都大学	新学術	イソキノリンアルカロイド生合成マシナリーの構築				○		
佐藤康成	放射線影響研究所	基盤Ｃ	次世代シーケンサーを用いた放射線のラット未熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響評価				○		
佐藤 豊	名古屋大学	新学術	RNAを介した植物と昆虫の生物界をまたいだ遺伝子発現制御の理解					○	
佐藤陽一	徳島大学	基盤Ｃ	男性不妊症における新規原因遺伝子の同定に向けた２方向からのアプローチ					○	
澤進一郎	熊本大学	若手Ｓ	CLEペプチドをモデルとした植物モルフォゲンの進化と作用機構に関する研究	○	○				
		基盤Ｂ	茎頂及び根端分裂組織の活性制御分子機構の相同性と相違点			○			

澤辺智雄	北海道大学	基盤Ｂ	マリンビブリオを活用した海藻糖質のバイオエタノール変換技術プラットフォームの構築	○		○			
		挑戦	バイオマス燃料生産に適する最少遺伝子セットを持つマリンビブリオセルの創成				○		
椎名 隆	東海大学	基盤Ｂ	生物医学研究推進のためのカニクイザルＭＨＣ多型情報基盤の整備	○					
塩見邦博	信州大学	基盤Ｂ	カイコの胚休眠誘導における環境温度情報の保存・記憶の分子解析			○	○		
執行正義	山口大学	基盤Ｂ	ネギ属バイオリソースを用いたオミクス統合解析のタマネギ育種への応用					○	
信濃卓郎	農業・食品産業技術総合研究機構	基盤Ｂ	土壌微生物の均等度評価手法の開発		○	○			
柴田弘紀	九州大学	基盤Ｃ	ミトゲノム解析と核マーカータイピングによる日本産ハブ属3種の遺伝的集団構造の研究					○	
柴 博史	奈良先端科学技術大学院大学	特定	種内雑種を利用した対立遺伝子間の優劣に関わるＤＮＡメチル化機構の解析	○					
		最先端	植物におけるエピゲノムを介した優劣性発現制御機構の解明		○				
嶋崎晴雄	自治医科大学	基盤Ｃ	遺伝性痙性対麻痺の新規原因遺伝子同定とその機能解析			○			
嶋田 透	東京大学	新学術	カイコとその近縁種における寄主植物選択機構の進化	○	○		○		
		基盤Ａ	カイコにおける性決定カスケードと遺伝子量補正および組換え抑制機構のクロストーク						○
島本 整	広島大学	基盤Ｃ	レトロンとmsDNAによる病原性発現制御とゲノム進化における役割					○	
將口栄一	沖縄科学技術大学院大学	新学術	サンゴに共生する褐虫藻類の比較ゲノム学的研究		○				
白澤健太	かずさDNA研究所	若手Ｂ	ゲノムの多様性解析による表現型可塑性を有する野生植物集団の栽培化に関する研究				○		
城石俊彦	国立遺伝学研究所	基盤Ａ	クロマチンループ構造変換による組織特異的Ｓｈｈ発現制御システム			○			
		基盤Ａ	マウス表現型に寄与するアレル発現量バイアスの原因シス制御配列						○
眞貝洋一	理化学研究所	基盤Ｂ	ヒト内在性レトロウイルス発現制御機構の解明			○※			
新蔵礼子	長浜バイオ大学	基盤Ｂ	腸管IgA抗体による腸内細菌選別機構の解明						○
新屋みのり	国立遺伝学研究所	若手Ｂ	ゼブラフィッシュ近交系の樹立	○					
		新学術	ゼブラフィッシュ初期精原細胞異常変異体からの精原幹細胞増殖・分化因子の同定		○				
末次正幸	立教大学	新学術	枯草菌細胞内への細胞周期回路の人工合成			○			
菅井基行	広島大学	基盤Ｃ	アトピー性皮膚炎感染黄色ブドウ球菌の病原性基盤						○
菅 裕	県立広島大学	スタート支援	動物多細胞性進化メカニズムの分子生物学的解明						○
杉本真也	東京慈恵会医科大学	若手Ａ	バイオフィルムマトリクス成分の新機能の開拓						○
寿崎拓哉	基礎生物学研究所	新学術	根粒共生における宿主細胞と根粒菌の相互認識機構の解析				○		
鈴木真吾	理化学研究所	若手Ｂ	全自動実験進化システムによる多剤耐性菌の創出と進化プロセスの解析			○			
鈴木 勉	東京大学	基盤Ｓ	RNA修飾が支配する遺伝子発現調節機構の探究と高次生命現象				○※		
		基盤Ｓ	RNAエピジェネティックスと高次生命現象						○

須田 亙	慶應義塾大学	若手Ｂ	ヒト唾液細菌叢に内在し、腸内炎症に関わる細菌の同定とその機能の解明						○
諏訪裕一	中央大学	基盤Ａ	環境メタゲノミクスで富栄養淡水湖沼での新しい窒素循環像を探る				○		
瀬川高弘	国立極地研究所	若手Ｂ	南極氷床底面から検出された72万年以上前の微生物探査			○	○		
関本弘之	日本女子大学	基盤Ｃ	ヒメミカヅキモの性フェロモン受容体同定と特性解析	○					
		基盤Ｂ	ヒメミカヅキモの性染色体領域解析による生殖様式進化の解明			○			○
瀬原淳子	京都大学	基盤Ｃ	ゼブラフィッシュの骨格筋に対する微重力環境の影響				○	○	
		基盤Ｃ	Pathway解析による微重力環境下筋萎縮メカニズムの解明と原因療法の開発						○
曽田貞滋	京都大学	新学術	マイマイカブリのゲノム塩基配列と適応形態遺伝子				○		
平良眞規	東京大学	基盤Ｂ	転写制御ネットワークから見る原口形成と原腸胚オーガナイザーの進化のメカニズム	○	○	○			
高田豊行	国立遺伝学研究所	基盤Ｃ	RNA編集様式の亜種間差を利用したエネルギー代謝関連・量的形質遺伝子の探索				○		
		新学術	モデルマウスを用いた新規摂食・脂肪蓄積調節遺伝子の機能解明					○	
高橋秀尚	北海道大学	若手Ａ	新規転写伸長制御因子ＭＥＤ２６の標的遺伝子解明と急性白血病への関与についての解析				○		
		新学術	Med26によってリクルートされる新規転写伸長複合体LECの機能解明					○	
		新学術	Pol2の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明						○
高橋秀幸	東北大学	新学術	陸上植物の水獲得に機能する根の水応答機構の解明					○	
高橋文雄	立命館大学	基盤Ｃ	褐藻の青色光応答反応の解析					○	
高畑信也	北海道大学	新学術	HP1とFACTの共役によるグローバルな転写制御機構						○
高濵洋介	徳島大学	特定	胸腺における自己形成と自己認識	○	○				
滝沢直己	微生物化学研究所	若手Ｂ	インフルエンザウイルスにおける分節化RNAゲノムパッケージング機構の解析					○	
		若手Ｂ	インフルエンザウイルス分節化ゲノムの粒子内立体配置決定						○
竹井祥郎	東京大学	基盤Ａ	魚類の海水適応を支配する脳と腸の内分泌相関			○	○		
竹内 理	京都大学	若手Ａ	ＲＮＡ分解酵素Ｚｃ３ｈ１２ａによる免疫制御機構の解析			○			
竹内祐子	京都大学	挑戦	なぜ線虫が巨木を枯らすのか―遺伝学的手法を用いたマツ材線虫病病原メカニズムの解明				○		
竹田潤二	大阪大学	新学術	ブルーム遺伝子欠損とDNA二重鎖切断の組み合わせによるゲノム不安定性の解析					○	
武田直也	基礎生物学研究所	若手Ｂ	共生体感染により変動する共生遺伝子制御ネットワークの解明				○		
武田洋幸	東京大学	新学術	組織が創るマクロでロバストなコンパートメントの成立・維持のロジック	○	○				
		基盤Ｂ	メダカゲノムを用いた発生重要遺伝子のエピジェネティック発現制御機構				○		
龍野一郎	東邦大学	基盤Ｂ	分子間架橋を応用したNFATc1複合体解析による骨エピジェネティクスの基盤的研究				○		
田中知明	千葉大学	基盤Ｂ	p53転写因子複合体によるクロマチン機能調節とiPSリプログラム制御機構の解明	○		○			
		挑戦	転写因子p53による新たな代謝調節機能と代謝環境応答のエピジェネティクス制御	○					

田中知明	千葉大学	新学術	転写因子ｐ５３のタンパクコードと細胞内代謝エネルギー制御機構				○		
田中章景	横浜市立大学	新学術	パーソナルゲノム解析に基づくALSの疾患関連遺伝子探索と病態解明	○					
谷 明生	岡山大学	若手Ａ	植物に共生するメタノール資化性細菌の多様性と共生機構の解明				○		
多羽田哲也	東京大学	新学術	ショウジョウバエの記憶形成回路の構造および機能発現の分子基盤	○					
田村智彦	横浜市立大学	基盤Ｂ	単核貪食細胞群の分化機構に関する研究				○	○	
		基盤Ｂ	単核貪食細胞系の分化における遺伝子発現制御機構の包括的解明						○
千葉和義	お茶の水女子大学	基盤Ｃ	母性mRNAの安定的貯蔵機構					○	○
千葉親文	筑波大学	基盤Ａ	アカハライモリのモデル動物化を加速する分野横断研究：技術・情報基盤構築と実践適用				○	○	○
塚原達也	東京大学	若手Ｂ	発生過程で細胞運命を規定する転写因子の生涯にわたる発現制御機構			○			
築山拓司	京都大学	基盤Ｂ	活性型転移因子がイネのエピゲノムにおよぼす効果の解明と育種への応用				○		
辻 省次	東京大学	新学術	パーソナルゲノム情報にもとづく脳疾患の発症機構の解明	○					
津田雅孝	東北大学	基盤Ｂ	環境汚染物質添加土壌での微生物集団応答様式の研究	○					
筒井 研	岡山大学	基盤Ｂ	遠隔ゲノム部位間の相互作用におけるＩＩ型ＤＮＡトポイソメラーゼの役割		○	○			
常田 聡	早稲田大学	挑戦	難治性感染症の原因となる休止細菌の分子機構解明						○
程久美子	東京大学	新学術	化学修飾導入siRNAによる１遺伝子特異的ケムバイオケム型RNA干渉法の開発					○	○
豊嶋崇徳	北海道大学	基盤Ｂ	GVHDによるホメオスタシス破綻のメカニズム					○	○
藤堂 剛	大阪大学	基盤Ｓ	メダカ逆遺伝学的手法を基盤とした個体・組織レベルでの損傷応答解析系の確立	○					
徳元俊伸	静岡大学	基盤Ｃ	ステロイド膜受容体の機能解析を中心とした卵成熟・排卵誘導機構の解明					○	○
戸田達史	神戸大学	新学術	パーキンソン病および認知機能関連分子とパーソナルゲノム解析	○	○				
殿城亜矢子	千葉大学	新学術	加齢脳におけるメゾ回路の機能障害					○	
		新学術	老化に伴う代謝恒常性の破綻による記憶低下機構の解明						○
豊福雅典	筑波大学	若手Ａ	ベシクルを介した微生物間ネットワークの解明とそのデザイン方法の創出						○
中川拓郎	大阪大学	新学術	セントロメア再編の分子メカニズム					○	
永田裕二	東北大学	基盤Ｂ	人為起源物質分解能をモデルとした環境中での細菌の機能進化を司る分子基盤の解明			○			
中永和枝	国立感染症研究所	基盤Ｃ	ブルーリ潰瘍対策に有用な早期診断法及び治療法開発に関する研究		○				
長宗秀明	徳島大学	基盤Ｃ	高病原性ストレプトコッカス・ミチスは存在する：その病原性と疫学の研究			○	○		
中山浩次	長崎大学	基盤Ａ	歯周病細菌の病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌機構の全容解明	○					
中山二郎	九州大学	基盤Ｂ	アジア人種の食と腸内フローラと健康に関する調査研究				○		○
成田一衛	新潟大学	基盤Ｃ	全ゲノム解析による家族性IgA腎症の原因遺伝子の探索			○	○		
		基盤Ｂ	ホロゲノム解析によるIgA腎症の病態解析と治療ターゲット探索					○	
新美輝幸	基礎生物学研究所	新学術	テントウムシに関連した擬態斑紋をもたらすゲノム・遺伝子相関の解明					○	○
		新学術	甲虫の角（ツノ）形成遺伝子ネットワークの進化メカニズムの解明					○	

新美輝幸	基礎生物学研究所	基盤Ｂ	昆虫翅の起源と多様化メカニズムの解明とその応用						○
二階堂雅人	東京工業大学	新学術	新規形質獲得のゲノム基盤とその進化的起源				○	○	
		基盤Ｃ	広範な脊椎動物に共通の新規フェロモン受容体の解析						○
西順一郎	鹿児島大学	基盤Ｃ	下痢症患児由来の大腸菌における病原遺伝子・薬剤耐性遺伝子のパンゲノム解析				○		
西田洋巳	富山県立大学	基盤Ｃ	菌類のエキソン、イントロン構造の進化機構の解明					○	
西中村隆一	熊本大学	挑戦	胎児型腎臓幹細胞の成体腎での再活性化	○					
西村欣也	北海道大学	基盤Ａ	表現型可塑性：生態学と分子発生学の統合的研究						○
西山智明	金沢大学	基盤Ｂ	シャジクモ概要ゲノムの解読と遺伝学的地図の同時構築による陸上植物進化の解明			○	○		
野崎久義	東京大学	基盤Ａ	性染色体領域の解析に基づく「雌雄性の誕生」に関する進化生物学的研究		○	○		○	
野澤昌文	国立遺伝学研究所	挑戦	ショウジョウバエNeo性染色体を用いたY染色体の退化過程の解明						○
長谷川政美	統計数理研究所	基盤Ｃ	分岐年代推定に関わる諸問題					○	
長谷部太	長崎大学	挑戦	ヒトと媒介蚊体内におけるデングウイルス準種の網羅的遺伝子解析				○		
長谷部光泰	基礎生物学研究所	新学術	少数遺伝子変化による新奇複合適応形質進化の分子機構解明	○	○				
花田耕介	九州工業大学	新学術	高二酸化炭素条件下で変動する遺伝子群とその進化起源			○			
濵﨑恒二	東京大学	新学術	分子生物地理からの新海洋区系				○		
浜本 洋	東京大学	若手Ａ	治療効果を指標とした新規抗生物質探索法の確立			○	○	○	
林 純一	筑波大学	基盤Ａ	ミトコンドリア移植による哺乳類ミトコンドリアゲノムのパラダイム変換					○	
林 深	東京医科歯科大学	若手Ｂ	共通のゲノム異常に起因する新規症候群の定義と病態解析		○				
		基盤Ｂ	小脳・脳幹部低形成を伴う発達遅滞を呈する疾患群の包括的病態解明				○		
林 哲也	宮崎大学	基盤Ｂ	新世代 DNA 塩基配列決定技術を用いた大腸菌 pan-genome の解明	○					
		基盤Ｂ	polymicrobial disease のメタゲノム解析とその臨床応用		○				
原 一雄	東京大学	基盤Ｃ	相互作用解析と発現解析による２型糖尿病遺伝素因の解明			○			
菱田 卓	大阪大学	基盤Ｂ	慢性低紫外線環境ストレスによるゲノム損傷応答と耐性機構に関する研究	○					
尾藤晴彦	東京大学	若手Ｓ	樹状突起形態・機能の神経活動依存的制御の分子機構			○			
平尾 章	筑波大学	若手Ｂ	標高傾度に沿って分布するシロイヌナズナ属野生種の温暖化適応形質の進化			○※			
廣瀬伸一	福岡大学	基盤Ａ	新規遺伝子改変動物と患者iPSを利用した分子病態に基づくてんかんの革新的治療開発			○ 2件	○	○※	
廣田 泰	東京大学	若手Ａ	プロゲステロン抵抗性に着目した、早産の治療標的分子の検索			○	○		
		新学術	子宮-胚間の協調的なエピゲノム調節と胚の活性化					○	
深田吉孝	東京大学	基盤Ｓ	脳時計ニューロンにおける光シグナリングと概日リズム制御の分子解析	○	○				
		基盤Ｓ	生存戦略としての体内時計システムの分子解剖			○			
福井 学	北海道大学	基盤Ｂ	環境オミクス手法による寒冷圏水界の微生物学的硫黄循環の解明		○	○	○		

福澤秀哉	京都大学	基盤Ｂ	デジタル遺伝子発現解析による微細藻類のCO２濃縮・水素発生関連遺伝子の同定と利用	○	○				
福重真一	東北大学	基盤Ｃ	がんにおけるＤＮＡ高度メチル化を指標としたバイオマーカーの探索		○				
藤井穂高	大阪大学	新学術	挿入的クロマチン免疫沈降法によるエピジェネティック制御機構の解明			○			
		新学術	挿入的クロマチン免疫沈降法（iChIP）による細胞分化制御因子の転写機構の解明				○		
		新学術	遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法による細胞分化制御因子の転写機構の解明						○
藤田敏次	大阪大学	基盤Ｃ	in vitro enChIP法の技術基盤の確立およびゲノム機能解析への応用						○
藤田知道	北海道大学	特定	メリステム制御の基盤を支える植物幹細胞の不等分裂の分子機構の解明	○		○			
藤田雅紀	北海道大学	若手Ａ	メタゲノム法を用いた環境機能分子およびその生合成遺伝子の探索と解析						○
藤本 龍	神戸大学	新学術	アブラナ科植物の雑種強勢の分子機構の解明を目指して			○	○		
		若手Ａ	アブラナ科植物の雑種強勢関連領域の同定						○
藤原晴彦	東京大学	新学術	昆虫の擬態紋様形成の分子機構と進化プロセスの解明	○	○	○			
布施直之	京都大学	基盤Ｃ	ゲノム編集によるショウジョウバエの環境適応の解析					○	
二又裕之	静岡大学	挑戦	高浄化効率を誘導する異種微生物間ネットワーク構造の解明	○					
古澤 力	理化学研究所	若手Ａ	ラボオートメーションを活用した大腸菌人工進化実験による適応進化ダイナミクスの解析		○				
古田芳一	マサチューセッツ工科大学	新学術	配列特異的ＤＮＡメチル化酵素によるエピゲノム工学：合成生物学・ゲノム工学の拡張へ			○	○		
星野 敦	基礎生物学研究所	若手Ｂ	高等植物のノンコーディングRNAの代謝と遺伝子発現の制御	○	○				
		基盤Ｃ	高等植物の多様なRNAサイレンシング経路の制御機構			○			
細 将貴	京都大学	若手Ａ	「魔法形質」による種分化の分子進化過程						○
細道一善	金沢大学	若手Ｂ	創薬ターゲットとしてのトリインフルエンザ抵抗性分子の同定	○					
		若手Ｂ	家族性IgA腎症で例示されるエクソーム解析による原因遺伝子同定プロトコールの確立			○	○ 2件		
		基盤Ｃ	同種造血幹細胞移植成績向上を目指したKIRハプロタイプ解析手法の確立					○	○
堀田紀久子	大阪大学	基盤Ｃ	異所性脂肪蓄積の遺伝素因と環境因子の検索と前向き追跡調査での検証					○	
堀江恭二	奈良県立医科大学	挑戦	バーコード導入型ベクターによる変異動物細胞解析システムの構築		○				
		挑戦	マウスES細胞の維持に必須な遺伝子群の網羅的探索			○			
堀川幸男	岐阜大学	基盤Ｂ	ゲノムコピー数低下領域に特化した日本人若年糖尿病の発症機構の解明				○		
堀家慎一	金沢大学	若手Ｂ	染色体の空間的配置と組織特異的遺伝子発現制御機構の解明		○				
本郷裕一	東京工業大学	最先端	シングルセル・ゲノミクスの確立による環境微生物の遺伝子資源化と生態系解明		○				
本田賢也	慶應義塾大学	最先端	腸内環境と免疫システム構築の統合的理解とその応用		○				
前川清人	富山大学	新学術	ソシオゲノムの進化：カースト分化を規定する遺伝子群の解明				○	○※	
前田和彦	大阪大学	基盤Ｃ	B細胞最終分化系譜における非コードRNA発現制御機構の解析					○	

前田太郎	基礎生物学研究所	新学術	ウミウシの盗葉緑体現象に注目した遺伝子水平伝播による複合適応形質の伝播機構解明				○		
槇宏太郎	昭和大学	挑戦	永久歯先天性欠如の空間的制御機構を解明するための変異タンパク質立体構造解析				○		
蒔田直昌	長崎大学	新学術	心臓イオンチャネルの遺伝子異常と機能破綻の分子基盤		○				
牧野能士	東北大学	基盤Ｂ	外来種の侵略性に関る遺伝的基盤の解明					○	○
		挑戦	全ゲノム重複後に消失する遺伝子パターンの実験的検証					○	○
増田誠司	京都大学	挑戦	CHERPが制御するmRNA選択的スプライシングの新たな分子機構の解明						○
松浦秀幸	大阪大学	若手Ｂ	転写開始点と翻訳制御の網羅的解析を通じた高温条件下における翻訳制御機構の解明				○		
松岡邦枝	東京都医学総合研究所	基盤Ｃ	聴覚機能解明および聴覚細胞再生モデルとしての新規誘導型障害マウスの開発					○	
松岡雅雄	京都大学	基盤Ｂ	HTLV-1 bZIP factorによる炎症性疾患発症機構の解析				○	○	
松尾隆嗣	東京大学	新学術	性的二型と闘争・求愛行動の進化		○				
松尾洋孝	防衛医科大学校	若手Ａ	大規模分子遺伝疫学的解析による痛風発症リスクの個人差評価法及び早期予防法の開発		○	○			
		基盤Ｂ	分子遺伝疫学的解析による痛風の病態解明とゲノムテーラーメイド医療への応用				○	○	
松尾亮太	福岡女子大学	基盤Ｃ	ニューロンにおけるDNA増幅現象の研究					○	
松下智直	九州大学	特定	花成を制御するフィトクロムＢのシグナル伝達機構の解明			○			
松島綾美	九州大学	挑戦	ゲノムに潜む鎮痛ペプチド・エンドモルフィンは酸化ストレスのRNA編集で誕生する					○	○
		基盤Ｓ	新世代ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性					○	
		若手Ａ	ビスフェノール低用量効果はタンデムに並ぶ核内受容体が誘起する						○
松田洋一	名古屋大学	新学術	異種ゲノムの不適合性が引き起す雑種の不妊・発育不全現象の遺伝的制御機構				○		
丸山治彦	宮崎大学	特定	腸管寄生線虫における肺移行の意義	○					
		基盤Ｃ	発現遺伝子解析によるベネズエラ糞線虫の感染機構の解明		○				
		挑戦	出芽酵母を用いた寄生線虫由来の長寿遺伝子の単離				○		
		基盤Ｃ	芽殖孤虫のゲノム解読による条虫類幼虫における無性増殖機構の解明						○
丸山史人	京都大学	若手Ａ	細菌感染および免疫システムオートファジーに関わる遺伝子発現ネットワークの解明				○	○	○
丸山玲緒	札幌医科大学	若手Ａ	大腸癌の発癌や進展に深く関与しうる長鎖ncRNAの量的・質的な異常の探索			○	○		
三浦史仁	東京大学	若手Ｂ	出芽酵母の転写単位確定とノンコーディングＲＮＡ発現の全貌把握	○					
三木哲郎	愛媛大学	基盤Ｂ	長期縦断大規模ゲノム疫学研究による生活習慣病発症の遺伝因子に関するエビデンス 構築	○					
水野洋介	埼玉医科大学	基盤Ｃ	トランスクリプトーム情報を基盤にした骨芽細胞と脂肪細胞の分化機構の統合的解析					○	
三谷啓志	東京大学	基盤Ｓ	個体内における電離放射線誘発突然変異成立過程の解明	○					
光永滋樹	東海大学	基盤Ｃ	リシーケンシングによる関節リウマチ感受性稀少変異の探索	○		○			

三戸太郎	徳島大学	若手Ａ	不完全変態昆虫（コオロギ）の胚形成における位置情報の形成と細胞移動のメカニズム			○	○		
蓑田 歩	筑波大学	挑戦	嫌気条件下での酸素発生型光合成のパラドックスを解く						○
三野享史	京都大学	若手Ｂ	Regnase-1の作用機構から探る自然免疫応答における転写後調節の解明				○	○	
三村維真理	東京大学	若手Ｂ	腎線維化に寄与する非翻訳RNAの同定およびその転写制御機構の解明					○	
三室仁美	東京大学	基盤Ｂ	ヘリコバクターピロリの胃粘膜感染機構と炎症惹起メカニズムの研究	○					
		挑戦	宿主応答撹乱を誘導するヘリコバクターピロリ由来ｎｃＲＮＡの同定		○				
		基盤Ｂ	ヘリコバクターピロリ胃粘膜長期感染に必要な宿主・菌体因子の時空間的動態解析			○			
宮崎健太郎	産業技術総合研究所	基盤Ｂ	大腸菌リボソームの可塑性と表現型進化の機構解明						○
宮崎 亮	産業技術総合研究所	若手Ａ	クローン細胞集団における一細胞レベルの不均一性の包括的理解とその応用技術の創成						○
向 正則	甲南大学	新学術	ショウジョウバエPGCの形成を制御する遺伝子ネットワークの解明					○	
宗景ゆり	奈良先端科学技術大学院大学	最先端	Ｃ4型作物の分子育種へ向けたＣ4型光合成誘導システムの解明			○			
村上洋太	北海道大学	基盤Ａ	動的クロマチン高次構造であるヘテロクロマチンの構造・機能ネットワークの解明		○				
		新学術	非コードRNAに制御されるヘテロクロマチン形成場の解析			○			
盛武 浩	宮崎大学	基盤Ｃ	家族性急性リンパ性白血病の原因遺伝子の探索				○	○	
守屋繁春	理化学研究所	新学術	先端ゲノム・トランスクリプトーム解析技術を用いた環境微生物の共生原理の解明			○			
守屋央朗	岡山大学	挑戦	酵母におけるプロセス負荷の原理の解明				○		
八木 健	大阪大学	挑戦	内在変異蓄積法による新たな量的デザインマウスの開発		○	○			
八木田和弘	京都府立医科大学	基盤Ｂ	発生過程における概日リズム成立原理の解明						○
谷口俊介	筑波大学	基盤Ｃ	三次元の体を構築するための体軸間相互作用の分子メカニズム					○	
安田仁奈	宮崎大学	若手Ｂ	大量発生予察に向けたオニヒトデ集団の広域受精遺伝子解析					○	
安友康二	徳島大学	若手Ｓ	免疫系の恒常性維持および破綻機構の解明に基づく自己免疫疾患の治療法開発	○	○				
山岡吉生	大分大学	基盤Ｂ	東南アジアにおけるピロリ菌分子疫学研究：新規病原因子の探求と人類移動の解明			○	○	○	
山口徹太郎	昭和大学	基盤Ｂ	先天性疾患と集団間の遺伝的変異から顎口腔領域に関連する形質の遺伝因子を解明する	○					
山田拓司	東京工業大学	若手Ａ	ヒト腸内細菌叢代謝機構の解明				○	○	○
山本友子	千葉大学	基盤Ａ	エフェクターと宿主標的分子間相互作用を基軸としたサルモネラ感染分子機構の解明					○	
山森哲雄	理化学研究所	基盤Ａ	霊長類大脳皮質領野特異的発現遺伝子の機能解析		○	○			
善岡克次	金沢大学	基盤Ｃ	軸索輸送における足場タンパク質ＪＳＡＰの役割とその分子メカニズム		○				

吉澤 晋	東京大学	若手Ａ	プロテオロドプシンを通して海洋生態系に流れ込む太陽光エネルギーの定量化			○	○		
吉田聡子	理化学研究所	新学術	ハマウツボ科寄生植物の寄生形質獲得と適応進化				○		
		若手Ａ	寄生生高等植物における寄生の分子メカニズム解明						○
和多和宏	北海道大学	新学術	ソングバードを用いた時空間制御を与える遺伝子発現系の開発と行動実験への応用			○			
		挑戦	Allelic imbalanceによる行動表現型のゲノム拘束性と可塑性の検証				○		
和田崇之	長崎大学	若手Ａ	結核菌臨床分離株における宿主定着・適応因子の究明と遺伝子型別技術の補完				○	○	
渡部 裕	新潟大学	基盤Ｃ	難治性不整脈症候群の不整脈基盤に関与する新たな遺伝的背景の解明と個別化治療の確立				○		
和田洋一郎	東京大学	基盤Ａ	炎症性刺激によるクロマチン構造の動的制御メカニズムの解析					○	

※：採択後の検討・協議の結果、研究支援を実施しなかった課題

特推　：特別推進研究
特定　：特定領域研究
新学術：新学術領域研究
基盤Ｓ：基盤研究（Ｓ）
基盤Ａ：基盤研究（Ａ）
基盤Ｂ：基盤研究（Ｂ）
基盤Ｃ：基盤研究（Ｃ）
挑戦　：挑戦的萌芽研究
若手Ｓ：若手研究（Ｓ）
若手Ａ：若手研究（Ａ）
若手Ｂ：若手研究（Ｂ）
スタート支援：研究活動スタート支援
最先端：最先端・次世代研究開発支援プログラム

２．交付決定額（配分額）

交付決定額（配分額）　（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　　計
平成22年度	1,080,000,000	324,000,000	1,404,000,000
平成23年度	1,080,000,000	324,000,000	1,404,000,000
平成24年度	1,156,000,000	346,800,000	1,502,800,000
平成25年度	1,155,000,000	346,500,000	1,501,500,000
平成26年度	1,080,000,000	324,000,000	1,404,000,000
平成27年度	1,080,000,000	324,000,000	1,404,000,000
総　計	6,631,000,000	1,989,300,000	8,620,300,000

３．研究発表

（１）雑誌論文

（a）支援による成果論文（公募支援課題成果報告書の略記リストの詳細）

（著者の中で、支援依頼者は二重下線で、支援担当者は点線で示した）

秋光信佳（東京大学）

1. Mizutani R., Imamachi N., Suzuki Y., Yoshida H., Tochigi N., Oonishi T., Suzuki Y., **Akimitsu N.** (2015) Oncofetal protein IGF2BP3 facilitates the activity of proto-oncogene protein eIF4E through the destabilization of EIF4E-BP2 mRNA. ***Oncogene***, in press　査読有り
2. Maekawa S., Imamachi N., Irie T., Tani H., Matsumoto K., Mizutani R., Imamura K., Kakeda M., Yada T., Sugano S., Suzuki Y. and **Akimitsu N**. (2015) Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance. ***BMC Genomics***, 16, 154.　査読有り
3. Tani H., Imamachi N., Mizutani R., Imamura K., Kwon Y., Miyazaki S., Maekawa S., Suzuki Y. and **Akimitsu N**. (2015) Genome-wide analysis of long noncoding RNA turnover, ***Methods in Mol. Biol.***, 1262, 305-320　査読有り
4. Imamura K., Imamachi N., Akizuki G., Kumakura M., Kawaguchi A., Nagata K., Kato A., Kawaguchi Y., Sato H., Yoneda M., Kai C., Yada T., Suzuki Y., Yamada T., Ozawa T., Kaneki K., Inoue T., Kobayashi M., Kodama T., Wada Y., Sekimizu K. and **Akimitsu N**. (2014). Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation between nuclear body paraspeckle and promoter mediates IL8 expression in response to immune stimuli. ***Mol. Cell***, 53, 393-406　査読有り
5. Imamachi N., Tani H., Mizutani R., Imamura K., Irie T., Suzuki Y. and **Akimitsu N.,** (2014) BRIC-seq: a genome-wide approach for determining RNA stability in mammalian cells, ***Methods***, 67, 55-63.　査読有り
6. Tani T., Torimura M. and **Akimitsu N.**, (2013) The RNA degradation pathway regulates the function of GAS5 a non-coding RNA in mammalian cells, ***PLoS ONE***., 8, e55684.　査読有り
7. Tani H., Imamachi N., Salam KA., Mizutani R., Ijiri K., Irie T., Yada T., Suzuki Y., and **Akimitsu N.**, (2013) Identification of hundreds of novel UPF1 target transcripts by direct determining whole transcriptome stability in mammalian cells, ***RNA Biology***, 9, 1370-1379. 査読有り
8. 秋光信佳、長鎖ノンコーディング RNA：遺伝子発現制御メカニズム別・機能リファレンス　監修　、細胞工学 2015 年 1 月号（2015）　査読無し
9. 今町直登、秋光信佳　長鎖ノンコーディング RNA に隠された RNA 言語解読への挑戦：バイオインフォマティクスからのアプローチ、細胞工学 2015 年 1 月号 (2015)　査読無し
10. 水谷玲奈、秋光信佳　発生およびがん・神経変性疾患と関連する長鎖ノンコーディング RNA リスト、細胞工学 2015 年 1 月号 (2015)　査読無し
11. 秋光信佳、桂真理、「放射性セシウムによるヒト影響：細胞レベル影響のトランスクリプトーム解析」、環境ホルモン学会ニュースレター、１７号 (2015)　査読無し
12. 今村亮俊、秋光信佳、ライフサイエンス新着レビュー、「ウイルスの感染における長鎖非コード RNA による転写抑制因子を介したサイトカインの産生の制御」、2014 年 2 月 18 日　査読無し
13. 今村亮俊，秋光信佳、核内長鎖非コード RNA NEAT1 による自然免疫応答制御の解明、細胞工学、2014 年 5 月号　査読無し
14. 秋光信佳、RNA ダイナミクスから迫る生命現象、薬事日報、3 月特集号 (2013)　査読

無し
15. 秋光信佳、ゲノムワイドな RNA 分解測定、細胞工学別冊「次世代シークエンサー　目的別アドバンストメソッド」、100-108. (2012)　査読無し

阿部知子（理化学研究所）

1. Tomonari Hirano, Yusuke Kazama, Kotaro Ishii, Sumie Ohbu, Yuki Shirakawa, Tomoko Abe, “Comprehensive identification of mutations induced by heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*” The Plant Journal, 82(1), 2015, p93-104, 査読有り
2. 阿部知子, "重イオンビームを用いた生物研究の新領域開拓−Mutagenesis から Mutagenomics へ−", Isotope News **733**, 2-6 (2015) 査読無し
3. 阿部知子、林依子、"重イオンビームを用いた品種改良技術の開発とサクラ新品種の育成"、FB News(放射線安全管理総合情報誌) 469, 2-6　(2015) 査読無し

飯田哲史（国立遺伝学研究所）

1. 飯田 哲史、“出芽酵母の鋳型 DNA 鎖修復機構”「二十一世紀の遺伝学」日本遺伝学会. (2014) 10 pp9

生田哲朗

1. Freeman R, Ikuta T (co-first author), Wu M, Koyanagi R, Kawashima T, Tagawa K, Humphreys T, Fang GC, Fujiyama A, Saiga H, Lowe C, Worley K, Jenkins J, Schmutz J, Kirschner M, Rokhsar D, Satoh N, Gerhart J　Identical genomic organization of two hemichordate hox clusters.　Curr Biol 22 (2012) 2053-2058 査読有
2. Ikuta T, Chen YC, Annunziata R, Ting HC, Tung CH, Koyanagi R, Tagawa K, Humphreys T, Fujiyama A, Saiga H, Satoh N, Yu JK, Arnone MI, Su YH　Identification of an intact ParaHox cluster with temporal colinearity but altered spatial colinearity in the hemichordate Ptychodera flava.　BMC Evol Biol 13 (2013) 129 査読有

石井敦士（福岡大学）

1. Sasaki M*., Ishii A*., Saito Y., Hirose S. Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism. Mov Disord. 2014;29(1):153-154. *equal contribution
2. Heinzen E. L., Arzimanoglou A., Brashear A., Clapcote S. J., Gurrieri F., Goldstein D. B., Johannesson S. H., Mikati M. A., Neville B., Nicole S., Ozelius L. J., Poulsen H., Schyns T., Sweadner K. J., van den Maagdenberg A., Vilsen B., for the A. T. P. A. Working Group. Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. Lancet Neurol. 2014;13(5):503-514.
3. Sasaki M*., Ishii A*., Saito Y., Morisada N., Iijima K., Takada S., Araki A., Tanabe Y., Arai H., Yamashita S., Ohashi T., Oda Y., Ichiseki H., Hirabayashi S., Yasuhara A., Kawawaki H., Kimura S., Shimono M., Narumiya S., Suzuki M., Yoshida T., Oyazato Y., Tsuneishi S., Ozasa S., Yokochi K., Dejima S., Akiyama T., Kishi N., Kira R., Ikeda T., Oguni H., Zhang B., Tsuji S., Hirose S. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. Neurology. 2014;82(6):482-490. * equal contribution
4. Ishii A., Saito Y., Mitsui J., Ishiura H., Yoshimura J., Arai H., Yamashita S., Kimura S., Oguni H., Morishita S., Tsuji S., Sasaki M., Hirose S. Identification of *ATP1A3* mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. PLOS ONE. 2013;8(2):e56120.

石川欽也（東京医科歯科大学）

1. Kokoro Ozaki , Hiroshi Doi, Jun Mitsui, Nozomu Sato, Yoichiro Iikuni, Takamasa Majima, Kiyomi Yamane, Takashi Irioka, Hiroyuki Ishiura, Koichiro Doi, Shinichi Morishita, Miwa Higashi, Teruhiko Sekiguchi, Kazuo Koyama, Naohisa Ueda, Yoshiharu Miura, Satoko Miyatake, Naomichi Matsumoto, Takanori Yokota, Fumiaki Tanaka, Shoji Tsuji, Hidehiro Mizusawa, Kinya Ishikawa. A Novel Mutation in ELOVL4 Leading to Spinocerebellar Ataxia (SCA) With the Hot Cross Bun Sign but Lacking Erythrokeratodermia: A Broadened Spectrum of SCA34. JAMA Neurol. 72(7): 797-805, (2015). 査読あり
2. Masato Obayashi, Giovanni Stevanin, Matthis Synofzik, Marie-Lorraine Monin, Charles Duyckaerts, Nozomu Sato, Nathalie Streichenberger, Alain Vighetto, Virginie Desestret, Christelle Tesson, H-Erich Wichmann, Thomas Illig, Johanna Huttenlocher, Yasushi Kita, Yuishin Izumi, Hidehiro Mizusawa, Ludger Schöls, Thomas Klopstock, Alexis Brice, Kinya Ishikawa, Alexandra Dürr Spinocerebellar ataxia type 36 exists in diverse populations and can be caused by a short hexanucleotide GGCCTG repeat expansion. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 86(9): 986-95, (2014). 査読あり

稲垣祐司（筑波大学）

1. Kamikawa R, Kolisko M, Nishimura Y, Yabuki A, Brown MW, Kim E, Tanabe AS, Kume K, Ishida K, Inagaki Y. Gene Content evolution in discobid mitochondria deduced from phylogenic position and complete mitochondrial genome of *Tsukubamonas globosa*. ***Genome Biology and Evolution*** 6(2):306-315 (2014)

稲田利文（東北大学）

1. Tsuboi, T., Yamazaki, R., Nobuta, R., Ikecuhi, K., Makino, S., Ohtaki, Y., Suzuki, Y., Yoshihisa, T., Trotta, C. and Inada, T. The tRNA Splicing Endonuclease Complex Cleaves the Mitochondria-localized *CBP1* mRNA. *J Biol. Chem.* 290, 16021-16030. (2015)

井ノ上逸朗（国立遺伝学研究所）

1. Nakaoka H, Tajima A, Yoneyama T, Hosomichi K, Kasuya H, Mizutani T, Inoue I. Gene expression profiling reveals distinct molecular signatures associated with the rupture of intracranial aneurysm. *Stroke*. 2014; 45: 2239-2245.
2. 中岡博史、井ノ上逸朗：脳動脈瘤と遺伝子．Clinical Neuroscience 月刊 臨床神経科学 2011; *29*: 1134-1137.
3. Hosomichi K, Mitsunaga S, Nagasaki H, Inoue I. A Bead-based Normalization for Uniform Sequencing depth (BeNUS) protocol for multi-samples sequencing exemplified by HLA-B. BMC Gnomics 15, 465 (2014)
4. Jinam TA, Nakaoka H, Hosomichi K, Mitsunaga S, Okada H, Tanaka A, Tanaka K, Inoue I. HLA-DPB1*04:01 allele is associated with non-obstructive azoospermia in Japanese patients. Hum Genet 132, 1405-11 (2013), 査読有
5. Hosomichi K, Jinam TA, Mitsunaga S, Nakaoka H, Inoue I. Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing. BMC Gnomics 14, 355 (2013), 査読有

今村拓也（九州大学）

1. Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Yasuhiro Go, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata and Takuya Imamura. Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. BMC Genomics 15: 35 (2014) 査読有

2. Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura. Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. Development 142:910 (2015). 査読有
3. Naoki Yamamoto, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura. Bidirectional promoters link cAMP signaling with irreversible differentiation through promoter-associated noncoding RNA(pancRNA) expression in PC12 cells. Nucleic Acids Research, in press. 査読有

岩間厚志（千葉大学）

1. Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, and Iwama A. Ezh2 augments leukemogenecity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. **Blood**, 120, 1107-1117, 2012.
2. Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, and Iwama A. Concurrent loss of *Ezh2* and *Tet2* cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. **J Exp Med**, 210:2627-2639, 2013.
3. Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H and Iwama A. The Tif1β-Hp1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. **Stem Cell Reports** 2:145-152, 2014.
4. Mishima Y, Wang C, Miyagi S, Saraya A, Hosokawa H, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Negishi M, Sashida G, Naito T, Ishikura T, Onodera A, Nakayama T, Tenen DG, Yamaguchi N, Koseki H, Taniuchi I, and Iwama A. Histone acetylation mediated by Brd1/Brpf2 is crucial for *Cd8* gene activation during early thymocyte development. **Nat Commun** 5:5872, 2014.
5. Oshima M, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Muto T, Miyagi S, Koide S, Yabata S, Wendt G, Saraya A, Wang C, Shimoda K, Suzuki Y, Iwama A. Ezh2 regulates the Lin28/let-7 pathway to restrict activation of fetal gene signature in adult hematopoietic stem cells. **Exp Hematol** 2015 in press.

上田真由美（京都府立医科大学）

1. Ueta M, Sawai H, Sotozono C, Hitomi Y, Kaniwa N, Kim MK, Seo KY, Yoon KC, Joo CK, Kannabiran C, Wakamatsu TH, Sangwan V, Rathi V, Basu S, Ozeki T, Mushiroda T, Sugiyama E, Maekawa K, Nakamura R, Aihara M, Matsunaga K, Sekine A, Gomes JAP, Hamuro J, Saito Y, Kubo M, Kinoshita S, Tokunaga K. New Susceptibility Gene, *IKZF1*, for Cold Medicine–Related Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis with Severe Mucosal Involvements. *J Allergy Clin Immunol. 2015 Jun;135(6):1538-1545.e17.*

上村 匡（京都大学）

1. Kohei Shimono, Kazuto Fujishima, Takafumi Nomura, Masayoshi Ohashi, Tadao Usui, Mineko Kengaku, Atsushi Toyoda, and Tadashi Uemura. An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size. *Scientific Reports*, 4: 4415 (2014). 査読有り

牛田一成（京都府立大学）

1. Ushida K, Tsuchida S, Ogura Y, Toyoda A, Maruyama F. Domestication and cereal feeding developed domestic pig-type intestinal microbiota in animals of suidae. Anim Sci J. 2015 Aug

27. doi: 10.1111/asj.12492.　査読有

2. Tsuchida S, Nezuo M, Tsukahara M, Ogura Y, Hayashi T, Ushida K. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus gorillae* strain KZ01T, isolated from a western lowland gorilla. Genome Announc. 2015 Oct 15;3(5). pii: e01196-15. doi: 10.1128/genomeA.01196-15.

漆原秀子（筑波大学）

1. Araki Y, Shimizu HD, Saeki K, Okamoto M, Yamada L, Ishida K, Sawada H, Urushihara H. A surface glycoprotein indispensable for gamete fusion in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. Eukaryot. Cell 11 (2012) 638-644. 査読有
2. Mohri K, Kiyota Y, Kuwayama H, Urushihara H. Temporal and non-permanent division of labor during sorocarp formation in the social amoeba *Acytostelium subglobosum*. Dev. Biol. 375 (2013) 201-209. 査読有
3. Romeralo M, Skiba A, Gonzalez-Voyer A, Schilde C, Lawal H, Kedziora S, Cavender JC, Glöckner G, Urushihara H, Schaap P. Analysis of phenotypic evolution in Dictyostelia highlights developmental plasticity as a likely consequence of colonial multicellularity. Proc. Biol. Sci. 280 (2013) 20120976. 査読有
4. Mohri K, Hata T, Kikuchi H, Oshima Y, Urushihara H. Defects in the synthetic pathway prevent DIF-1 mediated stalk lineage specification cascade in the non-differentiating social amoeba, *Acytostelium subglobosum*. Biol. Open 3 (2014) 553-560. 査読有
5. Kuwayama H, Tohyama T, Urushihara H. Cross-species functional complementation of cellulose synthase during the development of cellular slime molds. Dev. Growth Differ. 56 (2014) 526-533. 査読有
6. Urushihara H, Kuwayama H, Fukuhara K, Itoh T, Kagoshima H, Shin-I T, Toyoda A, Ohishi K, Taniguchi T, Noguchi H, Kuroki Y, Hata T, Uchi K, Mohri K, King JS, Insall RH, Kohara Y, Fujiyama A. Comparative genome and transcriptome analyses of the social amoeba Acytostelium subglobosum that accomplishes multicellular development without germ-soma differentiation. BMC Genomics 16 (2015) 80. 査読有
7. Sheikh S, Gloeckner G, Kuwayama H, Schaap P, Urushihara H, Baldauf SL. Root of Dictyostelia based on 213 universal proteins. Mol. Phylogenet. Evol. 92 (2015) 53-62. 査読有

江澤辰広（北海道大学）

1. 江沢辰広，第二，第三次技術革新が開くアーバスキュラー菌根共生研究 −栄養共生機構・生態・ビジネス展望−，日本土壌肥料学雑誌（印刷中）（査読無）

太田邦史（東京大学）

1. Oda A., Takemata N., Hirata Y., Miyoshi T., Suzuki Y., Sugano S., Ohta K. "Dynamic transition of transcription and chromatin landscape during fission yeast adaptation to glucose starvation." Genes to Cells. 20(2015)392-407 査読有
2. Galipon J., Miki A., Oda A., Inada T., and Ohta K. "Stress-induced lncRNAs evade nuclear degradation and enter the translational machinery", Genes to Cells 18(2013)353-368 査読有
3. Miyoshi T., Ito M., Kugou K., Yamada S., Furuichi M., Oda A., Yamada T., Hirota K., Masai H., & Ohta K. "A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S phase checkpoint" Molecular Cell 47(2012)1-12 査読有
4. 太田邦史、久郷和人、山田真太郎、小田有沙 実験医学 30: 2209-2214「非次世代シークエンサーによる非コード DNA 配列解析」(2012) 6
5. 太田邦史、小田有沙、Josephine Galipon、竹俣直道、三好知一郎、廣田耕志　実験医学 29: 1722-1727「長鎖 ncRNA によるクロマチン・転写活性化の制御」 (2011) 6

岡崎 伸（東京農工大学）

1. Okazaki S, Noisangiam R, Okubo T, Kaneko T, Oshima K, Hattori M, Teamtisong K, Songwattana P, Tittabutr P, Boonkerd N, Saeki K, Sato S, Uchiumi T, Minamisawa K, *Teaumroong N. Genome analysis of a novel Bradyrhizobium sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. PLOS ONEdoi:10.1371/journal.pone.0117392. (2015)（査読あり）

岡田典弘（東京工業大学）

1. Higasa K, Nikaido M, Saito TL, Yoshimura J, Suzuki Y, Suzuki H, Nishihara H, Aibara M, Ngatunga BP, Kalombo HWJ, Sugano S, Morishita S, Okada N. (2012) Extremely slow rate of evolution in the HOX cluster revealed by comparison between Tanzanian and Indonesian coelacanths. ***GENE*** 505:324–332.（**査読有**）
2. Nikaido M, Noguchi H, Nishihara H, Toyoda A, Suzuki Y, Kajitani R, Suzuki H, Okuno M, Aibara M, Ngatunga BP, Mzighani SI, Kalombo HW, Masengi KW, Tuda J, Nogami S, Maeda R, Iwata M, Abe Y, Fujimura K, Okabe M, Amano T, Maeno A, Shiroishi T, Itoh T, Sugano S, Kohara Y, Fujiyama A, Okada N. (2013) Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. ***Genome Res.*** 23:1740-1748.（**査読有**）
3. Iwasaki Y, Abe T, Okada N, Wada K, Wada Y, Ikemura T. (2014) Evolutionary changes in vertebrate genome signatures with special focus on coelacanth. ***DNA Res.*** 21:459-467.（**査読有**）
4. 二階堂雅人、岡田典弘　（2014）シーラカンスゲノム進化：進化速度・嗅覚・前適応『生物の科学遺伝』 Vol. 68. pp. 256-260.
5. 二階堂雅人、岡田典弘　（2014）シーラカンスのもう一つの繁殖地：タンザニア『生物の科学遺伝』 Vol. 68. pp. 210-214.
6. 二階堂雅人、岡田典弘（2014）「シーラカンスゲノム中に隠されていた脊椎動物陸上化のカギ」『バイオサイエンスとバイオインダストリー (財) バイオインダストリー協会』 Vol. 72. pp. 134-136.

小野寺淳（千葉大学）

1. **Onodera A**, Tumes DJ, Watanabe Y, Hirahara K, Kaneda A, Sugiyama F, **Suzuki Y**, Nakayama T. Spatial Interplay between Polycomb and Trithorax Complexes Controls Transcriptional Activity in T Lymphocytes. ***Mol Cell Biol.*** 35(22):3841-53 (2015). 査読有り
2. **Onodera A**, Nakayama T. Epigenetics of T cells regulated by Polycomb/Trithorax molecules. ***Trends Mol Med.*** 21(5):330-40 (2015). 査読有り
3. Sasaki T., **Onodera A**., Hosokawa H., Watanabe Y., Horiuchi S., Yamashita J., Tanaka H., Ogawa Y., **Suzuki Y**., Nakayama T.: Genome-Wide Gene Expression Profiling Revealed a Critical Role for GATA3 in the Maintenance of the Th2 Cell Identity. ***PLoS One***. 8(6):e66468 (2013). 査読有り
4. Tumes DJ, **Onodera A**, Suzuki A, Shinoda K, Endo Y, Iwamura C, Hosokawa H, Koseki H, Tokoyoda K, **Suzuki Y**, Motohashi S, Nakayama T.: The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. ***Immunity.*** 14;39(5):819-32 (2013). 査読有り
5. Hosokawa H., Tanaka T., **Suzuki Y**., Iwamura C., Ohkubo S., Endoh K., Kato M., Endo Y., **Onodera A**., Tumes DJ., Kanai A., **Sugano S**, Nakayama T.: Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 110(12):4691-6 (2013). 査読有り
6. Horiuchi S., **Onodera A**., Hosokawa H., Watanabe Y., Tanaka T., **Sugano S**., **Suzuki Y**., and Nakayama T.: Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. ***J. Immunol.*** 186:6378-6389 (2011). 査読有り

小野寺康之（北海道大学）

1. K. Yamamoto, Y. Oda, A. Haseda, S. Fujito, T. Mikami and Y. Onodera, Molecular evidence that the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L. are located at different loci in a chromosomal region. Heredity, 112(3), 317-324, 2014 査読有
2. Fujito S, Takahata S, Suzuki R, Hoshino Y, Ohmido N, Onodera Y., Evidence for a Common Origin of Homomorphic and Heteromorphic Sex Chromosomes in Distinct *Spinacia* Species. (2015) G3, 5(8):1663-73

小野竜一（東京医科歯科大学）

1. Ono R., Kuroki Y., Naruse M., Ishii M., Iwasaki S., Toyoda A., Fujiyama A., Shaw G., Renfree MB., Kaneko-Ishino T., Ishino F. Identification of tammar wallaby *SIRH12*, derived from a marsupial-specific retrotransposition event. ***DNA Research*** 18(4):211-9 (2011)（査読有）

風間裕介（理化学研究所）

1. Ishii K, Nishiyama R, Shibata F, Kazama Y, Abe T, and Kawano S. Rapid degeneration of noncoding DNA regions surrounding SlAP3X/Y after recombination suppression in a dioecious plant, *Silene latifolia*. G3: Genes, Genomes, Genetics 2013, 3: 2121-2130. 査読有
2. Kazama Y, Ishii K, Aonuma W, Ikeda T, Kawamoto H, Koizumi A, Filatov DA, Chibalina M, Bergero R, Charlesworth D, Abe T, and Kawano S. A new physical mapping approach refines the sex-determining gene positions on the *Silene latifolia* Y-chromosome. Scientific Reports 2016 6:18917. 査読有

鎌形洋一（産業技術総合研究所）

1. Takeuchi M., Katayama T., Yamagishi T., Hanada S., Tamaki H., Kamagata Y., Oshima K., Hattori M., Marumo K., Nedachi M., Maeda H., Suwa Y., Sakata S. *Methyloceanibacter caenitepidus* gen. nov., sp. nov., a facultatively methylotrophic bacterium isolated from marine sediments near a hydrothermal vent. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **64:** 462-468 (2013). *Peer-reviewed article.*
2. Takeuchi M., Kamagata Y., Oshima K., Hanada S., Tamaki H., Marumo K., Maeda H., Nedachi M., Hattori M., Iwasaki, W., Sakata S. *Methylocaldum marinum* sp. nov., a thermotolerant methane-oxidizing bacterium isolated from marine sediments, and emended description of the genus *Methylocaldum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **64:** 3240-3246 (2014). *Peer-reviewed article.*
3. Takeuchi M., Yamagishi T., Kamagata Y., Oshima K., Hattori M., Katayama T., Hanada S., Tamaki H., Marumo K., Maeda H., Nedachi M., Iwasaki W., Suwa Y., Sakata S. 2015. *Tepidicaulis marinum* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium denitrifying nitrate to nitrous oxide strictly under microaerobic conditions. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **65:** 1749-1754 (2015). *Peer-reviewed article.*

川口正代司（基礎生物学研究所）

1. Handa, Y., Nishide, H., Takeda, N., Suzuki, Y., Kawaguchi, M., Saito, K. RNA-seq transcriptional profiling of an arbuscular mycorrhiza provides insights into regulated and coordinated gene expression in *Lotus japonicus* and *Rhizophagus irregularis*. Plant and Cell Physiology. 56, (2015) 1490-1511. 査読有

河野重行（東京大学）

1. Yamazaki, T., Suzuki, R., Ichihara, K., Shimizu, Y., Oshima, K., Miyamura, S., Kuwano, K., Toyoda, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Hattori, M., Kawano, S.: Evolution of the primeval mating-type locus in an order with an isomorphic haploid-diploid life cycle and isogamy. PLOS Genetics *in revision* (2016) 査読有り
2. Suzuki, R., Ota, S., Yamazaki, T., Toyoda, A., Nonaka, S., Matsukura, C., Kuwano, K., Kawano, S.: Morphological changes of giant mitochondria in the unicellular to multicellular phase during parthenogenesis of *Ulva partita* (Ulvophyceae) revealed by expression of mitochondria targeting GFP and PEG transformation. Phycol. Res. 64, *in revision* (2016) 査読有り
3. Ichihara,K., Suzuki, R., Yamazaki, T., Ota, S., Mogi, Y., Kagami,Y., Kuwano, K., Kawano, S.: *Ulva partita* sp. nov., a novel *Enteromorpha*-Like *Ulva* Species from Japanese coastal areas. Cytologia 261-270 (2015) 査読有り
4. Yamazaki, T., Endo, M., Ito, K., Suzuki, R., Ota, S., Kuwano, K., Miyamura, S., Toyoda, A. and Kawano, S.: HAP2/GCS1 is involved in the sexual reproduction system of the marine macroalga *Ulva compressa*. Cytologia 79, 575-584 (2014). 査読有り
5. Suzuki, R., Yamazaki, T., Toyoda, A. and Kawano, S.: Technical note: A Transformation system using rbcS N-terminal region fused with GFP demonstrates pyrenoid targeting of the small subunit of RubisCO in *Ulva compressa*. Cytologia 79, 427-428 (2014). 査読有り
6. 河野重行・大田修平：生殖様式の多様性とその起源、科学、84、779-783 (2014)

河原行郎（大阪大学）

1. Li Q, Uemura Y, Kawahara Y. Cross-Linking and Immunopresipitation of Nuclear RNA-Binding Proteins. Methods in Molecular Biology,1262; 247-263, 2015. 査読有
2. Yokoshi M, Li Q, Yamamoto M, Okada H, Suzuki Y, Kawahara Y. Direct Binding of Ataxin-2 to Distinct Elements in 3' UTRs Promotes mRNA Stability and Protein Expression. Molecular Cell. 17;55(2):186-198 (2014). 査読有
3. 余越　萌, 河原　行郎. 神経変性疾患関連タンパク質 Ataxin-2 は 3’非翻訳領域にある特定の配列に直接結合することによって、mRNA の安定性を促進しタンパク質発現を増加させる, 新着論文レビュー, e9044 (2014). 査読無

河村正二（東京大学）

1. Tezuka, A., Kasagi, S., van Oosterhout, C., McMullan, M., Iwasaki, W. M., Kasai, D., Yamamichi, M., Innan, H., *Kawamura, S. and *Kawata, M. (2014). Divergent selection for opsin gene variation in guppy (*Poecilia reticulata*) populations of Trinidad and Tobago. Heredity, 113: 381-389. 査読有 *Corresponding author
2. Matsumoto, Y., Hiramatsu, C., Matsushita, Y., Ozawa, N., Ashino, R., Nakata, M., Kasagi, S., Di Fiore, A. Schaffner, C. M., Aureli, F., Melin, A. D. and *Kawamura, S. (2014). Evolutionary renovation of L/M opsin polymorphism confers a fruit discrimination advantage to ateline New World monkeys. Molecular Ecology, 23: 1799-1812. 査読有
3. Matsushita, Y., Oota, H., Welker, B. J., Pavelka, M. S. and *Kawamura, S. (2014). Color vision variation as evidenced by hybrid L/M opsin genes in wild populations of trichromatic *Alouatta* New World monkeys. International Journal of Primatology, 35: 71-87. 査読有
4. *Melin, A. D., Matsushita, Y., Moritz, G. L., Dominy, N. J. and *Kawamura, S. (2013). Inferred L/M cone opsin polymorphism of ancestral tarsiers sheds dim light on the origin of anthropoid primates. Proceedings of the Royal Society B, 280: 20130189. 査読有
5. 河村正二 (2012). 視覚センサー遺伝子の適応と進化多様性：魚類から霊長類まで. 化学と生物, 50: 325-336. 査読無
6. Hiwatashi, T., Mikami, A., Katsumura, T., Suryobroto, B., Perwitasari-Farajallah, D.,

Malaivijitnond, S., Siriaroonrat, B., Oota, H., Goto, S. and *Kawamura, S. (2011). Gene conversion and purifying selection shape nucleotide variation in gibbon L/M opsin genes. BMC Evolutionary Biology, 11: 312. 査読有

岸本健雄（お茶の水女子大学）

1. Morino, Y., Koga, H., Tachibana K., Shoguchi, E., Kiyomoto, M., and Wada, H. Heterochronic activation of VEGF signaling and the evolution of the skeleton in Echinoderm pluteus larvae. ***Evolution and Development*** 14 (2012), 428-436. 査読有

北野 潤（国立遺伝学研究所）

1. Yoshida, K., Makino, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Hasebe, M., Kawata, M., Kume, M., Mori, S., Peichel, C. L., Toyoda, A., Fujiyama, A., and Kitano, J. (2014) Sex chromosome turnover contributes to genomic divergence between incipient stickleback species. PLoS Genetics 10: e1004223（査読有）
2. Kitano, J., Yoshida, K., and Suzuki, Y. (2013) RNA sequencing reveals small RNAs differentially expressed between incipient Japanese threespine sticklebacks. BMC Genomics 14(1):214（査読有）
3. 北野 潤（2014）トゲウオの種分化はどのように起こるのか？　細胞工学　Vol.33, No. 7 p.770-773

木村亮介（琉球大学）

1. Saw, W.Y., X. Liu, C.C. Khor, F. Takeuchi, T. Katsuya, R. Kimura, T. Nabika, T. Ohkubo, Y. Tabara, K. Yamamoto, M. Yokota, Japanese Genome Variation Consortium, Y.Y. Teo, and N. Kato (2015) Mapping the genetic diversity of HLA haplotypes in the Japanese populations. *Scientific Reports* 5: 17855. **査読有**
2. Nakagome, S., T. Sato, H. Ishida, T. Hanihara, T. Yamaguchi, R. Kimura, S. Mano, H. Oota, and The Asian DNA Repository Consortium (2015) Model-Based Verification of Hypotheses on the Origin of Modern Japanese Revisited by Bayesian Inference Based on Genome-Wide SNP Data. *Molecular Biology and Evolution* 32: 1533-1543.　査読有
3. Sato, T., S. Nakagome, C. Watanabe, K. Yamaguchi, A. Kawaguchi, K. Koganebuchi, K. Haneji, T. Yamaguchi, T. Hanihara, K. Yamamoto, H. Ishida, S. Mano, R. Kimura, and H. Oota (2014) Genome-wide SNP analysis reveals population structure and demographic history of the Ryukyu Islanders in the southern part of the Japanese Archipelago. *Molecular Biology and Evolution* 31: 2929-2940. **査読有**

工藤 洋（京都大学）

1. Nishio H, Buzas DM, Nagano AJ, Suzuki Y, Sugano S, Ito M, Morinaga S, Kudoh H. From the laboratory to the field: assaying histone methylation at *FLOWERING LOCUS C* in naturally growing *Arabidopsis halleri*. Genes & Genetic Systems (in press). 査読有

國枝武和（東京大学）

1. Tanaka, S., Tanaka, J., Miwa, Y., Horikawa, D., D., Katayama, T., Arakawa, K., Toyoda, A., Kubo, T., and, Kunieda, T. Novel mitochondria-targeted heat-soluble proteins identified in the anhydrobiotic tardigrade improve osmotic tolerance of human cells. PLoS ONE 10, (2015), e0118272. （査読あり）
2. Yamaguchi, A., Tanaka, S., Yamaguchi, S., Kuwahara, H., Takamura, C., Imajoh-Ohmi, S.,

Horikawa, D. D., Toyoda, A., Katayama, T., Arakawa, K., Fujiyama, A., Kubo, T. and Kunieda, T. Two Novel Heat-Soluble Protein Families Abundantly Expressed in an Anhydrobiotic Tardigrade. *PLoS ONE* 7, (2012). e44209.（査読あり）

久原篤（甲南大学）

1. Ohta A., Ujisawa T., Sonoda S., Kuhara A. Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. ***Nature commun***,5, 4412, 1-12 2014 査読有

久保田健夫（山梨大学）

1. Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Akamatsu W, Oyama M, Okano H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome. *PLoS ONE* 8:e66729, 2013.査読有.
2. Kubota T, Miyake K, Hariya M, Mochizuki K. Epigenetics as a basis for diagnosis of neurodevelopmental disorders: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn* 14(6):685-697, 2014. 査読有.

倉橋浩樹（藤田保健衛生大学）

1. Kato T, Inagaki H, Tong M, Kogo H, Ohye T, Yamada K, Tsutsumi M, Emanuel BS, Kurahashi H. DNA secondary structure is influenced by genetic variation and alters susceptibility to *de novo* translocation. Mol Cytoenet 4, 18, 2011.（査読有）
2. Kato T, Kurahashi H, Emanuel BS. Chromosomal translocations and palindromic AT-rich repeats. Curr Opin Genet Dev 22(3), 221-228, 2012.（査読有）
3. Inagaki H, Ohye T, Kogo H, Tsutsumi M, Kato T, Tong M, Emanuel BS, Kurahashi H. Two sequential cleavage reactions on cruciform DNA structures cause palindrome-mediated chromosomal translocations. Nat Commun 4, 1592, 2013.（査読有）
4. Mishra D, Kato T, Inagaki H, Kosho T, Wakui K, Kido Y, Sakazume S, Taniguchi-Ikeda M, Morisada N, Iijima K, Fukushima Y, Emanuel BS, Kurahashi H. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24.13;q11.21) translocation. Mol Cytogenet, 7, 55, 2014.（査読有）

河内孝之（京都大学）

1. Ishizaki, K., Nonomura, M., Kato, H., Yamato, K. T., and Kohchi, T. Visualization of auxin-mediated transcriptional activation using a common auxin-responsive reporter system in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *J. Plant Res.***125**, 643-651 (2012). 査読有
2. Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S., and Kohchi, T. Homologous recombination-mediated gene targeting in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Sci. Rep.*, **13**, 1532 DOI: 10.1038/srep01532 (2013).
3. Ishizaki, K., Mizutani, M., Shimamura, M., Masuda, A., Nishihama, R., and Kohchi, T. Essential role of the E3 ubiquitin ligase NOPPERABO1 in schizogenous intercellular space formation in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *Plant Cell,* **25**, 4075-4084 (2013). 査読有
4. Kubota, A., Kita, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T. and Kohchi, T. Co-option of a photoperiodic growth-phase transition system during land plant evolution, *Nature Comm*., **5**, 3668 (2014). 査読有
5. Komatsu, A., Terai, M., Ishizaki, K., Suetsugu, N., Tsuboi, H., Nishihama, R., Yamato, K. T., Wada, M., and Kohchi, T. Phototropin encoded by a single-copy gene mediates chloroplast

photorelocation movements in the liverwort *Marchantia polymorpha* L., *Plant Physiol.*, **166**, 411-427 (2014). 査読有

6. Kato, H., Ishizaki, K., Kouno, M., Shirakawa, M., Bowman, J. L., Nishihama, R., and Kohchi, T. Auxin-mediated transcriptional system with a minimal set of components is critical for morphogenesis through the life cycle in *Marchantia polymorpha, PLOS Genet.*, **11**, e1005084 (2015).査読有
7. Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K. T., and Kohchi, T. Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research *Plant Cell Physiol*., in press (2015) 査読有
8. Bowman, J. L., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M. A., Berger, F., Dolan, L., Haseloff, J., Ishizaki, K., Kyozuka, J., Lin, S., Nagasaki, H., Nakagami, H., Nakajima, K., Nakamura, Y., Ohashi-Ito, K., Sawa, S., Shimamura, M., Solano, R., Tsukaya, H., Ueda, T., Watanabe, Y., Yamato, K. T., Zachgo, S. and Kohchi, T. The naming of names: guidelines for gene nomenclature in *Marchantia. Plant Cell Physiol.* in press (2015) 査読有

河野友宏（東京農業大学）

1. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y, Suzuki Y, Kono T、Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks、PLoS Genetics 8(1)、(2012)、e1002440、査読有
2. Kobayashi H, Sakurai T, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Kono T、 Imprinted DNA methylation reprogramming during early mouse embryogenesis at the Gpr1-Zdbf2 locus is linked to long cis-intergenic transcription、FEBS Letters 586(6)、(2012)、827-33、査読有
3. Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T、High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice、Genome Research 23(4)、2013、616-27、査読有

郷 康広（自然科学研究機構）

1. Uesaka M, Nishimura O, Go Y, Nakashima K, Agata K, Imamura T. (2014) Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. BMC Genomics 15:35. (査読有)

後藤由季子（東京大学）

1. Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. **Nat. Rev. Neurosci.** 11, 377-388, 2010. 査読あり
2. Kishi, Y., Fujii, Y., Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. HMGA proteins regulate global chromatin state and the neurogenic potential in neocortical precursor cells. **Nat. Neurosci.** 15, 1127-1133, 2012. 査読あり
3. Tyssowski, K., Kishi, Y. and Gotoh, Y. Chromatin regulators of neural development **Neuroscience** 264, 4-16 2013. 査読あり
4. Fujii, Y., Kishi, Y. and Gotoh, Y. IMP2 regulates differentiation potentials of mouse neocortical neural precursor cells. **Genes Cells.** 18, 79-89, 2013. 査読あり
5. Morimoto-Suzuki,N., Hirabayashi,Y.,Tyssowski, K., Shinga,J., Vidal, M., Koseki, H., and Gotoh, Y :The polycomb component Ring 1B regulates the timed termination of subcerebral projection neuron production during neocortical development. **Development.** 141:4343-4353, 2014 査読あり

権藤洋一（理化学研究所）

1. Gondo, Y. Experimental population genetics based on de novo mutation discovery by NGS. Genes and Genetic Systems 89(6): 285 (2014). 査読無し

佐伯和彦（奈良女子大学）

1. Kasai-Maita H, Hirakawa H, Nakamura Y, Kaneko T, Miki K, Maruya J, Okazaki S, Tabata S, Saeki K, Sato S. "Commonalities and differences among symbiosis islands of three *Mesorhizobium loti* strains" Microbes and Environments 28(2): 275-278 (2013)

坂山英俊（神戸大学）

1. Sato, M., Sakayama, H., Sato, M., Ito, M. and Sekimoto, H. Characterization of sexual reproductive processes in *Chara braunii* (Charales, Charophyceae). Phycological Research 62: 214–221 (2014).（査読有り）
   DOI: 10.1111/pre.12056
2. Hackenberg, D., Sakayama, H., Nishiyama, T. and Pandey, S. Characterization of heterotrimeric G-protein complex and its regulator from the green alga *Chara braunii* expands the evolutionarily breadth of plant G-protein signaling. Plant Physiology 163: 1510–1517 (2013).（査読有り）
   DOI: http://dx.doi.org/10.1104/pp.113.230425
3. Hoepflinger, M. C., Geretschlaeger, A., Sommer, A., Hoeftberger, M., Nishiyama, T., Sakayama, H., Hammerl, P., Tenhaken, R., Ueda, T. and Foissner, I. Molecular and biochemical analysis of the first ARA6 homologue, a RAB5 GTPase, from green algae. Journal of Experimental Botany 64: 5553–5568 (2013).（査読有り）
   DOI: 10.1093/jxb/ert322
4. Yang, Y., Maruyama, S., Sekimoto, H., Sakayama, H. and Nozaki, H. An extended phylogenetic analysis reveals ancient origin of “non-green” phosphoribulokinase genes from two lineages of “green” secondary photosyntheic eukaryotes: Euglenophyta and Chlorarachniophyta. BMC Research Notes 4:330 (2011).（査読有り）
   DOI: 10.1186/1756-0500-4-330
5. Kato, S., Misawa, K., Takahashi, F., Sakayama, H., Sano, S., Kosuge, K., Kasai, F., Watanabe, M. M., Tanaka, J. and Nozaki, H. Aquatic plant speciation affected by diversifying selection of organelle DNA regions. Journal of Phycology 47: 999–1008 (2011). （査読有り）
   DOI: 10.1111/j.1529-8817.2011.01037.x
6. 坂山英俊．植物の上陸作戦＝シャジクモの辿った道．BSJ-Review 1: 30-35 (2010). （査読無し）http://bsj.or.jp/frontier/BSJreview2010A7.pdf

佐々木えりか（実験動物中央研究所）

1. Sato K, Kuroki Y, Kumita W, Fujiyama A, Toyoda A, Kawai J, Iriki A, Sasaki E, Okano H, Sakakibara Y.， Scientific Reports, 5, 2015, DOI: 16894-16901，査読有り

佐藤文彦（京都大学）

1. 佐藤文彦 新しいモデル植物：ポストゲノム時代の研究材料　植物の生長調節 50(2)，2015，93-95 査読有

澤進一郎（熊本大学）

1. Yasuka, Y., Ishida, T., and Sawa, S. (2016) CLE peptides and their signaling pathways in plant development. J. Exp. Bot. In press.
2. Motomitsu, A., Sawa, S., and Ishida, T. (2015) Plant peptide hormone signaling. Essays in Biochem. In press.
3. Shimizu, N., Ishida, T., Yamada, M., Shigenobu, S., Tabata, R., Kinoshita, A., Yamaguchi, K., Hasebe, M., Mitsumasu, K., and Sawa, S. (2015) BAM 1 and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 constitute a signaling pathway and modulate CLE peptide triggered growth inhibition in Arabidopsis root. New Phytologists 208.1104-1113
4. Kinoshita, A., Seo, M., Kamiya, Y., and Sawa, S. (2015) Mystery in genetics: PUB4 gives a clue to the complex mechanism of CLV signaling pathway in the shoot apical meristem Plant Signaling & Behavior. 10:6, e1028707
5. Kinoshita, A, Hove, C.A., Tabata, R., Yamada, M., Shimizu, N., Ishida, T., Yamaguchi K., Shigenobu, S., Takebayashi, Y., Iuchi, S., Kobayashi, M., Kurata, T., Wada, T., Seo, M., Hasebe, M., Bilou, I., Fukuda, H., Scheres, B., Heidstra, R., and Sawa, S. (2015) A plant U-box protein, PUB4, regulates asymmetric cell division and cell proliferation in the root meristem. Development 142., 444-453.
6. Ishida, T., Tabata, R., Yamada, M., Aida, M., Mitsumasu, K., Fujiwara, M., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Higuchi, M., Tsuji, H., Shimamoto, K., Hasebe, M., Fukuda, H., and Sawa, S. (2014) Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through CLAVATA signaling in *Arabidopsis*. EMBO rep. In Press.
7. Tabata, R. and Sawa, S. Maturation processes and structures of secreted peptides in plants. (2014) Frontiers in Plant Science 04 July; doi: 10.3389/fpls.2014.00311.
8. Miyawaki, K., Tabata, R., and Sawa, S. (2013) Evolutionarily conserved CLE peptide signaling in plant development, symbiosis, and parasitism. Curr. Opin. Plant Biol. 16.598- 606.
9. Yamada, M., and Sawa, S. (2013) The function of CLE and other plant peptide hormones in root development. Curr. Opin. Plant Biol. 16. 1-6.
10. Tabata, R., Kamiya, T., Shigenobu S., Yamaguchi K., Yamada, M., Hasebe, M., Fujiwara, T., and Sawa, S. (2013) Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior. 8. e22534
11. 光増可奈子，西山英孝，中上知，金丸由実，澤進一郎 (2015) 細胞外空間（細胞壁）に注目した植物寄生性線虫の感染分子機構、日本農薬学会誌　in press.
12. 澤進一郎 (2013)　ペプチドホルモンによる植物幹細胞活性制御と線虫感染　Pure Science 8. pp6

澤辺智雄（北海道大学）

1. Tomoo Sawabe, Yoshitoshi Ogura, Yuta Matsumura, Feng Gao, AKM R. Amin, Sayaka Mino, Satoshi Nakagawa, Toko Sawabe, Ramesh Kumar, Yohei Fukui, Masataka Satomi, Ryoji Matsushima, Fabiano L. Thompson, Bruno Gomez-Gil, Richard Christen, Fumito Maruyama, Ken Kurokawa and Testuya Hayashi. 2013. Updating the Vibrio Clades Defined by Multilocus Sequence Phylogeny: Proposal of Eight New Clades, and the Description of *Vibrio tritonius* sp. nov. Front. Microbiol. doi: 10.3389/fmicb.2013.00414.　査読有.
2. Yuta Matsumura, Hidayu Al-saari, Sayaka Mino, Satoshi Nakagawa, Fumito Maruyama, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Ken Kurokawa, Toko Sawabe, Tomoo Sawabe. 2015. Identification of a gene cluster responsible for hydrogen evolution in *Vibrio tritonius* strain AM2 with transcriptional analyses. Int. J. Hydrogen Energy 40, 9137-9146.　査読有

椎名 隆（東海大学）

1. Shiina T, Kono A, Westphal N, Suzuki S, Hosomichi K, Kita YF, Roos C, Inoko H, Walter L.

Comparative genome analysis of the major histocompatibility complex (MHC) class I B/C segments in primates elucidated by genomic sequencing in common marmoset (Callithrix jacchus). Immunogenetics 63: 485-499, 2011.査読有

2. Arikata M, Itoh Y, Okamatsu M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K. Memory immune responses against pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induced by a whole particle vaccine in cynomolgus monkeys carrying Mafa-A1*052:02. PLoS One 7: e37220, 2012. 査読有
3. Blancher A, Aarnink A, Tanaka K, Ota M, Inoko H, Yamanaka H, Nakagawa H, Apoil PA, Shiina T. Study of cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) Mhc DRB gene polymorphism in four populations. Immunogenetics 64: 605-614, 2012. 査読有
4. de Groot NG, Otting N, Robinson J, Blancher A, Lafont BA, Marsh SG, O'Connor DH, Shiina T, Walter L, Watkins DI, Bontrop RE. Nomenclature report on the major histocompatibility complex genes and alleles of Great Ape, Old and New World monkey species. Immunogenetics 64: 615-631, 2012. 査読有
5. Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, Oka A, Umemura T, Joshita S, Takahashi O, Hayashi Y, Paumen M, Katsuyama Y, Mitsunaga S, Ota M, Kulski JK, Inoko H. Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. Tissue Antigens 80: 305-316, 2012. 査読有
6. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J. Direct Comparison of Autologous and Allogeneic Transplantation of iPSCDerived Neural Cells in the Brain of a Nonhuman Primate Stem. Stem Cell Reports 1: 1-10, 2013. 査読有
7. Blancher A, Aarnink A, Yamada Y, Tanaka K, Yamanaka H, Shiina T. Study of MHC class II region polymorphism in the Filipino cynomolgus macaque population. Immunogenetics 66: 219-230, 2014. 査読有
8. Kisu I, Mihara M, Banno K, Masugi Y, Hara H, Araki J, Iida T, Moriguchi H, Yamada Y, Tonsho M, Kato Y, Shiina T, Suganuma N, Aoki D. Uterine allotransplantation in cynomolgus macaque: preliminary experience with non-human primate models. J Obst Gynaecol Res. 40: 907-918, 2014. 査読有
9. Kono A, Brameier M, Roos C, Suzuki S, Shigenari A, Kametani Y, Kitaura K, Matsutani T, Suzuki R, Inoko H, Walter L, Shiina T. Genomic sequence analysis of the major histocompatibility complex (MHC) class I G/F segment in common marmoset (Callithrix jacchus). J Immunol. 192: 3239-3246, 2014. 査読有
10. Kisu I, Kato Y, Tsuchiya H, Kawamoto I, Nakagawa T, Ogasawara K, Hayakawa T, Yamayoshi Y, Iketani O, Mihara M, Banno K, Sato S, Shiina T, Aoki D. Study of pharmacokinetic properties of cyclosporine A after subcutaneous injection in cynomolgus monkey. Int J Pharmacol. 40: 907-918, 2014. 査読有
11. Shiina T, Yamada Y, Aarnink A, Suzuki S, Masuya A, Ito S, Ido D, Yamanaka H, Iwatani C, Tsuchiya H, Ishigaki H, Itoh Y, Ogasawara K, Kulski JK, Blancher A. Discovery of novel MHC-class I gene alleles, haplotypes and expression levels in Filipino cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) by pyrosequencing. Immunogenetics 67: 563-578, 2015. 査読有
12. Morita D, Yamamoto Y, Mizutani T, Ishikawa T, Suzuki J, Igarashi T, Mori N, Shiina T, Inoko H, Tanaka Y, Mikami B, Sugita M. Crystal structure of the lipopeptide-bound MHC class I complex. Nature Communication In press. 査読有
13. Kawamura T, Miyagawa S, Fukushima S, Maeda A, Kashiyama N, Kawamura A, Miki K, Hotta A, Okita K, Yoshida Y, Shiina T, Ogasawara K, Miyagawa S, Okuyama H, Sawa Preventing allogeneic immune rejection by transplantation of MHC-homo-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes into MHC-matched nonhuman primates. Stem Cell Reports In press. 査読有

塩見邦博（信州大学）

1. 塩見邦博「カイコの休眠誘導と環境応答」蚕糸・昆虫バイオテック，日本蚕糸学会，Vol. 84（2），119−126．2015．（査読無し）

柴 博史（筑波大学）

1. 柴　博史, シロイヌナズナ種内雑種で見られる雑種強勢の分子メカニズム, 植物の生長調節, 2015, 50, 139-143, 査読無し
2. Takada, Y., Sato, T., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., and Watanabe, M., Involvement of MLPK Pathway in Intraspecies Unilateral Incompatibility Regulated by a Single Locus with Stigma and Pollen Factors, Genes Genomes Genetics, 3, 2013, 719-726, 査読有り
3. 前川 雅彦, 金澤 章, 堤 伸浩, 木下 哲, 土生 芳樹, 柴 博史, 江面 浩, エピミュータジェネシスと次世代育種への展開,育種学研究 15, 2013, 42-50, 査読無し
4. Shiba, H. and Takayama, S., Epigenetic regulation of monoallelic gene expression, Development, Growth & Differentiation 54, 2012, 120-128, 査読有り

嶋田 透（東京大学）

1. Wang, H., Kiuchi, T., Katsuma, S., and Shimada, T., A novel sucrose hydrolase from the bombycoid silkworms *Bombyx mori*, *Trilocha varians*, and *Samia cynthia ricini* with a substrate specificity for sucrose. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 61:46-52
2. 嶋田 透（2015）昆虫の食性の進化を遺伝子で説明できるか？（特集「ゲノムで進化の謎を解く」），細胞工学, 2015, , 論文 024165

將口栄一（沖縄科学技術大学院大学）

1. Beedessee, G, Hisata, K., Roy, M.C., Satoh, N. & Shoguchi, E. Multifunctional polyketide synthase genes identified by genomic survey of the symbiotic dinoflagellate, *Symbiodinium minutum*. *BMC Genomics.* **16,** 941 (2015) 査読有り
2. Shoguchi, E., Shinzato, C., Hisata, K., Satoh, N. & Mungpakdee, S. The large mitochondrial genome of *Symbiodinium minutum* reveals conserved non-coding sequences between dinoflagellates and apicomplexans. *Genome Biol. Evol.* **7,** 2237-2244 (2015) 査読有り
3. Mungpakdee, S., Shinzato, C., Takeuchi, T., Kawashima, T., Koyanagi, R., Hisata, K., Tanaka, M., Goto, H., Fujie, M., Lin, S., Satoh, N. & Shoguchi, E. Massive gene transfer and extensive RNA editing of a symbiotic dinoflagellate plastid genome. *Genome Biol. Evol.* **6,** 1408-1422 (2014) 査読有り
4. Shoguchi, E., Shinzato, C., Kawashima, T., Gyoja, F., Mungpakdee, S., Koyanagi, R., Takeuchi, T., Hisata, K., Tanaka, M., Fujiwara, M., Hamada, M., Seidi, A., Fujie, M., Usami, T., Goto, H., Yamasaki, S., Arakaki, N., Suzuki, Y., Sugano, S., Toyoda, A., Kuroki, Y., Fujiyama, A., Medina, M., Coffroth, M. A., Bhattacharya, D. & Satoh, N. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. *Curr. Boil.* **23**, 1399-1408 (2013) 査読有り

鈴木 勉（東京大学）

1. Okada S., Sakurai M., Ueda H., Suzuki T. Biochemical and transcriptome-wide identification of A-to-I RNA editing by ICE-seq *Methods in Enzymology*, vol.560, pp.331-353, 2015.
2. Suzuki T, Ueda H., Okada S., Sakurai M. Transcriptome-wide identification of adenosine-inosine editing using ICE-seq method *Nature Protocols*, vol.10, pp.715-732, 2015.

3. Sakurai M., Ueda H., Yano T., Okada S., Terajima H., Mitsuyama T., Toyoda A., Fujiyama A., Kawabata H., Suzuki T. A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human brain transcriptome. *Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol.24, pp.522-534, 2014.

曽田貞滋（京都大学）

1. 曽田貞滋・小沼順二・藤澤知親（2014）陸貝食オサムシの巨頭型と狭頭型：適応的形態分化はどのように起こるのか？ ゲノムで進化の謎を解く！第 10 回．細胞工学 33(10)： 1080−1084.（査読無）

平良眞規（東京大学）

1. Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano, and Masanori Taira (2014). Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification. Nat. Commun. 5, 4322 (article number). 査読有り

高橋秀尚（北海道大学）

1. Takahashi H., Takigawa I., Watanabe M., Anwar D., Shibata M., Tomomori-Sato C., Sato S., Ranjan A., Seidel CW., Tsukiyama T., Mizushima W., Hayashi M., Ohkawa Y., Conaway JW., Conaway RC., Hatakeyama S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. ***Nature Commun.***, 6, 5941, 2015.（査読有）

高畑信也（北海道大学）

1. Shota Suzuki, Hiroaki Kato, Yutaka Suzuki, Yuji Chikashige, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Kimura, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Shinya Takahata and Yota Murakami, Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanism in fission yeast. *Nucleic Acids Research* in press (査読有り)

高濵 洋介（徳島大学）

1. Takada K, Van Laethem F, Xing Y, Akane K, Suzuki H, Murata S, Tanaka K, Jameson SC, Singer A, Takahama Y. TCR affinity for thymoproteasome-dependent positively selecting peptides conditions antigen responsiveness in $CD8^+$ T cells. *Nature Immunology*. 16, 1069-1076, 2015（査読あり）

竹井祥郎（東京大学）

1. Ando, M., Wong, M. K., and Takei, Y. (2014). Mechanisms of guanylin action on water and ion absorption at different regions of seawater eel intestine. Am. J. Physiol. 307: R653-R663.（査読あり）
2. Wong, M.K., Ozaki, H., Suzuki, Y., Iwasaki, W., and Takei, Y. (2014). Discovery of osmotic sensitive transcription factors in fish intestine via a transcriptomic approach. BMC Genomics 15: 1134（査読あり）

竹内 理（京都大学）

1. Uehata T, Iwasaki H, Vandenbon A, Matsushita, K, Hernandez Cuellar E, Kuniyoshi K, Satoh T, Mino T, Suzuki Y, Standley DM, Tsujimura T, Rakugi H, Isaka Y, Takeuchi O and Akira S,

Malt1-Induced Cleavage of Regnase-1 in CD4+ Helper T Cells Regulates Immune Activation, Cell, 153, 1036-49, 2013 査読有

2. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, Vandenbon A, Wessels HH, Ori D, Uehata T, Tartey S, Akira S, Suzuki Y, Vinuesa CG, Ohler U, Standley DM, Landthaler M, Fujiwara T, Takeuchi O. Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct Mechanisms. Cell, 161, 1058-73, 2015 査読有

竹田潤二（大阪大学）

1. Yamagata, Koichi; Yamanishi, Ayako; Kokubu, Chikara; Takeda, Junji; Sese, Jun, COSMOS: accurate detection of somatic structural variations through asymmetric comparison between tumor and normal samples., Nucleic Acids Research, In press

武田洋幸（東京大学）

1. Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Ichikawa K, Otsuka T, Ogoshi K, Saito TL, Matsushima K, Sugano S, Hashimoto S, Suzuki Y, Morishita S and Takeda H, “Large hypomethylated domains serve as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates”, *Development*, 141, 2014, 2568-1580 査読有り

田中知明（千葉大学）

1. Suzuki S, Tanaka T, Poyurovsky MV, Nagano H, Mayama T, Ohkubo S, Lokshin M, Hosokawa H, Nakayama T, Suzuki Y, Sugano S, Sato E, Nagao T, Yokote K, Tatsuno I, Prives C Phosphate activated glutaminase (GLS2), a novel p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(16):7461-6 (2010)、(査読有)
2. Horiuchi S, Onodera A, Hosokawa H, Watanabe Y, **Tanaka T**, Sugano S, Suzuki Y, Nakayama T. Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3. **J Immunol**. 186(11):6378-89 (2011) (査読有)
3. Hosokawa, H., **Tanaka, T.**, Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Nakayama, T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. ***Proc Natl Acad Sci U S A.***110 (12):4691-4696. (2013) (査読有)
4. Hosokawa H, **Tanaka T**, Kato M, Tohyama H, Hanazawa A, Tamaki Y, Hirahara K, Sakikawa I, Morita A, Nagira M, Suzuki, Y and Nakayama, T. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(46):18626-18631 (2013). (査読有)
5. 田中知明, 癌抑制遺伝子 p53 によるエピジェネティクス制御と細胞老化のメカニズム. 日本老年医学会雑誌. 48 :134-137. (2011)
6. 田中知明, 転写因子 p53 の翻訳後修飾と転写活性化機構. 生化学 82:200-209. (2011)
7. 田中知明, p53 作用の分子メカニズム. The Lipid. 22:374-384. (2011)

田中章景（名古屋大学）

1. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. Neurobiol Aging. in press [Epub ahead of print 2015 Dec 7] 査読あり

谷明生（岡山大学）

1. Tani A, Ogura Y, Hayashi T, Kimbara K: Complete genome sequence of *Methylobacterium aquaticum* strain 22A, isolated from *Racomitrium japonicum* moss. Genome Announc 3 (2015) e00266-15. 査読あり

千葉和義（お茶の水女子大学）

1. Ochi H, Saki A, Tachibana K, Hara M., and Chiba K. Block of Cdk1-dependent poly(A) elongation of *cyclin B* mRNA in MI-arrested starfish oocytes is released by intracellular pH elevation upon spawning. *Mol Reprod Dev* 83 79-87 (2016) 査読有り

千葉親文（筑波大学）

1. Endo Y., Toyama F., Chiba C., Mori H. and Shoji K. (2014) De Novo Short Read Assembly Algorithm with Low Memory Usage. *In Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms (BIOSTEC 2014)*, ISBN 978-989-758-012-3, 215-220. DOI: 10.5220/0004881002150220. 査読有
2. Yokoe, M., Sano, M., Shibata, H., Shibata, D., Takayama-Watanabe, E., Inaba, K. and Watanabe, A. (2014) Sperm proteases that may be involved in the initiation of sperm motility in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Int. J. Mol. Sci.* **15,** 15210-15224. DOI: 10.3390/ijms150915210. 査読有
3. Nakamura, K., Islam, M.R., Takayanagi, M., Yasumuro, H., Inami, W., Kunahong, A., Casco-Robles, R.M., Toyama, F. and Chiba, C. (2014) A transcriptome for the study of early processes of retinal regeneration in the adult newt, *Cynops pyrrhogaster*. *PLoS ONE* 9, e109831. DOI: 10.1371/journal.pone.0109831. **査読有**
4. Islam, M.R., Nakamura, K., Casco-Robles, M.M., Kunahong, A., Inami, W., Toyama, F., Maruo, F. and Chiba, C. (2014) The newt reprograms mature RPE cells into a unique multipotent state for retinal regeneration. *Sci. Rep.* **4**, 6043. DOI: 10.1038/srep06043. **査読有**
5. Inami, W., Islam. M.R., Nakamura, K., Yoshikawa, T., Yasumuro, H., Casco-Robles, M.M., Toyama, F., Maruo, F. and Chiba, C. (2016) Expression of two classes of *Pax6* transcripts in reprogramming retinal pigment epithelium cells of the adult newt. *Zool. Sci.* in press. 査読有
6. Sousounis, K., Qi, F., Yadav, M.C., Millan, J.L., Toyama, F., Chiba, C., Eguchi, Y., Eguchi, G. and Tsonis, P.A. (2015) A robust transcriptional program in newts undergoing multiple events of lens regeneration. *eLife* 2015;10.7554/eLife.09594. DOI: http://dx.doi.org/10.7554/eLife.09594. 査読有
7. Kudo, Y., Chiba, C., Konoki, K., Cho, Y. and Yotsu-Yamashita, M. (2015) Confirmation of the absence of tetrodotoxin and its analogues in the juveniles of the Japanese fire-bellied newt, Cynops pyrrhogaster, captive-reared from eggs in the laboratory using HILIC-LC-MS. *Toxicon* **101,** 101-105. DOI: 10.1016/j.toxicon.2015.05.008. 査読有
8. Endo, Y., Toyama, F., Chiba, C., Mori, H. and Shoji, K. (2015) A memory efficient short read de novo assembly algorithm. *IPSJ Transactions on Bioinformatics* **8,** 2-8. DOI: 10.2197/ipsjtbio.8.2. 査読有
9. Casco-Robles, M.M., Miura, T. and Chiba, C. (2015) The newt (Cynops pyrrhogaster) RPE65 promoter: molecular cloning, characterization and functional analysis. *Transgenic Res*. **24,** 463-473. DOI: 10.1007/s11248-014-9857-1. 査読有

塚原達也（東京大学）

1. Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Ichikawa K, Otsuka T, Ogoshi K, Saito TL, Matsushima K, Sugano S, Hashimoto S, Suzuki Y, Morishita S and Takeda H, “Large hypomethylated domains

serve as strong repressive machinery for key developmental genes in vertebrates", *Development*, 141, 2568-1580, 2014,査読あり

辻省次（東京大学）

1. The Multiple-System Atrophy Research Collaboration (Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Gen SobueSobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Hananosato MV, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee VM, Parkinson U, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Parkinson U, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S). Mutations in *COQ2* in familial and sporadic multiple-system atrophy. ***N Engl J Med***. 2013; 369: 233-44.（査読あり）
2. Mitsui J, Tsuji S. Genomic Aspects of Sporadic Neurodegenerative Diseases. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 2014; 452: 221-5.（査読あり）
3. Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, Brice A, Takashima H, Kikuchi A, Aoki M, Ishiura H, Yasuda T, Date H, Ahsan B, Iwata A, Goto J, Ichikawa Y, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Tanner CM, Kukull WA, Stern MB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Ozelius LJ, Foroud T, and Tsuji S. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. ***Ann Clin Transl Neurol.*** 2015; 2: 417-426（査読あり）

津田雅孝（東北大学）

1. 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: 芳香族化合物による土壌撹乱における微生物遺伝子プールの変動. Journal of Environmental Biotechnology 10: 63-71 (2010)
2. 永山浩史, 菅原智詞, 遠藤諒, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二, 津田雅孝: 機能相補による芳香族化合物複合汚染土壌からの新規分解酵素遺伝子の探索. Journal of Environmental Biotechnology 13: 51-56 (2013)
3. Mori H, Maruyama F, Kato H, Toyoda A, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Fujiyama A, Tsuda M, Kurokawa K: Design and experimental validation of non-degenerate universal primers that amplify prokaryotic 16S rRNA genes without amplification of eukaryotic rRNA genes. DNA Research 21: 217-227. (2014)
4. Nagayama H, Sugawara T, Endo R, Ono A, Kato H, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M: Isolation of oxygenase genes for indigo-forming activity from an artificially polluted soil metagenome by functional screening using *Pseudomonas putida* strains as hosts. Applied Microbiology and Biotechnology 99: 4453-4470. (2015)
5. Kato H, Ogawa N, Ohtsubo Y, Oshima K, Toyoda A, Mori H, Nagata Y, Kurokawa K, Hattori M, Fujiyama A, Tsuda M: Complete genome sequence of a phenanthrene degrader, *Mycobacterium* sp. strain EPa45 (NBRC 110737), isolated from a phenanthrene-degrading consortium. Genome Announcements 3: e00782-15. (2015)
6. 加藤広海, 小川なつみ, 津田雅孝: メタゲノム情報を基盤とした土壌細菌コミュニティの解析. 日本微生物生態学会誌 30: 57-64. (2015)

7. Kato H, Mori H, Maruyama F, Toyoda A, Oshima K, Endo R, Fuchu G, Miyakoshi M, Dozono A, Ohtsubo Y, Nagata Y, Hattori M, Fujiyama A, Kurokawa K, Tsuda M: Time-series metagenomic analysis reveals robustness of soil microbiome against chemical disturbance. DNA Research 22: 413-424 (2015)

筒井 研（岡山大学）

1. Onoda, A., Hosoya, O., Sano, K., Kiyama, K., Kimura, H., Kawano, S., Furuta, R., Miyaji, M., Tsutsui, K. and Tsutsui, K. M. : Nuclear dynamics of topoisomerase II reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain. Nucleic Acids Res., 42 (14): 9005-9020 (2014) 査読有り
2. Miyaji, M., Furuta, R., Sano, K., Tsutsui, K. M. and Tsutsui, K. : Genomic regions targeted by DNA topoisomerase II frequently interact with a nuclear scafforld/matrix protein hnRNP U/SAF-A/SP120. J. Cell. Biochem., 116: 677-685 (2015) 査読有り

永田裕二（東北大学）

1. Ohtsubo Y, Sato T, Kishida K, Tabata M, Ogura Y, Hayashi T, Tsuda M, Nagata Y. 2014. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* MTB-1, Isolated from a Microbial Community Enriched by the Technical Formulation of Hexachlorocyclohexane. Genome announcements 2:e01130-13 査読有
2. Ohtsubo Y, Kishida K, Sato T, Tabata M, Kawasumi T, Ogura Y, Hayashi T, Tsuda M, Nagata Y. 2014. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain TKP, Isolated from a gamma-Hexachlorocyclohexane-Degrading Mixed Culture. Genome announcements 2:e01241-13. 査読有

中永和枝（国立感染症研究所）

1. Yotsu RR, Nakanaga K, Hoshino Y, Suzuki K, Ishii1 N.: Buruli Ulcer and Current Situation in Japan: a new emerging cutaneous Mycobacterium infection. The Journal of Dermatology 39：587-593, 2012.
2. Nakanaga K, Hoshino Y, Yotsu RR, Makino M, Ishii1 N.: Laboratory procedures for the detection and identification of cutaneous non-tuberculous mycobacterial infections. The Journal of Dermatology 40:151-159,2013.
3. Nakanaga K, Yotsu RR, Hoshino Y, Suzuki K, Makino M, Ishii1 N.: Buruli ulcer and mycolactone-producing mycobacteria. Japanese Journal of Infectious Diseases 66:83-88,2013.
4. Ohtsuka M, Kikuchi N, Yamamoto T, Suzutani T, Nakanaga K, Suzuki K, Ishii N.: Buruli ulcer caused by *Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*: The first case of familial concurrent occurrence and detection of IS*2404* from the environment in Japan. JAMA Dermatology 150:64-67,2014.
5. Yotsu RR, Murase C, Sugawara M, Suzuki K, Nakanaga K, Ishii1 N, Kingsley A.: Revisiting Buruli ulcer, The Journal of Dermatology 42:1-9, 2015.
6. Sugawara M, Ishii N, Nakanaga K, Suzuki K, Umebayashi Y, Makigami K, Aihara M: Exploration of a standard treatment for Buruli ulcer through a comprehensive analysis of all Japanese cases. The Journal of Dermatology 42: 588–595, 2015.

中山浩次（長崎大学）

1. Mariko Naito, Yoshitoshi Ogura, Takehiko Itoh, Mikio Shoji, Masaaki Okamoto, Tetsuya Hayashi, and Koji Nakayama. The complete genome sequencing of *Prevotella intermedia* strain OMA14 and a subsequent finescale, intra-species genomic comparison re an unusual

amplification of conjugative and mobile transposons and identify a novel *Prevotella*-lineage-specific repeat. DNA Research (in press) (doi: 10.1093/dnares/dsv032) (査読有)

中山二郎（九州大学）

1. 東佳那子、中山二郎 「進化する次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析」 腸内細菌学雑誌、 29、2015、135-144、査読有.

二階堂雅人（東京工業大学）

1. Kudo Y*, Nikaido M*#, Kondo A, Suzuki H, Kikuchi K, Okada NA microsatellite-based genetic linkage map and putative sex determining regions in Lake Victoria cichlids. GENE 560:156-164. (2015) (*equally contributed, #corresponding author)
2. Brawand D, Wagner CE, Li YI, Malinsky M, Keller I, Fan S, Simakov O, Ng AY, Lim ZW, Bezault E, Turner-Maier J, Johnson J, Alcazar R, Noh HJ, Russell P, Aken B, Alföldi J, Amemiya C, Azzouzi N, Baroiller JF, Barloy-Hubler F, Berlin A, Bloomquist R, Carleton KL, Conte MA, D'Cotta H, Eshel O, Gaffney L, Galibert F, Gante HF, Gnerre S, Greuter L, Guyon R, Haddad NS, Haerty W, Harris RM, Hofmann HA, Hourlier T, Hulata G, Jaffe DB, Lara M, Lee AP, MacCallum I, Mwaiko S, Nikaido M, Nishihara H, Ozouf-Costaz C, Penman DJ, Przybylski D, Rakotomanga M, Renn SC, Ribeiro FJ, Ron M, Salzburger W, Sanchez-Pulido L, Santos ME, Searle S, Sharpe T, Swofford R, Tan FJ, Williams L, Young S, Yin S, Okada N, Kocher TD, Miska EA, Lander ES, Venkatesh B, Fernald RD, Meyer A, Ponting CP, Streelman JT, Lindblad-Toh K, Seehausen O, Di Palma F. The genomic substrate for adaptive radiation in African cichlid fish. Nature 513:375-381. (2014)
3. Nikaido M, Ota T, Hirata T, Satta Y, Saito Y, Aibara M, Mzighani SI, Hagino-Yamagishi K, Sturmbauer C, Okada N. Multiple episodic evolution events in V1R receptor genes of East-African cichlids. Genome Biol. Evol. 6:1135-1144. (2014)
4. 二階堂雅人、岡田典弘 「シクリッドゲノムプロジェクトの現状」『生物の科学遺伝』 pp. 184-188, 2012.

西田洋巳（富山県立大学）

1. Yamauchi K, Kondo S, Hamamoto M, Takahashi Y, Ogura Y, Hayashi T, Nishida H (2015) Draft genome sequence of the archiascomycetous yeast *Saitoella complicata*. Genome Announcements 3:e00220-15 [査読有]

西中村隆一（熊本大学）

1. Kanda S, Tanigawa S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Suzuki Y, Sato Y, Hino S, Sander M, Perantoni AO, Sugano S, Nakao M, and Nishinakamura R. Sall1 maintains nephron progenitors and nascent nephrons by acting as both an activator and a repressor. ***J. Am. Soc. Nephrol.*** 25: 2584-2595, 2014. 査読有

野崎久義（東京大学）

1. Hamaji, H., Smith, D. R., Noguchi, H., Toyoda, A., Suzuki, M., Kawai-Toyooka, H., Fujiyama, A., Nishii, I., Marriage, T., Olson, B. J. S. C. and Nozaki, H. 2013. Mitochondrial and plastid genomes of the colonial green alga *Gonium pectorale* give insights into the origins of organelle DNA architecture within the Volvocales. PLoS ONE 8: e57177. 査読有
2. Kawai-Toyooka, H., Mori, T. Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, B. J. S. C., Uemura, T., Ueda, T.,

Nakano, A., Toyoda, A., Fujiyama, A. and Nozaki, H. 2014. Sex-specific posttranslational regulation of the gamete fusogen GCS1 in the isogamous volvocine alga *Gonium pectorale*. Eukaryotic Cell 13: 648-656. 査読有

浜本 洋（東京大学）

1. Ishii K, Adachi T, Yasukawa J, Suzuki Y, Hamamoto H, Sekimizu K. Induction of Virulence Gene Expression in *Staphylococcus aureus* by Pulmonary Surfactant. *Infect Immun.* 82(4):1500-1510 (2014)

林 哲也（九州大学）

1. Tadasuke Ooka, Eisuke Tokuoka, Masato Furukawa, Tetsuya Nagamura, Yoshitoshi Ogura, Kokichi Arisawa, Seiya Harada, and Tetsuya Hayashi: A human outbreak case associated with *Escherichia albertii*. **Emerg. Infect. Dis.** 19(1):144-146, 2013.
2. Tadasuke Ooka, Yoshitoshi Ogura, Keisuke Katsura, Kazuko Seto, Hideki Kobayashi, Kimiko Kawano, Eisuke Tokuoka, Masato Furukawa, Seiya Harada, Shuji Yoshino, Junji Seto, Tetsuya Ikeda, Keiji Yamaguchi, Kazunori Murase, Yasuhiro Gotoh, Naoko Imuta, Junichiro Nishi, Taˆnia A. Gomes,Lothar Beutin, and Tetsuya Hayashi: Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. **Genome Biol Evol,** 7(12): 3170-3179. 2015.

原 一雄（東京医科大学）

1. Hara K, Fujita H, Johnson TA, Yamauchi T, Yasuda K, Horikoshi M, Peng C, Hu C, Ma RC, Imamura M, Iwata M, Tsunoda T, Morizono T, Shojima N, So WY, Leung TF, Kwan P, Zhang R, Wang J, Yu W, Maegawa H, Hirose H; DIAGRAM consortium, Kaku K, Ito C, Watada H, Tanaka Y, Tobe K, Kashiwagi A, Kawamori R, Jia W, Chan JC, Teo YY, Shyong TE, Kamatani N, Kubo M, Maeda S, Kadowaki T: Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. Hum Mol Genet. 23; 2014:239-246 (査読有)

菱田 卓（学習院大学）

1. Haruta, N., Kubota, Y., and Hishida, T., Chronic low-dose ultraviolet-induced mutagenesis in nucleotide excision repair-deficient cells. Nucleic Acids Res. 40(17):8406-8415, 2012.

深田吉孝（東京大学）

1. Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Hideki Terajima, Ngoc-Hien Du, Yutaka Suzuki, Taihei Fujimori, Naoki Kosaka, Shigeki Shimba, Sumio Sugano, Toshihisa Takagi, Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada CLOCK-controlled polyphonic regulations of circadian rhythms through canonical and non-canonical E-boxes. Mol. Cell. Biol., 34(10), 1776-1787 (2014) 査読有

福井 学（北海道大学）

1. Hisaya Kojima, Yoshitoshi Ogura, Nozomi Yamamoto, Tomoaki Togashi, Hiroshi Mori, Tomohiro Watanabe, Fumiko Nemoto, Ken Kurokawa, Tetsuya Hayashi and Manabu Fukui. Ecophysiology of *Thioploca ingrica* as revealed by the complete genome sequence supplemented with proteomic evidence. The ISME Journal 9: (2015) 1166-1176. 査読有

福澤秀哉（京都大学）

1. **Ohnishi N, Mukherjee B, Tsujikawa T, Yanase M, Nakano H, Moroney JV, Fukuzawa H** "Expression of a low-CO_2-inducible protein, LCI1, increases inorganic carbon uptake in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Cell 22: 3105-3117 (2010) 査読有
2. Y**amano T, Tsujikawa T, Hatano K, Ozawa S, Takahashi Y, Fukuzawa H** "Light and low-CO_2 dependent LCIB/LCIC complex localization in the chloroplast supports the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Cell Physiol. 51: 1453-1468 (2010) 査読有
3. **Matsuo M, Hachisu R, Tabata S, Fukuzawa H, Obokata J** "Transcriptome Analysis of Respiration-Responsive Genes in *Chlamydomonas reinhardtii*: Mitochondrial Retrograde Signaling Coordinates the Genes for Cell Proliferation with Energy-Producing Metabolism." Plant Cell Physiol. 52: 333-43 (2011) 査読有
4. **福澤秀哉、山野隆志、梶川昌孝**「緑藻クラミドモナスにおける無機炭素濃縮機構と脂質代謝」光合成研究 22: 174-184 (2012) 査読有
5. **Yamano T, Asada A, Sato E, Fukuzawa H** "Isolation and characterization of mutants defective in the localization of LCIB, an essential factor for the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*." Photosynthesis Res. 121: 193-200 (2014) 査読有
6. **Wang L, Yamano T, Kajikawa M, Hirono M, Fukuzawa H** "Isolation and characterization of novel high-CO_2 requiring mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*." Photosynthesis Res. 121:175-184 (2014) 査読有
7. **Kajikawa M, Kinohira S, Ando, A, Shimoyama M, Kato M, Fukuzawa H** "Accumulation of squalene in a microalga *Chlamydomonas reinhardtii* by genetic modification of squalene synthase and squalene epoxidase genes." PLoS ONE 10: e0120446 (2015) 査読有
8. **Kajikawa M, Sawaragi Y, Shinkawa H, Yamano T, Ando A, Kato M, Hirono M, Sato N, Fukuzawa H** "Algal dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase TAR1 regulates accumulation of triacylglycerol in nitrogen- or sulfur-deficiency." Plant Physiology 168: 752-764 (2015) 査読有
9. **Yamano T, Sato E, Iguchi H, Fukuda Y, Fukuzawa H** "Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 112: 7315-7320 (2015) 査読有
10. 福澤秀哉「微細藻類における CO_2 濃縮機構と物質生産」 学術の動向 15(12):70-71 (2010)

藤井穂高（大阪大学）

1. Fujita T, Yuno M, Suzuki Y, Sugano S, and Fujii H, Identification of physical interactions between genomic regions by enChIP-Seq, bioRxiv, (2016), 036160; doi: http://dx.doi.org/10.1101/036160; 査読無

藤本 龍（神戸大学）

1. Takahiro Kawanabe, Kenji Osabe, Etsuko Itabashi, Keiichi Okazaki, Elizabeth S. Dennis, Ryo Fujimoto: Development of primer sets that can verify the enrichment of histone modifications and their application to examining the vernalization mediated chromatin changes in *Brassica rapa* L. Genes Genet. Syst. In press

藤原晴彦（東京大学）

1. Futahashi, R., Banno, Y. and Fujiwara, H.: Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene pre-patterning process: new evidence from *tan* and *laccase2*. *Evolution and Development,* 12 (2010) 157-167. 査読有

2. Shirataki, H. Futahashi, R. and Fujiwara, H. : Species-specific coordinated gene expression and *trans*-regulation of larval color pattern in three swallowtail butterflies. *Evolution and Development*, 12　(2010) 305-314.　査読有
3. Yamaguchi, J. Mizoguchi, T. and Fujiwara, H.: siRNAs induce eficient RNAi response in *Bombyx mori* embryos. *PLoS One* , 6, (2011) e25469 査読有
4. Ando, T., Kojima, T. and Fujiwara, H.: Dramatic changes in patterning gene expression during metamorphosis are associated with the formation of a feather-like antenna by the silk moth, *Bombyx mori*. *Dev. Biol*, 357 (2011) 53-63. 査読有
5. Futahashi R., Shirataki, H., Narita, T., Mita, K. and Fujiwara, H.: Microarray-based Comprehensive Analysis for Stage-specific Larval Camouflage Pattern-associated Genes in the Swallowtail Butterfly, *Papilio xuthus*. *BMC Biol*.10 (2012) e46. 査読有
6. Shirai, H., Kamimura, M. Yamaguchi, J., Imanishi, S., Kojima, T. and Fujiwara, H.: Two adjacent cis-regulatory elements are required for ecdysone response of *ecdysone receptor (EcR) B1* transcription. *PLoS One 7* (2012) e49348 査読有
7. Ando, T. and Fujiwara, H.: Electroporation mediated somatic transgenesis for rapid functional analysis in insects. *Development*, 140 (2013) 454-458 査読有
8. Yamaguchi, J. Yamamoto, K. Mita, K. Bannno, Y., Ando, T. and Fujiwara, H.: Periodic Wnt expression in response to ecdysteroid generates twin-spot markings on caterpillars. *Nat. Commun.* 4 (2013) e1857. 査読有
9. Nishikawa, H., Iga, M., Yamaguchi, J., Saito, K., Kataoka, H., Suzuki, Y., Sugano, S. and Fujiwara, H.: Molecular Basis of the wing coloration in a Batesian mimic butterfly, Papilio polytes. *Sci. Rep.* 3 (2013) e3184. 査読有
10. Yoda S., Yamaguchi J., Mita K., Yamamoto K., Banno Y., Ando T., Daimon T. and Fujiwara H.: The transcription factor apontic-like controls diverse coloration pattern in caterpillars. Nat. Commun. 5, 4936. (2014) doi: 10.1038/ncomms5936
11. Edayoshi M., Yamaguchi J. and Fujiwara H.: Protruding structures on caterpillar are controlled by ectopic Wnt1 expression. PLoS One 8 (2015) e0121736 査読有
12. Nishikawa H., Iijima T., Kajitani R., Yamaguchi J., Ando T., Suzuki Y., Sugano S., Fujiyama A., Kosugi S., Hirakawa H., Tabata S., Ozaki K., Morimoto H., Ihara, K. Obara M., Hori H., Itoh T. and Fujiwara H. A genetic mechanism for female-limited Batsian mimicry in Pupilio butterfly. *Nature Genetics* 47 (2015) 405-409. 査読有
13. 藤原晴彦 : 体表の紋様がまだらになるカイコ（1 枚の写真館）、細胞工学、29(2010) 415. 査読無
14. 藤原晴彦、山口淳一：擬態の一面をさぐるー昆虫の体表紋様形成の分子機構（生き物の不思議）、遺伝 64(2010)11-16. 査読無
15. 藤原晴彦 :特集複合適応形質進化の遺伝子基盤、特集に当たって、生物科学、63(2012)130. 査読無
16. 藤原晴彦：ホルモン応答を介した昆虫擬態紋様の進化、遺伝 67（2013）216-221. 査読無
17. 藤原晴彦：世代シーケンサーの現状を考える、生物科学 64（2013）177-179. 査読無
18. 藤原晴彦 : 特集「昆虫の色素・紋様形成」に当たって、蚕糸昆虫バイオテック 82（2013）3-4. 査読無
19. 藤原晴彦：アゲハチョウの擬態はどのように進化したのか、細胞工学「ゲノムで進化の謎を解く」33. No11（2014）1196-1200. 査読無
20. 藤原晴彦 : アゲハの擬態紋様、生体の科学「進化と発生からみた生命科学」、66（2015）267-271. 査読無
21. 藤原晴彦 : 雌だけが擬態するアゲハチョウの謎を探る、現代化学、533（2015）29－32. 査読無
22. 藤原晴彦：アゲハチョウの擬態のどのように進化したか、進化の謎をゲノムで解く（2015）106-113. 査読無

古澤 力（理化学研究所）

1. Horinouchi, T., Suzuki, S., Hirasawa, T., Ono, N., Yomo, T., Shimizu, H., Furusawa, C., Phenotypic convergence in bacterial adaptive evolution to ethanol stress, BMC Evol. Biol., 15 (2015), 180 査読有

古田芳一（マサチューセッツ工科大学）

1. Yoshikazu Furuta, Hiroe Namba-Fukuyo, Tomoko F. Shibata, Tomoaki Nishiyama, Shuji Shigenobu, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Mitsuyasu Hasebe, Ichizo Kobayashi. Methylome diversification through changes in DNA methyltransferase sequence specificity. PLoS Genet., 10(4):e1004272 (2014). 査読有

細道一善（金沢大学）

1. Hosomichi K, Mitsunaga S, Nagasaki H, Inoue I. A Bead-based Normalization for Uniform Sequencing depth (BeNUS) protocol for multi-samples sequencing exemplified by HLA-B. BMC Genomics、15、2014、465、査読有
2. Hosomichi K, Jinam TA, Mitsunaga S, Nakaoka H, Inoue I. Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing. BMC Genomics、14、2013、355、査読有

堀川幸男（岐阜大学）

1. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純、遺伝子異常による糖尿病、**糖尿病学** 西村書店 pp250-256, 2015 査読なし
2. 塩谷真由美、堀川幸男、武田 純、遺伝子異常による糖尿病、**最新臨床糖尿病学** 日本臨床 2015(印刷中)査読なし

本田賢也（慶應義塾大学）

1. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature. 2013;500(7461):232-236. 査読有り

前川清人（富山大学）

1. 林良信，杉目康広，箕浦るん，三浦徹，重信秀治，前川清人（2015）ヤマトシロアリのゲノム情報を防除に役立てるために．しろあり，164：2－11．査読無し

前田太郎（基礎生物学研究所）

1. 前田太郎, 重信秀治, エヌ ・ ティー ・ エス, 「共生研究における新しいゲノム科学的手法」生物の科学「遺伝」Vol. 67(4), 435-440, (2013), 5p
2. 前田太郎, (財)水産無脊椎動物研究所「嚢舌目ウミウシ、チドリミドリガイは野外で藻類から葉緑体を補充し続けている」うみうし通信 Vol. 80, 8-10, (2013) 2p

松岡雅雄（京都大学）

1. Keiko Yasuma, Jun-ichirou Yasunaga, Keiko Takemoto, Kenji Sugata, Norihiro Takenouchi,

Masanori Nakagawa, Yutaka Suzuki, and Masao Matsuoka. HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). PLoS Pathogens, 12(1), 2016, e1005372. (査読あり)

松尾隆嗣（東京大学）

1. Setoguchi, S., Kudo, A., Takanashi, T., Ishikawa, Y., and Matsuo, T. (2015). Social context-dependent modification of courtship behaviour in Drosophila prolongata. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 282, 20151377.
2. Kudo, A., Takamori, H., Watabe, H., Ishikawa, Y., and Matsuo, T. (2015). Variation in morphological and behavioral traits among isofemale strains of Drosophila prolongata (Diptera: Drosophilidae). Entomological Science 18, 221-229.
3. Yang, B., Ozaki, K., Ishikawa, Y., and Matsuo, T. (2015). Identification of Candidate Odorant Receptors in Asian Corn Borer Ostrinia furnacalis. Plos One 10, e0121261.
4. Fujii, T., Yasukochi, Y., Rong, Y., Matsuo, T., and Ishikawa, Y. (2015). Multiple Delta 11-desaturase genes selectively used for sex pheromone biosynthesis are conserved in Ostrinia moth genomes. Insect Biochemistry and Molecular Biology 61, 62-68.
5. Ohta, S., Seto, Y., Tamura, K., Ishikawa, Y., and Matsuo, T. (2015). Comprehensive identification of odorant-binding protein genes in the seed fly, Delia platura (Diptera: Anthomyiidae). Applied Entomology and Zoology 50, 457-463.
6. Sugimoto, T.N., Kayukawa, T., Matsuo, T., Tsuchida, T., and Ishikawa, Y. (2015). A short, high-temperature treatment of host larvae to analyze Wolbachia-host interactions in the moth Ostrinia scapulalis. Journal of Insect Physiology 81, 48-51.
7. Setoguchi, S., Takamori, H., Aotsuka, T., Sese, J., Ishikawa, Y., and Matsuo, T. (2014). Sexual dimorphism and courtship behavior in Drosophila prolongata. Journal of Ethology 32, 91-102.
8. Ohta, S., Seto, Y., Tamura, K., Ishikawa, Y., and Matsuo, T. (2014). Identification of odorant-binding protein genes expressed in the antennae and the legs of the onion fly, Delia antiqua (Diptera: Anthomyiidae). Applied Entomology and Zoology 49, 89-95.
9. Nagamine, K., Kayukawa, T., Hoshizaki, S., Matsuo, T., Shinoda, T., and Ishikawa, Y. (2014). Cloning, phylogeny, and expression analysis of the Broad-Complex gene in the longicorn beetle Psacothea hilaris. Springerplus 3, 539.
10. Harada, E., Nakagawa, J., Asano, T., Taoka, M., Sorimachi, H., Ito, Y., Aigaki, T., and Matsuo, T. (2012). Functional Evolution of Duplicated Odorant-Binding Protein Genes, Obp57d and Obp57e, in Drosophila. Plos One 7, e29710
11. Matsuo, T. (2012). Contribution of olfactory and gustatory sensations of octanoic acid in the oviposition behavior of Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae). Applied Entomology and Zoology 47, 137-142.
12. Tomioka, S., Aigaki, T., and Matsuo, T. (2012). Conserved cis-regulatory elements of two odorant-binding protein genes, Obp57d and Obp57e, in Drosophila. Genes & Genetic Systems 87, 323-329.
13. Mitaka, H., Matsuo, T., Miura, N., and Ishikawa, Y. (2011). Identification of odorant-binding protein genes from antennal expressed sequence tags of the onion fly, Delia antiqua. Molecular Biology Reports 38, 1787-1792.
14. Nakai, Y., Horiuchi, J., Tsuda, M., Takeo, S., Akahori, S., Matsuo, T., Kume, K., and Aigaki, T. (2011). Calcineurin and Its Regulator Sra/DSCR1 Are Essential for Sleep in Drosophila. Journal of Neuroscience 31, 12759-12766.
15. Takahasi, K.R., Matsuo, T., and Takano-Shimizu-Kouno, T. (2011). Two types of cis-trans compensation in the evolution of transcriptional regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 15276-15281.

松尾洋孝（防衛医科大学校）

1. H. Matsuo, K. Yamamoto, H. Nakaoka, A. Nakayama, M. Sakiyama, T. Chiba, A. Takahashi, T. Nakamura, H. Nakashima, Y. Takada, I. Danjoh, S. Shimizu, J. Abe, Y. Kawamura, S. Terashige, H. Ogata, S. Tatsukawa, G. Yin, R. Okada, E. Morita, M. Naito, A. Tokumasu, H. Onoue, K. Iwaya, T. Ito, T. Takada, K. Inoue, Y. Kato, Y. Nakamura, Y. Sakurai, H. Suzuki, Y. Kanai, T. Hosoya, N. Hamajima, I. Inoue, M. Kubo, K. Ichida, H. Ooyama, T. Shimizu, N. Shinomiya, Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Ann. Rheum. Dis.*, epub ahead of print (2015). （査読あり）
2. M. Sakiyama, H. Matsuo, S. Shimizu, H. Nakashima, T. Nakamura, A. Nakayama, T. Higashino, M. Naito, S. Suma, A. Hishida, T. Satoh, Y. Sakurai, T. Takada, K. Ichida, H. Ooyama, T. Shimizu, N. Shinomiya, The effects of URAT1/SLC22A12 nonfunctional variants, R90H and W258X, on serum uric acid levels and gout/hyperuricemia progression. *Sci. Rep.* (in press) (2016). （査読あり）
3. M. Sakiyama, H. Matsuo, Y. Takada, T. Nakamura, A. Nakayama, T. Takada, S. Kitajiri, K. Wakai, H. Suzuki, N. Shinomiya, Ethnic differences in ATP-binding cassette transporter, sub-family G, member 2 (ABCG2/BCRP): genotype combinations and estimated functions. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **29** (2014) 490-492. （査読あり）
4. A. Nakayama, H. Matsuo, H. Nakaoka, T. Nakamura, H. Nakashima, Y. Takada, Y. Oikawa, T. Takada, M. Sakiyama, S. Shimizu, Y. Kawamura, T. Chiba, J. Abe, K. Wakai, S. Kawai, R. Okada, T. Tamura, Y. Shichijo, A. Akashi, H. Suzuki, T. Hosoya, Y. Sakurai, K. Ichida, N. Shinomiya, Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. *Sci. Rep.* **4** (2014) 5227. （査読あり）
5. H. Matsuo, A. Nakayama, M. Sakiyama, T. Chiba, S. Shimizu, Y. Kawamura, H. Nakashima, T. Nakamura, Y. Takada, Y. Oikawa, T. Takada, H. Nakaoka, J. Abe, H. Inoue, K. Wakai, S. Kawai, Y. Guang, H. Nakagawa, T. Ito, K. Niwa, K. Yamamoto, Y. Sakurai, H. Suzuki, T. Hosoya, K. Ichida, T. Shimizu, N. Shinomiya, ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload. *Sci. Rep.* **4** (2014) 3755. （査読あり）
6. H. Matsuo, K. Ichida, T. Takada, A. Nakayama, H. Nakashima, T. Nakamura, Y. Kawamura, Y. Takada, K. Yamamoto, H. Inoue, Y. Oikawa, M. Naito, A. Hishida, K. Wakai, C. Okada, S. Shimizu, M. Sakiyama, T. Chiba, H. Ogata, K. Niwa, M. Hosoyamada, A. Mori, N. Hamajima, H. Suzuki, Y. Kanai, Y. Sakurai, T. Hosoya, T. Shimizu, N. Shinomiya, Common dysfunctional variants in *ABCG2* are a major cause of early-onset gout. *Sci. Rep.* **3** (2013) 2014. （査読あり）
7. 崎山真幸, 松尾洋孝: 若くして痛風を発症する遺伝子要因, 北隆館, BIO Clinica **30**, 2015, 493-496
8. 中山昌喜, 松尾洋孝, 高田龍平, 市田公美, 四ノ宮成祥:【日本が貢献した世界的新知見】ABCG2 と高尿酸血症, メディカルレビュー社, 高尿酸血症と痛風 **21**, 2013, 43-48

松下智直（九州大学）

1. *Shikata H, *Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, and Matsushita T "Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*"(*equal contribution) ***Proc Natl Acad Sci USA***（査読あり）111: 18781-18786 (2014)

松島綾美（九州大学）

1. Matsushima, A., Koyanagi, O.K., Nishimura, H., Inamine, S., Motomatsu, Y., and Shimohigashi. Y.: An *in silico* genomic search of endomorphin-like opioid peptides. *Peptide Science 2014*, 281-282 (2015). 査読有

丸山治彦（宮崎大学）

1. Hunt, V., Tsai, I. J., Coghlan, A., Reid, A. J., Holroyd, N., Foth, B. J., Tracey, A., Cotton, J. A., Stanley, E. J., Beasley, H., Bennett, H., Brooks, K., Harsha, B., Kajitani, R., Kulkarni, A., Harbecke, D., Nagayasu, E., Nichol, S., Ogura, Y., Quail, M. A., Randle, N., Xia, D., Brattig, N., Ribeiro, D. M., Sanchez-Flores, A., Hayashi, T., Itoh, T., Denver, D. R., Grant, W., Stoltzfus, J. D., Lok, J. B., Murayama, H., Wastling, J., Streit, A., Kikuchi, T., Viney, M., and Berriman, M. The Genomic Basis of Parasitism in the Strongyloides Clade of Nematodes. **Nature Genetics**, 2016 (in press)
2. Hino, A., Maruyama, H., and Kikuchi T. A novel method to assess the biodiversity of parasites using 18S rDNA Illumina sequencing; Parasitome analysis method. **Parasitology International**, 2016 (in press)
3. Tanaka, R., Hino, A., Tsai, I.J., Palomares-Rius, J.E., Yoshida, A., Ogura, Y., Hayashi, T., Maruyama, H. and Kikuchi, T. Assessment of Helminth Biodiversity in Wild Rats Using 18S rDNA Based Metagenomics. **PLoS ONE** 9, e110769, 2014
4. Hino, A., Tanaka, T., Takaishi, M., Fujii, Y., Palomares-Rius, J.E., Hasegawa, K., Maruyama, H. and Kikuchi, T. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite Strongyloides venezuelensis. **Parasitology** 141, 1736-1745, 2014
5. Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T, Itoh T. Efficient *de novo* assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. **Genome Res**. 24 (8): 1384-1395, 2014.
6. Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H. Identification of a bacteria-like ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an animal parasitic nematode. **PLoS One**. 8 (3): e58458, 2013
7. Nagayasu E, Ogura Y, Itoh T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H. Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitol Int**. 62 (1): 57-65, 2013

光永滋樹（東海大学）

1. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Exome sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the BTNL2. *J Hum Genet.* **58** (2013), 210-215. 査読有
2. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Oka A, Shiina T, Inoko H, Inoue I. Aggregation of rare/low-frequency variants of the mitochondria respiratory chain-related proteins in rheumatoid arthritis patients. *J Hum Genet*. **60** (2015), 449-454. 査読有

蓑田 歩（筑波大学）

1. 蓑田　歩 100% CO_2 という極限における光合成の「未知」化学と工業 68, 709−711 (2015) 査読無

三野享史（京都大学）

1. Mino, T., Murakawa, Y., Fukao, A., Vandenbon, A., Wessels, H.-H., Ori, D., Uehata, T., Tartey, S., Akira, S., Suzuki, Y., Vinuesa, C.G., Ohler, U., Standley, D.M., Landthaler, M., Fujiwara, T., Takeuchi, O. Regnase-1 and Roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. Cell 161, 1058-1073, 2015. 査読有り.
2. Mino, T., Takeuchi, O. Regnase-1 and Roquin regulate inflammatory mRNAs. Oncotarget 6, 17869-17870, 2015. 査読有り.

3. 三野享史, 竹内理. Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御. 『日薬理誌』(日本薬理学会誌出版部). 2016 年 6 月刊行予定.
4. 三野享史. Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御. 『臨床免疫・アレルギー科』(科学評論社). 2016 年 2 月刊行予定.

村上洋太（北海道大学）

1. Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. Suzuki, S.. Kato, H., Suzuki, Y., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Obuse, C., Nagao, K., Kimura, H., Takahata, S., Murakami, Y.: Nuc. Acid. Res. in press (2016) 査読有

守屋央朗（岡山大学）

1. Makanae K, Kintaka R, Ishikawa K, Moriya H., Small Toxic Protein Encoded on Chromosome VII of Saccharomyces cerevisiae., PLOS One. 2015;10(3):e0120678.

八木 健（大阪大学）

1. Arikuni Uchimura, Mayumi Higuchi, Yohei Minakuchi, Mizuki Ohno, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Ikuo Miura, Shigeharu Wakana, Jo Nishino, Takeshi Yagi : Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice: *Genome Research* 25(8), 2015, 1125-1134 査読有
2. Arikuni Uchimura, Yuichiro Hara, Yoichi Gondo, Yusaku Nakabeppu : International Symposium on “Germline Mutagenesis and Biodiversification” *Genes & Genetic Systems* 89, 2014, 93-95 査読有
3. 内村有邦 : 生殖系列の変異率と変異蓄積マウス系統 : 実験医学 : 33 (19), 2015, 3123-3126 査読なし
4. 内村有邦、八木健 : 集団遺伝学から考える脳の進化 : *Clinical Neuroscience* : Vol.33 8, 2015, 909-911 査読なし

山岡吉生（大分大学）

1. Binh TT, Suzuki R, Shiota S, Kwon DH, Yamaoka Y. Complete Genome Sequences of *Helicobacter pylori* Clarithromycin-Resistant Strains. Genome Announc. 2013 Nov 14;1(6). pii: e00912-13. 査読あり
2. Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. Infect Genet Evol. 2012 Mar;12(2):203-13. 査読あり
3. 鈴木留美子,*H. pylori* による人類進化の歴史推定,日本臨床,第 71 巻・第 8 号,2013, 1368-1373,査読無し
4. Sgouras DN, Trang TT, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter. 2015 Sep;20 Suppl 1:8-16. 査読あり
5. Uotani T, Miftahussurur M, Yamaoka Y. Effect of bacterial and host factors on *Helicobacter pylori* eradication therapy. Expert Opin Ther Targets. 2015 Aug 6:1-14 査読あり
6. Binh TT, Suzuki R, Trang TT, Kwon DH, Yamaoka Y. Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* using next-generation sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr;59(4):2343-8. 査読あり
7. Binh TT, Suzuki R, Kwon DH, Yamaoka Y. Complete Genome Sequence of a Metronidazole-Resistant *Helicobacter pylori* Strain. Genome Announc. 2015 Mar 12;3(2). pii: e00051-15. 査読あり
8. 山岡吉生, 化学療法の領域 30(10), 30-38, 2014, ヘリコバクター・ピロリとは何もの一病原性の歴史も含めて一, 査読なし

9. 山岡吉生, 化学療法の領域 30(5), 100-107, 2014, ヘリコバクター・ピロリの病原因子と分子疫学に関する研究, 査読なし

山口徹太郎（昭和大学）

1. Yamaguchi T, Nakaoka H, Yamamoto K, Fujikawa T, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Shibusawa T, Park SB, Maki K, Kimura R, Inoue I.Genome-wide association study of degenerative bony changes of the temporomandibular joint. Oral Dis, 20, 2014, 409-415. 査読の有
2. Haga S, Nakaoka H, Yamaguchi T, Yamamoto K, Kim YI, Samoto H, Ohno T, Katayama K, Ishida H, Park SB, Kimura R, Maki K, Inoue I.A genome-wide association study of third molar agenesis in Japanese and Korean populations. J Hum Genet, 58, 2013, 799-803. 査読の有

吉澤 晋（東京大学）

1. Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong and Kazuhiro Kogure (2014) Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111,(18), 6732-6737. （査読有）

吉田聡子（理化学研究所）

1. 吉田聡子、若竹崇雅、白須賢「遺伝子から見た根寄生植物の生存戦略」(2014) 植物の生長調節 vol. 49, 66-73 (査読なし)
2. Conn, C., Bythell-Douglas, R., Neumann, D., Yoshida, S., Whittington, B., Westwood, J.H., Shirasu, K., Bond, C.S., Dyer, K.A., Nelson, D.C. (2015) Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants. ***Science*** 349: 540-543. （査読あり）
3. Ichihashi, Y., Mutuku, J. M., Yoshida, S. and Shirasu, K. (2015) Transcriptomics exposes the uniqueness of parasitic plants. ***Brief. Func. Genomics*** 14:275-282. （査読あり）
4. Cui, S., Wakatake, T., Hashimoto, K. Saucet, S.B., Toyooka, K., Yoshida, S., Shirasu, K. (2016) Haustorial hairs are specialized root hairs that support parasitism in the facultative parasitic plant, *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Physiol. in press*.

和多和宏（北海道大学）

1. Mori C, Wada K., Audition-independent vocal crystallization associated with intrinsic developmental gene expression dynamics. Journal of Neuroscience. 35: (2015) 878-89. 査読有

渡部 裕（新潟大学）

1. Makita N, Yagihara N, Crotti L, Johnson CN, Beckmann BM, Roh MS, Shigemizu D, Lichtner P, Ishikawa T, Aiba T, Homfray T, Behr ER, Klug D, Denjoy I, Mastantuono E, Theisen D, Tsunoda T, Satake W, Toda T, Nakagawa H, Tsuji Y, Tsuchiya T, Yamamoto H, Miyamoto Y, Endo N, Kimura A, Ozaki K, Motomura H, Suda K, Tanaka T, Schwartz PJ, Meitinger T, Kaab S, Guicheney P, Shimizu W, Bhuiyan ZA, Watanabe H, Chazin WJ, George AL, Jr. Novel calmodulin mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility. Circulation. Cardiovascular genetics. 2014;7:466-474 査読有

（b）班員による支援高度化等の成果論文

加藤和人 & ELSI ユニット

1. Kazuto Kato, Kei Kano, Tetsuya Shirai, Science Communication: Significance for Genome-Based Personalized Medicine – A View from the Asia-Pacific, *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 8(2), pp.92-96, 2010.
2. 白井哲哉, 加藤和人,「ゲノム医学と社会」,『日本医師会雑誌』第 139 巻 第 3 号, pp.620, 2010.
3. 白井哲哉, 加藤和人,「ゲノム ELSI ユニットの新設」,『日本生命倫理学会ニューズレター』No.46, p.6, 2010.
4. 加藤和人,「ゲノムと社会・倫理」, 浅島誠／黒岩常祥／小原雄治編『現代生物科学入門 2 ゲノム科学の展開』, 岩波書店, pp.137−163, 2011.
5. 白井哲哉, 三成寿作, 加藤和人,「ゲノム研究における『研究ガバナンス』の構築」S8-1, Vol.32『日本遺伝カウンセリング学会誌』, p.46, 2011.
6. Jane Kaye, Eric M. Meslin, Bartha M. Knoppers, Eric T. Juengst, Mylène Deschênes, Anne Cambon-Thomsen, Donald Chalmers, Jantina De Vries, Kelly Edwards, Nils Hoppe, Alastair Kent, Clement Adebamowo, Patricia Marshall, Kazuto Kato, ELSI 2.0 for Genomics and Society, *Science*, 336, pp.673-674, 2012. 査読有
7. 加藤和人,「パーソナルゲノム解読の倫理的・社会的課題」, 霜田求／虫明茂責任編集『シリーズ生命倫理 第 12 巻 先端医療』, 丸善出版, pp.220-230, 2012.
8. 加藤和人,「社会の中の研究 −自由・倫理・ガバナンス」, 広田照幸他編『研究する大学−何のための知識か』(シリーズ大学), 岩波書店, pp.99−133、2013.
9. 加藤和人, 三成寿作「パーソナルゲノム研究の倫理的課題」,『BRAIN and NERVE』, Vol.65, pp.267-272, 2013.
10. 加藤和人,「バイオセキュリティへの取り組み－現場の科学者および多様な人々の参画と協働の必要性」, 四ノ宮成祥・川原直人編『生命科学とバイオセキュリティ—デュアルユース・ジレンマとその対応』, 東信堂、pp.209-214、2013.
11. 野村安以・吉澤剛「『ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針』の改定をめぐる批判的談話分析」,『年報科学・技術・社会』22 巻、pp.47-88、2013.
12. 吉澤剛「責任ある研究・イノベーション—ELSI を越えて」,『研究技術計画』28 巻 1 号、pp.106-121、2013.
13. 吉澤剛「生命科学技術のバイオセキュリティとガバナンス」, 四ノ宮成祥・川原直人編『生命科学とバイオセキュリティ—デュアルユース・ジレンマとその対応』, 東信堂、pp.181-208、2013.
14. Timothy Caulfield, Jim Evans, Amy McGuire, Christopher McCabe, Tania Bubela, Robert Cook-Deegan, Jennifer Fishman, Stuart Hogarth, Fiona A. Miller, Vardit Ravitsky, Barbara Biesecker, Pascal Borry, Mildred K Cho, June C. Carroll, Holly Etchegary, Yann Joly, Kazuto Kato, Sandra Soo-Jin lee, Karen Rothenberg, Pamela Sankar, Michael J. Szego, Pilar Ossorio, Daryl Pullman, Francois Rousseau, Wendy J. Ungar, Brenda Wilson. Reflections on the Cost of "Low-Cost" Whole Genome Sequencing: Framing the Health Policy Debate. *PLoS Biology*, 11(11) e1001699, 2013. 査読有
15. 三成寿作, 加藤和人,「パーソナルゲノム時代の研究ガバナンス」,『医薬ジャーナル』50 巻、pp.55-58、2014.
16. Go Yoshizawa, Calvin Wai-Loon Ho, Wei Zhu, Chingli Hu, Yoni Syukriani, Ilhak Lee, Hannah Kim, Daniel Fu Chang Tsai, Jusaku Minari, and Kazuto Kato. ELSI practices in genomic research in East Asia: implications for research collaboration and public participation, *Genome Medicine*, 6(5), pp.39, 2014. 査読有
17. 山本奈津子「ヒトゲノム情報は２１世紀の新しい石油となるか？—パーソナルゲノム時代の倫理的・法的・社会的課題」,『医学のあゆみ』第 251 巻 第３号, pp.207-212, 2014.

18. Minari J, Shirai T and Kato K. Ethical considerations of research policy for personal genome analysis: The approach of the Genome Science Project in Japan, 10:4 *Life Sciences, Society and Policy*, 2014.　査読有
19. Minari J, Chalmers D and Kato K. Return of Genetic Research Results: The Japanese Experience and its Implications for the International Debate. 11:2 *SCRIPTed*, pp.180-192, 2014. 査読有
20. 吉澤剛, 「医療情報の利用に関する政策の 20 年」, 『医学のあゆみ』, 251 巻 3 号, pp.213-218,
21. 2014.
22. 山本奈津子, 鈴木正朝, 川嶋実苗, 藤田卓仙,「個人の遺伝情報の保護における国レベルでのルール形成に向けた試論　―個人情報保護法とその改正法を中心に」,『医療・生命と倫理・社会』 第 12 号, pp. 115-123, 2015.
23. Natsuko Yamamoto, Minae Kawashima, Takanori Fujita, Masatomo Suzuki and Kazuto Kato. How should the legal framework for the protection of human genomic data be formulated?―Implications from the revision processes of the Act on the Protection of Personal Information (PPI Act).　*Journal of Human Genetics*, doi:10.1038/jhg.2014.121, 2015.　査読有
24. Kazuto Kato. Ethics of stem cell research – learning from human genome ELSI research, *Proceedings of Uehara-Carnegie-Oxford Conference*, 2015. (in press)

山本健

1. Nakatochi M, Ichihara S, Yamamoto K, Ohnaka K, Kato Y, Yokota S, Hirashiki A, Naruse K, Asano H, Izawa H, Matsubara T, Yokota M: Epigenome-wide association study suggests that SNPs in the promoter region of RETN influence plasma resistin level via effects on DNA methylation at neighboring sites. **Diabetologia** 2015; 58: 2781-2790. 査読あり
2. Kato N, Loh M, Takeuchi F, Verweij N, Wang X, Zhang W, Kelly TN, Saleheen D, Lehne B, Leach IM, Drong AW, Abbott J, Wahl S, Tan ST, Scott WR, Campanella G, Chadeau-Hyam M, Afzal U, Ahluwalia TS, Bonder MJ, Chen P, Dehghan A, Edwards TL, Esko T, Go MJ, Harris SE, Hartiala J, Kasela S, Kasturiratne A, Khor CC, Kleber ME, Li H, Mok ZY, Nakatochi M, Sapari NS, Saxena R, Stewart AF, Stolk L, Tabara Y, Teh AL, Wu Y, Wu JY, Zhang Y, Aits I, Da Silva Couto Alves A, Das S, Dorajoo R, Hopewell JC, Kim YK, Koivula RW, Luan J, Lyytikäinen LP, Nguyen QN, Pereira MA, Postmus I, Raitakari OT, Bryan MS, Scott RA, Sorice R, Tragante V, Traglia M, White J, Yamamoto K, Zhang Y, Adair LS, Ahmed A, Akiyama K, Asif R, Aung T, Barroso I, Bjonnes A, Braun TR, Cai H, Chang LC, Chen CH, Cheng CY, Chong YS, Collins R, Courtney R, Davies G, Delgado G, Do LD, Doevendans PA, Gansevoort RT, Gao YT, Grammer TB, Grarup N, Grewal J, Gu D, Wander GS, Hartikainen AL, Hazen SL, He J, Heng CK, Hixson JE, Hofman A, Hsu C, Huang W, Husemoen LL, Hwang JY, Ichihara S, Igase M, Isono M, Justesen JM, Katsuya T, Kibriya MG, Kim YJ, Kishimoto M, Koh WP, Kohara K, Kumari M, Kwek K, Lee NR, Lee J, Liao J, Lieb W, Liewald DC, Matsubara T, Matsushita Y, Meitinger T, Mihailov E, Milani L, Mills R, Mononen N, Müller-Nurasyid M, Nabika T, Nakashima E, Ng HK, Nikus K, Nutile T, Ohkubo T, Ohnaka K, Parish S, Paternoster L, Peng H, Peters A, Pham ST, Pinidiyapathirage MJ, Rahman M, Rakugi H, Rolandsson O, Rozario MA, Ruggiero D, Sala CF, Sarju R, Shimokawa K, Snieder H, Sparsø T, Spiering W, Starr JM, Stott DJ, Stram DO, Sugiyama T, Szymczak S, Tang WH, Tong L, Trompet S, Turjanmaa V, Ueshima H, Uitterlinden AG, Umemura S, Vaarasmaki M, van Dam RM, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, Viikari JS, Waldenberger M, Wang Y, Wang A, Wilson R, Wong TY, Xiang YB, Yamaguchi S, Ye X, Young RD, Young TL, Yuan JM, Zhou X, Asselbergs FW, Ciullo M, Clarke R, Deloukas P, Franke A, Franks PW, Franks S, Friedlander Y, Gross MD, Guo Z, Hansen T, Jarvelin MR, Jørgensen T, Jukema JW, Kähönen M, Kajio H,

Kivimaki M, Lee JY, Lehtimäki T, Linneberg A, Miki T, Pedersen O, Samani NJ, Sørensen TI, Takayanagi R, Toniolo D; BIOS-consortium; CARDIo GRAMplusCD; LifeLines Cohort Study; InterAct Consortium, Ahsan H, Allayee H, Chen YT, Danesh J, Deary IJ, Franco OH, Franke L, Heijman BT, Holbrook JD, Isaacs A, Kim BJ, Lin X, Liu J, März W, Metspalu A, Mohlke KL, Sanghera DK, Shu XO, van Meurs JB, Vithana E, Wickremasinghe AR, Wijmenga C, Wolffenbuttel BH, Yokota M, Zheng W, Zhu D, Vineis P, Kyrtopoulos SA, Kleinjans JC, McCarthy MI, Soong R, Gieger C, Scott J, Teo YY, He J, Elliott P, Tai ES, van der Harst P, Kooner JS, Chambers JC: Trans-ancestry genome-wide association study identifies 12 genetic loci influencing blood pressure and implicates a role for DNA methylation. **Nat Genet.** 2015; 47: 1282-1293. 査読有り

3. Fares-Taie L, Gerber S, Tawara A, Ramirez-Miranda A, Douet JY, Verdin H, Guilloux A, Zenteno JC, Kondo H, Moisset H, Passet B, Yamamoto K, Iwai M, Tanaka T, Nakamura Y, Kimura W, Bole-Feysot C, Vilotte M, Odent S, Vilotte JL, Munnich A, Regnier A, Chassaing N, De Baere E, Raymond-Letron I, Kaplan J, Calvas P, Roche O, Rozet JM: Submicroscopic deletions at 13q32.1 cause congenital microcoria. **Am J Hum Genet.** 2015; 96: 631-639. 査読有り
4. He M, Xu M, Zhang B, Liang J, Chen P, Lee JY, Johnson TA, Li H, Yang X, Dai J, Liang L, Gui L, Qi Q, Huang J, Li Y, Adair LS, Aung T, Cai Q, Cheng CY, Cho MC, Cho YS, Chu M, Cui B, Gao YT, Go MJ, Gu D, Gu W, Guo H, Hao Y, Hong J, Hu Z, Hu Y, Huang J, Hwang JY, Ikram MK, Jin G, Kang DH, Khor CC, Kim BJ, Kim HT, Kubo M, Lee J, Lee J, Lee NR, Li R, Li J, Liu J, Longe J, Lu W, Lu X, Miao X, Okada Y, Ong RT, Qiu G, Seielstad M, Sim X, Song H, Takeuchi F, Tanaka T, Taylor PR, Wang L, Wang W, Wang Y, Wu C, Wu Y, Xiang YB, Yamamoto K, Yang H, Liao M, Yokota M, Young T, Zhang X, Kato N, Wang QK, Zheng W, Hu FB, Lin D, Shen H, Teo YY, Mo Z, Wong TY, Lin X, Mohlke KL, Ning G, Tsunoda T, Han BG, Shu XO, Tai ES, Wu T, Qi L. Meta-analysis of genome-wide association studies of adult height in East Asians identifies 17 novel loci. **Hum Mol Genet.** 2015; 24: 1791-1800. 査読有り
5. Sato T, Nakagome S, Watanabe C, Yamaguchi K, Kawaguchi A, Koganebuchi K, Haneji K, Yamaguchi T, Hanihara T, Yamamoto K, Ishida H, Mano S, Kimura R, Oota H: Genome-Wide SNP Analysis Reveals Population Structure and Demographic History of the Ryukyu Islanders in the Southern Part of the Japanese Archipelago. **Mol Biol Evol.** 2014; 31: 2929-2940. 査読有り
6. Wen W, Zheng W, Okada Y, Takeuchi F, Tabara Y, Hwang JY, Dorajoo R, Li H, Tsai FJ, Yang X, He J, Wu Y, He M, Zhang Y, Liang J, Guo X, Sheu WH, Delahanty R, Guo X, Kubo M, Yamamoto K, Ohkubo T, Go MJ, Liu JJ, Gan W, Chen CC, Gao Y, Li S, Lee NR, Wu C, Zhou X, Song H, Yao J, Lee IT, Long J, Tsunoda T, Akiyama K, Takashima N, Cho YS, Ong RT, Lu L, Chen CH, Tan A, Rice TK, Adair LS, Gui L, Allison M, Lee WJ, Cai Q, Isomura M, Umemura S, Kim YJ, Seielstad M, Hixson J, Xiang YB, Isono M, Kim BJ, Sim X, Lu W, Nabika T, Lee J, Lim WY, Gao YT, Takayanagi R, Kang DH, Wong TY, Hsiung CA, Wu IC, Juang JM, Shi J, Choi BY, Aung T, Hu F, Kim MK, Lim WY, Wang TD, Shin MH, Lee J, Ji BT, Lee YH, Young TL, Shin DH, Chun BY, Cho MC, Han BG, Hwu CM, Assimes TL, Absher D, Yan X, Kim E, Kuo JZ, Kwon S, Taylor KD, Chen YD, Rotter JI, Qi L, Zhu D, Wu T, Mohlke KL, Gu D, Mo Z, Wu JY, Lin X, Miki T, Tai ES, Lee JY, Kato N, Shu XO, Tanaka T: Meta-analysis of genome-wide association studies in East Asian-ancestry populations identifies four new loci for body mass index. **Hum Mol Genet.** 2014; 23: 5492-5504. 査読有り
7. Chen P, Takeuchi F, Lee JY, Li H, Wu JY, Liang J, Long J, Tabara Y, Goodarzi MO, Pereira MA, Kim YJ, Go MJ, Stram DO, Vithana E, Khor CC, Liu J, Liao J, Ye X, Wang Y, Lu L, Young TL, Lee J, Thai AC, Cheng CY, van Dam RM, Friedlander Y, Heng CK, Koh WP, Chen CH, Chang LC, Pan WH, Qi Q, Isono M, Zheng W, Cai Q, Gao Y, Yamamoto K, Ohnaka K, Takayanagi R, Kita Y, Ueshima H, Hsiung CA, Cui J, Huey-Herng Sheu W, Rotter JI, Chen YD, Hsu C, Okada Y, Kubo M, Takahashi A, Tanaka T, van Rooij FJ, Ganesh SK, Huang J, Huang T; Hematology

CHARGE Group Working, Gross MD, Assimes TL, Miki T, Shu XO, Qi L, Chen YT, Lin X, Aung T, Wong TY, Teo YY, Kim BJ, Kato N, Tai ES: Multiple non-glycemic genomic loci are newly associated with blood level of glycated hemoglobin in east asians. **Diabetes** 2014; 63: 2551-2562. 査読有り

8. DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium; Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium; South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium; Mexican American Type 2 Diabetes (MAT2D) Consortium; Type 2 Diabetes Genetic Exploration by Nex-generation sequencing in muylti-Ethnic Samples (T2D-GENES) Conrortium: Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. **Nat Genet.** 2014; 46: 234-244. 査読有り
9. Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, Nakatochi M, Chiu YF, Park EJ, Wen W, Adair LS, Borja JB, Cai Q, Chang YC, Chen P, Croteau-Chonka DC, Fogarty MP, Gan W, He CT, Hsiung CA, Hwu CM, Ichihara S, Igase M, Jo J, Kato N, Kawamoto R, Kuzawa CW, Lee JJ, Liu J, Lu L, McDade TW, Osawa H, Sheu WH, Teo Y, Vadlamudi S, van Dam RM, Wang Y, Xiang YB, Yamamoto K, Ye X, Young TL, Zheng W, Zhu J, Shu XO, Shin C, Jee SH, Chuang LM, Miki T, Yokota M, Lin X, Mohlke KL, Tai ES: A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin level in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. **Hum Mol Genet.** 23: 1108-1119, 2014. 査読有り
10. Ichihara S, Yamamoto K, Asano H, Nakatochi M, Sukegawa M, Ichihara G, Izawa H, Hirashiki A, Takatsu F, Umeda H, Iwase M, Inagaki H, Hirayama H, Sone T, Nishigaki K, Minatoguchi S, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Tada-Oikawa S, Kitajima H, Matsubara T, Sunagawa K, Shimokawa H, Kimura A, Lee JY, Murohara T, Inoue I, Yokota M: Identification of a Glutamic Acid Repeat Polymorphism of ALMS1 as a Novel Genetic Risk Marker for Early-Onset Myocardial Infarction by Genome-Wide Linkage Analysis. **Circ Cardiovasc Genet.** 6: 569-578, 2013. 査読有り
11. Ling H, Spizzo R, Atlasi Y, Nicoloso M, Shimizu M, Redis RS, Nishida N, Gafà R, Song J, Guo Z, Ivan C, Barbarotto E, De Vries I, Zhang X, Ferracin M, Churchman M, van Galen JF, Beverloo BH, Shariati M, Haderk F, Estecio MR, Garcia-Manero G, Patijn GA, Gotley DC, Bhardwaj V, Shureiqi I, Sen S, Multani AS, Welsh J, Yamamoto K, Taniguchi I, Song MA, Gallinger S, Casey G, Thibodeau SN, Le Marchand L, Tiirikainen M, Mani SA, Zhang W, Davuluri RV, Mimori K, Mori M, Sieuwerts AM, Martens JW, Tomlinson I, Negrini M, Berindan-Neagoe I, Foekens JA, Hamilton SR, Lanza G, Kopetz S, Fodde R, Calin GA: CCAT2, a novel noncoding RNA mapping to 8q24, underlies metastatic progression and chromosomal instability in colon cancer. **Genome Res.** 23: 1446-1461, 2013. 査読有り
12. Takeuchi F, Yokota M, Yamamoto K, Nakashima E, Katsuya T, Asano H, Isono M, Nabika T, Sugiyama T, Fujioka A, Awata N, Ohnaka K, Nakatochi M, Kitajima H, Rakugi H, Nakamura J, Ohkubo T, Imai Y, Shimamoto K, Yamori Y, Yamaguchi S, Kobayashi S, Takayanagi R, Ogihara T, Kato N: Genome-wide association study of coronary artery disease in the Japanese. **Eur J Hum Genet.** 20: 333-340, 2012. 査読有り
13. Wen W, Cho YS, Zheng W, Dorajoo R, Kato N, Qi L, Chen CH, Delahanty RJ, Okada Y, Tabara Y, Gu D, Zhu D, Haiman CA, Mo Z, Gao YT, Saw SM, Go MJ, Takeuchi F, Chang LC, Kokubo Y, Liang J, Hao M, Le Marchand L, Zhang Y, Hu Y, Wong TY, Long J, Han BG, Kubo M, Yamamoto K, Su MH, Miki T, Henderson BE, Song H, Tan A, He J, Ng DP, Cai Q, Tsunoda T, Tsai FJ, Iwai N, Chen GK, Shi J, Xu J, Sim X, Xiang YB, Maeda S, Ong RT, Li C, Nakamura Y, Aung T, Kamatani N, Liu JJ, Lu W, Yokota M, Seielstad M, Fann CS; The Genetic Investigation of ANthropometric Traits (GIANT) Consortium, Wu JY, Lee JY, Hu FB, Tanaka T, Tai ES, Shu XO: Meta-analysis identifies common variants associated with body mass index in east Asians. **Nat Genet.** 44: 307-311, 2012. 査読有り
14. Cho YS, Chen CH, Hu C, Long J, Ong RTH, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yamauchi T,

Chang YC, Kwak SH, Ma R, Yamamoto K, Adair LS, Aung T, Cai Q, Chang LC, Chen YT, Gao Y, Hu FB, Kim HL, Kim S, Kim YJ, Lee J, Lee N, Li Y, Liu J, Lu W, Nakamura J, Nakashima E, Ng DPK, Tay WT, Tsai FJ, Wong TY, Yokota M, Zheng W, Zhang R, Wang C, So WY, Ohnaka K, Ikegami H, Hara K, Cho YM, Cho N, Chang TJ, Bao Y, Hedman A, Morris A, McCarthy M, DIAGRAM CONSORTIUM, MuTHER consortium, Takayanagi R, Park KS, Jia W, Chuang LM, Chan J, Maeda S, Kadowaki T, Lee JY, Wu JY, Teo YY, Tai ES, Shu XO, Mohlke K, Kato N, Han BG, Seielstad M: East Asian Genome-Wide Association Meta-Analysis Identifies 8 New Loci for Type 2 Diabetes. **Nat Genet.** 44: 67-72, 2012. 査読有り

15. Kato N, Takeuchi F, Tabara Y, Kelly TN, Go MJ, Sim X, Tay WT, Chen CH, Zhang Y, Yamamoto K, Katsuya T, Yokota M, Kim YJ, Ong RT, Nabika T, Gu D, Chang LC, Kokubo Y, Huang W, Ohnaka K, Yamori Y, Nakashima E, Jaquish CE, Lee JY, Seielstad M, Isono M, Hixson JE, Chen YT, Miki T, Zhou X, Sugiyama T, Jeon JP, Liu JJ, Takayanagi R, Kim SS, Aung T, Sung YJ, Zhang X, Wong TY, Han BG, Kobayashi S, Ogihara T, Zhu D, Iwai N, Wu JY, Teo YY, Tai ES, Cho YS, He J: Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. **Nat Genet.** 43: 531-538, 2011. 査読有り
16. Kukita Y, Yahara K, Tahira T, Higasa K, Sonoda M, Yamamoto K, Kato K, Wake N, Hayashi K: A definitive haplotype map as determined by genotyping duplicated haploid genomes finds a predominant haplotype preference at copy number variation events. **Am J Hum Genet.** 86: 918-928, 2010. 査読有り
17. Takeuchi F, Isono M, Katsuya T, Yamamoto K, Yokota M, Sugiyama T, Nabika T, Fujioka A, Ohnaka K, Nakatochi M, Yamori Y, Yamaguchi S, Kobayashi S, Takayanagi R, Ogihara T, Kato N: Blood pressure and hypertension are associated with seven loci in the Japanese population. **Circulation** 121: 2302-2309, 2010. 査読有り

情報解析支援班

黒川顕

1. Mori, H., Maruyama, F., and Kurokawa, K. VITCOMIC: visualization tool for taxonomic compositions of microbial communities based on 16S rRNA gene sequences., *BMC Bioinfo*., 11:332, 2010.査読あり
2. Tsuda M, Fujiyama A, Kurokawa K (2011) Metagenomic analysis of response of soil microbiota to environmental change. *Genes Genet. Syst.*, 86:404-404. 査読あり
3. Suzuki S, Ishida T, Kurokawa K, Akiyama Y (2012) GHOSTM: A GPU-accelerated homology search tool for metagenomics. *PLoS one*, 7(5):e36060., doi: 10.1371/journal.pone.0036060 査読あり
4. Sawabe T, Ogura Y, Matsumura Y, Gao F, Amin A, Mino S, Nakagawa S, Sawabe T, Kumar R, Fukui Y, Satomi M, Matsushima R, Thompson F, Gomez-Gil B, Christen R, Maruyama F, Kurokawa K, Hayashi T (2013) Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: Proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov.. *Frontiers in Aquatic Microbiol*. 4:1-14. 10.3389/fmicb.2013.00414 査読あり
5. Yano M, Mori H, Akiyama Y, Yamada T, Kurokawa K (2014) CLAST: CUDA implemented large-scale alignment search tool. *BMC Bioinfo*., 15:406. doi:10.1186/s12859-014-0406-y 査読あり
6. Wang T, Mori H, Zhang C, Kurokawa K, Xing XH, Yamada T (2015) DomSign: a top-down annotation pipeline to enlarge enzyme space in the protein universe. *BMC Bioinfo*., 16:96. doi: 10.1186/s12859-015-0499-y 査読あり
7. Uchiyama T, Irie M, Mori H, Kurokawa K, Yamada T (2015) FuncTree: Functional analysis and visualization for large-scale omics data. *PLoS One*, 10(5): e0126967, doi: 10.1371/journal.pone.0126967. 査読あり

8. 黒川顕(2011) 微生物統合データベース”MicrobeDB.JP”, 細胞工学, vol.30, No.12. 査読無し
9. 森宙史, 山田拓司, 黒川顕(2012)メタゲノム解析の現状と将来, 情報管理, 55(3):167-175. 査読無し
10. 森宙史，山田拓司，黒川顕（2013）ヒトメタゲノムの大規模コホート研究，生物の科学「遺伝」，67(3):279-282. 査読無し

伊藤武彦

1. Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T, Itoh T. (2014) Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads., *Genome Res.*, 24(8):1384-95. doi: 10.1101/gr.170720.113. (査読有)

中村保一

2. Bowman JL, Araki T, Arteaga-Vazquez MA, Berger F, Dolan L, Haseloff J, Ishizaki K, Kyozuka J, Lin SS, Nagasaki H, Nakagami H, Nakajima K, Nakamura Y, Ohashi-Ito K, Sawa S, Shimamura M, Solano R, Tsukaya H, Ueda T, Watanabe Y, Yamato KT, Zachgo S, Kohchi T. (2015) The naming of names: guidelines for gene nomenclature in Marchantia. *Plant Cell Physiol.,* pii: pcv193.（査読有）
3. Mashima J, Kodama Y, Kosuge T, Fujisawa T, Katayama T, Nagasaki H, Okuda Y, Kaminuma E, Ogasawara O, Okubo K, Nakamura Y, Takagi T. (2015) DNA data bank of Japan (DDBJ) progress report. *Nucleic Acids Res.,* pii: gkv1105. （査読有）
4. Kobayashi M, Nagasaki H, Garcia V, Just D, Bres C, Mauxion JP, Le Paslier MC, Brunel D, Suda K, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Toyoshima H, Suzuki T, Igarashi K, Rothan C, Kaminuma E, Nakamura Y, Yano K, Aoki K. (2014) Genome-Wide Analysis of Intraspecific DNA Polymorphism in ‘Micro-Tom’, a Model Cultivar of Tomato *(Solanum lycopersicum)*. *Plant Cell Physiol.,* 55(2): 445-454 doi: 10.1093/pcp/pct181. （査読有）
5. Iida N, Yamao F, Nakamura Y, Iida T. (2014) Mudi, a web tool for identifying mutations by bioinformatics analysis of whole-genome sequence. *Genes to Cells,* 19(6): 517-527. doi: 10.1111/gtc.12151. （査読有）
6. Nagasaki H, Mochizuki T, Kodama Y, Saruhashi S, Morizaki S, Sugawara H, Ohyanagi H, Kurata N, Okubo K, Takagi T, Kaminuma E, Nakamura Y. (2013) DDBJ Read Annotation Pipeline: A Cloud Computing-Based Pipeline for High-Throughput Analysis of Next-Generation Sequencing Data. *DNA Res.,* 20(4): 383-390. doi: 10.1093/dnares/dst017. （査読有）

平川英樹

1. Kosugi S, Hirakawa H, Tabata S. (2015) GMcloser: closing gaps in assemblies accurately with a likelihood-based selection of contig or long-read alignments. Bioinformatics, 31(23):3733-41. doi: 10.1093/bioinformatics/btv465.（査読あり）

岩崎渉

1. Kumagai Y, Yoshizawa S, Oshima K, Hattori M, Iwasaki W, Kogure K (2014) Complete genome sequence of Winogradskyella sp. strain PG-2, a proteorhodopsin-containing marine flavobacterium, Genome Announc., 2:e00490-14. doiI: 10.1128/genomeA.00490-14. （査読有）
2. Hirase S, Ozaki H, Iwasaki W (2014) Parallel selection on gene copy number variations through evolution of three-spined stickleback genomes, *BMC Genomics,* 15:735. doi:

10.1186/1471-2164-15-735. （査読有）
3. 尾崎遼，岩崎渉 (2014) NGS データ解析，実験医学，32:3197-202. （総説、査読無）
4. Ishizu H, Iwasaki YW, Hirakata S, Ozaki H, Iwasaki W, Siomi H, Siomi MC (2015) Somatic primary piRNA biogenesis driven by cis-acting RNA elements and trans-acting Yb, *Cell Rep.*, 12:429-40. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.035. （査読有）
5. Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh M, Iwasaki W (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species, *Roy. Soc. Open Sci.,* 2:150088. doi: 10.1098/rsos.150088. （査読有）
6. Takashima M, Manabe R, Iwasaki W, Ohyama A, Ohkuma M, Sugita T (2015) Selection of orthologous genes for construction of a highly resolved phylogenetic tree and clarification of the phylogeny of Trichosporonales species, *PLOS ONE*, 10:e0131217. doi: 10.1371/journal.pone.0131217. （査読有）
7. 岩崎由香, 岩崎渉 (2015) ncRNA のバイオインフォマティクス解析, 実験医学, 33:3379-84. （総説、査読無）
8. 岩崎渉，佐藤行人，源利文，山中裕樹，荒木仁志，宮正樹 (2015) 環境 DNA 解析のインパクト，実験医学，34:103-7. （総説、査読無）
9. Ozaki H, Iwasaki W (2016) MOCCS: clarifying DNA-binding motif ambiguity using ChIP-Seq data, *Comput. Biol. Chem.*, in press. （査読有）
10. Hiraoka S, Machiyama A, Ijichi M, Inoue K, Oshima K, Hattori M, Yoshizawa S, Kogure K, and Iwasaki W (2016) Genomic and metagenomic analysis of microbes in a soil environment affected by the 2011 Great East Japan Earthquake Tsunami, *BMC Genomics,* in press.（査読有）

森下真一

1. Nakatani Y, Mello CC, Hashimoto S, Shimada A, Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Yoshimura J, Suzuki Y, Sugano S, Takeda H, Fire A, Morishita S. (2015). Associations between nucleosome phasing, sequence asymmetry, and tissue-specific expression in a set of inbred Medaka species. *BMC Genomics*, *16*(1), 978. 査読有
2. Ichikawa, K., Morishita, S. (2015). A linear time algorithm for detecting long genomic regions enriched with a specific combination of epigenetic states. *BMC Genomics*, 16(Suppl 2), S8. 査読有
3. Yamashita S, Mori A, Nishida Y, Kurisaki R, Tawara N, Nishikami T, Misumi Y, Ueyama H, Imamura S, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higuchi I, Morishita S, Yoshimura J, Uchino M, Takashima H, Tsuji S, Ando Y. (2015). Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(3), 391–398. 査読有
4. Koichiro Doi, Taku Monjo, Pham H. Hoang, Jun Yoshimura, Hideaki Yurino, Jun Mitsui, Hiroyuki Ishiura, Yuji Takahashi, Yaeko Ichikawa, Jun Goto, Shoji Tsuji, Shinichi Morishita (2014) Rapid detection of expanded short tandem repeats in personal genomics using hybrid sequencing. *Bioinformatics* 30(6): 815-822 査読有
5. Kazuki Ichikawa, Shinichi Morishita (2014) A Simple but Powerful Heuristic Method for Accelerating k-Means Clustering of Large-Scale Data in Life Science. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biology Bioinform.* 11(4): 681-692 査読有
6. Nishimura T, Herpin A, Kimura T, Hara I, Kawasaki T, Nakamura S, Yamamoto Y, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Tsukahara T, Kobayashi S, Naruse K, Shigenobu S, Sakai N, Schartl M, Tanaka M. (2014). Analysis of a novel gene, Sdgc, reveals sex chromosome-dependent differences of medaka germ cells prior to gonad formation. *Development*, 141(17), 3363–3369. 査読有

7. Isojima T, Doi K, Mitsui J, Oda Y, Tokuhiro E, Yasoda A, Yorifuji T, Horikawa R, Yoshimura J, Ishiura H, Morishita S, Tsuji S, Kitanaka S. (2014). A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny-Caffey syndrome type 2. Journal of Bone and Mineral Research : *The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 29(4), 992–998. 査読有
8. Saito TL, Hashimoto SI, Gu SG, Morton JJ, Stadler M, Blumenthal T, Fire A, Morishita S. The Transcription Start Site Landscape of *C. elegans*. *Genome Research* 23(8):1348-61 (2013) 査読有
9. Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S. (2013). Erbb4 mutations that disrupt the neuregulin-erbb4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *American Journal of Human Genetics*, 93(5), 900–905. 査読有
10. Zhao, Q., Zhu, Z., Kasahara, M., Morishita, S., Zhang, Z. (2013). Segmental duplications in the silkworm genome. *BMC Genomics*, 14(1), 521. 査読有
11. Ichikawa Y, Ishiura H, Mitsui J, Takahashi Y, Kobayashi S, Takuma H, Kanazawa I, Doi K, Yoshimura J, Morishita S, Goto J, Tsuji S. (2013). Exome analysis reveals a Japanese family with spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 1. *Journal of the Neurological Sciences*, 331(1-2), 158–60. 査読有
12. Ishikawa T, Okada T, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kamei Y, Shigenobu S, Tanaka M, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Toyoda A, Sakaki Y, Taniguchi Y, Takeda S, Mori K. (2013). ATF6α/β-mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish-Supplemental material. *Molecular Biology of the Cell*, 24(9), 1387–95. 査読有
13. Hashimoto S, Ogoshi K, Sasaki A, Abe J, Qu W, Nakatani Y, Ahsan B, Oshima K, Shand FH, Ametani A, Suzuki Y, Kaneko S, Wada T, Hattori M, Sugano S, Morishita S, Matsushima K. (2013). Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells. *J Immunol,* 190(8), 4076–4091. 査読有
14. Qu W, Hashimoto S, Shimada A, Nakatani Y, Ichikawa K, Saito TL, Ogoshi K, Matsushima K, Suzuki Y, Sugano S, Takeda H, Morishita S. (2012) Genome-wide genetic variations are highly correlated with proximal DNA methylation patterns. *Genome Research*, 22(8):1419-25 査読有
15. Ogoshi, K., Hashimoto, S., Nakatani, Y., Qu, W., Oshima, K., Tokunaga, K., Sugano, S., Hattori, M., *Morishita, S*., Matsushima, K. (2011). Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics*, *98*(4), 280–287. 査読有
16. Funakoshi, M., Tsuda, M., Muramatsu, K., Hatsuda, H., Morishita, S., Aigaki, T. (2011). A gain-of-function screen identifies wdb and lkb1 as lifespan-extending genes in Drosophila. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *405*(4), 667–72. 査読有
17. Kuroshu, R. M., Watanabe, J., Sugano, S., Morishita, S., Suzuki, Y., Kasahara, M. (2010). Cost-Effective Sequencing of Full-Length cDNA Clones Powered by a De Novo-Reference Hybrid Assembly. *PLoS ONE*, *5*(5), e10517. 査読有
18. Hongyan Wu, Taro L Saito, Shinichi Morishita. (2010) Accelerating Path-free XML Queries in RDBMS. *IPSJ Online Transactions*. Vol. 3, pp.206-217 査読有
19. 森下真一 「次世代高速シークエンサーの特性と情報処理」蛋白質核酸酵素 Vol.54, No.10 (2009)
20. 森下真一 「生命情報学-ゲノム情報ビッグバンの進展-」情報処理 Vol.51 No.6 (2010)
21. 森下真一 「第三世代シークエンサー」医学のあゆみ Vol.236, No.6 (2011)
22. 森下真一「パーソナルゲノムインフォマテイクス」実験医学 Vol.31, No.15 (2013)
23. 森下真一 「個人ゲノム解析のためのゲノムインフォマティクス」遺伝子医学 MOOK 別冊 シリーズ：最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング（印刷中）

24. 森下真一　「PacBio 1 分子実時間シーケンシングによるゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノム解析」羊土社　実験医学（印刷中）

浅井潔

1. Junichi Iwakiri, Michiaki Hamada, Kiyoshi Asai (2015) Bioinformatics tools for lncRNA research. ***Biochimica et biophysica acta (BBA) Gene Regulatory Mechanisms*** Available online 10 August 2015. doi:10.1016/j.bbagrm.2015.07.014 （査読あり）
2. Tsutomu Ikegami, Toyohiro Inatsugi, Isao Kojima, Myco Umemura, Hiroko Hagiwara, Masayuki Machida, Kiyoshi Asai (2015)　Hybrid De Novo Genome Assembly Using MiSeq and SOLiD Short Read Data. ***PLoS ONE*** 10(4): e0126289. DOI: 10.1371/journal.pone.0126289 （査読あり）
3. Michiaki Hamada, Yukiteru Ono, Ryohei Fujimaki, Kiyoshi Asai (2015)　Learning chromatin states with factorized information criteria. ***Bioinformatics*** 31(15) 2426-2433. doi: 10.1093/bioinformatics/btv163（査読あり）
4. Haruka Yonemoto, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada (2015) A semi-supervised learning approach for RNA secondary structure prediction. ***Computational biology and chemistry*** 57. 72-79. （査読あり）
5. Ryota Mori1, Michiaki Hamada, Kiyoshi Asai (2014) Efficient calculation of exact probability distributions of integer features on RNA secondary structures, ***BMC Genomics***, 15(Suppl 10):S6 . doi:10.1186/1471-2164-15-S10-S6（査読あり）
6. Edward Wijaya, Kana Shimizu, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada (2014)　Reference-free prediction of rearrangement breakpoint reads. ***Bioinformatics*** 30: 18.　2559-2567（査読あり）
7. Tsukasa Fukunaga, Haruka Ozaki, Goro Terai, Kiyoshi Asai, Wataru Iwasaki, Hisanori Kiryu (2014)　CapR: revealing structural specificities of RNA-binding protein target recognition using CLIP-seq data. ***Genome biology*** 15: 1. （査読あり）
8. Junichi Iwakiri, Tomoshi Kameda, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada (2013)　Analysis of base-pairing probabilities of RNA molecules involved in　protein-RNA interactions. ***Bioinformatics*** 29: 20. 2524-2528. （査読あり）
9. Haruka Yonemoto, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada (2013)　CentroidAlign-Web: A Fast and Accurate Multiple Aligner for Long　Non-Coding RNAs. **International journal of molecular sciences** 14: 3.　6144-6156. （査読あり）
10. Wijaya E, Frith MC, Horton P, Asai K (2013) Finding Protein-Coding Genes through Human Polymorphisms. ***PLoS ONE***　8(1): e54210. （査読あり）
11. Yukiteru Ono, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada (2013)　PBSIM: PacBio reads simulator--toward accurate genome assembly. ***Bioinformatics*** 29:1. 119-121. （査読あり）
12. Terai G, Okida H, Asai K, Mituyama T (2012) Prediction of Conserved Precursors of miRNAs and Their Mature Forms by Integrating Position-Specific Structural Features. ***PLoS ONE***　7(9): e44314. （査読あり）
13. Hiroki Ashida, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada (2012) Shape-based alignment of genomic landscapes in multi-scale resolution. ***Nucleic Acids Res***, 40(14):6435-6448. （査読あり）
14. Michiaki Hamada, Kiyoshi Asai (2012) A Classification of Bioinformatics Algorithms from the Viewpoint of Maximizing Expected Accuracy (MEA). ***Journal of Computational Biology***. May 2012, 19(5): 532-549. （査読あり）
15. Hisanori Kiryu, Kiyoshi Asai (2012) Rchange: algorithms for computing energy changes of RNA secondary structures in response to base mutations. ***Bioinformatics*** 28: 8. 1093-1101. （査読あり）
16. Martin C Frith, Ryota Mori, Kiyoshi Asai (2012) A mostly traditional approach improves alignment of bisulfite-converted DNA. ***Nucleic Acids Res***, 40(13):e100. （査読あり）
17. Raymond Wan, Vo Ngoc Anh, Kiyoshi Asai (2012) Transformations for the compression of

FASTQ quality scores of next-generation sequencing data. ***Bioinformatics*** 28: 5. 628-635. （査読あり）
18. Edward Wijaya, Martin C Frith, Kiyoshi Asai, Paul Horton (2012)　RecountDB: a database of mapped and count corrected transcribed sequences. ***Nucleic Acids Res*** 40: Database issue. D1089-D1092. （査読あり）
19. Michiaki Hamada, Koichiro Yamada, Kengo Sato, Martin C Frith, Kiyoshi Asai (2011) CentroidHomfold-LAST: accurate prediction of RNA secondary structure using automatically collected homologous sequences. ***Nucleic Acids Res*** 39: Web Server issue. W100-W106. （査読あり）
20. Hisanori Kiryu, Goro Terai, Osamu Imamura, Hiroyuki Yoneyama, Kenji Suzuki, Kiyoshi Asai (2011) A detailed investigation of accessibilities around target sites of siRNAs and miRNAs. ***Bioinformatics*** 27: 13. 1788-1797. （査読あり）
21. Michiaki Hamada, Edward Wijaya, Martin C Frith, Kiyoshi Asai (2011)　Probabilistic alignments with quality scores: an application to short-read mapping toward accurate SNP/indel detection. ***Bioinformatics*** 27: 22. 3085-3092. （査読あり）
22. Michiaki Hamada, Hisanori Kiryu, Wataru Iwasaki, Kiyoshi Asai (2011) Generalized centroid estimators in bioinformatics. ***PLoS One*** 6(2):e16450（査読あり）
23. Michiaki Hamada, Kengo Sato, Kiyoshi Asai (2011) Improving the accuracy of predicting secondary structure for aligned RNA sequences. ***Nucleic Acids Res*** 39(2):393-402.（査読あり）
24. Michiaki Hamada, Kengo Sato, Kiyoshi Asai (2010) Prediction of RNA secondary structure by maximizing pseudo-expected accuracy.　***BMC Bioinformatics*** 11: 586. （査読あり）

高橋弘喜

1. Kusuya Y, Sakai K, Takahashi H, Yaguchi T (2016) Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus Aspergillus lentulus IFM 54703T. *Genome Announc*., in press.（査読有）
2. Imashimizu M, Takahashi H, Oshima T, McIntosh C, Bubunenko M, Court DL, Kashlev M (2015) Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases in vivo. *Genome Biol*., 16(1):98.（査読有）
3. Kusuya Y, Takahashi-Nakaguchi A, Takahashi H, Yaguchi T (2015) Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus Aspergillus udagawae strain IFM 46973T (2015) *Genome Announc*., 3(4).（査読有）

笠原雅弘

1. Miyamoto M, Motooka D, Gotoh K, Imai T, Yoshitake K, Goto N, Iida T, Yasunaga T, Horii T, Arakawa K, Kasahara M, Nakamura S, Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes., *BMC Genomics.* 15:699, 2014. doi: 10.1186/1471-2164-15-699（査読有）
2. 笠原雅弘「１分子リアルタイム DNA シークエンサを用いた史上最高精度のゲノム配列解読」実験医学増刊号「ゲノム医学・生命科学研究総集編」31(15):2365, 2013（和文総説・査読無）

矢田哲士

1. Ichinose N, Yada T, Gotoh O (2014) Tetrahedral gray code for visualization of genome information, PLoS One, 9:e86133. doi: 10.1371/journal.pone.0086133. 査読あり
2. Fujiwara T, Yada T (2013) miRNA-target prediction based on transcriptional regulation, BMC Genomics, 14(Suppl 2):S3. doi: 10.1186/1471-2164-14-S2-S3. 査読あり

3. Ichinose N, Yada T, Gotoh O (2012) Large-scale motif discovery using DNA Gray code and equiprobable oligomers, Bioinform., 28:25-31. doi: 10.1093/bioinformatics/btr606. 査読あり
4. Yada T, Yoshida K, Morita M, Taniguchi T, Irie T, Suzuki Y (2011) Linear regression models predicting strength of transcriptional activity of promoters, Genome Inform., 25:53-60. 査読あり
5. Irie T, Park SJ, Yamashita R, Seki M, Yada T, Sugano S, Nakai K, Suzuki Y (2011) Predicting promoter activities of primary human DNA sequences, Nucl. Acids Res., 39:e75. doi: 10.1093/nar/gkr173. 査読あり

瀬々潤

1. Yamagata K, Yamanishi A, Kokubu C, Takeda J, Sese J. (2016) COSMOS: accurate detection of somatic structural variations through asymmetric comparison between tumor and normal samples. *Nucleic Acids Res. In press.* (査読あり)
2. 瀬々 潤. 網羅的遺伝子発現量データの解析. *血液フロンティア*. 25(8):1145-52. (査読なし)
3. Terada A, Kim H, Sese J. (2015) High-speed Westfall-Young permutation procedure for genome-wide association studies. In Proc. of *ACM BCB 2015*. 17-26. doi:10.1145/2808719.2808721(査読あり)
4. Akama S, Shimizu-Inatsugi R, Shimizu K.K, Sese J. (2014) Genome-wide quantification of homeolog expression ratio revealed nonstochastic gene regulation in synthetic allopolyploid Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 42 (6), e46. doi: 10.1093/nar/gkt1376(査読あり)
5. Terada A, Okada-Hatakeyama M, Tsuda K, Sese J. (2013) Statistical significance of combinatorial regulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110(32):12996-13001. doi: 10.1073/pnas.1302233110(査読あり)

（２）学会等発表

（a）支援による成果発表（支援依頼者は二重下線で、支援担当者は点線で示した）

秋光信佳（東京大学）

1. Fukuoka Y, Imamura K, Ishii Y, Imamachi N, Suzuki Y, Ishida Y, Nagahama M, Takaya A, Takahashi H, Yamamoto T, Taya T and Akimitsu N, Whole transcriptome analysis of infeced host by bacteria including noncoding RNAs. BMB2015,Kobe, Dec 1-4, 2015 (poster)
2. Maekawa S, Sugano S, Akimitsu N, Suzuki Y, Post-transcriptional regulation of RNA abundance under hypoxia. BMB2015,Kobe, Dec 1-4, 2015 (poster)
3. Imamachi N, Tani H, Mizutani R, Imamura K, Irie T, Suzuki Y and Akimitsu N. Identification of cis-regulatory elements within UPF1 target transcripts. The 19th Annual Meeting of the RNA Society, Quebec City, Canada, June 3-8, 2014. (Oral presentation)
4. Rena Mizutani, Naoto Imamachi, Yoshio Suzuki, Hiroshi Yoshida, Naobumi Tochigi, Tadahiro Oonishi, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu, Functional analysis of IMP3, a RNA-binding protein, RNA 2014 The 19th Annual Meeting of the RNA Society, Quebec City, Canada, June 3-8, 2014.
5. 今町 直登, 谷 英典, 入江 拓磨, 鈴木 穣, 秋光 信佳、ゲノムワイドな RNA 分解測定法を利用した UPF1 標的遺伝子および基質認識部位の予測、第 14 回 東京大学生命科学シンポジウム BIO UT, 東京, 4 月 26 日, 2014. (ポスター)
6. 水谷　玲菜、今町　直登、鈴木　良夫、吉田　裕、栃木　直文、大西　忠博、鈴木　穣、秋光　信佳、第１４回東京大学生命科学シンポジウム、東京、April 26, 2014.
7. 今町 直登, 谷 英典, 今村 克俊, 入江 拓磨, 鈴木 穣, 秋光 信佳、ゲノムワイドな RNA 分解測定法を利用した UPF1 標的遺伝子および基質認識部位の予測、ゲノム支援拡大班会議, 神戸, 8 月 20-21 日, 2014. (ポスター)
8. 今町 直登, 谷 英典, 入江 拓磨, 鈴木 穣, 秋光 信佳、ゲノムワイドな RNA 分解測定法を利用した UPF1 標的遺伝子および基質認識部位の予測、第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014, 富山, 9 月 20-21 日, 2014. (口頭発表)
9. Nobuyoshi Akimitsu, Naoto Imamachi, Rena Mizutani, Katsutoshi Imamura and Yutaka Suzuki, Regulation of long noncoding RNAs by Nuclear RNA degradation pathway in mammalian cells, The Biology Of Genomes, Cold Spring Harbor, NY., USA, May 7 - 11, 2013.
10. Nobuyoshi Akimitsu, Naoto Imamachi, Hidenori Tani, Kazi Abdus Salam, Rena Mizutani, Takuma Irie, Tetsushi Yada, Yutaka Suzuki, Eukaryotic RNA Turnover: From Structural Insights to Diseases, Strasburg, France, April 21 - 24, 2013.
11. Naoto Imamachi, Hidenori Tani, Kazi Abdus Salam, Rena Mizutani, Takuma Irie, Tetsushi Yada, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu, Identification of novel UPF1 target transcripts by direct determination of whole transcriptome stability., RNA 2013 The 18th Annual Meeting of the RNA Society, Davos, Switzerland, June 11-16, 2013.
12. Naoto Imamachi, Katsutoshi Imamura, Yutaka Suzuki, and Tetsushi Yada, Nobuyoshi Akimitsu, Identification and analysis of RNA decay factors by directly determining the stabilities of target mRNAs., Expanding Frontiers of Genome Science, Tokyo, Japan, January 9-10, 2013.
13. Rena Mizutani, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu, Functional analysis of IMP3, a RNA-binding protein., RNA 2013 The 18th Annual Meeting of the RNA Society, Davos, Switzerland, June 11-16, 2013.
14. 今町 直登, 谷 英典, 今村 克俊, 入江 拓磨, 鈴木 穣, 秋光 信佳、ゲノムワイドな RNA 分解測定法を利用した UPF1 標的遺伝子および基質認識部位の予測、NGS 現場の会 第三回研究会, 神戸, 9 月 4-5 日, 2013. (ポスター)
15. 水谷　玲菜、今町　直登、鈴木　穣、秋光　信佳, RNA フロンティアミーティング 2013, 静岡, September 3-5, 2013
16. 今町 直登, 谷 英典, 今村 克俊, 入江 拓磨, 鈴木 穣, 秋光 信佳、ゲノムワイドな RNA

分解測定法を利用した UPF1 標的遺伝子および基質認識部位の予測、ゲノム支援拡大班会議, 神戸, 8 月 28-29 日, 2013. (ポスター)

阿部知子（理化学研究所）

1. 風間裕介、平野智也、大田修平、佐藤陽一、村井耕二、河野重行、小野克徳、阿部知子、「重イオンビームによるグリーンイノベーションの創出」2015 年 12 月 12 日、京都
2. Kotaro Ishii, Yusuke Kazama, Tomonari Hirano, Michiaki Hamada, Yukiteru Ono, Tomoko Abe, "Pipeline for whole-genome analysis of heavy-ion-induced mutants in *Arabidopsis thaliana*" The 26th International Conference on Arabidopsis Research, 2015 年 7 月 5 日-9 日, パリ
3. Yusuke Kazama, Tomonari Hirano, Kotaro Ishii, Sumie Ohbu, Yuki Shirakawa, Tomoko Abe, "Comprehensive characterization of genomic rearrangement in heavy-ion induced *Arabidopsis* mutants by wholegenome resequencing" The 26th International Conference on Arabidopsis Research, 2015 年 7 月 5 日-9 日, パリ
4. 阿部知子、風間裕介、平野智也、「重イオンビーム育種の開発と品種改良ユーザー会」平成 26 年度非破壊検査に関する研究発表会、2014 年 8 月 29 日、大阪
5. 風間裕介、平野智也、阿部知子、「重イオンビームによるオンデマンド照射技術の開発」日本育種学会第 124 回講演会ワークショップ「九州ブランドを世界に！―突然変異育種の挑戦―」、2013 年 10 月 12 日、鹿児島
6. 阿部知子、風間裕介、平野智也、「Mutagenesis から Mutagenomics へ」第 52 回ガンマーフィールドシンポジウム「次世代育種の可能性：環境、食糧、エネルギー問題解決へのストラテジー」、2013 年 7 月 17 日、水戸

有泉 亨（筑波大学）

1. 発表者名：有泉亨、木村あかね、羽尾周平、森一樹、江面健太郎、岡部佳弘、篠崎良仁、増田順一郎、鈴木穣、斎藤岳士、久原哲、青木考、江面浩
   発表標題：トマト果実分化機構解明に向けた新規遺伝資源開発
   学会等名、発表年月日、発表場所：第 122 回日本育種学会、2012 年 9 月 16 日、京都産業大学 ***日本育種学会優秀発表賞**
2. 発表者名：Masuda J, Ariizumi T, Kimura A, Hao S, Mori K, Ezura K, Okabe Y, Shinozaki Y, Suzuki Y, Saito T, Kuhara S, Aoki K and Ezura H
   発表標題：Isolation of new parthenocarpic mutants and pistil-specific promoter for production of parthenocarpic cultivars in Tomato *(Solanum lycopersicum*).
   学会等名、発表年月日、発表場所：Plant and Animal Genome XXI, January 14th 2013, San Diego USA
3. 発表者名：Ezura K, Ji-Seong K, Mori K, Kuhara S, Suzuki Y, Ariizumi T and Ezura H
   発表標題 : The identification of pistil-specific genes by global transcriptome analyses in tomato (*Solanum lycopersicum*).
   学会等名、発表年月日、発表場所 : The 12th Solanaceae Conference, October 25-29, Bordeaux France ***Best Poster Presentation Award**

飯田哲史（国立遺伝学研究所）

1. 飯田哲史, 小林武彦、"蓄積した内因性ゲノム損傷定量法の確立."、第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、(2015 年 10 月 19~21 日) 静岡県・焼津市
2. Iida,T., Iida, N., Sese, J., Nakamura, Y. and Kobayashi, T.、 "Detecting ribonucleotides in the yeast genome.", 3R Symposium, (2014 年 11 月) 静岡県・御殿場市

石井敦士（福岡大学）

1. 石井敦士、斎藤義朗、新井ひでえ、山下純正、木村貞美、小国弘量、池田俊郎、大橋伯、小田洋一郎、川脇寿、佐々木征行、廣瀬伸一、小児交互性片麻痺の病因遺伝子である *ATP1A3* の同定と現状について、第 55 回日本小児神経学会学術集会 、2013 年 5

月 31 日、大分県大分市

2. 石井敦士、廣瀬伸一、佐々木征行、小児交互性片麻痺の責任遺伝子である *ATP1A3* の同定、第 474 回日本小児科学会福岡地方会例会・総会、2013 年 4 月 13 日、福大メディカルホール
3. Atsushi Ishii, Yoshiaki Saito, Jun Mitsui, Hiroyuki Ishiura, Jun Yoshimura, Hidee Arai, Sumimasa Yamashita, Sadami Kimura, Hirokazu Oguni, Shinichi Morishita, Shoji Tsuji, Masayuki Sasaki, Shinichi Hirose. Identification of *ATP1A3* mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japan. 30th International Epilepsy Congress, June 25, 2013, Montreal, Canada
4. Atsushi Ishii, Yoshiaki Saito, Masayuki Sasaki, Shinichi Hirose. Genetic analysis of Alternating Hemiplegia of Childhood. 10th European Congress of Epileptology, September 30, 2012, London

稲垣祐司（筑波大学）

1. 大規模配列データで解明される新奇真核微生物系統とそのオルガネラゲノム．稲垣祐司，西村祐貴，神川龍馬，谷藤吾朗，中山卓郎，橋本哲男．日本植物学会第 78 回大会，2014 年 9 月 12-14 日，明治大学生田キャンパス．口頭発表・招待講演
2. Progress in placing newly discovered protist lineages in the deep tree of eukaryotes: *Tskuubamonas globose* and *Palpitomonas bilix*. Yuji Inagaki. International Congress of Protistology (ICOP) XIV，2013 年 8 月 4-10 日，Westin Bayshore Hotel（バンクーバー・カナダ）．口頭発表・招待講演
3. The enigmatic discobid *Tsukubamonas globose*: phylogenomic analysis and mitochondrial genome sequence. Yuji Inagaki. Integrated Microbial Biodiversity Program meeting, Canadian Institute for Advanced Research, 2013 年 5 月 14-17 日, Four Seasons Hotel（ウィスラー・カナダ）．ポスター発表
4. 新奇単細胞真核生物 *Tsukubamonas globosa* の系統的位置とミトコンドリアゲノム．神川龍馬，西村祐貴，矢吹彬憲，Martin Kolisko，Alastair GB Simpson，Andrew J Roger，石田健一郎，橋本哲男，稲垣祐司．第 35 回日本分子生物学会，2012 年 12 月 11-14 日，福岡国際会議場・マリンメッセ福岡．ポスター発表
5. 新奇真核微生物がもたらす新しい真核生物大系統像．神川龍馬，矢吹彬憲，橋本哲男，西村祐貴，稲垣祐司．第 28 回日本微生物生態学会，2012 年 9 月 19-22 日，豊橋技術科学大学．口頭発表・招待講演
6. The phylogenetic position and mitochondrial genome sequence of the enigmatic discobid *Tsukubamonas globosa*. Ryoma Kamikawa, Yuki Nishimura, Akinori Yabuki, Martin Kolisko, Alastair G. B. Simpson, Andrew J. Roger, Ken-ichiro Ishida, Tetsuo Hashimoto, Yuji Inagaki. Protist2012，2012 年 7 月 29 日-8 月 3 日，University of Oslo（オスロ・ノルウェー）．口頭発表
7. 新奇真核微生物からの大規模配列データで変貌し続ける、我々の真核生物大系統像．稲垣祐司，矢吹彬憲，神川龍馬．第 31 回微生物系統分類研究会，2011 年 11 月 25 日，理化学研究所 和光本所．口頭発表・招待講演
8. *Tsukubamonas globosa* is a deep-branching member in the Discoba clade: Morphology, phylogenomics, and mitochondrial genome．Akinori Yabuki，Ryoma Kamikawa，Martin Kolisko，Sohta A. Ishikawa，Ken-ichiro Ishida，Alastair G. B. Simpson，Andrew J. Roger，Yuji Inagaki．International Union of Microbiological Societies 2011 Congress，2011 年 9 月 6-10 日，札幌コンベンションセンター．口頭発表・招待講演
9. Recent progress in placing newly-discovered lineages of protists in the deep tree of eukaryotes. Yuji Inagaki．Meeting of Center for Comparative Genomics and Evolutionary Bioinformatics, 2011 年 8 月 6 日，Dalhousie University（ハリファックス・カナダ）．口頭発表・招待講演

10. *Tsukubamonas globosa* gen. et sp. nov.; a novel excavate flagellate possibly hold a key for the early evolution in "Discoba". Akinori Yabuki, Takeshi Nakayama, Naoji Yubuki, Tetsuo Hashimoto, Ken-ichiro Ishida, Yuji Inagaki. 18the Meeting of International Society of Evolutionary Protistology, 2011 年 7 月 2-7 日, 金沢県立美術館. ポスター発表
11. *Tsukubamonas globosa* の Phylogenomic 解析と部分的ミトコンドリアゲノム配列. 神川龍馬, 矢吹彬憲, Martin Kolisko, 西村祐貴, 石川奏太, 石田健一郎, 橋本哲男, Andrew J Roger, Alastair GB Simpson, 稲垣祐司. 第 5 回日本進化原生生物研究会, 2011 年 6 月 11-12 日, 富山大学. ポスター発表

稲田利文（東北大学）

1. 坪井達久、鈴木穣、菅野純夫、稲田利文、「*CBP1* mRNA is an Endogenous Target of NGD」、『第 35 回日本分子生物学会年会』、3P-0274、福岡、2012 年 12 月
2. 坪井達久、鈴木穣、菅野純夫、稲田利文、「ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードするmRNAは分子内切断を受ける」、『第85回日本生化学会大会』、2P-981、福岡、2012年12月
3. Tatsuhisa Tsuboi[1], Yutaka Suzuki[2], Yoshihisa Tohru[3], Toshifumi Inada[1]、([1]Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University, [2]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [3]Graduate School of Life Science, University of Hyogo) *CBP1* mRNA is cleaved and produces nonstop mRNA in a translation and tRNA splicing endonuclease activity dependent manner. Conference on RNA localization & Localized translation, Ontario, Canada 2013 年 7 月 10 日
4. Tatsuhisa Tsuboi[1], Yutaka Suzuki[2], Yoshihisa Tohru[3], Toshifumi Inada[1]、([1] Graduate School of Pharmaceutical Science, Tohoku University, [2] Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [3] Graduate School of Life Science, University of Hyogo) *CBP1* mRNA is cleaved in a tRNA splicing endonuclease activity dependent manner 『第 14 回日本 RNA 学会大会』、松山、2013 年 7 月』

井ノ上逸朗（国立遺伝学研究所）

1. 中岡博史、細道一善、井ノ上逸朗：エクソーム解析と網羅的遺伝子発現情報を用いた脳動脈瘤感受性遺伝子の探索. 日本人類遺伝学会 第 57 回大会（2012 年 10 月 25 日～27 日）.
2. 細道一善、椎名隆、光永滋樹、猪子英俊、井ノ上逸朗, HLA-omics : HLA 領域におけるゲノム多様性、メチル化および遺伝子発現の統合的解析, 第 23 回日本組織適合性学会大会, 2014 年 9 月 13-15 日, 長崎大学医学部キャンパス(長崎)
3. 細道一善、井ノ上逸朗, ゲノム医科学研究ツールとしての HLA 領域の統合的ゲノム解析, 2013 アジレントゲノミクスフォーラム, 2013 年 6 月 11 日, 国際ファッションセンター(東京)
4. 細道一善 井ノ上逸朗, Phase-defined シーケンシングによる HLA 遺伝子配列完全決定とパイプライン, 第 58 回日本人類遺伝学会, 2013 年 11 月 20 日-23 日, 江陽グランドホテル(宮城)
5. 細道一善 中岡博史 清水まり恵 中島文明 井ノ上逸朗, 次世代シーケンサーによる骨髄ドナー登録者の HLA タイピング法の開発（Ⅱ）, 第 22 回日本組織適合性学会大会, 2013 年 9 月 14 日-16 日, コラッセふくしま(福島)
6. Ituro Inoue, Kazuyoshi Hosomichi, HLA allele determination by sequence-based method, 2012 Illumina Asia Pacific Scientific Summit, April 22 - 25, 2012, , Sheraton Mirage Resort & Spa Gold Coast (Brisbane)
7. 細道一善、井ノ上逸朗, ロングアンプリコンシーケンスと Read-Backed Phasing による HLA 遺伝子の塩基配列完全決定, 第 20 回日本組織適合性学会, 2012 年 9 月 15 日～17 日, 明治大学駿河台キャンパス(東京)

8. 細道一善、井ノ上逸朗, 新たな HLA タイピング技術 : ロングアンプリコンシーケンスと Read-Backed Phasing による HLA 遺伝子塩基配列の完全決定, 日本人類遺伝学会第 57 回大会, 2012 年 10 月 25 日～27 日, 京王プラザホテル(東京)
9. Kazuyoshi Hosomichi, Takahide Hayano, Ituro Inoue, Phase-defined complete HLA genotyping by amplicon sequencing and read-backed phasing., ASHG 2012 Annual Meeting, December. 6-10, 2012, Moscone Center (San Francisco)

今村拓也（九州大学）

1. 浜崎伸彦、今村拓也、マウス初期胚における卵活性化刺激依存性非コード RNA 発現による遺伝子プロモーターの脱メチル化、第６回日本エピジェネティクス研究会年会、２０１２年５月１５日、学術総合センター（東京都千代田区）
2. 上坂将弘、西村理、宇野健一郎、上田泰己、大石高生、今井啓雄、阿形清和、今村拓也、マカクザル特異的偽遺伝子挿入に由来する非コード RNA による遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化、第６回日本エピジェネティクス研究会年会、２０１２年５月１５日、学術総合センター（東京都千代田区）
3. Nobuhiko Hamazaki, Takuya Imamura、Promoter-associated noncoding RNAs mediate oocyte-activation-induced CpG and non-CpG demethylation in the early mouse embryo、第４５回日本発生生物学会年会、２０１２年５月２９日、神戸国際会議場（神戸市）
4. 浜崎伸彦、今村拓也、遺伝子プロモーター非コード RNA はマウス人為活性化胚の CG/非 CG 配列の脱メチル化を仲介することで異常 DNA メチル化パターン形成に関与する、第１０５回日本繁殖生物学会大会、２０１２年９月６日、筑波大学（つくば市）
5. Takuya Imamura、Promoter-associated noncoding RNAs for the sequence-specific epigenetic alterations during mammalian development、The 1st Hungarian Epigenetics Meeting、２０１２年９月２０日、Semmelweis Egyetem, NET (Budapest, Hungary)
6. 上坂将弘、西村理、大石 高生、今井啓雄、阿形 清和、今村 拓也、マカクザル特異的偽遺伝子挿入に由来する非コード RNA による遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化、２０１２年１２月１２日、福岡国際会議場（福岡市）
7. 浜崎伸彦、今村拓也、マウス初期発生胚においてプロモーターノンコーディング RNA は卵活性化刺激に応答して CG と非 CG 配列の脱メチル化を仲介する、第３５回日本分子生物学会年会、２０１２年１２月１４日、福岡国際会議場（福岡市）
8. Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura、Promoter-associated noncoding RNAs mediate gene-specific DNA demethylation for mouse preimplantation development、第７回エピジェネティクス研究会年会、２０１３年５月３０日、奈良県新公会堂（奈良市）
9. Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura、プロモーターノンコーディングＲＮＡによるほ乳類エピゲノム形成、Mammalian epigenome formation mediated by promoter-associated noncoding RNA、第７回エピジェネティクス研究会年会、２０１３年５月３０日、奈良県新公会堂（奈良市）
10. Takuya Imamura、Epigenome formation in the mammalian brain mediated by promoter-associated noncoding RNA、Neuro2013、２０１３年６月２１日、国立京都国際会館（京都市）
11. 上坂将弘、西村理、郷康広、中島欽一、阿形清和、今村拓也、霊長類特異的偽遺伝子挿入に由来する非コード RNA による遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化、第三回 NGS 現場の会、２０１３年９月４日、神戸国際会議場（神戸市）
12. 山本直樹、今村拓也、PC12 細胞を用いた不可逆的神経細胞分化制御に関わる RNA の発現動態解析、第三回 NGS 現場の会、２０１３年９月４日、神戸国際会議場（神戸市）
13. 上坂将弘、西村理、郷康広、中島欽一、阿形清和、今村拓也、ノンコーディング RNA 群による遺伝子活性化と大脳皮質における多様化、第七回神経発生討論会、２０１４年３月１３日、大阪大学（吹田市）

14. Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura、Promoter-associated noncoding RNAs mediate gene-specific DNA demethylation for mouse preimplantation development、第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会、２０１４年５月２６日、伊藤国際学術研究センター（東京都文京区）
15. 山本直樹、上坂将弘、中島欽一、阿形清和、今村拓也、PC12 細胞分化過程におけるエピジェネティック制御に関わる promoter-associated noncoding RNA の機能、第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会、２０１４年５月２６日、伊藤国際学術研究センター（東京都文京区）
16. Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura、Potential role for species-specific promoter-associated non-coding RNAs in the diversification of mammalian brain、第 47 回日本発生生物学会年会、２０１４年５月２７日、ウインクあいち（名古屋市）
17. 濵崎伸彦, 上坂将弘, 中島欽一, 阿形清和, 今村拓也、マウス初期胚の全能性を支える遺伝子を活性化するノンコーディング RNA の同定、第 107 回日本繁殖生物学会大会、２０１４年８月２１日、帯広畜産大学（帯広市）
18. 今村拓也、長鎖 ncRNA によるほ乳類エピゲノム制御、第 157 回日本獣医学会学術集会、２０１４年９月１１日、北海道大学高等教育推進機構（札幌市）
19. Naoki Yamamoto, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura　Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible differentiation of PC12 cells　第 8 回神経発生討論会　２０１５年３月１９日　九州大学病院キャンパス（福岡市）
20. Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura　Species-specific repertories of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile　第 8 回神経発生討論会　２０１５年３月１９日　九州大学病院キャンパス（福岡市）
21. Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura　Species-specific repertories of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile.　第 9 回エピジェネティクス研究会年会　２０１５年５月２５日　学術総合センター（東京都千代田区）
22. Nobuhiko, Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura　Promoter-associated noncoding RNAs mediate gene-specific DNA demethylation for mouse preimplantation development　第 9 回エピジェネティクス研究会年会　２０１５年５月２５日　学術総合センター（東京都千代田区）
23. Naoki Yamamoto, Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible differentiation of PC12 cells.　第 9 回エピジェネティクス研究会年会　２０１５年５月２５日　学術総合センター（東京都千代田区）
24. 今村拓也、浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、中島欽一　雌性発生胚を活用した Post-Bisulfite Adapter-Tagging 法によるマウス DNA メチローム解析　第 9 回エピジェネティクス研究会年会　２０１５年５月２５日　学術総合センター（東京都千代田区）
25. Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. 第 48 回 日本発生生物学会年会 (2015 JSDB-APDBN meeting)　２０１５年６月３日　つくば国際会議場（つくば市）
26. Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura　Species-specific repertories of promoter-associated non-coding RNAs may contribute to the diversification of gene expression profile.　第 48 回 日本発生生物学会年会 (2015 JSDB-APDBN meeting)　２０１５年６月３日　つくば国際会議場（つくば市）
27. Naoki Yamamoto, Masahiro Uesaka, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura Bidirectional promoter-derived antisense noncoding RNA epigenetically regulates irreversible

differentiation of PC12 cells.　第 38 回日本神経科学大会　２０１５年７月２９日　神戸国際会議場（神戸市）

28. 今村拓也、浜崎伸彦、上坂将弘、阿形清和、中島欽一　雌性発生胚を活用した Post-Bisulfite Adapter-Tagging 法によるマウス DNA メチローム解析　第 108 回日本繁殖生物学会大会　２０１５年９月１９日　宮崎大学（宮崎市）

今本尚子（理化学研究所）

1. 小瀬真吾、高木昌俊、儘田博志、今本尚子「核-細胞質間輸送運搬体 Hikeshi の機能：熱ストレス応答時における遺伝子発現変化の網羅的解析」第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会合同開催　2016 年 1 月 12-14 日、宮城県宮城郡(松島一の坊)
2. Imamoto N. “Thermal-stress induced nuclear transport mediated by Hikeshi” Nuclear transport meeting　2015 年 9 月 18-23 日、Sant. Feliu de Guixols、スペイン
3. 小瀬真吾、今本尚子「細胞ストレスで駆動する核—細胞質間輸送 –輸送運搬体Hikeshi の機能-」日本細胞生物学会シンポジウム“細胞核の構造・機能と生命現象”2014年6月9日 奈良
4. Imamoto N. “Heat stress-induced nuclear transport, Hikeshi” International meeting on mechanism of nuclear transport, October 18-23　2013 年 10 月 18-23 日 Marine Biology Laboratory, Woods Hole, MA, アメリカ

岩間厚志（千葉大学）

1. Tanaka S, Sashida G, Miyagi S, Yokote JK, Nakaseko C, and Iwama A. Ezh2 Plays a Critical Role in the Progression of *MLL-AF9*-Induced Acute Myeloid Leukemia.　53st Annual Meeting of American Society of Hematology, San Diego, December, 2011. (口頭発表)。
2. Muto T, Sashida G, Oshima M, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Iwama A. Long -term cell automomous effect of Tet2 loss in hematopoietic cells in mice. 54th AHS Annual Meeting and Exposition. December 8-11, 2012 (Atlanta, U.S.A.) (Poster)
3. Oshima M, Miyagi S, Koide S, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Wendt GR,Yabata S, Wang C, Suzuki Y, Sugano S, Iwama A. Ezh2 is required for the maintenance of developmental stage-specific functions of hematopoietic stem cells. The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition,December6-9,2014 (San Francisco, U.S.A.)
4. Oshima M, Miyagi S, Koide S, Wendt GR, Suzuki Y, Iwama A. Ezh2 is required for the maintenance of developmental stage-specific functions of hematopoietic stem cells. 第 76 回日本血液学会総会、2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日（大阪）
5. Koide S, Takubo K, Oshima M, Miyagi S, Matsui H, Kimura H, Wang C, Wendt G, Yabata S, Shinkai Y, Suda T and Iwama A. “Epigenetic Regulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells By the Eset Histone Methyltranferas” 56th ASH Annual Meeting and Exposition. December 6-9, 2014 (California, America)

上田真由美（京都府立医科大学）

1. Mayumi Ueta, Hiromi Sawai, Chie Sotozono, Yuki Hitomi, Nahoko Kaniwa, Mee Kum Kim, Kyoung Yul Seo, Kyung-Chul Yoon, Choun-Ki Joo, Chitra Kannabiran, Tais Hitomi Wakamatsu, Virender Sangwan, Varsha Rathi, Sayan Basu, Takeshi Ozeki, Taisei Mushiroda, Emiko Sugiyama, Keiko Maekawa, Ryosuke Nakamura, Michiko Aihara, Kayoko Matsunaga, Akihiro Sekine, José Álvaro Pereira Gomes , Junji Hamuro, Yoshiro Saito, Michiaki Kubo, Shigeru Kinoshita, Katsushi Tokunaga. New Susceptibility Gene IKZF1 for Cold Medicine–Related Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis with Severe Mucosal Involvement. The American Society of Human Genetics (ASHG) 2014, San Diego, CA, USA. Oct 21, 2014.

2. Hiromi Sawai, Mayumi Ueta, Yuki Hitomi, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita, Katsushi Tokunaga. Search for new risk gene for Stevens-Johnson Syndrome independent of *HLA* risk allele. The American Society of Human Genetics (ASHG) 2014, San Diego, CA, USA. Oct 21, 2014.

上野直人（基礎生物学研究所）

1. 上野直人、鈴木美穂、高木知世、アフリカツメガエルのゲノム倍化と機能進化 -MyoD 遺伝子を例として　平成 27 年 9 月 18 日、第 86 回日本動物学会、新潟市
2. Naoto Ueno, Matkoto Suzuki, Hiroshi Koyama and Yasuhiro Inoue. Cell and Tissue Dynamics of Neural Tube Formation. iCeMS International Symposium “Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter”, Kyoto University, Kyoto, September 23-26, 2015
3. Naoto Ueno and Matoko Suzuki. Calcium Dynamics Shapes the Neural Tube. The 3rd Asia-Pacific Developmental Biology Conference, Xi-An, China, September 11-14, 2015.
4. Naoto Ueno. Intracellular Ca^{2+} dynamics shapes the neural tube. The 7th APOCB Congress and ASCB Workshops, Singapore, February 24-27, 2014
5. Dan Rokhsar, Genome assemblies and the origin of tetraploidy. International Xenopus Conference, August 24, 2014, Pacific Grove, CA, USA.

その他、国内および国際アフリカツメガエルゲノムコンソーシアムのメンバーによる発表多数。

上村 匡（京都大学）

1. Tadashi Uemura. “An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size” Behavioral Neurogenetics of larval Drosophila: Molecules, Circuits, Computation & Robotics, March 9-12, 2014. Atami.
2. Tadashi Uemura. “Linking Body Size to Morphology of Neuronal Dendritic Arbors in Adults” in the minisymposium “Cells: polarity and size control” of American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting. December 14-18, 2013. New Orleans.
3. Yukako Hattori, Kaori Watanabe, Yuki Furumizo, Yuuki Takahashi, Hironobu Uchiyama, Shunsuke Yajima, Masayoshi Watada, Tadashi Uemura. The molecular basis of distinct dietary responses to nutrient balances for animal growth between Drosophila generalist and specialist species. CDBsymposium2016 "Size in Development: Growth, Shape and Allometry", 理化学研究所 CDB. 2016. 3.28-30.
4. 服部 佑佳子, 渡辺 佳織, 古溝 優生, 内山 博允, 高橋 優喜, 矢嶋 俊介, 和多田 正義, 上村 匡. 栄養バランス変化に適応する生体システムの解明に向けて. 生態進化発生コロキウム, 2015.12.28.
5. Yukako Hattori, Kaori Watanabe, Yuki Furumizo, Hironobu Uchiyama, Yuuki Takahashi, Shunsuke Yajima, Masayoshi Watada, Tadashi Uemura. Deciphering dietary responses to nutrient balances by comparative multi-omics approaches. 京都大学「発生・細胞生物学・システム生物学コース」, 2015.12.18.
6. 服部 佑佳子, 渡辺 佳織, 古溝 優生, 内山 博允, 高橋 優喜, 矢嶋 俊介, 和多田 正義, 上村 匡. 栄養バランス変化に適応する生体システムの解明に向けて. BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会､第 88 回日本生化学会大会 合同年会）ワークショップ「Nutri‐developmental biology: 栄養に応じた発生調節の分子メカニズムの理解に向けて」, 2015.12.3.
7. 渡辺 佳織, 服部 佑佳子, 古溝 優生, 内山 博允, 高橋 優喜, 矢嶋 俊介, 和多田 正義, 上村 匡. ショウジョウバエ近縁種を用いた栄養バランス変化への生体応答の比較解析. BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同年会）, 2015.12.3.

8. 服部 佑佳子, 渡辺 佳織, 古溝 優生, 内山 博允, 高橋 優喜, 矢嶋 俊介, 和多田 正義, 上村 匡. 栄養バランスと発生：Generalist と Specialist の比較オミックス解析. 「ショウジョウバエ多様性研究会」, 国立遺伝学研究所, 2015.9.28.
9. Yukako Hattori, Kaori Watanabe, Yuki Furumizo, Yuuki Takahashi, Hironobu Uchiyama, Yuuki Takahashi, Shunsuke Yajima, Masayoshi Watada, Tadashi Uemura. The molecular basis of distinct dietary responses to nutrient balances between generalist and specialist species. 24th European Drosophila Research Conference, 2015. 9.11.
10. Yukako Hattori, Kaori Watanabe, Yuki Furumizo, Hironobu Uchiyama, Yuuki Takahashi, Shunsuke Yajima, Masayoshi Watada, Tadashi Uemura. Investigating the molecular basis of distinct adaptations to nutrient balances between generalist and specialist species. 24th European Drosophila Research Conference, 2015. 9.10.
11. 服部 佑佳子, 渡辺 佳織, 古溝 優生, 内山 博允, 高橋 優喜, 矢嶋 俊介, 和多田 正義, 上村 匡. 栄養バランス変化に適応する生体システムの解明に向けて. 「ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会」, 国立基礎生物学研究所, 2015 年 8 月 18-19 日.
12. 服部 佑佳子, 渡辺 佳織, 古溝 優生, 内山 博允, 高橋 優喜, 矢嶋 俊介, 和多田 正義, 上村 匡. 栄養バランスに応じて発生を調節する メカニズムの解明に向けて. 第 17 回生命科学研究科シンポジウム, 京都大学, 2015 年 7 月 2-3 日.
13. Yukako Hattori, Kaori Watanabe, Yuki Furumizo, Yuuki Takahashi, Masayoshi Watada, Tadashi Uemura. Comparative systems biology of dietary responses among Drosophila species. The CDB Symposium 2015 "Time in Development". 理化学研究所 CDB, 2015.3.23-25.
14. Kohei Shimono, Hanae Komai, Kaori Watanabe, Yuki Furumizo, Taiichi Tsuyama, Shiori Ohwatari, Yukako Hattori, and Tadashi Uemura. Interorgan communication controlling size of neuronal dendritic arbors in response to nutritional restriction. The CDB Symposium 2015 "Time in Development".理化学研究所 CDB, 2015.3.23
15. Kohei Shimono, Hanae Komai, Shiori Ohwatari, Taiichi Tsuyama, Atsushi Toyoda, and Tadashi Uemura. Scaling growth of neuronal dendritic arbors. 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ"Scaling growth linking cell, organ, and whole organism in animals and plants", 2014.11.26.

牛田一成（京都府立大学）

1. 牛田一成、土田さやか、「宿主の家畜化が腸内細菌にもたらすインパクト−乳酸桿菌のゲノム解析で見えてきたもの−」、第４６回ルーメン研究会、２０１４年９月２７日、明治大学

漆原秀子（筑波大学）

1. 福原健輔、漆原秀子　「細胞性粘菌のゲノム比較による分化関連遺伝子の解析」日本ゲノム微生物学会第５回年会　2011 年 3 月 14 日、東北工業大学
2. 漆原秀子、伊藤武彦、豊田敦、桑山秀一、畑敬士、藤山秋佐夫 「細胞性粘菌 mRNAseq を利用したシグナル応答経路遺伝子の種間比較」日本ゲノム微生物学会第５回年会 2011 年 3 月 15 日、東北工業大学
3. Hitoshi Saitoh, Kurato Mohri, Hidekazu Kuwayama, Hideko Urushihara. “Differential expression patterns of cell-type markers between the cellular slime mold species with or without somatic cell differentiation” 44th Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. 20110520 Okinawa Convention Center, Okinawa, Japan
4. Kensuke Fukuhara, Hidekazu Kuwayama, Hideko Urushihara. “Comparative Analysis of Gene Families in *Acytostelium subglobosum*” International *Dictyostelium* conference 2011. 20110815 Radisson Cross Keys, Baltimore, USA
5. Kurato Mohri, Hitoshi Saitoh, Hidekazu Kuwayama, Hideko Urushihara. “Expression of the prestalk and prespore marker homologues during the development of *Acytostelium*

subglobosum” International *Dictyostelium* conference 2011. 20110815 Radisson Cross Keys, Baltimore, USA

6. Hideko Urushihara “Genome analysis of *Acytostelium subglobosum*, social amoebas that maintain equal right of survival” ZMMK (Center for Molecular Medicine Cologne)　Seminar 20111026 University of Cologne, Cologne, Germany
7. 福原健輔、桑山秀一、漆原秀子　「柄細胞分化関連遺伝子の探索を目的とした細胞性粘菌種間のゲノム比較」第 1 回日本細胞性粘菌学会例会　2011 年 11 月 5 日　大阪大学バイオ関連多目的施設
8. 毛利蔵人、齋藤仁志、桑山秀一、漆原秀子　「*Acytostelium* 属の発生過程における空間的遺伝子発現パターンの解析」第 1 回日本細胞性粘菌学会例会　2011 年 11 月 5 日　大阪大学バイオ関連多目的施設
9. Kurato Mohri, Hidekazu Kuwayama, Hideko Urushihara “Co-expression of somatic and germ cell markers in the cells of a non-differentiating cellular slime mold” Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists and The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology 20120530 Kobe International Conference Center.
10. Maria Romeralo, Anna Skiba, Christina Schilde, Alejandro Gonzalez- Voyer, Hajara Lawal, Sylwia Kedziora, Jim C. Cavender, Gernot Glöckner, Hideko Urushihara, Pauline Schaap. “Detailed Mapping of Phenotypic Evolution in Social Amoebas Highlights Developmental Plasticity as a Consequence of Colonial Multicellularity” Annual International *Dictyostelium* Conference 2012. 20120730 The Meliá Avenida de America Hotel, Madrid, Spain
11. Marina Okamoto, Lixy Yamada, Akiko Ohtsuka, Hitoshi Sawada, Hideko Urushihara. “Involvement of the plant fertilization protein Hap2/GCS-1 in the gamete interaction of *Dictyostelium discoideum*” Annual International *Dictyostelium* Conference 2012. 20120801 The Meliá Avenida de America Hotel, Madrid, Spain
12. Kurato Mohri, Yu Kiyota, Hidekazu Kuwayama, Hideko Urushihara “Switching expression of prespore and prestalk marker orthologues during fruiting body development of *Acytostelium subglobosum*” Annual International *Dictyostelium* Conference 2012. 20120802 The Meliá Avenida de America Hotel, Madrid, Spain
13. 毛利 蔵人、清田 侑、桑山 秀一、漆原秀子　「*Acytostelium subglobosum* の子実体形成における prespore マーカーと prestalk マーカーの発現スイッチング」第２回日本細胞性粘菌学会例会　2012 年 11 月 17 日　東京大学駒場キャンパス
14. 福原 健輔、伊藤武彦、畑 敬士、桑山 秀一、漆原秀子　「遺伝子発現パターンの細胞性粘菌種間比較」第２回日本細胞性粘菌学会例会　2012 年 11 月 18 日　東京大学駒場キャンパス
15. 大西 慶、毛利 蔵人、漆原秀子　「*Acytostelium* における柄細胞分化関連遺伝子の機能解析」第２回日本細胞性粘菌学会例会　2012 年 11 月 18 日　東京大学駒場キャンパス
16. 清田侑、遠山健、桑山秀一、毛利蔵人、漆原秀子　「*Acytostelium* の発生過程における cAMP シグナル経路の解析」第３回日本細胞性粘菌学会例会　2013 年 10 月 12 日　京都大学理学研究科セミナーハウス
17. 毛利蔵人、畑敬士、菊地晴久、漆原秀子「体細胞が分化しない細胞性粘菌 *Acytostelium subglobosum* に見られる分化誘導因子カスケードの変化」第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日　神戸ポートピアホテル
18. 毛利蔵人、畑敬士、菊地晴久、漆原秀子「細胞性粘菌近縁種における相同遺伝子機能の非保存性」日本ゲノム微生物学会第８回年会　2014 年 3 月 9 日　東京農業大学世田谷キャンパス

江澤辰広（北海道大学）

1. 丸山隼人・中西夏輝・鈴木芽以・江沢辰広, *Rhizophagus* spp. における protein-coding genes の種間ならびに種内の塩基配列多型評価，菌根研究会，2015 年 11 月 1 日，とかちプラザ（帯広市）

大隅典子（東北大学）

1. Yoshizaki Kaichi, Kimura Ryuichi, Koike Kohei, Inada Hitoshi, Osumi N. Crosstalk between Pax6 haploinsufficiency and paternal aging in modulating offspring behavior: a possible biomarker for sperm aging. 第 38 回日本神経科学会　2015 年 7 月 28 日　神戸
2. Yoshizaki Kaichi, Kimura Ryuichi, Koike Kohei, Inada Hitoshi, Osumi N Paternal *Pax6* haploinsufficiency precociously accelerated vocal communication deficits by advanced paternal aging. 第37回日本生物学的精神医学会　2015年9月25日　東京

太田邦史（東京大学）

1. Oda A, Hatakeyama T, Ishi S, Takemata N, Josehpine G, Kaneko K, Ohta K "Transcriptional dynamics of antisense long noncoding RNAs in stress response" the 3rd Annual Winter q-bio meeting (2015/02) Hawaii, US
2. 小田有沙、竹俣直道、石井智子、Galipon Josephine、三好知一郎、鈴木穣、菅野純夫、Hoffman Charles、太田邦史「センス及びアンチセンス long noncoding RNA による遺伝子発現の切り替え制御」第 36 回日本分子生物学会年会（2014/11）横浜
3. Oda A, Takemata N, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Hoffman CS, Ohta K. "Transcriptional regulation by glucose starvation stress-induced lncRNAs in yeast" Quantitatibe biology on the Hawaiian Islands (2014/02)
4. Oda A, Takemata N, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Ohta K.『分裂酵母のグルコース飢餓応答性 long noncoding RNA の発現制御』第 36 回日本分子生物学会年会 (2013/12) 神戸
5. Oda A, Takemata N, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Ohta K.. "Transcriptional regulation by glucose starvation-induced lncRNAs" EMBO Conference on Fission Yeast: pombe (2013/06)London, UK
6. 小田有沙、竹俣直道、三好知一郎、鈴木穣、菅野純夫、太田邦史『Directional RNA-seq 及び ChIP-seq によるグルコース飢餓応答性長鎖ノンコーディング RNA のゲノムワイド解析』第 35 回日本分子生物学会年会 (2012/12)福岡
7. 小田有沙、竹俣直道、鈴木穣、菅野純夫、太田邦史『Long non-coding RNA による転写制御の RNA-seq 解析』第 14 回日本 RNA 学会年会 (2012/07) 仙台
8. Oda A, Takemata N, Miyoshi T, and Ohta K."The transcriptiome analysis of stress responsive long non-coding RNAs using directional RNA-seq in fission yeast", CSHL meeting "DYNAMIC ORGANIZATION OF NUCLEAR FUNCTION" (2012/09) Cold Spring Harbor, US
9. 小田有沙, 三好知一郎, 阿部佳澄, 堀内映実, 鈴木穣, 菅野純夫, 太田邦史『長鎖ノンコーディング RNA によるグルコース飢餓応答時の転写制御の Directional RNA-seq によるゲノムワイド解析』第３４回日本分子生物学会(2011/12) 横浜

大坪和香子（東北学院大学）

1. 大坪和香子、宮城敦子、小島紀幸、川合真紀、内宮博文、宮内啓介、遠藤銀朗、エゾノギシギシを摂食する *Gastrophysa* 属ハムシ腸内フローラの地域的差異、日本農芸化学会 2015 年度大会、２０１５年３月、岡山大学

大西孝幸（横浜市立大学）

1. 大西孝幸・高松壮・及川和聡・猪俣拓也・田中啓介・古海弘康・倉田のり・小林久人・三ツ井敏明・木下哲「イネのオルガネラゲノムのリシーケンス」日本育種学会，2015 年 9 月 25 日，新潟大学

大西なおみ（北海道大学）

1. Naomi Ohnishi, Reiko Akamatsu, Keisuke Katsura, Fumito Maruyama, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Hideaki Higashi, 「Genetic Profiles of *Bacillus anthracis* Indigenous to Zambia and Characterization of *Bacillus* Species Causing Anthrax-like Disease」, 2015JSME annual meeting and 7th JTK symposium, 2015年10月17日-20日、Ibaraki, 亀城プラザ
2. 大西なおみ, 「炭疽の制圧を目指して-*Bacillus* 属細菌の病態-遺伝学的連関解析」, 第23回分子寄生虫学ワークショップ・第13回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2015年8月30日-9月2日, 帯広畜産大学
3. 大西なおみ、赤松玲子、桂啓介、小椋義俊、笹原鉄平、林哲也、東秀明, 「炭疽の克服戦略: Comprehensive strategy for anthrax control」, BMB2015 (第38回日本分子生物学会年回、第88回日本生化学会大会), 2015年12月1日-4日, 神戸ポートアイランド

大政健史（徳島大学）

1. Takeshi Omasa “Efficient construction of transgene-amplified CHO cell lines by cell cycle checkpoint engineering” In; Cambridge Healthtech Institute’s 13th Annual PepTalk 2014, Palm Springs, California, USA, January 13-17, 2014 (Invited lecture)
2. Takeshi Omasa “Quality control in Chinese hamster ovary cell culture –from cell to antibody-” In; Asian Congress on Biotechnology 2013 (ACB2013), No.519, abstract p.46, New Delhi, India, December 15-19, 2013 (Invited lecture, Key Note lecture)
3. 大政健史” 動物細胞を用いたバイオ医薬品生産ー代謝解析の観点から” 進化するメタボロミクス、2014年5/30, AP品川、東京（招待講演）
4. 大政健史 “次世代バイオ医薬品生産は如何にあるべきか～宿主細胞開発からプラットフォーム化まで” CPhI JAPAN, 2014年4/22　東京ビックサイト、東京（招待講演）
5. 大政健史”バイオ医薬品生産における網羅的解析法の課題と応用－高生産宿主細胞構築へ向けてー” 第２回 HiCEP研究会,2014年3/25　関東ITソフトウェア健保会館、東京（招待講演）

岡崎 伸（東京農工大学）

1. 岡崎伸、大島健志朗, 服部正平, Neung Teaumroong. エダウチクサネムから分離した新規Bradyrhizobium属細菌のゲノム配列植物微生物研究会第回研究交流会プログラム 2012年09月25-27日(神戸大学、兵庫県)
2. Okazaki S., Noisangiam R., Teamtisong K., Oshima K., Hattori M., Teaumroong N. Genome sequence of a novel *Bradyrhizobium* strains isolated from Aeschynomene americana. The 2nd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2012年10月28-31日 (Phuket, Thailand).
3. 岡崎伸、マメ科植物との共生を決定づける根粒菌III型分泌機構. 第86回日本細菌学会総会ワークショップ（2013年3月18日幕張メッセ、千葉県）
4. 岡崎伸. III型分泌機構による根粒菌の新規感染機構とその応用 日本土壌肥料学会2013年度名古屋大会2013年9月11日-13日（名古屋大学）
5. Okazaki S, Kaneko T, Sato S, Saeki K. Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. The18th International Congress on Nitrogen Fixation. 2013年10月14日-18日(Miyazaki, Japan)
6. Okazaki S Hijacking of leguminous nodulation signaling by the rhizobial type III secretion system. The 11th European Nitrogen Fixation Conference. 2014年9月7日-10日（Tenerife, Spain）【招待講演】
7. Okazaki S. Rhizobial type III secretion system controls host-dependent nodulation on soybean. The 3rd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. 2014年10月28日-31日(Chengdu, China)
8. Okazaki S. Rhizobial type III secretion system activates leguminous nodulation signaling in the absence of Nod factor. 19th International Congress on Nitrogen Fixation Conference, October 4 to 9, 2015. California, USA.【国際学会招待講演】

9. Okazaki S, Teulet A, Yasuda M, Furuta N, Miwa H, Giraud E. The Nod factor-independent and T3SS-dependent nodulation in Rhizobium–legume symbiosis. 日本微生物生態学会第 30 回大会. 2015 年 10 月 17 日-20 日(土浦市)

岡田典弘（東京工業大学）

1. Okada N. 「シーラカンス研究の最前線: The forefront of the coelacanth research」第 16 回日本進化学会（2014 年 8 月 21 日-24 日、高槻・現代劇場）
2. Nikaido M, Okada N. “Evolution of the chemo-receptor genes in coelacanth.” 第 16 回日本進化学会（2014 年 8 月 21 日-24 日、高槻・現代劇場）
3. 岡田典弘「シーラカンスの全ゲノム解析で解ったこと」次世代ゲノム科学の最前線（2013 年 2 月 19 日、京都大学・芝蘭会館）
4. Okada N. “Coelacanth genomes reveal a variety of signatures for pre-adaptation from water to land.” International Symposium on Genome Science “Expanding Frontiers of Genome Science” (2013 年 1 月 9 日, The University of Tokyo, Ito International Research Center)
5. 岡田典弘「生きた化石シーラカンスのゲノム解読」ゲノム生物学の最前線（2012 年 2 月 15 日　コクヨホール）

岡村 均（京都大学）

1. 岡村 均：生体リズム異常―時を調律する遺伝子と時を失った社会、平成 22 年度第 2 回睡眠文化研究会（重田眞義・鍛冶恵）、京都（京都大学稲盛財団記念館）、2010 年 9 月 24 日
2. 岡村 均：精神神経疾患モデルマウスと体内時計、シンポジウム 3 精神神経疾患と生体リズム（西川徹・柴田重信座長）、第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本精神神経薬理学会、東京（京王プラザ）、2011 年 10 月 27 日―29 日（10 月 27 日発表）

奥祐三郎（鳥取大学）

1. 奥祐三郎、黄福強、党志勝、金京純、八木欣平、孝口裕一、入江隆夫、鈴木穣、堀内映実　次世代シーケンサによる多包条虫の主要抗原の発現ステージの *in silico* 解析　第 158 回日本獣医学会学術集会　2015 年 9 月 7 日　十和田
2. HUANG, F., YAGI, K., KOUGUCHI, H., IRIE, T., SUZUKI, Y., OKU,Y. Expression level analysis of antigens in oncoshere and early stage metacestode from *Echinococcus multilocularis*　第 85 回日本寄生虫学会大会　2016 年 3 月 19・20 日　宮崎

小野寺淳（千葉大学）

1. **ONODERA Atsushi,** KIUCHI Masahiro, WADA Tomoko, KANNO Toshio, HAYASHIZAKI Koji, NAKAYAMA Toshinori: Fine scale positioning of Polycomb and Trithorax complexes controls transcriptional activity in T lymphocytes. 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015 年 11 月 18 日, 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）
2. **小野寺淳**、中山俊憲: ポリコーム／トライソラックス複合体による免疫細胞記憶維持機構の解明, 第25回Kyoto T cell Conference, 2015年5月16日, 京都大学芝蘭会館（京都府京都市）
3. **Onodera A,** Hirahara K, and Nakayama T.: Polycomb And Trithorax Complexes Control Epigenetic Memory Of T Helper Cells. NCI Symposium on Chromosome Biology: Chromatin, ncRNA, Methylation & Disease, 2015.4.16.～4.17. Bethesda, MD, USA.
4. **Onodera A** and Nakayama T.: Polycomb and Trithorax complexes control epigenetic memory of T helper cells.　International Symposium on Genome Science 2015, 2015 年 1 月 20 日, 一橋講堂（東京都千代田区）
5. **Onodera A** and Nakayama T.: Polycomb and Trithorax complexes control epigenetic memory of T helper cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 2014 年 12 月 12 日, 京都国際会館（京都府京都市）

6. Tumes DJ, **Onodera A**, Hosokawa H, Koseki H, **Suzuki Y**, Motohashi S and Nakayama T.: The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4+ T helper type-1 and type-2 cells. 第 24 回 Kyoto T cell Conference, 2014 年 5 月 17 日, 京都平安ホテル（京都府京都市）
7. **Onodera, A**., Horiuchi, S., Sasaki, T., Hosokawa, H., Watanabe, Y., and Nakayama, T.: Cellular memory of T helper type 2 cells controlled by GATA3 and epigenetic regulators. 第 42 回日本免疫学会総会学術集会, 2013. 12.11. 幕張メッセ（千葉市）
8. Tumes, D., **Onodera, A.**, Suzuki, A., Shinoda, K., Endo, Y., Iwamura, C., Hosokawa, H., Koseki, H., Tokoyoda, K., **Suzuki, Y**., and Nakayama, T.: The histone methyltransferase Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4 T helper cells. AAI Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, 2013. 5.6.
9. **ONODERA Atsushi**, HORIUCHI Shu, SASAKI Tetsuya, HOSOKAWA Hiroyuki, WATANABE Yukiko, **SUZUKI Yutaka**, NAKAYAMA Toshinori: Epigenetic regulation of helper T cells by Polycomb and Trithorax complexes, International Symposium on Genome Science, Tokyo, 2013. 1.9.〜10.
10. SASAKI Tetsuya, **ONODERA Atsushi**, HOSOKAWA Hiroyuki, WATANABE Yukiko, HORIUCHI Shu, YAMASHITA Junji, NAKAYAMA Toshinori: Genome-wide gene expression profiling revealed a critical role for GATA3 in the maintenance of the Th2 cell phenotype, 第41回日本免疫学会学術集会, 2012. 12.5.〜7. 神戸国際会議場
11. **Atsushi Onodera**, Shu Horiuchi, Hiroyuki Hosokawa, Yukiko Watanabe, **Yutaka Suzuki**, and Toshinori Nakayama: Genome-wide analysis reveals unique regulation of transcription of Th2-specific genes by GATA3, NCI Symposium on Chromosome Structure and Function, 2011.11.1.〜11.2. Bethesda, MD, USA.
12. Nakayama, T., and **Onodera, A.**: Epigenetic control of memory Th2 cell function via Polycomb and Trithorax molecules. EUThyme-Rolduc Meeting, 2011.5.21〜24. Leeuwenhorst, Netherland.
13. Nakayama, T., and **Onodera, A.**: Regulation of memory Th2 cell function and allergic airway inflammation via polycomb and trithorax molecules. 30th Congress of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2011.6.11〜15. Istanbul, Turkey.
14. 堀内周、**小野寺淳**、細川裕之、渡邊友紀子、**鈴木穣**、中山俊憲: GATA3 ChIP-sequence 解析を用いた Th2 特異的遺伝子の転写調節機構の解明, 第 5 回日本エピジェネティックス研究会, 2011. 5.19.〜20. KKR ホテル熊本
15. 堀内周、**小野寺淳**、細川裕之、渡邊友紀子、中山俊憲: GATA3 ChIP-sequence 解析を用いた Th2 特異的遺伝子の転写調節機構の解明, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011. 11.27.〜29. 幕張メッセ（千葉市）
16. **小野寺淳**、山下政克、遠藤裕介、桑原誠、東福寺聡一、細川裕之、堀内周、渡邊友紀子、中山俊憲: STAT6 によって誘導されるポリコームとトライソラックスの置換反応, 第 40 回日本免疫学会学術集会, 2011. 11.27.〜29. 幕張メッセ（千葉市）

小野寺康之（北海道大学）

1. 山本和輝・小野寺康之・三上哲夫：ホウレンソウの雄性および間性発現に関わる遺伝子間の対立性検定　日本育種学会　第 120 回講演会　2011 年秋季　福井県立大学　2011 年 9 月 23・24 日
2. 織田裕二・小野寺康之・三上哲夫：ホウレンソウ間性決定遺伝子近傍領域の連鎖地図の作成　第 120 回講演会　2011 年秋季　福井県立大学　　2011 年 9 月 23・24 日
3. 山本和輝・織田裕二・長谷田茜・小野寺康之・三上哲夫：性連鎖マーカーを用いたホウレンソウの雄性および間性決定遺伝子に関する対立性検定　日本育種学会　第 121 回講演会　2012 年春季　宇都宮大学　　2012 年 3 月 29・30 日
4. Yasuyuki Onodera, Hiroki Masumo, Itaru Yonaha, Kazuki Yamamoto, Yuji Oda, Tetsuo Mikami, Genetic analysis of the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L.

EUCARPIA Leafy Vegetables 2011, August 24-26, 2011, Université Lille Nord de France, Villeneuve d'Ascq, France

5. 織田 祐二, 長谷田 茜, 堀 英朗, 小野寺 康之, 三上 哲夫：ホウレンソウから見出された連鎖関係にある二つの性決定遺伝子座のマッピング　日本育種学会第 122 回講演会　平成 24 年 9/14-15 京都産業大学
6. 織田 裕二, 小野寺 康之, 豊田 敦, 山本 将之, 三上 哲夫：ホウレンソウにおける雄特異的ゲノム領域の構造解析　日本育種学会第 123 回講演会　平成 25 年 3/27-28　東京農業大学世田谷キャンパス
7. 長谷田茜，織田祐二，小野寺康之：ホウレンソウにおける間性決定遺伝子の量比と雌花着生比率の関連性　日本育種学会　第 124 回講演会　鹿児島大学　10 月 12 日-10 月 13 日
8. 鈴木伶実, 藤戸聡史, 星野洋一郎, 小野寺康之：*Spinacia* 属における分子系統学的解析および異型性染色体の探索　日本育種学会　第 125 回講演会　東北大学　3 月 21 日-3 月 22 日
9. 藤戸聡史, 鈴木伶実, 星野洋一郎, 近江戸伸子, 小野寺康之 : *Spinacia* 属から見出された同型および異型性染色体の FISH 法による特徴付け　日本育種学会　第 125 回講演会　東北大学　3 月 21 日-3 月 22 日
10. 高畠 聡史, 矢後 拓己, 本間 雄二朗, 久保 友彦, 小野寺 康之：テンサイとのシンテニーを利用したホウレンソウ性染色体の構造解析　日本育種学会　第 126 回講演会　宮崎県宮崎市　南九州大学　2014 年 9 月 26 日～9 月 27 日
11. 藤戸 聡史, 鈴木 伶実, 星野 洋一郎, 近江戸 伸子, 小野寺 康之：系統的に異なる Spinacia 属植物からの同型および異型性染色体の同定　第 37 回日本分子生物学会年会　パシフィコ横浜　2014 年 11 月 25 日～27 日
12. 高畠 聡史, 平川 英樹, 鈴木 穣, 小野寺 康之：トランスクリプトーム情報を利用したホウレンソウ性連鎖遺伝子群の網羅的同定　日本育種学会　第 127 回講演会　玉川大学 2015 年 3 月 21 日～22 日
13. 工藤 友裕，藤戸 聡史，豊田 敦，鈴木 穣，小野寺 康之：ホウレンソウ Y 染色体特異的領域に由来する BAC クローンの全長配列解析　日本育種学会　第 127 回講演会　玉川大学 2015 年 3 月 21 日～22 日
14. 岩渕 恵佑，高畠 聡史，小野寺 康之：ホウレンソウの間性主働遺伝子座の精密マッピングと物理地図作成　日本育種学会 第 128 回講演会 2015 年秋季 新潟大学　平成 27 年９月１１−１２日
15. 高畠 聡史，岩渕 恵佑，平川英樹，小野寺 康之：ホウレンソウ性染色体とテンサイ常染色体の比較解析　日本育種学会 第 129 回講演会 2015 年春季 横浜市立大学　平成 28 年 3 月 21−22 日

小野竜一（東京医科歯科大学）

1. 小野 竜一，黒木 陽子，成瀬 美衣，石井 雅之，岩崎 佐和，豊田 敦，藤山 秋佐夫，Geoff Shaw，Marilyn Renfree，金児-石野 知子，石野 史敏 Identification of SIRH12, a retrotransposon-derived gene specific to marsupial mammals. 横浜、201 1 年 12 月 **第 34 回日本分子生物学会年会**

小保方潤一（京都府立大学）

1. 「有殻アメーバ Paulinella chromatophora のトランスクリプトーム解析」潟端篤、松尾充啓、鈴木穣、水口洋平、野口英樹、豊田敦、藤山秋佐夫、佐藤壮一郎、松崎素道、中山卓郎、神川龍馬、野村真未、壁谷如洋、宮城島進也、稲垣 祐司、石田健一郎、小保方潤一, 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 11/25-27
2. 「有殻アメーバ Paulinella chromatophora のゲノム解析」松尾充啓、潟端篤、水口洋平、野口英樹、豊田敦、藤山秋佐夫、鈴木穣、佐藤壮一郎、松崎素道、中山卓郎、神川龍

馬、野村真未、壁谷如洋、宮城島進也、稲垣 祐司、石田健一郎、小保方潤一　第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 11/25-27

3. 「有殻アメーバ *Paulinella chromatophora* のゲノム・トランスクリプトームの解析より明らかとなったユニークな遺伝子構造とコアプロモーター構造」潟端篤、松尾充啓、鈴木穣、水口洋平、野口英樹、豊田敦、藤山秋佐夫、佐藤壮一郎、松崎素道、中山卓郎、神川龍馬、野村真未、稲垣裕司、石田健一郎、小保方潤一: 第 38 回 日本分子生物学会 3P0772 2015 年 12 月 3 日 神戸

鏡 雅代（国立成育医療研究センター）

1. Masayo Kagami, Takahide Hayano, Kazuyoshi Hosomichi, Kazuhiko Nakabayashi, Maki Fukami, Tsutomu Ogata, Ituro Inoue. Methylome analysis of the 14q32.2 imprinted region in patients with imprinting defects on human chromosome 14. 2nd EUROPEAN IMPRINTING DISORDER SCHOOL COST Action BM1208, May 4th 2015, Paris, France.
2. 鏡雅代、早野崇英、細道一善、深見真紀、緒方勤、井ノ上逸朗、ヒト14番染色体インプリンティング異常症患者における14番染色体インプリンティング領域のメチローム解析、第60回日本人類遺伝学会、2015年10月17日、東京

笠原和起（理化学研究所）

1. Takaoki Kasahara, Kuniya Abe, Tadafumi Kato. Molecular and genetic characterization of the mouse pseudoautosomal region. The 26th annual Mouse Molecular Genetics conference. 2013 年 9 月 19 日、Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, イギリス

風間裕介（理化学研究所）

1. 風間裕介、平野智也、大田修平、佐藤陽一、村井耕二、河野重行、小野克徳、阿部知子、「重イオンビームによるグリーンイノベーションの創出」 近畿作物・育種研究会公開シンポジウム 「変異創成技術の現状と未来」、2015 年 12 月 12 日、京都
2. 風間裕介、石井公太郎、阿部知子、河野重行、「巡回セールスマン問題を用いた植物型巨大 Y 染色体のマッピング」日本遺伝学会第 87 回大会ワークショップ「細胞遺伝学の新たなる地平と染色体研究の今」、2015 年 9 月 25 日、仙台
3. 風間裕介、石井公太郎、池田時浩、Dmitry Filatov、Margarita Chibalina、Roberta Bergero、Deborah Charlesworth、河野重行、阿部知子、「ヒロハノマンテマ Y 染色体の構造解析と組換え抑制領域の欠失マッピングプログラム DelMapper の開発」 日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 8 日、新潟
4. 風間裕介、石井公太郎、池田時浩、川元寛章、河野重行、阿部知子、「巡回セールスマン問題を応用したヒロハノマンテマ雄性決定領域の欠失マッピング」、日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日、川崎
5. 石井公太郎、風間裕介、川元寛章、河野重行、阿部知子、「Y 染色体遺伝子アレイを用いたヒロハノマンテマ性分化ステージの発現プロファイリング」日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日、川崎
6. 風間裕介、石井公太郎、池田時浩、川元寛章、河野重行、阿部知子、「巨大 Y 染色体との格闘～ヒロハノマンテマの性決定遺伝子の探索～」、日本育種学会第 125 回講演会ワークショップ「ワイルドはセクシーだ！」、2014 年 9 月 26 日、 都城
7. 風間裕介、石井公太郎、池田時浩、川元寛章、河野重行、阿部知子、「巡回セールスマン問題を応用した重イオンビーム欠失マッピング」、イオンビーム育種研究会 第 10 回大会、2014 年 7 月 17 日、　水戸
8. 風間裕介、平野智也、石井公太郎、青沼航、川元寛章、池田時浩、河野重行、阿部知子、「重イオンビーム誘発巨大欠失を用いた植物ゲノム研究ルネサンス」、理研シンポジウム「ゲノム新時代の重イオンビーム育種-Mutagenesis から Mutagenomics へ-」、2014 年 1 月 23 日、和光

9. 風間裕介、石井公太郎、青沼航、川元寛章、池田時浩、松永杏樹、河野重行、阿部知子、「巡回セールスマン問題を応用したヒロハノマンテマ Y 染色体欠失マッピング」、日本育種学会第 123 回講演会、2013 年 10 月 13 日、鹿児島
10. 風間裕介、石井公太郎、藤田尚子、青沼航、清水祐史、河野重行、阿部知子、「重イオンビーム照射で得た無性花変異体を用いた植物 Y 染色体雄性決定領域の解析」 日本育種学会第 119 回講演会 2011 年 3 月 30 日、 横浜

勝間 進（東京大学）

1. 相澤昂洋・川本宗孝・内山航大・鈴木穣・今西重雄・川崎秀樹・勝間進・岩永将司, *Bombyx mori* macula-like virus 感染細胞のトランスクリプトーム解析, 平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2015 年 9 月 26-27 日, 北海道大学
2. 藤本正太・川本宗孝・鈴木穣・川崎秀樹・岩下嘉光・勝間進・岩永将司, カイコ核多角体病ウイルス La 株の性状解析, 平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 2015 年 9 月 26-27 日, 北海道大学
3. 勝間進・川本宗孝・石原玄基・菅野純夫・鈴木穣・嶋田透, BmNPV の *gp64* 初期転写物は経口感染に必須である, 昆虫病理研究会, 2015 年 9 月 25 日, 北海道大学

鎌形洋一（産業技術総合研究所）

1. 竹内美緒・丸茂克美・前田広人・根建宗具・大島健志朗・片山泰樹・山岸昂夫・岩崎渉・鎌形洋一・花田智・玉木秀幸・服部正平・諏訪裕一・坂田将鹿児島湾海底堆積物中に生息するメタンを基盤とする新規中温性微生物群の生理学的・遺伝学的特徴の解明. 日本微生物生態学会（平成25年11月開催, 鹿児島）
2. Takeuchi M., Marumo K., Maeda H., Nedachi M., Oshima K., Katayama T., Yamagishi T., Iwasaki W., Kamagata Y.,Hanada S., Tamaki H., Hattori M., Suwa Y., Sakata S.Novel marine moderately thermophilic microbes isolated from microbial consortium dependent on methane. 第５回日韓台微生物生態学国際シンポジウム（平成25年11月開催, 台湾）

川上浩一（国立遺伝学研究所）

1. Kawakami, K.. The study of amygdalar and hippocampal functions in zebrafish. “Imaging the nervous (Cambridge Univ Symposium)”（招待講演）, 2015.9.9-10, ケンブリッジ大学。
2. Kawakami, K., Lal, P., and Tanabe, H. The study of amygdalar and hippocampal functions in zebrafish. 8th Zebrafish Disease Models Conference（招待講演）, 2015.8.24-27. ハーバード大学（ボストン)。

川口正代司（基礎生物学研究所）

1. Handa, Y., Takeda, N., Suzuki, Y., Kawaguchi, M., Saito, K. RNA-seq analysis of root nodules and arbuscular mycorrhiza in *Lotus japonicus* and *de novo* transcriptome assembly of *Glomus intraradices*. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, Kyoto, 2012 年 9 月
2. 半田佳宏、武田直也、鈴木穣、川口正代司、斎藤勝晴. ミヤコグサにおける根粒と菌根の RNA-seq 解析. 第 22 回植物微生物研究交流会、岡崎、2012 年 9 月
3. 半田佳宏、武田直也、鈴木穣、川口正代司、斎藤勝晴. 次世代シークエンサーを用いた新奇菌根共生制御遺伝子の同定. 第 54 回日本植物生理学会大会、岡山、2013 年 3 月
4. 半田佳宏、武田直也、鈴木穣、川口正代司、斎藤勝晴. アーバスキュラー菌根共生の制御機構の解明. NGS 現場の会 第三回研究会、神戸、2013 年 9 月
5. 半田佳宏、武田直也、鈴木穣、川口正代司、斎藤勝晴. アーバスキュラー菌根共生のトランスクリプトーム解析. 日本植物学会第 77 回大会、北海道、2013 年 9 月
6. Sasaki,T., Suzaki,T., Soyano,T., Handa, Y., Suzuki, Y., Kawaguchi, M. Searching for shoot-derived inhibitor of root nodulation in *Rhizobium*-legume symbiosis.

7. 第 55 回植物生理学会年会、富山大学、2014 年 3 月

河野重行（東京大学）

1. 清水恭夫、山﨑誠和、大田修平、市原健介、鈴木亮吾、宮村新一、桑野和可、河野重行：*Ulva partita* ゲノムの雌雄特異的領域にある遺伝子とその発現パターン．日本藻類学会 40 回大会、2016 年 3 月 19 日、日本歯科大学（東京都、千代田区）
2. 市原健介，宮村新一，平岡雅規，河野重行：緑藻スジアオノリに見られるアポミクシスの解析．日本藻類学会 40 回大会、2016 年 3 月 19 日、日本歯科大学（東京都、千代田区）
3. 市原健介、鈴木亮吾、山崎誠和、桑野和可、河野重行：九州・四国沿岸域のアオサ属の種多様性と一新種の発見．日本藻類学会第 39 回大会、2015 年 3 月 22 日、九州大学箱崎キャンパス（福岡県、福岡市）
4. 山崎誠和、鈴木亮吾、市原健介、豊田敦、桑野和可、鈴木穣、河野重行：アオサ藻綱ヒラアオノリのゲノム解読と雌雄ゲノムの比較による性決定領域の探索．日本藻類学会第 39 回大会、2015 年 3 月 22 日、九州大学箱崎キャンパス（福岡県、福岡市）
5. 河野重行：藻類の雌雄非対称性の成立、ゲノム支援公開シンポジウム、2014 年 12 月 12 日、東京国際フォーラム（東京都、千代田区）
6. 鈴木亮吾、清水恭夫、市原健介、山崎誠和、桑野和可、河野重行：ヒラアオノリの一過的形質転系を用いて観察した単為生殖過程のオルガネラと細胞の動態．日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県、川崎市）
7. 鈴木亮吾、清水恭夫、市原健介、山崎誠和、桑野和可、河野重行：ヒラアオノリ配偶子の単為発生過程における葉緑体とミトコンドリアの動態の可視化．日本植物形態学会第 26 回総会・大会、2014 年 9 月 11 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県、川崎市）
8. 鈴木亮吾、伊藤寛、尾関海、余哲、山崎誠和、豊田敦、桑野和可、河野重行：ヒラアオノリ配偶子の一過的形質転換系による葉緑体とミトコンドリアの可視化とその動態．日本藻類学会第 38 回大会、2014 年 3 月 15 日、東邦大学習志野キャンパス（千葉県、船橋市）
9. 河野重行：有性生殖と生活環制御が切り拓く藻類バイオの新戦略、日本植物学会第 77 回大会、2013 年 9 月 13 日、北海道大学高等教育推進機構（北海道、札幌市）
10. Suzuki, R., Endo, M., Mogi, Y., Miyamura, S., Kuwano, K. and Kawano, S.: Allo-authentication revealed by sexual asymmetry and uniparental organelle-inheritance of male- and femalegametes in the green alga, *Ulva compressa*. International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants. Joint Meeting of the 2nd Allo-authentication Meeting and the 5th Egg-Coat Meeting (MCBEEC). Hotel Nagoya Garden Palace, November 12-16, 2012 (Nagoya, Japan)

河原行郎（大阪大学）

1. 李　全、鈴木　穣、河原　行郎. A message from TDP-43/FUS complexes: narrow down the ALS-associated RNA targets. NGS 現場の会第二回研究会. 2012 年 5 月 23-24 日．大阪.
2. Munetaka Yamamoto, Quan Li, Sigeto Seno, Hideo Matsuda, Yutaka Suzuki, Yukio Kawahara. A common RNA targets of TDP-43 and FUS: an investigation into the disease mechanism of ALS. International Symposium on Genome Science. 2013.1.9. Tokyo.
3. 山本 宗隆，李 全，瀬尾 茂人，松田 秀雄，鈴木　穣，河原　行郎. Identification of RNA targets of TDP-43 and FUS by PAR-CLIP: an investigation into the disease mechanism of ALS. 第 4 回生命情報科学若手の会研究会. 2013 年 3 月 1-3 日．基礎生物学研究所 (愛知).
4. Quan Li, Munetaka Yamamoto, Sigeto Seno, Hideo Matsuda, Yutaka Suzuki, Yukio Kawahara. Comprehensive analysis of the roles of TDP-43 and FUS in RNA processing. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2013.6.20-23. Kyoto.

5. 山本　宗隆、李　全、鈴木　穣、河原　行郎. PAR-CLIP 法を用いた TDP-43 と FUS に共通するターゲットの同定. 第１５回日本 RNA 学会年会. 2013 年 7 月 24-26 日. 愛媛.
6. Yukio Kawahara. Toward a comprehensive functional analysis of Ataxin-2 for the understanding of a common mechanism underlying neurodegeneration. The 36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2013.6.20-23. Kyoto.
7. Yukio Kawahara. Toward a comprehensive analysis of Ataxin-2 functions for the understanding of a common mechanism underlying neurodegeneration. The 91th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2014.3.16-18. Kagoshima.
8. 河原　行郎.神経変性疾患と RNA 結合蛋白質. 第１２回日本プロテオーム学会年会. 2014.7.16-18. 筑波.
9. 河原　行郎.Ataxin-2 の生理的機能と polyQ 鎖伸長の病的意義について. 第１６回日本 RNA 学会年会. 2014.7.23-25. 名古屋.
10. 余越 萌、李 全、山本 宗隆、岡田 ひとみ、鈴木 穣、河原 行郎. 神経変性疾患関連タンパク質 Ataxin-2 による mRNA 安定化機構の解明. 第１６回日本 RNA 学会年会. 2014.7.23-25. 名古屋.
11. Kawahara, Y. Elucidation of Ataxin-2-mediated regulation of RNA metabolism. 第37回日本神経科学大会. 2014. 9. 11. 横浜　神奈川.
12. Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Ataxin-2 promotes the stability of mRNA through the direct binding to the distinct motifs. The EMBO | EMBL Symposium “Complex Life of mRNA”, 2014. 10. 5-8, Heidelberg, Germany.
13. Yokoshi, M., Li, Q., Yamamoto, M., Okada, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Ataxin-2 promotes the stability of mRNA through the direct binding to the distinct motifs. Joint Australia and Japan RNA Meeting 2014, 2014. 11. 2-5, Sydney, Australia.
14. Kawahara, Y. The physiological and pathological roles of Ataxin-2, a key player in neurodegeneration. 1st International Joint Symposium on Developmental Regulation of Gene Expression. 2014. 11. 9. 上海　中国.
15. 余越　萌、李　全、山本　宗隆、河原　行郎. 複数の神経変性疾患に関与する Ataxin-2 の生理的・病理的役割について. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014.11.25-27. 横浜　神奈川.
16. 余越　萌、李　全、山本　宗隆、河原　行郎. Ataxin-2 promotes the stability of mRNA through the direct binding to the distinct motifs. 2014 年度包括脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム. 2014.12.11-13. 東京医科歯科大学　東京.
17. 河原　行郎. 神経変性疾患とRNA結合タンパク質. 第4回ゲノム支援公開シンポジウム. 2014. 12. 12. 有楽町　東京.
18. Yamamoto, M., Yokoshi, M., Li, Q., Okada, H., Suzuki, Y., Kawahara, Y. Ataxin-2 stabilizes mRNA through the direct binding to the distinct motifs in 3’UTRs. NCI Symposium “RNA Biology 2015”, 2015. 3. 11-12, Bethesda, MA, USA.
19. Kawahara, Y. Neurodegeneration-associated mutation attenuates Ataxin-2-mediated stabilization of mRNAs.第 38 回日本分子生物学会年会, 2015. 12. 1-4. 神戸　兵庫.
20. 余越 萌、李 全、山本 宗隆、岡田 ひとみ、鈴木 穣、河原 行郎. U-rich RNA 結合タンパク質 Ataxin-2 は mRNA を安定化する. RNA フロンティアミーティング 2015. 2015. 12. 8-10. 蔵王　山形.

河村正二（東京大学）

1. Kawamura, S.: Color vision diversity and significance in primates inferred from genetic and field studies. **International Conference of the Genetics Society of Korea, 2015 (GSK2015)**, Hanyang University, Seoul, Korea, December 4-5, 2015. (Oral) (Invited)
2. 河村正二: 霊長類の色覚の由来から考えるヒト色覚の多様性の意味. **人間総合科学大学 第 27 回心身健康科学サイエンスカフェ**、人間総合科学大学 東京サテライト、御茶ノ水、2015 年 11 月 27 日. (口演) (Invited)

3. Kawamura, S.: Significance of color vision diversity in primates inferred from genetic and field studies. **The 17th Annual Meeting of the Society for Evolutionary Studies, Japan: Symposium "Sensory genetics, ecology and evolution of primates"**, Chuo University Korakuen Campus, Tokyo. August 20-23, 2015. (Oral) (Symposium organized by S. Kawamura and H. Imai)
4. Sakai, Y., Kasagi, S., Kawamura, S., Ohtsuki, H. and Kawata, M.: Variation of absorption spectrum and gene expression pattern of red opsins under different light environments and its effect on behavioral spectral sensitivity in guppies, *Poecilia reticulata*. **15th congress of the European Society for Evolutionary Biology**, The University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, August 10-14, 2015. (Oral)
5. Kawamura, S.: Evolutionary diversity of colour vision in primates: implications from field and genetic studies. **The 23rd Symposium of the International Colour Vision Society (ICVS 2015)**, Tohoku University Katahira Campus Sakura Hall, Sendai, Japan, July 3-7, 2015. (Oral) (Invited)
6. Pablo-Rodríguez, M., Matsushita, Y., Schaffner, C. M., Aureli, F., Hernández-Salazar, L. T. and Kawamura, S.: Prevalence of dichromacy and anomalous trichromacy in a wild population of spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) in Yucatan, Mexico. **The 5th Mexican Congress of Primatology**, USBI, Boca del Río, Veracruz, Mexico, June 29 – July 2, 2015. (Poster).
7. 酒井祐輔、大槻朝、笠木聡、河村正二、河田雅圭: グッピーにおいて生息光環境の変化がオプシン遺伝子発現量と色覚に与える影響. **第 62 回日本生態学会大会**、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島、2015 年 3 月 18-22 日. (口演)
8. 筒井圭、尾頭雅大、櫻井児太摩、鈴木-橋戸南美、早川卓志、Welker, B. J., Aureli, F.、Schaffner, C. M.、Fedigan, L. M.、河村正二、今井啓雄: 新世界ザルの苦味受容体応答の種間差. **第 59 回プリマーテス研究会**、日本モンキーセンター、犬山、2015 年 1 月 31 日. (ポスター)
9. Tsutsui, K., Otoh, M., Sakurai, K., Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Welker, B. J., Aureli, F., Schaffner, C. M., Fedigan, L. M., Kawamura, S. and Imai, H.: Interspecific variation of ligand sensitivity and evolution of bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World monkeys. **12th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception**, Kyushu University, Fukuoka, Japan, November 2-3, 2014. (Poster).
10. Tsutsui, K., Otoh, M., Sakurai, K., Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Welker, B. J., Aureli, F., Schaffner, C. M., Fedigan, L. M., Kawamura, S. and Imai, H.: Interspecific variation in ligand sensitivity of G-protein-coupled bitter taste receptors in New World monkeys. **16th International Conference on Retinal Proteins**, Nagahama Royal Hotel, Nagahama, Japan, October 5-10, 2014. (Poster)
11. Tsutsui, K., Otoh, M., Sakurai, K., Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Welker, B. J., Aureli, F., Schaffner, C. M., Fedigan, L. M., Kawamura, S. and Imai, H.: Interspecific variation of ligand sensitivity and evolution of bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World monkeys. **The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan**, Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan, September 25-27, 2014. (Poster)
12. 酒井祐輔、大槻朝、笠木聡、河村正二、河田雅圭: グッピーにおいて光環境がオプシン遺伝子の発現量の変化におよぼす影響. **第 16 回日本進化学会**、高槻現代劇場、高槻市、2014 年 8 月 21-24 日. (口演)
13. Kawamura, S., Tsutsui, K., Otoh, M., Matsushita, Y., Sakurai, K., Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Shirasu, M., Melin A. D., Bergstrom M. L., Welker B. J., Schaffner, C. M., Aureli, F., Fedigan, L. M., Touhara, K. and Imai, H.: Towards understanding evolutionary diversity of chemical sensors in New World monkeys with polymorphic color vision. **The 25th Congress of the International Primatological Society (IPS 2014)**, Melia Hotel, Hanoi, Vietnam, August 11-16, 2014. (Oral)
14. Matsushita1, Y., Pablo-Rodríguez, M., Schaffner, C. M., Ramos-Fernandez, G., Aureli, F. and

Kawamura, S.: Novel L/M opsin alleles create unique color vision
15. in Mexican spider monkeys. **The 25th Congress of the International Primatological Society (IPS 2014)**, Melia Hotel, Hanoi, Vietnam, August 11-16, 2014. (Oral)
16. Tsutsui, K., Otoh, M., Sakurai, K., Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Welker, B. J., Aureli, F., Schaffner, C. M., Fedigan, L. M., Kawamura, S. and Imai, H.: Functional diversity of bitter taste receptors in new world monkeys. **The 25th Congress of the International Primatological Society (IPS 2014)**, Melia Hotel, Hanoi, Vietnam, August 11-16, 2014. (Poster)
17. 松下裕香、Pablo-Rodriguez, M.、Schaffner, C. M.、Ramos-Fernandez, G.、Aureli, F.、○河村正二:メキシコユカタン半島 Punta Laguna 地域のクモザル野生集団に見出した新規 L/M オプシンアレルと新たな色覚多様性．**第 30 回日本霊長類学会**、大阪大学・大阪科学技術センター、吹田市・大阪市、2014 年 7 月 4-6 日．(口演)
18. 今井啓雄、筒井圭、尾頭雅大、櫻井児太摩、鈴木-橋戸南美、早川卓志、Aureli, F.、Schaffner, C. M.、Fedigan, L. M.、河村正二:新世界ザル苦味受容体機能の種間差．**第 30 回日本霊長類学会**、大阪大学・大阪科学技術センター、吹田市・大阪市、2014 年 7 月 4-6 日．(ポスター)
19. 栗山友理子、石崎直也、白井裕介、福世裕貴子、Kidd, K. K.、太田博樹、手島康介、河村正二:ヒト色覚多型の起源解明を目指した L-M オプシン遺伝子間塩基相違度の exon・intron 領域による違い方の集団間及び種間比較．**第 67 回日本人類学会**、国立科学博物館 上野本館・筑波研究施設、東京上野・つくば市、2013 年 11 月 1-4 日．(口演)
20. Tsutsui, K., Otoh, M., Sakurai, K., Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Aureli, F., Schaffner, C. M., Fedigan, L. M., Kawamura, S., Imai, H.: Functional diversity of bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World monkeys. **The 11th International Symposium on Molecular and Neural Mechanisms of Taste and Olfactory Perception (YR Umami Forum 2013: ISMNTOP 2013)**, Kyushu Uniersity Station-I and II, Collaborative Research, Fukuoka, Japan, October 31-November 2, 2013. (Poster)
21. Tsutsui, K., Otoh, M., Sakurai, K., Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Aureli, F., Schaffner, C. M., Fedigan, L. M., Kawamura, S., Imai, H.: Functional diversity of bitter taste receptors TAS2R1 and TAS2R4 in New World monkeys. **The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan**, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, October 28-30, 2013. (Poster)
22. 栗山友理子、石崎直也、白井裕介、福世裕貴子、Kidd, K. K.、太田博樹、手島康介、河村正二:L-M オプシン遺伝子間塩基相違度の exon・intron 領域による違い方を集団間及び種間で比較することでヒト色覚多型の起源を探る．**第 85 回日本遺伝学会**、慶応大学日吉キャンパス第 4 校舎独立館、横浜市、2013 年 9 月 19-21 日．(口演)
23. 河村正二、松本圭史、平松千尋、松下裕香、小澤範宏、蘆野龍一、中田真紀子、笠木聡、Di Fiore, A.、Schaffner, C. M.、Aureli, F.、Melin, A.:クモザル亜科 L/M オプシン多型の進化的改編による果実と背景葉の色識別能の向上．**第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会**、岡山理科大学、岡山市、2013 年 9 月 6-9 日．(口演)
24. 松下裕香、太田博樹、Welker, B.、Pavelka, M.、河村正二:霊長類における定向的色覚進化モデルの反証としてのホエザル属 3 色型色覚の多様性の実証．**第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会**、岡山理科大学、岡山市、2013 年 9 月 6-9 日．(口演)
25. 尾頭雅大、筒井圭、櫻井児太摩、鈴木-橋戸南美、早川卓志、Aureli, F.、Schaffner, C. M.、Fedigan, L. M.、今井啓雄、河村正二:色覚・食性の異なる新世界ザル種間における苦味受容体 TAS2R1 及び 4 のリガンド感受多様性．**第 29 回日本霊長類学会・日本哺乳類学会 2013 年度合同大会**、岡山理科大学、岡山市、2013 年 9 月 6-9 日．(ポスター)
26. 河村正二、松本圭史、平松千尋、松下裕香、小澤範宏、蘆野龍一、中田真紀子、笠木聡、Di Fiore, A.、Aureli, F.、Schaffner, C. M.、Melin, A.:クモザル亜科にみられる L/M オプシン多型の進化的改編がもたらした果実と背景葉の色識別能の向上．**第 15 回日本進化学会**、筑波大学筑波キャンパス、つくば市、2013 年 8 月 28-31 日．(口演)

27. 松下裕香、太田博樹、Welker, B.、Pavelka, M.、河村正二:ホエザル属 3 色型色覚の多様性実証による霊長類における定向的色覚進化モデル妥当性の検討．**第 15 回日本進化学会**、筑波大学筑波キャンパス、つくば市、2013 年 8 月 28-31 日．(口演)
28. Kawamura, S., Matsushita, Y., Melin, A. D., Mortiz, G. L. and Dominy, N. J.: Possible mesopic origin of primate trichromatic color vision inferred from L/M opsin polymorphism of ancestral tarsiers. **Annual Conference of the Society for Molecular Biology and Evolution 2013 (SMBE 2013)**, Hyatt Regency Chicago, Chicago, Illinois, USA, July 7-11, 2013. (Poster)
29. Matsushita, Y., Oota, H., Welker, B., Pavelka, M. and Kawamura, S.: Variability of trichromatic color vision in howler monkeys by L/M hybrid opsin genes. **Annual Conference of the Society for Molecular Biology and Evolution 2013 (SMBE 2013)**, Hyatt Regency Chicago, Chicago, Illinois, USA, July 7-11, 2013. (Poster)
30. 河村正二:魚類をモデルとした色覚進化の適応的柔軟性の検討．**三重大学 COE-A（世界に誇れる世界トップレベルの研究拠点）「魚類をモデルとした生物多様性と次世代型ポストゲノム教育研究拠点」シンポジウム 「色覚・光受容機能の多様性・環境応答とその応用」**、三重大学生物資源学部、津、2013 年 1 月 23 日．(口演) (Invited)
31. 河村正二、櫻井児太摩、白須未香、松下裕香、Melin, A.、Bergstrom, M.、今井啓雄、東原和成、太田博樹、Aureli, F.、Fedigan, L.:色覚多型を示す新世界ザル野生集団における苦味受容体遺伝子群の種内変異と採食果実の香気成分分析．**第 66 回日本人類学会**、慶應義塾大学日吉キャンパス、横浜市、2012 年 11 月 2-4 日．(口演)
32. 河村正二、松下裕香、Melin, A.、Moritz, G.、Dominy, N.:夜行性メガネザル 3 種の L/M オプシン遺伝子と共通祖先に維持された色覚多型の検討.**第 84 回日本遺伝学会**、九州大学医学部百年講堂･同窓会館、福岡、2012 年 9 月 24-26 日．(口演)
33. 河村正二、笠木聡、蘆野龍一、松下裕香、石崎直也、櫻井児太摩、尾頭雅大、栗山友理子、太田博樹、手塚あゆみ、河田雅圭:霊長類の自然集団に注目した感覚関連遺伝子の多様性の探索と適応進化の検証．**2012 年度「ゲノム支援」拡大班会議**、御殿場高原ホテル、御殿場、2012 年 8 月 29-30 日．(口演+ポスター)
34. 河村正二、笠木聡、手塚あゆみ、河田雅圭:色覚オプシンの種内多様性と環境適応．**2012 年度「ゲノム支援」拡大班会議**、御殿場高原ホテル、御殿場、2012 年 8 月 29-30 日．(ポスター)
35. 河村正二、櫻井児太摩、白須未香、松下裕香、Melin, A.、Bergstrom, M.、今井啓雄、東原和成、太田博樹、Aureli, F.、Fedigan, L.:新世界ザル野生集団における苦味受容体遺伝子群の種内変異と採食果実の香気成分分析．**第 14 回日本進化学会**、首都大学東京南大沢キャンパス、八王子、2012 年 8 月 21-24 日．(口演)
36. 酒井祐輔、大槻朝、手塚あゆみ、笠木 聡、河村正二、河田雅圭 : グッピーにおける LWS オプシン遺伝子の多型と遺伝子発現量及び長波長光感受性との関連．**第 14 回日本進化学会**、首都大学東京南大沢キャンパス、八王子、2012 年 8 月 21-24 日．(ポスター)
37. Kawamura, S., Matsumoto, Y., Matsushita, Y., Ozawa, N., Nakata, M., Kasagi, S. and Hiramatsu, C.: Improvement of chromatic resolution of L/M opsin alleles in atelid New World monkeys. **The 24th Congress of the International Primatological Society (IPS 2012)**, Cancun Convention Center, Cancun, Mexico, August 12-17, 2012. (Oral)
38. Kawamura, S., Sakurai, K., Bergstrom, M., Shirasu, M., Matsushita, Y., Melin, A., Imai, H., Touhara, K., Oota, H., Aureli, F. and Fedigan, L.: Assessment of bitter taste receptor gene variation and dietary fruit odorants in natural populations of color-vision polymorphic New World Monkeys. **The 24th Congress of the International Primatological Society (IPS 2012)**, Cancun Convention Center, Cancun, Mexico, August 12-17, 2012. (Oral)
39. Matsushita, Y., Oota, H., Welker, B., Pavelka, M. and Kawamura, S.: Possible anomalous trichromacy of color vision by hybrid L/M opsin genes in wild howler monkeys, *Alouatta*. **The 24th Congress of the International Primatological Society (IPS 2012)**, Cancun Convention Center, Cancun, Mexico, August 12-17, 2012. (Oral)
40. 河村正二、櫻井児太摩、白須未香、松下裕香、Melin, A.、Bergstrom, M.、今井啓雄、東

原和成、太田博樹、Aureli, F.、Fedigan, L.:新世界ザル野生集団における苦味受容体遺伝子群の多様性と採食果実の香気成分分析．**第 28 回日本霊長類学会**、椙山女学園星ヶ丘キャンパス、名古屋、2012 年 7 月 6-8 日．(口演)

41. 松下裕香、Melin, A.、Moritz, G.、Dominy, N.、河村正二:メガネザル 3 種の L/M オプシン遺伝子解析による共通祖先色覚多型の検討.**第 28 回日本霊長類学会**、椙山女学園星ヶ丘キャンパス、名古屋、2012 年 7 月 6-8 日．(口演)
42. Kawamura, S., Matsumoto, Y., Matsushita, Y., Ozawa, N., Nakata, M., Kasagi, S. and Hiramatsu, C.: Mutations improving chromatic resolution of L/M opsin alleles in atelid New World monkeys. **The 20th Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution 2012 (SMBE 2012)**, The Convention Centre Dublin, Ireland, June 23-26, 2012. (Poster)
43. Matsushita, Y., Oota, H., Welker, B., Pavelka, M. and Kawamura, S.: Color vision variation of trichromacy by L/M hybrid genes in wild populations of New World howler monkeys. **The 20th Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution 2012 (SMBE 2012)**, The Convention Centre Dublin, Ireland, June 23-26, 2012. (Poster)
44. Kawamura, S.: Molecular mechanism and adaptive significance of evolutionary diversification of visual opsins. **The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan: Symposium 38: Functional evolution of sensing receptors: Toward the comprehensive understanding by fusion of research in the different fields** (Organized by Makoto Tominaga and Hioo Imai), Shinshu University Matsumoto Campus, Matsumoto, Japan, March 29-31, 2012. (Oral) (Invited)
45. Kawamura, S.: Color vision polymorphism in wild New World monkeys and adaptive significance of primate color vision. **The 8th Okazaki Biology Conference (OBC8): Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics -**, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan, March 18-23, 2012. (Oral) (Invited)
46. 河村正二:魚類と霊長類の研究から見えてきた色覚進化の秘密．**日本塗装技術協会 第 27 回塗料･塗装研究発表会**、東京大学生産技術研究所、駒場リサーチキャンパス･コンベンションホール、駒場、2012 年 3 月 9 日．(口演) (Invited)
47. 河村正二:霊長類自然集団に対する感覚関連遺伝子の多様性と適応進化の検証．**平成 23 年度京都大学霊長類研究所･共同利用研究会「行動特性を支配するゲノム基盤と脳機能の解明」**、京都大学霊長類研究所、犬山、2012 年 3 月 2-3 日．(口演) (Invited)
48. 河村正二、櫻井児太摩、石崎直也、松下裕香、太田博樹:霊長類の自然集団に注目した感覚関連遺伝子の多様性の探索と適応進化の検証：新世界ザル苦味受容体とヒト L/M オプシンの集団多型調査．**2011 年度「ゲノム支援」拡大班会議**、新大阪ワシントンホテル、大阪、2011 年 12 月 17-18 日．(ポスター)
49. 河村正二、手塚あゆみ、笠木聡、河田雅圭:色覚オプシンの種内多様性と環境適応：グッピー視覚オプシンの遺伝的多型と自然選択．**2011 年度「ゲノム支援」拡大班会議**、新大阪ワシントンホテル、大阪、2011 年 12 月 17-18 日．(ポスター)
50. 松下裕香、太田博樹、Welker, B、Pavelka, M.、河村正二:旧世界霊長類型 3 色型色覚とされてきた新世界ホエザル野生群における L/M オプシン遺伝子多型調査．**第 34 回日本分子生物学会**、パシフィコ横浜、横浜、2011 年 12 月 13-16 日．(口演+ポスター)
51. 河村正二:色覚進化研究の人類学的展開：魚類と霊長類に見られる視覚光センサーの進化多様性を通して．**北里大学海洋分子生物学特別セミナー**、北里大学相模原キャンパス、神奈川、2011 年 12 月 2 日．(口演) (Invited)
52. 松下裕香、太田博樹、Welker, B、Pavelka, M.、河村正二:ヒトを含む旧世界霊長類型 3 色型色覚とされてきた新世界ホエザル野生群における色覚多型性調査．**第 65 回日本人類学会**、沖縄県立博物館・美術館、那覇、2011 年 11 月 4-6 日．(口演)
53. 石崎直也、白井裕介、福世裕貴子、石田肇、Kidd, K. K.、太田博樹、河村正二:ヒト色覚多型の起源と適応的意味の解明を目指した L/M オプシン遺伝子の人類集団多型解析（経過報告）．**第 65 回日本人類学会**、沖縄県立博物館・美術館、那覇、2011 年 11 月 4-6

日．(口演)

54. 櫻井児太摩、Bergstrom, M.、白須未香、今井啓雄、東原和成、太田博樹、Aureli, F.、Fedigan, L.、河村正二:色覚種内多型を示す新世界ザル野生集団における苦味受容体遺伝子の多型解析と採食果実匂い物質の同定．**第 65 回日本人類学会**、沖縄県立博物館・美術館、那覇、2011 年 11 月 4-6 日．(口演)
55. Kawamura, S.: Evolution of visual opsin genes in fish and primates. **15th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles (15th EBM)**, Regional Center of Educational Documentation ("Centre Regional de Documentation Pedagogique"), Marseilles, France, September 27-30, 2011. (Oral) (Invited)
56. 松下裕香、太田博樹、Welker, B、Pavelka, M.、河村正二:新世界ホエザル野生群に対する旧世界霊長類型３色型色覚の多型性調査．**第 83 回日本遺伝学会**、京都大学吉田キャンパス北部構内、京都、2011 年 9 月 20-23 日．(口演)
57. 松下裕香、太田博樹、Welker, B.、Pavelka, M.、河村正二: Finding a polymorphism of the L-M opsin gene in howler monkeys which have been supposed to have uniform trichromacy in New World monkeys. **第 13 回日本進化学会**、京都大学百周年時計台記念館、京都、2011 年 7 月 29-31 日． (口演)
58. 笠木聡、手塚あゆみ、河田雅圭、河村正二: Spectral characterization of guppy visual opsins. **第 13 回日本進化学会**、京都大学百周年時計台記念館、京都、2011 年 7 月 29-31 日． (ポスター)
59. 石崎直也、白井裕介、福世裕貴子、石田肇、Kidd, K. K.、太田博樹、河村正二: Toward understanding evolutionary force behind color vision polymorphism in humans. **第 13 回日本進化学会**、京都大学百周年時計台記念館、京都、2011 年 7 月 29-31 日． (ポスター)
60. 櫻井児太摩、Bergstrom, M.、白須未香、今井啓雄、東原和成、太田博樹、Aureli, F.、Fedigan, L.、河村正二: Toward understanding importance of chemical sense in primates: a study of natural populations of color-vision polymorphic New World monkeys. **第 13 回日本進化学会**、京都大学百周年時計台記念館、京都、2011 年 7 月 29-31 日． (ポスター)
61. Kawamura, S.: Evolutionary study of vertebrate color vision: from fish transgenesis to field primatology, and to human variation. **Annual Conference of Soceity for Molecular Biology and Evolution 2011 (SMBE 2011)**, Kyoto University (Clock Tower Centennial Hall and Shiran Kaikan) and Miyako Messe, Kyoto, Japan, July 26-30, 2011. (Oral) (Invited) Plenary Talk
62. Kasagi, S., Tezuka, A., Kawata, M. and Kawamura, S.: Spectral characterization of guppy visual opsins. **Annual Conference of Soceity for Molecular Biology and Evolution 2011 (SMBE 2011)**, Kyoto University (Clock Tower Centennial Hall and Shiran Kaikan) and Miyako Messe, Kyoto, Japan, July 26-30, 2011. (Poster)
63. Matsushita, Y., Oota, H., Welker, B., Pavelka, M. and Kawamura, S.: Finding a polymorphism of the L-M opsin gene in howler monkeys which have been supposed to have uniform trichromacy in New World monkeys. **Annual Conference of Soceity for Molecular Biology and Evolution 2011 (SMBE 2011)**, Kyoto University (Clock Tower Centennial Hall and Shiran Kaikan) and Miyako Messe, Kyoto, Japan, July 26-30, 2011. (Poster)
64. Ishizaki, N., Shirai, K., Fukuyo, Y., Ishida, H., Kidd, K. K., Oota, H. and Kawamura, S.: Toward understanding evolutionary force behind color vision polymorphism in humans. **Annual Conference of Soceity for Molecular Biology and Evolution 2011 (SMBE 2011)**, Kyoto University (Clock Tower Centennial Hall and Shiran Kaikan) and Miyako Messe, Kyoto, Japan, July 26-30, 2011. (Poster)
65. Sakurai, K., Bergstrom, M., Shirasu, M., Imai, H., Touhara, K.,Oota, H., Aureli, F., Fedigan, L. and Kawamura, S.: Toward understanding importance of chemical sense in primates: a study of natural populations of color-vision polymorphic New World monkeys. **Annual Conference of Soceity for Molecular Biology and Evolution 2011 (SMBE 2011)**, Kyoto University (Clock Tower Centennial Hall and Shiran Kaikan) and Miyako Messe, Kyoto, Japan, July 26-30, 2011. (Poster)

66. 松下裕香、太田博樹、Welker, B.、Pavelka, M.、河村正二:恒常的 3 色型色覚とされてきたホエザル属における種内 L-M オプシン多型の発見．**第 27 回日本霊長類学会**、犬山国際観光センター・フロイデ、犬山、2011 年 7 月 16-18 日．(口演)
67. 櫻井児太摩、今井啓雄、東原和成、太田博樹、Aureli, F.、Fedigan, L.、河村正二:色覚種内多型を示す新世界ザル野生集団における化学物質感覚センサーの多型解析 (経過報告)．**第 27 回日本霊長類学会**、犬山国際観光センター・フロイデ、犬山、2011 年 7 月 16-18 日．(口演)
68. 河村正二: ヒトの色覚多様性に進化学的意味を探る．**東京大学新領域創成科学研究科・新領域学融合セミナー**、東京大学柏キャンパス基盤棟、柏、2011 年 6 月 23 日．(口演)
69. 松下裕香、太田博樹、Welker, B、Pavelka, M.、河村正二:新世界霊長類の中で唯一恒常的 3 色型色覚とされるホエザル属における種内 L-M オプシン多型の発見．**第 11 回 東京大学生命科学シンポジウム**、東京大学本郷キャンパス、東京、2011 年 6 月 4 日．(ポスター)
70. 手塚あゆみ、笠木聡、河村正二、van Oosterhout, C.、河田雅圭:グッ ピー遺伝子にかかる選択の検出．**第 58 回日本生態学会**、札幌コンベンションセンター、札幌、2011 年 3 月 8-12 日．(口演)
71. 河村正二:色覚進化研究の人類学的展開：魚類と霊長類に見られる視覚光センサーの進化多様性を通して．**北里大学医学部解剖学（埴原単位）水曜セミナー・特別講演**、北里大学相模原キャンパス・医学部形態系多目的セミナー室、神奈川、2011 年 1 月 12 日．(口演) (Invited)
72. 河村正二:色覚センサーオプシンの種内変異：現在進行形の進化学的モーダルシフト．**特定領域研究公開シンポジウム「細胞感覚：セルセンサーのモーダルシフト」**、東京大学弥生講堂一条ホール、東京、2010 年 12 月 23 日．(口演) (Invited)
73. 河村正二:ヒト L/M オプシン遺伝子の多様性と色覚変異の起源及び中立性の検討．**戦略的研究プロジェクト研究「現生人類の拡散による遺伝子と文化の多様性創出に関する総合的研究」第 1 回全体会議**、総合研究大学院大学、葉山、2010 年 12 月 3 日．(口演) (Invited)
74. 松下裕香、太田博樹、Welker, B、河村正二:新世界ザルホエザル属におけるヒト型３色型色覚仮説の検証に向けて．**第 64 回日本人類学会**、だて歴史の杜カルチャーセンター、北海道伊達市、2010 年 10 月 1-3 日．(口演)
75. Kawamura, S., Hiwatashi, T., Okabe, Y., Tsutsui, T., Hiramatsu, C., Melin, A. D., Oota, H., Schaffner, C. M., Aureli, F., Fedigan, L. M. and Innan, H.: A population genetic test of balancing selection for color vision variation in New World monkeys. **The 23rd International Primatological Society Congress Kyoto 2010: Symposium "Variation and Evolution of Primate Color Vision Revealed by Cross-disciplinary Studies"**, Kyoto University (Yoshida Main Campus), Kyoto, Japan, September 12-18, 2010. (Oral) (Symposium organized by S. Kawamura and A. D. Melin)
76. Matsushita, Y., Oota, H., Welker, B. and Kawamura, S.: Toward deeper understanding color vision of howler monkeys. **The 23rd International Primatological Society Congress Kyoto 2010**, Kyoto University (Yoshida Main Campus), Kyoto, Japan, September 12-18, 2010. (Poster)
77. Kawamura, S.: Color vision polymorphism in wild New World monkeys as a model system to understand the adaptive significance of primate color vision. **The 4th International Symposium of the Biodiversity and Evolution, Kyoto University Global COE project "Evolution of Sensor, Communication and Society"**, Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto, Japan, September 11-12, 2010. (Oral) (Invited)
78. Matsushita, Y., Oota, H., Welker, B. and Kawamura, S.: Molecular genetic reevaluation of the uniform-trichromacy hypothesis for howler monkeys. **The 4th International Symposium of the Biodiversity and Evolution, Kyoto University Global COE project "Evolution of Sensor, Communication and Society"**, Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto, Japan,

September 11-12, 2010. (Poster)

79. 手塚あゆみ、笠木聡、河村正二、van Oosterhout, C.、松島野枝、河田雅圭:グッ ピーLWS オプシン遺伝子にかかる選択圧の検出．**第 12 回日本進化学会**、東京工業大学 大岡山キャンパス、東京、2010 年 8 月 2-5 日．(ポスター)
80. Kawamura, S.: Testing adaptive significance of primate color vision by behavioral and genetic studies of wild populations of New World monkeys. **International Symposium on Biodiversity Sciences (ISBDS) 2010 "Genome, Evolution and Environment"**, Nagoya City University (Hotel Rubra Ohzan), Nagoya, Japan, July 31-August 3, 2010. (Oral) (Invited)
81. 河村正二、樋渡智秀、平松千尋、印南秀樹、Melin, A. D.、Fedigan, L. M.、Schaffner, C. M.、Aureli, F.: 色覚オプシンの種内多様性と環境適応：新世界ザル野生集団に対する行動観察と遺伝子調査による色覚多型の適応的意義の検討．**特定領域研究「細胞感覚」平成 22 年度夏の班会議**、札幌市教育文化会館、札幌、2010 年 7 月 5-6 日．(ポスター)

菊池 潔（東京大学）

1. 細谷将・八谷剛史・田島祥太・家田梨櫻・藤田真志・田角聡志・菊池潔、複数個体の全ゲノム解読による表現型原因遺伝子の同定の試み、日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28-31 日、函館
2. 菊池潔、魚類の性決定遺伝子たちーフグ近縁種群を中心としてー、新学術領域研究「複合適応形質進化」公開シンポジウム、2014 年 12 月 12 日、千葉
3. Risa Ieda, Sho Hosoyaa, Satoshi Tasumia, Shigenori Suzuki, Kiyoshi Kikuchi, INCIPIENT TRANSITION OF A SEX DETERMINING GENE IN *Takifugu* PUFFERFISH., The International Symposium on Aquaculture Genetics XII, June 22-26, 2015, Santiago de Compostela, Spain

岸本健雄（お茶の水女子大学）

1. 西村智洋、立花和則、岸本健雄、伊藤武彦、イトマキヒトデの de novo アセンブリ、第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 26 日、岡山大学
2. 千代島隆弘、立花和則、梶谷嶺、岸本健雄、伊藤武彦、イトマキヒトデの de novo アセンブリ、第 38 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド

木曽彩子（情報システム研究機構）

1. 岡　彩子,城石俊彦：発表標題「遺伝子発現制御の進化的分化と生殖隔離」， 第 28 回モロシヌス研究会, 静岡, 2014 年 7 月
2. 岡　彩子, 城石俊彦：発表標題「 マウス亜種間ゲノム多型による転写調節のゆらぎと生殖隔離」, 日本遺伝学会第 85 回大会 ワークショップ「異なるゲノム間の軋轢と協調〜相互作用のゲノミクス〜」, 東京, 2013 年 9 月
3. 岡　彩子, 城石俊彦：発表標題「遺伝子発現におけるシス調節領域の進化と生殖隔離」, 日本遺伝学会第 86 回大会　ワークショップ「マウス遺伝学が牽引する最先端生命科学」, 長浜, 2014 年 9 月

北野 潤（国立遺伝学研究所）

1. Kitano J. “Drivers of sex chromosome-autosome fusions and their roles in speciation” American Genetic Association Symposium: Chromosome Evolution. Seattle, WA, USA. August, 2015
2. Yoshida K., Ishikawa A., Makino T., Kitano J., “A rapidly evolving heterochromatin-binding protein and hybrid male sterility in the Japanese Threespine Stickleback species pair”, *Stickleback 2015*, Stony brook, NY, USA, July 2015
3. Yoshida K., Makino T., Yamaguchi K., Shigenobu S., Hasebe M., Kawata M., Kume M., Mori S., Peichel K., Toyoda A., Fujiyama A., Kitano J., “Sex chromosome turnover contributes to

genomic divergence between incipient stickleback species." *SMBE 2014*, San Juan, Puerto Rico, June 2014

4. Yoshida K., Makino T., Yamaguchi K., Shigenobu S., Hasebe M., Mori S., Peichel C. L., Kawata M., Toyoda A., Fujiyama A., Kitano J., "Testing the link between heterochromatin evolution and speciation in sticklebacks", *ESEB 2013*, Lisbon, Portugal, August 2013
5. Kitano J. "Neo-sex chromosome formation and speciation in the Japanese sticklebacks" The Eight Okazaki Biology Conference: Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics. Okazaki, Aichi, Japan March, 2012
6. Yoshida K., Makino T., Yamaguchi K., Shigenobu S., Hasebe M., Mori S., Peichel K., Kawata M., Toyoda A., Fujiyama A., Kitano J., "Sex chromosome evolution and speciation in the sympatric pair of Japanese threespine sticklebacks", *Stickleback 2012*, Seattle, WA, USA, July 2012
7. Kitano J. "Genomic and functional characterization of a neo-sex chromosome important for stickleback speciation" Symposium: Molecular bases of speciation at the Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE 2011). Kyoto, Japan. July, 2011
8. 北野　潤「トゲウオにおける適応と種分化の遺伝機構」第 1065 回生物科学セミナー、2015 年 12 月 22 日、東京大学
9. 吉田恒太、石川麻乃、牧野能士、北野潤、「トゲウオ科魚類近縁種間の雑種不稔とクロマチン結合タンパク質の機能的分化 」第 87 回日本遺伝学会年会、仙台、2015 年 9 月
10. 吉田恒太、石川麻乃、牧野能士、北野潤、「トゲウオ科魚類近縁種間の雑種不稔とクロマチン結合タンパク質の機能的分化」第 17 回日本進化学会年会、東京、2015 年 8 月
11. 吉田恒太、石川麻乃、牧野能士、北野潤、「トゲウオ科魚類イトヨにおける雑種不稔の原因遺伝子の探索」第 86 回日本遺伝学会年会、長浜、2014 年 9 月
12. 吉田恒太、牧野能士、山口勝司、重信秀治、長谷部光泰、河田雅圭、豊田敦、藤山秋佐夫、北野潤「トゲウオ科魚類における新しい性染色体領域の出現は遺伝子のアミノ酸配列と発現量の進化を促進した」第 85 回日本遺伝学会、横浜、2013 年 9 月
13. 吉田恒太、北野潤「利己的な遺伝因子のメス減数分裂ドライブによる新しい性決定システムの出現」第 14 回日本進化学会年会、八王子、2012 年 8 月

木村亮介（琉球大学）

1. 木村亮介、渡辺千晶、宮里絵理、山口今日子、佐藤丈寛、川口亮、山本健、山口徹太郎、石田肇「顔面サイズと関連する遺伝子多型の探索」　日本人類遺伝学会第 60 回大会. 2015.10.14-17. 東京：京王プラザホテル.
2. 佐藤丈寛、渡辺千晶、山口今日子、川口亮、山本健、石田肇、木村亮介「Middle phalangeal hair (MPH)に関連する遺伝的多型の探索」　日本人類遺伝学会第 60 回大会. 2015.10.14-17. 東京：京王プラザホテル.
3. 米須学美、佐藤丈寛、山口今日子、渡邊千晶、川口亮、山本健、石田肇、木村亮介「手形態に関連する SNP の探索とその近傍遺伝子の Enrichment 解析」　日本人類遺伝学会第 60 回大会. 2015.10.14-17. 東京：京王プラザホテル.
4. 木村亮介、渡辺千晶、宮里絵理、山口今日子、佐藤丈寛、伊藤毅、川口亮、石田肇、山口徹太郎、山本健、河内まき子、持丸正明「顔面サイズの個体差とその要因」　第 68 回日本人類学会大会. 2015.10.10-12. 東京：産業技術総合研究所.
5. 米須学美、佐藤丈寛、山口今日子、渡邊千晶、川口亮、山本健、石田肇、木村亮介「ヒトの手形態変異に関連する遺伝子とその分子機能の探索」　第 68 回日本人類学会大会. 2015.10.10-12. 東京：産業技術総合研究所.
6. 佐藤丈寛、渡辺千晶、山口今日子、川口亮、山本健、石田肇、木村亮介「成人男性の体毛の濃さと分布パターンに関連する遺伝的多型の探索」　第 68 回日本人類学会大会. 2015.10.10-12. 東京：産業技術総合研究所.
7. 木村亮介、渡辺千晶、宮里絵理、伊藤毅、山口今日子、佐藤丈寛、川口亮、石田肇、山口徹太郎、山本健「日本人における顔面形態解析と関連遺伝子多型の探索」　日本遺伝

学会第 87 回大会. 2015.9.24-26. 仙台：東北大学.
8. 木村亮介「Genetic basis of human phenotypic diversity 」　日本進化学会第 17 回大会. 2015.8.20-23. 東京：中央大学.
9. 竹内史比古、勝谷友宏、木村亮介、並河徹、大久保孝義、田原康玄、山本健、横田充弘、W.Y. Saw、Y.Y. Teo、加藤規弘「日本人の精密な遺伝的構造の検討：アジア人の中での遺伝的由来及び遺伝的差異の起源の推定」　日本進化学会第 17 回大会. 2015.8.20-23. 東京：中央大学.
10. 木村亮介、渡辺千晶、宮里絵理、山口今日子、佐藤丈寛、川口亮、山本健、石田　肇「三次元顔面形態に関連する遺伝因子のゲノムワイド探索」日本人類遺伝学会第 59 回大会／日本遺伝子診療学会第 21 回大会. 2014.11.19-22. 東京：タワーホール船堀.
11. 米須学美、佐藤丈寛、山口今日子、渡邊千晶、川口亮、山本健、石田肇、木村亮介「ゲノムワイド関連解析による手形態の遺伝要因の探索」日本人類遺伝学会第 59 回大会／日本遺伝子診療学会第 21 回大会. 2014.11.19-22. 東京：タワーホール船堀.
12. 佐藤丈寛、渡辺千晶、山口今日子、川口　亮、山本健、石田肇、木村亮介「日本人男性の体毛の多さに関するゲノムワイド関連解析」日本人類遺伝学会第 59 回大会／日本遺伝子診療学会第 21 回大会. 2014.11.19-22. 東京：タワーホール船堀.
13. 山口今日子、川口　亮、佐藤丈寛、渡辺千晶、山本健、石田肇、木村亮介「日本人における頭蓋形態のゲノムワイド関連解析」日本人類遺伝学会第 59 回大会／日本遺伝子診療学会第 21 回大会. 2014.11.19-22. 東京：タワーホール船堀.
14. 木村亮介、渡辺千晶、宮里絵理、山口今日子、佐藤丈寛、川口亮、石田肇、山本健、河内まき子、持丸正明「日本人における三次元顔面形態のゲノムワイド関連解析」第 68 回日本人類学会大会. 2014.11.1. 浜松：アクトシティ浜松.
15. 米須学美、佐藤丈寛、山口今日子、渡邊千晶、川口亮、山本健、石田肇、木村亮介「ヒトの手形態に関するゲノムワイド関連解析」第 68 回日本人類学会大会. 2014.11.1-2. 浜松：アクトシティ浜松.
16. 佐藤丈寛、渡辺千晶、山口今日子、川口亮、山本健、石田肇、木村亮介「ゲノムワイド関連解析による体毛の多さに関連する SNP の探索」第 68 回日本人類学会大会. 2014.11.1-2. 浜松：アクトシティ浜松.
17. 山口今日子、川口亮、佐藤丈寛、渡辺千晶、山本健、石田肇、木村亮介「日本人の頭部形態に関する遺伝要因のゲノムワイド探索」第 68 回日本人類学会大会. 2014.11.1-2. 浜松：アクトシティ浜松.
18. 佐藤丈寛、川口亮、石田肇、山口徹太郎、山本健、河村正二、中込滋樹、間野修平、埴原恒彦、太田博樹、渡辺千晶、山口今日子、木村亮介「ゲノムワイド SNP データに基づく琉球列島の人々の集団構成」第 66 回日本人類学会大会. 2012.11.1-3. 横浜：慶應義塾大学日吉キャンパス.

清澤秀孔（高知大学）

1. 近藤伸二、加藤英政、鈴木穣、高田豊行、城石俊彦、清澤秀孔：MSM/Ms リソースを利用した遺伝子発現解析、第 27 回モロシヌス研究会、つくば、2013 年 6 月.
2. 清澤秀孔：マウスの非コード/アンチセンス RNA 解析から発見された新規サイズの低分子 RNA、千葉工業大学公開シンポジウム「Structured ncRNA 研究への前哨」、津田沼、2014 年 6 月.
3. Ly Le、近藤伸二、加藤英政、鈴木穣、菅沼成文、清澤秀孔：薬剤耐性を獲得した腫瘍培養細胞のトランスクリプトーム解析、第 16 回日本 RNA 学会、名古屋、2014 年 7 月.
4. 近藤伸二、加藤英政、鈴木穣、高田豊行、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：亜種間雑種 ES 細胞を用いた組織特異的ゲノム刷り込み解析、第 16 回日本 RNA 学会、名古屋、2014 年 7 月.
5. Ly Le、近藤伸二、加藤英政、鈴木穣、菅沼成文、清澤秀孔：薬剤耐性を獲得した腫瘍培養細胞のトランスクリプトーム解析、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月.

6. 近藤伸二、加藤英政、鈴木穣、高田豊行、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：in vitro 神経細胞分化系を用いた網羅的な組織特異的ゲノム刷り込み領域の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月.
7. Kondo S, Kato H, Suzuki Y, Takada T, Eitoku M, Shiroishi T, Suganuma N, Kiyosawa H: Comparative genomics of monoallelically expressed genes, INCF Japan Node International Workshop: Advances in Neuroinformatics 2015 (AINI 2015), Tokyo, November 2015.
8. 栄徳勝光、近藤伸二、鈴木穣、高田豊行、加藤英政、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：デフォルト神経分化による神経特異的ゲノム刷り込み領域における縦断的エピジェネティック解析、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月.
9. 近藤伸二、加藤英政、鈴木穣、高田豊行、城石俊彦、菅沼成文、清澤秀孔：10 週間に亘るマウス胚幹(ES)細胞の神経分化過程における F1 ハイブリッドマウス対 4 アレルのゲノム上のポリ A 鎖付加を伴う且つ伴わない転写活動の動的変化の比較解析、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月.

吉良潤一（九州大学）

1. 河野祐治，松下拓也，眞﨑勝久，米川智，佐藤眞也，吉良潤一，土井晃一郎，吉村淳，森下真一，辻省次．多発性硬化症一卵性双生児不一致例でのゲノムの相違　第 55 回日本神経学会学術大会，2014 年 5 月 21 日～24 日 福岡
2. 河野祐治，松下拓也，眞﨑勝久，米川智，佐藤眞也，吉良潤一，土井晃一郎，吉村淳，森下真一，辻省次　多発性硬化症一卵性双生児不一致例での新たなレトロエレメント挿入の可能性　第 56 回日本神経学会学術大会 2015 年 5 月 20 日～23 日 新潟

工藤 洋（京都大学）

1. 工藤洋. 野外エピジェネティクス：変動する環境下でのヒストン修飾と遺伝子発現調節. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会. 2015 年 5 月 25-26 日. 東京.
2. Kudoh H. Molecular phenology: seasonal control of flowering-time genes under natural conditions. 5th NIBB-MPIPZ-TLL Symposium, Horizons in Plant Biology, Max Planck Institute for Plant Breeding Research, 24-26 Nov, 2014, Cologne, Germany.
3. Kudoh H. Seasonal regulation of the gene expression in a natural fluctuating environment. Bristol-Kyoto Workshop on Plant Environmental Signaling, University of Bristol, 23-25 Sep, 2014, Bristol, UK.

國枝武和（東京大学）

1. 國枝武和、極限環境耐性動物クマムシの分子生物学的解析基盤の創成、第 11 回極限環境生物学会、2010 年 11 月 16 日、京都
2. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシにおけるクロマチン分画タンパク質の解析、極限環境生物学会第 12 回年会、2011 年 11 月 27 日、長崎
3. Kunieda T, Arakawa K, Katayama T, Toyoda A, Kuwahara H, Horikawa DD, Suzuki Y, Abe K, Shin-I T, Ohishi K, Motoyama A, Aizu T, Kohara Y, Fujiyama A. Genome annotations and transcriptomic analysis in Ramazzottius varieornatus. 12th International Symposium on Tardigrada. 2012/7/23-26, Porto (Portugal)
4. Tanaka S, Yamaguchi A, Yamaguchi S, Kuwahara H, Takamura C, Ohmi S, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. Two families of novel abundant heat-soluble proteins in an anhydrobiotic tardigrade. 12th International Symposium on Tardigrada. 2012/7/23-26, Porto (Portugal)
5. Hashimoto T, Saito Y, Oyama M, Hata H, Kuwahara H, Horikawa DD, Toyoda A, Katayama T, Arakawa K, Fujiyama A, Kubo T, Kunieda T. Proteomic analysis of chromatin fraction in an anhydrobiotic tardigrade, Ramazzottius varieornatus. 12th International Symposium on Tardigrada. 2012/7/23-26, Porto (Portugal)

6. 山口志保、山口理美、田中冴、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシにおいて大量に発現する新規な熱可溶性タンパク質 CAHS, SAHS の解析、第 13 回極限環境微生物学会年会、2012 年 12 月 1 日、東京
7. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、高い放射線耐性を示すヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 の解析、日本動物学会第 84 回大会、2013 年 9 月 26 日、岡山（岡山）
8. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、高い放射線耐性を示すヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 の解析、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月 18 日、青森
9. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 による DNA 断片化の抑制、極限環境生物学会第 14 回年会、2013 年 10 月 26 日、川崎（神奈川）
10. 田中冴、秦裕子尾山大明、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、,ヨコヅナクマムシにおける新規ミトコンドリアタンパク質の同定、極限環境生物学会第 14 回年会、2013 年 10 月 26 日、川崎（神奈川）
11. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、高い放射線耐性を示すヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸（兵庫）
12. 田中冴、秦裕子、尾山大明、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、ヨコヅナクマムシにおける新規ミトコンドリアタンパク質の同定、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸（兵庫）
13. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、高い放射線耐性を示すヨコヅナクマムシの新規クロマチンタンパク質 S261 の解析、日本動物学会第 85 回大会、2014 年 9 月 11 日、仙台（宮城）
14. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、放射線耐性を示すクマムシの新規タンパク質 S261 による DNA 損傷の抑制、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 1 日、鹿児島（鹿児島）
15. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、放射線耐性を示すクマムシの新規タンパク質 S261 による DNA 損傷の抑制、極限環境生物学会第 15 回年会、2014 年 11 月 1 日、名護（沖縄）
16. 田中冴、秦裕子、尾山大明、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、乾燥耐性クマムシにおけるミトコンドリア局在タンパク質の同定と解析、極限環境生物学会第 15 回年会、2014 年 11 月 1 日、名護（沖縄）
17. 橋本拓磨、斎藤裕樹、尾山大明、秦裕子、桑原宏和、堀川大樹、豊田敦、片山俊明、荒川和晴、藤山秋佐夫、久保健雄、國枝武和、放射線耐性を示すクマムシの新規タンパク質 S261 による DNA 損傷の抑制、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、横浜（神奈川）

久原篤（甲南大学）

1. 久原篤、宇治澤知代、太田茜　　線虫から探る温度応答と記憶のエッセンス　　動物学会近畿支部会　秋期講習会 / 統合ニューロバイオロジー研究所第 3 回シンポジウム　神戸　2015.12.5　国内　招待講演

2. 高垣菜式、坂井詩織、太田茜、久原篤　線虫 C. elegans を用いた温度馴化の可塑性に関わる分子の単離　　分子生物学会　神戸　2015. 12. 1-4　国内　ポスター
3. 五百藏誠、太田茜、井上朋香、久原篤　線虫 C. elegans の温度受容ニューロンにおける温度メモリーの解析　分子生物学会　神戸　2015. 12. 1-4　国内　ポスター
4. 井上朋香，五百藏誠，久原篤，太田茜　CREB を介した低温馴化の促進に関わる神経回路の解析 Neural circuit of CREB facilitating temperature acclimation in C. elegans　分子生物学会　神戸　2015. 12. 1-4　国内　ポスター
5. Ayana Maruo, Akane Ohta, Atsushi Kuhara　Transriptome analysis of single temperature sensing neuron that regulates temperature acclimation in C. elegans　温度馴化メモリーに関わる温度受容ニューロンのトランスクリプトーム解析　CompBiol 2015　広島　2015. 12. 11-13　国内　ポスター
6. 久原 篤､宇治澤知代､太田 茜　線虫から学ぶ温度に対する生体調節　Regulatory system for temperature response in nematode C. elegans　動物学会　ホメオスタシスバイオロジーシンポジウム　新潟　2015. 9. 18　国内　口頭　招待講演
7. Tomoyo Ujisawa, Kohei Ohnishi, Tohru Miura, Akane Ohta, Atsushi Kuhara　Temperature experience-dependent cold acclimation in nematode C. elegans　線虫 C. elegans における経験に依存した低温馴化機構　生物物理学会　金沢　2015. 9. 13　国内　招待講演
8. Atsushi Kuhara, Tomoyo Ujisawa, Tohru Miura, Misato Uda, Akane Ohta　Temperature experience-dependent cold habituation in C. elegans　神経科学学会　神戸　2015. 7. 28-31　国内　口頭
9. Akane Ohta, Makoto Ioroi, Natsune Takagaki, Atsushi Kuhara　Temperature experience-linked cold tolerance in C. elegans is controlled by CREB　神経科学学会　神戸　2015.7.28-31　国内　ポスター
10. Akane Ohta, Makoto Ioroi, Natsune Takagaki, Atsushi Kuhara　CREB facilitates a replacement of temperature experience-linked cold tolerance　20th C. elegans International meeting　Los. Angels　2015.6.24-28　国際学会　ポスター
11. 岡畑 美咲、太田茜、水口洋平、豊田敦、久原篤 線虫 C. elegans の温度馴化の多様性に関わる遺伝子のマッピング 分子生物学会　神戸　2015. 12. 1-4　国内　ポスター
12. Natsune Takagaki, Shiori Sakai, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara Genetic analysis of cold acclimation system and its plasticity in C. elegans　CompBiol 2015　広島　2015.12.11-13　国内　ポスター
13. Misaki Okahata, Akane Ohta1, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Atsushi Kuhara Polymorphism in the genes responsible for cold acclimation in C. elegans　CompBiol 2015　広島　2015.12.11-13　国内　ポスター
14. Misaki Okahata, Akane Ohta, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Atsushi Kuhara　Natural variation underlying temperature habituation speed in C. elegans　神経科学学会　神戸　2015.7.28-31　国内　ポスター
15. Misaki Okahata, Akane Ohta, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Atsushi Kuhara　Genetic analysis of natural variations for cold habituation in C. elegans　20th C. elegans International meeting　Los. Angels　2015.6.24-28　国際学会　ポスター
16. 久原篤、岡畑美咲、太田茜　線虫 C. elegans の温度応答と適応記憶の神経情報処理　実験動物技術者協会　広島　2014. 11. 29-30　国内　口頭　招待講演
17. 岡畑美咲、太田茜、久原篤　線虫 C. elegans における温度応答と記憶の多様性に関わる遺伝子多型　遺伝学会　長浜　2014. 9. 17-19　国内　口頭
18. 木下ゆかり、太田茜、久原篤　線虫の温度適応に関わる人工進化と新規の温度適応変異の遺伝学解析　遺伝学会　長浜　2014. 9. 17-19　国内　口頭
19. Yukari Kinoshita, Satoru Sonoda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara　Artificial evolution and screening for new genes involved in temperature habituation of C. elegans　神経科学学会　横浜　2014. 9. 11-15　国内　ポスター

20. Misaki Okahata, Syoko Furukawa, Akane Ohta, Atsushi Kuhara　Natural variation modifies temperature responses and memory in C. elegans　神経科学学会　横浜　2014.9.11-16　国内　ポスター
21. 木下ゆかり、太田茜、久原篤　線虫C. elegansの温度適応の人工進化と新規変異のマッピング　動物学会　東北　2014.9.11-16　国内　口頭
22. 木下ゆかり、太田茜、久原篤　線虫の温度環境への人工進化と温度適応に関わる新規変異体の遺伝学的解析　日本進化学会　大阪　2014.8.21-24　国内　ポスター
23. Misaki Okahata, Syoko Furukawa, Akane Ohta, Atsushi Kuhara　Natural variation modifies temperature responses and memory　C.elegans Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting　Nara　2014.7.15-21　国際学会　ポスター
24. Yukari Kinoshita, Misato Uda, Akane Ohta, Atsushi Kuhara　Artificial evolution and screening for mutants defective in temperature habituation　C.elegans Development, Cell Biology & Gene Expression Meeting　Nara　2014.7.15-21　国際学会　ポスター
25. 木下ゆかり、太田茜、宇多美里、久原 篤　線虫C. elegansにおける温度応答の人工進化と新規変異体の解析　動物学会近畿支部会　兵庫　2014.5.10 国内学会 口頭
26. 岡畑 美咲、古川 翔子、五百蔵 誠、高垣 菜式、太田茜、久原 篤　世界各地の線虫C. elegansの温度応答と記憶の多様性に関わる遺伝子　動物学会近畿支部会　兵庫　2014.5.10 国内学会　口頭
27. 木下 ゆかり、遠藤美喜子、園田悟、太田 茜、久原 篤　〃線虫の温度適応に関する人工進化と新規変異体の解析 Artificial evolution and isolation of genes underlying temperature habituation in C. elegans　動物学会　岡山　2013.9.26　国内学会 口頭
28. 太田茜、宇治澤 知代、園田 悟、木下 ゆかり、古川 翔子、遠藤 美喜子、小林 祐子、石割 友博、上原 湧将、久原 篤　線虫C. elegansにおける温度適応を制御する神経システム　遺伝学会　東京　2013.9.20　国内学会　口頭
29. Shoko Furukawa, Hitomi Mizutani, Akane Ohta, Atsushi KuharaNatural variation of genes modifying temperature responses of C. elegans　JSCPB2013　Himeji　2013.7.13-15　国内学会　口頭+ポスター
30. Satoru Sonoda, Yukari Kinoshita, Shoko Furukawa, Mikiko Endo, Yushuke Uehara, Akane Ohta, Atsushi Kuhara　Isolation of genes for temperature experience-dependent cold tolerance 19th International C. elegans Meeting　Los. Angels　2013.6.26-30　国際学会　ポスター
31. Satoru Sonoda, Hitomi Mizutani, Yukari Kinoshita, Hiromi Nagaya, Yukie Okubo, Tomoyo Ujisawa, Akane Ohta and Atsushi Kuhara　Identification of genes underlying cultivation temperature-dependent cold tolerance in C. elegans　Neuro2012　京都　2013.6.20-22　国際学会　ポスター
32. 木下ゆかり、園田悟、大久保幸恵、水谷仁美、長屋ひろみ、宇治澤知代、太田茜、久原篤　Artificial evolution and screen for genes underlying temperature resistance in C. elegans　分子生物学会　福岡　2012.12.11-14　国内　ポスター
33. 久原 篤　動物の温度応答の分子遺伝学　日本遺伝学会　九州　2012.9.25　国内講演 招待講演、プレナリーワークショップ
34. 太田 茜，宇治澤 知代，木下 ゆかり，水谷 仁美，井上 琢朗，井上 奈穂，久原 篤, Insulin-mediated neural signals negatively regulate temperature tolerance in C. elegans　第50回日本生物物理学会年会　名古屋　2012.9.23　国際学会　ポスター
35. 園田悟、大久保 幸恵、木下 ゆかり、水谷 仁美、長屋 ひろみ、宇治澤 知代、太田 茜、久原 篤　Screen for genes underlying temperature resistance in nematode C. elegans　第83回 日本動物学会年会　大阪　2012.9.13-15　国内学会　口頭

久保田健夫（山梨大学）

1. 三宅邦夫、平澤孝枝、久保田健夫. 次世代配列決定技術を用いた発達障害病態解明へのアプローチ（レット症候群一卵性双生児のゲノム・エピゲノム比較解析に基づく発達

障害遺伝子の同定)、文部科学省新学術領域ゲノム支援 （領域代表者小原雄治）拡大班会議、大阪、2011.12.17-18.

2. Miyake K, Hirasawa T, Minakuchi Y, Toyoda A, Kubota T: Epigenomic difference associated with neurodevelopmental discordance of the twins with Rett syndrome. International Symposium on Genome Science, Tokyo, 2013.1.9-10（文部科学省新学術領域　ゲノム支援（領域代表者小原雄治）国際シンポジウム）.
3. 久保田健夫、三宅邦夫、水口洋平、伊藤雅之、後藤雄一、豊田敦. 重症度の差異を認めたレット症候群の一卵性双生児のゲノム・エピゲノム比較解析. 日本人類遺伝学会第58回大会（仙台)、2013.11.20-24（2013.11.21）.

倉橋浩樹（藤田保健衛生大学）

1. Inagaki, H., Ohye, T., Kogo, H., Tsutsum,i Kurahashi H. Mechanism of recurrent translocation t(11;22) initiated by cruciform conformation of palindromes. FASEB SRC: Dynamic DNA structures in biology. Saxtons River, USA, June 17–22, 2012.
2. Kurahashi H, Inagaki H, Ohye T, Tsutsumi M, Kato T, Okamoto N. Towards the identification of novel palindrome-mediated translocations. ESHG 2013, Paris, France, June 8-11, 2013.
3. Kurahashi H, Kato T, Inagaki H, Mishra D, Ouchi Y, Tsutsumi M, Ohye T. Palindrome-mediated chromosomal translocations in humans. International Symposium on Genome Science. Tokyo, Jan 20-21, 2015.
4. Kato T, Inagaki H, Mishra D, Ouchi Y, Tsutsumi M, Ohye T, Kurahashi H. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22)(q24;q11) translocation. The 11th International Workshop on Advanced Genomics, May 20-22, 2015.
5. Kurahashi H, Mishra D, Kato T, Inagaki H, Kosho T, Wakui K, Kido Y, Sakazume S, Taniiguchi-Ikeda M, Morisada N, Iijima K, Fukushima Y, Emanuel BS. Breakpoint analysis of the recurrent constitutional t(8;22) (q24.13;q11.21) translocation. ESHG 2015, Glasgow, June 6-9, 2015.

黒岩麻里（北海道大学）

1. 黒岩麻里 「Y をすてた日本のネズミ―*SRY* をもたない哺乳類の性決定メカニズム」，第38回日本分子生物学会ワークショップ “オモロイ生き物の分子生物学”，**2015 年 12 月 3 日**，神戸ポートピアホテル，神戸.

桑田 晃（水産総合研究センター）

1. Kazumasa Yamada, Mutsuo Ichinomiya, Akira Kuwata, Mitsunobu Kamiya, Kaori Ohki, Kenji Saitoh, Yoji, Nakamura, Naoki Sato, Shinya Yoshikawa. Growth and cell wall morphogenesis of *Triparma laevis* (Parmales) under silicon-limitation. Molecular life of diatom. 2015 年 7 月 9 日，シアトル
2. Akira Kuwata. Exploring the evolutionary link between Parmales and the success of diatoms in marine ecosystems. Gordon Research Conference "Marine Molecular Ecology" 2015 年 8 月 5 日
3. 桑田晃, 佐藤晋也. パルマ藻から珪藻の進化の秘密を探る. 日本進化学会 第 17 回大会. 2015 年 8 月 20 日. 東京.
4. 中村洋路, 斉藤憲治, 吉川伸哉, 桑田晃. パルマ藻のドラフトゲノム.日本進化学会第 17 回大会. 2015 年 8 月 20 日. 東京.
5. 山田和正, 桂大貴, 佐藤晋也, 神谷充伸, 大城香, 一宮睦雄, 桑田晃, 長里千香子, 本村泰三, 吉川伸哉　パルマ藻 Triparma laevis の細胞外被形成過程の微細構造解析　日本植物学会第 79 回大会　2015 年 9 月 8　新潟
6. Akira Kuwata, Mutsuo Ichinomiya, Shinya Yoshikawa, Kazumasa Yamada,Masanobu Kawachi, Kenji Saitoh, Yoji Nakamura, Naoki Sato, Naoyuki Tajima, Adriana Lopes, Daniel Vaulot. Biology of a picoeukaryotic phytoplankton, Parmales, a sister group of diatoms. EMBO |

EMBL Symposia "A New Age of Discovery for Aquatic Microeukaryotes" 2016 年 1 月 27 日 ハイデルベルグ.

桑原知巳（香川大学）

1. 桑原知巳、今大路治之.「腸管内常在菌による *Clostridium difficile* の病原性抑制機構」. 日本細菌学会中国四国支部総会（2014 年 10 月、徳島）
2. 桑原知巳.「腸内フローラと感染症」. 第 84 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、シンポジウム「Host-Pathogen interaction に注目した感染症の病態解明と制御」. （2014 年 10 月、岡山）

河内孝之（京都大学）

1. 河内孝之、加藤大貴、西浜竜一、大和勝幸、石崎公庸、ゼニゴケ研究地平への投射：オーキシン信号伝達を例に、第 55 回日本植物生理学会年会、2014.3.19、富山大学（富山市）
2. 河内孝之、モデル植物ゼニゴケで探る陸上植物の普遍原理と多様性-モデル植物ゼニゴケ、第 53 回日本植物生理学会年会、2012.3.17、京都産業大学 （京都市）
3. 河内孝之、加藤大貴、石崎公庸、植物オーキシン応答と信号伝達の進化的解析、第 84 回日本生化学会大会、2012.9.23、京都国際会館（京都市）

郷 康広（自然科学研究機構）

1. 郷康広、辰本将司、福多賢太郎、野口英樹、早川卓志、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、阿形清和、藤山秋佐夫「チンパンジー親子トリオ全ゲノム解析による世代間直接変異率の推定」日本遺伝学会第 87 回大会. 2015 年 9 月 24 日. 仙台
2. 郷康広、辰本将司、福多賢太郎、野口英樹、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、阿形清和、藤山秋佐夫「チンパンジー親子トリオ全ゲノム解析による世代間直接変異率の推定」日本遺伝学会第 86 回大会. 2014 年 9 月 17 日. 長浜
3. 郷康広、辰本将司、福多賢太郎、野口英樹、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、阿形清和、藤山秋佐夫「チンパンジー親子トリオ全ゲノム解析による世代間直接変異率の推定」第 30 回日本霊長類学会大会. 2014 年 7 月 5 日. 京都
4. 郷康広「ヒトとチンパンジーにおけるアリル特異的発現遺伝子の同定と遺伝子発現制御機構の進化」第 14 回日本進化学会大会. 2012 年 8 月 23 日. 東京
5. 郷康広「オス・メス間ゲノムコンフリクティングとその生物学的意義の解明」基礎生物学研究所所内セミナー. 2012 年 7 月 18 日. 岡崎
6. 郷康広、辰本将司、豊田敦、西村理、友永雅己、平井啓久、松沢哲郎、藤山秋佐夫、阿形清和「チンパンジーパーソナルゲノム研究」第 28 回日本霊長類学会大会. 2012 年 7 月 7 日. 名古屋
7. 郷康広「オス・メス間ゲノムコンフリクティングとその生物学的意義の解明」新学術領域研究「ゲノム・遺伝子相関」班会議. 2012 年 6 月 25 日. 京都
8. 郷康広「霊長類ゲノム・トランスクリプトーム・メチローム研究」第 2 回 NGS 現場の会研究会. 2012 年 5 月 23 日. 大阪
9. Go Y. “Comparative transcriptome and genome analysis in a chimpanzee trio.” International Symposium of Developmental Systems Biology on Gene Regulation and Aging. 2011 年 10 月 13 日. Shanghai, CHINA
10. Go Y. “Comparative transcriptome and genome analysis in a chimpanzee trio.” Young Researchers Conference on Evolutionary Genomics. 2011 年 8 月 2 日. Tokyo
11. Go Y, Nishimura O, Toyoda A, Fujiyama A, Agata K. “Comparative Transcriptome Analysis in Chimpanzee Trio.” International Primatological Society XXIII Congress. 2010 年 9 月 12 日, Kyoto

12. 郷康広、西村理、豊田敦、藤山秋佐夫、阿形清和「チンパンジー親子トリオトランスクリプトーム解析による遺伝子発現制御機構の解明」日本進化学会第 12 回東京大会. 2010 年 8 月 3 日．東京
13. Go Y, Nishimura O, Toyoda A, Fujiyama A, Agata K. “Comparative transcriptome analysis in a chimpanzee trio.” Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE) 2010. 2010 年 7 月 6 日．Lyon, France

國府 力（大阪大学）

1. 吉田純子, 國府　力, 竹田潤二, 堀江恭二. レトロウイルスおよびDNA型トランスポゾンベクターのゲノムワイドな挿入部位の比較解析. 第 33 回日本分子生物学会大会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸
2. 國府　力. ベクター挿入部位の網羅的同定. 第５３回共同研テクニカルセミナー. 2010 年 12 月 15 日, 大阪大学.
3. 國府　力, Xingya Xu. トランスポゾン飛跡追跡による３次元ゲノム構造解析の試み. 次世代シークエンサー現場の会第 1 回研究会. 熱海. 2011 年 5 月 28-29 日, 熱海ニューフジヤホテル.
4. Chikara Kokubu, Ayako Yamanishi, Masahiro Tokunaga and Junji Takeda. A transposon-based approach to study three-dimensional genome architecture in mouse embryonic stem cells. The 61st NIBB Conference “Cellular Community in Mammalian Embryogenesis”, 2013 年 7 月 10−12 日, Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan.
5. 國府　力. マウス ES 細胞のミュタジェネシス：点変異からゲノム再構成変異まで. 京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」公開シンポジウム. 2014 年 5 月 13 日, 芝蘭会館稲森ホール, 京都大学.

後藤 眞（新潟大学）

1. 後藤 眞、細道一善、塚口裕康、渡辺博文、福田顕弘、藤元昭一、井ノ上逸朗、成田一衛、家族性 IgA 腎症の感受性遺伝子の同定、第 37 回 IgA 腎症研究会　平成 26 年 1 月 25 日
2. Shin Goto: IgA nephropathy: Whole exome sequencing analysis of Japanese familial IgA nephropathy.　The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014 in Tokyo　(May 14, 2014)
3. 後藤眞、塚口裕康、渡辺博文、土田雅文、福田顕弘、藤本昭一、成田一衛：エクソーム解析と連鎖解析による IgA 腎症関連遺伝子変異の検出、第 5 回日本腎臓学会学術総会　名古屋市　平成 27 年 6 月 7 日

後藤由季子（東京大学）

1. Yukiko Gotoh: Chromatin-level regulations during neocortical development, Cold Spring Harbor Conferences Asia, Local Transport-Francis Crick Neuroscience Symposium, Suzhou Dushu Lake Conference Center,上海, April 12-17,2010
2. Yukiko Gotoh, Masafumi Tsuboi, Yusuke Kishi, Nao Suzki, Yusuke Hirabayashi: Temporal regulation of neural stem cell fate in the developing mouse neocortex, CSHL, Francis Crick Neuroscience Symposium, 中国、蘇州, April 12-17, 2010
3. 後藤由季子 : Regulation of neural stem cell fate during mouse neocortical development、第 57 回日本実験動物学会総会、京都テルサ、平成 22 年５月 12-14 日
4. Gotoh, Y. : Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon, 3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden, Germany, 2010.7.11-14.
5. 後藤由季子：Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon、第 6 回グローバル COE 国際会議・第 20 回生体防御医学研究所ホットスプリングハーバーシンポジウム、ザ・ルイガンズ（福岡市）、2010 年 8 月 19-20 日

6. 後藤由季子 : Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon、 Neuro2010（第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会）、神戸コンベンションセンター（神戸市）、2010 年 9 月 2-4 日
7. 後藤由季子 : マウス大脳神経幹細胞の運命制御機構、第 26 回 Wako ワークショップ「幹細胞 iPS 細胞研究の最前線」、品川グランドセントラルタワー、東京、平成 22 年 11 月 26 日
8. Yukiko　Gotoh：Temporal regulation of neural stem cell fate in the developing mouse neocortex, RIKEN BSI Seminar, 和光市、平成 22 年 11 月 29 日
9. 後藤由季子：大脳神経幹細胞の分化ポテンシャルの制御、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド（神戸市）、平成 22 年 12 月 7-10 日
10. 後藤由季子：日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム、神経幹細胞の運命制御、石川県立音楽堂（石川県金沢市）、平成 23 年 5 月 25-26 日
11. 後藤由季子:GCOE の公開講座､脳を創る細胞の振舞い､東京大学小柴ホール（文京区）、平成 24 年 1 月 21 日
12. 後藤由季子：神経幹細胞の運命制御、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学甲府キャンパス（甲府市）、平成 24 年 3 月 26-27 日
13. 後藤由季子：大脳新皮質神経幹細胞の運命制御、新潟大学脳研究所セミナー、新潟大学（新潟市）、平成 24 年 8 月 4 日
14. 後藤由季子.大脳新皮質発生における神経幹細胞の分化能制御. 第 35 回日本神経科学大会, 名古屋, 平成 24 年 9 月 18-21 日.
15. Gotoh, Y.: Regulation of neural stem cell fate during mouse brain development. Cold Spring Harbor Conferences Asia “Stem cells and Development” (Co-organizer), Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou China, 2012/12/5-8.
16. Yukiko Gotoh: Epigenetic regulation of neural stem cell fate during mouse brain development. Keystone Symposium “Neurogenesis” (Co-organizer), Santa Fe, USA, 2013/2/3-8.
17. 後藤由季子：神経幹細胞の分化ポテンシャル制御による神経回路構成素子の形成メカニズム、CREST「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」研究領域　平成２４年度領域ミーティング、ベルサール神保町（東京）、平成 25 年 3 月 1-2 日
18. Yukiko Gotoh　Regulation of neural stem cell fate during mouse neocortical development Neocortical Development in Okazaki ,Nov.22-24,2013
19. 後藤由季子：神経幹細胞の運命制御、横浜市立大学鶴見キャンパス（横浜市）、2013 年 5 月 14 日
20. 後藤由季子「神経幹細胞の運命制御」浜松医科大学大学院特別講演　2013 年 11 月 6 日
21. 後藤由季子　神経幹細胞（前駆細胞）の運命制御、大阪バイオサイエンス研究所マンスリーレクチャー、2014 年 3 月 14 日
22. Yukiko Gotoh　Regulation of neural stem cell fate during mouse neocortical development MBSJ symposium: New concepts arising in stem cell biology in Kobe,　Dec. 3-6,2013
23. Yukiko Gotoh: Neural Stem Cell Development, Gordon Research Conferences /Phosphorylation & G-Protein Mediated Signaling Networks, University of New England, Jun.15-20,2014
24. Yukiko Gotoh: Regulation of neural stem cell fate, seminar, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA, Jul.17th,2014
25. Yukiko Gotoh: Regulation of neural precursor cell fate in the developing mouse neocortex, Development, functions and disorders of the Nervous System(Joint meeting of the 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience and the 5th Annual NeuroDev Net Brain Development Conference), Hilton Montreal Bonaventure, Montreal, Canada, Jul.19-24, 2014

26. 後藤由季子：Regulation of neural stem cell fate in mammalian brain,The 38th Naito Conference on “Molecule-based biological systems”, CHATERAISE Gateaux Kingdom SAPPORO, Japan, Oct.7-10, 2014
27. Yukiko Gotoh: Regulation of neural stem/progenitor cell fate in the embryonic and adult mouse brains, Global controls in stem cells, ISSCR Singapore, Nov.5-7,2014
28. Yukiko Gotoh: Regulation of embryonic and adult neural stem/progenitor cell fate. 2014ASCB/IFCB Annual Meeting, Philadelphia Convention Center, Philadelphia PA,USA, Dec. 6-10, 2014
29. Gotoh Y. Polycomb regulation of neural stem cell fate,2nd UK/Japan workshop on Neural Epigenetics, London,UK, Dec.15-16,2014
30. Yukiko Gotoh: Embryonic vs Adult Neural Stem Cells. Medical Research Center Symposium, London UK, Dec.17,2014
31. Yukiko Gotoh : Embryonic vs adult neural stem cells, CDB Symposium ,Time in Development, RIKEN Center for Development Biology, Kobe, Japan, Mar.23-25, 2015
32. Yukiko Gotoh: Embryonic vs adult neural stem cells, Cold Spring Harbor Asia (CSHA) Conference on International Brain Project, Suzhou Industrial Park Conference Center, Suzhou, China, Jun.19-22,2014
33. Yukiko Gotoh: Embryonic vs adult neural stem cells, 25th Meeting of the International Society for Neurochemistry (ISN), Cairns Convention Centre, Cairns, Australia, Aug.23-27, 2015
34. Yukiko Gotoh: Regulation of neural stem cell fate, Sino-German Joint Symposium,Institute of Genetics and Developmental Biology, 2015/9/11-14, Beijing, China
35. Yukiko Gotoh: **題名未定、**Neurogenesis, 2016/3/2-5, Cancun, Mexico
36. Yukiko Gotoh: Embryonic vs adult neural stem cells, CDBC2016 Satellite Symposium on Forebrain Neurogenesis, 2016/3/16-17, Banff, Canada

小林一三（東京大学）

1. 矢野大和、Zobaidul M. Alam、林原絵美子、古田芳一、鈴木穣、菅野純夫、柴山恵吾、小林一三. 特定のエピゲノム状態がピロリ菌ストレス耐性を支配する、 第 21 回 ヘリコバクター学会 、 2015 年 6 月 26-27 日、神戸ポートピアホテル
2. Hirokazu Yano, Zobaidul M. Alam, Emiko Rimbara, Yoshikazu Furuta, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Keigo Shibayama, Ichizo Kobayashi. Network of DNA methyltransferase behind the adaptive phenotype in Helicobacteri pylori. Gordon Research Conference, Microbial Population Biology. 2015 年 7 月 19-24. Andover, NH, (USA).
3. 小林一三、「エピジェネティックスに基づく進化」の細菌での検証、日本進化学会第 17 回大会、2015 年 8 月 20 日～23 日、中央大学後楽園キャンパス
4. 矢野大和、Zobaidul M. Alam、林原絵美子、古田芳一、鈴木穣、菅野純夫、柴山恵吾、小林一三、ピロリ菌の適応形質を支配する DNA メチル化系ネットワークの発見 、日本進化学会第１ 7 回大会、2015 年 8 月 20 日-23 日、中央大学後楽園キャンパス
5. Hirokazu Yano, Yoshikazu Furuta, Zobaidul M. Alam, Emiko Rimbara, Hiroe Namba-Fukuyo, Tomoko Shibata, Tomoaki Nishiyama, Shuji Shigenobu, Mitsuyasu Hasebe, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Keigo Shibayama, Ichizo Kobayashi, Adaptive evolution and ever metamorphosing DNA methylation systems, 7th NEB Meeting on DNA Restriction and Modification, 2015 年 8 月 24 日～29 日、グダンスク、ポーランド、
6. Ichizo Kobayashi, Genome/epigenome evolution of *H. pylori*, Campylobacter, Helicobacter & Related Organisms (CHRO) 2015, 2015 年 11 月 1 日～5 日, ロトルア、ニュージーランド
7. 小林一三、エピジェネティックス駆動進化：細菌での OMICS による検証、BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会　第 88 回日本生化学会大会　合同大会)、2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸ポートピアホテル

8. 矢野大和、Zobaidul M. Alam、林原絵美子、古田芳一、鈴木穣、菅野純夫、柴山恵吾、小林一三、Network of DNA methyltransferases behind the adaptive phenotype in *Helicobacter pylori* BMB2015、 2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートピアホテル
9. Ichizo Kobayashi, Genome/Epigenome Dynamics in Bacterial Evolution, Translational Health Science and Technology Institute, 2015 年 12 月 8 日、デリー、インド
10. Ichizo Kobayashi, Genome/Epigenome Dynamics in Bacterial Evolution, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, 2015 年 12 月 9 日、カルカッタ、インド
11. Ichizo Kobayashi, Genome/Epigenome Dynamics in Bacterial Evolution, MCB75: from Molecules to Organisms, 2015 年 12 月 11 日～14 日、バンガロール、インド
12. Ichizo Kobayashi, Genome/Epigenome Dynamics in Bacterial Evolution, National Centre for Biological Sciences, 2015 年 12 月 16 日、バンガロール、インド
13. 矢野大和、Zobaidul M. Alam、林原絵美子、古田芳一、鈴木穣、菅野純夫、柴山恵吾、小林一三. 特定のエピゲノム状態がピロリ菌ストレス耐性を支配する. 第 10 回日本ゲノム微生物学会 2015 年 3 月 7 日, 神戸大学六甲第２キャンパス
14. 小林一三、「一分子リアルタイムシーケンサー」によるメチローム解読、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23 日～25 日、大阪大学

権藤洋一（理化学研究所）

1. 権藤洋一　NGS解析に基づく変異検出とマウス集団遺伝学への展開 日本遺伝学会第86回大会 ワークショップ招待講演、2014年9月17日 長浜市
2. 権藤洋一、マウスの未知突然変異の検出と実験集団遺伝学 日本動物遺伝育種学会第15回大会 シンポジウム招待講演、2014年10月31日 和光市
3. Gondo, Y.　Mouse WES and WGS provide standardized assessment system for NGS analysis pipelines.　6th Annual Next Generation Sequencing Congress & 2nd Annual Single Cell Analysis Congress (Invited presentation)　2014年11月20日 London, UK
4. 権藤洋一、次世代シーケンシングに基づく新しいマウス遺伝学の展開、東海医学会(招待講演)、2015/4/28、伊勢原市
5. 権藤洋一、福村龍太郎、石塚祐一、小瀧逸人、森一樹、久原哲、豊田敦、藤山秋佐夫、マウスにおける自然発生突然変異の蓄積と新規変異の検出、NGS 現場の会第 4 回研究会、2015/7/2-2015/7/3、つくば市
6. 権藤洋一、ゲノム解析の基盤となるゲノム DNA 参照配列の再検討、日本遺伝学会第 87 回大会、2015/9/26、仙台
7. Gondo, Y.、Detection of spontaneous mutations in mammalian genomes、Biological & Medical Science based on Physics: Radiation and Physics, Physics on Medical Science, Modeling for Biological System (selected as a speaker of the first opening session)、2015/11/5、Kyoto, Japan、WEB にて公開
8. Gondo, Y., Mori, K., Fukumura, R., Toyoda, A., Oota, S., Takada, T., Himeno, R., Shiroishi, T., Kuhara, S., Fujiyama, A.　Needs of fundamental revision of mouse genome reference sequences.　The 29th International Mammalian Genome Conference (IMGC2015)、2015/11/10、Yokohama, Japan
9. 権藤洋一、福村龍太郎、石塚祐一、小瀧逸人、牧野茂、森一樹、久原哲、豊田敦、藤山秋佐夫、標準マウス系統 C57BL/6J における自然発生突然変異の解析法の確立、第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会合同大会（BMB2015）、2015/12/1、神戸
10. Gondo, Y.　Genetics, mutagenesis and genomics with standardized mouse inbred strains. Fudan University School of Pharmacy Seminar (Invited speaker)、2015/12/17、Shanghai, China

齊藤延人（東京大学）

1. 宮脇哲, 今井英明, 齊藤延人　東京大学医学部脳神経外科．遺伝子型に基づく頭蓋内主幹動脈狭窄病変の新たな疾患カテゴリーの提唱－もやもや病関連遺伝子 *RNF213* の解

析－（シンポジウム　3.神経疾患の病態解明における分子形態学的アプローチ）第 46 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会　　2014.10.17　東京

2. 宮脇哲 1　今井英明 1　清水暢裕 2　八木伸一 2　小野秀明 1　武笠晃丈 1　中冨浩文 1　清水庸夫 2　斉藤延人 1　1 東京大学医学部脳神経外科　2 関東脳神経外科病院．頭蓋内動脈硬化性狭窄の遺伝的要因の検証－もやもや病関連遺伝子 *RNF213* 変異の解析－ Genetic analysis of atherosclerotic intracranial stenosis（シンポジウム　動脈硬化性頭蓋内血管狭窄：Wingspan の役割）第 30 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会 2014.12.6　横浜
3. 宮脇 哲 1, 今井 英明 1, 清水暢裕 2, 八木伸一 2, 小野 秀明 1, 武笠 晃丈 1, 中冨 浩文 1, 清水　庸夫 2, 齊藤 延人 1　1 東京大学医学部脳神経外科　2 関東脳神経外科病院. もやもや病の遺伝子解析研究における新たな発見　（シンポジウム　もやもや病研究の新たな発見）　第 74 回日本脳神経外科会学術総会　2015.10.14　札幌
4. 宮脇哲, 今井英明, 齊藤延人　東京大学医学部脳神経外科．脳卒中の先制医療を目指した遺伝子解析研究　－もやもや病関連遺伝子 *RNF213* の解析－　2015 年度ゲノム支援公開シンポジウム「次世代ゲノム科学の最前線」2016.1.14　東京

佐伯和彦（奈良女子大学）

1. 眞板寛子、平川英樹、佐伯和彦、田畑哲之、佐藤修正．ミヤコグサ根粒菌（*Mesorhizobium loti*）12 株における遺伝子構造の比較解析．　2012 年 3 月 11 日（第 6 回日本ゲノム微生物学会年会．2012 年 3 月 10～12 日　立教大学池袋キャンパス）
2. 佐伯和彦、谷佳美、池田翠，金子貴一，眞板寛子，平川英樹，田畑哲之、佐藤修正．ミヤコグサ根粒菌共生アイランドの伝搬と進化：宿主モデル系統 MG20 自生地採集株群に焦点をあてて．2012 年 9 月 25 日（植物微生物研究会・第 22 回研究交流会．2012 年 9 月 25～27 日　神戸大学百年記念館）
3. Saeki K, Kasai-Maita H, Kubota K, Kaneko T, Hirakawa H, Tabata S, Sato S. Core gene sets and evolution of symbiosis islands in rhizobial isolates from *Lotus japonicus* indigenous to Japan. 2013 年 10 月 18 日（18th International Congress on Nitrogen Fixation, Phoenix Seagaia Resort; World Convention Center Summit, Miyazaki, Japan, 2013 年 10 月 14 日～10 月 18 日）
4. 窪田和奈, 眞板寛子, 平川英樹, 佐藤修正, 佐伯和彦. ミヤコグサ根粒菌野生系統の耐塩性について. 2013 年 9 月 8 日（植物微生物研究会・第 23 回研究交流会．2013 年 9 月 7～9 日　岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市））
5. 眞板寛子, 王　明卓, 窪田和奈,平川英樹, 佐伯和彦, 佐藤修正. *Aminobacter* 属に属するミヤコグサ根粒菌のゲノム解析. 2015 年 3 月 7 日（第 9 回日本ゲノム微生物学会年会．2015 年 3 月 6～8 日　神戸大学百年記念館）

坂山英俊（神戸大学）

1. 宮田大輔・西山智明・川井浩史・坂山英俊．シャジクモの遺伝学的解析に向けた交配実験系の確立．日本植物学会第 79 会大会，朱鷺メッセ（新潟県），2015 年 9 月 8 日．
2. 宮田大輔・西山智明・川井浩史・坂山英俊．シャジクモの遺伝地図構築に向けたジェノタイピングを用いた交配実験系の確立．日本藻類学会第 39 回大会，九州大学箱崎キャンパス（福岡県），2015 年 3 月 21 日．
3. Nishiyama, T., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A., Rensing, S. A. and Sakayama, H. The *Chara braunii* genome. International Symposium on Genome Science 2015, Tokyo, Japan, 20–21 January, 2015.
4. Sakayama, H., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, Rensing, S. A. and Nishiyama, T. The *Chara braunii* genome sheds light on the origin of land plants. International Plant & Animal Genome XXIII Conference, San Diego, USA, 10–14 January, 2015.
5. Nishiyama, T. Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A., Rensing, S. A. and Sakayama, H. The *Chara braunii* genome. International Plant & Animal Genome XXIII Conference, San Diego, USA, 10–14 January, 2015.

6. Sakayama, H. and Nishiyama, T. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data from charalean alga, *Chara braunii*. *Marchantia* Workshop 2014, Kobe, Japan, 8–10 December, 2014.
7. 西山智明・豊田　敦・鈴木　穣・藤山秋佐夫・坂山英俊．シャジクモゲノムにみる陸上植物の制御因子ホモログ．日本植物学会第 78 会大会，明治大学生田キャンパス（神奈川県），2014 年 9 月 12 日．
8. 藤原ひとみ・大西美輪・坂山英俊・石崎公庸・豊倉浩一・関本弘之・西山智明・七條千津子・小菅桂子・深城英弘・三村徹郎．植物細胞リン酸輸送機構とその進化について．日本植物学会第 78 会大会，明治大学生田キャンパス（神奈川県），2014 年 9 月 12 日．
9. 西山智明・豊田　敦・鈴木　穣・藤山秋佐夫・坂山英俊．陸上植物に近縁な緑色藻類シャジクモのゲノム解読とアノテーション．日本進化学会第 16 回大会，高槻現代劇場（大阪府），2014 年 8 月 22 日．
10. Kato, S., Kawai, H. and Sakayama, H. Evolutionary analyses on the two ecologically differentiated types of freshwater alga *Chara braunii* (Charales). *Ectocarpus* 2014, Kobe, Japan, 29 March 2014.
11. Sakayama, H. and Nishiyama, T. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data from charalean algae *Chara braunii*. *Ectocarpus* 2014, Kobe, Japan, 29 March 2014.
12. Nishiyama, T., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A. and Sakayama, H. Genome sequencing of the charophycean green alga, *Chara braunii*. *Ectocarpus* 2014, Kobe, Japan, 29 March, 2014.
13. 西山 智明・豊田　敦・鈴木　穣・藤山秋佐夫・坂山英俊．シャジクモのゲノム解読．日本植物分類学会第１３回大会，熊本大学（熊本県），2014 年 3 月 22 日．
14. 藤原ひとみ・大西美輪・坂山英俊・石崎公庸・関本弘之・西山智明・七條千津子・深城英弘・三村徹郎．植物細胞リン酸輸送機構とその進化について．第 55 回日本植物生理学会年会，富山大学（富山県），2014 年 3 月 18 日．
15. 西山智明・豊田　敦・鈴木　穣・藤山秋佐夫・坂山英俊．陸上植物に近縁な緑色藻類シャジクモのゲノム解読．第 55 回日本植物生理学会年会，富山大学（富山県），2014 年 3 月 18 日．
16. Nishiyama, T., Toyoda, A., Suzuki, Y., Fujiyama, A. and Sakayama, H. Genome sequencing of the charophycean green alga, Chara braunii. International Plant & Animal Genome XXII Conference, San Diego, USA, 11–15 January 2014.
17. 西山智明・豊田 敦・鈴木 穣・藤山秋佐夫・坂山英俊．陸上植物に近縁な藻類シャジクモのゲノム解読．日本植物学会第 77 会大会，北海道大学（北海道），2013 年 9 月 13 日．
18. 西山智明・豊田 敦・鈴木 穣・藤山秋佐夫・坂山英俊．陸上植物に近縁な藻類シャジクモのゲノム解読．NGS 現場の会・第三回研究会，神戸国際会議場（兵庫県），2013 年 9 月 4–5 日．
19. 加藤　将・永野　萌・嶌田　智・川井浩史・坂山英俊．シャジクモ (*Chara braunii*) における EST-SSR マーカーの開発．第 37 回日本藻類学会，山梨大学（山梨県），2013 年 3 月 29 日．
20. 坂山英俊・山田敏弘・西山智明・川井浩史・伊藤元己．シャジクモ藻類シャジクモ（*Chara braunii*）における *LEAFY* 遺伝子ホモログの発現解析．第 37 回日本藻類学会，山梨大学（山梨県），2013 年 3 月 28 日．
21. 坂山英俊・西山智明．ゲノム解析から見たシャジクモ類の多細胞化進化．日本植物学会第 76 会大会，兵庫県立大学（兵庫県），2012 年 9 月 17 日．
22. 坂山英俊・西山智明．シャジクモ藻類シャジクモ（*Chara braunii*）の RNA-seq 解析．日本藻類学会第 36 回大会，北海道大学（北海道），2012 年 7 月 15 日．
23. 加藤　将・川井浩史・坂山英俊．シャジクモの保全遺伝学に向けた SSR マーカーの新規開発．日本藻類学会第 36 回大会，北海道大学（北海道），2012 年 7 月 15 日．
24. Höpflinger, M., Geretschläger, A., Höftberger, M., Sommer, A., Nishiyama, T., Sakayama, H.,

Tenhaken, R., Ueda, T. and Foissner, I. Characterization of the first ARA6 homolog, a Rab5 GTPase, from green algae possibly involved in wound healing. SEB Meeting 2012, Salzburg, Austria, 29 June – 2 July 2012.

25. 西山智明・阿部淳・土金勇樹・坂山英俊・関本弘之．次世代シーケンサーデータの *de novo* アセンブリー解析．第 53 回日本植物生理学会年会，京都産業大学（京都府），2012 年 3 月 17 日．
26. Abe, J., Sakayama, H., Suzuki, Y., Toyoda, A., Tsuchikane, Y., Sekimoto, H. and Nishiyama, T. *Closterium* and *Chara* genome and transcriptome analyses. The International Plant & Animal Genome XX Conference, San Diego, USA, January 14, 2012.
27. 坂山英俊・西山智明．シャジクモ藻類のゲノム解析の現状とシャジクモ RNA-seq 解析から探る陸上植物の進化. 本植物学会第 75 会大会, 東京大学駒場キャンパス（東京都），2011 年 9 月 18 日．
28. 加藤将・柴田葵・坂山英俊．絶滅危惧種の多様性情報学と域外保全技術開発に向けて～シャジクモ類を例に～．第 33 回水草研究会全国集会，群馬県立自然史博物館（群馬県），2011 年 8 月 20 日．
29. 加藤将・坂山英俊．シャジクモ（*Chara braunii*）に見られる生態的 2 型の進化生物学的解析．第 33 回水草研究会全国集会，群馬県立自然史博物館（群馬県），2011 年 8 月 20 日．
30. 楊　億・丸山真一朗・関本弘之・坂山英俊・野崎久義．広範囲な分子系統解析は緑色系二次共生藻の光合成 PRK 遺伝子が緑色ではない藻類からの起源を示す．日本藻類学会第３５回大会，富山大学（富山），2011 年 3 月 27 日．

笹川洋平（理化学研究所）

1. Yohei SASAGAWA、Single-cell RNA sequencing methods～Quartz-Seq and next technology～、国際シンポジウム Expanding Frontiers of Genome Science II, 2015 年 1 月 21 日、Hitotsubashi Hall、Tokyo
2. Yohei SASAGAWA, Tetsutaro HAYASHI, Itoshi NIKAIDO、non-poly-A RNA も検出できる 1 細胞 RNA-seq 法の開発と比較、NGS 現場の会第四回研究会、2015 年 7 月 1 日、つくば国際会議場

佐々木洋（大阪大学）

1. 竹之下憂祐、松井求、豊田敦、岩崎渉、佐々木洋、NIH3T3 細胞を用いた細胞競合関連遺伝子の網羅的検索、日本発生生物学会、2016 年 5 月 1—3 日、熊本市国際交流会館

佐藤文彦（京都大学）

1. 堀健太郎、山田泰之、佐藤文彦、ドラフトゲノムを用いたハナビシソウアルカロイド生合成に関わる新規P450の探索、第33回日本植物細胞分子生物学会（東京）大会・シンポジウム、2015年8月11日、 東京大学農学部
2. Kentaro Hori, Yasuyuki Yamada, Fumihiko Sato, Exploring novel P450s involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis using draft genome sequence of *Eschscholzia californica*, 19th International Conference on Cytochrome P450 ; Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology, June 12-June 15, National Olympics Memorial Youth Center, Tokyo
3. 堀 健太郎、山田 泰之、佐藤 文彦、ドラフトゲノムデータを用いたハナビシソウアルカロイド生合成 P450 遺伝子の探索、2015年度日本農芸化学会大会、2015年3月28日、岡山大学農学部
4. Fumihiko Sato, Yasuyuki Yamada, Kentaro Hori, Molecular characterization of isoquinoline alkaloid biosynthesis using draft genome sequence of Eschscholzia californica. International Symposium on Genome Science 2015 –Expanding Frontiers of Genome Science II, Jan 20-21, 2015, Hitotsubashi Hall, Tokyo

5. Fumihiko Sato, P450s and plant isoquinoline alkaloid biosynthesis. 12th International symposium on cytochrome P450: Biodiversity and biotechnology, Sept. 24-28, 2014, Kyoto

佐藤康成（放射線影響研究所）

1. 佐藤康成、瀬々　潤、西村まゆみ、島田義也、中村　典、浅川順一、全ゲノムシーケンス法による放射線がマウス成熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響の評価、第 57 回日本放射線影響学会大会　2014/10/1-2014/10/3　鹿児島

佐藤 豊（名古屋大学）

1. 佐藤豊、新美輝幸、吉岡博文：RNAを用いた新奇害虫防除法の開発、BMB2015、ワークショップ「転写後制御を標的とした次世代創薬プラットフォーム」神戸、2015.12.03

澤進一郎（熊本大学）

1. Shinichiro Sawa. CLE peptide signaling in Arabidopsis. 3rd European Workshop on PlantPeptide Signalling, Ghent, Belgium, 2015.9
2. Shinichiro Sawa. Analysis of plant parasitic nematode infection steps in Arabidopsis. Joint mini symposium of INRA CNRS. Nice, France, 2015.7
3. Shinichiro Sawa. Identification of plant attractant of plant parasitic nematode. Front lines of plant cel wall research, Nara, 2015.3
4. Shinichiro Sawa. International Marchanita Workshop, Kobe, 2014.12
5. Shinichiro Sawa. Integrated Science for Molecular Chirality in Biology and Chemistry Aso, Kumamoto, 2014.11
6. Shinichiro Sawa. Analysis of plant parasitic nematode infection steps. International Kick-Off Symposium for ISMCBC Kumamoto, 2014.3
7. Shinichiro Sawa. CLE function and molecular mechanisms in Marchantia polymorpha, International Marchantia Workshop, Merboune, Australia, 2013.12
8. Shinichiro Sawa. Part of the cell wall interface in intercellular signaling in plants, International Cell Wall Integrity Symposium, KKR Kamakura Wakamiya, Kamakura, 2013.10
9. Shinichiro Sawa. Comprehensive genetic analysis of CLV3 downstream pathway and CLE peptide function in root knot nematode infection in Arabidopsis.: Japan-China Joint Symposium on Rice Developmental Biology, From Morphogenesis to Yield, March 7-9, 2013 – Beppu, Oita, Japan, 2013.3
10. Shinichiro Sawa. Carboxypeptidase in CLE peptide maturation step, and CLE signaling molecules in Arabidopsis.: The 21st International Conference on Plant Growth Substances Shanghai, China 2013.6/18-22 (Plenary talk), 2013.6
11. Shinichiro Sawa. Analysis of CLE peptide function in meristem maintenance and nematode infection steps in Arabidopsis, *NIBB-MPIPZ-TLL Symposium*, Okazaki, 2012.11
12. Shinichiro Sawa. CLE gene function in Marchantia, *International Marchantia Workshop,* Aso, 2012.11
13. Shinichiro Sawa. Molecular mechanisms of CLE peptide hormone in plant development and plant parasitic nematode infections. *International meeting of POSTEC future*, Pohang, Korea, 2012.5

澤辺智雄（北海道大学）

1. マリンビブリオによる海藻糖質からの水素生産. 松村佑太, 中川聡, 武田忠明, 丸山史人, 小椋義俊, 林哲也, 黒川顕, 澤辺智雄. 第 14 回日本マリンバイオテクノロジー学会大会. 静岡. 平成 23 年 5 月 28 日.（優秀ポスター賞（大会会長賞）受賞）
2. *Vibrio halioticoli* のアルコール脱水素酵素遺伝子の多様性. 原昇平, 中川聡, 丸山史人, 小椋義俊, 林哲也, 黒川顕, 澤辺智雄. 第 14 回日本マリンバイオテクノロジー学会大会. 静岡. 平成 23 年 5 月 28 日.
3. *Vibrio tritonius* sp. nov., a novel hydrogen-producing vibrio isolated from the gut of sea hare. T. Sawabe, Y. Matsumura, Y. Kawahara, S. Nakagawa, R. Matsushima, T. Y. Sawabe. IUMS2011. 札幌. 平成 23 年 9 月 7 日.
4. *Vibrio tritonius* の水素生成遺伝子群の構造. 松村佑太, 中川聡, 丸山史人, 小椋義俊, 林哲也, 澤辺智雄. 日本水産学会. 長崎. 平成 23 年 9 月 29 日.
5. Diversity of vibrios possessing gas metabolism. T. Sawabe, Y. Matsumura, N. R. Kumar. Vibrio2011. Santiago de Compostela. 平成 23 年 11 月 2 日.
6. Hydrogen evolution of *Vibrios tritonius* sp. nov. Y. Matsumura, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe. Vibrio2011. Santiago de Compostela. 平成 23 年 11 月 2 日.
7. Toward the creating marine microbial cell factory for biofuel production. T. Sawabe. 9th APMBC. 高知. 平成 24 年 7 月 13-16 日.
8. Molecular characterization of gene cluster responsible for hydrogen evolution in *Vibrio tritonius* AM2T. Y. Matsumura, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe. 9th APMBC. 高知. 平成 24 年 7 月 13-16 日.
9. Comparison of hydrogen productivity among marine vibrios. K. Sato, Y. Matsumura, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe. 9th APMBC. 高知. 平成 24 年 7 月 13-16 日.
10. Gene expression in *Vibrio halioticoli* during mannitol metabolism. K. Kuga, Y. Kawahara, S. Hara, S Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe, T. Sawabe. 9th APMBC. 高知. 平成 24 年 7 月 13-16 日.
11. Expression of pyruvate decarboxylase (*pdc*) gene in *Vibrio halioticoli* cells. Y. Inohara, S. Nakagawa, T. Sawabe. 9th APMBC. 高知. 平成 24 年 7 月 13-16 日.
12. Genome wide mining of alginate lyase genes of *Vibrio halioticoli* IAM 14596^{T} and the expressions. F. Gao, Y. Kawahara, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe. 9th APMBC. 高知. 平成 24 年 7 月 13-16 日.（Young Scientist Award 受賞）
13. マリンビブリオの持つ水素生産能の比較解析. 佐藤一道, 松村佑太, 中川聡, 丸山史人, 小椋義俊, 林哲也, 黒川顕, 澤辺智雄. 第 6 回細菌学若手コロッセウム. 八王子. 平成 24 年 8 月 8 日～10 日（優秀発表賞受賞）.
14. マリンビブリオをホモエタノール発酵へ改変する : ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子の発現. 猪原悠太郎、中川聡、澤辺智雄. 第 6 回細菌学若手コロッセウム. 八王子. 平成 24 年 8 月 8 日～10 日（優秀発表賞受賞）.
15. Toward the creating marine microbial cell factory for biofuel production. T. Sawabe, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, and Toko Sawabe. ゲノム支援国際シンポジウム. 東京. 平成 25 年 1 月 9 日～10 日.
16. Genome analysis of *Vibrio harveyi* strain S20: Detection and genome feature of the 3rd replicon. A.K.M.R. Amin, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, Toko Sawabe and T. Sawabe. ゲノム支援国際シンポジウム. 東京. 平成 25 年 1 月 9 日～10 日.
17. ゲノムから探る海洋微生物のバイオマス生産ポテンシャル. 澤辺智雄. ゲノム支援公開シンポジウム. 京都. 平成 25 年 2 月 19 日.
18. Characterization and practical application of hydrogen producing marine vibrios. 佐藤一道, 澤辺智雄. 日本細菌学会総会. 千葉. 平成 25 年 3 月 18 日.

19. F. Gao, T. Tachioka, K. Kuga, S. Nakagawa, F. Maruyama, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe, and T. Sawabe. Functional extracellular alginate lyases of *Vibrio halioticoli* IAM 14596^T are up-regulated in the alginate metabolism, 日本マリンバイオテクノロジー学会大会, 平成 25 年 6 月 1 日～2 日、那覇
20. 久我康太、水越草太、中川聡、丸山史人、小椋義俊、林哲也、黒川顕、澤辺桃子、澤辺智雄. 海藻糖質の代謝過程におけるマリンビブリオの遺伝子発現解析、第 7 回細菌学若手コロッセウム、広島、平成 25 年 8 月 7 日～9 日.
21. 猪原悠太郎、中川聡、澤辺智雄. マリンビブリオのアルギン酸分解機構の解明と代謝改変、第 7 回細菌学若手コロッセウム、広島、平成 25 年 8 月 7 日～9 日. （優秀発表賞受賞）.
22. 猪原悠太郎、中川聡、澤辺智雄. *Vibrio halioticoli* の代謝改変：*Zymomonas mobilis* 由来のピルビン酸脱炭酸酵素およびアルコール脱水素酵素 II の発現、日本生物工学会、広島、平成 25 年 9 月 18 日～20 日
23. 久我康太、中川聡、丸山史人、小椋義俊、林哲也、黒川顕、澤辺桃子、澤辺智雄. 海藻糖質の代謝過程における *Vibrio halioticoli* の遺伝子発現解析、日本生物工学会、広島、平成 25 年 9 月 18 日～20 日.
24. 佐藤一道、天田愛梨、中川聡、澤辺智雄. *Vibrio tritonius* AM2^T を用いた海藻糖質からの水素生産システムの構築、日本生物工学会、広島、平成 25 年 9 月 18 日～20 日.
25. K. Sato, E. Amada, S. Nakagawa, T. Sawabe. The development of hydrogen producing system from seaweed carbohydrate using marine vibrio、Asia BioHyLink 2013 、Osaka、平成 25 年 11 月 22 日～24 日.（ポスター賞受賞）.
26. E. Amda, K. Sato, S. Nakagawa, T. Sawab. Can the marine vibrio make bioconversion of formate to biohydrogen? Asia BioHyLink 2013 、Osaka、平成 25 年 11 月 22 日～24 日.
27. F. Gao, S. Nakagawa, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, T. Sawabe. Whole genome sequence analysis of *Vibrio halioticoli* IAM 14596^T. APMBC, 平成 26 年 5 月 5～7 日、Taipei.
28. 杉谷舞、澤辺智雄. バイオ燃向上させるマリンビブリオの代謝改変：海洋バイオマスの CBP に向けた *Vibrio halioticoli* へのデンプン代謝能付与. 日本生物工学会、平成 26 年 9 月 9～11 日、札幌.
29. 水越草太、丸山史人、小椋義俊、林哲也、黒川顕、澤辺智雄. 水素生成マリンビブリオの網羅的遺伝子発現解析：基質の還元度が中央代謝系に与える影響. 日本生物工学会、平成 26 年 9 月 9～11 日、札幌.
30. 天田愛梨、澤辺智雄. マリンビブリオを生物触媒としたギ酸塩の水素変換条件の最適化. 日本生物工学会、平成 26 年 9 月 9～11 日、札幌.

椎名 隆（東海大学）

1. 椎名 隆. カニクイザルの産地間差異を利用した Biomedical 研究への展開. 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会、2011 年 7 月 12 日、パシフィコ横浜
2. Shiina T, Suzuki S, Tanaka K, Yamanaka H, Nakagawa H, Ota M, Torii R, Ogasawara K, Inoko H, Blancher A. Elucidation of Genomic Structure and Diversity of the *Macaca Fascicularis* MHC, Workshop 04: Molecular biology and evolution of blood group and MHC antigens in primates, SMBE2011, 2011 年 7 月 28 日、京都大学
3. 椎名 隆、カニクイザル MHC 多型情報基盤と生物医学研究への展開、シンポジウム I 「MHC からみた種内多様性と進化」、第 20 回日本組織適合性学会大会, 2011 年 9 月 16 日、明治大学駿河台キャンパス
4. 椎名 隆、山田 幸穂、田中 景子、伊藤 靖、勝山 善彦、山中 久、中川 博司、太田 正穂、猪子 英俊、小笠原 一誠. フィリピン産カニクイザルの MHC 多型解析によるホモ接合個体の特定. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、マリンメッセ福岡
5. 椎名 隆、山田 幸穂、田中 景子、亀谷 美恵、岩谷 千鶴、土屋 英明、伊藤 靖、山中 久、中川 博司、太田 正穂、猪子 英俊、小笠原 一誠. iPS 研究の前臨床試験のための

カニクイザル MHC 遺伝子の多型解析. 第 12 回日本再生医療学会総会、2013 年 3 月 22 日、パシフィコ横浜

6. 椎名 隆、山田 幸穂、森実 飛鳥、杉田 直、河村 拓史、石垣 宏仁、高橋 淳、高橋 政代、澤 芳樹、小笠原 一誠. カニクイザルの iPS 細胞ならびに分化細胞における MHC 遺伝子発現解析. 第 24 回日本組織適合性学会大会、2015 年 9 月 11 日、ホテルレイクビュー水戸
7. 椎名 隆、山田 幸穂、鈴木 進悟、桝屋 安里、伊藤 さやか、岩谷 千鶴、土屋 英明、伊藤 靖、山中 久、中川 賢司、小笠原 一誠. 大規模 DNA タイピングによる MHC 統御カニクイザルの検出. 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸国際会議場
8. 椎名 隆. MHC 統御カニクイザルの開発と再生医学・移植研究への展開. 第 15 回日本再生医療学会総会シンポジウム「細胞移植と免疫反応」、 2016 年 3 月 17 日、大阪国際会議場

塩見邦博（信州大学）

1. 塩見邦博・國井雅代・新井満美子・鈴木穣・登坂真紀子・菊池泰司・今村聖実・黒川顕・山本希；カイコの胚休眠誘導における環境温度情報の保存・記憶の分子解析；新学 3 領域研究「ゲノム支援」拡大班会議要旨集, 66, 2013. 神戸市.
2. 國井雅代・新井満美子・土屋良磨・松野久美子・塩見邦博；カイコの胚休眠と光受容体の関係；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 69 号, 14, 2013. 松本市.
3. 新井満美子・國井雅代・土屋良磨・松野久美子・鈴木穣・山本希・黒川顕・塩見邦博；カイコの休眠誘導に関わる遺伝子の探索 −胚期の温度感受性時期における RNA-seq. 解析−；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 69 号, 6, 2013. 松本市.
4. 松野久美子・内野恵郎・田中良弥・國井雅代・新井満美子・土屋良磨・田中良明・瀬筒秀樹・塩見邦博；カイコの休眠誘導における蛹脳のコラゾニンの作用機構の解析；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 69 号, 19, 2013. 松本市.
5. 塩見邦博・佐藤梓・曽我部隆彰・加塩麻起子・安河内祐二・鈴木穣・山本希・黒川顕・富永真琴；カイコの次世代卵の休眠性を決定する温度感受性 TRP チャネル. 日本遺伝学会第 86 回大会；WS15 TRP チャネルの機能的多様性と生理的意義, 2014 年 9 月 19 日, 長浜市.
6. 塩見邦博・國井雅代・新井満美子・向田萌香・鈴木穣・黒川顕・山本希；カイコの胚休眠誘導における環境温度情報の保存・記憶の分子解析；新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議プログラム＆要旨集, 83, 2014. 神戸市.
7. 土屋良磨・國井雅代・向田萌香・久保田穏香・中西弘充・安河内祐二・瀬筒秀樹・高須陽子・塩見邦博；カイコ蛹期の休眠ホルモン放出制御と GABA 受容体との関係；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 70 号, 11, 2014. 岡谷市.
8. 國井雅代・土屋良磨・向田萌香・新井満美子・鈴木穣・黒川顕・山本希・安河内祐二・瀬筒秀樹・高須陽子・一田昌利・塩見邦博；カイコの休眠誘導に関わる遺伝子の探索 −温度・光条件の異なる胚子の RNA-seq. 解析−；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 70 号, 16, 2014. 岡谷市.
9. 向田萌香・土屋良磨・國井雅代・鈴木穣・山本希・黒川顕・塩見邦博；カイコの休眠誘導に関わる蛹期の脳−食道下神経節内の遺伝子の RNA-seq. 解析による探索；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 70 号, 17, 2014. 岡谷市.
10. 塩見邦博；カイコの休眠誘導と温度感受性 TRP チャネル；平成 26 年度学融合研究事業 戦略的共同研究 I 「温度感受システムの進化生理学」, 2015. 2 26. 逗子市.
11. 塩見邦博・高須陽子・國井雅代・土屋良磨・向田萌香・小林正和・瀬筒秀樹・一田（高濱）昌利・溝口明；TALEN を利用した休眠ホルモンシグナル経路の遮断がカイコの休眠誘導に及ぼす影響；日本蚕糸学会 85 回大会講演要旨集, 40, 2015. 札幌市.

12. 土屋良磨・田中まみ・田中佑磨・渡井拓人・瀬筒秀樹・高須陽子・塩見邦博；カイコ蛹期の休眠ホルモン放出制御と GABA 性神経伝達の関係調査；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 71 号，6，2015．松本市.
13. 田中佑磨・田中まみ・渡井拓人・土屋良磨・國井雅代・高須陽子・瀬筒秀樹・塩見邦博；カイコの休眠誘導における温度情報の受容・保存に関わる遺伝子の探索−候補遺伝子の発現動態解析−；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 71 号，8，2015．松本市.
14. 渡井拓人・田中まみ・田中佑磨・土屋良磨・高須陽子・瀬筒秀樹・塩見邦博；カイコにおけるコラゾニンおよびその受容体遺伝子のノックアウトが休眠性に及ぼす影響の調査；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 71 号，13，2015．松本市.
15. 田中まみ・向田萌香・土屋良磨・田中佑磨・渡井拓人・塩見邦博；カイコのインスリン受容体の完全長 cDNA のクローニングとアイソフォーム同定の試み；日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 71 号，19，2015．松本市.

執行正義（山口大学）

1. 執行正義・佐藤修正・Abdelrahman, Mostafa ・ 平田翔・平川英樹・田中啓介・峯洋子・杉山信男・山内直樹、ネギ属バイオリーソースを用いたトランスクリプトーム解析データの活用、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015 年 9 月 26 日、徳島大学
2. 山北和香・佐藤修正・Abdelrahman, Mostafa・平田翔・平川英樹・田中啓介・峯洋子・山内直樹・執行正義、ネギ単一異種染色体添加系統の RNA-Sequencing によるシャロット染色体マーカーの大量取得、園芸学会平成 27 年度秋季大会、2015 年 9 月 26 日、徳島大学

柴田弘紀（九州大学）

1. 柴田弘紀, 千々岩崇仁, 上田直子, 中村仁美, 服部正策, 松原和純, 松田洋一, 森一樹, 田代康介, 久原哲, 山崎慎一, 藤江学, 後藤大輝, 将口栄一, 久田香奈子, 小柳亮, 佐藤矩行, 大野素徳, 服巻保幸, 小川智久. 日本固有の毒蛇ハブ（*Protobothrops flavoviridis*）の全ゲノム配列決定と遺伝子モデルの作製. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 01-04 日. 神戸、神戸ポートアイランド
2. 山口和晃, 千々岩崇仁, 池田直樹, 林みず紀, 柴田弘紀, 上田-小田直子, 服巻保幸, 服部正策, 大野素徳. クサリヘビ科ヘビの毒ホスホリパーゼ A2 遺伝子の形成と起源. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会. 2015 年 12 月 01-04 日. 神戸、神戸ポートアイランド

柴 博史（筑波大学）

1. 柴　博史, 次世代シークエンスを用いたエピゲノム解析, 園芸学会秋季大会シンポジウム「次世代シークエンサーの園芸学研究における利用」, 2015 年 9 月 26 日, 徳島
2. Shiba, H., Analysis of global gene expression changes in two *Arabidopsis* accessions and their reciprocal hybrids, 日本植物学会第 79 回大会シンポジウム"Diverse physiological functions of plant non-coding RNA", 2015 年 9 月 6 日, 新潟
3. 志村 卓哉, 中川原 真澄, 鈴木 穣, 矢野 健太郎, 高山 誠司, 柴 博史, シロイヌナズナ F_1 雑種において優劣発現を示す遺伝子の分子生物学的解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26 日, 岡山
4. 垰野　裕, 中川原真澄, 鈴木　穣, 矢野健太郎, 高山誠司, 柴　博史, シロイヌナズナの種内雑種（F_1 雑種）で観察される雑種強勢に関与するノンコーディング RNA の探索, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26 日, 岡山
5. 柴　博史, ネガティブレギュレーターとしての エピゲノムの動態解析, 植物遺伝子発現制御と環境ストレス応答に関する環境科学セミナー, 2015 年 3 月 24 日
6. Shiba, H., Analysis of global gene expression changes in two Arabidopsis accessions and their reciprocal hybrids, Institute of Plant Science and Recourses Workshop "Plant Epigenetics: From Emerging Phenomena to Novel Molecular Events", 2015 年 1 月 31 日, 岡山

7. 柴　博史, 三浦　栄子, 樽谷　芳明, 磯貝　彰, 高山　誠司, 植物におけるエピゲノムを介した優劣性発現制御機構の解明, 日本農芸化学会第２回関東支部例会, 2013 年 2 月 9 日, 土浦
8. 柴　博史, 日野　沙由理, 桂　奈津美, 五十嵐　香理, 藤橋　大祐, 堀内　映実, 鈴木　穣, 矢野　健太郎, 磯貝　彰, 高山　誠司, オミクス解析で明らかとなってきた種内雑種特異的な遺伝子発現制御, 日本育種学会第 122 回講演会, 2012 年 9 月 14 日, 京都
9. Shiba, H., Tarutani, Y., Miura, E., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama, S., Epigenetic regulation of dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility alleles, 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜
10. 柴　博史, 樽谷芳明, 三浦栄子, 岩野　恵, 柿崎智博, 渡辺正夫, 磯貝　彰, 高山誠司, エピゲノムを介した自家不和合性対立遺伝子間の優劣性発現制御, 第 83 回日本遺伝学会, 2011 年 9 月 20 日, 京都

嶋崎晴雄（自治医科大学）

1. 嶋崎晴雄, 本多純子, 直井為任, 滑川道人, 石浦浩之, 三井純, 後藤順, 辻 省次, 吉村 淳, 土井晃一郎, 森下真一, 瀧山嘉久. 常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺の新規原因遺伝子探索. 平成 25 年度運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班会議. 2014 年 1 月 8 日, 東京.

嶋田 透（東京大学）

1. Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Maki Kubo, Yan Meng, and Susumu Katsuma: Genetic studies on adaptation of bombycid silkmoths to the mulberry. The 20th CDB Meeting "Molecular Bases for Evolution of Complex Traits", RIKEN CDB, Kobe, Japan. 2011 年 2 月 23 日（国際ワークショップ、招待講演）
2. Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Huabing Wang, Hiroaki Abe, Akio Onuma, Takashi Kiuchi, and Susumu Katsuma: Genomic studies on the relationship between the silkworm and its food plant, mulberry. Genome Research: Current Challenges and Future Directions, KOKUYO HALL, Shinagawa, Japan. 2012 年 1 月 21 日（国際シンポジウム、招待講演）
3. Toru Shimada, Takaaki Daimon, Tsuguru Fujii, Yan Meng, Huabing Wang, Hiroaki Abe, Akio Onuma, Takashi Kiuchi, and Susumu Katsuma: Genetic and genomic studies on the food habits of the silkworm: Special Lecture for the Silver Jubilee of the Department of Biotechnology (Ministry of Science & Technology, Indian Government), Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, Hyderabad , India. 2012 年 2 月 24 日（国際会議、招待講演）
4. Toru Shimada, Tsuguru Fujii, Huabing Wang, Takeshi Fujii, Hiroaki Abe, Akio Ohnuma, Yukio Ishikawa, Takashi Kiuchi, and Susumu Katsuma. Molecular genetic studies on the spli locus controlling pheromone preference in the silkmoth, Bombyx mori. XXIV International Congress of Entomology, EXCO-Daegu Convention Center, Daegu, Korea, August 19-24, 2012（国際会議、招待講演）
5. 木内隆史・ 王 華兵・加藤裕子・藤井告・大門高明・門田幸二・鈴木 穣・菅野純夫・勝間 進・嶋田 透：カイコとその近縁種における寄主植物選択機構の進化. 第 56 回日本応用動物昆虫学会大会（小集会 「昆虫の適応形質進化へゲノム科学的アプローチ」）、2012 年 3 月 28 日、近畿大学農学部（奈良県奈良市）（口頭発表）
6. 山野 峻・木内隆史・王 華兵・鈴木 穣・ 菅野純夫・大門高明・門田幸二・勝間 進・嶋田 透 : カイコ二糖分解酵素の糖類似アルカロイド に対する抵抗性. 日本蚕糸学会第 83 回大会（蚕糸・昆虫機能利用学術講演会）、2013 年 3 月 18 日～19 日、農林水産技術会議事務局筑波事務所(茨城県つくば市)（一般講演；口頭発表）
7. 菅野雄大・庄司佳祐・古賀光・木内隆史・嶋田透・勝間進：カイコ雄化因子 Masc の細胞内局在解析および標的の探索. 日本蚕糸学会第 85 回大会（蚕糸・昆虫機能利用学術講演会）、北海道大学農学部（北海道札幌市）.

島本 整（広島大学）

1. 湯ノ谷 学・島本 敏・島本 整, コレラ菌の病原性発現調節におけるレトロンと msDNA の機能解析, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 24 日, 大阪市

將口栄一（沖縄科学技術研究基盤整備機構）

1. 將口栄一、新里宙也、久田香奈子、佐藤矩行. 渦虫藻 *Symbiodinium minutum* のミトコンドリアゲノムの解読. 日本藻類学会　2015 年 3 月 21 日. 九州大学.
2. 將口栄一. A first assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. Joint aquatic science meeting (Phycology society of America)　2014 年 5 月 22 日. Oregon convention center
3. 將口栄一、新里宙也、川島武士、佐藤矩行. 褐虫藻類のゲノムの解読. 日本サンゴ礁学会　2013 年 12 月 14 日. 沖縄技術大学院大学
4. 將口栄一　サンゴに共生する渦鞭毛藻類のゲノム構造とその進化. 日本分子生物学会　2013 年 12 月 5 日. 神戸国際展示場
5. 將口栄一、新里宙也、ｽﾀﾀﾞ ﾑﾝﾊﾟｯﾃﾞｨｰ、行者蕗、小柳亮、竹内猛、久田香奈子、田中牧子、 川島武士、佐藤矩行. 渦鞭毛藻 *Symbiodinium minutum* ゲノムの解読. 日本藻類学会　2013 年 3 月 28 日. 山梨大学.
6. 將口栄一、新里宙也、Sutada Mungpakdee、行者蕗、小柳亮、竹内猛、久田香奈子、川島武士、佐藤矩行. 渦鞭毛藻類 *Symbiodinium* のゲノムの解読. 日本分子生物学会 2012 年 12 月 13 日. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡.

城石俊彦（国立遺伝学研究所）

1. 天野孝紀、「遺伝子の差次的発現を支える染色体コミュニーケーション」、「細胞を創る」研究会 8.0、2015 年 11 月 13 日、大阪
2. 天野孝紀「CRISPR/Cas9 系を用いたマウス Shh 遺伝子座のシス制御機構の解析」、日本遺伝学会第 87 回大会ワークショップ　“マウス遺伝学による疾患研究の最前線” 2015 年 9 月 24 日、仙台
3. T. Amano、Enhancer sharing and promoter insulation from enhancer activities: spatial and temporal organization of gene regulation around the mouse *Shh* locus、発生生物学会第 47 回大会、2014 年 5 月 29 日、名古屋

新屋みのり（国立遺伝学研究所）

1. M. Shinya, N. Sakai, Establishment of a zebrafish inbred strain by consecutive full sib-pair mating. 10th International conference on Zebrafish Development and Genetics, June 20-24, 2012, in Madison USA.
2. M. Shinya, N. Sakai, Establishment of a zebrafish inbred strain by consecutive full sib-pair mating. 第 18 回小型魚類研究会, 2012 年 9 月 22・23 日, 京都.
3. M. Shinya, N. Sakai, Establishment of the first zebrafish inbred strain by consecutive full sib-pair mating. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11～14 日, 福岡.
4. 新屋みのり、中谷明弘、江端俊伸、豊田敦、藤山秋佐夫、酒井則良, ゼブラフィッシュ近交系 IM 系統の遺伝的評価.日本遺伝学会第 85 回大会, 2013 年 9 月 19～21 日, 神奈川.

末次正幸（立教大学）

1. 松本健佑、**末次正幸**、染色体複製開始のタイミングと共役して遺伝子転写を抑制/促進する機構、第 23 回 DNA 複製・組換え修復ワークショップ、焼津、2015 年 10 月
2. 松本健佑、**末次正幸**、大腸菌における細胞周期性転写活性制御機構の解析、第 12 回 21 世紀大腸菌研究会、滋賀県大津、2015 年 6 月
3. **末次正幸**、松本健佑、小林寛子、大腸菌遺伝子転写の細胞周期制御、「細胞を創る」研究会 7. 0、東京、2014 年 11 月

4. 松本健佑、**末次正幸**、大腸菌における細胞周期依存の転写活性変動のリアルタイム観測系を用いた解析、第３７回分子生物学会年会、横浜、2014 年 11 月
5. 松本健佑、**末次正幸**、大腸菌における細胞周期依存性の転写活性変動のリアルタイム観測、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、盛岡、2014 年 6 月
6. **末次正幸**、小林 寛子、松本 健佑、片山 勉、再構成アプローチによる大腸菌染色体複製周期の解析．日本農芸化学会 2014 年度大会シンポジウム**「ゲノム改変による潜在能力覚醒を基にした細菌研究の新展開**」、東京、2014 年 3 月
7. **Su'etsugu, M.**, Kobayashi, H. and Katayama, T., An approach to reconstruction of cell cycle oscillation of DnaA activity for replication initiation and transcription regulation. CBI 学会 2013 年大会、東京、2013 年 10 月

鈴木真吾（理化学研究所）

1. Shingo Suzuki, Takaaki Horinouchi, and Chikara Furusawa, “Bacterial evolution of cross-resistance and hypersensitivity to other classes of antibiotics”, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26-28 日（東京）.
2. 鈴木真吾, 堀之内貴明, 古澤力, “異なる系統の抗菌薬に対する交差耐性および超感受性の進化”, 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 2014 年 3 月 7-9 日（東京）.
3. 鈴木真吾, 堀之内貴明, 古澤力, “実験進化的手法による薬剤耐性大腸菌の創出とそのゲノミクス解析”, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18-20 日（広島）.

鈴木 勉（東京大学）

1. 鈴木　勉、RNA 修飾の多彩な機能と疾患、名古屋市立大学薬学会特別講演会2015/6/4 、名古屋市立大学

諏訪裕一（中央大学）

1. 諏訪裕一，村上由夏，荒井渉，池田拓哉，勝山千恵，小椋義俊，林哲也，吉永郁生，福原康平，黒岩恵，高見英人，メタゲノム解析による生理・代謝機能ポテンシャルから見た富栄養湖（北浦）の窒素循環像，日本微生物生態学会第３０回大会，2015 年 10 月 17 日，土浦

瀬川高弘（国立極地研究所）

1. 瀬川高弘，近藤伸二，本山秀明，氷床アイスコア中の微生物解析　日本細菌学会細菌学若手コロッセウム　2012 年
2. S. Kondo, T. Segawa, Y. Hongo and H. Motoyama “Metagenome analyses of glacier samples: detection of rare (but critical species) and viral data analysis by utilizing various controls”, 雪氷生物研究会，千葉大学，　2013 年

関本弘之（日本女子大学）

1. 西山智明、関本弘之、坂山英俊「参照配列無し短リード塩基配列の情報解析」日本植物学会シンポジウム「ケノム解析によって解き明かされる植物の多様性」、2011 年 9 月 18 日（東京大学）
2. 阿部 淳、西山 智明、関本弘之「単細胞シャジクモ藻類ヒメミカヅキモのゲノミクス」日本植物学会シンポジウム「ゲノム解析によって解き明かされる植物の多様性」、2011 年 9 月 18 日（東京大学）
3. Abe, J., Sakayama, H., Suzuki, Y., Toyoda, A., Tsuchikane, Y., Sekimoto, H., Nishiyama, T. “*Closterium* and *Chara* genome and transcriptome analyses.” The International Plant & Animal Genome XX Conference, January 14, 2012, San Diego, CA, USA.
4. 西山智明、阿部　淳、土金勇樹、坂山英俊、関本弘之「次世代シーケンサーデータの de novo アセンブリー解析」第 53 回日本植物生理学会シンポジウム「次世代シーケンサーによる高速分子遺伝学」、2012 年 3 月 17 日（京都産業大学）

5. 阿部淳、関本弘之「藻類の遺伝子操作の現状と課題 ―単細胞シャジクモ藻類ヒメミカヅキモを例として―」第 53 回日本植物生理学会シンポジウム「微細藻類による燃料生産:実現への課題と生物学からの解決策」、2012 年 3 月 18 日（京都産業大学）
6. 関本弘之「ミカヅキモの有性生殖に関わる細胞間情報伝達機構の解析」第 7 回化学生態学研究会、2012 年 6 月 30 日（湯の川プリンスホテル渚亭）
7. Sekimoto, H., Hirano, N., Marukawa, Y., Tsuchikane, Y., Abe, J. “Intercellular communication in sexual reproduction of a unicellular charaphycean alga, *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants, November 16, 2012, Nagoya.
8. 関本弘之、平野直子、大槻涼、川井絢子、土金勇樹、西山智明、阿部淳「シャジクモ藻類ヒメミカヅキモの有性生殖制御」第 77 回日本植物学会シンポジウム「アルガルセックス：有性生殖と生活環制御が切り拓く藻類バイオの新戦略」、2013 年 9 月 13 日（北海道大学）
9. 関本弘之「シャジクモ藻類ヒメミカヅキモの有性生殖機構」第 84 回日本動物学会シンポジウム「受精機能と生殖戦略の進化　～藻類から脊椎動物まで」、2013 年 9 月 26 日（岡山大学）
10. 小宮あゆみ、阿部淳、川井絢子、鈴木穣、豊田敦、藤山秋佐夫、大槻涼、土金勇樹、西山智明、関本弘之「ヒメミカヅキモの−型細胞特異的遺伝子 *CpMinus1* の解析」日本植物生理学会第 55 回大会、2014 年 3 月 18 日（富山大学）
11. 小宮あゆみ、阿部淳、川井絢子、鈴木穣、豊田敦、藤山秋佐夫、大槻涼、土金勇樹、西山智明、関本弘之「ヒメミカヅキモの−型細胞ゲノム特異的遺伝子 *CpMinus1* の機能解析」日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 12 日（明治大学）
12. 川井絢子、阿部淳、鈴木穣、豊田敦、藤山秋佐夫、土金勇樹、西山智明、関本弘之「シャジクモ藻類ヒメミカヅキモにおける陸上植物特異的な転写因子の探索と発現解析」日本植物学会第 78 回大会、2014 年 9 月 14 日（明治大学）
13. 横山佳奈、関本弘之、鈴木穣、西山智明、土金勇樹「自殖するミカヅキモにおける性決定遺伝子 *CpMinus1* の機能解析」日本植物分類学会第 14 回大会、2015 年 3 月 6 日（福島大学）
14. 土金勇樹、横山佳奈、鈴木穣、西山智明、関本弘之「ホモタリックなヒメミカヅキモにおける *CpMinus1* 相同遺伝子の機能解析」日本藻類学会第 39 回大会、2015 年 3 月 21 日（九州大学）
15. Komiya, A., Abe, J., Kawai, J., Suzuki, Y., Ootsuki, R., Tsuchikane, Y., Nishiyama, T., Sekimoto, H. “The *CpMinus1* gene, specifically localized on the mating-type minus genome, is responsible for the sex determination of heterothallic *Closterium peracerosum-strigosum-littorale* complex” 6th European Phycological Congress, August 25, 2015, London, England.
16. 小宮 あゆみ,阿部 淳,川井 絢子,鈴木 穣,豊田 敦,藤山 秋佐夫,大槻 涼,土金 勇樹, 西山 智明, 関本弘之「*CpMinus1* 遺伝子はヒメミカヅキモの性を決定する」日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 8 日（新潟・朱鷺メッセ）
17. 土金 勇樹,渡邊 樹梨,加藤 万智,鈴木 穣,西山 智明, 関本弘之「接合藻ヒメミカヅキモにおける新規交配群 G の発見とトランスクリプトーム解析」日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 8 日（新潟・朱鷺メッセ）
18. 金澤愛樹、坂本季美枝、鈴木穣、豊田敦、藤山秋佐夫、西山智明、関本弘之「シャジクモ藻類ヒメミカヅキモには、２つのクラスの *KNOX* 遺伝子が存在する」日本植物学会第 79 回大会、2015 年 9 月 8 日（新潟・朱鷺メッセ）
19. Hiroyuki Sekimoto「Sexual reproduction and sex determination of green algae」日本植物学会第 79 回大会シンポジウム “Fusion” in Fertilization: Interdisciplinary Collaboration among Plant and Animal Scientists, 2015 年 9 月 7 日（新潟・朱鷺メッセ）

瀬原淳子（京都大学）

1. 佐藤文規、Choi Minyong、 内田智子、谷垣文章、鈴木穣、川上浩一、瀬原淳子「宇宙滞在によって変化するゼブラフィッシュの骨格筋トランスクリプトーム」日本宇宙生物科学会、2015 年 9 月 26, 27 日、東京都

2. 瀬原淳子「骨格筋の発達・維持・萎縮における負荷依存性の分子基盤の理解」新学術研究「宇宙に生きる」キックオフシンポジウム（公開）、2015 年 10 月 6 日、東京都

曽田貞滋（京都大学）

1. Junji Konuma, Tomochika Fujisawa, Teiji Sota: Genome sequence and genetic basis of morphological divergence in a snail feeding carabid beetle. International Symposium on Genome Science 2015 “Expanding Frontiers of Genome Science II”. Jan. 20–21, 2015, Hitotsubashi-Hall, Tokyo.

平良眞規（東京大学）

1. Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano, and Masanori Taira "Genomics Study of the Spemann-Mangold Organizer: Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification." （安岡、口頭発表；PD 口頭発表賞を受賞） 15th International Xenopus Conference、Asilomar (California, USA)（2014 年 8 月 24 日～30 日）
2. Yuki Honda, Yoshiaki Kirigaya, Yuuri Yasuoka, Saya Imai, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Makoto Asashima, Sumio Sugano, and Masanori Taira “ChIP-Seq analysis of Transcription factor Siamois for mechanisms of head organizer formation” 第 36 回分子生物学会年会、神戸（2013 年 12 月 3 日～6 日）
3. Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Yukiko Tando, Kaoru Kubokawa, Ken W. Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano and Masanori Taira "Otx2 and TLE/Groucho occupancy marks tissue-specific cis-regulatory modules for head specification" 第 35 回分子生物学会年会、福岡（2012 年 12 月 11 日～14 日）
4. Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Yukiko Tando, Kaoru Kubokawa, Ken W. Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano and Masanori Taira "Massively parallel regulation of head and non-head genes by Otx2, Lim1 and Gsc is based on evolution of the head organizer in the chordate" 日本発生生物学会第 45 回大会、神戸（2012 年 5 月 28 日～31 日）

高田豊行（国立遺伝学研究所）

1. 矢坂拓，阿部貴志，城石俊彦，高田豊行、マウスを用いた RNA 編集様式の亜種間差探索に向けた遺伝子発現解析、第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学大会 合同大会、2015 年 12 月 2 日、神戸

高橋秀尚（北海道大学）

1. 高橋秀尚，瀧川一学，渡部昌，Delnur Anwar，柴田美音，佐藤チエリ，佐藤滋生，Amol Ranjan, Chris W. Seidel, 築山忠維, 林正康, 大川恭行, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, 畠山 鎮次 : メディエーター複合体による転写伸長制御, 第 37 回日本分子生物学会年会，横浜，2014. 11. 25
2. 高橋 秀尚, 畠山 鎮次 : Med26 は Little elongation complex をリクルートすることで small nuclear RNA 遺伝子の発現を制御する，日本 RNA 学会，ホテルライフォート札幌，札幌，2015. 7.17
3. Hidehisa Takahashi, Ichigaku Takigawa, Masashi Watanabe, Delnur Anwar, Mio Shibata, Chieri Tomomori-Sato, Shigeo Sato, Amol Ranjan, Chris W. Seidel, Tadasuke Tsukiyama, Wataru Mizushima, Joan W. Conaway, Ronald C. Conaway, Shigetsugu Hatakeyama.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex, CSHL meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2015. 8. 27
4. 高橋 秀尚，Joan W. Conaway，Ronald C. Conaway，畠山 鎮次：メディエーター複合体

による転写伸長制御機構，第 38 回日本分子生物学会，神戸ポートピアホテル，神戸，2015. 12. 1

高橋秀幸（東北大学）

1. 宮林彩智子、藤井伸治、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリの根の重力屈性時と水分屈性時に偏差的に発現する遺伝子の比較」日本宇宙生物科学会第 29 回大会 2015 年 9 月 26 日～9 月 27 日（東京）
2. 藤井伸治、宮林彩智子、小林啓恵、山崎千秋、宮沢豊、鎌田源司、笠原春夫、長田郁子、嶋津徹、伏島康男、東端晃、山崎丘、石岡憲昭、高橋秀幸「キュウリの根の水分屈性と重力屈性に関わる遺伝子の網羅的発現解析」第 30 回宇宙環境利用シンポジウム 2016 年 1 月 19 日～1 月 20 日（相模原）
3. Sachiko Miyabayashi, Nobuharu Fujii, Akie Kobayashi, Chiaki Yamazaki, Yutaka Miyazawa, Motoshi Kamada, Kasahara Haruo, Osada Ikuko, Shimazu Toru, Fusejima Yasuo, Higashibata Akira, Yamazaki Takashi, Ishioka Noriaki, Takahashi Hideyuki. “Transcriptome analysis of gene expressions during hydrotropic and gravitropic responses in cucumber roots. ”第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18～3 月 20 日 (岩手)

高橋文雄（立命館大学）

1. 吉川伸哉（福井県大・海洋）　細川真美（福井県大・海洋）　上井進也（新潟大・理）　奥田修二郎（新潟大・歯）　笠原賢洋（立命館・生命）　高橋文雄（立命館・生命）　RNA-seq による褐藻アカモクの青色光受容体の解析　日本藻類学会、2016 年 3 月 19－20 日予定　日本歯科大学（東京）

高畑信也（北海道大学）

1. 高畑信也、FACT 複合体によるヘテロクロマチンサイレンシングの分子機構、第 9 回日本エピジェネティクス研究会年会 2015 年 5 月 25 日、学術総合センター一橋講堂（東京）
2. Shinya Takahata, Saori Chida, Yota Murakami HP1/Swi6 recruits FACT for heterochromatin regulation in fission yeast. The 8th International Fission Yeast Meeting、2015 年 6 月 24 日（神戸）
3. 高畑信也、大沼葵、村上洋太　ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 と結合する FACT の相互作用領域の解析 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日（神戸）
4. 高畑信也、鈴木詔大、大沼葵、村上洋太　HP1/Swi6 と FACT の共役によるグローバルな転写制御機構解析 第 33 回染色体ワークショップ/第 14 回核ダイナミクス研究会共催、2016 年 1 月 13 日（松島）
5. 高畑信也、鈴木詔大、大沼葵、村上洋太　HP1/Swi6 と FACT の共役によるグローバルな転写制御機構解析 新学術領域「転写サイクル」 冬の若手ワークショップ 2016、2016 年 2 月 4 日（山中湖）

高濵洋介（徳島大学）

1. Takahama Y. Thymus-dependent positive selection of T cells. *Frontiers in Basic Immunology 2015, National Cancer Institute.* Bethesda, USA. 8th October 2015（招待講演）
2. Takahama Y. The thymic microenvironments that shape T cell repertoire. *15th International Congress of Immunology.* Milan, Italy. 24th August 2013（招待講演）

滝沢直己（微生物化学研究所）

1. 滝沢 直己、小椋 義俊、林 哲也、黒川 顕　次世代シーケンサーを利用したインフルエンザウイルスゲノムRNA粒子内立体配置解析法の開発、NGS現場の会第四会研究会、2015.7.1-3、つくば国際会議場
2. 滝沢 直己、小椋 義俊、林 哲也、黒川 顕　インフルエンザウイルスRNAゲノムのパッケージングに重要なRNAモチーフの同定、第17回日本RNA学会年会、2015.7.15-17、ホテルライフォート札幌

竹井祥郎（東京大学）

1. Takei, Y., Wong, M.K.S., and Iwasaki, W. Exploring key genes responsible for seawater adaptation in teleost fish by transcriptome analyses. International Symposium on Genome Science 'Expanding Frontiers of Genome Science'. January 9-10, 2013, Tokyo (Abstracts p. 24).
2. 竹井祥郎、Marty Wong, 尾崎遼、鈴木譲、岩崎渉. 魚類の海水適応能を司る遺伝子の探索: 海水移行にともなうトランクリプトーム解析。新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議、平成 25 年 8 月 28~29 日、神戸（要旨集 84 頁）。
3. Takei, Y., Wong, M.K.S., Nobata, S., and Ando, M. The eel: an excellent but enigmatic model for the study of osmoregulation. Eel Genome Symposium 2014, January 16-17, 2014, Leiden, The Netherlands (Abstract book p. 29).
4. Wong, M.K.S., Ozaki, H., Suzuki, Y., Iwasaki, W., Takei, Y. Discovery of Transcription factors for seawater acclimation in fish intestine via transcriptomic approach. Symposium on Ion and Acid-Base Regulation, In International Congress of the Biology of Fish, August 3-7, 2014, Edinburgh, Scotland.
5. Wong M.K.S., Ozaki H, Suzuki Y, Iwasaki W, Takei Y. Discovery of transcription factors for seawater adaptation in teleost via a transcriptomic approach. 新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議、平成 26 年 8 月 21-22 日、神戸(要旨集 103 頁)

竹内 理（京都大学）

1. Takeuchi, O.: Posttranscriptional control of immune responses. Weizmann Institute of Science, Department of Immunology, Department seminar, April 9, 2013
2. Takeuchi, O.: Posttranscriptional control of inflammation by an RNase, Regnase-1. France - Japan Joint Forum "Frontiers in Innate Immunity" Strasbourg, France, June 5-8, 2013
3. Takeuchi, O.: Regnase-1-mediated posttranscriptional regulation of inflammation. Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea, Osong, Korea, October 17, 2013
4. Takeuchi, O.: Posttranscriptional control of inflammation by an RNase, Regnase-1. Ochanomizu atherosclerosis forum, Tokyo, February 23, 2013
5. Takeuchi, O.: Molecular mechanisms of immune cell regulation by an RNase, Regnase-1. The 86th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society. Yokohama, September 13, 2013.
6. 竹内　理: RNA分解酵素Regnase-1による炎症制御機構.　生化学若い研究者の会　近畿支部秋のセミナー, 2013年10月27日.
7. 竹内　理: 炎症制御の分子メカニズムーmRNA分解の役割を中心にー. 日本薬学会東海支部特別講演会. 2013年11月25日.
8. 竹内　理: Regnase-1 による炎症制御機構の解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 2013 年 12 月 3 日.
9. Takeuchi, O.: "Posttranscriptional regulation of inflammatory responses", Seminar in Washington University, Washington, USA. January 23, 2014
10. Takeuchi, O.: "Posttranscriptional regulation of inflammatory responses", BIMSB seminar, Berlin, Germany, February 11, 2014
11. Takeuchi, O.: "Posttranscriptional control of inflammation by an RNase, Regnase-1", Molecular Clock 2014, Kyoto, February 29, 2014,

12. 竹内　理: "Posttranscriptional regulation of inflammation by an RNase, Regnase-1", 第 87 回日本薬理学会年会, 仙台, 2014 年 3 月 19–21 日.
13. 竹内　理: "炎症制御の分子メカニズムーmRNA 分解の役割を中心にー", 第 14 回日本抗加齢医学会総会, 大阪, 2014 年 6 月 6–8 日.
14. 竹内　理: "Toll-like receptor 活性化による炎症応答の転写後調節機構", 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム, 京都, 2014 年 10 月 17 日.
15. 竹内　理: "教育講演 57「自然免疫」第 76 回日本血液学会学術集会", 大阪, 2014 年 11 月 1 日.
16. Takeuchi, O.: "Regulation of inflammatory responses by RNA binding proteins Regnase-1 and Roquin", RNA Stability 2015, Estes Park, Colorado, USA, 1–4 June, 2015.
17. Takeuchi, O.: "Regulatory mechanisms of cytokine gene expression in macrophage", JSPS Core-to-Core Program International Research Network for Virus Infections and Host Responses 1st International Symposium "Intranuclear Infection and Host Immunity", Kyoto, Japan, 27–28 January, 2015.
18. 竹内　理: "自然免疫による炎症の惹起とその調節メカニズム", 第 14 回高知県ウイルス感染症研究会, 高知, 2015 年 2 月 6 日.
19. 竹内　理: "mRNA 分解による免疫制御", 第 88 回日本薬理学会年会, 名古屋, 2015 年 3 月 18–20 日.
20. 竹内　理: "自然免疫による炎症の惹起とその調節機構", 第 89 回日本感染症学会総会・学術講演会, 京都, 2015 年 4 月 15–16 日.
21. 竹内　理: "mRNA 分解による炎症制御メカニズム", 第 113 回「細胞シグナリング」研究会, 横浜, 2015 年 5 月 15 日.
22. 竹内　理: "自然免疫の転写後制御メカニズム", 第 30 回千葉基礎・臨床免疫セミナー, 千葉, 2015 年 5 月 22 日.
23. 竹内　理: "病原体センサー分子による炎症応答の転写後調節機構", 第 33 回日本生化学会北陸支部大会, 富山, 2015 年 5 月 23 日.
24. Takeuchi, O.: "Posttranscriptional regulation of inflammatory responses by RNA binding proteins Regnase-1 and Roquin", IMS-JSI International Symposium on Immunology 2015 "Infection and Immunity", Yokohama, Japan, 18–19 June, 2015.
25. 竹内　理: "RNA 分解酵素 Regnase-1 による炎症の転写後調節機構の解析", 第 67 回日本細胞生物学会大会, 東京, 2015 年 6 月 30 日–7 月 1 日.
26. 竹内　理: "mRNA 分解による炎症制御メカニズム", 第 25 回日本病態生理学会大会, 愛媛, 2015 年 7 月 31 日–8 月 1 日.
27. 竹内　理: "mRNA 分解による免疫の制御機構", 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科セミナー, 奈良, 2015 年 11 月 13 日.
28. 竹内　理: "Regnase-1 と Roquin による炎症関連 mRNA の時空間制御", BMB2015 [ワークショップ 4W27-p] mRNA 分解の機能破綻がもたらす多様な疾患病態, 神戸, 2015 年 12 月 1–4 日.

竹内祐子（京都大学）

1. Tetsuro Kato, Akira Kaneko, Ryoji Shinya, Kazuyoshi Futai, Yuko Takeuchi. Phenotypic and genotypic traits of recombinant inbred lines of pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. IUFRO 2013 -Pine Wilt Disease Conference, 18 October 2013, Braunschweig, Germany【口頭】
2. 加藤 徹朗・金子 彰・本庄 三恵・永野 惇・工藤 洋・森 一樹・菊地 泰生・久原 哲・二井 一禎・竹内 祐子「組み換え近交系を用いたマツノザイセンチュウにおける重要形質のゲノム解析」第 58 回日本応用動物昆虫学会大会（2014 年 3 月 28 日、高知大学朝倉キャンパス、高知）【ポスター】
3. 加藤 徹朗・金子 彰・八杉 公基・本庄 三恵・永野 惇・工藤 洋・森 一樹・久原 哲・二井 一禎・竹内 祐子「RAD-seq を用いたマツノザイセンチュウ組み換え近交系の重要

形質関連遺伝子群の探索」第 125 回日本森林学会大会（2014 年 3 月 29 日、さいたま市大宮ソニックシティ、埼玉）【口頭】

4. Tetsuro Kato, Akira Kaneko, Mie N. Honjo, Atsushi J. Nagano, Hiroshi Kudoh, Kazuki Mori, Taisei Kikuchi, Satoru Kuhara, Kazuyoshi Futai, Yuko Takeuchi. Phenotype/genotype association for pathogenesis of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Japan-Korea Joint Symposium on Nematology 2014, 19 September 2014, Tsukuba, Japan【ポスター】
5. 竹内 祐子「なぜ線虫が巨木を枯らすのか―マツ材線虫病のメカニズムに遺伝学とゲノム科学で迫る」松枯れ対策シンポジウム（2014 年 10 月 31 日、ベルサール飯田橋ファースト、東京）【招待講演】
6. 竹内 祐子「マツノザイセンチュウの病原性規定因子にゲノミクスとプロテオミクスで迫る」第 126 回日本森林学会大会（2015 年 3 月 27 日、北海道大学、北海道）【招待講演】
7. Yuko Takeuchi, Akira Kaneko, Tetsuro Kato, Mie N. Honjo, Atsushi J. Nagano, Hiroshi Kudoh, Kazuki Mori, Taisei Kikuchi, Satoru Kuhara, Kazuyoshi Futai. An 'omics' based approach to the pathogenic mechanism of pine wilt disease. Society of Nematologists Fifty-fourth Annual Meeting, 21 July 2015, East Lansing, Michigan, USA【ポスター】

竹田潤二（大阪大学）

1. Kokubu C., Yamanishi A., Yamagata K., Sese J. and Takeda J, Whole-genome sequencing analysis of radiation-induced genomic rearrangements in BLM-suppressed mouse embryonic stem cells., FASEB Science Research Conferences "Dynamic DNA Structures in Biology"., July 20-25, 2014 Eaglewood Resort & Spa, Itasca, Illinois, USA
2. 山西　絢子、山形　浩一、瀬々　潤、竹田　潤二、國府　力、 Blm 遺伝子欠損状態における放射線照射によるゲノム再編成の亢進について、 第 37 回日本分子生物学会年会 2014.11.27　パシフィコ横浜

武田直也（基礎生物学研究所）

1. 福原舞，半田佳宏，武田直也，川口正代司　「ミヤコグサ *cerberus* 変異体のトランスクリプトーム解析より示唆されるアーバスキュラー菌根菌の菌糸伸長機構」第 55 回日本植物生理学会年会　2014 年 3 月 17 日　富山大学
2. 永江美和　Martin Parniske　川口正代司　武田直也　「ミヤコグサの根粒共生におけるチアミン生合成酵素遺伝子 *Thi1* の解析」　第 56 回日本植物生理学会年会　2015 年 3 月 18 日　東京農業大学

武田洋幸（東京大学）

1. Nakamura, R., Kawanishi, T., Tsukahara, T., Takeda, H. "Epigenetic Regulation of Lifelong Region-specific Expression of *zic1/zic4*, Key Regulators of Vertebrate Body Patterning" CDB symposium 2011 年 3 月 14 日、神戸
2. Nakamura, R., Tsukahara, T., Takeda, H. "Long-term Epigenetic Regulation of Region-specific Expression of zic1/zic4, Key Regulators of Vertebrate Body Patterning" 第 44 回日本発生生物学会大会、2011 年 5 月 18 日、沖縄
3. Tsukahara, T., Nakamura R., Takeda H. "Epigenetic regulation of key developmental genes from embryos to adult organs" 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜
4. Nakamura R, Saito T, Wei Qu, Yoshimura J, Morishita S, Suzuki Y, Hashimoto S, Tsukahara T, Takeda H "Antagonistic relationship between Histone and DNA Methylation in Long-term Regulation of *zic1/zic4*, Key Regulators of Vertebrate Body Patterning"第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、横浜
5. Takeda, H. "Epigenetic regulation of key developmental genes – genome wide approaches in medaka fish"The first bilateral India－Japan Developmental Biology Workshop. 2012.

6. Nakamura, R. Saito, T., Wei Qu, Yoshimura, J., Morishita, S., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Tsukahara, T., Takeda, H. “Antagonistic relationship between Histone and DNA Methylation in Long-term Regulation of *zic1/zic4*, Key Regulators of Vertebrate Body Patterning”Joint Meeting for the British Society of Cell Biology, Developmental Biology and the Japanese Society for Developmental Biologist, 2012 年 4 月 15 日、コヴェントリー
7. Takeda H “Decoding the epigenetic code of key developmental genes in the medaka genome” German-Japanese Colloquium on Cellular Biochemistry Shaping Animals, 2013年1月31日、カールスルーエ
8. Takeda H “Epigenetic regulation of key developmental genes – a genome-wide approach in the medaka genome” CDB symposium, 2013年3月5日、神戸
9. Nakamura R, Saito TL, Qu W, Yoshimura J, Morishita S, Suzuki Y, Hashimoto S, Tsukahara T and Takeda H “Antagonistic relationship between H3K27me3 and DNA methylation in long-term regulation of developmental genes” CDB symposium, 2013年3月4日、神戸
10. Nakamura R, Saito TL, Qu W, Yoshimura J, Morishita S, Suzuki Y, Hashimoto S, Tsukahara T and Takeda H “Antagonistic relationship between H3K27me3 and DNA methylation in the regulation of developmental genes” 第46回日本発生生物学会大会、2013年5月31日、島根
11. Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Otsuka T, Ogoshi K, Saito TL, Matsushima K, Sugano S, Hashimoto S, Suzuki Y, Morishita S, Takeda H, “DNA hypomethylated domain size reflects repression level of developmental genes”, Ketstone symposia (Joint meeting of Transcriptional Regulation and Cancer Epigenetics), 2014 年 2 月 4 日、サンタフェ

龍野一郎（東邦大学）

1. Nakayama A,Yoshida T, Nagano H, Suzuki Y, Sugano S, Tatsuno I, Yokote K, Tanaka T. (2015)　WHSC1 associates with NFATc1 and regulates RANKL-dependent Osteoclast Differentiation. March 5 2015, The Endocrine society's 97th annual meeting & expo,San Diego Convention Center, USA.
2. 吉田知彦、中山哲俊、永野秀和、小出尚史、鈴木穣、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明. RANKL 依存性破骨細胞分化における網羅的遺伝子発現解析と新規 NFATc1 結合候補分子 WHSC1 の役割　第 87 回日本内分泌学会学術総会、2014 年 4 月 24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

田中知明（千葉大学）

1. 田中知明: Novel function of tumor suppressor p53 in cellular senescenceand ES/iPS cells.、日本血管分子生物学会シンポジウム、2011.5、東京
2. 田中知明: 癌抑制遺伝子 p53 の多彩な生理作用と複雑な機能制御メカニズム、大阪大学心不全セミナー、2012.12、大阪
3. 田中知明: 転写因子 p53 の多彩な生理作用とそのクロマチン制御機能、第 1 回がんと代謝シンポジウム、2013.7、東京
4. Suzuki Sawako, Kazuhiro Ikeda, Satoshi Inoue, Suzuki Yutaka, Sugano Sumio, Yokote Koutarou, Tanaka Tomoaki. Mitochondiral GLS2 regulates pluripotency in human ES/iPS cells through the control of glutamine metabolism. 第 73 回日本癌学会学術総会 20140925 (oral presentation)
5. 鈴木佐和子 、池田和博 、井上聡 、田中知明 、横手幸太郎、　ヒト多能性幹細胞における p53 下流遺伝子 GLS2 のミトコンドリア機能制御を介した幹細胞制御機構の解明 第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー
6. Sawako Suzuki, Akitoshi Nakayama, Akina Siga, Tomoko Takiguchi, Ikki Sakuma, Seiichiro Higuchi, Hidekazu Nagano, Naoko Hashimoto, Tomoaki Tanaka, Koutarou Yokote GLS2 regulates mitochondrial function, Its concern in stemness regulation and cancer. 18th International Vascular Biology Meeting 2014 (IVBM 2014) 20140415

田中章景（名古屋大学）

1. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Watanabe H, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno K, Tanaka F, Izumi Y, Morita M, Ogaki K, Taniguchi A, Aiba A, Mizoguchi K, Okamoto K, Hasegawa K, Aoki M, Kawata A, Abe K, Oda M, Konagaya M, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2014.10.18-10.22, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA

多羽田哲也（東京大学）

1. Satoshi Murakami, Maki Minami, Yuko Maeyama, Yutaka Suzuki, Tetsuya Tabata、Transcriptome analysis of olfactory aversive memory in Drosophila mushroom body、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月７－１０日、神戸
2. Satoshi Murakami, Maki Otsubo, Katsuhiko Shirahige, Yutaka Suzuki, Tetsuya Tabata、Olfactory memory mutant analysis based on RNA-seq analysis of the Drosophila mushroom body、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月１３－１６日、横浜

田村智彦（横浜市立大学）

1. 黒滝大翼, 大里直樹, 西山 晃, 山本道雄, 田村智彦 : 単球分化に必須の IRF8-KLF4 転写因子カスケードの発見. 第 10 回麒麟塾, 2014.7.12, 東京
2. 黒滝大翼, 山本道雄, 西山晃, 宇野和宏, 藩龍馬, 市野素英, 佐々木悠, 松永智子, 吉成正裕, 梁明秀, 中澤正年, Keiko Ozato, 田村智彦 : 転写因子 IRF8 による C/EBPa の機能阻害が単核貪食細胞前駆細胞において好中球分化能の喪失をもたらす. 第 19 回造血器腫瘍研究会, 2015.1.23, 佐賀
3. Kurotaki D, Yamamoto M, Nishiyama A, Uno K, Ban T, Ichino M, Sasaki H, Matsunaga S, Yoshinari M, Ryo A, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T: IRF8 inhibits the activity of C/EBPa to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. 45th Annual Scientific Meeting of International Society for Experimental Hematology, 2015.9.17, 京都
4. Kurotaki D, Nakabayashi J, Nishiyama A, Sasaki H, Kaneko N, Koizumi S, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T: Enhancer landscape dynamics during monocyte and dendritic cell development and the role of the transcription factor IRF8. 45th Annual Scientific Meeting of International Society for Experimental Hematology, 2015.9.17, 京都
5. 黒滝大翼, 中林潤, 西山晃, 佐々木悠, 金子尚史, 小泉真一, Keiko Ozato, 鈴木穣, 田村智彦 : 単球-樹状細胞系譜分化におけるエンハンサーランドスケープの解読. 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015.10.18, 金沢
6. Kurotaki D, Nakabayashi J, Nishiyama A, Sasaki H, Kaneko N, Koizumi S, Ozato K, Tamura T: Transcription factor IRF8 governs the enhancer landscape dynamics in mononuclear phagocyte development. 第 44 回日本免疫学会学術集会, 2015.11.19, 札幌
7. Kurotaki D, Nakabayashi J, Nishiyama A, Sasaki H, Kaneko N, Koizumi S, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T: Transcription factor IRF8 governs the enhancer landscape dynamics during monocyte and dendritic cell development. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2015.12.2, 神戸
8. Kurotaki D, Nakabayashi J, Nishiyama A, Sasaki H, Kaneko N, Koizumi S, Ozato K, Suzuki Y, Tamura T: Enhancer landscape dynamics and the role of IRF8 in mononuclear phagocyte development. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2015.12.6, Orlando

千葉和義（お茶の水女子大学）

1. 越智洋絵、原昌稔、立花和則、青砥早希、千葉和義　ヒトデ卵母細胞の減数分裂進行時における mRNA ポリ A 鎖伸長調節　日本動物学会　第 85 回大会　2015 年 9 月 11 日　東北大学

2. 越智洋絵、千葉和義　ヒトデ卵減数分裂進行時における cyclinB mRNA のオリゴウリジレーションとポリ A 鎖伸長　日本動物学会　第 86 回大会　2015 年 9 月 19 日　新潟コンベンションセンター　朱鷺メッセ
3. Kazuyoshi Chiba　Ability of paternal asters to form meiotic spindle during oocyte maturation in starfish　Oocyte maturation and fertilization meeting IV　２０１５年６月１７日　東北大学附属浅虫海洋生物学教育研究センター
4. Hiroe Ochi and Kazuyoshi Chiba　Removal of 3' terminal oligo(U) tail followed by poly(A) elongation of cyclin B mRNA in starfish oocytes resuming meiosis　Oocyte maturation and fertilization meeting IV　２０１５年６月１７日　東北大学附属浅虫海洋生物学教育研究センター
5. Saya Iwanaga, Hiroe Ochi and Kazuyoshi Chiba　Analyzing uridylation at 3’ end of mRNA in immature oocytes of starfish using next-generation sequencer　Oocyte maturation and fertilization meeting IV　２０１５年６月１７日　東北大学附属浅虫海洋生物学教育研究センター

千葉親文（筑波大学）

1. 千葉親文、中村研太、Roman M. Casco-Robles、外傷性疾患の治療と自己再生誘導の寄与する新奇イモリ遺伝子の探索：網膜と肢を例に、第 119 回日本解剖学会総会・シンポジウム・次々世代の再生医学研究－再生可能動物に学ぶ－、2014 年 3 月 27 日、自治医科大学（栃木県下野市）招待講演
2. 安室博文、千葉親文、成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期進入における上皮間葉移行の関与、第 84 回日本動物学会、2013 年 9 月 28 日、岡山大学（岡山県岡山市）
3. 竹島一仁、平野高大、越智陽城、星島一幸、高山－渡辺絵里子、渡辺明彦、外山史、千葉親文、CRISPR-Cas9 を用いたアカハライモリ・チロシナーゼ遺伝子欠失個体の作製、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
4. Chiba, C., Toyama, T., Maruo, F., Islam, M.R., Casco-Robles, M.M. and Casco-Robles, R.M. Can we learn the cause of differences in regeneration-competency from the newt? International Workshop on Developmental and Regenerative Biology in Yamagata. 2014 年 9 月 10 日、山形大学（山形県山形市）招待講演
5. 千葉親文、外山史、丸尾文昭、Islam, M.R., Casco-Robles, M.M. and Casco-Robles, R.M.、私たちは再生できる・できないの原因をイモリから学ぶことができるか？第 85 回日本動物学会・シンポジウム・ゲノム情報と胚誘導・形態形成研究のクロストーク、2014 年 9 月 12 日、東北大学（宮城県仙台市）招待講演
6. Casco-Robles, M.M., Miur, T. and Chiba, C.、再生イモリの網膜色素上皮層における導入遺伝子発現、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学（宮城県仙台市）
7. 三浦智也、Casco-Robles, M.M.、千葉親文、イモリのトランスジェニック効率に対するニワトリ beta-globin インスレーターの効果、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学（宮城県仙台市）
8. 安室博文、千葉親文、成体イモリ網膜色素上皮細胞の細胞周期進入における上皮間葉移行の関与、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学（宮城県仙台市）
9. Casco-Robles, R.M., Chiba, C. and Toyama, F. Cloning of unique regeneration-specific genes in the newt. 第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学（宮城県仙台市）
10. 田中響、ナツサーニオン、Casco-Robles, M.M.、三浦智也、千葉親文、イモリ肢の再生に関わる細胞種、第 85 回日本動物学会、2014 年 9 月 11 日、東北大学（宮城県仙台市）
11. Chiba, C., Islam, M.R., Kunahong, A., Casco-Robles, M.M., Nakamura K., Inami, W. and Toyama, F. Adult newt RPE cells are reprogrammed into a unique state of multipotent cells to regenerate missing neural retina. XXI Biennial Meeting of the International Society for Eye Research. 2014 年 7 月 22、San Francisco, USA.
12. 長谷川俊、大谷優樹、木下勉：アカハライモリの個体発生における POU ファミリーク

ラス V 転写因子の発現プロファイルの解析、日本発生生物学会第 47 回大会、2014 年 5 月 27～30 日、WINE AICHI（愛知県名古屋市）

13. 長谷川俊､木下勉､心臓の形成および再生における Pou5f1 と Pou5f3 の発現の比較解析、日本分子生物学会第 38 回大会、2015 年 12 月 1～4 日、神戸ポートアイランド（神戸ポートピアホテル　神戸国際会議場　神戸国際展示場　神戸商工会議所）（兵庫県神戸市）
14. 半沢汐里、千葉親文、外山史、成体イモリの網膜再生過程における RPE 細胞のリプログラミング：シングルセルトランスクリプトーム解析、第 86 回日本動物学会、2015 年 9 月 17 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）
15. 長谷川俊、木下勉：アカハライモリにおける CpPou5F3 の同定と遺伝子発現の解析, 第 86 回日本動物学会、2015 年 9 月 17 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）
16. 中尾一石、高野美玖、木下勉：アカハライモリの四肢形成における骨形成と遺伝子発現について, 第 86 回日本動物学会、2015 年 9 月 17 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）
17. 千葉親文、成体イモリの網膜再生－ナチュラルリプログラミングの single cell 解析、第 1 回次世代両生類研究会、2015 年 8 月 24 日、岡崎カンファレンスセンター（愛知県岡崎市）　招待講演
18. 千葉親文、私たちはイモリのように再生できるのか？－アカハライモリに学ぶ体組織再生の戦略－、第 5 回細胞再生医療研究会、2015 年 7 月 26 日、臨床研究情報センター（兵庫県神戸市）　招待講演
19. 千葉親文、動物が魅せるナチュラルな体細胞リプログラミングと網膜再生、第 221 回つくばブレインサイエンス・セミナー、2015 年 7 月 21 日、筑波大学（茨城県つくば市）招待講演

塚原達也（東京大学）

1. Nakamura R, Tsukahara T, Takeda H “Antagonistic relationship between histone and DNA methylation in long-term regulation of zic1/zic4, key regulators of vertebrate body patterning” BSDB/BSCB/JSDB Joint Meeting, 2012
2. Takeda H “Decoding the epigenetic code of key developmental genes in the medaka genome” German-Japanese Colloquium on Cellular Biochemistry Shaping Animals, 2013
3. Takeda H “Epigenetic regulation of key developmental genes – a genome-wide approach in the medaka genome” CDB symposium, 2013
4. Nakamura R, Saito TL, Qu W, Yoshimura J, Morishita S, Suzuki Y, Hashimoto S, Tsukahara T and Takeda H “Antagonistic relationship between H3K27me3 and DNA methylation in long-term regulation of developmental genes” CDB symposium, 2013
5. Nakamura R, Saito TL, Qu W, Yoshimura J, Morishita S, Suzuki Y, Hashimoto S, Tsukahara T and Takeda H “Antagonistic relationship between H3K27me3 and DNA methylation in the regulation of developmental genes” 第46回日本発生生物学会大会、2013
6. Nakamura R, Tsukahara T, Takeda H, “The size of DNA hypomethylated domain reflects repression levels of developmental genes”, 第36回分子生物学会年会, 2013
7. Nakamura R, Tsukahara T, Qu W, Otsuka T, Ogoshi K, Saito TL, Matsushima K, Sugano S, Hashimoto S, Suzuki Y, Morishita S, Takeda H, “DNA hypomethylated domain size reflects repression level of developmental genes”, Ketstone symposia (Joint meeting of Transcriptional Regulation and Cancer Epigenetics), 2014

築山 拓司（京都大学）

1. 築山拓司、活性型トランスポゾンを利用した新しい育種法の開発、日本育種学会第 126 回講演会ワークショップ「トランスポゾンによる変異創成とその育種への利用」、2014 年 9 月 26 日、南九州大学

辻省次（東京大学）

1. 石浦浩之、小久保康昌、三井純、福田陽子、日笠幸一郎、吉村淳、斉藤太郎、森下真一、豊田敦、原賢寿、西澤正豊、葛原茂樹、後藤順、辻省次. 紀伊筋萎縮性側索硬化症・パーキンソニズム認知症複合（ALS/PDC）の全ゲノム配列解析による疾患遺伝子の探索. 日本神経学会学術大会，2012 年 5 月 25 日，東京
2. Hiroyuki Ishiura, Yoko Fukuda, Budrul Ahsan, Jun Mitsui, Yasumasa Kokubo, Shigeki Kuzuhara, Sohei Yoshida, Tameko Kihira, Jun Yoshimura, Koichiro Doi, Koichiro Higasa, Shinichi Morishita, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Ryozo Kuwano, Kenju Hara, Masatoyo Nishizawa, Jun Goto, Shoji Tsuji. A molecular genetic study of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex (ALS/PDC) in Kii peninsula of Japan. Annual meeting of American Society of Human Genetics. Oct 2013, Boston

津田雅孝（東北大学）

1. 津田雅孝, 加藤広海, 大坪嘉行, 永田裕二: 土壌汚染に対する微生物遺伝子プールの変動解析. 環境バイオテクノロジー学会 2010 年度大会. 2010 年 6 月 21-22 日. 仙台
2. H. Kato, H. Mori, A. Toyoda, Y. Ohtsubo, F. Maruyama, G. Fuchu, R. Endo, A. Dozono, M. Miyakoshi, Y. Nagata, A. Fujiyama, K. Kurokawa, M. Tsuda: Fluctuation of gene pools of soil microbiota induced by contamination with aromatic hydrocarbons. 13th International Society for Microbial Ecology Conference. Aug. 22-27, 2010. Seattle, USA.
3. M. Tsuda: Response of soil microbiota to exposure to aromatic pollutants. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 6-10, 2011. Sapporo, Japan. (招待講演)
4. H. Kato, H. Mori, A. Toyoda, Y. Ohtsubo, F. Maruyama, G. Fuchu, R. Endo, A. Dozono, M. Miyakoshi, Y. Nagata, A. Fujiyama, K. Kurokawa, M. Tsuda: Fluctuation pattern of gene pools of microbiota in aromatic hydrocarbon-contaminated soil by sequential metagenomic analysis. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 6-10, 2011. Sapporo, Japan
5. 津田雅孝: 環境変動に対する土壌微生物集団応答様式のメタゲノム的解析. 日本遺伝学会第 83 回大会. 2011 年 9 月 20-22 日. 京都
6. 津田雅孝: 環境汚染物質添加土壌での微生物集団の経時的メタゲノム解析. 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会. 2012 年 3 月 10-12 日. 東京
7. 津田雅孝: Response of soil microbial community after exposure to aromatic pollutants.「環境保全と健常生活のための先端バイオテクノロジーの統合的研究」第３回公開シンポジウム. 2012 年 3 月 13 日. 多賀城
8. M. Tsuda: Metagenomic analysis of microbial community in soil contaminated with aromatic pollutants. 6th Japan-Finland Biotechnology Symposium. June 4−8, 2012. Sendai, Japan (招待講演)
9. H. Kato, H. Mori, F. Maruyama, A. Toyoda, Y. Ohtsubo, G. Fuchu, R. Endo, A. Dozono, M. Miyakoshi, Y. Nagata, A. Fujiyama, K. Kurokawa, M. Tsuda: Response of soil microbial community against pulse perturbation by aromatic pollutants. 14th International Symposium on Microbial Ecology. Aug. 19-24, 2012. Copenhagen, Denmark.
10. H. Nagayama, R. Endo, H. Kato, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, M. Tsuda: Isolation of aromatic ring-hydroxylating oxygenase genes by cultivation-independent functional screening of metagenome from soil artificially contaminated with aromatic hydrocarbons. 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS 2012). Sep. 16-21, 2012. Daegu, Korea.
11. M. Tsuda, K. Kurokawa: Time series metagenomic analysis of soil microbial community. International Symposium on Genome Science - "Expanding Frontiers of Genome Science". Jan. 9-10, 2013. Tokyo (招待講演)
12. 津田雅孝: 環境メタゲノム解析における微生物種. 日本農芸化学会2013年大会. 2013年3月24-27日. 仙台

13. H. Nagayama, T. Sugawara, R. Endo, H. Kato, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, H. Mori, K. Kurokawa, M. Tsuda: Isolation of phenol-catabolic genes by cultivation-independent functional screening from metagenome of soil artificially polluted by aromatic hydrocarbons. 2nd Thünen Symposium on Soil Metagenomics: mining and learning from metagenomes plus workshop on bioinformatic tools for soil microbiologists. Dec. 11-13, 2013. Braunschweig, Germany.
14. H. Mori, F. Maruyama, H. Kato, A. Toyoda, A. Dozono, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, A. Fujiyama, M. Tsuda, K. Kurokawa: Design and experimental validation of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes. 2nd Thünen Symposium on Soil Metagenomics: mining and learning from metagenomes plus workshop on bioinformatic tools for soil microbiologists. Dec. 11-13, 2013. Braunschweig, Germany.
15. M. Tsuda, H. Kato, H. Mori, F. Maruyama, A. Toyoda, Y. Ogura, T. Hayashi, A. Fujiyama, K. Kurokawa: Transplantation of soil microbiota: establishment process of microbial community in sterilized soil. International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II" "Expanding Frontiers of Genome Science II" January 20-21, 2015. Tokyo
16. M. Tsuda: Response of microbial community to chemical pollutants. International Symposium of Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi University, March 9, 2015. Yamaguchi, Japan. (招待講演)
17. 大坪嘉行, 加藤広海, 永田裕二, 津田雅孝: 土壌細菌叢変動とレジームシフト. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23-25 日, 大阪
18. 加藤広海, 森宙史, 永山浩史, 大坪嘉行, 永田裕二, 黒川顕, 津田雅孝: 土壌微生物のノトバイオロジー. 日本*農芸化学会 2016* 年度大会. *2016* 年 3 月 27-30 日, 札幌

筒井 研（岡山大学）

1. Tsutsui, K.M., Miyaji, M., Furuta, R., Kawano, S., Tsutsui, K.: Transcriptional Induction of Neuronal Genes by Targeted Action of DNA Topoisomerase II□. Advances in DNA Topoisomerase and Chromosome Dynamics. Academia Sinica, Taipei, Taiwan, 10/12-16, 2011
2. Tsutsui, K.M., Sano, K., Miyaji, M., Hosoya, O., Furuta, R., Tsutsui, K.; Regulatory roles of DNA topoisomerase II□ in the developing cerebellar neurons. Fourth International Congress of the Society for Research on the Cerebellum. Tokyo, Japan, 9/18, 2011
3. 古田良平、宮地まり、佐野訓明、桑野良三、筒井公子、筒井　研：DNA トポイソメラーゼ IIβ による遠隔ゲノム部位間の相互作用　第 34 回日本分子生物学会年会　横浜　2011 年 12 月 13-16 日
4. 古田良平、宮地まり、筒井公子、筒井　研：トポイソメラーゼ IIβ は離れたゲノム部位の間ではたらくか 第 10 回細胞核ダイナミクス研究会　北広島、北海道　2011 年 10 月 26-28 日
5. Tsutsui, K.M., Miyaji, M., Sano, K., Furuta, R., Tsutsui, K.; Induced Expression of Neuronal Genes in Terminal Differentiation: Essential Roles of DNA Topoisomerase IIbeta. BIT's 3rd Annual World Congress of NeuroTalk-2012. Beijing International Convention Center, Beijing, China 5/18-20, 2012
6. Furuta, R., Miyaji, M., Sano, K., Tsutsui, K.M., Tsutsui, K.; DNA Topoisomerase IIbeta Mediates Distal Genomic Interactions in Terminal differentiation of Neurons. BIT's 3rd Annual World Congress of NeuroTalk-2012. Beijing International Convention Center, Beijing, China 5/18-20, 2012
7. 古田良平、宮地まり、佐野訓明、筒井公子、筒井　研；DNA トポイソメラーゼ IIβ による遠隔ゲノム部位間の相互作用と遺伝子発現制御　第 35 回日本分子生物学会年会　福岡　2012 年 12 月 11-14 日
8. 古田良平、宮地まり、佐野訓明、筒井公子、筒井　研：II 型トポイソメラーゼによる遠隔ゲノム部位間の相互作用。第 30 回染色体ワークショップ・第 11 回細胞核ダイナミクス研究会　淡路島　2012 年 12 月 19-21 日
9. 宮地まり，古田良平，佐野訓明、細谷　修、筒井公子，筒井　研；II 型トポイソメラーゼによる核内構造変化と遺伝子発現制御。第 30 回染色体ワークショップ・第 11 回細胞

核ダイナミクス研究会　淡路島　2012 年 12 月 19-21 日
10. 筒井　研 ; DNA 高次構造と遺伝子発現制御　バイオメディカル研究部門セミナー　筑波 2012 年 12 月 26 日
11. 筒井　研 : II 型 DNA トポイソメラーゼの核内動態と遺伝子制御　(シンポジウム : 細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能)　第 86 回日本生化学会大会　横浜　2013 年 9 月 11-13 日
12. 古田良平、宮地まり、佐野訓明、細谷　修、筒井公子、筒井　研 : DNA トポイソメラーゼ IIβ による遺伝子制御と核構造　第 36 回日本分子生物学会　神戸　2013 年 12 月 3-6 日
13. 宮地まり、佐野訓明、古田良平、細谷　修、筒井公子、筒井　研 : II 型 DNA トポイソメラーゼによる神経特異的遺伝子の発現制御機構　第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回細胞核ダイナミクス研究会　箱根　2013 年 11 月 25- 27 日
14. 古田良平、宮地まり、細谷　修、佐野訓明、筒井公子、筒井　研 : DNA トポイソメラーゼ IIβ による核内構造変化と遺伝子発現調節.　第 37 回日本分子生物学会年会　横浜 (2014)
15. 古田良平、宮地まり、佐野訓明、細谷　修、姜　志妗、舘野　賢、筒井公子、筒井　研 : DNA トポイソメラーゼ IIβ は遺伝子間領域に作用し遠隔ゲノム部位間の相互作用を媒介する　第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会　合同大会　神戸 12/2-4、(2015)
16. 宮地まり、細谷　修、古田良平、佐野訓明、筒井公子、筒井　研 : hnRNPU/SAF-A/SP120 と DNA トポイソメラーゼ IIβ 複合体による神経細胞核のグローバルなクロマチン構造変換　第 38 回　日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会　合同大会　神戸 12/2-4、(2015)
17. 宮地まり、古田良平、細谷　修、佐野訓明、姜　志妗、舘野　賢、筒井公子、筒井　研 : 神経細胞終末分化過程での DNA トポイソメラーゼ IIβ によるグローバルなクロマチン構造変換を介した遺伝子発現制御機構　第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回細胞核ダイナミクス研究会　松島　1/12-14 (2016)

程久美子（東京大学）

1. Soh Ishiguro, Josephine Galipon, Rintaro Ishii, Yutaka Suzuki, Shinji Kondo, Mariko Okada-Hatakeyama, Masaru Tomita, Kumiko Ui-Tei. Genome-wide identification of A-to-I editing in human miRNA by ADAR isoform-specific RIP-sequencing. BMB2015 (2015.12.1) 神戸ポートアイランド
2. 村上 文則、高橋 朋子、程 久美子、RNA サイレンシングに関わる二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP が結合する microRNA の網羅的解析、新学術領域研究『ゲノム支援』2015 年度拡大班会議 （2015.8.27）国立京都国際会館 アネックスホール
3. Josephine Galipon, Soh Ishiguro, Rintaro Ishii, Hideaki Kume, Kimihiro Hino, Yutaka Suzuki, Shinji Kondo, Mariko Okada-Hatakeyama, Masaru Tomita, Kumiko Ui-Tei. A-to-I RNA editing fine-tunes miRNA function in human cells. 2nd Symposium on Complex Biodynamics & Networks (Bio 2015) （2015.5.11-13）慶應義塾大学鶴岡メタボロームキャンパス（山形）
4. Kumiko Ui-Tei, Fuminori Murakami, Tomoko Takahashi. Global identification of the interacting RNAs with dual functional RNA binding protein TRBP by next-generation sequencing. International Symposium on Genome Science 2015"Expanding Frontiers of Genome ScienceⅡ"（2015.1.20）一ツ橋ホール
5. 村上 文則、高橋 朋子、程 久美子、「二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP と相互作用する RNA の網羅的解析」, 第 37 回日本分子生物学会年会（2014.11.26）パシフィコ横浜
6. Soh Ishiguro, Josephine Galipon, Rintaro Ishii, Yutaka Suzuki, Shinji Kondo, Mariko Okada-Hatakeyama, Masaru Tomita, Kumiko Ui-Tei. "Validation of A-to-I RNA editing sites

identified by RIP-seq in human miRNAs" 第 37 回日本分子生物学会年会（2014.11.26）パシフィコ横浜

7. 石黒 宗、Galipon Josephine、石井 倫太郎、鈴木 穣、近藤 仲二、岡田 眞里子、富田 勝、程 久美子、ヒトの ADAR アイソフォームによる A-to-I miRNA 編集の検出とその発現解析、第 6 回 生命情報科学若手の会（2014.10.29-30）理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター(CDB) 研究棟Ｃ棟 1 階
8. Josephine Galipon, Rintaro Ishii, Soh Ishiguro, Yutaka Suzuki, Shinji Kondo, Mariko Okada-Hatakeyama, Masaru Tomita, Kumiko Ui-Tei. Distinct patterns of A-to-I editings on miRNAs due to different ADAR isoforms. 新学術領域「ゲノム支援」2014 年度 拡大班会議 （2014.8.20－21）神戸ポートピアホテル
9. Josephine Galipon, Rintaro Ishii, Soh Ishiguro1, Yutaka Suzuki, Shinji Kondo, Mariko Okada-Hatakeyama, Masaru Tomita, Kumiko Ui-Tei. Specificity of miRNA A-to-I editing by different human ADAR isoforms.
第 16 回日本 RNA 学会年会 （2014.7.23） ウインクあいち
10. Josephine Galipon, Rintaro Ishii, Yutaka Suzuki, Shinji Kondo, Mariko Okada-Hatakeyama, Kumiko Ui-Tei. A-to-I editing of miRNAs by human ADAR isoforms. 第 4 回理研ゲノム科学総合研究組織(GSC)七夕ミーティング （2014.7.11） 理化学研究所 横浜事業所交流棟ホール

豊嶋崇徳（北海道大学）

1. Teshima T. Protection of the Tissue Stem cell and Niche System as a Novel Approach to Control GVHD, ***2nd Australia-Japan Haematology Consortium***, Sep 11-12th 2015, Brisbane, Australia.
2. Hayase E, Hashimoto D, Nakamura K, Ogura Y, Hayashi T, Kurokawa K, Ayabe T, and Teshima T. R-Spondin1 promotes Paneth cell growth, maintains intestinal microbial ecology, and ameliorates graft-versus-host disease, ***57th ASH Annual Meeting***, Dec 6th 2015, Orlando, FL, USA.
3. Teshima T. Emerging concepts on tissue injury in GVHD. ***BMT Tandem Meeting 2016***, Feb 18th 2016, Honolulu, HI, USA. (発表予定)

藤堂 剛（大阪大学）

1. Takeshi Todo : Radiation-induced genomic instability in Medaka fish、Program of the Sugahara Memorial International Symposium on “Prospective Topics and Charm of Radiation Biology” Radiation biology is an important key to solve biological system, 25th January 2012, Kyoto
2. 藤原（石川）智子、藤堂　剛：メダカ TILLING ライブラリーにおける変異体の網羅的スクリーニング、日本放射線影響学会第 55 回大会、9 月 7 日、2012 年、仙台
3. Tomoko Ishikawa-Fujiawara, Takeshi Todo: High throughput screening of induced mutations in Medaka TILLING library by Next Generation Sequencer、18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 22nd September 2012, Kyoto
4. Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo：Targeted Inactivation of Rev1 gene、The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology、2013.11.11, Sydney Australia
5. Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo：Targeted Inactivation of DNA photolyase family genes using CRISPR system, The 6th Asia and Oceania Conference on Photobiology、2013.11.11, Sydney Australia

徳元俊伸（静岡大学）

1. 徳元 俊伸、穐山雄一、栄　雄太；ゼブラフィッシュの新規産卵誘発法を用いた排卵誘導遺伝子群の同定；日本動物学会；2014 年 9 月 10-13 日；仙台

2. Toshinobu Tokumoto ; ***In vivo*** **induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish; an ideal model to distinguish between genomic and nongenomic actions of steroids** ; Workshop in Ramkhamhaeng University ; Oct 27,2014 ; Bangkok, Thailand
3. 徳元 俊伸、ワンラダ クラングヌラック ; ゼブラフィッシュの新規産卵誘発法を用いた排卵誘導遺伝子群の選択 ; 日本動物学会 ; 2015 年 9 月 17-19 日 ; 新潟
4. Toshinobu Tokumoto ; **ESTABLISHMENT OF PROCEDURES FOR mPR INTERACTING AGENTS AND STUDY ON PHYSIOLOGICAL ROLES OF mPR** ; 9th Rapid Responses to Steroid Hormones ; 7-10 Jun, 2015 Taipei TAIWAN

戸田達史（神戸大学）

1. 小林千浩、千代延友裕、森本昌史、戸田達史　精神遅滞 2 家系のエクソーム解析　日本人類遺伝学会第 60 回大会　2015 年 10 月 16 日　東京・新宿

殿城亜矢子（千葉大学）

1. 殿城亜矢子、干智華、高橋弘喜、伊藤素行、長期記憶依存的トランスクリプトーム解析と加齢による変化、ゲノム支援拡大班会議、2015 年 8 月 28 日、京都

中川拓郎（大阪大学）

1. 中川拓郎「セントロメア再編の分子メカニズム」新学術領域研究「ゲノムを支える非コード DNA 領域の機能」第 9 回領域会議（2015 年 8 月 5 日）兵庫県淡路夢舞台
2. 中川拓郎「セントロメアで起きる染色体再編の分子メカニズム」新学術領域研究「ゲノム支援」2015 年度拡大班会議（2015 年 8 月 27-28 日）国立京都国際会館
3. 豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「分裂酵母セントロメアで起こる染色体再編の分子メカニズム」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会（2015 年 12 月 1-4 日）神戸ポートピア
4. 沖慶太郎、豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎「セントロメア領域での染色体再編に必要な新規因子の同定」第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会（2015 年 12 月 1-4 日）神戸ポートピア

中永和枝（国立感染症研究所）

1. 中永和枝、星野仁彦、石井則久：本邦の"*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*"を起因菌とするブルーリ潰瘍症例の増加．第87回日本結核病学会総会　2012年　5月10-11日　広島
2. Yotsu R R, Nakanaga K, Hoshino Y, Suzuki K, Ishii N: Buruli Ulcer in Japan: the current situation. WHO Meeting on Buruli ulcer Control and Research 25–27 March 2013, Geneva, Switzerland
3. Nakanaga K, Yotsu R R, Hoshino Y, Ishii N: Laboratory Examination of Buruli Ulcer in Japan 2010-2012.　WHO Meeting on Buruli ulcer Control and Research, 25–27 March 2013, Geneva, Switzerland
4. Takatsuka Y, Murata S, Komine M, Maki N, Maekawa T, Nozaki M, Nakanaga K, Ishii N, Ohtsuki M: A case of Buruli ulcer in Tochigi prefecture, the temperate climate area of Japan. 9th Asian Dermatological Congress, 10-13 July 2013. Hong Kong
5. Yotsu R R, Nakanaga K, Hoshino Y, Suzuki K, Ishii N: Epidemiology and Clinical Characteristics of Buruli ulcer in Japan.　International Leprosy congress, 16-19 September 2013. Brussels, Belgium
6. Yotsu R R, Murase C, Sugawara M, Suzuki K, Nakanaga K, Ishii N: Buruli ulcer in Japan: update　WHO Meeting on Buruli ulcer 23–25 March 2015, Geneva, Switzerland

長宗秀明（徳島大学）

1. 野上明日香, 田端厚之, 竹田望, 高尾亞由子, 大國寿士, 前田伸子, 友安俊文, 長宗秀明：β 溶血性の高病原性 *Streptococcus mitis* サブグループの特性, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18 日～20 日, 千葉
2. 竹田望, 田端厚之, 野上明日香, 高尾亞由子, 大國寿士, 前田伸子, 友安俊文, 長宗秀明:N 末に追加ドメインを有するコレステロール依存性細胞溶解毒素の作用特性, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 13 日, 横浜
3. 村上漱, 田端厚之, 高尾亞由子, 友安俊文, 大國寿士, 長宗秀明：高病原性 *Streptococcus mitis* 検出・同定システムの構築, 第 66 回日本細菌学会 中国・四国支部総会, 2013 年 10 月 12 日, 広島
4. 村上漱, 田端厚之, 高尾亞由子, 大國寿士, 友安俊文, 長宗秀明：高病原性 *Streptococcus mitis* の検出・同定を目的とした新規検査システムの開発, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 28 日, 東京
5. 田端厚之, 竹田望, 高尾亞由子, 友安俊文, 前田伸子, 大國寿士, 長宗秀明：コレステロール依存性細胞溶解毒素の膜孔形成活性に及ぼす糖の影響, 第 55 回日本生化学会 中国四国支部例会, 2014 年 6 月 6 日, 松山
6. 森下淳, 田端厚之, 村上漱, 高尾亞由子, 勝部康弘, 大國寿士, 友安俊文, 前田伸子, 長宗秀明：*Streptococcus mitis* における膜孔形成毒素遺伝子の保有と β-ラクタム薬耐性の関連性, 第 67 回日本細菌学会 中国・四国支部総会, 2014 年 10 月 4 日, 徳島
7. 玉岡雅章, 竹田望, 田端厚之, 大倉一人, 友安俊文, 大國寿士, 長宗秀明：コレステロール依存性細胞溶解毒素の膜孔形成活性に対する糖の抑制効果, 第 87 回日本生化学会大会, 2014 年 10 月 18 日, 京都
8. Hideaki Nagamune, Atsushi Tabata, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi: Diversity in genome structure showing the genomic dynamism of human-derived *Streptococcus mitis*, International Symposium on Genome Science 2015 “Expanding Frontiers of Genome Science II”, 2015 年 1 月 20 日, 東京
9. 森下惇, 田端厚之, 村上漱, 高尾亞由子, 大國寿士, 小椋義俊, 林哲也, 友安俊文, 前田伸子, 長宗秀明:*S. mitis* におけるコレステロール依存性細胞溶解毒素遺伝子の分布と β-ラクタム系薬剤耐性の関連性, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 28 日, 岐阜

中山浩次（長崎大学）

1. 内藤真理子,庄子幹郎, 佐藤啓子, 雪竹英治,中山浩次：*Prevotella intermedia* における Por 分泌機構の変異株作成, 第 64 回日本細菌学会九州支部総会・第 48 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2011 年 8 月 26-27 日, 北九州
2. Mariko Naito: Site-directed mutagenesis in *Prevotella intermedia*: genetic analysis of *P. intermedia* Por secretion system. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species, 2012 年 8 月 27-28 日, 長崎
3. 内藤真理子, 小椋義俊, 岡本公彰, 林哲也, 中山浩次：歯周病原菌 *Prevotella intermedia* 臨床分離株 OMA14 の全ゲノム配列決定, 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18-20 日,千葉
4. 内藤真理子, 中山浩次：*Prevotella intermedia* における遺伝子特異的変異株作成, 平成 25 年度 第 45 回 九州微生物研究会総会, 2013 年 12 月 6 日,福岡
5. 内藤真理子, 庄子幹郎,成田由香,中山浩次： *Prevotella intermedia* における病原遺伝子特異的変異株作成, 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26-28 日,東京
6. 内藤真理子, 小椋義俊, 林哲也, 中山浩次：歯周病原菌 *Prevotella intermedia* 臨床分離株 OMA14 の全ゲノム配列決定, 第 8 回日本ゲノム微生物学会, 2014 年 3 月 7-8 日,東京

中山二郎（九州大学）

1. Nakayama J. “Digging into our gut microbial community by NGS” The 2nd Asian Fermented Foods: Probiotic: the potential ingredients for health products. August 27, 2015, Bangkok, Thailand.
2. Nakayama J. “What is microbiota, microbiome and their analysis ?” The 8th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. July 8, 2015, Bangkok, Thailand.
3. 中山二郎 「アジア人の食と腸内細菌と健康に関するマルチコホート研究」第 19 回腸内細菌学会シンポジウム．2015 年 6 月 18 日，北里大学薬学部（東京）.
4. Nakayama J, Lee YK. (2015) “Asian Microbiome Project: Diversity in gut microbiota of Asian People” 4th Beneficial Microbes Conference. March 18, 2015, Hague, Netherlands.
5. 中山二郎、東佳那子、山本麻寿紗、本田倫子、百田理恵、園元謙二、Yuan Kun Lee (2015) 「Asian Microbiome Project: アジア人の腸内細菌叢に関する横断型コホート研究」第 88 回日本細菌学会総会．2015 年 3 月 26 日，長良川国際会議場（岐阜）.
6. 中山二郎、東佳那子、山本麻寿紗、百田理恵、本田倫子、渡辺幸一、リーユアンカン(2015) 「Asian Microbiome Project: アジア人の食と腸内フローラと健康に関する横断型コホート研究」日本農芸化学会 2015 年度大会シンポジウム．2015 年 3 月 29 日，岡山大学津島キャンパス（岡山）.

成田一衛（新潟大学）

1. 第 55 回日本腎臓学会学術総会、総会長主導企画「次世代ライフサイエンス技術が腎臓病研究・医療に与えるインパクト」次世代シーケンサーを用いた腎臓病研究：家族性 IgA 腎症のエクソーム解析、後藤　眞、横浜市、2012 年 6 月 1 日
2. 第 56 回日本腎臓学会総会、総会長主導企画「IgA 腎症：病因論」: IgA 腎症感受性の責任遺伝子、成田一衛、東京都、2013 年 5 月 11 日
3. 第 56 回日本腎臓学会総会、ワークショップ　「次世代シークエンサーが開く新しい腎臓基礎研究の展開」家族内集積を示す腎疾患のエクソーム解析、後藤　眞、東京都、2013 年 5 月 11 日
4. 公開シンポジウム「次世代ゲノム科学の最前線」　平成 26 年 1 月 21 日 Gene と腎、成田一衛
5. 第 37 回 IgA 腎症研究会　平成 26 年 1 月 25 日 家族性 IgA 腎症の感受性遺伝子の同定 後藤 眞、細道一善、塚口裕康、渡辺博文、福田顕弘、藤元昭一、井ノ上逸朗、成田一衛
6. The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014 in TokyoSymposium : IgA nephropathy (May 14, 2014): Whole exome sequencing analysis of Japanese familial IgA nephropathy. Shin Goto
7. 第 5 回日本腎臓学会学術総会　名古屋市　平成 27 年 6 月 7 日 エクソーム解析と連鎖解析による IgA 腎症関連遺伝子変異の検出　後藤眞、塚口裕康、渡辺博文、土田雅文、福田顕弘、藤本昭一、成田一衛
8. KidneyWeek 2015, American Society of Nephrology, San Diego, 2015, Nov. 5 、 Comprehensive microbiome analysis of tonsillar crypts in IgA nephropathy.　Hirofumi Watanabe, Shin Goto, Masafumi Tsuchida, Ichiei Narita.
9. IgA 腎症の口蓋扁桃陰窩のマイクロバイオーム解析、第 38 回 IgA 腎症研究会、2015 年 1 月 24 日、東京、渡辺博文, 後藤眞, 土田雅史, 森宙史, 東光一,近藤大介, 山崎肇, 青柳竜治, 高田琢磨, 細道一善,山田拓司, 井ノ上逸朗, 黒川顕, 成田一衛
10. IgA 腎症患者の口蓋扁桃マイクロバイオーム解析、第 58 回日本腎臓学会学術総会、平成 27 年 6 月 7 日、名古屋、渡辺博文、後藤眞、土田雅史、近藤大介、山崎肇、青柳竜治、高田琢磨、成田一衛

新美輝幸（基礎生物学研究所）

1. 新美輝幸、比較トランスクリプトーム解析によるカブトムシ角形成遺伝子の網羅的同定、日本動物学会第 85 回大会シンポジウム、2014 年 9 月 12 日、東北大学（仙台市）
2. Teruyuki Niimi、Horn development in the Japanese rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus*、Invited Seminar at Dr. Emlen's laboratory、2014 年 12 月 19 日、The University of Montana（USA）
3. 新美輝幸、ナミテントウ斑紋多型現象解明へのアプローチ、第 1 回 Evolution 研究集会、2015 年 3 月 26 日、名古屋大学理学研究科附属菅島臨海実験所（鳥羽市）
4. 新美輝幸、性決定遺伝子で探る甲虫の角形成、昆虫共生酵母研究会主催シンポジウム「生物の共生進化を考える」、2015 年 6 月 2 日、島根大学（島根市）
5. 新美輝幸、昆虫の多様性創出の進化メカニズム、基礎生物学研究所臨時所内セミナー、2015 年 7 月 2 日、基礎生物学研究所（岡崎市）
6. Teruyuki Niimi、Control of horn development by the *doublesex* gene in beetles、"Nothiger" meeting, Insect Sex Determination、2015 年 8 月 16 日、University of Lausanne（Switzerland）
7. Teruyuki Niimi、Towards the understanding of horn development in the Japanese rhinoceros beetle、Invited Seminar at Institute of Molecular Life Sciences、2015 年 8 月 18 日、University of Zurich（Switzerland）
8. 新美輝幸、*doublesex* 遺伝子で探る甲虫の形態的雌雄差、日本進化学会第 17 回大会シンポジウム、2015 年 8 月 22 日、中央大学後楽園キャンパス（文京区）
9. 新美輝幸、カブトムシの角形成遺伝子の探索 、「認識と形成」研究会 2015、2015 年 9 月 21 日、沖縄科学技術大学院大学（国頭郡）
10. 新美輝幸、昆虫特異的な新奇形態の Evo-Devo 研究、C-Bio Seminar 37th、2015 年 11 月 9 日、宇都宮大学（宇都宮市）
11. 新美輝幸、性決定遺伝子で探る甲虫の武器形質、ミニシンポジウム「認識と形成」、2015 年 11 月 27 日、熊本大学発生医学研究所（熊本市）
12. Teruyuki Niimi、Towards the Understanding of Sexually Dimorphic Horn Formation、The 63rd NIBB Conference "Environment to Bioresponse"、2015 年 11 月 30 日、Okazaki Conference Center（Okazaki）
13. 辻知広・後藤寛貴・柳沼利信・新美輝幸、ナミテントウにおける色素輸送に関わる ABC トランスポーター遺伝子群の同定、日本蚕糸学会 中部支部第７１回・東海支部第６７回研究発表会ならびに特別講演会、2015 年 12 月 4 日、信州大学理学部（松本市）
14. 新美輝幸、カブトムシの角形成機構の解明をめざして、昆虫自主セミナー第 111 回、2015 年 12 月 9 日、農業生物資源研究所（つくば市）
15. Teruyuki Niimi、Towards the understanding of the origin and diversity of beetle horns、"Origin of Novelty"The Joint Symposium of the Entomological Society of Japan and the Japanese Society of Applied Entomology and Zoology、2016 年 3 月 27 日、Osaka Prefecture University（Sakai）

二階堂雅人（東京工業大学）

1. 二階堂雅人『シクリッドの唇肥大化に関わる平行進化メカニズム』(2015 年 12 月 3 日, 神戸）第 38 回日本分子生物学会ワークショップ「オモロイ生き物の分子生物学」(2015 年 12 月 3 日)
2. 二階堂雅人、岡田典弘『シクリッドの唇肥大化に関わる平行進化メカニズム』日本遺伝学会第 87 回大会（2015 年 9 月 25 日、東北大学川内キャンパス）
3. 二階堂雅人、岡田典弘『収斂進化の分子機構：シクリッドを題材にして』日本進化学会第 17 回大会シンポジウム（2015 年 8 月 22 日、中央大学）
4. 二階堂雅人『東アフリカ産シクリッドの唇肥大化に関わる平行進化の分子メカニズム』Tokyo Vertebrate Morphology Meeting （2015 年 8 月 12 日、東京慈恵医科大学）
5. 二階堂雅人『シクリッドにおける唇の肥大化の平行進化に関わる遺伝的基盤』日本魚類学会年会シンポジウム（2014 年 11 月 17 日、生命の星・地球博物館、小田原）

6. 小林直樹、二階堂雅人、近藤梓、鈴木彦有、菊池潔、岡田典弘　「シクリッドの唇肥大化メカニズム」第 16 回日本進化学会（2014 年 8 月 21 日-24 日、高槻・現代劇場）
7. Nikaido M. “Highly dimorphic diversity of V1R receptor genes on the sex chromosome of East-African cichlids.” Workshop on Sensory Systems (30th Jan. 2014, Tokyo Institute of Technology, Yokohama)
8. 二階堂雅人『ほぼ全ての脊椎動物に存在する新規フェロモン受容体 ancV1R の進化』第 3 回ケモビ研究会（2015 年 11 月 14 日，箱根）
9. 鈴木彦有、西田秀史、廣田順二、二階堂雅人『全ての脊椎動物に共通な新規フェロモン受容体の機能解明』日本動物学会第 86 回大会（2015 年 9 月 17 日、新潟大学）

西順一郎（鹿児島大学）

1. Imuta N, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Nishi J. Molecular epidemiology analysis of extend-spectrum-β lactamase (ESBL) producing Enteroaggregaive *Escherichia coli* (EAEC) 第 87 回日本細菌学会総会, 2014.3.26-2, 東京
2. Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Yoshiie K. Molecular epidemiological analysis of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC)　The 114th General Meeting of the American Society for Microbiology 2014.5.17-20, Boston, USA
3. Imuta N, Ooka T, Seto K, Yoshiie K, Ogura Y, Hayashi T, Nishi J. Genetic heterogeneity of AggR-positive enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): emergence of EAEC/UPEC O25:H4:ST131 producing ESBL 第 88 回日本細菌学会総会, 2015.3.26-28, 岐阜市
4. Imuta N, Ooka T, Seto K, Yoshiie K, Nishi J. Genetic heterogeneity of AggR-positive enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC); emergence of EAEC/UPEC O25:H4:ST131 producing ESBL. The 115th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2015.6.1-3, New Orleans, USA

西田洋巳（富山県立大学）

1. 山内健太、近藤伸二、浜本牧子、鈴木穣、西田洋巳　「古生子嚢菌類 *Saitoella complicata* の RNA マップ解析およびヌクレオソームマップ解析」　2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会、2015 年 9 月 20 日、射水

西山智明（金沢大学）

1. 西山智明, 豊田敦, 鈴木穣, 坂山英俊.　陸上植物に近縁な藻類シャジクモのゲノム解読. NGS現場の会第三回研究会、2013年9月４、５、神戸
2. 西山智明, 豊田敦, 鈴木穣, 坂山英俊.　陸上植物に近縁な藻類シャジクモのゲノム解読. 日本植物学会第７７回大会、2013年9月１３−１５、札幌
3. Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama and Hidetoshi Sakayama. Genome Sequencing of the Charophycean Green Alga, *Chara braunii*. Plant & Animal Genomes XXII, January 2014, San Diego
4. 西山 智明, 豊田 敦, 鈴木 穣, 藤山 秋佐夫, 坂山 英俊　陸上植物に近縁な藻類シャジクモ: 2.3Gb ゲノムの解読・アセンブリー　生命情報科学若手の会第５回研究会 2014年2月17-19 検見川
5. Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama and Hidetoshi Sakayama. Genome Sequencing of the Charophycean Green Alga, *Chara braunii*.第55回植物生理学会年会, 2014年3月18-20, 富山
6. 西山 智明, 豊田 敦, 鈴木 穣, 藤山 秋佐夫, 坂山 英俊　シャジクモのゲノム解読 日本植物分類学会第13回大会　2014年3月20-23,熊本

7. Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama and Hidetoshi Sakayama. Genome Sequencing of the Charophycean Green Alga, *Chara braunii*. Ectocarapus 2014. March 28, 2014, 神戸
8. 西山 智明, 豊田 敦, 鈴木 穣, 藤山 秋佐夫, 坂山 英俊　シャジクモゲノムにみる陸上植物の制御因子ホモログ　日本植物学会第 78 回大会　2014 年 9 月 12-14 生田,
9. Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama, Stefan A. Rensing , Hidetoshi Sakayama "The *Chara braunii* genome" Plant & Animal Genomes XXIII, 2015 年 1 月 San Diego,
10. Hidetoshi Sakayama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama, Stefan A. Rensing, Tomoaki Nishiyama.　"The *Chara braunii* Genome Sheds Light on the Origin of Land Plants" Plant & Animal Genomes XXIII, San Diego, 2015 年 1 月 San Diego
11. Tomoaki Nishiyama, Atsushi Toyoda, Yutaka Suzuki, Asao Fujiyama, Stefan A. Rensing, Hidetoshi Sakayama. "The *Chara braunii* genome" International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II", Hitotsubashi Hall, Tokyo, 2015 年 1 月２０、２１,東京

野崎久義（東京大学）

1. Takashi Hamaji, Yuko Mogi, Patrick J. Ferris, Shinya Miyagishima, Toshiyuki Mori5, Bradley J.S.C. Olson, Masahiro Suzuki, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, James G. Umen, Ichiro Nishii, Yoshiki Nishimura & Hisayoshi Nozaki "Sequencing the mating type locus of the isogamous colonial *Gonium pectorale*"(15th Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kongresshotel Potsdam, Germany, 5-10 June 2012)
2. Hiroko Kawai-Toyooka, Toshiyuki Mori, Takashi Hamaji, Masahiro Suzuki, Bradley J.S.C. Olson, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, and Hisayoshi Nozaki "Identification and characterization of GCS1 orthologue in *Gonium pectorale*"(15th Conference on the Cell & Molecular Biology of *Chlamydomonas*, Kongresshotel Potsdam, Germany, 5-10 June 2012)
3. Olson, B. J. S. C., Marriage, T., Nozaki, H., Hamaji, T., Suzuki, M., Kawai-Toyooka, H., Fujiyama, A. Toyoda, A., Pierre, D., Ferris, P. and Michod, R. "Evolution of cell cycle control in the volvocine algae: from unicellular *Chlamydomonas* to colonial multicellular *Gonium*", 15th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Kongresshotel, Potsdam (near Berlin), Germany, 5-10 June 2012)
4. Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, B. J. S. C., Toyoda, A., Fujiyama, A. and Nozaki, H. "*Gonium* GCS1 is expressed on the tubular mating structure of the mating-type minus gamete", International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants (Joint Meeting of 2nd Allo-authentication Meeting and 5th Egg-Coat Meeting) (Hotel Nagoya Garden Palace Nagoya, Japan, 12-16 November 2012)
5. Kawai-Toyooka, H., Mori, T., Hamaji, T., Suzuki, M., Olson, B. J. S. C., Toyoda, A., Fujiyama, A. and Nozaki, H. "Whole-genome sequencing-based identification of GC-rich gamete fusion gene *GCS1* in *Gonium pectorale*", International Symposium on Genome Science, "Expanding Frontiers of Genome Science" (The University of Tokyo, Ito International Research Center, Tokyo, Japan 9-10 January 2013)
6. 豊岡博子、森 稔幸、浜地貴志、鈴木雅大、Bradley J. S. C. Olson, 豊田 敦、藤山秋佐夫、野崎久義「群体性ボルボックス目ゴニウムにおける *GCS1* オルソログの単離と解析-接合様式の進化と配偶子融合因子発現制御の普遍性-」（第 12 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学本郷キャンパス、2012 年 6 月 30 日）
7. 豊岡博子、森 稔幸、浜地貴志、鈴木雅大、Bradley J. S. C. Olson, 豊田 敦、藤山秋佐夫、野崎久義「群体性ボルボックス目ゴニウムにおける配偶子融合因子 *GCS1* オルソログの解析」（日本植物学会第 76 回大会、兵庫県立大学、2012 年 9 月 15-17 日）
8. 野崎久義、浜地貴志、豊岡博子、鈴木雅大、豊田敦、野口英樹、藤山秋佐夫 "性染色体領域の解析に基づく「雌雄性の誕生」に関する進化生物学的研究" （2012 年 8 月 29 日

～30 日、新学術領域「ゲノム支援」2012 年度拡大班会議、御殿場高原ホテル、御殿場市）

9. 浜地貴志、Smith DR、野口英樹、豊田敦、鈴木雅大、豊岡博子、藤山秋佐夫、西井一郎、Marriage T、Olson BJSC、野崎久義 “群体性ボルボックス目 *Gonium pectorale* のオルガネラゲノム”（2013 年 3 月 28 日～29 日、日本藻類学会第 37 回大会、山梨大学甲府西キャンパス、甲府市）
10. 野崎久義、豊岡博子、森 稔幸、浜地貴志、鈴木雅大、豊田 敦、野口英樹、藤山秋佐夫 “群体性ボルボックス目のゲノム情報から探る雌雄性の進化と多細胞化”（2013 年 8 月 28 日～29 日、新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議、ポートピアホテル、神戸市）
11. 豊岡博子、浜地貴志、茂木祐子、鈴木雅大、森稔幸、野崎久義 “群体性ボルボックス目で探る配偶子融合の分子メカニズムとその進化” (2013 年 9 月 13 日～15 日、日本植物学会第 77 回大会シンポジウム「アルガルセックス: 有性生殖と生活環制御が切り拓く藻類バイオの新戦略」、北海道大学札幌キャンパス、札幌市)”
12. 豊岡博子、森稔幸、浜地貴志、鈴木雅大、豊田敦、野口英樹、藤山秋佐夫、野崎久義 ” ゲノム情報から探る群体性ボルボックス目の配偶子融合の分子機構”（2013 年 6 月 2 日～3 日、新学術領域研究「動植物アロ認証」第 7 回領域会議、くにびきメッセ、松江市）
13. Hamaji, T., Mogi, Y., Ferris, P., Mori, T., Miyagishima, SY., Kabeya, Y., Nishimura, Y., Toyoda, A., Noguchi, H., Fujiyama, A., Suzuki, M., Kawai-Toyooka, H., Olson, B. J. S. C., Marriage, T. H., Umen, J., Nishii, I., and Nozaki, H. “Sex-determining locus in the isogamous colonial volvocine *Gonium pectorale* gives insights into the evolution of oogamy in volvocine green algae” (Annual Meeting of SMBE 2013, Hyatt Regency Chicago, Chicago, Illinois, USA, 7-11 July 2013)
14. Hamaji, T., Ferris, P., Nishimura, Y., Toyoda, A., Noguchi, H., Fujiyama, A., Suzuki, M., Kawai-Toyooka, H., Olson, B. J. S. C., Marriage, T. H., Umen, J., Nishii, I., and Nozaki, H. “Evolutionary dynamic features of mating loci inferred from de novo genome sequencing of *Gonium pectorale* (Volvocales, Chlorophyta)” (Second International *Volvox* Conference, University of New Brunswick. Fredericton, New Brunswick, Canada, 31 July-3 August 2013)
15. Olson, B. J. S. C., Hanschen, E. R., Marriage, T. N., Hamaji, T., Durand, P., Nozaki, H., Ferris, P. J., Featherston, J., Suzuki, M., Kawai-Toyooka, H., Fujiyama, A., Toyoda, A., Brown, S., Coleman, M., and Michod, R. E. “The Volvocales genome project” (Second International *Volvox* Conference, University of New Brunswick. Fredericton, New Brunswick, Canada, 31 July-3 August 2013)
16. 野崎久義、豊岡博子、森 稔幸、浜地貴志、鈴木雅大、豊田 敦、野口英樹、藤山秋佐夫 “群体性ボルボックス目の性染色体領域の比較解析に基づく「雌雄性」の進化生物学的研究”（2014 年 8 月 20 日～21 日、新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議、ポートピアホテル、神戸市）
17. Nozaki, H., Kawai-Toyooka H., Suzuki, M., Mor, T., Hamaji, T., Toyoda, A., Noguchi, H. and Fujiyama, A. “Genome data of the evolutionary time machine colonial volvocaleans unveiling origins of genders and multicellularity” (International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II," Hitotsubashi Hall, Chiyoda-ku, Tokyo, 20-21 January 2015)
18. 野崎久義、豊岡博子、新垣陽子、松﨑令、浜地貴志、豊田 敦、野口英樹、水口洋平、藤山秋佐夫 “群体性ボルボックス目の比較ゲノム解析に基づく多細胞化と雌雄性の進化生物学的研究” （2015 年 8 月 27～28 日新学術ゲノム支援「2015 年度拡大班会議」、国立京都国際会館アネックスホール、京都市）

長谷川政美（統計数理研究所）

1. 米澤隆弘　次世代シーケンサーによる絶滅生物の進化学的解析　NGS現場の会第四回研究会　7月1～ ３日　つくば国際会議場
2. 米澤隆弘　古代DNAによるゲノム系統学と形態学が解き明かす自然史～収斂進化への挑戦～　第五回TVMM (Tokyo Vertebrate Morphological Meeting)　8月11日　東京慈恵医科大学
3. 長谷川政美 博物館試料と古代ＤＮＡ解析 日本進化学会　8月22日　中央大学
4. T Yonezawa, T. Segawa, H. Mori, M. Hasegawa.　Phylogenomics and morphology of extinct birds point to Laurasian origin of palaeognaths. 新学術領域「ゲノム支援」２０１５年度 拡大班会議　8月27-28日　国立京都国際会館

長谷部光泰（基礎生物学研究所）

1. Ohshima I (2015) From Juglandaceae to Ericaceae: the genetic background of host shifting between distantly related host plants in a leaf mining moth *Acrocercops transecta* (Lepidoptera: Gracillariidae). Le Studium Conference “Insects, Pathogens and Plant Reprogramming: From Effector Molecules to Ecology”. 7, October. Tours, France. (Oral. Invited speaker)
2. Ohshima I (2015) How many genomic changes are required for adaptation to a novel host plant: forward genetic and whole genome sequencing approaches. S02-2. The 62nd Ecological Society of Japan Annual Meeting. 19, March. Kagoshima, Japan. (Oral. Invited speaker)
3. Ohshima I, Nishiyama T, Hasebe M (2013) Evolution of complex traits: detecting the genes responsible for host-plant adaptation in insects. International Symposium on Genome Science "Expanding Frontiers of Genome Science". 9, January, University of Tokyo, Japan. (Poster)
4. Ohshima I & Hasebe M (2011) QTL mapping of a larval-performance trait in the leaf mining moth *Acrocercops transecta*. Keystone symposium, Evolutionary Developmental Biology. 219. Tahoe, California, USA. 27, February-2nd, March. (Poster)

花田耕介（九州工業大学）

1. 花田耕介（招待）、「様々な条件下でトランスクリプトーム解析をやり続けることでみえること」明日の植物科学を探る、植物グローバル研究プロジェクト（代表者　深尾陽一朗）、奈良先端大学、2012 年、11 月
2. Hanada K (invited). Small open reading frames associated with morphogenesis are hidden in plant genomes. "Evolutionary Genetics and Proteomics of Natural Resources in Asia". 2013, Jan.
3. Hanada K (invited). Many genes associated with morphogenesis are hidden in genomes. NIG Meeting: Evolution of Junk DNAs. 2013. June.
4. 花田耕介（招待）、植物ゲノム隠れている短い遺伝子の機能解析、ワークショップ「ウェット個別研究とドライ研究の実践的超融合～新しい分子生物学のあり方を模索する」、分子生物学会、神戸、2013 年、12 月
5. 花田耕介（招待）、「次世代シークエンサーを利用したゲノムレベルの進化解析の最前線」、2014 アジレントゲノミクスフォーラム、東京、2014 年、6 月
6. 花田耕介（招待）、「シロイヌナズナ集団内のメチル化の多様性から明らかになったメチル化が遺伝子発現に影響する役割」、「次世代シークエンサーを利用したゲノムレベルの進化解析の最前線」シンポジアム、第 16 回日本進化学会、大阪、2014 年、8 月
7. 花田耕介、「植物の多様性あるいは共通性の理解に比較ゲノム解析は有効か？」、中国地域育種談話会　基調講演、2014 年、12 月、鳥取
8. **Hanada K**. Peptides encoded by small genes hidden in plant genomes show essential functions. Technische University Munchen. 2015 Sep, Germany
9. **Hanada K**. Functional analysis of small genes hidden in plant genomes. 3rd European Workshop on Peptide Signalling and Activity in Plants. Ghent University, (**Selected Talk**), 2015 Sep, Belgium　(査読有)

10. 花田耕介、「近縁種の高精度ゲノムを利用した非モデル生物の Illumina Short Reads データの解析」、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター　特別講演、平成２７年　７月、東京

濵﨑恒二（東京大学）

1. 津田敦・鈴木光次・浜崎恒二（2014）「分子生物地理からの海洋区系」日本海洋学会秋季大会シンポジウム「持続的な海洋利用のための海洋区系」2014年9月13日長崎大学
2. Koji Hamasaki, Shotaro Suzuki, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Hiroshi Mori, Ken Kurokawa, Wataru Arai, Hideto Takami (2015) Diversity, community structure and functional potential of planktonic bacteria in the Pacific Ocean: insights from the NEOPS transoceanic cruises. International symposium: “Developing new ocean provinces on their biogeochemistry and ecosystems”, The University of Tokyo, 2015.12.3

浜本 洋（東京大学）

1. Mechanistic Analysis of Novel Antibiotics Kaikosins、Kazuhisa Sekimizu, Hiroshi Hamamoto、The 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity, Oct. 31-Nov. 1, 2012, Kyoto
2. Characterization and mechanistic analysis of novel antibiotics Kaikosin, produced by *Lysobacter* sp.、Hiroshi Hamamoto, Su Jie, Paudel Atomika, Makoto Urai, Kazuhisa Sekimizu、International Symposium on Genome Science Expanding Frontiers of Genome Science, Jan. 9-10, 2013, Tokyo
3. 次世代シークエンサーを用いた黄色ブドウ球菌の宿主応答因子の網羅的な解析手法、浜本洋、石井健一、安達健朗、鈴木穣、関水和久、第 36 回日本分子生物学会年会（ワークショップ「ウェット個別研究とドライ研究の実践的超融合～新しい分子生物学のあり方を模索する」）、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸
4. 治療効果を指向した新規抗生物質の開発に向けて、浜本洋、文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」公開シンポジウム 次世代ゲノム科学の最前線、2014 年 1 月 21 日、東京
5. Novel Therapeutically Effective Antimicrobial Agent Targets Bacterial RNA Polymerase Sigma Factor、Atmika Paudel, Hiroshi Hamamoto, Keiichi Kaneko, Shigeki Matsunaga, Yutaka Suzuki, Momomu Kanai, Kazuhisa Sekimizu、54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)、2014 年 9 月 5 日～10 日、Washington D.C.
6. マウス臓器に感染した黄色ブドウ球菌の網羅的遺伝子発現解析、浜本洋、扇喜秀、鈴木穣、Paudel Atmika、 関水和久、第２７回微生物シンポジウム、2015 年 9 月４～5 日、岡山
7. Comprehensive gene expression analysis for Staphylococcus aureus infection in mouse organs、Hiroshi Hamamoto, Suguru Ohgi, Yutaka Suzuki, Paudel Atmika, Kazuhisa Sekimizu、ICAAC/ICC 2015、2015 年 9 月 17～21 日、サンディエゴ
8. 宿主臓器における遺伝子発現上昇を指標とした黄色ブドウ球菌の新規病原性因子の探索、扇喜秀、浜本洋、鈴木穣、関水和久、第 14 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2015、2015 年 9 月 12～13 日、千葉
9. 宿主臓器における遺伝子発現上昇を指標とした黄色ブドウ球菌の新規病原性因子の探索、扇喜秀、浜本洋、鈴木穣、関水和久、BMB2015（第３８回日本分子生物学会、第 88 回生化学会　合同大会）、2015 年 12 月 1～4 日、神戸

林 深（東京医科歯科大学）

1. 林深，稲澤譲治．ゲノム解析が明らかにしてきた顎顔面奇形の病態．第 54 回日本先天異常学会学術集会 シンポジウム１ 顔面奇形:基礎と臨床　2014 年 7 月 26 日，相模原．
2. Hayashi S, Imoto I, Makita Y, Hata A, Inazawa J. Pathogenic CNVs and causative genes

detected by two-stage screening in 647 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies of unknown etiology. 12th International Congress of Human Genetics / The American Society of Human Genetics 61st annual meeting, Oct 12-14, 2011, Montreal. **(poster)**

3. 林深, Daniela Tiaki Uehara, 長縄光代, 稲澤譲治. 高解像度アレイを用いた pathogenic CNV を付加的に修飾する微細 CNV の探索．日本人類遺伝学会第 57 回大会　2012 年 10 月 27 日，東京.
4. 林深，Daniela Chiaki Uehara，長縄光代，井本逸勢，蒔田芳男，羽田明，稲澤譲治．オリゴアレイ・SNP アレイを用いた先天異常疾患症例におけるゲノム異常評価とアレイポテンシャルの比較．日本人類遺伝学会第 56 回大会　2011 年 11 月 10 日，千葉.
5. Hayashi S, Okamoto N, Takanashi J, Inazawa J. Comprehensive investigation of CASK and other relevant genes in 41 patients with intellectual disability, microcephaly and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH) using next-generation sequencing. The American Society of Human Genetics 64th annual meeting, Oct 18-22, 2014, San Diego. **(platform)**
6. Hayashi S, Nobuhiko O, Takanashi J, Inazawa J. Investigation of CASK gene aberrations in 38 patients with severe intellectual disability, microcephaly and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia. The American Society of Human Genetics 63rd annual meeting, Oct 22-26, 2013, Boston. **(platform)**
7. 林深，岡本伸彦，高梨潤一，稲澤譲治．小脳脳幹部低形成を伴う小頭症 (MICPCH)41 例に対する CASK 遺伝子その他の包括的疾患原因探索．日本人類遺伝学会 59 回大会 2014 年 11 月 21 日，東京.
8. 林深，岡本伸彦，高梨潤一，稲澤譲治．小脳脳幹部低形成 (MICPCH)の原因となる多彩な病態の探索．日本人類遺伝学会 58 回大会　2013 年 11 月 23 日，仙台.

林 哲也（九州大学）

1. 大岡唯祐, 林哲也 : 人獣共通新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノムの特徴と診断疫学マーカーの開発. 第 157 回日本獣医学会学術集会　微生物学分科会企画シンポジウム, 9/9-12, 2014, 札幌.
2. 後藤恭宏, 林哲也（ワークショップ・招待演者）: 難培養菌群による polymicrobial disease へのゲノムからのアプローチ. 第 87 回日本細菌学会総会, 3-26-28, 2014, 東京.

原 一雄（東京医科大学）

1. Hara K, Hayato Fujita H, Johnson TA, Yamauchi T, Maeda S, Tsunoda T, Nakamura Y, Kadowaki T. Comprehensive evaluation of type 2 diabetes susceptibility loci in the Japanese population using 1000 genomes project data. The 48th EASD (European Association for the Study of Diabetes) Annual Meeting, 2012 年 10 月 3 日, ベルリン（ドイツ）（査読有）
2. Hara K, Fujita H, Johnson TA, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kadowaki T. Comprehensive evaluation of type 2 diabetes susceptibility loci in East Asians by using 1000 Genomes Project data. American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting, 2012 年 11 月 9 日, サンフランシスコ（米国）（査読有）
3. 原　一雄、藤田　逸人, 庄嶋　伸浩, 堀越　桃子, 岩部　美紀, 岩部　真人, 岡崎　由希子, 山内　敏正, 前田　士郎, 伊藤　千賀子, 植木　浩二郎, 久保　充明, 中村　祐輔, 門脇　孝 : 高密度遺伝子多型情報を利用した全ゲノム解析による新規 2 型糖尿病感受性遺伝子同定の試み、第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会、2012 年 5 月 18 日、横浜
4. 原　一雄、藤田 逸人、前田 士郎、門脇 孝：発現解析と全ゲノム解析による２型糖尿病感受性領域の探索、第 57 回日本人類遺伝学会、2012 年 10 月 26 日、東京

5. 藤田 逸人, 原 一雄, 庄嶋 伸浩, 今村 美菜子, 前田 士郎, 門脇 孝：ゲノムワイド関連解析を用いた東洋人における２型糖尿病感受性領域の探索,第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会,2013 年 5 月 17 日,熊本

菱田 卓（学習院大学）

1. 菱田卓、慢性的な紫外線照射による突然変異の誘起メカニズム、放射線影響学会第 55 回大会、2012 年 9 月 7 日、仙台
2. 菱田卓、慢性的な紫外線損傷ストレスに対する耐性獲得に関与するヌクレオソーム構造、放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 2 日、鹿児島

深田吉孝（東京大学）

1. 吉種光, Du-Ngoc Hien, 岩崎渉, 鈴木穣, 尾崎遥, 寺嶋秀騎, 深田吉孝、CLOCK の DNA 結合リズムとその結合部位の探索、第 18 回日本時間生物学会学術大会（愛知県 名古屋市 名古屋大学）2011 年 11 月 24 日-25 日（ポスター発表、口頭発表）
2. 寺嶋秀騎, 吉種光, Du-Ngoc Hien, 岩崎渉, 尾崎遥, 鈴木穣, 深田吉孝、マウス肝臓において時計因子 CLOCK がリズミックに結合する DNA 領域の探索、日本動物学会第 64 関東支部大会（千葉県 船橋市 東邦大学 習志野キャンパス）2012 年 3 月 17 日（ポスター発表）
3. 寺嶋秀騎, 吉種光, Du-Ngoc Hien, 岩崎渉, 尾崎遥, 鈴木穣, 深田吉孝、時計因子 CLOCK がリズミックに結合する DNA 領域の探索、第 19 回日本時間生物学会学術大会（北海道 札幌市 北海道大学）2012 年 9 月 15 日-16 日 (ポスター発表)
4. 吉種光, 尾崎遥, 寺嶋秀騎, Du-Ngoc Hien, 岩崎渉, 鈴木穣, 深田吉孝、時計タンパク質 CLOCK の ChIP-Seq 解析と概日性トランスクリプトーム解析、CLOCK ChIP-Seq and circadian transcriptome in the mouse liver、第 35 回日本分子生物学会年会（福岡県 福岡市 福岡国際会議場）2012 年 12 月 13 日（ポスター発表、口頭発表）
5. 吉種光, 尾崎遥, 寺嶋秀騎, Du-Ngoc Hien, 岩崎渉, 鈴木穣, 深田吉孝、時計タンパク質 CLOCK の ChIP-Seq 解析と概日性トランスクリプトーム解析、CLOCK ChIP-Seq and circadian transcriptome in the mouse liver、第 85 回日本生化学会大会（福岡県 福岡市 福岡国際会議場）2012 年 12 月 15 日（ポスター発表、口頭発表）
6. Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Hideki Terajima, Ngoc-Hien Du, Wataru Iwasaki, Yutaka Suzuki and Yoshitaka Fukada　CLOCK-controlled polyphonic regulations of circadian rhythms through canonical and non-canonical E-boxes.　Gordon Research Seminars: Chronobiology（米, RI, Salve Regina Univ.）2013 年 7 月 13-14 日（ポスター発表）
7. Hideki Terajima, Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Ngoc-Hien Du, Yutaka Suzuki, Taihei Fujimori, Wataru Iwasaki and Yoshitaka Fukada.　CLOCK-controlled multiple regulations of circadian rhythms through canonical and noncanonical E-boxes.　13th European Biological Rhythms Society （独ミュンヘン, Ludwig-Maximilians-University）2013 年 8 月 19 日（口頭発表）
8. Hideki Terajima, Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Ngoc-Hien Du, Yutaka Suzuki, Shigeki Shimba, Taihei Fujimori, Sumio Sugano, Toshihisa Takagi, Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada　CLOCK-ChIP-Seq and Circadian Transcriptome in the Mouse Liver　第 86 回日本生化学会大会（神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜）2013 年 9 月 11 日（ポスター発表）
9. 吉種光, 尾崎遥, 寺嶋秀騎, Du-Ngoc Hien, 布川莉奈, 岩崎渉, 鈴木穣, 深田吉孝、多様な時計シスエレメントを介した概日リズムの多重制御、第 20 回日本時間生物学術大会（大阪府 東大阪市 近畿大学 東大阪キャンパス）2013 年 11 月 9 日（ポスター発表）
10. 吉種光, 深田吉孝、時計タンパク質 CLOCK と BMAL1 のリン酸化リズムとその制御、第 36 回日本分子生物学会年会（兵庫県 神戸市 神戸ポートアイランド）2013 年 12 月 3 日（口頭発表）

11. 寺嶋 秀騎、吉種 光、深田 吉孝、時計タンパク質 CLOCK が生み出す転写リズムと転写後制御の概日変動、第２回卓越した大学院拠点形成支援補助金による理学系リトリート（静岡県 伊豆市 ラフォーレ修善寺）2014 年 3 月 11 日（ポスター発表）
12. Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Hideki Terajima, Ngoc-Hien Du, Wataru Iwasaki, Yoshitaka Fukada. MOCCS analysis for determination of CLOCK-binding motifs. Society for Research on Biological Rhythms 2014 (米国モンタナ州、Big Sky Resort) 2014 年 6 月 16 日(ポスター発表)
13. Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Hideki Terajima, Ngoc-Hien Du, Yutaka Suzuki, Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada A new method, MOCCS analysis, for determination of CLOCK-binding motifs. The 30th Anniversary Meeting Sapporo Symposium on Biological Rhythm （北海道 札幌市 北海道大学）2014 年 7 月 26 日-27 日（ポスター発表）
14. 深田 吉孝：行動の日周リズムを規定する時計タンパク質の修飾クロノコード. 大阪市立大学 生物分子機能学ゼミナール 大阪市立大学大学院理学研究科（大阪）2014 年 8 月 21 日（招待講演）
15. Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Hideki Terajima, Ngoc-Hien Du, Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada A new method, MOCCS analysis, for determination of CLOCK-binding motifs The 68th Fujihara Seminar "Homeodynamics in Clocks, Sleep and Metabolism"（静岡県 伊豆市 IBM 天城ホームステッド）2014 年 9 月 25 日、26 日（ポスター発表）
16. Hikari Yoshitane, Yoshitaka Fukada Genome-wide approach for molecular outputs of the circadian clock in mice Chile-Japan Academic Forum in UTokyo Workshop on Genes, Cells and Organisms（東京都 文京区 東京大学）2014 年 10 月 8 日（口頭発表）
17. Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Hideki Terajima, Ngoc-Hien D,Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada A new method, MOCCS analysis, for determination of CLOCK-binding motifs 第 87 回日本生化学会大会（京都府 京都市 国立京都国際会館）2014 年 10 月 17 日（ポスター発表、口頭発表）
18. 寺嶋 秀騎、吉種 光、尾崎 遥、鈴木 穣、榛葉 繁紀、岩崎 渉、深田 吉孝、時計因子 CLOCK が生み出す転写リズムとリズミックな転写後制御の重要性、第 21 回日本時間生物学会学術大会（福岡県 福岡市 九州大学）2014 年 11 月 8 日（ポスター発表）
19. Hikari Yoshitane and Yoshitaka Fukada、哺乳類の概日時計機構の理解に向けた OMICS 解析、第 21 回日本時間生物学会学術大会（福岡県 福岡市 九州大学）2014 年 11 月 8 日（口頭発表）
20. 寺嶋 秀騎、吉種 光、尾崎 遥、鈴木 穣、榛葉 繁紀、岩崎 渉、深田 吉孝、ゲノムワイドな CLOCK の標的探索が明らかにしたリズミックな転写後制御、第 37 回日本分子生物学会年会（神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜）2014 年 11 月 25 日（ポスター発表、口頭発表）
21. 吉種 光, 尾崎 遼, 寺嶋 秀騎, Ngoc-Hien Du, 岩崎 渉, 鈴木 穣, 深田 吉孝、新しいバイオインフォマティクス技術 MOCCS を用いた転写因子 CLOCK の DNA 結合モチーフの決定、第 37 回日本分子生物学会年会（神奈川県 横浜市 パシフィコ横浜）2014 年 11 月 25 日（ポスター発表）
22. Yoshimasa Asano, Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Yutaka Suzuki, Hideki. Terajima, Aya Sagami, Wataru Iwasaki, Yoshitaka Fukada Genome-wide circadian transcription through rhythmic regulation of clock cis-elements E-box and D-box International Symposium on Genome Science 2015 “Expanding Frontiers of Genome Science II”(東京、日本教育会館) 2015 年 1 月 20 日(ポスター発表)
23. Yoshitka Fukada Genome-wide analysis of CLOCK-controlled genes reveals importance of the transcriptional rhythm and the post-transcriptional regulation. 4th International Symposium Molecular Clock 2015 Epigenetic Landscape in Biological Rhythms（Shiran-Kaikan, Kyoto, Japan） 2015 年 3 月 27 日（招待講演）
24. Yoshitaka Fukada Canonical and noncanonical E-boxes Regulate Transcriptional and Post-Transcriptional Circuits. XIV European Biological Rhythms Society and IV World

Congress of Chronobiology, （The University of Manchester, Manchester ,UK,） Aug. 4, 2015（招待講演）

25. Hideki Terajima, Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Yutaka Suzuki, Shigeki Shimba, Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada　Circadian control of RNA modification regulates rhythmic gene expression and clock speed　Gordon Research Conferences on Chronobiology: Biological Rhythms（Melia Golf Vichy Catalan Business and Convention Center, Girona, Spain）2015 年 7 月 1-2 日(ポスター発表)
26. 寺嶋 秀騎、吉種 光、尾崎 遥、鈴木 穣、榛葉 繁紀、岩崎 渉、深田 吉孝、リズミックな A-to-I RNA 編集が担う体内時計機構の分子基盤、第 17 回日本 RNA 学会年会（北海道 札幌市 ホテルライフォート札幌）2015 年 7 月 15 日（口頭発表）
27. Hikari Yoshitane, Hideki Terajima, and Yoshitaka Fukada　Circadian epitranscriptomics: mRNA rhythms driven by rhythmic post-transcriptional regulation　14th European Biological Rhythms Society (EBRS) and 4th World Congress of Chronobiology （The University of Manchester, Manchester, UK）2015 年 8 月 3-4 日（ポスター発表）
28. Yoshitaka Fukada: Rhythmic transcription and post-transcriptional regulation govern circadian outputs. Asian Forum on Chronobiology in 2015 （Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido）Sep.7, 2015（招待講演）
29. Fukada Yoshitaka: Impact of RNA editing on circadian epitranscriptome in mice. Cold Spring Harbor Asia Conferences on Biological Rhythms.（Suzhou Industrial Park Conference Center, Suzhou, China）Oct.29, 2015（招待講演）
30. 寺嶋 秀騎、吉種 光、尾崎 遼、鈴木 穣、榛葉 繁紀、岩崎 渉、深田 吉孝、広範な RNA リズムを作り出す A-to-I RNA 編集と時計振動体との機能連関、第 22 回日本時間生物学会学術大会（東京都 文京区 東京大学 伊藤国際学術研究センター）2015 年 11 月 21 日（ポスター発表）
31. 浅野 吉政、吉種 光、尾崎 遼、鈴木 穣、寺嶋 秀騎、佐上 彩、岩崎 渉、深田 吉孝、時計シスエレメント D-box を介したゲノムワイドな転写制御機構の解析、第 22 回日本時間生物学会学術大会（東京都 文京区 東京大学 伊藤国際学術研究センター）2015 年 11 月 21 日（ポスター発表）
32. 寺嶋 秀騎、吉種 光、尾崎 遼、鈴木 穣、榛葉 繁紀、岩崎 渉、深田 吉孝、リズミックな A-to-I RNA 編集による体内時計システムの分子制御、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 BMB2015（神戸、ポートアイランド）2015 年 12 月 4 日（口頭発表）

福澤秀哉（京都大学）

1. 福澤 秀哉、久保 雄昭、大和 勝幸、鈴木 穣、菅野 純夫、伊藤 武彦、谷口 丈晃、黒木 陽子、豊田 敦、伊藤 武彦、新井 理、小原 雄治「緑藻クラミドモナスのストレス応答をゲノムで見る：次世代シーケンサーを用いたゲノム発現データベースの構築」第 51 回 日本植物生理学会　2010 年 3 月 18-21 日（熊本大学　黒髪北キャンパス）
2. **Mari Yanase, Takeaki Kubo, Katusyuki Yamato, Takashi Yamano, Tomoya Satake, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Asao Fujiyama, Takehiko Itoh, Takeaki Taniguchi, Hideya Fukuzawa** "Identification of novel low-CO_2 inducible genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by massive transcriptomic analysis" VIIth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (CCM7), 29 August-2 September, Awaji, Japan, 2010
3. **Yu Sasaki, Yosuke Yamahara, Hirobumi Nakano, Shin-ichiro Ozawa, Yuichiro Takahashi, Hideya Fukuzawa** "Structure and function of the CCM1 complex controlling CO_2 concentrating mechanism in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*" VIIth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (CCM7), 29 August-2 September, Awaji, Japan, 2010
4. **Takashi Yamano, Tomoki Tsujikawa, Kyoko Hatano, Shin-ichiro Ozawa, Yuichiro**

Takahashi, and Hideya Fukuzawa “Light and low-CO_2 dependent LCIB/LCIC complex localization in the chloroplast supports the carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*.” VIIth International Symposium on Inorganic Carbon Utilization by Aquatic Photosynthetic Organisms (CCM7), 29 August-2 September, Awaji, Japan, 2010

5. **浅田 温子、鈴木 穣、菅野 純夫、谷口 丈晃、福澤 秀哉**「緑藻クラミドモナスのゲノム発現データベース KCGD を用いた水素発生関連遺伝子の探索」第 52 回日本植物生理学会　2011 年 3 月 20-22 日（東北大学川内北キャンパス）
6. **柳瀬 麻里、久保 雄昭、鈴木 穣、菅野 純夫、谷口 丈晃、福澤 秀哉**「RNAseq 法による新たな無機炭素濃縮関連遺伝子の探索」第 52 回日本植物生理学会　2011 年 3 月 20-22 日（東北大学川内北キャンパス）
7. **山野 隆志、浅田 温子、福澤 秀哉**「緑藻の CO_2 濃縮機構の制御因子とピレノイド局在因子の解析」、第 27 回ユーグレナ研究集会　2011 年 11 月 12 日（中部大学春日井キャンパス）
8. **Takashi Yamano, Takeaki Kubo, Takeaki Taniguchi, Mari Yanase, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Takehiko Itoh, Asao Fujiyama, Yuji Kohara, Atsushi Toyoda, Tadasu Shin-i, Yoko Kuroki, Hideya Fukuzawa** "Genome-wide response to CO_2 deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii* revealed by RNA-seq analysis" The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 19-21 March 2012（奈良県　東大寺総合文化センター）
9. **Takashi Yamano, Takeaki Taniguchi, Takeaki Kubo, Mari Yanase, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Takehiko Itoh, Asao Fujiyama, Yuji Kohara, Atsushi Toyoda, Tadasu Shin-i, Hideya Fukuzawa** "Genome-wide response to CO_2 deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii* revealed by RNA-seq analysis" 15th International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas June 2012, Potsdam, Germany
10. **山野 隆志、谷口 丈晃、舟津 尚子、中田 光隆、柳瀬 麻里、鈴木 穣、菅野 純夫、福澤 秀哉**「緑藻クラミドモナスにおける CCM1 複合体を介した CO_2 応答性遺伝子の転写調節機構」日本植物学会第 76 回大会　2012 年 9 月 15-17 日（兵庫県立大学　姫路書写キャンパス）
11. **Takashi Yamano, Takeaki Taniguchi, Takeaki Kubo, Mari Yanase, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Takehiko Itoh, Asao Fujiyama, Yuji Kohara, Atsushi Toyoda, Tadasu Shin-i, Hideya Fukuzawa** “Genome-wide response to CO_2 deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii* revealed by RNA-seq analysis.” International Symposium on Genome Science “Expanding Frontiers of Genome Science” 9-10 January 2013（東京大学 伊藤国際学術研究センター）
12. **Lianyong Wang, Takashi Yamano, Masataka Kajikawa, Masafumi Hirono, Hiro Iguchi, Hideya Fukuzawa** “CO_2-requiring mutants defective in CCM-induction generated by high frequency transformation with square electric pulses” 16th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas, 8-13 June 2014（Pacific Grove, CA, USA）
13. **Takashi Yamano, Emi Sato, Hiro Iguchi, Hideya Fukuzawa** “HLA3 and LCIA are associated with inorganic carbon transport in *Chlamydomonas reinhardtii*” 16th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas, 8-13 June 2014（Pacific Grove, CA, USA）
14. **Lianyong Wang, Takashi Yamano, Masafumi Hirono, Hideya Fukuzawa**「CO_2-requiring mutants defective in CCM-induction generated by high frequency transformation with square electric pulses: Is CAS protein essential for CO_2-signaling?」第 11 回クラミドモナス研究会 2014 年 10 月 3-4 日（高知市文化プラザかるぽーと）
15. **山野 隆志、佐藤 江美、井口 ひろ、福澤 秀哉**「葉緑体包膜と細胞膜における HCO_3^- 輸送体」第 11 回クラミドモナス研究会　2014 年 10 月 3-4 日（高知市文化プラザかるぽーと）
16. **Hideya Fukuzawa, Lianyong Wang, Takashi Yamano, Shunsuke Takane** “Molecular components of carbon-dioxide-sensing and regulation of carbon-concentrating mechanism in a green alga, *Chlamydomonas mutants*” 2nd International Symposium on Plant Environmental

Sensing, 13-15 March 2015（産業技術総合研究所　臨海副都心センター）

17. **山野 隆志、佐藤 江美、井口 ひろ、福田 有里、福澤 秀哉**「細胞膜 HLA3 と葉緑体包膜 LCIA は重炭酸輸送に協調的に働き、低 CO_2 環境において光合成を維持する」第 56 回日本植物生理学会年会　2015 年 3 月 16-18 日（東京農業大学　世田谷キャンパス）
18. **山野 隆志、佐藤 江美、井口 ひろ、福田 有里、福澤 秀哉**「細胞膜に局在する HLA3 と葉緑体包膜に局在する LCIA は重炭酸イオンを輸送し緑藻の炭酸固定を支える」第 6 回日本光合成学会年会および公開シンポジウム　2015 年 5 月 22-23 日（岡山国際交流センター）
19. **Hideya Fukuzawa, Takashi Yamano, Masataka Kajikawa** "Regulatory factors controlling expression of bicarbonate transporters revealed by characterization of CO_2-requiring *Chlamydomonas mutants*" Gordon Research Conference - The Dynamics and Regulation of Photosynthesis: From the Origin of Biocatalysis to Innovative Solar Conversion, 28 June-3 July 2015（Bentley University, Waltham, MA）
20. **Lianyong Wang, Takashi Yamano, Ryutaro Tokutsu, Shunsuke Takane, Kosuke Tsuda, Jun Minagawa, Hideya Fukuzawa** "Calcium-sensing receptor homolog, CrCAS, is essential for regulation of carbon-concentrating mechanism in a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*." 第 11 回京大縦横無尽の会ワークショップ　2015 年 7 月 17 日（京都大学　理学研究科セミナーハウス）
21. **山野 隆志、梶川 昌孝、井口 ひろ、水原 初枝、王 連勇、新川 はるか、舟津 尚子、安部 竜樹、小川 真梨菜、津田 高佑、福田 有里、豊川 知華、新川 友貴、後藤 裕樹、椹木 裕里、高根 俊輔、黄瀬 光稀、北田 諒平、坂井 遼太、木平 成子、佐藤 江美、中田 光隆、古谷 憲一、北 悠人、宮崎 葵、福澤 秀哉**「緑藻ランダム挿入変異体ライブラリーの作成と利用」第 12 回クラミドモナス研究会　2015 年 9 月 3-4 日（中央大学後楽園キャンパス）

福重真一（東北大学）

1. Fukushige S, Horii A: MeTA-array, a useful method to identify genes transcriptionally silenced by tumor-specific hypermethylation in cancer. 104th American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2013. 4. 9, Washington DC, USA.
2. 福重 真一、堀井 明：ヒト癌において腫瘍特異的な高度メチル化により転写抑制された遺伝子の MeTA-array による効率的探索法の開発. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012. 9. 20、札幌.

藤井穂高（大阪大学）

1. Locus-specific biochemical epigenetics / chromatin biochemistry by insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP). Hodaka Fujii. Epigenomics, Sequencing & SNiPs-2013 Meeting, July 10 - 11, 2013, Boston, USA.
2. Identification and characterization of promoter-bound molecules involved in transcriptional regulation by insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP). Fujii H: Cold Spring Harbor meeting "Mechanisms of eukaryotic transcription", August 27 - 31, 2013, Cold Spring Harbor, USA.
3. Locus-specific biochemical analysis of genome functions by iChIP and enChIP (locus-specific ChIP). Hodaka Fujii. Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming - 2013 Meeting, November 25 - 26, 2013, Tokyo, Japan.
4. Identification and characterization of promoter-bound molecules involved in transcriptional regulation of Pax5 by insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP)　Fujita T, and Fujii H 第 42 回日本免疫学会総会　2013 年 12 月 10-13 日　千葉

5. Analysis of chromatin mechanisms by locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies. Toshitsugu Fujita, Hodaka Fujii. Keystone Symposia "Chromatin Mechanisms and Cell Physiology". March 23 - 28, 2014, Oberstdorf, Germany.
6. enChIP: a method for locus-specific biochemical analysis of genome functions.　藤田敏次、浅野良則、大塚旬子、高田洋子、斉藤一伸、大木理恵子、藤井穂高　第8回日本エピジェネティクス研究会年会　2013年5月25日-27日　東京
7. Biochemical analysis of lymphocyte lineage commitment using the locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies (iChIP and enChIP). Fujii H: 2nd International Molecular Immunology & Immunogenetics Congress (MIMIC-II). April 27 - 30, 2014, Antalya, Turkey.
8. enChIP: a method for locus-specific biochemical analysis of genome functions. Fujita T, and Fujii H: 11th EMBL Conference: Transcription and Chromatin. August 23 - 26, 2014, Heidelberg, Germany.
9. 人工DNA結合分子を用いた遺伝子改変・遺伝子発現制御・生化学的ゲノム機能解析　藤井穂高　第24回遺伝医学セミナー　2014年9月　大阪
10. Engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法による特定ゲノム領域の単離と結合分子の同定　藤井穂高　第4回ゲノム編集研究会　2014年10月7日　広島
11. Capturing chromatin: biochemical analysis of genome functions using the locus-specific chromatin immunoprecipitation technologies　藤田敏次、藤井穂高　第37回日本分子生物学会年会　2014年11月26日　横浜

藤田知道（北海道大学）

1. 川田慎也、Bao Liang、石橋充浩、巻口勇馬、野田なつみ、日渡祐二、石川雅樹、鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、藤田知道　細胞周期制御因子サイクリン依存性リン酸化酵素A（CDKA）によるストレス応答制御への関与　日本植物学会第79会大会、2015(H27)/9/6-8、新潟市
2. 川田慎也、Bao Liang、石橋充浩、巻口勇馬、野田なつみ、日渡祐二、石川雅樹、 鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、藤田知道　細胞周期進行と環境応答を同時に制御する植物サイクリン依存性キナーゼCDKAの機能解析　第37回日本分子生物学会年会、2014(H26)/11/25-27、神戸市
3. 石橋充浩、巻口勇馬、野田なつみ、日渡祐二、石川雅樹、 鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、藤田知道　ヒメツリガネゴケにおけるCDKAの機能解析　日本植物生理学会年会、2013(H25)/3/21-23、岡山市
4. Yuya Tsuchiya, Kohei Nakamura, Hiroyuki Imai, Yoichi Sakata, Ralph Quatrano, Mitsuyasu Hasebe, Tomomichi Fujita　Cell wall proteins regulates asymmetric and symmetric modes of cell division.　MOSS2012 International Conference、2012(H24)/6/16-18、New York City, NY
5. 藤田知道　ヒメツリガネゴケのストレス耐性細胞Brood cellはどのような細胞か　日本植物学会第79会大会(スペース・モス関連集会)、2015(H27)/9/6-8、新潟市
6. Junling Ren, Yuya Tsuchiya, Mitsuyasu Hasebe, Tomomichi Fujita　The study of a plasma membrane protein involved in cell polarity in Physcomitrella patens　第56回日本植物生理学会年会、2015(H27)/3/16-1、世田谷区
7. Junling Ren, Yuya Tsuchiya, Mitsuyasu Hasebe, Tomomichi Fujita　The study of a plasma membrane protein involved in cell polarity regulation in Physcomitrella patens　MOSS2014 International Conference、2014(H26)/9/25-28、 Beijing, China
8. Ren Junling, Tsuchiya Yuya, Hasebe Mitsuyasu, Fujita Tomomichi　The study of a plasma membrane protein involved in cell polarity regulation in Physcomitrella patens　日本植物学会第78会大会、2014(H26)/9/12-14、川崎市

9. 細木悠太郎、一力綾子、久保稔、鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、藤田知道　Functional Analysis of GRAS Family Transcription Factor that Regulates Asymmetric Cell Division in Physcomitrella patens　第 55 回日本植物生理学会年会、2014(H26)/3/18-20、富山市
10. Ren Junling, Yuya Tsuchiya, Mitsuyasu Hasebe, Tomomichi Fujita　Analysis of a cell wall protein involved in cell polarity in protonemata of Physcomitrella patens　第 55 回日本植物生理学会年会、2014(H26)/3/18-20、富山市
11. Junling Ren, Yuya Tsuchiya, Mitsuyasu Hasebe, Tomomichi Fujita　Analysis of two proteins that are involved in cell polarity in protonemata of Physcomitrella patens　日本植物学会第 77 会大会、2013(H25)/9/13-15、札幌市
12. 細木悠太郎，Ren Junling，Bao Liang，長谷部光泰，藤田知道　ヒメツリガネゴケを用いた極性研究 –植物極性制御の多様性と共通性–　日本植物学会第 77 会大会、2013(H25)/9/13-15、札幌市

藤本 龍（神戸大学）

1. 藤本　龍；川辺　隆大；板橋　悦子；安田　剛志；岡崎　桂一：ハクサイにおけるヒストンメチル化抗体を用いたクロマチン免疫沈降法のポジティブ/ネガティブコントロールプライマーの作製。園芸学会平成 27 年度秋季大会　2015 年 9 月　徳島大学
2. 藤本　龍；川辺 隆大：アブラナ科の雑種強勢の分子機構の解明を目指した後成遺伝学的なアプローチ。日本遺伝学会第 87 大会　2015 年 9 月　東北大学

藤原晴彦（東京大学）

1. 藤原晴彦：昆虫の擬態紋様形成の 分子機構と進化プロセスの解明、公開シンポジウム「複合適応形質の進化」、2010 年 9 月 17 日、東大農学部
2. 山口淳一、藤原晴彦：鱗翅目昆虫のスポット斑紋パターンを生み出す Wnt1 遺伝子上流の Cis エレメント、第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23-25 日、東大駒場キャンパス
3. 溝口喬之、山口淳一、伴野豊、三田和英、山本公子、藤原晴彦：カイコ斑紋突然変異体 Zebra(Ze)の原因遺伝子の探索、第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23-25 日、東大駒場キャンパス
4. 西川英輝、小嶋徹也、藤原晴彦：シロオビアゲハとベニモンアゲハの後翅の赤色色素の比較解析、第 81 回日本動物学会大会、2010 年 9 月 23-25 日、東大駒場キャンパス
5. Mizoguchi, T., Yamaguchi, J., Banno Y., Mita, K., Yamamoto K., and Fujiwara, H.: Investigation of the Gene Responsible for the Larval Striped Pigmentation Pattern of the Silkworm Mutant *Ze.* The 20th CDB Meeting “Molecular bases for evolution of complex traits” February 23-24 (2011), RIKEN CDB in Kobe, Japan.
6. Nishikawa, H., Kojima, T. and Fujiwara, H.: Genes involved in the wing pattern formation of a swallowtail butterfly, *Papilio polytes.* The 20th CDB Meeting “Molecular bases for evolution of complex traits” February 23-24 (2011), RIKEN CDB in Kobe, Japan.
7. Yamaguchi, J., Banno Y., Mita, K., Yamamoto K., and Fujiwara, H.: Mechanism of Twin-Spot Marking Formation on Larval Body of *Lepidoptera.* The 20th CDB Meeting “Molecular bases for evolution of complex traits” February 23-24 (2011), RIKEN CDB in Kobe, Japan.
8. Fujiwara, H., Yamaguchi, J., Shirataki, H., Futahashi, R. and Mizoguchi, T.: Molecular Mechanisms of Pigmentation Pattern Formation in Lepidopteran Larva. The 20th CDB Meeting “Molecular bases for evolution of complex traits” February 23-24 (2011), RIKEN CDB in Kobe, Japan.
9. 枝吉美奈、山口淳一、伴野豊、山本公子、三田和英、藤原晴彦：幼虫体節に一対のコブ状の突起が生じるカイコ変異体（K）の解析、第 82 回日本動物学会大会、2011 年 9 月 21-23 日、旭川、北海道

10. 山口淳一、伴野豊、藤原晴彦：鱗翅目昆虫の幼虫表皮でのスポット紋様形成における *wnt1* の空間的・時間的制御、第 82 回日本動物学会大会、2011 年 9 月 21-23 日、旭川、北海道
11. 依田真一、岡本俊、山口淳一、山本公子、生川潤子、三田和英、伴野豊、蜷木理、藤原晴彦 : カイコ幼虫斑紋遺伝子座 *p* の原因遺伝子探索、第 82 回日本動物学会大会、2011 年 9 月 21-23 日、旭川、北海道
12. 西川英輝、藤原晴彦、山口淳一、二橋亮：シロオビアゲハとベニモンアゲハの蛹期の翅の遺伝子発現の比較解析、第 82 回日本動物学会大会、2011 年 9 月 21-23 日、旭川、北海道
13. 藤原晴彦 : 昆虫の擬態－だましのテクニックの進化、第 114 回東大公開講座、「だます」人・自然・技術の嘘と方便、2011 年 10 月 15 日、東京大学・安田講堂
14. 山口淳一、溝口喬之、藤原晴彦 : 昆虫胚での siRNA 注射による RNAi 効果は long dsRNA よりも高い、第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13－16 日、横浜国際会議場、横浜
15. 山口淳一、溝口喬之、依田真一、枝吉美奈、山本公子、伴野豊、藤原晴彦：蝶や蛾の幼虫体表紋様パターンの多様性を生み出す分子メカニズム、第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13－16 日、横浜国際会議場、横浜
16. 藤原晴彦：蝶のゲノムサイエンスから探る環境適応、日本学術会議公開シンポジウム「環境変動と昆虫科学」、2012 年 3 月 4 日、琉球大学
17. 山口淳一、山本公子、伴野豊、藤原晴彦：Wnt1/wingless による幼虫体表紋様の制御、第 82 回日本蚕糸学会年会、2012 年 3 月 18－19 日、九州大学、福岡
18. 枝吉美奈、山口淳一、伴野豊、山本公子、三田和英、藤原晴彦：カイコ突然変異体コブ(K)の原因遺伝子およびコブ形成メカニズムの解明、第 82 回日本蚕糸学会年会、2012 年 3 月 18－19 日、九州大学、福岡
19. 依田真一、岡本俊、山口淳一、山本公子、生川潤子、三田和英、伴野豊、蜷木理、藤原晴彦：多様な幼虫斑紋を作り出すカイコ p 複対立遺伝子座の原因遺伝子の同定、第 82 回日本蚕糸学会年会、2012 年 3 月 18－19 日、九州大学、福岡
20. 山口淳一、山本公子、伴野豊、藤原晴彦 : Wnt/Wingless による幼虫体表紋様の制御、第 82 回日本蚕糸学会年会、2012 年 3 月 18－19 日、九州大学、福岡
21. 枝吉美奈、山口淳一、伴野豊、山本公子、三田和英、藤原晴彦：カイコ突然変異体コブ（K）の原因遺伝子及びコブ形成メカニズムの解明、第 82 回日本蚕糸学会年会、2012 年 3 月 18－19 日、九州大学、福岡
22. 安藤俊哉、藤原晴彦 : Electroporation と体細胞 transgenesis を介した昆虫における迅速な in vivo 機能解析法、第 83 回日本動物学会年会、2012 年 9 月 13－15 日、大阪大学、大阪
23. 依田真一、岡本俊、山口淳一、山本公子、生川潤子、三田和英、伴野豊、蜷木理、藤原晴彦：多様な幼虫斑紋を作り出すカイコ p 複対立遺伝子座の原因遺伝子の同定、第 83 回日本動物学会年会、2012 年 9 月 13－15 日、大阪大学、大阪
24. 枝吉美奈、山口淳一、伴野豊、山本公子、三田和英、藤原晴彦：真皮細胞の過剰増殖によって生じるカイコ幼虫突起の形成に関わる分子メカニズム、第 83 回日本動物学会年会、2012 年 9 月 13－15 日、大阪大学、大阪
25. 藤原 晴彦、山口淳一、安藤俊哉、西川英輝、二橋亮、枝吉美奈、依田真一：昆虫の擬態紋様形成の分子機構と進化プロセスの解明、新学術領域「複合適応形質の遺伝子基盤」平成２４年度公開シンポジウム、2012 年 9 月 26 日、東京大学農学部弥生講堂、東京
26. Fujiwara H., Yamaguchi J., Ando T., Ijima T., Hori H., Toyoda A., Ito T., Hirakawa H., Kosugi S., Fujiyama A., Suzuki Y., Sugano S., Nishikawa H., Futahashi R. and Shirataki H. : The Papilio genome project to understand various types of protective mimicry. International Symposium on Genome Science, Expanding Frontiers of Genome Science, Jan. 9-10 (2013) University of Tokyo, Hongo, Japan

27. 山口淳一、依田真一、藤原晴彦：Wnt1 が制御する幼虫紋様形成の分子メカニズムとその保存性について、日本蚕糸学会第 83 回大会、2013 年 3 月 18 日-19 日、農林水産省技術会議事務局筑波事務所本館、つくば市
28. 枝吉美奈、山口淳一、山本公子、三田和英、伴野豊、藤原晴彦：ジャコウアゲハ幼虫外皮を突出させる特殊な細胞周期、日本蚕糸学会第 83 回大会、2013 年 3 月 18 日-19 日、農林水産省技術会議事務局筑波事務所本館、つくば市
29. Yamaguchi, J., Yamamoto, K., Bannno, Y. and Fujiwara, H. : Wnt1/winglress generates spot-pigmentation on a larval body. Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology, April 8-9, (2012) Chongqing, China.
30. Fujiwara, H., Shirai, H., Kamimura, M. and Yamaguchi, J. : Two adjacent cis-regulatory elements are required for the ecdysone response of ecdysone receptor (EcR) gene in Lepidoptera. International Congress of Entomology 2012, Aug. 19-25. (2012) Daegu, Korea
31. Fujiwara, H., Yamaguchi J., Ando T., Ijima, T., Hori, H., Toyoda, A., Ito, T., Hirakawa, H., Kosugi, S., Fujiyama, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Nishikawa, H., Futahashi, R. and Shirataki, H. : The Papilio genome project to understand various types of mimicry. Plant and animarl genome conference ASIA, March 17-19 (2013) Singapore.

布施直之（京都大学）

1. 布施直之「ゲノムの視点から迫るショウジョウバエの暗闇適応のメカニズム」　第８回 Evo-devo 青年の会「進化の実証を試みる」　2015 年 6 月 27 日　名古屋大学

二又裕之（静岡大学）

1. Flexible metabolic changes caused by cell-to-cell interaction have relevance to community succession, self-organizing mechanism, and stability of microbial ecosystem. Kenshi Suzuki, Fatma Azwani, Yuma Inuzuka, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata 2015.5.30-6.2 ASM2015 (New Orleans, Louisiana, USA)
2. 三菌株混合培養系における代謝変化と遺伝子発現制御（Alternation of gene expression contributes to system stability in a model microbial ecosystem）鈴木研志、犬塚友麻、Fatma Azwani、田代陽介、二又裕之　日本農芸化学会 2015 年 3 月 29 日（岡山市、岡山大学）
3. 異属三菌株のフェノール分解代謝経路の解析と発現制御　鈴木研志 [1]、犬塚友麻 [1]、Fatma Azwani[2]、田代陽介 [1]、二又裕之 [1]　環境微生物系学会合同大会 2014　2014 年 10 月 22 日　静岡県浜松市（アクトシティ浜松）
4. *Pseudomonas* sp. C8 株由来の増殖抑制物質の探索および作用機構の解析　犬塚友麻 [1]、鈴木研志 [1]、Fatma Azwani[2]、邱偉涛 [3]、小堀一 [3]、河岸洋和 [3]、田代陽介 [1]、二又裕之 [1]　環境微生物系学会合同大会 2014　2014 年 10 月 22 日　静岡県浜松市（アクトシティ浜松）
5. 混合連続集積培養系におけるシステムの安定性と代謝機構◦鈴木研志、Fatma Azwani、犬塚友麻、田代陽介、二又裕之　第 66 回日本生物工学会　2014 年 9 月 11 日　北海道札幌市（札幌コンベンションセンター）
6. シンセテティック・エコロジーの始動　菊地淳、二又裕之　第 66 回日本生物工学会シンポジウム　2014 年 9 月 9 日　北海道札幌市（札幌コンベンションセンター）
7. Bacterial community dynamics by interactive compounds from *Pseudomonas* sp. C8. Yuma Inuzuka[1], Kenshi Suzuki[1], Fatma Azwani[2], Yosuke Tashiro[1], Hajime Kobori[3],Wei Tao Qui[3], Hirokazu Kawagishi[3], Hiroyuki Futamata [1] ISME-15 2014 24th Aug. to 29 th Aug. Soul Korea
8. Cell-to-cell interaction and metabolic flexibility contribute to homeostasis of microbial ecosystem.　Kenshi Suzuki[1], Fatma Azwani[2],Yuma Inuzuka[1], Yosuke Tashiro[1], and Hiroyuki Futamata [1]　ISME-15 2014 24th Aug. to 29 th Aug. Soul Korea
9. Dramatic Alteration of Metabolic Processes under the Cell-to-Cell Interaction. Kenshi Suzuki[1], Fatma Azwani[2], Yuma Inuzuka[1], Hajime Kobori[3], Wei Tao Qui[3], Yosuke Tashiro[1], Hirokazu Kawagishi[3], and Hiroyuki Futamata [1] IUMS 2014 27th July to 1st Aug. Montreal, Canada

10. 微生物生態系におけるシステムの安定維持および優占種変遷機構　鈴木研志　第 2 回微生物系研究セミナー　2014 年 5 月 23 日　静岡県浜松市（静岡大学）
11. *Pseudomonas* sp. C8 株培養上清による増殖抑制効果の解析　犬塚友麻　第 2 回微生物系研究セミナー　2014 年 5 月 23 日　静岡県浜松市（静岡大学）
12. 東京工業大学研究会：微生物の世界を数理モデルで語る　題目「微生物生態系における共存機構を探る」二又裕之、Fatma Azwani、鈴木研志　2014 年 3 月 26 日　東京工業大学（東京都港区芝浦 3-3-6）
13. NGiME (Next Generation in Microbial Ecology)勉強会　題目「微生物生態系成立機構の理解へのアプローチ」　二又裕之　2014 年 2 月 23 日　愛媛大学（愛媛県松山市）
14. 非線形現象の数理を考えるセミナー　題目「微生物生態系の持つ原理とはナニかな」二又裕之　2014 年 1 月 21 日　京都市
15. 「生態系をひもとく数学・生物学・社会学」研究会　題目「微生物生態系の理解に向けて−混合培養系における個の振る舞いと全体の挙動ー」　二又裕之　2013 年 12 月 13 日　首都大学東京（東京都八王子市）
16. 藪田セミナー　生物間コミュニケーション研究の最前線　題目「モデル微生物生態系におけるシステムの動的平衡と微生物間の相互作用」　鈴木研志、犬塚友麻、邱偉涛、小堀一、河岸洋和、田代陽介、二又裕之　2013 年 12 月 6 日　アクトシティ浜松コングレスセンター（浜松市）
17. Population dynamics and cell-to-cell interaction in a model microbial ecosystem. Kenshi Suzuki, Fatma Azwani, Yuma Inutsuka, Yosuke Tashiro, and Hiroyuki Futamata. UPM-Shizuoka University International colloquium 2014. 3rd March 2014. Malaysia (Universiti Putra Malaysia)
18. Analysis of the growth repressing compounds secreated from *Pseudomonas* sp. C8. Yuma Inutsuka, Kenshi Suzuki, Fatma Azwani, Yosuke Tashiro, Hajime Kobori, Wei Tao Qui, Hirokazu Kawagishi, and Hiroyuki Futamata. UPM-Shizuoka University International colloquium 2014. 3rd March 2014. Malaysia (Universiti Putra Malaysia)
19. *Pseudomonas* sp. C8 株と *Comamonas testosterone* R2 株における菌株間相互作用の解析　鈴木研志、Fatma Azwani、犬塚友麻、田代陽介、Wei Tao Qui、河岸洋和、二又裕之　第２９回日本微生物生態学会　2013 年 11 月 23 日　鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）
20. *Pseudomonas* sp. C8 株の培養上清が環境微生物の増殖に及ぼす影響　犬塚友麻、鈴木研志、田代陽介、二又裕之　第２９回日本微生物生態学会　2013 年 11 月 23 日　鹿児島大学（鹿児島県鹿児島市）
21. 異属菌株間における相互作用の解析　鈴木研志、Fatma Azwani、犬塚友麻、田代陽介、二又裕之　第 44 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会　2013 年 11 月 2 日　静岡大学（静岡県浜松市）
22. 環境微生物の増殖に及ぼすフェノール資化性 *Pseudomonas* sp. C8 株の培養上清の影響　犬塚友麻、鈴木研志、田代陽介、二又裕之　第 44 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会　2013 年 11 月 2 日　静岡大学（静岡県浜松市）
23. フェノール資化性 *Pseudomonas* sp. C8 株由来の異属細菌増殖抑制物質の探索　鈴木研志、Fatma Azwani、犬塚友麻、田代陽介、二又裕之　第６５回日本生物工学会　2013 年 9 月 20 日　広島国際会議場（広島県広島市）
24. 土壌細菌 *Pseudomonas* sp. C8 株と異属細菌間における相互作用　鈴木研志、Fatma Azwani、犬塚友麻、長谷川雄将、田代陽介、二又裕之　2013 年度日本土壌肥料学会 2013 年 9 月 11 日　名古屋大学（愛知県名古屋市）
25. Population dynamics and bacterial interaction in a model phenol-degrading bioreactor. Kenshi Suzuki, Fatma Azwani and Hiroyuki Futamata. WET-2013　2013 年 6 月 16 日　東京農工大（東京都小金井）
26. フェノール資化性 *Pseudomonas* sp. C8 株の異属細菌に及ぼす相互作用機構　◦鈴木研志、Fatma Azwani、二又裕之　環境バイオテクノロジー学会　2013 年 5 月 30 日　北九州国際会議場（福岡県北九州市）

27. Characterization of cell-to-cell communication by *Pseudomonas* sp. strain C8. ○Kenshi Suzuki[1], Fatma Azwani[2], and Hiroyuki Futamata[1]　超領域日中韓国際シンポジウム　2013 年 1 月 8 日　静岡県静岡市（グランシップ）
28. Characterization of cell to cell interaction by *Pseudomonas* sp. C8. ○Kenshi Suzuki[1], Fatma Azwani[2], and Hiroyuki Futamata[2].　第２８回日本微生物生態学会　2012 年 9 月 20 日　愛知県豊橋市（豊橋技術科学大学）

古澤 力（理化学研究所）

1. 堀之内貴明, 鈴木真吾, 小野直亮, 玉岡邦康, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, 古澤力「大腸菌実験室進化によるエタノールストレス環境に対する適応過程のマルチオミックス解析」生命情報科学若手の会第 4 回研究会，2012 年 3 月 1 日，岡崎
2. 古澤力,「大腸菌の人工進化実験を用いた適応進化ダイナミクスの解析」，第 85 回細菌学会総会シンポジウム，2012 年 3 月 27 日，長崎
3. 古澤力,「変動する環境下での人工進化実験による進化過程の解析」，新学術領域複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」平成 24 年度公開シンポジウム，2012 年 9 月 26 日，東京
4. 堀之内貴明, 鈴木真吾, 小野直亮, 玉岡邦康, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, 古澤力「進化実験から得られたエタノール耐性大腸菌のマルチオミックス解析」第 64 回日本生物工学会大会，2012 年 10 月 23 日，神戸
5. 堀之内貴明, 鈴木真吾, 小野直亮, 玉岡邦康, 平沢敬, 四方哲也, 清水浩, 古澤力「実験室進化とマルチオミックス解析によるストレス耐性大腸菌の創成」第３回・新規材料創製を目指した合成生物学，2012 年 11 月 16 日，和光
6. 古澤力,「大腸菌人工進化実験の表現型/遺伝子型解析 ～複数の時間スケールが絡み合うダイナミクスの理解を目指して～」，複雑生命システム動態研究教育拠点第四回全体会議，2013 年 7 月 20 日，東京
7. 古澤力,「大腸菌の実験室進化系を用いた適応進化ダイナミクスの解析」，Interdisciplinary Symposium on Advanced Biology and Biotechnology，2013 年 12 月 13 日，筑波
8. 古澤力,「生物システムの多階層性を （理論/実験）から理解する」，第２回 NINS Colloquium『自然科学の将来像』，2013 年 12 月 16 日，箱根

古田芳一（マサチューセッツ工科大学）

1. 古田芳一、小林一三：Methylome diversification through changes in the sequence specificity of DNA methyltransferases、第 87 回日本細菌学会総会、P2-171、東京、2014 年 3 月 28 日、ポスター発表
2. 古田芳一、南波宏枝、柴田朋子、西山智明、重信秀治、鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、小林一三：PacBio RS を用いたピロリ菌メチロームの種内比較解析、第 8 回日本ゲノム微生物学会年会、1P-019、東京、2014 年 3 月 8 日、ポスター発表
3. 古田芳一、南波宏枝、柴田朋子、西山智明、重信秀治、鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、小林一三：DNA メチル化系の認識配列変換によるメチローム多様化：種内複数株でのメチローム解読からの証拠、第 36 回日本分子生物学会年会、3P-0034、兵庫、2013 年 12 月 5 日、ポスター発表
4. 古田芳一、南波宏枝、柴田朋子、西山智明、重信秀治、鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、小林一三：一分子リアルタイム(SMRT)シークエンシングによるメチローム解読と「エピジェネティクス駆動進化」仮説、日本遺伝学会第 85 回大会、WS9-1、神奈川、2013 年 9 月 21 日、口頭発表
5. 古田芳一、南波宏枝、柴田朋子、西山智明、重信秀治、鈴木穣、菅野純夫、長谷部光泰、小林一三：DNA メチル化系の認識配列変換によるメチローム多様化：種内複数株でのメチローム解読からの証拠、日本進化学会第 15 回大会、3A-13、茨城、2013 年 8 月 30 日、口頭発表

細道一善（金沢大学）

1. Shin Goto, Kazuyoshi Hosomichi, Hiroyasu Tsukaguchi, Ichiei Narita, Exome Sequencing Identifies a Novel EEA1 Variant in Japanese Familial IgA Nephropathy, American Society of Nephrology Kidney Week 2012、2012 年 10 月 30 日～2012 年 11 月 4 日、San Diego, USA
2. Kazuyoshi Hosomichi、The impact of NGS on HLA research.YARSI GENOMIC MEDICINE CONFERENCE 2015、6 May, 2015、Universitas YARSI (Jakarta, Indonesia)
3. 細道一善、井ノ上逸朗、Phase-defined シーケンシングによる HLA 遺伝子配列完全決定とパイプライン、第 58 回日本人類遺伝学会、2013 年 11 月 20 日-23 日、江陽グランドホテル(宮城)
4. 細道一善、中岡博史、清水まり恵、中島文明、井ノ上逸朗、次世代シーケンサーによる骨髄ドナー登録者の HLA タイピング法の開発（Ⅱ）、第 22 回日本組織適合性学会大会、2013 年 9 月 14 日-16 日、コラッセふくしま(福島)
5. 細道一善、Kapa エンジニア酵素を利用したヒトの主要組織適合遺伝子複合体（HLA）タイピング法の開発事例、NGS 現場の会 第三回研究会、2013 年 9 月 4 日-5 日、神戸国際会議場(兵庫)
6. 細道一善、井ノ上逸朗、Phase-defined シーケンシングによるヒト主要組織適合遺伝子複合体(HLA)遺伝子配列の完全決定法、NGS 現場の会 第三回研究会、2013 年 9 月 4 日-5 日、神戸国際会議場(兵庫)
7. 細道一善、ゲノム医科学研究ツールとしての HLA 領域の統合的ゲノム解析、2013 アジレントゲノミクスフォーラム、2013 年 6 月 11 日、国際ファッションセンター(東京)
8. 細道一善、屋部登志雄、椎名隆、田嶋敦、井ノ上逸朗、同種造血幹細胞移植成績向上を目指した KIR ハプロタイプ解析手法の確立、第 60 回日本人類遺伝学会、2015 年 11 月 19-22 日、京王プラザホテル(東京)
9. 細道一善、屋部登志雄、椎名隆、田嶋敦、井ノ上逸朗、同種造血幹細胞移植成績向上を目指した KIR ハプロタイプ解析手法の確立、第 24 回日本組織適合性学会大会、2015 年 9 月 10-12 日、ホテルレイクビュー水戸(茨城)

堀江恭二（奈良県立医科大学）

1. 堀江恭二、吉田純子 ホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた包括的遺伝子機能解析 第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 26 日　横浜
2. 堀江恭二 ホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた迅速な表現型スクリーニング. 理研シンポジウム 2013 年 6 月 28 日 つくば

堀川幸男（岐阜大学）

1. 塩谷真由美、堀川幸男、横山恵子、川田純子、土田宏美、廣田卓男、諏訪哲也、武田純、BLM 遺伝子のエクソン 1 欠損と MODY との関係についての検討、第 57 回　日本糖尿病学会年次学術集会　2014 年 5 月 24 日　大阪
2. 堀川幸男、若年発症糖尿病の遺伝素因の解明、第 59 回　日本人類遺伝学会　2014 年 11 月 21 日　東京　（シンポジウム）
3. 堀川幸男、日本人若年糖尿病（MODY）研究における内科-小児科連携構築の提言、第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会　2015 年 5 月 21 日　下関　（シンポジウム）
4. 塩谷真由美、堀川幸男、橋本健一、廣田卓男、諏訪哲也、間部裕代、福嶋　恵、大橋正明、池田富貴、武田　純、日本人 MODY6 の 4 症例についての検討、第 58 回日本糖尿病学会学術集会　2015 年 5 月 22 日　下関
5. 堀川幸男、日本人若年糖尿病の新規原因遺伝子同定戦略とその展開、第 58 回日本糖尿病学会学術集会　2015 年 5 月 22 日　下関　（シンポジウム）
6. 福嶋　恵、春名英典、清水ゆう、山口里恵、椿原麻由子、庄野哲夫、大山　昇、塩谷真由美、堀川幸男、武田純、田久保憲行、清水俊明、MODY6 と診断された 1 家系の臨床経過、第 49 回小児内分泌学会　学術集会　2015 年 10 月 8 日　東京

7. 間部裕代、遠藤文夫、塩谷真由美、堀川幸男、武田　純、MODY6 と診断された親子例、第 49 回小児内分泌学会　学術集会　2015 年 10 月 8 日　東京
8. 斎藤朋洋、矢ケ崎英晃、大堀淑恵、牧野耕一、小林基章、小林浩司、太田正法、堀川幸男、武田　純、杉田莞爾、GH 治療を行っている Glucokinase 遺伝子異常がある SGA 性低身長症の 1 例、第 49 回小児内分泌学会　学術集会　2015 年 10 月 8 日　東京
9. 塩谷真由美、堀川幸男、武田　純、日本人 MODY6 の 4 症例についての検討、第 60 回日本人類遺伝学会　2015 年 10 月 17 日　東京

本郷裕一（東京工業大学）

1. Ajeng K. Pramono, Akinori Yamada, Hirokazu Kuwahara, Yuji Mochizuki, Takako Mabuchi, Osamu Kitade, Nathan Lo, Shigeharu Moriya, Atsushi Toyoda, Takehiko Itoh, Moriya Ohkuma, Yuichi Hongoh, "Comparative genomics of the nitrogen-fixing endosymbionts of the cellulolytic protists Pseudotrichonympha spp. in the gut of termites" 18th International Congress on Nitrogen Fixation (ICNF18)（宮崎）(2013.10.18)　**Best Poster Award**
2. Yuichi Hongoh, "Evolution of nitrogen-fixing endosymbionts of termite-gut protists" 14th International Union for the Study of Social Insects (IUSSI14) (Cairns, Australia) (2014.7.20)（招待講演）

本田賢也（慶應義塾大学）

1. Kenya Honda「Regulation of Th17 and Treg cells by the gut microbiota」109th International Titisee Conference, International symposium　（ドイツ, Titisee, Apr 11, 2014）

前川清人（富山大学）

1. Maekawa K, Saiki R, Hayashi Y, Watanabe D, Shigenobu S & Miura T (20-21 Jan, 2015) Genome sequences and transcriptomes reveal insights into proximate mechanisms during caste differentiation of termites. International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II" (Hitotsubashi Hall, Tokyo).
2. 前川清人，齊木亮太，矢口甫，増岡裕大（2014 年 11 月 23 日）シロアリにおけるカースト分化の分子基盤：重要遺伝子の発現と機能．平成 26 年度日本動物学会中部支部大会（のと勤労者プラザ）.
3. 前川清人，重信秀治，三浦徹（2014 年 3 月 27 日）シロアリが示す高度な社会システムの発生遺伝学的な背景を探る．第 58 回日本応用動物昆虫学会（高知大学）.

前田和彦（大阪大学）

1. Kazuhiko Maeda, Mayuko Shimoda, Shailendra Kumar Singh, Sarah Ameen Almofty, Mohammed Mansour Abbas Eid, Nobuo Sakaguchi、Regulation of selective non-coding RNA species involved in B-cell maturation by AID-interacting molecule GANP、Keystone Symposia The Golden Anniversary of B Cell Discovery, March 22- 27, 2015 - Fairmont Banff Springs - Banff, Alberta, Canada
2. Shailendra Kumar Singh, Mayuko Shimoda, Kazuhiko Maeda, and Nobuo Sakaguchi, GANP interacts *c-myc* gene and translation initiation factor 4E associated with Burkitt's lymphomagenesis、第 44 回日本免疫学会学術集会 2015 年 11 月 18 日（水）～20 日（金）札幌コンベンションセンター

前田太郎（基礎生物学研究所）

1. 前田太郎「ウミウシの盗葉緑体現象が示唆する新しい進化原理」日本生化学会：生化学若い研究者の会秋のセミナー　2015 年 11 月 14 日　大阪大学吹田キャンパス（大阪府）

2. 前田太郎 「ウミウシの盗葉緑体現象：遺伝子を伴わない葉緑体の水平伝播」日本植物学会第 79 回大会　2015 年 9 月 6 日　朱鷺メッセ（新潟県）
3. 前田太郎「ウミウシにおける外来葉緑体の PSII 活性維持機構」日本植物生理学会：関連集会：第 17 回植物オルガネラワークショップ 2015 年 3 月 15 日　東京大学駒場キャンパス(東京都)
4. 前田太郎「マリアージュ ： ウミウシが餌海藻の葉緑体を細胞内で保持するメカニズム」第 58 回日本応用動物昆虫学会大会 2014 年 3 月 27 日高知大学(高知県)
5. Taro Maeda, Euichi hirose, Yoshito Chikaraishi, Masaru Kawato, Kiyotaka Takishita, Takao Yoshida, Heroen Verbruggen, Jiro Tanaka, Shigeru Shimamura, Yoshihiro Takaki, Masashi Tsuchiya, Kenji Iwai, Shuji Shigenobu, Tadashi Maruyama, "*Plakobranchus ocellatus* (Sacoglossa) continuously qcquires kleptoplasts and nutrition from multiple algal species in nature", World congress of malagology, **22-26 July 2013**, Azores University, Ponta delgada, Portuguesa,
6. 前田太郎「ウミウシにおける盗葉緑体現象の紹介」第2回細胞共生若手の会 2013年9月21-22日京都大学 (京都府)

槇宏太郎（昭和大学）

1. Yamaguchi T, Hosomichim K, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Park SB, Inoue I, Maki K. A novel causative gene for permanent tooth agenesis. 8th International Orthodontic Congress, 27-30, September 2015 London, UK
2. Yamaguchi T, Hosomichi K, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Park SB, K Maki, Inoue I. A novel causative gene for permanent tooth agenesis. The 16th Congress of International Society of Craniofacial Surgery, 14-18, September, 2015 Chiba, Japan
3. 山口徹太郎、芳賀秀郷、方山光朱、中脇貴俊、富田大介、槇宏太郎. 下顎前歯先天欠如の原因遺伝子の同定. 第 25 回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会, 2015 年 6 月 4 日～5 日　　東京
4. 山口徹太郎、細道一善、芳賀秀郷、方山光朱、中脇貴俊、冨田大介、大塚裕忠、野中直子、中村 雅典、井ノ上逸朗、槇宏太郎非症候群性永久歯先天欠如の新規原因遺伝子の同定. 昭和大学歯学部 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 26 年度シンポジウム 「次世代型顎口腔組織再生医療の研究開発拠点形成」研究成果発表会, 2015 年 3 月 28 日, 東京
5. Yamaguchi T, Hosomichi K, Kim YI, Yano K, Haga S, Katayama K, Park SB, Maki K, Inoue I. A novel causative gene for permanent tooth agenesis. International symposium on Genome Science 2015, 20-21, January 2015, Tokyo
6. 山口徹太郎、細道一善、矢野圭介、芳賀秀郷、方山光朱、中脇貴俊、冨田大介、中村 雅典、上條竜太郎、井ノ上逸朗、槇宏太郎. 永久歯先天欠如の新規原因遺伝子. 第 73 回 日本矯正歯科学会大会, 2014 年 10 月 20 日～22 日, 千葉

牧野能士（東北大学）

1. 牧野 能士、Experimental verification for gene loss pattern after whole genome duplication、酵母マルチオミクス研究会、2015 年 6 月 12 日、日本歯科大学
2. 牧野 能士、全ゲノム重複後の遺伝子進化、酵母マルチオミクス研究会、2016 年 1 月 27 日、サントリー ワールド リサーチセンター

松浦秀幸（大阪大学）

1. 岸田百世，松浦秀幸，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正．高温ストレス条件下の植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析．分子生物学会．2015 年 12 月．神戸．
2. 御田洋介，松浦秀幸，高橋弘喜，岸田百世，加藤晃，平田收正．植物において翻訳促進機能を有するアンチセンス RNA の網羅的探索．分子生物学会．2015 年 12 月．神戸．

3. 岸田百世，松浦秀幸，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正．CAGE 法を用いた植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析．第 4 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム．2015 年 1 月．京都大学.
4. 松浦秀幸. CAGE 解析を用いて植物におけるストレス環境下での翻訳制御メカニズムに迫る．理化学研究所公開シンポジウム「遺伝子発現解析から転写産物解析へ」．2014 年 11 月．横浜理研.
5. 松浦秀幸．植物の翻訳制御機構研究 ～個別遺伝子解析から次世代シーケンサーを用いた網羅的解析へ～．NGS 現場の会 第三回研究会．2013 年 9 月．神戸.
6. 岸田百世，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正，松浦秀幸．高温ストレス条件下の植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析．第 16 回日本 RNA 学会年会．2014 年 7 月．名古屋.

松岡邦枝（東京都医学総合研究所）

1. 松岡邦枝、安田俊平、宮坂勇輝、和田健太、設楽浩志、山口碧、多屋長治、吉川欣亮：内耳外有毛細胞選択的破壊マウスを用いた特異遺伝子の探索．第 62 回日本実験動物学会総会．2015. 5. 28．京都
2. 松岡邦枝、宮坂勇輝、和田健太、安田俊平、設楽浩志、山口碧、多屋長治、吉川欣亮：Oncomodulin ノックアウトマウスにおける聴覚障害．第 63 回日本実験動物学会総会．2015. 5. 18-20．川崎（発表予定）

松岡雅雄（京都大学）

1. Keiko Yasuma, Jun-ichirou Yasunaga, Keiko Takemoto, Kenji Sugata, Norihiro Takenouchi, Masanori Nakagawa, Yutaka Suzuki, and Masao Matsuoka. Identification of TIGIT as an HBZ-induced gene by genome-wide analyses: its association with evasion of host defense. 17th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses. 2015 年 6 月 19 日, Trois Ilets, Martinique, French West Indies, フランス
2. Keiko Yasuma, Jun-ichirou Yasunaga , Masao Matsuoka. Genome-wide analyses identify TIGIT as an HTLV-1 bZIP factor-induced gene. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、名古屋

松尾洋孝（防衛医科大学校）

1. Airi Akashi, Hirotaka Matsuo, Ken Yamamoto, Hirofumi Nakaoka, Akiyoshi Nakayama, Masayuki Sakiyama, Atsushi Takahashi, Takahiro Nakamura, Yuki Tanahashi, Nobuyuki Hamajima, Ituro Inoue, Michiaki Kubo, Kimiyoshi Ichida, Hiroshi Ooyama, Toru Shimizu, Nariyoshi Shinomiya: Genome-wide association study of clinically-ascertained gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes, The13th International Congress of Human Genetics, 2016.4.3-7, Kyoto (Japan) (演題採択済)
2. 松尾洋孝、山本健、中岡博史、中山昌喜、崎山真幸、高橋篤、中村好宏、中島宏、高田雄三、檀上稲穂、清水聖子、立川誠四郎、櫻井裕、浜島信之、井ノ上逸朗、久保充明、市田公美、大山博司、清水徹、四ノ宮成祥: ゲノムワイド関連解析による痛風の新規遺伝子座の同定と臨床病型との関連，日本人類遺伝学会 第 60 回大会, 2015.10.15, 東京
3. Hirotaka Matsuo, Ken Yamamoto, Hirofumi Nakaoka, Akiyoshi Nakayama, Masayuki Sakiyama, Atsushi Takahashi, Takahiro Nakamura, Hiroshi Nakashima, Inaho Danjoh, Yusuke Kawamura, Tappei Takada, Yutaka Sakurai, Tatsuo Hosoya, Nobuyuki Hamajima, Ituro Inoue, Michiaki Kubo, Kimiyoshi Ichida, Hiroshi Ooyama, Toru Shimizu, Nariyoshi Shinomiya: Genome-wide association study (GWAS) of gout identifies multiple risk loci related to metabolic pathways, 17th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2015.9.9, Chennai (India) **【Best Abstracts Award 受賞】**
4. Akiyoshi Nakayama, Hirotaka Matsuo, Hirofumi Nakaoka, Takahiro Nakamura, Hiroshi Nakashima, Tappei Takada, Masayuki Sakiyama, Kenji Wakai, Tatsuo Hosoya, Yutaka Sakurai,

Kimiyoshi Ichida, Nariyoshi Shinomiya: Common genetic defects of ABCG2 have stronger effect than typical environmental risks for hyperuricemia, 17th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress, 2015.9.9, Chennai (India) **【Best Abstracts Award 受賞】**

5. 松尾洋孝、山本健、中岡博史、中山昌喜、崎山真幸、檀上稲穂、河村優輔、立川誠四郎、中村幸夫、浜島信之、井ノ上逸朗、久保充明、大山博司、清水徹、四ノ宮成祥: 痛風のゲノムワイド関連解析:新規遺伝子座の同定と臨床病型との関連, 第 33 回日本ヒト細胞学会学術集会, 2015.8.22-23, 宮崎
6. 崎山真幸、松尾洋孝: 尿酸トランスポーター遺伝子多型による痛風の発症リスク（シンポジウム）, 第 10 回トランスポーター研究会年会, 2015.6.21, 東京
7. 立川誠四郎、松尾洋孝、山本健、中岡博史、中山昌喜、崎山真幸、高田雄三､清水聖子、河村優輔、小縣開、高田龍平、井上勝央、加藤将夫、櫻井裕、鈴木洋史、金井好克、浜島信之、井ノ上逸朗、久保充明、市田公美、大山博司、清水徹、四ノ宮成祥: 第 10 回トランスポーター研究会年会, 2015.6.20-21, 東京
8. Hirotaka Matsuo, Ken Yamamoto, Hirofumi Nakaoka, Akiyoshi Nakayama, Masayuki Sakiyama, Tappei Takada, Nobuyuki Hamajima, Michiaki Kubo, Kimiyoshi Ichida, Hiroshi Ooyama, Toru Shimizu, Nariyoshi Shinomiya: Genome-wide association study (GWAS) of gout identifies multiple risk loci: a clue for future companion diagnostics of gout, The 16th International Symposium of the Purine and Pyrimidine Society, 2015.6.6-9, New York (USA)
9. Hirotaka Matsuo: Genetics of urate transporter genes and their roles in gout and hyperuricemia, The 16th International Symposium of the Purine and Pyrimidine Society, 2015.6.6-9, New York (USA)
10. Akiyoshi Nakayama, Hirotaka Matsuo, Tatsuo Hosoya, Kimiyoshi Ichida, Nariyoshi Shinomiya: Genetic effect of ABCG2 is stronger than environmental effects for hyperuricemia progression, 59th Annual General Assembly and Scientific Meeting of the Japan College of Rheumatology, 2015.4.23, Nagoya **【JCR2015 International Workshop Award 受賞】**
11. Hirotaka Matsuo, Akiyoshi Nakayama, Masayuki Sakiyama, Toshinori Chiba, Seiko Shimizu, Hiroshi Nakashima, Takahiro Nakamura, Yuzo Takada, Tappei Takada, Hirofumi Nakaoka, Kenji Wakai, Sayo Kawai, Yin Guang, Hiroko Nakagawa, Toshimitsu Ito, Ken Yamamoto, Yutaka Sakurai, Kimiyoshi Ichida, Toru Shimizu, Nariyoshi Shinomiya: ABCG2 dysfunction causes not only renal urate overload hyperuricemia but also renal urate underexcretion hyperuricemia, 第 25 回日本疫学会学術総会, 2015.1.23, 名古屋
12. 中山昌喜、松尾洋孝、中岡博史、中村好宏、中島宏、高田雄三、及川雄二、高田龍平、崎山真幸、清水聖子、千葉俊周、若井建志、川合紗世、岡田理恵子、田村高志、七条由佳、赤司藍理、櫻井裕 、市田公美、四ノ宮成祥: Genefic effect by dysfunctional variants of ABCG2 is stronger than environmental effects for hyperuricemia, 第 25 回日本疫学会学術総会, 2015.1.23, 名古屋
13. 中山昌喜、松尾洋孝、中岡博史、中村好宏、中島宏 、高田雄三、及川雄二、高田龍平、崎山真幸、清水聖子、千葉俊周、若井建志、櫻井裕、市田公美、四ノ宮成祥: 高尿酸血症の発症において ABCG2 遺伝子変異による影響は生活習慣より強い, 第 59 回日本人類遺伝学会総会, 2014.11.21, 東京
14. 松尾洋孝、中山昌喜、崎山真幸、千葉俊周、清水聖子、中島宏、中村好宏、高田雄三、中岡博史、若井建志、伊藤利光、山本健、市田公美、清水徹、四ノ宮成祥: 尿酸排泄輸送体 ABCG2 遺伝子の機能低下型変異は腎排泄低下型と腎負荷型高尿酸血症の両方の原因となる, 第 59 回日本人類遺伝学会総会, 2014.11.20, 東京
15. Hirotaka Matsuo, Akiyoshi Nakayama, Masayuki Sakiyama, Toshinori Chiba, Seiko Shimizu, Hiroshi Nakashima, Hirofumi Nakaoka, Kenji Wakai, Toshimitsu Ito, Ken Yamamoto, Yutaka Sakurai, Kimiyoshi Ichida, Toru Shimizu, Nariyoshi Shinomiya: ABCG2 dysfunction causes renal underexcretion hyperuricemia as well as renal overload hyperuricemia, American Society of Human Genetics 2014 Annual Meeting, 2014.10.18-22, San Diego (USA)

16. Akiyoshi Nakayama, Hirotaka Matsuo, Kimiyoshi Ichida, Tappei Takada, Hiroshi Nakashima, Takahiro Nakamura, Yuzo Takada, Seiko Shimizu, Masayuki Sakiyama, Nobuyuki Hamajima, Yutaka Sakurai, Toru Shimizu, Nariyoshi Shinomiya: A major risk of early-onset gout: ABCG2 dysfunction in a Japanese male population, 20th IEA World Congress of Epidemiology, 2014.8.17-21, Anchorage (USA)
17. Hirotaka Matsuo, Kimiyoshi Ichida, Tappei Takada, Akiyoshi Nakayama, Hiroshi Nakashima, Takahiro Nakamura, Yusuke Kawamura, Yuzo Takada, Ken Yamamoto, Seiko Shimizu, Masayuki Sakiyama, Toshinori Chiba, Nobuyuki Hamajima, Yutaka Sakurai, Toru Shimizu, Nariyoshi Shinomiya: Common dysfunctional variants of urate exporter gene ABCG2/BCRP are a major cause of early-onset gout, The American Society of Human Genetics 63rd Annual Meeting, 2013.10.22-26, Boston (USA)
18. 松尾洋孝: 痛風・高尿酸血症と尿酸トランスポーター, 第 31 回日本ヒト細胞学会学術集会, 2013.8.10,所沢
19. 松尾洋孝: 尿酸トランスポーターABCG2 と痛風・高尿酸血症, 第 8 回トランスポーター研究会年会, 2013.6.16, 熊本

松尾亮太（福岡女子大学）

1. 「ナメクジの脳における DNA 増幅」、2015 年 9 月 7 日（大阪市立大学理学部生物学科セミナー招待講演）

松下智直（九州大学）

1. Tomonao Matsushita “Molecular mechanism of phytochrome signal transduction in higher plants” 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology (Taipei, Taiwan, November 2015)
2. Tomonao Matsushita “Light-dependent dual regulation of gene expression by phytochrome” 2015 International Symposium on Plant Sciences & the Annual Conference of the Korean Society of Plant Biologists (Daejeon, Korea, November 2015)
3. 松下智直「植物の「目」の基礎研究から偶然発見した植物の生産性を高めるバイオテクノロジー」日本生物工学会市民フォーラム（飯塚、2015 年 10 月）
4. 松下智直「植物の光情報受容体フィトクロムの細胞内シグナル伝達機構の解析」日本シダ学会・関連集会（新潟、2015 年 9 月）
5. Tomonao Matsushita “Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*” The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing (Tokyo, Japan, March 2015)
6. 松下智直「植物の光受容体フィトクロムによる遺伝子発現の多段階制御」第 7 回トランスポーター研究会九州部会シンポジウム（北九州、2014 年 11 月）
7. Tomonao Matsushita “Light-dependent regulation of gene expression by phytochrome” Symposium “The cutting edge of photoresponse mechanisms: photoreceptor and signaling mechanism”, The 78th Annual Meeting of the Botanical Society of Japan (Tokyo, Japan, September 2014)
8. Tomonao Matsushita “Phytochrome directly regulates various aspects of gene expression” Symposium “Light in life: photo-biology of animals, plants, microorganisms and optogenetics”, The 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Sapporo, Japan, September 2014)
9. Tomonao Matsushita “Phytochrome controls alternative splicing in Arabidopsis” Academia Sinica Institutional Seminar (Taipei, Taiwan, February 2014)
10. Tomonao Matsushita “Phytochrome regulates alternative splicing in Arabidopsis” International Symposium on Plant Photobiology (ISPP) (Edinburgh, UK, June 2013)
11. Tomonao Matsushita “Phytochrome regulates alternative splicing in Arabidopsis” The 6th Asia & Oceania Conference on Photobiology (AOCP) (Sydney, Australia, November 2013)

12. Tomonao Matsushita “Phytochrome regulates alternative splicing in Arabidopsis” Plant Photobiology Colloquium 2013 (Daejeon, Korea, November 2013)

松島綾美（九州大学）

1. 松島綾美、ゲノムに潜む沈痛ペプチド・エンドモルフィンは酸化ストレスの RNA 編集で誕生する、新学術領域「ゲノム支援」２０１５年度拡大班会議、2015 年 8 月 27 日、国立京都国際会館アネックスホール（京都市）
2. 松島綾美、新世代ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性、新学術領域「ゲノム支援」２０１５年度拡大班会議、2015 年 8 月 27 日、国立京都国際会館アネックスホール（京都市）
3. 松島綾美、ビスフェノール低用量効果はタンデムに並ぶ核内受容体が誘起する、新学術領域「ゲノム支援」２０１５年度拡大班会議、2015 年 8 月 27 日、国立京都国際会館アネックスホール（京都市）

松田洋一（名古屋大学）

1. 松田洋一. 異種ゲノムの不適合性が引き起こす雑種の不妊・発育不全現象の遺伝的制御機構、 日本遺伝学会第 85 回大会ワークショップ「異なるゲノム間の軋轢と強調 ～相互作用のゲノミクス～」、2013 年 9 月 21 日、横浜
2. 石下聡、辰本将司、木下圭司、中野幹治、郷康広、松田洋一. Transcriptome analysis of intergeneric avian hybrids、第 5 回アジア染色体コロキウム、2015 年 4 月 29 日、バンコク
3. 石下聡、木下圭司、鈴木圭子、中野幹治、松田洋一. ニワトリとウズラの属間 F_1 雑種の胚発生と性比の解析、日本家禽学会 2015 年度秋季大会、2015 年 9 月 10 日、江別
4. 石下聡、辰本将司、木下圭司、浅野有美、多田政子、郷康広、松田洋一. 鳥類の種間雑種の初期胚におけるトランスクリプトーム解析、日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年 9 月 7 日、仙台
5. 石下聡、辰本将司、木下圭司、浅野有美、多田政子、郷康広、松田洋一. 鳥類の性染色体におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御、第 38 回日本分子生物学会年会／第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1 日、神戸

丸山治彦（宮崎大学）

1. Maruyama H: Genome and transcriptome analysis of *Strongyloides venezuelensis*, an intestinal nematode of rats. (Symposium: What Makes Worms Parasitic ? - Understanding the Molecular Basis for Parasitism), XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 9/6-10, 2011, Sapporo
2. Chakraborty G, Nagayasu E, Yoshida A, Maruyama H: Development of Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid and sensitive detection of *Strongyloides*. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 9/6-10, 2011, Sapporo
3. Nagayasu E, Ogura Y, Ito T, Yoshida A, Chakraborty G, Hayashi T, Maruyama H: Transcriptome sequencing of *S. venezuelensis*, an animal parasitic nematode. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. 9/6-10, 2011, Sapporo

丸山史人（京都大学）

1. 丸山史人、池辺忠義、渡辺孝康、相川知宏、野澤孝志、大西 真、中川一路、「ハイブリッドアプローチから紐解く A 群レンサ球菌の生存・進化機構」、第 46 回 レンサ球菌研究会、平成 26 年 6 月 27 日(金)~28 日(土)、京大学農学部

水野洋介（埼玉医科大学）

1. 水野洋介, 仲地豊, 八塚由紀子, 徳澤佳美, 岡崎康司:トランスクリプトーム情報を基盤にした骨芽細胞と脂肪細胞の分化機構の統合的解析. 第 37 回日本分子生物学会年

会,2014 年 11 月 27 日,横浜市

2. Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi, Yukiko Yatsuka, Yoshimi Tokuzawa, Yasushi Okazaki: The Integrated Transcriptome Analysis of Adipocyte and Osteoblast Differentiation. Keystone Symposium 2014: Obesity and the Metabolic Syndrome: Mitochondria and Energy Expenditure (X7), Mar.23,2015,Whistler (Canada)
3. 水野洋介, 仲地豊, 八塚由紀子, 徳澤佳美, 岡崎康司:トランスクリプトーム情報を活用した, 骨芽細胞と脂肪細胞の分化機構の統合的解析. 第 17 回日本 RNA 学会年会,2015 年 7 月 16 日,札幌市
4. Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi, Yoshimi Tokuzawa, Yukiko Yatsuka, Yasushi Okazaki: The Integrated Transcriptome Analysis of Adipocyte and Osteoblast Differentiation. 29th International Mammalian Genome Conference (IMGC 2015),Nov.9,2015,Yokohama (Japan)

三谷啓志（東京大学）

1. “Genome-wide detection of allelic imbalance using intestine of hybrids between two medaka inbred strains. “ Murata Yasuhiko, Suzuki Yutaka, Oda Shoji, Mitani Hiroshi: 7th European Zebrafish Meeting, P1-73, July 5-9th 2011, Edinburgh, Poster
2. “メダカ近交系統を利用したアレル特異的な発現量を親子間で比較する新手法.” 村田泰彦、尾田正二、三谷啓志 :第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, P-103, 2011 年 5 月 19-20 日，熊本．ポスター発表
3. “メダカ近交系統および交雑個体を用いた遺伝子発現解析.” 村田泰彦、鈴木穣、尾田正二、三谷啓志 :第 34 回日本分子生物学会年会、2T7a-5、横浜、2011 年 12 月 13-16 日
4. “近交系間交雑Ｆ１個体における対立遺伝子間の発現調節” 村田泰彦, 鈴木穣, 尾田正二, 三谷啓志：第 14 回日本進化学会　東京　2012 年 8 月 21-24 日

光永滋樹（東海大学）

1. 奥平裕子、光永滋樹、國井七絵、細道一善、田中政之、林英樹、河田寿子、鈴木康夫、佐藤慎二、本間康彦、井ノ上逸朗、猪子英俊：エクソーム解析による関節リウマチ感受性遺伝子の探索。第 34 回日本分子生物学会年会， 2011 年 12 月，横浜市　パシフィコ横浜。

三戸太郎（徳島大学）

1. Taro Mito, Takehiko Itoh, Hiroya Morimoto, Ray Kajitani, Atsushi Toyoda, Sayuri Tomonari, Masao Fuketa, Takahito Watanabe, Yuji Matsuoka, Sumihare Noji: Genome sequencing and annotation of the cricket *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model, Ninth Annual Arthropod Genomics Symposium, Manhattan, June 17-19, 2015, Kansas, USA.
2. Taro Mito: Whole-genome sequencing and targeted genome editing in the cricket *G. bimaculatus, In* the workshop "Ethology, neuroscience and genetics in crickets: How can they meet?" Hokkaido Neuroethology Workshops 2014, July 27, 2014, Sapporo, Japan.
3. Taro Mito: RNAi analysis and genome sequencing in the cricket *Gryllus bimaculatus*, a model for evolutionary developmental studies, *International Symposium on RNAi and Genome editing methods*, Mar.14-16, 2014, Tokushima, Japan.

三野享史（京都大学）

1. 三野享史, 村川泰裕, 深尾亜喜良, Markus Landthaler, 藤原俊伸, 竹内 理. Regnase-1 と Roquin は時空間的に異なるメカニズムで共通の炎症性 mRNA を制御する. 第 17 回日本 RNA 学会年会. 北海道札幌市(ホテルライフォート札幌). 2015 年 7 月 15 日(水)～17 日(金).
2. Takashi Mino and Osamu Takeuchi. Regnase-1 destabilizes inflammation-related mRNAs in a translation-dependent manner. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 京都府京都市(国立京都国際会館). 2014 年 12 月 10 日(水)～12 日(金).

3. Masanori Yoshinaga, Takashi Mino and Osamu Takeuchi. A novel role of Regnase-1 in the iron homeostasis and anemia. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 京都府京都市(国立京都国際会館). 2014 年 12 月 10 日(水)～12 日(金).
4. 三野享史, 深尾亜喜良, 藤原俊伸, 竹内理. Regnase-1 は翻訳に依存して炎症関連 mRNA を分解する. 第37回日本分子生物学会年会. 神奈川県横浜市(パシフィコ横浜). 2014年 11 月 25 日～27 日.
5. 阿部壮岐, 三野享史, 村川泰裕, 竹内理. Regnase-1 標的 mRNA 配列の網羅的同定. RNAフロンティアミーティング 2014. 和歌山県西牟婁郡白浜町(ラフォーレ南紀白浜). 2014 年 9 月 16 日～18 日.
6. 三野享史, 深尾亜喜良, 藤原俊伸, 竹内 理. Regnase-1 destabilizes inflammation-related mRNAs in a translation-dependent manner. 第 16 回日本 RNA 学会年会. 愛知県名古屋市(ウインクあいち). 2014 年 7 月 23 日(水)～25 日(金).
7. 三野享史. 自然免疫応答の転写後調節における Regnase-1 の作用機構. 日本化学会北海道支部平成 25 年度室蘭・苫小牧地区化学講演会. 北海道苫小牧市(苫小牧工業高等専門学校). 2013 年 12 月 6 日.（招待講演）
8. 三野享史. 自然免疫応答の転写後調節における Regnase-1 の作用機構. 名古屋市立大学大学院薬学研究科藤原研究室セミナー. 愛知県名古屋市(名古屋市立大学田辺通キャンパス). 2013 年 10 月 17 日.（招待講演）

三村維真理（東京大学）

1. 三村　維真理　「Histone modification and chromosomal conformation changes under hypoxia.」Meet the Expert of Kidney Disease. 2015 年 12 月 19 日　東京
2. 三村　維真理　「Identification of novel microRNAs inhibiting tubulointerstitial fibrosis.」Kidney Summit. 2015 年 12 月 20 日　東京
3. 三村　維真理、平川陽亮、神吉康晴、鈴木穣、油谷浩幸、南学正臣　「腎尿細管間質の線維化を抑制する新規 microRNA の同定」日本腎臓学会　2016 年 6 月発表予定　横浜

向 正則（甲南大学）

1. 中村　翔一, 塩田孝祐, 小林　悟, 佐藤昌直, 向　正則「ショウジョウバエ母性因子 Mamo と遺伝学的に相互作用する因子の解析」日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日、新潟市
2. 向　正則, 平　誠司, 藤原　真人,中村　翔一, 辻　拓真, 宮形奈紗, 小林　悟「ショウジョウバエ母性因子 Mamo による *vasa* 遺伝子の発現活性化機構の解析」日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17 日、新潟市
3. 中村　翔一, 塩田孝祐, 小林　悟, 佐藤昌直, 向　正則「ショウジョウバエ母性因子 Mamo と遺伝学的に相互作用する因子の解析」第 37 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸市
4. 向　正則, 平　誠司, 藤原　真人,中村　翔一, 辻　拓真, 宮形奈紗, 木村宏, 小林　悟「生殖細胞関連遺伝子の発現活性化に関わるエピジェネティックな制御機構」第 37 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 4 日、神戸市

宗景ゆり（奈良先端科学技術大学院大学）

1. Yuri Nakajima Munekage, Jun Yoshimura, Shio Inoue, Risa Kishizaki, Akiho Yokota、Analysis of F_2 progenies of hybrids between C_3-C_4 intermediate *Flaveria floridana* and C_4-like *Flaveria brownii*、The 2013 International Symposium on C_4 and CAM Plant Biology、2013.8.6-9、University of Illinois および The 16th International Congress on Photosynthesis. 2013.8.11-16、St. Louis, USA

2. 宗景(中島)ゆり、谷口幸美、Flaveria 属植物の解析から見える C_4 型進化モデル、日本植物学会第 78 回大会シンポジウム「C_4 光合成研究の新展開」、2014.9.12、明治大学(横浜)
3. 宗景（中島）ゆり、井上史生、谷口幸美、横田明穂、Flaveria 属 C_3-C_4 中間型 *F. floridana* と C_4 様型 *F. brownii* の交雑 F_2 集団を用いた C_4 型進化過程の遺伝学的解析、第 56 回日本植物生理学会年会、2015.3.16-18、東京農業大学（東京）
4. 宗景（中島）ゆり、植物 C_4 化の取り組み、第 6 回日本光合成学会公開シンポジウム、2015.5.22-23、岡山国際交流センター(岡山)

村上洋太（北海道大学）

1. Murakami, Y., A jmjC-domain containing putative histone demethylase, Epe1 protects epigenome against aberrant heterochromatin formation in euchromatin: The 40th Naito Conference on Epigenetics-From histone code to Therapeutic Strategy, Sept. 16 2015, Sapporo, Japan
2. Tsunemine, S, Kotomura, N., Nakagawa, H. and Murakami, Y., The Snf5 chromatin remodeling factor Sfh1 regulates boundaries between heterochromatin and kinetochore: The 8th international fission yeast meeting, June 23 2015, Kobe Japan
3. Takahata, S., Chida, S. and Murakami, Y., HP1/Swi6 recruits FACT for heterochromatin regulation in fission yeast: The 8th international fission yeast meeting, June 23 2015, Kobe Japan
4. Suzuki, S., Kato, H., Takahata, S. and Murakami, Y., H3K36 tri-methylation but not H3K36 di-methylation is required for gene silencing in *Schizosaccharomyces pombe*: The 8th international fission yeast meeting, June 23 2015, Kobe Japan
5. Murakami, Y., A CTD code of RNA polymerase II promotes heterochromatin formation via lncRNA and RNAi.: IIAS Research Conference 2014, May 13, 2014, Seika-Cho, Kyoto, Japan
6. Kajitani K., Hermmand D., Obuse, C., Shuman, S. and Murakami, Y.: Regulation of RNAi-directed heterochromatin formation by CTD-phosphorylation of RNA polymerase II, EMBO Conference: *pombe* 2013, June 25 2013, London, UK
7. Kajitani,T. Hermmand D., Kimura H. and Murakami, Y.: Non-coding RNA binds to heterochromatin via DNA:RNA hybrid to mediate RNAi-directed heterochromatin formation, Sweeden-Japan Joint Colloquium; Epiegenetics Sept. 7, 2012, Stockholm, Sweeden

守屋繁春（理化学研究所）

1. Kumiko Kihara, Yumiko Nakanishi, Masahiro Sugimoto, Nathan Lo, Yuichi Hongho, Shinji Fukuda, Shigeharu Moriya; Comparative metabolomic analysis of termite hindgut microbiota; ; 2nd International Symposium Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells; 2015 年 9 月; Tsukuba
2. 木原久美子, 中西裕美子, 杉本昌弘, 本郷裕一, 福田真嗣, 守屋繁春; 腸内代謝産物から観るリグノセルロース分解機構のシロアリ種間比較; 第 30 回微生物生態学会; 2015 年 10 月 ; 土浦
3. 木原久美子, 中西裕美子, Nathan Lo, 本郷裕一, 福田真嗣, 守屋繁春 ; 原生生物 1 細胞のメタボロミクス解析の現状～シロアリ腸内共生原生生物を例に～ ; 第 3 回マトリョーシカ型生物学研究会; 2014 年 07 月 11 日～13 日; 神戸大学
4. 木原久美子, 中西裕美子, Nathan Lo, 本郷裕一, 福田真嗣, 守屋繁春 ; 環境微生物の代謝産物をシングルセルで観察できるか～ムカシシロアリの腸内共生原生生物ミクソトリカを例に～ ; 第 29 回日本微生物生態学会大会; 2013 年 11 月 23 日～25 日; 鹿児島大学

守屋央朗（岡山大学）

1. 酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会（口頭発表）　「出芽酵母ゲノムに（たまたま）コードされていた、毒性のある小さなタンパク質」　守屋央朗、石川浩史、金高令子、蒔苗浩司

八木 健（大阪大学）

1. 内村有邦、樋口真弓、日高裕子、豊田敦、藤山秋佐夫、三浦郁生、若菜茂晴、八木健：mutator マウスの長期継代が個体の表現型に及ぼす影響の解析：日本遺伝学会第８４回大会：2012 年 9 月 24 日：九州大学
2. Arikuni Uchimura, Mayumi Higuchi, Takeshi Yagi：Experimental mouse evolution model can produce variable novel phenotypes: the birth of singing mice：新学術領域研究「ゲノム支援」国際シンポジウム：2013 年 1 月 9 日：東京大学
3. 内村有邦、樋口真弓、豊田敦、藤山秋佐夫、三浦郁生、若菜茂晴、八木健：高い突然変異率が後世代の哺乳類集団に及ぼす影響：日本遺伝学会　第 85 回大会：2013 年 9 月 19 日：慶応大学
4. Arikuni Uchimura：DNA replication errors that fuel genetic and phenotypic diversities in mammals：International Symposium on “Germline Mutagenesis and Biodiversification”：2014 年 3 月 21 日：九州大学
5. Arikuni Uchimura：New genetics by using long-term breeding mutator mouse lines：理研 Genomic Sciences Research Complex (GSC)七夕ミーティング 2014：2014 年 7 月 11 日：理化学研究所横浜キャンパス
6. 八木健、樋口真弓、水口洋平、豊田敦、藤山秋佐夫、三浦郁生、若菜茂晴、内村有邦：Mutator マウスの継代から産まれた「ヒト可聴音域で鳴くマウス」：第 37 回日本神経科学大会：2014 年 9 月 12 日：パシフィコ横浜
7. 内村有邦、樋口真弓、水口洋平、西野穣、豊田敦、藤山秋佐夫、三浦郁生、若菜茂晴、八木健：長期継代マウス系統を用いた突然変異率の推定と新しい遺伝学：日本遺伝学会第 86 回大会：2014 年 9 月 17 日：長浜バイオ大学
8. 内村有邦、樋口真弓、水口洋平、西野穣、豊田敦、藤山秋佐夫、八木健：マウス長期継代系統を用いた生殖系列突然変異率の閾値とその影響：日本環境変異原学会第４３回大会：2014 年 12 月 4 日：一橋講堂(東京)
9. 内村有邦、樋口真弓、新見恵理、水口洋平、豊田敦、藤山秋佐夫、西野穣、八木健：マウス変異蓄積系統を利用した生殖系列の突然変異率の推定とその特徴：日本遺伝学会第 87 回大会：2015 年 9 月 25 日：東北大学
10. Arikuni Uchimura, Mayumi Higuchi, Yohei Minakuchi, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Shigeharu Wakana, Jo Nishino, Takeshi Yagi : Germline mutation rates and mutation accumulation lines in mice : 29th International Mammalian Genome Conference (IMGC2015)　: 2015 年 11 月 10 日: Yokohama Port Opening Memorial Hall

安田仁奈（宮崎大学）

1. Hideaki Yuasa, Nina Yasuda, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Dai Yoshimura, Rei Kajitani, Takehiko Ito, Zac Forsman, Niphonn Phongsuwan, Nalinee Thongtham (2016) Preliminary result of whole genome sequencing of *Acanthaster planci* in Japan, Hawaii and Thailand. 13th International Conference of Coral Reefs 、2016 年 6 月 23 日、ハワイ

山岡吉生（大分大学）

1. Rumiko Suzuki, Naruya Saitou, Kirill Kryukov, Osamu Matsunari, Yoshio Yamaoka、Prediction of Human Migration by *Helicobacter Pylori* 、日本ヘリコバクター学会学術集会、2012 年 6 月 29 日、岡山コンベンションセンター
2. 鈴木留美子, 松成修, 塩田星児, Kirill Kryukov, 斎藤成也, 山岡吉生、人類移動に伴う *Helicobacter pylori* 菌の拡散、日本進化学会、2012 年 8 月 23 日、首都大学東京

3. Rumiko Suzuki, Seiji Shiota, Yoshio Yamaoka、Prediction of ancient human migration by *H. pylori*、日本ヘリコバクター学会学術集会、2013 年 6 月 28 日、長崎大学医学部
4. 鈴木留美子, 松成修, 塩田星児, Kirill Kryukov, 斎藤成也, 山岡吉生、*Helicobacter pylori* から探る人類移動、2013 年 8 月 28 日、筑波大学
5. 山岡吉生. *Helicobacter pylori* と生体防御. 第 24 回日本生体防御学会、2013 年 7 月 11 日、熊本コンベンションセンター
6. 山岡吉生. ピロリ菌研究の面白さ：沖縄特有のピロリ菌の発見も含めて、第 9 回沖縄上部消化管の炎症を考える会、2013 年 7 月 11 日、那覇市
7. Yoshio Yamaoka. *Helicobacter pylori* current status in Dominican Republic, XXII Congreso Nacional de Gastroenterologia. 2013 年 9 月 6 日、プンタカナ（ドミニカ共和国）
8. Yoshio Yamaoka. Genetic characteristics of *Helicobacter pylori* and its relation to gastric cancer, XXII Congreso Nacional de Gastroenterologia. 2013 年 9 月 6 日、プンタカナ（ドミニカ共和国）
9. Yoshio Yamaoka. *Helicobacter pylori* genotypes in Asian countries, XXVIth International Workshop on *Helicobacter pylori* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. 2013 年 9 月 12 日、マドリッド（スペイン）
10. 山岡吉生. ピロリ菌感染症の臨床と研究、第 303 回日本内科学会地方会：生涯教育講演会、2013 年 11 月 17 日、那覇市
11. Yoshio Yamaoka. Genotypes of *Helicobacter pylori* in Asian countries, Mongolia-Japan joint symposium for *Helicobacter pylori*. 2013 年 11 月 22 日、ウランバートル（モンゴル）
12. Yoshio Yamaoka, Human migration inferred by *Helicobacter pylori* genes, SOKENDAI Symposium: Modern human diversity on genes and culture. 2014 年 2 月 3 日、総研大（葉山町、金沢県）
13. Yoshio Yamaoka, *Helicobacter pylori* and gastric cancer in Asia: from epidemiological view, Seoul National University Gastroenterology Meeting. 2014 年 2 月 6 日、ソウル（韓国）
14. Yoshio Yamaoka, Carcinogenesis of *Helicobacter pylori* infection, The 3rd Dong-A International Medical Symposium. 2014 年 2 月 7 日、釜山（韓国）
15. Yoshio Yamaoka, *Helicobacter pylori* genomes: from pathogenesis to tool for human migration, The 87th Annual Meeting for Japanese Society for Bacteriology. 2014 年 3 月 26 日、東京フォーラム
16. Yoshio Yamaoka, Does the difference of CagA phenotype explain the geographic differences in gastric cancer incidence? 4th Mongolian Digestive Week 2014. 2014 年 6 月 18 日、ウランバートル（モンゴル）
17. 山岡吉生,CagA の差異で、胃癌の発症率の地域差を説明することは本当にできるのか？日本ヘリコバクター学会、2014 年 6 月 18 日、ステーションカンファレンス東京（東京）
18. Yoshio Yamaoka, Genomic diversity of *Helicobacter pylori* in Asia. Asian Pacific Digestive Week 2014. 2014 年 11 月 22 日、デンパサール（インドネシア）
19. Yoshio Yamaoka, The diversity of *Helicobacter pylori*: correlation to laboratory diagnosis. 9th National Symposium & Workshop of Indonesia Antimicrobiol Resistance Watch and Annual Scientific Meeting of Indonesian society for clinical microbiologist. 2014 年 11 月 29 日、ジャカルタ（インドネシア）

山口徹太郎（昭和大学）

1. 山口徹太郎、中岡博史、山本健、藤川泰成、澁澤龍之、芳賀秀郷、方山光朱、木村亮介、井ノ上逸朗、槇宏太郎. ゲノムワイド関連解析から同定される顎関節変形性関節症の新規感受性遺伝子座位. 第 71 回 日本矯正歯科学会大会, 2012 年 9 月 26 日−28 日, 盛岡
2. 芳賀秀郷、山口徹太郎、中岡博史、山本健、方山光朱、木村亮介、槇宏太郎、井ノ上逸朗. ゲノムワイド関連解析を用いた第三大臼歯（親知らず）先天欠如に関与する遺伝学的背景の探索. 第 57 回 日本人類遺伝学, 2012 年 10 月 24 日−27 日, 東京

山田拓司（東京工業大学）

1. 演題：ヒト腸内細菌代謝経路データベースの構築、第 366 回 CBI 学会講演会、グランフロント大阪、2015 年 11 月 5 日
2. 演題：Metabolic pathway database for Human gut microbiome、第 67 回日本生物工学会大会、城山観光ホテル（鹿児島）、2015 年 10 月 26 日-28 日
3. 演題：Fecal metagenomic analysis of colorectal cancer cohort、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、2015 年 10 月 8 日-10 日
4. 演題：ヒト腸内細菌代謝機能データベースの構築、第 15 回日本抗加齢医学会総会、福岡国際会議場、2015 年 5 月 29 日- 31 日
5. 演題：ヒト腸内細菌代謝機能データベースの構築、第 88 回日本細菌学会総会 、長良川国際会議場、2015 年 3 月 26 日- 28 日
6. 演題：ヒト腸内細菌代謝経路データベース、第 18 回腸内細菌学会、東京大学「伊藤国際学術研究センター」、2014 年 6 月 11 日-12 日
7. 演題：ヒト腸内細菌代謝経路データベースの構築、第 17 回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会、東京慈恵会医科大学（西新橋キャンパス）、2014 年 10 月 4 日
8. 演題：ヒト腸内細菌代謝経路データベースの構築、第 97 回日本細菌学会関東支部総会、東京ドームホテル、2014 年 10 月 30 日-31 日
9. 演題：ヒト腸内細菌代謝経路データベースの構築、環境微生物系学会合同大会 2014、アクトシティ浜松コングレスセンター、2014 年 10 月 21 日-24 日
10. 演題：腸内細菌代謝反応データベースの構築、第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、京王プラザホテル（新宿）、2014 年 7 月 10 日-11 日

山本友子（千葉大学）

1. Yayoi Fukuoka, Katsutoshi Imamura, Yoshiyuki Ishii, Naoto Imamachi, Yutaka Suzuki, Yoichi Ishida, Masami Nagahama, Akiko Takeya, Hiroyuki Takahashi, Tomoko Yamamoto, Toshiki Taya and Nobuyoshi Akimitsu、Whole transcriptome analysis of infected host by bacteria including noncoding RNAs、日本分子生物学会　第 38 回年会、2015 年 12 月 3 日、兵庫県神戸市
2. 今村亮俊、高屋明子、今町直登、掛田実穂、渡辺千尋、鈴木穣、山本友子、秋光信佳、Functional analysis of long noncoding RNAs induced by Salmonella infection、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 24 日ポスター発表、2016 年 3 月 25 日ワークショップ口頭発表、大阪国際交流センター

山森哲雄（基礎生物学研究所）

1. 郷康広、「霊長類認知ゲノミクスと精神・神経疾患をターゲットとした霊長類モデル動物の探索」、自然科学研究機構新分野創成センターシンポジウム「大規模脳神経回路機能マップのその先」、2014 年 1 月 12 日、東京
2. Yasuhiro Go, Atsushi Toyoda, Tomoyuki Aizu, Hiroo Imai, Hirohisa Hirai, Tetsuo Yamamori, Asao Fujiyama, Tadashi Isa “Deep Exome Sequencing in Macaque Monkeys for the Establishment of Primate Cognitive and Psychiatric Disease Model.” The 24th CDB meeting Genomics and Epigenomics with Deep Sequencing. 2013 年 6 月 13 日, 神戸
3. 郷康広、「ニホンザルエキソーム解析」、ナショナルバイオリソースプロジェクト「ニホンザル」第 9 回公開シンポジウム、2012 年 11 月 9 日、東京
4. 郷康広、豊田敦、会津智幸、今井啓雄、藤山秋佐夫、平井啓久、「ニホンザルエキソーム解析～実験動物化にむけた遺伝的バックグラウンドの解明～」、第 27 回日本霊長類学会、2011 年 7 月 16 日

吉澤 晋（東京大学）

1. Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya

Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong and Kazuhiro Kogure. Functional diversification in bacterial rhodopsins: a new class of light-driven Cl- pumps in marine flavobacteria. International Symposium on Genome Science 2015 “Expanding Frontiers of Genome Science II”. Tokyo, Japan. Jan. 20-21, 2015.

2. Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong and Kazuhiro Kogure. Functional diversification in bacterial rhodopsins: a new class of light-driven Cl- pumps in marine flavobacteria. 15th International Society for Microbial Ecology. Seoul, Korea. Aug. 28, 2014.
3. Yohei Kumagai, Susumu Yoshizawa, Tsukasa Fukunaga, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Edward F. DeLong, Kazuhiro Kogure, Wataru Iwasaki. Gains and losses of proteorhodopsin genes affect genomic evolution. 15th International Society for Microbial Ecology. Seoul, Korea. Aug. 25, 2014.
4. 熊谷 洋平, 吉澤 晋, 木暮 一啓, 岩崎 渉. ゲノム駆動型の未知遺伝子の機能解析 -プロテオロドプシンと DUF2237 を例として-, 生命情報科学若手の会第 7 回研究会. 慶應義塾大学鶴岡タウンキャンパス, 山形. Oct. 1-03, 2015.
5. 熊谷 洋平, 吉澤 晋, 福永 津嵩, 渡辺 麻衣, 池内 昌彦, 小椋 義俊, 林 哲也, 木暮 一啓, 岩崎 渉. プロテオロドプシンを持つ海洋細菌の有光層への適応に寄与する２つの遺伝子、SbtA と DUF2237, 第 30 回日本微生物生態学会. 土浦亀城プラザ, 茨城. Oct. 22-25, 2015.
6. 吉澤晋. ゲノム解析が切り開く微生物の新しい光エネルギー機構.「次世代ゲノム科学の最前線」, 文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」公開シンポジウム. 東京国際フォーラム. 東京. Dec. 12, 2014.
7. 熊谷洋平, 吉澤晋, 福永津嵩, 渡辺麻衣, 池内昌彦, 小椋義俊, 林哲也, 木暮一啓, 岩崎渉. 大規模比較ゲノム解析が明らかにする、プロテオロドプシンを持つ海洋細菌のゲノム進化. 環境微生物系学会合同大会 2014. 浜松アクトシティコングレスセンター. 浜松. Oct. 24, 2014.
8. Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong, and Kazuhiro Kogure. Light-driven transmembrane H+, Na+ and Cl- pumping is mediated by three different rhodopsins in a marine flavobacterium. 環境微生物系学会合同大会 2014. 浜松アクトシティコングレスセンター. 浜松. Oct. 24, 2014.

吉田聡子（理化学研究所）

1. Satoko Yoshida, Ri-ichiro Manabe, Seungil Kim, Thomas Spallek, Musembi Mutuku, Michael Timko, Doil Choi, Ken Shirasu, “Genome and transcriptome analysis of Striga spp.” 12th World Congress on Parasitic Plants, June 2013 at Sheffield UK
2. 吉田聡子、Juliane K. Ishida, 若竹崇雅、Songkui Cui, 白須賢「Plant-plant communications in rhizosphere: Interaction and signaling between root parasite and their host plants」日本植物生理学会年会　2014 年 3 月　富山大学
3. 吉田聡子, Thomas Spallek, Songkui Cui, 市橋 泰範, Seungill Kim, Yong-Min Kim, 真鍋 理一郎, Michael Timko, Doil Choi , 白須 賢　「ゲノム・トランスクリプトーム解析から見た植物の寄生」第８回細菌学若手コロッセウム, 2014 年８月、ニセコ
4. 吉田聡子, Thomas Spallek, Songkui Cui, 市橋 泰範, Seungill Kim, Yong-Min Kim, 真鍋 理一郎, Michael Timko, Doil Choi, 白須 賢「寄生植物ストライガの全ゲノム解読」日本植物学会大会　2014 年９月、生田
5. 吉田聡子, Musembi Mutuku, Songkui Cui, 堀千明, 清水崇, 市橋安範, 出村拓, 白須賢「寄生植物と宿主植物の細胞壁をめぐる攻防」2015 年 3 月 16-18 日　日本植物生理学会年会　東京農工大学　（シンポジウム発表）
6. Musembi Mutuku、吉田聡子、清水崇史、市橋泰範、高橋章、瀬尾光範、白須賢　「寄

生植物ストライガの抵抗性におけるジャスモン酸とサリチル酸シグナル経路の役割」日本植物病理学会 100 周年記念大会　2015 年 3 月２８−３１日　明治大学　（口頭発表）

7. 吉田聡子、Thomas Spallek, 市橋泰範、Songkui Cui, 若竹崇雅、Juliane Ishida, 白須賢「ハマウツボ科寄生植物の寄生形質獲得と適応進化」日本植物学会　２０１５年９月６−８日　新潟
8. **Satoko Yoshida,** Takanori Wakatake, Songkui Cui, Juliane K. Ishida, Thomas Spallek, Simon Saucet, and Ken Shirasu (2015) Genomic and genetic analyses of haustorium formation using *Phtheirospermum japonicum* as a model parasitic plant. The 13th World Congress on Parasitic Plants at Kunming China, 5-10. July(口頭発表)

和多和宏（北海道大学）

1. Mori C, Wada K,『Robustness of developmental gene expression dynamics for vocal learning』International Congress of Neuroethology (ICN) 国際神経行動学会 2014 年 7 月 29 日（札幌 札幌コンベンションセンター）
2. Hayase S, Ohgushi E, Kobayashi M, Wada K,『Regulation of singing-driven gene expression in the song system during the critical period for vocal learning』International Congress of Neuroethology (ICN) 国際神経行動学会 2014 年 7 月 29 日（札幌　札幌コンベンションセンター）
3. Wada K,『A neuronal constraint and learnability of a species-specific vocal pattern in songbirds』Cold Spring Harbor Asia Conference, Neurobiology: Diverse Species & Conserved Principles, 2014, September 15-19（中国　蘇州　Dushu Lake Conference Hotel）
4. Hayase S, Ohgushi E, Kobayashi M, Wada K,『Experience-dependent regulation of singing-driven gene expression in the song system during the critical period of vocal learning』Society for Neuroscience meeting, 2014, November 19 (USA, Washington DC, Washington DC convention center)
5. 澤井梓、和多和宏,『鳴禽類交雑種の歌学習の個体差に与える学習バイアス』 日本動物行動学会 2015 年 11 月 20 日 (東京・東京海洋大学)

和田崇之（長崎大学）

1. 和田崇之．ゲノム解析が解き明かす結核の拡散経緯とこれから．第 20 回国際結核セミナー．2015 年 3 月 5 日．東京．
2. Takayuki Wada, Tomotada Iwamoto, Shinji Maeda, Junji Seto, Aki Tamaru, Atsushi Hase, Koichi Murakami, Taketoshi Takara, Tadayuki Ahiko, and Taro Yamamoto. Phylogenetic uniqueness and its historical backgrounds of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. International Symposium on Genome Science 2015 "Expanding Frontiers of Genome Science II". 2015. 1. 20, 21. Tokyo, Japan.
3. 和田崇之，岩本朋忠，瀬戸順次，阿彦忠之，田丸亜貴，長谷篤，前田伸司，山本太郎．M 株の広域的分離の原因究明―比較ゲノム解析に基づく「結核ゲノム疫学」の導入．第 89 回日本結核病学会総会．2014 年 5 月 9, 10 日．岐阜．
4. 和田崇之．結核分子疫学研究の現在と未来．第 19 回国際結核セミナー．2014 年 3 月 6 日．東京．

和田洋一郎（東京大学）

1. Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas and TAL to purification of specific genomic regions. Fujita T, and Fujii H: June 28 - July 3, 2015; FASEB Science Research Conference "Transcription, Chromatin, and Epigenetics", West Palm Beach, USA.
2. Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas and TAL to purification of specific genomic regions. Fujii H: November 17 - 20, 2015; TGE2015 Conference on Transposition and Genome Engineering 2015, Nara, Japan.

3. Locus-specific biochemical analysis of genome functions using enChIP: an application of CRISPR/Cas to purification of specific genomic regions. Fujita T, and Fujii H: Cold Spring Harbor meeting: Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution, September 24 - 27, 2015, Cold Spring Harbor, USA.
4. 組換え蛋白質を利用した in vitro 遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法による転写・エピジェネティック制御機構の解析　藤井穂高　BMB2015（第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会　合同大会）　2015 年 12 月　神戸

（b）班員による支援高度化等の成果発表

加藤和人 & ELSI

1. 2010 CSHL Meeting on The Biology of Genomes（2010 年 5 月 ニューヨーク、アメリカ）
2. パーソナルゲノム情報に基づく脳疾患メカニズムの解明　班会議（2010 年 8 月　神戸ポートピアホテル）
3. I2TA 公開シンポジウム（2010 年 8 月　東京大学福武ラーニングシアター）
4. 第 20 回遺伝医学セミナー（2010 年 9 月　ホテル阪急エキスポパーク）
5. 第 50 回生物物理若手の会夏の学校（2010 年 9 月　尾西グリーンプラザ）
6. Workshop for Biotech Policy and Public Communication in Post-Genomic Era（2010 年 10 月 台湾）
7. 文部科学省科学技術政策研究所所内セミナー（2010 年 10 月　文部科学省科学技術政策研究所）
8. 「細胞を創る」研究会 3.0（2010 年 11 月　東京大学生産技術研究所）
9. 理化学研究所横浜研究所所内公開セミナー（2010 年 11 月　理化学研究所横浜研究所）
10. サイエンスアゴラ 2010（2010 年 11 月　日本科学未来館）
11. 科学技術社会論学会シンポジウム（2010 年 11 月　京都大学総合人間学部）
12. 脳科学研究戦略推進プログラム課題 A, B 分科会プログラム（2010 年 12 月　キャンパスプラザ京都）
13. パーソナルゲノム情報に基づく脳疾患メカニズムの解明　班会議（2010 年 12 月 学術総合センター会議室）
14. 欧州と日本における科学技術ガバナンス会合（2010 年 10 月　京都大学芝蘭会館）
15. 科学技術イノベーション政策における「政策のための科学」検討 WS（2011 年 2 月　科学技術振興機構研究開発戦略センター）
16. I2TA 3 月公開シンポジウム（2011 年 3 月　東京大学福武ラーニングシアター）
17. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会合同大会（2010 年 12 月　神戸ポートアイランド）
18. 「細胞を創る」研究会 3.0,（2010 年 11 月　東京大学）
19. 第 52 回日本神経学会学術大会（2011 年 5 月　名古屋国際会議場）
20. 遺伝医学合同学術集会 2011（2011 年 6 月 17‐19 日　京都大学百周年時計台記念館）
21. The 9th International Workshop on Advanced Genomics（2011 年 7 月　東京）
22. STS Network Japan（2011 年 8 月　高松センチュリーホテル）
23. 新学術領域「パーソナルゲノム情報に基づく脳疾患メカニズムの解明」班会議（2011 年 9 月　東京大学）
24. 2011 CSHL Meeting on Personal Genomes（2011 年 9 月−10 月、ニューヨーク、アメリカ）
25. The 12th International Congress of Human Genetics (ICHG)/The 61st ASHG Annual Meeting（2011 年 10 月　モントリオール、カナダ）
26. 日本人類遺伝学会第 56 回大会/第 11 回東アジア人類遺伝学会（2011 年 11 月　幕張メッセ）
27. 第 34 回日本分子生物学会年会（2011 年 12 月　パシフィコ横浜）

28. Qatar International Conference on Stem Cell Science and Policy（2012 年 2 月−3 月　ドーハ、カタール）
29. Institute Seminar, Genome Center, University of Washington （2012 年 2 月　シアトル、アメリカ）
30. The 11th Conference of the International Association of Bioethics（2012 年 6 月　ロッテルダム、オランダ）
31. International Symposium: Developing Frameworks for ELSI research on Personalized Medicine（2012 年 8 月　ソウル、大韓民国）
32. 日本生物学オリンピック 2012 本選（つくば大会）（2012 年 8 月　つくば）
33. 新学術領域「パーソナルゲノム情報に基づく脳疾患メカニズムの解明」班会議（2012 年 9 月　東京大学）
34. The 62nd American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting.（2012 年 11 月、サンフランシスコ、アメリカ合衆国）
35. International Workshop: Exploring the unique social/ethical and health systems challenges of low cost whole genome sequencing（2013 年 4 月　モントリオール、カナダ）
36. P3G/CGP/ELSI 2.0 Workshop（2013 年 9 月　モントリオール、カナダ）
37. Returning Genetic Results in Biobanks: Opening an International Dialogue（2013 年 11 月 Brocher Foundation　スイス）
38. 日本人類遺伝学会第 58 回大会（2013 年 11 月　宮城県仙台市）
39. American Society of Human Genetics (ASHG) 2013 Annual Meeting（2013 年 10 月　ボストン、アメリカ）
40. 自治医科大学多地域研究ネットワークプロジェクト（JMS II プロジェクト）公開シンポジウム「大規模地域ゲノムバンク／介入・コホート研究推進事業」（2013 年 7 月　自治医科大学）
41. Initiating a biobank – infrastructures and regulations: Japan experiences', University Sains Malaysia（2014 年 8 月　コタバル、マレーシア）
42. Ethical, legal and social issues of genetic and genomic medicine: a focus on East Asian situations, University Sains Malaysia（2014 年 8 月　コタバル　マレーシア）
43. European Society of Human Genetics (ESHG) 2014 Annual Meeting（2014 年 5 月−6 月　ミラノ、イタリア）
44. British Sociological Association Medical Sociology Group 46th Annual Conference 2014.（2014 年 9 月　バーミンガム、イギリス）
45. The 64th American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting.（2014 年 10 月　サンディエゴ、アメリカ）
46. International Code of Conduct for Genomic and Clinical Date Sharing（2014 年 4 月、パリ、フランス）
47. The Indianapolis ELSI 2.0 Meeting（2014 年 5 月　インディアナポリス、アメリカ）
48. Ethics at the Crossroads: Where Public Health, Genomics, Data and Translational Science Meet（2014 年 5 月　インディアナポリス、アメリカ）
49. Workshop on Data Sharing Between International Consortia（2014 年 6 月　ジュネーブ、スイス）
50. The 9th ICGC meeting（2014 年 5 月　北京、中国）
51. American Society of Human Genetics(ASHG)2014　Annual Meeting（2014 年 10 月　サンディエゴ、アメリカ）
52. 日本生命倫理学会第 26 回年次大会（2014 年 10 月　浜松）
53. 第 34 回医療情報学連合大会　（2014 年 11 月　幕張メッセ）
54. 第 59 回日本人類遺伝学会 第 21 回日本遺伝子診療学会 合同大会（2014 年 11 月　タワーホール船堀）
55. Europian Society of Human Genetics(ESHG)2015（2015 年 6 月 6〜9 日、グラスゴー、イギリス）

56. Translation in Healthcare Conference - Exploring the Impact of Emerging Technologies（2015 年 6 月 23〜25 日、オックスフォード、イギリス）
57. 第 21 回日本遺伝子治療学会学術集会（2015 年 7 月 26 日、大阪、日本）
58. The European Society for Gene and Cell Therapy (ESGCT) Annual Congress（2015 年 9 月 17~20 日、ヘルシンキ、フィンランド）
59. American Society of Human Genetics (ASHG) 2015 Annual Meeting（2015 年 10 月 6~10 日、ボルチモア、アメリカ）
60. 日本人類遺伝学会第 59 回大会（2015 年 10 月 14〜17 日、東京、日本）
61. 研究倫理を語る会（2015 年 12 月 12 日、東京）

伊藤武彦

1. 梶谷嶺, ゲノムの k-mer 頻度分析 de novo アセンブルから比較ゲノムまで, NGS 現場の会・第二回研究会, 2012/05/24-25, ホテル阪急エキスポパーク
2. 梶谷嶺, 高ヘテロ接合性ゲノムの de novo アセンブリ, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/12, 福岡国際会議場
3. 矢花充, 高ヘテロ接合性をもつベネズエラ糞線虫のゲノム解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012/12/11, 福岡国際会議場
4. 梶谷嶺, メタゲノム用 de novo アセンブラの開発および Illumina データを用いたベンチマーク, 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 2014/03/07-09, 東京農業大学
5. 梶谷嶺, メタゲノム用 de novo アセンブリ・クラスタリングツール MetaPlatanus の開発, 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会, 2015/03/07, 神戸大学

岩崎渉

1. 岩崎渉．バイオインフォマティクスから時空間解析へ．日本学術会議学術フォーラム 生命情報ビッグデータ時代における新しい生命科学 (2014/8/29) 日本学術会議講堂，東京都港区．（招待講演）
2. 岩崎渉．Fundamental bottlenecks in big-data biology．第 52 回日本生物物理学会年会 (2014/9/27) 札幌コンベンションセンター，北海道札幌市．（招待講演）
3. Hikari Yoshitane, Haruka Ozaki, Hideki Terajima, Ngoc-Hien Du, Yutaka Suzuki, Taihei Fujimori, Naoki Kosaka, Shigeki Shimba, Sumio Sugano, Toshihisa Takagi, Wataru Iwasaki, and Yoshitaka Fukada. CLOCK による古典的・非古典的 E-box を介した概日時計の“多声的”制御，日本バイオインフォマティクス学会 2014 年年会（第 3 回生命医薬情報学連合大会）（2014/10/3）仙台国際センター，宮城県仙台市.
4. 岩崎渉，楊靜佳．微生物の生息環境の多様性とその進化：MetaMetaDB による解析．環境微生物系学会合同大会 2014 (2014/10/24) 浜松アクトシティコングレスセンター．静岡県浜松市.
5. 岩崎渉．定量生物学と情報生物学．定量生物学の会第七回年会 (2015/1/11) 九州大学筑紫キャンパス，福岡県春日市．（招待講演）
6. 岩崎渉，楊靜佳．MetaMetaDB:微生物ゲノムと環境を簡便に結びつけるデータベース．第 9 回日本ゲノム微生物学会年会 (2015/3/6) 神戸大学六甲第二キャンパス，兵庫県神戸市.
7. 岩崎渉，楊靜佳．MetaMetaDB：メタ・メタゲノム解析のためのデータベース．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/2) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
8. 岩崎渉. NGS データ解析におけるバイオインフォマティクスの課題. 第 17 回日本 RNA 学会年会 (2015/7/15) ホテルライフォート札幌，北海道札幌市． （招待講演）
9. 岩崎渉．NGS データ解析とバイオインフォマティクス：ゲノムから海洋生態系まで．第 6 回生命科学阿波おどりシンポジウム (2015/8/12) 徳島大学蔵本キャンパス．徳島県徳島市．（招待講演）
10. 岩崎渉．NGS メタバーコーディングからより多くの情報を得るために．日本進化学会第 17 回大会 (2015/8/20) 中央大学後楽園キャンパス，東京都文京区．（招待講演）

11. Wataru Iwasaki. Bioinformatics for Exhaustively Describing Biological Systems: Genomes, Phenotypes, and Ecosystems. QBiC Symposium 2015 (2015/8/25) RIKEN Quantitative Biology Center. Suita, Osaka, Japan. *
12. Wataru Iwasaki, Masaki Miya, Yukuto Sato, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, Keiichi Sato, Toshifumi Minamoto, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Hitoshi Araki, Reiko Fujimura, Minoru Ijichi, Koji Hamasaki, Kazuhiro Kogure, and Michio Kondoh. Toward ecosystem-scale biodiversity monitoring: Metabarcoding of microbial and environmental DNA from identical water samples. 第 30 回日本微生物生態学会土浦大会 (2015/10/19) 土浦市亀城プラザ, 茨城県土浦市.
13. Masaki Miya, Yukuto Sato, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, Jan Yde Poulsen, Keiichi Sato, Toshifumi Minamoto, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Hitoshi Araki, Michio Kondoh, and Wataru Iwasaki. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. 生命医薬情報学連合大会 2015 年大会（日本バイオインフォマティクス学会 2015 年年会）(2015/10/30) 京都大学宇治キャンパス，京都府宇治市.
14. 石津大嗣，平形樹生，福永津嵩，尾崎遼，木立尚孝，岩崎渉，塩見春彦，塩見美喜子. 人工 piRNA 発現システムを用いた piRNA 生合成機構の解析. 第 16 回日本 RNA 学会年会（2014/7/23-25）ウインクあいち，愛知県名古屋市.
15. Susumu Yoshizawa, Yohei Kumagai, Hana Kim, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Wataru Iwasaki, Edward F. DeLong and Kazuhiro Kogure. Functional diversification in bacterial rhodopsins: a new class of light-driven Cl- pumps in marine flavobacteria. 15th International Symposium on Microbial Ecology (2014/8/24-29) Coex Convention Center, Seoul, Korea.
16. Minoru Ijichi, Asako Machiyama, Yui Takahashi, Hiroshi X. Chiura, Yohito Ito, Tamotsu Kitade, Shigehisa Hanada, Yuji Tanaka, Wataru Iwasaki and Kazuhiro Kogure. Meta-omics approach to biofilm communities on the membrane of seawater reverse osmosis system. 15th International Symposium on Microbial Ecology. (2014/8/24-29) Coex Convention Center, Seoul, Korea.
17. Yohei Kumagai, Susumu Yoshizawa, Tsukasa Fukunaga, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Edward F. DeLong, Kazuhiro Kogure, Wataru Iwasaki. Gains and losses of proteorhodopsin genes affect genomic evolution. 15th International Symposium on Microbial Ecology. (2014/8/24-29) Coex Convention Center, Seoul, Korea.
18. 青木誠志郎，伊藤元己，岩崎渉. マメ科根粒菌の起源：β-から α-プロテオバクテリアへの根粒形成遺伝子群 nodIJ の水平伝播. 環境微生物系学会合同大会 2014 (2014/10/23) 浜松アクトシティコングレスセンター，静岡県浜松市.
19. 竹内美緒，山岸昂夫，鎌形洋一，大島健志朗，服部正平，片山泰樹，花田智，玉木秀幸，丸茂克美，前田広人，根建心具，岩崎渉，諏訪裕一，坂田将. 微好気条件でのみ脱窒・亜酸化窒素生成(N2O)を行う新規海洋細菌. 環境微生物系学会合同大会 2014 (2014/10/24) 浜松アクトシティコングレスセンター，静岡県浜松市.
20. 平岡聡史，町山麻子，伊知地稔，井上健太郎，木暮一啓，岩崎渉. 東北大地震の津波による土壌微生物の多様性変化及び環境適応. 環境微生物系学会合同大会 2014 (2014/10/24) 浜松アクトシティコングレスセンター，静岡県浜松市.
21. 熊谷洋平，吉澤晋，福永津嵩，渡辺麻衣，池内昌彦，小椋義俊，林哲也，木暮一啓，岩崎渉. 大規模比較ゲノム解析が明らかにする、プロテオロドプシンを持つ海洋細菌のゲノム進化. 環境微生物系学会合同大会 2014 (2014/10/24) 浜松アクトシティコングレスセンター，静岡県浜松市.
22. 伊知地稔，町山麻子，高橋唯，千浦博，伊藤世人，北出有，花田茂久，田中祐之，岩崎渉，木暮一啓. Every gene is everywhere, but the environment selects. 環境微生物系学会合同大会 2014 (2014/10/24) 浜松アクトシティコングレスセンター，静岡県浜松市.
23. 宮正樹，佐藤行人，福永津嵩，佐土哲也，佐藤圭一，源利文，山中裕樹，荒木仁志，岩崎渉. 魚類環境 DNA 用ユニバーサルプライマーの開発と次世代シーケンサを用いた分析法の確立. 2014 年度日本魚類学会年会 (2014/11/15-17) 神奈川県立生命の星・地球

博物館，神奈川県小田原市.

24. 寺嶋秀騎，吉種光，尾崎遼，鈴木穣，榛葉繁紀，岩崎渉，深田吉孝．ゲノムワイドな CLOCK の標的探索により明らかにされたリズミックな転写後制御の重要性．第 37 回日本分子生物学会年会 (2014/11/25) パシフィコ横浜，神奈川県横浜市.
25. 尾崎遼，吉種光，寺嶋秀騎，Ngoc-Hien Du，鈴木穣，藤森大平，小阪実生，榛葉繁紀，菅野純夫，高木利久，深田吉孝，岩崎渉．ChIP-Seq データから認識配列を網羅的に抽出するバイオインフォマティクス手法 MOCCS．第 37 回日本分子生物学会年会 (2014/11/26) パシフィコ横浜，神奈川県横浜市.
26. 石津大嗣，岩崎由香，平形樹生，福永津嵩，尾崎遼，木立尚孝，岩崎渉，塩見春彦，塩見美喜子．人工 piRNA 発現システムを用いた piRNA 生合成機構の解析．第 37 回日本分子生物学会年会 (2014/11/27) パシフィコ横浜，神奈川県横浜市.
27. Wataru Iwasaki, Haruka Ozaki, Hikari Yoshitane, Hideki Terajima, Ngoc-Hien Du, Yutaka Suzuki, Taihei Fujimori, Naoki Kosaka, Shigeki Shimba, Sumio Sugano, Toshihisa Takagi, and Yoshitaka Fukada. MOCCS: a bioinformatic method to enumerate DNA-binding motifs from ChIP-Seq data. International Symposium on Genome Science 2015 “Expanding Frontiers of Genome Science II” (2015/1/20-21) Hitotsubashi-Hall, Tokyo, Japan.
28. 藤村玲子，金子亮，武島弘彦，岩崎渉，福庭辰洋，浜崎恒二，木暮一啓．超高速遺伝子解析時代の海洋生態系評価手法の創出．第 17 回マリンバイオテクノロジー学会大会（2015/5/30）東京海洋大学品川キャンパス，東京都港区.
29. 石津大嗣，岩崎由香，平形樹生，尾崎遼，岩崎渉，塩見春彦，塩見美喜子．piRNA 生合成における前駆体 RNA 認識機構の解析．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/2) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
30. 尾崎遼，岩崎渉．ChIP-Seq データから DNA モチーフを抽出する MOCCS とその応用．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/1-3) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
31. 岩崎渉，楊靜佳．MetaMetaDB：メタ・メタゲノム解析のためのデータベース．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/1-3) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
32. 平岡聡史，町山麻子，伊知地稔，井上健太郎，吉澤晋，木暮一啓，岩崎渉．東北大地震の津波がもたらした大規模な環境撹乱に対する微生物の応答と適応．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/1-3) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
33. 平瀬祥太朗，岩崎渉．日本列島における Hybrid Speciation の可能性 －アゴハゼの NGS－．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/1-3) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
34. 熊谷洋平，吉澤晋，福永津嵩，渡辺麻衣，池内昌彦，小椋義俊，林哲也，木暮一啓，岩崎渉．プロテオロドプシンを持つ海洋細菌のゲノム比較から、新規の光利用関連遺伝子を探る．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/1-3) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
35. 新居良規，岩崎渉．タヌキモ科におけるゲノムサイズの変化とウイルス感染との相互作用の解析．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/1-3) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
36. 松井求，岩崎渉．NGS 時代の新たな系統解析アプローチ: Graph Splitting 法．NGS 現場の会第四回研究会 (2015/7/1-3) つくば国際会議場，茨城県つくば市.
37. Masaki Miya, Yukuto Sato, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, Jan Yde Poulsen, Keiichi Sato, Toshifumi Minamoto, Satoshi Yamamoto, Hiroki Yamanaka, Hitoshi Araki, Michio Kondoh, and Wataru Iwasaki. MiFish, a set of universal primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of >230 species from aquarium tanks and coral reefs in the subtropical western North Pacific. 6th International Barcode of Life Conference (2015/8/19) University of Guelph, Guelph, Canada.
38. Masako Takashima, Ri-ichiroh Manabe, Wataru Iwasaki, Akira Ohyama, Moriya Ohkuma, and Takashi Sugita. A highly resolved phylogenetic tree of Trichosporonales species based on multiple gene sequence analysis. 32nd International Specialized Symposium on Yeasts (2015/9/13-17), Hotel Giò Centro Congressi, Perugia, Italy.

39. Motomu Matsui and Wataru Iwasaki. Graph Splitting Method: Novel Phylogenetic Approach Beyond the Twilight Zone. 生命医薬情報学連合大会 2015 年大会（日本バイオインフォマティクス学会 2015 年年会）(2015/10/29-31) 京都大学宇治キャンパス，京都府宇治市.
40. Satoshi Hiraoka and Wataru Iwasaki. Novel metagenomic data analysis method based on genetic divergences and gene-order networks. 生命医薬情報学連合大会 2015 年大会（日本バイオインフォマティクス学会 2015 年年会）(2015/10/29-31) 京都大学宇治キャンパス，京都府宇治市.
41. 松井求，岩崎渉．Graph Splitting 法：トワイライトゾーンを越える新たな系統解析アプローチ. 生命医薬情報学連合大会 2015 年大会（日本バイオインフォマティクス学会 2015 年年会）(2015/10/29) 京都大学宇治キャンパス．京都府宇治市.
42. 熊谷洋平，吉澤晋，渡辺麻衣，池内昌彦，木暮一啓，岩崎渉.「光合成」と「ロドプシン」、二つの異なる光利用システムを繋げる未知遺伝子 DUF2237 の機能解析．藍藻の分子生物学 2015 (2015/11/16-17) かずさアカデミアホール，千葉県木更津市.
43. 松井求，岩崎渉．Graph Splitting 法：トワイライトゾーンを越える新たな系統解析アプローチ．第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 (2015/12/1-4) 神戸ポートアイランド，兵庫県神戸市.

高橋弘喜

1. 韓栄春, 高橋弘喜, 中村道美, Somnuk Bunsupa, 吉本尚子, 山本浩文, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 山崎真巳, 斉藤和季. Transcriptome Analysis of Nine Tissues to Discover Genes Involved in the Biosynthesis of Active Ingredients in Sophora flavescens. 日本薬学会第１３６年会. 2016 年 3 月 26 日-29 日．横浜
2. 萩原大祐，高橋弘喜，楠屋陽子，川本進，亀井克彦，五ノ井透．Aspergillus 属菌の休眠胞子および発芽胞子のトランスクリプトーム解析．日本農芸化学会 2016．2016 年 3 月 27 日-20 日．札幌
3. 福岡弥生, 今村亮俊, 石井善幸, 今町直登, 鈴木譲, 石田洋一, 長浜正巳, 高屋 明子, 高橋弘喜, 山本友子, 田谷敏貴, 秋光信佳. 非コード RNA を含めた病原体感染時のヒト宿主トランスクリプトーム解析．第３８回日本分子生物学会．2015 年 12 月 1 日-4 日．神戸
4. 楠屋陽子，早川真理子，五ノ井透，高橋弘喜．Aspergillus fumigatus における銅恒常性維持機構に関与する遺伝子の探索．第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス．2015 年 11 月 19 日-20 日．府中
5. 萩原大祐，楠屋陽子，高橋弘喜，川本進，亀井克彦，五ノ井透．休眠胞子および発芽胞子のトランスクリプトーム解析から示唆された休眠―発芽における AtfA の機能．第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス．2015 年 11 月 19 日-20 日．府中
6. 高橋弘喜，楠屋陽子，高橋（中口）梓，早川真理子，五ノ井透．トランスクリプトーム解析による糸状菌 Aspergillus fumigatus の環境ストレス応答能の基盤整備. 第 15 回糸状菌分子生物学コンファレンス．2015 年 11 月 19 日-20 日．府中
7. 高橋弘喜，楠屋陽子．ゲノム情報解析支援－スペーサー配列及び連続 2 塩基の特性を考慮した DNA モチーフ検出ソフトウエアの開発－．新学術領域「ゲノム支援」２０１５年度 拡大班会議．2015 年 8 月 27 日-28 日．京都
8. 高橋弘喜．次世代シーケンサーの病原真菌 Aspergillus fumigatus への応用．第 97 回日本細菌学会関東支部総会．2014 年 10 月 30 日-31 日（招待講演）．東京
9. 韓栄春，中村道美，Bunsupa Somnuk，山本浩文，鈴木秀幸，高橋弘喜，吉本尚子，山崎真巳, 斉藤和季. RNA-Seq analysis on 9 tissues of Sophora flavescens reveals putative genes involved in the biosynthesis of quinolizidine alkaloids and isoflavonoids. 日本生薬学会第 61 回年会．2014 年 9 月 13 日-14 日．福岡
10. 岸田百世，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正，松浦秀幸. 高温ストレス条件下の植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析. 第 16 回日本 RNA 学会年会. 2014 年 7 月 23 日-25 日．名古屋

11. 岸田百世，高橋弘喜，御田洋介，加藤晃，平田收正，松浦秀幸. 高温ストレス条件下の植物における転写開始点と mRNA 翻訳状態の網羅的解析. 生物工学会若手会夏のセミナー. 2014 年 7 月 12 日-13 日. 神戸
12. Kusuya Y, Kurokawa K, Takahashi H. The mechanisms of Copper acquisition and detoxification in Aspergillus fumigatus. ISHAM 2015. May 4-8, Melbourne, Australia.
13. Imashimizu M, Takahashi H, Oshima T, McIntosh C, Bubunenko M, Court DL, Kashlev M. Visualizing translocation dynamics and nascent 1 transcript errors in paused RNA polymerases in vivo. NCI Symposium on Chromosome Biology. April 16-17, 2015. **Bethesda, USA.**
14. Imashimizu M, Takahashi H, Oshima T, Kashlev M. Transcriptional pauses and errors frequently occur at CpG sequences in E. coli. NIH Symposium on RNA Biology. March 11-12, 2015. **Bethesda, USA.**
15. Takahashi H. Understanding of molecular mechanism under heat stress conditions in A. fumigatus. The 10th Chiba University Tenure Track Seminar. March 6, 2013. Chiba, Japan.
16. Hagiwara D, Takahashi H, Nakayama M, Abe K, Gonoi T, Kawamoto S. Repression of the phosphor-transmitter gene ypdA resulting in growth defect in Aspergillus fumigatus. 27th Fungal Genetics Conference. March 12-17, 2013. California, USA.

笠原雅弘

1. Kasahara M, Local Package Manager—Database of genome analysis tools with installation procedures, Genome Informatics, Churchill college, Cambridge, United Kingdom, 9/21/2014

矢田哲士

1. Hori K, Yada T (2015) Inference of genetic mutations causing host shifts or rabies virus, 生命医薬情報学連合大会 2015 年大会, 10 月 29-31 日, 京都. バイオグリッド奨励賞：若手奨励賞.
2. Zhang W, Ichinose N, Kumada T, Yada T (2013) Identifying mutations bringing de novo gene birth to Saccharomyces sensu stricto genomes, 生命医薬情報学連合大会 2013 年大会, 10 月 29-31 日, 東京. エクセレントポスター賞.
3. Liu Y, Irie T, Monjo T, Yada T, Suzuki Y, "Deciphering Regulatory Code from Transcription Activity Data of Mutagenesis Promoters" 第 38 回日本分子生物学会年会.(20151201-20151204). 神戸.
4. 入江拓磨, 劉エイ, 門城拓, 関真秀, 榊原雄太, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木穣, "次世代シークエンサーを用いた変異プロモーターの網羅的解析" 第 38 回日本分子生物学会年会.(20151201-20151204). 神戸.
5. 黒木陽子, 矢田哲士, 谷口丈晃, 野口英樹, 豊田敦, 藤山秋佐夫, "大型類人猿における 19 番長腕サブテロメア近傍領域の比較ゲノム解析" 第 38 回日本分子生物学会年会.(20151201-20151204). 神戸.
6. Hori K, Yada T, "Inference of genetic mutations causing host shifts or rabies virus" 日本バイオインフォマティクス学会年会. (20151029-20151031). 京都.
7. Yada T, Irie T, Taniguchi T, Suzuki Y, "Next generation sequencing data and its bioinformatics analysis dissect genomic regulatory elements", International Symposium on Genome Science. (2015, Jan 20-21). Tokyo.
8. 入江拓磨, 門城拓, 劉エイ, 関真秀, 菅野純夫, 矢田哲士, 鈴木穣, "次世代シークエンサーによる変異プロモーターの網羅的解析" 第 37 回日本分子生物学会年会.(20141125-20141127). 横浜.
9. 矢田哲士, "ゲノム大規模データを解析する−転写制御領域の解読と設計−" 新生命科学分野開拓とスーパーコンピューター「京」.(20140916). 福岡. 招待講演.
10. Zhang W, Ichinose N, Kumada T, Yada T: "Identifying Mutations Bringing de novo Gene Birth to Saccharomyces sensu stricto Genomes" 日本バイオインフォマティクス学会年会.

(20131029-20131031). タワーホール船堀.

11. Kobayashi H, Ichinose N, Kumada T, Yada T: "Co-regulatory relation between cancer genes and miRNAs" 日本バイオインフォマティクス学会年会. (20131029-20131031). タワーホール船堀.
12. Zheng P, Ichinose N, Kumada T, Yada T: "Motif identification based on the idea of Gibbs Sampling and Genetic Algorithm" 日本バイオインフォマティクス学会年会. (20131029-20131031). タワーホール船堀.
13. Ichinose N, Yada T, Gotoh O: "Methylation Structure of Honey Bee Genome" 日本バイオインフォマティクス学会年会. (20131029-20131031). タワーホール船堀.
14. Liu Y, Irie T, Suzuki Y, Ichinose N, Kumada T, Yada T: "Deciphering Regulatory Code from Transcription Activity Data of Mutagenesis Promoters" 日本バイオインフォマティクス学会年会. (20131029-20131031). タワーホール船堀.
15. 矢田哲士: "転写制御コードの多様性に挑む" ゲノム多様性のデータ利用. (20131220-20131220). 統計数理研究所, 東京. 招待講演
16. Yada T: "Deciphering Regulatory Code Underlying Promoter Sequences" The 2nd BMIRC International Symposium on Advances in Bioinformatics and Medical Engineering. (20140129-20140130). Center of Iizuka Research and Development, Fukuoka.
17. 矢田哲士: "プロモーター配列の合理的な設計に挑む" 情報処理学会第 37 回バイオ情報学研究会(招待講演). (20140305-20140305). 九州工業大学, 福岡.
18. 矢田哲士: "転写因子の結合と転写の関係を明らかにする試み" 新学術領域研究「転写サイクル」第 2 回トレーニングワークショップ(20140308-20140308). 九州工業大学, 福岡. 招待講演.
19. Zeng C, Iwata H, Ichinose N, Yada T, Gotoh O, "Detection of Splice Junctions from Mid-to-Long RNA-seq Reads by Spaln", Genome Informatics Workshop (GIW2012), Tainan.
20. Fujiwara T, Yada T, "miRNA-target prediction based on transcriptional regulation", ISCB-Asia/SCCG 2012, Shenzhen.
21. Zeng C, Iwata H, Ichinose N, Yada T, Gotoh O, "Accurate spliced alignments of mid-to-long RNA-seq reads", ISCB-Asia/SCCG 2012, Shenzhen.
22. Zeng C, Iwata H, Ichinose N, Yada T, Gotoh O, "Mapping and Aligning PacBio RNA-seq Data", 6th Asian Young Researchers Conference for Computational and Omics Biology (AYRCOB2012), Shenzhen.
23. Zeng C, Iwata H, Ichinose N, Yada T, Gotoh O, "Splice Junction Mapping of Middle-to-Long RNA-seq Reads", Computational Biology Research Center Workshop 2012 (CBRC2012), Tokyo.
24. Irie T, Park S-J, Yamashita R, Seki M, Yada T, Sugano S, Suzuki Y: "Predicting promoter activities of primary human DNA sequences" 第 34 回日本分子生物学会年会. (20111213-20111216). 横浜.
25. Yada T, Morita M, Irie T, Suzuki Y: "Linear regression models which predict transcriptional activities from promoter sequences" Annual Conference of JSBi (Japanese Society for Bioinformatics). (20101213-20101215). Fukuoka.
26. Irie T, Park S-J, Yamashita R, Seki M, Yada T, Sugano S, Nakai K, Suzuki Y: "Predicting promoter activities of primary human DNA sequences" Biochemistry and Molecular Biology BMB2010. (20101209). Kobe.

瀬々潤

1. 寺田 愛花, 津田 宏治, 瀬々 潤. (2015) 第 4 回 生命医薬情報学連合大会 ポスター賞「LAMPLINK: An additional function for PLINK to detect statistically significant genetic interactions」(京都)
2. Terada A, Tsuda K, Sese J. (2015) American Society of Human Genetics. Reviewers' choice. "LAMPLINK: An additional function for PLINK to detect statistically significant genetic

interactions” (米国ボルチモア)
3. 瀬々 潤. (2014) Oxford Journals-JSBi Prize
4. 山形 浩一. (2014) 第 3 回 生命医薬情報学連合大会 連合大会研究奨励賞「COSMOS:トリオや近交系も扱える精度の高い染色体構造変異の検出手法」
5. 金 韓永. (2014) 第 3 回 生命医薬情報学連合大会 JSBi 研究奨励賞「Accelerating Westfall-Young permutation procedure for sensitive enrichment analysis」
6. 齊藤 有紀. (2014) 第 3 回 生命医薬情報学連合大会 JSBi 研究奨励賞「Statistical assessment in network-based GWAS analysis」

（３）図書

公募支援課題

上村匡（京都大学）

1. Dongbo Shi, Masaki Arata, Tadao Usui, Toshihiko Fujimori and Tadashi Uemura. Springer Publishing Company. Seven-pass transmembrane cadherin CELSRs, and Fat4 and Dchs1 cadherins: from planar cell polarity to three-dimensional organ architecture. In press. In **"The Cadherin Superfamily"** (Shintaro Suzuki and Shinji Hirano eds.)

大政健史（徳島大学）

1. Takeshi Omasa and Kyoungho Lee "Chromosome rearrangement and gene amplification" in Animal Cell Technology (Roland Wagner and Hansjörg Hauser (eds.)) Walter de Gruyter GmbH (2014)

岡田典弘（東京工業大学）

1. 二階堂雅人、岡田典弘（2015）「絶滅危惧種のゲノム解読とその利用」『次世代シーケンサー活用術』化学同人　143-156.

奥野浩行（京都大学）

1. 奥野浩行、「RNA-Seq, Single-Cell　試薬編」 in NGS Professional シリーズ RNA-Seq マスターブック、羊土社、2016 年春刊行予定

小野寺淳（千葉大学）

1. Bonifer, C. and Cockerill, P.: Springer Berlin Heidelberg, Transcriptional and Epigenetic Mechanisms Regulating Normal and Aberrant Blood Cell Development, 2014, 398pp (担当分：**Onodera, A.**, Tumes, D. J., and Nakayama, T.: Epigenetic Control of Immune T Cell Memory. p367-382).
2. 中山俊憲/徳久剛史/山本一彦編集、羊土社、実験医学増刊号_免疫記憶の制御と疾患治療、2011年、204pp (担当分：**小野寺淳**、堀内周、中山俊憲、CD4免疫記憶と機能維持 ~エピジェネティック研究から得られた新知見、p2746-2754)

河野重行（東京大学）

1. Noguchi, T., Kawano, S., Tsukaya, H., Matsunaga, S., Sakai, A., Karahara, I., Hyashi, Y., (eds): Atlas of Plant Cell Structure, Springer, pp1- 202 (2014)
2. 河野重行：同形配偶子生殖から卵精子生殖への進化、「動植物の受精学：共通機構と多様性（澤田均編）」、化学同人、pp. 267-285 (2014).

河村正二（東京大学）

1. *Kawamura, S. and *Melin, A. D. (2016). Evolution of genes for color vision and chemical senses in primates. In: **Evolution of the Human Genome Volume I: The Genome and Genes** (Saitou, N. ed.), In Press, Springer, Tokyo. 査読有
2. *Melin, A. D., Hiramatsu, C., Fedigan, L. M., Schaffner, C. M, Aureli, F. and *Kawamura, S. (2012). Polymorphism and adaptation of primate colour vision. In: **Evolutionary Biology:**

Mechanisms and Trends (Pontarotti, P. ed.), pp. 225-241, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 査読有

3. *河村正二 (2012). 第 8 章コラム：霊長類型 3 色型色覚をめぐる「謎」. In: 進化：生命のたどる道 (長谷川眞理子 日本語版監修), pp. 208-209, 岩波書店. 原著：Carl Zimmer (2010). The Tangled Bank: An Introduction to Evolution, Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, Colorado. 査読有
4. *Kawamura, S., Hiramatsu, C., Melin, A. D., Schaffner, C. M, Aureli, F. and Fedigan, L. M. (2012). Polymorphic color vision in primates: evolutionary considerations. In: **Post-Genome Biology of Primates** (Hirai, H., Imai, H. and Go, Y. eds.), pp. 93-120, Springer, Tokyo. 査読有
5. *Kawamura, S. (2011). Evolutionary diversification of visual opsin genes in fish and primates. In: **From Genes to Animal Behavior: Social Structures, Personalities, Communication by Color** (Inoue-Murayama, M., Kawamura, S. and Weiss, A. eds.), pp. 329-349, Springer, Tokyo. 査読有

國分力（大阪大学）

1. 堀江恭二、國府　力、竹田潤二. 「トランスポゾンによるゲノム改変」　実験医学別冊「ES・IPS 細胞実験スタンダード: 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識」 316-323（2014）

後藤由季子（東京大学）

1. 伊藤靖浩、後藤由季子　化学同人　脳の発生学３章「細胞運命決定の分子機構」、pp. 34-50、2013

佐伯和彦（奈良女子大学）

1. Andersen SU, Aoki T, Bandyopadhyay K, Becana M, Betti M, Binder A, Chiurazzi M, Credali A, Dam S, Edwards A, Ferreira J, Fukai E, García-Calderón M, Hashiguchi M, Hayashi M, Hirakawa H, Kawaguchi M, Małolepszy A, Márquez AJ, Matamoros MA, Mun M, Nakagawa T, Okazaki S, Parniske M, Pedrosa-Harand A, Pérez-Delgado CM, Radutoiu S, Ramos J, Robson F, Ronson CW, Rook F, Rubio MC, Saeki K, Sainz M, Sandal N, Sato S, Sawada Y, Shibuya N, Smith AM, Soyano T, Stougaard J, Suganuma N, Suzuki A, Takos AM, Udvardi M, Valkov VT, Vega JM, Verdier J, Vriet C and Wang TL （計 51 名）著（Tabata S and Stougaard J 編）、Springer-Verlag Berlin、***The Lotus japonicus Genome*** (2014) 、267pp

坂山英俊（神戸大学）

1. 坂山英俊. シャジクモ藻類（シャジクモ目）. 藻類ハンドブック. pp. 41-45. エヌ・ティー・エス (2012).

澤進一郎（熊本大学）

1. 重信秀治、澤進一郎、栗原志、持田恵一、上原（山口）由紀子、高木宏樹、阿部陽、寺内良平、関原明、高橋聡史（2015） 植物ゲノム解析、次世代シーケンサー活用術、化学同人、In press

澤辺智雄（北海道大学）

1. 澤辺智雄. マリンビブリオを活用した海藻からのエタノール生産. 海藻バイオ燃料. CMC 出版. 2011 年. pp. 117-128.

2. T. Bruce, A.D. Gonzales, Y. Nakashimada, Y. Matsumura, F.L. Thompson, T. Sawabe (2015). Biofuel innovation by microbial diversity. S.-K. Kim ed. Springer Handbook of Marine Biotechnology. pp. 1163-1180.
3. Bruno Gomez-Gil, Cristinane C. Thompson, Yuta Matsumura, Toko Sawabe, Tetsuya Iida, Richard Christen, Fabiano Thompson, Tomoo Sawabe (2014). The Family Vibrionaceae. In: (ED.)., M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, And E. Stackebrandt. (Org.). The prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiology community. 4th ed. New York, 2014.pp. 660-747.
4. Tomoo Sawabe, Nurhidayu Al-saari, Yuta Matsumura, Kazumichi Sato, Sayaka Mino, and Toko Sawabe. Microbial biofuels – potential and challenges. Bruce and Amaro, eds. in "Molecular Diversity of Environmental Prokaryotes". CRC in press (https://www.crcpress.com/Molecular-Diversity-of-Environmental-Prokaryotes/Rodrigues-Silva/9781482233223)

椎名隆（東海大学）

1. Shiina T, Suzuki S, Kulski JK. Intech, MHC Genotyping in Human and Nonhuman Species by PCR-based Next-Generation Sequencing (Chapter 3). In Next generation sequencing (ed. Kulski JK). Croatia, 2016, 29 pages.

柴博史（奈良先端科学技術大学院大学）

1. 柴　博史，植物における small RNA を介した時期・組織特異的な対立遺伝子間の優劣性発現調節機構，国際高等研究所　研究プロジェクト「細胞履歴に基づく植物の形態形成」報告書（ISBN978-4-906671-81-6），2011，81-88

嶋田透（東京大学）

1. 嶋田 透（2015）昆虫の食性の進化を遺伝子で説明できるか？～カイコガ科におけるクワへの適応を例にして～（「ゲノムで進化の謎を解く」長谷部光泰編），学研メディカル秀潤社．pp. 114-123.

新屋みのり（国立遺伝学研究所）

1. M. Shinya, Springer, Zebrafish: Methods and Protocols, a chapter: Construction of the inbred strain, In press.

曽田貞滋（京都大学）

1. 曽田貞滋・小沼順二・藤澤知親（2015）陸貝食オサムシの巨頭型と狭頭型：適応的形態分化はどのように起こるのか？　Pp. 124-132．長谷部光泰監修　細胞工学別冊　進化の謎をゲノムで解く．秀潤社．198 頁．

高濵洋介（徳島大学）

1. Boehm T, Takahama Y. Thymic development and selection of T lymphocytes. *Current Topics in Microbiology and Immunology 373, Springer.* 132 pages, 2014（書籍編集と一部執筆）

竹井祥郎（東京大学）

1. Takei, Y., and Hwang, P.-P. (2015). Homeostatic responses to osmotic stress in fishes. In: Fish Physiology Vol. 35: Biology of Stress in Fish (C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell,

and C. J. Brauner eds.), Academic Press, San Diego, (in press).

程久美子（東京大学）

1．「RNA-Seq による A-to-I RNA 編集の検出」、ガリポン・ジョゼフィーヌ、石黒宗、冨田勝、程久美子, 羊土社、NGS Professional シリーズ RNA Seq マスターブック, 2016.　印刷中。

中永和枝（国立感染症研究所）

1. 中永和枝、石井則久、斎藤肇、*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense* 症 pp.548-560、医薬ジャーナル社、斎藤肇監修、藤田次郎、阿部千代治、一山智、飯沼由嗣、森亨、石井則久編集、非結核性抗酸菌の基礎と臨床、2015 年、635 ページ

成田一衛（新潟大学）

1. Pathogenesis and Treatment in IgA Nephropathy. An International Comparison. Ed. Yasuhiko Tomino, Springer, 2016, 328 pages.　Is IgAN a familial or sporadic disease? Ichiei Narita, Yoshikatsu Kaneko, Yumi Itho, Yuichi Sakamaki, Seitaro Iguchi, Suguru Yamamoto, Minako Wakasugi, Junichiro J, Kazama, Shin Goto

深田吉孝（東京大学）

1. Hikari Yoshitane and Yoshitaka Fukada. Protein modifications pace the circadian oscillation of biological clocks. in “Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling” (Jun-ichiro Inoue & Mutsuhiro Takekawa, eds.), Springer, pp.251-268 (2015)
2. 吉種光、深田吉孝　「概日時計の発振メカニズムと時計タンパク質の翻訳後修飾」単行本「ブルーライトテキストブック」チャプター4 サーカディアンリズムの基礎、金原出版 (2015)

福澤秀哉（京都大学）

1. 山野隆志、福澤秀哉 第 4 章「微細藻類の CO_2 濃縮機構 -モデル緑藻におけるゲノム発現情報の利用」微細藻類によるエネルギー生産と事業展望 シーエムシー出版（2012）

藤原晴彦（東京大学）

1. 藤原晴彦、慶応義塾大学出版会、生命の教養学Ｘ「新生」、昆虫の新生・変態と擬態、2014 年、51−74（分担執筆）.
2. 藤原晴彦、オーム社、だましのテクニックの進化　昆虫の擬態の不思議、2015 年、206 ページ

古澤力（理化学研究所）

1. 堀之内貴明，鈴木真吾，古澤力，「適応進化はどのように起こるのか? ： 進化実験によるアプローチ」，学研メディカル秀潤社「進化の謎をゲノムで解く」（監修・長谷部光泰），2015 年，9 ページ

前田太郎（基礎生物学研究所）

1. 前田太郎, 裳華房,「ウミウシの葉緑体」, サイエンスの扉(2015)　2p

松下智直（九州大学）

1. 松下智直「植物の光受容体フィトクロムは選択的スプライシングを制御することで植物の光応答を仲介する」***細胞工学***（査読なし）Vol.34 No.6 596-597 (2015)

三野享史（京都大学）

1. 三野享史, 竹内理. システム免疫学-免疫細胞における RNA-Seq-.『NGS Professional シリーズ　RNA-Seq マスターブック』(羊土社). 2016 年 4 月刊行予定.

山岡吉生（大分大学）

1. 山岡吉生、南山堂、胃がんリスク検診（ＡＢＣ検診）マニュアル : 改正 2 版、2015 年、3 ページ

公募支援課題以外の班員の研究成果

黒川顕

1. 森宙史, 丸山史人, 黒川顕 (2010) メタゲノムインフォマティクス, 難培養微生物研究の最新技術 II, pp82-91,シーエムシー出版.　査読無し
2. 森宙史, 丸山史人, 黒川顕 (2010) メタゲノムデータベース, メタゲノム解析技術の最前線, pp42-53, シーエムシー出版.　査読無し
3. 山本希, 森宙史, 山田拓司, 黒川顕 (2014) メタゲノミクスの現状と未来, 生命のビッグデータ利用の最前線, シーエムシー出版. 査読無し
4. 森宙史, 黒川顕（2014）MicrobeDB.jp, 今日から使えるデータベース・ウェブツール, pp76-77, 羊土社.　査読無し
5. 森宙史, 東光一, 山田拓司, 黒川顕 (2015) 微生物統合データベースによる微生物と環境の研究への貢献, 難培養微生物研究の最新技術 III—微生物の生き様に迫り課題解決へ—, pp10-19, シーエムシー出版.　査読無し

中村保一

1. 児玉悠一，福田亜沙美，神沼英里，長崎英樹，望月孝子，中村保一 学研メディカル秀潤社（2012）「第 8 章 データ解析ツール＆保存編 3. 次世代シークエンサーのデータアーカイブとその周辺サービス」細胞工学 別冊次世代シークエンサー：目的別アドバンストメソッド 252 ページ

森下真一

1. Yoichiro Nakatani, Wei Qu, and Shinichi Morishita. Comparing the Human and Fish Genomes. (2014) *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons

笠原雅弘

1. 柴田朋子，笠原雅弘，重信秀治，西山智明，長谷部光泰「１分子シーケンサーを用いた非モデル生物の *de novo* ゲノム解読」化学同人「次世代シーケンサー活用術」林崎良英（監）伊藤昌可・伊藤恵美（編）, 2015（和文総説・査読無）
2. 笠原雅弘,　「LPM を用いて解析環境を構築する」実験医学別冊「次世代シークエンス解析スタンダード」二階堂愛（編）, 2014（和文総説・査読無）

3. 笠原雅弘「データ解析のためのコンピューター環境」細胞工学別冊「次世代シークエンサー　目的別アドバンストメソッド」, 2012（和文総説・査読無）

矢田哲士

1. 矢田哲士 (印刷中) 遺伝子発見, 人工知能学辞典 (人工知能学会 編), 共立出版.
2. 市瀬夏洋, 矢田哲士, 後藤修 (2012) Hegma: 大規模 DNA 配列を対象としたモチーフ発見ツール, 日本バイオインフォマティクス学会ニュースレータ, 24:5-6.
3. 矢田哲士 (2010) ゲノミクス, バイオインフォマティクス (A.ポランスキ, M.キンメル著: 後藤修 訳), 共立出版.

瀬々潤

1. 瀬々 潤、浜田 道昭. (2015) 生命情報処理における機械学習〜多重検定と推定量設計〜. 講談社サイエンティフィック. 全 192 ページ.

４．研究成果による産業財産権の出願・取得状況

上田真由美（京都府立医科大学）

１．発明の名称：眼合併症を伴う重症薬疹の発症リスクの評価方法
発明者：徳永　勝士, 澤井　裕美, 上田　真由美, 外園　千恵, 木下　茂
出願人：国立大学法人東京大学, 凸版印刷株式会社, 京都府公立大学法人
出願番号：特願 2013-221646　　出願日：2013/10/24
国内

國枝武和（東京大学）

1. 「DNA 障害抑制剤」、（発明者）國枝武和・橋本拓磨、（権利者）國枝武和・橋本拓磨、特許・特願 2015-032209、2015 年 2 月 20 日出願、未取得、国内

椎名隆（東海大学）

1. カニクイザル MHC 遺伝子のマルチプレックス DNA タイピング方法及びプライマーセット、椎名 隆、山田 幸穂、小笠原 一誠、太田 正穂、株式会社イナリサーチ、2013-158501、国内

花田耕介（九州工業大学）

1. 植物の形態形成および／または環境ストレス耐性に関与するポリペプチド
Kousuke Hanada, Mieko HIGUCHI, Takeshi Yoshizumi, Kentaro NAKAMINAMI, Masanori Okamoto, Motoaki Seki, Minami Matsui
公告番号　　WO2013137490 A1
公開タイプ　出願
出願番号 PCT/JP2013/058458
公開日　　2013 年 9 月 19
出願日　　2013 年 3 月 15 日
外国

本田賢也（東京大学）

1. PCT/US2014/045801　　Application No.:　61/844204
Title:　COMPOSITIONS CONTAINING COMBINATIONS OF BIOACTIVE MOLECULES DERIVED FROM MICROBIOTA FOR TREATMENT OF DISEASE
Filing Date July 21, 2014
Inventor(s):　Kenya Honda et al. RIKEN, Univ of Tokyo, Azabu Univ.

松尾洋孝（防衛医科大学校）

特許申請中

５．研究成果

まず、班員による支援高度化などのための活動（１）ゲノム ELSI ユニット、（２）情報解析支援活動における高度化、（３）領域企画課題の成果を述べ、その後に（４）公募支援課題の成果について各分野ごとにまとめた。その後に、（５）として公募支援依頼者から寄せられた支援による成果報告書をつけた。

（１）ゲノム ELSI ユニット

ELSI とは、Ethical Legal Social Implications（倫理的・法的・社会的課題）の頭文字である。医科学において先端的な大型プロジェクトをマネジメントする上で、ELSI への対応がますます重要になっている。そのためゲノム支援では ELSI センターが構想され、初年度より「ゲノム ELSI ユニット」が総括班内に設置された。ゲノム ELSI ユニットは、ゲノム支援 4 分野のうち、ゲノム医科学分野と微生物分野におけるヒト試料を用いる研究の推進を支援する活動を行った。具体的には、１．実務面での支援活動、２．支援活動に必要な情報収集のための調査研究、３．ELSI 分野のネットワーク形成、４．人材の育成という 4 つの目標をかかげ、活動を推進した。

１．実務面での支援活動

１）説明同意文書のモデル文書の作成

ヒトゲノム研究の現状を把握した上で必要な対応策を検討するため、文献や学会等での情報収集、次世代シーケンサーを導入して大規模解析を行っている国内の複数の研究機関や全ゲノムデータを扱う NIH 等の海外機関への訪問調査を行い、ELSI の課題を分析した。これらの調査研究をもとに、ゲノム支援での倫理面の支援を行った。

まず初年度には、大規模ヒトゲノム研究の倫理審査を申請するにあたって必要な留意点を盛り込んだ説明同意文書のモデル書式を作成し、次年度の支援課題公募時から公開を行った。モデル文書の作成にあたっては、国内外の大学・研究機関・研究プロジェクトが使用する様式、政府による指針（ゲノム３省指針）、およびゲノム支援の戦略会議のメンバーの意見を検討・考慮した。モデル文書は毎年改定を行いゲノム支援の web サイトに掲載した。また平成 24 年度公募分から、研究計画書や説明同意文書に記載すべき項目のリストも作成し、合わせて公開を行った。

説明文書および同意文書のモデル書式

2014. 3. 1

文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」編

説明文書モデル書式 ………………………………2～6 ページ
同意文書モデル書式 ………………………………7 ページ
同意撤回文書モデル書式 …………………………8 ページ

【ゲノム支援への応募以外の目的のために本モデル書式を使われる方へ】
（ゲノム支援への応募のために本書式を利用される研究者の方は本項は無視してください。）

ゲノム支援への応募以外の場面での使用を目的とした本書式の利用及び改変に関して制限は設けておりません。ただし、その際は「文部科学省科学研究費新学術領域研究『ゲノム支援』が作成したモデル書式を参考とした」旨を明記して頂きますようお願いします。また、国内で使用されている説明同意文書の現状を把握するために、作成された文章の電子版を参考のためにゲノム支援までお送り頂けますと幸いです。
宛先・お問い合わせ先：ゲノム支援ゲノム ELSI ユニット（g_elsi@eth.med.osaka-u.ac.jp）

研究協力者の皆様へ
研究課題「※申請書の研究課題名」
へのご参加について

青字の箇所は、研究内容に合わせて適宜表現を修正してください。

全ゲノム配列解析・全エクソン配列解析・特定領域の塩基配列解析・全ゲノム関連解析の例文

このたび皆様には、私どもの研究「※申請書の研究課題名」にご参加いただきたく、お願い申し上げます。この研究は、皆様の血液（または組織）から「遺伝子」を抽出して解析することを通じ、病気の原因を究明することを目指すものです。

「遺伝子」とは、人間の身体を作る設計図にあたるものです。人間の身体は、約６０兆個の細胞からなっていますが、遺伝子は、細胞一個一個の中の「核」という部分に入っています。人間の身体は、この遺伝子の働きに基づいて成長し、維持されています。また遺伝子の働きは病気にも関係しています。これまでに、遺伝子の働きから病気の原因を調べる研究が進められてきましたが、未だ原因を解明できていない病気が数多くあります。

近年、技術革新が進んだことで、１つの遺伝子ではなく、ヒト一人の持つ全ての遺伝情報（ゲノム）と病気との関わりについて調べることができるようになりました。（全ゲノム関連解析の場合：近年、技術革新が進んだことにより、ゲノム全域の多様性について病気との関わりを調べることができるようになりました。）これによって、これまで原因を調べることが困難であった疾患についても、究明できる可能性が高まっています。

今回の研究は、＊＊（申請する研究の目的を簡潔に記載してください。）できるように目指したものです。

なお、このような研究では、数多くの試料を扱い、高度な解析機器を使用するだけでなく、膨大な量の遺伝情報を収集して研究者間で広く共有することが求められます。そこで本研究では、他の研究機関と協力体制を組み、得られた研究結果は公的データベースに登録します。研究結果を公的データベースに登録し、多くの研究者が利用できるようにすることで医学研究全体および新規技術の開発を推進し、様々な病気について今まで不可能であった疾患の原因の解明や治療法・予防法の確立に貢献することを目指します。

この研究にご協力いただくかどうかは、皆様の自由意思に委ねられています。研究にご協力いただけない場合でも皆様に不利益はありません。

説明同意文書のモデル書式の表紙（上）と、研究計画書や説明同意文書に記載すべき内容のリスト（下）。ゲノム支援のホームページから公開、ダウンロード可能である。

支援課題（C.ゲノムリシーケンス）における研究計画書及び、説明同意文書に記載すべき内容のリスト

項目		研究計画書（研究倫理審査申請書） 注）	説明同意文書
研究の説明			
	研究目的について	・全ゲノム解析、全エキソン解析等について実際の研究内容に則して具体的に記載。	・当該研究の目的（疾患の原因究明や機序解明等）について記載。 ・当該研究だけでなく様々な疾患の研究を行うことについて記載。 ・単一遺伝子や少数の遺伝子ではなく、全ゲノムを対象とする解析を行うことを記載。
	共同研究機関について	・ゲノム支援の説明。※例文1 ・ゲノム支援側の研究者、所属、研究実施場所等を記載。	・共同研究機関（ゲノム支援を含む）、責任者、所属等を記載。
データベースへの登録・公開・共有		・頻度情報や配列情報は、バイオサイエンスデータベースセンター（National Bioscience Database Center: NBDC）が運営するNBDCヒトデータベースに、データの種類や性質に応じて登録することを記載。※補足説明 ・個人の同定につながらないvariationの頻度情報等は一般公開し、個々のゲノムデータ等は制限付きアクセスの下、審査を経て承認された研究者に対して共有を認めることを記載。 ・「ゲノム支援」が頻度の最も高いvariationを採用して日本人ゲノムの参照配列を作成し、及び参照配列は個人ゲノムのデータ数が増加し、個人識別を可能にする情報が含まれないと判断される段階で、NBDCから公開することを記載。	・データベースの具体名は不要であるが、解析データを公的データベースに登録することについては記載。 ・データベースに登録されたデータは将来のゲノム研究に利用される可能性があることについて記載。 ・データベースの公開・共有では、2段階アクセス（一般公開、制限付きアクセス）を用いることを記載。
研究における不利益			・研究に伴う身体への危険性（侵襲性）について記載。 ・研究協力者また血縁者の方に予測できない不利益が生じる可能性があることを記載。※例文2 ・遺伝カウンセラーの紹介について記載。
同意の撤回			・撤回の自由について記載。 ・解析データがデータベースに登録された後の撤回では期待に添えない場合があることを記載。
結果の開示		・方針を検討して記載。	
将来の利用（オプション）		・試料・情報を、現時点では特定されない将来の他の研究に用いたり、将来他の研究機関に提供したりする可能性を検討。	・試料・情報について、他のヒトゲノム・遺伝子解析研究における利用や他の研究機関への提供が将来的に想定される場合には記載し、その可能性や利用手続等について十分な説明を行う。

注）
空欄の部分（研究における不利益、同意の撤回、結果の開示）については、説明同意文書への記載内容を含めた上で当該研究計画に合わせた内容を記載してください。研究計画書と説明同意文書の内容に不整合がないようにしてください。

※補足説明
NBDCヒトデータベースはNBDCと日本DNAデータバンク（DNA Data Bank of Japan: DDBJ）の協力により運営されている。格納用データベースはDDBJのもとに置かれている。それらにはDRA、JGA、NHAがあり、以下のように分けられている。
データ提供および利用の申請窓口はNBDCである。
1. 一般公開（オープンアクセス）が可能な集団の統計値や特定の個人由来ではない試料の解析結果などは、DRAあるいはNHAに登録される。
2. 制限付きアクセスの必要な次世代シークエンスデータ、アレイデータ、その分析データは、JGAあるいはNHAに登録される。
3. その他は、NHAに登録される。

※例文1
文部科学省科学研究費新学術領域研究「ゲノム支援」では、高度な遺伝情報の解析を行う体制を整備し、多くの研究者の研究を支援しています。本研究の一部は「ゲノム支援」で担われています。また「ゲノム支援」により得られたデータは、公的データベースに登録し多くの研究者に提供することにより、多くの病気について、今まで不可能であった疾患の原因の解明や治療法・予防法の確立に貢献することとしています。

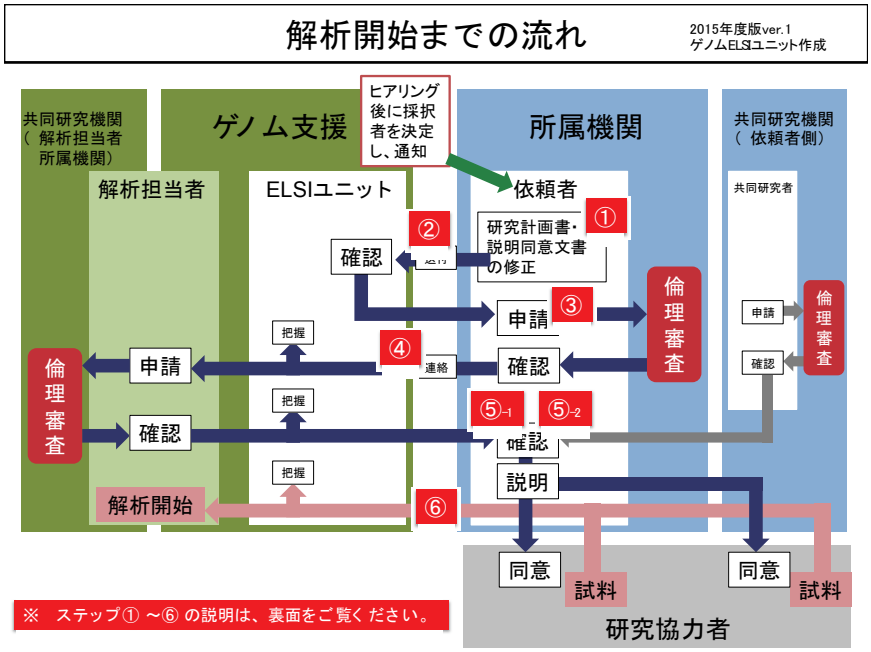
※例文2
遺伝子解析の研究では、皆様や皆様の血縁者の方に対して、将来の発病に対する不安や社会的差別などの様々な倫理的・法的・社会的問題が生じる可能性も考えられます。不安や懸念をお持ちになった場合に備えて、遺伝カウンセリングの担当スタッフをご紹介するなどの体制を整えています。

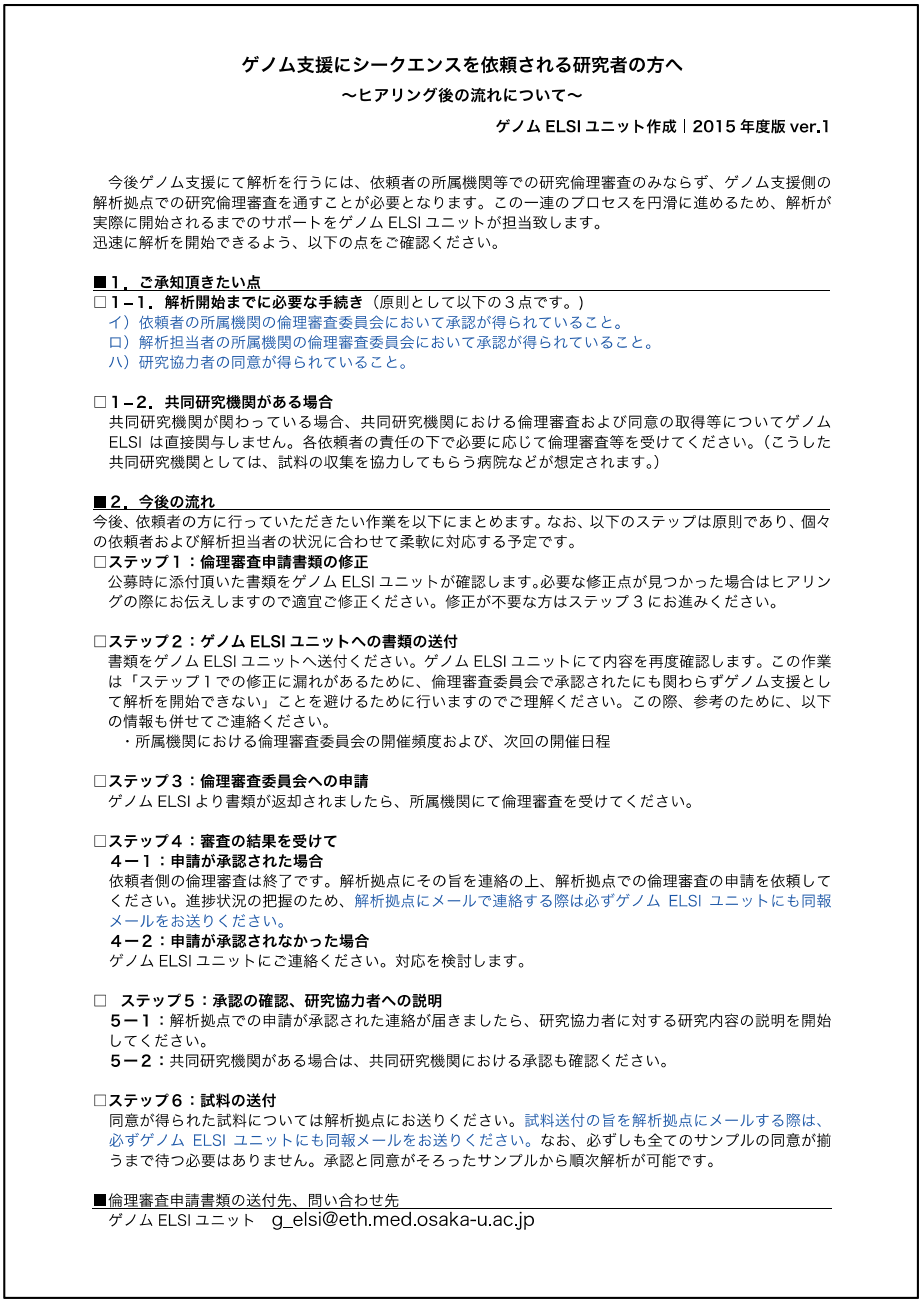
２）個別課題への対応

各年度の医科学および微生物分野のゲノム ELSI ユニットの支援対象課題について支援を行い、支援の中で見えてきた課題に対応してきた。具体的には、各機関の倫理審査委員会での審査をスムーズに進めるための、個別の研究計画書・同意説明文書作成への助言およびフローチャート等の作成である。ゲノム ELSI ユニットでは、プロジェクトが始まった当時から、研究計画書や説明同意文書を全て確認した上で、問題点を指摘し、審査の効率化のためのきめ細やかな対応を行ってきた。そのなかで、研究計画を採択された研究者と解析を実施する支援側の倫理審査や審査後の試料採取、試料の送付、解析までを含めた研究全体をスムーズに進めるためには、支援活動のフローチャートが必要であることがわかり、フローチャートを作成・配布した。また、質問の多かった説明同意文書に盛り込むべき内容については、それを網羅したモデル文書を作成し配布することで、研究倫理審査の効率化を図った。支援対象となった研究数は、平成 22 年度 11 件（ゲノム医学)、平成 23 年度 12 件（ゲノム医学)、平成 24 年度 16 件（ゲノム医学)、平成 25 年度 15 件（ゲノム医学 13 件、微生物 2 件)、平成 26 年度 14 件（ゲノム医学 12 件、微生物 2 件)、平成 27 年度 10 件（ゲノム医学 8 件、微生物 2 件）であった。

採択者の所属機関の倫理審査委員会のメンバーに対しては、研究倫理審査における困難な点や最新の状況等をアンケート調査し、委員間で情報を共有できるよう研修会を開催し、研修会の記録集の作成・配布することによって、各研究機関における倫理審査の改善に資することができたと考えている（詳しくは１－３）にて記述する)。

ヒアリング時に配布したフローチャート（下）とその説明書（次ページ)。





ゲノム支援にシークエンスを依頼される研究者の方へ

～ヒアリング後の流れについて～

ゲノム ELSI ユニット作成｜2015 年度版 ver.1

今後ゲノム支援にて解析を行うには、依頼者の所属機関等での研究倫理審査のみならず、ゲノム支援側の解析拠点での研究倫理審査を通すことが必要となります。この一連のプロセスを円滑に進めるため、解析が実際に開始されるまでのサポートをゲノム ELSI ユニットが担当致します。
迅速に解析を開始できるよう、以下の点をご確認ください。

■1．ご承知頂きたい点

□**1－1．解析開始までに必要な手続き**（原則として以下の３点です。）
イ）依頼者の所属機関の倫理審査委員会において承認が得られていること。
ロ）解析担当者の所属機関の倫理審査委員会において承認が得られていること。
ハ）研究協力者の同意が得られていること。

□**1－2．共同研究機関がある場合**
共同研究機関が関わっている場合、共同研究機関における倫理審査および同意の取得等についてゲノム ELSI は直接関与しません。各依頼者の責任の下で必要に応じて倫理審査等を受けてください。（こうした共同研究機関としては、試料の収集を協力してもらう病院などが想定されます。）

■2．今後の流れ

今後、依頼者の方に行っていただきたい作業を以下にまとめます。なお、以下のステップは原則であり、個々の依頼者および解析担当者の状況に合わせて柔軟に対応する予定です。

□**ステップ１：倫理審査申請書類の修正**
公募時に添付頂いた書類をゲノム ELSI ユニットが確認します。必要な修正点が見つかった場合はヒアリングの際にお伝えしますので適宜ご修正ください。修正が不要な方はステップ３にお進みください。

□**ステップ２：ゲノム ELSI ユニットへの書類の送付**
書類をゲノム ELSI ユニットへ送付ください。ゲノム ELSI ユニットにて内容を再度確認します。この作業は「ステップ１での修正に漏れがあるために、倫理審査委員会で承認されたにも関わらずゲノム支援として解析を開始できない」ことを避けるために行いますのでご理解ください。この際、参考のために、以下の情報も併せてご連絡ください。
・所属機関における倫理審査委員会の開催頻度および、次回の開催日程

□**ステップ３：倫理審査委員会への申請**
ゲノム ELSI より書類が返却されましたら、所属機関にて倫理審査を受けてください。

□**ステップ４：審査の結果を受けて**
４－１：申請が承認された場合
依頼者側の倫理審査は終了です。解析拠点にその旨を連絡の上、解析拠点での倫理審査の申請を依頼してください。進捗状況の把握のため、解析拠点にメールで連絡する際は必ずゲノム ELSI ユニットにも同報メールをお送りください。
４－２：申請が承認されなかった場合
ゲノム ELSI ユニットにご連絡ください。対応を検討します。

□ **ステップ５：承認の確認、研究協力者への説明**
５－１：解析拠点での申請が承認された連絡が届きましたら、研究協力者に対する研究内容の説明を開始してください。
５－２：共同研究機関がある場合は、共同研究機関における承認も確認ください。

□**ステップ６：試料の送付**
同意が得られた試料については解析拠点にお送りください。試料送付の旨を解析拠点にメールする際は、必ずゲノム ELSI ユニットにも同報メールをお送りください。なお、必ずしも全てのサンプルの同意が揃うまで待つ必要はありません。承認と同意がそろったサンプルから順次解析が可能です。

■倫理審査申請書類の送付先、問い合わせ先
ゲノム ELSI ユニット　g_elsi@eth.med.osaka-u.ac.jp

ゲノム ELSI ユニットによる支援から見えてきた今後の課題に、共同研究を伴う研究計画の倫理審査をスムーズに進められるための仕組みづくりを挙げておきたい。ゲノム支援では、採択側と支援側の少なくとも二つの研究機関が研究に関わるが、これまで支援してきた研究の多くの採択側がすでに多施設共同研究であった。そのような場合、共同研究機関の倫理審査で承認されてから承認を出すという倫理審査委員会も多数存在し、最終の承認までに長時間を要するケースが見られた。多数の研究機関が参画する研究計画の審査がスムーズに進めるための工夫が必要であると考えている。

３）研修会

初年度および次年度に、支援対象者の研究機関の倫理審査委員会において、ゲノム支援で支援の要件としたデータ共有など、大規模ゲノム解析・パーソナルゲノム解析の倫理的課題が議論となり、承認が遅れたり、審査が通らなかったりするという事例がみられた。そこで「ゲノム支援」の方針および最新のゲノム解析研究の現状と倫理的課題に対する、全国の大学・研究機関の倫理審査委員会の理解を深めることを目的に、3 年度目（2012 年度）から、倫理審査委員会の関係者を集めた研修会を開催した。対象は、倫理審査委員会の委員長、委員（外部委員を含む）、事務局スタッフなどで、データ共有をはじめとして、パーソナルゲノム解読に特有の課題や国の研究倫理指針、共同研究の倫理審査等を話題にし、倫理審査委員会関係者の意見交換の場にもなった。研修会の毎年の開催実績を下に示す。

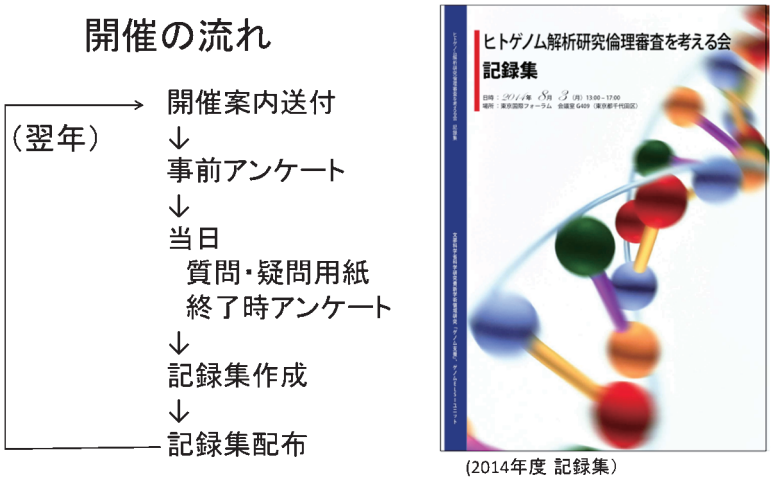
	名称	日時	場所	参加数	トピック
第1回	ヒトゲノム解析研究倫理審査のための研修会	2012年8月5日（日）	東京国際フォーラム	約35機関より約90名	・ヒトゲノム指針改正
第2回	ヒトゲノム解析研究倫理審査を考える会	2014年1月13日（月）	千里ライフサイエンスセンター	33機関より63名	・インフォームド・アセント ・ゲノム解析の結果開示 ・データ共有ポリシー
第3回		2014年8月3日（月）	東京国際フォーラム	36機関より74名	・ヒトゲノム指針 ・共同研究、連携研究における倫理審査
第4回		2015年8月9日（日）	千里ライフサイエンスセンター	31機関より65名	・医学系指針 ・ゲノム編集

参加機関（2012 年の例）：　札幌医科大学、東北大学、新潟大学、金沢大学、国立成育医療研究センター、自治医科大学、昭和大学、東海大学、東京大学、東京医科歯科大学、国立遺伝学研究所、藤田保健衛生大学、名古屋大学、防衛医科大学校、山梨大学、京都大学、京都府立医科大学、大阪大学、国立循環器病研究センター、神戸大学、徳島大学、愛媛大学、九州大学、長崎大学、近畿大学、（公財）がん研究会がん研究所、他




（第 1 回東京国際フォーラムにおける研修会の様子）

開催にあたっては、参加者への開催案内送付時に事前アンケート調査紙を同封し、回答を集めて中間まとめを作成、プログラム作りに活用するとともに、参加者へメールにて開催前１週間前後を目処に送付した。研修会当日はパネルディスカッションの際アンケート結果を参照した議論を行った。会の終了時にもアンケートを回収し、次回開催への参考とした。会の内容は記録集としてまとめ、参加者や登壇者へ配布を行った。



(2014年度 記録集)

この研修会の終了アンケートでは、会に参加したことによって他機関の状況がわかり、自機関の倫理審査の役に立ったという感想や、普段実施している説明同意やデータ共有についてもさらに理解が深まったという回答が見られた。倫理指針に記載されていても具体的な運用に困っているような事項について、会を通じた関係者同士の学び合いが生じ、よい方向での解決に向かっていることが推測された。

参加者は倫理審査の関係者という枠組みであるため、医療従事者や倫理専門家、法学者、実験研究者、患者団体関係者、政策関係者など様々な立場の人々が一同に会しており、ヒトゲノム解析の課題を共通の関心として論じ合うことができた。従来は異分野で分断されていた関係者の意見交流が進み、ELSI という分野が字義通り融合領域として生じていることが実感された。

また研修会では、ゲノム 3 省指針や倫理審査体制等、国レベルの体制のあり方についても多く議論された。ゲノム解析研究を含む医科学では、その進展にともない、多施設共同研究の倫理審査体制をはじめとして様々な課題が発生している。解決にむけて政府等でも議論されているが、その際に現場からの意見を伝えることは必須と考えられる。そのような形で本会の成果を政策等に反映させることができるかどうかは、課題として残されている。

さらに、情報共有の機会を増やすことも今後の課題として挙げておきたい。年に一度開催してきたが、オンラインでの情報共有のしくみを構築するなどして、より即時的な情報

共有のあり方も検討する必要がある。

２．調査研究

文献での情報収集、国内外の学会での情報収集や聞き取り、欧米の研究機関の訪問調査や専門家の招聘、共同研究を行った。初年度には、説明同意文書のモデル書式の作成にも役立てるために、パーソナルゲノム解読や次世代シーケンサーやデータベースを用いた大規模ゲノム解析に伴う ELSI 課題を見渡したリストを作成した。その後は、特に結果の開示やデータ共有といった遺伝情報の取扱いに関する事項を重要課題と位置づけ、法的規制やガイドラインの整備状況、研究現場での運用を調査した。さらに、ヒトゲノム解析結果の利用に関する市民の意識調査を行った。アジア圏の ELSI についても共同研究を行った。

１）ゲノム ELSI の課題のリスト化

１－１）でも述べたように、支援活動の実施にあたって、ゲノム解析に伴う ELSI 課題を国内外の状況を広く見渡し、把握することが必要であった。そのために、文献調査および海外の研究機関の訪問調査を行い、どのような課題に取り組む必要があるかを整理・分析した。

そのひとつとして、ゲノム支援で行っているように、ゲノム解析が GWAS（全ゲノム関連解析）や全ゲノム塩基配列解析であって個人ゲノムの全域を対象とする場合には、従来の遺伝子解析研究と違う点を特に説明同意文書に盛り込み、試料提供者の十分な理解が得られるよう配慮すべきといった新たな課題が生じていることがわかった。例えば、ゲノム全域を対象としている点について、明確に記載すべきといった点である。これらの点は、次ページの表のような説明同意の際に盛り込むべき項目のリストにし、ゲノム ELSI ユニットによる採択課題の倫理審査書類のチェックに使用した。初年度や次年度などでは倫理審査書類に記載されていないことも多かったことから、個人のゲノム研究者や各機関の倫理審査委員会では気付かなかったり指摘するのが困難であったりした点と考えられる。ゲノム ELSI ユニットの活動によって、研究参加者への倫理的配慮が向上し、研究がより適切に進められたと考えている。

これらの項目の内容は、前掲の説明同意文書のモデル書式に記載し、次年度以降は課題公募ホームページでも公開して採択者へ周知を行った。同時に１－３）で述べた倫理審査関係者の研修会でも紹介し、各機関の審査でも配慮されるようにした。

この研究の結果は、モデル書式作成経緯を含め、論文として発表した（Minari, Shirai and Kato 2014）。

Table 1

Specific requirements of the IC document to the MGSP

Key issues	Description
Research purpose	• Explanation of personal genome research
	• Description of whole-genome/exome sequencing, if applicable
	• Description of general research purposes of genotype-phenotype information
Collaborations with external institutions	• List of names of relevant institutions and principle investigators in the MGSP
Data sharing	• Description of significance and purpose of data sharing
	• Two levels of access to national/public databases
Withdrawal of consent	• Inability of withdrawal of consent for data use after they are registered to databases
Risk assessment and management	• Physical interventions
	• Explanation of associated ethical, legal and social issues
	• Genetic counseling

Minari *et al.*

Minari *et al. Life Sciences, Society and Policy* 2014 **10**:4 doi:10.1186/s40504-014-0004-9

OPEN DATA

２）結果の開示に関する課題への対応

大規模なゲノム解析を伴う支援課題においては、ゲノム解析結果の取り扱いが課題となることがわかった。モデル文書作成時の検討に加え、毎年度の倫理支援活動に必要な情報を得るために、国内外、特に日本における政府文書や政府指針の分析を行った。その結果、2013 年に改正された政府指針（ゲノム３省指針）では、結果の開示についてより詳しいガイダンスが与えられているが、研究者の解釈の余地が大きく、プロジェクトが十分な検討をしないと、研究参加者への倫理的配慮が十分に行えない可能性があることが明らかになった（Minari, Chalmers and Kato 2014）。また、ゲノム ELSI ユニットには現場からの意見も多く寄せられており、例えば、結果の開示について研究者個人が開示すべきと考えても、遺伝カウンセリング等のインフラ整備が機関によって不十分であるなどの理由で、対応が難しいといった様々な事情があることが明らかとなった。ゲノム ELSI ユニットの倫理審査書類チェックなどの倫理支援活動はこの知見を考慮しながら行った。

また、結果の開示については、近年日本でもクリニカルシークエンスの概念が導入されており、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）を中心として、研究が進められている。ゲノム ELSI ユニットでは、結果開示についての知見を AMED のプロジェクトなどへも提供し、ゲノム医療政策におけるルール作りにも貢献している。

３）データ共有やデータベースに関する課題

データ共有やデータベース等への情報提供はゲノム支援課題採択者への支援要件であったが、実施や運用の倫理面のガバナンスを形成する際、ゲノム三省指針のみでは不十分であった。そこでゲノム ELSI ユニットにおいて、国内外の関連機関におけるポリシーやガイドラインの調査を行なった。特に、データアクセスについて、２段階アクセス方式が以前よりさらに推奨されるようになっていること等が明らかとなった。それらをもとに、ゲノム支援自体のデータベース運営機関と相談し、ゲノム支援で使う研究計画書や説明同意文書にあらかじめ記載すべき項目をリスト化することができた。このリストを課題採択者に配布し、助言や指摘を行った。

４）データ保護に関する課題

遺伝情報の医学医療・健康に関連した多分野での利用や、データベースのクラウド化にともなう近い将来の ELSI 課題についても、日本・EU の研究者と共同で準備状況を調査し検討を行った。その結果、遺伝情報に対する個人情報性や機微性への認識が EU を中心に変容しており、一部ですでに立法化に至るなど、社会に大きな影響を与えていることが示された。この結果を受け、日本でも遺伝情報の取扱いについて、ゲノム三省指針の守備範囲を超えた大きな範囲で、円滑な運用に向けた体制の準備が必要なことが分かった。それを指摘する論考（Yamamoto et al. 2015）や学会発表を行い、関係者の議論を呼びかけた。これにより、日本人類遺伝学会をはじめとする各種学会や学術会議などが、個人情報保護法の改正におけるゲノム情報の取扱い等について検討や意見形成を始めている。それらの活動に対して、複数のゲノム ELSI ユニットメンバーが情報提供やアドバイスを行った。この点でも、ユニットにおける調査研究は、ゲノム支援内部だけでなく、日本全体の研究ガバナンスのためにも、重要な役割を果たしていると言える。

５）ヒトゲノム解読の進展に関する市民の意識

地域住民や多数の試料提供者が参加する大規模ヒトゲノム解析研究や消費者直販型遺伝子検査の普及、個別化医療政策等により、ヒトゲノムの利用はパーソナルゲノム時代を迎えた。このような時代変化をふまえて一般市民を対象に意識調査を実施し、市民の日常生活や市場経済活動と、ヒトゲノム解析研究の相互の影響を評価するためのデータが得られた。調査はインターネットとウェブサイトを用いて行い、国内において 3 回実施、そのうちの２回は国際比較が可能な内容をデザインした。さらにそのうち１回はオーストラリア、英国、米国等との共同研究として行った。この調査から、全ゲノム解析や消費者直販型の遺伝子検査に前向きなのはどのような人々か、検査等の内容の理解度、遺伝子やゲノムか

らどのような情報を欲しいと考えているか等が分析された。今後は国際比較を行うとともに、国内の政策やグローバルな規制への提言を検討する。各回の結果は解析が終わり次第、論文等で公表する予定である。

６）アジアのゲノム ELSI

欧米だけでなく、アジア地域の ELSI 研究者のネットワークを積極的に拡げるために、国際シンポジウムなどを開催してきた。特に 2013 年に大阪で開催したシンポジウムでできたネットワークをもとに、アジアにおけるゲノム ELSI への取り組み状況について比較分析した論文を共同で発表した（Yoshizawa et al. 2014）。

論文発表により、他のアジアの地域の ELSI 研究者の関心を集め、2015 年度以降のマレーシアや台湾、インドネシアの研究者との共同研究につながった。この結果、ヒトゲノム解析の状況が、アジア地域では日本や欧米と異なる状況が明らかとなった。その一方で、バイオバンクやインフォームド・コンセントにかかる ELSI 等では、類似の課題を抱えていることもわかり、説明同意文書のアジア的な特徴を抽出することができた。こうしてアジア地域の研究者と論文や学会発表を行うとともに、今後も各国の法規制や政策等の情報交換のできる研究者間のネットワークを構築した。そこで得られる情報は実務レベルの支援活動に生かしてきている。

３．ELSI 分野のネットワーク形成

倫理審査委員会・実務者向け、ELSI 専門家・研究者向け、市民向け、国際活動といった個別目的の会議、シンポジウムに加え、分野交流型の会議等を多数開催した。それによって、ゲノム支援の研究活動内容の情報提供および ELSI についての情報共有、協力体制の充実が実現した。

- ヒトゲノム解析研究倫理審査のための研修会・考える会（4 回、前掲）
- ネットワーク研究会

  平成 22 年 12 月（京都）

  ゲノム科学者、医療倫理学者、法学者、研究支援関係者計 13 名
- 公開シンポジウム「社会で築くゲノム科学の未来」（2 回）

  平成 23 年 2 月（東京）、平成 24 年 2 月（東京）

  ゲノム科学者、医療関係者、政府関係者、生命倫理関係者、市民等約 140 名
- 国際会議「Genome ELSI Osaka 2013」

  平成 25 年 2 月（大阪）

  ゲノム科学者、医療関係者、生命倫理関係者、市民等約 60 名

- 国際シンポジウム「責任ある研究・イノベーションのための国際シンポジウム –International Symposium for Responsible Research and Innovation-」
  平成 25 年 12 月 16 日（大阪）
  日本、アメリカ、ドイツ等の ELSI 関係者　約 30 名
- 「ライフサイエンス・医療と社会」研究セミナー（2 回）
  平成 27 年 7 月 8 日（大阪）「病院におけるアートの経験－ハンチントン病とダンス－ Expérience de l'art à l'hôpital-Huntington et danse」
  平成 27 年 9 月 3 日（大阪）「Clouds for Translational Genome Research -A European Perspective with Special Focus on Commercial Service Providers」

さらに波及効果としては、ゲノム ELSI ユニットメンバーによる講演、情報提供、様々な研究会への協力や共催、モデル書式等作成物の他機関での採用などにより、他の研究分野との連携が進んだ。さらに国際組織 ELSI2.0 や Global Alliance for Genomics and Health においても、ゲノム ELSI ユニットメンバーが WG 主査などの重要な役割を担い、日本のゲノム研究の倫理面の世界との連携を推進することができた。

４．人材育成

ゲノムの ELSI を専門としない分野から毎年新しい人材を研究員として雇用し、ここから、別の ELSI 関連のキャリアポストを得てゲノム ELSI ユニットを出て行く人員が発生した。大学で ELSI を含む部門に教員職・専門職を得た者は総計４名である（医学系３名と研究支援系１名）。このことから、ゲノム ELSI 分野の実務および調査研究実績を積んだ人材の増員に貢献しており、全体としてゲノム ELSI 分野の強化が実現した。さらに３で述べた会議やシンポジウムには、参加者あるいはスタッフとして多くの若手研究者（ゲノム研究の ELSI や医療倫理分野の大学院生・研究者）が関わった。このような人々にも、ゲノム研究の ELSI についての知識や最先端の動向を見聞きする経験を提供でき、将来のゲノム ELSI を担う人材の育成に貢献できたと考える。

（２）情報解析支援活動における高度化

情報解析支援活動では、主に基盤技術開発グループを中心として、ゲノム科学を推進する上で必須となる基盤技術（ソフトウェア、解析パイプライン、データベース等）の開発を実施してきた。アセンブル関連ソフトウェア8本、配列解析ソフトウェア16本、解析パイプライン5本、可視化ソフトウェア4本、環境整備系ソフトウェア3本、データベース6件、その他7本の、合計49本の新規ソフトウェア、データベースを開発し公開した。以下に、それら開発したソフトウェア等の概要をまとめた。

【アセンブル関連ソフトウェア】

1)MetaVelvet：メタゲノムアセンブラ（慶応大・榊原）

細菌叢における菌種の存在率に顕著な違いがある場合に、バルクで抽出したメタゲノムDNAを次世代シーケンサーでシーケンスしたショートリードからアセンブリする専用のソフトウェアの開発が求められていた。そこで、de Bruijnグラフに基づく単一種ゲノム用アセンブラであるVelvetを改良し、メタゲノム対応型アセンブラMetaVelvetを設計して実装した。本手法の基本的アイデアは、入力メタゲノム配列から作成された複数種のゲノムが混在した状態の de Bruijnグラフを、個々の菌種から構成される部分グラフへと分解して、アセンブリを行なうことにより、菌種別のスキャフォールドを求めることである。今回開発したMetaVelvetは、元のVelvetにバンドルされる形で、すでに配布・流通され世界中で使用されている。

2)PBSIM：Pac Bioシーケンサーのリードシミュレータ（東大・浅井）

PacBio RS DNAシーケンサーは、長い配列を出力するが、従来機器よりも１桁高いエラー率を持っている。そのため、その情報解析ツールは従来のツールとは異なったアルゴリズム・ツールの開発が必要となっている。一方、NGS解析ツールの精度評価では、正解が既知のデータによる検証が欠かせない。そのためには、シーケンサーのリードをシミュレートするソフトウェアが不可欠であるが、PacBioシーケンサーには有効なシミュレータが存在しなかった。そのため、公開されているPacBioシーケンサーのリードデータから、そのエラーの統計的性質を解析してパラメータを取得し、独自のシミュレートを開発した。

3)Sprai：PacBioシーケンスによるアセンブルソフトウェア（東大・笠原）

一分子リアルタイムDNAシークエンサーPacBio RSは商用出荷されている製品中で最も長い配列を出力し、ゲノムの新規解読に有効であると期待されてきた。しかし、出力する配列は非常に長いものの、従来型のシークエンサーと比べて１桁以上高い塩基エラー率（約１５％）を持つため従前のゲノム解読アルゴリズムは適用不可能だった。そこで、PacBio RS の出力する塩基配列に含まれるシークエンシングエラーがほぼ独立に生じる性質を利用し、塩基配列同士のマルチプルアラインメントを高速に行い、エラーを検知・除去をする世界最高精度のアルゴリズム Sprai を開発した。Sprai にはシークエンシングエラー除去後にアセンブリするパイプラインを内蔵しており、PacBio RS の長い出力塩基配列のみを入力としてエラーの除去からゲノム配列出力までワンストップで行うことができる。

4)Xgenovo：454リード専用メタゲノムアセンブラ（慶応大・榊原）

454のペアエンドリードを用いてメタゲノムをアセンブルする、メタゲノム専用のアセンブルソフトウェアXgenovoを開発した。シングルエンド専用のアセンブラgenovoを拡張することにより、アセンブルされるcontig長がより伸長され、計算時間もより効率的であることが示された。

5) Platanus：大型真核生物ゲノムアセンブラ（東工大・伊藤）

次世代シーケンサーのショートリードによる大型真核生物ゲノムのアッセンブルを可能とするソフトウェアの開発を実施した。開発に際しては、支援活動によりシーケンスされたイトマキヒトデおよびベネズエラ糞線虫のデータを使用した。これ

らの生物種においては、ゲノムのヘテロ接合性が高いため、他生物種で良好なアセンブル結果が得られていると報告されているSOAPdenovoなどを用いても、N50が2kb前後にとどまる等、芳しくない結果しか得られない。今後野生由来生物のゲノム解析が増加すると考え、ヘテロ接合性が高いゲノム向けの新規アセンブラplatanusを開発した。本アセンブラの有効性は、ヘテロ接合性の高いゲノムとして決定されたジャガイモ、カキなどのデータで有効性を検証済みである。さらに本アセンブラの有効性を高めるために、ゲノム配列が既知の線虫および、繰り返し配列を比較的多く含むイネを再シーケンスしたものを用いてアセンブルアルゴリズムの改良を実施した。本アセンブラplatanusを支援依頼の各種生物ゲノム（線虫、ベネズエラ糞線虫、ナミアゲハ，シロオビアゲハ、イトマキヒトデ、フタホシコオロギ、アメリカザリガニ、ヌタウナギ、オニヒトデ、アマミトゲネズミなどヘテロ接合度が高い生物種）に適用しアセンブルを実施した。その結果、アセンブル結果が既存のSOAPdenovoなどのソフトウェア利用時よりも飛躍的に向上し、大型真核生物のゲノム解析を大きく進展させる事が可能となった。

6)MetaVelvet-SL：メタゲノムアセンブラ（慶応大・榊原）

メタゲノム対応型アセンブラMetaVelvetを開発してきたが、アセンブリグラフ中のキメラノードの検出率が低いという問題が残っており、より長くかつ高品質なアセンブリの生成を妨げる要因になっていた。この問題点を機械学習手法を適用することにより解決して、MetaVelvetの性能を大きく改善したMetaVelvet-SLを新たに開発した。MetaVelvet-SLは、MetaVelvetはもとより、世界で最新のメタゲノムアセンブラであるIDBA-UDやRay Meta、OMEGAと性能評価実験をおこなった結果、いずれのアセンブラよりも大幅な高性能を達成することに成功した。

7)GMcloser：高精度ギャップ修復ソフトウェア（かずさDNA研・田畑、平川）

支援課題「シロオビアゲハのゲノム配列の決定」では、イルミナ社製HiSeqにより得られた配列データに対してアセンブルを行った。これにより得られたスキャフォールド配列にはNが連続した複数のギャップ領域が存在しており、これらの箇所を埋める必要性が生じた。そこで、コンティグ配列もしくはPacBioといった長鎖リードを用いてスキャフォールド配列上のギャップを埋めるソフトウェアGMcloserを開発した。これにより、GapCloserやGapFillerといったソフトウェアよりも高い精度でギャップを修復することができた。GMcloserでは、PacBioリードを用いてギャップを修復できることが特徴の一つであるが、その精度はPacBioリードにおけるエラー修正の精度に依存しており、3～15xのカバレッジでエラー修正されたリードで効率的に修復できることが分かった。

8)GMvalue：アセンブリ精度評価ソフトウェア（かずさDNA研・田畑、平川）

GMcloserによりギャップを修復した配列の精度を評価する必要性が生じた。このため、リファレンス配列に対してコンティグ配列やスキャフォールド配列をアライメントすることで正確性を測定し精度を評価するソフトウェアGMvalueを開発した。アセンブリ精度を評価できるソフトウェアであるGAGEやQuastといったものとは異なり、GMvalueでは、リファレンス配列にコンティグ配列もしくはスキャフォールド配列をアライメントする際の相同性やカバレッジ、許容するindelサイズなどを指定することで配列の精度をより詳細に評価することができる。

【配列解析ソフトウェア】

1)MURASAKI：多重ゲノム配列比較システム（慶応大・榊原）

複数種のゲノム配列から保存領域を高速に検出するシステムMurasakiの並列化と高速化をさらに向上させた。その結果、哺乳類ゲノムの比較では十数種まで実用時間内で計算可能となった。

2)Raccess：RNA配列の領域毎のアクセサビリティを計算するツール（東大・浅井）

機能性RNAは、その部分配列が他のRNA分子の逆相補配列と塩基対を形成するこ

とにより、高い標的特異性を示す。したがって、機能性RNAの標的予測においては逆相補鎖の検索が有力な手段となりうる。しかしながら、機能性RNAの塩基は、分子内でも塩基対作って２次構造を形成するため、他のRNA分子と相互作用しやすい領域と、しにくい領域が存在する。一方、RNA２次構造は熱力学的に揺らいでおり、予測２次構造のみを根拠として相互作用しやすいかどうかを判定することは誤りである。Raccessは、RNA２次構造のエネルギーモデルを用いた動的計画法により、RNA分子内の各領域のアクセシビリティ（分子内で塩基対を取らない度合い）を計算するツールである。

3)CentroidHomfold-LAST：相同配列を用いたRNA2次構造予測（東大・浅井）

RNA２次構造では、最も自由エネルギーが小さい構造（MFE構造）を取る確率が最も大きい。そのため、従来はMFE構造を予測するツールがRNA２次構造予測の主流であった。しかし、MFE構造といえども、その確率は極めて小さく、また類似の確率を持つ構造も多数存在する。RNA２次構造予測では、塩基対の予測が重要であるため、構造既知のRNAで塩基対をどのくらい正確に予測できるかによって予測手法の評価が行われる。CentroidFoldは、期待精度最大化原理に基づき、真陽性と真陰性のバランスをとるパラメータを許しつつ、塩基対予測精度の期待値が最大となるよう、設計されたアルゴリズムによるRNS２次構造予測ソフトウェアである。第３者による性能評価では、常に最上位にランクされてきた。

4)GeLAto：ゲノムランドスケープ比較ツール（東大・浅井）

ゲノム配列上にアノテーションされた様々な数値的付加情報（メチル化率、ゲノム複製タイミング、Alu密度など）を分析することにより、単純なゲノム配列の文字列解析では知りえない生物学的知見を得ることができる。同種の付加情報の異なった位置での類似性、異なる付加情報の類似性など、類似の付加情報パターンは類似の生物学的機能・減少と関係している可能性があるが、これらを網羅的・高速に比較することは難しい。GeLAtoでは、数値的付加情報を巧妙に離散記号化し、それらを文字列としてアラインメントすることによって、類似の付加情報のパターンの抽出を行う。

5)Rchange:塩基置換による２次構造エネルギー変化を計算するツール（東大・浅井）

RNA配列では、塩基置換はその２次構造に関するエネルギー分布の変化を引き起こす。進化的な解析や疾患関連ゲノム変異の解析を行う際、個々の塩基置換がどのくらいRNA２次構造の安定性に影響を及ぼすかを知ることは需要である。Rchangeは、RNA２次構造のエネルギーモデルを用いた動的計画法により、RNA配列の全ての１塩基、２塩基置換によるエネルギー変化を一括して経することのできる計算ツールである。

6)DAFS：機能性RNA配列アライメントプログラム（慶応大・榊原）

Small RNA-seqなどの次世代シークエンサーによる網羅的な機能性非コードRNAの解読により、機能性RNAに対する情報解析手法（RNAバイオインフォマティクス）が急速に求められるようになった。そこで、機能性RNA配列に対して、二次構造を考慮して高速かつ正確に多重アライメントを計算する手法DAFSを開発した。本プログラムの開発により、多数の機能性RNA配列の多重アライメントが計算できるようになり、機能性RNAの解析が効率的に行えるようになった。

7)Hegma：転写因子結合部位予測プログラム（九工大・矢田）

ゲノムワイドなプロモーター配列セットから転写因子の結合部位(TFBS)をde novoに見つけ出す情報解析技術を開発した。この技術は、Hegmaと名付けられたプログラムにまとめられ、公開されている。Hegmaは、配列に現れるk-merの頻度に基づいてTFBSを探し出す(カウント法)。1GBのメモリを搭載したデスクトップコンピューターを用いると、長さ1,000bpのプロモーター配列18,000本を30秒ほどで解析することができる。また、TFBSを見つけ出す性能は、これまで最も性能が高いと報告されてきたカウント法プログラムWeederを大きく上回った。遺伝子の転写制御ネットワ

ークを解明するためには、実験的に特徴付けられた数百～数千のプロモーターに共通する配列構造（モチーフ）を明らかにしなければならない。そのためには、数万に及ぶゲノムワイドなプロモーターに観察されるモチーフとの比較が必須であるが、これまで、そのような大規模なデータからモチーフを発見する情報解析技術は存在しなかった。開発したHEGMAにより、このような情報解析を初めて実現することができるようになった。

8)TRhist：次世代シーケンサーの短いリードからのタンデムリピート伸長発見ソフトウェア（東大・森下）

エキソンやイントロンにおけるタンデムリピート伸長はトリプレットリピート病などの疾患と関わる例が知られている。しかし、次世代シーケンサーによる短いリードからはリード長を超えるような長い伸長を発見するのは難しく、対応するソフトウェアもなかった。我々はリード中のタンデムリピート長の頻度の変化を利用して長いタンデムリピート伸長を発見するソフトウェアを開発し、脊髄小脳失調症31型の疾患者のリードデータからこの疾患に関わるタンデムリピート伸長が発見できることを示した。このソフトウェアにより、既知のものばかりでなく未知のタンデムリピート伸長を発見することが期待される。

9)RintD：参照RNA構造からの近さに基づく構造確率分布計算ツール（東大・浅井）

RNA２次構造は、熱力学的な揺らぎを持っているため、その取りうる構造の可能性は膨大である。RintDは、予測構造やその他の参照構造からどれくらい近い構造にどのくらいの確率が分布しているか等、構造に付加した整数値のスコア（予測構造からのハミング距離など）の確率分布を計算するソフトウェアである。同時に、任意の割合の確率でどの範囲の構造をとる可能性があるか、その半径（信頼性限界）を計算することが出来る。

10)CapR：２次構造文脈の周辺確率の計算ツール（東大・浅井）

RNA配列の各領域は、それぞれ確率的にとりやすい構造を持っている。CapRは、ステム、ループ、バルジ、インターナルループなど、RNA２次構造の各文脈を取る確率を、動的計画法によって塩基単位で計算できるツールである。

11)boostKCP: standardized Euclidean distanceを使用したK-means clusteringの高速化手法（東大・森下）

生物学的データの解析によく用いられるPearson correlation distanceを用いたK-means clustering高速化はまだあまり研究されていなかった。我々が開発したboostKCPではPearson correlation distanceの計算法から考案したシンプルではあるが強力なヒューリスティックによって効率的に計算の枝刈りを行うことで、ヒトのnucleosome positioning signal dataや遺伝子発現量データのような高次元かつ大規模なデータにおいても、Pearson correlation distanceを用いたK-means clusteringの高速化を可能にした。

12)SHARAKU：トランスクリプトームデータから機能性RNAを解析するプログラム（慶応大・榊原）

Small RNA-seqなどの次世代シーケンサーによる機能性非コードRNAの解読は、新しい機能性RNAの存在と発見を次々に明らかにしてきた。このような解析を効率化するために、すなわち、大量のシーケンスデータから、機能未知のRNAを解析して発見するためのバイオインフォマティクス手法を開発した。発現している機能性RNAからRNA-Seqによりシーケンシングしたリードを RNA配列にマッピングし、その形状をクラスタリングすることによってプロセシングパターンの分類を行うプログラムSHARAKUを開発した。本プログラムの開発により、derived RNAなどの新しい種類の機能性RNAの同定を効率よく体系的に行うことが可能となった。

13)MOCCS：ChIP-SeqデータからのDNA配列モチーフ列挙手法（東大・岩崎）

ゲノム配列にコードされた遺伝子ネットワークの構造や機能を解明する上では、それらの遺伝子の転写をコントロールするタンパク質である転写因子がどのように

DNA配列を認識しているか、網羅的かつ正確に明らかにすることが必要である。しかし、そういった目的のために利用可能なソフトウェアはこれまで存在していなかった。そこで、転写因子が認識するDNA配列をChIP-Seqデータを解析することで網羅的かつ正確に明らかにできるソフトウェアMOCCS（Motif Centrality Analysis of ChIP-Seq）を開発した。ChIP-Seqにより得られるゲノム規模のタンパク質結合部位データには、タンパク質が認識するDNA配列の多様性の全体像に関する知識が蓄えられている。位置特異的重み行列などの要約された情報を抽出する既存手法とは違い、MOCCSは、網羅的に部分配列の出現頻度分布を解析することで、認識配列のレパートリーを正確に列挙することが可能である。本手法MOCCSを、東京大学の深田吉孝教授らの支援課題において得られた、哺乳類の概日リズムを制御する転写因子CLOCKの ChIP-Seqデータ（多細胞生物２支援拠点にてシーケンス）に適用することで、非典型的な配列を含めてCLOCKが認識するDNA配列のレパートリーを正確に明らかにすることに初めて成功した。MOCCSはすでに様々な転写因子のChIP-Seqデータに対して適用され、これまでに知られていなかった多くの認識DNA配列を新規に明らかにするとともに、さらに、その一部については実験的検証にも成功しつつある。

14)LAST：クオリティ情報を考慮した確率アラインメント手法（東大・浅井、早大・浜田）

リードのクオリティ情報を数学的に適切に考慮した確率アラインメント手法を開発した。ギャップやアラインメントされる塩基の位置を正確に予測することが可能となり、マッピング後のSNP/Indelの予測性能が改善されることを確認した。さらに、確率アラインメント部分の実装上の変更を行い数倍以上の高速化を実現した。また、bisulfite sequencing配列の比較、マッピングについてベイズ流の理論的な検討を行い、置換行列の変換によって従来のC－T変換のみによる手法よりも高精度なマッピングが可能であることを示した。これらの開発成果は、高速配列相同性検索ソフトウェアLASTに実装して公開した。

15)GHOSTM & CLAST：超高速配列相同性検索ソフトウェア（東工大・黒川ら）

メタゲノム解析により得られる遺伝子情報はサンプルあたり1億遺伝子を超えるなど、極めて膨大である。したがって、アノテーションのためのデータベース相同性検索も通常の検索ソフトウェアでは非現実的な計算時間がかかる。そこで、GPUとスパコンを利用し、超高速に高精度な検索を可能とするソフトウェアGHOSTM（塩基vsアミノ酸）およびCLAST（塩基vs塩基）を開発した。本ソフトウェアにより、BLASTと比較して最大で約430倍（GHOSTM）、約100倍（CLAST）の高速性能を達成でき、超高速なメタゲノム解析を可能とした。メタゲノム解析に関する支援課題のほぼ全てを、CLASTやGHOSTMを利用した相同性検索で解析している。さらに、CLASTは可視化ソフトウェアVITCOMICや、メタゲノム解析パイプラインMeGAPに組み込み済みであり、特にMeGAPはH27年度中にDDBJパイプラインから公開予定である。

【解析パイプライン】

1)MiGAP：全自動微生物ゲノムアノテーションパイプライン（東工大・黒川ら）

新型シーケンサーの登場により、ゲノム構造が単純な微生物のゲノムは比較的簡単に解読できるようになった。ゲノム情報から生物学的意義を見出すためには遺伝子のアノテーション作業が必須となる。しかし、アノテーション作業では、多種多様なソフトウェアを駆使し、得られた複数の知識を統合することが要求されるため自動化が難しく、ゲノム科学のネックとなっている。この問題を少しでも克服するため、微生物ゲノム解析において定評あるデータベースと定評あるアルゴリズムを組み合わせ、アノテーション作業を自動化した解析パイプラインMicrobial Genome Annotation Pipeline （以下、MiGAP）を開発し2009年に公開した。ゲノム支援では、

初年度よりMiGAPを継続的に開発してきており、真正細菌・古細菌のみならず、菌類や藻類などの単細胞真核生物も対象種として利用可能とし、MiGAPによって、誰でも、何時でも、どこからでも、微生物ゲノム配列の生物学的意味を入手できるようになった。

2)DDBJ pipeline：NGSの解析支援パイプライン（遺伝研・中村）

遺伝研スーパーコンピュータは遺伝情報解析用に特化した設計の大型計算機であり、国内の生物学研究社に無料で利用できるようアカウント発行をしている。近年大量のNGS由来の情報が比較的容易に高速に得られるようになってきており、生物学者自身がゲノム情報処理を行い、活用していく必要性がたかまってきている。しかしながら大型計算機にログインし、コマンドを駆使してゲノム解析を行うことは一般の生物学者には困難である。そこで、DDBJに登録された、あるいは自らの端末から大量の配列を転送し、アセンブルや既知ゲノムへのマッピングなどのような定型的な作業をWWW上でグラフィカルインターフェイスにより実行をできるシステムを作成し提供している。

3)Mudi：WGSによる変異点同定支援WWWツール（遺伝研・中村）

従来の遺伝学は、変異株のスクリーニングと原因遺伝子のクローニングにより行われてきたが、NGSを活用することで、変異体をゲノムリシークエンスすることによって、短期間で網羅的に変異体の原因遺伝子変異を同定できるメリットがある。「遺伝子変異同定ツール（Mutation discovery, Mudi）」 は、酵母と線虫を対象に、ゲノムリシークエンス、ゲノムマッピング、遺伝子アノテーション、共通変異点サブトラクションを組み合わせることにより効率よく原因遺伝子変異を同定する手法と、一連の解析をパイプライン化したサーバーを合わせて提供している。これにより、実験を手順通りに行った後にデータをアップロードし実行することで、原因遺伝子変異点候補の結果が効率良く得られるようになった。

4)Rtools：RNA配列・２次構造解析関係のツールの統合サーバー（東大・浅井）

RNA２次構造は、その取りうる構造の種類が膨大であるため、ある瞬間に熱力学的に特定の１つの構造をとる確率は極めて小さい。そのため、計算機による２次構造予測の結果をもとに、生物学的な推論を行うことは往々にして大きな誤りを犯す危険を伴う。一方、塩基対確率やアクセシビリティなどの周辺確率は必ずしも小さくないため、周辺確率を計算して適切に可視化すれば、RNA２次構造に関するより深い知見を得ることが出来る。また、予測２次構造の信頼性についても、その２次構造と類似の構造の取る確率の合計により、議論することが可能である。これらの多様な解析を、手軽に行うことは研究者にとって重要であるので、このウェブサーバでは、１本のRNA配列を入力することにより、２次構造予測、周辺確率計算、予測信頼性評価に関する７個のソフトウェアを同時に起動し、高速に結果を表示させる。

5)MeGAP：メタゲノム解析パイプライン（東工大・黒川ら）

新型シーケンサーの発達により、誰でも容易にメタゲノムシーケンシングができるようになってきた。しかし、メタゲノム解析で得られる膨大な情報から新規知識を引き出すためには、得られた配列情報に生物学的意味を付加する必要があるが、使用するアルゴリズムや統計的手法が多岐に渡ること、それら利用には高度な技術、知識が要求されること、さらには情報量が膨大であることから、得られたメタゲノムデータを有効活用することが困難となっていた。fastq ファイルまたは圧縮された fastq.gz ファイルをクエリとして、メタ 16S 解析データであれば系統組成、メタゲノム解析データであれば系統組成と遺伝子機能組成を推定して結果をメイルでユーザーに返す解析パイプライン MeGAP (MetaGenome Annotation Pipeline)を開発した。MeGAPを利用することで、ユーザーは何ら事前の知識がなくとも、シーケンサーから出力されたfastq関連ファイルをMeGAPに投入するだけで、統計的補正を施したメタゲノム解析結果を得る事ができる。

【可視化ソフトウェア】

1)VITCOMIC：メタゲノムデータにおける系統組成および株間進化関係の可視化（東工大・黒川ら）

膨大な配列が一度に得られるメタゲノム解析では、従来からの分子進化解析による配列系統樹推定などが困難であった。そこで、新型シーケンサー由来の大量の短いメタ16Sおよびメタゲノム配列データについて、ゲノム解読済みの株の16S rRNA遺伝子配列をReferenceとして配列相同性検索を行い、個々の16S rRNA遺伝子配列断片の系統推定を行い配列相同性と共に集計することで、細菌群集の系統組成を推定すると共に系統間の進化的な関係性も同時に視覚化し、サンプル間で系統組成を比較解析可能なWebアプリケーションVITCOMICを開発した。VITCOMICを用いることで、系統組成の単純な円グラフや棒グラフではわからない、系統間の進化的な関連性も考慮してサンプル間で系統組成を比較解析できるため、2010年に公開してから現在までの間に、1,700以上のメタ16Sおよびメタゲノムサンプルについての解析が世界中のユーザーによって行われている。

2)高速なマッピングビューアーSamScopeの開発（慶応大・榊原）

RNA-SeqやChIP-Seq実験から取得されたシーケンスリードをマッピングした結果を高速に表示するビューアSamScopeを開発した。その最大の特徴は、①コンピュータグラフィックスの理論に基づき、マッピング結果を縮小表示したときに、マッピングの形状がつぶれて表示されないように、形状が正しく保たれたまま表示されるよう工夫した。この機能により、塩基レベルで表示する場合でも、ゲノム全体を俯瞰して表示する場合でも、マッピング形状が正確に表示される。②マッピング形状の表示の高速化により、塩基レベルの拡大表示からゲノムレベルの全体表示まで、スムーズに高速に表示を拡大縮小できる。以上の今までのビューアにない利点により、研究者がマッピング結果を用いて解析を行うときに、ストレスなくスムーズにマッピングの表示を行い、結果の解釈と解析が可能となった。

3)DomSign:配列ドメイン組成からの機能未知遺伝子の機能推定法（東工大・黒川ら）

メタゲノム解析では細菌群由来の膨大な遺伝子情報が得られるが、土壌細菌叢などサンプルによっては、リファレンスとなる機能既知の遺伝子がデータベースに登録されていることは希であるため、メタゲノム遺伝子群のほとんどが機能未知となってしまう。DomSignでは、機能既知遺伝子のドメイン存在率マトリクスを教師データとし、メタゲノム等で得られる機能未知遺伝子中のドメイン存在率や並び順などから、酵素のEC番号予測をするアノテーションパイプラインである。DomSignを利用することで、UniProt-TrEMBLに登録されている遺伝子のうち、EC番号が付されている遺伝子の割合を12%から30%にまで高めることに成功した。また、KEGG に登録されている2,584株の細菌由来の遺伝子のうち、EC番号が付されている遺伝子の割合を26%から33%にまで高めることに成功した。さらに、ヒトメタゲノムHMPのデータに応用し、約100万遺伝子に対して新たにEC番号を付加することができ、他のEC番号予測ツールと同等以上の性能を発揮することができた。

4)FuncTree：メタゲノム全代謝パスウェイ情報の階層的可視化ツール（東工大・黒川ら）

細菌叢全体でどのような生物学的機能を有しているのかをメタゲノムデータから調べるためには、得られた遺伝子配列に対して、代謝パスウェイや機能モジュールなどの機能カテゴリを、統計的有意性を検証しつつ割り当てる必要がある。しかし、現在そのようなアプリケーションはほとんどなく、そのためゲノム・メタゲノムデータの生物学的機能の全体的な傾向が俯瞰できず、包括的な情報を読み取ることが難しくなっている。FuncTreeは、KEGGの生物学的機能カテゴリを円形の樹形図（マップ）として表現し、その円形マップ上にユーザーが入力するデータを直接あるいは統計解析を行った上でマッピングすることで、データの潜在的な生物学的機能性を可視化することができるウェブアプリケーションである。FuncTreeを利用するこ

とで、各機能カテゴリ間の相互関係が一枚の樹形図として表現されているため、他の可視化ツールと比べて、ユーザーのデータが有する生物学的機能性の全体像を俯瞰しやすくなっている。

【その他（アルゴリズム等）】

1)fatt：世界最速FASTA/Qファイル統計ソフト（東大・笠原）

配列解析において FASTA/Q フォーマットは最も基本的なデータフォーマットの一つである。今までに開発されてきたゲノム解析のソフトウェアに共通して現れる操作が数多くあったが、それらの操作は個別の研究者が個別に実装していたため車輪の再発明が行われ開発時間の無駄が多くなっていた。また、それらの操作は開発速度を重視してスクリプト言語で実装されることが多く実行速度が遅かった。そこで、FASTA/Qファイルに対する基本操作を集約した世界最高速のデータ処理ツールを開発した。サポートしている操作は (1) 特定の名前を持つ配列の抜き出し (2) 配列数のカウント (3) 配列名の抜き出し (4) 各種統計値の計算 (5) QV の種類自動判定 (6) CSVとの相互変換 (7) 行の折り返し/畳み (8) 等分割 (9) 配列のリネームや切り出し・接続など日常的に繰り返し使用する操作であり、開発により研究者の時間が大幅に節約できるようになった。

2)HomeoRoq：異質倍数体の発現解析ソフトウェア（産総研・瀬々）

植物が新たな環境に適応し進化する過程で倍数化、特に異種間の倍化である異質倍数化を利用することがある。人間もこの現象を利用しており、麦、豆など主要穀物の多くは異質倍数化が最近起こった種である。一方で、倍化したゲノムは類似配列が多く、遺伝子発現解析が容易ではなかった。HomeoRoqは、異質倍数体（あるいは、その親種）のゲノム配列解読後、RNA-seqにより採取された遺伝子発現量を、由来染色体を明確に分けて発現解析を行い、更に環境間における差を統計的に判定できるソフトウェアである。ゲノムワイドにRNA-seqから異質倍数体の遺伝子発現量の定量と、統計解析を行うソフトウェアは他に無く、本ソフトウェアにより、次世代シーケンサーによる異質倍数体種のゲノムワイドな解析が可能になった。

3)LAMP：組合せ効果の検定手法（産総研・瀬々）

転写因子やSNPなど、複数の因子が相互作用を起こす生命現象は、枚挙にいとまがない。一方で、これらの相互作用をゲノムワイドな情報から統計的有意性を持って発見することは困難であった。その理由として、複数の因子を調査することで、調査すべき因子数、つまり検定数が急激に増加するが、この検定数増加にともなって増える偽陽性を抑えるために行われる多重検定補正が、過剰に補正を行っていることが挙げられる。LAMPでは、この過剰な補正を修正し、かつ、複数の因子を見つけるため高速化を導入することで、複合因子であっても、統計的有意性を持って発見が可能になった。

4)COSMOS：大規模構造変異検出ソフトウェア（産総研・瀬々）

配列解読のコストが急激に下り、様々な種や個体、更には様々な腫瘍からゲノム配列が読まれるようになってきた。その中で、個体間あるいは腫瘍間のゲノム配列には大きな構造変異が頻繁に存在することが明らかとなってきた。その一方で、これらの構造変異を感度、精度ともに高く発見できるソフトウェアが存在しなかったため、配列の向きと量を定量的に評価することで、既存ソフトウェアよりも高性能のソフトウェアを開発した。マウスのES細胞に放射線を照射し、人工的に構造変異を起こした細胞の解析を行ったところ、既存手法より14%以上高い精度を達成した。

5)ChIP2LAMP：相乗的に働く転写因子結合部位の検出ソフトウェア（産総研・瀬々）

細胞のiPS化には4つの転写因子、通称山中因子、が必要であることが知られている。同様に、複数の転写因子が関連し、生命現象のスイッチとなる可能性は示唆されているが、iPS化因子の様に複数の因子が相乗的に働く事例の発見は必ずしも進んでいない。その原因として、転写因子のDNAへの結合を検出するChIP-seqと遺伝子

発現量を観測するRNA-Seqが、いずれも次世代シーケンサーを利用するため、敷居が高いこと、また、それらが解決できたとしても、複合因子の統計的有意性を示すことが難しいことが挙げられる。ChIP2LAMPは、それらの問題点を解決するため、ChIP-seqとRNA-seqの情報を入力するだけで、統計的に有意な複合因子を発見する、初の解析パイプラインである。

6)LAMPLINK：相乗的に働くSNPを検出できるGWASソフトウェア（産総研・瀬々）

遺伝性が認められるにもかかわらず、原因となる変異が発見できない現象は、ミッシングヘリタビリティと呼ばれている。ゲノムワイド関連解析が進むなかで、特に頻度が比較的高い疾患において、ミッシングヘリタビリティが問題となっている。その一つの解決策として、現在の解析では変異それぞれの疾病に与える影響を見ているが、これを、複数の変異が同時に起こった場合について考える、エピスタシスの解析へと発展させることが提案されている。その一方で、エピスタシスの解析を行った場合、統計的有意性を担保することが難しく、結果として一つも要因が発見できないことが多かった。この点を、既存のGWAS解析プログラムであるPLINKに、統計的に有意な複合因子を発見できるLAMPを統合することで解析できるようにしたLAMPLINKを開発した。ソフトウェアは、統計的に有意に関連したエピスタシスを発見できる初のソフトウェアである。

7)CSMinFinder: Large K27HMDを検出する区間分割法（東大・森下）

細胞の万能性の維持に重要な役割を持っている、H3K27me3により修飾された低メチル化状態の長い領域(K27HMD)を検出する計算的な手法はまだ考案されていなかった。我々の開発したCSMinFinderはDNA配列各位置のsignal dataから、各位置のエピゲノム修飾と特定の修飾組み合わせの類似度を計算し類似度の高い区間を連続して検出できる。CSMinFinderによってヒト、メダカゲノム内のdevelopmentに関連する遺伝子のプロモーター領域にあるLarge K27HMDを検出することができた。

【環境整備系ソフトウェア】

1)Local Package Manager：バイオインフォマティクス向けソフトウェア環境自動構築ソフト（東大・笠原）

ゲノム解析向けソフトウェアはソフトウェアエンジニアリングの訓練を受けていない研究者が開発することがほとんどでありソフトウェアのインストールが大変である。多くのソフトウェアを組み合わせる現代型のゲノム解析では、得意なバイオインフォマティシャンでも１～２週間をまるごとソフトウェアのインストールに費やし、生物学者であれば半年掛かることも珍しくない。そこでLinux/Mac 上で動き、管理者権限を使用すること無くゲノム解析ツールを１コマンドでインストールすることができるソフトウェア Local Package Manager を作成した。詳しいユーザーがインストール方法の手順書をアップロードし共有することで、大多数のユーザーは全自動で様々なソフトウェアを導入することができ、研究者の時間を大幅に節約することに成功した。

2)ffton:ファイアーウォールを越えた大容量ファイル高速転送ソフト（東大・笠原）

シーケンサーのデータなど大容量のデータを長距離伝送する際に一般のファイルコピーソフトウェアを用いると回線帯域をフルに活用できない、あるいは通信が不安定になる問題があった。また、近年の計算機クラスターはセキュリティ上の理由からファイアーウォールの裏側に設置され、別々の計算機間で直接データ転送できない問題が発生していた。ffton ではこの二つの問題を解決している。前者はTCP/IP を使わずに長距離高速伝送専用に設計された UDT プロトコルを用いてファイル転送をすることで回線帯域を９割以上活用し接続も安定化した。後者についてはUDPホールパンチングと呼ばれるP2P通信の技術を駆使して（対称型IPマスカレード方式の）ファイアーウォールを超えて直接通信することにより中間サーバーのボトルネックを取り除き通信の安定性も上がっている。

3)Tiny Cloud Engine：解析パイプライン記述言語（東大・笠原）

ゲノム解析では複数の解析ソフトウェアを組み合わせて結果を出すことが多い。しかし、従来の並列計算では多数の解析ソフトウェアを組み合わせることが少なく、最適なツールとパラメータの組み合わせを見いだすための解析パイプライン記述に１～２週間以上掛かることが多かった。また、記述が煩雑で分かりにくくなるため記述したパイプラインの内容を変更して試行錯誤したりバグを修正したりすることが著しく困難になっていた。Tiny Cloud Engine では複数の解析ソフトウェアを組み合わせた並列計算において全体の計算の手間を見通しよく人間に理解しやすい形で記述できるようにすることで、試行錯誤を手早く行うことができるようになった。手間の削減を客観的に定量することは非常に難しいが、著者の場合には体感で９割以上の手間が削減されている。

【データベース】

1)MicrobeDB.jp & MEO：微生物統合データベースおよび微生物生息環境オントロジー（東工大・黒川ら）

メタゲノム解析では、メタゲノムから得られる膨大な遺伝子情報と、遺伝子情報に付加される環境情報（メタデータ）とを統合的に解析することが重要となる。しかし、これまでの遺伝子データベースでは、遺伝子配列データに主眼が置かれており、そのメタデータは自然言語による記述のみにとどまっており、系統的に利用することが困難となっている。そこで、生息環境や感染症などの微生物学の様々な知識を整理しオントロジーとして記述し、遺伝子情報や系統情報など多様なデータをそれらのオントロジーと対応付けることで統合したデータベースMicrobeDB.jpを構築した。微生物の生息環境の記述に用いられるオントロジーMEOを構築し、本データベースの中核としている。全てのデータはRDFまたはOWLによって記述してあり、遺伝子名・系統名・環境名等の様々なキーワードでSPARQL言語を用いて検索することが可能となっている。ゲノム支援で得られたメタゲノムデータに対してもオントロジーマッピングを実施し、すでに公開されている他のメタゲノムデータとの比較解析を実現可能とした。

2)Medaka Methylome Browser: メダカのメチロームに関するゲノムブラウザ（東大・森下）

DNAメチル化をはじめとするエピジェネティック情報は、遺伝子の転写制御などの重要な機能を持っていて、生物の進化にも深く関わっている。我々はメダカの初期胚を含める六つのサンプルの一塩基解像度のメチロームを同定・公開し、ゲノム上のDNA低メチル化領域では、高メチル化領域に比べて近辺DNA配列の進化速度が有意に低いことを見出し、DNAメチル化とDNA配列の進化との強い関連性を示唆した。

3)メタゲノム・16S rRNAアンプリコンシーケンスのメタデータベースMetaMetaDBの開発（東大・岩崎）

世界各国の研究プロジェクトで、様々な環境中の微生物叢のメタゲノム・16S rRNAアンプリコンシーケンスデータ解析が進みつつある。これらのデータの一つ一つは、その多くは培養困難でもある微生物群と環境を結びつける有用なデータであるにも関わらず、再利用しやすい形でのデータベース公開は必ずしも行われていなかった。そこで、世界各国の研究プロジェクトによって取得された様々な環境のメタゲノム・16S rRNAアンプリコンシーケンスデータを集めたデータベースMetaMetaDBを開発した。メタゲノム・16S rRNAアンプリコンシーケンスデータ解析にMetaMetaDBを用いることで、様々な環境で微生物叢の変化があった場合に、どのような環境の微生物叢とより近くなったか、という新たな観点から解釈することが可能になった。

4)魚類ミトコンドリアゲノムデータベースMitoFishの開発（東大・岩崎ら）

生物資源の適切な保全や生物多様性の管理のため、また生物進化の歴史の解明のため、遺伝的情報に基づいた精緻な議論が不可欠となっている。こうした目的のための遺伝情報源として、動物において非常に有用なのがミトコンドリアゲノム配列データである。我々が開発したMitoFishデータベースはこの背景のもと、我が国にとっての重要生物資源でもあり、水圏生物界で重要な位置を占める魚類のミトコンドリアゲノム配列データを提供する、世界で唯一の魚類ミトコンドリアゲノムデータベースである。その特徴として、新たに開発した魚類ミトコンドリアゲノムアノテーションソフトウェアMitoAnnotatorにより、極めて正確なアノテーション情報とともにミトコンドリアゲノム配列データを提供している。MitoFishは世界的に活用されており、作成代表者らによる本データベースの報告論文は出版後２年あまりの間に150回引用されている。

5)wormtss：線虫C.elegansの転写開始点同定データ（東大・森下）

線虫ゲノム中の転写開始点の正確な位置は、trans-splicing と呼ばれるRNAの先頭部分を除去する機構により長い間未解明であり、数個程度の転写開始点しか知られていなかった。我々は核内から splicing 前の RNA を収集し 7351個の転写開始点を決めることに成功した。このデータをもとに線虫の遺伝子転写についての知識は飛躍的に深まり、活用されている。

上述した開発ソフトウェア等の公開URL、ダウンロード数、アクセス数や論文成果などを別表にまとめた。【別表参照】

＜開発した最先端技術・ソフトウェアのライフサイクル＞

基盤技術開発グループでは、主に支援課題から要求される解析に対して、新規の技術・ソフトウェアの開発をおこない、支援課題における解析を前進させることを目的の一つとして活動してきた。さらに、開発した技術・ソフトウェアを一般化し、広く利用可能にするための解析パイプラインの整備なども併せて実施した。このことで、「支援課題からの要求→技術開発→解析パイプラインへの組込→一般からのフィードバック」、というソフトウェアのライフサイクルが実現し、より容易に最先端技術を利用することが可能となった。以下にその例を示す。

1)アセンブルソフトウェアPlatanusのDDBJ Read Annotation Pipelineへの組込み

大型真核生物のゲノム解読には、大量のショートリードから高ヘテロ接合性ゲノムの再構築が可能なアセンブルソフトウェアの開発が必須であった。Platanusの開発により、ゲノム再構築が圧倒的に改善され、大型真核生物のゲノム科学が大きく進展した。それらを一般化するために、DDBJパイプライン上に実装し、広く一般から使えるようにしている。

2)超高速相同性検索ソフトウェアCLASTのDDBJ Read Annotation Pipelineへの組込み

メタゲノム解析で得られる膨大な遺伝子配列からアノテーション情報を得るためには、超高速な相同性検索ソフトウェアの開発が必須である。GHOSTMやCLASTなど、GPGPUを活用した超高速相同性検索ソフトウェアの開発により、GPUスパコン利用を前提として、これまでより100倍以上高速な動作を達成することができた。これらGPGPUソフトウェアを組込んだメタゲノム解析パイプライン「MeGAP」をDDBJスパコン上に構築することで、広く一般の利用者も容易に大規模メタゲノム解析が可能となった。

別表　開発ソフトウェアー覧

	班員	公開年	名称	概要	URL	論文	引用数	アクセス数／他		ダウンロード
アセンブル	榊原	2012	MetaVelvet	メタゲノム対応型アセンブラ	http://metavelvet.dna.bio.keio.ac.jp/MV.html	Namiki et al. 2012	89			
	浅井	2013	PBSIM	Pac Bioシークエンサーのリードシミュレータ	http://code.google.com/p/pbsim/	Ono et al. 2013				
	笠原	2013	Sprai	PacBio用ゲノムアセンブリソフト	http://sprai.bio/	Miyamoto et al. 2014	21	1,495		723
	榊原	2013	Xgenovo	454リード専用メタゲノムアセンブラ	http://xgenovo.dna.bio.keio.ac.jp/	Afiahayati et al. 2013	3			
	伊藤	2014	Platanus	高ヘテロ接合性に適応可能なゲノムアセンブラ	http://platanus.bio.titech.ac.jp	Kajitani et al. 2014	51	1,074		454
	榊原	2014	MetaVelvet-SL	学習機能を備えたメタゲノム対応型アセンブラ	http://metavelvet.dna.bio.keio.ac.jp/MSL.html	Afiahayati et al. 2015	2			
	平川	2015	GMcloser	高精度ギャップ修復ソフトウェア	https://sourceforge.net/projects/gmcloser/	Kosugi et al, 2015				
	平川	2015	GMvalue	アセンブリ精度評価ソフトウェア	https://sourceforge.net/projects/gmcloser/	Kosugi et al, 2015				
配列解析	榊原	2010	Murasaki	多重ゲノム配列比較システム	http://murasaki.dna.bio.keio.ac.jp/	Popendorf et al. 2010	10			
	浅井	2011	Raccess	アクセサビリティの計算	http://rtools.cbrc.jp/	Kiryu et al. 2011				
	浅井	2011	CentroidHomfold-LAST	相同配列を用いたRNA2次構造予測	http://rtools.cbrc.jp/	Hamada et al. 2011				
	浅井	2012	GeLAto	ゲノムランドスケープ比較	http://www.cb.k.u-tokyo.ac.jp/asailab/gelato/	Ashida et al. 2012				
	浅井	2012	Rchange	塩基置換によるエネルギー変化	http://rtools.cbrc.jp/	Kiryu et al. 2012				
	榊原	2012	DAFS	機能性RNA配列アライメントプログラム	http://www.ncrna.org/software/dafs/	Sato et al. 2012	3			
	矢田	2012	hegma	大規模配列データ（～Gb）からのモチーフ発見	http://www.genome.ist.i.kyoto-u.ac.jp/~ichinose/hegma/	Ichinose et al. 2012	3	863		75
	森下	2013	TRhist	NGSリードからのタンデムリピート伸長発見ソフトウェア	http://trhist.gi.k.u-tokyo.ac.jp	Doi et al. 2014	10			
	浅井	2014	RintD	参照RNA構造からの近さに基づく構造確率分布計算	http://rtools.cbrc.jp/	Mori et al. 2014				
	浅井	2014	CapR	2次構造確率プロファイルの計算	http://rtools.cbrc.jp/	Fukunaga et al. 2014				
	森下	2014	boostKCP	標準化ユークリッド距離使用のK-means clustering高速化	http://mlab.cb.k.u-tokyo.ac.jp/~ichikawa/boostKCP/	Ichikawa et al. 2014	4	55		
	榊原	2015	Sharaku	ncRNAのRNA-seqリードマッピングプロファイルを分類	http://www.dna.bio.keio.ac.jp/sharaku/	submitted. 2016				
	岩崎	2016	MOCCS	ChIP-SeqデータからDNA配列モチーフ列挙	https://github.com/yuifu/moccs	Ozaki & Iwasaki 2016				
相同性検索	浅井	2011	LAST	リードのクオリティ情報を数学的に適切に考慮した確率アラインメント手法	http://last.cbrc.jp/	Hamada et al. 2011 Martin et al. 2012				
	黒川	2012	GHOSTM	GPUを用いた高速なアミノ酸配列相同性検索ツール	http://www.bi.cs.titech.ac.jp/ghostm/	Suzuki et al. 2012	20			
	黒川	2014	CLAST	GPUを用いた高速な塩基配列相同性検索ツール	https://github.com/masayano/CLAST	Yano et al. 2014				
可視化	黒川	2010	VITCOMIC	系統間の進化的関連性と共に描画するWebアプリ	http://mg.bio.titech.ac.jp/vitcomic/	Mori et al. 2010	18	1,702	解析数	
	榊原	2012	Samscope	高速なマッピングビューアー	http://sourceforge.net/projects/samscope/	Popendorf et al. 2012	2			
	黒川	2015	DomSign	配列中に存在するドメインの組み合わせを基に機能未知なタンパク質の機能予測するツール	http://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1186%2Fs12859-015-0499-y/MediaObjects/12859_2015_499_MOESM3_ESM.zip	Wang et al. 2015	2			
	黒川	2015	FuncTree	サンプルの機能的特徴の視覚化可能なWebアプリ	http://bioviz.tokyo/functree/	Uchiyama et al. 2015	1			
パイプライン	黒川	2010	MiGAP	微生物ゲノム自動アノテーションパイプライン	http://migap.org/			12,061	解析数	
	中村	2011	DDBJ pipeline	NGSの解析支援パイプライン	https://p.ddbj.nig.ac.jp/	Nagasaki et al. 2013	19	961	利用者数	
	中村	2013	Mudi	WGSによる変異点同定支援WWWツール	http://naoii.nig.ac.jp/mudi_top.html	Iida N et al. (2014)				
	浅井	2014	Rtools	RNA配列・2次構造解析関係のツールの統合サーバ	http://rtools.cbrc.jp/	Iwakiri et al. 2016				
	黒川	2014	MeGAP	メタゲノム解析パイプライン	http://fs2.bio.titech.ac.jp/megap/			364	解析数	
環境整備	笠原	2010	Local Package Manager	ソフトウェア環境自動構築ソフト	http://lpm.bio/			24,070		推定2万
	笠原	2012	ffton	ファイアーウォールを越えた大容量ファイル高速転送ソフト	http://github.com/mkasa/ffton/			13	2週間で	1
	笠原	2012	Tiny Cloud Engine	解析パイプライン記述言語	http://ka.cb.k.u-tokyo.ac.jp/tce/			211		6
その他	笠原	2012	fatt	世界最速FASTA/Qファイル統計ソフト	http://github.com/mkasa/klab/			12	2週間で	4
	瀬々	2013	Homeoroq	異質倍数体の発現解析ソフトウエア	http://seselab.org/homeoroq/	Akama et al. 2014	13	1,301		
	瀬々	2013	LAMP	組合せ効果の検定手法	http://seselab.org/lamp/	Terada et al. 2013	17	4,171		
	瀬々	2015	COSMOS	大規模構造変異検出ソフトウエア	http://seselab.org/cosmos/	Yamagata et al. 2016		85		
	瀬々	2015	ChIP2LAMP	相乗的に働く転写因子結合部位の検出ソフトウエア	http://seselab.org/chip2lamp/	-		221		
	瀬々	2015	LAMPLINK	相乗的に働くSNPを検出できるGWASソフトウエア	http://seselab.org/lamplink/	Terada et al. in prep		607		
	森下	2015	CSMinFinder	Large K27HMDを検出する区間分割法	http://mlab.cb.k.u-tokyo.ac.jp/~ichikawa/Segmentation/	Ichikawa et al. 2015		257		
データベース	黒川	2011	MicrobeDB.jp	セマンティックWeb技術利用の微生物統合データベース	http://microbedb.jp/			65,357		
	黒川	2012	MEO	微生物の生息環境に関するオントロジー	http://mdb.bio.titech.ac.jp/meo	Tuama et al. 2012	4	67,430		
	森下	2012	Medaka Methylome Browser	メダカのメチロームに関するゲノムブラウザ	http://utgenome.org/methylome/	Qu et al. 2012	18	671		
	岩崎	2013	MetaMetaDB	メタゲノム・16S rRNAのメタデータベース	http://mmdb.aori.u-tokyo.ac.jp/	Yang & Iwasaki 2014	2			
	岩崎	2013	MitoFish	魚類ミトコンドリアゲノムデータベース	http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/	Iwasaki et al. 2013	150	98,074	PV	
	森下	2013	wormtss	線虫C.elegansの転写開始点を大規模に同定した	http://wormtss.utgenome.org/	Saito et al. 2013	5	328		43

（３）領域企画課題

大規模ゲノム情報生産及び研究リソース構築支援活動では、一般公募による申請課題に対する支援と並行し、比較的少数の領域企画課題（以下、企画課題）を実施してきた。多細胞生物のゲノム解読、特に全ゲノム解読は、試料調製から情報解析に至るまで総合的かつ分野融合的に進める必要があるため、個別の研究室で企画・実行することは規模と複雑さの点で極めて困難だからである。そのため、研究コミュニティからの提案（ホワイトペーパー）課題、あるいは我が国の研究者（グループ）が参加する国際プロジェクトで、支援活動によって我が国の国際的プレゼンスが高まると予想される課題について、総括支援活動でゲノム科学の研究課題としての意義・有効性などについて審査した後に企画課題として取り上げ、多くの場合は複数の支援拠点が連携してゲノム解読を実施した。また、格別にサイズが大きかったり構成が複雑なゲノムを対象とする課題で技術的難題が伴う場合には、上記と同じプロセスで技術開発目的の企画課題として取り上げた。ゲノム解読技術の急速な進歩に対応し、将来の支援に結びつけるために必要な先端的技術開発についても同様である。以下、企画課題ごとに内容と成果について報告する。

（１）シーラカンスゲノム解読

実施期間：2011～2013

本課題は、国際プロジェクトとしての提案である。解析用に、東京工業大学からタンザニア産 3 頭、コモロ産 1 頭、東京大学からインドネシア産 1 頭の、現存する全 2 種のシーラカンス（*Latimeria chalumnae* および *L. menadoensis*）に由来する試料が提供された。これらについて全ゲノム配列を決定し、さらに保存状態は不良であったが一部の試料についてトランスクリプトームデータも取得して大規模な比較ゲノム解析を実施した。東京工業大学伊藤研究室（情報支援）で開発されたアセンブラ（PLATANUS）を用いて構築したゲノムは LatCha_J1.0 として公開しており、推定ゲノムサイズ、2.67 Gb、N50（contig）9043 bp、N50（scaffold）331,424 bp を NGS データのみから実現している。また、遺伝子モデルの構築にも成功し、総遺伝子数（タンパクコード遺伝子）を約 22,000 と推定した。特に、四肢形成や嗅覚に関連する遺伝子について詳しく調べたところ、シーラカンスは水中で生息する魚類であるにも関わらず、そのゲノム中には陸生の四足動物に特徴的な遺伝子群がすでに存在していることが明らかになった。また、異なる繁殖集団のゲノム比較の結果、調査した個体群の遺伝的多様性が極めて低いことも明らかとなり、この希少種の絶滅回避に向けた本格的保全活動が急務であることも示唆された。

本課題は、当時のシーケンシング及び情報解析拠点のほぼ全力を注入した結果、約 1 年で論文投稿に到達した。論文の著者も国内研究者および水族館関係者、国外の大学・政府研究機関と多彩であることも特徴で、ゲノム支援活動が研究グループ形成にも有効であることを示唆している。

実施形態：

ゲノム支援活動

遺伝研拠点、東大柏拠点（大規模ゲノム情報生産・研究リソース構築支援活動）

東工大（情報支援活動）

ゲノム支援以外の参加研究グループ

東工大（岡田研究室）、慈恵医大（岡部研究室）、遺伝研（城石研究室）

成果サマリー

＊ゲノムサイズ 2.67 Gb、N50（contig）9043 bp、N50(scaffold) 331,424 bp

＊推定遺伝子数（タンパクコード遺伝子）：22,000

＊高度に個体内、集団間で相同性が高くヒトの約 1／40。種の遺伝的多様性保全の観点からは、極めて危険な状態にある。

＊アフリカ種－インドネシア種間差は、従来の小規模解析結果と同じく約 0.2%

＊進化速度（遺伝子変異速度）は、ヒト、トリ、カエルの約 60%程度と遅い

＊陸上化、四肢形成への前適応状態を保存していると思われる遺伝子群を検出

情報公開

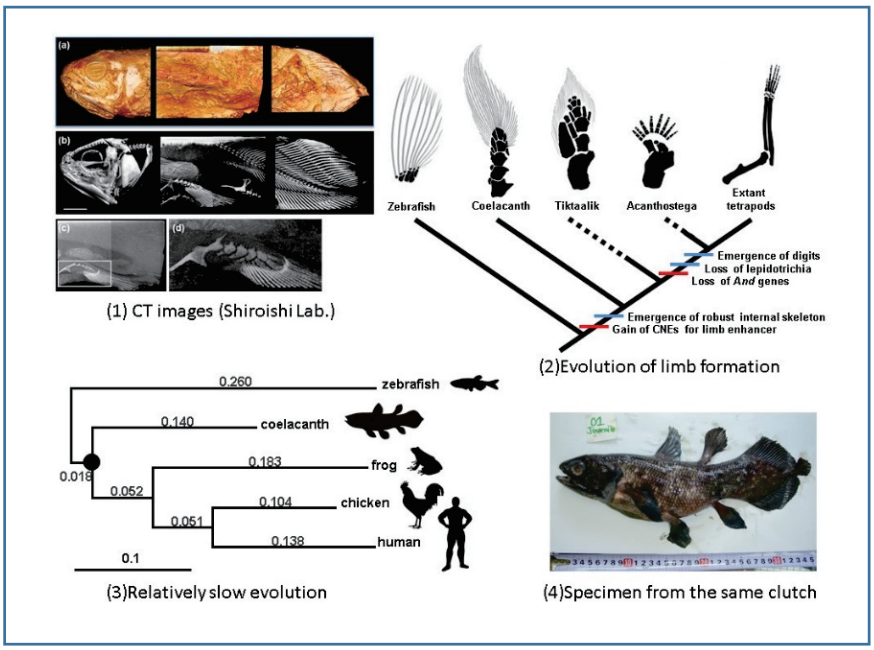
＊査読付き論文：Nikaido M. *et al.* (2013) Coelacanth genomes reveal signatures for evolutionary transition from water to land. ***Genome Res.*** 23:1740-1748.

＊ホームページ（公開中）:http://coelacanth.nig.ac.jp/

＊データ公開：Coelacanth genome sequencing project

BioProject: Accession: PRJDB500 ID: 174410

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/174410



（２）アフリカツメガエルゲノム解読国際コンソーシアム支援

実施期間：2011～2015（2015年12月に論文投稿）

アフリカツメガエルは、発生生物学における中心的なモデル生物の一つである。しかし、ゲノムが偽4倍体で解読が困難である等の理由で近縁種のネッタイツメガエルのゲノム解読が先行していた。一方、発生生物学の知見の多くはアフリカツメガエルを用いた研究から得られており、また国内研究者によって樹立された近交系（J-strain）が国際的にも使われるなど、その学術的有用性のみならず研究コミュニティの規模からも重要な生物種である。本課題は、アフリカツメガエルを使用する発生生物学コミュニティから当初提案が行われた。一方、米国でもJGI、UC-Berkeleyを中心にゲノム解読が進められようとしていたことから、日米を中心とする国際コンソーシアム支援として企画課題に取り上げた。国際コンソーシアムにおける日本側コミュニティの規模と寄与は次第に拡大しており、2種類のBACライブラリ作成と国内・国際頒布、多数の組織を対象としたRNA-seq解析およびアノテーション、サブゲノムを区別するためのFISH解析等のほか、米国側との定期協議も実施しており、2015年12月に論文投稿に至った。さらに、解析の途中段階からゲノムブラウザ（http://xenopus.lab.nig.ac.jp/）をコミュニティ向けに公開し、アクセス制限付きでありながら共同研究が派生するなど大きな影響を発生生物学分野に与えている。ChIP-seqやメチローム解析が、個体発生時の遺伝子発現調節やエピジェネティック制御を解明するための主要な手段になりつつあるが、本支援の成果は、そのための重要な研究基盤情報となるものである。

実施形態：

ゲノム支援活動

遺伝研拠点、東大柏拠点（大規模ゲノム情報生産・研究リソース構築支援活動）

ゲノム支援以外の参加研究グループ

産業技術総合研究所、東京大学、基生研、名古屋大学、広島大学、北海道大学、長浜バイオ大学、山形大学、東京工業大学、徳島大学、立教大学、北里大学,新潟大学

成果サマリー（論文投稿中のため詳細は省略）

＊全ゲノムアセンブリーの構築と倍数体ゲノムの判別

＊BAC ライブラリ（2 種類）構築

＊各種組織のトランスクリプトームデータとアノテーション

情報公開

＊論文投稿中（2015 年 12 月）日本側著者　28 名,国外著者 19 名

＊ホームページ（制限付きアクセス）：http://xenopus.lab.nig.ac.jp/



研究打ち合わせ風景(遺伝研)

（３）ポリプテルスゲノム解読

実施期間：2011～

条鰭類のゲノム情報は、ゼブラフィッシュやメダカなどがモデル動物として整備されているが、これらの種は過去に大規模なゲノム重複が生じており、したがってゲノムと遺伝子の構成も複雑で解析が困難な場合もある。ポリプテルスは、条鰭類の中でもこのゲノム重複に先立って種が分岐したと考えられており、硬骨魚のボディプランの基本形と発生プロセスを明らかにする上で重要な生物種である。本課題は、前ゲノム特定領域研究でEST解析の一部を支援しており、引き続きコミュニティからの要請を受けての支援である。解析用の種として、形態と魚体の大きさが異なる*Polypterus senegalus*および*P. endlicheri*を、それぞれ慈恵医大、理化学研究所が個体を提供し、関連研究者が一堂に会して試料採取を行った。本報告書執筆時点でゲノムアセンブリ、RNA-seq、BAC-end配列決定等の基礎的データの取得は終了しており、論文執筆を進めている段階である。

実施形態

ゲノム支援活動

遺伝研拠点、東大柏拠点（大規模ゲノム情報生産・研究リソース構築支援活動)、東工大（情報支援）

ゲノム支援以外の参加研究グループ

慈恵医大、理化学研究所、東京大学、名古屋大学、北海道大学、基礎生物学研究所、

東京工業大学、愛媛大学、

成果サマリー（論文準備中のため詳細は省略）

＊初期ゲノムアセンブリ（Platanus を使用、継続検討中）：総塩基数、3.56 Gb；Scaffold N50、1.13 Mb；Contig N50、32.4 kb。G/C%=39.2。Repeat content=52.4%。

＊BAC ライブラリ構築: BAC エンドシーケンス（約 7 万クローン分完了）、全長シーケンス（73 クローン終了）

＊RNA-seq 解析：17 組織から取得

＊遺伝子モデル構築：遺伝子数＝23,173（暫定版）

情報公開

＊ホームページ（制限付アクセス）：http://polypterus.lab.nig.ac.jp/

（４）スンクスゲノム解読

実施期間：2013～

スンクスは、ジャコウネズミ（*Suncus murinus*）の実験動物室系統であり、繁殖率がよく、標準系統である KAT 系統（ネパール国カトマンズ由来）をはじめとし、11 系統（亜系統含む）が我が国で樹立・維持されている。本種は、古くは食虫目（真無盲腸目）に分類された生物であり、一般的な実験動物であるマウス、ラットとは異なり、様々な種特異性を示すことが知られている（消化管ホルモンであるモチリンの存在・嘔吐反射・ビタミンＡ催奇形性高感受性・卵巣摘出下での妊娠持続など）。このように、スンクスはマウス、ラットでは明らかにすることのできない様々な生物現象にアプローチできる非常に有益なモデル動物である。また、哺乳類の進化系統上もユニークな生物で、霊長類との近縁性が主張されたこともある（これは、今回のゲノム解読の結果、完全に否定された）。我が国では、1970 年代からこの動物の研究モデル（発生学、形態学、免疫系、脂肪代謝、生殖系、食餌行動など）としての重要性に着目した研究が進められており、2006 年にはスンクス研究会が設立されている。研究者の範囲も基礎生物学から医学分野までと幅広く、日本を中心に国際的な広がりを見せており、世界の十数カ国の研究者から数百編の論文が発表されている（http://suncus.w3.kanazawa-u.ac.jp/about.html）。この中からスンクスゲノム研究コンソーシアムが組織され、ホワイトペーパー及びサポート文書が本支援活動に送付された後に企画課題として採択された。ゲノム解読試料としては、岡山理科大学で維持飼育されている Ous:KAT-227c 系統を使用した。また、コンソーシアムメンバーから組織提供を受け、東大柏拠点で RNA-seq データを取得した。現時点でのゲノム概要配列では、ゲノムサイズが約 2.4Gb、ContigN50 値が 32.5 kbp、ScaffoldN50 値が 3.57 Mbp と、良好な統計値が得られている。BAC/Fosmid ライブラリも作成してあることから、ゲノム編集技術を応用した組換え動物の作成等の基盤研究技術開発が今後は進むことが期待できる。コンソーシアム

と拠点メンバーとは定期的に会合を持っており、アノテーションと並行して論文作成を進めている。我が国発のモデル生物として、スンクスの有用性が高められ、医学生物学研究の発展にユニークな寄与をすることが期待されている。

実施形態

ゲノム支援活動

遺伝研拠点、東大柏拠点（大規模ゲノム情報生産・研究リソース構築支援活動)、遺伝研（情報支援）

ゲノム支援以外の参加研究グループ

岡山理科大学、埼玉大学、金沢大学、首都大学東京、九州大学、国立成育医療センター、、名古屋大学、岡山大学、日本獣医生命科学大学

成果サマリー（論文準備中のため詳細は省略）

＊ゲノムアセンブリー完了(Platanus を使用):総塩基数、2.37 Gb;ContigN50、32.5 kbp；ScaffoldN50、3.57Mbp

＊BAC ライブラリ構築、Fosmid ライブラリ構築とエンドシーケンス決定

＊RNA-seq 解析：16 組織分、アノテーション作業進行中

情報公開

＊ホームページ（制限付きアクセス）：http://suncus.nig.ac.jp/

＊データ公開

Accession: PRJDB3329 ID: 269699

BioSample: SAMD00023309

DRX024927: Illumina HiSeq 2500 paired end sequencing of SAMD00023309

DRX024926: Illumina HiSeq 2500 paired end sequencing of SAMD00023309

（５）カイコ p50T 系統ゲノム再解読

実施期間：2014～

技術開発研究を主体とする企画課題として、第三世代 1 分子シーケンサによる長配列データを中心に全ゲノム配列を構築するための開発研究を進めている。カイコゲノムは、前ゲノム特定領域研究で構築を支援した概要配列であるが、これの高度化と統合化が目的である。解析用試料として東京大学からカイコ近交系 p50T 系統に由来する組織提供を受け、100 kb を超える長鎖 DNA の抽出精製から PacBIO RSII による配列データ生産とアセンブリ作成、Illumina リードによるギャップ解消、BAC 全長配列決定を組み合わせて概要配列の高度化の検討を進めている。現在は雌雄両ゲノムについて、ゲノム全体および性染色体について

の検証を行っている段階だが、公開概要ゲノム配列では約 45,000 か所残っていたギャップが約 1000 か所にまで減少し、ゲノム配列の連続性が数十倍程度に向上した。また、ゲノム配列の連続性を示す N50 値も、公開ゲノム配列の 15.5 kbo に対して 346.6 kbp と、20 倍以上の高精度化を実現している。現在は、論文執筆に向けて新アセンブリと既存ゲノム情報とアノテーションの統合化を進めている。

実施形態

ゲノム支援活動

遺伝研拠点（大規模ゲノム情報生産・研究リソース構築支援活動）、遺伝研（情報支援）

ゲノム支援以外の参加研究グループ

東京大学、農業生物資源研究所

成果サマリー

＊p50T 系統の雌雄各 1 個体から DNA を抽出、雄 DNA について PacBIO RSII による配列データの取得と初期アセンブリ構築、さらに ILLUMINA データによる補正を実施

＊初期アセンブリデータ：scaffold 数：726 個、461,879,106 bp（>10 kb）；N50：14,176,391 bp；ギャップ数：119（1.77 Mb）

＊BAC/fosmid の全長配列でギャップの解消中

情報公開

＊ホームページ（制限付きアクセス）：http://bombyx.nig.ac.jp/

＊ホームページ（公開中）：https://kaiko.nig.ac.jp/

（６）オーストラリアハイギョゲノム解読

実施期間：2013～

サイズが非常に大きくリピート構造が複雑なゲノムをもつ生物種（群）は地球上に数多く存在する。こうしたゲノムの全配列を効率よく次世代型シーケンサで解読するための技術開発研究は、ゲノム科学としての学術面のみならず農学、環境学等への応用上も必須である。そこで、本課題ではハイギョ類の中でもゲノムサイズが最小のとされているオーストラリアハイギョを対象としたゲノム解読を進めている。ハイギョは、分岐年代がシーラカンスよりも更に四足動物に近いとされており、生物の進化や多様性を研究する上で非常に重要な位置を占める種である。そこで解析用の試料として、理化学研究所がオーストラリアから正規手続きを経て導入し、アクアマリンふくしまで飼育されていたオーストラリアハイギョ、*Neoceratodus forsteri* の個体提供を受け、前述したポリプテルスと同時にゲノム解読用の組織採取を実施した。オーストラリアハイギョのゲノムサイズは、ハイギョ類の中では最小の 50 Gb 程度と推定されており、この数値をもとに Illumina シーケンサによ

る配列データ生産と、初期情報解析を進めている。また、新アセンブラの開発についての検討を行っている。

実施形態

ゲノム支援活動

遺伝研拠点、東大柏拠点（大規模ゲノム情報生産・研究リソース構築支援活動)、遺伝研（情報支援）

ゲノム支援以外の参加研究グループ

慈恵医大、理化学研究所

成果サマリー

＊Illumina シーケンサによる配列データ生産：PE400、849.14 Gb；PE600、961.96 Gb

＊RNA-seq データ：11 組織から取得（未解析）

情報公開

＊計画中



オーストラリアハイギョ個体（全長約 38cm）

（4）公募支援課題成果のまとめ

① ゲノム医科学

＜支援の概要＞

医学領域のゲノム解析を含む支援課題に対して，①ゲノムワイド関連解析，②家系由来試料のゲノム解析，③大規模ゲノム再シーケンシング，④ターゲット再シーケンシング，⑤ゲノム機能解析（RNA-seq 解析，ChIP-seq 解析，エピゲノム解析）等の幅広い支援を行った．具体的には，①ゲノムワイド関連解析として延べ 7 件（6,816 検体），②家系由来試料の解析として延べ 20 件（341 検体），③大規模ゲノム再シーケンシングとして延べ 40 件（エクソームまたはターゲットシーケンス：4,248 検体，全ゲノムシーケンス：43 検体），④ターゲット再シーケンシングとして，IgA 腎症の 5 つの候補遺伝子について 500 検体の配列決定をおこなっている。HLA 領域遺伝子のターゲットシーケンシングについては，HLA 領域 33 遺伝子について 2,000 検体のシーケンシングを実施している。⑤ゲノム機能解析として延べ 15 件（RNA-seq 解析：124 検体，ChIP-seq 解析：29 検体，エピゲノム解析：48 検体）の課題に対して支援を行った．

対象は基本的にヒトの疾患患者であり，検体提供者への説明同意文書，及び研究計画書は，「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が求める記載事項に加え，ゲノム全域の解析及びデータベースへの登録を行うことを明記することが必要となるため，研究倫理申請への手続きや対象者への再同意の取得などに対して，ゲノム ELSI ユニットが支援を行った．

産出された配列データに対して，ヒト参照ゲノムへのアライメント，変異のコーリングとアノテーションを行った．アノテーションに際しては，インハウスの日本人データベースや外部のデータベースを活用した．また，家系例に対しては連鎖解析による候補領域の絞り込み，トリオ解析による新生突然変異の抽出，一卵性双生児間の新生突然変異の抽出などを行った．なお，解析を行うにあたっては，申請者側と議論を行い，必要に応じて解析サンプルの選定についての助言，取得したデータの解釈や解析についての指導や助言などを行った．

＜主な支援成果＞

①ゲノムワイド関連解析

ゲノムワイド関連解析は，ゲノム全体をほぼカバーするような，50 万個以上の一塩基多型（SNP）の遺伝子型を決定し，SNP の頻度と疾患や量的形質との関連を統計的に調べる方法である．代表的な成果として，次の成果を挙げることができる．

【日本人男性の痛風のリスク遺伝子を同定（防衛医大・松尾）】

日本人男性の痛風のゲノムワイド関連解析として，臨床診断された痛風症例 1,993 名と正常尿酸値（7 mg/dl 以下）の対照 2,547 名が解析され，5 つのゲノムワイドで有意な遺伝

子座を検出した．このうち，MYL2-CUX2 と CNIH-2 はこれまで報告されていない新規の遺伝子座である．さらにカスタム・チップを用いた解析を行い， 新規の遺伝子座を 5 つ同定している．

本研究は，尿酸の生体における制御機構を解明するとともに，リスクのある人に対して飲酒量や体重の適切な管理を促すことによって，痛風の発症を予防するという社会医学的観点からもインパクトの大きい成果となった．

②家系由来試料のゲノム解析

主としてメンデル遺伝性疾患を対象として，家系員の連鎖解析，発症者のエクソーム解析や全ゲノム解析，トリオ解析による新生突然変異の抽出などを行った．代表的な成果として，次の成果を挙げることができる．

【小児交互性片麻痺の原因遺伝子を同定（福岡大・廣瀬，石井)】

小児交互性片麻痺（AHC）は，非常にまれな孤発性疾患で，日本国内の患者数は 50 例程度といわれている．1 歳半以前に発症し，数分間から数日間続く片麻痺あるいは四肢麻痺発作で，不随意運動，眼球運動異常，けいれん発作などを伴う．頭部 MRI，発作時脳波でも異常を示さず確実な診断法がなかった．本研究では，血縁のない日本人 AHC 患者 8 例を対象にエクソーム解析を行い，健常集団にはみられない変異を抽出したうえで，患者にのみ共通する変異を探索することで，全例で ATP1A3 遺伝子変異を同定した．

本研究によって，AHC の臨床診断が可能になるとともに，ATP1A3 遺伝子産物である Na+/K+ ポンプの機能解析によって病態機序の理解と治療法研究の道を拓いた．また，このような小児期発症の重篤な孤発性疾患に対するアプローチとして，血縁のない患者間の共通変異の抽出やトリオ解析による新生突然変異の抽出が極めて有効であることを示し，インパクトの大きい成果となった．

③大規模ゲノム再シーケンシング

主として多因子疾患を対象として，患者群・対照群でエクソーム解析やターゲットシーケンス解析を行い，関連遺伝子を検索するアプローチを行った．現時点で支援の直接的な成果には乏しいが，支援の成果として対照群のデータを共有することで，今後の発展が期待される．

④ゲノム機能解析

その大規模シーケンス能力を活用して，RNA-seq 解析，ChIP-seq 解析，エピゲノム解析等の幅広い支援を行った．代表的な成果として，次の成果を挙げることができる．

【PAR-CLIP 法を用いた Ataxin-2 の標的 RNA と機能の同定（大阪大・河原)】

ATXN2 は遺伝性脊髄小脳変性症 2 型（SCA2）の病因遺伝子であり，その遺伝子産物である ataxin-2 のポリグルタミン鎖（グルタミンの繰り返し配列）の異常伸長（健常者は 26

回以内，患者は 34 回以上）によって発症する．その中間的な伸長（27 から 33 回）を持っていると，神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病の発症リスクになるのではないかという報告があったが，ataxin-2 の機能は不明だった．本研究では，依頼者が独自の手法により，ataxin-2・RNA 複合体から RNA を回収し，支援側が RNA-seq 解析を行った．その結果，ataxin-2 が mRNA の 3’非翻訳領域にある AUUUN という配列を認識し、mRNA の安定性を高める機能を果たしていることが判明した．

本研究の結果，これまで分からなかった ataxin-2 の機能を解明することによって，SCA2 の病態理解を深めるとともに，筋萎縮性側索硬化症やパーキンソン病といった神経難病の病態解明にもつながるインパクトの大きい成果となった．

② 多細胞生物１

おもに多細胞ゲノムの新規ゲノム配列決定および遺伝子同定のためのRNA-seq/IsoSeq解析、高密度遺伝子地図作成のためのRad-seq解析などを実施することによりゲノム解読を推進した。その他には、BAC/fosmidライブラリの作製とエンドシークエンス、特定領域をカバーするクローンの全長配列決定なども支援している。新規ゲノム配列決定以外の支援としては、再シーケンスによる多型の検出や遺伝子地図作製のためのマーカーの取得、既知転写因子の標的遺伝子群探索などである。支援課題数は76件（2010年度17件、2011年度15件、2012年6件、2013年度10件、2014年度14件、2015年度14件）、解析対象は化石試料・原生生物・動物（扁形・節足・棘皮・原索・脊椎動物など）・植物（緑藻・コケ・種子植物など）など70種以上である。

- 新規ゲノム配列決定：40生物種（解読中を含む）
- 系統間・個体間の全ゲノム解析：10課題
- 新たな実験系の開発（モチーフの同定など）：4課題
- BAC/Fosmid ライブラリの作製と両末端配列決定、全長配列決定：8 課題
- 化石試料：2課題
- その他（RNA-seq 解析やアンプリコン解析など）：3 課題

＃ 複数年度にまたがる同一依頼者からの課題は、ひとつにまとめて記載している

＜主な支援成果＞

（１）新規ゲノム配列決定を対象とした支援

Illumina およびPacBio を用いた新規ゲノム配列決定を実施するとともに情報支援の東工大・伊藤らとアセンブラ（Platanus）の開発を行った。新規ゲノム配列決定では、支援内容（RNA-seq 解析や Rad-seq 解析など）が多岐にわっており、多大な時間と労力がかかっている。なお、最近では多くのプログラムや解析手法が発表されており、依頼者側自身でゲノム解析を実施するケースも増加しつつある（10/40 生物種）。この傾向は、国内でのゲノム解析のすそ野が順調に広がりつつあることを示していると考えられる。成果の代表例として、次の研究を挙げることができる。なお、6 年間で解読したゲノム数は 46 件である。

「生きた化石」 シーラカンス２種の全ゲノム解読

東工大・岡田らは、タンザニア産シーラカンスの全ゲノム概要配列（約2.74Gbp）をIlluminaデータを用いて決定することに成功した。また、このゲノム配列を参照配列として、インドネシア産とコモロ産シーラカンスと比較することにより、現存する全2種のシー

ラカンスのゲノム配列を世界に先駆けて決定した。また、1）遺伝的多様度（ヘテロ接合度）が極めて低い、2）進化速度が極めて遅い、3）陸生四足動物に特徴的な嗅覚受容体遺伝子が数多く存在する、などを明らかにしており、陸上への進出メカニズム解明に向けた大きな一歩となった。（Genome Research 23, 1740-1748, 2013）

シロオビアゲハとナミアゲハのゲノム解読：ベイツ型擬態遺伝子座の同定

東大・藤原らは、Illuminaデータを用いて2種のアゲハ（シロオビアゲハとナミアゲハ）ゲノムをアゲハチョウ科の参照ゲノム配列としてはこれまでにない高い完成度で決定し、ゲノムブラウザ（http://papilio.bio.titech.ac.jp/papilio.html）から提供している。今後、これらのゲノム基盤情報を利用した染色体進化や形質進化などの研究の進展が期待できる。また、多くの研究者が注目していたシロオビアゲハのベイツ型擬態遺伝子座の同定にも成功しており、世界的にも大きな貢献である。(Nature Genetics, 47, 405-409 2015)

アサガオのゲノム解読

基生研・星野らは、PacBio と Illumina データを用いたハイブリッドアセンブリ法によりアサガオ（東京古型標準型）のゲノム配列決定を行い、同じナス目に属するトマトやジャガイモゲノムと比較することより進化の過程で全ゲノム重複がおきていることを明らかにした。また、アサガオの主要な変異原である Tpn1 ファミリーのトランスポゾンを網羅的に同定するとともに、古典連鎖地図（1956 年）から、その存在が示唆されていた渦遺伝子を同定した。論文は、現在投稿中である。

このほかにも植物においては、多細胞体制や陸上化に向けた進化の解明に重要なヒメミカヅキモやシャジクモ、同じく多細胞化と性特異的領域の解明を目指した微細藻類であるヒラアオノリ、ゴニウム、ユードリナ、ヤマギシエラなどのゲノム解析結果も今後注目される。

（2）ゲノム配列が決定されている生物を対象とした支援

おもに参照ゲノム配列との比較解析、すなわち全ゲノム配列データを用いて変異（de novo 変異）や多型を同定する課題が多く、6 年間に支援した課題数は 10 件である。系統間または個体間での全ゲノム・遺伝子解析によりゲノム変化の解明を目指した研究が大きく広がろうとしている。

蓄積された突然変異が後世代に与える影響の解明

阪大・八木らが作製したMutatorマウス(複製に必須なDNAポリメラーゼδの複製正確性を下げたマウス)と野生型マウスの複数世代においてIllminaデータによる全ゲノム配列決定を実施し、世界で初めてマウスの1世代あたりの変異率の測定に成功した。また、本実験系では、集団中で新たに発生する変異が表現型データとともに、その全過程の解析が可能で

ある（実験室内マウス進化モデルの確立）。（Genome Research 25, 1125-1134, 2015）

苔類ゼニゴケのゲノム情報基盤の構築

苔類ゼニゴケは、遺伝子重複が少なく、形質転換が容易であることからモデル植物として有用である。京大・河内らは、北白川株ゲノムの再シーケンスを実施し、宝ヶ池株（標準系統）との間で多くの多型（SNP :144,836、Insertion:17,714、Deletion :14,884）を検出しており、それらの多型情報をデータベース化することによって、新たなモデル生物としての地位を確立するに至っている。また、本ゲノム情報を活用した論文が多数発表されている。

（３）新たな実験系の開発

新たな実験系を評価するために次世代シーケンサーによる配列決定を支援した。4課題のうち、代表例として、次の研究を挙げる。

イネの耐乾性を高める側根の制御ネットワークの解明

名古屋大・犬養らは独自に開発したゲノムライブラリー中に含まれる転写因子結合領域を含むDNA断片を選択的に濃縮する手法を用いて、イネの側根のメリステムサイズを制御する転写因子が結合する配列を網羅的に単離することに成功している。今後、単離した配列から抽出されたモチーフとメリステム形成との関連性および分子ネットワークを解明することにより根系形態改良するうえで有用な遺伝子の同定が期待される。現在、さらなる解析を進めており、論文発表には至っていない。

（４）サンガー法によるゲノム・遺伝子解析

BAC/Fosmid ライブラリの作製と両末端配列決定、クローンの全長配列決定が主な課題となっており、成果の代表例として、次の研究を挙げることができる。また、アンプリコン解析による進化生物学的な研究結果としては、東大・河村らが霊長類の M/LWS タイプオプシン遺伝子と比較対照領域の配列比較により、現在も進行している適応進化の可能性を示している（BMC Evolutionary Biology 11, 312, 2011）。

コモンマーモセットのゲノム配列解読の改良

コモンマーモセットは小型の霊長類であり、繁殖性が高く、遺伝子改変動物の作出が可能であることなどから脳疾患の解明においてヒト疾患モデル動物として有用である。実中研・佐々木らは BAC エンド配列（約 7.7 万クローン分）をマーモセットゲノム配列上にマッピングすることにより、遺伝子改変実験などにおいて解析対象をカバーする BAC クローンを迅速に選択することを可能にした。また、Illumina データを用いて公開されているゲノム配列をアップデートする際にも有用であった。今後、霊長類に特有な高次脳機能の解明に向けた遺伝子改変実験などにおける重要な基盤情報を提供した。（Scientific Reports

5, 16894, 2015)

<u>アフリカツメガエルのゲノム解読</u>

発生生物学における中心的なモデル生物の一つであるアフリカツメガエルはゲノムが異質4倍体であり、その解読の困難さからゲノム情報が整備されていなかった。東大・平良/基生研・上野らを中心とした国内のXenopusコミュニティは、国際共同研究としてゲノム解読を進め、Illuminaデータを用いた全ゲノム配列決定に成功している。ゲノム支援では、BACおよびFosmidライブラリの作製と両末端配列決定（約21.3万クローン)、アセンブリが困難である領域に関してはBACクローンの全長配列決定、FISH解析用のBACクローンのDNA調製、RNA-seq解析、情報支援（ブラウザの作成など）を実施している。これまでに染色体逆位や融合領域、サブゲノム（異質倍加前の祖先種ゲノム）、ゲノム倍加後に起きたと考えられる特徴的な変化などが明らかとなっており、今後ゲノム倍化の生物学的意義に関する研究が飛躍的に進展すると考えられる。また、この成果は発生生物学分野だけではなく、多くの生命科学分野に大きな影響を与えると期待される。現在、論文を投稿中である。

以下の生物種についてはゲノムブラウザを構築し、公開済である（公開用以外は、支援依頼者およびコミュニティ用であり、アクセス制限を実施している)。

シーラカンス	http://coelacanth.nig.ac.jp（公開用）
アフリカツメガエル	http://xenopus.lab.nig.ac.jp（公開用）
ハナビシソウ	http://hikakudb.nig.ac.jp/CaliforniaPoppy
ヒラアオノリ	http://hikakudb.nig.ac.jp/Ecomp
変異マウス(阪大)	http://hikakudb.nig.ac.jp/osaka_mouse
線虫（甲南大）	http://hikakudb.nig.ac.jp/konan_celegans
ゴニウム	http://hikakudb.nig.ac.jp/Gonium
アゲハ	http://hikakudb.nig.ac.jp/Ppolytes
カイコ	http://kaiko.nig.ac.jp/（公開用）
	http://bombyx.nig.ac.jp/

＜支援活動における課題等＞

ゲノムサイズが大きい（3Gb 以上）すなわちリピート（特に完全一致したリピート）の割合が多い、あるいは、相同染色体間の違いが大きい生物種のゲノムアセンブリは、コンティグ間のつながりが良くない状況であり、今後のゲノム配列決定における大きな課題である。対応策として、Microfluidics 技術を用いた BioNano Genomics 社が開発した「1 分子ゲノムマッピングシステム」や 10X Genomics 社の「GemCode テクノロジー」の活用を検討

するとともに、PacBio のロングリードとの組み合わせに対応したアセンブラーの開発を情報解析支援チームと取り組んでいる。しかしながら、PacBio を用いる場合は特に高品質のゲノム DNA（高純度かつ高分子 DNA）を大量に必要とするため、ゲノム DNA 抽出技術の開発も緊急を要する課題である。また、ゲノム DNA 量が少ない場合における鋳型調製法についても今後さらなる検討が必要である。

論文化については、アノテーション作業や生物学的解析、高度なデータ解析において、従来と同様、人材が不足していることもあり、多大な時間と労力がかかっている。なお、多細胞生物のゲノム解読として発表された論文は3件、投稿中が4件とやや少ない状況であるが、多くは現在論文化に向けた作業が進んでいる。

③　多細胞生物２

＜支援の概要＞

（1）ゲノム配列情報等の産出

主として、ゲノム配列が既知の真核生物・多細胞生物について、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析、ChIP-seq、BS-seqを中心としたエピゲノム解析、exome解析、さらにTSS-seqあるいはRIP-se等の特殊な解析を含む幅広い機能ゲノム解析の支援を行い、また、ゲノム配列未知の生物についてもその遺伝子構造を特定するためのRNA-seq解析を行った。具体的には、223件（2010年度20件、2011年度24件、2012年40件、2013年度47件、2014年度53件、2015年度39件）の課題に対して支援を行った。解析サンプル数も、1件の支援でトランスクリプトーム解析とエピゲノム解析行うなど多層オミクス解析の依頼が増えており、2014・2015年度は各年度1000サンプルを超えている。対象は、ヒトをはじめとして、酵母から線虫・ショウジョウバエ・メダカ・ゼブラフィシュ・シロイヌナズナ・マウスなどのモデル生物が多いものの、ヒトデ・ホタル・アフリカツメガエル・イモリ・パルマ藻・アオノリ・ジャガイモ等50種類以上の生物種にわたる。また、最近では、1細胞のRNA-seqなど極微量のサンプルの解析要望も出てきている。

（2）情報解析支援

算出されたデータの一次情報解析支援、さらに必要に応じて、論文化に必要な高度な情報解析支援（ゲノム比較解析等）を情報支援グループと連携して行った。なお、解析を行うにあたっては、申請者側と議論を行い、必要に応じて、サンプル調整の指導、解析サンプルの選定についての助言、取得したデータの解釈や解析についての指導や助言などを行った。

（3）実地での技術講習

支援希望者側の要望に応じて、実地での技術講習（On–the-Job-Training）を行い、本研究分野の裾野の拡大と若手育成を図った。各年度、3-4課題の支援依頼者またはその研究グループの若手研究者に対してOJTを実施した。

以上を通じて、全体として、単なる配列決定だけにとどまらない総合的なゲノム解析支援を実施した。

＜主な支援成果＞

（1）　<u>トランスクリプトーム解析とエピゲノム解析を組み合わせたメカニズム解明</u>

マウスなどモデル生物を用い、様々な生物学現象につき、トランスクリプトーム解析とエピゲノム解析を組み合わせた多層オミクス解析でその現象にかかわる遺伝子を見いだしたり、その制御メカニズムにせまる研究は、多細胞２の分野の支援課題の約8割を占める。代表的な成果として、 次の研究を挙げることができる。

【大脳新皮質神経幹細胞による多様な細胞の産生機構の解明（東大・後藤）】

後藤らは、ポリコーム群タンパク質が神経幹細胞のニューロン分化能を抑制することで、ニューロン分化期からグリア分化期へと移行することを見出していたが、これまでの支援により、HMGA2がポリコーム群タンパク質の重要な標的遺伝子であることを明らかにした。（***Nat. Neurosci*, 2012**）また、HMGA2過剰発現で発現が上昇する遺伝子のうち、Igf2bp2という新たな神経幹細胞の制御因子を見つけることができた。（***Genes Cells*, 2013**）さらにFezf2がポリコーム群タンパク質の標的であることを見出した。（***Development*, 2014**）

【RNA分解酵素Zc3h12aによる免疫抑制機構の解析（京大・竹内）】

竹内らは、新規 RNA 分解酵素である Regnase-1（Zc3h12a）を同定し、この遺伝子がT細胞で発現しないと自己免疫性炎症性疾患発症し致死的であることを示してきた。本支援では、Regnase-1標的mRNAを網羅的に検討し、これまでに同定されていた Il6などに加え、c-Relや、Icos、Ox40、Il2などの mRNA を見つけることが出来た。さらに、RIP-Seq解析を行い、これらの分子をコードするmRNA が Regnase-1 による直接の標的となっていることを示す事が出来た。（***Cell,* 2013, 2015**）

【エピジェネティック異常による造血腫瘍の発症機構の解明（千葉大・岩間）】

癌において、多くのエピジェネティック制御遺伝子が遺伝子変異の標的となることが明らかになりつつある。岩間らは、ゲノム支援を受けて、ポリコーム群遺伝子EZH2 遺伝子欠損マウスとDNA 脱メチル化過程を触媒する TET2 遺伝子ノックダウンマウスを用いて、EZH2 と TET2 の活性喪失型変異が骨髄異形成症候群 (MDS)、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の病態形成にどのように関与するのかについて解析を行った。

その結果、Ezh2 の欠損により H3K27me3 レベルがゲノムワイドに低下しきわめて多くの遺伝子の発現が亢進すること、一方で、一部の分化関連遺伝子や癌抑制遺伝子はEzh1 の代償的な機能によりH3K27me3が保持され、遺伝子抑制が維持されることを明らかにした。（***J Exp Med*, 2103**）

（2）新規のゲノム解析における遺伝子構造の確定に向けたトランスクリプトーム解析

多くの場合、多細胞１の分野と協力して新規のゲノム配列決定と同時にRNA-seqなどのトランスクリプトーム解析を行うことが多かった。また、ドラフトゲノム配列のみが利用可能な生物について配列解析の確度を上げるためのトランスクリプトーム解析の支援も行った。件数としては全体で2割程度である。例としては、

【アカハライモリのモデル動物化を加速する分野横断研究（筑波大・千葉）】

千葉らはJapan Newt Research Community (JNRC)を結成し、イモリの「モデル動物化」を推進してきた。本支援は、JNRCが行っている利用価値の高い遺伝子情報の収集活動（データベース構築）の支援をめざしてRNA-seqを行い、再生眼球（術後 20 日、25日、30 日、50 日）、再生脳、再生心臓、水晶体、内臓器官（肺・腸・膵臓・肝臓・腎臓）から約 8.7 億リードを取得した。これらの情報をもとに de novo assembly により「組織特異的transcriptome」および「全 transcriptome」の構築がなされ、JNRC が管理するサイトIMORI (http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/)において公開された。（***PLoS ONE*, 2014; *Sci Rep*, 2014**）

【新規形質獲得のゲノム基盤とその進化的起源（東工大・二階堂）】

二階堂らはビクトリア湖に生息するシクリッドを対象に、なぜ、「唇の肥大化」という平行進化が起きたのかを理解しようとしている。そのための分子基盤を確立するために唇の肥大化しているシクリッド種（Haplochromis chilotes）と肥大化していない種（H. sauvagei）

の 2種を対象に、全ゲノム配列の決定（リシーケンス）、異種間雑種系統の構築から遺伝子地図の作製、QTLマッピングをおこなってきた。本支援では上記の、2 種の唇組織についてRNA-seq を行った。その結果、7 コピーある MAGP4 遺伝子のうち、 MAGP4-CD 遺伝子のみが、H. chilotes の唇組織において顕著に発現量が低いことが明らかとなり、これはqPCR によっても確認された。MAGP4 は弾性繊維（エラスチン）の形成に関与し、この遺伝子を含むゲノム領域の欠損はヒト遺伝病（Smith-Magenis Syndrome）を引き起こすことが知られているが、そのSMS の特徴の1 つが唇の肥厚であることが記載されている。H. chilotes における唇の肥大化がMAGP4 遺伝子の発現低下に起因するエラスチン繊維の形成不全によるものであると予想された。（***Nature*, 2014; *Genome Biol Evol,* 2014**）
なお、このゲノム解析を実施する中で、伊藤らによって開発されたヘテロ接合性に強いゲノムアッセンブラPlatanusが活躍した。

（3）新規のゲノム解析法の開発

少数ではあるが、RNAやエピゲノム解析について新規の方法を開発したり、既存の方法の改良を行い、その評価を支援した場合がある。主なものは、

【RNA分解キネティックスの網羅的解析法の開発（東大・秋光）】

秋光らは､哺乳動物細胞のRNA分解について網羅的に解析できるBRIC法の開発を行った。まず、細胞内RNAをBromouridine でパルスラベルし、その後、特異的抗体を用いた免疫沈降法で経時的にBromouridineラベルされたRNAを回収･定量することで RNA 分解を測定できる手法である。この手法で回収されたRNA を次世代シーケンサー解析することによって、細胞内 RNA 分解を網羅的に解析することが可能になった（BRIC-seq）。本支援では、BRIC-seq の評価だけでなく、同時に RIP-seq と ChIP-seq、なども行い、RNA分解制御機構の理解の可能性も示した。（***Mol Cell,* 2014; *Method in Mol Biol,* 2014**）

なお、バイオインフォマッティクス解析支援も受け、ノンコーディングRNA のRNA 安定性解析も行った。

＜支援活動における課題等＞

【サンプル調整の問題】

サンプルの品質は、しばしばゲノム解析の効率や成否に大きく影響する。特に、ChIP-seq や RIP-seq など、最終的に得られるサンプル量が少ない場合、期待されたデータが中々得られずその原因を明らかにするのに時間と労力のかかる場合が数多く見られた。また、特殊な条件下での mRNA 調整など、当初予定されていた計画がうまくいかず、ゲノム解析に供するサンプルの調整ができなかった例も存在した。限られた人的・経済的・施設資源を有効に使うためには、支援課題の選定の段階で、技術面で、もう少し厳密な審査を行うことや、支援開始前などのもう少し丁寧な議論を依頼者と支援担当者間で行うことなどによって、これらの問題に対応する必要がある。

【論文作成の遅れ？】

最近では、ゲノムデータの論文化には、ますます高度なデータ解析が求められる傾向にあり、ゲノム論文の作成は、他の分野の研究者が考えている以上に多大な時間と労力を要する作業になっている。この点において、情報解析支援の一段の強化および情報解析を行える人材の育成が急務である。また、解析対象によっては、集団遺伝学や数理統計などの専門家による支援も必要と考えられる。

④　微生物

＜支援の概要＞

（1）ゲノム配列情報等の算出

微生物のゲノム解析を含む支援課題に対して、最新のゲノム解析技術を用いたゲノム配列決定、ゲノムワイドな変異部位検索、トランスクリプトーム解析（Chip-seq解析等を含む）、メタゲノム解析（16S rRNA配列を用いた集団組成解析を含む）等の幅広い支援を行った。具体的には、107件（2010年度16件、2011年度14件、2012年16件、2013年度22件、2014年度20件、2015年度19件）の課題に対して支援を行った。対象は、ウイルス・真正細菌・古細菌から真菌・原虫・線虫等の真核微生物をカバーする140種類以上の微生物種・微生物集団であり、以下のような配列データ等を提供した。

・ゲノム配列の取得：1809株
・メタゲノム解析（16S による菌叢組成解析を含む）：840 サンプル
・RNA-seq/ChIP-seq 解析など（メチローム解析を含む）：393 サンプル
・　その他（Fosmid/Bac ライブラリーの両端配列決定など）：4 課題

(現在解析中のものもあり、最終的なサンプル数が確定していないものもあるため、正確なサンプル数にはこの数を上回る)

（2）情報解析支援

算出されたデータの一次情報解析支援、さらに必要に応じて、論文化に必要な高度な情報解析支援（ゲノム比較解析等）を情報支援グループと連携して行った。なお、解析を行うにあたっては、申請者側と議論を行い、必要に応じて、サンプル調整の指導、解析サンプルの選定についての助言、取得したデータの解釈や解析についての指導や助言などを行った。

（3）実地での技術講習

支援希望者側の要望に応じて、実地での技術講習（On–the-Job-Training）を行い、本研究分野の裾野の拡大と若手育成を図った。具体的には、9課題の支援依頼者またはその研究グループの若手研究者に対してOJTを実施した。

以上を通じて、全体として、単なる配列決定だけにとどまらない総合的なゲノム解析支援を実施した。

＜主な支援成果＞

（1）新規性・有用性の高い微生物のゲノム解析とゲノム情報からの新規機能遺伝子の検索

この方向では、様々な環境由来の微生物の個別ゲノム解析を行い、ゲノム情報からの新規有用遺伝子の検索を行った。代表的な成果として、 次の研究を挙げることができる。

【海洋細菌のゲノム解析による新規ロドプシンの発見（東大・吉澤）】

ロドプシンの多様性に着目して海洋細菌の菌種横断的なゲノム解析を行い、世界

初めて、H^+ポンプ型、Na^+ポンプ型、Cl^-ポンプ型の3種類ロドプシンを同時にもつ細菌を発見した。海洋細菌からのCl^-ポンプ型ロドプシンの発見自体が世界で初であり、Na^+ポンプ型ロドプシンも２例目であり、当初の期待を上回る極めて新規性の高い研究成果が得られた。この成果は、太陽光エネルギーを地球生態系へ結ぶ新しいパスウェイである光駆動型プロトンポンプ（プロテオロドプシン）の研究を大きく前進させると同時に、急速に神経科学の分野で広がりつつある光遺伝学（Optogenetics）の新しいツールとしての応用も期待される。**（*PNAS*, 2014）**

（2）微生物集団のメタゲノム解析と難培養細菌のゲノム解読

本支援活動の大きな柱となった研究分野の一つは、微生物集団のメタゲノム解析とそこに含まれる難培養細菌のゲノム解読である。代表的な成果として、 2つの研究を挙げることができる。

【微生物共生系のメタゲノム解析からの難培養細菌のゲノム解読（北大・福井）】

湖底環境での窒素・硫黄循環を担う微生物共生系のメタゲノム解析を行い、２種類の難培養細菌のドラフト配列が得られた。代謝の中心となるThioplocaについては、メタゲノム配列から、このグループの菌としては世界で初めて完全配列を再構成することに成功し、さらにプロテーム解析へと展開することによって、本菌の窒素・硫黄代謝の全貌が明らかとなった。この結果は、環境微生物学のトップジャーナルISEM Journalに発表された。**（ISEM Journal、2015）**

なお、この方向でのメタゲノム解析では、他にもメタン酸化細菌、Anammox、原虫内部寄生菌などの難培養細菌のゲノム再構築に成功している。

【汚染土壌のメタゲノム解析（東北大・津田）】

芳香族化合物による汚染土壌のメタゲノム解析を行い、細菌による芳香族化合物の分解とそれに伴う土壌細菌叢の経時的変化を明らかにした。本研究は、環境微生物の分野において新しい方向を示す、今までにないタイプの環境メタゲノム解析であり、微生物による環境浄化の分野を先導する研究である。**（*DNA Res*, 2015）**

ヒトおよび動物の腸内細菌叢の解析に関しても、8課題に対して支援を行った。これらの支援活動は、東大・本田らによる免疫を制御するヒト腸内菌種の同定（Atarashi et al. Nature, 2013）に結びついたほか、東工大・山田らによる360サンプルを超える大規模な解析などが進行中である。我が国では、海外のような腸内細菌叢に関する大規模プロジェクトが走っておらず、また腸内細菌叢の研究においては、1サンプルあたり6 Gbp程度のデータ量が国際標準となっているため、本支援活動が我が国の腸内細菌叢解析を支えているといえる状況にある。

（3）属・種レベルでの大規模比較ゲノム解析

数十～数百の菌株を対象とした大規模比較ゲノム解析と全ゲノム情報に基づいた高精度系統解析も、本支援活動の大きな柱である。この方向では、大分大・山岡らのヘリコバクター・ピロリ409株のゲノム比較解析や東京医科大・丸山のレンサ球菌351株の解析など、10課題以上の支援を行ったが、いずれも解析に時間を要しており、まだ論文発表に至っていない。論文化に成功した成果の代表例として、 次の研究を挙げることができる。

【*Escherichia albertii*の主レベルでの比較ゲノム解析（宮崎大・林）】

最近発見された大腸菌に近縁の病原細菌であるEscherichia albertii 29株のゲノム配列を決定し、大腸菌や他のEscherichia属とのゲノム比較から、Escherichia属に共通なコア

ゲノムとE. albertiiに共通なコアゲノムを同定し、E. albertiiの病原遺伝子の網羅的な同定にも成功した。また、E. albertii特異的で他のEscherichia属には存在しない遺伝子群の検索結果に基づいて、E. albertiiの特異的検出法を開発した（。なお、この検出法を用いて、E. albertiiによる集団感染を世界で初めて検出することにも成功している。（***Genome Biol Evol,* 2015**）

（4）真核微生物のゲノム解読

真核微生物に関しては、酵母等のre-sequencingによる変異部位の同定などの支援とともに、de novoのゲノム配列決定も支援した。代表的な成果として、 次の2つの研究を挙げることができる。

【ベネズエラ糞線虫のゲノム解析（宮崎大・丸山）】

ベネズエラ糞線虫のゲノム解読を行った。これは、我が国で初めての病原寄生虫の全ゲノム配列決定であり、本支援活動で得られた配列情報が主要データとなり、Sanger研究所と共同で病原糞線虫のゲノム比較が実施され、Nature Geneticsに発表された。（***Nat Genet,* 2016**）

なお、このゲノム解析を実施する中で、次世代シーケンサを用いた真核生物の全ゲノム解析で問題となるヘテロ接合性に強いゲノムアッセンブラPlatanusが情報支援グループの伊藤らによって開発された。

【サンゴと共生する褐虫藻の全ゲノム解析（OIST・將口）】

サンゴとの共生関係にある褐虫藻のゲノム配列を支援し、全ゲノム配列の決定に成功した。これは、渦鞭毛藻類としては、初めてのゲノム解読である。その結果、核ゲノム、ミトコンドリアゲノム、葉緑体ゲノムのユニークな構造が明らかになっただけでなく、海洋での生物間共生のメカニズムに関する研究や珊瑚礁の保全等へのデータの活用が期待される研究成果である。（***Curr. Biol.***, 2103 ; ***Genome Biol Evol,* 2014; *Genome Biol Evol,* 2015**）

＜支援活動における課題等＞

【サンプル調整の問題】

サンプルの品質は、しばしばゲノム解析の効率や成否に大きく影響する。特に、メタゲノム解析では、元々のサンプル量が少ない場合やゲノム解析の本来の対象ではない微生物などの混入などにより、期待されたデータが得られなかった例が見られた。また、特殊な変異体の作成や特殊な条件下での mRNA 調整など、当初予定されていた計画がうまくいかず、ゲノム解析に供するサンプルの調整ができなかった例も存在した。限られた人的・経済的・施設資源を有効に使うためには、支援課題の選定の段階で、技術面で、もう少し厳密な審査を行うことや、支援開始前などのもう少し丁寧な議論を依頼者と支援担当者間で行うことなどによって、これらの問題に対応する必要がある。

【論文作成の遅れ？】

最近では、ゲノムデータの論文化には、ますます高度なデータ解析が求められる傾向にあり、ゲノム論文の作成は、他の分野の研究者が考えている以上に多大な時間と労力を要する作業になっている。この点において、情報解析支援の一段の強化および情報解析を行える人材の育成が急務である。また、解析対象によっては、集団遺伝学や数理統計などの専門家による支援も必要と考えられる。

⑤　情報解析

＜情報解析支援活動の概要＞

他の支援活動と連携して、ゲノム配列データのアセンブル、マッピング、アノテーション（生物学的・医学的意味付け）など、ゲノム配列の情報解析の支援を行った。データ産出量は加速度的に増えており、いずれの課題においても情報解析が鍵となっていることから、本支援活動の要となる活動となった。これに加えて、今後の高度な支援のための先行技術開発を実験系研究者と連携して進め、解析ソフトウェアやデータベースの開発を実施した。さらに、支援活動が進むにつれ、情報解析支援部分が最も要望が高くまたボトルネックにもなってきたことから、きめの細かい講習会の開催やOJTを通じた支援依頼側の人材育成も実施した。

情報解析支援活動では以下の３つのグループにより、情報解析支援課題のみならず、他の支援活動と一体となり支援を実施した。

1)一次解析支援グループ

大規模ゲノム及びゲノム医科学支援活動と一体的に活動し、産出される塩基配列やタイピングなどの一次データに対して情報解析技術を用いた支援を行う。主に次世代型シーケンサー由来の大量の一次データに対して、一般的なソフトウェアによるアッセンブル、マッピング、相同性検索等の各種自動解析を実施し、その結果を支援依頼した研究者らに提供する。

2)情報解析支援グループ

塩基配列やタイピングなどのシーケンスデータに対して高度な情報解析技術を駆使した支援（データの整理や生物学的医学的意味付け、データベース構築支援、データ公開支援、など）を行う。その結果を、各研究者にウェブを通して提供するための技術開発を行う。また、現在のソフトウェアでは対応できない解析に向けて、汎用性のある情報解析技術の開発を行うとともに、基盤技術開発グループで開発された新規技術を導入し、速やかにプロトコル化しワークフローを作成することで支援の範囲を順次拡大する。さらに高度な生物学的または情報科学的な知識の導入が不可欠である解析については、適切な研究者との共同研究の推進を計る。

3)基盤技術開発グループ

ゲノム情報解析支援において、最新のプロトコルでも達成困難な研究領域を補完し、より高度な、かつ最先端の支援を実施するため、次世代型シーケンサーからの大量データ解析に向けた次世代の情報解析支援技術（高速なアッセンブルおよびマッピング技術、自動アノテーション技術や超高速相同性検索技術、高度並列化計算技術、バイオクラウドコンピューティング技術等）の開発を実施する。

情報解析のみの支援として、2010年度4件（うち1件は支援中止）、2011年度3件、2012年度6件（継続申請2件含む）、2013年度5件、2014年度2件、2015年度3件、2016年度4件の支援申請が採択された。全課題に対して支援担当者を決定し、支援依頼者と議論を重ねつつ支援を行った。これに加え情報解析支援は、上述した一次解析支援、情報解析支援、基盤技術開発支援の３つのグループにおいて支援ならびに技術開発を行った。

(1)一次解析支援グループ

本グループは大規模ゲノム情報生産等支援活動及びゲノム医科学推進支援活動と一体的に活動した。

(2)情報解析支援グループ

ゲノム医科学、多細胞生物１＆２、微生物における支援活動と連携して、以下の支援課題において、高度な情報解析支援を実施した。［医科学］2010年度8件、2011年度6件、2012年度12件、2013年度10件、2014年度9件、2015年度8件のエキソーム解析（Target capture含む）もしくは全ゲノム解析。［多細胞生物］2

010年度6件、2011年度4件，2012年度2件、2013年度2件、2014年度12件、2015年度4件のゲノム解析およびRNA-seq解析。［微生物］2010年度4件、2011年度3件、2012年度2件、2013年度7件、2014年度9件、2015年度7件のゲノム・メタゲノム・SNP解析・RNA-seq解析。上記支援活動に加えて、支援を円滑に実施するための高度なソフトウェアを簡便に利用可能な解析パイプラインの開発を行った。

(3)基盤技術開発グループ

ゲノム科学において必須となる高度な解析技術、ソフトウェア開発を進め、アセンブル関連ソフトウェア8本、配列解析ソフトウェア16本、解析パイプライン5本、可視化ソフトウェア4本、環境整備系ソフトウェア3本、データベース6件、その他7本の、合計49本の新規ソフトウェア、データベースを開発し公開した。

＜主な支援成果＞

【創薬ターゲットとしてのトリインフルエンザ抵抗性分子の同定（金沢大・細道）】

トリインフルエンザ抵抗性の主動遺伝子を同定するために、ヒトの全エキソン領域のシークエンシングデータをゲノム配列にマッピングすることによって、疾患の原因となるゲノム変異の検出を試みた。検出された変異が真にヒトゲノムの変異によるものか、シーケンシングエラーによるものかの判定は難しく、特にIndelに関しては、既存のツールでは高精度の検出は困難であった。そこで、塩基アラインメントツールLASTに、得られた塩基のクオリティ情報を活用し、確率的な枠組みでアラインメントの不確実性を考慮してIndelやSNPを検出する改良を実装し適用することで、IndelやSNPの検出精度が向上することが確認でき、多くの新規多型情報発見することに成功した。

【シロオビアゲハなど大型真核生物のゲノム解読（東大・藤原）他】

シロオビアゲハとナミアゲハの高精度なドラフトゲノム配列を、高ヘテロ接合性ゲノムのde novoアセンブラPlatanusを開発し適用することで完成させることができた。雌のシロオビアゲハのベイツ型擬態に関する擬態責任領域には、性分化を制御するdsx遺伝子が存在するが、本領域（約130kbp）が擬態型（H型）と非擬態型（h型）で逆位を示すことを突き止めた。(*Nature Genet*., 2015)

大型真核生物のゲノムアセンブルを可能にしたPlatanusは、上記アゲハ以外に、イトマキヒトデ、ベネズエラ糞線虫、シーラカンス、フタホシコオロギ、アマミトゲネズミ、ザリガニ、オニヒトデ、ヌタウナギ、カタツムリ、ハナビシソウ、ホンハブ、ハナビシソウ、トカラハブ、サキシマハブ、ゲンジボタル、ヘイケボタル、ヒメカメノコテントウ、ダンダラテントウなどを対象とする支援課題にて、対象種別のチューニングを施した上で適用されている。

【転写因子CLOCKによる概日リズムの制御の解明（東大・深田）】

マウス肝臓を用いたChIP-Seqデータに、網羅的に部分配列の出現頻度分布を解析し認識配列のレパートリーを列挙する事が可能なソフトウェアMOCCSを開発し適用することで、哺乳類の概日リズムを制御する転写因子CLOCKが認識するDNA配列のレパートリーを非典型的な配列を含め正確に明らかにすることに初めて成功した。その結果、概日リズムは、転写因子CLOCKがDNAに結合する直接的な制御に加えて、他の転写因子や遺伝子発現を抑制するmicroRNAによる間接的な制御により巧みに調節されていることが明らかとなった。（*MCB*, 2014）

【環境擾乱に対する土壌細菌叢のロバスト性（東北大・津田）】

環境擾乱にともなう細菌群集動態を明らかにすることを目的として、土壌細菌群集の時系列メタゲノム解析を実施した。解析で得られた膨大な遺伝子断片情報に対してGPGPUによる超高速相同性検索ソフトウェアGHOSTMおよびCLASTを開発し適用することで、土壌に添加した多環芳香族化合物は、約10週をかけて土壌細菌群集により完全に分解されるが、土壌細菌群集構造は、多環芳香族化合物を添加した直後著しい変動を示すものの、その後24週をかけて緩やかに元の構造に戻るレジリエントな動態を示すことを明らかにした。また、このレジリエントな現象が、化合

物添加により増殖した細菌がファージ感染により減少するkill the winner仮説により説明可能であることを示した。（*DNA Res.*, 2015）

＜ゲノム情報解析講習会＞

支援対象者のみならず広く国内の研究者を対象として、主に情報解析支援活動により開発されたソフトウェアを利用した講習会を開催し、様々な生命科学研究分野におけるゲノム情報解析の人材育成に努めた。ゲノム科学の裾野拡大のためには、微生物のゲノム解析やモデル生物の機能解析については、各大学等に設置されたシーケンサーの活用が望まれる。そのネックとなるのは、次世代シーケンサーからの配列情報を各大学で処理できる人材が不足していることである。特に国内外で開発されている解析ソフトウェアはUNIX上で動作するものがほとんどで、これらが情報分野以外の研究者にとっての大きな障壁となっている。そこで、研究対象とする生物種や解析内容、さらには研究者のスキルに応じて，ソフトウェアや解析パイプラインの利用方法、DDBJスパコンの利用方法のみならずUNIXの基礎など、よりきめ細やかな講習会を実施し、ゲノム情報解析の人材育成を図ってきた。以下は、毎年度実施した講習会およびその応募状況である。

年度	日程	開催地	申込数	受講者数
2012	3月17日	東京	28	26
2012	3月24日	京都	26	25
2013	11月26日、27日	三島	41	25
2014	2月28日、3月1日	三島	25	16
2015	11月19日、20日	三島	22	17

＜支援活動における課題＞

【情報解析のみの支援課題について】

情報解析のみの支援課題においては、その多くが大規模ゲノム情報生産等支援活動により産出されたデータではなく、主に支援依頼者により独自に産出されたデータに基づく解析支援であった。これらの課題の中には、既存の手法では容易に解決できない難問が含まれており、支援を進めるためにはハイレベルの技術開発が要求されるものもあった。また多くの場合が、膨大なデータからのターゲットスクリーニングなどが解析の要となっているため、難問を解決したとしても論文化に至るまでには時間を要する課題となっている。このようなケースを最小限にとどめ効率良い支援を実施するためには、課題選定の段階で、期間内での解析実現性に関するさらに厳密な審査を行う必要がある。また支援依頼者と徹底した打合せを実施し、場合によっては企画課題にするなど、さらなる柔軟な支援体制の構築をする必要があると思われる。

【支援課題と技術開発のマッチング】

上述した「支援課題からの要求→技術開発→解析パイプラインへの組込→一般からのフィードバック」、というソフトウェアのライフサイクルを効率良く廻し、最先端技術の一般化を進めるためには、支援課題と技術開発とのマッチングを図る必要がある。そのためには、課題解決において何が障壁となっているか、それを解決する手段は何か、など、情報解析研究者間のコミュニケーションをより充実させるとともに、トップダウンマネジメントをさらに強化し、支援遂行に最適の技術開発を進める必要がある。

（５）公募支援課題の成果報告書

支援成果公表リストは略記している。

詳細リストは 25 ページからの研究発表リストに掲載した。

公募支援課題：2012 年度, 2013 年度

RNA 分解を介した核局在型高分子非コード RNA 作用マシナリーの制御機構の解明

新学術領域研究

秋光 信佳・東京大学アイソトープ総合センター

＜背景・目的＞

遺伝子発現を規定する RNA 分子の発現量は転写と分解のバランスで決定される。そのため、転写と同様に RNA 分解も重要な生化学的過程であるが、その理解は進んでいない。本研究では、哺乳動物細胞の RNA 分解機構について網羅的に解析できる BRIC 法の開発と応用を目指した。BRIC 法とは、申請者らが開発した手法であり、細胞に Bromouridine を取り込ませることで細胞内 RNA を Bromouridine でパルスラベルし、その後、特異的抗体を用いた免疫沈降法で経時的に Bromouridine ラベルされた RNA を回収・定量することで RNA 分解を測定できる手法である。この手法で回収された RNA を次世代シーケンサー解析することによって、細胞内 RNA 分解を網羅的に解析することが可能になった（BRIC-seq）。

＜支援の内容＞

上述した BRIC-seq 法の開発のために必要な次世代シーケンサー解析（RNA-seq）を本支援で行った。また、BRIC-seq を用いた哺乳動物細胞の遺伝子発現制御機構の解明では、同時に RNA - protein immunoprecipitation と Chromatin - immunoprecipitation 実験なども行う必要が生じたため、本ゲノム支援にて実施した。また、BRIC-seq では mRNA のみならずノンコーディング RNA の RNA 安定性も同時に解析が可能になる。そこで、本支援でバイオインフォマッティクス解析支援を受け、ノンコーディング RNA の RNA 安定性解析も行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

哺乳動物細胞の遺伝子発現制御において、転写と RNA 分解のそれぞれの寄与について解析した。その結果、mRNA の 10%程度は RNA 分解による発現制御を強く受けていることが判明した。さらに、BRIC 法の適用範囲を拡大し、かつより使い勝手の良い技術とするため、複数の培養細胞を用いてゲノムワイドな RNA 分解を測定した。また、低酸素ストレスに応答した RNA 分解のグローバルな変化も測定してきた。

RNA 分解制御では RNA 結合タンパク質が中心的役割を果たすと考えられているため、RNA 結合タンパク質の標的 RNA の分解制御を調べる研究に BRIC-seq 法を適用した。まず、UPF1 という RNA 分解因子の標的 RNA をゲノムワイドに検索し、約 700 個の UPF1 分解標的を同定して報告した。また、GAS5 ノンコーディング RNA の分解を介した発現制御も報告した。さらに、RNA 結合タンパク質の IMP3 の分解標的 RNA を同定した。IMP3 の研究では、IMP3 による分解標的 mRNA を解析する中で、IMP3 が mRNA 分解を介して翻訳反応を制御することを見いだした。これは、がんの細胞増殖制御における RNA 分解制御の重要性を示す好例となった。

ウイルス感染細胞における RNA 発現パターン、スプライシングパターン、RNA 分解を測定し、NEAT1 ノンコーディング RNA が自然免疫応答におけるスイッチ分子として機能することを報告した。

これらの BRIC-seq 実施の過程で様々なノウハウが蓄積され、より良い手法へと成熟させたプロトコールを論文報告した。

以上に述べた支援の成果は原著論文として発表した。また、支援の成果を日本語総説や日本語プロトコールとしても発表し、広く情報発信した。特に、日本語プロトコールについては、ゲノム支援の班員が監修する書籍としても発表しており、本支援の成果を情報発信することに貢献できた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援の成果については、現時点でも論文投稿中の成果もある。また、今後も複数の研究成果を報告できる予定である。さらに、本支援で成熟化した BRIC-seq 法は国際的にも注目され、国内のみならず海外との共同研究（米国、ドイツ）を遂行中である。また、核内 RNA 分解の研究という新しい研究領域の開拓にも貢献すると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

Mizutani R. et al., Oncogene, in press
Maekawa S. et al., BMC Genomics, 16, 154. (2015)
Tani H. et al., Methods in Mol. Biol., 1262, 305-320 (2015)
Imamura K. et al., Mol. Cell, 53, 393-406 (2014)
Imamachi N. et al., Methods, 67, 55-63. (2014)
Tani H. et al., Plos ONE 8, e55684. (2013)
Tani H. et al., RNA Biol., 9, 1370-1379 (2013)

公募支援課題：2015 年度

長鎖ノンコーディングＲＮＡによる自然免疫応答制御機構の解明

基盤研究（B）

秋光 信佳・東京大学アイソトープ総合センター

＜背景・目的＞

ノンコーディング RNA とは、タンパク質のアミノ酸一次配列情報をコードしない RNA の総称である。ノンコーディング RNA の中でも、200 塩基長以上のものを長鎖ノンコーディング RNA と呼んでいる。

申請者は、2012 年度と 2013 年度のゲノム支援による次世代シークエンス解析並びにバイオインフォマティックス解析の支援を受けた結果、長鎖ノンコーディング RNA の中でも RNA 分解の早い一群の RNA を同定した。これら分解の早い RNA を Short Lived noncoding Transcripts (SLiTs)と名付けた。細胞を核と細胞質に分画し、それぞれを次世代シーケンス解析した結果（これもゲノム支援での支援成果）、SLiTs の多くは核内に局在することが判明した。そこで申請者は、特に核に局在する短寿命長鎖ノンコーディング RNA である SLiTs に着目した研究を展開することにした。

ここで、メッセンジャーRNA の研究から、免疫関連タンパク質をコードするメッセンジャーRNA は一般的に短寿命であり、免疫刺激に応答して RNA 分解が抑制され、その結果、短時間に免疫関連タンパク質をコードするメッセンジャーRNA が増加されることが知られる。この知見にヒントを得て、申請者は、短寿命ノンコーディング RNA の SLiTs が免疫刺激に応答して RNA 分解が抑制され、その結果、ノンコーディング RNA が増加して免疫応答の制御に関わっている可能性を考えて研究を実施することを計画した。

＜支援の内容＞

本支援では、上述した申請者独自のアイデアを検証する研究に対する次世代シーケンサー解析、クロマチン免疫沈降実験、バイオインフォマッティクス解析を支援依頼する予定である。具体的には、免疫刺激源として、病原性微生物を用いて、病原性微生物に感染したときに発現変動する SLiTs の探索を行う。さらに、同定した免疫刺激に応答して発現する SLiTs の生理機能を解析する上では、SLiTs が核内に局在化する点に着目して転写制御における役割を調べる予定である。この解析では、SLiTs による転写因子の活性制御について検証予定であるため、転写因子に対するクロマチン免疫沈降実験を行う予定である。また、2012 年度と 2013 年度のゲノム支援で開発した BRIC-seq 解析を実施する支援も依頼する予定である。具体的には、病原体に感染した細胞を用いて BRIC-seq 解析を予定している。さらに、これらの解析で得られる大量のデータを用いて解析を実施するとともに、本支援で得たオリジナルデータと既存データベース中の各種次世代シークエンスデータとの比較解析等も行うため、本支援ではバイオインフォマティックス解析の支援も依頼予定である。

＜支援によって得られた研究成果＞

本年度から新規開始の支援課題であるため、論文発表は行っていないが、病原性微生物に感染したヒト培養細胞における遺伝子発現プロファイリングを完了した。その結果、病原性微生物感染に応答して、500 種類程度の SLiTs が発現誘導されることを見いだした。さらに、定量 RT-PCR 解析によって、病原性微生物感染による SLiTs 誘導の再現性も確認した。次に、感染後の時系列 RNA-seq データを取得することによって、病原性微生物感染で誘導される SLiTs には、感染初期に誘導されるものから感染後 12 時間以降から誘導されるものまで多様な発現誘導パターンにあることが分かった。免疫関連タンパク質をコードするメッセンジャーRNA でも感染後の経時的発現パターンは多様であり、その発現パターンはコードするタンパク質機能と密接に関連することから、この知見をヒントに、SLiTs の機能予測等を現在実施中である。また、個々の SLiTs について siRNA を用いたノックダウン実験、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト実験、RNA-protein immunoprecipitation 実験等を組み合わせた実験を実施し、病原体感染に対する宿主細胞の応答（自然免疫応答の一種）における SLiTs の機能を解明する予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

病原体感染に対する宿主細胞側の応答について、これまで全く注目されていなかった短寿命長鎖ノンコーディング RNA の生理機能が明らかになると期待される。それと同時に、核内 RNA 分解の生理的意義についても本支援によって解明できると期待され、細胞レベルの自然免疫応答制御における核内 RNA 分解制御の重要性が明らかになり、新しい研究分野の扉を開くことが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2012 年度

マウス多能性胚細胞・生殖細胞の発生プログラム制御に関する研究

特定領域研究

阿部 訓也・理化学研究所バイオリソースセンター

＜背景・目的＞

着床は、胎生という発生様式を取る哺乳類に特有の現象であり、母体（子宮）との接触を通じて、胚の発生は新しい段階に入る。着床前後のステージではゲノム再プログラム化と呼ばれる大規模なエピジェネティック状態の変換が起き、同時に劇的な遺伝子発現プロファイルの変動が生じると考えられ、真の意味の個体発生・分化は着床を契機として始まると言うこともできよう。しかし、着床直後の胚はサイズが非常に小さく、脱落膜に埋もれた状態にあるためアクセスが難しく、他のステージに比べて解析が非常に遅れているのが現状で、この時期の遺伝子発現変動について詳細な解析は為されていない。本研究では、着床前後の胚を構成する胚葉組織を分離し、それぞれに関するRNA-seq解析を行ない、この時期に始まる発生学的変換における転写、細胞シグナリングネットワークに関する情報を収集し、さらに、並行して実施しているDNAメチル化等のエピゲノム解析の結果と総合することにより、このステージにおける生物学的知見を飛躍的に増大させることを目的とする。

＜支援の内容＞

着床前期胚である受精後 3.5 日胚（E3.5）から、着床後の 6.5 日胚から胚体外外胚葉、胚体外内胚葉、胚体外胚葉の３つの組織を分離し、それぞれに関して RNA-Seq ライブラリーを作製した。本支援により、それらのライブラリーのシーケンス解析を実施した。

＜支援によって得られた研究成果＞

各サンプルから、3700 万から 7700 万リードを得て、fastq ファイルを用いて、マウス mm9 ゲノム配列に対して TopHat、Cufflinks 等のツールを用いてマッピングを行った。その結果をゲノムブラウザーで表示し検討したところ、調べた限りは良好な形でシーケンスリードが取れていることが確認できた。3.5 日胚、4.5 日胚、5.5 日胚、6.5 日胚それぞれの未分化多能性細胞、すなわち内部細胞塊 、エピブラスト、胚体外胚葉の発生過程における遺伝子発現変動を調べるため、既知遺伝子および新規転写産物（候補）それぞれの発現量を定量し、ANOVA 等の統計解析を加えて、発現変動を示す遺伝子を抽出した。3.5 日・内部細胞塊、4.5 日・エピブラスト、5.5 日-6.5 日・胚体外胚葉の 3 者はそれぞれ有意に異なる発現プロファイルを示した。言い換えると、3.5 日から 4.5 日、4.5 日から 5.5 日の間で大規模な遺伝子の発現変動が起きることが示唆された（5.5 日-6.5 日の変動は相対的に少ない）。これは、子宮への着床を契機として細胞形質の転換が起きる、という予測を遺伝子レベルで裏付ける結果であると考えられる。興味深いことは、4.5 日の発現プロファイルはその前後とも有意に異なっており、この時期に特有の発現を示す遺伝子が多数見つかっている。これら 4.5 日特異的発現を示すものの中には、これまで未知の新規転写産物が多く含まれる傾向が認められた。これは、着床前後の細胞形質転換に伴うエピゲノム状態の変動を反映している可能性がある。

胚体組織においては、3.5 日～5.5 日の間で、大規模な遺伝子発現の転換が起きていることが明らかとなってきたが、この時期の胚の最外層を構成する栄養外胚葉-胚体外外胚葉系譜（胎盤等に分化）でも、他の実験結果より、同様な時期にエピゲノム変動が起きている示唆を得ている。そこで、胚体外組織（栄養外胚葉、胚体外外胚葉）に関しても、RNA-Seq 解析によりその実証を試みるため、新たに胚体外組織を可視化するトランスジェニックマウスを導入し、これを用いて E3.5-E4.5 の胚体外組織のサンプリングを行ない、RNA-Seq 解析を行った。その結果、胚体外外胚葉組織においては、3.5 日胚、4.5 日胚は比較的類似性が高く、5.5 日、6.5 日胚同士も類似していたが、4.5 日と 5.5 日の間で、大規模な変動が起きていることが示された。また、胚発生の基盤となるエピゲノム（DNA メチローム）の形成とその遺伝子発現に対する影響を追究するため、DNA メチル化転移酵素欠損胚より、胚体組織、胚体外組織を単離し、RNA-Seq 解析を実施し、DNA メチル化により制御される遺伝子群の抽出を行った。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

上述のように、4.5 日胚の発現プロファイルはその前後とも有意に異なっており、この時期に特有の発現を示す未知遺伝子が多数見つかっている。これは、着床前後の細胞形質転換に伴うエピゲノム状態の変動を反映している可能性があるが、この点については、新規転写産物の妥当性確認を含め、今後より詳細な解析が必要となる。これまで、4.5 日胚・エピブラストに関する網羅的発現解析は実施されておらず、また今回用いた cDNA 増幅法である SPIA 法は、polyA 鎖を持たない RNA、未知非翻訳性 RNA の増幅も行うことが可能なので、今回の解析から新規の転写産物が多数同定されると期待される。現在、着床前後の発生イベントのモデルとして、naïve 型幹細胞である ES 細胞から、primed 型幹細胞である EpiSC 細胞への高効率転換系を構築することに成功したので、この度得られた in vivo 胚の結果と in vitro 系の結果を比較検討し、着床前後の発生プログラムの包括的理解を目指したい。

＜支援成果公表リスト＞

論文作成中

公募支援課題：2012 年度

高エネルギー量子ビームによる次世代突然変異育種技術の開発

最先端・次世代研究開発支援プログラム

阿部 知子・理化学研究所仁科加速器研究センター

＜背景・目的＞

理化学研究所仁科加速器研究センターRI ビームファクトリーで発生する重イオンビームは高エネルギーであり、核種および速度を選択することにより線エネルギー付与（LET）を精密に制御することができる。LET は単位長さ当たりに物質に与えるエネルギーの大きさであり、高 LET 線である重イオンビームは細胞を通過するとき局所的に DNA 二本鎖を切断する。申請者は重イオンビームが変異原として有効であることを実証し、共同研究により実用化品種を育成した。また、モデル植物シロイヌナズナを用いて LET の変異誘発に対する影響を精査した。変異率が高い LET 30 keV/μm では誘発する変異のほとんどが一遺伝子破壊であるが、致死効果が高い超高 LET 290 keV/μm では、大規模欠失や染色体再編成が多いことをゲノムリシーケンスで明らかにした。このとき、点突然変異、小規模欠失および挿入の検出に SAMtools、大規模欠失および挿入、染色体再編成の検出に Pindel および BreakDancer をそれぞれ利用した。検出した変異候補数は、SAMtools で各系統につき約 15,000 箇所、Pindel と BreakDancer でそれぞれ 3,000～5,000 箇所を超えたため、疑陽性を除いたゲノムに生じる全ての変異検出には 1 変異体あたり 2 ヶ月程度を要した。ゲノムリシーケンスによる変異検出を実用化するには、効率的に擬陽性を取り除くツールの開発が必要であった。

＜支援の内容＞

重イオンビーム照射で生じた突然変異を全ゲノムレベルで迅速に同定することを目的としたパイプラインの構築を、ゲノム支援グループ浅井潔教授（東京大学）、浜田道昭特任准教授（現早稲田大学准教授）、小野幸輝氏（情報数理バイオ（株）に依頼した。

当初は、SAMtools や Pindel、BreakDancer で検出された変異候補 1 つ 1 つを Integrative Genomics Viewer を用いて目視で確認し、偽陽性を判別していた。我々は判別作業を体系化することで、(1) Depth が一定の範囲(5-1,000)にないもの、2) 2 検体以上に共通する、研究室アクセッション固有の多型であるもの、3) 反復配列前後でのミスマッピングに起因するもの）という偽陽性の特徴を見出した。これを用いてビューワーを介さずに SAMtools や Pindel、BreakDancer の出力に偽陽性の判別フラグを付加するルーチンをパインプラインに組み込んだ。

また、Breakdancer における擬陽性除去ルーチン内で行う多検体比較では、2 検体以上に共通する変異候補の位置が検体ごとに数十～数百 bp ずつずれてしまい、それらが同一の変異候補か否かを判断するのが困難である問題があった。近傍に存在する染色体再編成候補をクラスタリングすることで、多検体比較を可能にした。

さらに、点突然変異、小規模欠失および挿入の検出のために GATK を、大規模欠失および挿入、染色体再編成の検出のために CNVnator を新たに導入し、これらの実行ルーチンと擬陽性の除去ルーチンをパイプラインに組み込んだ。

最終的に、HiSeq の Raw データ（fastq ファイル）からマッピング、SAMtools、GATK、Pindel、BreakDancer、CNVnator による変異候補の検出、検出結果の偽陽性判定を一気通貫して行うパイプラインを構築して頂いた。また、パイプラインを研究室の PC で実装するため、各処理過程の要求メモリ量を確認した。

＜支援によって得られた研究成果＞

3 変異体を用いたテスト解析では、パイプラインにより、陽性の検出をもらすことなく、疑陽性の数を開発前の 12%にまで減少させることができ、変異誘発効果の迅速解析が可能となった。この成果は Genes & Genetic Systems 誌に論文として投稿しており、現在査読中である。今後、本パイプラインを用いて様々な LET での重イオンビーム照射個体を解析し、変異領域に与える LET の影響を解明する。また有用変異体については、原因遺伝子同定に本パイプラインを利用する。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本パイプラインによる出力結果は、必要に応じて特定の遺伝子領域や染色体領域の解析、ホモ接合変異の抽出などもでき、突然変異体の原因遺伝子迅速探索にも大きな力を発揮する。当チームは、独自にシロイヌナズナとイネの変異体リソースを開発している。さらに、他の生物種の重イオンビーム変異体リソースを共同研究で構築している。本パイプラインはシロイヌナズナ以外の生物へ適用でき、変異体を用いた新規遺伝子同定の迅速化が可能となる。昨今、ゲノム編集技術を活用した育種技術(NBT: New Breeding Technology)が開発され、多様な作物で NBT のターゲットとなる新規遺伝子の探索研究が推進されており、有用変異体の重要性が増加している。重イオンビーム変異体と本パイプラインは、更なる次世代育種技術に貢献できると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

Hirano, T. et al., Plant J. 82(1)：93–104 (2015)

公募支援課題：2011 年度、2012 年度

トマト変異体バイオリソースの育種的利用による果実肥大特性の包括的評価

若手研究（B）

有泉 亨・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

課題担当者が所属する機関では、小型トマト品種マイクロトムの突然変異誘発系統を作出している。課題担当者は着果性（果実が実ること）や果実肥大性を示す多数のトマト変異体を独自に単離してきた。本研究では、これらの変異体を利用して、以下の 3 つの課題を目的とした。(1)果実肥大性が変化した 2 つの独立な変異体 *fasciated carpel 1*（*fcc1*）、*fcc2* の原因遺伝子を明らかにする。(2) これまでトマトの雌蕊で特異的に発現を示す遺伝子はほとんど報告が無かったため、トマトの雌蕊特異的発現遺伝子を RNA-seq 解析を利用して明らかにする。(3)着果性(着果効率）に優れた変異体を保有しているので、この変異体の雌蕊（子房部位）を利用した RNA-seq 解析を行ない、着果の分子機構を解明する。以上の研究により、果実肥大性や着果性を制御する分子メカニズムの新たな知見が得られると期待している。

＜支援の内容＞

(1)2 系統の変異体においてゲノムを illumina Hiseq 2000 で解読し(100bp のペアエンドシークエンス)、トマトゲノムサイズの 30 倍程度のゲノム情報を保有していたので、情報解析を依頼した。得られたリードをトマトのドラフトゲノム参照配列（Heinz 品種、マイクロトム品種の両方）にマッピングして、参照配列と比較することで *fcc1* あるいは *fcc2* 変異体でそれぞれ特異的に存在する SNP の検出を依頼した。
(2)マイクロトムの異なる組織や時期特異的な組織（根、茎、葉、花弁、葯、発達ステージの異なる雌蕊、果実など）で実施した 20 の RNA-seq のデータを保有していたため、情報解析情報により雌蕊で特異的に発現する遺伝子の抽出を依頼した。
(3)野生株と着果性に優れた変異体の RNA-seq 解析を行っていたので、発現量の算出と変異体で特異的にエンリッチされたパスウエイの同定を依頼した。

＜支援によって得られた研究成果＞

(1)トマト野生株ゲノム(マイクロトム)と比較して、*fcc1*、*fcc2* 変異体で特異的に存在する SNP はそれぞれ 1,414 個、1,095 個であった。そのうち、遺伝子機能に変化を与える可能性のある変異（非同義置換）はそれぞれ 155 個、55 個であった。
(2)雌蕊でのみ発現して、他の組織／器官で発現していないような、雌蕊特異的に発現を示す可能性のある 1,715 個の遺伝子を同定した。
(3) 着果時には細胞分裂や肥大に関わる遺伝子の活性化の他に、光合成、クロロフィル合成、糖代謝、細胞壁代謝、脂肪酸合成などの脂質代謝、あるいはおよびタンパク質合成に関連する遺伝子群の発現が共通に上昇していることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

(1)*fcc1*、*fcc2* 変異体においてはそれぞれ DNA マーカーを活用したラフマッピングを実施し、原因遺伝子の絞り込みを行なった。次に絞り込んだ染色体領域内において、変異体で特異的に存在する SNP を抽出し、原因遺伝子の候補を絞り込んだ。その結果、*fcc1*、*fcc2* 変異体でそれぞれ候補遺伝子が 1 つずつ選抜された。次に変異体と野生株との交配から得られた F_2 集団で連鎖解析を行なったところ、同定した遺伝子変異が変異体の表現型と一致していたことを確認した。それぞれの候補遺伝子に対して RNAi ベクターを作成し、マイクロトム野生株に遺伝子導入を行なった。その結果、*fcc2* の候補遺伝子の遺伝子発現を抑制させた形質転換体において、*fcc2* 変異体の表現型を再現できたため、選抜された遺伝子が原因遺伝子であったと結論づけた。一方、*fcc1* の候補遺伝子の RNAi 組換え体は現在作出中である。本支援により、果実肥大性に関わる新しい遺伝子の同定に成功した。

これまで、変異体の同定には大量の雑種集団と DNA マーカーを作成、利用する必要があったが、本支援の情報解析により、変異体の原因遺伝子を短時間で同定できる道筋ができた。実際に、ここで確立した手法で、申請者が独自に保有している、カロテノイド合成に欠陥があるトマト変異体の原因遺伝子の同定を試みたところ、NGS を利用して原因遺伝子を迅速に同定できた。この成果は、次世代シークエンサーを利用してトマトの変異体の原因遺伝子を同定した世界初の報告であった。
(2)選抜された雌蕊特異的発現遺伝子において、RT-PCR にて組織特異的発現の再現性の調査を行った。80 遺伝子において確認したところ、雌蕊特異的発現性の強い 14 個の遺伝子を選抜することができた。いずれも、新規の遺伝子であった。このような雌蕊特異的発現遺伝子は果実発達に重要である可能性もあるため、得られた遺伝子の機能を解明することで果実発達における新しい知見が得られる可能性が開かれた。
(3)ここで得られた知見により、着果に関わる新しいパスウエイが同定できた。今後、これらの遺伝子の機能を解明することで果実発達における新しい知見が得られる可能性が開かれた。

＜支援成果公表論文リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

次世代シークエンサーを用いたゲノム損傷抑制機構の解明

挑戦的萌芽研究

飯田 哲史・東京大学分子細胞生物学研究所

＜背景・目的＞

一般に DNA 修復は、ゲノムにランダムに生じた DNA 損傷に誘導されて起こると考えられています。しかし、染色体の特定領域で高頻度かつ広範囲で鋳型 DNA 鎖（複製の鋳型になる DNA 鎖側）の修復が通常の細胞周期で起きているという可能性が見出されました。この現象は、本来 RNA を構成するリボヌクレオチド(rNMP)が染色体複製の際に新生 DNA 鎖に誤って取り込まれ残存したものを、細胞周期で除去・修復する過程で起きるものであることが判ってきました。rNMP のゲノムへの誤った取り込みは、細胞内の高い濃度の rNTP プールにさらされる DNA ポリメラーゼによって高頻度に行われると推察されており、取り込まれた rNMP は突然変異を誘発する内在性の DNA 損傷として RNaseH を介して除去・修復されます。したがって、rNMP が蓄積する領域を明らかにすることができれば、突然変異や染色体異常が起きやすい領域を予測することにつながると考えられます。しかし、実際に染色体のどの領域に取り込まれ rNMP が蓄積し染色体の機能に影響を与えるかについては全く不明です。そこで、ゲノム中に取り込まれた rNMP を一塩基レベルの高解像度で検出・定量する方法を確立することで rNMP 蓄積の動態を追い、真核生物に保存された rNMP 蓄積のメカニズムの解明を行うことを目的としました。

＜支援の内容＞

本研究で、新しく開発を行った rNMP 解析シークエンス法は、１つのシークエンスライブラリから複数種のデータが産出され、これまでに行われてきた次世代シークエンスデータ解析とは異なるため、新たな rNMP 残存頻度の解析手法の確立と、それを効率よく自動解析するパイプラインの構築が必要でした。本支援では、一般に公開されているフリーの次世代シークエンサーデータ解析ツールを組み合わせるプログラム作製のアドバイス、実際のスクリプト作製の支援のほか、初期プログラムのバグへの対処などの支援を受けました。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援課題では、ゲノムに蓄積した rNMP の実際の蓄積頻度を全ゲノム領域において塩基・DNA 鎖レベルで算出することを可能にする RisCQ-Seq (Ribonucleotide scanning Competitive Quantification-sequencing) 法について、シークエンス法と解析手法の開発を行いました。現在、ゲノムに作用するタンパク質の結合やそれらの修飾状態などは、ChIP-Seq 法を中心として、標的となるゲノム DNA 領域の断片を精製･濃縮しそれらを網羅的にシークエンスすることでゲノムにおける標的因子の分布を解析する手法が中心です。しかし、ChIP-seq 様の解析法では、標的因子のゲノム上の分布の解析には有効であるものの、実際の存在量を、複数のサンプル間で比較することはできません。本課題で開発した RisCQ-seq は、ゲノム中に取込まれた rNMP 部分を酵素的に切断し、rNMP を一塩基・DNA 鎖レベルで検出するだけでなく、同時に切断されていないバックグランドとなる領域も区別して網羅的にシークエンスすることで、全ゲノム領域で rNMP とバックグランドの存在比、すなわち rNMP の検出頻度を算出することを可能にします。さらに、存在比が既知の標準 DNA_rNMP 断片を同時に混在させサンプル調製することにより、絶対的な rNMP 残存量を再現性よく推定することが可能になりました。本支援では、１サンプルから算出される(i) rNMP 検出リード、(ii) バックグランド由来のリード、(iii) 標準 DNA の rNMP リード、(iv) 標準 DNA のバックグランド由来リードの 4 種類のリードに加え、別のロットでシークエンスした(v) PCR で増幅した rNMP 検出リードを同時に処理し相互に関連させ補正した結果を得ることが可能なパイプラインの構築に成功しました。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本課題の支援によって、rNMP の絶対定量が可能になり、全ゲノムの各領域で、rNMP の除去が出来ない変異体と野生型の rNMP 量の単純な引き算による比較から、rNMP の除去修復効率を推定することが可能となり、実際に野生型の細胞が普通に増殖する際に行われているゲノム修復を全ゲノムレベルではじめて解析することが出来るようになりました。一見同じように見える二本鎖 DNA のそれぞれで異なる修復効率がみられたこと、rNMP 蓄積に特徴的な性質があり、rNMP がゲノム修復と深く関連することが示唆されています。また、rNMP の修復効率が悪い領域では、挿入・欠失変異が蓄積しやすいことも見出されました。これまでランダムに起こると考えられがちであった DNA 損傷は、細胞増殖中に必然的に起こり除去・修復されることでゲノムの恒常性を維持していること、ゲノムの特定の領域に取込まれやすく修復されにくい領域があることが明らかとなったことで、遺伝子変異や遺伝子発現に関連する DNA メチル化修飾などの研究に加えて、“ゲノムの質”の指標となる rNMP の絶対定量を通して、ゲノム領域間、細胞種間、生物種間におけるゲノムの安定性について研究を展開する礎を構築することが可能となりました。

＜支援成果公表リスト＞

飯田哲史　「二十一世紀の遺伝学」10, 9-9 (2014)

公募支援課題：2011 年度

始原的新口動物 Hox/ParaHox 遺伝子群の包括的研究

基盤研究（C）

生田 哲朗・国立研究開発法人海洋研究開発機構

＜背景・目的＞

Hox 遺伝子群は、動物に共通する前後軸に沿った体制構築とその進化に深く関わるとされている。Hox 遺伝子の染色体上の並びに従い、各遺伝子の発現領域の前方境界が前から後に並ぶ現象は空間的コリニアリティー、発現の時期が並び順に従うことは時間的コリニアリティーと呼ばれる。このような性質から、Hox 遺伝子は動物に共通の、前後軸に沿った体制の源である一方で、そのクラスター構造の変化や発現パターンの変化を通じて、動物界に形態的な多様性をもたらしたと考えられている。半索動物は棘皮動物とともに、歩帯動物として脊索動物と姉妹群を形成し、新口動物の進化を考える上で重要な位置を占める。本研究支援では、始原的な新口動物にあたる半索動物の Hox 遺伝子クラスターおよびその姉妹群である ParaHox 遺伝子クラスターの構造を明らかにし、無脊椎動物から脊椎動物へと至る形態進化の理解に有用な知見を得ることを目的とした。

＜支援の内容＞

ヒメギボシムシ（*Ptychodera flava*）の Hox および ParaHox 遺伝子群を含む計５つの BAC クローン（予め PCR によるスクリーニングで特定済み）の、サンガー法を用いたショットガンシークエンシングによる全長解読と、リードのアセンブル。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援を受けた解析により、ヒメギボシムシ（*P. flava*）の Hox および ParaHox 遺伝子クラスターの全貌が明らかになった。

Hox 遺伝子クラスターに関しては、Hox1 から Hox9/10 に属する９つの遺伝子で、その並び順、転写方向について、始原的脊索動物であるナメクジウオ（*Branchiostoma floridae*）や脊椎動物との完全な共通性が見出された。一方、最も後方のグループである Hox11/13 では、解析に使用した BAC ライブラリーには Hox11/13b が含まれていなかった。そこで当時進行中であった、ヒメギボシムシの全ゲノム解読のデータを合わせた所、Hox11/13b を含めた後方グループの構造が明らかとなった。ヒメギボシムシの後方グループの Hox 遺伝子は、棘皮動物と同様に Hox11/13a, 11/13b, 11/13c の３つから構成されていたが、並び順や転写方向は棘皮動物のものとは異なり、脊索動物との共通性も見出されず、半索動物で独自に構造が進化していることが窺われた。また、遺伝子クラスターの規模としては全体で約 450kb と、ナメクジウオのものとほぼ同じであることが分かった。

ParaHox 遺伝子クラスターに関しては、Gsx, Xlox, Cdx の３つの遺伝子の並び、転写方向ともに、ナメクジウオや脊椎動物と全く同じであることが明らかとなった。また、遺伝子クラスターの規模としては全体で約 110kb と、ナメクジウオのものより約 2 倍の大きさであることが分かった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ヒメギボシムシにおける Hox/ParaHox 遺伝子群は、遺伝子の欠失や並び替え等の少ない（intact な）クラスター構造を持つ事が分かり、脊索動物との共通祖先におけるクラスターに近い状態が保存されていると推測された。

Hox 遺伝子群においては、Hox1-9/10 までのクラスター構造に高い保存性が見られ、今後、これらの発現や機能の解析から、新口動物の共通祖先における形態形成機構との関わりが明らかになっていくものと期待される。一方で最も後方の Hox11/13 のグループでは、脊索動物とも棘皮動物とも異なる状況が確認され、脊索動物における尾部など、各分類群の後方の形態進化との関係が注目される。

ParaHox 遺伝子群においては脊索動物以外で、intact なクラスターが見つかったのは初めて（論文報告はヒトデ（*Patiria miniata*）が先となった）であり、支援外の研究から発現とのコリニアリティーも部分的に見られることが分かった。今後は、クラスター構造の保存機構やコリニアリティーの背景にある分子機構等について、脊索動物よりさらに遡った詳細な研究が望まれる。

＜支援成果公表リスト＞

Freeman et al. Curr Biol 22 (2012) 2053-8
Ikuta et al. BMC Evol Biol 13 (2013) 129

公募支援課題：2013 年度

イチジクの連続着果性を制御する花成分子機構の解明

若手研究（B）

池上 秀利・福岡県農林業総合試験場豊前分場

＜背景・目的＞

イチジク（*Ficus carica* L.）はクワ科イチジク属の低木落葉性果樹である。イチジクの花芽（花序＝果実）はリンゴ等の多くの樹種と異なり、結果の当年に分化が誘導され、かつその分化時期が春先から秋にかけて長期的に継続する。また空間的には花芽分化は当年の結果枝の下位から上位の節に向かって順に連続して進行する。以上のイチジクに特徴的な花成ならびに花芽分化のメカニズムの背景を明らかにすることは、植物花成制御の多様性に新たな視点を与えるものと考えられる。本課題ではイチジクの花芽分化と深い関連のある *FcFT1* (Ikegami et al., 2013)の発現特性が上記のメカニズムに関与しているとの仮説のもと、*FcFT1* およびそのホモログ遺伝子群の発現制御関係の概略を明らかにすることを試みた。

＜支援の内容＞

FcFT1 の発現量が変動する時系列（長日条件下 6 ポイントと暗黒条件下 6 ポイント）および空間系列（節位 3 ポイント）の計 15 サンプルについて、HiSeq2500 ペアエンド解析による RNA-seq 実施の支援を受けた。さらに当該 RNA-seq 情報に基づく相関解析やネットワーク解析等の情報解析支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

15 の葉由来の RNA サンプルから、平均約 5,300 万リード、総計約 8 億リードの RNA-seq 情報を取得した。次に時系列および空間系列のそれぞれにおいてリードのアセンブルと遺伝子予測を行い、予測された遺伝子について発現量の定量と発現量に基づいた遺伝子相互間の相関解析およびネットワーク解析を実施した。対象遺伝子カタログとして、モデル植物等で既報の花成関連遺伝子カタログと、トランスクリプトーム情報から予測された遺伝子のカタログの 2 通り（のべ 26,410 遺伝子）を作成し、解析に供試した。なお、空間系列の解析では対象サンプル数が少なく、解析の信頼性が十分でなかったため、以下では時系列のデータのみに基づいた解析結果を示した。

時系列解析系においては、*FcFT1* と極めて強い相関（＞0.9）のある遺伝子として 502 個（正 501 個、負 1 個）の遺伝子が、強い相関（0.8~0.9）のある遺伝子として 2,330 個の遺伝子（正 2,056 個、負 274 個）が見出され、上記遺伝子群には *Squamosa promoter-binding*（*SPL*）や *CONSTANS-like*（*CO*）を含む既報の花成関連遺伝子が多く含まれていた。SPL 遺伝子は齢経路における役割が知られており、その他の遺伝子のほとんどは光周期経路に関与するものであったことから、*FcFT1* が主に齢経路と光周期経路により制御されていることが推察された。また相関の強い遺伝子として *FVE*（0.71）が検出され、自律的経路の関与も想定された。

齢経路においては、*SPL* の相関が極めて強く（0.97）、*FcFT1* の齢依存的な発現が *SPL* により制御されており、このことがイチジクの連続的な花芽分化に関与している可能性が示唆された。

光周期経路においては、GI-CO-FT モジュールの保存が確認され、明期開始後早期に GI および CO の発現上昇が認められた。また、光周期反応性との関連が知られている *ATHB-16* も強い相関（0.91）を有しており、*FcFT1* の日長反応性の低さにこれらの遺伝子が関与している可能性が考えられた。

上記とは別に *FcFT1* と極めて強い相関（＞0.9）が認められ、かつ機能未知な遺伝子が 38 種類検出された。これら相関上位の遺伝子群は *FT* を介した花成制御に関わる新規の遺伝子候補として貴重な情報になると考えられる。

イチジクにおいては *FcFT1* の他に 2 つの *FT* ホモログ（*FcFT2*、*FcFT3*）がこれまでに同定されている。ネットワーク解析の結果から 3 者の制御関係が基本的に異なること、また花成関連遺伝子群との相関が *FcFT1* において他 2 者に比べてより強いことが確認されており、*FcFT1* がイチジク花成において主要な役割を持つ可能性が高いことが推察された。ただし、*FcFT2* および *FcFT3* の花成への関与を完全に排除できず、両者の機能および制御について今後更なる検討が必要である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援の結果、イチジク *FT* ファミリー遺伝子制御における主要関連経路が推定され、特に齢経路、光周期経路が *FcFT1* の発現制御に関わっていることが明らかとなった。また、今回検出された *SPL* 等の複数の遺伝子が光周期反応性等の *FcFT1* の発現特性に基づくイチジクの特徴的な花成や花芽分化様式の要因となっている可能性が示された。加えて *FT* 制御の候補因子として複数の新規遺伝子を見出すことができた。新規候補遺伝子の中にイチジク以外の種においても機能が共通しているものが含まれている可能性は高いと考えられる。本支援で得られた結果は花成制御の多様性の理解に貢献するだけでなく、植物に共通する花成機構の解明にも新たな情報をもたらすことが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2011 年度

小児交互性片麻痺の分子病態の解明

若手研究（B）

石井 敦士・福岡大学医学部・小児科学教室

＜背景・目的＞

小児交互性片麻痺（Alternating Hemiplegia of Childhood: AHC）は生後 2～3 か月ごろに異常な眼球運動で発症することが多く、続いて 6～7 か月ごろ片麻痺、又は四肢麻痺や、ジストニアが出現する。不随意運動としてジストニアや舞踏アテトーゼ運動が発作間欠期に常時現れるようになる症例もある。けいれんは 6 歳頃出現する症例が多く、強直発作や強直間代性発作を来すことが多い。これらの発作性のエピソードに伴って認知機能は低下する。最終的には重度の知的障害や麻痺の固定化による寝たきり状態に至る疾患である。血液・尿中のアミノ酸、血液・髄液に異常は見られない。また、多彩な症状や進行性の経過にも関わらず、画像上は脳病変を欠き、脳波でも発作間欠期には脳波異常を認めないことが多く、突発波はまれである。奇異な症状であるが特異的検査はなく診断は極めて困難である。生後直ちに発症し、遺伝子の関与が示唆されていたが、責任遺伝子は不明であった。その為、その分子生物学的本態はほとんど分かっておらず、根本的な治療法の開発や創薬が行えない状態であった。正確な診断、病態の解明、治療方法の開発のため、責任遺伝子の同定を目的とした。

＜支援の内容＞

責任遺伝子を同定すべく次世代シークエンサーでのエクソーム解析を実施する支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

次世代シークエンサーで全エクソーム解析を AHC 典型症例 8 名に対して行った。*De novo* 仮説を建て、マイナー・アレル頻度 0.005 未満の rare variant と中枢神経発現遺伝子をフィルターとした。一塩基置換での合計 712,558 個の全バリアント、13,517 個の遺伝子より発端者 4 人以上に共通した *CNTN4, SYEN1, ATP1A3* 遺伝子の 3 個まで絞り込みを行った。これら変異に対して *in silico* 解析を行い、何れの変異もタンパク構造に大きく変化を与える変異であった。サンガー法での発端者に対する変異確認と両親と日本人健常者 96 名に対して同変異を探索した。*CNTN4* は偽陽性、*SYEN1* の変異は健常者にみられるものがあり polymorphism と判断した。一方、*ATP1A3* は発端者 8 人全員にヘテロ接合でのミスセンス変異を認め、同変異は両親に存在しなかった。また、追加症例として孤発患者 2 名をサンガーシークエンスで解析し *de novo* でのミスセンス変異をヘテロ接合で同定した。以上より、AHC の責任遺伝子として *ATP1A3* 遺伝子を発見し報告した。

ATP1A3 遺伝子は Na+-K+ ATPase ポンプのα3 サブユニットをコードし、植物から霊長類まで高い相同性をもつ。この Na+-K+ ATPase ポンプは ATP 依存性に Na イオンを細胞外に K イオンを細胞内に取り込むことによりイオンバランスと電荷の恒常性を保つことが知られている。また、中枢神経内ではβサブユニットと結合し細胞膜に存在している。*ATP1A3* 遺伝子は 2004 年に青年期から成人で発症する Rapid onset dystonia parkinsonism (RDP)の責任遺伝子として同定されていた。RDP で同定された変異は蛋白発現量の低下によるハプロ不全をもたらすことが知られていた。

これまでに合計 52 名の AHC 患者に対して *ATP1A3* 遺伝子変異を探索し約 88%の検出となった。また、E815K 変異と D801N 変異が 70%程度占めていた。その結果、感度の高い遺伝子検査として臨床現場に提供することにより、正確な確定診断が可能となった。同定した変異の中で RDP に同定されたものと同じ変異を同定した。このことから、AHC と RDP の表現型の違いには他の修飾因子が存在することが示唆された。

また、解析患者・主治医に対して臨床症状調査を実施し *ATP1A3* 遺伝子の変異型と症状の相関を解析した。その結果、E815K 変異症例において麻痺発作、発達予後で重症であることが判明した。E815K 変異症例では 6 歳頃までの発達は他の変異と同じだが、6 歳時に多くがてんかん重積発作を起こし、この発作を契機に精神運動発達が退行することが判明した。しかし、塩酸フルナリジン投与群では、てんかん重積発作は有意に少なく、それに伴い、精神運動発達遅滞が抑制されていた。本解析結果を世界にいち早く報告した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

責任遺伝子を同定したことにより、遺伝子診断が可能となった。また、表現型解析により、特定の遺伝子型においては予後予測が可能となりった。

一方で、高い変異検出率であるが、12%の患者において変異を同定できていない為、第 2 の責任遺伝子同定を目的に、本症例に対してトリオでのエクソーム解析を実施している。また、遺伝子型と表現型の分析より、てんかん重積に注目し、エクソームデータを用いて、修飾バリアントや遺伝子を探索する。健常者 iPS 細胞に CRISPR/Cas9 により変異を導入し、*ATP1A3* 遺伝子変異の機能解析や患者変異を導入したモデル動物作成により、さらなる病態解明と有効な治療法を開発する展望が拓けた。

＜支援成果公表リスト＞

Sasaki, M. et al., Movement Disorder 29(1), 153-154 (2 014)
Heinzen, E. L. et al., Lancet Neurolpgy 13(5), 503-514 (2014).
Sasaki, M. et al., Neurology 82(6), 482-490 (2014)
Ishii, A., et al., PLOS ONE 8(2), e56120 (2013)

公募支援課題：2012 年度

小児交互性片麻痺の分子病態の解明

若手研究（B）

石井 敦士・福岡大学医学部小児科学教室

＜背景・目的＞

（家族性）片麻痺片頭痛[(Familial) Hemiplegic Migraine: (F)HM]は麻痺発作を伴う前兆のある片頭痛で、家族歴を有するものは FHM と呼ばれる。本邦での患者数は人口 100 万人あたり 1 人と稀な疾患である。確定診断は臨床所見によって行われ、血液検査、髄液検査、画像検査で特異的なものはみられない。治療ではアセタゾラミドが有効という報告があるが、抗てんかん薬の使用も報告されている。臨床症状より、本疾患は難治性小児神経疾患である小児交互性片麻痺（AHC）の類縁疾患と考えられていた。HM は通常は精神・運動発達は正常であり、他の慢性的神経症状は呈さず、AHC に比して軽症と考えられていた。しかし、近年は繰り返す発作とそれに伴う知的退行やてんかん発作を発症する症例が報告されている。急性期には、てんかん重積と意識消失を来し、頭部 MRI 画像では半球性の血管性浮腫が見られ、急性脳症に類似する点が指摘されている。

これまで、*CACNA1A*（電位依存性 P/Q 型カルシウムチャネルα1 サブユニット）、*ATP1A2*（ATP 感受性 Na/K チャネルα2 サブユニット）、*SCN1A* 遺伝子（電位依存性 Na チャネルα1 サブユニット）で変異が同定されている。近年は、乳児けいれんや運動誘発性ジスキネジアの責任遺伝子である *PRRT2* 遺伝子変異をもつ家系内での発症も報告されたが関連は不明である。しかしながら、*CACNA1A* と *ATP1A2* の 2 つの遺伝子に変異が同定されるのは約 50%であり、*SCN1A* は 7 症例だけである。その為、未だ多くの患者では遺伝子変異が同定されておらず、複雑な表現型を呈する HM での病因・病態は解明されていない。そこで、HM の責任遺伝子を同定する事を目的とした。

＜支援の内容＞

キャピラリーシークエンサーによるサンガー法で *CACNA1A*、*ATP1A2*、*SCN1A*、*PRRT2* 遺伝子に変異がみられなかった 4 症例に対してエクソーム解析で責任遺伝子を同定する支援を受けた。4 検体に対して、エクソームキャプチャーでエクソン濃縮を行い、次世代シークエンサーによりシークエンスを行った。その後、トリミング、PCR 重複除去を行い、hg19 を参照配列としてマッピングしたのち、single nucleotide variant と indel を抽出する支援を得た。

＜支援によって得られた研究成果＞

全エクソーム解析の結果、重複を除いた全バリアントは 810,689 個、全遺伝子は 12,244 個だった。新規変異かつ非アミノ酸同義置換・スプライス部位異常は 1,129 個のバリアント、1,042 個の遺伝子だった。また、この内 2 名以上に共通する遺伝子は 69 個存在した。これらに対してサンガーシークエンスにて家系内での変異分布を確認したが一致する遺伝子は同定できなかった。

次に、症例毎に寛容性の低いバリアントを求めた。コントロール群データベースとして 1000 ゲノムと ESP6500 を使用し、新規のフレームシフト、ナンセンス、インフレーム挿入・欠失、開始コドン消失、終止コドン消失、2bp のイントロンスプライシング領域、エクソン内スプライシング領域、ミスセンスバリアントを抽出した。その後、SIFT, PolyPhen-2 hvar、CADD score、phyloP score で寛容性を評価した。1 症例で、*CACNA1A* 遺伝子のインフレーム欠失（c. c.4500_4503delCTT: p.Phe1501del）が存在し、発端者と両親にキャピラリーシークエンサーでバリアントを確認した所、de novo と判断した。当初のキャピラリーシークエンスでは検出できておらず、キャピラリーシークエンサーでの偽陰性と判断した。残り 3 症例は 32、44、39 個のバリアントが候補となっているが病的変異の同定に至っていない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

次世代シークエンスによるエクソームシークエンス実施前に、キャピラリーシークエンサーでのンガー法で見られなかったバリアントを次世代シークエンサーでは検出した。該当箇所のフォワードで 17、リバースで 5 本のリードで決して高い値ではなかったが、各 1 リードのキャピラリーシークエンサーに比べて有益だと判断し、該当症例に対する次世代シークエンサーでの遺伝子パネルによるシークエンスを実施することにより偽陰性を減少させる遺伝子診断が可能となった。また、大規模なコントロール群データベースとして ExAC browser、日本人エクソームデータとして HGVD が利用可能となったため、支援によって得たデータを再度解析することにより、更に限定することが可能になると考える。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2013 年度

小児交互性片麻痺の分子病態の解明

若手研究（B）

石井 敦士・福岡大学医学部小児科学教室

＜背景・目的＞

PCDH19 関連てんかんは女性にのみに発症する稀なてんかんとして知られている。責任遺伝子である *PCDH19* 遺伝子は X 染色体に座し、患者の変異は無症状の父親由来または新生変異である。PCDH19 関連てんかんは、報告当時は女性に限定されるてんかんと精神遅滞（Epilepsy and mental retardation limited to females：EFMR）と命名され、女性のみに発症し、知的退行を有するてんかんとして知られていた。乳児期に有熱時や入浴時といった熱感受性発作で始まり、発作形式は部分発作から 2 次性全般性強直に移行し、発作は重積よりも群発することを特徴とする。その後、無熱時にも発作がみられ、抗てんかん薬に抵抗性である。多くの患者は認知発達遅滞を併発する。2009 年にオーストラリアの家系で *PCDH19* 遺伝子のヘテロ変異が報告された後、続々と変異が報告され責任遺伝子と考えられる。当初は家族性での変異同定の報告であったが、孤発発症でも変異が報告された。*PCDH19* は細胞間接着因子である protocadherin-19 をコードし、Xq22 に座している。通常 X 連鎖劣性遺伝の場合、男児が発症し女児は保因者である。また X 連鎖優性遺伝では男児は致死的で出生しない。しかし、PCDH19 関連てんかんは変異をもった男性は病型を示さず、変異をもった女性のみ発症する。エクソーム解析により、発症を修飾する要因を探索する事を目的とした。

＜支援の内容＞

3 家系のトリオに対して、ゲノム DNA に対してエクソームキャプチャーでエクソン濃縮を行い、次世代シークエンサーによりシークエンスを行った。その後、トリミング、PCR 重複除去を行い、hg19 を参照配列としてマッピングしたのち、single nucleotide variant と indel を抽出する支援を得た。

＜支援によって得られた研究成果＞

全症例でサンガーシークエンスにより確認済みの *PCDH19* 遺伝子変異をエクソーム解析データより確認できた。しかし、現時点では、遺伝形態を説明できる遺伝子の同定には至っていない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

トリオのエクソームシークエンスによるバリアントを使用し、他の健常者家系と異なるバリアントを探し、てんかん感受性のバリアントや修飾因子を探索が可能である。
また、解析終了後は患者由来の iPS 細胞を用いて、CRISPR などのゲノム編集技術により、表現型に影響を及ぼすバリアントを修正し、どのように影響するかを調べることにより病態解明や新規治療薬の開発への展望が拓ける。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2012 年度

優性遺伝型脊髄小脳変性症のハイスループット遺伝子変異探索

新学術領域研究

石川 欽也・東京医科歯科大学医学部附属病院

＜背景・目的＞

本研究の目的は、常染色体優性遺伝型の脊髄小脳変性症のうち、未だ原因が不明の病型の原因を現在の技術で最も迅速と考えられるハイスループットな手法で同定することである。我々はこれまで本邦の原因不明の優性遺伝型脊髄小脳変性症を集積し、2009 年にその 1 病型の原因を発見することが出来た。しかし未だ原因が同定されない病型(「未同定 SCA」)が全 SCA 家系の 10-20%と多数存在する。本研究では原因同定に有力な家系に絞って次世代シークエンサーと DNA マイクロアレー法を用いて原因の探索を目指した。まず家系 5 つについてマイクロアレーを用いて遺伝子変異が存在する候補染色体領域を限定ました。次に各家系から発症者 2 名ずつを選び、次世代シークエンサーを用いてエクソーム解析を行った。

その結果､1 つの家系ではその連鎖候補領域内に存在する遺伝子内に、発症者全員に共通する遺伝子異常を見出した。この遺伝子異常は種を越えて保存されている機能的に重要な部位の変化であり、コンピュータ予測の結果でも原因である可能性をサポートする結果を得た。しかし、この結果のみでは本家系の原因であると断定できないため、当該家系と臨床的に類似する家系を全国に募った。

＜支援の内容＞

全国に類似家系を募り、さらに学会報告レベルでも類似の家系を募ったところ、15 家系の集積が得られた。これらについて、平成 24 年度ゲノム支援から支援いただき、各家系から 1 名ずつエクソーム解析を行った。なお、この 15 名の中には明らかな家族歴が無い方や、同胞間発症のため、当初ターゲットとした常染色体優性遺伝とは決定できないサンプルもあった。

＜支援によって得られた研究成果＞

エクソーム解析を行った結果、15 名の内、1 名から同じ遺伝子内に異常を見出した。目下、しかし、この患者家系には明瞭な家族歴が無く、家系内での分離は、確認されなかった。また、この異常は、他の動物種では確認できる変化であり、人間に於いての異常がどの程度疾患の発症に関与するかは疑問が残った。結局、この遺伝子異常が疾患の原因であるとまでは結論つけられなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

まず、今回の支援のきっかけになった家系について、その後、他の施設と協力して家系内のすべての発症者を解析することができた。その結果、やはり当初疑った異常が疾患に寄与する変異である可能性が高まった。論文を執筆する段階で、同じ遺伝子異常が欧州より報告され、結果を確認することができたが、最初の報告をすることができなかった。現在、論文を執筆中である。

一方、他の未同定家系についても、遺伝子異常の探索を進めることができた。その結果、我々のサンプルの中から、SCA36、そして、SCA34 を発見し、それぞれ誌上報告を行った。

他にも原因未同定家系が残っており、地道に原因探索を進めることにしている。

＜支援成果公表リスト＞

1. Ozaki, K. et al., JAMA Neurol. 72, 797-805 (2015)
2. Obayashi, M. et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry. 86, 986-95 (2014).

公募支援課題：2010 年度

酵母をモデルとした機能性 RNA 探索戦略の開発

基盤研究（B）

伊藤 隆司・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

我々は、出芽酵母の完全長 cDNA 解析の結果から、既知遺伝子以外の多種多様な非コード RNA が遺伝子内および遺伝子間領域の両鎖から活発に転写されていることを見出した（Proc Natl Acad Sci USA 103(47):17846, 2006）。同様の結果は他のグループによるタイリングアレイ実験でも確認され、更に RNA-Seq によっても支持されている。したがって、ゲノムワイドな転写と多種多様な ncRNA の存在は、高等生物の特性ではなく、むしろ真核生物に共通の性質と考えるべきであることを示している。

Struhl によると、生物分子認識における識別能を考えると、ゲノムワイドにノイズ的転写が起こるのは不可避であるという(Nat. Struct. Mol. Biol. 14, 103, 2007)。識別力の高い厳密な転写装置の創成よりも、ノイズ的転写の許容の方が、進化的コストは低かったのであろう。ノイズ的転写は、それが cis に及ぼす影響や転写産物の trans 作用が一定限度を越えない限りは、存在を許される中立的なものである。そう考えると、これらの ncRNA が一般に進化的保存性が悪く、またその発現量も通常の遺伝子のそれに比較すると平均的には低いことも説明がつく。

しかし、こうした転写であっても、それがひとたび cis あるいは trans の機能を獲得すると、自然選択の対象となり、潜在的プロモータはよりソリッドなものへと進化を始めるであろう。転写されたりされなかったりする揺らぎの大きな潜在性プロモータが、より安定性の高いプロモータへと進化し、最終的には転写因子による発現制御を獲得し生理学的応答のコンテクストへと組み込まれる。つまり、転写装置がアクセスしやすいような物理化学的特性によってのみ転写されていた脆弱でノイジーな潜在性プロモータが、生物学的要請によって転写される頑強なプロモータへと進化する。この考えによれば、ゲノム中に散在する多数の潜在性プロモータ活性は、新しい遺伝子獲得におけるプロモータのリソースとしての進化的意味を持っていることになる。

この説が正しいとすると、酵母の中で機能を持たないマイコプラズマゲノム全体を人工染色体として保持させた場合でも、そこからは一定のパターンの転写が見られることが期待される。更に、その転写はヌクレオソームが存在しない領域から起こりやすいことも期待される。そこで酵母細胞中のマイコプラズマゲノムの転写の様子を転写開始点と終結点の双方を同定する RNA-PET 解析によって明らかにすることによって、この仮説を検証することを試みた。

そのために、独自の RNA-PET のプロトコルを開発して、454 を用いた予備的な RNA-PET 解析を実施したところ、マイコプラズマゲノムがランダムではなく、一定のパターンを持って転写されること、つまり非機能性の転写が相当の頻度で起こることを示す証拠を得た（図１）

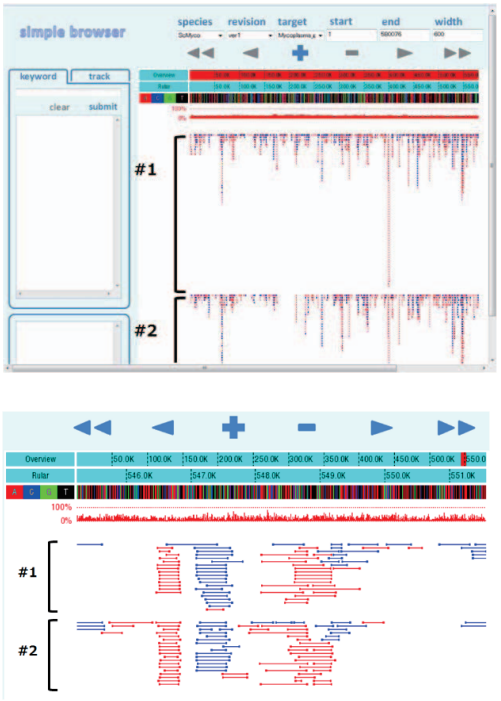


図１：RNA-PET による酵母細胞内でのマイコプラズマゲノムの転写パターン.

この結果は、非機能性の転写の基盤となるゲノム配列あるいはクロマチン構造上の特性があることを示唆する。その点を明確にすべく SOLiD によるデータ取得の支援を依頼した。

＜支援の内容＞

上記の酵母株から、SOLiD 用に RNA-PET ライブラリおよび MNase-Seq ライブラリを作成して、シーケンスを依頼した。

＜支援によって得られた研究成果＞

SOLiD のランの途中で HD が飛ぶなどのトラブルに見舞われたためか、最終的に回収されたリードの殆どが酵母ゲノムにマッピングできないという残念な結果に終わり、研究成果には結びつかなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

特になし

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題:2010 年度

原始真核生物を求めて:新奇真核微生物の形態・発現遺伝子・ミトコンドリアゲノム解析

挑戦的萌芽研究

稲垣 祐司・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

真核微生物（原生生物）の 1 グループであるディスコバ生物群に含まれる *Reclinomonas* はゲノムサイズ・遺伝子数が最大である「祖先的」ミトコンドリアゲノム（mtDNA）を持ち、真核生物の根元に最も近い可能性が示唆されている（Lang ら ***Nature*** 1997 387:493-497）。従って、*Reclinomonas* 以外にもディスコバ生物群は祖先真核生物を決定するための鍵となる生物を含むと考えられる。我々が培養株として確立した *Tsukubamonas globosa* は、光学顕微鏡観察では所属不明真核微生物であった（Yabuki ら ***J Eukaryot Microbiol*** 2011 58:319-331）。*Tsukubamonas* から 5 種の遺伝子を単離し系統解析を行った結果、この生物は①ディスコバ生物群の新奇系統であること、および②ディスコバ生物群内で *Reclinomonas* よりも早く分岐したこと示唆した。本研究では、mtDNA が他の真核生物よりも祖先的であるディスコバ生物群の新奇系統 *Tsukubamonas* の mtDNA を解読し、ディスコバ生物をはじめ他の真核生物の mtDNA との比較解析を目指した。

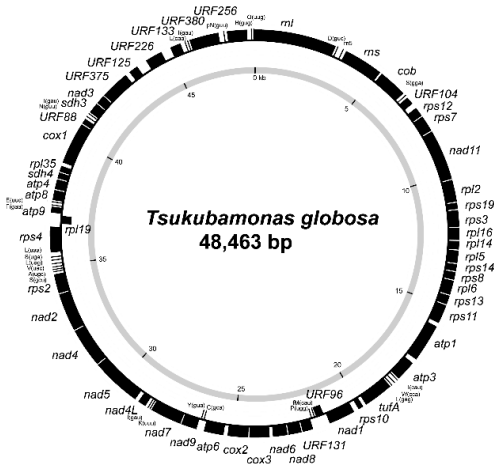
＜支援の内容＞

Tsukubamonas globosa の mtDNA 塩基配列の完全決定をめざし、同生物から精製した total DNA サンプルを鋳型に、ランダムプライマーでローリングサークル増幅（RCA）した検体、ミトコンドリア遺伝子特異的プライマーで RCA した検体をもとにライブラリーを作成した。この 2 種類のライブラリーを、454 パイロシーケンスにより全ゲノムショットガンシークエンス（WGS）した（フラグメントとペラエンド；合わせて 1/2 ラン分）。

＜支援によって得られた研究成果＞

ランダムプライマーをもちいた RCA 産物由来のライブラリーからはミトコンドリアゲノム断片は増幅されなかった。このライブラリーから得られた塩基配列はいずれも AT 含量が低く培養液に混じっているバクテリア配列であると予想された。一方ミトコンドリアゲノム特異的プライマーによる RCA 産物由来のライブラリーから得られた 10 コンティグは AT 含量が高く、典型的ミトコンドリアタンパク質をコードしていると考えられた。このミトコンドリアゲノム由来と考えられるコンティグは、合計約 40 kbp に達し、*Tsukubamonas* mtDNA の大部分の塩基配列を取得することに成功した。このデータを基盤に、我々再度 WGS を行い、mtDNA の完全解読に成功した。

その結果、*Tsukubamonas* は環状の mt ゲノムをもち、そのサイズは 48,463 塩基対と判明した。従って *T. globosa* mt ゲノムは、*R. americana* mt ゲノムについで、（既知の mt ゲノムの中では）2 番目に大きな mt ゲノムとなる。AT 含量は 66%、ゲノム全体の 90%は遺伝子コード領域と考えられた。タンパク質コード遺伝子は 52、そのうち既知のタンパク質と相同性をもつものは 42、残り 10 遺伝子は機能未知タンパク質をコードしていた。リボソーム RNA・トランスファー RNA 遺伝子は合計 29 であった。



解読された *Tsukubamonas globosa* ミトコンドリアゲノム

＜支援によって開かれた新たな展望＞

Tsukubamonas をふくむ Discoba 生物群は、ミトコンドリアゲノムの多様性が極めて大きいことが知られている。今回ディスコバ生物群の新奇系統である *Tsukubamonas* の mtDNA を決定することにより、原始真核生物を含むと考えられこの生物群内で mt ゲノム遺伝子構成がどのように変遷してきたかを推測する手がかりを得ることができた。我々が行った *Tsukubamonas* に関するの一連の研究は、Discoba 生物群内には *Tsukubamonas* や *Reclinomonas* よりも祖先的な mtDNA をもつ新奇生物種が存在する可能性を示しており、ミトコンドリアゲノムの多様性は、現在我々が把握しているよりもさらに大きい可能性を示唆している。

＜支援成果公表リスト＞

Kamikawa, R, et al. ***Genome Biology and Evolution*** 6, 306-315 (2014)

公募支援課題：2011 年度

遺伝子発現の正確性を保証する mRNA 品質管理機構

新学術領域研究

稲田 利文・東北大学大学院薬学研究科

＜背景・目的＞

終止コドンを持たない mRNA（ノンストップ mRNA）は代表的な異常 mRNA の 1 つである。細胞内には、①ORF 内でのポリ(A)鎖付加反応、②正常な mRNA が 3’末端からエキソソームによって分解される反応の中間体、③NGD (No Go Decay)における翻訳伸長阻害に依存した mRNA の分子内切断の結果生じる 5’側の断片（5’側分解中間体）、などの様々なノンストップ mRNA が存在する。これらのノンストップ mRNA がエキソソームによって 3’末端から迅速に分解されるためには、mRNA の 3’末端で停滞したリボソームが解離することが必須である。最近我々は、

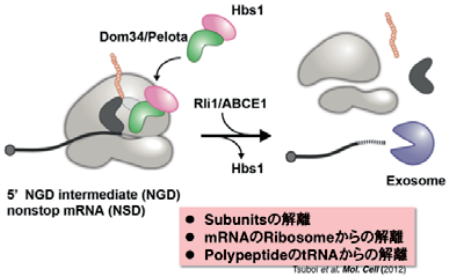


図1 Dom34:Hbs1は、ノンストップmRNAの3’末端で停滞したリボソームを解消し、エキソソームによる分解を促進する

Dom34:Hbs1 複合体が、mRNA の 3’末端で停滞したリボソームを解離し、ノンストップ mRNA の分解を促進することを明らかにした [1]。

NGD (No Go Decay)は、翻訳伸長反応が阻害された mRNA を排除する mRNA 品質管理機構である。現在までに mRNA の二次構造や連続したレアコドン、塩基性アミノ酸の連続配列が NGD を引き起こすことが報告されているが、細胞内における NGD の標的 mRNA は不明である。最近我々は、*CBP1* mRNA が NGD の内在性標的 mRNA であることを見いだした。CBP1 は核にコードされ、ミトコンドリアに輸送されるタンパク質である。*CBP1* mRNA における分子内切断には、ミトコンドリア局在化シグナル及び、652-726nt の mRNA 上の配列が必須であった。さらに CBP1 のミトコンドリア局在化シグナルと *CBP1* mRNA の 652-726nt の配列を挿入したレポーターmRNA が、分子内切断を受けることを明らかにした。以上の結果から、*CBP1* mRNA がミトコンドリアに輸送されることで分子内切断を受けると考えられ、mRNA 品質管理機構に mRNA 局在化が重要であることが強く示唆された。

mRNA 品質管理における Dom34:Hbs1 複合体の機能解析の過程で、Dom34:Hbs1 複合体欠損株においてノンストップ mRNA の 3’末端で停滞したリボソームによって新たな mRNA の分子内切断が誘起され、70-300 ヌクレオチド長の mRNA 断片のラダーが生じることを見いだした。

この各断片間の長さの違いは、リボソームによって保護される mRNA の長さと同じ 30 ヌクレオチド長であった。リボソームが結合した mRNA 領域は RNase による分解から保護されるため、結合するリボソームの数に依存して長さの異なる断片が生じると考えられる。従って、Dom34:Hbs1 複合体欠損株で安定化される短い mRNA 断片を同定することで、品質管理機構の標的となる内在性 mRNA が明らかになることが期待された。

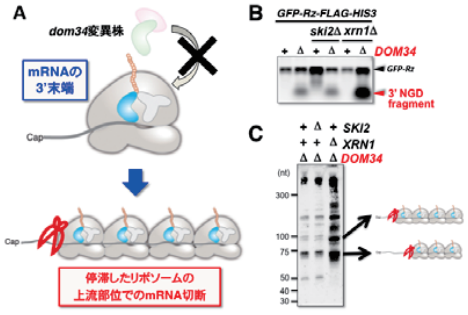


図2 Dom34:Hbs1非存在下でのmRNA内部切断

[1]Tsuboi et al., *Mol Cell*, 2012.

＜支援の内容＞

Dom34:Hbs1 複合体による品質管理機構の標的 mRNA の候補の網羅的な同定を目的に、Dom34:Hbs1 複合体欠損株に安定に存在する 100nt 長の RNA 断片を分離精製し、deep sequencing を行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られた候補 mRNA の中で、*CBP1* mRNA 同様にミトコンドリアへ局在化するタンパク質をコードする mRNA に特に注目し、NGD の有無を検証した。具体的には、3’側からの分解系に欠損を示す Ski2 欠失変異株において、NGD 産物である 5’側の切断片が同定可能か、ノーザン解析を行い NGD の内在性標的 mRNA の標的候補について検証実験を行った。その結果、NGD の内在性標的 mRNA を同定することは出来なかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

停滞したリボソーム中の RNA 断片を同定する実験条件の決定が、NGD の内在性標的 mRNA を同定するために必須であることが明らかとなり、今後の研究の重要な基盤となった。

＜支援成果公表リスト＞

Tsuboi, T. et al., *J Biol. Chem.,* 290, 16021-16030, (2015)

公募支援課題：2013 年度、2014 年度

イネの耐乾性に寄与する側根形成遺伝子の機能とネットワークの解明

基盤研究（B）

犬飼 義明・名古屋大学農学国際教育協力研究センター

＜背景・目的＞

近年、世界的な干ばつが頻発する中、根系改良による耐乾性育種が注目されている。イネの耐乾性を高める場合、側根と呼ばれる分枝根の発達を促すことが有効であり、これは側根のメリステムサイズの増大により可能となる。本研究は、イネの側根メリステムサイズの制御ネットワークを順・逆遺伝学的手法を駆使することにより明らかにし、根系形態改良のための研究基盤の確立を目的とした。

＜支援の内容＞

抽出したイネゲノム（約 390 Mbp）を平均断片長 100 bp となるように断片化し、これにリンカーを付加したゲノムライブラリーを調製し、このライブラリーを鋳型として平均 1 分子/分画となるような条件でエマルジョン PCR を行い、ゲノムビーズライブラリーとした。このライブラリーと N 末端に His タグを付加したイネの側根メリステムサイズ制御に関与する転写因子 CRL5 を大腸菌によって発現させた組換え CRL5 を用いて転写因子結合部位ハイスループット解析法、genomic systematic evolution of ligands by exponential enrichment (gSELEX) を 2 ラウンド実行した。gSELEX は、ゲノムライブラリー中に含まれる転写因子結合領域を含む DNA 断片を選択的に濃縮する手法である。これによって得られた各選択 DNA プールをゲノム支援により HiSeq による高速 DNA シークエンス解析に供して頂き、トータル約 2 Gb の配列情報を取得した。

＜支援によって得られた研究成果＞

これらの配列情報をもとに、バイオインフォマティクス解析を行ったところ、イネゲノム上に点在する幾つかのモチーフが抽出された。今後、これら結合モチーフとイネ側根メリステム形成との関連性を詳細に解析するとともに、イネ側根メリステム形成機構に関与するその他の転写因子の結合部位解析も行い、イネ側根メリステム形成機構分子ネットワークの解明、さらにはイネの転写制御機構の全貌の解明を試みる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

上記 gSELEX と本支援を組み合わせることにより、各転写因子がどの遺伝子制御にどの程度関与しているのか、ゲノムレベルで俯瞰することが可能となった。今後は以上の解析結果を総合的に捉え、側根メリステム形成機構の分子ネットワークを解析するとともに、見出された制御因子群の機能欠損、あるいは過剰発現体の表現型を精査することを通して、根系形態改良上の有用遺伝子の同定に努める。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし。今後、支援結果から得られた情報をもとに、さらなる解析を進め論文としてまとめる予定である。

公募支援課題：2010 年度

ハテナ・アレニコラの次世代シーケンスを用いた核ゲノム解析

挑戦的萌芽研究

井上 勲・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

単細胞生物 *Hatena arenicola*（以下、ハテナ）はその細胞内に共生藻を保持しているが、共生藻は細胞分裂時に２つの娘細胞のうち、片方のみに受け継がれる。この現象は、宿主と共生藻の細胞分裂が同調する前の段階だと捉えることが出来、ハテナは二次共生の初期段階にあると示唆される。故に、ハテナゲノムを解読することで二次共生初期に共生藻からどのような遺伝子が宿主ゲノムへ水平転移したのかを知ることができると期待される。しかし、現在までハテナの培養は成功していない。そこで、本研究では全ゲノム増幅試薬を用いてハテナ１細胞からどの程度、その核ゲノムを解読することができるか知ることを目的とする。

＜支援の内容＞

ハテナ１細胞（抗生物質処理済み）から全ゲノム増幅を行った 2 検体について、Roche Genome Sequencer FLX System を用いて、それぞれ 1/4 ランずつの試し読みシーケンスおよび、その後の配列アセンブルをしていただいた。シーケンスの結果、検体 1 については約 70Mb、検体 2 については、約 42Mb の塩基配列が得られた。また、アセンブルの結果、検体 1 では総コンティグ数（>1kb）579、総シングルトン数 45,704 であり、検体 2 では総コンティグ数（>1kb）257、総シングルトン数 52,256 であった。

＜支援によって得られた研究成果＞

以上の2検体について、BLASTによる相同性検索を行った結果、検体2においては目的の生物以外からのゲノムのコンタミネーションがあまりにも多く、その後の本解析には使えないと判断した。検体1については、ハテナ由来と思われる配列、共生藻由来と思われる配列が得られた。検体1について、100 bp以上の12,451配列に対してBLASTを行った結果、E値が1e-5以下の条件下で配列相同性が得られた配列の内訳は、約59%が後生動物、次いで約23%がバクテリア、約10%がウイルスとなった。ハテナが属する分類群は後生動物ではなく、ハクロビアであるが、これまでにハクロビアに属する生物のゲノム情報、トランスクリプトーム情報が得られていないため（当時）、今回のシークエンスで得られた配列の多くが後生動物にヒットしたものと考えられる。ヒットの詳細をみてみると後生動物そのものであると思われる配列はほとんどなかったので、これらの後生動物にヒットした配列はハテナ由来であると結論付けた。また、本サンプルの前処理において、培地内に複数種類の抗生物質処理を行ったにも関わらず、大量のバクテリア由来の配列が得られた。培地内の抗生物質処理では細胞内のバクテリアは完全には除けないため、細胞内のバクテリアがコンタミネーションしたか、あるいはサンプル調整途中でバクテリアのコンタミネーションがあったことが想像される。ハテナのゲノムサイズは非常に大きいことが予想されている。そのため、バクテリアのコンタミが多いと非常にたくさんのラン数が必要になる。よって、今回の検体1のシーケンス結果から少数細胞からでもハテナゲノムの解析が可能であることがわかったが、本検体はバクテリア等からのコンタミネーションが多く、検体2と同様、検体1についても本解析には使用しないこととした。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回改めて、少数の真核細胞を用いたゲノム解析が難しいことがわかった。これまでに別の研究グループからシングルセルの真核細胞をもちいたゲノム解析論文が出版されているが、この論文においても目的外生物からのゲノムのコンタミネーションが多いことがわかっている。今後は目的の生物以外からのゲノムのコンタミネーションを極力減らすことが必要である。

また、本支援の後、独自に同様の実験を行ったが、それでも検体内の目的外生物からのゲノムのコンタミネーションが認められること、全ゲノム増幅によると思われる大量の繰り返し配列が得られることなどにより、1細胞からハテナ細胞の核ゲノムを取得する計画を変更するに至った。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2010 年度

大規模 GWAS で得られた脳動脈瘤感受性遺伝子の病態への関与

基盤研究（A）

井ノ上 逸朗・国立遺伝学研究所

＜背景・目的＞

脳動脈瘤は破裂により致死性のくも膜下出血をきたす。脳卒中の死亡率は昭和 40 年以降順調に低下し、脳卒中の制圧はほぼ成功したといえるが、くも膜下出血の死亡率に限ればこの 10 年変化がなく、研究の立ち遅れが指摘されており、くも膜下出血の原因となっている脳動脈瘤発生メカニズム解明が求められている。我々の研究グループでは、脳動脈瘤における国際多施設共同研究として、症例 2,885 例、対照 23,820 例でのゲノムワイド関連解析実施し、人種を越えて脳動脈瘤形成に関与する遺伝子座を同定してきた(Bilguvar et al. Nat Genet 2008; Yasuno et al. Nat Genet 2010; Yasuno et al. PNAS 2011)。これらの成果は脳動脈瘤の発症メカニズムの解明に向けた基盤的知見となりうるものであるが、一般的なタイプの脳動脈瘤感受性遺伝子座の疾患へリスクへの寄与はオッズ比で 1.2-1.4 程度と小さいものであり、これらの知見だけでは病態に迫ることはできず、治療法開発にもつながらない。本研究では、エクソーム解析による家族性脳動脈瘤遺伝子同定を試みた。また、脳動脈瘤はその破裂・未破裂が患者の転帰に決定的な差をもたらす疾患であることから、脳動脈瘤の将来の破裂リスクと関連する分子表現型を同定することが重要であると考え、脳動脈瘤病変部位での網羅的遺伝子発現解析を行った。エクソーム解析と網羅的遺伝子発現解析結果を統合することで脳動脈瘤破裂病態の理解へとつなげる。

＜支援の内容＞

2011 年度ゲノム医科学推進支援による脳動脈瘤患者 12 検体のエクソーム解析を実施した。

＜支援によって得られた研究成果＞

Agilent SureSelect Human All Exome Kit によるターゲット領域について、depth 20 以上でのカバー率は 83.0%～85.8%、平均 depth は 93.0～118.8 であり、12 検体で安定して良質なデータが得られた。Genome Analysis Tool Kit を用いて同定した SNV（一塩基多型）数は 12 検体の平均で約 35,000 SNVs、エクソン領域の SNV は約 18,000(非同義置換が 8,500)、splice site SNV 数は約 60 であった。dbSNP に未登録の非同義置換 SNV は各検体で約 500 サイト検出された。脳動脈瘤感受性遺伝子探索には VAAST を用い、症例 12 例・対照 149 例による関連解析を行い、症例においてアミノ酸置換を伴う変異が有意に集積している遺伝子を同定した。また、破裂脳動脈瘤および未破裂脳動脈瘤病変組織を用いた網羅的遺伝子発現解析により、破裂脳動脈瘤検体は発症時年齢によって若年と高齢で異なる遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになった。若年の破裂脳動脈瘤と未破裂脳動脈瘤検体を比較することで、発現量に有意差が認められる遺伝子群を同定した。破裂脳動脈瘤で発現が上昇している遺伝子は、免疫反応やクロマチン構造やエピジェネティックな発現制御のパスウェイに関わる遺伝子が集積していること、一方、破裂脳動脈瘤で発現が減少している遺伝子は、細胞接着、細胞外マトリックスや成長調節に関わっている遺伝子が多く含まれていた。

両解析の有意性に基づき全遺伝子を序列化した上で、両者を rank aggregation 法によって統合した。上位にランクされた遺伝子について、多数サンプルを用いたターゲットリシーケンシングを行い、新たな脳動脈瘤感受性遺伝子同定に向けた研究を進めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

エクソーム解析は稀少疾患の原因変異同定に極めて有効であることが実証されてきたが、ありふれた疾患への適用例は少なかった。今回の支援課題での 12 症例のシーケンシングに加え、1000 ゲノム・プロジェクトの JPT サンプルやインハウスのエクソーム解析のデータを対照検体として用いることで、統計解析がようやく可能となった。エクソーム解析による候補遺伝子スクリーニングと病変部位での全遺伝子発現解析を統合することで、より効率よく感受性遺伝子を同定できると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

Nakaoka H, et al. Stroke. 2014; 45: 2239-2245.

公募支援課題：2011 年度

HLA アレルと強く関連する薬剤副作用の惹引分子同定と作用機序

新学術領域研究

井ノ上 逸朗・国立遺伝学研究所総合遺伝研究系

＜背景・目的＞

薬剤は時に、有害な反応（副作用）を示す場合がある。その副作用が重篤な場合には、患者が死に到る例もあることから、その機序解明は目下の急務である。特に重篤な薬剤副作用の発生により薬剤が市場から撤退すること事例もあり、個々人の遺伝的背景と薬剤副作用の関連は注目されてきた。近年、ゲノムワイドな遺伝学的関連解析の結果から、特定の薬剤副作用と HLA アリルとに非常に強い関連があることが明らかになってきた。しかしながら、どういった分子（薬剤、薬剤産物とペプチドの複合体が予測される）によって副作用が惹起されるか、かつ関与する免疫応答機序もまったく不明である。本研究では、HLA アリルと薬剤副作用に関する原因分子の同定、及び発生機序の解明を目的とする。本研究の前提ではあるが、遺伝的に HLA アレルが薬剤副作用の直接原因となっているかの検討は必要である。HLA アレルと連鎖不平衡にある変異が原因である可能性も考えられ、そのような変異の存在を領域シーケンシングで確認しなくてはいけない。HLA 領域の Exome 解析支援によって HLA アリルと薬剤副作用に関する原因分子の同定ならびに発生機序の解明が期待される。

＜支援の内容＞

Exome解析による薬剤副作用原因遺伝子検索

＜支援によって得られた研究成果＞

支援の結果、ExomeシーケンスからのHLA領域の遺伝子のアレルタイピング法を確立した。Exomeにより21,522遺伝子のエクソンが決定されるが、第6番染色体短腕上に入りするHLA領域は3.6Mbほどの領域にも関わらず、極めて遺伝子密度が高く、全遺伝子の1.14%にあたる182遺伝子が位置する。HLA領域には6個のHLAクラスI遺伝子、18個のHLAクラスII遺伝子の他、免疫系において重要な役割を果たす*MICA*、*MICB*、*TAP1*および*TAP2*などの非HLA遺伝子も多数含まれる。我々はExomeシーケンスデータから該当するreadを抽出し、IMGT/HLAデータベースによるアレル検索を行う独自のパイプラインを構築し、IMGT/HLAデータベースにアレルが登録されている28個の遺伝子(*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-DMA*、*HLA-DMB*、*HLA-DOA*、*HLA-DOB*、*HLA-DPA1*、*HLA-DPB1*、*HLA-DQA1*、*HLA-DQB1*、*HLA-DRA*、*HLA-DRB1*、*HLA-DRB3*、*HLA-DRB5*、*HLA-DRB9*、*HLA-E*、*HLA-F*、*HLA-G*、*HLA-H*、*HLA-J*、*HLA-K*、*HLA-L*、*HLA-V*、*MICA*、*MICB*、*TAP1*および*TAP2*)のタイピング法を確立した。これらの結果を既存のHLAタイピング手法であるPCR-SSOによるタイピング結果と比較したところ、*HLA-A*、*HLA-B*、*HLA-C*、*HLA-DPB1*、*HLA-DQB1*および*HLA-DRB1*の6遺伝子座それぞれについて、97.5%、90.0%、95.0%、97.5%、100%および100%の一致率を示した。タイピング結果が一致しなかったHLAアレルを精査したところ、PCR-SSOの結果ではレアまたは低頻度アレルに起因するAmbiguityが認められた。したがって、Exomeシーケンスからの HLAタイピング法は既存の手法に比べて、部分的ではあるが、相に分けられたシーケンスにより確実にHLAアレルを決定することができることが確認された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

この手法によってHLA アリルと関連する薬剤副作用原因分子の同定および発生機序の解明が期待される。加えて、100以上もの報告がある多くのHLA関連疾患の原因遺伝子同定法として新たな展望を開いた。

＜支援成果公表リスト＞

Hosomichi, K. et al., BMC Gnomics 15, 465 (2014)
Jinam, TA. et al., Hum Genet 132, 1405-11 (2013)
Hosomichi, K. et al., BMC Gnomics 14, 355 (2013)

公募支援課題：2011 年度

Wnt シグナルを介したフロアープレートによる脊椎分節機構の解析

基盤研究（C）

猪早 敬二・東京工業大学大学院生命理工学研究科

＜背景・目的＞
メダカ fu-2 は脊椎骨が融合して脊椎の分節性が失われる自然発生突然変異体である。本研究の目的は fu-2 変異体の原因遺伝子を明らかにすることである。fu-2 の原因遺伝子の同定するためにポジショナルクローニングを行ったところ、fu-2 の原因遺伝子は染色体２３番に位置していることが判明した。さらに詳細なゲノムマッピングを行ったところ、原因遺伝子があると予想される領域は染色体 23 番の末端であり、メダカゲノムデータベース上に存在しない未知の領域であることが分かった。

＜支援の内容＞
染色体２３番末端の未知の領域にマップされる複数の DNA マーカーを用いてメダカ BAC クローンライブラリーのスクリーニングを行ったところ、２つの BAC クローンを単離することに成功した。本支援では、上記の方法で単離された２つの BAC クローンと、それらに関連する２つの fosmid クローンの全シーケンス解析を依頼した。

＜支援によって得られた研究成果＞
本支援により得られたシーケンスデータを基に、メダカゲノムデータベースを再検索し、物理地図を再構築することができた。その結果、染色体２３番の末端の未知領域は少なくとも 1 Mbp 程度存在することが明らかとなった。しかしながら、染色体２３番の末端部と本支援により同定された未知の領域は結合していないため、染色体２３番の末端構造の解明には未だ至っていない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
fu-2 は fsc 変異体と全く同様の表現型を示すメダカ突然変異体である。fsc 変異体の原因遺伝子は wnt4b であり、fu-2 の原因遺伝子は Wnt シグナルに関連する遺伝子である可能性が高い。本支援により再構築された物理地図内には、Wnt シグナルに関連する遺伝子が存在しており、これらの遺伝子を fu-2 変異体の原因遺伝子の最有力候補として、今後の解析を進める予定である。

＜支援成果公表リスト＞
なし

公募支援課題：2012 年度

偽遺伝子挿入による種特異的非コード RNA 獲得に基づく遺伝子スイッチ制御の多様化

基盤研究（B）

今村 拓也・九州大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

ほ乳類における転写制御の種間多様性の理解には、複数の遺伝子発現に影響をあたえるような転写因子の違いだけではなく、各遺伝子座レベルでの違いに着目することが必須である。タンパク質をコードする領域と異なり、遺伝子発現制御領域では DNA 配列レベルの種間多様性が高いことから、例えば、プロモーターから転写され配列特異的に転写活性化を引き起こす長鎖 non-codingRNA (ncRNA)である promoter-associated ncRNA (pancRNA)の発現は、種間で多様である可能性が高い。本研究は、脳の動物種間多様性成立機構を解き明かすため、比較トランスクリプトーム解析を用いて、機能的 ncRNA クラスである pancRNA による遺伝子発現制御がさまざまなほ乳類種にわたって見られるのか（敷衍性）と、pancRNA レパートリーが種によって異なるのか(種間多様性)、という２つの問いを解くこととした。これにより、非タンパク質コード RNA (ncRNA) 獲得と機能化が近傍遺伝子の発現スイッチを多様化しうる、という独自の実験的知見が、実際にほ乳類種分化に機能してきたのか、を検証することを目的とした。

＜支援の内容＞

アカゲザル・チンパンジー・マウス・ラット由来 polyA+ RNAのDirectional RNA-seq

ライブラリー作製は支援依頼者が行った

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノムへの偽遺伝子挿入パターンは動物種毎に異なっている。本課題では、脳の動物種間多様性成立機構を解き明かすため、偽遺伝子挿入による非タンパク質コード RNA (ncRNA) 獲得と機能化が近傍遺伝子の発現スイッチを多様化しうる、という独自の発見の普遍性を検証している。ncRNA の活性には二本鎖ゲノムからの転写方向が非常に重要であり、本ゲノム支援のサポートにより、ncRNA 発現を指標とした多様なシスエレメント情報の網羅化、に大きな進展があった。

アカゲザル・チンパンジー・マウス・ラットの微量 RNA サンプルからイルミナ社 HiSeq2000 を用いた directional RNA-Seq 解析を強力に進めた。例えば、マウスとチンパンジー大脳・小脳では、いずれもゲノムの約 1%程度しか両鎖からの転写が起こっておらず、二本鎖 RNA がシスに形成される確率は低いと考えられた。一方で、タンパク質コード遺伝子の転写開始点近傍では、アンチセンス転写とセンス転写を明確に分ける「スイッチ点」が数千の座位で認められた。このような両方向性の転写を司る head-to-head 型プロモーターの９割以上は CpG アイランドを含んでおり、また、CCG リピートと CGG リピートがそれぞれプロモーター上流と下流に有意に高く存在していた。興味深いことに、組織特異的プロモーターncRNA (pancRNA) を持つタンパク質コード遺伝子は、pancRNA 発現増大にしたがい協調的に発現を増大させており、一方でハウスキーピング遺伝子には概して pancRNA が欠落していた。

さらに、ほ乳類 5 種の 5 組織を用いた比較トランスクリプトーム解析の結果、pancRNA は発現プロファイルと塩基配列の点で生物多様性が高いということ、pancRNA を持つ遺伝子は組織特異的な発現を示す傾向にあること、数百の生物種特異的 pancRNA が存在しているということが明らかになった。さらに、マウス大脳皮質特異的発現を示す pancRNA の機能解析から、実際に種特異的 pancRNA が遺伝子発現活性化に寄与し、表現型発現に結びついていることを示した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

以上より、動物種毎にそれぞれ特異的な pancRNA レパートリーが存在し、それらが共通の遺伝子発現活性化機構を駆動することで、種にしたがった遺伝子発現制御ネットワークを作り出している、という種間多様性発現機構が進化の過程で機能してきたことを提唱する。

＜支援成果公表リスト＞

Masahiro Uesaka, Osamu Nishimura, Yasuhiro Go, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata and Takuya Imamura. Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. BMC Genomics 15: 35 (2014)

公募支援課題：2013 年度

マウス初期胚エピゲノム変換に資するプロモーター非コードＲＮＡ機能の解明

挑戦的萌芽研究

今村 拓也・九州大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

核移植/iPS 細胞作製技術は家畜の効率的生産等の応用展開へのシーズであるが、両技術とも低成功率であるという大問題を抱えている。RNA は生化学的にも壊れやすい分子であり、したがって上記のゲノムリプログラミングを伴う再生関連技術が安定しないことを説明する格好の分子標的である可能性が高い。

生物の設計図とも言われるゲノム DNA には、タンパク質を作る命令を出す遺伝子の他にも、タンパク質にはならずに RNA として機能を発揮する分子群を生み出す情報がコードされている。このような RNA はノン（タンパク質）コーディング RNA あるいは非コード RNA(ncRNA)と呼ばれており、2006 年には、米国の Craig Mello 博士と Andrew Fire 博士が、短い二本鎖 RNA（＜40 塩基）による遺伝子の抑制機構である「RNAi」の発見によりノーベル医学・生理学賞を受賞している。2001 年にヒトゲノム DNA の配列解読がなされて以来、ビッグデータ解析を基礎とした大規模 RNA 解読が進行しており、その過程において、短い二本鎖 RNA 以外にも多種多様な ncRNA が見つかってきている。

本研究では、まず、次世代シーケンサー解析から一本鎖の ncRNA を同定し、バイオインフォマティクスにより統合的に mRNA 発現情報と紐付けたデータベースを構築することを第一目標とした。また、得られる ncRNA についてゲノム配列特異的エピジェネティクス変換に係る機能性を実証し、これを基礎として RNA を利用した人為操作胚の質的向上に向けて、マウス受精卵等を用いて検討した。特に、初期胚は受精後に全能性型遺伝子発現パターンを精確に再現するために配列特異性が高い分子である長鎖 ncRNA による制御機構を利用している、と予測し、それを検証することを最大の目標とした。

＜支援の内容＞

マウス初期胚由来微量サンプルからの directional RNA-seq（ノンコーディング RNA 検出・定量）

Post-bisulfite adaptor tagging 法による WGBS（ノンコーディング RNA 発現と DNA メチル化パターン形成の対応化）

ライブラリー作製は支援依頼者が行った

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援のサポートを得て、微量である受精前後のマウス初期発生胚を用いて、directional RNA-seq 解析を行ったところ、胚性遺伝子活性化時に pancRNA 群が 1000 以上の遺伝子座からパートナーとなる mRNA に共役して転写されていることが明らかになった。そのうちの代表的な 5 つの pancRNA の機能解析結果から、マウス初期発生において、pancRNA が胚性遺伝子活性化メカニズムに寄与し、パートナーとなる直下の遺伝子を配列特異的に活性化する役割を担っていることが明らかになった。

興味深いことに機能解析を深化する過程で、インターロイキンファミリーの一つである Il17d 遺伝子をパートナーとする pancRNA である pancIl17d のノックダウンが胚盤胞形成不全を引き起こすことが明らかになった。その阻害効果は IL17D タンパク質の培養液中添加によりレスキューできた。胚盤胞形成期はマウス初期発生において、初めての細胞系列分岐が起こる重要なステージであり、この細胞系列分岐によって多能性を持つ内部細胞塊と胎盤系列細胞の栄養芽層が生み出される。したがって、その制御機構の解明は発生生物学上、極めて重要な課題であり、pancIl17d ノックダウンによる細胞系列分岐への影響を解析した。pancIl17d ノックダウンにより、桑実胚期に異所性の細胞死が亢進することが示された。pancIl17d ノックダウン胚の RNA-seq 解析からは細胞死関連遺伝子に加え、栄養芽層分化と多能性細胞分化関連遺伝子発現にも異常をきたしていることが示された。さらに、内部細胞塊の培養および ES 細胞におけるノックダウン実験から、pancIl17d は細胞増殖を促進することが分かった。以上から、pancIl17d は Il17d 遺伝子を活性化することで、初期発生における細胞生存・細胞増殖・細胞運命決定に重要な役割を果たしていることが示された。

上記のメカニズムが細胞の人為操作により乱される可能性が考えられたため、PBAT 法による DNA メチローム解析を人為操作胚に適用し、その妥当性を探索した。その結果、母方由来ゲノムにおいて、受動的脱メチル化領域以外にも、受精から二細胞期までに能動的脱メチル化あるいは新規メチル化が起こりうる 39,000 領域の同定に成功した。これらの可変領域には反復配列である LTR の MERVK ファミリー属する配列が多く含まれていた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

様々な動物種から得られてきた細胞リソースを医療・農畜産応用に結びつける上で、動物種差を理解し、安全性を考慮しながら活用することが必須である。機能性 ncRNA が、遺伝子機能抑制だけでなく発生の最初期から遺伝子活性化に働くことを発見した本研究成果により、動物種を超えて遺伝子のスイッチ ON／OFF を制御する研究展開が見込まれた。

＜支援成果公表リスト＞

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura. Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. Development 142:910 (2015).

公募支援課題：2014 年度

遺伝子配列特異的エピジェネティック制御によるマウス腹内側核の機能的性差形成

新学術領域研究

今村 拓也・九州大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

げっ歯類脳性分化にはエストロジェン-エストロジェン受容体（ERα）システムとアンドロジェン-アンドロジェン受容体（AR）システムの両者が機能しているが、一方で、霊長類にはアンドロジェン-AR システムのみが存在する。申請者の研究において、腹内側核における AR の DNA メチル化制御が腹腔エストロジェン投与により変化することから、げっ歯類の場合エストロジェン-ERα システムによる脳性分化を腹内側核においてなんらかの形で受容し、並行してアンドロジェン-AR による性分化が引き続く、という 2 ステップのげっ歯類脳オス化カスケードが仮定できる。

＜支援の内容＞

マウス胎児脳特定領域由来微量サンプルからの directional RNA-seq（ノンコーディング RNA 検出・定量）

Post-bisulfite adaptor tagging 法による WGBS（ノンコーディング RNA 発現と DNA メチル化パターン形成の対応化）

ライブラリー作製は支援依頼者が行った

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究では、ほ乳類種間で共通して存在するアンドロジェン-AR による性分化に着目し、マウスアンドロジェン受容体(AR)発現の性差形成に焦点を絞り、アンドロジェンと ncRNA による細胞と細胞間連絡の可塑性の人為改変に向けて、ノンコーディング RNA(ncRNA)発現/DNA メチル化情報を指標とした腹内側核細胞群の細胞動態解析を行なっていくものである。

これまで、次世代シーケンサー解析によるアンドロジェン-AR の細胞内シグナリングを起点とする RNA 発現／DNA メチル化変化の同定、に大きな進展があった。昨年度までに樹立したアンドロジェン-AR シグナリング駆動細胞株について、AR を特異的に活性化するジヒドロテストステロンで処理したサンプルを作製し、directional RNA-seq 解析と、Post-Bisulfite Adapter-Tagging 法による DNA メチローム解析を行うことにより、一塩基レベルでのエピゲノムダイナミクスを評価した。その結果、脳性分化決定前の細胞から樹立した神経幹細胞株は、アンドロジェン-AR システムによりニューロンへの分化が抑制された一方でアストロサイトへの分化が促進することが分かってきた。興味深いことに、性腺刺激ホルモン放出ホルモンである GnRH の発現あるいは分泌を制御すると考えられる遺伝子が発現上昇することも明らかとなった。この変化は DNA メチル化変化を伴っており、アンドロジェン-AR システムはエピゲノムレベルで遺伝子発現を固定することで腹内側核を雄性化し、性に従った内分泌のための神経回路確立に寄与している可能性が考えられた。

取得した ncRNA によるエピゲノム変換能解析についても進めており、受精卵を用いたアッセイにより ncRNA が確かに DNA 脱メチル化に機能していることを見つけ、一部 Development 誌に報告し、プレスリリースを行った。このようにアンドロジェン-AR シグナルにより形成される DNA 脱メチル化領域を 659 箇所、また DNA メチル化領域を 511 箇所同定していることから、現在これらのゲノム領域の特徴を解析しているところである。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ホルモンシグナルが脳の特定領域において、エピゲノムレベルで敷衍するさまが明らかになってきたことにより、今後は ncRNA を分子標的とすることで、これまで難しいと考えられていた脳の性差の解除を後天的に実行できる分子基盤に資するはずである。

＜支援成果公表リスト＞

Nobuhiko Hamazaki, Masahiro Uesaka, Kinichi Nakashima, Kiyokazu Agata, Takuya Imamura. Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. Development 142:910 (2015).

Naoki Yamamoto, Kiyokazu Agata, Kinichi Nakashima, Takuya Imamura. Bidirectional promoters link cAMP signaling with irreversible differentiation through promoter-associated noncoding RNA(pancRNA) expression in PC12 cells. Nucleic Acids Research in press.

公募支援課題：2012 年度, 2015 年度

ストレス応答時に機能する新規核ー細胞質間輸送経路の解明によるシャペロン機能の発掘, 核ー細胞質間輸送因子 Hikeshi の機能:基礎的解析から高次生命機能の理解

最先端・次世代研究開発支援プログラム, 基盤研究（A）

今本 尚子・理化学研究所基幹研究所

＜背景・目的＞

核と細胞質が隔てられた真核細胞では、この２つのコンパートメントの間で絶え間ない情報分子の交換が行われている。このプロセスを担う核ー細胞質間輸送は遺伝子発現制御の要として、細胞が基本的に生きていく上で必須なだけでなく、その恒常性を維持し、外界の刺激に応答するうえでも不可欠である。これまで、大部分のタンパク質の核内外輸送は importin β ファミリー運搬体分子群によって担われることが明らかにされている。しかし、熱ショックをはじめとする細胞のストレス応答時には importin β ファミリー運搬体分子群が担う輸送経路の活性が低下することが知られていた。私たちは、熱ストレスをかけたときに Hikeshi と名付けた importin ファミリーに属さない新しい運搬体が担う輸送経路の駆動することを見つけた（Kose 他、Cell 2012）。

Hikeshi は熱ストレス時に分子シャペロン Hsp70s を核に運ぶ運搬体分子である。Hikeshi は低分子量 GTPaseRan を利用せずに、新しい原理の輸送を担うと考えられる。ヒト培養細胞から Hikeshi を siRNA でノックダウンすると、細胞はストレスダメージから回復せずに死滅する。Hikeshi をノックアウトしたマウスは生後 48 時間以内に死ぬ。また Hikeshi の点変異はヒト疾患を誘引する。このように、Hikeshi の活性変化は、細胞がストレス刺激を受けて生きるため重要な影響を与えると考えられる。Hikeshi の活性変化は高等動物の細胞と個体に重篤な影響を与えると考えられるが、分子シャペロン Hsp70 の核内機能は不明であり、Hikeshi の作用は具体的にわからない。Hikeshik 活性の有無で、細胞の遺伝子発現にどのような影響が見られるのかを把握することで、Hikeshi の生理機能を明らかにしていく端緒をつかみたい。

＜支援の内容＞

2012 年度 : Hikeshi の有無で、熱ストレスをかけたときに遺伝子発現が変化するかを把握するため、Hikeshi をノックダウンした細胞とノックダウンしていないコントロール細胞で、熱ストレス前、熱ストレス直後、熱ストレス解除 1.5 時間後、解除３時間後のそれぞれのタイムポイントの遺伝子発現を RNAseq で解析した。(解析には HeLa 細胞を用いた)

2015 年度: CRISPR-Cas9 ゲノム編集システムにより Hikeshi 遺伝子発現をノックアウトした HeLa 細胞を作成した。これらの細胞を用いて、2012 年度と同様に、熱ストレス応答時の遺伝子発現を RNA-seq で解析した。

＜支援によって得られた研究成果＞

2012 年度:Hikeshi をノックダウンすることで 2.9%（263,19 因子中 771 因子）の因子の発現が５倍～30 倍に上昇することがわかり、5.5%（26,319 因子中 1,454 因子）の因子の発現が 1/3～1/50 に減少することがわかった。転写因子でない Hikeshi のノックダウンで、これだけ多くの遺伝子発現に変化が見られるのは驚きである。アポトーシス、DNA 損傷に寄与する因子に変動するものが見られ、Hikeshi 機能とこれらの現象の関係ついて解析を進めている。その他に、Hikeshi をノックダウンすると、細胞老化を reinforce する複数のサイトカインの遺伝子発現が 10 倍から 30 倍上昇することがわかった。Hikeshi ノックアウトマウス胚から得た MEF 細胞の population doubling levels (PDLs)が低下すること、いくつかの組織形成に細胞老化が寄与することが報告されてきており、Hikeshi ノックアウトの phenotype が細胞老化を伴った現象である可能性を確認したい。

2015 年度：一般に、熱ストレス時には転写因子 HSF1 の活性化により、多くの熱ストレスタンパク質(HSPs)やその関連因子の発現が誘導される。今回の解析で、Hikeshi ノックアウト HeLa 細胞では、正常温度時でも HSPA1 や DNAJB1 など HSP 関連因子の発現がコントロール細胞よりもすでに発現が亢進していることがわかった。また、通常、熱ストレス時に発現誘導された HSPs は、ストレス解除後は徐々にその発現が低下するが、Hikeshi ノックアウト HeLa 細胞では、発現が亢進したままのものが多く見られた。これらの結果は、Hikeshi ノックアウト細胞では熱ストレスダメージが長時間持続していることを示唆しており、Hikeshi がタンパク質恒常性維持に重要な役割をもっていることが予想される。今後は、Hikeshi と HSF1 転写制御の関連性を分子レベルで明らかにするとともに、個体発生などにおける機能を解析していく。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

私たちがストレス時に機能する輸送因子として同定した Hikeshi は、機能未知因子としてデータベース上に登録されていた。Hikeshi が作用する分子シャペロン Hsp70 の核内機能は不明である一方で、Hikeshi ノックダウンや点変異によるその活性変化が細胞死、老化、疾患といった細胞と個体レベルの生体機能に重篤な影響を与えることがわかってきた。その分子メカニズムを明らかにする上で、今回の支援で得られた結果は貴重である。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2010 年度

パプアニューギニアの高地に住む人々の低タンパク食適応における腸内細菌叢の役割

若手研究（B）

岩瀬 忠行・東京慈恵会医科大学医学部

＜背景・目的＞

Klebsiella は、土壌や植物の根、昆虫の腸内、そしてヒトを含む哺乳類の腸内からも分離される極めて生育範囲の広いグラム陰性の通性嫌気性細菌である。*Klebsiella* の一部は窒素固定能を有し、イネ科植物の根や昆虫の腸内で窒素固定を行うことが報告されている。哺乳類の腸内においても窒素固定を行いうるかどうかは実証されていないものの、これは極めて重要な課題であると考えられ、今後の研究が期待される。

Klebsiella は病原性と有益性という２つの異なる側面を持つ医学的生物学的に興味深い細菌である。*Klebsiella* の窒素固定能に関する知見は、農学ならびに応用微生物学分野において集積しつつあるものの、ヒト由来株についてはほとんど研究がなされておらず、その詳細は明らかではない。その解明には、窒素固定遺伝子を有するヒト由来株を含む様々な由来の *Klebsiella* のゲノム情報の集積が重要になると思われる。今回得られたヒト由来株と植物由来株の２株のゲノム情報は、その情報集積へ寄与するだけでなく、得られた情報を解析することで、それぞれがどのような特徴を有しているかが明らかになるものと考えられる。そしてこれらの知見を応用することで、*Klebsiella* の持つ潜在的な２つの異なる側面、病原性と有益性を制御することが可能になるものと期待される。

＜支援の内容＞

ヒトおよび植物より分離された２株の *Klebsiella* のゲノム解読（454 のドラフト;フラグメントとペアエンド　＋Illumina による配列修正）

＜支援によって得られた研究成果＞

ヒト由来株ならびに植物由来株の両株とも窒素固定遺伝子群 *nif* cluster を有していることが明らかになった。引き続き解析を行う予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ヒト由来株と植物由来株の２株ともに、*nif* cluster を有していた。また酵素遺伝子の偽遺伝子化は認められず、全く異なる由来の *Klebsiella* であるが、窒素固定能が保存されていることが確認された。農学的生物学的には窒素固定細菌として知られ、医学的には日和見細菌として知られる *Klebsiella* について、より理解が進むと期待される。

＜支援成果公表リスト＞

窒素固定遺伝子を有する *Klebsiella* ２株のゲノム解読の結果を、DDBJ に登録した（PRJDB4172（公開）、PRJDB4173（公開））。これをもとに論文投稿を行う。

公募支援課題：2011 年度

癌幹細胞の特性維持に関わる長鎖非蛋白コード RNA の同定と新規治療標的としての検討

新学術領域研究

岩間 厚志・千葉大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

申請者は骨髄球系前駆細胞が白血病癌幹細胞にリプログラムされる際に、ポリコーム複合体の標的遺伝子が大きく変化することを見いだし、この過程に白血病原因遺伝子が直接活性化する large intergenic noncoding RNA (LincRNA) が関与するのではないかとの着想を得た。このような背景をもとに、本研究においては、白血病原因遺伝子産物によって白血病細胞特異的に転写が活性化される lincRNA をプロファイルし、白血病細胞の特性維持に果たす機能を明らかにすることを目指した。さらに、ポリコーム複合体と結合し癌遺伝子として機能する lincRNA を白血病細胞においてプロファイルし、白血病細胞の特性を規定する lincRNA の機能を明らかとし、癌幹細胞のエピジェネティクスの新領域を開拓するとともに、新規治療標的としての lincRNA の可能性を追求することを目的とした。

＜支援の内容＞

ChIP seq 5 sample, RNA-seq 2 sample

＜支援によって得られた研究成果＞

ポリコーム複合体の標的遺伝子へのリクルートは、ポリコーム蛋白と結合する long non-coding RNA (ncRNA)による経路が近年注目を集めている。このことから我々は、強い転写活性を有する白血病融合蛋白 MLL-AF9 により直接発現が誘導され、且つポリコーム複合体の白血病特異的標的遺伝子群へのリクルートに関わる long ncRNA の探索を行った。ヒト $CD34^{+}$造血幹細胞に 3xFlag-MLL-AF9 ウイルスを感染させ形質転換させた後、MLL-AF9 と H3K4me3 の ChIP-sequence 解析を行った。得られたマッピングデータから Broad Institute の Human long ncRNA catalog に基づいてタグを抽出することで、MLL-AF9 により直接制御される long ncRNA のリストアップを行った。次に、ヒト $CD34^{+}$造血幹細胞とその形質転換細胞のマイクロアレイ解析、および正常核型と MLL-AF4、MLL-AF9 染色体転座を有する白血病患者検体を用いたマイクロアレイ解析を行った。同時に、形質転換細胞より RNA-sequence 解析を行い、合わせて MLL-AF9 により発現誘導される標的 long ncRNA の同定を試みた。それぞれの解析から共通するものを抽出することで、最終的に十数個の標的候補 long ncRNA が得られた。RNA-sequence と定量 RT-PCR で候補 lincRNA の発現を検討したところ, HoxA9 や Meis1 のような MLL-AF9 の代表的な標的遺伝子と比較して、発現は全般的に低い傾向にあったが, これは lincRNA に共通した特徴であり、発現が低いながらも機能を有するものと考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

lincRNA の解析は ES 細胞などにおける解析が主に行われているが, 十分な解析が進んでいないのが現状である.。HOTAIR などの一部の lincRNA がそれぞれ単独で解析されているが, 網羅的な機能解析、特に MLL-AF9 のような癌遺伝子によって読み出される lincRNA の解析例は皆無である。上述のような準備状況をもとに, 今後は、候補 lincRNA の白血病幹細胞の特性維持における機能を, ノックダウンと強制発現解析により検証するとともに, lincRNA による白血病幹細胞における遺伝子発現制御機構の検証を通して明らかにしていきたい. 具体的には以下の解析を予定している。

1. 白血病幹細胞特異的 lincRNA 機能の検証：MLL-AF9 によって直接転写が活性化される lincRNA の中で白血病幹細胞特異的な発現パターンを持つと判断された lincRNA について, その白血病原性における機能をノックダウンの系を用いて評価する. MLL-AF9 で形質転換したヒト CD34 陽性造血前駆細胞を用い, in vitro の replating assay とともに免疫不全マウスへの移植による in vivo での白血病発症活性を検証する. また, 同様の系を用いて強制発現の効果を評価する。
2. lincRNA による白血病幹細胞特異的遺伝子発現制御機能の検証：重要性が確認された lincRNA を, 白血病幹細胞でノックダウンした際の遺伝子発現プロファイルの変化を, マイクロアレイで解析し, それぞれの lincRNA が白血病幹細胞の維持において, どのようなセットの遺伝子群の発現制御を行っているのか, またどのようなクロマチン制御分子の機能を制御するのかについて明らかにする。
3. lincRNA が制御するクロマチン制御分子の同定：重要性の示された lincRNA をベイトとして, MLL-AF9 で形質転換したヒト $CD34^{+}$造血前駆細胞における会合分子を精製し, 質量分析によって同定する. この解析により, 白血病幹細胞成立の過程において, MLL-AF9 癌遺伝子が lincRNA の発現誘導を介してどのような転写機構を駆動し標的遺伝子の発現を調節するのかを理解する。

HOXA9 や MEIS1 のような MLL-AF9 の重要な標的遺伝子の転写活性化機構の解析が詳細に行われ, 転写活性化に関わる分子群を治療標的とした様々な低分子化合物が開発されてきた。今回同定された lincRNA の中にも HOXA9 や MEIS1 に匹敵するものが存在するものと考えられ, 新規治療標的として期待される。本研究の成果は他の癌にも応用可能なものであり, 波及効果は大きいと考えられる. 以上の解析を通して, lincRNA による癌幹細胞のエピジェネティック制御という新領域を開拓するとともに, 新規治療標的としての lincRNA の可能性を検証していきたい。

＜支援成果公表リスト＞

Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C,

Yokote K, Koseki H, and Iwama A. Ezh2 augments leukemogenecity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. Blood, 120, 1107-1117, 2012.

公募支援課題：2012 年度

エピジェネティック異常による造血器腫瘍の発症機構の解明

基盤研究（A）

岩間 厚志・千葉大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

癌におけるジェネティック異常が網羅的に解析され、新規の遺伝子異常が報告される中、驚くべきことに多くのエピジェネティック制御遺伝子が遺伝子変異の標的となることが明らかになりつつある。したがって、癌の発症・進展にはエピジェネティックな制御機構の破綻が主要な因子として関与するものと考えられる。申請者らはこれまでに、ヒストン修飾を介して転写を抑制的に制御するポリコーム群複合体が造血幹細胞機能に必須であること、その機能の増強または破綻が異常造血に関与することを明らかにしてきた。このような中、ポリコーム群遺伝子 *EZH2* (7q36) の活性増強型変異がリンパ腫で、活性喪失型変異が骨髄異形成症候群 (MDS)、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) で同定され、さらに MDS、MPN では *EZH2* 遺伝子変異または-7/7q-染色体異常が *TET2* などの他の遺伝子変異と共存することが示された。したがって、*EZH2* は癌遺伝子と癌抑制遺伝子の相反する二つの機能を有すると言える。本研究では、ポリコーム群遺伝子の機能の増強または破綻が *TET2* 遺伝子変異に代表される他のエピジェネティック異常とどのように協調して造血器腫瘍の発症・進展に関わるのかを解析し、造血器腫瘍におけるエピジェネティック制御異常の意義を明らかにするとともに、得られた知見をもとに新規エピジェネティック治療法開発の可能性を追求する。

＜支援の内容＞

ChIP seq　48 sample

●mRNA/RNA seq, miRNA seq, TSS seq, RIP seq1
生物種名(和名): マウス
試料数: 6

＜支援によって得られた研究成果＞

Tet2 低発現マウスは生後早期に死亡すると報告されている事や、ニッチの構成細胞における Ezh2 と Tet2 の影響を除外する目的で、各遺伝子改変マウス由来の胎児肝の細胞を致死的照射線量の放射線照射を行った WT レシピエントマウスに移植をし、移植後 4 週に *Ezh2* を欠損させる目的でタモキシフェンと投与し、血液学的な表現系の観察を行った。長期間の観察中に *Ezh2* 欠損マウスは MDS/MPN 様の病態をきたし、10 ヶ月以内に半数が死亡した。これらのマウスは、MPN の特徴とした髄外造血を伴った脾腫、MDS の特徴とした骨髄中の赤芽球のアポトーシスに起因した貧血を呈した。一方、驚くべきことに、*Ezh2* 欠損マウスと *Tet2* 低発現マウスとのコンパウンドマウスは、MDS/MPN だけでなく MDS 様の病態もきたし、全マウスが 10 ヶ月以内に肺炎で死亡した。MDS/MPN を発症したコンパウンドマウスは、髄外造血を伴った脾腫や単球の増加といった MPN の特徴を示す方で、MDS を発症したコンパウンドマウスは、これらの MPN の特徴を有さなかった。また、MDS/MPN 並びに MDS を発症したコンパウンドマウスは、骨髄中の赤芽球のアポトーシスの亢進に起因した貧血、好中球の偽ペルゲル核異常や核の過分葉といった異形成を MDS の特徴として示した。

DNA マイクロアレイの結果を用いて、gene set enrichment analysis (GSEA)を行ったところ、*Ezh2* 欠損マウスと MDS/MPN および MDS を発症したコンパウンドマウスの Lineage$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ (LSK)細胞において、Myc module が有意に正に enrichment していた。また、予想通り、polycomb repressive complex 2 (PRC2) 遺伝子セット (Ezh2 標的遺伝子セットと Ezh1 標的遺伝子セット)は *Ezh2* 欠損マウスとコンパウンドマウスの LSK 細胞で共に正に enrichment していた。一方で、注目すべき事に、コンパウンドマウスが MDS/MPN 並びに MDS を発症させる過程で、Ezh1 の標的遺伝子セットは負に enrichment していた。クロマチン免疫沈降シーケンシングと DNA マイクロアレイの結果からは、*Ezh2* の欠損により直接的な PcG 複合体の標的癌遺伝子群の発現抑制が解除されることが確認された。その一方で、Ezh1 による代償作用で homeobox, paired-box, T-box, forkhead, Gata 遺伝子ファミリー、zink finger DNA 結合タンパクなどの典型的な発生・分化制御遺伝子の転写抑制が維持されることが確認された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

以上の解析から、MDS の発症に *Ezh2* は癌抑制遺伝子として機能するとともに、*Tet2* 遺伝子変異など共存する他の遺伝子変異と協調して機能する事が明らかとなった。

＜支援成果公表リスト＞

Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, and Iwama A. Concurrent loss of *Ezh2* and *Tet2* cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. **J Exp Med**, 210:2627-2639, 2013.

公募支援課題：2013 年度

エピジェネティック異常による造血器腫瘍の発症機構の解明

基盤研究（A）

岩間 厚志・千葉大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

癌におけるジェネティック異常が網羅的に解析され、新規の遺伝子異常が報告される中、多くのエピジェネティック制御遺伝子が遺伝子変異の標的となることが明らかになりつつある。したがって、癌の発症・進展にはエピジェネティックな制御機構の破綻が主要な因子として関与するものと考えられる。申請者らは、昨年度本ゲノム支援を受けて、ポリコーム群遺伝子 *EZH2* 遺伝子欠損マウスと DNA 脱メチル化過程を触媒する *TET2* 遺伝子ノックダウンマウスを用いて、*EZH2* と *TET2* の活性喪失型変異が骨髄異形成症候群 (MDS)、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の病態形成にどのように関与するのかについて解析を行った。その結果、Ezh2 の欠損により H3K27me3 レベルがゲノムワイドに低下しきわめて多くの遺伝子の発現が亢進すること、一方で、一部の分化関連遺伝子や癌抑制遺伝子は Ezh1 の代償的な機能により H3K27me3 が保持され、遺伝子抑制が維持されることを明らかにした。本研究では、Ezh2 の欠損にともなう病態形成の過程におけるエピゲノムと付加的なゲノム異常を経時的に解析し、MDS, MPN 発症に至るゲノム・エピゲノム異常の進展様式を理解する。

＜支援の内容＞

ChIP-seq 解析 12 sample、RNA-seq 解析 4 sample

＜支援によって得られた研究成果＞

Tet2 低発現と *Ezh2* コンディショナルノックアウトのコンパウンドマウス (*Tet2*$^{KD/KD}$*Ezh2*$^{fl/fl}$) の系を確立し、*Tet2* 変異に続いて *Ezh2* 欠損を導入すると、マウスは血球の異形成と無効造血に起因した貧血を呈し、*Ezh2* 単独欠損と比べ早期に MDS 様の疾患を発症することが明らかとなった (**J Exp Med** 2013)。その後の研究において、*Tet2*$^{KD/KD}$*Ezh2*$^{\Delta/\Delta}$ MDS マウスおよび *Tet2*$^{KD/KD}$、*Ezh2*$^{\Delta/\Delta}$ マウスの造血幹・前駆細胞を用いた RRBS による DNA メチル化解析を行い、Tet2 を欠損するとエンハンサー領域の DNA メチル化が特異的に亢進することを確認した。このような DNA メチル化の亢進は加齢に伴って生じるものと想定されているが、その詳細はいまだ不明である。一方、 *Ezh2* 欠損により造血幹･前駆細胞において Ezh2 標的遺伝子群の発現の脱抑制（活性化）が見られたが、興味深いことに、癌抑制遺伝子群や発生・分化制御遺伝子など、細胞の増殖・未分化性維持に重要な遺伝子群の発現は抑制が維持されていた。ChIP-seq 解析により *Ezh2* 欠損による H3K27me3 の変化を経時的に観察したところ、特に活性化マーカーである H3K4me3 と H3K27me3 が共存する Bivalent 遺伝子群において、一旦減少した H3K27me3 が Ezh2 と同様の酵素活性を持つ Ezh1 によって有意に回復することが明らかとなった。このように高齢者に多い MDS の発症には広範なエピゲノム異常（リプログラミング）が関与するが、この異常が加齢造血幹細胞のエピゲノム特性にどのように依存するのかは不明である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

上述の結果から、生理的加齢に伴う造血幹細胞のエピゲノム変化の造血器腫瘍発症における病因論的意義が重要ではないかという仮説に至った。加齢造血幹細胞のエピゲノムデータと、Tet2 および Ezh2 の機能異常に起因するエピゲノム変化とを比較検討することで、この点が明らかになることが期待される。また、このような解析を通して、造血幹細胞の加齢変化により誘導される造血器腫瘍の発症リスクを増大させるようなエピゲノム要因を抽出・同定することが可能ではないかと考えられる。この加齢に伴う腫瘍化を規定するエピゲノム要因を同定できれば、造血器腫瘍の発症予防や新規治療法の開発につながることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H and Iwama A. The Tif1β-Hp1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. **Stem Cell Reports** 2:145-152, 2014.

Mishima Y, Wang C, Miyagi S, Saraya A, Hosokawa H, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Koide S, Negishi M, Sashida G, Naito T, Ishikura T, Onodera A, Nakayama T, Tenen DG, Yamaguchi N, Koseki H, Taniuchi I, and Iwama A. Histone acetylation mediated by Brd1/Brpf2 is crucial for *Cd8* gene activation during early thymocyte development. **Nat Commun** 5:5872, 2014.

Oshima M, Hasegawa N, Mochizuki-Kashio M, Muto T, Miyagi S, Koide S, Yabata S, Wendt G, Saraya A, Wang C, Shimoda K, Suzuki Y, Iwama A. Ezh2 regulates the Lin28/let-7 pathway to restrict activation of fetal gene signature in adult hematopoietic stem cells. **Exp Hematol** 2015 in press.

公募支援課題：2015 年度

極限貧栄養環境下で増殖する細胞の創出

基盤研究（C）

イン ベイウェン・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

生物進化の理論の検証や新しい分子機構の解明に実験進化のアプローチが用いられるようになった。実験進化とは、実験室内において厳密に定められた環境下で、細胞の経代培養を行い、その細胞集団の日々の変化（たとえば、増殖速度）を定量的に観測し、数百から数万世代を経たあと、進化前後の遺伝子型と表現型（ゲノム配列、遺伝子発現、適応度など）を解析し、適応進化に関わる既存理論の検証、または新規メカニズムの提案を目指すものである。また、分子生物学的には、表現型の変化がゲノム変異や分子機構の発見に直接に関連付けられる。

実験進化の研究では、ある特定の環境ストレスを細胞に与えて、増殖が速くなるプロセスを注目することがほとんどである。しかし、自然環境条件下での進化は必ずしも単一なストレスへの適応ではない。そこで、我々は厳しい自然界で生きる微生物の生存戦略を注目し、実験室内で、栄養源の枯渇と緩和を繰り返す自然環境を疑似し、大腸菌に対する自然選択を行った。その結果、進化過程を経た大腸菌集団が飢餓に強い耐性の獲得と引き換えに、富栄養下での適応度が下がった。つまり、適応進化の結果、増殖の遅い表現型が選ばれた。これは従来の進化実験で増殖の速い表現型が生き残るという結果と間逆な現象であり、自然界での微生物のほとんどが休眠状態にいることを支持する結果となった。

以上、該当進化実験は「環境が良くなると、逆に不都合になる」という極めて興味深い現象が得られているため、その過程におけるゲノムの変化を詳しく解析することが、「適応進化とは何か」に新規的な発見に繋ぐ。そこで、本支援プログラムにおける高精度の解析により、実際の進化過程おけるゲノムの動態変化が実験レベルで捉えられる。詳細なゲノム配列解析により、進化過程における集団ヘテロ性やゲノム構造レベルでの評価が期待できる。

＜支援の内容＞

実験進化により得られた極小栄養環境下でも増殖できる大腸菌の全ゲノム再シーケンスが行われた。具体的には、合計 22 大腸菌集団の精製ゲノム（検体）に対して、Nextera によるライブラリーを調整し（TruSeq PCR フリーDNA サンプル調整）、次世代シーケンサーMiSeq (Illumina)を用いた Paired-End Sequencing（300 bp×2、100×以上）を実施した（九州大・林グループ）。

＜支援によって得られた研究成果＞

進化実験に獲得されたすべての大腸菌集団に対したゲノムリシーケンスの結果、スローライフを営むようになった大腸菌の遺伝子型がどう変わっているのか、極小栄養環境下で進化戦略に普遍性があるのかを明らかにするためのゲノム変異情報が得られている。

初歩的な解析結果であるが、極小栄養条件下での適応進化では、複数生存戦略が見られている。主に、RNA の分解を特化した進化戦略と翻訳を抑制する生存戦略が示唆された。特に、制御因子を潰すためのゲノム変異が多数みられ、複数進化過程に共通する変異が確認された。今後、これらの変異の遺伝子機能の確認に伴い、ゲノム変異蓄積のダイナミクスを詳細に調べる。省エネ的な生き残り戦略を解明し、生命の持続性や環境微生物生態の理解に有益なヒントを与える。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援により、大腸菌実験進化のゲノム変動ダイナミクスの詳細が明らかとなり、研究全体を新たに下記三つの課題に展開することができる。

① ゲノム進化のダイナミクスとその普遍性

高精度ゲノム配列解析により、変異蓄積やゲノム構造変化のダイナミクスを明らかにする。分子進化の観点とゲノム構造変化の視点から、増えにくくなる進化過程における進化のメカニズムを議論する。これまでに検証されてきた進化理論は、増殖速度の上昇の過程におけるものがほとんどだが。本支援プログラムの結果によっては、新たな進化機構を提案することが可能となり、異なる適応度条件下でのゲノム進化の普遍性の検証となる。

② 極限環境微生物の生存機構の解明

ゲノム構造変化の同定と分子生物学的検証により、低下する増殖速度と極限厳しい環境下での生存戦略の関係を明らかにし、その分子機構と数理学的原理の解明に繋ぐ。実験室条件で扱いにくい“休眠細胞”の生物学的理解に寄与する。

③ 自然進化ゲノムと実験進化ゲノムの比較

ゲノム情報データバンクから、環境微生物の情報と比較する。また、これまでに行われている適応度上昇の実験進化のゲノム配列情報も取り入れ、ゲノム進化の特徴を抽出する。自然進化と実験進化を比較することにより、生物情報科学的法則を見出す。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2014 年度

ウイルス・宿主共存機構：宿主個体群構造ダイナミクスの生理生態学的・数理学的解析

基盤研究（B）

植木 尚子・岡山大学資源植物科学研究所

＜背景・目的＞

ウイルスは、自己複製過程で宿主の生理機能を妨げ、多くの場合死滅させる一方で、ウイルスの種としての存続には宿主の存続が不可欠である。このような逆説的な関係にあるウイルスと宿主の共存はいかにして可能となるのか？本研究では、赤潮原因藻ヘテロシグマとそのウイルスをモデルとして、**ウイルスの宿主感染過程の分子細胞レベルでの解析**と、その結果に基づいた**個体群感染過程の数理学的解析**により、**ウイルス・宿主共存機構の解明**をめざす。自然環境中では、死滅型、非感染型、排除型、潜在型といった異なる感染型を持つヘテロシグマ株が個体群を形成し、ウイルスはその**混合個体群**に感染する。このような混合個体群が宿主・ウイルス共存に果たす役割を検証するために、各感染型宿主のウイルス感染過程の生理学的解析を行い、その情報に基づいて、混合個体群へのウイルス感染過程の数理モデルを構築する。本研究は宿主・ウイルスの生理生態と環境中における個体群としての動態の関係を解明する上で重要な知見を与える。

＜支援の内容＞

本研究計画には、ヘテロシグマ混合個体群中の各株識別法を確立が不可欠である。そこで、遺伝子バーコード配列選定を目的として、*HaV*に対して異なる感染形質を示すヘテロシグマ 5 系統の葉緑体ゲノム配列(総塩基数~160 kb)解読の支援を依頼した

＜支援によって得られた研究成果＞

葉緑体ゲノムを効率的に解読するために、ヘテロシグマ 5 系統（国内由来 5 系統：H93616, *Ha*Fk01, *Ha*00-17, *Ha*GS95, *Ha*Tj01 カナダ・British Columbia 州由来 1 系統: NEPCC522）より葉緑体を回収した上で、DNA を抽出し、Illumina HiSeq によりリードを取得し、アセンブルを行った。得られたコンティグ配列について BLAST 検索したところ、系統によっては葉緑体ゲノム配列よりもミトコンドリアゲノム配列由来のより長いコンティグが得られたことがわかった。さらに、すでに解読されているヘテロシグマ葉緑体ゲノム配列に得られたリードをマップしたところ、葉緑体ゲノム配列中でも、特に AT 含有率の高い配列がコンティグとしてアセンブルされなかったことが明らかとなった。ミトコンドリアゲノム配列上には、葉緑体ゲノム上には見られた AT 含有率の高い配列は見られないこと、また、ミトコンドリア由来のコンティグも十分に得られたことから、最初の計画を変更して、ミトコンドリアゲノム配列の解読を行うこととした。そこで、すでに解読がなされているヘテロシグマ CCMP452 系統をレファレンスとして、得られたコンディグ配列をマップし、リードが十分得られなかった部分については PCR による増幅を行ったのちに配列をサンガー法により解読し、6 系統中 5 系統(H93616, *Ha*Fk01, *Ha*GS95, *Ha*Tj01, NEPCC522) のミトコンドリアゲノム全長配列および *Ha*00-17 の部分配列を決定した。

全配列を解読した 5 系統と、部分配列の解読が完了した 1 系統、およびレファレンス系統間のアラインメントを行い、比較的相同性が低い部分を探したところ、4 つのセグメントを見出した。しかしながら、この 4 つのセグメントにおいては、*Ha*Fk01, *Ha*00-17, *Ha*Tj01, NEPCC522 系統のうち 5 系統は識別が可能なバリエーションを見出したが、H93616・*Ha*GS95 の 2 系統については、全く同一配列であった。さらに詳しく調べたところ、この識別困難な 2 配列のうち、レファレンス 34655 相当の残基について、他の 5 系統全てが T を持つところで *Ha*GS95 は G を有することがわかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、ミトコンドリア配列を利用することで、ヘテロシグマ 6 系統全ての識別が可能となった。本研究では、ヘテロシグマを宿主とする DNA ウイルスによる感染に際して異なる反応を示す株として、この 6 系統を選択した。つまり、ウイルス・宿主間の相関を個体群のレベルで解析することを目的として受けた支援であったが、その後、例えば、これら 6 系統の鉄イオン要求性が異なることが明らかとなった。海水中の鉄イオン濃度の変化は、赤潮の発生要因の一つとされているが、ヘテロシグマは赤潮原因藻の一種であり、ヘテロシグマ赤潮の発生のしやすさが、鉄イオン濃度とともに、生息しているヘテロシグマ系統の鉄要求性に依存する可能性がある。このように、ウイルス感染に限らず、環境中におけるヘテロシグマの挙動を理解するための研究を行っていく上で、本支援によって可能となった系統の識別は非常に重要な知見をもたらす可能性が高いと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

ヘテロシグマ 5 系統のミトコンドリアゲノム配列とその相違について述べる論文を現在執筆中。

公募支援課題：2015 年度

大型二本鎖 DNA ウイルス：多因子・多層制御による宿主感染機序の理解を目指して

新学術領域研究

植木 尚子・岡山大学資源植物科学研究所

＜背景・目的＞

当研究は、*Mimivirus* や *Chlorovirus* の例が知られる大型二本鎖 DNA ウイルス(Giant dsDNA virus, 以下 G-DNAV)の感染機序の理解を目的とする。G-DNAV は、300-kb~1.2-Mb というウイルスとしては巨大な dsDNA をゲノムとする。ゲノム上には数百の ORF と共に、長い遺伝子間領域、さらに 10 種類以上の tRNA コード領域等、新奇な特徴が見られる。また、G-DNAV 遺伝子の相当数は、感染と宿主の死滅には必要とされないことが知られている。古典的には、ウイルスとは、小さなゲノムに限られた数の遺伝子を持ち、それらをフル活用することで宿主細胞機構を利用して感染・増殖を果たす『半生命体』とされてきた。G-DNAV は、この理解に相反するかのような存在といえる。当研究は、G-DNAV の 3 大特徴—多数の遺伝子､発現制御領域として機能可能な長い遺伝子間領域配列、ウイルス tRNA—によるウイルス生活環制御機構の解明を目指す。

＜支援の内容＞

(1) 異なる感染型宿主における *HaV* 感染過程における mRNA の解析

ヘテロシグマは、*HaV* 感染に対する反応の違いから、溶藻型・排除型・潜在型に分類できる。これらの特徴を持つ株のウイルス感染過程における遺伝子発現パターンの違いの比較解析（図 3 中 9 つのサンプルから溶藻型溶藻後を除く）を行う。*HaV* に近縁である *PBCV1* 遺伝子は、polyA を持つ mRNA として生合成されることが知られている。そこで、*HaV* 感染宿主から精製した mRNA 配列情報を得ることで、*HaV* 発現遺伝子の配列及び発現量に関する情報を得る。

上記の実験からは二つの重要な知見が得られる。まず、各々の宿主株の異なる感染ステージにおける *HaV*・宿主の遺伝子発現量の時系列比較により、各ステージに必要とされる発現遺伝子を絞り込む。また、*HaV*・宿主の遺伝子発現量を異なる感染型を持つ宿主間で比較することで、各宿主感染型を決定する *HaV*・宿主因子候補の絞り込みが可能となる。この際、特に異なる宿主間・感染ステージにおける *HaV* 遺伝子の splicing variants の存在に特に注意を払う。さらに、各々のサンプルの発現配列情報は、*HaV*・宿主ゲノム配列のアノテーションに利用する。(理想的にはウイルス・宿主双方の発現 mRNA 情報の取得を希望する。この解析で宿主由来 mRNA 既に完了した宿主 RNAseq による情報とともに、ゲノム上の遺伝子アノテーションに利用可能と考える。あまりに多くのリード数が必要とされる等の問題がある場合には、特に *HaV* 発現遺伝子についての情報を優先して得ることを希望する。)

(2) tRNA 発現量の比較

HaV ゲノム配列の特徴の一つとして、十数種の tRNA 配列の存在が上げられる。このようなウイルス tRNA の存在は、他の大型 dsDNA ウイルスでも確認されているが、その感染過程における役割についての研究は例がない。そこで、感染過程において発現するウイルス及び宿主の tRNA の解析を希望する。tRNA の塩基数は 73～93 nt であるため、市販のキットを用いて small RNA(<200nt)を分画し、この small RNA プールを RNAseq する。既に *HaV* ゲノム配列情報を有することから、*HaV* 感染過程におけるウイルス由来 tRNA を同定し、さらに宿主由来 tRNA との割合をアンチコドン配列別に計算し、ウイルス tRNA による感染促進の可能性を検証する。

＜支援によって得られた研究成果＞

本原稿を執筆している H28 年 1 月半現在、支援班による解読が進行中でありる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援によって、未だに謎の多い新奇なウイルスである大型二本鎖 DNA ウイルスの感染過程についての重要な知見が得られると期待できる。

公募支援課題：2012 年度

ＳＪＳ／ＴＥＮの発症機序解明および発症予測に向けた先駆的研究

基盤研究（Ｂ）

上田 真由美・京都府立医科大学感覚器未来医療学

＜背景・目的＞

我々は、重篤な粘膜障害を伴う感冒薬関連 Stevens-Johnson 症候群（SJS）/中毒性表皮壊死症（TEN）では、HLA-A*0206 と強い関連を認める事、また、重篤な粘膜障害あり患者となし患者では、関連する HLA が異なることを報告した。今回、重篤な粘膜障害を伴う感冒薬関連 SJS/ TEN 患者を対象に、ゲノム全域関連解析を実施することを目的にゲノム支援を受けた。

＜支援の内容＞

GWAS1

試料数: 390

プラットフォーム: affymetrix Axiom

＜支援によって得られた研究成果＞

日本人感冒薬関連 SJS/TEN 患者 117 人、日本人コントロール 691 人を対象に、Affymetrix 社の AXIOM ASI Array を用いてゲノム全域関連解析を実施した。AXIOM ASI Array により $P<10^{-3}$ の関連が認められた HLA 領域以外の SNPs については、DigiTag2 法を用いてタイピング結果を検証した。また、新規の日本人（患者 16 人、コントロール 188 人）、韓国人サンプル（患者 27 人、コントロール 90 人）、を用いて、TaqMan 法で replication 解析を行った。有意な関連を認めた遺伝子多型については、インド人ならびにブラジル人サンプルを用いて検証を行った。さらに、末梢血単核球における遺伝子発現を解析した。

全ゲノム関連解析では、HLA 領域以外で $P<10^{-3}$ の関連を示した SNPs は、60 存在した。$P<10^{-5}$ を示す 10SNPs について replication 解析を行ったところ、追加の日本人サンプルでは有意な差をみとめる SNP はなかったが、9SNPs において同じ傾向を示した。韓国人サンプルの解析では、IKZF1 遺伝子多型と有意な関連を認めた。また、さらにインド人、ブラジル人でも同様の傾向を認め、日本人、韓国人、インド人、ブラジル人のメタ解析では $p=8.5\times10^{-11}$ の有意な関連を認めた。重篤な粘膜障害を伴う感冒薬関連 SJS/TEN 発症には IKZF1 遺伝子多型が関連していると考えらえる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

重篤な粘膜障害を伴う感冒薬関連 Stevens-Johnson 症候群（SJS）/中毒性表皮壊死症（TEN）の新規疾患関連遺伝子 IKZF1 が見つかり、本疾患の病態解明がさらに進行することが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

論文

Ueta M, Sawai H, Sotozono C, Hitomi Y, Kaniwa N, Kim MK, Seo KY, Yoon KC, Joo CK, Kannabiran C, Wakamatsu TH, Sangwan V, Rathi V, Basu S, Ozeki T, Mushiroda T, Sugiyama E, Maekawa K, Nakamura R, Aihara M, Matsunaga K, Sekine A, Gomes JAP, Hamuro J, Saito Y, Kubo M, Kinoshita S, Tokunaga K. New Susceptibility Gene, *IKZF1*, for Cold Medicine–Related Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis with Severe Mucosal Involvements. *J Allergy Clin Immunol. 2015 Jun;135(6):1538-1545.e17.*

学会発表

１．Mayumi Ueta, Hiromi Sawai, Chie Sotozono, Yuki Hitomi, Nahoko Kaniwa, Mee Kum Kim, Kyoung Yul Seo, Kyung-Chul Yoon, Choun-Ki Joo, Chitra Kannabiran, Tais Hitomi Wakamatsu, Virender Sangwan, Varsha Rathi, Sayan Basu, Takeshi Ozeki, Taisei Mushiroda, Emiko Sugiyama, Keiko Maekawa, Ryosuke Nakamura, Michiko Aihara, Kayoko Matsunaga, Akihiro Sekine, José Álvaro Pereira Gomes , Junji Hamuro, Yoshiro Saito, Michiaki Kubo, Shigeru Kinoshita, Katsushi Tokunaga. New Susceptibility Gene IKZF1 for Cold Medicine–Related Stevens-Johnson Syndrome/Toxic Epidermal Necrolysis with Severe Mucosal Involvement. The American Society of Human Genetics (ASHG) 2014, San Diego, CA, USA. Oct 21, 2014.

２．Hiromi Sawai, Mayumi Ueta, Yuki Hitomi, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita, Katsushi Tokunaga. Search for new risk gene for Stevens-Johnson Syndrome independent of *HLA* risk allele. The American Society of Human Genetics (ASHG) 2014, San Diego, CA, USA. Oct 21, 2014.

公募支援課題：2011-2012 年度

細胞形態・運動を基盤とした器官形成のロジック

新学術領域研究

上野 直人・基礎生物学研究所形態形成研究部門

＜背景・目的＞
近年、その生物学的意義が注目されている「胚発生における力学刺激」に着目し、とくに力学刺激による遺伝子発現調節機構に関する研究を着想した。アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の胚組織を用いて力学刺激実験を実施し、胚に発生する力の分布や強度について新しい知見を得ることができたが、この力学応答経路を解明するにはアフリカツメガエルゲノム解読および RNA-seq による大規模遺伝子発現解析は必須であった。ゲノム支援によりアフリカツメガエルゲノムの情報整備を行うことによって、ツメガエルをモデルとする生命科学を飛躍的に進展させるため、ゲノムの完全解読を行うことを目的とした。

＜支援の内容＞
1. BAC ライブラリーの作製：純系の J-strain♀の血液より DNA の精製、制限酵素 HindIII で処理し、ベクターに組み込む。
2. Fosmid ライブラリーの作製：純系の J-strain♀の DNA をランダムに切断しベクターに組み込む。
3. BAC クローンおよび Fosmid クローンの両端を ABI キャピラリーシーケンサーで決定する。
4. 追加で読まれている米国 JGI のショットガンシーケンスデータと本研究による BAC および Fosmid 両端シーケンスデータを SOAPdenovo でアセンブルする。
5. BAC クローンを用いて FISH 解析を行う。
6. BAC クローンを数十個選び全長配列決定を行う。
7. J-strain の各発生段階、臓器について RNA-seq 解析を行う。
8. 得られた情報をもとにしたゲノムブラウザを作成する。

＜支援によって得られた研究成果＞
アフリカツメガエルの純系 J-strain メスの血液より採取した DNA から BAC ライブラリーを作成し、134,400 クローン（268,800 リード）の解読を完了した。約 136,000 のスキャフォールドが得られ、その平均長は約 20 kb であった。3 種類のアセンブラーによるアラインメントの結果、70～80%が上記スキャフォールドにマップされた。アセンブリが困難である領域に関しては full-length BAC sequencing を行い、候補領域の選出をおこなった。各スキャフォールドにマップされた BAC クローンを用いて、マルチカラーFISH による染色体へのマッピングした。さらに、SacI-BAC ライブラリーのギャップを補完する目的で HindIII-BAC ライブラリーを作成し、19,200 クローンの解読を完了した。加えて Fosmid ライブラリーを作成し、59,904 クローンの解読を完了した。3 種類のアセンブラーによるアラインメントの結果、70～80%が上記スキャフォールドにマップされた。アセンブリが困難である領域に関しては full-length BAC sequencing を行い、50 クローンの配列を決定した。各スキャフォールドにマップされた BAC クローンを用いて、マルチカラーFISH による染色体へのマッピングを行い、222 ペアの同祖遺伝子がマップされた。最終的に全体の 70%程度のスキャフォールドが染色体上にマップされることが分かった。
さらに、支援によって得た初期胚・成体器官の RNA-seq、および NCBI・cDNA/EST 等のトランスクリプトームデータを利用して、米国 JGI およびテキサス大学のグループと共同で Genome Guided Gene Model を作成した。また、日本の Xenopus 研究者グループによるゲノムアセンブリの確認・修正、遺伝子モデルのアノテーションと遺伝子モデリングパイプラインの改善作業を行なった。これらの高精度のゲノムアセンブリと遺伝子モデルを活用し、染色体逆位と融合、同祖遺伝子とパラログの変異・欠失・増幅・遺伝子発現、トランスポゾンによるサブゲノム（異質倍加前の祖先種ゲノム）の同定、性決定遺伝子座等の解析を進めている。その結果、TGF-beta 等のシグナル伝達経路、ケラチン、HOX、主要組織適合抗原複合体、T 細胞受容体、嗅覚受容体、細胞周期制御経路には、ゲノム倍加後に起きたと考えられる特徴的な変化が確認されている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
アフリカツメガエル卵の大きさは直径 1.2 mm と比較的大きく組織切除実験など胚操作、タンパク質の抽出・精製が容易なことから発生生物学、細胞生物学のモデル生物として重用されてきたが、異質 4 倍体でありその解読の困難さからゲノム情報が整備されておらず、ゲノム研究、プロテオーム研究を妨げていた。今回のゲノム支援によって同ゲノム配列が読まれ FISH によって同祖遺伝子の染色体上の位置を区別することによって完全なゲノム情報が整備されれば、今後 RNA-seq による発現解析を重ねることによってゲノムの倍化によって生じた同祖先遺伝子がどのように使い分けられてきたか、またそれは環境適応にどのように寄与してきたかなど、ゲノム倍化の生物学的意義に関する研究が飛躍的に進展することが期待される。これらを基盤として、今後は力学応答センサー分子の探索、シグナル伝達経路について解析を進め、いままで未知であった力学応答経路の全容を解明することを目指す。

＜支援成果公表リスト＞
Adam Session, Yoshinobu Uno, Taejoon Kwon, Jarrod Chapman, Atsushi Toyoda et al. Genome evolution in the allotetraploid frog Xenopus laevis. 論文投稿中

公募支援課題：2011 年度

成体型神経回路へのリモデリングと一生を通した維持機構の解明

基盤研究（A）

上村 匡・京都大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

体の大きさは人それぞれ異なっており、体が大きい人ほど脳や心臓といった臓器も大きい。臓器を体の大きさに合わせたサイズに調節する様式の一つとして、体の大小に応じてそれぞれの細胞のサイズを調節する様式（スケーリング）がある。の細胞のサイズの制御には、Insulin/IGF signaling (IIS) and Target of Rapamycin complex 1 (TORC1) シグナル伝達経路（IIS/TORC1 シグナル伝達経路）が重要な役割を果たすことが知られている。しかし神経細胞のような複雑な枝分かれの形態を示す細胞のサイズがどのように制御されているかについては、これまでほとんど分かっていなかった。

＜支援の内容＞

申請者は、神経細胞のサイズの調節に異常を示すショウジョウバエの突然変異体を分離していた（図１A と１C）。そして、その変異体および同じ遺伝学的背景を持つ他の系統の全ゲノム配列の決定を申請し、その支援を受けた。また得られた全ゲノム配列の解析については、技術的なアドバイスを頂きつつ、解析そのものは自分のグループ内で行い、原因遺伝子を同定した。

＜支援によって得られた研究成果＞

申請者は、ショウジョウバエの感覚神経をモデル系として用いて、体の大きさを変化させた時に神経細胞の「サイズ」と「形（枝分かれのパターン）」がどのような影響を受けるかを調べた。その結果、飢餓条件にして体が通常より小さくなったショウジョウバエでは、神経細胞は形を保ったまま小さくなっていること、つまり通常の神経細胞のミニチュア型（精巧な縮小コピー）となっていることを発見した（図１A と１B）。さらに申請者は、この「形を保ったままでの神経細胞のサイズの制御」に重要な遺伝子を見つけるために、分子遺伝学と次世代シーケンサーを用いた解析を行い、ヒトのゲノムにも保存されている HSP90 のコシャペロンをコードする *CHORD* 遺伝子を発見した。

神経細胞が *CHORD* 遺伝子の機能を失うと、適正な栄養条件下で体全体は十分に成長しているにも関わらず、神経細胞の突起はミニチュア型になってしまう（図１A と１C）。遺伝学的な解析の結果、CHORD タンパク質は Tor complex 2 (TORC2) を介して栄養条件あるいは体の大きさを感知し、神経細胞のサイズを制御していることをはじめて見出した。

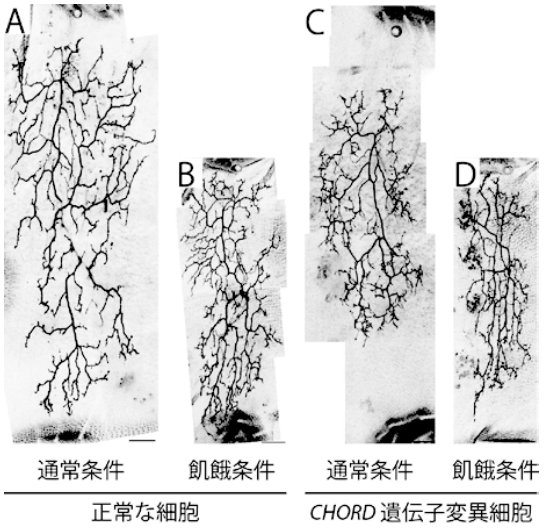


図 1. 通常条件（A と C）または飢餓条件（B と D）で生育した個体中での、正常な神経細胞（A と B）または *CHORD* 遺伝子に変異を持つ神経細胞（C と D）の観察画像。正常な神経細胞は体の大きさに合わせて形を変えずに拡大縮小しているのに対し、*CHORD* 変異細胞は体のサイズに関わらず常にミニチュア型のパターンを示す。

IIS/TORC1 シグナル伝達経路が突起の伸長と分岐の両方を制御しているのに対して、CHORD は TORC2 と共に突起の伸長のみを制御することで、形を保ったままでの樹状突起サイズのスケーリングを実現していることが示された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

CHORD や TORC2 は広く保存されている。それぞれの動物種においては、CHORD が体の大きさに合わせて神経細胞のサイズを調節することに重要な役割を果たしているのではないか。もしもこのような神経細胞のサイズの調節が破綻すれば、神経細胞、ひいては脳の機能に障害が発生する可能性がある。

＜支援成果公表論文リスト＞

Shimono K., et al. *Scientific Reports*, 4, 4415 (2014)

公募支援課題：2014 年度

遺伝学的摂動を用いた樹状突起ジオメトリーの演算原理の追究

新学術領域研究

上村 匡・京都大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

動物を取り巻く主な環境要因の一つは、食餌から摂取する栄養である。一時的にせよ栄養失調や飢餓は、発生速度、老化、そして子孫を残す能力などの life history traits を大きく左右する。また、主要栄養素すなわちタンパク質、糖、そして脂肪は、各々単独で影響を与えるのではなく、互いのバランスが重要であることも報告されている。急速な成長期にある個体において、栄養状態が器官・組織・そして細胞の成長や分化をどのように調節しているかについては、幹細胞を含む細胞の増殖制御の観点で研究が進んでいる。しかし分裂を終了した細胞に関してはほとんど明らかにされていない。

申請者は、分裂終了後に、樹状突起や軸索を伸長・分岐させて表面積を劇的に増加させる神経細胞に着目した。そして、ショウジョウバエの感覚神経 dendritic arborization (da) neuron を in vivo での樹状突起形成のモデル系として採用し、その形成を支える遺伝子プログラムを研究してきた。今までに突起内のオルガネラ輸送の制御機構など、神経細胞自律的な仕組みを多数報告する一方で、細胞非自律的なメカニズムの重要性を強く示唆する成果も得ていた。その一つは、成長期のショウジョウバエ野生型個体を、通常エサで飼育した場合と、一時的な絶食あるいは主要栄養素のアンバランスにさらした場合での da neuron の樹状突起の発達を比較した結果、新規の器官間相互作用経路の存在を示唆する成果を得たことである（Shimono et al., *Sci. Reports*, 2014；未発表データ）。これらの発見を切り口として、消化系と神経系を仲介する仕組みを追究し、栄養状態依存的に、機能的な神経系の形成を司るプログラムを解明する（図１）。

＜支援の内容＞

通常エサを与えた場合と、主要栄養素の組成の異なるエサを与えた場合に、樹状突起ジオメトリーに与える影響を体系的に調べている。これらの条件および対照エサで飼育した個体から RNA を調製するので、RNA-seq を行う支援を申請し、採択して頂いた。エサの条件として、高糖度あるいは低糖度のエサ、高脂質のエサ、さらにタンパク質と炭水化物の比を変えたエサを検討している。対象とする発生段階は、さかんに摂食している幼虫期に加えて、成虫も用いる。幼虫と成虫とでは、グリコーゲンや中性脂肪を貯える脂肪組織の体重に占める割合が異なるなど、それぞれに際立った特徴を示すので、両者を検討対象としている。

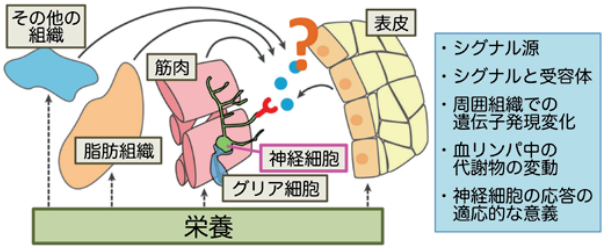


図１　研究目的：栄養状態に依存して神経細胞の成長を調節する、細胞非自律的なメカニズムの解明。本研究でモデル系としている感覚神経の樹状突起

＜支援によって得られた研究成果＞

RNA-seq データを解析した結果、炭水化物含有量がより高い食餌で発現上昇する多数の応答遺伝子を同定した。これらの応答遺伝子は、解糖系などに属する遺伝子が有意に濃縮していた。また、応答遺伝子の多くが、ヘテロクロマチンに分類されるゲノム領域に位置していた。従って食餌依存的にクロマチンの構造変化が起きるのではないかとの仮説を立てている。さらに栄養状態を、神経細胞を含む全身に伝える血リンパ中の全身性因子を想定しており、この因子を分泌する候補器官として、脂肪体や腸での RNA-seq 解析も行っている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまでの神経回路の発生や機能の研究では、個体を取り巻く環境は一定に保った条件下で様々な遺伝子の働きを調べる手法が圧倒的であった。本申請では、この環境の大きな要因である食餌に着目し、食餌条件−遺伝子型の関連を追究する研究を発展させることができる。栄養状態の変化によって、組織破砕液や血リンパ液中に含まれる糖や脂質などを含む代謝産物を分析し、支援によって得られた RNA-seq の結果と照合することで、マルチオミックス解析が実現した。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2013 年度

宿主との共進化をメルクマールとした家畜用プロバイオティクスの選抜と機能開発

基盤研究（B）

牛田 一成・京都府立大学生命環境科学研究科

＜背景・目的＞

これまで、ペット動物用や家畜用のプロバイオティクスは、ヒト用に開発されたものを転用するなどして、対象の動物の特性を考慮せずに用いられてきた．それぞれの動物には、固有の消化機構があり、そこには固有の腸内細菌叢が発達していることが次第に明らかになってきた．今回は、ブタを対象として、彼らの直接の祖先であるイノシシや，近縁他属のイノシシ類の腸内細菌叢の特徴を明らかにするとともに、祖先種と家畜種に共通して存在する乳酸菌を分離し、それらの比較ゲノムを行うことで、家畜化の過程で共生腸内細菌として必要となった、あるいは不要となった形質を明らかにしようとした。それによって、宿主動物種に応じたプロバイオティクスの開発要件を推定しようとするものである。

＜支援の内容＞

ブタとイノシシの糞便から単離したビフィズス菌及び乳酸桿菌の新規ゲノム配列決定（48 検体）
ブタおよびイノシシ糞便から抽出した DNA でのメタゲノム解析（6 検体）

＜支援によって得られた研究成果＞

イノシシ類およびブタに共通して存在する乳酸菌 *Bifidobacterium thermoacidophilum* と *Lactobacillus mucosae*、家畜ブタに広く分布する *L. amylovorus* のドラフトゲノムを決定し、比較ゲノムを行った。*B. thermoacidophilum* については、集約的養豚場から分離した株にのみ薬剤耐性遺伝子がゲノム中に検出され、実測したところ高度耐性をしめした。ゲノムの構造解析からトランスポゾン様の配列が上流に座乗することから、ブタの腸管内で水平移動した耐性遺伝子である可能性が示唆された。また、*L. mucosae* と *L. amylovorus* の比較ゲノムで、家畜化に伴って不要化した機能性が明確に示される結果となった。

また、ブタ（日本（愛知県：ヨーロッパ種）、ブタ（ガボン共和国：アフリカ種）、アカカワイノシシ（野生：ガボン共和国ムカラバ国立公園）、アカカワイノシシ（飼育：横浜動物園）、アジアイノシシ（野生：滋賀県）アジアイノシシ（飼育：沖縄県）の糞便 DNA のメタゲノム解析を行ったところ、それぞれの動物種で優勢な細菌群を明確に示すことができ、イノシシが家畜化することによってまず大腸菌群の優勢化が進行するとともに、穀類の給与が始まることによって、ビフィズス菌ではなく乳酸桿菌の優勢化が誘導されたと考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

この研究によって、本来イノシシ亜目と共生関係にあったと考えられる乳酸菌と家畜化の中で定着が可能となった乳酸菌を区別することができ、両者のゲノムの比較により、家畜化によって不要となった（あるいは、家畜化によって必要となった）機能遺伝子を推測することができました．腸内細菌の種分化にあたえる宿主の家畜化の影響を明らかにすることで、家畜化のインパクトを明確に定義することが可能となったばかりでなく、メタゲノム解析によって、これまで腸内細菌学で常識とされていた「ブタは *Lactobacillus* 優勢なラクト動物」という定義について、「家畜化されることによって、ブタは、はじめてラクト動物となった」ということを明らかにできました。腸内細菌の種分化にあたえる宿主の家畜化の影響を明らかにすることで、家畜化のインパクトを明確に定義することが可能になるとともに、新規なプロバイオティクス探索の要件を明確化することができたと考えています。

＜支援成果公表リスト＞

Ushida, K. et al., Anim Sci J. DOI: 10.1111/asj.12492 (2015)

公募支援課題：2014 年度

宿主との共進化をメルクマールとした家畜用プロバイオティクスの選抜と機能開発

基盤研究（B）

牛田 一成・京都府立大学生命環境科学研究科

＜背景・目的＞

これまで、ペット動物用や家畜用のプロバイオティクスは、ヒト用に開発されたものを転用するなどして、対象の動物の特性を考慮せずに用いられてきた．それぞれの動物には、固有の消化機構があり、そこには固有の腸内細菌叢が発達していることが次第に明らかになってきた．今回は、ブタを対象として、彼らの直接の祖先であるイノシシや，近縁他属のイノシシ類の腸内細菌叢の特徴を明らかにするとともに、祖先種と家畜種に共通して存在する乳酸菌を分離し、それらの比較ゲノムを行うことで、家畜化の過程で共生腸内細菌として必要となった、あるいは不要となった形質を明らかにしようとした。それによって、宿主動物種に応じたプロバイオティクスの開発要件を推定しようとするものである。

＜支援の内容＞

飼育環境及び品種を異にするブタと野生イノシシ、野生カワイノシシと同所に生息するゴリラから分離した乳酸桿菌単離株のゲノム配列決定（80 株）

＜支援によって得られた研究成果＞

アフリカの熱帯雨林でアカカワイノシシと同所的に生息する野生ニシローランドゴリラから得られた乳酸菌についてイノシシ由来株と併せて解析した。ゴリラ由来株については、ゲノムサイズが乳酸桿菌の中では最小に近く、GC 含量は最大に近かった。薬剤耐性をコードすると推測される遺伝子が複数見つかり、そのうち自然耐性と思われる van オペロン以外に獲得耐性と推定される遺伝子が複数存在した。

ブタおよびイノシシ由来株については、前年までの動物種に加えて、あらたにガーナ共和国の野生イボイノシシ由来 *Lactobacillus mucosae* 株、飼育イボイノシシ由来 *L. mucosae* 株の解析を実施できた。ゲノム情報に基づく系統解析では、*L. mucosae* が、アフリカクラスターと日本クラスターに区分されることがわかった。よこはま動物園の飼育アカカワイノシシは、アフリカの野生個体群と同じ *L. mucosae* に加えて、日本の家畜ブタと同じクラスターに区分される *L. mucosae* を持つことがわかった。この場合、*L. mucosae* とイノシシ亜目の宿主との共生関係は、少なくとも *Potamochoerus* の分岐まで遡ることができると考えられるが、前年度の腸内細菌のメタゲノム解析の結果と併せて考えると、地理的分離の可能性に加えて飼養条件の違いが *L. mucosae* の分化を誘導したのではないかと推測される。COG 情報から、*L. mucosae* と *L. amylovorus* を比較すると前者にのみキシラン水解物の代謝系があり、後者にはデンプン水解物の代謝系が備わっていた。さらに前者にのみ、植物二次代謝産物に対する抵抗性を示唆する機能遺伝子が備わっていることが明らかとなった。一方、COG から推定される *L mucosae* の 2 つの型の間の異同は、現状では必ずしも明瞭にできていない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

この研究によって、本来イノシシ亜目と共生関係にあったと考えられる乳酸菌と家畜化の中で定着が可能となった乳酸菌を区別することができ、両者のゲノムの比較により、家畜化によって不要となった（あるいは、家畜化によって必要となった）機能遺伝子を推測することができました．腸内細菌の種分化にあたえる宿主の家畜化の影響を明らかにすることで、家畜化のインパクトを明確に定義することが可能となったばかりでなく、メタゲノム解析によって、これまで腸内細菌学で常識とされていた「ブタは *Lactobacillus* 優勢なラクト動物」という定義について、「家畜化されることによって、ブタは、はじめてラクト動物となった」ということを明らかにできました。腸内細菌の種分化にあたえる宿主の家畜化の影響を明らかにすることで、家畜化のインパクトを明確に定義することが可能になるとともに、新規なプロバイオティクス探索の要件を明確化することができたと考えています。

＜支援成果公表論文リスト＞

Tsuchida S. et al. Genome Announc. doi: 10.1128/genomeA.01196-15.2015.

公募支援課題：2015 年度

FIB/SEM を用いたヌクレオソームトモグラフィーによる染色体内部構造の解明

基盤研究（A）

内山 進・大阪大学大学院工学研究科

＜背景・目的＞

本研究では、染色体スキャッフォールド蛋白質であるコンデンシンを利用した分裂期染色体クロマチン免疫沈降–配列解読（mChIP-seq）を実施（配列解読の支援を希望）、解読した配列と共同研究により進めてきた分裂期染色体 Hi-C による DNA 配列間の距離情報を統合し、DNA 上でのコンデンシンの配列的および空間的位置情報を拘束条件としたクロマチンフォールディング計算を行い、ヌクレオソーム分解能でのヒト染色体の高次構造解明を解明する。効率的な mChIP-seq の実現のため、CRISPR/CA9 を用いて FLAG をコンデンシンと融合させた組換え細胞を利用する。

＜支援の内容＞

申請者が準備・調製を行った ChIP-seq 試料を送付し、次世代型シーケンサーによる配列解析を行って頂く。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在、FLAG を付加したコンデンシンサブユニットを発現する細胞を準備しており、本年度の残りの期間の早い段階に送付する予定である。

公募支援課題：2010 年度

細胞性粘菌におけるアロ認証機構の解明

新学術領域研究

漆原 秀子・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

細胞性粘菌は単細胞として分裂増殖するアメーバが飢餓条件下で集合して多細胞化し、胞子塊とそれを支える柄からなる子実体を形成する独特の生活環をもつ。単細胞期は細胞分裂や細胞運動の、多細胞期には細胞間相互作用や細胞分化のモデルとして研究されている。また、冠水条件では環境耐性の強いシストを形成する有性生殖を行うことから、生殖様式の進化の観点からも興味深い生物である。主として柄の構造をもとに分類され、*Dictyostelium*（分枝のない細胞性の柄）、*Polysphondylium*（分枝のある細胞性の柄）、*Acytostelium*（非細胞性の柄）の３属が知られている。最も多用されている *Dictyostelium discoideum* については国際共同研究でゲノム解読が行われ、2005 年に発表された。また、他種細胞性粘菌についてもさまざまな目的でゲノム解読が進行している。

我々はすべての細胞が胞子になり非細胞性の柄を形成する細胞性粘菌 *Acytostelium subglobosum* の発生に興味をもち、細胞分化する他属の細胞性粘菌、特に *D. discoideum* との遺伝情報の違いを知ることを目的として平成 21 度までのゲノム特定領域においてゲノム及び mRNA sequencing を行ってきた。しかしながら、ゲノムの全貌をとらえるにはいたっていなかった。さらに、有性生殖メカニズム進化の研究からも *A. subglobosum* ゲノム情報の取得が望まれていた。

＜支援の内容＞

上述の細胞性粘菌 *A. subglobosum* について、すでに得られているゲノム及び mRNA sequencing 結果の解析によって、①高信頼性ゲノム配列の取得、②遺伝子モデル構築、の２点について情報処理支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

情報支援によって、*A. subglobosum* ゲノムのコンティグ（supercontig）は 106 までに連結された。ゲノムサイズ 31 Mbp、染色体数は 18 であり、他種細胞性粘菌の解析と比較してもゲノムワイドな遺伝子解析には十分な完成度と見なすことができる。 また、タンパク質をコードする遺伝子は 12,722 個と予測され、その約 2/3 について発生過程における発現タイムコースを得ることができた。

これらの結果を利用して、非細胞性の柄を形成する *A. subglobosum* 発生メカニズムの謎解きが進んだ。最初に見いだされたのは、「柄細胞」が分化しない *A. subglobosum* にも *D. discoideum* で柄細胞分化に関わることが知られている遺伝子のほぼすべてが存在し、発現しているという意外な事実であった。遺伝子構造を利用したホールマウントインシチュハイブリダイゼーションと免疫染色の手法を組み合わせることにより、完成形の子実体ではすべての細胞が胞子に「分化」しているのであるが、形態形成の途中ではどの細胞もセルロースを分泌して *D. discoideum* の予定柄細胞と同様に柄の形成に関わる「temporal な役割分担」をしていることが明らかになった。

より詳細な解析によって、①オーソロガス遺伝子の発現タイムコースが *A. subglobosum* では *D. discoideum* と大きく異なっていること、②*D. discoideum* において細胞運命決定の初期に関わるとされている ABC トランスポーターの一つをコードする遺伝子が *A. subglobosum* には欠失していること、が示された。これは遺伝子レパートリーは酷似していても発現のタイミングが変化することによって発生のシナリオが著しく異なることを意味しており、遺伝情報の微細な変化でも発生プログラムに大きな変更をもたらす質的飛躍の可能性が示された。また、*Acytostelium* の非細胞性の柄は獲得した形質ではなく、細胞性の柄を形成する（ことにより大きな子実体を形成できる）能力を失った結果であると推測された。

さらに、*A. subglobosum* の遺伝子構造に関する情報を利用した研究成果として、セルロース合成酵素遺伝子内ドメインに種間交換の可能なものとそうでないものがあること、有性生殖に必須な膜タンパク MacA, HAP2-GCS1 ホモログが高度に保存されていることなどが示された。また、真核生物分岐の系統解析においてより信頼性の高い系統樹を作成することができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

Acytostelium のゲノム解析が終了することによって細胞性粘菌すべての属についてゲノム情報が得られたこととなり、細胞性粘菌を用いた研究が大きく展開できることとなった。また、国内外の分子系統解析を含む研究にも大きな貢献となった。

＜支援成果公表リスト＞

1. Araki, Y. et al., Eukaryot. Cell 11, 638-644 (2012)
2. Mohri, K. et al., Dev. Biol. 375, 201-209 (2013)
3. Romeralo, M. et al, Proc. Biol. Soc. 280, 20120976 (2013)
4. Mohri, K. et al., Biol. Open 3, 553-560 (2014)
5. Kuwayama, H., Develop. Growth Differ. 56, 526-533 (2014)
6. Urushihara, H. et al., BMC Genomics 16, 80 (2015)
7. Sheikh, S. et al., Mol. Phylogenet. Evol. 92, 53-62 (2015)

公募支援課題：2014 年度

植物絶対共生菌の革新的遺伝子サイレンシング法が開く菌根共生の分子基盤

基盤研究（B）

江澤 辰広・北海道大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

アーバスキュラー菌根菌(AM 菌)は、ほとんどの陸上植物と共生し、リン酸供給を通じて農業生産や植生の成立において重要な役割を果たしているものの、逆遺伝学的手法が適用できない多核性生物であるため、植物へのリン酸供給プロセスの分子機構はほとんどわかっていない。本研究では、これまで困難であった AM 菌遺伝子の機能解析の突破口として、植物ウィルスを利用した革新的ノックダウン法を開発し、次世代シーケンスと組み合わせてリン酸の吸収・濃縮、長距離輸送、植物への移行過程において中心的役割を果たす AM 菌／宿主側の遺伝子群を明らかにする。共生的リン酸獲得の分子基盤が明らかになれば、リン資源を有効利用するための菌根利用能を強化した作物の育種やリン供給効率の高い菌株の選抜に重要な遺伝情報を提供すると期待される。

ただ、AM 菌は種内や種間の表現形質の多様性が極めて高く、一種、一系統から得られた遺伝子発現情報の普遍性については、遺伝子レパートリーの取得が容易ではないことから、確かめることが困難であった。一方、当研究室では、植物を用いた解放栽培系において、AM 菌の菌糸を大量かつ同調的に培養するシステムを確立したことで、高品質 RNA の調製が可能になり、これまでに *Rhizophagus clarus* HR1 およびモデル菌株 *R. irregularis* DAOM197198 のトランスクリプトーム情報を獲得してきた。さらに当研究室では、強酸性土壌などのストレス環境から肥沃な土地まで広く分布する *R. clarus* RF1 株および肥沃な土地（農耕地など）に特化した *Claroideoglomus etunicatum* H1-1 株を保有しており、これら生態系を代表する 2 菌株においても、遺伝子レパートリーの取得と、共生的リン酸獲得にかかわる遺伝子発現プロファイルを得ることは、ストレス耐性やリン酸獲得経路の種間多様性／普遍性に関する情報が得られる点で極めて意義深い。

＜支援の内容＞

(1) 材料
・菌株：*R. clarus* RF1 および *C. etunicatum* H1-1
・宿主植物：*L. japonicus*（ミヤコグサ）
・経時変化：リン酸添加 0 および 4 時間後
・組織タイプ：根外菌糸および根内菌糸(根を含む)
・総サンプル数：24 (n = 3)
(2) シーケンス規模
Illumina HiSeq 101 bp ペアエンド×1.5 億リードペア／菌株（合計 3 億リードペア）

＜支援によって得られた研究成果＞

(1) 共生菌由来リードの選別および遺伝子レパートリーの取得法の確立

本研究における材料は、解放系において宿主植物との共生条件のもとで培養されたものであるため、得られるリードには必ず宿主植物および雑菌由来のものが含まれる。それらを除去し、AM 菌由来のリードから遺伝子レパートリーの取得および発現プロファイルを得る方法を以下のように確立した。

i) ミヤコグサ cDNA (かずさ DNA 研より取得)へマッピングされないリードの選抜
ii) リードの *de novo* アッセンブル (Trinity, 遺伝研サーバー利用)
iii) 得られた contigs をミヤコグサ cDNA 、細菌由来遺伝子 (NCBI より取得), 代表的な菌類 6 種のゲノム (NCBI および JGI より取得)、およびモデル AM 菌 *R. irregularis* DAOM197198 ゲノム (JGI より取得)に対して相同性検索 (Blastn) を行い、*R. irregularis* に最も高い相同性を示す contigs を AM 菌由来遺伝子として選別
iv) アミノ酸 50 残基以上のタンパク質をコードする ORF をこれら contigs から抽出 (Transdecoder)
v) スプライシングバリアントなどを除くために得られた contigs を塩基配列相同性 95%を基準にクラスタリング
vi) 酵母およびアカパンカビデータベースを参照してアノテーション付与
vii) リードマッピングによるプロファイリング

(2) 遺伝子発現プロファイルの種内および種間差

本支援により得られた *R. clarus* RF1 の根外および根内菌糸における遺伝子発現プロファイルの種内および種間差を比較するために、これまでに当研究室において同じ条件で培養して RNA-Seq を行った *R. clarus* HR1 および *R. irregularis* DAOM197198 のリードを(1)の方法で純化、アッセンブル後、主成分分析を行った。予想通り、種内変動は種間変動よりも小さいことが分かったが、組織別に見ると、根外および根内菌糸における発現プロファイルの違いには、種を超えて一定の傾向があることが分かった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム情報が無く、解放系において宿主植物と共存する状態で培養した AM 菌においても、遺伝子レパートリーを取得する方法が確立できたことは、優れた表現形質を持つ種や系統の分子レベルでの解析に道を開いたという点で意義深い。また、遺伝子発現プロファイルの普遍性に関する情報が得られたことは、本科研費研究においてサイレンシングの標的とする遺伝子が AM 共生において普遍的な役割を果たしているかどうかを判断するための重要な判断材料となるだけでなく、今後の AM 共生機構の分子レベルでの理解を飛躍的に向上させる重要な一歩となり得る。

＜支援成果公表リスト＞

江沢, 土肥誌 (印刷中)

公募支援課題：2014 年度

胎生期神経前駆細胞内 mRNA 長距離輸送に関わる RNA 結合タンパクの探索と機能解析

基盤研究（B）

大隅 典子・東北大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

胎生期における哺乳類大脳皮質の構築過程において、神経前駆細胞として働く放射状グリア（RG）細胞は、脳室面（apical 側）から脳表面（basal 側）まで達する長い突起を有する。本研究では、このような極性の強い神経前駆細胞内において、どのようにして核から遠く離れた部位まで mRNA 分子が輸送されるのか、そのメカニズムを明らかにすることを目指す。具体的には、(1) 我々がすでにマウス大脳皮質原基において明らかにした *Cyclin D2* mRNA の basal 側輸送に関わる 3'-UTR 配列と結合する RNA 結合タンパク質を同定し、(2) この RNA 結合タンパク質により実際に basal 輸送が行われるか確認するとともに、(3) *Cyclin D2* 以外に basal 側に輸送される分子や、RNA 結合タンパク質とともに働くモータータンパク分子や微小管結合タンパク質を同定する。RNA 結合タンパク質の内、特に、胎仔脳皮質の RG において脳室面および脳表面に局在し、成熟ニューロンにおいてグルタミン酸受容体等機能分子の mRNA のシナプスへの局在とその局所翻訳に関与している RNA 結合タンパク質 FMRP に着目し、中枢神経系の発生初期における標的 mRNA を網羅的に同定する。本研究は哺乳類型脳構築過程の基本原理解明に大きく貢献すると考えられる。

＜支援の内容＞

RIP-seq 法による FMRP 標的 mRNA の網羅的探索

マウス胚大脳皮質原基において、基底膜を構成する細胞外基質（ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン、テネシン等）は RG 細胞により分泌され、それらの受容体として機能する細胞膜タンパク質インテグリンも RG 細胞の basal 側に局在する。したがってこれらの分子が細胞体で翻訳されタンパク質として輸送されるのか、それとも上記 Cyclin D2 と同様に mRNA の状態で長距離輸送されるのか興味が持たれる。また、大脳皮質原基において mRNA 輸送に関与する RNA 結合タンパク質 FMRP が発現し、basal 側に局在していることが報告されているが、その役割は未だ不明のままである。

そこで、FMRP による mRNA 輸送のマシナリーを包括的に理解するために、E14.5 のマウス大脳皮質原基、大脳基底核原基、中脳、脊髄を切り出し、RIP-seq 法を用いて、FMRP と結合する mRNA を網羅的に探索する。FMRP の RIP 解析用の抗体は各種市販されているので、それらを利用して結合 RNA サブセットを免疫沈降物から単離した。「ゲノム支援」によって、得られた RNA サブセットの次世代シーケンサを用いた配列決定をおこなった。試料数は、FMRP について、野生型マウスから単離した大脳皮質原基 3 試料、大脳基底核原基 2 試料、中脳 2 試料、脊髄 2 試料、および対象としてウサギ IgG について大脳皮質原基 2 試料、計 11 試料の解析を行った。また、遺伝研で開催されたゲノム支援情報解析講習会を受講し、得られた配列データの解析方法を学んだ。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援によって得られた配列データについては現在解析中であるが、FMRP が結合する RNA の候補遺伝子として、チャネル分子、イオン輸送体、Ig、コラーゲン、細胞接着因子、転写因子、small nucleolar RNA、染色体不活性化因子などを同定することができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

未だほとんど不明のままである、脳の初期発生における FMRP の機能について、FMRP の標的候補分子を同定することができた。今後、免疫染色法や *in situ* 法によって、標的候補分子 RNA の局在を解析することで、脳の初期発生における FMRP の脳室面および脳表面の局在の意義についての研究が進展することが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

＜支援成果公表論文リスト＞

支援の成果を公表した雑誌論文のリストを簡略型（筆頭著者、雑誌名、巻、発行年、最初と最後の頁）で記載して下さい。

公募支援課題：2014 年度

マウス音声コミュニケーションの神経生物学的基盤の解析

挑戦的萌芽研究

大隅 典子・東北大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

これまでのヒト疫学研究より、父親の高齢化は、自閉症を含む様々な精神疾患や発達障害の発症リスクを増大させることが知られている[Vestergaard *et al.*, 2005; Frans *et al.*, 2008; Malaspina *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2009; Reichenberg *et al.*, 2006; Durkin *et al.*, 2008]。その病態基盤はまだ明らかではないが、高齢の父親に由来する子供において *de novo* ゲノム変異の出現頻度が高いこと[Kong *et al.*, 2012]や、高齢の父親の精子においてグローバルな DNA メチル化が亢進していること[Jenkins *et al.*, 2013]が報告されていることから、父親の加齢に伴う生殖細胞系譜のゲノム変異および／またはエピゲノム変異がその病態基盤にあると考えられている。申請者らはこれまでに、自閉症の言語コミュニケーション障害モデルとして考えられている母子分離に伴う超音波発声 ultrasonic vocalization (USV)を主要な指標として、父親の高齢化が次世代に及ぼす影響について検討してきた。若齢（3 ヶ月齢）あるいは高齢（12 ヶ月齢以上）の父親マウス[F0]由来の仔マウス[F1]および若齢の雄仔マウス[F1]由来の孫マウス[F2]における 3 世代 USV 解析を実施した結果、高齢の父親マウス由来の仔マウス[F1]において、USV の減少が観察されたが、この減少は、孫マウス[F2]では観察されなかった。したがって、父親の高齢化に伴う言語コミュニケーション障害には、遺伝子変異というよりも可逆的要因の関与、つまり、エピゲノム変異の関与が示唆されている。

＜支援の内容＞

前述したように、父親の高齢化による仔マウスの言語コミュニケーション障害の分子基盤にはエピゲノム変異の関与が示唆されている。ゲノム支援では、若齢（3 ヶ月齢）および高齢（12 ヶ月齢以上）の雄マウス、それぞれ 2 匹の精巣上体より精子を採取して、全ゲノムバイサルファイトシークエンス whole genome bisulfite sequence (WGBS)を実施した。

＜支援によって得られた研究成果＞

今回のゲノム支援では、若齢および高齢由来の精子ゲノム（2 個体分）を WGBS により、それぞれ 2,548,898,494 および 2,539,963,474 リードずつシークエンスを実施し、解析ソフト Bismark を用いて、UCSC genome browse のリファレンスゲノム配列（mm9）にマッピングした。若齢および高齢由来精子ゲノムのマッピング効率は思いの外低く、それぞれ 35~37%および 29~43%であった。マッピングデータは Integrative Genome Viewer を用いて DNA メチル化を可視化した。また、若齢および高齢由来の精子における DNA メチル化の比較解析を実施し、高齢由来の精子において 5,610 個の脱メチル化 CpG（4561 遺伝子）と 1,574 個のメチル化 CpG（1467 遺伝子）を同定した。さらに、DNA メチル化の比較解析における染色体ごとの分布について検討したところ、その分布は一様ではなく、DNA メチル化 CpG については、第 2, 4, 5, 7, 11 番染色体において多く、また、DNA 脱メチル化 CpG については、上記の染色体に加えて、第 17 番染色体においても多いことが明らかとなった。さらに、これまでの先行研究より、仔マウスの USV に関連すると考えられる 27 遺伝子をリストアップし、その遺伝子領域における DNA メチル化について検討した結果、*Foxp2* 遺伝子領域における CpG のメチル化および *Neuroligin2*、*Neuroligin3*、*Oxytocin* 受容体遺伝子領域における CpG の脱メチル化が確認された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究ではこれまでの 3 世代行動解析の結果より、父親の加齢に伴うエピジェネティック変異が仔マウスの母子分離に伴う USV の分子病態基盤である可能性が推察されていた。本支援では、その分子病態基盤となる候補遺伝子を同定することを目指しており、今回の結果より、父親の加齢に伴う DNA メチル化および脱メチル化の変化が USV 関連遺伝子を含めて、広範な遺伝子領域において引き起こされていることが明らかとなった。今後は、これらの DNA メチル化の変化しているゲノム領域の中から、父親の高齢化による仔マウスの USV 異常に影響を与える遺伝子群をスクリーニングすることを目指す。まずは、仔マウス脳の各種領域における遺伝子発現を実施し、遺伝子発現に変化を及ぼすものについては、精子において DNA メチル化を受けた領域のバイサルファイト解析を仔マウス脳由来 DNA に関して実施し、精子における DNA メチル化との対応について検討することにより、父親の高齢化による精子の変化と仔マウスの表現系異常との関連性について検討する。さらには、これらの因果関係を解明するための技術開発や評価法の確立を目指す。

＜支援成果公表リスト＞

特になし。

公募支援課題：2015 年度

仔マウスの行動に 対する雄生殖細胞の次世代継承エピゲノム変化に関する研究

挑戦的萌芽研究

大隅 典子・東北大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

これまでの疫学研究から、父親の高齢化により様々な精神疾患や発達障害の発症リスクが増大することが知られている[Vestergaard *et al.*, 2005; Frans *et al.*, 2008; Malaspina *et al.*, 2005; Saha *et al.*, 2009; Reichenberg *et al.*, 2006; Durkin *et al.*, 2008]。現在までにその病態基盤は明らかではないが、生殖細胞系譜におけるゲノム変異あるいはエピゲノム変異に起因すると考えられている[Kong *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013]。申請者はこれまでに、若齢（3 ヶ月齢）の父親マウス由来の仔マウスと比較して、高齢（12 ヶ月齢以上）の父親マウス由来の仔マウスでは、母子分離に伴う母子間コミュニケーションの低下が引き起こされることを見出した。さらに、父親マウスの高齢化による仔マウスへの影響は、孫マウスでは観察されないことから、父親の高齢化による様々な精神疾患や発達障害の発症リスクの病態基盤にはエピゲノム修飾が関与していることと考えている。加えて申請者らは、父親の高齢化を制御する因子として、転写制御因子 Pax6 を同定した。Pax6 は雄性生殖細胞系列において発現することを報告するとともに、[Kimura *et al.*, 2015]、若齢（3 ヶ月齢）の ***Pax6*** 変異父親マウス由来の仔マウスは行動異常を示さないにも関わらず、野生型では仔マウスに影響のみられない中年齢（6~8 ヶ月齢）の ***Pax6*** 変異父親マウス由来の仔マウスにおいて、高齢（12 ヶ月齢以上）の野生型父親マウス由来の仔マウスと同程度の行動異常を示すことを見出した。

＜支援の内容＞

そこで本申請では、若齢（3 ヶ月齢）および中年齢（6~8 ヶ月齢）の ***Pax6*** 変異父親マウスの精子における DNA メチローム解析を希望する。若齢（3 ヶ月齢）および中年齢（6~8 ヶ月齢）の ***Pax6*** 変異父親マウスの精子をそれぞれ 3 サンプルずつ、合計 6 サンプルの DNA メチローム解析を予定している。また、本年度の結果を受けて、昨年度の解析して頂いた解析結果（若齢および高齢の野生型マウスの精子における DNA メチローム解析）との相違についての検討することにより、父親の高齢化によるエピゲノム修飾の中から、仔マウスの行動異常との関連の高い標的エピゲノム修飾を同定することを目指す。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在、ゲノム支援に依頼する中年齢（6~8 ヶ月齢）の野生型ならびに ***Pax6*** 変異精子サンプルを調整中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2010 年度

長鎖非翻訳 RNA を介したクロマチン／染色体機能の制御

基盤研究（A）

太田 邦史・東京大学大学院総合文化研究科

＜背景・目的＞

支援者はこれまでに、分裂酵母のグルコース飢餓ストレスに応答して発現制御される長鎖非コード RNA(lncRNA)を、フルクトース 1,6 ビスホスファターゼ遺伝子上流の 5’遺伝子間領域に見出した(Hirota et al., Nature 2008)。本研究では、類似の lncRNA がグルコース飢餓時に他の染色体領域で発現しているかを、Illumina シークエンサーを用いた RNA-seq により、経時的かつゲノムワイドに検索することを目的として実施した。また、ChIP-Seq によりヒストン密度やヒストン修飾の変化も解析した。

＜支援の内容＞

RNA-seq 及び ChIP-seq 用のライブラリー調整のため、大学院生 2 名が 1 週間、菅野研究室に滞在し、研究者の指導の下サンプル調整を実施した。得られたライブラリーのを Illumina GAIIx を用いて合計８サンプル（野生型×4 時間点、ストレス応答性 lncRNA 発現に関わる転写因子 *atf1* の遺伝子破壊株×４時間点）で、８レーンを用いて１ランを実施した。ChIP-Seq では、ヒストン H３およびアセチル化 H3K9、トリメチル化 H3K4 のヒストン修飾の変化について解析した。配列情報解析や DB 登録に際しても技術面での支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

今回のゲノム支援によって、基盤研究でカバーできない RNA-seq が実施できたこと、また野生型および atf1 変異体で詳細な時間経過を調べることができた。さらに、ChIP-seq により、エピジェネティックな観点から lncRNA の機能を考察することが可能となった。

その結果、

1. 同様な lncRNA の発現する領域をゲノムワイドに探索することができた。
2. それらはいずれも *atf1* に依存性を示すことが明らかになった。
3. それらの一部は、グルコース存在条件でアンチセンス lncRNA の転写をともなっていることがわかった。
4. グルコース飢餓後にセンス lncRNA 転写が増大すると、アンチセンス lncRNA の転写が減弱していく様子を初めて検出した。
5. アンチセンス RNA が mRNA の素早い抑制に関与することが示唆された。
6. 上記の非コード領域の転写に伴って、ヒストン密度の変化やヒストン修飾の変化が起こる領域の特定ができた。
7. 上記の結果を、既に解析しているタイリングアレイを用いた解析データと照合すると、整合性があることが明らかになった。

などの新しい知見を得た。

以上の結果は、lncRNA の転写制御のみならず、グルコース飢餓時のアンチ lncRNA や他のノンコーディング RNA や遺伝子の転写制御に関する重要な基礎データを提供するものである。

また、lncRNA の発現を網羅的に解析する生物情報学的な技術・解析ツールの確立を行い、これらを用いてゲノム支援によって得たデータを解析している。この解析を裏付けるために、ゲノムワイド解析の情報をもとに、分子生物学的な手法による詳細な個別の解析を行うことで、さらなる法則性や新事実の発見を目指している。さらに、システムバイオロジーの観点から、得られたデータをモデル化し、酵母のストレス応答のダイナミクスを「環境適応のモデル系」としてとらえることでノンコーディング RNA が関与した転写制御の合理性を説明することを試みた。また、この系を用いて、数理モデルを構築し、酵母のストレス応答を *in silico* に再現する新たな試みを行なった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回のゲノム支援で新たなグルコース飢餓応答性の lncRNA を同定することができたので、これらの染色体領域の個別解析（シス作用因子の変異体解析など）を進め論文として発表した。また、アンチセンス lncRNA の転写という新しい発見事実を得たので、この生理的意義について研究を開始し、遺伝子発現制御における役割を検証している。また、ヒストンおよび修飾ヒストンのマッピングを行い、上記の lncRNA のマップと比較して、クロマチン制御における役割についても、一部は論文として発表し、残りも投稿中である。また、この支援により、特定の遺伝子座における lncRNA の知見が蓄積したことにより、lncRNA の安定性制御機構が明らかにされ、論文発表につながった。

また、ゲノムワイド解析手法のスキルアップを通じて、別課題の解析の進捗につながり、論文発表に役立った。今回の支援により、単なるゲノムワイドな次世代シークエンサーのデータではなく、RNA 及びクロマチンについての早期ストレス応答の時系列情報、さらには転写因子の変異体を用いたデータも得ることができた。上記の多くの情報がパラメータの多い深みのある高次元データ解析を可能とした。

＜支援成果公表リスト＞

Oda, A. et al., Genes Cells 20, 392-407 (2015)

Galipon, J. et al., Genes Cells 18, 353-368 (2013)

Miyoshi, T. et al., Mol Cell 47, 1-12 (2012)

公募支援課題：2015 年度

愛知県保美貝塚出土資料による考古学・人類学のコラボレーションモデルの構築と展開

基盤研究（B）

太田 博樹・北里大学医学部

＜背景・目的＞

化石など古い生物遺体から抽出した DNA は古代 DNA と呼ばれ、PCR 法をもちいた分析が 1980 年代半ば頃にスタートした[1]。古代 DNA 分析は過去に生きていた生物の遺伝情報を直接手にすることができるため、人類の進化や集団の形成史の研究においても大いに着目された[2,3]。

近年 NGS の普及にともない古代 DNA 分析は新たな局面に突入している。2010 年にはネアンデルタール人ゲノムのドラフトゲノム解読が[4]、2012 年にはネアンデルタール人の姉妹種とみられるデニソワ人の 30 倍カバレッジ・ゲノム解読が発表された[5]。さらに 2014 年には 50 倍以上のカバレッジを誇るネアンデルタール全ゲノム解読が発表され[6]、いま生きている人の全ゲノム解読と差がない古代ゲノム解析が実現し、現生人類との系統関係や混血の可能性が論じられた[4,5,6]。また、古代エスキモーの全ゲノム解析のように、従来の系統論だけでなく、形質特徴に焦点を当てた研究も増加している[7]。

日本国内ではいくつかの研究グループが縄文人などの NGS によるゲノム解析に取り組んでいる。私達もそうしたグループの 1 つである。本研究は系統だけでなく遺跡集団内の血縁構造や各時代の表現型の復元に取り組み、先史時代人の個人ゲノム（personalized genome）を提案する。

【参考文献】下線は本研究の代表者らが発表した原著論文

[1] Paabo (1985) Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. ***Nature*** 314:644-5.

[2] Oota et al. (1995) A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. ***Am J Phys Anthropol***. 98:133-45.

[3] Oota et al. (2001) Genetic study of the Paleolithic and Neolithic Southeast Asians. ***Hum Biol.*** 73:225-31.

[4] Green et al. (2010) A draft sequence of the Neandertal genome. ***Science*** 328:710-22.

[5] Meyer et al. (2012) A high-coverage genome sequence from an archaic Denisovan individual. ***Science*** 338:222-6.

[6] Prufer et al. (2012) The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. ***Nature*** 505:43-9.

[7] Rasumussen et al. (2010) Ancient human genome sequence of an extinct Palaeo-Eskimo. ***Nature*** 463:757-62

＜支援の内容＞

古人骨由来 DNA シーケンスのフィージビリティー試験を行い、その後の進め方のアドバイスを受ける。

＜支援によって得られた研究成果＞

代表者らはこれまでに 113 個体の先史時代人骨の DNA 分析を行ってきた。このうち縄文人骨は 15 個体で、12 個のライブラリーを作成し、イルミナ社の MiSeq のショットガン・シークエンシングによるプレスクリーニングを行い、そのうちの 1 つで 2.6%のマップ率（内在 DNA の割合）を得た。国際的な古代ゲノム研究の共通認識としてマップ率 1.0%以上ならゲノム解読に値する基準と考えられている。この縄文時代人骨は洞穴遺跡からの出土ではなく、従来のライブラリー作成では成功が困難であった温暖湿潤な沿岸部の開地遺跡から出土しており、日本列島に広く点在する開地遺跡から出土する縄文時代人骨の古代ゲノム学の分析可能性を評価するうえでも重要な試料といえる。この“チャンピオン試料”に焦点を当てた高精度ゲノム解読をおこなう計画である。ただし、1 つのライブラリーだけを深く読むと同じクローンからの重複データの問題が生じる。そこで同じ個体由来 DNA からさらに 4 つのライブラリー作成をおこなった。合計 5 つのライブラリーをゲノム支援の HiSeq で解読しようとしている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究では“チャンピオン縄文人骨試料”由来 DNA を用いて、5～10x カバレッジの精度の配列決定を目指す。さらに高精度ゲノム解読が達成されれば、信頼性の高い SNP アレル判定が可能となり、その個体のホモ/ヘテロ接合を正確に決定できる。これにより集団構造や人口動態などに関して、より精度の高いパラメータ推定が可能となり、形態的形質や生理的形質あるいは疾患感受性などに着目した表現型予測を試みる。また、この“チャンピオン試料”は壮年女性で、幼児の遺体とともに埋葬されていた。この幼児のゲノム解析もおこない血縁関係を明らかにする。

＜支援成果公表リスト＞

現在分析進行中のため論文等はまだ無し。

公募支援課題：2014 年度

コガタルリハムシ腸内共生乳酸菌の機能生態の解明

挑戦的萌芽研究

大坪 和香子・東北大学大学院農学研究科（旧所属先：東北学院大学工学総合研究所）

＜背景・目的＞

本研究は、日本の在来昆虫であるコガタルリハムシ（*Gastrophysa atrocyanea*）およびその近縁昆虫であるヨーロッパ原産の *Gastrophysa viridula* が、幼虫成虫共に有害な水溶性シュウ酸を多量に含むヨーロッパ原産の外来雑草エゾノギシギシを選択的かつ旺盛に摂食する生活環について、腸内に共生する微生物の関与を明らかにすることを目的としている。本研究では、腸内フローラの優勢種の単離および解析が困難であったことから、メタゲノム解析による細菌叢の解析を行うことにより、細菌叢の群集構造の種および地域的な相違やシュウ酸分解に関与する機能遺伝子の存在を明らかにすることを目的とした。

＜支援の内容＞

ゲノム支援事業では、*G. atrocyanea* および *G. viridula* の（i）メタ 16S rRNA 遺伝子比較解析、および（ii）メタゲノム解析とシュウ酸分解遺伝子の探索、について支援を頂いている。具体的には、研究代表者が日本国内 4 地点でサンプリングした *G. atrocyanea* およびドイツ国内 2 地点でサンプリングした *G. viridula* の計 20 試料について、腸由来 DNA およびそれを鋳型とした 342F-806R プライマー増幅産物（16S rRNA 遺伝子アンプリコン）を調製し、支援班（林研究室、黒川研究室）に Illumina MiSeq によるシーケンスおよび QC、アセンブリ、および Classification を行って頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

１．メタ 16S rRNA 遺伝子解析

２種の *Gastrophysa* 属ハムシの腸由来 DNA を鋳型とした 16S rRNA 遺伝子アンプリコンのメタ解析の結果、両種において腸内細菌科（*Enterobacteriaceae*）が優勢化していた。その中でも、*Rahenella* 属および *Pantoea* 属が優勢属として共通して見出された。特筆すべき点として、２種ハムシに共通に見出された新規の *Rahenella* 属細菌（SR グループ）の割合が、*G. atrocyanea* よりも *G. viridula* における優勢度が高く、この細菌の存在比が種分化や機能的進化に関与している可能性が考えられた。一方、同種のハムシにおいても採集地による差が見られ、特に早坂高原（岩手県）において採集した *G. atrocyanea* の腸内フローラの構造は、*Rhizobium* 属を多く含むなど、他の試料と大きく異なっていた。また、飼育条件においては、*Enterobacter* など、野外で採集したハムシには見られない系統グループの細菌が多く存在していた。同じ採集地においてサンプリングされた *G. atrocyanea* については１齢幼虫から３齢幼虫までの腸内細菌叢は非常に似ていたことから、腸内フローラは成長プロセスよりも、生育環境（摂食する植物）に影響を受けることが示唆された。

２．メタゲノム解析

２種の *Gastrophysa* 属ハムシの腸由来 DNA を鋳型としたメタゲノムライブラリから、シュウ酸分解を担う酵素遺伝子配列の相同性検索を行ったところ、*G. viridula* のライブラリから、シュウ酸脱炭酸酵素 oxalate decarboxylase をコードする遺伝子配列 *oxdC* が見出された。この配列は、*Pantoea agglomerans* Eh318（植物共生細菌）の *oxdC* と 99%の相同性が見られ、*P. agglomerans* は *G. viridula* の 16S rRNA 遺伝子ライブラリにおいて２番目に優勢的であることから、これらの細菌由来である可能性が示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

２種の *Gastrophysa* 属ハムシの腸内フローラにおいて、植物のエピファイトとして知られている *Pantoea agglomerans* が共通に存在し、優勢化しているという事実は、ハムシが摂食した植物に付着している細菌が、腸内細菌として定着していることを示唆している。このような現象は、ショウジョウバエの腸内に共生する *Lactobacillus* 属などで観察されているが、本支援によるメタゲノム解析では、シュウ酸の分解酵素遺伝子も見出されたことから、外界から取り込まれた当該細菌が単に腸内に定着しているだけではなく、宿主ハムシ腸内におけるシュウ酸分解に関与していることが示唆された。このように、食物から取り込んだ細菌が腸内環境で機能をもつ、というコンセプトは「プロバイオティクス」として知られているが、実際の効果や自然界における現象としての知見は非常に乏しい。そのため、本研究で見出された *P. agglomerans* の生態および機能を、今後の研究で明らかにしていくことにより、自然界に存在する新規のプロバイオティクス機構を証明できることが期待される。

一方、エゾノギシギシを摂食する進化的歴史が長い *G. viridula* の腸内フローラにおいて、特定の細菌（*P. agglomerans* や *Rahnella* 属など）の割合がコガタルリハムシの腸内よりも多かったことから、これらの細菌が、エゾノギシギシの摂食や消化に重要な役割を持っており、コガタルリハムシが明治時代以降に導入された外来種のエゾノギシギシを選択的に摂食するようになった生態適応にも貢献している可能性が示唆された。特に *P. agglomerans* にシュウ酸分解能力を有することが今回のメタゲノム解析で明らかになったことから、酵素遺伝子の発現解析や、さらなるシュウ酸分解関連遺伝子の探索を継続していく予定である。さらに、宿主ハムシのエゾノギシギシの摂食能力やシュウ酸分解能力と、単離したこれらの細菌の感染・定着の関連性を明らかにし、植物–昆虫–細菌の三者共生系の全容の解明を目指す。

＜支援成果公表論文リスト＞

なし

公募支援課題：2015 年度

高温登熟による胴割れ米発生に対する分子育種的解決策の開発

若手研究（B）

大西 孝幸・横浜市立大学木原生物学研究所

＜背景・目的＞

葉緑体とミトコンドリアはどちらも生体内エネルギー代謝に関わるオルガネラであり，生命現象におけるその重要性は広く認知されています． これらのオルガネラは光合成や呼吸を行う「場」のみを提供するに留まらず，自身の遺伝情報（オルガネラゲノム）もまたエネルギー代謝に不可欠な役割を担っています.

オルガネラゲノムの育種への利用は細胞質雄性不稔形質を用いた F1 採取に限られ，これを除けば体系化されていません．本研究によって，イネの栽培域が拡大する過程において，新しい環境条件でも頑健にエネルギー代謝を行うために達成した核ゲノム−オルガネラゲノムの共進化を解明し，作物のエネルギー代謝能力を改変するための基礎知識を理解することで，環境変動適応型の新規有用作物の分子育種に結びつけます.

イネには下記２点の特徴があり，核ゲノム−オルガネラゲノム間の共進化・相互作用を検証する研究材料として最適であると言えます.

(a)環境適応の歴史がある点.

栽培イネ(O.sativa)の祖先種であるO.rufipogon の分布域が熱帯域に限定的であるのに対し，栽培イネの栽培域は熱帯域から北海道まで世界中のさまざまな地域に拡大し，さまざまな環境条件への適応を成し遂げています．すなわち，約１万年の歳月を費やして獲得した環境適応機構やそのゲノム設計を理解できるモデルケースとみなすことができます.

(b)遠縁交雑に甘受的な点.

多くの植物種は種間でゲノムサイズや倍数性が異なるため，種間交雑後に F2 世代以降が得られないという問題が生じます．これに対して，イネ属の多くの種は染色体数(12 本)が維持された２倍体の遺伝情報を保持するため，遠縁な種間交雑においても F2 世代以降の後代まで獲得できます．このことは，さまざまな生息地において固有の環境に応じた進化を遂げたイネ品種を利用し，それらのオルガネラゲノムを取り入れた細胞質置換系統を作出することを可能にします.

＜支援の内容＞

今回の次世代シークエンサー解析には,イネのトータル DNA を用いずに,オルガネラゲノムを精製したサンプルを用いた.これによって,核ゲノムに移行した相同配列に由来するノイズの影響を抑えるとともも,標的配列のみを高いカバー率で解読することが可能となった． しかしながら，得られた大規模データをトリミング条件の吟味が不十分であり，専門的な知識をもっている方に，トリミング条件を最適化してもらう必要がある.

このため，イネ 11 品種について,ミトコンドリアゲノム(mtDNA)と葉緑体ゲノム(cpDNA)の 2 種類ずつ,計 22 サンプルのゲノム解析(イルミナ MiSeq, paired end 300)結果を提供した.

また，Illumina 由来のショートリードデータだけでは，ゲノム解読が不完全であったため，PacBio R2 によるロングリードデータも取得中でありその解析も今後お願いしたい.

＜支援によって得られた研究成果＞

cpDNA を約 2000x のカバー率で解読し,公表されている cp ゲノム配列中に 190 箇所の sequencing error があること，mtDNA を約 500x のカバー率で解読し,公表されている mt ゲノム配列中に 311 箇所の sequencing error があることを明らかにした(未発表)．加えて,公表されているイネのオルガネラゲノムには,リードが一切マップされない領域が複数箇所において認められた.この結果を受けて,今後 Pac Bio R2 による gap closure を試み,正確なイネのオルガネラゲノム配列を公表する計画である.

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後，核ゲノムとオルガネラゲノムの共進化の分子メカニズムを明らかにしたい.

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

タンパク質の高次構造情報に基づく医薬分子設計に向けた基盤的技術の創出

挑戦的萌芽研究

大西 なおみ・北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター

＜背景・目的＞

本研究は細菌性感染症の中で最も毒性の強い炭疽の新規予防法開発に貢献することを目的とする。炭素菌毒素タンパク質複合体の立体構造情報に基づく計算科学的及び構造生物学的アプローチから新規抗炭疽ワクチンの分子設計を行うことを目指す。

一方、我が国の臨床現場に目を転じると、炭疽菌(*Bacillus anthracis*) の最も近縁種であるセレウス菌（*B. cereus*) に感染した患者が重篤な炭疽様病態(菌血症）を引き起こし死亡する例が相次いで報告されている。セレウス菌は環境常在細菌の一つであり、世界各国で発生する食中毒の原因となり下痢や嘔吐症状を引き起こす。非常に興味深いことに、菌血症を引き起こしたセレウス菌は炭疽菌固有のゲノムマーカーに陽性であることが報告され、生化学的にはセレウス菌の性状を示すものの、染色体上にある遺伝子の系統解析からはきわめて炭疽菌に類似の菌種であることが示された。これらの知見は、これまで生化学的性状と一部の遺伝子型に基づき明確に分類・区別されてきたセレウス菌と炭疽菌が、別々の種なのか、同一種の中の変種なのか、進化上の中間種のような菌種が存在するのか、現代の技術と解析法に基づいた系統分類の再議論を強く要求している。そこで本研究計画では、今なお世界各地で流行する炭疽の克服戦略の一環として、炭疽様症状を引き起こすセレウス菌の性状を包括的なゲノム情報に基づき明らかにすることを目的として立案に至った。

＜支援の内容＞

「大規模ゲノム情報生産支援」のなかで、合計 43 株：セレウス菌（食中毒起因株)、高病原性セレウス菌（炭疽様病態起因株)、炭疽流行地域において申請者らが独自に単離した炭疽菌（環境由来株)ならびに炭疽菌ゲノムマーカーに陽性のセレウス菌環境由来株、のシーケンスが遂行された。これらのシーケンスは､申請者らが抽出したゲノム DNA についてライブラリの作製から支援を受け、シーケンスを Illumina 社の Miseq を用いて 300bp paired end で実施された。また、特に臨床情報が詳細に記録されているセレウス菌株 2 株については、Mate pair でのシーケンスが実施された。ゲノム情報解析についても懇切にご指導をいただき、都度の質問にも的確なアドバイスをいただきながら効率よく情報産出を行うことができた。

＜支援によって得られた研究成果＞

林哲也教授、小椋義俊准教授 （九州大学） のもと、食中毒起因菌ならびに我が国で菌血症を引き起こしたセレウス菌、申請者らが独自に単離した炭疽菌ゲノムマーカー陽性のセレウス菌（環境分離株）及び炭疽菌、合計 43 株の全ゲノムシーケンスを行い、被覆度 40 倍以上の配列データを得た。全ゲノム情報の比較に基づく系統解析の結果、我が国で菌血症のアウトブレイクを引き起こした高病原性セレウス菌は、食中毒起因菌と比較してきわめて炭疽菌に近い系統であることが示された。さらに興味深いことに、相同性解析から菌血症を引き起こしたセレウス菌の中には、炭疽菌の病原プラスミドに相同性が高いゲノム領域を持つ菌株が存在する可能性が示された。尚、比較のために国内の異なる地域（東京都と岐阜県）かつ異なる年に発生したセレウス菌アウトブレイク由来株のシーケンスを行った結果、これらのアウトブレイク事例株間の遺伝的多様性は高いことが明らかになった。このことは、これらのアウトブレイクがそれぞれ別の菌株感染に由来する独立事例であることを示すものであり、致死的な菌血症を呈する高病原性セレウス菌は国内に広く蔓延していることが推察された。さらに 2015 年度までに申請者らは、栃木県内で発生したセレウス菌アウトブレイク由来臨床分離株 78 株を入手し同様の解析を進めている。炭疽菌群、セレウス菌群の相同遺伝子分布をさらに解析数を増やして比較し、*Bacillus* 属細菌の病態発現機構及び系統進化を解明していきたいと考えている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

炭疽菌とセレウス菌はこれまで、毒素産生プラスミドの有無や生化学的性状から容易に区別されるとされてきた一方、染色体上にある遺伝子の解析を基盤とした系統解析研究からは元々異論を呼ぶ結果が得られている。これは炭疽菌、セレウス菌ならびに中間菌種の三者の間で起きた分岐の時期があまりに接近しているので、これまでの情報量では本質的な進化系統を示す差異が分子や方法の違いによるばらつきの範囲内に収まってしまっていたと考えられる。本支援によってこれらの限定要因は縮小され、包括的なゲノム情報に基づくゲノム多様性の解明が可能になった。本研究から得られる成果は、炭疽の流行に対する予防、治療法開発の一助となるものであり、この社会的意義は非常に大きい。さらに本研究は、現在までに蓄積された膨大なゲノム情報データベースを活用し、生化学、病態医科学それぞれの研究分野で明らかにされてきた *Bacillus* 属細菌の知見を融合させることで初めて実現可能となるものである。炭疽菌及びセレウス菌の臨床分離株のみならず環境分離株を既に独自に単離し保有している申請者の研究環境は他の研究機関では再現が難しいものであり、今後もさらに特色のある独創的な研究を展開できると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

論文作成中

公募支援課題：2013 年度

細胞内品質管理プロセスを用いた次世代蛋白質生産システム創製

基盤研究（B）

大政 健史・徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

＜背景・目的＞

本研究グループでは Chinese hamster ovary (CHO)細胞のゲノム解明とその応用のために CHO 細胞の全ゲノムをカバーする BAC ライブラリーを構築・活用している。CHO は全世界で生産されている抗体医薬品の 70%以上を生産している宿主であり、最大で 2 万 L の細胞培養が行われ、歴史上、最も大量に培養されている動物細胞であることは間違いない。2011 年現在世界のトップ 20 の医薬品のうち、バイオ医薬品が 7 品目、これらほとんどが CHO 細胞を宿主として生産されている。一方、そのゲノム情報は、やっと 2011 年に CHO-K1 細胞のドラフトゲノムが北京ゲノムセンター（BGI）のグループによって発表されたところであり、産業規模での応用に比較して早急な解明と活用が望まれている。本「ゲノム支援」には、この CHO 細胞のバクテリア人工染色体（BAC）ライブラリーに基づいた CHO 細胞の染色体分類マーカーを利用した染色体物理地図の補完、さらに発現遺伝子解析における補完事項として、下記の項目の支援を希望した。

＜支援の内容＞

現在、CHO 細胞における染色体変動を解析するために、我々のグループでは遺伝子増幅 CHO 細胞より 12 万クローンからなる BAC ライブラリーを構築し、これを用いて、世界で初めて BAC ライブラリーによる CHO DG44 細胞の染色体物理地図を作成している。これは、構築した遺伝子増幅 CHO 細胞由来 BAC ライブラリーを用いた蛍光 *in situ* hybridization（FISH）を行い、特定のクローンの染色体上の位置を推定したものであり、CHO DG44 細胞の 20 本の染色体における BAC クローンの位置を解析し、約 300 個の BAC クローンの位置を特定することにより、染色体変動を解析したものである。現在、この位置を推定した BAC クローンの末端配列については、それぞれのクローンについて配列情報は取得しているものの、そのアノテーション解析については行っていない。そこで、この配列情報を元に、アノテーション解析を行うことにより、CHO 染色体のもつ根源的な不安定性の解析や、染色体上の遺伝子情報の同定、ならびに近縁動物種との比較解析を通じて、CHO 細胞の生産性向上につながる知見を得る基盤を構築することを支援の目的として希望した。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまでに BAC ライブラリーを用いた FISH 法によって Chinese hamster の初代細胞、CHO-K1 細胞株、CHO-DG44 細胞株、さらには産業上利用されている無血清馴化 CHO-DG44 細胞株等の染色体の比較を行っている。その結果、これらの細胞間において安定に保持されている染色体領域と特に不安定な領域がはっきりしていることが示されている。

一方、我々の解析結果によると、この不安定な領域が実際の産業応用される際の目的タンパク質遺伝子の組み込み位置になっている場合が多い。また、CHO 細胞は、ヒト細胞株と異なり、安定形質転換体の取得および、高生産株変異株が得やすく、多数の細胞をクローニングすることにより、より高生産な株を取得できるという特徴があり、これらの染色体領域が重要な役割を担っていると推定される。

これまでは、染色体中に細胞株を超えて安定に保存されている領域と染色体の融合、再編、脱落を繰り返す不安定な領域、それぞれが存在することは解っていたが、実際の配列自体については解明されていなかった。

そこで、本研究では公募支援によって BAC クローンのインサート内に存在する遺伝子リストを CHO-K1 株のゲノムアノテーションデータから抽出し、片側の BAC 末端配列しかアライメント情報が得られなかったもの（F-align, R-align）については、末端配列の読み始めから 150 Kb 上流または下級までの領域を対象に遺伝子の抽出を行った。

ゲノム支援によって新たに得られるこれらの情報と得られた株間の比較データをまとめることにより安定領域に存在する遺伝子・配列構造についての知見を得、これらを元にした、染色体ターゲッティングを活用した、安定領域への生産性遺伝子の組み込みについて新たな知見を得ることができる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで単なる配列情報としてしか価値のなかった末端配列情報から、実際の機能配列への手がかりが得られた。また、現在引き続き行っている様々な CHO 細胞株における BAC クローンの染色体上の位置情報の変化とこれらの末端配列情報を比較することにより、今後様々な形で CHO 細胞のゲノムの安定性・不安定性解析ならびにこの情報を活用した生産性向上株の構築に対する展望が大きく拓けることとなった。

＜支援成果公表リスト＞

現時点で、論文として発表したものは特にない。

（著書 1 件、招待講演 5 件（国内 3 件、国際 2 件））

公募支援課題：2015 年度

ゲノムワイド関連解析から得た顎顔面変形症感受性領域のハプロタイプ同定

基盤研究（C）

岡 晃・東海大学総合医学研究所

＜背景・目的＞

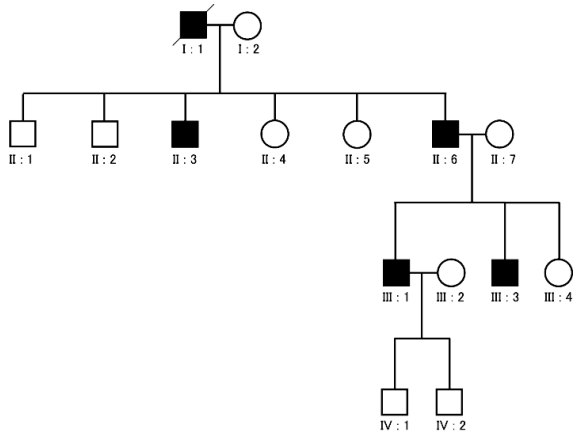
骨格性不正咬合のうち、手術を伴う歯科矯正治療を必要とするものを顎変形症と呼ぶが、そのうち骨格性下顎前突症（反対咬合、受け口とも呼ばれる）は、ハプスブルグ家の例で一般的によく知られるものであるが、欧米人よりも日本人を含むモンゴロイドでの出現頻度が圧倒的に高い疾患である。よって、骨格性下顎前突症の原因遺伝子に関する研究は、サンプルが比較的容易に集められることからも、国内外の関連研究のなかでも我々日本人が担うべきものと考える。

頭蓋顎顔面領域における疾患感受性遺伝子の特定に関する報告は、先天異常を伴わないものでは、今の所、国内外で、歯の先天性欠如に関する論文（*Nature Gent.* 13, 417-21, 1996）など極わずかである。顎変形症に関しては、疾患感受性遺伝子は未だ特定されていない。そこで、日本人の骨格性下顎前突症罹患家系を対象にエクソーム解析を実施し、原因変異の同定を目指すこととした。

＜支援にかかわる研究計画＞

分担研究機関の東海大は現在 NGS を保有していないが、共同研究機関や外注により、エクソーム解析をこれまでに実施している。ゲノム DNA からライブラリーを調整し、他機関にシークエンシングを依頼し、当該機関によりデータの解析ならびにサンガーシークエンシングなどによる変異の confirmation を行っている。すなわち、本ゲノム支援におけるその内容は NGS によるエクソームシークエンシングならびにデータ解析に関する共同研究である。

今回申請する研究は日本人の骨格性下顎前突症罹患家系を対象としたエクソーム解析であり、以下の 1 家系を解析対象に予定している。



＜研究の現状＞

試料収集を予定の家系について、その可否に関する内諾は得られている。しかし、本報告書作成時において、試料収集機関における倫理審査の承認がおりておらず、残念ながら試料収集ができていない。

＜支援によって期待される成果＞

ハプスブルグ家の例で一般的によく知られたこの骨格性下顎前突症であるが、本疾患の家系を対象としたエクソームによる解析例は世界的にも皆無であり、これまでに見出されていない重要な遺伝子座が浮かび上がってくることを期待している。また、本研究から見出された遺伝子は本疾患そのものだけでなく、顔貌形成に関与する可能性もあり、人類遺伝学上、興味深い知見が見出される可能性もある。

公募支援課題：2011～2012 年度

根粒菌３型分泌系によるマメ科植物共生シグナルの活性化機構

若手研究（B）

岡崎 伸・奈良女子大学大学院人間文化研究科、東京農工大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

マメ科植物は根粒菌とよばれる土壌細菌と共生関係を結ぶことが知られている。根粒菌はマメ科植物の根に形成される根粒と呼ばれる器官の中で、空気中の窒素をアンモニアに変換し、植物に供給して生育を促進する。根粒の形成は、根粒菌の分泌する Nod 因子が、植物の Nod 因子受容体に結合して開始されると考えられてきた。しかしながら、私達はこの定説を覆す以下２つの証拠を得ている。

（１）私達が分離した根粒菌 DOA9 株（旧名 55011B 株）は、既知の根粒菌が持つ Nod 因子合成遺伝子を持っていない。

（２）私達は細菌の蛋白質分泌システムの一つである３型分泌系を研究する中で、根粒菌の３型分泌系が、根粒菌の Nod 因子と植物側の受容体から成る相互認証過程を経由せずに、マメ科植物の根粒形成シグナルを直接活性化することを明らかにした。

以上のような状況の中で、本支援では以下の２つの課題を支援していただいた。

（１）新規根粒菌 DOA9 株のゲノム配列： DOA9 株のゲノム解析により、Nod 因子合成遺伝子の存在を明らかにするとともに、他の根粒菌とのゲノム比較により根粒菌の共生戦略とその遺伝子進化を明らかにする。

（２）RNA-Seq 解析による根粒菌３型分泌タンパク質遺伝子の同定：そこで３型分泌系により分泌されるタンパク質（エフェクター）の遺伝子を同定し、３型分泌系による根粒菌の新規共生機構のメカニズムを明らかにする。

＜支援の内容＞

（１）新規根粒菌 DOA9 株のゲノム配列：根粒菌 DOA9 株の全ゲノム配列解読の支援を受けた。具体的には、Roche 454FLX でシングルエンド(1/2 ラン)、ペアエンド(1/2 ラン)のデータを取得し、Newbler v2.6 でアセンブルを行っていただいた。

（２）RNA-Seq 解析による根粒菌３型分泌タンパク質遺伝子の同定:根粒菌の RNA-Seq 解析とその情報学的解析を支援していただいた。具体的には、野生型根粒菌（USDA61 株)と３型分泌系のアクティベーター遺伝子 ttsI の遺伝子破壊株（ΔttsI 株）からそれぞれ RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析を行った。シーケンスデータの情報学的解析により、USDA61 株と比較して ΔttsI 株でリード数が著しく低いものをエフェクター候補遺伝子として抽出するという解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

（１）新規根粒菌 DOA9 株のゲノム配列：シーケンスとアセンブルの結果、DOA9 株のゲノム配列は２つのスキャフォールド(scaffold1：7.1 Mb と scaffold2：0.7Mb)にまとまり、それぞれが環状になった。scaffold1 が主染色体で、scaffold2 がプラスミドと考えられた。Gap 領域を Sanger 法により解析し、最終的には全配列を決定することができた。

（２）RNA-Seq 解析による根粒菌３型分泌タンパク質遺伝子の同定：RNA-Seq 解析により USDA61 株と ΔttsI 株で発現する RNA の配列をそれぞれ 1 億リードほど解読し、発現量に差がある遺伝子を抽出した。USDA61 株と比較して ΔttsI 株で発現量が著しく低下するものをエフェクター候補とした。その結果、既に他の根粒菌で報告のあるものを含む複数の遺伝子がエフェクター候補として検出された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

（１）新規根粒菌 DOA9 株のゲノム配列：本支援により私達単独では予算的、技術的に不可能であった DOA9 株のゲノム配列を解読することができた。近縁根粒菌種とのゲノム比較により、本菌は既知の根粒菌とは顕著にことなる Nod 因子合成遺伝子を持つこと、さらに、マメ科植物との共生に必要な遺伝子をプラスミド上に持つという、新規根粒菌であることが判明した。本成果については PLOS ONE 誌に掲載された。今後、正・逆遺伝学的手法による遺伝子機能の解析により、共生根粒菌の進化や新規共生遺伝子を解明して行く予定である。

（２）RNA-Seq 解析による根粒菌３型分泌タンパク質遺伝子の同定：本支援により、既知のものを含む複数の遺伝子がエフェクター候補として検出された。*nopA* 遺伝子は、３型分泌装置の繊毛部分を構成するタンパク質であると報告されているが、*nopP* 遺伝子は、根粒菌 *Rhizobium* sp.NGR234 株で特定のマメ科宿主との共生に影響を与えることが報告されており(Skorpil et al. 2005)、USDA61 株でもエフェクターとして機能している可能性が高い。また、Neisseria などが宿主の上皮細胞に感染する時に重要な働きをするタンパク質である Opacity protein と相同性の高い遺伝子が２個検出された。Opacity protein の根粒菌共生における報告は未だされておらず、病原性と共生の接点を考える上で非常に興味深い。

現在、上記エフェクター候補遺伝子の破壊株を作成中であり、今後遺伝子破壊株の共生形質を検討することで、根粒形成シグナルを活性化するエフェクターの同定を行う予定である。今後、根粒菌エフェクターの解析を進めることで、病原菌の病原因子として知られる３型分泌機構が、どのように共生に利用されているのか、分子レベルで明らかにできる可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

Okazaki, S. et al., PLOS ONE doi: 10.1371 / journal.pone.0117392. (2015)

公募支援課題：2010~2011 年度

新種の出現：種分化と大進化の分子機構

基盤研究（S）

岡田 典弘・東京工業大学大学院生命理工学研究科

＜背景・目的＞

シーラカンスは 1938 年に初めてその生存個体が確認され、形態的特徴がそれまでに記載されていた化石種と殆ど変化していなかった事から「生きた化石」と呼ばれ、非常に希少な脊椎動物として広く知られていた。そのシーラカンスが、2000 年初頭からタンザニア沖をはじめとする西インド洋の漁師によって混獲される事例が増えたため、タンザニア水産研究所の協力を得てそれらの混獲個体を進化研究のために利用することとした。シーラカンスが生物学的に注目を集めている理由は、その系統学的な位置と、それに起因する高度に発達した鰭構造にある。シーラカンスは一見すると他の硬骨魚類と似た体の構造をしているが、それらの多くは祖先的な形質を保持しているためであり、実際には陸上四足動物を含んだ肉鰭類に分類され、硬骨魚を含む条鰭類とは別のグループである。このことをもっとも如実にあらわしているのが、シーラカンスに特徴的な鰭構造であり、発達した骨と筋肉の構造を有している。つまりシーラカンスは形態的にも魚類と四足動物の中間的存在であり、まさにそのミッシングリンクとなりうる。我々は主に、この魚類（水中に生息）と四足動物（陸上に生息）の間のミッシングリンクを埋める途中段階にあるシーラカンスの様々な器官の形態形成が、実際にどのような分子レベルのメカニズムを経て達成されているのかを詳細に研究し、水中から陸上への移行という極めてダイナミックな分子イベントを DNA レベルで解き明かしていきたいと考えている。

＜支援の内容＞

タンザニア産シーラカンス 1 頭分の全ゲノム DNA 配列の新規決定、インドネシア産シーラカンス 1 頭を含めてさらに 4 頭分の全ゲノム DNA 配列の再決定（リシーケンシング）、シーラカンス個体各組織に発現する RNA 配列の網羅的決定、およびその後のアッセンブル、アノテーションを含めたインフォマティクス解析について支援を受けた。具体的には、新規決分について Hiseq2000 を用いて、筋肉由来 DNA より、PE（paired-end）300bp および 500bp をそれぞれ、24 億リード、20 億リード、鰭 MP（mate-pair）2.5kb および 5.0kbp をそれぞれ 7 億リード、10 億リード、さらに鰭 PE 300bp および 500bp をそれぞれ 26 億リード、30 億リードの配列を収集した。東工大伊藤 GP が開発した *de novo* アッセンブラー「PLATANUS」を用いて全ゲノム配列のアッセンブルをおこなっていただいた。さらには、アセンブルの正確性を確認するために ABI3730xl シーケンサーを用いた Fosmid end sequencing（60,288clone 分）もおこなった。また、RNA seq データはそれぞれ PE を腎臓周囲 3300 万リード、腹鰭 4200 万リード、胸鰭 4400 万リード、咽頭周辺部 3000 万リード、鰓 4000 万リード、尾部筋肉 3200 万リードの配列を収集した。遺伝子アノテーションに関しては、Homology に基づいた方法と *ab initio* による遺伝子部位の予測に基づく方法によっておこなっていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援によって、タンザニア産シーラカンスの全ゲノム概要配列（全長約 2.74Gbp）を決定することに成功した。同時に、シーラカンス個体の各組織にて発現する RNA 配列も網羅的に決定することができた。シーラカンス概要配列は、総計 37861 の Scaffold にまとまり、その N50 は約 331kbp に達した（現在は再解析によりさらに精度が上がっている）。また、この概要配列を参照配列とし、インドネシア、コモロのシーラカンスも含めてリシーケンシングをおこなうことで、現存する全 2 種のシーラカンスの全ゲノム配列を世界に先駆けて決定し、そのドラフト配列に基づいた様々な研究を進める事が可能となった。詳細な解析では、シーラカンスのゲノムは他の脊椎動物と比較したときに、1）遺伝的多様度の指標となるヘテロ接合度が極度に低い、2）DNA の進化速度が他脊椎動物と比較し極度に遅い、3）水中に生息する魚類であるにも関わらず、陸生四足動物に特徴的な嗅覚受容体遺伝子が多く存在する、4）硬骨魚のヒレの発生に必須な遺伝子を維持したまま、四足動物に特異的な四肢の発生に関わる cis 因子も獲得している、事が明らかになった。これらはすべて、DNA レベルで初めて明らかにされた事であり、進化生物学上とても重要な発見であると考えられる。この研究結果は米科学誌 Genome Research に 2013 年 7 月 22 日付で発表することができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

シーラカンスは、これまでに全ゲノム配列の決定されているどの生物種とも遺伝的に近縁ではなく、また DNA 配列が他と大きくかけ離れているため、既存の解析では目的遺伝子のオーソログを単離することが極めて困難であった。その状況の中で、次世代シーケンサーによるゲノム配列の網羅的決定とそれに付随するインフォマティクス解析支援は、上記の研究上の困難をすべて払拭し、一気に様々な DNA 情報を入手することが可能になった。今後はシーラカンスを多個体間を用いたゲノムレベルでの遺伝的分化度の推定など、生態学的な解析も進めていきたいと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

Higasa, K. et al., ***GENE*** 505, 324-332 (2012)

Nikaido, M. et al., ***Genome Res.*** 23, 1740-1748 (2013)

Iwasaki, Y. et al., ***DNA Res.*** 21, 459-467 (2014)

公募支援課題：2015 年度

HLA imputation 法を用いた自己免疫疾患のバイオマーカーの同定

若手研究（A）

岡田 随象・東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

＜背景・目的＞

ヒト 6 番染色体の単腕上に位置する主要組織適合性複合体（major histocompatibility complex; MHC）領域は、多彩な疾患の発症において強い影響を持つことが知られており、大規模ヒトゲノム解析（ゲノムワイド関連解析; genome-wide association study [GWAS]）においても、同領域に顕著な関連を報告する例が多い。MHC 領域内に存在する HLA（human leukocyte antigen）遺伝子が責任感受性遺伝子と考えられ、高いリスクを伴うため疾患の発症や病態の進行を予測するバイオマーカーとしての活用が期待されている。

しかし、(1)：複数の HLA 遺伝子が短いゲノム領域に密集している、(2)：各 HLA 遺伝子ごとに遺伝子多型が数十種も存在し解析が難解、(3)：HLA 遺伝子多型のジェノタイピングが高額なため大規模解析が実施困難、といった事情により MHC 領域内の疾患リスク遺伝子多型の同定は遅れていた。

ハーバード大学（米国）の Raychaudhuri 博士や申請者らは、一般集団で得られた MHC 領域内の一塩基多型（single nucletotide polymorphism; SNP）と HLA 遺伝子多型を参照データとして、既存のゲノムワイド関連解析における HLA 遺伝子多型をコンピューター上で高精度に推定する手法（HLA imputation 法）を開発し、「追加費用無し」での HLA 遺伝子の網羅的解析を実施可能にした。欧米人および東アジア人における HLA imputation 法の適用の結果、関節リウマチや乾癬など、多数の疾患における疾患発症リスクや病態進展予測バイオマーカーとしての HLA 遺伝子多型が同定されている。

HLA imputation 法の適用に際しては予め、1,000 人規模の多数のサンプルを対象に MHC 領域内の SNP と HLA 遺伝子多型を実験的に決定し、参照データを作成しておく必要がある。現在、各人種集団における HLA imputation 法の実装に向けた国際競争が進んでいる。我々は日本人集団を対象とした参照データを作成し、日本人集団に対する HLA imputation 法の実装を行ったが、高精度の HLA imputation を実子するために、より大規模かつ網羅的な HLA 遺伝子多型情報を搭載した参照データの作成が有用と考えられた（Okada Y et al. Nat Genet 2015）。

本研究では、(1)：日本人集団を対象とした大規模参照データの作成による HLA imputation 法の日本人集団への適用拡大、および(2)：日本人集団を対象とした既存の自己免疫疾患のゲノムワイド関連解析への HLA imputation 法の適用を通じた、疾患発症や病態進展を予測するバイオマーカーの同定、を研究期間内の目的としている。

＜支援の内容＞

日本人集団における参照データの作成に際しては、高密度 SNP マイクロアレイによる SNP タイピングと HLA 遺伝子型の決定が必要である。本支援活動においては、次世代シークエンサーを用いた HLA 遺伝子および HLA 関連遺伝子の配列決定が支援対象となった（国立遺伝学研究所：井ノ上逸朗先生、Hosomichi K et al. BMC Genomics 2013, 2014）。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在、支援の結果得られたシークエンスデータの検証を実施中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

既存の HLA 参照データは、特定の HLA 遺伝子の配列を既存の商用キットを用いて決定したものが多い。本研究のように次世代シークエンサーを用いて網羅的に HLA 遺伝子配列を決定した参照データは学術的価値が高く、より詳細な HLA 遺伝子バイオマーカーの同定が可能になると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

（該当無し）

公募支援課題：2010 年度

分子時計による体内リズムの統合機構の解明

特別推進研究

岡村 均・京大学大学院薬学研究科

＜背景・目的＞

特別推進研究（平成 18-22 年度）「分子時計による体内リズムの統合機構の解明、研究課題番号 18002016：代表　岡村均」では、生命現象の基本的な性質の一つである生体時計のシグナルが、遺伝子発現から個体レベルのリズム発現に至るメカニズムとその異常を分子レベルで解明することを目的としている。この研究により、ヒトの新しいステロイド合成酵素の同定とその産生異常による高血圧（Nature Med 2010）、活性化 T 細胞異常による関節リウマチ（J Immunol 2010）、周期延長・睡眠相後退マウスの開発（Nature Com 2011）、生体時計の関与する排尿リズム異常マウス（Nature Com 2013）、時差消失マウスの開発（Science 2013）を報告した。今回、この研究の一環として、ヒト睡眠リズム異常の世界的にもきわめて貴重な血液サンプルを利用した GWAS を行い、体内リズム異常による睡眠障害の病態解明を行う。

＜支援の内容＞

概日リズム障害による不眠は、概日リズム睡眠障害（CRSD）と言われ、その脳内機構、遺伝子機構が解明されている数少ない脳機能の一つであり、遺伝学的検索が精神疾患の中でもっとも有効であると考えられている。今回、国内十数箇所の施設で採取した CRSD の世界的にもきわめて貴重な血液サンプル（対象日本人 502 例）を利用した「ヒト概日リズム睡眠障害の GWAS 解析」GWAS を行った。

研究は、岡村均（代表：京都大学）とともに共同研究者である角谷寛（滋賀医科大学）、海老澤尚（東京警察病院）、三島和夫（国立精神・神経医療研究センター）、山本健（九州大学）が協力して行なった。

＜支援によって得られた研究成果＞

我々は 502 例の日本人 CRSD サンプルを Ilumina OminiExpress で解析した。Quality control として、, call rate <0.95、Minor allele frequency (MAF)<0.01、p<10-7 of Hardy-Weinberg equilibrium (HWE)は除外した。この quality control の結果、739,323 SNP のうち 127,693 SNP を除外した。全てのサンプルの Call rate は ≥0.95 であった。Principal component analysis にて、15 サンプル（2 サンプルは日本人グループと大きく異なるもの、13 サンプルは近親者）を除去した。我々が解析した CRSD は、睡眠相後退症候群 delayed sleep phase syndrome (DSPS)、睡眠相前進症候群 advanced sleep phase syndrome (ASPS)、非 24 時間睡眠覚醒症候群 non-24 hour rhythm syndrome (Non-24)、季節性感情障害 seasonal affected disorders (SAD)である。GWAS 解析では、p<8.17x10-8 のマーカーは検出されなかった。しかし、非 24 時間睡眠覚醒症候群(Non-24) に関しては、p< x10-6 の marker が 6 つ認められた（7.14x10-7、1.88 x10-6、2.11 x10-6、6.51 x10-6、8.54 x10-6、9.66 x10-6）。このうち集積が認められた 2 遺伝子について、マウスの概日リズム中枢である視交叉上核に大量に発現していることを確認した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

生体時計 Biological Clock は、地球の自転にともなう昼夜の規則正しい変動に基づき形成された、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである。しかるに近年、交代性勤務や長時間労働が日常的になり、現代社会は 24 時間活動する不夜城とも言える人工的な社会になってしまった。これにつれ、食事、睡眠などの生活リズムは崩壊の危機に瀕しており、これに起因する生活習慣病等の疾病が緊急の解決すべき課題になりつつある。

この中で一つの鍵になるのは時計遺伝子である。実際、時計遺伝子異常と睡眠障害との関係は一部の ASPS で認められており、Per2 遺伝子の S662G 変異、CK1δ) 遺伝子の T22A 変異が報告されている。

残念ながら、今回の GWAS の結果はサンプルサイズが小さかったため、有意差には達しなかったが、サンプル数を増やして、再度 GWAS を行いたい。CRSD に関しては、前述の時計遺伝子を除いてはゲノムデータは全くなく、その実体は不明である。しかし、時計中枢で有る視交叉上核に発現する時計遺伝子で無い、シグナル伝達物質の多数がリズム異常を引き起こすことは動物実験の結果明らかであり（Nature Commun 2: 327, 2011；Science, 342: 85-90, 2013 他）、CRSD における非時計遺伝子の関与の解析が望まれる。

一般に GWAS は症例数が少ないものには有用でないと言われているが、睡眠障害の臨床検索は非常に進んでおり、たとえば、むずむず脚症候群（RLS）では、GWAS が非常に有効であり（Winkelmann et al. Nat Genet 39:1000-1006, 2007; Plos Genet 7:e1002171, 2011）、RLS903 例、対象例 891 と非常に少ない症例で、有意な SNP 同定に成功している。今後も、我々は、GWAS とマウス SCN の研究と組み合わせて、新たな CRSD の原因と治療に貢献する遺伝子検索を引き続き行なっていく所存である。

＜支援成果公表リスト＞

1：岡村 均：生体リズム異常―時を調律する遺伝子と時を失った社会、平成 22 年度第 2 回睡眠文化研究会（重田眞義・鍛冶恵）、京都（京都大学稲盛財団記念館）、2010 年 9 月 24 日

2：岡村 均：精神神経疾患モデルマウスと体内時計、シンポジウム 3 精神神経疾患と生体リズム（西川徹・柴田重信座長）、第 21 回日本臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本精神神経薬理学会、東京（京王プラザ）、2011 年 10 月 27 日―29 日（10 月 27 日発表）

公募支援課題：2013～2014 年度

シナプス活動依存的遺伝子Ａｒｃの可塑性調節機能の解明

基盤研究（Ｂ）および新学術領域

奥野 浩行・京都大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

我々ヒトを含む動物は経験や出来事を記憶として保持し、後にこの記憶に基づいて判断したり行動したりする能力を持つ。ある種の記憶は分～時間単位の比較的短い時間しか持続しない一方で、ある種の記憶は長期間、場合によっては一生の間、保持される。このような記憶の保持を制御する神経機構、およびそれを支える分子機構の解明は神経科学の長年の目標の一つである。

外部刺激に反応して速やかに誘導される c-*fos* や *Arc* 等の前初期遺伝子(IEGs)の発現は大脳の認知プロセスと良く相関することから、直近の大脳神経活動状態を示す分子マーカーとして脳研究で常用されている。また多くの IEG はシナプスや神経機能調節に直接関与することが次第に明らかになってきた。このため、新規 IEGs の探索を含む活動依存的遺伝子プロファイリングやカタログ化は国内外の多数の研究室で精力的に試みられている。しかしながら、生理的刺激による神経活動の統制は極めて困難であるためサンプルの再現性が乏しく、これまでのところ遺伝子変化の統一的理解には至っていない。さらに、脳組織にはニューロンとニューロン以外の細胞が混在しているうえ、生化学的、形態的、生理的に性質の異なる多種のニューロンタイプが存在する。このため、細胞タイプを特定し、かつ、活動状態を同定した上で RNA をサンプリングする手法が求められていた。

＜支援の内容＞

本研究においては支援申請者らが開発した遺伝子発現レポーターTg マウスを材料に大脳において活性化した細胞のみを単離し、網羅的遺伝子発現解析を行った。「ゲノム支援」の菅野・鈴木シークエンスチームよりサポートをいただいた具体的な内容は、申請者らが調製した活性化単一神経細胞およびごく少数（数個～１０個程度）活性化細胞群由来の cDNA をもとに、①バーコードライブラリ―作成、②HiSeq2500 によるペアエンドシークエンスである。さらに、得られたシークエンス結果をマウスリファレンスゲノム(MM10)にマッピングし、遺伝子毎のリードカウントを算出するバイオインフォマティクス解析に関してもご支援いただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまで支援申請者および共同研究者である尾藤晴彦教授（東京大学）は 2012 年度「ゲノム支援」にて少数の神経細胞群から抽出した RNA-Seq の支援をうけ、活性化神経細胞の遺伝子発現プロファイルを解析している。2012 年度の支援によって得られた RNA-Seq の結果から単一神経細胞を 10～20 個程度集めることにより再現性良く遺伝子解析が行えることが明らかになってきた。2013 年度では更に 10 個以下の神経細胞からの RNA-Seq を行うための条件検討を行った。市販キットおよび論文で報告された超微量 RNA サンプルからの逆転写法や cDNA 増幅法によって得たサンプルを解析し、神経細胞由来の超微量 RNA サンプルからの RNA-Seq に有効なプロトコールを決定することができた。2014 年度においてはさらに活性化単一神経細胞からの RNA-Seq を行った。

これらの RNA-Seq によって、これまでにない精度でマウス海馬において活性化された神経細胞に特異的に発現する遺伝子リストを得ることができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

神経活動依存的な遺伝子発現プロファイルは記憶・学習などの脳の高次機能であるの分子メカニズムの解明に必須情報である。特に、細胞種別に神経活動依存的な単一神経細胞遺伝子発現プロファイルをデータベース化することは基礎研究のみならず疾患研究のためにも極めて重要であり、得られた結果は国内外を問わず大きなインパクトを持つと期待される。本支援によって細胞の存在する場所情報を保持した単一神経細胞トランスクリプトーム解析への道が開けたことにより、神経細胞の個性・多様性の本質に迫ることが可能となったと考えられる。

＜支援成果公表論文リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2015 年度

シナプス可塑性関連因子 Arc による認知機能調節機構の解明

基盤研究（B）

奥野 浩行・京都大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

シナプス活動依存的な新規遺伝子発現は神経伝達やシナプス形態の可塑的変化を長期間保持・持続するために必須な細胞応答である。生理的なシナプス刺激によって誘導される神経特異的前初期遺伝子 *Arc* はシナプス可塑性やシナプス恒常性に直接関わる因子として近年格段の注目を集めている。支援申請者はこれまで、シナプスから核へのシグナリングによる *Arc* 遺伝子の発現制御機構および Arc タンパクのシナプス局在化機構について研究を進めてきた。本研究提案では、Arc による逆シナプスタギング機構の生理的意義の実証をめざし、*Arc* の一過的な活動依存的発現がシナプス調節および大脳認知機能に果たす役割を明らかにすることを目的とする。

これまでの研究により、脳特異的前初期遺伝子 *Arc* を欠損するマウスは記憶形成や精神疾患に関連する指標において異常が見られることが明らかになってきた。そこで、*Arc* 欠損による神経機能異常をもたらす関連遺伝子を明らかにするために、この *Arc* 欠損の遺伝背景をもつマウスの遺伝子発現様式を RNA-Seq 法によって網羅的に解析を行う。活動依存的な *Arc* 遺伝子の欠損による遺伝子発現への影響を調べるためには本来 *Arc* 遺伝子が発現している細胞群のみで遺伝子発現解析を行うことが重要である。このために、支援申請者がこれまで「ゲノム支援」によるサポートを受けて開発してきた活性化単一神経細胞 RNA-Seq 技術を *Arc* 欠損マウスに適用し、*Arc* レポーター発現細胞から構成される活性化神経回路における遺伝子発現プロファイルを決定し、野生型の遺伝子発現プロファイルと比較を行う。

＜支援の内容＞

Arc 欠損マウスと Arc-pro-Venus マウスを交配させた２重遺伝子改変マウスを作製し、その大脳スライスから微小ガラスピペットを用いて正確に標的単一細胞を単離し、そこから cDNA 化反応を行った。「ゲノム支援」鈴木研・菅野研シークエンスチームにより、この単一細胞 cDNA 産物からのライブラリー作製および次世代シークセンサーによる解析を行っていただいた。RNA-Seq の解析試料数は、*Arc* 欠損マウスから得られた活性化単一神経細胞および対照マウスから得られた複数の領域から得られた単一神経細胞由来のサンプルおよび対照サンプルおよび種々のコントロールを含む数十サンプルである。バイオアナライザーで品質評価し、条件を満たすサンプルのみ解析を依頼した。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援によって得られたシークエンス結果はバイオインフォマティクスの専門家との共同研究により解析中である。大脳認知機能を調節する遺伝子群のリストが得られる可能性が高いと考えている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで支援申請者および共同研究者である尾藤晴彦教授（東京大学）は 2012 年度、2013 年度および 2014 年度と３年間にわたり「ゲノム支援」にて RNA-Seq 解析の支援をうけることにより、極少数の大脳神経細胞からの網羅的遺伝子発現解析法を確立した。2015 年度の提案では、これまでに開発した方法を認知障害モデルマウスである *Arc* 欠損マウスに適用することにより、記憶形成に直接かかわる新たな遺伝子を同定を試みる。

本研究支援によって同定された新たな神経活動依存的な遺伝子は、今後 qRT-PCR や in situ hybridization 法(ISH)や免疫組織染色法(IHC)により、脳における発現部位や活動依存的遺伝子発現能を確認する。このスクリーニングによって選択された遺伝子は、培養神経細胞や個体脳を用いた生物学的機能の探索や遺伝子ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスによる生理機能の解析に展開する予定である。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2013 年度

エキノコックス感染初期（虫卵から多胞化嚢胞）における遺伝子発現の推移

基盤研究（C）

奥 祐三郎・鳥取大学農学部

＜背景・目的＞

エキノコックスは世界的に重要な人獣共通寄生虫である。国内においては、エキノコックスの一種である多包条虫 *Echinococcus multilocularis* が重要で、北海道におけるキツネの感染率は約 40%で、野生動物間では高度の流行状態にある。人では、適切な治療を行わない場合肝臓において幼虫が無性増殖し、重篤な経過をたどため、診断および対策が重要である。人は虫卵を経口摂取して感染するため、虫卵の研究が必要とされるが、特別な実験施設がないと研究できないため、虫卵を用いた研究は遅れている。我々のグループは本種の虫卵の採取可能な感染実験研究システムを保有し、虫卵採取が可能である。今回、我々は次世代シーケンサーを用いて、虫卵、活性化虫卵および感染初期嚢胞および培養微小嚢胞のトランスクリプトームを解析することを目的とした。すでにサンガー研究所から公表されているゲノムデータ、成熟嚢胞、未熟成虫、受胎成虫のトランスクリプトームデータと合わせて、主要抗原の発現時期について *in silico* 解析し、特に幼虫感染初期の診断用の抗原およびワクチン候補分子の選択を主たる標的分子とした。

＜支援の内容＞

東京大学の鈴木穣研究室において、前述の多包条虫の各発育段階(4 検体)の mRNA の発現状態を調べるため、次世代シーケンサ IlluminaHiseq を用いて、解読していただいた。さらに、解読されたリードを Trinity による *de novo* アセンブリにより contig 予想、およびサンガー研究所から公表されているゲノムデータへのマッピングにより、各 contig の FPKM 値の算出、アノーテーションを行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

人のエキノコックス症診断には主に血清診断が用いられ、様々な診断用抗原が用いられてきた。幼虫感染の診断用抗原である、Antigen B、Antigen 5、EG 19、EM13 については、主に幼虫において多くの発現が見られたが、Antigen B グループでは、EnAgB8/3 は 3 種含まれ、いずれもが成虫においても発現し、EmAg B8/5 は成虫にのみ発現が見られた。虫卵では、これらの AntigenB、Eg19、Antigen 5 はほとんど発現しなかったが、EM13 と Antigen II/3 については、すべての発育段階で発現し、特に、虫卵での発現が顕著であった。このように、EM13 と Antigen II/3 が虫卵の段階から発現されていることは、人において感染ごく初期における診断が可能であることが示唆された。なお、虫卵の活性化により一部の AntigenB が急激に発現されるようになることが示された。虫卵の活性化により様々な分子の発現が増加し、全体的な代謝系の活性化が示唆された。

Taenia solium の診断用抗原として知られている糖タンパク抗原 Diagnostic antigen gp50 については、多包条虫においては 35 種の存在が予想されたが、発現量が多いものとしては 24 種あり、そのうち成虫で顕著に多いものは 15 種、虫卵で多いものは 6 種、活性化後虫卵から感染初期幼虫に多いものは 5 種あったが、成熟幼虫ではいずれも顕著な発現はなかった。*Taenia solium* においては gp50 が幼虫(嚢虫)感染における有効な抗原である事が良く知られているが、エキノコックスにおいては幼虫感染後期(通常感染が抗体検出法で診断される時期)では gp50 はほとんど発現せず、診断用抗原としては有用ではないことが示唆された。さらに、幼虫周囲は laminated layer (LL) が取り囲み、これらは主に糖タンパクからなることがわかっているが、LL には gp50 の関与はないものと考えられ、LL の主要成分としては、他の糖タンパクの存在が予想された。

我々は今までワクチンの研究を行ない、 EMY163 および TSP3 がワクチン効果を示すことを報告してきたが、これらの分子をコードする遺伝子については誤解していたものと予想された。アミノ酸配列が同じである類似した遺伝子の発現がワクチン効果として重要であることが推定された。また、ワクチンの候補分子が多数発見され、今後のワクチン研究の進展が期待された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

前述した様に、今まで研究されてこなかった虫卵および活性化虫卵のトランスクリプトームが解明され、感染初期の診断に有効な分子の選択やワクチン候補分子の選択を可能となった。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2015 年度

オタマボヤをもちいた発生遺伝学の展開に向けた遺伝学技術の導入と発生現象の調査

若手研究（B）

小沼 健・大阪大学大学院理学研究科

＜背景・目的＞

オタマボヤ (*Oikopleura dioica*) はゲノムサイズが小さく (70 Mb: 寄生虫以外の動物では最小)、遺伝子が高密度に存在する (遺伝子数は 17,000 で、4-5 Kb に 1 つ遺伝子がある)。私たちと同じ脊索動物門に属しながら、細胞数が 3000 個と少なく、受精後 3 時間で孵化し、世代時間が 5 日と短い。すなわち、脊索動物型のボディプランと線虫のような「単純な体の実験動物の利点」を兼ね備えており、新しいモデル動物として、基礎生物学、とくに発生生物学の進展に貢献すると考えられる。

申請者らは、表題の若手研究 (B) を通じて、遺伝子のノックダウン法の確立、胚・幼生の蛍光ライブイメージング法の確立、全 mRNA の配列決定などに成功した。現在、これらの技術や遺伝子情報を土台に、オタマボヤの発生現象そのものの研究に踏み込む状況へと移行しつつある。これらの背景のもと、2015 年度のゲノム支援では、(1)ゲノム情報のインフラ構築と、(2) 胚発生にともなう時間差次的トランスクリプトーム情報の取得を目的とした。

＜支援の内容＞

(1)については、遺伝学研究所の豊田敦先生による支援のもと、PacBio シーケンサーによる日本産オタマボヤのゲノム配列決定と、ゲノム配列のアセンブルに取り組んでいる。オタマボヤは個体間の、および、アリル間の配列多型が多いことが知られているので、その影響を減らすため、オスとメス一匹を選んで掛け合わせて増幅し（すなわち、アリルのバリエーションの数は 4 以下となる）、その子孫から 600 個体分のゲノム DNA を集めた。

(2)については、東京大学の鈴木穣先生による支援のもと、マボヤとオタマボヤの発生段階をカバーした RNA-seq 解析に取り組んでいる。主な目的はリード数の定量解析にあり、解析を予定する試料数は、マボヤで 36 (12 ステージ)、オタマボヤが 43 (13 ステージと成体 4 試料)である。Total RNA は、AGPC 法により調整した。

＜支援によって得られた研究成果＞

PacBio 解析については、600 個体分のゲノム DNA を調整し、ライブラリー作成に適した長さの 50Kb 前後のフラグメントが調整できていることが確認された。ただし、得られた DNA 量は約 15μg で、推奨量の 20μg には届かなかった。ライブラリー作成にはぎりぎりの量という判断を頂いたため、現在追加の試料を採取中で、2 月中旬に送付予定である。

また、申請者らはこの支援期間中に、Illumina HiSeq2000 による配列決定を外注して行った。PE ライブラリーのシーケンスを終え、40Gb 分以上のクリーンデータ（オタマボヤのゲノムサイズの 400 倍以上）を得ている。今後のゲノムアセンブルには、こちらの配列ももちいる予定である。

RNA-seq 解析については、マボヤでは total RNA の採取と調整を順調に終え、送付を完了した。バイオアナライザーによる Quality check と定量の結果、RIN 値は 7.5 以上であり、また RNA 量についても strand-specific なライブラリー作成に推奨される 100 ng を超えており、問題なく total RNA の調整を完了したことが確認された。他方、オタマボヤについても、43 試料について調整を終えて送付したが、このうち 10 試料以上について total RNA 量が不足しているか、RIN 値が低いために再度調整する必要が生じた。オタマボヤの胚ひとつ当たりの total RNA 含量はマボヤの 1/30 程度(約 1 ng)ときわめて微量で、試料採取にはかなりの手間を要するという問題が改めて浮かび上がった。現在、追加の試料を採取しており、こちらも 2 月中旬に送付予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

現段階では、いまだ試料調整の途上であり、データは得られていないが、展望を述べる。

目的(1)のゲノムシーケンスについては、決定済みの Illumina による配列情報と、本支援により得る予定の PacBio によるロングリード配列の双方を合わせてアセンブルを行う。申請者らのグループは、すでに近縁種のマボヤ（ゲノムサイズ 170Mb）で Illumina 解析によるゲノム配列決定をほぼ終えている。オタマボヤのゲノムサイズは 70Mb と比較的小型なので、Illumina と PacBio の双方の結果を合わせれば、精度・効率ともに高いアセンブルができると期待される。リファレンスを構築だけでなく、日本の野性集団から得たリード配列(決定ずみ)や、公開されているノルウェー産のゲノム配列と比較し、同種内での配列多型の実体解明をも視野に入れている。

目的(2)の発生時系列トランスクリプトーム解析では、上記のオタマボヤの追加試料が揃い次第、すぐに送付して解析に入る予定である。申請者らはすでに、リードをマップするための mRNA 配列自体は構築ずみで、リードの定量解析を行う基盤は整っている。得られた結果はデータベースとして公開し、様々な発生学研究に活用する。このように、本支援は、新しいモデル動物の研究を牽引していくための基盤となるもので、独自性、学術的意義ともきわめて高い。オタマボヤの小ささのため、試料を集めるのに時間を要しているが、当初の予定通りの内容でデータ取得を行う予定である。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2011 年度、2013 年度

ポリコーム／トライソラックス複合体による免疫細胞記憶制御機構の解明

若手研究（B）

小野寺 淳・千葉大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

免疫系は、外来病原体の侵入から宿主を守る防御システムである。古くから、麻疹など種々の感染症で一度罹ると二度と罹らないという“二度無し現象”があることが知られていた。この免疫記憶機構の根幹をなすのが、獲得免疫系である B 細胞と T 細胞である。免疫記憶の機構はワクチンなどに応用され、感染症予防に利用される一方、過剰な免疫応答はアレルギーなどの原因となりうる。この免疫記憶機構の分子基盤の解明が我々の研究の大きな目標である。実際に我々の研究グループでは、CD4 陽性 T 細胞(ヘルパーT 細胞)を用いて、ポリコーム群(PcG; H3K27me3 を介した転写抑制)およびトライソラックス群(TrxG; H3K4me3 を介した転写活性)複合体やその標的遺伝子 Gata3 による転写制御機構に関する研究を行ってきた。先行研究において我々は、PcG と TrxG タンパク質が特定の遺伝子座(Gata3)において置換反応を起こすことを見出していた。この現象が特定の遺伝子座においてのみ見られるのか、あるいは普遍的に見られるのかという疑問を持ち、ゲノム支援の公募に申請した。具体的な研究目的は以下の通りである。

- PcG、TrxG タンパク質の標的遺伝子をゲノムワイドレベルで明らかにする。
- 標的遺伝子 Gata3 の転写産物 GATA-3 分子の制御遺伝子をゲノムワイドレベルで明らかにする。
- エピゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を用いて、未解決問題“なぜメモリーT 細胞はナイーブ T 細胞(未感作)に比べて迅速な免疫応答を起こすことができるのか”に対してアプローチする。

＜支援の内容＞

東京大学の菅野純夫先生、鈴木穣先生と共同研究を行い、主として ChIP-seq 解析、RNA-seq の支援をして頂いた。

2011 年度のサンプルは以下の通りである（いずれも ChIP-seq）。

- ES 細胞: Bmi1、Ezh2、Menin、RNAPII。
- B 細胞: Bmi1、Ezh2、Menin、RNAPII。
- CD4 T 細胞: Bmi1、Ezh2、Menin、RNAPII。
- Th1 細胞: Bmi1、Ezh2、Menin、GATA3、H3K27Me3、H3K4Me3、H3K9Ac。
- Th2 細胞: Bmi1、Ezh2、Menin、RNAPII、GATA3、H3K27Me3、H3K4Me3、H3K9Ac。

また上記のシークエンスデータに対して、ピークの抽出、Tag count による結合レベルの数値化データの作成、BED 形式へのファイルの変換、等のデータ解析をして頂いた。

2013 年度のサンプルは以下の通りである。

1) RNA-Seq（サンプルは全てマウス由来のもの）

- ナイーブ CD4T 細胞の TCR 刺激前後での比較（刺激前、刺激後）。
- メモリーTh2 細胞の TCR 刺激前後での比較（刺激前、刺激後）。

2) ChIP-Seq データ解析（サンプルは全てマウス由来のもの）

- ナイーブ CD4T（刺激前）での、RNAPII およびヒストン修飾（H3K9Ac 、H3K4Me3 、H3K27Me3）。
- ナイーブ CD4T（刺激後）での、RNAPII およびヒストン修飾（H3K9Ac 、H3K4Me3 、H3K27Me3）。
- メモリーTh2 細胞（刺激前）での、RNAPII およびヒストン修飾（H3K9Ac 、H3K4Me3、H3K27Me3）。
- メモリーTh2 細胞（刺激後）での、RNAPII およびヒストン修飾（H3K9Ac 、H3K4Me3、H3K27Me3）。

＜支援によって得られた研究成果＞

(a) GATA-3 の ChIP-seq 解析

CD4 陽性 T 細胞の中で、Th2 細胞はアレルギー性疾患の根幹に位置する細胞であると考えられている。我々は ChIP-seq 法により、Th2 細胞を分化誘導するマスター転写因子 GATA-3 の標的遺伝子を網羅的に同定した。次に GATA-3 の結合と、それらの標的遺伝子座のヒストン修飾状態の変化や発現レベルの変化との関連性を評価した。その結果、これまでの考えられていた Th2 細胞分化のモデルを作り替えるような発見があった（論文 6)。この研究では Th2 細胞分化誘導時における GATA-3 の役割について明らかにしたが、並行して行った Th2 細胞機能維持における GATA-3 の役割の網羅的解析も完了し、論文発表をした（論文 3)。また、GATA-3 の共役因子 Chd4 による制御機構についても解析し、一つの転写因子が正負の両面で発現制御を行うメカニズムの一端を明らかにした（論文 5)。

(b) PcG、TrxG 複合体の ChIP-seq 解析

PcG や TrxG 複合体の標的遺伝子に関する解析は、ショウジョウバエやマウスの ES 細胞において盛んに行われている。ES 細胞においては、H3K27me3 と H3K4me3 の両方ヒストン修飾を持つ bivalent 遺伝子が報告され多数の研究例があるが、PcG 複合体と TrxG 複合体の両方の標的となる co-occupied 遺伝子についてはほとんど研究されていない。リンパ球系における上記複合体の解析はほとんどなされておらず、我々が Naïve CD4 T 細胞の Gata3 遺伝子座において PcG と TrxG 複合体の両方の結合が見られることを報告したが、未だ全容の解明には至っていない。

そこで我々は、ChIP-seq 法を用いて ES 細胞および CD4 T 細胞での PcG、TrxG 複合体結合の遺伝子地図の作成を行った。さらに我々は ChIP-Seq 法における結合の形を評価する方法を考案し、Ezh2 (PcG の一種)と Menin (TrxG の一種)のデータ解析を行った。その結果、未分化の ES 細胞と終末分化した CD4 T 細胞では両者の結合パターンの特徴が異なることが分かった。Ezh2 と Menin の両方の標的となる co-occupied 遺伝子の数は ES 細胞で多く、T 細胞で少ない。また、いずれの細胞においても両者の結合レベルは互いに相反する。ES 細胞での co-occupied 遺伝子では Ezh2 と Menin が同じ位置に結合して転写は poised 状態になっているのに対し、T 細胞での co-occupied 遺伝子は多様性を示す。TSS の上流に抑制性の Ezh2、下流に活性型の Menin が結合すれば転写レベルは高く、逆に TSS の下流に Ezh2、上流に Menin の結合が見られれば転写レベルは低いことが分かった。また、T 細胞の分化や機能に重要な遺伝子群の多くが co-occupied 遺伝子に分類されることも分かった。上記のような DNA 結合タンパクの空間的位置と機能との関連についての先行研究はほとんどなく、我々の得た知見は非常に有用であると考えている（論文 1, 2)。

また、PcG 複合体を形成する分子 Ezh2 の欠損マウスの解析により、免疫反応の新たなブレーキ機構を突き止めた（論文 4)。ChIP-seq 解析の結果、当初の予想に反して、Ezh2 欠損マウスで過剰に産生されていたサイトカイン遺伝子には Ezh2 が結合しにくく、Ezh2 は直接サイトカインの産生を抑制していないことが明らかになった。一方で、これらのサイトカインを上流で制御している転写因子の遺伝子には Ezh2 が結合し、その発現を抑制することが分かった。

(c) 免疫記憶細胞のエピジェネティック解析

上記で培った ChIP-seq/RNA-seq の解析方法を応用して、免疫記憶に関する未解決問題 “なぜメモリーT 細胞はナイーブ T 細胞(未感作)に比べて迅速な免疫応答を起こすことができるのか”に対してアプローチした。具体的には、ナイーブ T 細胞とメモリーTh2 細胞の抗原刺激後のエピゲノム解析およびトランスクリプトーム解析を行い、迅速免疫応答を制御する中核因子の同定を目標とした。既にいくつかの候補遺伝子を抽出し、siRNA を用いた解析、KO マウスの作製、KO マウスの解析に着手している。また、これらの候補遺伝子の多くがエピジェネティックな発現制御を受けていることも分かり、免疫記憶細胞の分子基盤の一端が明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援により行ったゲノムワイド解析は、我々が取り組んできたウェットの実験結果を裏付けると同時に、多くの「予想外」の結果をもたらしてくれた。ある分子の働きは、細胞や場面によって多様性を持ち、以前の論文で報告されていた内容と異なるケースは往々にしてありうることが分かった。特定の分子に注目して研究する場合、それらが生物種を超えて普遍的に働く機構および免疫細胞特異的に働く機構の両面からアプローチすることが重要であることを再認識した。具体的には、PcG や TrxG 結合に関する ES 細胞と T 細胞の共通点と相違点などがそれに相当する。つまり、PcG や TrxG に関して一般的に知られている知見のうち、広く適用できるものと特定の場面にしか適用できないものがあることが徐々に明らかとなり、PcG や TrxG 複合体による遺伝子発現制御機構に関する新たな展望が拓けた。

PcG や TrxG 複合体の ChIP-seq 解析では、Peak calling の方法や標的遺伝子の定義法が非常に重要である。そのため、自らプログラミング言語 R を用いて数値計算を行い、様々な角度から検証を行った。ただ、自作の手法では論文の Reviewer から痛烈な批判を受けるといった経験もした。Web 上では様々な ChIP-seq 解析用のプログラムが公開されているが、実際に使用してみると一長一短であり、万能ではないと感じた。しかしながら一つ言えることは、複数の種類のプログラムで検証し、同様の傾向が見られることを確認することが最も信頼のおけるやり方であるということである。こうすることで論文の査読を乗り切り、今後の糧とすることができた。また、学生時代にはあまり理解できなかった統計学についても、少しは理解できるようになるなどの副産物も得られた。

さらには、ゲノムワイド解析により生命は複雑であるということを改めて痛感した。１つの分子、１つの遺伝子では説明できない現象がほとんどを占める。ゲノム、エピゲノム、転写産物の制御、タンパク質の制御、そして偶然が複雑に絡み合って最終的なアウトプットが導き出されるのである。しかしながら、論文にする際には１つ現象に焦点を当てなくてはならない。このギャップをどう克服すべきなのか。自分なりに考えた答えは、その現象が普遍的なものなのか特異的なものなのかを常に意識して取り組むということである。そしてストーリーありきではなく、できる限り忠実に結果を解釈することである。今はなかなか受け入れられない事象でも真摯に取り組んでいけばいつかは報われると信じて努力したい。このように、ゲノム支援では科学的な展望が拓けたのみならず、自分の研究に取り組む姿勢にも変化がもたらされた。

＜支援成果公表リスト＞

1) Onodera, A. et al., *Mol Cell Biol.*, 35, 3841-53 (2015)
2) Onodera, A. et al., *Trends Mol Med.*, 21, 330-40 (2015)
3) Sasaki, T. et al., *PLoS One*, 8, e66468 (2013)
4) Tumes, DJ. Et al., *Immunity*, 39, 819-32 (2013)
5) Hosokawa, H. et al., *PNAS*, 110, 4691-6 (2013)
6) Horiuchi, S. et al., *J. Immunol.*, 186, 6378-6389 (2011)

公募支援課題：2011 年度

ホウレンソウにおける性決定遺伝子コード候補領域の絞り込み

基盤研究（C）

小野寺 康之・北海道大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）は，雌雄異株として知られるが，雄株および雌株の他に雌雄両方の機能を備えた間性株（雌雄同株）も頻繁に見出される．これらの多様な「性」は，ホウレンソウ F1 品種の種子生産（F1 採種）において不可欠な受粉制御に利用される重要形質である．さらに，学術的な観点においても，雌雄同株から雌雄異株へ至る「性」の進化過程を理解する上でホウレンソウは非常に興味深い研究材料である．

筆者はホウレンソウの性決定機構および雌雄異株（雄／雌）の生起機構の解明を目的として，性決定遺伝子の単離を目指している．これまでに，ホウレンソウの雄性決定遺伝子（*Y*）および間性決定遺伝子（*M*）が同じ染色体に座乗していることを明らかにしてきた．さらに，性決定遺伝子の単離に必要なゲノム情報およびリソースを整備するために，性決定遺伝子近傍領域の AFLP 連鎖地図および BAC ゲノムライブラリーを構築してきた．本研究ではこれらの成果を活用して，性決定遺伝子（*Y* および *M*）の座乗領域をカバーする BAC コンティグ作成およびコード領域の絞り込みを試みる．

＜支援の内容＞

① ホウレンソウの性決定遺伝子近傍領域の BAC クローンの末端配列の決定

申請者が性決定遺伝子（*Y* および *M*）と連鎖（および共分離）する分子マーカーを用いて単離した BAC クローンおよびクロモソームウォーキングの過程で単離した BAC クローンの末端配列の決定．

② ホウレンソウ雄特異的領域（組換え抑制領域）の BAC クローンの全配列決定

申請者が行ったこれまでの研究から，ホウレンソウの性染色体における雄性決定遺伝子座乗領域を含むゲノム領域は減数分裂時の組換えが抑制された雄特異的領域（MSY, Male Specific region of the Y chromosome）であることが示された．本支援では，この領域に由来する BAC クローンの全長配列を決定した．

＜支援によって得られた研究成果＞

雄特異的 DNA マーカーを用いて単離した BAC クローンの末端配列情報を用いて，MSY 領域を部分的にカバーする 5 個の BAC コンティグ（総全長 約 680Kbp）を構築した．さらに，これらの MSY-BAC コンティグの末端からの染色体歩行を試みたが，反復配列に阻まれて，コンティグ間のギャップを埋めることはできなかった．

次いで，各コンティグから代表的な BAC クローンを 1～2 個選び（合計 6　個，総全長 約 500 Kb）全長配列を決定した．

その結果，MSY の大部分が，Ty1-copia 型および非自律型 LTR レトロエレメント（SpRE1 および SpRE2 と命名）によって占められている可能性が示された．その一方で，タンパク質コード遺伝子に該当する配列を同定するには至らなかった．以上の結果から，ホウレンソウの MSY は，散在性の反復配列が高度に蓄積している一方で，遺伝子密度が低いことが示された．

ホウレンソウの雄性（*Y*）および間性（*M*）決定遺伝子と連鎖する AFLP マーカーを用いて単離された一部の BAC クローンに関して末端配列を決定した．得られた塩基配列情報を用いて，共優性の SCAR マーカーを開発することに成功した．これらのマーカーを活用して，雄性（*Y*）および間性（*M*）遺伝子が対立では無く連鎖関係にあることを証明するに至った．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

① ホウレンソウの MSY は，遺伝子密度が極めて低いことが分かったので，性決定遺伝子の候補（MSY に座乗する遺伝子群）を効率的に探索する方法として，BAC クローンを用いた染色体歩行の他に，RNAseq 解析を併用することを着想するに至った．

② 筆者は，これまでにホウレンソウは同型の性染色体（X および Y 染色体が同サイズ）を持つが，その近縁野生種（*Spinacia tetrandra*）は異型の性染色体（Y が X よりも 1.65 倍大きい）を持つことを見出している．さらに，両者の性染色体は共通の祖先染色体から進化したことを明らかにしており，性染色体の異型化に関わる進化機構を解明する上で有用なモデルとして注目している．今後は，*S. tetrandra* の性染色体が異型化（Y 染色体が巨大化）した成因を探るために，ホウレンソウ MSY から見出されたレトロエレメント SpRE1 および SpRE2 が *S. tetrandra* の Y 染色体に蓄積している可能性の検証を予定している．

＜支援成果公表リスト＞

Yamamoto K. *et al.*, Molecular evidence that the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L. are located at different loci in a chromosomal region. Heredity, 112(3), 317-324, 2014

公募支援課題：2013 年度

ホウレンソウにおける性決定遺伝子コード候補領域の絞り込み

基盤研究（C）

小野寺 康之・北海道大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

ホウレンソウ（*Spinacia oleracea*）は，雌雄異株として知られるが，雄株および雌株の他に雌雄両方の機能を備えた間性株（雌雄同株）も頻繁に見出される．これらの多様な「性」は，ホウレンソウ F1 品種の種子生産（F1 採種）において不可欠な受粉制御に利用される重要形質である．

ホウレンソウは同型の性染色体対を持っており、Y 染色体はその大部分の領域において減数分裂期に X 染色体と組換えを起こすが、雄性決定遺伝子（*M*）座の周辺は減数分裂期の組換えが抑制された雄特異的領域(MSY, Male Specific region of the Y chromosome)になっている。つまり、Y 特異的領域は X 染色体上のカウンターパート領域（X 特異的領域）との間で組換えが抑制されているため，この領域に座乗する対立遺伝子の間には SNP 等の変異が高度に蓄積していると予想される。本研究では、ホウレンソウの雌雄間のトランスクリプトームの比較解析を通して、性連鎖 SNP 及び性連鎖遺伝子の網羅的同定を試みた。

＜支援の内容＞

ホウレンソウ雌雄異株系 03-009 の雄株および雌株の mRNAseq 解析の支援を受けた．

材料：雌雄異株系統 03-009 の雄株および雌株（開花前の地上部組織）

解析試料数：雄株および雌株から，各 4 サンプルずつ（試料数合計 8）

＜支援によって得られた研究成果＞

雌雄異株系統 03-009 の雄株および雌株(各 8 個体)から total RNA を抽出した．さらに，雌株および雄株 5 個体から抽出した total RNA サンプルを等量ずつ混合し，雄および雌バルクサンプルとした．各 total RNA サンプル（雄シングルサンプル×3，雌シングルサンプル×3，雄バルクサンプル×1，雌バルクサンプル×1）に対して mRNA-seq 解析（100-bp PE）を行い，全てのサンプルから取得されたリード（約 27 Gb）をプールした後に，それらの *de novo* アセンブリを行った．構築された 232,553 本のコンティグ（総全長 122.8 Mb）から，コンタミ配列および冗長性を除いた 190,200 本(総全長 66.8 Mb)の unigene セットをリファレンストランスクリプトームとした．これらの平均長，N50 値および最長のコンティグ長は，それぞれ 351 bp，607 bp および 34,073 bp であった．

次いで，各サンプルに由来するリードをリファレンスへマッピングして，雄特異的 SNP の抽出を試みた．なお， SNP の抽出は全てのサンプルに由来するリードがマップされている領域を対象に行った．また，性連鎖 SNP としての判定条件は，雌シングルおよび雌バルクサンプル（XX）の全てにおいてホモであり，雄シングルおよび雄バルクサンプル（XY）の全てにおいてヘテロとなっているサイトとした．その結果,98 本の unigene から見出された 187 個の SNPs が性連鎖していると判定された．これらの一部について，多型マーカーを作成して連鎖解析を行った結果，期待通りに雄性決定遺伝子との連鎖が確認された．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

現在，本研究で見出された性連鎖遺伝子（unigene）群から，MSY に座乗する遺伝子の選定を行っている．今後，MSY に座乗する遺伝子群に関して，性決定との関連性を調査することを計画している．さらに，MSY 座乗遺伝子の配列情報を利用して MSY をカバーする BAC クローンを単離し，この領域の構造を明らかにすると同時に，雄性決定候補遺伝子の探索を進めていく予定である．

筆者はホウレンソウの雄性決定遺伝子（*M*）および間性決定遺伝子（*M*）が性染色体上の異なる遺伝子座に座乗していることを既に明らかにしている．現在，筆者の研究室では独自のホウレンソウ雌雄異株系統 03-009 および間性系統 03-336 を用いた遺伝解析によって *M* の単離に向けた研究に取り組んでいる．

本支援で構築された 03-009 のトランスクリプトーム配列情報と独自に取得した系統 03-336 の RNA-seq リードデータを組み合わせて，03-009/03-336 間の SNP 情報を取得し，遺伝解析を効率的に展開する体制を整えた．実際に，この成果を活用して系統 03-336 が保持する間性遺伝子（*M*）の座乗領域の精密マッピングに成功している．現在は *M* 遺伝子のコード配列の同定に向けて，当該領域の物理地図の構築を進めている．

さらに,03-009/03-336 間のトランスクリプトーム SNP を活用してホウレンソウの性染色体をカバーする分子連鎖地図（約 100 cM）も構築した．この分子連鎖地図情報と，ホウレンソウと同じアカザ科（*Chenopodiaceae* s.s.）に属する両性植物テンサイ（*Beta vulgaris*)のゲノム情報の比較解析によって，*Spinacia* 属の性染色体の出現機構に関する研究の展開を計画している．

＜支援成果公表リスト＞

Fujito S. *et al.*, Evidence for a Common Origin of Homomorphic and Heteromorphic Sex Chromosomes in Distinct *Spinacia* Species. (2015) G3, 5(8):1663-73

公募支援課題：2015 年度

ホウレンソウ性決定遺伝子座の構造決定および進化過程の解明

基盤研究（B）

小野寺 康之・北海道大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

ホウレンソウは雌雄異株として知られるが，雄株および雌株の他に雌雄両方の機能を備えた間性株（雌雄同株）も頻繁に見出される．ホウレンソウに見られる多様な「性」は，F1 品種の種子生産（F1 採種）において不可欠な受粉制御に利用される重要形質である．筆者は，ホウレンソウの F1 品種育成の効率化に向けて，ホウレンソウの性決定遺伝子の単離および性決定機構の解明を目指している．

申請者はこれまでにホウレンソウの Y 染色体における雄性決定遺伝子座の周辺は減数分裂時の組換えが抑制されており，雄特異的な領域（MSY, Male Specific region of the Y chromosome）になっていることを明らかにした．本研究では，MSY の構造的特徴を理解するために，この領域の一部をカバーする BAC クローン全長配列（総全長　約 500kbp）に含まれる遺伝子および反復配列に関する情報解析を試みた．さらに，雄株および雌株のトランスクリプトームの解析を通して，MSY 座乗遺伝子（転写領域）の新規同定および雄性決定遺伝子の影響下にある遺伝子群の同定を試みた．

また，ホウレンソウ性決定機構解明に向けた研究基盤の整備の一環として，間性系統 03-336 の mRNAseq リードデータを用いて unigene 配列セットの構築も試みた．

＜支援の内容＞

支援１）ホウレンソウ Y 染色体特異的領域に含まれる反復配列ファミリーの新規同定（de-novo repeat family identification）解析：Y 染色体特異的領域に由来する BAC ゲノムクローンの全長配列（約 500 kbp）から反復配列の *de-novo* 同定し，この領域に含まれる反復配列ファミリーに関する定量的なデータの取得を試みる．

支援 2）ホウレンソウの unigene データセットのアノテーションおよび雌雄間で発現量が異なる遺伝子群の GO 解析

支援 3）ホウレンソウ間性系統 03-336 の mRNAseq リードの *de novo* アセンブリ

＜支援によって得られた研究成果＞

支援１）MSY-BAC クローンの一つ(インサート長約 100 kbp)を，RepeatScout を用いて解析した結果，その 62%の配列が反復配列として *de novo* 同定された．これらの大部分は，筆者が以前に同定したレトロエレメント（SpRE1 および SpRE2）に該当する配列であった．本解析で，新規に反復配列を同定することにも成功したが，その由来は現時点では不明である．その他のクローンは現在解析中である．

支援２）ホウレンソウ雄株および雌株間の RNAseq データを用いて雌雄間で発現量が異なる遺伝子群の同定を試みている．現時点の解析結果に基づくと，雌雄間で発現量が異なる遺伝子（転写物）が 1000 個以上あると見積もられた．現在，発現量比較に適切な統計検定について検討を加えている．

支援３）ホウレンソウ間性系統 03-336 の mRNAseq リード（100-bp PE, 4 Gb）の *de novo* アセンブリを行った結果，122,318 本（総全長 68 Mb, N50 = 1,391 bp）のコンティグが構築された．これらから，コンタミ配列および冗長性を除いた 107,116 本（総全長 47 Mb, N50 = 1,036 bp）の unigene セットを構築した．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

筆者は，これまでにホウレンソウは同型の性染色体（X および Y 染色体が同サイズ）を持つが，その近縁野生種（*Spinacia tetrandra*）は異型の性染色体（Y が X よりも 1.65 倍大きい）を持つことを見出している．さらに，両者の性染色体は共通の祖先染色体から進化したことを明らかにしており，性染色体の異型化に関わる進化機構を解明する上で有用なモデルとして注目している．今後は，*S. tetrandra* の性染色体が異型化（Y 染色体が巨大化）と反復配列の蓄積の関係について検証するために，2011 年度の支援によってホウレンソウ MSY から見出されたレトロエレメント SpRE1 および SpRE2 に加え，新たに同定した反復配列ファミリーにも注目した解析を計画している．

＜支援成果公表リスト＞

無し（現在，投稿準備中）

公募支援課題：2010 年度

レトロトランスポゾン由来の遺伝子 Peg10 による哺乳類胎生機構獲得の検証

若手研究（B）

小野 竜一・国立医薬品食品衛生研究所

＜背景・目的＞

申請者は、新規父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg10*（*Paternally Expressed Gene 10*）が哺乳類で高度に保存されているレトロトランスポゾン由来の遺伝子であり、哺乳類に特異的臓器である胎盤の形成に必須な機能を持っていることを証明した。これは、レトロトランスポゾンが哺乳類の進化の過程で、哺乳類の生存に必須な機能を獲得したことを実証した初めての報告である。さらに *Peg10* 同様に 10 個のレトロトランスポゾン由来の遺伝子群 *SIRH* family が真獣類において高度に保存されていることを明らかにしている。これらのレトロトランスポゾンが哺乳類の進化の過程において、いつゲノムに挿入され、遺伝子としてどのような機能を獲得したかを明らかにすることにより、「レトロトランスポゾン獲得による哺乳類の進化」という新たな仮説を実証することを目的としている。

＜支援の内容＞

申請者は、新規父性発現インプリンティング遺伝子 *Peg10*（*Paternally Expressed Gene 10*）が哺乳類で高度に保存されているレトロトランスポゾン由来の遺伝子であり、哺乳類に特異的臓器である胎盤の形成に必須な機能を持っていることを証明した。これは、レトロトランスポゾンが哺乳類の進化の過程で、哺乳類の生存に必須な機能を獲得したことを実証した初めての報告である。さらに *Peg10* 同様に 10 個のレトロトランスポゾン由来の遺伝子群 *SIRH* family が真獣類において高度に保存されていることを明らかにしている。これらのレトロトランスポゾンが哺乳類の進化の過程において、いつゲノムに挿入され、遺伝子としてどのような機能を獲得したかを明らかにすることにより、「レトロトランスポゾン獲得による哺乳類の進化」という新たな仮説を実証することを目的としている。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在までの解析では、明確に *SIRH* family に高い相同性を持つ遺伝子は見つかっていない。このことから、多くの *SIRH* family 遺伝子群は、真獣類と有袋類の分岐後に真獣類でのみ獲得されたレトロトランスポゾン由来の遺伝子であることが判明した。これとは逆に、有袋類でのみ獲得されたレトロトランスポゾン由来の遺伝子が存在する可能性に至り、有袋類に特異的に挿入された *SIRH12* の単離に成功した。また tammar wallaby の *SIRH12* を含む BAC を今回の支援で塩基配列決定を行うことで、詳細なマッピングにも成功した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援結果により、種特異的なレトロトランスポゾン由来の遺伝子獲得が明らかになり、このような種特異性により種分化が起こる可能性が高くなった。今後も、このような種特異的なレトロトランスポゾン由来の遺伝子の単離および、その機能を明らかにすることで、レトロトランスポゾン挿入を介した新たな進化説を提唱、証明していく予定である。

＜支援成果公表リスト＞

Ono R., Kuroki Y., Naruse M., Ishii M., Iwasaki S., Toyoda A., Fujiyama A., Shaw G., Renfree MB., Kaneko-Ishino T., Ishino F.
Identification of tammar wallaby *SIRH12*, derived from a marsupial-specific retrotransposition event.
DNA Research 18(4):211-9 (2011)

小野 竜一, 黒木 陽子, 成瀬 美衣, 石井 雅之, 岩崎 佐和, 豊田 敦, 藤山 秋佐夫, Geoff Shaw, Marilyn Renfree, 金児-石野 知子, 石野 史敏 Identification of SIRH12, a retrotransposon-derived gene specific to marsupial mammals.
横浜、2011 年 12 月 **第 34 回日本分子生物学会年会**

データベース登録した支援結果の Accession No. 及び公開/非公開の区別

Genbank Accession No. JF720345

公募支援課題：2013～2014 年度

ミトコンドリア･色素体以外の共生オルガネラ成立過程の解明

新学術領域研究・マトリョーシカ型進化原理

小保方 潤一・京都府立大学生命環境科学研究科

＜背景・目的＞

光合成生物がもつ葉緑体は、15 億年ほど前に始原真核細胞に共生したシアノバクテリアが細胞内共生進化して出来たオルガネラである。我々は、この細胞内共生進化の初期過程で、宿主ゲノムと共生体ゲノムの統合化や、原核共生体の遺伝子群が宿主核に転移して核遺伝子になったメカニズム、つまり機能を伴った遺伝子転移が生じたメカニズムについて興味を持っている。しかし、この十数億年前の事象を現時点で直接調べることは困難である。そこで、葉緑体の起源や進化とは独立に、わずか 6000 万年前にシアノバクテリアによる一次共生が新たに生じ、葉緑体に似た独自の光合成オルガネラ（シアネレ）を進化させた有殻アメーバ *Paulinella chromatophora* に着目し、この生物のゲノム学的解析から、上記の共生進化の初期過程を類推し、解明しようと企図している。

＜支援の内容＞

本ゲノム支援では、2013 年度には、Illumina Hiseq シーケンサーによる有殻アメーバの ① ゲノム配列の取得とアセンブル、② RNA-seq, TSS-seq による cDNA 配列、転写開始点タグ配列の取得、次いで 2014 年度には、③得られた配列データについてのバイオインフォマティクスによる一次情報解析支援をしていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援により、有殻アメーバ *Paulinella chromatophoran* の極めて精度の高い概要ゲノム配列を世界で初めて得ることが出来た。その結果、この有殻アメーバゲノムは、ゲノムサイズが 1Gb と大きく、リピート領域が全ゲノムの 70%近くを占め、さらに 5b 以下の繰り返しからなるシンプルリピートが大量に含まれる極めて特徴的なゲノムであることが明らかになった。また共生シアノバクテリアや原核生物から多くの遺伝子を水平転移により獲得していることが判明した。興味深いことに、我々の事前の予想に反して、共生オルガネラであるシアネレの配列が核へ転移した跡として生じる nuclear localized plastid DNA (nupDNA) 配列は、全く検出できなかった。またシアネレ・共生シアノバクテリア由来と推定された核遺伝子群も、アミノ酸配列レベルで変異を多く蓄積しており、核に転移してからかなりの年月を経た古参であることが明らかになった。

シアネレは、約 6000 万年前に有殻アメーバに共生したシアノバクテリアに由来するオルガネラだと考えられており、植物･藻類の葉緑体が 15 億年の時と進化を経ているのに比べると、経過時間にしてまだ数パーセントすぎない極めて若いオルガネラである。有殻アメーバの核ゲノム中に nupDNA や、若い転移遺伝子が見つからなかったということは、このわずか 6000 万年の時間のなかで、オルガネラから宿主核への遺伝子転移はもうかなり長い間生じていなかった、つまり、共生体のオルガネラ化に必要な共生体から宿主核への遺伝子移動は、共生成立後の極めて短い時間に完遂した、ということを意味している。この知見は、細胞内共生進化の過程では、共生体から宿主核への遺伝子移動は徐々に、漸進的に進む、と考えられていた従来の学説を大きく修正するものであり、学問的に重要な発見である。

また転移遺伝子のアノテーション解析からは、初期に転移した遺伝子群が光合成システムの光適応や原核型遺伝子発現制御・細胞分裂、アミノ酸代謝等の機能を持つことが示唆された。これらは一次細胞内共生を成立させる上で宿主がまず獲得しなければならなかった機能だと考えられる。

また RNA-seq 解析から、この有殻アメーバにおいて、Spliced leader (SL) 型トランススプライシングが生じていることが明らかになった。リザリア生物群ではこれまで SL 型トランススプライシングの報告例はなく、本研究が最初の発見例となる。有殻アメーバにおいては全タンパク質遺伝子の約 1/4 が、トランススプライシングにより発現制御されていると考えられる。

転写開始点タグ配列の解析からも興味深い知見が得られた。*P. chromatophora* においては、上流プロモーター領域からだけでなく、コード領域内から転写が始まる「転写開始点の乱立現象」が非常に多くの遺伝子で検出された。そして、この現象は転移遺伝子において特に顕著であった。転写開始点の乱立現象や SL 型トランススプライシングといったこの生物の遺伝子発現系の特性は、「プロモーター・5’UTR の獲得」といった遺伝子転移プロセスに影響すると考えられ、一次細胞内共生進化を促した重要な要因ではないかと考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回のゲノム支援によって有殻アメーバのゲノム・トランスクリプトーム情報が整備されたことで、“有殻アメーバ” と”植物・藻類”という、独立にシアノバクテリアを取り込んで光合成生物になった二つの生物系統をゲノムレベルで比較できるようになった。シアノバクテリアを取り込んで光合成生物となるための分子基盤、ゲノムの特性といった、これまで解析が難しかった「真核型光合成生物が生まれるための本当の分子メカニズム」について、比較ゲノム学的手法によるアプローチが初めて可能になったといえる。

＜支援成果公表リスト＞

投稿論文準備中

公募支援課題：2015 年度

新規 RNA 結合タンパク質群による細菌の病原性発現機構の解明

基盤研究（B）

垣内 力・東京大学大学院薬学系研究科

＜背景・目的＞

本研究の目的は、新規 RNA 結合タンパク質群の機能解明によって、細菌の病原性発現の新たな機構を明らかにすることである。これまでに代表者らは黄色ブドウ球菌のゲノム上に見出された機能未知因子群の欠損株ライブラリーを作製し、その中から病原性低下株を検索することにより、新規の病原性因子群を同定してきた。これらの病原性因子群は RNA 結合、RNA 分解、リボソームの構造修飾などの機能を有することから、細菌の病原性因子の新しい機能カテゴリーの存在が示唆される。本研究は、RNA 結合、RNA 分解、ヌクレオチド代謝などの新規機能カテゴリーの病原性因子群の機能を明らかとし、病原性因子の発現を引き起こす新しい細胞内シグナル経路を解明する。

＜支援の内容＞

黄色ブドウ球菌の親株、*cvfE* 遺伝子欠損株、*cvfE* 遺伝子相補株、ならびに、Psm-mec を発現させた黄色ブドウ球菌について、RNAseq 解析支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

代表者らは、新規ヌクレオシド二リン酸分解酵素 CvfE が黄色ブドウ球菌の病原性に必須の役割を果たすことを明らかにしている。CvfE が黄色ブドウ球菌の遺伝子発現に与える影響を明らかにする目的で、親株, *cvfE* 欠損株、及びその相補株について RNAseq を行った。*cvfE* 欠損株において, 親株よりも発現量が 2 倍以上減少もしく増加し、その発現変化が *cvfE* 遺伝子の導入によりキャンセルされた遺伝子群を同定した。

プロモーター活性の低下や定量的 RT-PCR 解析の結果と一致して、*cvfE* 欠損株では、病原性制御因子をコードする *agr* 遺伝子座の発現量の減少が確認された。また、病原性の制御に働く転写因子をコードする SarA ファミリー遺伝子群の発現量が減少していた。また、*pgk* や *tpiA* といった解糖系に関わる遺伝子群やその下流の発酵経路に関わる遺伝子である *adh1*、*ldh1*、*ldh2* の発現量の低下が見られた。

さらに, *cvfE* 欠損株では、*purE* や *purK* といった IMP 合成経路に関わる遺伝子、ならびに、S-methyl-5'-thioadenosine や S-adenosyl-L-homocystein よりアデニンを回収する *pfs* などのヌクレオチド代謝に関わる遺伝子の発現量が増加していた。

以上の結果は、*cvfE* の欠損により、ヌクレオチド代謝、解糖系、病原性制御因子などの様々な遺伝子の発現が変化することを示唆している。

cvfE 欠損株において IMP 合成経路に関わる遺伝子群、ならびに、アデニン回収に関わる遺伝子の発現量が増加していた理由として、ヌクレオシド二リン酸分解活性が失われた結果、ヌクレオシド一リン酸が不足して、それを補う反応がおきていると推測できる。現在、*cvfE* 欠損株において各種ヌクレオチド量の変化が起きているかについて検討を行っている。

cvfE 欠損株においては、解糖系の酵素をコードする遺伝子群とその下流で発酵経路に関わる遺伝子群の発現量が低下していた。*cvfE* 欠損株におけるヌクレオチド代謝経路の変化は、解糖系と発酵経路の酵素の発現変化を導くと推定される。興味深い事に、黄色ブドウ球菌の病原性に必要な RNA 修飾酵素をコードする *cvfA* の欠損株においても、発酵経路にかかわる遺伝子群の発現量の低下、ならびに、*agr* 遺伝子座と SarA ファミリー遺伝子群の発現量低下が観察されている。さらに、臨床上問題となっている Small Colony Variant の表現型を示す *hemB* や *menD* の変異株においても、解糖系の酵素をコードする遺伝子群と発酵経路に関わる酵素をコードする遺伝子群の発現量が減少し、*agr* 遺伝子座の発現量が減少することが知られている。一方、*agr* の欠損株では、これらの解糖系や発酵経路の遺伝子の発現低下は観察されていない。これらの結果は、解糖系や発酵経路の発現量変化が *agr* の発現量変化を引き起こす可能性を提示している。

代表者らは、黄色ブドウ球菌の病原性抑制に働く機能性 RNA Psm-mec を同定している。Psm-mec の作用を明らかにするため、Psm-mec を発現させた黄色ブドウ球菌の RNAseq 解析を行った。Psm-mec の発現により、白血球溶解毒素をコードする遺伝子の発現が減少していることが見出された。さらに、Psm-mec の発現によって、発酵経路にかかわる *adh1* 遺伝子と硝酸還元酵素遺伝子の発現量が減少していた。この結果は、Psm-mec の発現は、病原性因子群以外に、発酵経路にかかわる遺伝子群の発現量を減少させることを示唆している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

黄色ブドウ球菌の病原性発現に必須の役割を果たすヌクレオシド二リン酸分解酵素によるヌクレオチド代謝が黄色ブドウ球菌の病原性制御因子の発現に必要であると同時に、解糖系と発酵経路に関わる遺伝子の発現維持に必要であることが判明した。また、この代謝酵素の発現への寄与は、病原性制御因子の発現に必要な数種類の遺伝子においても共通していた。また、病原性の抑制に働く機能性 RNA によっても、発酵経路に関わる遺伝子群の発現量が減少することが判明した。以上の結果は、解糖系と発酵経路の遺伝子群の発現量が病原性制御因子の発現制御において重要な役割を有することを示唆している。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2012 年度

14 番染色体インプリンティング遺伝子の生理学的機能と発現調節機構の解明

基盤研究（B）

鏡 雅代・国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部

＜背景・目的＞

本研究の目的は、14 番染色体インプリンティング領域の DNA メチル化状態を数塩基レベルで明らかにすることである。本領域には父性発現遺伝子である *DLK1*、 *RTL1*、母性発現遺伝子である *MEG3*、*MEG8*、*MEG9*、snoRNA、microRNA が一群となって存在する。これらの遺伝子発現制御には CpG 配列のメチル化修飾が親由来に異なる Differentially Methylated Region（DMR）が重要な役割をはたしており、本領域には IG-DMR、*MEG3*-DMR の二か所の DMR が存在する。これらの DMR が DMR となっている領域は不明であり、未知の DMR が存在している可能性もある。DNA メチル化状態の数塩基レベルでの解明は、ヒストン修飾、さまざまなメチル化関連因子の結合領域の推定など本領域の遺伝子発現機構解明のためのベースとなる情報である。

＜支援の内容＞

血液由来 DNA 34 検体[Temple 症候群（TS14）（旧 14 番染色体母親性ダイソミー症候群）エピ変異 2 症例およびその両親、Kagami-Ogata 症候群（KOS）（旧 14 番染色体父親性ダイソミー症候群）エピ変異 7 症例およびその両親、KOS 父親性ダイソミー2 症例、TS14 母親性ダイソミー1 症例、KOS 欠失 1 症例、正常コントロール 3 名]、皮膚繊維芽細胞由来 DNA 3 検体[KOS エピ変異 2 症例、正常コントロール 1 例]、胎盤由来 DNA 3 検体[KOS エピ変異 1 症例、KOS 父親性ダイソミー1 症例、正常コントロール 1 例]につき 14 番染色体インプリンティング領域約 1.9 Mb に対するターゲットリシーケンスおよびメチローム解析を施行。

＜支援によって得られた研究成果＞

14 番染色体インプリンティング領域の DNA メチル化状態が塩基レベルで判明した。本領域の DMR において、鏡像関係のメチル化異常を示す TS14 および KOS 患者検体の DNA メチローム解析の結果を比較することにより、インプリンティングセンターとして機能する DMR である IG-DMR, *MEG3*-DMR がそれぞれ約 3 kb の広がりをもつこと、*MEG8*-DMR, *MEG9*-DMR 二か所の新規 DMR を同定した。異なった組織である血液、胎盤、皮膚のメチロームデータを比較においては、組織ごとにメチル化状態は異なりことが明らかとなり、胎盤、皮膚では全体的に低メチル化傾向であった。ただし、IG-DMR についてはすべての組織において DMR となっていた。解析領域内には複数の遺伝子が存在するが、インプリントの有無にかかわらず gene body は低メチル化傾向であることも明らかとなった。

Target resequence は、TS14 および KOS でエピ変異と診断されている症例において、メチル化異常を引き起こす未知の genetic な異常（正常メチル化に必要な因子の結合部位の変異、欠失など）の同定を目的に検索を行ったが、明らかな異常は同定されていない。また、すでに行っていたエクソーム解析でもメチル化異常に関連する遺伝子の変異を同定されていないことから、１４番染色体インプリンティング異常症におけるエピ変異は未知の genetic な異常により生じるものではなく、epigenetic な原因により生じたと推測できる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援により、これまで点としてとらえていた 14 番染色体インプリンティング領域内のメチル化状態が連続した状態でとらえることができるようになった。メチロームデータは UCSC ゲノムブラウザで見られるような形に整理していただき、既存データとの照合も容易にできるようになったことから、領域のメチル化状態とヒストン修飾状態などを比較検討が可能となり、14 番染色体インプリンティング遺伝子発現制御に関連する可能性のある領域の抽出が容易になった。UCSC のデータとの比較で DMR および近傍に CTCF タンパクやヒストン修飾の特徴的な分布を認めており、現在、KOS、TS14 の欠失症例検体を用いて ChIP seq によるヒストン修飾の網羅的解析を進めており、アレル特異的なヒストン修飾を検討している。この結果は、ゲノム支援で得られた DNA メチローム解析結果とリンクすることにより、詳細な本領域内インプリンティング遺伝子発現制御メカニズムが明らかとなる。今後その領域への結合タンパクの検索などから、発現調節メカニズムの解明が進展すると期待できる。

＜支援成果公表リスト＞

1. Masayo Kagami, Takahide Hayano, Kazuyoshi Hosomichi, Kazuhiko Nakabayashi, Maki Fukami, Tsutomu Ogata, Ituro Inoue. Methylome analysis of the 14q32.2 imprinted region in patients with imprinting defects on human chromosome 14. 2nd EUROPEAN IMPRINTING DISORDER SCHOOL COST Action BM1208, May 4th 2015, Paris, France.
2. 鏡雅代、早野崇英、細道一善、深見真紀、緒方勤、井ノ上逸朗、ヒト14番染色体インプリンティング異常症患者における14番染色体インプリンティング領域のメチローム解析、第60回日本人類遺伝学会、2015年10月17日、東京

公募支援課題：2011 年度

哺乳類におけるメラトニンおよびその前駆体の生理学的意義の解明

若手研究（A）

笠原 和起・理化学研究所脳科学総合研究センター

＜背景・目的＞

哺乳類（真獣類）の性染色体の末端には X 染色体と Y 染色体に共通の配列が存在しており、この領域において減数分裂の際に X と Y が対合・組換えを起こす。まるで常染色体のように振る舞うという意味で、この領域は偽常染色体領域（pseudoautosomal region; PAR）と呼ばれる。PAR の領域は小さく（ヒトの場合、X 染色体が 120 Mb、Y 染色体が 50 Mb のうち PAR は 2.6 Mb）、減数分裂時に PAR の内部で組換えを必ず 1 回以上起きるために、単位塩基対あたりの組合え頻度が非常に高く、変異の発生頻度も高い。そのため、PAR は繰り返し配列が多いなど、特有の塩基配列を有している。特に、齧歯類の PAR のサイズは極端に小さいため（マウスは約 0.2 Mb と推測される）、齧歯類の PAR は、染色体の進化、ゲノム配列の進化の未来を見せてくれる希有なゲノム領域であるが、マウス PAR の塩基配列は未知であった。我々は、マウスのメラトニン合成酵素をコードする遺伝子 *Asmt*（acetylserotonin *O*-methyltransferase）が PAR に存在することを見出し（Kasahara *et al*., *PNAS* **107**, 6412-6417 (2010)）、さらにマウス PAR の一部を含む BAC クローンを単離・配列決定を行った。

実はマウスだけでなく、すでにゲノム解読が完了したと宣言されている他の哺乳類も、ヒトを除いて、PAR の大部分の領域についてその塩基配列はいまだに決定していない。ラットに至っては、PAR の存在さえ明らかになっていない。そこで、チンパンジーとオランウータンの PAR 中央部の塩基配列を調べ、比較ゲノム解析ならぬ「比較 PAR 解析」を行おうと考えた。PAR 中央部に位置すると期待される *ASMT* 遺伝子を含む BAC クローンを得て（理化学研究所（現 国立成育医療研究センター）・黒木陽子博士との共同研究）、その塩基配列決定を支援していただいた。

＜支援の内容＞

ASMT 遺伝子を含むチンパンジーBAC クローンとオランウータン BAC クローン（それぞれ 1 クローン）の DNA 塩基配列を決定していただいた。これらの BAC クローンは、FISH 解析によって、どちらの種においても、XY 両性染色体の PAR に存在していることが判明している。ヒト PAR やマウス PAR の塩基配列では繰り返し配列が多く、GC 含量の極端に高い部分が存在することから、本支援における DNA シーケンシングはサンガー法によって行っていただいた。

チンパンジーやオランウータンのゲノム BAC ライブラーのスクリーニングでは、*ASMT* 遺伝子を含む BAC クローンが問題なく単離できたため、マウス PAR を含む BAC クローンも単離できると予想し、マウスについても塩基配列決定を支援して頂く予定だった。しかし、いくつかのマウス系統のゲノム BAC ライブラリーを徹底的にスクリーニングしたが、PAR を含む新たな BAC クローンは得られず、本支援による塩基配列決定をキャンセルした。

＜支援によって得られた研究成果＞

チンパンジーとオランウータンの BAC クローンとも、シーケンシングギャップが 2 カ所ずつ残った。いずれも、PCR で増幅できなかったり、シークエンスが読めなかったりして、ギャップを埋めることはできなかったと報告を受けた。このようにシーケンシングギャップがあるものの、チンパンジーの BAC クローンは 212 kb、オランウータンのは 167 kb の塩基長であった。

これらの BAC クローンと、ヒトゲノム（PAR）やマウスゲノム（PAR）の相同領域の比較を行った。ゲノムのその他の一般的な領域と比べて顕著に異なる特徴として、GC 含量があった。ヒトゲノム平均の GC 含量は 41%であるが、チンパンジー47.7%、オランウータン 47.9%、ヒト 47.8%、マウス 63.0%であり、いずれも高 GC 含量であると同時に、マウスの特異性が際立っていた。

ASMT 遺伝子のコード領域（エキソン）を予測プログラムによって推測し、塩基置換数を計算したが、ゲノムの他の領域と大差はなかった。しかし、*ASMT* の隣の遺伝子 *AKAP17A* がチンパンジー、オランウータンとも BAC クローンに含まれていたが、*AKAP17A* 遺伝子の終止コドンが両類人猿では変異していた。ヒト、マウス、ニワトリ等の相同遺伝子との比較によって両類人猿の配列の方が異常であると考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ヒト、チンパンジー、オランウータン、マウスによる「比較 PAR 解析」が可能になった。さらに、ゲノムの一般的な染色体領域の配列との比較を行い、PAR が共通に有している特徴、ならびに各生物種（特に PAR のサイズが小さいマウス）の PAR の配列が有している特異性を抽出できるようになった。ただし、現状では、*ASMT* 遺伝子～*AKAP17A* 遺伝子周辺の短い塩基配列（ホミノイドの場合は 100 kb 前後、マウスの相同領域はたったの約 16 kb）のみしか解析できない。また、生物種の広がりに関しては、4 種しか情報がない。他の齧歯類（つまりラット）、他の真獣類（例えば、イヌやネコ）の PAR の塩基配列の情報が強く望まれる。

＜支援成果公表リスト＞

現在のところなし。

公募支援課題：2010 年度

植物性染色体を利用した重イオンビーム照射による染色体切断機構と LET 効果の解析

若手研究（B）

風間 裕介・理化学研究所

＜背景・目的＞

雌雄異株植物ヒロハノマンテマはナデシコ科多年生草本であり、哺乳類と同じ XY 型の性染色体で雌雄が決まる。Y 染色体が約 570 Mb と巨大なため、細胞遺伝学的解析には適しているが、ゲノム解析は困難を極めてきた。また、Y 染色体の大部分は組換え抑制領域であるため、遺伝学的なマッピングができず、性決定領域の絞り込みも困難であった。当該科研費では、理研リングサイクロンで発生する重イオンビームを用いて、Y 染色体に様々なサイズの欠失をもたせ、圃場で両性花と無性花を単離して、Y 染色体欠失・性転換変異体ライブラリを作製した。本支援では、ヒロハノマンテマの BAC ライブラリの拡充を行っていただき、我々は、欠失変異体を手がかりとして、Y 染色体上に 2 つあると推定される性決定領域（SPF：おしべ発達促進領域、GSF：めしべ発達抑制領域）のシーケンシングを進めた。

＜支援の内容＞

ヒロハノマンテマの雄株(♂)由来の BAC ライブラリの構築(2010～2012 年度)、および性決定領域の配列を含む 2 つの BAC クローン（102,115 bp と 115,891 bp）のシーケンス(2010 年度)を行っていただいた。BAC ライブラリは、制限酵素サイトのバイアスにより目的クローンが得られない可能性を考慮し、2 種類の酵素を用いて作製していただいた。*Sac*I を用いたライブラリ(SLMB1)は、平均インサートサイズ 105 kb、61,440 クローン、*Hin*dIII を用いたライブラリ(SLMB2)は、平均インサートサイズ 110-130 kb、72,960 クローンからなり、合計で 134,400 クローンのライブラリが完成した。

＜支援によって得られた研究成果＞

支援により、ヒロハノマンテマ Y 染色体の配列解析が可能となった。SPF、GSF 性決定領域由来の BAC 配列を得るため、上記の変異体を用いた欠失マッピングを行った。共同研究先の Edinburgh 大と Oxford 大より Y 染色体に座乗する遺伝子の情報を得て、Y 染色体上の 69 箇所について特異的マーカーを作製し PCR を行った。各変異体について、欠失しているマーカーの情報を集めた。重イオンビームや γ 線等で生じる欠失はなるべく少なくなるという仮説に基づき、連続して欠失する 2 つ以上のマーカーを一続きの欠失と見なし、「各変異体の欠失数の合計が最小になるマーカーの並び順」を巡回セールスマン問題に帰着して求めた。計算は、独自に開発したプログラム DelMapper を用いて行った。その結果、GSF と SPF が Y 染色体の p 腕にマップされ、それぞれの領域を挟み込む最近傍マーカーも同定できた。

SPF 領域と GSF 領域に座乗する BAC クローンをスクリーニングするため、BAC ライブラリの 3D スクリーニングプールを作製した。このプールを用いた PCR により、134,400 クローンから目的のクローンを 2 日で特定できる。スクリーニングの結果、SPF 性決定領域に存在する BAC を 6 クローン、GSF 性決定領域に存在する BAC を 9 クローン得た。これらを 454 シーケンサーや Hiseq 2000 で解読した。SPF 性決定領域については 27 の scaffold からなる計 676 kb の配列を得た。CDS が 147 個予測され、そのうち 87 個はトランスポゾンやレトロトランスポゾン、58 個は機能未知、2 個が既知遺伝子と相同性をもつ遺伝子であった。GSF 性決定領域については 28 の scaffold からなる 1,019 kb の配列を得た。CDS が 249 個予測され、そのうち 125 個はトランスポゾンやレトロトランスポゾン、109 個は機能未知、15 個が既知遺伝子と相同性をもつ遺伝子であった。現在、これらの遺伝子の中から性決定遺伝子の候補を絞り込むため、全ての無性花変異体、（または両性花変異体）に共通して変異のある遺伝子を探索している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援による BAC ライブラリの構築は、性染色体の構築過程についての研究も可能にした。動物でも植物でも、一対の常染色体から性染色体が生まれたと考えられている。常染色体に雄性（Z 染色体では雌性）決定遺伝子が誕生し、その周辺で逆位等の組換えを抑制する変異が生じて原始性染色体が誕生したと考えられている。組換え抑制領域には雄に有利な（雌に有利な）変異が蓄積していき、それに伴い組換え抑制領域が拡大したと考えられる。このような組換え抑制領域の誕生と拡大のサイクルは、ヒト、ショウジョウバエ、トゲウオ、パパイアなどの Y 染色体の構造解析から明らかになったものだが、ヒロハノマンテマは、原始性染色体とヒトの性染色体との中間程度に位置づけられる重要な性染色体のモデルである。Y 染色体のなかで最も早く組換え抑制が生じたと考えられる GSF や SPF 領域と、性染色体構築後に組換え抑制が生じたと領域における、遺伝子の多型頻度や進化速度を計算することにより、どのように X 染色体と Y 染色体が異型化したか、雄らしい遺伝子・雌らしい遺伝子がどのように獲得されたのか、動物と植物とで性染色体の進化過程でどのような違いがあるか、等の性染色体進化に関わる重要な知見が得られると期待される。本研究に関して Oxford 大学の Dmitry Filatov 博士と共同研究を開始した。

＜支援成果公表リスト＞

Ishii K. et al, G3 3, 2121-2130 (2013)
Kazama Y et al. Scientific Rep 6, 18917 (2016)

公募支援課題：2012 年度

ＨＬＡアレル欠失現象を利用したヒト造血幹細胞制御分子の同定

若手研究（Ｂ）

片桐 孝和・金沢大学医薬保健研究域保健学類

＜背景・目的＞

我々の最新の発表により、再生不良性貧血発症のメカニズムが明らかにされつつある。具体的には、①造血幹細胞（HSC）に発現している何らかの抗原に対して CTL が攻撃を行い、その結果 HSC 自身が HLA の発現を低下させることにより CTL からの攻撃を回避する。②その後骨髄内で異常化した免疫細胞から放出される炎症性サイトカインにより、骨髄中の造血が抑制され再生不良性貧血が発症する。我々はこれまでに、再生不良性貧血症例の約 15%において、6 番染色体の短腕で uniparental disomy (UPD) が検出されることを明らかにした(2011. Blood Katagiri et al.)。この UPD 領域は HLA 遺伝子領域を必ず含んでいるため、父方または母方由来の HLA の発現が低下する。治療後の UPD クローンは正常造血により淘汰されるものと推測されたが、我々の解析結果では再生不良性貧血発症直後に認められた UPD クローンは、治療後寛解を得てもなお同程度に検出され続ける。この原因について我々は、UPD という遺伝子異常を選択的に受けた造血幹細胞が、何らかの造血制御因子に異常を起こし、その結果年余に渡り生体内で UPD クローンが検出され続けるものであると考えている。

＜支援の内容＞

当初我々は、一卵性双生児では全遺伝子配列が完全に同一であることに着目し、再生不良性貧血を発症した患者と健常例の一卵性双生児において、疾患発症側のみで somatic mutation または epigenetic 変異が起きていることを想定していた。そこで、再生不良性貧血の発症関連遺伝子を同定することを目的として、両者において末梢血顆粒球由来および口腔内粘膜由来の DNA を対象に、①全ゲノム配列解析、②エピゲノム解析、さらに①、②で同定された遺伝子の、造血組織における発現解析を目的として、骨髄 CD34 陽性細胞由来の RNA を対象に、③RNASeq 解析の支援を希望した。その結果、健常側では検出されない遺伝子変異が疾患発症側で同定され、即ち再生不良性貧血の発症関連遺伝子が初めて同定されることが予想された。さらに RNASeq 解析により骨髄中造血幹細胞における標的遺伝子の発現レベルが患者側で高発現していることが予想され、標的遺伝子由来の抗原が患者側の造血組織において実質的に CTL の標的となっていることが裏付けられることになる。本症例における一卵性双生児は極めて希有な症例であるが、我々はこれを 4 ペア認識している。また、再生不良性貧血を発症し、兄弟間で骨髄移植を施行後ドナーの骨髄が生着したものの、ドナー型晩期生着不全(LGF)を発症し、ドナー型の再生不良性貧血を発症した例も存在する。

支援を希望すた対象検体の詳細を以下にまとめる。

対象症例：一卵性双生児例 1 ペアおよびドナー型 LGF 例 1 ペア。

対象検体：患者と健常人それぞれの末梢血顆粒球由来 DNA および口腔内粘膜由来 DNA、骨髄 CD34 陽性細胞由来の RNA。

各実施項目における検体数：①全ゲノム配列決定; 8, ②エピゲノム解析; 8, ③RNASeq 解析; 4。再生不良性貧血を発症した例と健常例の一卵性双生児およびドナー型 LGF 発症症例において、発症例側のみで造血制御に関わる何らかの遺伝学的変異が起きていることを予測し、末梢血顆粒球または骨髄単核球由来、口腔内粘膜由来の DNA を対象に、双方において全ゲノム配列決定を計画した。本研究計画では、健常側では検出されない遺伝子変異が疾患発症側で同定され、再生不良性貧血という造血幹細胞のクローン選択が起こり得る状態において、選択されたクローンのゲノム異常を明らかにすることにより、再生不良性貧血における造血抑制メカニズムが解明される可能性が考えられた。支援を受けた具体的内容は、骨髄移植後にドナー型 LGF を発症した症例と、そのドナーから、末梢血顆粒球 DNA 採取し、加えてドナーの口腔内粘膜由来 DNA を採取し、それらを対象に全ゲノムシークエンスを施行していただいた。バイオインフォマティクス解析は、自施設で実施した。

＜支援によって得られた研究成果＞

ドナーには認められず LGF を発症した例でのみ認められた遺伝子変異が約 80 個見つかった。その中で nonsynonymouse な遺伝子は 4 つほどあり、かつ機能的に我々が目的としている遺伝子は 1 つである。ただし、その遺伝子変異（SNV）は、sanger 法では同定されず非特異的な結果であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回は 1 ペアのみを対象にした解析であり、今後、症例異数を増やして解析を進めることで、仮説を裏付ける変異が同定される可能性が考えられる。また、クローン性造血のメカニズムを遺伝的に解明するという目的にとどまらず、一卵性双生児を対象とした疾患発症遺伝子の同定にも取り組んでいきたいと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

なし。

公募支援課題：2015 年度

発作性夜間血色素尿症（PNH）形質を利用したヒト造血幹細胞動態の解明

若手研究（B）

片桐 孝和・金沢大学医薬保健研究域保健学類

＜背景・目的＞

再生不良性貧血(aplastic anemia, AA)、発作性夜間血色素尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome、MDS)といった骨髄不全症候群では、様々な染色体異常やゲノムコピー数の異常が知られているが、その意義については不明な点が多い。我々は、AA 患者の 40%において、MDS でしばしばみられる DNMT3A、ASXL1、BCOR などの変異がみられることを明らかにした（N Engl J Med, 2015）。免疫病態による骨髄不全患者では、PIGA 変異幹細胞や、第 6 染色体短腕の片親性ダイソミー（6pUPD）を起こした造血幹細胞によるクローン性造血がしばしば検出される。これらの細胞が産生するクローン性血球集団は、GPI アンカー膜蛋白や、HLA-A アレル欠失という細胞表面形質を利用して純化することができる。このようなクローン性血球集団と、それ以外の血球集団との間でゲノム変異を比較し、ゲノム変異がクローン性造血にどの程度関与しているかを明らかにする。

＜支援の内容＞

平成 27 年 12 月末日時点では、解析が進行している状態であるため、申請した支援内容を以下に示す。

再生不良性貧血（aplastic anemia, AA）、骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndrome, MDS）、発作性夜間血色素尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH）は、造血幹細胞の異常に起因し、共通点が多いことから、近年では骨髄不全症候群と呼ばれている。この骨髄不全症候群においては、様々な染色体異常やゲノムのコピー数の異常などが知られているが、その意義については不明な点が多い。

我々の次世代シークエンサーを用いた最近の研究により、AA 患者の 40%において、MDS でしばしばみられる DNMT3A、ASXL1、BCOR などの変異がみられることを明らかになった（Yoshizato, Katagiri, Nakao, et. al, N Engl J Med, in press）。しかし、検出されたゲノム変異の多くは臨床的な意義が不明のものであるため、これらの異常が患者の予後にどのような影響を及ぼすかについても明らかにされていない。

免疫病態による骨髄不全患者の末梢血では、PIGA 変異幹細胞や、第 6 染色体短腕の片親性ダイソミー（6pUPD）を起こした造血幹細胞によるクローン性造血がしばしば検出される。これらの細胞が産生するクローン性血球集団は、GPI アンカー膜蛋白や、HLA-A アレル欠失という細胞表面形質を利用して純化することができる。このようなクローン性血球集団と、それ以外の血球集団との間でゲノム変異を比較すれば、上記のゲノム変異がクローン性造血にどの程度関与しているかを明らかにすることができる。

支援を希望する対象検体の詳細を以下にまとめる。

対象症例：6pUPD(+)の AA 例 5 症例。
対象検体：6pUPD(+)の各 AA 症例について、末梢血中顆粒球における①6pUPD 陽性分画由来 DNA、②非 6pUPD 陰性分画由来 DNA、③口腔内粘膜由来 DNA（5 症例×3＝15 検体）。

各実施項目における検体数：Whole exome 解析；15 検体。

解析結果の情報解析の希望：解析は本学で実施する。
その他コメント： ①coverage ×1,000 を希望する。
②ターゲットサイズは 59Mb(All exon + lncRNA)を希望する。

＜支援によって得られた研究成果＞

なし（平成 27 年 12 月末日時点では、支援が進行している状態であるため。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

なし（平成 27 年 12 月末日時点では、支援が進行している状態であるため。

＜支援成果公表リスト＞

なし（平成 27 年 12 月末日時点では、支援が進行している状態であるため。

公募支援課題：2014 年度

高次宿主制御を司るバキュロウイルス組織トロピズムの分子解剖

基盤研究（B）

勝間 進・東京大学大学院農学生命科学研究科

＜背景・目的＞
昆虫ウイルスの多くは経口感染により伝播し、最初に侵入する組織である「中腸でのみ」複製・増殖を行う。一方、昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルスの多くは、例外的に中腸にとどまらず、気管や血液を介して中枢系を含めた全身に移行し、「全身感染」を確立することが知られている。申請者は、最近、このバキュロウイルスの「全身感染」において、組織トロピズムが存在し、絹糸腺やマルピーギ管、中腸ではウイルスの増殖が抑制されていることを定量的に証明した（Katsuma et al., 2012, J. Virol.）。しかし、この組織トロピズムを実現しているウイルス遺伝子、およびその分子機構はそのほとんどが未解明である。本研究では、ウイルス・宿主の両面からこの現象の分子解剖を行い、責任遺伝子を網羅的に同定するとともに、高次宿主制御における役割を解明する。

＜支援の内容＞
(1) バキュロウイルス(BmNPV)感染カイコ中腸の RNA-seq
・野生株 BmNPV 感染中腸
・経口感染力欠失 BmNPV 感染中腸
・ウイルス非感染中腸
(2)マキュラウイルス感染カイコ培養細胞の RNA-seq
カイコマキュラウイルス感染培養細胞：感染後 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間, 2 週間, 持続感染細胞
(3)強病原性バキュロウイルス感染細胞の RNA-seq
・強病原性 BmNPV 感染培養細胞
・標準野生株 BmNPV 感染培養細胞

＜支援によって得られた研究成果＞
(1)カイコに感染するバキュロウイルス BmNPV をカイコ幼虫に経口感染させ、中腸における遺伝子発現を継時的に RNA-seq に供した。その際、経口感染が損なわれている変異体とウイルス非感染中腸も同時に解析することで、中腸にウイルスが侵入した時の宿主の反応について、遺伝子発現レベルで明らかにすることができた。

(2) 細胞レベルでのウイルス増殖トロピズムを解明するために、バキュロウイルスとは異なりカイコ細胞に対して持続感染を成立するカイコマキュラウイルス（Katsuma et al., 2005, J. Virol.）とマキュラウイルス非感染細胞（Iwanaga et al., 2012, J. Virol. Method）を用いた RNA-seq 解析を行った。マキュラウイルス感染時の宿主細胞における遺伝子発現を調査した結果、持続感染成立までに発現変動する宿主遺伝子を多数同定することができた。その中には、細胞接着に関わる因子も存在し、それらの発現上昇によって細胞塊が形成されることが示唆された。一方、ウイルス量は途中までは上昇するが、ある時点を境に減少することが明らかになった。他の解析結果から、この抑制は小分子 RNA 経路によるものであることが明らかになった。

(3) 病原性と遺伝子発現の関係を調査するために、強病原性 BmNPV と標準株 BmNPV を同じカイコ培養細胞に感染させ、継時的にサンプリングし、RNA-seq を行った。その結果、2 つのウイルス間で発現が異なるウイルス遺伝子と宿主遺伝子のリストを作成することができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
(1)これまでバキュロウイルスの経口感染における宿主応答に関して、詳細に解析した報告はない。今回の研究で、経口感染時に発現変動する宿主遺伝子や中腸で発現するウイルス遺伝子を同定することができた。今後はこれらの遺伝子に注目して、バキュロウイルスの組織トロピズムについて研究を進める予定である。

(2)マキュラウイルス感染時の宿主細胞における遺伝子発現を調査することで、マキュラウイルスの持続感染時には宿主の小分子 RNA 経路が機能し、マキュラウイルス量を制御していることが明らかになった。今後、致死性感染をもたらすバキュロウイルス感染時の遺伝子発現と比較検討することで、持続感染と致死性感染がどういった要因で分かれているのかを解明できるかもしれない。

(3)現在、RNA-seq データをもとに強病原性 BmNPV のゲノム配列のアセンブリを行っている。今回得られた遺伝子発現データとゲノム多型を比較することで、病原性や遺伝子発現などに関与する領域のファインマッピングが可能になると考えている。

＜支援成果公表リスト＞
なし。

公募支援課題：2015 年度

真骨魚類の淡水・海水適応を担うイオン輸送体の解析

基盤研究（B）

加藤 明・東京工業大学大学院生命理工学研究科

＜背景・目的＞

真骨魚体液のイオン組成や浸透圧はヒト体液とほぼ同じである。淡水魚はエサを食べなくても淡水中に含まれるわずかなイオンを吸収して生きることができる。一方高塩濃度の環境に棲息する海水魚はエラや腎臓からイオンを積極的に排出し、体液のイオン組成や浸透圧の恒常性を維持する。魚類の環境適応に必要な、濃度勾配に逆らったイオン輸送を担う分子機序の多くは生理学上の open question となっている。申請者らは、2002 年に魚類で最初にゲノム配列が公開されたトラフグ（海水魚）とその近縁種で淡水・海水の両方で棲息可能なメフグ、時にはゼブラフィッシュをモデルに用い、真骨魚の淡水・海水適応を担う上皮輸送機構の解析を行ってきた。ゲノムデータマイニングと系統解析をベースにした遺伝子ファミリーの同定、網羅的な組織発現解析、組織・細胞レベルでの局在解析、およびイオン輸送体の電気生理学的な活性測定などの手法を用いて、メフグ腸における重炭酸輸送体の網羅的な発現解析から飲水した海水中のカルシウムを炭酸塩として析出させる仕組みに関わる重炭酸分泌機構を初めて明らかにした（Am J Physiol 294: R1402-12, 2008)。また海水魚は二価イオンを尿中に濃縮して排出するが、海水メフグ腎臓における網羅的な発現解析から、SO_4^{2-}, Ca^{2+}の尿細管分泌を担う輸送体 Solute carrier (Slc) 26a6, Na^+/Ca^{2+} exchanger Ncx2 の特定に初めて成功した（Am J Physiol 297: R1647-59, 2009, Am J Physiol 301: R1427-39, 2011)。Mg^{2+} 輸送体の網羅的な発現解析から尿細管細胞の細胞内液胞に局在する Mg^{2+} 輸送体 Slc41a1 を同定し、transcytosis の関与を示した（Am J Physiol 205: R385-96, 2013)。ヒト家族性低マグネシウム血症で変異が観察される Cyclin M (Cnnm) 遺伝子の相同遺伝子を調べると、腎臓における Cnnm2 の発現が淡水適応時に上昇する一方,Cnnm3 の発現は海水適応時に上昇することを見出した（Am J Physiol 307: R525-37, 2014)。淡水メフグ腎臓に高発現する Na^+-Cl^- cotransporter (NCC) は海水飼育時に down regulation され、トラフグ腎臓では全く発現しないことを見出し、腎臓の NCC が魚類の淡水適応に必須だという説を提唱した（Am J Physiol 300: R284-97, 2011)。淡水魚エラには NH_4^+ 排出と交換に淡水中の微量の Na^+をとりこむ仕組みが存在する。ゼブラフィッシュ Na^+/H^+ exchanger (Nhe3) の電気生理学的な活性解析から、Nhe3 が NH_4^+ も基質とし Na^+/NH_4^+ 交換輸送を担う事を初めて明らかにした（Am J Physiol 306: R315-27, 2014)。

＜支援の内容＞

モデル生物という視点で見るとトラフグやメフグはサイズが大きいため特定の小さな組織を純化して集めるのに適しており、これは広く用いられているゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類に無い強みである。この特徴を生かし、腎臓など浸透圧調節に係る臓器から特定の組織を集めて RNA-Seq 解析を行う。

＜支援によって得られた研究成果＞

トラフグ腎臓より顕微鏡下で近位尿細管と集合管を集めることに成功した。抽出した RNA の品質が悪かったため解剖から RNA 抽出までの作業手順を見直している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

高品質の RNA が得られて RNA-Seq 解析を行うことで、その解析結果から体液ホメオスタシスを担う未解明の分子機構に対して独自の仮説を提唱することができる。組織・細胞レベルでの局在解析、電気生理学的・生化学的な活性測定を行い、得られた仮説を実験的に証明することを試みる。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし。

公募支援課題：2014 年度

ホタルルシフェリン生合成経路の解明とキラルフリー発光システムへの応用

基盤研究（C）

加藤 太一郎・鹿児島大学学術研究院理工学域理学系（異動前：兵庫県立大学大学院工学研究科）

＜背景・目的＞

ホタルの発光は、酵素ホタルルシフェラーゼが、基質 D-ルシフェリンをオキシルシフェリンへと化学変換することで実現される。本現象は化学発光の一種であり、蛍光発光と比較して S/N 比が高いこと、細胞深部の標的でも検出可能であること等の優位性から、医療・食品など様々な分野における検出やバイオイメージング手法として応用されている。このように今や我々の生活に欠かせない存在となっている発光反応であるが、基質構造中に不斉点が存在することが問題となっている。

つまりルシフェリン分子は 1 つの不斉炭素を有しており、D-体 L-体という一組の光学活性体が存在するが、これらの内、現状の発光反応条件では D-体が発光基質として利用できる一方、L-体は強い発光阻害剤として働き、定量的な発光反応の発現を妨げたり、再現性を低下させたりする原因となっている。またルシフェリン分子は、中性付近でも容易にラセミ化することが知られており、系中における光学純度の維持が困難な場合もある。申請者は、本問題を解決するために D-ルシフェリンの生合成経路に着目することで、D-体 L-体いずれからでも効率よく発光するキラルフリーシステムを構築することを計画した。具体的には、L-ルシフェリンはホタルルシフェラーゼに対して、発光とは全く違う触媒活性、立体選択的チオエステル化活性、を発現させる。本活性は L-ルシフェリンの発光阻害の解除に関わっていると考えられている。つまり活性部位に強く結合している L-ルシフェリンは、本活性によって補酵素 A(CoASH)と反応し L-ルシフェリル-CoA へと変換される。これによって酵素との親和性が低下し、阻害が解除されるというわけである。

しかし申請者らは、上記チオエステル化活性が、実は D-ルシフェリン生合成のために利用されているのではないかと考えた。申請者はこれまで、チオエステル化酵素とエピメリ化酵素、加水分解酵素の 3 種を組み合わせることで、立体反転を伴ってラセミ体から光学活性体を 100%の収率にて得るデラセミ化プロセスを構築する研究を行ってきたが、ホタル体内でもこのようなデラセミ化様立体反転プロセスが進行し、L-から D-ルシフェリンが生合成されているのではないか考えた。そこで、これに関与する酵素群を明らかにするための提案を行った。

＜支援の内容＞

申請者は、ホタル D-ルシフェリン生合成経路を利用したキラルフリー発光システムの構築を目的とした研究を行うことを計画している。ただし、想定している生合成経路は予想の段階であり、その経路に関与すると考えられる酵素タンパク質も未同定であった。よって本ゲノム支援活動によって、以下の 2 種類の解析を依頼した。

①ゲンジボタルおよびヘイケボタルの成虫発光器に対するトランスクリプトーム解析(RNA-seq 解析) [2 検体]

②ゲンジボタルおよびヘイケボタルの全ゲノム配列解析 [2 検体]

＜支援によって得られた研究成果＞

まず、①ゲンジボタルおよびヘイケボタルの成虫発光器に対するトランスクリプトーム解析を行った。ホタル成虫発光器より抽出した totalRNA に対して Agilent Strand kit を用いたライブラリー調製を行い、イルミナ社製 HiSeq2500 にて Pair End 100bp の条件でシークエンスを実行した(得られた情報は DDBJ データベースに登録済、現状非公開)。本解析より得られた情報を基に、DDBJ Read Annotation Pipeline により de novo アセンブリを行った。推定されたタンパク質はゲンジボタル 89,717 配列、ヘイケボタル 178,083 配列となった。

また、②ゲンジボタルおよびヘイケボタルに対する全ゲノム配列を決定する試みも行った。当初 DNA 抽出源として幼虫を用いたが、共生細菌と思われる *Rickettsia* や *Pseudomonas* 等少なくとも 5,6 種類の細菌の配列コンタミネーションが見られ、それらすべてを取り除くことは困難であった。そこで成虫を DNA 抽出源とした検討に切り替えた。その結果、ゲンジボタルに対して配列長閾値を 1 kbp とした場合、Contig N50 サイズ 0.3 Mbp、Scaffold N50 サイズ 11.9 Mbp（3,247 配列）を達成した。推定ゲノムサイズは 667.9 Mbp であった。一方同様の閾値でのヘイケボタルのゲノムサイズはおよそ 1 Gbp と大きく、k-mer 頻度からヘテロ接合度が極めて高いことが示唆された(Contig N50 サイズ:33.7 kbp、Scaffold N50:416.8 kbp、20,747 配列)。これらの配列情報はデータベース未登録の状態である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

トランスクリプトーム解析によって、生合成経路に関わる酵素タンパク質を推定可能な状態になったため、BLAST 検索等によって、デラセミ化様立体反転プロセスを進行させる可能性のある酵素遺伝子の発現を確認した。その結果、キラルフリー発光に必要なタンパク質候補を数種類にまで絞り込むことができた。今後これらタンパク質の機能解析を行い、デラセミ化反応が進行するか確認する予定である。

一方、全ゲノム配列解析については完全な解析には至らなかったが、ゲンジとヘイケ両ホタルで、そのサイズに大きな違いがあることを明らかにできた。また、甲虫類として唯一解析が終了していたコクゾウムシ(*Tribolium castaneum*)よりもゲノムサイズが大きいことも判明した。今回の支援によって基礎的な配列情報を得ることができたため、今後はより詳細なアセンブリに着手すると共に、遺伝子領域の推定作業に取り掛かる予定である。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2010 年度

高速シーケンスによる一卵性双生児双極性障害不一致例における遺伝子変異の探索

挑戦的萌芽研究

加藤 忠史・理化学研究所脳科学総合研究センター

＜背景・目的＞

双極性障害（躁うつ病）は、遺伝子を基盤として発症する疾患であるが、その原因は未だ明らかではない。これまで連鎖解析、候補遺伝子の関連解析、および全ゲノム関連解析により、さまざまな所見が報告されてきたが、未だ明確な原因遺伝子あるいは遺伝的危険因子が同定されたとは言い難い状況にある。双極性障害の原因遺伝子を探るためには、これまでの遺伝性疾患とは異なったアプローチによる研究が必要である。本研究では、一卵性双生児不一致例におけるゲノム差異を高速シーケンサーを用いて探索し、双極性障害の原因遺伝子変異の特定を目指す。

＜支援の内容＞

健常な双生児において、ゲノム配列の不一致がどの程度存在するか、未だ十分なデータはない。そこで本研究では、エクソンキャプチャーアレイを用いて、全エクソンを含む DNA 断片を集め、これを増幅し、高速シーケンサーにより、全エクソンのシーケンスを行う。シーケンス不一致の可能性がある部分は、PCR ダイレクトシーケンス法により、塩基配列差異を確認する。

＜支援によって得られた研究成果＞

今回調べた 3 ペアの健常一卵性双生児においては、明らかな不一致 SNP は見いだされなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回、3 ペアの一卵性双生児において、明らかな不一致 SNP は見いだされなかった。このことは、今後、双極性障害に関して不一致な一卵性双生児間において、不一致な SNP が見いだされた場合、これに意味がある可能性を支持するものである。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

環境による性決定遺伝子の発現調節メカニズムの解明―甲殻類ミジンコをモデルとして―

若手研究（B）

加藤 泰彦・大阪大学大学院工学研究科

＜背景・目的＞

生物の根幹的な基本システムである性決定の様式は、遺伝性決定と環境性決定に大きく分類される。我々は最近ミジンコの環境性決定の制御に、他の動物の遺伝性決定を制御する転写因子 DSX のオーソログが機能していることを発見し、遺伝子レベルでの性決定の普遍性を見いだした。また、環境の悪化を感知した個体が体内の幼若ホルモン（Juvenile hormone: JH）のレベルを上昇させ *Dsx* 遺伝子の発現を誘導していることを示唆する結果も得た。本研究では、JH による *Dsx* 遺伝子の制御機構を解析し、動物種を超えて保存された性決定遺伝子 *Dsx* の発現が、どのように環境変化に応答するようになったのかを解明することを目的とする。

＜支援の内容＞

卵形成期に JH の曝露を受けた卵は、曝露から 12 時間後の胚発生期に *Dsx* の発現を開始する。このように *Dsx* の JH に対する応答は遅いことから、*Dsx* 遺伝子が JH の直接のターゲットではなく、JH に直接制御される別の遺伝子があるのではないかと仮説を立てた。そこで、JH 曝露から *Dsx* 発現に至るまでの性決定期における JH 応答遺伝子の探索を行うために、「ゲノム支援」活動により、性決定時期のオオミジンコ卵巣及び胚の RNA-seq の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

性決定の臨界期である産卵の 8 ～ 9 時間前の卵形成中のオオミジンコ親個体に JH アナログであるフェノキシカルブを曝露した。曝露前の卵巣、曝露後 3 時間の卵巣、曝露後 8 時時間の産卵直後の卵、曝露後 14 時間の胚をサンプリングし（図 1 参照）、これらのサンプルから total RNA を調製した。「ゲノム支援」を担当する東京大学の菅野・鈴木研究室シーケンスチームに依頼し、total RNA から Ribozero Kit により rRNA の除去、鋳型調製を行った。そして、Illumina Hiseq2500 にて single end 36 bp でシーケンスを行った。全てのサンプルで 1000 万以上のリード数を得た。

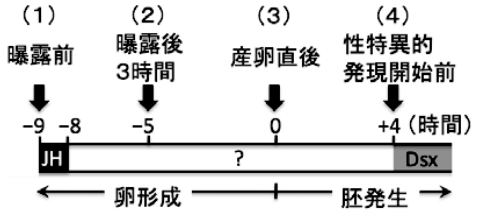


図 1 RNA-Seq に供する検体回収のタイミング

続いて、基礎生物学研究所情報解析室の内山グループとの共同研究により、RNA-Seq データの解析を行った。近年解読されたオオミジンコ Xinb 系統のリファレンスゲノムへの TopHat によるマッピング、Cufflinks 及び Cuffmerge によるトランスクリプトのアセンブル、Cuffquant 及び Cuffdiff による遺伝子発現解析、CummeRund によりデータの可視化を行った。その結果、2 倍以上有意に発現が上昇、減少した遺伝子をそれぞれ、曝露後 3 時間で 2967 個、86 個、曝露後 8 時間で 206 個、72 個、曝露後 14 時間で 182 個、196 個見出した。*Dsx* 等の以前に定量 PCR 解析を行った遺伝子の発現パターンと本解析結果が一致していることが確認できた。また、性決定期に JH に応答して発現が変動している遺伝子を見出すことにも成功した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究では、性決定遺伝子 *Dsx* の発現に性差が生じる前に、JH 依存的に発現が変動している遺伝子群を見出すことができた。これは、研究開始時に立てた仮説を支持するものであり、*Dsx* の活性化以前に JH のホルモンシグナルによって活性化される遺伝子が存在することが強く示唆される。現在 JH 依存的に変化している遺伝子が特定のパスウェイに集中しているか否かを調べるために、KEGG パスウェイ解析を進めている。また、近年遺伝子発現制御で注目されている因子、ノンコーディング RNA の発現変動の解析も行っている。

これらの網羅的解析により得られた *Dsx* の制御因子の候補については、遺伝子機能解析を行う。本解析には、我々のグループで開発したオオミジンコの RNAi、Crispr/Cas、TALEN システムを用いたノックアウト、ノックイン技術を用いる予定である。

最終的には、科研費・若手研究 (B)の計画で進めている *Dsx* のプロモーターに結合する因子の解析の結果と統合することで、*Dsx* の制御因子を同定することができるだけでなく、JH による階層的な遺伝子発現制御の全体像を解明できると期待される。その結果、これまで遺伝性決定でのみ行われていた性決定メカニズムの議論に新たな展開をもたらすだけでなく、生態における性、生殖戦略の理解においても重要な知見を得られる。一方で、 未だ多くの議論がなされている無脊椎動物の重要なホルモンである幼若ホルモンの作用機構を明らかにする本研究は、節足動物の内分泌の理解にも貢献できる。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2010 年度

地下圏内メタン生成・消費活動に関わる未知微生物群の分離培養と動態解析ツールの開発

基盤研究（A）

鎌形 洋一・産業技術総合研究所　生物プロセス研究部門・生命工学領域研究戦略部

＜背景・目的＞

本研究課題ではメタンの消費活動を担う難分離培養性のメタン酸化細菌ならびに当該微生物と強固な共存（共生）関係にある 2 種の微生物、合計 3 種から構成される安定した微生物群集のゲノム情報からその代謝経路を推定し，それらの情報を基に新たな代謝特性を見いだすことにより最終的に 3 種の新種微生物の実体を捉えることを目的とした。

＜支援の内容＞

我々は，上述の科研費基盤研究において、鹿児島湾海底熱水噴出孔周辺の海底堆積物からメタンを唯一のエネルギー源とする人工培地を用いて、海産性メタン酸化細菌と 2 種の細菌を含む安定した集積培養系を確立した。本複合微生物系中に存在するメタン酸化細菌は陸域からのみ分離培養例があった *Methylocaldum* 属（*Gammaproteobacteria*）に比較的類縁のものだったが、当初純粋分離に全く成功することができなかった。そこで，この複合微生物系に含まれる全微生物のゲノム解読について支援を受けた。一方、当該メタン酸化細菌以外の２種類の微生物については分離培養に成功していた。本ゲノム支援では集積培養系のメタゲノム解析から２種類の純粋微生物のゲノム情報を subtract することによって，培養困難なメタン酸化細菌についてもドラフトゲノム情報を得る支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援によって最終的に複合微生物内に存在する３種の微生物のゲノム配列情報を高精度に得ることができた。培養困難だった *Methylocaldum* 属メタン酸化細菌にはゲノム解析の結果、メタン酸化酵素である soluble methane monooxygenase, particulate methane monooxigenase (pmmo)遺伝子ならびに RuBisCO 遺伝子､さらには serine pathway の全遺伝子が確認された。こうしたことから、本菌はその基本属性が既知の *Methylocaldum* 属とほぼ同様であることが示された。

そこで本微生物について再度の分離を試みた。気相をメタン/空気、窒素源を硝酸からアンモニアに代え、基本培地を人工海水培地にした上で、寒天の代わりにゲランガムを用いることによって、コロニーを形成させることに成功した。こうして最終的には複合微生物系のメンバーすべての完全な分離培養に成功した。これら 3 種の微生物は 1) メタン酸化細菌である *Methylocaldum marinum* (Takeuchi et al., 2015); 2)メタノール資化性細菌である *Methyloceanibacter caenitepidi* (Takeuchi et al., 2014)、3) 微好気で脱窒を行う *Tepidicaulis marinus* (Takeuchi et al., 2015)で構成されており、いずれも新属あるいは新属新種としてそれぞれの性質を決定・記載した。

Methyloceanibacter caenitepidi はメタノール資化に必須な methanol dehydrogenase 遺伝子を持ち, serine hydroxyl-methyltransferase を有することから serine pathway でメタノールを資化するメチトロフであり，メタン酸化細菌によってメタンから生成されるメタノールを利用していると考えられた。本微生物は海底堆積物から得られた初めてのメチロトロフであり，近縁クローンが世界各国の海底から検出されていることから，海底の C１化合物循環において重要な役割を果たしていると推測された。

Tepidicaulis marinus は amine oxidase, グリオキシル酸回路に必要な遺伝子群などを有していることから様々な基質を利用できる従属栄養細菌と考えられ、培養試験の結果と一致した。また，微好気環境でのみ脱窒を行う好気性菌であることが明らかになった。ドラフトゲノム情報からは脱窒関連遺伝子として，periplasmic nitrate reductase (*nap*)遺伝子群が見つかった。また，*nap* クラスターは *napEFDABC* であり，脱窒を行う微生物に特徴的な *nap*-α タイプであることが確認された。本菌の複合微生物系における役割は未だ解析中であるが、前二者（メタン酸化菌とメタノール資化菌）の生育と物質授受を安定化させる何らかの機能を持つものと推定された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本ゲノム研究支援によって極めて安定な三者複合微生物系の全ゲノムが明らかになった。純粋培養の知見と合わせ、複合系における遺伝子発現解析等を通じて共存（共生）関係の根幹を解析中である。

＜支援成果公表リスト＞

1) Takeuchi M., et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64:** 462-468 (2013).
2) Takeuchi M., et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64:** 3240-3246 (2014).
3) Takeuchi M., et al. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65:** 1749-1754 (2015).

公募支援課題：2013～2014 年度

トランスポゾンを用いた方法論に基づく脊椎動物フェノーム解析の基盤形成

基盤研究（A）

川上 浩一・国立遺伝学研究所初期発生研究部門

＜背景・目的＞

これまで私たちは、トランスポゾンを用いた遺伝子転移システムを開発し、エンハンサートラップ法、遺伝子トラップ法、Gal4-UAS 法などの重要な遺伝学的な方法論と組み合わせることで、器官、組織、細胞に特異的に Gal4 を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを 1000 系統以上作成してきた。これらのトラップ系統と Gal4 認識配列である UAS の下流に GFP を持つ UAS:GFP 系統を掛け合わせることで得られた 2 重トランスジェニックフィッシュでは、Gal4 発現細胞を GFP にて可視化することができる。これらのトラスジェニックフィッシュの中から、私たちは脳の領域特異的な神経細胞に Gal4 を発現する系統を選別した。それらの神経細胞の機能を阻害し、学習行動における異常を解析することで、その神経細胞の機能を解明しようと研究を進めている。

＜支援の内容＞

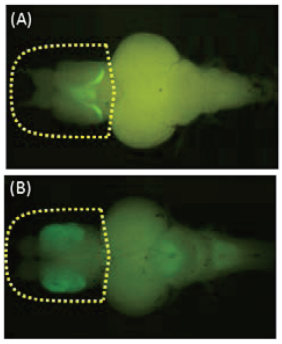
学習行動を制御している領域特異的な神経細胞を GFP にて可視化した後、この GFP 陽性細胞を FACS にて分画し、RNA を抽出した。それらサンプルの RNA-seq 解析および遺伝子発現プロファイリング解析に関して支援をうけた。

＜支援によって得られた研究成果＞

はじめに、ゼブラフィッシュの全脳、終脳領域(学習行動に関与する脳領域)において、組織より RNA を抽出し、RNA-seq を行った。さらに、ゼブラフィッシュにおいて恐怖条件付け実験を行い、実験の 30 分後の終脳より RNA を抽出し、RNA-seq を行った。この条件付け実験では CS として光刺激を、US として電気ショックを用いた。学習させたゼブラフィッシュ終脳の遺伝子発現パターンとコントロール(光刺激のみサンプルまたは未学習サンプル)の遺伝子発現パターンを比較することで、学習制御に関与する遺伝子の候補を同定することができた。

次に、終脳のうち、上記の恐怖条件付けに必須であった神経細胞を GFP にて可視化し、終脳より得られた GFP 陽性細胞を FACS にて分離後、RNA-seq を行った。この GFP 陽性領域は、魚類において、哺乳類の扁桃体に相同な領域と考えられている(図 A)。FACS で分離した細胞からの RNA 抽出は技術的に困難であり、プロトコルの確立に時間を要したが、最終的には、少量の RNA 抽出に成功した。この結果、ゼブラフィッシュ扁桃体相同領域に特異的に発現する遺伝子の候補を得た。

私たちはさらに、哺乳類の海馬に相当する領域についても検討を行った。海馬は時系列学習に必須の脳領域であるが、私たちは恐怖条件付けを応用した時系列学習系を用いて、この学習に必須な終脳神経細胞群を明らかにした。この神経細胞は哺乳類の海馬相同と考えられているゼブラフィッシュの領域に局在している(図 B)。この神経細胞を GFP にて可視化し、終脳より得られた GFP 陽性細胞を FACS にて分離した後、RNA-seq を行った。この結果、ゼブラフィッシュの海馬相同領域に特異的に発現する遺伝子の候補を得た。



図．終脳の特異的な領域にGFP(Gal4)を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ。黄色で囲まれた領域は終脳を表す。(A) 終脳背側内側部にGal4を発現するトランスジェニック系統。この領域は哺乳類の扁桃体相同領域と考えられている。(B) 終脳背側外側部にGal4を発現するトランスジェニック系統。この領域は哺乳類の海馬相同領域と考えられている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の検討では、哺乳類の扁桃体や海馬相同領域について、領域特異的に発現する遺伝子の候補を得た。これらについて in situ hybridization を行うことで、その遺伝子の領域特異性を明確にできる。また、in situ hybridization の結果が GFP 陽性細胞群よりも狭い領域で見られるのであれば、領域をより微細に分画できる可能性があり、新たな展望として期待される。

学習の前後で発現変化が観察できた遺伝子については、in situ hybridization を用いて発現領域を特定することにより、どの領域の神経が学習に必要なのかを明らかにできると期待される。また、学習に必要な遺伝子を発見するための展望が開けた点も強調したい。それを実現するために、私たちはこれら遺伝子について、CRISPR-Cas9 法を用いてノックアウトフィッシュを作成し、行動実験を行う計画を立てている。

＜支援成果公表リスト＞

英文原著論文 1 報、FACS と RNA-seq 解析について述べたプロトコールブックのチャプターひとつを執筆、投稿中である。

公募支援課題：2011 年度

アーバスキュラー菌根共生系から根粒共生系への進化

新学術領域研究

川口 正代司・基礎生物学研究所共生システム研究部門

＜背景・目的＞

陸上植物の科の約８割にはアーバスキュラー菌根菌（AM 菌）が共生している。AM 菌は菌糸を介して土壌中のリンを植物に供給する菌類であり、共生の起源は植物が陸上に進出した４～５億年前と推測されている。興味深いことに、この AM 菌と植物の共生系を基盤として、マメ科植物と根粒菌の共生窒素固定系が進化してきたことが分かってきた。本研究では、RNA-seq 解析により AM 菌の感染によってミヤコグサで発現変動する遺伝子群を網羅的に同定するとともに、それら遺伝子群が進化の過程で根粒共生系に流用されたかについて解析した。

＜支援の内容＞

植物－微生物共生に関わる遺伝子群を特定するため、ミヤコグサ（*Lotus japonicus*）の菌根と根粒の試料を調製した（菌根：*Rhizophagus irregularis* 接種後 15 日目、27 日目；根粒：*Mesorhizobium loti* 接種後 3 日目、12 日目；各 3 反復）。また、対照として葉と根も調製した（葉：成熟葉；根：移植後 3 日目、15 日目、成熟根；各 3 反復）。試料数は合計 24 サンプルであった。各試料から RNA を抽出したのち、RNA-seq の paired-end ライブラリー作製と Illumina HiSeq2000 によるシーケンスの支援を受けた。ライブラリー作製には 12 種類のアダプターを用いてマルチプレックス化を行い、4 レーンで 24 サンプルのシーケンスを行った。各サンプルから 101 bp×2 の配列情報が約 70 M リード程度得られた。Trynity を用いて *de novo* transcriptome assembly を行った。TopHat を用いてショートリードをミヤコグサゲノムと *R. irregularis* ゲノムにマッピングするとともに、*de novo* assembly で得られた contig に対してもマッピングを行った。各遺伝子にマップされたリード数をカウントし、iDEGES/edgeR を用いて発現変動遺伝子（FDR < 0.001）の検出を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

菌根形成に関わる遺伝子を網羅的に同定するため、マメ科モデル植物のミヤコグサの根に AM 菌を共生させた菌根をサンプルとして RNA-seq を行った。HiSeq2000 によって得られた菌根と非菌根の転写産物の配列をもとに、Trinity を用いて *de novo* transcriptome assembly を行った。菌根の転写産物には植物由来のものと AM 菌由来のものが含まれることから、BLAST 解析により両者の配列を分けた。最終的にミヤコグサに由来する 57,103 種類のトランスクリプトと *R. irregularis* に由来する 22,583 種類の配列を同定した。菌根形成時のミヤコグサの発現変動遺伝子を iDEGES/edgeR で解析し、3,641 遺伝子が発現変動することを明らかにした。発現変動遺伝子のうち大半は菌根形成により発現上昇していた。特に、発現変動遺伝子は分泌タンパク質や転写因子、トランスポーター、脂肪酸代謝、アミノ酸代謝、リボゾーム、ヒストンに関連する gene ontology term に濃縮されており、これらの遺伝子が菌根形成や共生機能発現に関与している可能性が示された。根粒形成は菌根形成のシステムの一部を流用して成立していると考えられているが、菌根形成時と根粒形成時の発現変動遺伝子の比較では、両共生で共通する遺伝子は多くはなかった（3,641 遺伝子中 275 遺伝子が共発現）。このことは共生開始後の遺伝子発現は各共生に特異的であることを示している。さらに転写因子の発現変動に着目したところ、これまで同定されている菌根形成に関わる遺伝子以外にも多くのの遺伝子が変動していた。それら転写因子の中でも菌根形成時に特に強く誘導される AP2 転写因子について RNAi 系統を作製し機能解析を行った。この菌根誘導性 AP2 転写因子は樹枝状体を含む皮層細胞で発現していた。樹枝状体は植物の皮層細胞内に形成される高度に分岐した菌構造であり、宿主―菌根菌間の養分交換に関与する。RNAi 系統に *R. irregularis* を接種し菌根表現型を解析したところ、樹枝状体の発達に異常が見られ、AP2 転写因子が菌根形成の重要な制御因子であることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

共生形成に関わる新規複合適応形質を担う遺伝子ネットワークの進化の解析から、共生の進化における遺伝子ネットワークの流用と独自性が明らかになりつつある。今後は RNAi 法やタグライン、CRISPR/Cas9 法を用いることで、逆遺伝学的に菌根形成の責任遺伝子を絞り込む予定である。特に、転写因子に関しては、DEX 誘導系による RNA-seq 解析や ChIP-seq 解析により、その下流の遺伝子を同定し、菌根共生の遺伝子ネットワークの解明を目指す。

AM 菌は絶対共生菌であり、遺伝学や分子生物学的解析が困難な非モデル生物であるが、*de novo* transcriptome assemble が有力なツールであることが分かり、今後、非モデル生物のゲノムや進化学的解析に展望が開けた。

＜支援成果公表リスト＞

Handa, Y. et al., Plant Cell Physiol 56, 1490-1511 (2015)

公募支援課題：2012 年度

アーバスキュラー菌根共生系から根粒共生系への進化基盤の解明

新学術領域研究

川口 正代司・基礎生物学研究所共生システム研究部門

＜背景・目的＞

根粒菌は、マメ科植物の根から分泌されるフラボノイドを受容すると、根粒誘導因子である Nod ファクターを合成する。Nod ファクターはキチンオリゴマーに長鎖脂肪酸が結合したシグナル分子であり、宿主特異的に根毛のカーリングを誘導する。根粒菌はカールした根毛細胞に包まれると感染ポケットを形成し、そこを起点として細胞中に侵入する。その際、管状の「感染糸」が細胞の内部に向けて形成され成長するが、このような特異な構造がどのように作られるのか、また、感染がどのように成立するのかについてはほとんど明らかにされていない。この一つの原因としては、根の多くの根毛細胞のごく一部でしか感染糸が形成されないということが挙げられる。

モデルマメ科植物であるミヤコグサ *Lotus japonicus* の *daphne* 変異体は、イオンビーム照射によって単離された新規変異体である。*daphne* は根粒菌が感染しても全く根粒原基すら形成しない発生初期の変異体であるが、根のいたるところで過剰な「感染糸」を形成している点で、前例がない。「感染糸」を介した根粒菌の感染プロセスが明らかになると期待される。また、感染糸内の根粒菌で発現が制御される遺伝子もほとんど分かっていないので、*daphne* はシンビオント側の解析にも適していると考えられた。

一方、植物の成長に応じて一植物体あたりの根粒（コブ）の数は、シュート（植物の地上部）において遠隔制御されていることが古くから知られている。このシステムでは、根粒菌の感染を受け根で CLE 糖ペプチド(CLE-RS1/2)が合成され、それがシュートで働く HAR1 レセプターキナーゼに受容されることで、根粒形成抑制因子(Shoot-derived Inhibitor SDI)が合成される。SID については、いくつかの候補物質が提唱されているが、長期にわかりその実体は明らかにされていない。

以上、*daphne* 変異体や根粒の全身制御に関わる *har1* 変異体、さらには *CLE-RS1/2* 遺伝子過剰発現体を用いた RNA-seq 解析を行うことによって、２つの現象の遺伝子発現レベルでの解明を目的とした。

＜支援の内容＞

マメ科植物ミヤコグサの根粒菌の過剰感染と感染糸形成に関与する新規遺伝子の同定を目的として、ミヤコグサ野生型(Miyakojima MG-20)および根粒菌過剰感染変異体 *daphne* (Yoro et al. (2014) Plant Physiology)の、根粒菌非感染、感染それぞれの根全体を使った RNA-seq の支援を受けた。根粒菌非感染 4 サンプル、根粒と感染糸を含む根粒菌感染後の根 4 サンプル、さらにミヤコグサのみならず根粒菌由来の RNA も解析対象とする RiboMinus(Invitrogen)処理後の４サンプルについて、RNA-seq 用の single read のライブラリー作製と Illumina HiSeq2000 によるシーケンスの支援を受けた。

また、遠距離シグナル伝達を介した根粒形成の全身制御を明らかにするために、ミヤコグサ野生型の葉細胞と根粒過剰着生変異体 *har1* の葉細胞、*CLE-RS1/2* ペプチド遺伝子過剰発現体の葉細胞の計 12 サンプルについて RNA-seq の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

根粒形成の過程は、根の表皮組織で開始する「感染」と皮層組織で開始する「器官発生」二つの経路に大別される。*daphne* 変異体は表皮での「感染」は過剰に起こるが、皮層組織での「器官発生」が全く起こらない変異体である。野生型と *daphne* 変異体（*nin* 変異体アリル）のトランスクリプトーム比較により、根粒形成において重要な転写因子 *NIN* の関連遺伝子のうち、「感染」と「器官発生」の二つの経路それぞれにおいて、共通した発現変動を示す遺伝子と、異なる発現変動を示す遺伝子をそれぞれ同定することができた。これら変動遺伝子について解析を進めていくことで、転写因子 *NIN* の「感染」と「器官発生」におけるそれぞれ異なる下流遺伝子の同定が期待される。

根粒形成の遠隔制御については、*har1* 変異体のシュートで発現が減少し、*CLE-RS1/2* の２系統の過剰発現体で発現が上昇する転写産物が１つ見つかった。その遺伝子はコード領域を持たず、*Medicago* やダイズなどマメ科植物間での保存が確認されなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

マメ科植物―根粒菌共生系において、変異体の不足や解析法の困難から、理解が進んでいない、共生の進行段階で起こる「感染」と「器官発生」両経路のクロストークや独立性を担う新規因子の同定が期待できる。また、ミヤコグサと根粒菌の両方の RNA を解析対象としたサンプルのデータから、植物とバクテリアの同時トランスクリプトームにおける問題点が明確となった。

一方、今回の支援で、根粒菌側の RNA も解析対象としたサンプルについては、rRNA の除去が不十分であったために、総リード数のうち rRNA のリードが占める割合が約 60%にも達してしまい、根粒菌側のトランスクリプトームはリード数が解析対象以下となってしまった。今後、植物と根粒菌側の両方のトランスクリプトームを解析するためには、感染糸中の根粒菌からの RNA 抽出方法および rRNA の除去方法、ライブラリー作製方法等の再検討が必要であることが判明した。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2012～2014 年度

藻類における雌雄非対称性の成立とオルガネラ遺伝の方向を決める形態と構造の探索

免疫サブトラクション法による藻類の雌雄非対称性の成立に関与する形態と構造の探索

基盤研究（B）

河野 重行・東京大学大学院新領域創成科学研究科

＜背景・目的＞

雌雄が異なっているのは、動物においては当たり前だし、その配偶子にいたっては卵と精子で大きさに極端な違いがある。興味深いのは藻類で、同形から異形、異形から卵生殖へといった進化の中間体が生存している。アオサ藻綱に属する *Ulva partita* や *U. prolifera* は、それらの雌雄配偶子が同形から異形へわずかに進化した種で、株によっては雌雄の大きさが逆転していたりもする。大きさという変動しやすい量的形質から、左右の非対称性という空間的で一義的な形質に目を転ずると、いずれの種でも眼点と接合装置の位置が雌雄で逆転していて、雌雄に大小の生じる前から非対称性があることがわかってきている。この非対称性を可能にした雌雄の細胞表層の構造の相違と遺伝子に注目して雌雄の起源を明らかにしたい。

＜支援の内容＞

U. partita はアオサ藻綱に属する雌雄異株の海産緑藻類である。本研究課題では、アオサ藻綱のなかでも配偶子が同形から異形への進化の途上にある *U. partita* を用いて、雌雄の個体サイズの差が生じる前から存在する雌雄の非対称性がどうやって生じ、お互いがそれをどう認識するのかを、ゲノム支援で得られるゲノムやトランスクリプトーム(mRNA/RNAseq)の情報と *U. partita* の雌雄配偶子を用いた「免疫サブトラクション法」を利用して明らかにしたい。

平成 24 年度は雌雄 *U. partita* のゲノム配列の新規シーケンスを、454 シーケンサー、solexa シーケンサー、PacBio を用いて遺伝研・豊田研究室で、配列データは FASTA ファイルと web 上のゲノムブラウザの形で提供された。

平成 25 年度の支援では RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を東大・新領域・鈴木研究室に支援して頂き、トランスクリプトームデータは先述のゲノムブラウザ上にアセンブルされ反映されている。

平成 26 年度は mRNA/RNA-Seq のラン数を増やし、配偶子誘導開始後 0、24、48 時間目の雌雄の葉状体と配偶子の RNA-Seq データを雌雄ゲノム配列上の遺伝子モデル対してマップし、RPKM 値等の発現量を算出して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

上述の平成 25 年度までの支援によって 雌(♀)で 117Mb、雄(♂)で 114Mb と推定されたゲノム領域のシーケンスデータが得られ、スカフォールド数は♀で 1521、♂で 2279 である。最長のスカフォールドの長さ及び N50 値は♀で 15.4Mb と 2.7Mb、♂で 10.6Mb と 1.7Mb となり、同じ緑色藻類であるクラミドモナスやボルボックスと比べても遜色のない精度のゲノム情報を得ることができた。これらのゲノム配列を比較したところ雌で 2 つ、雄で 1 つのスカフォールドにおいて性特異的なゲノム領域が同定され、雌特異的領域は最大で約 1.5Mb、雄特異的領域は最大で約 1.2Mb であった。平成 25 年度のゲノム支援による mRNA/RNA-Seq のリードデータをこの領域上にマッピングし、雄特異的で発現量の多い MS1(male specific 1) 遺伝子を単離した。MS1 は blast 解析によりユビキチン E3 ライゲースと相同性が高いことがわかり、isotig 情報および RT-PCR による発現解析の結果、葉状体と配偶子でスプライスバリアントをもっていることがわかった。また平成 26 年度に経時的なサンプリングにより mRNA の RNA-Seq の Run 数を重ねたことで、雌雄配偶子での差次的に発現する遺伝子群の解析を統計的に高い精度で実施でき、MS1 のような雌雄どちらかの性決定に関わる遺伝子を複数発見することができた。また、これまでの支援によって緑藻クラミドモナスの雄(♂)配偶子接合装置に局在する GCS1 が、*U. partita* の雄(♂)配偶子でも接合装置に局在し、配偶子の接合に直接関わっていることを明らかにした。さらに *U. partita* の形質転換系の開発も進展しており、*U. partita* のゲノム及びトランスクリプトームデータから得られた遺伝子と GFP の融合タンパク質を用いたオルガネラ動態の観察に成功している。今後、「ゲノム支援」にて単離した性決定の候補遺伝子の機能解析に応用する予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

U. partita の雌雄決定に性特異的領域が関わる可能性が見えてきた。*U. partita* は同型配偶子生殖や異形配偶子生殖の中間段階にあり、その雌雄の差は配偶子の形態の非対称性にあると考えられてきた。雌雄のトランスクリプトームデータから性特異的に存在する遺伝子を探索できたことで、今後はその遺伝子がどのように配偶子の配向を決めているのかを明らかにしたいと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

Suzuki, R. et al., Cytologia 79, 427-428 (2014)
Yamazaki, T. et al., Cytologia 79, 575-584 (2014)
Ichihara, K., Cytologia 80, 80261-270 (2015)
Suzuki, R. et al., Phycol. Res. 64, *in revision* (2016)
Yamazaki, T. et al., PLOS Genetics *in revision* (2016)

公募支援課題：2011～2012 年度

ALS の病態解明に向けた RNA 結合蛋白質 TDP-43 及び FUS の網羅的機能解析

新学術領域研究

河原 行郎・大阪大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

筋萎縮性側索硬化症（ALS)は、運動神経細胞が選択的に脱落し、全身の筋力が低下する神経難病の一つである。ALS では、TDP-43 及び FUS と呼ばれる 2 つの RNA 結合蛋白質が果たす何らかの RNA 制御機能の異常が発症に深く関与している。このため、両蛋白質に共通する RNA 制御機能を特定することが病態解明への鍵を握っているが、ほとんど解明されていなかった。このため、本研究では、タンパク質に結合する RNA を網羅的かつ高解像度に決定できる PAR-CLIP 法（Hafner et al, Cell, 2010)を確立する。その上で、両者に共通する RNA 制御機能を特定することを最終目標に、TDP-43 および FUS の共通標的 RNA を同定することを目的とした。

＜支援の内容＞

初年度は当究室で PAR-CLIP 法について様々な条件検討を行った。その上で TDP-43 に結合する RNA 断片から調整した cDNA ライブラリーを作成し、これを東京大学大学院新領域創成科学研究科　菅野先生・鈴木先生の研究室において、HiSeq を用いて deep sequence していただいた。シーケンス後の生データを FASTQ フォーマットでいただき、その後、当研究室で情報解析を行い、PAR-CLIP 法によるライブラリー調整の妥当性について検討した。次年度は、PAR-CLIP 法が確立されたことから、TDP-43 及び FUS に結合する RNA 断片から調整した cDNA ライブラリーの deep sequence を実施いただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

(1) PAR-CLIP 法を用いた TDP-43 および FUS に結合する RNA ライブラリーの樹立：N 端に Halo タグを付加した TDP-43 と FUS の発現ベクターを作成し、HEK293T 細胞に導入することによって、これらの安定発現細胞株を樹立した。培養液中に 4-チオウリジン（4-SU）を添加し、新規に転写される RNA にウリジンの代わりに取り込ませた。次に 365nm の長波長紫外線によって架橋反応を行い、4-SU を介した強い蛋白質-RNA クロスリンクを行った。その後、Halo タグに対して免疫沈降を行い、RNaseT1 で処理後、ラジオアイソトープ標識し、ゲルに電気泳動すると、沈降した蛋白質の大きさの位置で強くアイソトープが検出された。これをゲルから抽出し、回収された RNA を用いて cDNA ライブラリーを作成し、網羅的なシーケンスを行った（初年度)。情報解析した結果、20 塩基長以上のものが全体の 30%程度しかないことが判明した。また、グアノシン の含有量が有意に少ないことを見出した。これは、RNase T1 による処理が強すぎることに起因すると考えられた。このため、条件を変更して再度シーケンスを行った結果、これらの諸問題が解決した（次年度)。次に、リンカー除去後のリードを、ゲノム配列に対して annotation を行った。蛋白質と架橋した部分の 4-SU は、逆転写反応中にチミン（T)ではなくシトシン（C)に置換される。このため、シーケンス後にゲノム配列と比較し、T から C への置換が生じていれば、その部位は TDP-43 及び FUS の認識配列に含まれることを意味している。このため、ライブラリー作成の成功の可否を確認するため、T-to-C 変異の頻度を解析した。その結果、T-to-C 変異は、その他の変異と比べて 5-8 倍高いことが確認でき PAR-CLIP 法を確立したことを確認した。

(2) TDP-43 と FUS の結合 RNA プロファイル：TDP-43 および FUS ともに約 2000 箇所に結合部位が同定された。その内訳は、両者とも約 60-70%が mRNA 内にあった。TDP-43 では、約 60%がイントロンに結合部位があったのに対し、FUS では、イントロンが 20%程度で、3’UTR や coding region の方に多く結合部位が同定された。両者に共通する遺伝子を解析したところ、FUS で約 50%, TDP-43 で約 25%の遺伝子が両者によって制御されていることが明らかとなった。また、200-300 箇所が、同じ結合部位として見出された。

(3) TDP-43 と FUS の結合モチーフ：TDP-43 及び FUS が認識する RNA の一次配列について、cERMIT 法を用いて解析した。TDP-43 は、UG リピートをモチーフとして認識した。一方、FUS については、明確なモチーフは認めなかった。過去に GGU が弱いモチーフだとする報告があったため（Rogeli et al, 2012)、同モチーフが本解析で用いたライブラリーに含まれるかどうかを解析したところ、弱いながら enrichment されていることが分かった。この結果から、FUS は GGU 配列に弱い結合傾向を持つと考えられた。

(4) TDP-43 遺伝子点変異による RNA 結合能への影響：最後に、家族性 ALS で同定されている遺伝子点変異によるアミノ酸置換が、RNA 結合能に影響するかどうかを評価した。その結果、D169G, G348S のいずれの点変異を挿入した場合でも、モチーフは変動せず、さらに制御される遺伝子の 95%以上が一致した。この結果から、点変異は結合する RNA のプロファイルには影響しないと考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

世界でも数研究室でのみ実施可能な PAR-CLIP 法を、本邦で最初に確立することに成功した。またシーケンス結果を、研究室内で情報解析できる体制に至るまで整えることができた。これによって、様々な RNA 結合タンパク質の多様な条件下での結合 RNA や機能の網羅的解析が可能となり、研究の幅が広がった。

＜支援成果公表リスト＞

Li, Q. et al, Methods Mol Biol 1262, 247-263 (2015)

公募支援課題：2013 年度

ALS と脊髄小脳変性症に共通した発症病態の解明

新学術領域研究

河原 行郎・大阪大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)や脊髄小脳変性症(SCA)などの神経難病は、治療法が確立しておらず、病態解明が急務である。SCA 2 型は、Ataxin-2 遺伝子の CAG リピート(ポリグルタミン鎖)異常伸長が原因であるが、最近になって本リピートの中等度伸長が、ALS の発症を有意に高めることが判明し、Ataxin-2 の機能破綻が、両疾患に共通した神経変性機構の根底にあると考えられる。しかしながら、Ataxin-2 の生理的機能は長らく不明であった。我々は、Ataxin-2 が RNA 結合能を持つことを予備的に発見したことから、培養細胞を材料にして結合 RNA を網羅的に解析し、Ataxin-2 が果たす RNA 制御能の全体像を把握することを本研究の目的とした。更にはポリグルタミン鎖伸長による RNA 結合能や結合 RNA 構成の変化を定量解析することによって、ポリグルタミン鎖伸長の病的意義を明らかにすることを最終目標とした。

＜支援の内容＞

当研究室で、タンパク質に結合する RNA を低バックグラウンドかつ高解像度で決定できる PAR-CLIP 法(Hafner et al, Cell, 2010)を用いて、Ataxin-2 に結合する RNA 断片から調整した cDNA ライブラリーを作成した。同様にポリグルタミン鎖異常伸長型 Ataxin-2 に結合する RNA 断片からも cDNA ライブラリーを作成した。これらのライブラリーの deep sequence を実施いただいた。Deep sequence は、東京大学大学院新領域創成科学研究科　鈴木穣教授の研究室において、HiSeq を用いて実施していただいた。シーケンス後の生データを FASTQ フォーマットでいただき、その後、当研究室で情報解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

Ataxin-2 結合 RNA から作成した cDNA ライブラリーを網羅的にシーケンスした。その結果、約 4,000 遺伝子の 15,000 箇所に、Ataxin-2 の結合部位を同定した。また、その主たる標的は、mRNA の 3’非翻訳領域 (UTR) に存在することが分かった。次に、Ataxin-2 が特定のモチーフを認識して結合しているのかどうかを解析した。PAR-CLIP 法では、RNA 結合タンパク質 (RBP)の結合部位に T-to-C 置換が挿入されるため、この情報をもとに解析した。その結果、Ataxin-2 はウリジン (U) に富んだ配列 (U-rich element)を認識していることが分かった。その中には mRNA の安定性を制御し、AUUUA を基本骨格とする AU-rich element (ARE)も含まれていた。In vitro 系で結合アッセイを行ったところ、Ataxin-2 が、ARE を含む RNA を特異的に認識すること、結合には LSm ドメインが必要であることが確認された。

Ataxin-2 が ARE に結合することから、RNA の安定性を制御している可能性が示唆された。このため、Ataxin-2 の発現をノックダウンまたは過剰にした後、全遺伝子の発現変化をマイクロアレイを用いて解析した。その結果、Ataxin-2 を抑制すると、標的 RNA の発現量は減少し、過剰にすると増加した。Ataxin-2 の結合部位が多いものほど、Ataxin-2 の発現量変化の影響を強く受けた。また、Ataxin-2 をノックダウンすると、標的 mRNA の半減期が減少し、これに伴ってタンパク質の発現量も減少することが確認された。これらの結果から、Ataxin-2 は、標的 mRNA の安定性を促進し、その結果タンパク質の発現量を増加させることが分かった。また、この機能を発揮するには、Ataxin-2 が標的 mRNA に直接結合することが必要不可欠であった。

最後に、神経変性疾患で認められる PolyQ 鎖の異常伸長が、Ataxin-2 による mRNA 安定性促進に及ぼす影響を解析した。Q31 (ALS 型)、Q35 (SCA2 型)、Q39 (SCA2 型) の伸長した PolyQ 鎖を含む 3 種類の Ataxin-2 発現ベクターを作製した。はじめに、Q31 と Q39 に対して、PAR-CLIP 法を行い、標的 RNA が変動するかどうかを解析した。その結果、80%以上の標的 RNA が野生型と同じであった。一方、テザリングアッセイを行ったところ、PolyQ 鎖が伸長するほど mRNA を安定化させる能力が低下した。これは、HEK293 細胞でも SH-SY5Y 細胞でも同様の結果であった。以上の結果から、PolyQ 鎖の異常伸長は、標的 RNA の認識には余り影響せず、mRNA の安定性を促進する機能を減弱させることが分かり、神経変性の一因になっている可能性が考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

世界でも数研究室でのみ実施可能な PAR-CLIP 法を、本邦で最初に確立することに成功し、論文発表することができた。これは単に WET 実験体制の確立に留まらず、シーケンスいただいた結果を、研究室内で情報解析できる体制に至るまで整えることができた。これによって、様々な RNA 結合タンパク質の多様な条件下での結合 RNA や機能の網羅的解析が可能となり、研究の幅が広がった。

＜支援成果公表リスト＞

Yokoshi, M et al., Mol Cell 55, 186-198 (2014)

公募支援課題：2010 年度

色覚オプシンの種内多様性と環境適応

特定領域研究

河村 正二・東京大学大学院新領域創成科学研究科

＜背景・目的＞
色覚オプシンの種内変異は現在進行中の色覚進化を反映していると考えられ、同一種内の異なる色覚型間の比較から、色覚の適応的意義を解明する絶好のモデルともなる。これまでに色覚に種内変異があることが明確にわかっているのは、新世界ザル類、当の我々ヒト自身、そして魚類のグッピー(*Poecilia reticulata*)のみである。これらは共通に M/LWS タイプのオプシンに遺伝的多型が存在するが、特にヒトとグッピーに関してはその種内変異の程度、起源、自然選択との関係などに関して未解明な点が多く残されている。本研究はヒトとグッピーを主要な研究対象とし、それぞれの集団サンプルに対して M/LWS タイプオプシンの吸収波長と塩基配列の多様性を明らかにし、中立対照ゲノム領域との集団遺伝学的比較解析を通して、それらの種内多様性に関わる自然選択の有無、様式、時期を検証することを目的とした。

＜支援の内容＞
様々なヒト集団とグッピー野生集団を対象に、色覚の光受容体のひとつである中長波長感受性の M/LWS タイプオプシン遺伝子と比較対照領域の塩基配列多型性を、PCR とダイレクトシーケンスによって調査した。ヒトの M/LWS オプシン遺伝子については本州・北部九州男性 96 人に対し総計 2,304 run（約 1.2 Mb）、グッピーの M/LWS オプシン LWS-1、LWS-2、LWS-3、LWS-4 と中立対照 Creatine Kinase-1、Aldolase-B、紫外線型オプシン SWS1 の 7 遺伝子座については 15 集団約 800 個体に対し、サンガー法を用いて総計 21,628 un（約 10.8 Mb）の集団塩基配列データの収集を目指した。

＜支援によって得られた研究成果＞
調べた日本人ヒト集団に約 50%という高頻度で L/M ハイブリッドオプシン遺伝子が存在すること、約 5%で「色覚異常」の遺伝子型が存在することが確認された。さらに他の集団も含めた集団配列データを必要とし、同時に支援を受けた基盤研究（A）「霊長類の自然集団に注目した感覚関連遺伝子の多様性の探索と適応進化の検証」（22247036）への支援として継続させた。一方、グッピーに関しては 4 遺伝子座すべての LWS オプシン遺伝子においてアミノ酸多型があることがわかった。他の遺伝子との比較から、LWS-1 遺伝子と LWS-3 遺伝子には、集団動態などの影響ではなく、アリルを集団間で分化させる自然選択が働いている可能性が示唆された。ただし、LWS-2 遺伝子に関しては、解析サンプル数、集団数が不足していた。短波長感受性の SWS2-B オプシン遺伝子においてもアリル多型の存在と、多型を維持するような選択圧の存在が示唆された。コアレッセンスシミュレーションや連鎖不平衡解析などのより詳細な解析と集団データの追加のために、同時に支援を受けた基盤（A）課題への支援として継続させた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
多量の集団サンプルに対し、塩基配列レベルの多型性を精緻に解析することで、従来は不十分であった自然選択の評価を統計学的厳密さをもって定量的に行なう道が拓けた。

＜支援成果公表リスト＞
1. Tezuka, A. et al. Heredity 113, 381-389 (2014)
2. 河村正二. 化学と生物 50, 325-336 (2012)
3. Kawamura, S. In: From Genes to Animal Behavior: Social Structures, Personalities, Communication by Color (Inoue-Murayama, M., Kawamura, S. and Weiss, A. eds.), pp. 329-349, Springer, Tokyo (2011)

公募支援課題：2010～2011 年度

霊長類の自然集団に注目した感覚関連遺伝子の多様性の探索と適応進化の検証

基盤研究（A）

河村 正二・東京大学大学院新領域創成科学研究科

＜背景・目的＞
近年色覚や様々な化学物質感覚センサーの遺伝子が同定されている。色覚と化学物質感覚センサーが相互にどのような適応的意義をもつのかを理解することはヒトを含めた霊長類の進化を理解する上で極めて重要である。そのためには野生の集団中でこれらの遺伝子がどのような多様性を持つかを調査することで自然選択を検出する方法が極めて有効である。本研究では色覚の様相の異なる様々な種の霊長類の野生集団を対象に、色覚、嗅覚、フェロモン知覚、味覚の受容体遺伝子及びゲノム中の中立対照領域の塩基配列多型性を調査し、自然選択の予測された遺伝子に対し機能解析を行ない、野生行動との関連を検討することで、霊長類感覚系の適応進化に対する理解を特段に深めることを目的とした。

＜支援の内容＞
基盤研究（A）課題の目的のひとつは、恒常的 3 色型色覚や 2 色型/3 色型多型色覚など色覚の様相の異なる様々な霊長類種の野生集団を対象に、色覚、味覚、嗅覚、フェロモン知覚の受容体遺伝子及びゲノム中の中立対照領域の塩基配列多型性を、糞抽出 DNA サンプルからの PCR とダイレクトシーケンスによって調査することである。

2010 年度には新世界ザルの苦味受容体 TAS2R1、TAS2R4、TAS2R16、TAS2R40 の全長約 1 kb についてシロガオオマキザル 4 群、チュウベイクモザル 1 群、マントホエザル 4 群、グアテマラホエザル 3 群に対し総計 1,144 run（約 0.6 Mb）の集団塩基配列データの収集を目指した。

2011 年度には 2010 年度に終了した特定領域研究「細胞感覚」公募課題「色覚オプシンの種内多様性と環境適応」（21026007）に対するゲノム支援でカバーしきれなかったヒト L/M オプシン遺伝子と中立対照及びグッピーの LWS-2 オプシン遺伝子の集団解析の継続を、本基盤（A）課題の関連課題として取り込み、ゲノム支援対象として追加した。

上記の新世界ザル種の集団に対しては、苦味受容体 TAS2R1、TAS2R4、TAS2R9、TAS2R16、TAS2R40、TAS2R42、pTAS2R60（偽遺伝子）各全長約 1 kb、L/M オプシンのエクソン 5 を中心とした約 1 kb 領域、中立対照としての eta-globin pseudogene、von Willebrand factor intron 11、transferrin intron 5、beta-2-microglobulin precursor introns 2&3、blue opsin intron 4 各約 0.5 kb の配列決定を行ない、総計 3,744 run（約 1.9 Mb）の集団塩基配列データの収集を目指した。

ヒトについてはアフリカ系 3 集団、ヨーロッパ系 4 集団、アジア系 5 集団に対し、L/M オプシンのエクソン 3～エクソン 5 の約 3.7 kb 領域、中立対照領域（eta-globin pseudogene、ZFX、Xq13.3、TDGF3 pseudogene、GULOP）各約 0.5 kb の配列決定を行ない、総計 38,880 run（約 19.4Mb）の集団塩基配列データの収集を目指した。

グッピーについてはトリニダッド・トバゴの集団に対し、LWS-2 遺伝子の全長約 6 kb の配列決定を行ない、総計 11,040 run（約 5.5 Mb）の集団塩基配列データの収集を目指した。

＜支援によって得られた研究成果＞
新世界ザルに関しては、（1）新世界ザルの TAS2R1 遺伝子はリガンド結合部位のアミノ酸がヒトと異なっており、リガンドがヒトと異なる可能性があること、（2）ヒトとチンパンジーの TAS2R 遺伝子は機能制約が緩んでいると先行研究で考えられているのに対し、クモザルとオマキザルでは機能制約が強い可能性があること、（3）オマキザルの TAS2R1 と TAS2R16 は群れ間で顕著な集団分化を示し、地域適応的な自然選択が働いている可能性があることがわかった。

ヒトに関しては、（1）ヒトの L/M オプシンの多様性が極めて大きいこと、（2）L/M オプシンハイブリッド遺伝子はアジア系、ヨーロッパ系、アフリカ系集団で共有されていること、（3）したがって色覚多型の起源は出アフリカ以前である可能性があることがわかった。

グッピーに関しては、4 遺伝子座すべての LWS オプシン遺伝子の集団情報を総合して、（1）LWS-1 に吸収波長に影響を及ぼすことがわかっているアミノ酸サイトにおいて多型がみられること、（2）中立対照を元にしたコアレッセンスシミュレーションにより LWS-1、LWS-3、SWS2-B の物理連鎖群に有意な集団分化がみられることがわかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
多量の集団サンプルに対し、塩基配列レベルの多型性を精緻に解析することで、従来は不十分であった自然選択の評価を統計学的厳密さをもって定量的に行なう道が拓けた。

＜支援成果公表リスト＞
1. Tezuka, A. et al. Heredity 113, 381-389 (2014)
2. Matsumoto, Y. et al. Mol. Ecol. 23, 1799-1812 (2014)
3. Matsushita, Y. et al. Int. J. Primatol. 35, 71-87 (2014)
4. Melin, A. D. et al. Proc. R. Soc. B 280, 20130189 (2013)
5. Hiwatashi et al. BMC Evol. Biol. 11, 312 (2011)

公募支援課題：2013 年度

トラフグ性決定遺伝子の遺伝学的同定とその応用

基盤研究（B）

菊池 潔・東京大学大学院農学生命科学研究科

＜背景・目的＞

雌雄という性の二型は多くの生物に認められる根元的な生命現象の一つであるが、性決定機構は生物間でかならずしも共通ではない。これまでの脊椎動物の性決定に関する研究は、哺乳類の性決定遺伝子 *Sry* を起点とした機構をモデルとしてきた。しかし近年、多くの非哺乳類において性決定遺伝子の非保存性（オーソログではない）を示唆する証拠が次々と報告されている。この事態を受けて、「近縁種間で急速に進化する機構」という視点から、脊椎動物の性決定機構を捉え直そうという動きが強まっている。

そもそも、性決定遺伝子はなぜ急速に多様化するのだろうか？この点に関しては、理論研究側から幾つもの仮説が展開されている。一方で、理論研究の成果を検証した実証研究はほとんどない。実証研究がない理由は、新しい性決定遺伝子を獲得した直後の生物を見つけることが困難なことに加え、仮に見つけたとしてもそういった非モデル生物の染色体ワイドな解析が技術的に困難なことにあった。

本基盤研究を遂行する過程で、我々はトラフグの性決定遺伝子が *Amhr2*（抗ミュラー管ホルモン II 型レセプター）であり、X 染色体と Y 染色体の差は 1 塩基（SNP）であることを発見した。この成果を受けて、トラフグの近縁種における性決定遺伝子の探索に着手したところ、新しい性決定遺伝子を獲得した直後の種を見出した。興味深いことに、新旧の性決定遺伝子座は同一（同祖）の染色体上に存在していた。さらに、この近縁種のゲノム配列は、トラフグのゲノム配列と非常に似ていることも見いだした。つまり、フグ類は、「新旧の性決定遺伝子を持つ染色体」上に残された選択の痕跡を研究する上で絶好の機会を与えてくれる生物群であると考えられる。本研究では、トラフグ属魚類における新旧の性決定遺伝子を解析し、性決定遺伝子多様化の動因を明らかにする。

＜支援の内容＞

本研究では新しい性決定遺伝子を獲得した種としてクサフグを用いた。新しい性決定遺伝子の周辺に残された選択の痕跡を解析するため、6 つの完全同胞家系を作出した。これらの中で、8 個体の全ゲノム解読（リシーケンシング）について支援を受けた。具体的には、Illumina Hiseq を用いた解析により、1 個体あたり被覆率 40-50 倍程度のゲノム配列（1 個体あたり 400Mb×50＝20Gb）を得た。また、得られた配列の多型情報取得についても支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究では、新しい性決定遺伝子を獲得したフグ 6 家系 13 個体の全ゲノム解読（リシーケンシング）をおこない（支援対象は 8 個体）、得られた多型情報を利用して、まず、①新しい性決定遺伝子が存在する領域の限局化をおこなう。次に、②新旧の性決定遺伝子およびその周辺領域における選択の痕跡を探索し、最終的に③性決定遺伝子の遷移を促す動因を明らかにすることを目指す。

これまでに、予定通り 8 個体のゲノム配列を得た（1 個体あたり約 20Gb、合計 160Gb）。これらをトラフグゲノム概要（Ensembl fugu version 5）に貼り付けたところ、多型情報の網羅的抽出に充分な配列数と品質を有することがわかった。次に、これらの情報を用いてプロジェクト①を進めた。「オスでヘテロ接合・メスでホモ接合」という条件で SNP 情報のフィルタリングをおこない、XX-XY 型の新規性決定遺伝子のごく近傍に存在すると予想される SNP 座を探索した。その結果、性染色体上に 385 個の SNP 座が同定された。事前シュミレーションの結果から当該 SNP 座の数は約 100 個と予想していたので、研究計画の方向が正しいことが示された。別途、性決定遺伝子座の連鎖解析をおこなったところ、本性決定遺伝子は量的形質遺伝子として振る舞うことがわかった。詳細な量的形質座解析の結果と、上記 SNP 座解析の結果を併せたところ、候補 SNP 座を 10 個まで絞りこめた。ただし、ゲノム概要配列のギャップが本性決定遺伝子座領域に存在することも判明した。このギャップに、未知配列（ゲノムデータベース内で位置情報不明と分類されているスキャフォールド）が存在する可能性を考慮すると、さらに 204 個の SNP 座が候補座に加わってしまった。現在、ギャップを埋める作業を進めている。②のプロジェクトにおいては、X 染色体と Y 染色体をそれぞれ分集団とみなし、組み換えによるアリルの交換を分集団間の移住と捉えて、集団遺伝学的な解析をおこなう予定である。そのためには、SNP 座の phase を推定して、X 染色体および Y 染色体のハプロタイプを別々に再構築しなければならない。現在、その作業を進めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

脊椎動物における性決定遺伝子研究進展の大きな障害は、非モデル動物の染色体ワイドな解析が、現実的ではなかったことである。本研究はまだ完成には至っていないが、比較的少数の個体のゲノム配列を取得するだけで、性決定遺伝子領域の絞り込みが可能であることを示している。今後の解析により、本支援の成果を、性決定遺伝子多様化の動因の解明に結び付けたい。

＜支援成果公表リスト＞

本支援結果を活用した論文は準備中である。

公募支援課題：2010 年度

卵細胞における細胞周期の開始機構

特定領域研究

岸本 健雄・東京工業大学大学院生命理工学研究科（2013 年度から、お茶の水女子大学 SEC）

＜背景・目的＞

イトマキヒトデ（*Asterina pectinifera*）は日本近海に広く分布し、古くから発生学の実験材料として用いられている。特に、金谷晴夫らが全動物種を通じて初めて卵成熟誘起ホルモン（1-methyladenine）を同定して（1969 年）以来、卵成熟に関する研究で先導的な役割を果たしてきた。このホルモンの刺激で卵内では卵成熟促進因子（maturation-promoting factor; MPF）が生じ、G2 期で停止していた細胞周期の再開に至る。MPF の分子実体および活性化については我々のグループも含めて多くの研究があるが、卵成熟を引き起こすホルモンの受容体はどの動物種においても未同定であり、活性化した MPF がどのようにして細胞周期を再開させるかについても不明の点が多い。これらの重要な課題の解決のためには、イトマキヒトデのゲノム情報の整備は急務であり、本支援によりゲノム解析を進めた。

＜支援の内容＞

イトマキヒトデのゲノム配列決定、cDNA 解析、および情報支援（アセンブリ・アノテーション）。

・ゲノム解読支援：Solexa GAIIx 1 run (7 lane) (75 bpx2 paired-end 500 bp insert)、HiSeq 2000 (11 lane) (100 bpx2 paired-end 300 bp insert, 100 bpx2 mate-pair 3 kb insert, 5 kbp insert)、および HiSeq 2500 (150 bpx5 paired-end 300 bp insert, 150 bpx5 mate-pair 10 kbp insert)。

・cDNA 解読支援：Solexa GAIIx (170 bpx2 paired-end 150 bp insert; total length 解読用 61.6 Gb、アセンブル用 36.1 Gb)。

＜支援によって得られた研究成果＞

・ゲノム解読：2010 年度のゲノム支援によって得られたゲノムシーケンスデータについて、従来のアセンブラ（SOAPdenovo など）を用いてアセンブルを試みた。しかし、いかにパラメータを振ってアセンブルしても N50 が数百 bp より改善しなかった。

この原因を調査した結果、hetero 接合性が 1%程度と高く（ヒトでは 0.07%）、これによりうまく繋がらないことを示唆するデータが揃ってきた。そこで、hetero 接合性に起因し、アセンブル中に生じるバブル構造を許した上でアセンブルをするアセンブラ「PLATANUS」を、伊藤らが独自に開発した。さらに、リード長やライブラリの精度の改善のため、HiSeq 2500 で再度シークエンスし直し、そのデータを用いてアセンブルを実行した。その結果、飛躍的にアセンブルを進めることができ、500 bp 以上の Scaffold で 93,991 本、N50：195 kbp、最長 1,327 kbp まで繋くことができた。

しかし PLATANUS を利用してアセンブルした他の高ヘテロ接合性種と比べて繋がりが悪いため、その原因を探るべく様々な追加解析を実施した。

2014 年度には別個体の体細胞（管足）由来 DNA をシークエンスし、Platanus v1.2.3 でアセンブルしたところ N50：175 kb となり、前述の精子由来のデータの結果（N50：195 kbp）と大きな差は認められなかった。アセンブルが芳しくない理由は、個体の特異性や精子形成における組換えなどに起因したものではなく、イトマキヒトデゲノムが持つ配列の特徴に起因していることが強く示唆される。

さらに Fosmid ベースのシークエンス／アセンブルを実施し、その結果と比較することで PLATANUS アルゴリズムの改良を進め、現在 500 bp 以上の Scaffold で 22,231 本、N50：506 kbp、最長 3,328 kbp まで繋くことができている。今後もアルゴリズムに改良を加えるなどによりさらに良い結果を目指し、ゲノム配列アセンブルを確定させる予定である。

・cDNA 解読：Solexa による cDNA 解読データに関しては、上記理由によりゲノム情報の完成が先になることが示唆されたため、ゲノムへのマッピングではなく、de novo アセンブルを実施した。500 bp 以上の Contig が 48,169 本、N50：1,559 bp、最長 25,506 bp の結果を得ている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

イトマキヒトデのゲノムはかなりアセンブルが進み、他の生物のゲノムと高精度に比較可能になった。実際、和田洋博士（筑波大・生命環境科学研究科）と当研究室の立花との共同研究により、これまで不明であった棘皮動物幼生で発現している骨片形成に関わる遺伝子を同定することができた（下記論文）。さらに、ヒトデの配列情報は、棘皮動物に特有の五放射対称性を司る因子の同定や、脊椎動物の進化につながる左右対称性の起源など多くの重要問題に貢献することが期待される。

cDNA 解析に関連しては、ゲノム支援で得られたゲノム情報や大規模 EST 情報を高速タンパク質同定システム MASCOT (Matrix Science)に導入した。その結果、マススペクトログラフィーの結果を迅速にアミノ酸配列の同定に連結することが可能となった。実際、ゲノム支援による我々の科研費の研究課題の進展として、イトマキヒトデの 1-MeAde 結合タンパク質や MPF の下流で細胞分裂に関与する分子の同定において、今や不可欠の役割を担っている。さらに現在、この大規模 EST 情報は国内外のヒトデ・コミュニティで高頻度に活用され始めており、今後も大いに貢献すると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Morino, Y. et al., *Evo. Dev.* 14, 428-436 (2012).

公募支援課題：2012 年度、2013 年度

エピゲノム構造異常によって引き起こされるマウス亜種間の生殖隔離の解析

新学術領域研究

木曽 彩子・情報システム研究機構新領域融合研究センター

＜背景・目的＞

生殖隔離は、系統分化した種・亜種間の雑種個体に繁殖や生存に関わる障害が発生する現象であり、種・亜種間の遺伝的交流を抑制することから種分化において重要な現象である。しかし、生殖隔離の遺伝的基盤およびその分子機構を証明した研究例は限られており、その実体は不明である。これまで、生殖隔離の原因として、配偶子形成期に発現する関連タンパクのアミノ酸配列多型が原因として想定される場合が多かった。しかし近年のゲノムワイド連関解析(GWAS)により、生物の多様性の多くがノンコーディング領域に存在するシス転写調節配列の多型によることが示され、シス転写調節領域の進化と生殖隔離の関連が議論されるようになった。これまでの研究で、ドメスティカス亜種 C57BL/6J 系統の遺伝的背景にモロシヌス亜種 MSM 系統の X 染色体を導入した系統(B6-ChrX^{MSM}、B6-ChrXT)で精子形成に障害が発生し生殖隔離現象が再現されることを示した。また、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、これらの系統で X 染色体連鎖遺伝子の発現が変動し、それに連鎖してゲノム全体の精子形成関連遺伝子の発現低下が起こることが示された。このことは、X 染色体連鎖遺伝子のシス転写調節配列の多型に加え、精巣で発現する転写調節因子の多型が亜種間に存在し、シス転写調節配列と転写調節因子の間で遺伝的不和合が生じている可能性を示唆するものである。本課題では、シス転写調節配列の進化に注目し、生殖隔離の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

＜支援の内容＞

2012 年度は、亜種間染色体置換系統（コンソミック系統）及び親系統の C57BL 系統、MSM 系統の精巣のクロマチンサンプルを用いて、転写活動に関連のあるヒストン修飾(H3K4me1 、 H3K4me3 、 H3K27me3)を解析するため ChIP-seq の支援を得た。2013 年度は、培養細胞系を用いてより詳細なトランスクリプトーム解析を行うため、コンソミック系統、C57BL 系統、MSM 系統から樹立した ES 細胞の RNA-seq の支援を得た。

＜支援によって得られた研究成果＞

先行研究ではマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行っていたが、プローブに系統間多型がある遺伝子の発現量データが得られないのが難点であった。RNA-seq による解析では、得られたリードの 8~9 割程度を系統間 SNP を用いてアリルを区別してリファレンスゲノムにマップすることが可能であり、非常に解像度のよいトランスクリプトームデータを得ることができた。その結果、X 染色体コンソミック系統 B6-ChrXT^{MSM} において、発現している X 染色体連鎖遺伝子の 15%が発現低下、5%が発現増加していることが明らかとなった。また、ChIP-seq データと RNA-seq データを合わせた網羅的解析では、エンハンサー候補領域を示す H3K4me1 のピークやプロモーター候補領域を示す H3K4me3 のピークの FPKM 値と遺伝子発現量の間に相関があり、これらのシス転写調節配列には他のゲノム領域と比較して系統間多型が多いことがみえてきた。この ChIP-seq データをもとに、発現差があった個々の遺伝子について、発現差の原因となる可能性の高いシス転写調節配列の絞り込みを行うことができた。現在、ルシフェラーゼアッセイなどの実験的手法で、エンハンサー活性と系統間多型の影響を培養細胞系で検証中である。これらの解析により、シス転写調節配列の進化が、遺伝子発現量に影響を与え、表現型の多様化に寄与していることが証明されると考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

シス転写調節配列の修飾パターンは、プロモーターの種類（TATA-box の有無や CpG アイランドの有無など）や遺伝子機能（発生関連遺伝子、ハウスキーピング遺伝子など）などによって異なっており、これらを区別して解析することでシス転写調節配列の進化における特徴がみえてくる可能性がある。このような違いは、ゲノムスケールのシーケンスデータを俯瞰できるようになって初めてみえてきた。この点を考慮しつつ丁寧に解析していくことで、シス転写調節配列の進化が種分化にどのような影響を与えてきたのかを詳細に知ることができる。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2014 年度

シス調節配列多型に依存するマウス亜種間雑種のトランスクリプトーム解析

新学術領域研究

木曽 彩子・情報システム研究機構新領域融合研究センター

＜背景・目的＞

生物の多様な表現型は、遺伝子産物であるタンパク質の構造的多型だけでなく、遺伝子の発現量や発現のタイミング、発現部位の違いによっても生み出される。遺伝子の転写調節は、プロモーター、エンハンサーなどのシス転写調節配列と、転写調節因子などのトランス調節因子との相互作用によって行われる。種分化の過程において、分岐したそれぞれの種に蓄積されたシス転写調節配列やトランス調節因子の多型は、時として(亜)種間雑種において遺伝的不和合を引き起こし、その結果おこる遺伝子の不適切な発現調節は様々な疾患の原因や(亜)種間雑種の低繁殖性などに代表される生殖隔離現象の原因となる。これまでの研究で、マウス・ドメスティカス亜種の遺伝的背景へモロシヌス亜種の染色体を導入したコンソミック系統を用いて、シス転写調節配列とトランス調節因子の亜種間多型による不和合が原因の異常な発現調節が生殖関連遺伝子に高頻度に起こることを示し、生殖隔離現象との関連を示した。本課題では、発生期の精巣の生殖細胞と体細胞のトランスクリプトーム解析結果などから、シス転写調節配列の進化が生殖隔離にどのような影響を与えたのかを解析することを目的とする。

＜支援の内容＞

マウスの生殖細胞は、胎齢 7.5 日に胚体外中胚葉において始原生殖細胞(Primordial germ cell, PGC)として出現し、その後生殖腺へと移動して成熟する。胎齢 11.5 日の PGC は、ES 細胞と似た性質を持ち、多能性関連遺伝子を発現している。胎齢 13.5 日の PGC では、多能性関連遺伝子の発現は低下し、性特異的な生殖関連遺伝子の発現が上昇する。また生後 0 日齢の生殖細胞は一旦分裂を止め、生後 5 日齢は体細胞分裂を盛んに行う時期である。生後 7 日齢は、減数分裂に入る直前の準備段階であり、減数分裂関連遺伝子の発現が上昇し始める。このように特徴付けられるそれぞれの発生ステージにおいて、生殖細胞と体細胞を分画し、それぞれについて RNA-seq の支援を得て網羅的トランスクリプトーム解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまで、若齢マウスの精巣組織を用いたトランスクリプトーム解析から、生殖関連遺伝子において、シス転写調節配列とトランス調節因子の共進化が速いスピードで起こり、その結果シス-トランス因子間の遺伝的不和合が高頻度に起こり、不適切な発現調節が引き起こされることが示された。しかし、なぜ生殖関連遺伝子にシス-トランス因子間の遺伝的不和合が起こりやすいのかは不明であった。そこで、生殖隔離現象のモデル系統であるコンソミック系統 B6-ChrXT を用いて、発生期の生殖細胞と体細胞のトランスクリプトームを比較することで、生殖細胞におけるシス-トランス因子間の遺伝的不和合はどの発生ステージから始まるのか、また生殖細胞への分化と関連があるのか、などについて解析を行った。その結果、B6-ChrXT 系統の生後 5 日齢の生殖細胞において生殖関連遺伝子の発現異常の程度が大きくなることが示された。また、他の染色体のコンソミック系統においては、大きな発現変動はみられなかった。このことから、減数分裂関連遺伝子の発現開始に伴ってシス-トランス因子間の遺伝的不和合が起こりやすい傾向が示唆され、また X 染色体連鎖遺伝子にこの傾向が強いことが示された。X 染色体には精原細胞で発現する遺伝子が多いことが知られており、このことが今回の結果と関連していると思われた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

2012 年度支援の 5 日齢および 7 日齢の精巣サンプルを用いた転写活性関連ヒストン修飾の ChIP-seq 解析の結果と本支援の結果を合わせて、C57BL/6J-MSM 系統間の発現差がある生殖関連遺伝子のシス転写調節配列の候補の絞り込みを行うことができた。現在はこれらの配列のエンハンサー活性と亜種間多型の影響について、培養細胞系を用いたアッセイにより検証を行っている。
生殖関連遺伝子は、コーディング配列の進化速度が比較的速く、このことが生殖隔離の原因であるという研究報告はあるが、シス転写調節領域の進化が生殖隔離の原因になり得ることを実験的に示した報告は殆ど無い。本支援の結果は、シス転写調節領域の進化と生殖隔離の関係を示す重要な足がかりとなった。今後、実験的検証結果と合わせて論文発表を行う予定である。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2010 年度

トゲウオ科魚類における種分化の遺伝機構

若手研究（B）

北野 潤・東北大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

野外脊椎動物における種分化について、地理的要因や生態学的要因については多くのことが明らかになりつつあるものの、遺伝機構については未解明な部分が多い。申請者は、トゲウオ科魚類のイトヨを種分化のモデル系として確立し、量的形質遺伝子座マッピングによってイトヨの種分化に重要な原因遺伝子座を同定し、性染色体転座と種分化の関わりを示唆する実例を世界で初めて報告した。そこで、本研究では、日本産イトヨのゲノム配列を決定し、当該遺伝子座の配列解析などからイトヨの種分化の原因遺伝子を探索し、種分化遺伝子に働いた選択圧や変異の生じた時期、雑種不妊の分子生理機構などの解明を目指す。また、日本海イトヨは性染色体転座に由来するネオ性染色体を保持することを利用して、性染色体転座が種分化に果たす役割を解明する為に、転座領域にみられるゲノム上の特徴を解明する。

＜支援の内容＞

（1）精巣と脳の低分子 RNA プロファイル解析（16 サンプル）

日本海型雌雄 4 個体ずつと太平洋型雌雄 4 個体ずつの遺伝子プロファイルを比較するために RNA シークエンスを支援して頂いた。その後、ネオ性染色体における低分子 RNA 発現の特徴を解析した。

（2）トゲウオ科魚類イトヨ多集団のゲノムリシークエンス（5 集団）

同所性太平洋型イトヨ（厚岸産）、異所性太平洋型イトヨ（北米産、カナダ産）、異所性日本海型イトヨ（弁慶岬）、陸封型太平洋型イトヨ（岐阜県産）について、全ゲノムを解読した。

＜支援によって得られた研究成果＞

まず、申請者らのマイクロアレイの実験によって、イトヨでは性染色体の量的補償が弱く、X 染色体上の遺伝子はメスでオスに比して約 1.5～2 倍の発現があること、日本海型イトヨのネオ X 染色体でも同様の減少が見られることが既に明らかとなっていた。今回、ゲノム支援によって低分子 RNA でも同様の現象が確認された。いくつか種間で発現差を示す低分子 RNA も同定できた。今後は、ネオ X 染色体やネオ Y 染色体から特異的に発現している低分子 RNA を同定することによって、性染色体進化がエピジェネティックス制御の進化に与える効果を明らかにしていく。

全ゲノム配列に関しては、まず、日本海型ゲノムと太平洋型イトヨの配列を比較することによって、日本海イトヨ固有のネオ性染色体の上では、X と Y の間で遺伝子配列の分化が起こり始めるなど性染色体の特徴を既に示しつつあること、また、太平洋型の当該ゲノム領域と比較することで種間差を示す遺伝子が蓄積していることなどを見いだした。ネオ X 染色体と祖先 X 染色体の双方において、常染色体よりもヘテロ接合度の低下がみられた。一方、アラスカ湖産のイトヨの配列と比較したところ、19 番（祖先 X 染色体）は明らかに常染色体よりも遺伝的分化が少なかったが、ネオ X 染色体ではまだその傾向が現れていなかった。このように、ネオ X 染色体には、常染色体とは異なる特徴が現れつつあるものの、まだ、祖先 X 染色体ほどの分化が進んでいないことが明らかになった。これは、性染色体の進化を理解する上で極めて貴重な知見である。

また、雑種不妊の原因遺伝子座に急速進化を示し、精巣に発現するすへテロクロマチン結合分子を同定した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ネオ性染色体のゲノム的特徴について脊椎動物で解析した世界で最初の研究例となった。現在も、追加解析を実施中であり、ネオ性染色体上の遺伝子の機能解析へと進めて行きたい。また、雑種不妊の候補遺伝子に関しては、現在、その機能の詳細を解析中であり、野外脊椎動物における雑種不妊の原因遺伝子として世界で最初の例となる可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

Yoshida, K., Makino, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Hasebe, M., Kawata, M., Kume, M., Mori, S., Peichel, C. L., Toyoda, A., Fujiyama, A., and Kitano, J. (2014) Sex chromosome turnover contributes to genomic divergence between incipient stickleback species. PLoS Genetics 10: e1004223

Kitano, J., Yoshida, K., and Suzuki, Y. (2013) RNA sequencing reveals small RNAs differentially expressed between incipient Japanese threespine sticklebacks. BMC Genomics 14(1):214

2015 August American Genetic Association Symposium: Chromosome Evolution. Seattle, WA, USA. “Drivers of sex chromosome-autosome fusions and their roles in speciation”

2012 March The Eight Okazaki Biology Conference: Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics. Okazaki, Aichi, Japan " Neo-sex chromosome formation and speciation in the Japanese sticklebacks"

2011 July Symposium: Molecular bases of speciation at the Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE 2011). Kyoto, Japan. “Genomic and functional characterization of a neo-sex chromosome important for stickleback speciation”

公募支援課題：2015 年度

トゲウオ淡水進出の鍵形質の遺伝基盤

基盤研究（A）

北野 潤・国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系

＜背景・目的＞

未開拓の新規ニッチへの進出は、新しい豊富な資源の利用を可能にし、その後の適応放散を誘導しうる。また、新規ニッチを利用可能にする形質が生殖隔離にも貢献する場合、祖先集団と新規集団の間で交雑率が低下し、多様性が維持されうる。しかし、新規ニッチへの進出の鍵となる形質の遺伝基盤について、実際の野外集団で解明された例は極めて少ない。本課題では、申請者がこれまで詳細に記載してきた日本産トゲウオにおいて、多様な淡水域に進出して表現型多様化を遂げた系統（イトヨ太平洋集団）と淡水に進出できず均一な表現型にとどまった系統（ニホンイトヨ＝イトヨ属日本海系統）を利用して、その背景にある淡水餌資源の利用能力の違いの鍵となる遺伝基盤、及び、その鍵遺伝子と生殖隔離との関連性について、遺伝子操作、連鎖マッピング、集団ゲノミクス、半野外生態実験、配偶行動実験などを駆使して解明する。

また、我々は、イトヨの淡水侵出の過程で、TSHB2 の遺伝子に選択がかかることが既に明らかになっている。その結果、TSHB2 の遺伝子発現パターンが海産イトヨと河川に侵出したイトヨで異なることを見いだしている。また、この遺伝子発現パターンの違いにシス領域の変異が重要であることも見いだしている。しかしながら、具体的にどのような因子がシス領域に結合して遺伝子発現調節を行っているのかは不明である。そこで、下垂体における TSHB2 発現細胞のキャラクタリゼーションが必要であると考え single cell RNA シークエンスを行うことが最適であると着想するに至った。

＜支援の内容＞

多様な淡水域に進出して表現型多様化を遂げた系統（イトヨ太平洋集団）と淡水に進出できず均一な表現型にとどまった系統（ニホンイトヨ＝イトヨ属日本海系統）について、多価不飽和脂肪酸合成酵素を含む fosmid をシークエンスし、アラインして近傍領域の配列を解読する。

下垂体の single cell RNA シークエンスを実施する。淡水侵出の過程で、TSHB2 の遺伝子に選択がかかることが既に明らかになっている。そこで、TSHB2 遺伝子の変動と連動して働く転写因子などを同定することが目的である。イトヨ太平洋集団の下垂体を採取し、トリプシンにて単一細胞に分離し、Fluidigm C1 を利用して single cell RNA から cDNA を合成する。その後、Nextera kit にてライブラリを作成し、RNA シークエンスを実施する。

＜支援によって得られた研究成果＞

多価不飽和脂肪酸合成酵素を含む fosmid を同定し、シークエンスを実施して頂いた結果、当該 fosmid は染色体 19 番（X 染色体）由来であることが明らかになった。さらに参照配列（アラスカ湖産）と配列を比較したところ、一部、配列の異なる領域も見つかっており現在詳細な解析を実施中である。

イトヨの下垂体を太平洋集団のイトヨから採取し、高い生存率を保って細胞を分離する方法を見いだした。これはトリプシンと EDTA を用いたものである。その結果、イトヨの下垂体の多くの細胞のサイズが直径 10 um 以下と小さいことが明らかになった。その後、国立遺伝学研究所にて Fluidigm C1 を用いて cDNA を合成した。これら cDNA のいくつかについて、下垂体に発現するホルモンの遺伝子の複数について定量 PCR を実施した結果、PRL 産生細胞などに加えて、TSHB2 発現細胞も確認できた。cDNA の収量もサンプル間でばらつきはあるものの、Nextera でのライブラリ作成に回せる程度の収量を得ることにも成功した。したがって、10um 以下の細胞群のなかに TSHB2 産生細胞は含まれており、当該条件で実験を継続することによって目的となるデータが得られることが明らかになった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

次世代シークエンスによるショートリード解析は簡便であるものの、繰り返し配列や重複領域などの解析にはいまだ難があり、fosmid を作成して配列を解読するという一連の作業が極めて有用であることが明らかになった。また、この fosmid ライブラリは他の遺伝子領域を解析するための重要なリソースともなりうることから、淡水餌資源の利用能力の違いの鍵となる遺伝基盤、及び、その鍵遺伝子と生殖隔離との関連性について解析する上で重要なツールとなりうる。

下垂体は、生体の内外の環境を感知し、ホルモンを分泌して生体の状態を調節させる臓器であるが、個々の細胞における遺伝子発現調節や、細胞間の相互作用などについて、また、それらが異なる環境に生息するエコタイプ間でどのように進化しているかについては不明である。本成果は、single cell RNA シークエンスが下垂体研究に極めて有用であることを示しており、トゲウオに関わらず他の魚種や哺乳類など、特に疾患モデルマウスなどにも応用可能であることを示している。

＜支援成果公表リスト＞

現在、データを解析中であり、結果がまとまり次第論文化する。

公募支援課題：2010 年度

顔面形態における三次元デジタル解析およびゲノムワイド関連解析

若手研究（A）

木村 亮介・琉球大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

顔面形態をはじめとするヒトの可視形質には、個体差が存在する。また、人類集団間を比較しても、多くの可視形質には違いが存在している。ヒトの可視形質の研究については、人類学の分野において形態学的研究が数多く存在し、その遺伝性も認識されている。にもかかわらず、これまで正常形質が遺伝子関連解析の研究対象として扱われることは少なく、未だ遺伝因子が不明なものが多い。

本研究において、非接触三次元スキャナを導入した現代日本人の顔面形態解析と、DNA マイクロアレイによるゲノムワイド関連解析を行うことで、顔面形態と関連する遺伝子多型を同定する。形態解析においては、軟部表面形態の三次元データを用いた解析方法を確立する。また、形態データの多変量解析により、成分抽出あるいはタイプ分けを試み、形態を表す新たな指標を創出する。本土と沖縄の人々を対象とし、両地域間の顔面の立体的な形態の違いを明らかにする。また、ゲノムワイド SNP データを用いて、琉球列島を含む日本人の集団構造を明らかにする。

＜支援の内容＞

ゲノム支援からは、2010 年度に九州大学・山本健准教授（現久留米大学教授）の下、イルミナ社 Omni-Express を用いた約 400 検体分のゲノムワイド SNP タイピングの支援を受けた。2011 年度以降も、当該科研費やその他の研究経費により、SNP タイピングを進め､約 900 検体分の遺伝子型データを得た。さらに、ゲノム支援（国立遺伝学研究所・井ノ上逸朗教授・中岡博史特任研究員）の技術的協力を受けて、1000 人ゲノムおよび国際ハップマッププロジェクトのデータを参照した遺伝子型のインピューテーションを進めた。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノムワイド関連解析に先立ち、得られたゲノムワイド SNP データを用いて、集団遺伝学解析を行った。沖縄諸島、宮古諸島、八重山諸島、本土日本、韓国出身者および国際 HapMap 計画の JPT，CHB，CEU，YRI の SNP データを用いて、系統解析、主成分分析、クラスタ解析を行ったところ、先行研究（Yamaguchi-Kabata et al. 2008; HUGO Pan-Asian SNP Consortium 2009）と同様に、東アジア人集団は、琉球クラスタ、本土クラスタ、韓国クラスタ、漢民族クラスタに分かれた。さらに、琉球列島内においても、沖縄集団と宮古集団の間で遺伝的な分化がみられ、八重山集団は地理的位置関係に反して、遺伝的にはその中間に位置した。また、沖縄集団と宮古集団の分岐年代の推定を行ったところ、更新世までは遡らないことが示唆された。琉球列島においては、港川人や近年発掘された白保竿根田原洞穴人をはじめとする更新世時代人の存在が知られているが、今回の結果から、これら琉球列島の更新世時代人が現在の琉球集団の遺伝子プールに与えた影響は小さいと考えられた。研究成果は Molecular Biology and Evolution に発表したほか、国内の報道機関に取り上げられた。集団遺伝学解析の結果は、ゲノムワイド関連解析において集団構造を補正する際にも用いられた。

表現型である顔面形態については、非接触三次元スキャナを用いて約 750 人の形状データを取得した後、コンピュータ上での解析を進めた。画像データのクリーニング、特徴点の抽出、座標軸の決定を行い、特徴点間の距離や角度を算出した。特徴点との対応点を含む 2,596 点からなるポリゴンモデルに基づいて Homologous Body Modeling v1.0 を用いて、各個体の顔面データを相同モデル化した。このデータに対し主成分分析を行うことで、顔面形態の多様性において共変動する成分を観察した。琉球出身者と本土出身者との間で顔面形態を比較し、顔高や眉間・鼻根部の凹凸などに集団間の違いがあることが示された。また、顔面形態の他に、身体計測値、体毛分布、手形態などの表現型も調べた。

顔面形態についてのゲノムワイド関連解析の結果、顔全体のポリゴンデータを用いて主成分分析した際に抽出された第 9 主成分（顔面の平坦性を表す成分）においてゲノムワイド水準（$P < 5\times10^{-8}$）で有意な関連のある SNP を同定した。また、眼窩周辺のポリゴンデータだけを切りとって主成分分析をした際に得られた第 5 主成分（眼窩上隆起などの凹凸に関する成分）についても関連 SNP を得ることができた。さらに、顔面形態の他、頭囲、体毛分布、手形態についてゲノムワイド関連解析を行い、いくつかの関連 SNP を同定した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援によって、これまで詳細に明らかにされていなかったヒト顔面形態に係わる遺伝子多型を同定することができた。このような成果は、ヒトにおける形態形成の分子メカニズムを明らかにするだけでなく、社会性動物としてのヒトの顔の進化を解き明かす上でも有益である。しかしながら、量的遺伝形質に係わる遺伝要因を検出するには、まだまだサンプルサイズが少ないことは否めない。本支援により方法論は確立され、一定の成功を収めることはできたので、今後、サンプル規模の拡大に努めたい。

＜支援成果公表リスト＞

Saw, W.Y. et al. (2015) Scientific Reports 5: 17855.
Nakagome, S. et al. (2015) Molecular Biology and Evolution 32: 1533-1543.
Sato, T. et al. (2014) Molecular Biology and Evolution 31: 2929-2940.

公募支援課題：2012～2014 年度

Ｕｂｅ３ａ遺伝子座における超長鎖非コードアンチセンスＲＮＡの構造・機能解析

新学術領域研究

全ての転写産物を網羅したゲノム刷り込み領域の多元的解析

基盤研究（Ｂ）

清澤 秀孔・高知大学医学部

＜背景・目的＞

哺乳動物の細胞核内ではタンパク質をコードする遺伝子の他に内在性のアンチセンス RNA や非コード RNA を含め様々な RNA が転写されている。アンチセンス転写は特にゲノム刷り込み遺伝子座において頻発するとの報告もある。ゲノム刷り込みは配偶子形成の際に行われると考えられているが、Ube3a 遺伝子のように脳においてのみ母親由来の片アレル発現を示し、他の組織では両アレル発現（母親と父親由来の両アレルが発現する）が知られている遺伝子も存在する。本申請では遺伝的多型を有するマウス ES 細胞（亜種間雑種 F1）を in vitro で神経細胞へ分化させたサンプルを RNA-seq することにより、神経細胞特異的なゲノム刷り込み領域を特定する。その際、センス鎖・アンチセンス鎖、母親・父親由来の染色体、ポリ A 鎖を有する・欠く RNA などの区別を行い、包括的なトランスクリプトーム解析を行う。その他、ヒトがん細胞の薬剤耐性に関わる包括的トランスクリプトーム解析も行う。

＜支援の内容＞

・亜種関係にある 2 つの異なる近交系マウスを交配することによって作製した 2 系統の ES 細胞および、親の近交系 ES 細胞を in vitro で神経細胞へ分化させた発生段階におけるサンプルの RNA-seq。リファレンスとして成体脳サンプル。

・上記分化系における K36me3 の ChIP-seq。

・2 系統の亜種間雑種 ES 細胞のうち片方の分化系での 50-120nt サイズを対象とした低分子 RNA-seq。

・non-small cell lung cancer 由来のがん培養細胞 PC9 に対して、抗がん剤 Gefitinib を用いてエピジェネティックに薬剤耐性株を作製した。その薬剤耐性株ともとの PC9 細胞の RNA-seq。

＜支援によって得られた研究成果＞

サンプルに用いた F1 亜種間雑種の染色体間にはおおよそ 100bp に 1 箇所程度の SNPs が存在するため、SNP を指標として 2 つの対立遺伝子間の発現を区別することができ、in vitro 神経細胞分化系サンプルにおけるゲノム刷り込み遺伝子の同定をすることができた。また、全 RNA の RNA-seq を行ったことにより、mRNA のみを対象とした RNA-seq では見られない超長鎖の ncRNA/アンチセンス RNA がはっきり検出できた。非コード RNA など今まで遺伝子領域と考えられてこなかった領域からの転写も見られるため、K36me3 などの転写のマークとなる ChiP-seq サンプルも解析中である。

ゲノム刷り込み遺伝子の数より亜種特異的に発現が見られる遺伝子（母親父親由来ではなく、どちらかの亜種の対立遺伝子しか発現しない遺伝子）の数のほうが一桁程度多い為、亜種間雑種の親となる 2 種類の近交系において、母親と父親の組み合わせを逆にした 2 系統の亜種間雑種における解析は絶対に必要である。

また、上記の解析結果を受けて、亜種間雑種にした場合、ゲノム刷り込み遺伝子よりも一桁多い数の亜種特異的な発現を示す遺伝子は、親の近交系で発現が無い遺伝子なのか、もしくは亜種間雑種にしたことによって亜種特異的な発現となったかの区別ができない。その為、親の近交系の RNA-seq も行い、現在解析中である。

がん培養細胞と薬剤耐性化した細胞の RNA-seq では、薬剤耐性化した細胞でのがん幹細胞マーカーや、がん悪性化のマーカーの検出ができたので、抗がん剤耐性により悪性化したモデル作製に成功したと考えている。今後は ncRNA やアンチセンス RNA に注目して悪性化前後の発現の違いの解析を続ける。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

トランスクリプトームの全容を理解するには全 RNA の RNA-seq が効果的であることを示すことができた。また、我々が用いている亜種間雑種 ES 細胞の in vitro 神経細胞分化系が組織特異的なゲノム刷り込み現象を理解するために有用であることも示すことができた。

RNA-seq は遺伝子発現解析として最新のパワフルな手段であるが、単に細胞、組織間の発現の違いを解析するだけではなく、1）対立遺伝子間の発現量の区別、2）ポリ A 鎖の有無の区別、3）センス鎖とアンチセンス鎖の区別、を考慮し包括的なトランスクリプトーム解析を行うことにより、ゲノム刷り込みなどの生命現象に加え、対立遺伝子間の遺伝子発現量解析、長鎖の ncRNA 解析など新たな解析方法に有効である手応えを得ることができた。

特に長鎖 ncRNA やアンチセンス RNA などはエピジェネティックな発現制御への関与の可能性もあるため、今後ヒストン修飾などのマークを重ねて解析していきたい。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2012 年度

遺伝子間相互作用と膜蛋白ミクロアレイ解析に基づいた多発性硬化症の分子標的療法の開発

基盤研究（B）

吉良 潤一・九州大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

多発性硬化症(MS)は再発および寛解を繰り返す中枢神経の脱髄性疾患である．日本において近年その発症数が増加しており，特定疾患受給件数も 1 万を超えてきている．

先行研究としては，欧米白人の一卵性の MS discordant twin pair での全ゲノム解析では差異を認めなかったという報告が Baranzini らによって 2010 年になされた．しかし、MS 以外では，統合失調症における一卵性双生児の罹患者での僅かな変異，といった一卵性双生児のゲノムの僅かな違いが疾患に結びついた報告があり，さらにヒトゲノムおよび各種疾患関連遺伝子および分子間相互作用ネットワークなどに関しての知見が蓄積されており，解析できる環境が整備されつつある．

そこで、私たちは一卵性双生児において、一方が MS に罹患しているが、もう一方は罹患してない家系において、一卵性双生児の全ゲノム解析を行なった。対象は多発性硬化症一卵性双生児 2 組，合計 4 例である．

＜支援の内容＞

2012 年度

多発性硬化症(MS)発症者と非発症者対照者からなる双生児(MS discordant twin pair)で，一卵性と考えられる 2 組 4 名において，HiSeq2000 を用いた全ゲノム解析の支援を受けた．1 リードあたり 100 ベース，1 検体当たり平均 17 億リードが得られ，重複を除いたリードでのゲノム全体の平均カバレージは 48x になり，同じく先行研究での約 22x を大きく上回るものであった．またリファレンスゲノムとの比較では，1 個人あたりの変異総数は約 400 万で既報告と同等であり，データ精度の妥当性が確認できた．

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究では，SNV レベルでの相違，コピー数レベルでの相違，retroelement 挿入部位の相違を検討している．

双子間，および双子以外のペア間での遺伝子変異の相違の検討から，今回の双子は確かに一卵性である確証が得られた．双子間での遺伝子変異の差異の検討したところ，多数の SNV の相違が予測された．それらの Sanger 法での確認を続けているが，これまで確認できた部位は全て HiSeq2000 のデータのエラーで，真の差異は確認されてない．それらについては，候補部位選択のための工夫として，genome への mapping プログラムとして BWA, Bowtie2 を，SNV 予測プログラムとして GATK と samtools それぞれの組み合わせで共通に予測された SNV を比較する方法に変え，候補の絞り込みか進んでいる最中である．

コピー数変異の解析も試みたが，カバレージなどからくる確率論的問題もあり，結論には至ってない．

retroelement 挿入部位の比較では，全ゲノム由来のリードからゲノム-レトロエレメント境界部位の可能性のあるリードを抽出した．そのリードを，BWA と Bowtie2 それぞれでヒト参照ゲノムにマッピングし，BWA と Bowtie2 の両方のマッピングプログラムでの結果が共通し，レトロエレメントの 5'と 3'の両端が 50 ベース以下の範囲内で予測され，遺伝子領域内であり，MS 患者サンプルに固有な挿入予測部位を抽出した．両患者で共通した遺伝子はなかったが，MS 患者 1 では 12 箇所，患者 2 では 20 箇所の固有なレトロエレメント挿入部位が予測され，多くは intron 内であった．現在はレトロエレメント挿入配列の復元と確認作業が進行中である．

今後は以上のような基本的な変異データを元に，予測された双子間での相違を確認する．その後，公開データベースのデータを用いて，これまでに MS と関連したと考えられてきたものに限定しない，個々のパスウェイに与える遺伝子変異の影響の，特に環境因子との相互作用を含めた網羅的な検討などの検討を行う予定である．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

MS に関しては，今までも主に欧米白人での GWAS によって多くの感受性遺伝子が判明してきた．しかし他の GWAS と同様に，一般的かつ寄与率の低い SNP を特異的に検出したものであった．今回のプロジェクトは，まれな変異ではあるが，寄与率の高いものを検出する試みである．これまでのところ確実に一卵性双生児の発症者のみ，あるいは非発症者のみでの変異と言えるものは見つかってないが，現在も解析プログラムの改良は継続中で，他疾患での既報告でも，末梢血では確実に somatic mutation が進行中である証拠があり，本研究でも少数の変異が見つかる可能性が高い．また神経系では hemimegalencephaly のように局所での somatic mutation による疾患も明らかにされており，将来的には MS での病変部位と非病変部位の各細胞での相違の検討も視野にいれている．また神経変性疾患でも同様に不一致一卵性双生児例での解析ができればと考えている．

＜支援成果公表リスト＞

論文準備中

(学会)多発性硬化症一卵性双生児不一致例での新たなレトロエレメント挿入の可能性第 56 回日本神経学会学術大会 2015 年 5 月 20 日～23 日 新潟

公募支援課題：2013 年度

遺伝子発現の季節解析にもとづく植物気候応答の機能解明と予測技術開発

最先端・次世代研究開発支援プログラム

工藤 洋・京都大学生態学研究センター

＜背景・目的＞

植物においてヒストン修飾による遺伝子発現制御は、低温、乾燥、食害などに応答する遺伝子において、外部環境のメモリーとして植物の環境適応に機能することが知られている。本課題では、遺伝子発現を指標として、植物の季節応答を捕捉してその調節機構を明らかとすることを目指している。シロイヌナズナ属の多年草であるハクサンハタザオ（*Arabidopsis halleri*）の兵庫県自然集団から時系列で得た野外サンプルを対象に遺伝子発現を解析した結果、野外変動環境における遺伝子発現調節に、メモリー機構が重要な役割を果たしていることが示唆された。本支援では、このようなヒストン修飾によるメモリー機能を有する遺伝子を ChIP-seq により新規に同定することの可能性を探ることを目的とした。

＜支援の内容＞

研究代表者らは、シロイヌナズナ属の多年草であるハクサンハタザオ（Arabidopsis halleri）の兵庫県自然集団から得た野外サンプルを対象に Chromatin immunoprecipitation（ChIP）実験を行う方法を開発した。葉サンプルは野外においてホルムアルデヒド固定し、研究室に持ち帰ることで分析が可能となった。この手法が、ゲノムワイドな手法である ChIP-seq に拡張することが、本支援の第一の目的である。

本ゲノム支援では、季節的な変化を解析するため、2012 年 11 月上旬から 2013 年 9 月下旬まで月 1 回の 12 時点のサンプルについて、抑制型修飾である H3K27me3、活性型修飾である H3K4me3、ヒストン H3 不変領域をそれぞれ認識する 3 通りの抗体で ChIP を行い、それぞれ 2 反復の計 72 検体について HiSeq2500 でのシーケンス解析支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られたリードを、近縁種セイヨウミヤマハタザオ（*Arabidopsis lyrata*）ゲノムに Bowtie2 でマッピングし、MACS2 でピーク検出を行った。その結果、シロイヌナズナにおいて低温処理によりヒストン修飾が変化することが知られている FLC 遺伝子座において、H3K27me3 は 12 月上旬から転写開始領域で増加し、2 月上旬からコーディング領域全体に広がった。その後 4 月上旬から転写開始領域で減少し始めることがわかった。一方 H3K4me3 は転写開始領域で 3 月上旬において最も低いレベルとなった。これらの結果は、シロイヌナズナでの知見と整合性があり、また同じサンプルを用いた ChIP-qPCR による季節解析の結果と一致していた。このことは野外サンプルからの ChIP 実験とシーケンス解析が成功していることを示している。

次に、所属研究室で進行中のハクサンハタザオのトランスクリプトーム解析において発現量が季節変化を示した遺伝子領域に注目し、ヒストン修飾の変化を調べた。その結果、クロロフィルサイクルにおいて機能する遺伝子座において H3K27me3 は遺伝子領域全体で変化しなかったが、H3K4me3 は転写開始領域において変化し、その変化は RNA 発現パターンと一致していた。一方、食害ストレスに応答してジャスモン酸生合成経路において機能する遺伝子座では H3K27me3、H3K4me3 ともに季節変化を示し、これらは RNA 発現パターンと矛盾しない結果であった。一般に H3K27me3 は細胞記憶として体細胞分裂後も安定に維持されることから、これらの結果は後者の遺伝子において、環境のメモリー機能を保持している可能性がある。

今後、遺伝子領域毎およびピーク毎に時系列を解することで、ゲノムワイドにヒストン修飾が季節変化を示す遺伝子を選出する予定である。それらの遺伝子を対象とした、メモリー機能の検証実験を実施する必要がある。また、研究経費が得られ次第、時系列モデリングが可能な高密度サンプリングでヒストン修飾の季節解析を行うことを計画している。その際に、本支援で得られたデータセットを用いた解析により、時系列でサンプルを得るときに、どの程度の深度でリードを読む必要があるのかといった重要な情報が得られる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

野外の自然集団における世界初の ChIP-seq データである。野外における ChIP-seq 分析の有効性を示すことができ、今後の研究の展開に大きな波及効果が期待される。複雑に環境が変動する自然条件においてヒストン修飾の役割について、包括的に理解を進めることができるようになる。

＜支援成果公表リスト＞

Nishio H, et al., Genes & Genetic Systems, in press (2016)

公募支援課題：2010 年度

極限環境耐性動物クマムシが獲得した耐性メカニズムの解明

新学術領域研究

國枝 武和・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

クマムシは外界の乾燥に応じて体内の水をほぼ全て失い、乾眠と呼ばれる乾燥無代謝状態に移行する。乾眠状態のクマムシは超低温、真空、高圧、放射線、有機溶媒に対して耐性を示すが、こうした乾眠能力・極限環境耐性を支える分子基盤についてはほとんどわかっていない。我々はクマムシ類の中でも高い耐性を示すヨコヅナクマムシ *Ramazzottius varieornatus* についてゲノム配列を解読し、本課題開始時の予測遺伝子モデルをもとに、その過半が既知遺伝子と相同性を示さないクマムシ固有の新規遺伝子であると推定した。こうした新規遺伝子群はクマムシの例外的な耐性を支える有力な候補と考えられたが、既知配列との相同性が無いことから、その予測配列の根拠は遺伝子予測プログラムによる推定だけであり、実際にそのような遺伝子が存在しているのかは判然としていなかった。

本支援課題では、こうしたクマムシ固有遺伝子の配列を実験的に検証するために、複数の異なる条件下におけるヨコヅナクマムシについてトランスクリプトーム解析を行い、発現データに基づくヨコヅナクマムシの正確な遺伝子モデルの構築を目的とした。

＜支援の内容＞

ヨコヅナクマムシ成体の急速乾燥時のトランスクリプトームデータについては、本支援とは別に解析を行ったため、本支援では成体と同様の耐性を持つ胚期のほか、高湿度曝露により緩やかに乾燥した成体サンプルについてトランスクリプトーム解析の支援を受けた。胚期のサンプルについては発生ステージによって発現遺伝子が大きく変動することが予測されたため、産卵 1-2 日後と 3-4 日後に分けて回収したサンプルを用いた。胚期については 76 塩基ペアエンド(Illumina HiSeq2000)、高湿度乾燥時のサンプルについては 36 塩基シングルエンド(Illumina GAIIx)の解読支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

支援によって得られたトランスクリプトームデータをアップデートされたゲノム配列にマッピングし、この結果をもとに遺伝子モデルを作成した。これらのモデルを他のトランスクリプトームデータや ab initio 遺伝子モデルと組み合わせ、最終的に約 2 万遺伝子からなる高精度な遺伝子モデルを新たに構築した。新遺伝子モデルでは、約 75%の遺伝子モデル(約 15,000 個）がいずれかのトランスクリプトーム解析において実際に発現（fpkm が 1 以上）していることが確認され、そのうちの約 30%（約 5,000 遺伝子)が他の生物群の既知遺伝子と相同性を示さない固有の遺伝子であることがわかった。また、構築した遺伝子モデルおよびトランスクリプトームデータから、胚期、成体期ともに大量に発現している遺伝子の多くがこうしたクマムシ固有の遺伝子であることが明らかになった。大量発現するクマムシ固有遺伝子について、細胞内局在予測解析を行ったところ、細胞質、細胞膜、細胞外、核、ミトコンドリアなど様々な細胞内コンパートメントへの局在が予測されるものが見出された。それらのうち、ミトコンドリア局在が予測される遺伝子について、そのタンパク質の生化学的性状を解析した結果、加熱しても沈殿しない特殊な性質(熱可溶性)を持つことを明らかにし、同遺伝子を哺乳類培養細胞に導入することで高浸透圧耐性を向上できることが分かった（Tanaka, et al.)。また、本支援データをもとに構築した新規遺伝子モデルを用いることで、プロテオーム解析で得られた質量データからタンパク質配列を同定することが可能になり、ヨコヅナクマムシではクマムシ固有の新規熱可溶性タンパク質が常時大量に発現していることを明らかにした（Yamaguchi, et al.)。新遺伝子モデルにおいて、これらの大量発現熱可溶性タンパク質は、多数のパラログが存在し、胚期と成体期で異なるファミリーメンバーが大量に発現することがわかった。

また、本支援により構築された遺伝子モデルをもとに、クマムシの持つ遺伝子レパートリーを他生物と比較した結果、遺伝子経路の予想外の喪失を含むクマムシゲノムの特徴的な性質が複数見出され、これらの成果については投稿中である。以上の成果はいずれも、本支援により構築された高精度かつ網羅的な遺伝子モデルがあって初めて可能になった成果である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により構築された高精度かつ網羅的な遺伝子モデルは、クマムシの持つ耐性能力のゲノム基盤を解明する基礎となるだけでなく、質量分析を用いたタンパク質同定を可能にすることで、様々なプロテオーム解析を著しく促進することが期待される。また、本解析をベースにして遂行されたタンパク質の機能解析によって、クマムシ固有のタンパク質がクマムシの耐性能力に関わる良い候補になることが示唆された。本支援によって決定された多数のクマムシ固有遺伝子の配列群は、クマムシの耐性能力の分子基盤を明らかにする上で貴重な基盤になることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Tanaka, S. et al., PLOS ONE 10, e0118272 (2015)
Yamaguchi, A. et al., PLOS ONE 7, e44209 (2012)

公募支援課題：2012 年度

線虫の神経回路における相反性シナプス伝達の分子メカニズム

若手研究（A）

久原 篤・甲南大学理工学部

＜背景・目的＞

温度は生体反応に直結する環境情報であるため、温度に対する適応機構は必須のシステムである。我々は、温度適応に関する分子生理機構の解明に向け、シンプルな動物である線虫 *C. エレガンス* をもちた解析を行っている。これまでに、線虫の低温適応に関して、従来、光やフェロモンを受容することが知られていた感覚ニューロンが温度を受容し、それに応じてインスリンが分泌され、腸などで受容されることで制御されるという、新たなシステムが見つかった（Ohta, Ujisawa, Sonoda, Kuhara ,***Nature commun, 2014***）。

この温度適応に関して、世界各地から単離された *C. エレガンス*の野生株の表現型を測定したところ、産地に応じて温度適応の表現型が異なることが明らかとなった。そこで、ゲノム支援により、3 系統の多型株の全ゲノムシークエンス解析とデータベースの構築をおこない、イギリス　ブリストル産の N2 株と、アメリカ　カリフォルニア産の CB4854 株の温度応答の多型に関わる遺伝子の責任遺伝子の同定に向けて解析をおこなう。

＜支援の内容＞

2012 年度、線虫 4 系統の全ゲノムリシークエンス

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援研究により解読された系統の配列をもとに SNP 解析を行い、昨年度までに、候補となる遺伝子を絞った。これらの遺伝子の中から、低温適応の遺伝子多型を絞り込んだところ、ゴルジ関連逆輸送タンパク（GARP)が候補として得られたため、原因遺伝子であるかを遺伝子導入解析により検証している。今後、本研究より動物の温度応答に関わる多様性を決める遺伝子の解析から、環境気温と温度適応の相関性が明らかとなると考えられる。

温度記憶の多様性の遺伝子

新たに見つかった温度への適応に関わる記憶の多様性のゲノムのバリエーションをとらえることを目指した。これまでに、本申請者らの解析から、世界各地から単離された線虫 *C. elegans* の温度適応と記憶に対する表現型に複数のバリエーションがあることが見つかった。通常、研究室で使用している野生株であるブリストル産 N2 株は、25℃で飼育した個体を 2℃に静置すると死滅するのに対して、15℃で飼育した個体を 2℃に静置しても生存する現象である。さらに、25℃で飼育された個体をわずか 3 時間 15℃に置くことで、2℃で生存できるようになった。つまり、わずか 3 時間で体内の温度記憶が置き換わったと考えられる。この記憶は神経系で制御されている。

これらの温度適応と記憶の表現型にかんして、世界各地から単離された線虫 *C. elegans* の温度応答に対する表現型に複数のバリエーションがあることが見つかった。これら温度に関する適応と記憶の表現型の多様性に関わる遺伝子を同定ために、次世代 DNA シーケンサー解析から得られた情報を用いている。遺伝子が同定されることにより、温度環境への適応や記憶の分子機構と神経回路機構が明らかになると考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

従来の解析手法では同定に多大なる時間を要した多様性株の遺伝子情報を、短期間で取得することによって、これまで未知であった多様性の現象に関わる遺伝子をハイスループットに同定することができた。特に神経系の感覚や記憶といった、一見しただけでは見えない現象の解析には、従来の方法では解析が困難であったため、多型株の SNP を利用することで解析が可能となった。

＜支援成果公表リスト＞

Ohta, A. et al., Nature commun, 5, 1-12 (2014)

公募支援課題：2015 年度

神経と多臓器間で制御される温度適応メモリーの解析

新学術領域研究

久原 篤・甲南大学統合ニューロバイオロジー研究所

＜背景・目的＞

線虫 *C. エレガンス*は飼育温度に馴化し、飼育限界よりも低温(2℃)での生存能力が変化する。具体的には、25℃で飼育された個体は 2℃で生存できないが、15℃で飼育された個体は 2℃で生存できる。興味深いことに、25℃飼育個体を、3 時間 15℃に移動させることで２℃でも生存できることが見つかった(Ohta, Ujisawa, et al., *Nature Commun,* 2014)。この低温馴化が数時間で形成される過程では、何らかの温度記憶が３時間で置き換わると考えられる。我々は、低温馴化における飼育温度を記憶するメカニズムの解明を目指している。

これまでの解析から、ほ乳類の記憶に関わる転写因子である CREB (cAMP responsible binding protein) の線虫変異体(*crh-1)*では低温馴化に遅れを示すことが明らかとなった。*crh-1* 変異体の組織特異的レスキュー実験より、CRH-1/CREB は、神経系において低温馴化のための新たな温度記憶の形成を促進している可能性が示唆された。また、低温馴化に関わる温度受容ニューロン ASJ のカルシウムイメージング解析により、飼育温度依存的な温度刺激への応答性の変化が観察できた。また、ASJ ニューロンの温度応答性は *crh-1* 変異体で低下し、この ASJ の活性低下異常は ASJ ニューロンで *crh-1* cDNA を発現させることで回復した。以上の結果より、ASJ 温度受容ニューロンは CREB を介して飼育温度を細胞自律的に記憶している可能性が示唆された。そこで、本研究では、記憶の細胞自立性に関わる関連遺伝子の同定を目的とした。

＜支援の内容＞

温度記憶ニューロンから mRNA を単離し、次世代シークエンサーの RNAseq 解析により記憶に関わる遺伝子発現のプロファイルを作成。

＜支援によって得られた研究成果＞

線虫 *C. elegans* の１対の神経細胞のみから mRNA を採取する方法(Sugi & Ohtani BBRC 2014)を用いて、ASJ ニューロンの mRNA を採取した。いくつかの飼育温度パターン別に ASJ と温度受容しないニューロン ASE の mRNA を採取し、微量 RNA を増幅し、次世代 DNA シークエンサーにより解析を行った。その結果、ASJ ニューロン特異的、あるいは温度馴化が形成される過程で特徴的な発現パターンを示す遺伝子のリストが得られた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

記憶の分子生理機構の解明は現在科学の重要課題である。しかし、記憶を構成する神経ネットワークは複雑であり、その情報処理の完全な解明には時間を要すると考えられる。その一方、記憶の神経情報処理を 1 細胞レベルのゲノミクスとして捉えている例は少ない。そこで、本研究により記憶を 1 細胞レベルで非常にシンプルに捉えることができれば、その解析は飛躍的に進展すると考えられる。本研究では、これまでに同定した記憶を行う単一の神経細胞を解析モデルとして、その細胞内で行われる記憶に関する遺伝子発現変動のプロファイルを提示するものであり、記憶のゲノム科学にとって重要なものである。

＜支援成果公表リスト＞

本年度 7 月より研究開始した課題のため、まだ公表論文はない。

公募支援課題：2014 年度

次世代シーケンシングによるヌタウナギの生殖細胞と体細胞の比較ゲノミクス

基盤研究（C）

久保田 宗一郎・東邦大学理学部

＜背景・目的＞

真核生物において生殖細胞と体細胞は生体内で異なる機能を担っている。通常、それらのゲノムに本質的な差はないが、この 2 つの細胞系列の「分化」を、染色体放出というダイナミックなゲノム再編成で体現している生物が無顎綱円口類に属するヌタウナギの仲間（ヌタウナギ目）である。本研究では次世代シーケンサーを用いて、ヌタウナギ目ヌタウナギの生殖細胞ゲノム（G ゲノム）と体細胞ゲノム（S ゲノム）の全ゲノム配列をそれぞれ決定し、両者を比較することにより、生殖細胞に特異的なゲノム（すなわち体細胞には存在しないゲノム：E ゲノム）を明らかにし、これまで未知であった染色体放出現象の抜本的な理解と、染色体放出と 2 細胞系列の「分化」との関連性を追求したい。

＜支援の内容＞

ヌタウナギ体細胞ゲノムの新規ゲノム配列決定；メイトペアデータ（Hiseq2500）（3kb:39.1Gb、5kb:40.6Gb、8kb:23.9Gb、10kb:23.2Gb）の取得

＜支援によって得られた研究成果＞

K-mer 分布の結果から、ある 32bp が全リード中に S ゲノムで 108 回、G ゲノムでは 103 回出現していた。この結果より今回の NGS データでは、S ゲノムを平均 108 倍、G ゲノムでは 103 倍の厚みで読めていることが明らかとなった。横軸に 32bp の出現回数、縦軸にその頻度としたグラフを作成したところ、ピークが 2 箇所に見られた。それらは相同染色体間で配列の異なるヘテロ領域に由来するもの及びホモ領域に起因するものと考えられ、さほど高くはないもののヘテロ接合性がある程度認められるゲノムであると考えられる。本分布から推定されるゲノムサイズは、S ゲノムが 1.3-1.5Gb、G ゲノムが 1.4-1.6Gb 程度となった。我々の比較 DNA 量解析の結果では、S ゲノムが約 1.7Gb と見積もっていたので大きな差は無かった。

今回のアセンブルには、北海道システムサイエンスで受託解析をした S ゲノム、G ゲノムのペアエンドのショートリードに、ゲノム支援で取得して頂いたメイトペアデータを加えて、プラタナスによって行った。結果としては、ギャップクローズ後の S ゲノムが約 1.7Gb となり、我々が推定していたゲノムサイズである 1.5Gb に近似した。G ゲノムについても S ゲノム同様の解析を行った結果、推定されるゲノムサイズはギャップクローズ前で約 1.6Gb と S ゲノムよりも小さい結果なった。アセンブル時のパラメーターを最適化し、ギャップクローズすれば数値も変わってくることが期待される。

更なる解析として、G ゲノムのアセンブル結果に、S ゲノムのリードデータをマッピングし、リードが一切マッピングされなかった領域（E ゲノム）を抽出した。この E ゲノムの配列は、染色体放出によって体細胞には存在しないゲノム領域であると推定される。本領域配列を BLAST+にて検索（E-値<1e-5）を行ったところ、機能をもたない、あるいは一時的に不要となった機能をもつと思われる遺伝子が複数ヒットした。我々はヌタウナギの仲間の行う染色体放出を、生殖細胞と体細胞で働く遺伝子セットを切り替えるスイッチの役割をしているとの仮説を唱えてきたが、本結果は、この仮説を支持する可能性を示唆している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

G ゲノムに関してアセンブルの最適化を行い、最終的なゲノム配列を得る。今回行ったマッピングに加えて、生殖細胞の RNA-Seq のリードデータやヌタウナギの生殖細胞で特異的に増幅している既知の反復配列（11 種類）をマッピングし、E ゲノム領域の検索を進める予定である。これらの実験を行った後には、ナメクジウオやウミヤツメウナギの全ゲノムデータと合わせた全ゲノムでの系統進化解析を試みる。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2010 年度

レット症候群一卵性双生児のゲノム・エピゲノム比較解析に基づく発達障害遺伝子の同定

挑戦的萌芽研究

久保田 健夫・山梨大学大学院医学工学総合研究部

＜背景・目的＞

個体形質の変化や疾患発想要因として、以前より遺伝（氏）か環境（育ち）かといった議論がなされてきた。また両者の寄与度を把握する方法として一卵性双生児と二卵性双生児の比較研究がなされてきた。

一方、近年の遺伝学研究の進展を受けて、ゲノム上のコピー数多型（CNV）の変化が遺伝子の発現量を変化させ神経疾患、精神疾患、小児自閉症の発症要因となること(*Neuron* 2006; *Nature* 2008; *Am J Hum Genet* 2008)、DNA 上の化学修飾状態が加齢、精神ストレス、環境要因で変化すること(*JAMA* 2006; *Nat Neurosci* 2004; Kubota, *Environ Health Prev Med* 2008)が報告されてきた。

このような中、申請者の久保田は発達障害疾患における「ゲノム異常」(*Clin Genet* 2003; *Am J Med Genet* 2007)や「エピゲノム異常」(*Nat Genet*1997; *Am J Med Genet*2004; *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; *Autoimmunity* 2007)、さらに本申請研究の対象疾患のレット症候群において「X 染色体不活化の関与（*Brain Dev* 2001)」、「MeCP2 の脳グリア細胞発現（*Dev Brain Res* 2005)」、「*MECP2* 遺伝子の新しい変異(*Clin Genet* 2006)」、「MeCP2 被制御シナプス病態分子（申請時投稿中、*BMC Neurosci 2011)*」を明らかにしてきた。さらに連携研究者の佐々木は小児神経疾患の診療（*J Child Neurol* 2005; *Brain Dev* 2008）を通じて Rett 症候群双生児における臨床的差異を、研究協力者の佐藤はゲノムワイド解析により疾患感受性遺伝子（*BBRC* 2008;*J Hum Genet* 2008）を見いだしてきた。

以上をふまえ、申請者らは、氏の影響の測定指標としてゲノム配列が、育ちの影響の測定指標としてエピゲノム修飾が活用し、症状や重症度に著しい臨床的差異を認めたレット症候群の一卵性双生児を対象に、ゲノム配列及びエピゲノム修飾の比較解析を実施し、「レット症候群や精神発達障害の重症化および軽症化分子」を同定することを目的に、ゲノム配列比較解析の支援を依頼した。

＜支援の内容＞

支援の内容は、一組の一卵性双生児間の全ゲノム配列決定とその比較解析（相違配列箇所の同定）である。具体的には、国立遺伝学研究所の次世代シーケンサーを用いて、双子それぞれの全塩基配列決定を行って不一致箇所を検出し、検出された不一致箇所に対し、異なる手法（SNV/CNV チップ）による確認（validation）を行った。また検出された欠失箇所においては PCR 解析による確認（validation）作業も支援側が実施した。なおエピゲノム修飾比較解析は依頼側が実施した。

＜支援によって得られた研究成果＞

一卵性双子間に臨床症状の相違が見られた場合、その原因として考えられることは、氏（生まれつきの DNA 配列のちがい）か育ち（環境によるエピゲノム修飾のちがい）のどちらかである。まず本ゲノム支援により、氏（生まれつきの DNA 配列のちがい）の方は否定的となった。そこで、エピゲノム修飾差異を DNA メチル化アレイ法で検証したところ、こちらは、精神発達差異につながりうる神経関連遺伝子領域の DNA メチル化修飾差異が双子間で検出された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

以下の２つの遺伝学的な展望が拓けた。

＜展望１＞双子のゲノム配列は同一であること

遺伝的に同一とされてきた一卵性双子だが、可変性に富む繰り返し配列領域（CNV領域）では双子間でゲノムDNA配列が異なると発表された。しかしながらその後の追試はなく、われわれの結果はCNVアレイで検出された差異はすべて疑陽性（一分子PCRによる）であることが判明し、CNVも含めて、同一であるとの考え方が支持された。

＜展望２＞双子間でエピゲノム修飾は異なること

最近の研究によりエピゲノム（DNAやヒストンの化学修飾）は環境の影響を受けて変化することが示唆され始めた。今回、一卵性双子間でエピゲノムの差異が検出されたことから、エピゲノムには生後（卵割後）の環境による変化またはstochastic（自然発生的）な変化が生じることが示唆された。

＜支援成果公表リスト＞

1. Miyake K, et al. PLoS ONE 8,e66729 (2013)
2. Kubota T, et al. Expert Rev Mol Diagn 14, 685-697(2014)

公募支援課題：2011 年度

父親に特異的に由来する染色体構造異常発生メカニズム

基盤研究（B）

倉橋 浩樹・藤田保健衛生大学総合医科学研究所

＜背景・目的＞

t(11;22)(q23;q11)はヒト生殖細胞系列で最も高頻度にみつかる染色体転座である。転座が遺伝子を破壊しないので均衡型転座保因者は健康だが、リプロダクションに影響する。本転座が高頻度にみつかるのは、ひとりの創始者から伝播したのではなく、高頻度に転座が *de novo* に発生することに起因する。実際に、健常男子由来の精子で、10^{-5} の頻度で転座が検出される。わたしたちは、t(11;22)の両染色体の転座切断点がともに、数 100 塩基対の AT 含量に富む回文配列（palindromic AT-rich repeat: PATRR11、PATRR22）の中央部近傍にクラスターしていることを発見した。PATRR22 は t(11;22)以外の他の染色体転座の切断点のホットスポットでもある。PATRR22 の関与したいくつかの染色体転座の切断点が詳細に解析され、パートナー染色体の切断点にはやはり PATRR 配列が同定されており、PATRR の関与する染色体転座は別の染色体上の PATRR 同士で特異的に切断・再結合する特殊な転座発生メカニズムにより発生していることが予想される。そこで、この PATRR 特異的染色体転座の発生メカニズムの全貌を解明するために、健常男子由来の精子ゲノム DNA を材料にして、PATRR を介した新生転座を網羅的に同定し、転座切断点の配列の特徴を解析することを目的とした。

＜支援の内容＞

方法は、リンカーアダプターライゲーション後、リンカープライマーと PATRR22 に近接したプライマーとで PCR 増幅を行う。この産物で大規模シークエンス、マッピングをおこなうことで、染色体転座のパートナー染色体の切断点の由来を同定することを試みた。*de novo* t(11;22)頻度が 10^{-4} の健常人精子 DNA を 10 μg 用い、上記の方法で PATRR22 に関連する転座切断点を特異的に増幅した。調整サンプルをサンガーシーケンスで 100 分子程度確認したところ、t(11;22)転座が 1 分子見つかり、PATRR 転座が濃縮されていることが確認できた。同一ドナーらの精子由来 DNA と、末梢血由来 DNA とを平行して上記のサンプル調整を行い、大規模シーケンスをおこなった。その結果、非特異的増幅産物が数多く出現するものの、別染色体の配列との融合分子が複数検出された。これらが真の転座分子であるか、リンカーアダプターライゲーションによるアーチファクトなのかを判定するのが困難であった。

＜支援によって得られた研究成果＞

今後、リンカーアダプターライゲーションの非特異的結合の頻度を減らす工夫をおこなったのち、再度、サンプル調整を行い、染色体転座のパートナー染色体の切断点の由来を網羅的に同定する。その結果から、PATRR を介した染色体転座のパートナーは必ず PATRR であることを証明する予定である。

また、パリンドローム部にはクローン化不能、PCR 不能、シークエンス不能という三重苦があるため、ヒトゲノムレファレンス配列からは、パリンドローム部が脱落してしまっていることが多いが、いったん転座するとパリンドローム構造はなくなるので、この方法で三重苦は回避することができ、未知のパリンドローム配列が数多く同定できると考えている。

一方、わたしたちが 2010 年に、PATRR を介した染色体転座であることを示した t(8;22)(q24.13;q11.21)転座に関して、これまでは 8 番染色体上の PATRR8 の解析が三重苦のため不十分であったが、複数の健常人から得られた PATRR8 を含む約 1kb の PCR 産物の大規模シーケンスを行うことで、PATRR8 の全貌を明らかにした。PATRR 中央部近傍は、約 30000 の読みのうち約 50 であり、特に中央を含む配列の出現頻度は低かった。300-400bp の PATRR8 は多型性があり、8 種類のアリルを同定した。新たに同定した日本人 t(8;22)転座の 2 家系を含めた t(8;22)転座の切断点を塩基レベルで解析すると、切断点は対称型 PATRR8、PATRR22 のほぼ中央部であり、最小限のマイクロホモロジーを介して再結合しており、これまでの t(11;22)の切断点に関する知見と一致した。また、従来から知られている染色体構造異常の発生機序に基づいて考えると、独立して発生しているはずの der(8)と der(22)のジャンクション配列が、今回のデータでは完全に一致していた。der(8)と der(22)の発生がなんらかの形で連動していることが示唆されるデータであり、染色体の切断を介さない、これまでに知られていない新たな転座発生のメカニズムが想起された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

期待していた、網羅的解析の部分がまだ解決していないので、新しい展開は開けなかったが、今後、現在の問題点が解決して、期待したデータ、すなわち PATRR 転座のパートナー染色体は必ず PATRR であるというデータが得られた場合、染色体再構成に関する新しいメカニズムを提唱することが可能である。

＜支援成果公表リスト＞

1. Kato T, et al. Mol Cytoenet 4, 18, 2011.
2. Kato T, et al. Curr Opin Genet Dev 22(3), 221-228, 2012.
3. Inagaki H, et al. Nat Commun 4, 1592, 2013.
4. Mishra D, et al. Mol Cytogenet 7, 55, 2014.

公募支援課題：2014 年度

SRY をもたない哺乳類における新しい性決定遺伝子の同定

新学術領域研究

黒岩 麻里・北海道大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

南西諸島に生息するトゲネズミ属は、*SRY* 遺伝子に依らない新しい性決定の仕組みを獲得していると考えられている。アマミトゲネズミ（*Tokudaia osimensis*）は奄美大島に生息する日本の固有種であり、Y 染色体をもたず、*SRY* 遺伝子も消失している。よって、雌雄ともに X 染色体 1 本だけをもつ XO/XO 型の性染色体構成であり、染色体数も奇数となる（$2n$=25）。哺乳類の Y 染色体には、*SRY* 遺伝子以外に、精子形成や精巣発達など雄性に必須な遺伝子が存在しているが、申請者の先行研究により、アマミトゲネズミでは、*SRY* 以外の元 Y 染色体連鎖遺伝子は、X染色体長腕末端部に転座することにより、雌雄のゲノム中に保存されていることがわかっている。さらに、オスとメスがもつ 1 本の X 染色体に性差はなく、性決定を行う遺伝子座は常染色体上に存在することが示唆されている。しかし、Comparative Genomic Hybridization 法により、雌雄間の染色体を比較した結果、雌雄差をもつ領域は検出されなかった。CGH の検出限界が 10 Mb であることから、性決定領域は 10 Mb 以下のごく限られた領域であることが示唆されている。また、*SRY* 遺伝子の下流で性分化にはたらく既知の遺伝子群（性分化関連遺伝子群）は、アマミトゲネズミにおいてすべて保存されていることから、アマミトゲネズミでは、*SRY* 遺伝子に代わる常染色体上の新しい遺伝子が性決定の引き金を担っていることが予想される。よって、本研究では、アマミトゲネズミが獲得した新しい性決定遺伝子を見つけ出すことを目的とする。また、精巣において発現している転写産物を確認することにより、X 染色体に転座した元 Y 染色体上の遺伝子の発現について解析する。

＜支援の内容＞

1. アマミトゲネズミ雄 1 個体の全ゲノム配列を解読し、*de novo* アセンブリ解析を行う。
2. 精巣由来の転写産物において RNA-seq を行い、精子形成を行っている成体精巣で発現している転写産物を網羅的に同定する。

＜支援によって得られた研究成果＞

1. *de novo* アセンブリ解析

Hiseq2500 によりゲノム配列がおよそ 140 倍のカバレッジで解読された。推定されたアマミトゲネズミのゲノムサイズはおよそ 2.45Gbp であり、N50 はおよそ 15.1Mbp であった。ヘテロ接合度は 0.321%であった。また、約 129 Mbp の領域が低カバー率であることがわかり、これら領域をマウスのゲノム配列にマッピングしたところ、そのうち 99.19%は X 染色体にマップされた。しかし、残りのおよそ 1 Mbp の領域は常染色体の 7 ヶ所に分散して存在することが明らかとなった。また、これら領域の近傍に存在することが示唆されている遺伝子配列について、雄 3 個体、雌 3 個体のゲノム配列を用いて比較を行ったところ、雄のイントロン配列のみに、ヘテロな配列が蓄積していることが確認された。よってこれら 7 カ所の領域は、雄でヘテロになっている領域と考えられ、これらの中に性決定遺伝子を含む性決定領域が存在することが期待された。

2. 精巣における RNA-seq 解析

アマミトゲネズミ雄 1 個体の精巣から抽出された polyA(+)RNA を用いて、100bp paired-end で Hiseq2500 により RNA 配列を決定した。リード数は 481,167,614 であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

アマミトゲネズミの性決定領域は大変小さな領域であると予想されており、従来の核型解析や CGH 法による解析からは同定することが困難であった。しかし、本支援によるゲノム配列の *de novo* アセンブリ解析により、性決定領域の候補となる領域が確認された。本支援により、長年不明であった *SRY* 遺伝子に代わる新しい性決定遺伝子の同定へと、着実に進展している。今後は、これら候補領域の BAC クローンを単離し、配列を決定することにより、さらに性決定領域を狭め、最終的には遺伝子の同定を行う。

また、アマミトゲネズミは Y 染色体もたず、雌雄ともに XO 型という世界的にも極めて珍しい哺乳類種である。本種は、奄美大島にのみ生息する日本の固有種で、近年絶滅が危惧されており、かつ国の天然記念物に指定されている。よって、本支援により全ゲノム配列が整備されたことは、希少な日本固有種のリソースを保管する観点からも意義が大きい。

また、トゲネズミ属は三種から構成されており、アマミトゲネズミ以外にも、徳之島に生息するトクノシマトゲネズミ（*Tokudaia tokunoshimensis*, $2n$=45, XO/XO）と沖縄島に生息するオキナワトゲネズミ（*Tokudaia muenninki*, $2n$=44, XX/XY）も絶滅危惧種および天然記念物に指定されている。今回得られたアマミトゲネズミの全ゲノム配列に、これら二種のゲノム配列をマッピングすることにより、今後トゲネズミ属のゲノム配列を解読することが容易になる。さらに、トゲネズミ属は天然記念物に指定されているため、生体材料を入手することが極めて困難である。本支援により得られた精巣における RNA-seq データは大変希少なものあり、本課題の目的のみならず、今後のトゲネズミ属における進化研究に大きく貢献できるものである。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2014～2015 年度

ヒトの発生異常としての多発奇形・精神遅滞の病因解析

基盤研究（C）

黒澤 健司・神奈川県立こども医療センター遺伝科

＜背景・目的＞

先天異常は一般集団の 3－5%に認められ、その原因解明と治療法の開発は医療における重要な課題である。我が国における乳児死亡原因の第 1 位は、先天異常・変形・染色体異常である。小児難病症例が集中する小児病院では遺伝的要因・先天異常例は全入院の 57%を占める（Soneda, Kurosawa、2012）。診断技術の向上や医療の発展によっても先天異常の比率は変わらない。こうした先天異常、特に多発奇形・精神遅滞（MCA/ID・DD）の多くは総体としての頻度は極めて高く、生涯にわたる医療負担は勿論、家族の負担も極めて大きいにも関わらず、研究、医療施策いずれにも対象とされることがほとんどなかった。近年、多くの MCA/ID・DD がヒトの発生に関わる遺伝子の病原性変異に由来することが明らかになりつつある。こうした背景より、本研究は**ヒトの発生異常（多発奇形・精神遅滞例）**の原因をエクソーム解析により**ゲノム・遺伝子レベル**で確定し、その**障害を受けた遺伝子の機能から結果（症状）に至るメカニズム（病態）**を明らかにしてゆくことを目的とした。

＜支援の内容＞

解析対象は 30 家系（31 症例）で、発端者の全エクソーム解析について解析支援を受けた。エクソームキャプチャー・ライブラリー作成は SureSelect V5+UTRs（Agilent）を用い、解析は HiSeq2500 で pair end 101+101 で行った。データ解析では、参照ゲノムに hg19 を用い、bwa（mapping）、samtools（SNV, indel 抽出）を用いた。参照データベースは dbSNP135、ESP6500、1000g などを用いた。解析および解析結果に加え、データの再解析が可能なように、fastq でのデータ提供も受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

データの mapping rate は、>98%（unique 領域 >94%）、coverage >70x で、きわめて信頼度の高いデータを得ることができた。

対象家系の選択は、従来の一般的臨床評価で診断が困難な例を中心として、多発奇形・精神遅滞 20 家系（同胞発症 7 家系）、先天性心疾患 5 例（同胞発症 4 家系）、その他の先天異常 6 家系（同胞発症 3 家系）であった。MCA/ID・DD では全例染色体 G 分染とマイクロアレイ CGH によるスクリーニングを行った後に今回の全エクソーム解析をおこなった。このうち MCA/ID・DD の 3 家系で、疾患と症状が一致する病原性変異を同定し、家系解析により確定できた。2 家系で疾患特異性が強く疑われる変異が検出され、現在も家系解析を含め、解析継続中である。先天性心疾患同胞例、並びにその他の先天異常では、同胞例にもかかわらず、疾患特異的変異を検出することができていない。しかし、今回の解析があくまでも発端者のみの解析であるので、家系解析を含めたデータの見直しが今後も必要である。

検出された疾患特異的変異：

症例 2　*UBE2A* 変異家系（新規変異）

重度精神遅滞・先天性心疾患・脳梁低形成・白内障を主症状とした。現在まで報告のない新規の変異を検出し、過去の報告例とも矛盾のない臨床像であった。UBE2A は、H3K4me、H3K79me 等に必須の因子であり、多臓器にわたる複雑な病態はその機能に由来することが推察された。

症例 17　*ATRX* 変異家系（既報告変異）

臨床的に ATR-X 症候群を疑われながら変異がこれまで検出されなかった重度精神遅滞の同胞発症家系。ATRX の機能ドメインを中心に変異スクリーニングを行ったが、変異が確認されていなかった。今回、検出された変異は期報告変異が集中する機能ドメインから外れていたことから、ATRX の構造と機能について新しい意義が示唆されたと考えられる。さらに、同一報告は日本からであることから数世代遡る家系である可能性もあり、臨床的にも意義深い。

症例 21　*BRAF* 変異（既報告変異）

変異検出により臨床的再評価を検討した結果、症状（Cardio-facio-cutaneous：CFC 症候群）と矛盾ないことを確認した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究の特色は、先天異常をヒトの発生異常という視点からとらえ、網羅的な全エクソーム解析により原因遺伝子を同定し、臨床像との関連を検討することにより病態を把握することにある。今回の対象となった 30 家系（1 同胞組を含む 31 症例）は、14 家系が同胞発症例で、明らかな遺伝的背景が考えられるものの従来の遺伝学的手法では病因を明らかにできなかった家系である。海外の報告では全エクソーム解析により診断未確定症例の約 25%で疾患特異的変異が検出されるとされることから、依然として疾患特異的変異がデータ中に潜在している可能性が高い。引き続きデータ解析を継続し、新規の先天異常病因遺伝子の同定を進める予定である。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2013 年度、2015 年度

転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセシングの共役機構の解明
mRNA 前駆体の組織特異的転写後プロセシングの制御機構の解明

新学術領域研究、基盤研究（B）

黒柳 秀人・東京医科歯科大学難治疾患研究所

＜背景・目的＞

RNA ポリメラーゼ II による mRNA 前駆体の転写サイクルや転写後プロセシングの動態は主に培養細胞を用いて研究されているが、生物個体レベルでの解析は遅れている。本支援を受ける研究課題では、線虫 *Caenorhabditis elegans* をモデル生物として用い、新生 RNA を、細胞を分画して、経時的に、または組織ごとに調製し RNA-seq 解析を行うことで、多細胞生物個体における新生 mRNA 前駆体の転写後プロセシングの時間的・空間的動態を高精細に明らかにすることを目的としている。これに付随して、転写や mRNA 前駆体プロセシングの制御因子の変異体を野生型と比較して RNA-seq 解析を行うことで、制御因子の転写サイクルや転写後プロセシングの動態制御における機能を解明することも目的としている。

＜支援の内容＞

【2013 年度】線虫の個体レベルでの mRNA 前駆体の転写後プロセシングの空間的な進行過程を明らかにするために、次のように合計 12 種類の全 RNA 試料を調製し、「ゲノム支援」の支援を受けて、ポリ(A)+ RNA を精製することなく全 RNA をそのままシーケンス解析した。

RNA 試料の調製方法：線虫の野生型株 N2、神経系特異的選択的スプライシング制御因子 UNC-75 の変異体株、および転写と選択的スプライシングの双方に異常が出ることを見出している *lst-3*変異体株の計 3 株について、液体培養により同調飼育した成虫から漂白により卵を回収し、20 度の緩衝液中で 18 時間インキュベートして孵化させて L1 幼虫期で同調させた。そこへ餌である大腸菌 OP50 株を加えて 20 度で 3 時間飼育し、線虫を回収した。線虫を液体窒素で凍結後、乳鉢で粉末状にすり潰し、融解後にダウンスホモジナイザーを用いてホモジナイズし、大まかな固形物を除いて全細胞画分とした。ここから低速遠心により核を分離し、上清をさらに高速遠心して上清を調製することにより細胞質画分を得た。また、尿素を含む緩衝液で核を処理し、その遠心上清を核質画分、沈殿した画分をクロマチン画分とした。それぞれの画分から DNase 処理を行った上で全 RNA を抽出した。

得られた RNA-seq データ：本支援により、上述の合計 12 試料についてシーケンス解析（Hiseq2500、Single End 36bp）していただき、それぞれ 3,000 万～5,000 万リードのデータが得られた。結果は、fastq 形式の圧縮ファイルで、ハードディスクごと送付を受けた。

データの解析：シーケンス解析用の試料の提出が当該年度末になったためデータの受け取りが 2014 年度にずれ込み、当初の計画では本支援を受ける予定であったデータの解析については、支援を受けないこととなった。その代わり、所属機関である東京医科歯科大学難治疾患研究所のゲノム解析室の支援を受けて解析を行った。

ゲノム支援情報解析講習会：2013 年 11 月に国立遺伝学研究所で開催された講習会に参加した。講習会では、端末を用いたスーパーコンピュータの使用方法の実習、UNIX コマンドの解説、マッピングやアセンブルの実践、簡単なプログラミング、Linux サーバーの構築、ソフトウェアのインストールなど、実践的な内容を直接体験することができ、現在、あるいは今後も自分自身でデータを解析する上で役に立つスキルや情報を得ることができた。

【2015 年度】線虫の個体レベルで転写と共役した mRNA 前駆体の転写後プロセシングを解析するために、同調した L1 幼虫から核画分を調製し、global nuclear run-on (GRO)アッセイで転写伸長途中の新生 RNA を標識して精製し、rRNA を除去してから「ゲノム支援」の支援を受けて標識 RNA をシーケンス解析する予定である。また、線虫の転写後 mRNA プロセシングの経時的な進行過程を明らかにするために、同調した L1 幼虫を用いて新生 RNA を代謝標識し、経時的に新生 RNA を抽出して rRNA を除去してから「ゲノム支援」の支援を受けて RNA をシーケンス解析する予定である。比較のために、mRNA 前駆体の転写や転写後プロセシングの制御因子の変異体株を用いて同様の解析を行う。

RNA 試料の調製方法（検討中）：4-チオウリジン三リン酸(4S-UTP)を用いた GRO アッセイによる新生 RNA の標識方法、4-チオウリジン(4SU)を用いた新生の代謝標識方法、4-チオ標識 RNA の精製方法について、現在最終的な条件検討を行っており、最終的な調製方法を確定させた後に、シーケンス解析用の RNA 試料を調製する予定である。線虫株として野生型株 N2 と *lst-3* 変異体株を用い、前述のように同調飼育した L1 幼虫に大腸菌 OP50 株を加えて 20 度で 3 時間飼育したものを用いる予定である。また、代謝標識した新生 mRNA については、成熟過程にある mRNA をより濃縮するために、前述のクロマチン画分の全 RNA から標識新生 RNA を精製する方法も検討している。

＜支援によって得られた研究成果＞

【2013 年度】全細胞画分、細胞質画分、核質画分、クロマチン画分の各試料のリードの線虫ゲノムへのマッピングを終えた。

その結果、全細胞画分および細胞質画分の RNA には予想どおりプロセシングが完了した成熟 mRNA が濃縮していた。一方、マウスの大食細胞で行われた同様の細胞分画実験の報告から、クロマチン画分や核質画分にはプロセシング途中の、すなわちイントロンを保持した mRNA 前駆体が濃縮されていることを想定していたが、得られた結果によれば、線

虫のこれらの画分ではほとんどのリードがエクソンにマップされ、イントロンにマップされたリードはかなり低頻度であった。特に、発現量の多いハウスキーピング遺伝子の構成的イントロンでは、全細胞画分や細胞質画分と同様、リードはほとんどマップされなかった。このことは、この飼育条件では新規の mRNA 前駆体の転写はほとんど起こっていない可能性、構成的イントロンのスプライシングによる除去は転写とほぼ同時に進行しイントロンの寿命がたいへん短い可能性、あるいは、スプライシングを受け成熟した mRNA がかなりの長時間にわたり核内にとどまり相対的にイントロンのリードが少なく見えている可能性を示唆する。

一方で、これまでの全細胞画分由来 RNA の解析では、少なくとも選択的スプライシングを受けるイントロンの一部については、RT-PCR により検出が可能であり、また、*unc-75* 変異体や *lst-3* 変異体ではイントロンを保持した RNA の相対量が変化することを確認しているが、本支援を受けたシーケンス解析でも、これらの選択的スプライシングを受けるイントロンについては、クロマチン画分や核質画分ではある程度リードがマップされた。しかし、選択的スプライシングを受けるイントロンであっても、クロマチン画分でイントロンにマップされるリードがエクソンにマップされるリードより少ないことに変わりはなく、RNA-seq のデータを基にイントロンリードの密度を定量的に解析することで転写後プロセシングの動態を解明するのは困難であると結論した。そこで、新生 RNA を濃縮する方法の検討を開始し、2015 年度の支援依頼内容に引き継がれている。

【2015 年度】報告書執筆時点ではまだ試料の準備途中であり、当該年度の支援による具体的な研究成果はまだ得られていない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

2013 年度に得られたデータの解析結果を受けて、2014 年度以降は、新生 RNA を標識する方法の検討を行っている。

GRO アッセイは新生 RNA 標識法の 1 つであり、線虫個体から核を抽出後に RNA ポリメラーゼによる試験管内で新生 RNA を標識できることを確認している。RT-PCR による解析では、RNA ポリメラーゼ II による転写の進行中にもイントロンの除去がある程度進行していることが確認できていることから、GRO アッセイで標識される新生 RNA の大規模シーケンス解析は、転写と共役したスプライシング制御を理解する上で基礎となる重要なデータを提供すると期待される。

代謝標識により新生 RNA を生体内で標識する方法も並行して行っている。経時的に標識 RNA を抽出することで転写後プロセシングの進行過程を追跡できると期待されるが、非標識 RNA が非特異的にある程度混入してバックグランドを大きいことが技術的な課題である。一方、新生 RNA を代謝標識した上で細胞分画法と組み合わせることにより、新生 RNA のプロセシングと細胞内の空間的な移動を経時的に解析できると期待される。組織特異的に新生 RNA を代謝標識する方法も検討している。

将来的にはこれらを組み合わせ、さらに制御因子の変異体と野生型を比較することで、新生 mRNA 前駆体が転写後に受けるイントロン除去、ポリ A 付加などのプロセシングの進行過程が組織ごとにゲノムワイドに明らかになり、多細胞生物の多様な細胞の多様な遺伝子発現制御に転写後プロセシング制御がどのように寄与するか具体的に明らかになることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2014 年度

珪藻の進化・繁栄の謎を握る未知の藻類:パルマ藻の生物学

基盤研究（B）

桑田 晃・水産総合研究センター東北区水産研究所

＜背景・目的＞

珪藻は微細藻類ながら熱帯雨林と同等の炭酸固定を行い、海洋で最も多様かつ重要な一次生産者である。だがその科学的重要性にもかかわらず、珪藻の起源ならびに繁栄に到った過程は依然として不明である。近年応募者らは、珪藻同様シリカの殻を持つが培養不能であったパルマ藻の培養系構築に世界で初めて成功し、両者が共通祖先を持つきわめて近縁な生物グループであることを明らかにした。この成果を受け本研究では、珪藻進化の鍵を握るパルマ藻を対象にゲノミクス・生理生態学・生物地球化学的解析を実施し、両藻間の詳細な比較を行うことで、珪藻の出現から現在の繁栄に到った進化過程を解明することを目的とする。本研究の実施により、珪藻に代表される珪酸質を持つ藻類の進化・生態・繁栄戦略に関する理解の飛躍的深化が期待される。

＜支援の内容＞

我々は、パルマ藻は珪藻と大きく異なり、珪酸塩欠乏条件でも無殻の細胞のまま増殖が可能であり、珪酸塩の供給によりシリカの殻形成を開始することを明らかにした。本支援では、この特徴に着目し、珪酸塩がある条件で培養したシリカの殻を持つ細胞と珪酸塩欠乏培地で培養した無殻の細胞との間で発現している遺伝子の違いを定量的に比較することにより、珪酸欠乏条件に対する応答やシリカの殻形成に関与する遺伝子群を同定することを目的とした。先行しているパルマ藻のゲノム解析の結果からパルマ藻のゲノムは、ゲノムサイズが最大で 40Mbp でおよそ 13000 個の遺伝子を含むことが予測されている。そこで、培地中の**珪酸塩“あり“と”なし“の 2 条件**で培養した各細胞から抽出した RNA の RNA-seq を 2 万リード（2 Gb）本支援によりシーケンシングし、各条件下で特異的に発現する遺伝子の同定を進めた。また定量的な結果を得るため、各条件の RNA 抽出と RNA-seq を 3 回ずつ行い解析した。

＜支援によって得られた研究成果＞

培地中の珪酸塩“あり“と”なし“の 2 条件下での培養を 3 回行うことにより、シリカの殻を持つ細胞と無殻細胞での RNA-seq の比較解析を 3 回行い、シリカの殻を持つ細胞で有意に（$P<0.05$）発現量が変化した遺伝子を明らかにした。217 個の遺伝子が殻を持つ細胞で有意に発現量の増加が見られた一方で、100 個の遺伝子は有意に発現量が低下していた。発現量の増加が見られた遺伝子の中には、亜鉛輸送体ホモログ等の金属イオン輸送に関わることが予想される遺伝子が複数見られたことから、パルマ藻におけるケイ素の取込みが、他の金属イオンと共役輸送により運ばれる可能性が示唆された。珪藻で珪素輸送に関わることが示されている珪素輸送体の発現の増加は現時点では見出されなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後は、さらに詳細な発現遺伝子の解析を進めるとともに、RNA-Seq 解析で得られた殻を持つ細胞で発現量の増加が見られた遺伝子について、免疫細胞化学法を用いた発現部位の同定と定量的 PCR による詳細な発現時期の解析を行う。これらの解析によりシリカの殻形成に関わる新規の分子機構の解明につながることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

現在、得られた成果を取りまとめ、投稿準備中である。

公募支援課題：2010 年度

パーソナルゲノムの高次構造に基づくアルツハイマー病発症病態の解析

新学術領域研究

桑野 良三・新潟大学脳研究所

＜背景・目的＞

アルツハイマー病は、常染色体優性遺伝形式をとる若年発症の家族性と加齢に伴う高齢発症の孤発性に分けられる。大多数を占める孤発性アルツハイマー病も遺伝素因（λs=5）が関与し、パーソナルゲノムの多様性を背景に体内/体外環境因子が加わって発症すると考えられている。近年、ゲノムワイド SNP タイピングによる大規模 GWAS (Genome-wide association study)が精力的に行われてきた。その結果、約 700 のリスク遺伝子候補が報告されたが、異なる人種間で再現性がない、および弱いリスク遺伝子（オッズ比 2 以下）のため、病気の発症機序を説明するには不十分であった。これは比較的頻度の高い SNP または欧米人 SNP 情報を基にしているためかもしれない。そこで、疾患−対照群相関解析の GWAS から視点を変えて、家族内多発家系または同胞発症を対象とする rare variants の解析が重要と考えた。Next generation sequencing (NGS) による高精度の全ゲノム配列情報を取得し、得られた rare variants、CNV、in/del 等の包括的ゲノム情報をベースに、アルツハイマー病関連領域を同定することが、ゲノム支援を依頼する目的である。

＜支援の内容＞

アルツハイマー病多発家系を対象とした全ゲノム配列情報を取得するために、次世代シークエンサー（HiSeq2000）による支援を申請し、初年度の支援課題に採択された。「ゲノム支援」を受けるにあたって、新しく多発家系の研究協力者から「ゲノム支援」用の同意を得る必要があった。同意が得られた 3 家系（各家系から 1 人の計 3 人）について、全ゲノム配列情報の支援を受けた。次年度からはゲノム支援は受けられなかったが、引き続き家族内発症を捜し研究協力者を増やして、全ゲノムシークエンス情報を追加して解析を進めた。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまでの SNP をベースとする GWAS で得られたリスク SNP のほとんどが、イントロンまたは遺伝子間にあった。本支援によって得られる全シークエンス情報は、疾患関連タンパクの変異のみならず非翻訳領域のゲノム情報が得られるので、公開データベースに登録されていない未知の rare variants の同定ならびに新しい遺伝子発現制御機構の解明に向けて研究が展開すると期待された。本支援を元に、その後に追加した家族内のアルツハイマー病複数発症例と非発症例の全シークエンスデータを比較して、発症例だけが保有する変異の同定を試みたが、家系に共通する原因遺伝子は無かった。この結果は、既知の原因遺伝子（*APP*、*PSEN1*、*PSEN2*）についても *APP* 家系が *PSEN1* 変異を持つことが無いように、かならずしも家族性アルツハイマー病家系が同じ原因遺伝子を共有しない事を意味している。したがって、家族性アルツハイマー病の各家系には、その家系に固有の原因遺伝子があると考える Rare variant-causative gene in each family の概念を提唱する成果が得られた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

解析できた症例数が少なく、今回の支援のみでアルツハイマー病のリスク遺伝子の同定に至らなかったが、全ゲノムシークエンスによる rare variants の包括的ゲノム情報解析に目処が立った。「ゲノム支援」によって確立した解析法に準拠して、同一家族内で多数発症している家系の検体収集を進める。これによって、全ゲノムシークエンスによるアルツハイマー病関連ゲノム領域や原因遺伝子を同定する研究ならびに機能タンパクとして相互作用する遺伝子群や同一の代謝経路にある遺伝子群を同定する研究へ進む展望が拓けた。

＜支援成果公表リスト＞

準備中

公募支援課題：2013 年度

腸内細菌による病原細菌の病原性発現抑制機構の解明と応用

基盤研究（C）

桑原　知巳・香川大学医学部

＜背景・目的＞

Clostridium difficile は偏性嫌気性グラム陽性菌であり、抗菌薬投与などにより腸内細菌叢が攪乱された場合に増殖し、抗菌薬関連下痢症や偽膜性大腸炎の原因となる。*C. difficile* の主要な病原因子はエンテロトキシン（Toxin A）とサイトトキシン（Toxin B）であり、腸管内でのこれらの毒素レベルが *C. difficile* 関連下痢症の発症と密接に関連する。我々は腸内常在菌である *Bacteroides thetaiotaomicron* の培養上清中には *C. difficile* の Toxin A および Toxin B の産生を抑制する効果があり、この作用の責任分子は 10-100 kDa の耐熱性因子であることを見出した。さらに *B. thetaiotaomicron* のトランスポゾン挿入変異ライブラリーを用いて、この毒素産生抑制因子をコードする遺伝子群を探索した結果、*B. thetaiotaomicron* の莢膜多糖合成や多糖分解に関する遺伝子群が *C. difficile* の病原性の抑制に関与していると考えられた。これらの結果は、*B. thetaiotaomicron* の糖代謝における中間代謝分子が *C. difficile* の毒素産生を抑制していることを示唆しているが、これらの分子が *C. difficile* にどのような遺伝子発現変化をもたらしているのかについては不明であった。そこで、ゲノム支援を受け、*C. difficile* に対する毒素産生抑制作用が減弱した 11 株のトランスポゾン挿入変異株と野生株の培養上清をそれぞれ添加した培地で *C. difficile* を培養し、RNA を抽出して RNAseq 解析を行った。

＜支援の内容＞

C. difficile に対する毒素産生抑制作用が減弱した 11 株のトランスポゾン挿入変異株と野生株の培養上清をそれぞれ添加した培地で培養した *C. difficile* の total RNA を用いて HiSeq2000 を用いた RNAseq 解析によるトランスクリプトーム解析を行った。得られたリードを *C. difficile* のレファレンスゲノム配列にマッピングし、野生株の *B. thetaiotaomicron* との共培養と比較して、変異株において有意に発現変動する遺伝子群を抽出する。

＜支援によって得られた研究成果＞

RNAseq 解析の結果、*B. thetaiotaomicron* 野生株培養上清添加では *C. difficile* 630 株の糖代謝系遺伝子の発現が顕著に上昇していた。毒素産生抑制作用が減弱した *gcpE* 変異株は細胞壁ペプチドグリカンや多糖の菌体外輸送が障害されているが、この変異株の培養上清で *C. difficile* 630 株を培養した場合、糖代謝関連遺伝子群の発現は野生株の培養上清と比較すると顕著に減少していた。このことは、*B. thetaiotaomicron* の産生する多糖類を *C. difficile* が利用していることを示唆している。*C. difficile* の菌体外への毒素の放出には菌体の自己融解が関連していると考えられているため、RNAseq 解析データをもとに溶菌酵素遺伝子の発現を比較すると、*B. thetaiotaomicron* 野生株培養上清の添加により、溶菌に関連する遺伝子群の発現が減少しており、*B. thetaiotaomicron* は *C. difficile* の溶菌を抑制することにより、毒素の遊離を阻害していると考えられた。ゲノム支援による RNAseq 解析により、これまで知られていなかった腸内常在菌の病原細菌に対する新たな病原性発現抑制メカニズムを見出すことができた。今後、*B. thetaiotaomicron* の莢膜多糖の構造解析により、*C. difficile* 関連下痢症の予防薬や治療薬の開発に向けた研究への展開が期待できる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

RNAseq 解析により主要な腸内常在菌の一つである *B. thetaiotaomicron* が偽膜性大腸炎の原因となる *C. difficile* の溶菌を抑制し、結果として毒素の遊離を低減させていることが明らかになった。この溶菌抑制には *B. thetaiotaomicron* の産生する莢膜多糖や本菌の作用によって遊離する糖が重要な役割を果たしており、本菌の培養上清の添加により、*C. difficile* の PTS システムなどの糖輸送体や糖代謝関連の遺伝子発現が大きく変動していることを明らかにすることができた。溶菌は様々な病原体特異的な分子を多量に遊離させ、宿主免疫系を強く刺激して炎症を惹起する。*B. thetaiotaomicron* は病原細菌の溶菌抑制という今まで認知されていなかった作用機序で腸管内の恒常性維持に寄与していると考えられる。*Bacteroides* は他の菌群と異なり、多種類の莢膜多糖を産生することを特徴とする。支援により得られた結果によって、*Bacteroides* がなぜ多種類の莢膜多糖を産生するのか、その生物学的意義や本菌群の炎症性腸疾患における役割に関して新たな展望を見出すことができた

＜支援成果公表リスト＞

なし（投稿準備中）

公募支援課題：2014 年度

遺伝子解析によるソリトン波の形成・維持メカニズムの解明

挑戦的萌芽研究

桑山 秀一・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

衝突しても形や運動量を崩さず安定に存在し続ける波(ソリトン波)は、非線形性を扱う物理学や数学等の基礎研究やその工学的応用にとって非常に重要な物理現象である。これまで細胞の振る舞いにソリトン波の性質が存在することは報告されていなかったが、申請者は細胞性粘菌のある突然変異株が、衝突しても形や運動量を崩さずにすり抜ける波状の細胞集団（細胞ソリトン波）を形成することを発見し、生物の細胞運動レベルの現象にソリトン波現象が存在することを世界で初めて報告した(Kuwayama and Ishida, *Scientific Reports*, 2013)。本申請は、細胞ソリトン波形成の原因に関連する遺伝子を同定しその生物的機能を解析することにより、細胞ソリトン波の物理的性質を検討するために必須な遺伝学的な知的基盤を構築することを目的とする。

＜支援の内容＞

ソリトン形成株である KI-5 株、KI-10 株及びそれらの親株である XP55 株それぞれの全ゲノム配列の決定を行い、親株とソリトン株の塩基の違いを解析する。さらに、大規模 mRNA 解析 (Deep Sequencing) によりソリトン株である KI-5 株、KI-10 株のソリトン現象前後での遺伝子発現の相違を解析する。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援により得られた研究成果は以下のとおりである。

１．KI-5 株、KI-10 株及びそれらの親株である XP55 株それぞれの全ゲノム配列の決定は宮崎大学（現九州大学）林教授、小椋准教授の支援により行われた。得られたデータの解析は、千葉大学の高橋准教授の支援により行われた。それぞれ約 2.4 x 10^7、2.6 x 10^7、2.1 x 10^7 リードの配列、total bps としてはそれぞれ、6.0 x 10^9、6.6 x 10^9、6.1 x 10^7 の塩基数の配列を元に bowtie2 および bwa による相互マッピングを行い、一塩基多形(SNP）解析を行った。その結果、親株 XP55 とタンパク質コード領域において塩基配列の異なる箇所が、KI-5 において botie2 において 75 箇所、bwa において 99 箇所見出された。同様に、KI-10 において botie2 において 75 箇所、bwa において 98 箇所見出された。これらのうち、74 箇所が KI-5 と KI-10 に共通の変異であることが分かった。

２．KI-5 株、KI-10 株それぞれのソリトン現象前後での遺伝子発現の大規模解析は、東京大学の鈴木教授の支援により行われた。得られたデータの解析は、千葉大学の高橋准教授の支援により行われた。ソリトン現象後において１６倍以上発現量が増加している遺伝子は KI-5 において 105 遺伝子、KI-10 において 19 遺伝子存在することが判明した。逆に、ソリトン現象後において１６倍以上発現量が減少している遺伝子は KI-5 において 384 遺伝子、KI-10 において 57 遺伝子存在することが判明した。これらのうちで、KI-5 株と KI-10 株に共通する遺伝子は、１６倍以上増加するもので 6 遺伝子、16 倍以上減少するもので 24 遺伝子であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援による研究成果から、以下の興味深いことが明らかになった。まず、表現型が全く同じであるソリトン株である KI-5 株と KI-10 株においてゲノム配列変異レベルの相同性も高いことが判明した。しかしながら、ソリトン現象の進行における遺伝子発現プロファイルの変化においては、大きな違いがあった。ソリトン現象に関連する遺伝子はソリトン株両者に共通であることが予測されたので、今回のゲノム配列解析結果はそれを裏づけるものであると考えられた。

支援によって開かれた新たな展望は、これまで細胞集団運動におけるソリトン現象という表現型に関連する変異責任遺伝子が全く不明であったが、今回の支援により責任遺伝子候補として実体が明らかになった。今後は、これらの変異遺伝子のうちソリトン現象に関連する遺伝子を、逆遺伝学的手法あるいは表現型を相補する遺伝子の選択により明らかにする。現在までに数個の遺伝子について検証を行ったが責任遺伝子の同定にまで至っていないので、今後変異遺伝子すべてにおいて検証を進める計画である。同様に、遺伝子発現解析によって明らかになった KI-5 株、KI-10 株に共通して観察された発現量の変動が見られた遺伝子に関して。また、遺伝子発現プロファイルの違いは共通な変異遺伝子以外での影響によるものと考えられることから、これらの遺伝子の影響がソリトン現象にどのような影響を与えているかを解析することも今後の研究課題となった。

＜支援成果公表リスト＞

無し

公募支援課題：2010 年度

基部陸上植物苔類ゼニゴケを用いた順遺伝学研究手法の確立

挑戦的萌芽研究

河内 孝之・京都大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

コケ植物は、進化系統的に陸上植物の基部に位置し、生活環の大半が半数体世代である。苔類ゼニゴケは、遺伝子重複が少なく、形質転換が容易であるというモデル植物として理想的な性質をもつ。本研究では、遺伝子機能発見ツールとして順遺伝学的な研究手法を開発する。ゲノム解析は標準系統である宝ヶ池株を用いて JGI の Community Sequencing Project で進行中である。そこで、本研究では、遺伝的なマッピングのリファレンス系統である北白川株のゲノムをリシーケンスし、多型を抽出する。そして、マップベーストクローニングの基礎を築く。分子遺伝学と進化生物学の融合を通じて、陸上植物の生長の背景にある分子機構の普遍性と変遷過程に関する研究の基礎を築く。これは単なる 1 グループの研究にとどまらない植物科学領域への波及効果が期待できる。

＜支援の内容＞

ゼニゴケゲノム遺伝地図と物理地図統合に向けたゲノム配列解析として、ゼニゴケ *Marchantia polymorpha* accession 北白川-2 ゲノムのリシーケンスを Solexa 60x （2010 年度完了）、メイトペア 3kb 1 レーン、5kb 1 レーン（2011 年度完了）の規模で行った。また、情報支援として宝ヶ池株との多型検出を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノムシーケンス解析と情報支援で得られた北白川-2 の配列は宝ヶ池株との間で 144，836 の SNP、17,714 Insertion、14,884 Deletion といった多型を検出した。現時点では、宝ヶ池株のゲノム配列データのアノテーションなどゲノム配列の情報解析と遺伝子機能解析のデータベース開発の共同研究を継続中である。

我々が開始したゼニゴケを利用した分子遺伝学研究は国内外に広がりを見せている。これまでに、苔類ゼニゴケでは、さまざまな実験基盤が整備され、これまでシロイヌナズナで研究してきた現象を進化的に検証する研究や、逆にゼニゴケから見つけた現象をシロイヌナズナで検証するといった研究も進行しつつある。細胞間隙形成の分子機構、成長相転換制御の光周性制御、葉緑体光定位制御、オーキシン信号伝達の解析といった多岐に渡る研究が効率的に実施できるようになった。これらの研究には、ゲノム支援によるデータも含め、ゲノム解析といった基盤的なリソースが大いに貢献している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

宝ヶ池株と北白川株の間に多型が適度に分布し、効率良くマッピングに用いることが可能となった。ゼニゴケの突然変異体を用いた分子遺伝学解析の基盤が大幅に整備された。国内外の新たなモデル生物としての利用が一層促進された。我が国発のモデル生物として位置づけられるに至った。

次世代シーケンサーによる多型検出が背景となり、F1 集団ゲノム配列決定を用いて変異遺伝子同定する実験も進行中である。現在、JGI のデータをもとに進めているゲノム解析と合わせて、今後は高密度の遺伝地図の整備とゲノムアセンブルへの貢献が期待される。

2010 年に先駆的な解析をしたことの成果は、現在、次のような研究基盤を生み出した。次世代シーケンサーを用いたリシーケンスによる変異原因遺伝子の同定：これまでに分離した突然変異体の原因遺伝子が変異体のゲノムを直接シーケンスすることで遺伝子同定できるようになった。これには、支援で受けた対照株のゲノム情報が役に立っている。次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq による遺伝子発現の解析：これまでに分離した変異体と過剰発現株および野生型を利用して、遺伝子発現を解析し、短期間に俯瞰的かつ包括的なデータの取得が可能となっている。更に、相同組換えを利用した遺伝子破壊法や miRNA を利用した発現抑制法を開発し、強力な研究手法を確立した。CRISPR/Cas によるゲノム編集も極めて効率よく行えるようになった。ゲノム情報の活用が益々期待されている。

植物の組織や器官の発生分化および環境依存的成長調節には、転写因子を介する制御系が重要な役割を果たすことが明らかにされている。シロイヌナズナゲノムには約 2000 の転写因子がコードされているが、その多くの機能は不明である。解析の難しさの背景には遺伝的な冗長性がある。ゼニゴケゲノムには、シロイヌナズナの約 1/6 である約 300 の転写因子がコードされているが、遺伝子ファミリー数は変わらない。植物は陸上化したときに既に基本遺伝子セットを保有しており、その後の進化の過程で遺伝子の重複と機能分化が進んだと考えられる。そこで、ゼニゴケ転写因子に注目し、植物の形態形成や環境応答の制御システムの共通原理の抽出を進めている。ゲノム情報解析は研究の基本な基盤となった。

＜支援成果公表リスト＞

Ishizaki, K. et al., J. Plant Res. 125, 643-651 (2012)
Ishizaki, K. et al., Sci. Rep. 13, 1532 (2013)
Ishizaki, K. et al., Plant Cell 25, 4075-4084 (2013)
Kubota, A. et al., Nature Comm. 5, 3668 (2014)
Komatsu, A. et al., Plant Physiol. 166, 411-427 (2014)
Kato, H. et al., PLOS Genet. 11, e1005084 (2015).
Ishizaki, K. et al., Plant Cell Physiol. in press (2016)
Bowman、K. et al., Plant Cell Physiol. in press (2016)

公募支援課題：2010 年度、2012 年度

次世代シークエンサーを用いた生殖系列のエピゲノム修飾とトランスクリプトーム解析

基盤研究（S）

河野 友宏・東京農業大学応用生物科学部

＜背景・目的＞

本研究は、哺乳類の雌雄生殖系列におけるエピゲノム情報のリプログラミングを解明するため、遺伝子発現制御する主要因である DNA メチル化の全貌を生殖細胞において次世代シークエンサーを用いて明らかにするために実施した。

＜支援の内容＞

[2010 年度]

マウス生殖細胞の全ゲノム包括的な DNA メチル化（DNA メチローム）マップを作製するため、近交系マウス C57BL/6N の精巣上体尾部由来の精子、ならびに卵核胞期の卵子の DNA から調整したバイサルファイトショットガンシーケンス用のライブラリーについて HiSeq2000（Illumina）を用いて配列解析を行った。また DNA メチロームとトランスクリプトームを比較するため、各生殖細胞の mRNA-seq 用のライブラリーを調整し、Genome Analyzer Ⅱ（Illumina）を用いて配列解析を行った。

[2012 年度]

マウスの始原生殖細胞の全ゲノム包括的な DNA メチロームマップを作製するため、Oct4-EGFP トランスジェニックマウス（近交系マウス C57BL/6N）の生殖巣から始原生殖細胞を FACS ソーティングにより回収し、Post-Bisulfite Addaptor Tagging（PBAT）法によりバイサルファイトショットガンシーケンス用のライブラリーを調整し、HiSeq2000（Illumina）を用いて配列解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

メチローム解析の結果、精子、卵子、DnmtL-KO 卵子、さらに ES 細胞のメチロームマップを作成し 329 の卵子型メチル化差異領域(DMR)と 349 の精子型 DMR を同定した（PLoS Genetics, 2012）。さらに mRNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施し、マウス卵子において mRNA 転写量と遺伝子内のメチル化（Gene-body メチル化）に強い正の相関性を見出した。さらに、卵子では低率ではあるが non-CpG が存在すること、およびレトロトランスポゾンが高メチル化されていることを明らかにした。さらに、マウス 1 番染色体領域に同定した新規インプリント領域（Gpr1-Zdbf2）におけるメチル化領域を見出し、また長大な新規インプリント転写産物同定した（FEBS letters, 2012）。PBAT 法を用いた 1000 細胞単位でのメチローム解析用の DNA ライブラリーの作製に成功し、胎齢(E)10.5-16.5 日の雌雄 PGC のメチロームマップを完成させた（Genome Research, 2012）。PGC 移動期にかけて、ゲノム刷り込み遺伝子と X 関連遺伝子群のメチル化の消去とともにゲノムワイドな脱メチル化がみられたが、LTR、LINE などの一部のレトロトランスポゾンが脱メチル化に抵抗的であることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

近年の不妊治療の普及と技術の向上に伴い、正常な卵子の効果的評価の基準化が求められている。DNA メチル化は哺乳類生殖細胞の正常な形成に必要なステップの一つであり、実際に DNA メチル化の以上に起因する先天性疾患（あるいは腫瘍形成）は数多く報告されている。本研究は生殖細胞の正常なメチル化確立の規律とその役割を明らかにするとともに、人為的異常が起こりにくい不妊治療法の確立の一助になることが期待される。

当該分野における最前線研究手法の情報を常に提供されたことから、競争の激しい研究領域でいち早く研究成果をまとめることができた。それと同時に、更なる発展の手がかりを得ることができた。

＜支援成果公表リスト＞

[2010 年度支援分]

(1) Kobayashi H, et al. PLoS Genetics 8, e1002440 (2012)

(2) Kobayashi H, et al. FEBS Letters 586, 827-33 (2012)

[2012 年度支援分]

(3) Kobayashi H et al. Genome Research 23, 616-27 (2013)

公募支援課題：2010 年度

ヒトとチンパンジーの比較トランスクリプトーム・メチローム研究

若手研究（B）

郷 康広・京都大学霊長類研究所（現所属：自然科学研究機構新分野創成センター）

＜背景・目的＞

ヒトの全ゲノム配列決定によるゲノム研究は医学研究だけでなく、ヒトの進化史などの基礎研究にも貢献が大きい。1000 人ゲノム研究に代表され、その後、全ゲノム配列解読が数万人規模で行われているが、ヒトの疾患や多様性の理解、特にその進化的な意義を問うためには、ヒト集団だけをみていても不十分である。ヒトに最も近縁な現生種であるチンパンジーのゲノム配列は、藤山らによる 21 番染色体と Y 染色体の報告があり、2005 年には国際コンソーシアムによるドラフトゲノム配列が発表された。また、2013 年には、チンパンジー24 個体を含む 74 個体の大型類人猿の全ゲノム配列が決定され、ヒトを含めた集団動態や進化史の解明研究がなされるようになった。ただし、研究開始時点（2010 年）においては、チンパンジーの全ゲノム配列は上記のドラフト配列のみであり、それだけではヒトゲノムの比較対象とするには不十分な状況にあった。また、ゲノム構造を基盤にしたより高次表現型の比較解析のために、ゲノムワイドな遺伝子発現解析を行なうことも目的とし、ゲノム支援による支援を受けた。

＜支援の内容＞

以下の 3 つの課題に関して支援をいただいた。

I. チンパンジー親子トリオの全ゲノム配列決定

京都大学霊長類研究所において飼育されているチンパンジー親子トリオを対象とした全ゲノム解析を行った。3 個体の血液サンプルよる DNA を調整し、ライフテクノロジー社の次世代型シーケンサー（SOLiD4）による 50bp シングルリードの配列決定を行った。

II. ヒトおよびチンパンジー親子トリオトランスクリプトーム解析

研究 I.において全ゲノム配列決定を行なった親子トリオと同一個体の末梢血を用いたトランスクリプトーム解析を行った。イルミナ社の Genome Analyze IIx を用いて、50bp ペアエンドの配列決定を行った。また、1000 人ゲノム計画により高精度全ゲノム配列が公開されているヒト親子トリオセルラインを用いたトランスクリプトーム解析も行った。

III. ノンコーディング RNA による脳機能制御の解明

研究 III では、ヒトとチンパンジーの脳の機能的な違いをノンコーディング RNA による遺伝子発現制御の種特異性を明らかにすることで解明を行なうことを目的とした。動物園で死亡したチンパンジーの死後脳を用いて大脳皮質と小脳由来 RNA を用いたトランスクリプトーム解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

I. チンパンジー親子トリオの全ゲノム配列決定

2010 年度のゲノム支援において、親子トリオの全ゲノム解析に SOLiD4 を使った配列解読を行ったが、その後、HiSeq のデータも加え、親子トリオそれぞれ 150 カバレッジ以上の深度で配列解読を行った。その結果、コドモゲノムにおいて生殖細胞系列突然変異（de novo SNV）を 45 個同定し、擬陽性率を加味した結果、1.7×10^{-8}/site/generation という突然変異率を算出することができた。

II. ヒトおよびチンパンジー親子トリオトランスクリプトーム解析

チンパンジートリオ（6 組、計 12 個体）のトランスクリプトーム・エキソーム解析を行った結果、

i) 7~14%のアリル特異的発現遺伝子を同定

ii) どのトリオにおいても親の性に共通なアリル特異的発現パターンを示す遺伝子（インプリント遺伝子候補）を 15 個同定

iii) ヒトとチンパンジー間で共有されているアリル特異的発現パターンを示す遺伝子を 20 個同定したが、これはランダムに発現パターンが決まっていると想定した場合との有為差が認められなかった。

III. ノンコーディング RNA による脳機能制御の解明

種特異的ノンコーディング RNA のゲノム構造の多様化への影響を検証した結果、

i) 霊長類ではげっ歯類よりもプロモーターへの偽遺伝子挿入の固定率が 3 倍高い

ii) 固定した挿入配列からは RNA 転写がコード遺伝子に対しアンチセンス方向に起こる

iii) 挿入配列自体はプロモーター／エンハンサーとして、DNA メチル化した挿入配列はサイレンサーとして機能しうる

iv) 挿入配列由来ノンコーディング RNA と DNA グリコシラーゼの強制発現により、挿入配列を配列特異的に脱メチル化/遺伝子オンにできる。

この結果に関して、論文を発表した（以下、参照）。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまでの個人研究、特に若手研究者を対象とした研究費では、達成が不可能であったような大規模配列解析も、本ゲノム支援のサポートにより達成可能になり、チンパンジーのゲノム・トランスクリプトーム研究を加速させることができた。その成果として、ヒトとチンパンジーの新生突然変異率の直接推定と種間比較、アリル特異的発現遺伝子の種内・種間固有性、ノンコーディング RNA の系統比較、などを明らかにすることが可能となった。

＜支援成果公表リスト＞

Uesaka, M. et al, BMC Genomics 15, 35 (2014)

公募支援課題：2010~2012 年度

初期発生におけるクロマチン制御のリアルタイム解析（2010~2011 年度）、及び発生・分化における細胞核内３次元ゲノム構造の役割（2012 年度）

新学術領域研究

國府 力・大阪大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

細胞核内３次元ゲノム構造は、遺伝子発現調節等のゲノム機能に関わる有力なファクターのひとつとして、近年注目を集めている。この分野は、間期核 3D-FISH 法や 2002 年に Dekker らが発表した Chromosome Conformation Capture (3C)法、さらにはその応用である 4C、5C、Hi-C など新しい解析手法の開発によって進展してきたが、得られた知見がそれぞれの解析方法に依存している面があり、さらに別の角度からの技術開発が望まれる。一方、我々がこれまでゲノム工学のツールとして研究してきた DNA トランスポゾンは、ゲノム上の近傍領域に転移しやすい性質（ローカル・ホッピング特性）を有することが知られているが、これは細胞の核内空間における３次元的な近接領域に転移し易いことを意味しているとも考えられる。そこで本研究では、次世代シークエンサー(NGS)を用いてトランスポゾンの転移・挿入サイトを網羅的に同定することにより、核内３次元ゲノム構造を推定する新しい実験手法の開発を試みた。

＜支援の内容＞

DNA トランスポゾンをマウス ES 細胞の特定遺伝子座にノックインし、ES 細胞内でトランスポゾンの転移を誘導したのち、ゲノム中への再挿入部位を NGS で網羅的に同定する。この工程の中で、ES 細胞操作・ゲノム DNA の採取から PCR によるトランスポゾン挿入部位のエンリッチメント、ペアエンドライブラリの調整までを依頼者側で実施し、イルミナ GAIIx によるシークエンスとマウスゲノムへのマッピング作業を支援者側に依頼した。マッピング結果は依頼者側に返却され、３次解析（トランスポゾン挿入部位の抽出、挿入密度の計算）は依頼者側で行った。まず 2010 年度には、NGS を用いたトランスポゾン挿入部位の網羅的同定法のプロトコール開発とその最適化を行った。また各種トランスポゾンの性能比較を行うとともに、特定の遺伝子座から転移させたトランスポゾンの再挿入分布を解析する原理証明実験を行った。つづいて 2011 年度には、ゲノム上にノックインしたトランスポゾンの起点や培養条件の異なる複数の条件下で転移誘導を行い、トランスポゾンの再挿入分布をゲノムワイドに解析し比較した。さらに 2012 年度には分化過程における核内３次元ゲノム構造の変化を検出する目的で、マウス ES 細胞から栄養外胚葉(Trophectoderm, TE)細胞への in vitro 分化実験系においてトランスポゾンの転移誘導を行い、分化の前後におけるトランスポゾン再挿入分布を比較した。

＜支援によって得られた研究成果＞

第一に、トランスポゾン挿入部位を網羅的に同定するためのスプリンカレット型リンカーを用いた DNA 試料作製法と、NGS による解析ワークフローを確立し、トランスポゾン挿入分布を算出するためのソフトウェアを開発した。第二に、３種類のトランスポゾン piggyBac(PB)、Tol2、Sleeping Beauty(SB)のプラスミドからゲノムへの挿入分布指向性を上記の方法で比較・解析した。その結果、SB が、明瞭なローカル・ホッピング特性を示しつつ距離以外のパラメーター（近傍の遺伝子発現強度や GC 含量など）の影響が最小限であり、本研究の目的に最適なトランスポゾンであることが証明された。第三に、マウス ES 細胞の３カ所の遺伝子座に SB を通常の相同組替え法で導入した後、転移酵素発現ベクターによって転移を誘導し、その挿入分布を算出して３次元ゲノム構造との相関を検討した。その結果、Pax1 及び Krt14 遺伝子座を起点とするトランスポゾンの挿入分布はポリコーム複合体結合領域ならびに H3K27me3 領域と正の相関を示した。一方、Nanog 遺伝子座を起点とするトランスポゾンの挿入分布は、H3K4me1, H3K27a, p300 領域と負の相関を示した。これらの結果はプラスミドからゲノムへのトランスポゾン転移では認められず、核内３次元ゲノム構造に依存する現象であることが示唆された。さらに、マウス ES 細胞における Hi-C 解析の公開データと比較し、一定の相関を認めた。第四に、ES 細胞を in vitro で栄養外胚葉細胞に分化させ、トランスポゾンの挿入分布の変化を検討したが、現状では有意な変化を確認するに至っていない。この点に関しては、転移誘導の方法等を改善することにより、実験系の汎用性を高めていく必要がある。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援により、トランスポゾンの転移分布追跡によって３次元ゲノム構造を解析するというアイディアを実行することができた。新規の実験手法の開発であるため、適切なコントロールをおいて詳細な条件検討を行うことができたメリットは大きい。一連の実験結果により、本法は、3C 法などに代表される従来の３次元ゲノム構造解析法に比べて、より遠い距離（数 MB）間の位置関係を反映している可能性が示唆された。今後、さらに精度を向上させ、NGS の新しい用途としての確立を目指す。

＜支援成果公表リスト＞

Yoshida J. et al.（論文執筆中）

堀江恭二 他. 実験医学別冊「ES・IPS 細胞実験スタンダード: 再生・創薬・疾患研究のプロトコールと臨床応用の必須知識」(2014), 316-323.

公募支援課題：2014 年度

miRNA は B 細胞運命決定において転写因子を超えられるか？

新学術領域研究

幸谷 愛・東海大学医学部

＜背景・目的＞

microRNA (miRNA)は遺伝子の翻訳前調節を行う’fine tuner’として重要な役割を持つことが知られている。近年の研究では、ある miRNA の標的となる二つの内在性の転写産物が競合し、他方の発現を調整する機構が明らかになり、competing endogenious RNA (ceRNA)という概念が確立されつつある。

我々はこれまでに EBV 由来の *LMP-1* 遺伝子がヒトの *PTEN* 遺伝子と競合することを実験的に示した。LMP1 のほかに、潜伏感染期の EBV は１０種類前後の遺伝子を発現し、さらに４４種類もの miRNA を発現する。したがって、更なる EBV 転写産物と内在性転写産物の競合が存在すると考えられる。

そこで本研究では、EBV 由来の転写産物が内在性転写産物と競合して形成する、EBV 感染細胞特異的な ceRNA ネットワークの解析を目的とする。

＜支援の内容＞

本研究では、ceRNA ネットワークを解析するために、miRNA とそのターゲット遺伝子の発現を次世代シーケンシングによって網羅的に解析する。

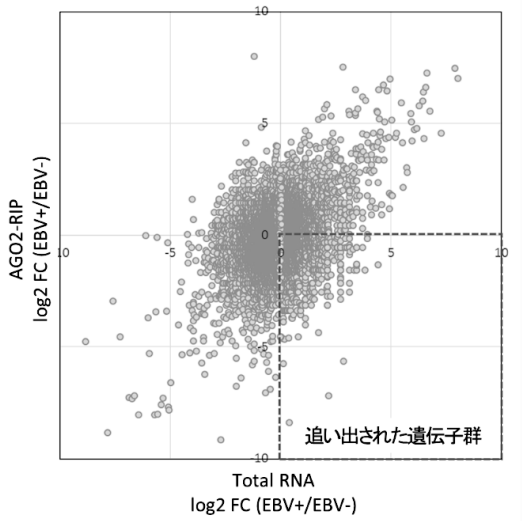
RNA 干渉を担う RNA-induced silencing complex(RISC)から抽出した miRNA とターゲット転写産物を、東京大学の鈴木穣先生のご支援で、RNA-seq ライブラリー作製から次世代シーケンシングまでを実施していただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援研究では EBV 陽性細胞と EBV 陰性細胞のそれぞれについて、トータル転写産物と RISC から抽出した転写産物の RNA-seq を行った。

シーケンスデータの解析の手順は以下のとおりである。1）FASTX-toolkit でクオリティフィルタリング、2）cutadapt によるライブラリーアダプタの除去、３）miRDeep2 パッケージに含まれる fastaparse.pl により 20nt 未満のリードを除去、4）Bowtie2 によるヒトゲノム GRCh38 及び EBV ゲノムへのマッピング、5）HTSeq-count によるリード数の取得、6）TCC による正規化と発現変動遺伝子の検出である。

EBV 由来の転写産物と miRNA を共有する内在性の転写産物は、EBV 由来転写産物の発現により、RISC から追い出され、その結果分解を免れた転写産物の存在量は増加すると予想される。これらの転写産物を同定するために、1)トータル転写産物のうち、EBV 陰性細胞と比較して EBV 陽性細胞で発現が上昇した遺伝子、2)RISC から抽出した転写産物のうち、EBV 陽性細胞で減少していた遺伝子、という 2 つの条件を満たす遺伝子をピックアップした。その結果、1)を満たす遺伝子は 12,797 遺伝子、2) を満たす遺伝子は 15,161 遺伝子、1)と 2)を両方満たす遺伝子は



4,517 遺伝子であった。また、当研究室で EBV 由来の遺伝子との競合が確認されている遺伝子、*PTEN* もこれらの条件を満たすことが確認できた。これらの結果は EBV 由来転写産物と内在性転写産物の競合の存在を示唆するものである。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援研究では、2 つの遺伝子が有意差を持って EBV により追い出され、発現が上昇する遺伝子であることが明らかになった。現在、これらの遺伝子について、miRNA の標的遺伝子を予測プログラムにより EBV 由来転写産物と競合する miRNA を予測し、実験的な同定を進めている。さらに同定した miRNA の標的部位に対する変異挿入などにより「競合を阻害」した条件で起こる現象を細胞レベルで解析し、生物学的な意義の解明を行う予定である。

また、今回の解析で有意差が現れた遺伝子は 4,517 遺伝子のうち、2 つ限られたため、ceRNA ネットワークを描くことはできなかった。今後は、サンプル数を増やすことでより正確に統計学的な解析を行い、詳細な ceRNA ネットワークの解析を目指す。

＜支援成果公表リスト＞

現時点ではなし。

公募支援課題：2014 年度

次世代シーケンサーを用いた封入体筋炎筋発現プロファイルによる炎症と変性の病態解明

基盤研究（C）

後藤 順・東京大学医学部附属病院（現、国際医療福祉大学三田病院）

＜背景・目的＞

特発性炎症性筋疾患（MII）、筋炎には臨床的に、皮膚筋炎（DM）、多発筋炎（PM）、封入体筋炎（IBM）など特徴を有するサブグループが存在する。そのうちで封入体筋炎は、慢性進行性で、組織学的に骨格筋の炎症及び縁取り空胞変性を呈し、有効で確実な治療法のない難治性の疾患である。炎症反応と変性過程との関係を解明することは、病態の理解、治療法開発のヒントを見出すのに有用と考えられる。封入体筋炎生検骨格筋の次世代シークエンサーによる RNA-seq 解析にて網羅的な発現プロファイリングによる解析を行い、本症における炎症反応と変性過程との関係を分子レベルで、明らかにし、病態を解明する。

＜支援の内容＞

封入体筋炎及び CD8 陽性筋炎患者の生検骨格筋試料検体での RNA-seq 解析;検体数 30 検体

＜支援によって得られた研究成果＞

１．解析試料検体数（終了分）

ゲノム支援分	30
2014 年度基盤研究	19
2015 年度基盤研究	11

２．解析試料検体の筋病理診断内訳（終了分）

封入体筋炎（IBM）	33
中間群	11
多発筋炎（PM）	17
対照（正常筋病理）	1
計	62

３．RNA-seq 方法

① 凍結生検骨格筋試料より Trizol にて total RNA を抽出

② DNase I 処理後、TruSeq Total RNA Sample Prep Kit with RiboZero Gold (Illumina) を用いてシーケンスライブラリー作成

③ HiSeq2500 を用いて、101 ベースペアエンド法にて解析

４．RNA-seq 結果

① 検体当たり短鎖長配列リード数；66.4-161.8 メガリード（平均 107 メガリード）

② 参照配列（hg19）への貼り付け（alignment）；TopHat2 にて、平均 76%のリードが align された

５．クラスター分析

① Cufflinks を用いて Gencode 登録遺伝子の発現量の定量を行い、クラスター解析を施行した

② IBM のクラスターは独立して認められ、PM の一部（9 例）もクラスター化した。中間群と、一部の PM（5 例）も一つのクラスターを形成していた

予備的解析の段階であるが、病理学的分類と網羅的な遺伝子発現プロファイリングによるクラスター分析によるクラスターとに対応がみられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援によって相当数の生検骨格筋の網羅的発現プロファイリングを行い、その結果、病理学的分類と網羅的な遺伝子発現プロファイリングのクラスターとに対応が示唆され、分類および病態の鍵となる分子、パスウェイの同定を進めることが可能と考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2015 年度

新規遺伝子変異による IgA 腎症病態モデル

基盤研究（C）

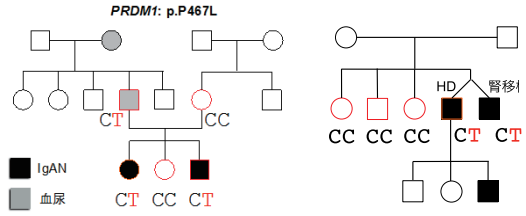
後藤 眞・新潟大学大学院医歯学総合研究科

＜背景・目的＞

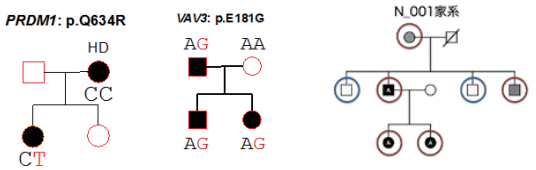
IgA 腎症は慢性糸球体腎炎の中で最も多い疾患であり、家族集積性があることから発症には遺伝要因の関与が推定されている。過去、申請者らを含む多くの研究により IgA 腎症の疾患感受性遺伝子が同定されたが、その詳細は不明である。近年、孤発性 IgA 腎症を対象とした全ゲノム関連解析が行われ、HLA 領域や補体関連因子 *CFHR*、抗菌ペプチド *DEFA*、炎症性サイトカイン *HORMAD2*, *MTMR3* などの遺伝子座に疾患関連アレルが存在することが報告された。さらに本年、申請者らを含む大規模国際共同研究が行われ、B 細胞関連蛋白 *VAV3* や接着分子 *ITGAM-ITGAX*, *CARD9* などの遺伝子座が新たに同定された（Nat Genet, 2014）。現在、これらのリスクアレルは総じても遺伝分散の約 6～7%を説明するにすぎないが、今後より多くの症例を解析することで、さらに多くの疾患関連アレルを同定できる可能性がある。

一方、より遺伝背景が強い家族性 IgA 腎症に対しては、過去、全ゲノム連鎖解析が行われ、4 遺伝子座（2q36、4q26-31、6q22-23、17q12-22）が報告された。家族性 IgA 腎症の遺伝背景にはローカス異質性が存在し、原因遺伝子はまだ特定されていない。近年、シークエンス技術の革新に伴い、大量の遺伝情報の解析が可能となり、申請者らは、2012 年度、2013 年度（新潟大学・成田支援課題）を通じて総計 12 家系の構成者を対象としたエクソーム解析を行った。規模が大きい 1 家系解析でが候補遺伝子として同定され、変異スクリーニングで他の家系でも *EEA* の rare variant が検出されている。　比較的小規模な 10 家系の解析では、まず家系内の co-segregation が認められ、さらに複数の家系で認められた rare variant を候補とした。さらに 10 家系で全ゲノム連鎖解析を行い、HLOD > 1.3 を候補領域とし、その領域に含まれる rare variant を検索したところ、*PRDM1* が同定された。また、上述の IgA 腎症の GWAS によって同定された遺伝子座の中で、*VAV3* の rare variant を有する 1 家系も同定された。

PRDM1 は免疫細胞の分化・発達に関係するマスター遺伝子であり、特に B 細胞では形質細胞への分化、免疫グロブリンの産生に関与する。また、*VAV3* は B 細胞受容体からのシグナルを PI3 kinase の活性化を通じて調節する。これらの変異は、アミノ酸置換による蛋白質への影響度が大きく、免疫細胞の機能を障害している可能性が高い。



また、非常に浸透度が高いと思われる IgA 腎症 1 家系の解析（2012 年度支援課題）では、公的データベースに登録のない候補遺伝子変異が検出されている。中でも 1)リンパ球に強く発現し,T および B 細胞の分化に関与する、2)欠損マウスで糸球体腎炎を呈する、有力な候補遺伝子も含まれている。疾患遺伝子の順位付けを効果的に実行するソフトウェア：pVAAST/Phevor を用いた結果でも最上位にランキングされた。さらに孤発例を対象としたリシークエンス解析を行い、遺伝学的に検証することで、IgA 腎症の疾患原因遺伝子として同定が可能になると思われる。



2012 年度解析家系

＜支援の内容＞

孤発性 IgA 腎症 500 例を対象として、家族性 IgA 腎症候補遺伝子の *SIPA-1*, *ST3GAL5*, *SLIT*, *PRDM-1*, *VAV3* のリシークエンス解析を予定し、現在、進行中である。

＜支援によって期待される成果と現状＞

「ゲノム支援」により得られたシークエンス解析から孤発性 IgA 腎症における候補遺伝子の関与を検討することで、遺伝学的に原因遺伝子であると証明できる可能性がある。またリスク効果の高い複数の原因遺伝子変異が明らかになれば疾患パスウェイの解明から新規治療薬の開発につながる可能性がある。得られた変異が蛋白の機能あるいは発現量に影響を与えると予想される場合、細胞生物学的に検討し、またヒト腎生検組織での発現量の変化を検討し、機能解析から原因遺伝子変異であることを証明する。

IgA 腎症の発症に関わる遺伝子が同定された場合、その遺伝子を含めた疾患パスウェイから新たな診断マーカー、治療経過を評価しうるバイオマーカーを見出せる可能性がある。患者に多大な侵襲を与える腎生検を行わないで IgA 腎症と診断でき、疾患活動性を適切に評価し、治療に反映できる可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

特になし

公募支援課題：2010~2012, 2014 年度

胎生期大脳新皮質神経幹細胞による多様な細胞の産生機構の解析

新学術領域研究

後藤 由季子・東京大学大学院薬学系研究科

＜背景・目的＞

本課題では、胎生期大脳新皮質神経幹細胞の分化能が、発生時期依存的に変化するメカニズムについて、特にポリコーム群タンパク質による制御機構について支援を受けた。我々は以前、ポリコーム群タンパク質が神経幹細胞のニューロン分化能を抑制することで、ニューロン分化期からグリア分化期へと移行することを見出していた（Hirabayashi et al., Neuron, 2009）。この時点では、ポリコーム群タンパク質は、Neurog1という神経幹細胞がニューロン分化する際に必須の遺伝子を抑制することでニューロン分化能を抑制することを報告したが、神経幹細胞におけるポリコーム群タンパク質の表現型は大きく、他の標的遺伝子も存在するのではないかと考えていた。また、ポリコーム群タンパク質がその標的遺伝子をどのように制御するかについては全く明らかとなっていなかった。

＜支援の内容＞

ゲノム支援には以下のような内容で支援を受けた。

1) 神経幹細胞における発生時期依存的なH3K27me3修飾のChIP-seq
2) 神経幹細胞における発生時期依存的なRing1BのChIP-seq
3) 神経幹細胞における発生時期依存的な遺伝子発現変化（RNA-seq）
4) 神経幹細胞のRing1A/B double KOによる遺伝子発現変化（RNA-seq）
5) 神経幹細胞におけるHMGA2のChIP-seq
6) 神経幹細胞においてHMGA2をノックダウンしたときのChIP-seq
7) 神経幹細胞においてHMGA2を過剰発現したときのChIP-seq

また、以上のシークエンスの解析についても多大な支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまでの支援により、神経幹細胞の発生時期依存的な分化能の変化におけるポリコーム群タンパク質の役割の全体像が明らかとなってきた。我々は、この課題とは独立にHMGAタンパク質群というクロマチン因子が神経幹細胞のニューロン分化能の促進に重要であることを見出していたが、そのHMGA2がポリコーム群タンパク質の重要な標的遺伝子であることを本課題により明らかにすることができた（Kishi et al., Nat. Neurosci, 2012）。

また、そのHMGAタンパク質群が神経幹細胞のニューロン分化能を制御するメカニズムを明らかにした。HMGA2過剰発現で発現が上昇する遺伝子のうち、本支援で明らかとなっていた発生時期依存的に遺伝子発現が変化する遺伝子を絞り込んだところ、Igf2bp2という新たな神経幹細胞の制御因子を見つけることができた（Fujii et al., Genes Cells, 2013）。さらに、神経幹細胞のニューロン分化能を制御する別の候補遺伝子も得られており（論文投稿準備中）、本支援により新たな神経幹細胞の制御因子を明らかにできると考えている。

さらに、ポリコーム群タンパク質が標的とする他のニューロン分化関連遺伝子も明らかとなっている。大脳新皮質を構成するニューロンの1つである5層皮質外投射ニューロンは、Fezf2という転写因子によって運命付けられるが、そのFezf2がポリコーム群タンパク質の標的であることを最近報告した（Morimoto-Suzki et al., Development, 2014）。結果、様々な遺伝子の発現を抑制することこそが、ポリコーム群タンパク質による神経幹細胞の運命転換機構の全体像であることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

現在はさらに、ポリコーム群タンパク質がどのようにして正しいタイミングで正しい標的遺伝子の発現を抑制しているのかを調べている。現在までに、本支援により明らかにしたポリコーム群タンパク質の標的遺伝子座におけるH3K27me3修飾ドメインが、神経幹細胞の発生時期依存的に興味深い挙動を示すことをがわかった。そして、H3K27me3ドメインの制御メカニズムを解明することでニューロン分化関連遺伝子の発現制御を通じた神経幹細胞の分化運命制御機構を明らかにしようとしている（論文投稿準備中）。

ポリコーム群タンパク質は、発生過程のみならずガンを始めとした様々な疾患で重要な役割を果たすことが明らかとなっているが、その活性制御メカニズムはほとんど明らかとなっていない。本研究によりその活性制御メカニズムを明らかにすることで、神経発生のみならず様々な分野に貢献することができると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

Hirabayashi and Gotoh, Nat. Rev. Neurosci. 11, 377-388 (2010)
Kishi et al., Nat. Neurosci. 15, 1127-1133 (2012)
Tyssowski et al., Neuroscience 264, 4-16 (2013)
Fujii, Y et al., Genes Cells. 18, 79-89 (2013)
Morimoto-Suzuki,N et al., Development. 141:4343-4353 (2014)

公募支援課題：2014 年度

比較ゲノミクス・メチロミクス・トランスクリプトミクスでのエピゲノム駆動進化の実証

新学術領域研究

小林 一三・東京大学大学院新領域創成科学研究科

＜背景・目的＞

「ゲノム配列でなく、エピゲノム情報こそが進化の担い手である」という可能性を示唆する現象が、ヒトを始め様々な生物で蓄積している。「生殖系列＝体細胞」である単細胞細菌で、この考え方を実証することが、本研究の目的である。とくにゲノムメチル化に着目し、「配列特異的な DNA メチル化酵素が、有無と認識配列と発現とを変換することによって、多様なエピゲノム（メチローム）状態を実現し、それらが多様な遺伝子発現パターンと形質に対応し、自然選択の単位となって適応進化を実現する」という「エピゲノム駆動進化仮説」を検討する。ピロリ菌等について、最先端の技術で、ゲノム・メチローム・トランスクリプトームを近縁系列間で比較し、進化過程を追跡し、適応との関連を探る。

＜支援の内容＞

Illumina の HiSeq を用いたピロリ菌 60 サンプル分の RNA-seq。細菌株から全 RNA を抽出し、リボソームを除去する作業を応募者が行い、インデックス付き cDNA の作成と、illumina HiSeq2500 を用いたシーケンシング、Fastq ファイルの作成を支援者サイドにしていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

ピロリ菌の標準株２株について、I 型（３座位）、II 型（５座位）、および III 型制限修飾系メチル化酵素遺伝子（４座位）のシングルノックアウト株を作成し、それらの対数期、定常期トランスクリプトームプロファイル、場合によってはさらにメチローム、をそれぞれのコントロール株と比較した。

全体として、トランスクリプトームに与える影響の程度はメチル化系の種類によってかなり異なること、それは標的配列のゲノム上での出現回数と関係性が低いこと、メチル化系同士が転写レベルで相互に影響しているという事実が判明した。

並行しておこなわれた形質解析から、幾つかのメチル化系が、運動性、酸化ストレス耐性、酸耐性という細胞表現型について相反する影響を与えることが判明した。これは、ピロリ菌ゲノム内の複数のメチル化系が協調的に形質を調節できるようゲノムが変貌を遂げてきたことを意味する。

ノックアウト株のメチローム解析によって III 型メチル化系の新規標的配列を解明し、その標的がゲノムの特定の領域に多いことも明らかにした。 このようなアイランドの遺伝子発現の制御に III 型メチル系が使われていることを明らかにした。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援によって一部の DNA メチル化系がトランスクリプトームと形質に影響を与えるという「エピゲノム駆動進化」を支持する結果が得られた。さらにピロリ菌が持つ多数のメチル化系が構成するネットワークの一端が明らかになった。この意味を解明するのが次の段階である。 これには多数の日本株ゲノム解析から得られる各株のメチル化系のレパートリーのパターン解析や、メチロームの解読によって、メチル化系の共進化がピロリ菌の系統地理的な適応に寄与する証拠が得られると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2015 年度

比較ゲノミクス・メチロミクス・トランスクリプトミクスでのエピゲノム駆動進化の実証

新学術領域研究

小林 一三・東京大学大学院新領域創成科学研究科

＜背景・目的＞

私たちは、遺伝と進化のシステムの本質をエピジェネティクスに求め、細菌をモデルとして、このシステムの両端にあたる「制限修飾系（＝配列特異的DNAメチル化酵素＋制限酵素）」と「集団ゲノム」を解析し、「制限修飾系が、有無と発現と認識配列を変換することによって、多様なエピゲノム（メチローム）を実現する」、それらは「多様な遺伝子発現パターンと形質セット」に対応するとともに「遺伝情報の流れからの隔離」をも規定し、「自然選択の単位となって適応進化が実現する」という具体的モデルを提唱した。この「エピゲノム駆動進化仮説」を、近縁オーミクス比較によって実証することが、本研究の目的である。ピロリ菌について、近縁系列間で、そして同じ系列の時間経過の前後で、ゲノム・メチローム・トランスクリプトームを比較し、進化過程を追跡し、適応との関連を探る。

本年度の申請では、ピロリ菌メチローム状態の変化が、ピロリ菌の宿主個体内進化、宿主移動、特定の胃の疾患の惹起に関与するという仮説の検証に焦点を当てる。

＜支援の内容＞

ピロリ菌 118 株の完全ゲノムおよびメチローム解読。DNA の調整、クオリティチェクは応募者側が行い、支援者サイドには 10 kb インサート長の SMRT ベルライブラリーの作成、PacBio RSII によるゲノムシーケンシング（＞100x ゲノムカバレッジ）および塩基配列修飾情報（IPDR）の取得を行っていただいている。応募者サイドは以下のサンプルを準備した。

1. 日本国内で得られた、病態（胃炎、十二指腸潰瘍、胃がん；内視鏡像）と対応づけられた、84 株の臨床分離ピロリ菌。
2. 日本の同一ヒト個体内から年月を経てサンプルした、ピロリ菌株２対（計６株）。
3. 日本の一家族の３名のそれぞれから得たピロリ菌（計３株）。
4. 中国のヒト胃の同一組織片から得られた、ピロリ菌株 12 株。
5. RNA-seq データとの対応づけが可能なピロリ菌標準株派生体８株。
6. インドの特定の地域から得られた臨床分離ピロリ菌５株。

これらを Pac Bio RS II で解読する。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまで 37 株分の提供が終了している。

上の３の３株、4 の 12 株のうち７株について、Pac Bio のアウトプットを頂き、４の１株を除いて完全ゲノム配列を得た。

3（家族内感染でのメチローム進化）

3 株全てについてメチロームデータを得ることに成功した。モチーフ解析によって 21 のメチル化モチーフを同定した。全ての株でメチロームが一致した。これと本支援外で得られた「別の家族からのピロリ菌では、全株でメチロームが異なっていた」という結果から、「メチローム変換のある家族と無い家族がある」ことが分かり、「メチローム変換の有無を決めるものは何か」という新たな問題が提起された。

4（メチロームのミクロ多様性）

12 株中 6 株についてデータが得られた。64 ものメチル化モチーフを同定した。先行研究（Cao et al. GUT 2014)で遺伝子から推測されていた 10 のモチーフのうち、５つで実際にメチル化が確認された。また、どれ一つとして、同じメチロームのものは無かった。「ピロリ菌複数の系列間の相互の相同組換えによって、メチロームの多様性が増えている」ことが予想され、今後組換えと合わせての解析を行っていく。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これら以外に日本の同一個体内進化から年月を経てサンプルされたピロリ菌８対が Pacbio 社で解析されている。その成果と以上で得られた成果を合わせて結果の発表を予定している。合わせて 134 株について、完全ゲノム配列と完全(m6A, m4C)メチロームが得られることになる。これは、全ての生物で初めての画期的な成果であり、そこから多くの発見がもたらされると予想される。

似たような家族内でもメチロームが全く変わらない場合も、大きく変わる場合もあることは、メチローム進化を支配する未知の因子の存在を示唆する。

また、近くに存在するピロリ菌のメチロームの著しい多様性の発見は、マイクロバイオームの多様性を極限分解能まで追いつめた成果と言え、メタゲノム研究に大きなインパクトを持つであろう。

「相互の相同組換えがなぜあるのか」は、「真核生物に性（異系列の融合と相同組換えを伴う減数分裂）がなぜあるのか」と相同な問題である。私達の結果は、「多様なエピゲノムを作り出すため」という新しい説に繋がる可能性がある。「エピジェネティックスによる駆動される進化」概念の拡張である。今後の組換え解析とメチローム解析の関連の様相の詳細な解析から、生命の理解が格段に進む可能性が大きい。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2014 年度、2015 年度

超高速ゲノム解読に基づくマウス生殖細胞誘発変異検出と微量変異原リスク評価法の確立

基盤研究（A）

権藤 洋一・理化学研究所バイオリソースセンター

＜背景・目的＞

進化研究に必須な自然発生突然変異率とスペクトルを得るとともに、低線量放射線など、微量変異原の正確なリスク評価にも欠かせないバックグランドでの変異率（コントロール値）を正確に捉えるため、マウスをモデルとする突然変異の高速高精度かつ大規模な検出方法を独自に立案確立した。この方法は、バランサー染色体など特殊な系統を用いる必要がなく、また、新しく生じた変異をホモ接合とならない交配様式で世代に渡って蓄積できる方法であり、有性生殖する生物種すべてに広く応用できる。本研究では実際に、公開されているマウスゲノム参照配列解読の材料となった C57BL/6J 標準系統において、あしかけ５世代、変異を自然に蓄積した独立な 8 家系を交配確立し、それぞれの８家系において、変異をもっとも蓄積した５世代目 8 個体のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサー(NGS)でゲノム解読を行い、公開されている参照配列とまず比較し、single nucleotide variation（SNV）コールを行い変異候補を抽出し、真の変異かどうか実験検証を行う。このとき、初代マウスも含め、全家系において実験検証を行うことで、真の変異と確認できるだけでなく、それが、いつどこで生じたかという起因までトレース解析する、この突然変異蓄積方法によって、突然変異率を求める理論もすでに確立した。最終的に、ヒトを含めたほ乳類のモデル系となるマウスにおいて、精度の高い自然発生突然変異率およびスペクトル解析を、雌雄、加齢、遺伝的背景、環境要因などの違いも含めて解析できる基盤を確立することを目的とする。将来的には、構造変異（structural variation; SV）などすべてのゲノム変異を解析するサンプルとデータが得られるため、生データや試料そのものも公開し、突然変異研究および微量変異原リスク評価の基盤情報、データ、試料を研究コミュニティーに広く提供していく。

＜支援の内容＞

本研究を企画立案した基盤研究（A）では、全マウスゲノム配列 3 Gbp のうち、コーディング領域 50Mbp を解析対象として申請していた。いわゆる全エキソームシーケンシング（whole exome sequencing; WES）による解析を予定していた。全ゲノムシーケンシング（whole genome sequencing; WGS）を行えば、全く同じ試料を用いて、解析規模を一気に 60 倍に拡充できることから、2014 年度ゲノム支援課題として申請し、上記８個体ゲノムの WGS 解読が採択され実現した。得られるビッグデータの情報解析も支援が得られることとなった。すでに 8 サンプルの WGS は完了し、SNV コールによって変異候補 2224 個についてプライマー設計が完了し、実験検証と全家系トレースを大規模に進めている。

さらに、新たに生じる突然変異の有害度、遺伝的背景の違いを解明するための試料も、バイオリソースセンターにおいて整備蓄積されていることを活用し、2015 年度ゲノム支援課題として、兄妹交配で維持している C57BL/6J 系統を含めたマウス近交系 3 系統における初代と末代の 2 個体ずつ合計 6 個体のゲノムサンプルの WGS および SNV コール支援を申請し採択された。兄妹交配は、新しく生じた突然変異も含め、すべての遺伝子座がホモ接合となる確率が最も高い交配様式であるため、有害な劣性変異が選択淘汰で最も除外されやすい。すなわち、2014 年度のホモ接合とならない変異蓄積から得られた変異率より、2015 年度の兄妹交配において得られた変異率の方が低くなれば、新規に生じた突然変異率の有害度によるものとして評価解析できる。さらに、発がん性が極めて低い MSM/Ms 系統と、逆にテラトーマが高頻度に生じる 129J 系統の２系統も、WGS 解析支援されたので、発がん性と生殖系列突然変異に相関が見られるかどうかなど、遺伝的背景の違いによる自然発生突然変異解析も 2015 年度の採択によってはじめて大規模網羅的に可能となった。この 6 サンプルにおいても WGS が既に完了し、現在、SNV コール解析がゲノム支援によって進んでいる。

＜支援によって得られた研究成果＞

C57BL/6J を中心として、総数 14 ゲノムの WGS ビッグデータが、2014 年度・2015 年度のわずか 2 年で得られた。BAM ファイルにしていずれも 90GB ずつ、ゲノムカバレッジも 50×ずつを遥かに上回り、変異解析に十分なデータがゲノム支援によって得られた。SNV コールを中心とするビッグデータ解析も順調に進んでいる。最初の大きな鍵は「初代マウスゲノム」にどのくらいすでに多型/変異が参照配列と比較してク含まれているかという点である。そこで、全情報解析が完了するのを待たず、2014 年度前半 4 個体の解析が完了した時点で、小規模に実験検証を実施した。多数の SNV コールから、4 個体においてユニークかつヘテロ接合として検出された SNV 候補のなかから 113 候補を精選し、検証と家系トレースを行ったところ、すべて真の変異であるとともに、そのうちの 16 変異が蓄積交配中に新規に生じた変異であることと、その由来となる個体、さらには、塩基置換のタイプまで同定できることを明らかかにした。すなわち、この 4 個体比較解析からは、真の変異として同定できた SNV のうち 1/7 が新規に生じた変異であった。2014 年度解析から得られた現在検証中の残りの 2111 変異候補は、8 サンプルにおいてユニークかつヘテロ接合として検出されたものなので、4 個体比較から得られた候補よりも、さらに新規に生じた変異が抽出されている割合が高いと想定され、実際に検証する。

さらに、2014 年度のゲノム支援採択結果が、当初

申請計画を遥かに上回って進捗したため、もとの基盤研究（A）課題でも将来的な展望として記載していた新しく生じてくる突然変異の有害度や、突然変異が生じる遺伝的背景の効果なども、理化学研究所バイオリソースセンターで整備保管しているサンプルを活用することによって、一気に可能であることを着想し、2015 年度の兄妹交配サンプルの利用によるゲノム支援申請が実現した。これによって、2014 年度採択の、ヘテロ接合として新しく生じた変異を世代間で蓄積していく方法と異なり、飼育するマウス数を格段に縮小し、少ないマウス数で自然発生突然変異解析を可能するシステムが確立した。この確立によって、微量変異原などのリスク評価がさらに小規模なマウス実験で可能になることと、これから分子進化研究が全ゲノムにわたって多検体多系統にわたって網羅的に比較解析する扉も開かれた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

独自に立案提唱した自然発生突然変異の蓄積と検出システムが、実際に実験解析可能であることを実証した。ほ乳類の代表モデル系であるマウスにおいて、初代交配からちょうど１年で足かけ 5 世代目のサンプルを、独立に８家系から調製しゲノム支援に送付できたことから、微量変異原リスク評価にも十分にスループットのある解析系であることがわかった。例えば、２家系ずつ、コントロールおよび３つの異なる変異原投与量解析実験の試料 8 サンプル調製まで１年で１研究室で完了できる。一連のデータは、他の生物種における試料調製のスループット推定のための基礎情報としても活用できる。

また、C57BL/6J 標準系統ゲノムそのものは、すでに既知のマウス参照配列として一般には認識されており、通常は、そのまま再解読することはコントロール実験などを省きほとんどない。とくに、今回, 2014 年度に 8 サンプル、2015 年度に２サンプル、合計 10 サンプルの C57BL/6J ゲノムを再解読しており、このショートリードビッグデータは、他にない本邦独自のデータであり、マウス参照配列そのものの再検証と精度向上に大きく貢献できるデータである。じつは、公開されている参照配列に問題があることは、われわれだけでなく以前から多く指摘されている。今回の 2014 年度 8 サンプルを用いた SNV コール結果からも参照配列の問題点が浮き彫りとなった。

この問題は、がんゲノムや 100 万人ゲノム解析等が進むヒトではさらに深刻である。実際に、ほ乳類最初のゲノム解読例となったヒトゲノム参照配列において重要視され、未解読部分の解消と「間違い」の是正が大規模に複数の機関で実施され 2015 年相次いで報告されている。参照配列の精度は、本研究の主目的である変異検出を大きく左右するだけでなく、基礎研究から応用研究に至るまで常用される PCR プライマーの設計から、発現解析などに汎用される RNAseq、Methylseq, ChIPseq などの一連の NGS 技術を駆使する解析、さらには、今日、その解析応用が加速しているゲノム編集などにも必須な情報であり、その「間違い」は致命的な結果になりうる。そこで、本研究の成果そのものである C57BL/6J ゲノム 10 サンプル分のショートリードビッグデータ（BAM ファイルにして約 900MB）と、最新の１分子長鎖 DNA 解読技術を駆使して、C57BL/6J ゲノムの独自のアッセンブリー（de novo assembly）を計画し、現在、国立遺伝学研究所などとの連携を主軸に、国際ゲノム参照配列コンソーシアム（Genome Reference Consortium: GRC）、米国ジャクソン研究所、英国サンガー研究所との交渉も開始しており、国際的に整備展開していく目処が立ちつつある。

とくに、このマウス標準系統の参照配列として最も利用される C57BL/6J だけでなく、上述した 129 系統や MSM/Ms 系統のショートリードデータもそれぞれ２サンプル分（BAM ファイルにして 180GB ずつ）ゲノム支援によって解読されすでにビッグデータが得られている。すべて、生データから公開する予定で現在 DRA 登録なども進めている。129 系統は世界ではじめて ES 細胞株が樹立された系統であり、一方で、MSM/Ms は本邦独自に確立され、他の近交系とは分子進化的に大きな違いがあるだけでなく、その表現型においても上述したように発がん性が極めて低いことも含め、本来の野生マウスが有する形質を多く保持しているユニークな系統である。それぞれの突然変異率が C57BL/6J と異なるかどうか、という科学的興味もさることながら、今後、近交系間の違いを踏まえた遺伝子間相互作用などゲノムワイドに網羅的に解析するために必須な高精度な参照配列をこの２系統においても整備していくうえで、大きく貢献できると確信している。

＜支援成果公表リスト＞

Gondo, Y. Genes. Genet. Sys. 89(6): 285.

Gondo, Y. (WEB公開) YITP International Workshop: Biological & Medical Science based on Physics: Radiation and phyiscs, Physics on medical science, Modeling for biological system. http://www.rcnp.osaka-u.ac.jp/~manabe/ppt/yoichigondo.pdf

公募支援課題：2013～2015 年度

脳卒中関連遺伝子に関する研究

基盤研究（B）

齊藤 延人・東京大学医学部

＜背景・目的＞

我々は脳梗塞の主たる原因である頭蓋内主幹動脈狭窄（以下頭蓋内狭窄）に関連の強い遺伝子変異を同定した(*Stroke* 2012)。これは特発性の頭蓋内狭窄であるもやもや病の感受性遺伝子変異として特定された *RNF213* c.14576G＞A (rs112735431) である。

先行研究において、2011 年 11 月から 2014 年 4 月の間に東京大学附属病院脳神経外科および関東脳神経外科病院にて様々な脳血管疾患の患者 649 例（もやもや病 91 例、片側もやもや病 19 例、頭蓋内狭窄 185 例、頚動脈狭窄 74 例、脳動脈瘤 110 例、高血圧性脳内出血 25 例、normal control 145 例）において RNF213 c.14576G＞A の有無を検証した。

変異を持つ割合はもやもや病では 84.6% (77/91)、片側例では 63.1% (12/19) であった。さらにはアテローム硬化性の頭蓋内狭窄においては 24.3% (45/185) であった。その他の群では頚動脈狭窄に 1 例、脳動脈瘤に 1 例、control に 2 例認めるのみであった。c.14576G＞A はもやもや病ばかりでなく、動脈硬化性の頭蓋内狭窄に対しても有意な関連が示された(*Stroke* 2013)。

この変異が一般の動脈硬化性の頭蓋内狭窄をきたす遺伝的リスクファクターであると考え多角的な検討を行うことを本研究の目的とした。

＜2013 年度の支援の内容＞

先行研究において *RNF213* が脳卒中関連遺伝子して重要であることを明らかにした。一方で、頭蓋内狭窄を有する患者の中には変異 c.14576G>A を持たない者も存在する。これらの患者の中には c.14576G>A 以外の *RNF213* の変異を持つ者が存在する可能性がある。そこで、これまで *RNF213* の遺伝子変異 c.14576G>A のみに着目し解析を行ってきたが、疾患発症に関連する *RNF213* 上のその他の変異の同定を目指した。頭蓋内狭窄患者 271 人と健常者 141 人において *RNF213* 全体の resequence を行い、c.14576G>A 以外の疾患に関連する変異同定を目指した。*RNF213* は exon 数が 68 と大きな遺伝子であり、次世代シークエンサーを用いた target resequence を施行して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

解析の結果 *RNF213* 上に 185 の変異（多型）が同定された。その内訳としては、82 が Noncoding 領域で、103 が Coding 領域に存在した。Coding 領域の変異（多型）の内訳は Synonymous 42、Missense が 61、Nonsense 0、Frameshift 0 であった。

Coding 領域の変異（多型）のうち、疾患発症に関わるものは Missense のものと考え、61 の Missense の変異 (多型) において Case-control study を行い、case に有意な関連がある変異（多型）の同定を目指した。結果としてはこれまで着目してきた c.14576G＞A (rs112735431)が最も疾患に強い関連を持つ変異であることが明らかとなった。

また疾患群でのみ認められる rare variant が 8 種類同定され、c.14576G＞A (rs112735431)以外で疾患と関連する遺伝子変異の候補であると考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

以上の結果より、これまで着目してきた遺伝子変異 *RNF213* c.14576G>A の重要性が再確認される結果となった。また *RNF213* c.14576G>A をもたない発症者にこれまで報告のない新規の変異を数種類認められ、疾患に関わる遺伝子変異の候補と考えられる。これらの候補となる変異に関しては別コホートでの validation や変異の生物学的意義の検証が必要であると考えられる。

＜2014, 2015 年度の支援の内容＞

以上の結果から我々は *RNF213* c.14576G>A が脳卒中の主たる原因である頭蓋内狭窄に大きな関連を持つことを明らかにした。*RNF213* 変異 (c.14576G>A) は日本人の一般集団の 2%と比較的高頻度に認められるが明らかとなっており、一方で頭蓋内狭窄の有病率は約 1000 人に 1 人程度 (全体の 0.1%程度) あり、*RNF213* c.14576G＞A の保因者 (全体の 2%程度) がすべて発症するわけではない。つまり *RNF213* c.14576G＞A を持っていても、頭蓋内狭窄の発症の有無、重症度に関わるさら別の遺伝子変異が存在する可能性が高いと考えられる。2014, 2015 年においてはこのような疾患発症の決定因子となる新たな遺伝的変異（遺伝子多型）を明らかにすることを目的とした。

2014 年は家系解析行った。すなわち同一家系内で *RNF213* c.14576G＞A を有しながら発症者、非発症者を認める家系を 15 系 30 検体の whole exome 解析を行い、遺伝学的手法を用いて全ゲノム領域から疾患発症の決定因子となる遺伝子変異の同定を試みている。2015 年度には *RNF213* c.14576G＞A を有する発症者群と非発症者群の 2 群間で whole exome 解析を行う方針とした。発症者を 100 人 whole exome 解析を行い、また 76 名の非発症者（東京大学ゲノム医学センターのデータベースのデータを利用）と関連解析を行っている。いずれの解析も現在進行中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

RNF213 c.14576G＞A は様々な表現型の頭蓋内狭窄に有意な関連が示され、またこの変異は日本人の 2%程度がもつことが確認できた。この変異は高血圧との関連することも報告されており、頭蓋内狭窄のリスクアレルと相まって脳卒中関連遺伝子変異（バイオマーカー候補）ととらえることもできる。この変異をもつリスク群に対しては、MRI などの脳精査や早期からの降圧薬治療介入などを積極的におこなうことにより、脳卒中の予防医療すなわち先制医療につながることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2011 年度

共生遺伝子群最小セットの同定を目指すミヤコグサ根粒菌共生アイランドの最小化

基盤研究（C）

佐伯 和彦・奈良女子大学 研究院 自然科学系・生物科学領域

＜背景・目的＞
根粒菌とマメ科植物が営む窒素固定共生は、相利共生の代表的な例であり、数少ない細胞内共生の実例でもある。異種生物間の相互認識と寛容・排除の機構、さらにその進化は基礎科学上の重要な課題であるとともに、ダイズなどの重要作物生産性改良の基盤となる課題と言える。共生に必要な遺伝子の最小セットを同定することは、改良の道筋を示す上で重要である。
根粒菌側の共生遺伝子としては、根粒の形成に機能する遺伝子群（*nod*）、窒素固定反応を行うニトロゲナーゼとその成熟などに関与する窒素固定遺伝子群（*nif*）とニトロゲナーゼ以外で根粒内での窒素固定に関与する遺伝子群（*fix*）などに加えて、さらに数多くの遺伝子群が必要である。既知の根粒菌は、近縁の非根粒菌と共通する主ゲノムのセットに加えて、主ゲノム上の一部に外来性のアイランドとして、あるいはプラスミドとして上記の *nod*, *nif* と *fix* 遺伝子群を保持することが知られている。しかし、共生に必要な遺伝子の最小セットの実体は未だ未解明の課題である。本研究では、マメ科のモデル植物であるミヤコグサの根粒菌 *Mesorhizobium loti* の共生アイランドについて、異なる菌株・野生系統の配列データに基づいて欠失を導入、最小共生アイランドを実体化し、共生遺伝子群の最小セットの解明に迫ることを目的とする。また、この目的達成に付随して、根粒菌とその近縁種で利用可能な遺伝子工学ツールキット（遺伝子発現と破壊用）の整備も行う。

＜支援の内容＞
ミヤコグサ根粒菌・野生系統 4 株の Roche 454 による、ドラフト・シーケンス解析：4 株のゲノムサイズは、6.7 Mbp～7.3 Mbp で、17.0 x から 44.7 x カバーにより、2 から 8 の scaffold へアッセンブル（東京大学大学院新領域創成科学研究科（大島健志朗先生、服部正平先生）による）。
上記とは別のミヤコグサ根粒菌・野生系統 8 株の、HiSeq メイトペアデータ（3kbp と 4kbp で 101 サイクル）、これらのうち 5 株について MiSeq ペアエンドデータ（400 bp で、150 サイクル）取得（国立遺伝学研究所（豊田敦先生）による）。

＜支援によって得られた研究成果＞
ミヤコグサ根粒菌の共生アイランド・コア遺伝子の確定：ミヤコグサ根粒菌野生系統 4 株の 454 解析データから、いずれの菌株でも Phe-tRNA 遺伝子を分断再生させる形式で共生アイランドが水平伝搬していることが示された。アイランドのサイズは 415 から 615kbp で、400～600 程度の ORF を含んでいた。HiSeq と MiSeq 解析を行った他の菌株も含めて、いずれの共生アイランドにも共通して含まれるコア遺伝子数は 165 であった。これらのコア遺伝子は根粒の形成に機能する遺伝子群（*nod*）、窒素固定反応を行うニトロゲナーゼとその成熟などに関与する窒素固定遺伝子群（*nif*）とニトロゲナーゼ以外で根粒内での窒素固定に関与する遺伝子群（*fix*）および共生アイランドの水平伝搬に関わる *trb* 遺伝子などを含む概ね 3 つのクラスターに分かれ、3 つのクラスター間の配列には著しく高い多様性が認められた。
ミヤコグサ根粒菌の主染色体の多様性：ミヤコグサ根粒菌ゲノムの共生アイランド以外の領域は、全体として相互に保存は認められるものの、例えば 16S-23S rRNA 配列の多様性と同様の多様性が認められた。共生アイランドの挿入されている Phe-tRNA 以外にも複数の rRNA 遺伝子への挿入因子の存在が認められた。菌株間の比較により、主染色体側のコア遺伝子の概要が判明した。
ミヤコグサ根粒菌野生株の耐塩性遺伝子：ミヤコグサ根粒菌野生系統には 3％程度の NaCl の存在下でも活発に増殖するものが複数知られている。これらの塩耐性株に特有な遺伝子セットが見つかった。塩耐性株での遺伝子破壊と塩感受性株への遺伝子導入を用いた機能の実証解析を実施した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
マメ科のモデル植物ミヤコグサの根粒菌は、所謂 *Mesorhizobioum* 属を越え *Aminobacter* 属等を含み、共通の祖先を持つ共生アイランドが *Phylobacteriaceae* に属する細菌の主染色体に挿入することにより成立していると推定された。これらの共生アイランドは、共生とは直接に関係しないビオチンやチアミンなどのビタミン合成系遺伝子群を含み、主染色体の機能を補う機能を持ち、400kbp 以上のサイズを持つ『利己的遺伝子クラスター』として、一定の細菌の主染色体と相互作用し、既に獲得済みの根粒形成や窒素固定遺伝子群に加えて、主染色体上に位置する遺伝子群を取捨選択しつつ進化しているものと考えられた。確認された共生アイランドはいずれも、アイランド内に位置する P4 ファージ型インテグラーゼにより、Phe-tRNA 遺伝子を標的としたと判断され、ミヤコグサ根粒菌の成立と進化に関して、統合的な理解が得られ、共生遺伝子の最小セットの実証的同定の見通しがついた。
主ゲノム部分の解析から、根粒菌の塩ストレス耐性、乾燥耐性などの原因候補が抽出でき、育種へ向けての展望が拓けた

＜支援成果公表リスト＞
Kasai-Maita H et al. Microbes and Environments 28(2): 275-278 (2013)

公募支援課題：2010、2015 年度

シャジクモ藻類の比較ゲノムと遺伝子機能解析から探る植物の多細胞体制進化

基盤研究（C）

坂山 英俊・神戸大学大学院理学研究科

＜背景・目的＞

陸上植物は約 4.8 億年前に水中生活をする藻類から進化した。これまでの形態学的研究と分子系統学的研究の結果から、シャジクモ藻類 (シャジクモ、コレオケーテ、ヒメミカヅキモ、クレブソルミディウム等) が陸上植物に最も近縁だと考えられている。

陸上植物はすべて胞子体とよばれる２倍体多細胞体と配偶体とよばれる１倍体多細胞体からなる世代交代を行っており、陸上植物の１倍体と２倍体はどちらも多細胞である。いっぽう、シャジクモ藻類では１倍体多細胞体はあるが２倍体多細胞体はない。では、陸上植物および各シャジクモ藻類の多細胞体制の発生システムにどのような違いがあるのであろうか。生物進化において、新規に獲得した遺伝子の多様化が、その後の形態進化に大きく寄与したと考えられている。これまでに、主要な陸上植物の概要ゲノム解読が完了し、ごく最近、クレブソルミディウムの概要ゲノムが解読されたことから植物の多様性はゲノムレベルで比較できるようになってきた。シャジクモ藻類では、先行研究により、いくつかの陸上植物特異的な発生遺伝子がシャジクモ藻類にも存在することが報告されている。

本研究では植物多細胞体制の起源と進化過程を解明するため、陸上植物とシャジクモ藻類が持つ１倍体多細胞体制と２倍体多細胞体制を遺伝子情報から比較する。シャジクモ藻類において申請者らが確立した培養系を基礎とし、トランスクリプトーム/ゲノム解析により発生に関わる遺伝子を網羅的に収集する。どの遺伝子が陸上植物と各シャジクモ藻類との共通祖先に存在するか、存在する場合にどのような役割を果たしているかを解明し、多細胞体制獲得前後での遺伝子進化を特定する。

＜支援の内容＞

・シャジクモ（*Chara braunii*, S276 株）において、様々なステージにある細胞から 8 種の RNA を調整し、次世代シーケンサー（Illumina）を用いた RNA-seq 解析を本支援のもと実施した（2010 年度）。

・シャジクモの器官/細胞毎、発生ステージ毎の RNA（計 12 種、各 3 検体）を調整し、次世代シーケンサー（Illumina）を用いた RNA-seq 解析を本支援のもと進めている（2015 年度）。

＜支援によって得られた研究成果＞

シャジクモについて、本支援を受けた共同研究（支援依頼者：金沢大・西山智明博士）により明らかにした概要ゲノムをもとに、シャジクモの発生段階をほぼ網羅する RNA-seq データ、および陸上植物のタンパク質のアミノ酸配列を用い遺伝子モデル構築を行い、35,883 遺伝子、36,887 転写産物を予測した。シャジクモに加え、コレオケーテ類、ホシミドロ類、クレブソルミディウム、クラミドモナスのゲノム/トランスクリプトーム情報を含め、陸上植物のゲノムとの比較解析を行った。その結果、シャジクモ藻類と陸上植物の共通祖先の段階で 6,300 前後の遺伝子を共有していたと推定された。また、植物特異的だと考えられていた多くの発生遺伝子のホモログをシャジクモ藻類から見いだした。いっぽう、シャジクモ藻類の各系統に特異的な遺伝子の数が多いことや、シロイヌナズナとイヌカタヒバに存在し、ヒメツリガネゴケに存在しないと考えられていたいくつかの発生遺伝子がシャジクモ藻類に存在することが明らかになった。また、シャジクモ藻類と陸上植物が共有する発生遺伝子について遺伝子系統樹を構築し、相同遺伝子間の系統関係と遺伝子重複パターンを解析した。その結果、シャジクモ藻類の遺伝子は、各遺伝子ファミリーやそのサブファミリーにおいて系統的に基部に位置することや、陸上植物の段階で多様化が進んでいる遺伝子ファミリーの多くは、シャジクモ藻類の段階では冗長性が低く多様化が進んでいないことが確認された。

いくつかの遺伝子について、シャジクモにおける発現様式を RT-PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析し、発生段階や器官/細胞毎に特異的に発現する遺伝子を特定した。また、シャジクモの遺伝子をシロイヌナズナに導入し機能解析を行い、遺伝子の構造や機能、およびシャジクモ藻類と陸上植物が持つ多細胞体制の進化過程を考察した。さらに、シャジクモのゲノム情報に基づき、生活環を通して高い発現を示すと考えられる遺伝子のプロモーターが含まれるゲノム領域を用い、外来遺伝子を発現させるコンストラクトを作製し、遺伝子導入の条件検討を進めた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

以上の研究を通して、シャジクモ藻類のゲノムの特徴と、シャジクモ藻類と陸上植物のゲノムレベルの違いの外観が見えてきた。また、個々の遺伝子の解析により、その祖先的な性質と進化過程を推定することができた。今後、シャジクモの発生過程における網羅的な遺伝子発現解析や個々の遺伝子の機能解析が進展し、系統間での比較が可能になることにより、シャジクモ藻類と陸上植物における多細胞体制の起源と進化過程が明確になってくると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Sato, M. et al. Phycol. Res. 62, 214–221 (2014)
Hackenberg, D. et al. Plant Physiol. 163, 1510–1517 (2013)
Hoepflinger, M. et al. J. Exp. Bot. 64, 5553–5568 (2013)
Yang, Y. et al. BMC Res. Notes 4, 330 (2011)
Kato, S. et al. J. Phycol. 47, 999–1008 (2011)

公募支援課題：2013 年度

多数の 1 細胞から定量性のある網羅的遺伝子発現情報を取り出すための基盤技術の開発

挑戦的萌芽研究

笹川 洋平・理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニット

＜背景・目的＞

様々な生理条件において集団細胞内では、ゲノム情報が同一であっても、1 細胞間に RNA やタンパク質の発現量の不均一性が存在する。培養したより均一な細胞集団においても、RNA レベルの発現量のばらつきが存在し、細胞機能との関連性も示唆されている。原理的に、1 細胞 RNA-seq 法は 1 細胞間の RNA レベルの発現量の変動を網羅的に検出できる可能性をもつ。しかし、より微細な遺伝子発現のばらつきを検出するには定量性（検出遺伝子数・再現性や正確性）の不足が指摘されていた。これまでに我々は簡便で定量性の高い 1 細胞 RNA-seq(Quartz-Seq)法を開発し、遺伝子発現のばらつきを網羅的に調べることに成功している。一方で理想的な 1 細胞 RNA-seq のためには、定量性のさらなる改善や、一度に処理可能なサンプル数の上昇（ハイスループット性能）や non-poly-A RNA の検出が求められる。これらをすべて満たす方法は、Quartz-Seq を含め一つもなく、該当方法の開発を試みた。

＜支援の内容＞

Quartz-Seq を含めた報告されているほぼ全ての 1 細胞 RNA-seq 法は、oligo-dT プライマーを活用することで poly-A RNA 検出対象とし、3’末端から 5’末端にかけるまでを 1 単位とする比較的長い cDNA として DNA 増幅を行っていた。そのため増幅バイアスがかかりやすく、Quartz における増幅ではバイアスがかからないようにとくに PCR 増幅を改善してきたが、検出感度の改善はこれ以上難しい。一方で、ランダムプライマーなどで逆転写すると 3’末端から 5’末端にかけるまでを数十単位に分割できるため、増幅バイアスをリスク分散できる可能性があるため検出感度が上昇することが期待される。対象 RNA の poly-A 部分を”点”で捉える方式から、対象 RNA を分割して”面”で捉える方式にすることで、検出感度を上昇させることを試みた。最初にランダムプライマーベースの逆転写反応の最適化を行った。その結果、既存方法では、数 copy の遺伝子を捉えることが難しかったが、改善方法ではほぼ 100%捉えることが出来た。これを発展させ、超並列型シーケンサーのライブラリ作製を試み、いくつかの方式の 1 細胞 RNA-seq のシーケンスライブラリ DNA を作製した。

ゲノム支援では、東京大学鈴木穣先生と鈴木研究室の登坂様、堀内様、菊池様に支援いただいた。開発法で作製したシーケンスライブラリ DNA を Illumina HiSeq Paired-end 101 bp で 15 レーン分解析していただいた。総数 50 サンプル、1 細胞 RNA-seq 法 6 種類の解析をしていただき、一部シーケンスデータが不足した部分に関しては、追加のシーケンスも行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

[簡便でかつ、高い定量性能を発揮する、non-poly-A RNA を検出できる開発方法 SCP3]

mouse ES 細胞由来 10 pg total RNA を人工サンプルとして用いた性能比較の結果、オリジナル開発法 SCP3 がもっとも高い定量性能を発揮することがわかった。1 ug の total RNA を用いた通常の RNA-seq のデータと希釈により作製した 10 pg total RNA を用いた 1 細胞 RNA-seq のデータを比較することで、どれくらいもとのプロファイルを保っているか調べることができる。Quartz-Seq では、10,100 トランスクリプトが検出され 2 倍の範囲内に収まるトランスクリプトが約 59%の 6,000 遺伝子が検出された。一方で、SCP3 では約 10,700 トランスクリプトが検出され、2 倍の範囲内に約 77% 8,250 トランスクリプトが検出された。SCP3 と同様にランダムプライマーを用いた市販品の場合、3,600 トランスクリプトが検出され、約 40%の 1,500 トランスクリプトが 2 倍の範囲内に検出された。これらの結果から、開発した方法が、1 細胞から最も定量性良く遺伝子発現量を取り出せることがわかった。また、SCP3 では、Hist1h1b などの poly-A テールを持たないトランスクリプトが検出できた。Quartz-Seq などの 1 細胞 poly-A RNA-seq 法で出来なかった non-poly-A RNA の検出に成功した。長鎖トランスクリプトにおける全長のカバレッジの改善も確認できた。SCP3 では Quartz-Seq にくらべてステップ数が半分になり簡便性がさらに改善した。一方で、rRNA が全体のリードの 1/3 程をしめることがわかった。ミトコンドリア由来 RNA などを含め、改善の余地があることも分かった。

残るサンプルの解析もすすめ、non-poly-A RNA を検出可能な新規 1 細胞 RNA-seq 法として、論文化を進める予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

科学研究費「挑戦的萌芽研究」の範囲内では難しい規模のシーケンス量（RNA-seq 50 サンプル）をしていただくことで課題を大きく拡大させることが可能になった。我々の開発した“数 copy を捉え漏らさない新規逆転写反応（特許申請中)”を 1 細胞 RNA-seq 法に応用し、非常に高い効果と実用性を示すことができた。これまでできなかった non-poly-A RNA の検出が可能になり、1 細胞での non-poly-A トランスクリプト解析への道が拓けた。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2010 年度

標的遺伝子ノックダウンによる霊長類ヒト疾患モデルの作出

基盤研究（A）

佐々木 えりか・実験動物中央研究所

＜背景・目的＞

コモンマーモセット（マーモセット）は小型の霊長類であり、繁殖性が高く、人獣共通感染症を持たない事、次世代へ導入遺伝子が伝達可能な遺伝子改変動物の作出が可能な事などからバイオメディカルサイエンスの実験動物として有用である。

本研究では、発現遺伝子を分解する RNA 干渉現象を応用し、目的の遺伝子のみを抑制的かつ可逆的に制御する遺伝子ノックダウン（KD）マーモセットの作出法を確立し、得られた KD マーモセットのヒト疾患モデル動物としての有効性を明らかにする事を目的とする。しかしながら、これらノックアウトマーモセット、ノックダウンマーモセットの作出にはゲノムクローンが必要である。現在、マーモセットゲノム BAC ライブラリーは作成されているが、必要とするクローンの選択には、フィルターハイブリダイゼーション、PCR などのスクリーニングが必要であり、ノックアウト、ノックダウンベクターを作成するには多大な時間と労力がかかっている。そこでマーモセット BAC クローンの配列情報をゲノム上にマップすれば、煩雑なスクリーニング過程を経ることなくコンピュータ上で希望するクローンを検索・同定することが可能である。今後、多くの遺伝子改変マーモセットの作出が見込まれ、霊長類の実験動物として利用増加が見込まれているマーモセットの BAC ライブラリーは国として戦略的に整備すべきリソースであり、そこに配列情報を付加することにより、これらのクローンを用いた機能ゲノム解析、ひいては国内外のライフサイエンス研究が飛躍的に発展すると考えられる。

＜支援の内容＞

マーモセット ES 細胞より分化誘導した線維芽細胞株を調製し、この細胞から得られたマーモセットゲノム DNA を用いて作成した ES 由来のライブラリー(384 well plate, 220 枚分）のエンドシークエンスを行っていただき、全てのエンドシークエンスが終了した。

＜支援によって得られた研究成果＞

慶應義塾大学理工学部生命情報科学科榊原研究室と共同して、BAC ライブラリーのエンドシークエンス配列を、実中研マーモセットゲノム配列上に BLAT を用いてマッピングを行い、BAC ライブラリー物理地図を作成した。次に、この BAC 地図をマーモセットゲノムの統合ブラウザー上に実装し、BAC ライブラリーを用いた遺伝子工学実験を行うマーモセット研究者に公開した。BAC ライブラリーを用いたマーモセット遺伝子改変実験に有効利用することにより、当該研究分野が加速されることが期待される。さらに、BAC ライブラリーの成果も含めた論文を発表した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究期間に遺伝子改変技術を取り巻く環境が大きく変化し、ゲノム編集技術という新たな技術が出現し、キメラ個体作製能を持つ ES 細胞、iPS 細胞を作製できない動物種でも標的遺伝子ノックアウト個体の作製が比較的容易に可能となった。しかしながら、標的遺伝子ノックイン技術は、その作製効率から非ヒト霊長類では現在のゲノム編集技術では未だ困難である。本支援によって BAC ライブラリーの整備が整い、対象の遺伝子の近傍領域のプロモータ、エンハンサーの解析を行わなくても正確な組織特異的発現する遺伝子改変マーモセットを作製することが可能となった。近年、げっ歯類と霊長類では、様々な組織で発現する遺伝子が異なること、または発現パターンが異なることが明かにされてきているが、霊長類におけるこれらの遺伝子機能の解析が可能となった。今後は、霊長類に特有である高次認知機能がどのように発達するのかという問題を明かにしていく上で重要な基盤となるものである。

＜支援成果公表リスト＞

Sato K et al., Scientific Reports, 5, 2015, DOI: 16894-16901

公募支援課題：2014 年度

Hippo シグナル経路による細胞間コミュニケーションの分子基盤

基盤研究（A）

佐々木 洋・熊本大学発生医学研究所

公募支援課題：2015 年度

線維芽細胞における細胞競合機構とその発生学的意義

新学術領域研究

佐々木 洋・大阪大学大学院生命機能研究科

＜背景・目的＞

私たちの体は、たった一つの受精卵から、発生によって正確に再現性良く作られる。発生の重要な特徴の一つはその正確性であるが、胚内の個々の細胞の挙動にはばらつきがあり、なばらつきを持った動きをする細胞が、集団として正確に再現性良く体をつくり上げるためには、隣接する細胞同士がコミュニケーションすることで、その挙動を調和させることが必要であると考えられる。しかし、そのような、隣接細胞の状態を認識した細胞間コミュニケーションの仕組みはあまりわかっていない。

私はこれまでのマウス胚発生の研究によって、Hippo シグナル経路が細胞間の接着によって活性化されるシグナルであり、細胞が、細胞密度などを認識する事に関わっていることを見出した。さらに、マウス胚線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞において、Hippo 経路の下流で働く転写因子 Tead の転写活性の異なる細胞を混ぜて共培養すると、Tead 活性の高い細胞が優先的に増殖し、Tead 活性の低い細胞が排除される細胞間コミュニケーションが起こることを見出した。このような状態(適応度という)の異なる隣接細胞間に見られる細胞間コミュニケーションは、ショウジョウバエで最初に同定された細胞競合と呼ばれるものである。

細胞競合の研究はショウジョウバエを中心に進められているが、ショウジョウバエにおいても、どのようにして隣接細胞の状態を認識するのかなど、そのしくみの多くがわかっていない。哺乳類においては、いくつかの系で細胞競合が起こる報告があるものの、そのしくみや発生における役割などは、ほとんどわかっていないのが現状である。

本研究では、マウスにおける隣接細胞の状態を認識した細胞間コミュニケーションの仕組みを明らかにすることを目的として、我々が樹立した NIH3T3 細胞を用いた細胞競合の系を利用して、細胞競合に関わる遺伝子の網羅的なスクリーニングをおこなった。

＜支援の内容＞

スクリーニングの系として、以下のような方法を用いた。まず、CRISPR/Cas9 システムの gRNA のゲノムワイドなレンチウイルスライブラリーを、Cas9 を発現させた NIH3T3 細胞に感染させることで、様々な遺伝子に変異を持つ NIH3T3 細胞の集団、すなわち変異細胞ライブラリーを作成する。この変異細胞ライブラリーを培養すると、細胞競合に関わる遺伝子に変異を持つ細胞は、時間とともに、その存在比率が変化すると考えられる。すなわち、細胞競合の勝者になる細胞はコンフルエントになっても細胞増殖を続けるため存在比率が増加する。一方、敗者になる細胞は増殖が抑制され排除されるため、時間と共に存在比率が減少する。そこで、元の gRNA ライブラリー、培養 4 日目と 10 日目の変異細胞ライブラリーにおける各 gRNA の存在比率を比較し、存在比率の経時的な増減として、細胞競合関連遺伝子を同定する。

本支援では、元の gRNA ライブラリー、培養 4 日目と 10 日目の変異細胞ライブラリーのゲノム DNA に含まれる gRNA を次世代シークエンサーで解読し、さらに、各 gRNA の存在比率の経時的な変化を解析していただいた。2014 年度は Koike-Yusa らによる gRNA ライブラリー(Nat Biotech 32, 267-273, 2014)を用いたスクリーニングを 2 回行い、2015 年度は、これまでに Zhang らによる gRNA ライブラリー(Nat Methods 11, 783-784, 2014)を用いたスクリーニングを 2 回おこなった。

次世代シークエンサーによる塩基配列の解読は国立遺伝学研究所の豊田敦先生に、データの解析は東京大学の岩崎渉先生、松井求先生に、それぞれ支援していただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

<2014 年度＞

2014 年度は Koike-Yusa らの gRNA ライブラリー(Nat Biotech 32, 267-273, 2014)を用いて NIH3T3 の変異細胞ライブラリー作成し、スクリーニングを行った。その結果、本方法によって、実際に細胞競合に関連する遺伝子の同定が可能であることが確認できた。また、その一方で、はっきりとした判定ができない遺伝子も多く得られ、さらなる方法の改善が必要であることも明らかになった。具体的には、以下のとおりである。

Hippo 経路に異常を持つ細胞は、細胞競合の勝者になり、時間と共に存在比率の増加が予想されるが、実際、Nf2, Sav1, Amotl2 などの Hippo 経路の遺伝子に対する gRNA の存在比率が顕著に増加しており、本実験系によって細胞競合関連遺伝子の検索が可能であることが示された。また、時間とともに増加す

る細胞競合の勝者になる新規遺伝子の候補のリストと、時間と共に減少する敗者になる新規遺伝子の候補のリストが得られた。その一方で、以下の問題点も明らかになった。2 回の実験間、あるいは 1 つの遺伝子内の複数の gRNA 間で、結果のばらつきが大きく、増減を判定しにくい遺伝子が多数あった。また、細胞競合の敗者になる遺伝子の候補の中から 16 個の遺伝子を選び、個別に遺伝子機能を確認したところ、10 個の遺伝子で細胞増殖の低下が見られ、そのうち 6 個の遺伝子で細胞競合の敗者になることが確認された。6 個の遺伝子は影響がなく、スクリーニングの偽陽性であることが分った。スクリーニングの効率を上げるためには、ランダムなばらつきがどの程度起きるのかを明らかにし、それを考慮して判断する必要があると考えられた。

<2015 年度>

2015 年度は、前年の問題点を解決するために、各 gRNA の存在比率の変動のランダムなばらつきの程度を考慮したスクリーニングを行った。そのため、gRNA ライブラリーとして、新たに、特定の遺伝子を標的としない non-target gRNA を 1000 個含んでいる、Zhang らの gRNA ライブラリー(Nat Methods 11, 783-784, 2014)を用いた。その結果、まず、4 日目の変異細胞ライブラリー内の存在比率が低い gRNA はランダムなばらつきの影響を大きく受けることがわかったため、その様な gRNA のデータは解析から排除した。さらに、non-target gRNA の存在比率はランダムに変動するが、2 回の実験結果が共にある数値以上に増加(あるいは減少)する確率は低いことが分った。そこで、その値を基準として、2 回の実験結果が、共にその数値以上の変動を示しているものを、意味のある変動を示す gRNA とした。さらに、その様な意味のある変動を示す gRNA が 1 つの遺伝子に対して複数存在する場合に、その遺伝子が細胞競合に関わる遺伝子とした。これらの基準を用いることで、かなり信頼度の高い勝者・敗者の遺伝子候補のリストを得ることができたと考えている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究の支援を受けることにより、マウスの細胞競合関連遺伝子を網羅的に検索できる新たな実験系を作ることができた。これまで、細胞競合の研究は、ショウジョウバエの遺伝学的解析が先行しているが、ショウジョウバエにおける新規遺伝子の検索は、細胞競合に異常を示す変異体を同定した後に、その原因遺伝子を同定するという方法を用いるため、まず変異体のリストが得られ、細胞競合にどのような遺伝子が関わっているのか、その全貌を理解するには時間がかかる。それに対して、本方法では、最初から細胞競合に関わる遺伝子のリストを得ることができるため、今後、得られた遺伝子名のリストを、既知のネットワーク情報と照らし合わせることにより、細胞競合に関わるシグナル経路、代謝経路などの情報を一気に得ることができ、細胞競合に関する遺伝子ネットワークの全容を俯瞰することができるようになると期待される。このように、細胞競合に関わる遺伝子ネットワークの全体像を理解することにより、これまで進められてきたような、特定の個別遺伝子に注目し、その周辺事項の解析を進めて行くという研究スタイルとは全く異なる、システムレベルでの研究を進めることが可能になり、細胞競合の全体像の理解が深まることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

無し

公募支援課題：2013 年度

イソキノリンアルカロイド生合成マシナリーの構築

新学術領域研究

佐藤 文彦・京都大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

植物は多様な二次代謝産物を産生するが、その生合成系については、解明が遅れている。特に、含窒素二次代謝産物（アルカロイド）は生理活性が顕著であるが、その産生が特定の植物種に限定され、かつ、組織特異性があるために、生化学的、分子生物学的解析が困難であった。我々は、イソキノリンアルカロイドに着目し、その産生培養細胞系を確立することにより、同生合成系の解析を進め、生合成遺伝子の多くを単離同定するとともに、異種発現系を用いて微生物に生合成マシナリーを再構築することにも成功していた。一方、生合成系には、未同定の生合成遺伝子が多数存在し、その単離同定により、さらに多様な二次代謝物の生産が可能となると期待した。

これまで、未同定の遺伝子を単離同定する方法として、メタボロームとトランスクリプトームの統合的解析が有効であることを明らかにしてきたが、ゲノム配列を元にした包括的な解析方法があると考えた。特に、近年、植物二次代謝生合成系においても遺伝子クラスターの存在が明らかになってきたことより、ゲノム遺伝子配列からの生合成酵素遺伝子の探索と機能解析を用いた新奇な生合成マシナリーの構築を検討することとした。

＜支援の内容＞

ケシ科のハナビシソウは、これまでにイソキノリンアルカロイドの生合成酵素遺伝子、並びにその発現制御が精力的に解析されるとともに、比較的ゲノムサイズが小さいこと（約 500Mb）、また、EST 情報(16537 配列)が整備されていることから、次世代シーケンサーによるドラフトゲノム解読が可能と考えた。我々自身が予備的に行ったゲノム解析により 360 Mb の配列が得られていたが、N50 が 1.7 Kb と短かったことより、ゲノム支援により、より長い配列情報を得ることを期待した。平均インサートサイズ 342bp, 545bp の PE(ペアエンド) 300, PE500,平均インサートサイズ 2820bp, 4,545bp, 7,926bp, 8,945bp, 13,158bp, 15,125bp の MP(メイトペア)3k, MP5k, MP8k, MP10k, MP15k, MP20k ライブラリーをリード長 150bp ずつ、それぞれ約 6 億、約 5 億、約 2,2 億、約 2.5 億、約 1.2 億、約 3.6 億、約 1.3 億、約 1.7 億解読するとともに、Platanus ソフトを用いたアッセンブル解析をお願いした。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム解読支援により 43,738 コンティグ（総延長塩基数 419 Mb、最長 340 Kb、 N50; 21,362 bp）、15,668 scaffold（総延長塩基数 467 Mb, 最長 4.25 Mb, N50; 796 kb）の配列情報を得ることができた。この配列情報は、ゲノムサイズ 500 Mb とするとほぼ 9 割をカバーするものであった。また、NCBI に登録されている EST の 9 割が 90%カバー率でマップされ、さらに、Phytometasyn に登録されている RNA 配列についても、9 割を越える配列が 50%カバー率でマップされていることが明らかとなり、今回のゲノム解読により、構造遺伝子の多くをカバーする塩基配列情報が得られたと判断された。

このドラフト配列情報を元に、イソキノリンアルカロイド生合成系遺伝子クラスターの存在を検討した。残念ながら、明白な遺伝子クラスターは認められなかったが、複数のイソキノリンアルカロイド生合成関連遺伝子が近接して存在する scaffold を見つけることができた。

また、イソキノリンアルカロイド生合成系で重要な役割を果たしているチトクローム P450 遺伝子（以下、P450 と略す）の遺伝子数を推定したところ、イソキノリンアルカロイド生合成系に関与すると考えられる P450、特に、CYP82 ファミリーがドラフトゲノム上に多く存在すること、また、同遺伝子ファミリーが特定の scaffold 内で重複して存在することを見出した。また、これら CYP82 ファミリー遺伝子間には、発現に大きな違いがあることが判明した。そこで、これら CYP82 遺伝子の発現とアルカロイド産物との相関を解析した結果、ハナビシソウの主要アルカロイドであるサンギナリンからさらに水酸化されて生成するマカルピンの蓄積と相関した発現を示す CYP82 遺伝子を数クローン見出した。

これらの新規 P450 遺伝子を単離し、酵母において発現し、ジヒドロサンギナリンを基質に反応を行った結果、一つの新規 CYP82 が同基質を水酸化することを認めた。また、別の CYP82 は、地上部特異的に発現し、レチクリンを基質として、新規な化合物を産生することが明らかになった。これらの遺伝子産物機能については、さらに詳細な解析が必要であるが、これら以外にも多くの未解析の P450 を見出すことができ、アルカロイド生合成系の新たな酵素遺伝子の発掘が期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回のゲノム解析から、植物においても、ゲノム情報を元にした天然物生合成系解析の糸口が見えてきた。特に、発現しないために、解析が不可能であった沈黙の生合成遺伝子を生合成マシナリーの新たな素材として利用できる可能性がでてきている。また、発現している RNA 配列とのアッセンブリーにより、発現制御機構を理解する糸口がでてきた。従来のトランスリプトーム／メタボロームの統合解析を越えた新次元の天然物生合成研究が可能になると期待している。また、二次代謝の分子進化についても、有力な知見が得られ、今後の発展が期待できる。

＜支援成果公表リスト＞

佐藤文彦 植物の生長調節 50(2), 93-93 (2015)

公募支援課題：2013 年度

次世代シーケンサーを用いた放射線のラット未熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響評価

基盤研究（C）

佐藤 康成・放射線影響研究所分子生物科学部

＜背景・目的＞

ヒトにおける放射線被ばくの継世代リスクを解明するための動物モデルとして、男性被ばくを評価するためにはマウスが用いられてきた。それに対して、女性被ばくを評価する動物モデルとしては、マウスはその未熟卵母細胞が放射線に高い感受性(細胞死)を示しほとんど細胞が得られないため適さない。このため、当初の計画では、未熟卵母細胞が放射線に感受性を示さないラットを動物モデルに使用する予定であった。しかし、ラットの未熟卵母細胞における放射線影響を 2 次元電気泳動法により調べた研究において、ラットの未熟卵母細胞での放射線誘発突然変異率がオスマウスの精原細胞と比べてかなり低いことが示唆されたため、継世代リスクを解明するために次世代シーケンサーを用いる方法を導入するにあたって、既に放射線により突然変異が誘発されることが知られているマウス成熟卵母細胞を標的細胞とした。この場合、精原細胞照射の場合の 2 倍くらいの突然変異が F1 マウスに観察されることが過去に報告されている。

近年の次世代シーケンス技術の進展により、動物個体一匹ごとの全ゲノムシーケンスが可能な状況となった。継世代リスクの解明のためには、突然変異率の低さのために非常に多数の遺伝子座を調べる必要がある。全ゲノムシーケンス法では、個体一匹のほぼ全ての DNA 配列を調査することができ､塩基置換、欠失・挿入、ゲノムの構造異常といった多くの種類の多型を解析できる。従来用いられた技術と比べてはるかに高い解像度での調査を行うことができるため、得られる結果は生殖細胞への放射線照射についてのリスク推定においてゲノム全体における塩基対レベルでの最も詳細なものになると予想された。

本研究では、4 Gy 照射された成熟卵母細胞由来の F1 マウスの突然変異を、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンスにより解析した。母親への照射前に産まれた F1 マウスと照射後に産まれた F1 マウスの突然変異を比較することで、その種類と頻度について検討した。

＜支援の内容＞

材料：雌親に C57BL/6、雄親に C3H という純系マウスを使用した。放射線医学総合研究所の動物施設において同研究所の協力のもと、まず放射線を照射していない C57BL/6 と C3H を交配させ F1 を得た。初回の出産から 4 週が経過した後に、雌親 C57BL/6 に 4 Gy のガンマ線を照射した。成熟卵母細胞由来の F1 を得るために、C57BL/6 は照射後すぐに雄親 C3H と同じケージに 3 日間入れて交配させた。放射線照射前の交配により産まれた F1 マウス 3 匹と、放射線照射後の交配により産まれた F1 マウス 3 匹を後の解析に用いた。それぞれの F1 マウス、親マウスの脾臓から抽出したゲノム DNA を全ゲノムシーケンスに用いた。

全ゲノムシーケンス：それぞれのマウスの脾臓由来ゲノム DNA を用いて Illumina Hiseq 2000 によりシーケンスを行った。500bp の DNA フラグメントライブラリーを 100bp のペアエンド法によりシーケンスを実施した。得られたデータは、ゲノム支援の支援担当者との共同研究により国立遺伝学研究所のスーパーコンピューターを用いて解析を行った。bwa-mem を用いてマウスの参照配列(mm10)へのマッピングを行った後、samtools と GATK により塩基多型の抽出を行った。それぞれのマウスで検出された塩基多型の中で、親には検出されず、1 匹の子供にのみ検出される多型を突然変異の候補として、サンガー法による検証を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

合計 8 匹のマウスの全ゲノムシーケンス解析を行った。一匹あたり約 90 Gb のシーケンスを行い、F1 マウス 1 匹あたり約 500 万個の塩基多型が検出された。

検出された多型の内、両方の親マウスには検出されず、1 匹の F1 にのみ検出される多型で、他の F1 マウスには検出されないものを抽出し、その中でもカバレッジが 15 以上、多型アレルの頻度が 0.35 から 0.65 となるものを de novo の突然変異候補とした。6 匹の F1 マウスに合計で 72 個の塩基置換型の突然変異候補を得た。

このような突然変異候補をサンガーシーケンスにより確認したところ、元のアレルによるピークと変異を示すピークの 2 つのピークを示すヘテロ接合になっている様子が観察された。検証の結果、塩基置換型の変異候補の内､47 個が真の突然変異であった。

放射線照射前の交配で産まれた 3 匹の F1 マウスに 16 個、4Gy のガンマ線を照射後の成熟卵母細胞由来の F1 マウス 3 匹に 31 個の塩基置換型の新規突然変異が検出され､放射線照射された F1 マウスでは突然変異の数が増加していた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

放射線により生殖細胞に生じる突然変異は、マウスの特定遺伝子座についての研究から主に欠失型であると考えられてきたが、ゲノム全体にどのような変化が起きているかは不明であった。本研究により、4 Gy のガンマ線が照射されたマウス成熟卵母細胞由来の F1 において、照射前の交配により生まれた F1 と比べて約 2 倍の新規塩基置換型突然変異が観察された。この結果は、放射線が成熟卵母細胞において塩基置換を増加させていることを示唆している。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

RNA を介した植物と昆虫の生物界をまたいだ遺伝子発現制御の理解

新学術領域研究

佐藤 豊・名古屋大学大学院生命農学研究科

＜背景・目的＞

ジャガイモの害虫であるニジュウヤホシテントウの餌に二重鎖RNA (dsRNA)を混ぜておくと、エサから取り込まれたRNAがニジュウヤホシテントウの遺伝子発現を制御しうることをこれまでに明らかにした。昆虫が摂食により取り込んだdsRNAによる昆虫の遺伝子発現制御の生物学的な意味を考えてみると、ニジュウヤホシテントウはジャガイモが持つ内在性dsRNAをエサとして日々食べている訳で、植物が持つ内在性のdsRNA（ほとんどは機能未知）が、実は、昆虫などの遺伝子発現を調節しているのではないかと考えられる。本研究の目的は、このような生物界をまたいだdsRNAによる遺伝子発現調節を生物と生物の相互作用をとりもつ「ゲノム・遺伝子相関」現象の一つと捉え、その分子機構ならびにこのことの生物学的な意義を明らかにすることである。

RNA 干渉の引き金ともなる siRNA は多くの真核生物が保持する DICER と呼ばれる酵素により dsRNA から作られている。植物にも多数の内在性 dsRNA が存在する事は知られているが、その機能がはっきりと明らかになっている例は少なく、多くが機能未知である。このような dsRNA の本来的な役割が生物間相互作用にある事を申請者らは予想しており、申請者は本研究を通して植物が持つ機能未知 dsRNA の解析にとどまらず、dsRNA を介した生物間相互作用と両者のゲノム共進化に関する、全く新たな概念を「ゲノム・遺伝子相関」の一つとして提案し、本概念の基礎・応用の両面においての定着を目指す。

＜支援の内容＞

本研究では、ジャガイモの二重鎖 RNA の配列とニジュウヤホシテントウの発現遺伝子の間で相同性検索を行い、trans kingdom interfering RNA (tkiRNA)候補を見いだす事を目的としている。本支援新学術では、ジャガイモに内在する二重鎖 RNA を効率的に抽出し次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を支援新学術「ゲノム支援」により行った。また、ジャガイモの葉もしくは人工的に合成した二重鎖 RNA を摂食させたニジュウヤホシテントウの mRNA-seq 解析も行った。この実験により、ジャガイモからもし tkiRNA が見つかった場合に、tkiRNA がどのようなタイムコースや作用機序で昆虫の遺伝子発現に影響を及ぼすかを知る事ができる。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまでに、ニジュウヤホシテントウの mRNA-seq 解析データについては、アセンブルを完了し、発現変動遺伝子の抽出を行っている。少なくとも、人工合成した二重鎖 RNA に相同な配列を持つニジュウヤホシテントウの内在性遺伝子の発現が、摂食後 24hr のサンプルで顕著に低下することを確かめた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ジャガイモの葉を摂食後に発現変動するニジュウヤホシテントウの遺伝子を抽出するとともに、ジャガイモの二重鎖 RNA ライブラリーの配列から、これらの遺伝子と相同な配列の有無を検索する。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2014 年度

男性不妊症における新規原因遺伝子の同定に向けた２方向からのアプローチ

基盤研究（C）

佐藤 陽一・徳島大学大学院医歯薬学研究部

＜背景・目的＞

現在明らかにされている男性不妊症の遺伝的背景として、Y 染色体上の無精子症因子(AZF)領域の欠失が挙げられる。しかし無精子症患者で AZF 領域の欠失がみられる患者は 1 割にも満たないことから、他にも原因遺伝子が存在すると考えられる。そこで、我々は新たな無精子症原因遺伝子を同定することを目的とし、Y 染色体をターゲットとした解析を行った。Y 染色体は約 50～60 Mb の大きさで、両末端には偽常染色体領域が存在し、この領域には遺伝子は無いといわれている。ユークロマチン領域は約 25 Mb からなり、この領域内には 8 種類のパリンドローム配列が存在し、このパリンドローム内に精巣で発現している遺伝子が多く含まれていることから、この領域に精子形成に関わっている遺伝子が含まれている可能性が示唆される。従って、パリンドローム内を含む Y 染色体ユークロマチン領域の変異を PacBio RS によりロングリードで解析することで、新規の無精子症原因遺伝子が同定できると考えた。

＜支援の内容＞

対象患者として、非閉塞性無精子症と診断され、顕微鏡下精巣内精子回収術において精子が確認されず、その原因（精索静脈瘤、核型異常、AZF 領域の欠失など）が明らかにされていない患者を対象とした。ゲノム支援により 1 例の PacBio RS による全ゲノムシーケンスが行われた。PacBio のリードは、Illumina HiSeq より得られたリードで補正された。また、Illumina より得られたリードを reference genome (hg19)にマッピングし、samtools により SNV、indel が抽出された。Annotation を付加後、dbSNP build 135、NHLBI Exome Sequencing project、1000 genomes project などのデータベースにある SNV、indel はフィルターされた。

＜支援によって得られた研究成果＞

1 例の PacBio RS による全ゲノムシーケンスにより、平均長 7.8 kb のリードが得られた。しかしながら、Y 染色体上のパリンドローム配列は塩基の相同性も高く、またその長さも 9 kb～3.5 Mb にも及ぶことから、今回のリードだけでは、重複領域をユニークに被覆することが出来なかった。一方、Illumina による全ゲノムシーケンス解析の結果、新規の SNV は 63,901、indel は 48,855 であった。そのうち、non-synonymous な新規 SNV は 331、cording 領域の新規 indel は 67 であり、これらの SNV を含む遺伝子は 266、indel を含む遺伝子は 65 であった。Y 染色体に関しては SNV が 12,929、indel が 1,272 であったが、non-synonymous な新規 SNV や cording 領域の新規 indel は含まれていなかった。しかし、新規 SNV や indel のうち、遺伝子の上流及び下流に存在するいくつかの変異がみつかった。また、前述のように無精子症患者の 1 割に AZF 領域の欠失がみられ、AZFa, b, c の 3 領域のうち、特に AZFa と AZF b の領域の欠失は顕微鏡下精巣内精子回収術による精子の回収が不可能であることから、これら 2 つの AZF 領域内に無精子症の原因遺伝子が存在する可能性が考えられた。そこで、これら 2 つの AZF 領域内及び近傍に存在する遺伝子上の変異を、PacBio より得られたリードを用いて BLAST サーチにより確認を行った。その結果、既知の SNV であるが、非コード領域の変異や遺伝子の上流及び下流に存在する変異が確認された。今後、多数の健常者と無精子症患者の検体を用いて、サンガーシーケンスにより、これらの遺伝子上の変異を解析し、無精子症の原因遺伝子を同定する必要がある。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

我々はこれまで、男性不妊症の原因遺伝子を明らかにすることを目的とし、Y 染色体を中心に研究を行ってきた。その間、Y 染色体ハプログループや gr/gr 欠失は無精子症や精子運動率と関連があることを明らかにしてきた。さらに AZFc 領域内に存在する *DAZ*、*BPY2*、*CDY1*、*TTTY4* などの遺伝子は、複数コピー存在し、これらの遺伝子は精巣内で発現することから、これらの遺伝子のコピー数の低下が男性不妊症の原因であると考え解析を行ってきた。その結果、これらの遺伝子のコピー数と無精子症との間には強い関連があることを示した。しかし、真の原因遺伝子を同定するには至らなかった。また、この解析の過程で遺伝子の欠失が断片的であることを見出した。つまり、長鎖にわたるパリンドローム構造のため、Y 染色体の参照配列が日本人の配列とは合っておらず、欠失を検出するマーカーの位置が異なっている可能性が示唆された。本支援によって得られた PacBio RS によるリードでは残念ながら Y 染色体上のパリンドローム領域をユニークに被覆することが出来なかったが、我々が解析を行ってきた Y 染色体ハプログループや AZFc 領域内のコピー数と PacBio RS によるリードを結びつけることで、日本人の Y 染色体の配列を再確認する研究への展望が考えられる。

また、本研究では Y 染色体をターゲットとした解析を行ったが、全ゲノム解析の支援を得ることが出来たことから、Y 染色体に限らず常染色体も対象として男性不妊症の原因遺伝子の同定に繋げたい。

＜支援成果公表リスト＞

無し

公募支援課題：2010～2012 年度、

CLE ペプチドをモデルとした植物モルフォゲンの進化と作用機構に関する研究

若手研究（S）

茎頂及び根端分裂組織の活性制御分子機構の相同性と相違点

基盤研究（B）

澤 進一郎・熊本大学大学院自然科学研究科

＜背景・目的＞

植物は、器官を切除して培養することや、分化全能性をひきだすことが容易であることから、いかにも各器官、組織、細胞が自律分散的に生きているように見える。しかし、中枢神経系を持つ動物のような中央管理型の生命形態ではないにもかかわらず、各器官（細胞）の間では確実に情報のやりとりを行っていて、個体としての統一性を保っている。それでは、どのようにして各器官（細胞）の間で情報のやりとりを行っているのか。また、各細胞は、細胞自身の位置情報や、環境、発生プログラムをどのように認識して自分自身を分化させ"個体"を形作っているのか。現在までに動物の空間認識には拡散性の物質が重要な機能を持つことがよくしられている。しかし、植物では形態形成に関わるペプチドホルモンはこれまで知られていなかった。我々は、CLV3 が 12 アミノ酸のペプチドホルモンとして機能することを明らかにしてきたことから、本研究では、この CLV3 ペプチドホルモンの分子作用基盤の構築を目指した。

＜支援の内容＞

我々は、植物の空間認識機構解明のための実験系として植物の茎頂分裂組織を中心とした分裂組織の形成・維持機構に注目している。現在の所、植物の分裂組織の形成や維持には、植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンが重要な機能を持つことが一般的に知られており広く受け入れられている。しかし、それらのホルモンがどのような遺伝子を利用し、どのような機構で分裂組織の形成や維持を担っているのかはほとんど分かっていなかった。

本研究では、シロイヌナズナのペプチドホルモンの CLV3 の作用機構の解明を目指している。昨年度までに主に３つの受容体が機能的冗長性をもって機能することを明らかにしてきたが、H22-24 年度に受けたゲノム支援による突然変異体のリシーケンスにより､それぞれ clv2(H22 年度), rpk2(H23 年度), clv1(H24 年度)のエンハンサー突然変異体の原因遺伝子を同定した。

＜支援によって得られた研究成果＞

clv2 エンハンサー突然変異体として､多数の突然変異体を得て、本ゲノム支援により、ゲノムシーケンスを行った。そのゲノムシーケンスとマッピングを組み合わせた解析により、三量体 G タンパク質のβサブユニット、ロイシンリッチリピート受容体キナーゼである BAM1, CLEN2,CLEN3 及び、アルマジロリピートドメインを持ちユビキチンリガーゼとして機能する PUB4 を同定した。さらに、その他の 3 突然変異体の原因遺伝子について候補遺伝子が特定できた。

このようなことから､本学術ゲノム支援により、多大な研究の進捗があった。通常、マッピングから遺伝し単離を目指す場合、1遺伝子1年はかかるところが、短期間に８つの候補遺伝子が同定できた。今後も、さらなる解析により、シグナル因子の同定が進むと考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究の結果、シグナル伝達因子が多数単離されてきた。今後、それらの因子の綱がりを明らかにすることで、植物の幹細胞活性調節機構の全体像

が明らかになると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

Yasuka, Y. et al. (2016) J. Exp. Bot. In press.

Motomitsu, A. st al., (2015) Essays in Biochem. In press.

Shimizu, N., et al., (2015) New Phytologists 208.1104-1113

Kinoshita, A., et al., (2015) Plant Signaling & Behavior. 10:6, e1028707

Kinoshita, A, et al., (2015) Development 142., 444-453.

Ishida, T.,et al., (2014) EMBO rep. In Press.

Tabata, R. and Sawa, S. (2014) Frontiers in Plant Science 04 July; doi: 10.3389/fpls.2014.00311.

Miyawaki, et al., (2013) Curr. Opin. Plant Biol. 16.598- 606.

Yamada, M., and Sawa, S. (2013). Curr. Opin. Plant Biol. 16. 1-6.

Tabata, R., et al., (2013) Plant Signaling & Behavior. 8. e22534

公募支援課題：2010 年度、2012 年度、2013 年度

マリンビブリオを活用した海藻糖質のバイオエタノール変換技術プラットフォームの構築

基盤研究（B）

バイオマス燃料生産に適する最少遺伝子セットを持つマリンビブリオセルの創成

挑戦的萌芽研究

澤辺 智雄・北海道大学大学院水産科学研究院

＜背景・目的＞

陸上バイオマスや淡水に依存しないバイオマス燃料の生産として，海洋バイオマスの燃料変換技術基盤の効率化が喫緊の課題である。海藻の糖質をバイオエタノールやバイオ水素に変換する特異な代謝を持つ 2 種類のマリンビブリオを見いだした。これらビブリオの海藻糖質からのエタノールや水素の生産量は，大腸菌や酵母よりも秀でた発酵能を示す。水産資源が豊かな日本では，海藻の糖質をはじめとする海洋バイオマスは未開発の再生可能なエネルギー資源となるため，本研究では，これらマリンビブリオが持つエタノールや水素生産に関連する代謝遺伝子群の解析（ゲノム解析）およびその発現バランスの解明を行い，マリンビブリオによる海洋バイオマスのバイオ燃料への変換技術の基盤を構築する。さらに，海藻特有の糖質をバイオエタノールやバイオ水素に変換するマリンビブリオを対象とし，バイオマス燃料生産に適する最少の遺伝子セットを持つマリンビブリオセルの創成を目的とした。

＜支援の内容＞

バイオ水素生産性の高い *Vibrio tritonius* AM2 株とリファレンス株である *V. harveyi* S20 の完全なゲノム解析データを得るための fosmid ライブラリーの構築とそのショットガンシークエンス，およびリシークエンスの支援を受けた。また，アルギン酸分解性とガス生産性ビブリオなど，計 11 種のドラフトゲノム配列の支援を受けた。さらに，2 種類のマリンビブリオ（*V. halioticoli* および *V. tritonius*）を対象として，異なる条件下で培養した菌体の RNA-Seq 情報取得で支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

I. マリンビブリオが持つバイオ水素生産系遺伝子構造のユニークさ

V. tritonius AM2 株は海水を含む培養系で効率よくバイオ水素を生成でき，3 L の培養系で 10 L の超えるバイオ水素の生産が可能な新種のマリンビブリオである。本支援を通じて，本菌の水素生成の鍵酵素であるギ酸－水素リアーゼ複合体（FHL）遺伝子群が 24 kb の領域にコードされることが明らかになった。さらに，本支援で得られた全 8 種 9 株のマリンビブリオのゲノムデータを比較し，①ガス産生ビブリオはいずれも大腸菌では機能が弱い *hyf* に類似した遺伝子構造であること，②水素生成収率が高い *V. tritonius* の FHL 遺伝子クラスターとその他の活性の低いビブリオの遺伝子構造が異なることが見いだされた。

II. 海藻糖質のバイオ燃料変換に必要な遺伝子群の発現動態の把握

両菌株において，海藻糖質を代謝している細胞のゲノムワイドな遺伝子発現の一端が明らかにすることができるようになった。まず，*V. halioticoli* では，ゲノム解析のみでは同定ができなかった，アルギン酸分解物の取り込みに関する遺伝子を絞ることができた。これらの成果を基に，海水存在下でアルギン酸からエタノールを生成可能な代謝改変 *V. halioticoli* 株の作出に成功した。現時点で，これはアルギン酸からエタノールを生成可能な最小遺伝子セットを有するマリンビブリオである。一方，*V. tritonius* では，24 kb におよぶこの FHL 遺伝子クラスターの転写単位が可視化できるようになり，単一の転写産物ではなく，3～4 領域に分かれて発現されているものと示唆された。さらに，本菌はニトロゲナーゼ遺伝子クラスターを有し，これが水素生成に寄与しているか不明のままであったが，本支援により，遺伝子の発現はほとんど観察されず，その寄与は極めて低いことが示唆された。

III. ビブリオの進化系統樹の更新に必要な塩基配列情報の取得

ビブリオ科 78 種の標準株を 9 つのハウスキーピング遺伝子に基づき分子系統再解析を行い，これらは 14 種のクレードに分けられることを示した。しかし，未だ多くのビブリオで，遺伝子変異の大きさから解析対象とするハウスキーピング遺伝子の増幅が困難であった。本支援により，このうちの一部の種（*V. aerogenes*, *V. gazogenes*, *V. rhizosphaerae* など）の塩基配列に取得に成功し，ビブリオの進化系統樹を更新し，新たなクレードを提案した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

H21 から 3 年度にわたりゲノム支援を受けた結果，①個別の遺伝子解析では見出すことが困難であったマリンビブリオの発酵代謝遺伝子を探索し，ビブリオ細胞のバイオ燃料生成に関わる代謝ネットワークを推定することが可能になり，②この代謝ネットワークを基に海藻糖質の代謝過程における遺伝子の発現動態を調べることができるようになり，③マリンビブリオ細胞を用いて，バイオ燃料生成に極めて不利であった「アルギン酸」という多糖からエタノールを生成可能な代謝改変株を作製することに成功し，有用物質の生産工場化するための多彩な研究（Vibrio

Factory 化研究）の展開に結びつけることが現実のものとなってきた。さらに，申請者が旧来から進めているビブリオの系統進化の全容解明に向けて，新たな知見を集積することができ，update した情報を学術コミュニティーに発信することもできた。ビブリオのゲノム情報に関しては，140 種全ての情報を加味した系統や進化のグループ分けを視野に入れ，ゲノム情報の取得に鋭意努力をしている。

＜支援成果公表リスト＞

Sawabe, T. et al., Front. Microbiol. 4, 414 (2013)
Matsumura, Y. et al., Int. J. Hydrogen Energy 40, 9137-9146 (2015).

公募支援課題：2010 年度

生物医学研究推進のためのカニクイザルMHC多型情報基盤の整備

基盤研究（B）

椎名 隆・東海大学医学部

＜背景・目的＞

カニクイザル（*Macaca fascicularis*）は iPS 細胞や臓器移植研究のモデル動物として利用されているが、ドナーとレシピエントの MHC 型を考慮した研究報告は国内にない。よってカニクイザルを用いた非臨床試験を円滑に進めるためには、その MHC 多型を理解し、特定 MHC 型のホモ接合体とそのヘテロ接合体の安定供給体制を確立することが必要である。ところがカニクイザル MHC（*Mafa*）領域には、遺伝子重複により形成された類似性の高い MHC 遺伝子が数多く位置しており、ヒトと同様な多型解析法ではその多型性の明確化は困難である。そこで、本研究課題では、Roche GS FLX シークエンサーを用いた *Mafa* クラス I 遺伝子のシークエンシングについての支援を受け、その後の展開を含めて *Mafa* 全領域における MHC ハプロタイプ構造を明らかにすることを目的とした。

＜支援の内容＞

カニクイザル MHC (*Mafa*) クラス I 遺伝子由来 RT-PCR 産物 (400 bp～500 bp)、300 サンプルの Roche GS FLX シークエンサーによるパイロシークエンシング

＜支援によって得られた研究成果＞

１．*Mafa* 遺伝子の多型解析とハプロタイプ解析

シークエンシングの支援により、計 112 種類の *Mafa* クラス I 遺伝子の塩基配列を検出した。それらの内、58 種類は新規に同定されたものであった。これら塩基配列の組み合わせから 17 種類、23 種類、12 種類の *Mafa-A*、*Mafa-B/I* および *Mafa-E* ハプロタイプ（Hp）をそれぞれ推定した。とりわけ、F/A/E/B-Hp1 や F/A/E/B-Hp1 の頻度はそれぞれ 10.5%, 10.2%であり、他のハプロタイプ頻度よりも高い値を示したことから、特定の *Mafa* 型を有するホモ接合体などの個体は、これら高頻度ハプロタイプに焦点を絞ることにより効果的に検出されると考えられた。

２．NGS よる *Mafa* 遺伝子のジェノタイピング法の開発

前項の多型情報を用いて、次世代シークエンシング法に基づく正確、簡素、迅速なジェノタイピング法を開発した。すなわち、*Mafa-A, -B, -I, -E, -F, -DRB, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1* の多型解析から得られた計 188 種類の塩基配列について、それら保存性の高い部位にローカス特異的プライマーを設計し、マルチプレックス PCR 法の条件検討を行った。本法の検証として、前項に用いた 127 頭についてマルチプレックス PCR を行い、GS Junior や Ion PGM を用いたアンプリコンシークエンシングによりリード配列を得て、既知アリル配列を参照しながらアリル判定を行った。その結果、既知情報と矛盾なく判定されたことから、本法は、多検体のジェノタイピングのための優れたツールであると考えられた。

３．MHC 情報付加カニクイザルの再生医療・移植研究への応用

前項にて開発したジェノタイピング方法を用いて 5,000 頭規模のスクリーニングを行った結果、47 頭の MHC ホモ接合体をこれまでに検出した。それらの内の 5 頭は、A-Hp8.1、E-Hp2、B/I-Hp1、#7 を有するホモ接合体であった。複数頭のホモ接合体からの iPS 細胞が既に樹立されており、ドーパミン分泌神経細胞、心筋細胞、網膜色素上皮細胞などへの分化実験ならびに移植実験に利用されている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

iPS 細胞由来分化細胞の移植や、子宮等の臓器移植実験において、本研究課題にて開発した MHC 統御カニクイザルが用いられつつある。今後も多施設からの需要が見込まれていることから、発生工学的手法を駆使した人工繁殖法やサルの育成施設における DNA タイピングを施したカニクイザルを親とした繁殖コロニーの作製を進めるなど、安定供給体制の構築を進めている。

＜支援成果公表論文リスト＞

Shiina T. et al., Immunogenetics 63, 485-499 (2011)
Arikata M. et al., PLoS One 7, e37220 (2012)
Blancher A. et al., Immunogenetics 64, 605-614 (2012)
de Groot NG. et al., Immunogenetics 64, 615-631 (2012)
Shiina T. et al., Tissue Antigens 80, 305-316 (2012)
Morizane A. et al., Stem Cell Reports 1, 1-10 (2013)
Blancher A. et al., Immunogenetics 66, 219-230 (2014)
Kisu I. et al., J Obst Gynaecol Res. 40, 907-918 (2014)
Kono A. et al., J Immunol. 192, 3239-3246 (2014)
Kisu I. et al., Int J Pharmacol. 40, 907-918 (2014)
Shiina T. et al., Immunogenetics 67, 563-578 (2015)
Morita D. et al., Nature Communications In press.
Kawamura T. et al., Stem Cell Reports In press.

公募支援課題：2012～2013 年度

カイコの胚休眠誘導における環境温度情報の保存・記憶の分子解析

基盤研究（B）

塩見 邦博・信州大学繊維学部

＜背景・目的＞

カイコ（*Bombyx mori*）の胚休眠誘導にみられる季節適応は親子２世代にわたった独自の環境応答機構である。胚を 25℃に保護すれば次世代卵は休眠し、胚発生初期で形態形成が停止する。15℃では次世代は非休眠卵となり、約１週間で幼虫が孵化する。このように、親が受けた温度条件により、子供（胚）の運命（表現型）がリプログラミングされる。これまでの研究で、TRP（Transient receptor potential）チャネルの BmTRPA1 が胚期において 20℃以上の温度を受容し、次世代での休眠を誘起するセンサー分子であることを突き止めた。また、休眠ホルモン（DH）は蛹期の卵巣の DH 受容体に作用して休眠卵を誘導する神経ペプチドホルモンであるが、BmTRPA1 の活性化は DH の血液中への積極的な放出を促進することも明らかにした。おそらく、カイコの休眠誘導には 20℃以上の環境温度を受容し活性化した BmTRPA1 により、DH 放出の制御に繋がる約１ヶ月におよぶ環境情報の保存・記憶を伴う分子ネットワークに可塑的変化がもたらされ、休眠性を決定していると考えられる。さらに、胚期を 20℃に保護した場合には光（日長）条件により休眠性が決定されることや幼虫期の栄養条件によって休眠性が変更されることも知られている。本研究では、カイコの胚休眠誘導に見られる発生可塑性における環境情報の保存・記憶の分子実体の解明を目指している。

＜支援の内容＞

本支援では、この概念的に仮定した情報の保存・記憶の分子実体を解明するために、新型シーケンサによるトランスクリプトーム（RNA-seq.）解析を行ない、休眠誘導関連遺伝子の網羅的なスクリーニングと機能解析を進めた。解析では、鈴木穣先生をはじめとする東大菅野研究室シーケンスチームによりシークエンシングを、東京工業大学の黒川顕研究室によりデータ解析を行なっていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

2012 年度の支援では、合計 6 検体の解析を行なった。6 検体の内訳は、まず (1) 25℃・全暗、(2) 15℃・全暗、および (3) (4) 25℃・全暗で TRPA1 のノックダウン処理（２種類）を行ない、次世代の休眠性を運命づけた胚から RNA を抽出し、RNA-seq. 解析を行なった。また、胚期を (5) 25℃・全暗、(6) 15℃・全暗に保護した蛹の脳-食道下神経節複合体から抽出した RNA を用いて、RNA-seq. 解析を行なった。さらに 2013 年度の支援では光（日長）や栄養条件の違いによる RNA-seq 解析を胚子と幼虫や蛹の脳-SG で行ない、それぞれの環境条件で発現量の異なる遺伝子の同定を試みた。さらに、2012 年度の結果と照らし合わせることにより、休眠性の違いにより共通の挙動を示す遺伝子の同定を試みた。

2012 年度の支援により、(1)～(4) の胚においては、(1) と (2) で 305 個、(1) と (3) で 284 個、(1) と (4) で 333 個、(2) と (3) で 481 個、(2) と (4) で 607 個、(3) と (4) で 77 個の遺伝子をピックアップした。これらの遺伝子の中にはヒートショックタンパク質、ホルモン、時計関連の遺伝子が含まれていた。さらに、(1)～(4) を再解析し、(1) のみで発現量が高く、（もしくは低く）(2)～(4) ではいずれも発現量が低い（もしくは高い）遺伝子を 94 個同定した。おそらくこれらの遺伝子の中には休眠誘導と関連し、BmTRPA1 の活性化シグナルの下流で機能する遺伝子が含まれていると考えられる。次に、(5) と (6) の蛹の脳-食道下神経節で 75 個の遺伝子をピックアップした。これらの遺伝子の中にはヒートショックタンパク質、ホルモン関連の遺伝子が含まれていた。興味深いことに、(5) と (6) の解析で差のあった 75 個の遺伝子の内、13 個 (17.3%) の遺伝子が (1) と (2) で差のあった 305 個の遺伝子と重複していた。このことは、休眠誘導にはライフステージ全般を通しての遺伝子発現の違いが重要であることを示している可能性がある。さらに、2013 年度の支援により、休眠性の違いにより共通の挙動を示す遺伝子を同定した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、休眠誘導に関わる環境温度情報の受容から DH の放出制御に繋がる可能性のある遺伝子が多数ピックアップされた。その後、RT-PCR 解析とリアルタイム PCR 解析により、興味深い遺伝子の胚期を通した発現や蛹期の脳-食道下神経節での発現を確認した。そして現在、これらの休眠誘導関連候補遺伝子は、大規模にゲノム編集技術の TALEN やトランスポゾンを利用した形質転換カイコを作出し、次世代の休眠性に与える影響を調査するとともに、それらの個体における DH 量に与える影響の調査を行なっている。ある遺伝子に関しては、母蛾の胚期での 15℃ での発現が 25℃に比べて有意に高く、TALEN によるノックアウトカイコでは次世代卵において休眠性の逆転が観察された。現在、この遺伝子の機能解析を重点的に進めるとともに、本支援によって得られた知見をもとに、カイコの胚休眠誘導に見られる発生可塑性における環境情報の保存・記憶の分子実体の解明を目指している。

＜支援成果公表リスト＞

(1) 塩見邦博, 蚕糸・昆虫バイオテック, 84 (2), 119-126 (2015).

公募支援課題：2014 年度

ネギ属バイオリソースを用いたオミクス統合解析のタマネギ育種への応用

基盤研究（B）

執行 正義・山口大学農学部

＜背景・目的＞

タマネギ（*Allium cepa*）はゲノムサイズが非常に大きく（15 Gbp），DNA マーカーの開発，連鎖地図の構築，連鎖地図と染色体の対応付け等の作業に困難を伴うため，それを克服する目的で異種間交雑と染色体倍加を組み合わせて作出したシャロット（分球性タマネギ）由来単一異種染色体を添加したネギ系統シリーズ（添加系統シリーズ）等のリソースが開発されてきた．一方で，かずさ DNA 研と連携して Allium Transcriptome Database（Allium TDB）の開発も行っており，この DB に格納されている各種ネギ属種のトランスクリプトームデータの配列比較解析を行い，種間多型を示す膨大な数の DNA マーカーを得ている．したがって，シャロットとネギの間で得られている DNA マーカーを単一異種染色体添加系統シリーズ（FF+1A-FF+8A）よる多型解析に適用し，それらが座乗するシャロット染色体を決定することも可能である．そこで，本研究では，同シリーズの根部から RNA-Sequencing データを収集し，シャロット鱗茎部の unigene セットをリファレンスとしてマッピングを行なうことにより，ネギ由来の遺伝子と識別できるシャロット遺伝子の情報を整理し，それを基にして同植物の染色体マーカー取得を先ずは試みた．

＜支援の内容＞

シャロットの染色体を添加したネギ添加系統シリーズの根部における RNA-seq 解析（30 検体）：１検体当りのリード数を 2,000 万リードに設定し，１０種類の植物体（８種類の添加系統と２種類の両親種） Ｘ ３反復 ＝３０検体の解析に必要なリード数は 20M Ｘ 30＝600M（6 億）リードになり，この 600M リードは受託解析で利用された HiSeq シーケンサーでの 1 フローセル解析 1-2 回分（8 レーン中 1-2 レーン）を使えば達成できる数値（100PE ランの場合）であった。

＜支援によって得られた研究成果＞

各系統につき 3 サンプルを用い，各サンプル 20M reads の配列情報を収集した．得られた配列情報は，昨年度構築したシャロット鱗茎部の unigene セットをリファレンスとしてマップした後に，RPKM（reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads）値を算出することにより集計し，整備を進めているネギ属トランスクリプトームデータベース（AlliumTDB）に情報を加えることにより比較解析，統合オミクス解析に応用するための基盤情報として整備した．RPKM データ整理の結果，添加したシャロット染色体に由来すると考えられるシャロットの発現遺伝子の情報や，シャロット染色体の添加により発現誘導かれたと考えられるネギ遺伝子の情報を得ることができた．加えて，RNA-Sequencing で得られたシャロットとネギの間の配列多型の影響で，シャロット由来の遺伝子のみがマップされる（ネギ親株の RPKM 値が 0 となる）unigene を検索したところ，根部で 10,197 の対象配列がそれぞれ得られた．さらに，特定の染色体系統のみでシャロットに近い RPKM 値が得られた unigene の数をカウントすると 5,308 となった．それらの染色体毎の内訳は以下の通りとなった；1A 803, 2A 830, 3A 799, 4A 594, 5A 603, 6A 622, 7A 568, 8A 489. また，これらの中には，その他の２器官（葉身と葉鞘）の解析のいずれにおいても検出されている共通 unigene も多数得られており，それらが最も確度の高い染色体特異的 unigene であり，マーカーとして優先的に活用できることが示唆された．以上より，添加系統シリーズを用いたトランスクリプトーム解析により，染色体特異的マーカーの大量取得が達成された．現在，タマネギ倍加半数体（DH）とシャロット DH の掛け合わせにより作出された F_2 分離集団のトランスクリプトームデータを基にした遺伝子型情報も得られ始めており，本研究により得られた情報は大量の SNP マーカー等を包含する超高密度連鎖地図を物理染色体へ振り分ける際に効力を発揮すると思われる．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

我々は，連鎖地図作製や QTL 解析に向けたメタボローム情報の収集を進めている上記 F_2 個体に対してトランスクリプトーム解析を行い，得られた配列情報の SNP パターンを解析することにより，タマネギ由来とシャロット由来の転写産物を区別し，その情報を基に遺伝子型情報を収集し始めている．30 個体を用いたテスト解析より得られた RNA-seq の配列情報をシャロット鱗茎部の unigene セットをリファレンスとしてマップし，塩基多型情報を収集整理することにより，約 5,000 の unigene について遺伝子型情報を得ることができている．この情報を整備中の遺伝子地図情報に統合することで，メタボローム QTL やゲノム配列解析に向けた高密度マーカーの整備等に活用できることが示唆されており，本研究で得られたマーカー情報と照合することで短期間に超高密度染色体地図を構築できる可能性が切り開かれたといえよう．

＜支援成果公表リスト＞

なし。

公募支援課題：2011～2012 年度

土壌微生物の均等度評価手法の開発

基盤研究（B）

信濃 卓郎・農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター

＜背景・目的＞
土壌微生物は種数、個体数が多い上に難培養性であるため研究が遅れている。そこで超並列型シークエンサーを用い、土壌から抽出した DNA/RNA を対象に機能性遺伝子のアンプリコンシークエンス解析を行い、機能性遺伝子の多様性評価を行う。さらに土壌から抽出した DNA を直接シークエンスし、アンプリコンシークエンス解析により得られるデータと合わせることで均等度による評価を行う。こうして得られた成果を元に、機能性遺伝子の均等度と肥沃度やバイオジェオケミカルプロセスとの関連性を明らかにして新たな研究の方向性を打ち出す。

＜支援の内容＞
アンプリコンシークエンスによる網羅的な定性解析の導入を試みている。初年度に当たる本年は系統学的指標遺伝子や地球環境に密接に関与していると考えられている土壌微生物によるバイオジェオケミカルプロセスのうち本解析に用いうる遺伝子を各 5 程度選抜し、合計 10 遺伝子の解析を行う。また対象とする土壌は、一般的な管理がされた圃場に加え、有機農法が施された圃場や約１００年間異なる施肥管理を行ってきた圃場、強力な温暖化ガスである N_20 ガスを大量に放出する圃場など１０地点程度を予定している。次年度以降、解析対象とする遺伝子数を増やす予定である。具体的にはこれらのアンプリコンシークエンス結果の解析、データベース化、各遺伝子間の連鎖解析を行う。

＜支援によって得られた研究成果＞
選定する遺伝子を用いた情報解析の可能性について議論を進め、それに基づく土壌微生物の解析を行った。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
多種多様な微生物遺伝子から構成される環境機能を解析する手法として活用可能であることが考えられた。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2014 年度

ミトゲノム解析と核マーカータイピングによる日本産ハブ属 3 種の遺伝的集団構造の研究

基盤研究（C）

柴田 弘紀・九州大学生体防御医学研究所

＜背景・目的＞

医学的にも生態学的にもまた創薬シーズとしても重要な毒生物であるハブの遺伝的多様性を包括的に理解することを目指して、日本産ハブ属 3 種（ハブ（*Protobothrops flavoviridis*）、トカラハブ（*P. tokarensis*）、サキシマハブ（*P. elegans*））について生息域全域にわたる大規模 DNA 解析を進める。具体的には以下の２つの計画からなる。

①島集団間の遺伝的分化の度合いを、ミトコンドリアゲノム及びマイクロサテライトマーカーの多様性により推定し、ハブ属 3 種の系統地理を包括的に解明する。あわせて現行の 3 種分類の妥当性を検討する。

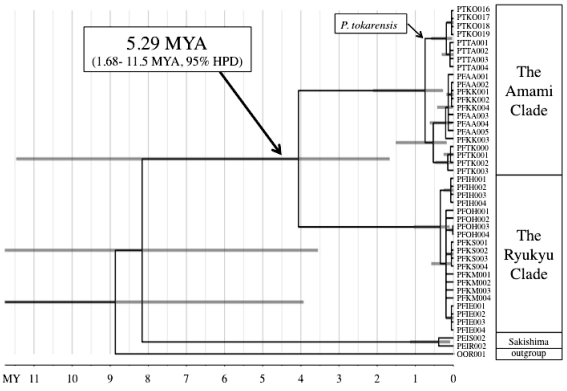
②上で同定される多型性の高い領域、マーカーに対象を絞って、各島集団内の遺伝的多様性を検出し、遺伝学的な集団構造の推定を行う。遺伝子流動の歴史を再現し、ハブ属の現在の分布域が形成される過程を南西諸島の地史に照らして再構築する。さらに、集団遺伝学的パラメータから各集団の遺伝的健全度を検討し、種の保全に資する。

＜支援の内容＞

ハブ（沖縄本島産）の WGS シークエンシングと新規アセンブリによるドラフト配列作成。トカラハブおよびサキシマハブの WGS シークエンシングと沖縄ハブゲノムドラフト配列へのマッピングによる変異解析。ハブの毒腺（成体および幼体）、副毒腺、膵臓、肝臓、卵巣からの RNA シークエンシング。

＜支援によって得られた研究成果＞

奄美大島、加計呂麻島。徳之島、沖縄本島、伊平屋島、伊江島、久米島、渡嘉敷島の 6 島のハブ各 4 または 5 個体、小宝島、宝島のトカラハブ各 4 個体、および石垣島、西表島のサキシマハブ各 1 個体、及び外群としてヒメハブ（*Ovophis okinavensis*）1 個体、計 44 個体のミトゲノム配列を決定し最尤法による解析を行った。その結果ハブは，北部個体群（奄美大島，加計呂麻島、徳之島）からなる奄美クレードと、南部個体群（沖縄島，伊平屋島，伊江島、久米島、渡嘉敷島）からなる琉球クレードの 2 群に遺伝的に分化していることが分かった（図 1）。また，トカラハブは宝島、小宝島ともに、奄美クレードに完全に包含された．以上のことから、現在ハブとされる種の島集団間の遺伝的多様性は大きく、現在別種とされるトカラハブはその多様性の中に完全に収まるため、トカラハブのみを独立種とすることの妥当性は低いと考えられた。一方、サキシマハブについてはその単系統性が確認された。さらに合体シミュレーションにより分岐年代を推定したところ、奄美クレードと琉球クレードの分岐は、529 万年前と推定された（下図）。奄美群島と沖縄諸島の地理学的な分断は 150 万年前と推定されており、ハブの祖先集団は地理学的な分断に先立って、奄美クレードと琉球クレードとに遺伝的に分化していたことが示唆された。



支援をお願いしているハブ属 3 種の全ゲノム配列は引き続き解析中でデータの取得には至っていないが、これが完成すれば、マイクロサテライトを始めとする核遺伝子マーカーの収集が用意になり、遺伝的多様性の理解は飛躍的に進むと期待される。特に多型性の高いマイクロサテライトマーカーが整備されることで集団内の詳細な多様性解析が可能になると期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

毒腺を始めとするハブ組織からの RNA-seq のデータを、ゲノム支援によって取得することができた。これをアセンブルした転写産物情報と、これまでに得られていたハブゲノムのドラフト配列を比較することで、ハブの毒液関連遺伝子の配列が 329 個同定された。これらの遺伝子配列情報と、本科研課題ですでに収集済みの多数のハブ集団由来のサンプルを用いることで、毒液関連遺伝子群の遺伝的多様性の包括的な解析を行うことが可能になった。これにより、ハブ毒液構成成分のいくつかの遺伝子で報告されている加速進化の一般性や、そのメカニズムに迫る研究に繋がると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Shibata et al. Genetic divergence of mitochondria genome sequence of the Habu viper, *Protobothrops* among Japanese subtropical islands.（投稿中）

公募支援課題：2011 年度、2012 年度

植物におけるエピゲノムを介した優劣性発現制御機構の解明

最先端・次世代研究開発支援プログラム

柴 博史・奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

＜背景・目的＞

有性生殖によって生み出される子孫は、両親の持つ性質のいずれか一方のみを受け継ぐ場合が多く知られている。メンデルの「優性の法則」として知られる遺伝現象であるが、そのメカニズムは不明な点が多い。我々は、植物の受粉に関わる因子の研究を通じて、ゲノム塩基配列の変化を伴うことなく形質変異が生じることで優劣性を決定するという新しい優劣性決定機構を世界に先駆けて明らかにした。本研究課題では、最新の全ゲノム解析技術を駆使して、植物におけるゲノム塩基配列の変化を伴わない優劣性発現制御の実態をゲノムワイドに明らかにするとともに、その分子機構解明を目指す。また種内雑種当代で特異的な遺伝子発現制御機構の実態を明らかにする。さらに微量組織からの DNA メチル化パターンの網羅的解析を通じて、エピジェネティックな遺伝子発現制御が指摘されている花粉の生殖細胞と栄養細胞および葯タペート細胞における組織特異的なメチル化の実態を明らかにする。

＜支援の内容＞

1. 一遺伝子多型(SNP)を考慮したアレル特異的な遺伝子発現パターンの網羅的かつ定量的解析
2. SNP 情報を得るためのシロイヌナズナ種内系統のリシークエンス
3. シロイヌナズナ種内系統の small RNA シークエンス
4. バイサルファイトショットガンシークエンスによるシロイヌナズナ種内雑種における DNA メチル化部位の解析

＜支援によって得られた研究成果＞

筆者は、全ゲノム配列が公開されていないシロイヌナズナ種内系統のゲノム配列を、次世代シークエンサーを用いてリシークエンスし、既に公開されているシロイヌナズナのゲノムシークエンスと比較して、2 系統間の SNP 情報を得た。その際、SNP 解析ツールとパラメータ条件を吟味することで、高精度な SNP 情報を得た。上記 2 系統とこれらを掛け合わせた F_1 雑種の実生から poly A RNA を抽出し、次世代シークエンサーでその遺伝子発現を網羅的に解析した。そして SNP 情報を用いて両親系統で共に発現を示すが、F_1 雑種になるといずれかの親に由来する対立遺伝子のみが発現を示す遺伝子を探索することにより、F_1 雑種において片側対立遺伝子発現を示す遺伝子を複数同定した。また F_1 雑種と両親系統の small RNA の網羅的解析も行い、優劣性がトランス作用性の低分子 RNA により調節されていると推測される実例を見出した。そこで F_1 雑種と両親系統の実生からゲノム DNA を抽出し、バイサルファイトショットガンシークエンスに供して、DNA メチル化パターンを網羅的に検出した。F_1 雑種と両親との DNA メチル化パターンの違いと片側対立遺伝子発現制御との関係を調べたが、メチル化レベルと遺伝子発現に相関関係は見られなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により種内系統間の SNP 情報をゲノムワイドに収集することが出来るようになり、F_1 雑種におけるアレル毎の優劣発現を網羅的に調べる事が可能となった。そして、優性側対立遺伝子由来の低分子 RNA により劣性側対立遺伝子の発現が抑制されるという優劣性モデルを提唱することができた。このことは、対立遺伝子間の優劣性という重要な遺伝子発現制御機構の理解につながると考えている。また本支援により、F_1 雑種およびその親系統における DNA メチル化パターンをゲノムワイドに解析することが出来るようになった。これにより、対立遺伝子間の DNA メチル化誘導機構やその生物学的意義についても明らかになると考えている。本研究によって得られた結果は、植物の優劣性発現に関わる DNA メチル化機構の解明に貢献するばかりでなく、動植物を含めて広く遺伝子発現調節の研究に寄与すると考えられる。また当該研究で得られた F_1 雑種形成時にエピジェネティックな要因により遺伝子発現制御が起こる遺伝子を明らかにしていくことで、有用ハイブリッド作物の作出による生産機能向上やバイオマス改良につながる事が期待される。また遺伝子組換えを使わない新しい育種法の確立にもつながる事が期待される。

＜支援成果公表リスト＞

1. 柴　博史, 植物の生長調節 50, 139-143 (2015)
2. Takada, Y., G3 3, 719-726 (2013)
3. 前川 雅彦、他, 育種学研究 15, 42-50 (2013)
4. Shiba, H. et al. DGD 54, 120-128 (2012)
5. 柴　博史、他, 国際高等研究所研究プロジェクト「細胞履歴に基づく植物の形態形成」報告書, p81-88 (2011)

公募支援課題：2012 年度

遺伝性痙性対麻痺の新規原因遺伝子同定とその機能解析

基盤研究（C）

嶋崎 晴雄・自治医科大学医学部　内科学講座　神経内科学部門

＜背景・目的＞

遺伝性痙性対麻痺（HSP）は，臨床的に緩徐進行性の両下肢の痙性対麻痺を中核症状とし，その他様々な症状を合併しうる症候群である．近年HSPの遺伝子座あるいは原因遺伝子が近年次々と解明されてきている．現在までの所，その遺伝子座はSPG1～75まで染色体上にマッピングされており，そのうち約60個余りの原因遺伝子が単離されている．遺伝形式は常染色体優性（AD）のものが多く，半数以上の例で原因遺伝子変異が同定されるが，常染色体劣性（AR）のものは少なく，大部分は原因遺伝子やその変異が不明である．

我々は，常染色体劣性遺伝と考えられる，両親が近親婚で同胞発症者が存在する以下の家系について，その遺伝子座と原因遺伝子変異同定を試みている．

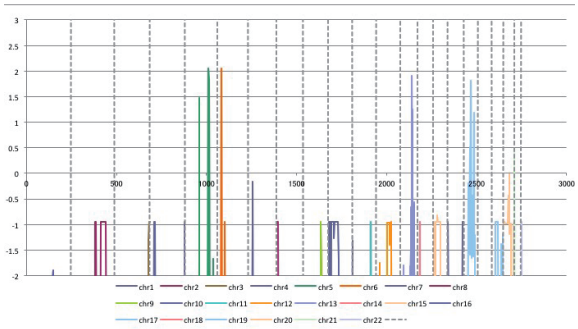
＜支援の内容＞

常染色体劣性遺伝性(AR)と考えられる，両親が近親婚で同胞発症している遺伝性痙性対麻痺(HSP)の 2 家系について，本支援により家系毎の連鎖解析と，各家系の患者 1 名についてエクソーム解析を行って頂いた．さらに，他の AR が疑われる原因遺伝子未同定の HSP 家系に候補遺伝子の変異を認めるか検討して頂いた．

＜支援によって得られた研究成果＞

第 1 の家系については，家系内 5 名（患者 2 名と健常者 3 名）の連鎖解析の結果，第 5,6,13,17 染色体に lod 値の高い部分を認めた（図 1）．

図1. 家系1の連鎖解析 (患者2名と健常者3名)

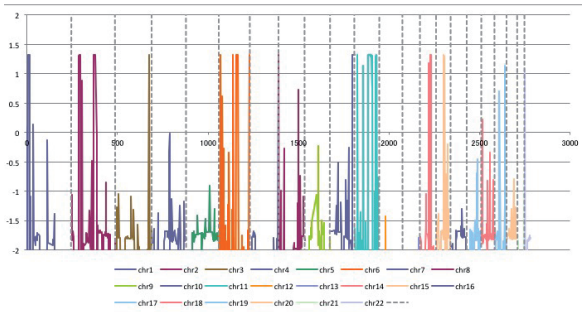


その家系の患者 1 名のエクソーム解析により，その領域内の 2 つの遺伝子にそれぞれホモ接合体で新規の一塩基置換を同定した．そのうち 1 つの遺伝子 *F*****の変異は家系内で共分離が確認された．それは正常コントロール 208 名に存在しなかった．さらに AR が疑われる HSP 家系患者 89 例には *F*****の変異は存在しなかった．ところが，*F*****のネッタイツメガエルの相同遺伝子 *f***** を Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)を用いたゲノム編集を行い破壊したが，表現形の変化は認めなかった．

第 1 の家系のもう 1 名の患者のエクソーム解析を行ったところ，常染色体優性遺伝性(AD) HSP である SPG3A の原因遺伝子 *ATL1* の既報の病的変異(p.F413L)をヘテロ接合体で認めた．この変異は家系内の別患者や健常者には存在しなかった．また，家系内の患者 2 名のみに *ATL1* 遺伝子の同義置換(p.Y459Y)をヘテロ接合体で認めたが，病的意義は不明である．本家系は見かけ上遺伝形式は AR と思われたが，AD-HSP の遺伝子変異を新規に生じた患者が 1 名混在していると考えられた．

第 2 の家系は，患者 1 名と健常者 1 名での連鎖解析の結果，第 1,2,3,6,8,10,11,14,15,19,22 染色体に lod 値の高い部分を認めた（図 2）．

図2. 家系2の連鎖解析 (患者1名と健常者1名)



その家系の患者 1 名のエクソーム解析により，その領域内の 6 つの遺伝子にそれぞれホモ接合体で新規の一塩基置換を同定した．その内，家系内で共分離するのは，*V*****遺伝子の変異であった，この変異はコントロール 326 名には存在せず, AR が疑われる HSP 家系患者 89 例と 13 例の近親婚のある HSP 家系にも *V*****に病的変異は同定されなかった．*V*****のネッタイツメガエルの相同遺伝子 *v***** を TALEN で破壊したところ，オタマジャクシの運動に異常が認められた．

さらに，第 2 の家系の家系内 4 名（患者 2 名と健常者 2 名）での連鎖解析の結果，第 1,2,10,11 染色体に lod 値が高い部分が絞り込まれた．家系内のもう 1 名の患者のエクソーム解析でも，既報の遺伝性痙性対麻痺遺伝子の病的変異は認めなかった．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

小さな少数家系を用いての原因遺伝子同定へ展望が開けた．第 1 の家系は SPG3A 患者が混在した家系

であり，*F*****は原因遺伝子ではない可能性が高い．

第 2 の家系で同定された候補遺伝子 *V******については，孤発例を含めた原因遺伝子未同定の新たな家系，症例に対しても遺伝子変異の有無の検討や，変異による細胞内局在の変化なども観察し，真の原因遺伝子であるか検証を行ってゆくこととしている．

＜支援成果公表リスト＞

嶋崎晴雄ら．常染色体劣性遺伝性痙性対麻痺の新規原因遺伝子探索．平成 25 年度運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究班会議. 2014 年 1 月 8 日，東京．

公募支援課題：2010 年度、2011 年度、2013 年度

カイコとその近縁種における寄主植物選択機構の進化

新学術領域研究

嶋田 透・東京大学大学院農学生命科学研究科

＜背景・目的＞

カイコはクワの葉のみを食餌とする。クワの葉には、1-deoxynojirimycin（DNJ）や 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol（D-AB1）などの糖類似アルカロイドが大量に含まれ、植食性昆虫に対する防御物質として働いている。たとえば、ヤママユガ科のエリサンの餌に DNJ や D-AB1 を添加すると、糖の吸収や代謝が阻害されて数日で死亡する。しかし、カイコは糖類似アルカロイドを摂取しても正常に成長することができる。私たちは、カイコが糖類似アルカロイドに抵抗性の消化酵素を持つことが、クワへの適応の主たる機構と考えており、実際に、進化の過程で細菌から獲得した消化酵素 β-フルクトフラノシダーゼ（β-FFase）がアルカロイド抵抗性のスクラーゼであることを明らかにした（Daimon et al., 2008, JBC）。

カイコでは２つの β-FFase 遺伝子のうち BmSuc1 が中腸で多量に発現している。他の鱗翅目昆虫でもこれらのオーソログがゲノム上に存在するが、クワ食であるウスバクワコやクワノメイガのみで高発現している。したがって、カイコをはじめとするクワ食昆虫は、中腸における Suc1 の発現を高めることで、クワ毒素への適応を果たしたと推定できる。また、カイコガ科にはクワ科クワ属を食草とする一群（カイコ、クワコ等）の他に、ガジュマルなどイチジク属を寄主植物とする一群、すなわちイチジクカサン、テンオビシロカサン等が存在する。これらにクワを与えると成長が阻害されて死亡する。これらクワ食の種と、イチジク属食の種を比較することにより、カイコガ科の寄主の変遷に伴う適応進化の過程が明らかになる。

一方、カイコには多くの食性変異体が存在し、それらは桑葉以外の植物でも摂食する。私たちは、カイコゲノム情報を活用し、世界に先駆けて２つの変異体 *Bt* および *spli* の原因遺伝子候補を同定した。いずれも POU-ホメオドメインを持つ転写因子をコードしており、食性だけではなく、フェロモン応答性も支配していた。したがって、この分子が新規な寄主植物への進出と種分化にあたって、複合適応形質を制御している可能性が高い。カイコ食性変異体の原因遺伝子の解明、および機能解析から、食性進化を支える遺伝子ネットワークを明らかにする。

上記の２つの角度から、カイコのクワ食への適応進化に関与する遺伝子群とその作用機構を解明する。

＜支援の内容＞

[解析 1] カイコとその近縁の昆虫における食性進化に関与する器官の比較トランスクリプトーム解析

カイコ及びカイコ近縁種であるイチジクカサン *Trilocha varians*、テンオビシロカサン *Ernolatia moorei*、ウスバクワコ *Rondotia menciana*、クワコ *Bombyx mandarina*（以上カイコガ科）、エリサン *Samia cynthia ricini*、サクサン *Antheraea pernyi*（以上ヤママユガ科）、ヨトウガ *Mamestra brassicae*（ヤガ科）、アメリカシロヒトリ *Hyphantria cunea*（ヒトリガ科）、クワノメイガ *Glyphodes pyloalis*（ツトガ科）の各種から、それぞれ終齢幼虫の中腸・中部糸腺・後部糸腺、成虫の雌触角・雄触角・雌フェロモン腺の RNA を調製した。

これら RNA を、GA IIx、HiSeq2000 または HiSeq2500 による RNA-seq 解析に供した。

[解析 2] カイコの食性変異体の幼虫小顎、触角および脳のトランスクリプトームの比較

カイコ正常系統（p50T）および食性異常系統における化学感覚の異常の原因を探るため、変異系統"spli"および正常系統"p50T"のそれぞれについて、終齢幼虫（雄）の触角・小顎および成虫（雌・雄）の触角・脳から、RNA を調製した。それら RNA を、GA IIX による RNA-seq 解析に供した。

＜支援によって得られた研究成果＞

[解析1] カイコとその近縁種における食性進化に関与する器官の比較トランスクリプトーム解析

得られたペアエンドのリードは、Trinityによりアセンブルし、RSEMによるマッピングを行った。BLASTによりコンティグのアノテーションを行いオーソログ間の発現量を種間で比較した結果、クワ食昆虫の中腸では、非クワ食の昆虫に比べて、β-フルクトフラノシダーゼ遺伝子（*Suc1*）の発現量が高かった。β-フルクトフラノシダーゼはクワの乳液毒素である糖類似アルカロイドに耐性があることが知られている。さらに、α-グルコシダーゼ型の可溶性スクラーゼをコードする*Mal1*など、多数の二糖分解酵素の発現量が、クワ食昆虫で増加していた。桑葉に含まれる糖類似アルカロイドは、α-グルコシダーゼを阻害する毒素であるので、クワ食昆虫の消化管における二糖分解酵素遺伝子の発現量上昇は、クワ毒への対抗手段であると推定される。

RNA-seqデータから明らかになった主要なα-グルコシダーゼのMal1およびSuhについて、組換えタンパク質を作製し、そのスクラーゼ活性へ与える糖類似アルカロイドの影響を調べたところ、カイコなどのクワ食の昆虫のスクラーゼは、非クワ食のスクラーゼよりもアルカロイドへの抵抗性が高いことが分かった。

[解析2] カイコの食性変異体の幼虫小顎、触角および脳のトランスクリプトームの比較

*spli*は、桑葉以外の餌を摂食してしまう食性異常だけでなく、性フェロモンであるボンビコールに対する応答性が低下する形質を有する。雄成虫触角の

RNA-seqデータをカイコゲノムにマッピングした結果、変異体ではボンビコール受容体遺伝子*BmOr1*の発現がカイコ正常系統（p50T）の数百分の1に低下していることがわかった。さらに、その他の嗅覚受容体遺伝子の発現も、変異体では減少していた。*sp1i*はPOU-ホメオドメインをもつ転写因子の遺伝（*Bmacj6*）の欠失変異体である。転写因子１つの変化で寄主選択と配偶者選択の両方が同時に変化することから、種分化の遺伝子機構を説明可能なモデルとして、*sp1i*変異体は興味深い材料であることが分かってきた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本解析で得られた各種昆虫のトランスクリプトームの比較によって、*Suc1*遺伝子をはじめとする二糖分解酵素の遺伝子の発現量が、鱗翅目昆虫のなかでも、特にカイコおよびクワ食の種に特異的に多いことを見いだした。スクラーゼやトレハラーゼのような二糖分解酵素は、クワの乳液に含まれる毒素すなわち糖類似アルカロイドの標的であることから、クワ食の昆虫はアルカロイドへの対抗手段として、二糖分解酵素の発現量を上昇させていると考えられる。

また、組換えタンパク質を作製する実験の結果から、Mal1やSuhといったα-グルコシダーゼ型のスクラーゼについては、クワ食の種で特異的に糖類似アルカロイド抵抗性が上昇していることが明らかになった。つまり、これら遺伝子は、クワへの適応進化の過程で、遺伝子発現の上昇という量的変化だけでなく、抵抗性という質的な変化も獲得してきたものと推定される。

新学術領域研究「複合適応形質進化の遺伝子基盤解明」では、カイコガ科近縁種でありながら非クワ食のイチジクカサンおよびエリサンのゲノム解読を実行した。本申請で得られたトランスクリプトームデータを、ゲノムの配列と照合することにより、カイコガ近縁種（カイコガ上科）のクワ食への適応において、二糖分解酵素遺伝子や嗅覚受容体遺伝子などがいかにして質的・量的に変化したのか、分子進化学的な視点で調べているところである。

＜支援成果公表リスト＞

1. Wang, H., Kiuchi, T., Katsuma, S., and Shimada, T., A novel sucrose hydrolase from the bombycoid silkworms *Bombyx mori*, *Trilocha varians*, and *Samia cynthia ricini* with a substrate specificity for sucrose. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 61:46-52

本課題は以下の方々との共同研究で行われた：勝間進[1]・木内隆史[1]・大門高明[1,2]・藤井 告[1,3]・王 華兵[1,4]・川本宗孝[1]・門田幸二[1]・鈴木 穣[5]・菅野純夫[5]（1.東大・農、2.生物研、3.現九大、4.現浙江大、5.東大・新領域）

公募支援課題：2015 年度

カイコにおける性決定カスケードと遺伝子量補正および組換え抑制機構のクロストーク

基盤研究（A）

嶋田 透・東京大学大学院農学生命科学研究科

＜背景・目的＞

動物の性決定様式はきわめて多様であり、昆虫においても種によって異なる性決定機構が採用されている。チョウ目昆虫の性決定は、古くからカイコにおける遺伝学的研究を中心に進められてきた。カイコはW染色体が存在すれば雌化することが知られていたが、その分子実体は長年未解明のままであった。しかし 2014 年、我々のグループは、W 染色体上の小分子 RNA がガイドとなり、Z 染色体上の雄化遺伝子 Masc の mRNA が切断されることが、カイコの性決定の最上位の仕組みであることを解明した（Kiuchi et al., Nature, 2014）。さらに、Masc タンパク質が、雄化のみならず、遺伝子量補正をも支配するタンパク質であることも発見した。本研究では、Masc タンパク質が遺伝子量補正を実行する分子メカニズムを解明し、チョウ目昆虫における遺伝子量補正の全貌を明らかにする。一方、カイコが雌の減数分裂において染色体交叉を起こさないメカニズムを調査することで、チョウ目昆虫における性決定カスケードと組換えとの関係を分子レベルで解明する。

これらの目的を達成するため、Masc タンパク質の標的となる DNA の塩基配列を、培養細胞で Masc を強制発現させ、ChIP 解析を行うことによって明らかにしたい。また、性決定カスケードで *Masc* の下流にある遺伝子群を、RNA-seq によって明らかにする。さらに、間性変異体系統を用いて、減数分裂における性特異的な交叉の分子機構へ迫る。

＜支援の内容＞

(1) BmN4 を使った Masc の ChIP-seq（9 サンプル）

本研究では、Z 染色体にコードされ、ジンクフィンガードメインを有するタンパク質 Masc の機能を明らかにすることが大きな目標である。そのため、カイコ卵巣由来の培養細胞である BmN に、種々の改変をほどこした Masc を強制発現させ、それが結合するゲノム領域の塩基配列を、ChIP 解析によって明らかにする。

(2) 前項の実験と同じサンプルの RNA-seq（9 サンプル）

BmN 細胞における Masc の強制発現によるトランスクリプトームの変化を明らかにするため、(1)の同じサンプルの RNA を RNA-seq によって解析する。

(3) 正常系統と間性変異系統の RNA-seq（8 サンプル）

間性系統は、W染色体の変異によって、雌個体の形質が部分的に雄化した系統である。本研究では、正常系統と間性変異系統のそれぞれについて、生殖巣（精巣・卵巣）の経時的な RNA-seq 解析を行い、比較する。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在、支援による解析を実施中

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究は、我々が明らかにしたカイコ Z 染色体上の性決定遺伝子 *Masc* の機能を、遺伝子・分子レベルで具体的に解明することをめざしている。

支援内容(1)は、Masc のターゲット遺伝子を同定し、雄化および遺伝子量補正のカスケードを、分子レベルで明らかにするためのものである。Masc タンパク質は CCCH タイプのジンクフィンガードメインを 2 つ持つ雄化タンパク質であり、胚子を用いた実験から、遺伝子量補正に関わる分子であることも判明している。本研究では、様々な Masc 変異体-GFP 融合遺伝子を作成し、それらを BmN4 細胞に導入して ChIP-seq を行うことで、Masc タンパク質が結合するゲノム領域と、それに関与する Masc の機能ドメインを同定することができる。その結果から、Masc タンパク質を介した雄化や遺伝子量補正カスケードの解明が可能となる。

これらによって、ショウジョウバエなどと大きく異なる性決定機構、すなわち piRNA を起点とした性決定カスケードと遺伝子量補正機構の全貌が解明されることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

なし

本課題は以下の方々との共同研究で行われた：勝間進・木内隆史・川本宗孝（東大・農）、鈴木 穣・菅野純夫（東大・新領域）

公募支援課題：2014 年度

レトロンと msDNA による病原性発現制御とゲノム進化における役割

基盤研究（C）

島本 整・広島大学大学院生物圏科学研究科

＜背景・目的＞

細菌の逆転写酵素（RT）は，multicopy single-stranded DNA（msDNA）と呼ばれる RNA-DNA 複合体の合成に必須の酵素である。*Vibrio cholerae* の RT 遺伝子（*ret*）はゲノム上で msDNA をコードする領域（*msr*･*msd*）と 2 つの機能未知の ORF（*orf540*, *orf205*）とともに，レトロンと呼ばれるオペロン（レトロン-Vc95）を形成している。レトロン-Vc95 の機能は解明されていないが，流行性コレラの原因となる *V. cholerae* O1/O139 血清型のすべての株がレトロン-Vc95 を保有しているため，病原性とレトロンの関係が強く示唆されている。

また，これまでの研究で，レトロン-Vc95 の *ret* を欠損させた株（TSC-11）と野生株（MDO-6）および欠損株の相補株（TSC-11/pBNR-1）との遺伝子発現レベルの比較より，VC0176（transcriptional regulator, putative）遺伝子と VC0177（transcriptional regulator, VspR）遺伝子の発現が変化していることが明らかになった。VC0176，VC0177 両遺伝子は VSP-1（*Vibrio* seventh pandemic island）と呼ばれる pathogenicity island 上にコードされているため，この 2 つの遺伝子がレトロンまたは msDNA を介して病原性を調節していることを示唆している。

VC0176, VC0177 両遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を調べたところ, msDNA の DNA ステム部分と部分的に一致する配列が存在した。当研究室では，msDNA がデコイ核酸のように機能し，転写制御因子である VC0176 タンパク質と結合することによって，VC0177 遺伝子の発現制御を行っているのではないかという仮説を立て，ゲルシフト法を用いて検証した。この検証結果により，VC0176 タンパク質は VC0177 遺伝子のプロモーター領域，および msDNA の DNA ステム部分に結合することが明らかとなった。

上述のゲルシフト法による結果は *in vitro* における DNA と VC0176 タンパク質の結合の有無を確認したものであるが，実際にコレラ菌細胞内でも同様の結合が起こり，遺伝子の発現制御を行っているかどうかは不明である。今回, *in vivo* において VC0176 タンパク質と相互作用する DNA の部位を特定し，VC0176 が制御する遺伝子群を網羅的に解析することが本支援で ChIP-Seq 解析を行う直接的な目的である。

＜支援の内容＞

V. cholerae O1 El Tor P1418 株に FLAG タグの付いた VC0176 タンパク質を発現するプラスミドを導入し, アラビノースで誘導することによって VC0176 タンパク質を発現させた。そして，コントロールとしてベクター（pBAD33）を導入した株を用い，それぞれ誘導を行ったものと誘導を行わなかったもの，計 4 サンプルについて ChIP-seq 解析を行った。そして，得られた結果についてサンプル間で比較することによって VC0176 が結合する染色体上の領域を明らかにした。解析は，東京大学の鈴木穣教授と菅野純夫教授の研究室に依頼し，支援をいただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

VC0176 タンパク質が結合した部位から 1 kb 以内に転写開始部位（transcriptional start site, TSS）が存在する遺伝子を検索したところ，コレラ菌の 55 の遺伝子が該当することがわかった。その内訳は，酵素の遺伝子が 33%, hypothetical protein が 27%, 病原性関連遺伝子が 9%，トランスポーターが 4%, 転写制御因子が 2%，その他が 18%であった。

また，該当遺伝子の中に DNA-directed RNA polymerase subunit β 遺伝子（VC0328）が含まれていることがわかった。別の実験から msDNA に結合するタンパク質として同じタンパク質が同定されている。このことは，msDNA および VC0176 タンパク質が協同して RNA polymerase の発現，あるいは活性の調節に関与している可能性を示唆している。さらに，それによりコレラ菌の病原性の発現に寄与しているのかもしれない。更なる解析により，レトロンや msDNA の機能，およびコレラ菌の新たな病原性発現調節機構の一端を明らかにすることにより，科研費課題研究の多大な進展が期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ChIP-Seq 解析の結果，msDNA が関与する可能性のある転写制御因子 VC0176 によって制御される候補遺伝子として数多くの遺伝子が検出された。今後，これらの遺伝子について個々に解析を進め, VC0176 転写制御因子さらには msDNA-Vc95 の機能の解析に結びつけることが可能となった。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2011 年度

サンゴに共生する褐虫藻類の比較ゲノム学的研究

新学術領域研究

將口 栄一・沖縄科学技術大学院大学マリンゲノミックスユニット

＜背景・目的＞

渦鞭毛藻類にはサンゴに共生する褐虫藻、赤潮や食中毒の原因になる種など約 2000 種が含まれ、海洋環境を考えていく上で重要なグループである。また常に凝縮した核を持つという他の真核生物にはみられない特徴を備え、ゲノム構造の進化を考える上で興味深いグループでもある。しかしながら、そのゲノムサイズは 1.5 Gbp から 245 Gbp と非常に大きいことなどから、全ゲノム解読はなされていなかった。そのような背景から、渦鞭毛藻類で初となりうる、褐虫藻ゲノムを決定する上で、BAC や fosmid ライブラリーからの配列データが、高精度のゲノム概要配列の決定に必要であると考えられた。さらに、報告されてきた渦鞭毛藻のトランスクリプトームやプロモーター領域の解析から、その遺伝子発現メカニズムも非常に独特なものであるかもしれないという議論がなされていた。それゆえ、転写開始点(TSS)を予測するためのトランスクリプトーム配列のデータが、詳細な遺伝子構造及び発現メカニズムの解析に非常に重要なものになると考えられた。

＜支援の内容＞

1. 褐虫藻（*Symbiodinium minutum*)のゲノム DNA から、BAC ライブラリーを作成し、384 プレートの 82 枚にアレイして頂いた。その中の 31,104 クローンのエンドシーケンスをして頂いた。
2. 褐虫藻のゲノム DNA から、fosmid ライブラリーを作成し、384 プレートの 206 枚にアレイして頂いた。その中の 19,200 クローンのエンドシーケンスをして頂いた。
3. 褐虫藻の mRNA から、転写開始点(TSS)を予測するための RNAseq ライブラリーを作成して頂いた。イルミナのシーケンサーにより、そのライブラリーのシーケンスを行って頂き、約 29.1 Gbp の TSS 配列を決定して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

1. 世界に先駆けて、渦鞭毛藻類核ゲノムの概要配列を決定し、驚きの核ゲノム構造を明らかにした(Shoguchi et al., 2013)。BAC や fosmid のペアエンド配列は、アセンブルしたゲノムの正確性を検証する上で非常に有用であった。TSS 配列をゲノム概要配列にマッピングすることにより、スプライストリーダートランススプライシングを受けるトランスクリプトームを同定することできた。
2. 褐虫藻の葉緑体ゲノムはミニサークル DNA という特殊なゲノム構造を持つ。TSS 配列を葉緑体ゲノムにマッピングすることにより、TSS 上流域において、12 個のミニサークル間で保存された非コード領域を同定した(Mungpakdee et al., 2014)。
3. 渦鞭毛藻類のミトコンドリアゲノムは、様々な長さの断片が組み換えを起こした状態で存在しているため、その全ゲノム配列は報告されていなかった。fosmid のエンド配列と TSS 配列のマッピングデータも使って、褐虫藻ミトコンドリアの全ゲノム配列決定し、その解析結果を報告した(Shoguchi et al., 2015)。
4. 渦鞭毛藻は、毒を含むユニークな二次代謝産物（ポリケチド）を合成しそうであることが報告されてきた。しかしながらその生合成には、渦鞭毛藻に共生しているバクテリアなどが関わっているのかもしれないという疑問点が残っていた。褐虫藻 *S. minutum* のゲノムにコードされているポリケチチド合成酵素の遺伝子群を解析し、褐虫藻がポリケチドを合成していることをサポートする結果を報告した(Beedessee et al, 2015)。TSS 配列のマッピングデータは、ポリケチド合成酵素遺伝子領域の詳細な解析に有用であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

褐虫藻 *Symbiodinium* 属には、サンゴを含む刺胞動物、海綿動物、軟体動物、扁形動物、有孔虫に共生する種などが含まれ、非常に多様であることが報告されてきている。*Symbiodinium* の多様性をゲノム比較の側面からもみていくことは、サンゴの白化現象を含む海洋環境を考えていく上で、重要であると考えられる。得られたゲノム配列を参照することにより、サンゴに共生している褐虫藻のゲノムが、ストレスや環境の変化に対しどのように反応しているのかが、比較ゲノムやトランスクリプトーム解析などから明らかとなり、サンゴの白化メカニズム解明と対策立案に貢献する。

＜支援成果公表リスト＞

1. Shoguchi, E. et al., Curr. Biol. 23, 1399-1408 (2013)
2. Mungpakdee, S. et al., Genome Biol. Evol. 6, 1408-1422 (2014)
3. Shoguchi, E. et al., Genome Biol. Evol. 7, 2237-2244 (2015)
4. Beedessee, G. et al., BMC Genomics 16, 941 (2015)

公募支援課題：2013 年度

ゲノムの多様性解析による表現型可塑性を有する野生植物集団の栽培化に関する研究

若手研究（B）

白澤 健太・かずさ DNA 研究所　先端研究部

＜背景・目的＞

栽培植物は野生の植物種に比べて生長量と繁殖力が劣ることが多いが、これは植物が栽培化の過程で遺伝的な多様性と、それに伴う様々な環境ストレスに対する抵抗性、すなわち可塑性を失ったことに起因すると考えられている。したがって逆説的に、遺伝的な多様性を維持したまま野生植物を栽培化できれば、高度な可塑性を持った栽培植物が作出できる可能性が高い。つまり、これまで人類が数千年もかけて行なってきた野生植物の栽培化を、現代においてもゲノム解析技術を駆使することで短期間に、かつ、より効果的に達成することが可能になる。

野生植物集団のゲノムの多様性を先端的なゲノム解析技術により明らかにし、栽培化関連遺伝子座を固定した集団の表現型と可塑性を評価することができれば、植物集団の遺伝的多様性、表現型の固定度、および可塑性との関連を解明できるようになる。

若手研究（B）では、遺伝的多様性の高さを維持する野生植物集団へ栽培特性を付与することで、高度な可塑性を持った栽培植物、すなわち各種のストレスに耐性を持った栽培植物が開発できる可能性を検証することを目的としている。そのためには、野生植物に栽培特性を付与させるために必要なゲノム領域と、栽培植物に高度な可塑性を持たせるために必要なゲノム領域の双方の情報取得が不可欠である。そこで本支援では、解析の対象とするヤハズエンドウのゲノム概要配列の決定と、野生集団の遺伝的多様性を表したハップマップの作成を目的とした。

＜支援の内容＞

(1) 1 個体のヤハズエンドウのショットガンライブラリー作製と PacBio RS の CLR モードでの配列分析
(2) 1 個体のヤハズエンドウのメイトペアライブラリの作製と配列分析
(3) 768 個体のヤハズエンドウのペアエンドライブラリ作製と配列分析

＜支援によって得られた研究成果＞

ヤハズエンドウゲノムの配列データの収集とアセンブル

野生植物に栽培特性を付与させるために必要なゲノム領域と、栽培植物に高度な可塑性を持たせるために必要なゲノム領域の双方の情報を得るためには、ヤハズエンドウのゲノム解読が必要である。そこで、ヤハズエンドウの純系標準株を確立した。

標準株から全ゲノム DNA を抽出し、ペアエンド（インサート長 500 bp）、メイトペア（インサート長 2 kb、5 kb、10 kb、及び 15 kb）、及びロングリードのシークエンスライブラリを作製した。ペアエンドとメイトペアライブラリの配列分析は Illumina 社の HiSeq を、ロングリードライブラリの配列分析には PacBio 社の RS を使用した。このうち、2 種類のメイトペアライブラリとロングリードライブラリの作製、及び配列分析は「ゲノム支援」のサポートを受けて実施した。得られた配列データを品質で精査後、これをアセンブルすることで推定ゲノム長の 80%以上をカバーする概要配列を得た。この配列は、真核生物に共通の遺伝子セットの 90%以上を含んだことから、ゲノムのカバー率は十分であると考えられた。

アノテーション

構築したゲノム配列に含まれるトランスポゾン等のリピート配列の検出を行い、ヤハズエンドウのゲノム配列の 80%以上がリピート配列で占められていることを明らかにした。

さらに、構築したゲノム配列から遺伝子を予測するために、標準株から葉、茎、および根などの合計 10 器官を採取し、これらから全 RNA を抽出し、シークエンスライブラリを作成し、Illumina 社の MiSeq を使用して配列分析を行った。得られた情報と、近縁マメ科植物の遺伝子配列等を利用して遺伝子予測を行い、構築したゲノム配列上に 3 万以上の遺伝子を見出した。これらの遺伝子配列は、近縁マメ科植物の遺伝子配列と比較し、ヤハズエンドウに特有の遺伝子を同定した。

野生集団の多様性解析

当初は、全国各地から収集した 8 集団のヤハズエンドウのペアエンドライブラリの作製と配列分析を計画していたが、その後のシークエンス技術の進歩と分析コストの低下に伴い、解析の対象とする集団数を 12 集団とした。各集団・個体を RAD-Seq 法で分析し、得られた配列データを構築したゲノム配列と比較することで、集団あたり 5 千～1 万程度の SNP を検出し、野生集団の遺伝的多様性を表したハップマップを作製した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援によって、野生集団に普遍的に可塑性をもたらすゲノム領域を高精度に推定するための道筋が得られた。副次的に、ハップマップから得られる連鎖不平衡の情報を利用したゲノムマッピングの方法の確立が見込まれた。

＜支援成果公表リスト＞

準備中。

公募支援課題：2012 年度

クロマチンループ構造変換による組織特異的 *Shh* 発現制御システム

基盤研究（A）

城石 俊彦・情報・システム研究機構国立遺伝学研究所　系統生物研究センター

＜背景・目的＞

遺伝子の組織特異的、時期特異的発現には、染色体の三次元構造の変化が大きく関わっている。染色体のループ構造は、エンハンサー・プロモーターの相互作用を促進することで転写の活性化にポジティブな効果をもたらす反面、物理的な障壁となり、転写にネガティブな影響を与えることもある。しかし、染色体上に並んだ遺伝子の間でループの構造変換がいったいどのように組織化されているのか、そのメカニズムはあまりよく分かっていない。

Shh 遺伝子座では、約 1 Mb に及ぶ広大なゲノム領域に 10 以上のエンハンサーがすでに同定されており、組織特異的な発現制御機構を解析するための良いモデル領域となっている。我々は、これらのエンハンサーが数百 Kb に及ぶ長い距離を超えて、組織特異的に *Shh* プロモーターに作用することをすでに明らかにしている。ただし、エンハンサーを欠失したマウスの肢芽でも野生型と同様な染色体動態が観察されることから、染色体構造の変化には、エンハンサーとは別に未知のシス配列とトランス因子が必要だと推測される。

＜支援の内容＞

(1) ChIP-seq

遺伝子発現の活性化に相関して特定のゲノム領域をつなぐことが知られている CTCF と Cohesin に関して、*Shh* 遺伝子座上の分布を知るために ChIP-Seq 解析を行った。マウスの 11.5 日胚より、肢芽と頭部の 2 組織をそれぞれ調製し、CTCF、Cohesin サブユニットの Smc1a、Cohesin のローディング因子である Mau2 に対する 3 種類の特異抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。2 組織の免疫沈降 DNA とインプット DNA、計 8 サンプルに関して HiSeq による網羅的配列解析の支援をお願いした。

(2) 4C-seq

Chromosome Conformation Capture (3C)法を応用した 4C 法により、マウス胚 *Shh* 遺伝子座周辺の染色体相互作用を評価した。マウス 11.5 日胚の *Shh* 発現肢芽細胞から、染色体相互作用部位を含む環状のキメラ DNA を調製し、各ベイト配列に設計したプライマーによるインバース PCR を行った。ベイト配列として用いたのは、以下の *Shh* 遺伝子座周辺の 7 ヶ所である。①*Shh* プロモーター領域、②肢芽エンハンサー領域、③肢芽エンハンサー近傍の進化的保存配列、④*Shh* 翻訳配列上流の CTCF 結合サイト、⑤*Shh* 翻訳配列下流の CTCF 結合サイト、⑥ヒト欠肢症（Achieropodia）の原因候補領域、⑦*Shh* 近傍に位置する Lmbr1 遺伝子のプロモーター。この 7 種類の PCR 産物に対して、HiSeq による網羅的配列解析をお願いした。

＜支援によって得られた研究成果＞

ChIP-Seq 法により、マウス胚組織における CTCF と Cohesin 関連タンパク質のゲノム上の分布を網羅的にマップすることができた。肢芽での *Shh* 発現に必須であることが知られている CTCF は、*Shh* 翻訳領域を挟むように上流 3.5 Kb と下流 6.5 Kb の位置にピークが認められた。また、肢芽エンハンサーの上流と下流 20 Kb に各々ピークが認められた。一方で、エンハンサーと *Shh* 翻訳領域の間の 800 Kb に及ぶインタージーン領域では、数個の低いピークが認められるだけであり、CTCF の結合は MFCS1・*Shh* 翻訳領域特異的であった。CTCF はホモ二量体を形成することで、染色体ループ構造の形成に寄与するため、ChIP-seq の結果は肢芽での *Shh* の転写活性化に CTCF が関与する可能性を強く示唆している。

また、4C-Seq 法による解析の結果、*Shh* 翻訳領域と MFCS1 を含む 1 Mb 超の区画の中で高頻度に相互作用が起こっていることが明らかになった。これは、*Shh* と MFCS1 が特定の染色体ループ構造を作って安定な結合をしているというよりも染色体上の機能的な区画の中で動的に相互作用を繰り返していることを示唆しており、我々が以前に報告した、肢芽エンハンサーと *Shh* プロモーターは断続的な相互作用を繰り返すというデータをよく支持していた。

さらに、*Shh* 近傍の *Lmbr1* のプロモーターは、*Shh* に比べてより小さな相互作用ドメインを形成しており、*Shh* 翻訳領域との相互作用はほとんど認められなかった。マウス肢芽において、*Shh* と *Lmbr1* は異なる発現パターンを呈するため、両者のプロモーター領域における排他的な相互作用ドメインの形成は、その発現の違いを生み出すのに必要である可能性がある。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ChIP-seq で明らかになった CTCF 結合サイトが *Shh* の発現と四肢の表現型にどのように影響を与えるのか調べるために、CRISPR/Cas9 系を用いて、それぞれノックアウトしたマウス株を作製した。現在、これらのマウスの表現型解析が進行中である。

Shh とその近傍の *Lmbr1* 遺伝子は、異なるサイズの相互作用ドメインを有していた。これは、エンハンサーと遺伝子の相対的位置関係（トポロジー）が、近接する遺伝子間の異なる発現パターンを生み出す可能性を示唆している。遺伝子間のトポロジーの違いを生み出す新規シス配列を同定するため、CRISPR/Cas9 系を用いて、*Shh* 遺伝子座に長距離欠失を有する複数のマウス胚を作製した。これらのマウスの発現解析により、*Lmbr1* 下流の 60 Kb が、新規インシュレーターを含むことを発見した。

現在、以上の成果を含む論文を作成中である。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2015 年度

マウス表現型に寄与するアレル発現量バイアスの原因シス制御配列

基盤研究（A）

城石 俊彦・情報・システム研究機構国立遺伝学研究所　系統生物研究センター

＜背景・目的＞

生物種内の表現型多様性の原因の多くが、遺伝子発現量を制御するシス配列多型であることが分かってきた。しかし、シス配列多型を体系的に同定する方法は未整備で、表現型多様性を生むゲノム多型の全体像は未知である。本研究では、最初にマウス表現型多様性の原因となる遺伝子群を抽出するため、醸訳配列上の多型(cSNP)を指標に、マウス亜種間交配 F1 個体を用いて対立遺伝子発現量比の歪み(アレル発現量バイアス)を計測する。次に、発現量バイアスと相関するクロマチン修飾や染色体ループの亜種間差を基に関連するシス配列を探索し、野生由来系統のハプロタイプ解析、培養細胞やマウス個体への遺伝子導入実験により原因シス多型を同定する。本年度は、身長や長骨長などマウス亜種間の顕著な形態多様性の原因遺伝子（群）を探索するため、西欧産 *Mus musculus domesticus* 亜種由来の C57BL/6J 系統、日本産 *Mus musculus molossinus* 亜種由来の MSM/Ms 系統、およびこれらの正逆交配 F1 個体を使用して、成長軟骨を対象にアレル発現量バイアス計測、およびオープンクロマチン構造の探索・同定研究を計画した。

＜支援の内容＞

本年度は、まず成長軟骨を対象に次世代シーケンサを用いた RNA-seq 解析の支援を受けた。解析系統は、マウス C57BL/6J 系統と MSM/Ms 系統、これらの正逆交配により得られた 2 種類の F1、およびコントロールとしてのラットの計 5 種類である。解析はアレル発現量バイアスの性差についても検証するため、雌雄両方について行った。解析数は雌雄各 6 匹由来の組織をプールした計 10 種である。

つぎに、発現量バイアスを示す遺伝子のシス調節配列の構造多型を明らかにするため、Transposase-Accessible Chromatin (ATAC)-seq によるオープンクロマチン構造の探索・同定を行うことを予定しているが、ATAC-seq はごく最近の技術であるため、まずはテストサンプルを用いて小規模解析を行い、得られた結果を参考にして本番サンプルの調整法などを検討する必要があると判断した。そのためのテストサンプルは、本報告書作成時点(2015 年 12 月)で支援班に送付済みである。結果の 2 次解析を行い次第、成長軟骨から採取したサンプルの解析を支援班に依頼する。ATAC-seq 解析についても、サンプルは C57BL/6J 系統、MSM/Ms 系統、これらの正逆交配由来の 2 種類の F1、およびラットの 5 種に由来するものを予定している。

＜支援によって得られた研究成果＞

本報告書作成時点で「ゲノム支援」により受けた結果は、マウス C57BL/6J 系統と MSM/Ms 系統、これらの正逆交配により得られた 2 種類の F1、およびラットの計 5 種の雌雄各 6 匹のプールサンプル、計 10 種類について、成長軟骨を対象に次世代シーケンサを用いた RNA-seq の解析結果であり、36pb シングル読み、平均 3,000 万リードの解析結果を頂いた。

これまで、マウスおよびラットの各系統および交配群を用いて、アレル発現量バイアスとクロマチン修飾やオープンクロマチン部位などのエピゲノム構造多型を関連づけて解析し、ゲノムワイドにシス配列を同定した報告はまだない。現在、支援いただいたデータは 2 次解析中であるが、本研究で解析しているアレル発現量バイアス、シス配列多型、そして表現型の三者を体系的に関連づけて行う解析は、実際に量的形質に寄与する遺伝基盤の解明に大きく貢献するものと期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

国内外で行われるマウス F1 雑種を用いた遺伝子発現解析の多くは、父系・母系のインプリント効果を説明するものに偏っている。一方、本研究では、C57BL/6J 系統と MSM/Ms 系統の正逆交配で父系・母系の異なる 2 種類の F1 を作製し、旧来のインプリント遺伝子群にみられるアレル発現バイアスをポジティブコントロールとして参考にしながら、インプリンティング現象とは無関係な新たな亜種および種間のアレル発現バイアスに注目している。また、ATAC-seq によるオープンクロマチン情報は、成長軟骨で発現する遺伝子のシス調節配列の位置情報を与えるものである。今後、アレル発現バイアスとオープンクロマチンの程度のアレル間差違を対応づけることができれば、新規なシス配列同定法へとつなげることが可能となる。

さらに、マウス亜種間におけるアレル発現量バイアスは、骨サイズなど量的形質の亜種間（種間）多様性を説明する主要な遺伝基盤となりうる。また、本ゲノム解析支援によって生産されるデータは、形態多様性の原因となるシス制御配列の基礎となるものであり、形態進化の遺伝基盤の根幹の理解につながるものである。これらの情報とこれまでに我々が蓄積してきた表現型情報とを関連づけることで、シス制御配列多型が量的形質の亜種間（種間）多様性を生み出すメカニズムの全体像を明らかにすることが可能になると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

遺伝子発現解析のデータは、DDBJ に登録準備中である。

公募支援課題：2015 年度

腸管 IgA 抗体による腸内細菌選別機構の解明

基盤研究（B）

新蔵 礼子・長浜バイオ大学バイオサイエンス学部

＜背景・目的＞

腸管内には多種多様な細菌が常に生息し、宿主と平和的な共生関係を築いている。この共生関係が崩れると、炎症性腸疾患や肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病、大腸ガンなど各種疾患の発症に繋がるため、腸内環境を恒常的に維持することは健康維持に重要である。腸は宿主と腸内細菌による共生の重要な場であり、恒常性維持のために多くの免疫細胞や分子が働いているが、IgA は粘膜面の病原菌防御だけでなく腸内常在細菌の制御にも重要であり、このような共生関係の維持にも極めて重要であると考えられている。腸管に分泌される IgA は腸内細菌に対して poly-reactive に反応し粘膜面の第一線防御に重要と考えられてきたが、具体的に腸内細菌をどのように認識し制御するかは明らかではない。最近の研究では腸管腔に分泌される IgA 抗体が腸内細菌を識別して制御することが示唆されているが具体的なターゲットは明らかにされていない。

私たちは腸管の恒常性を維持するためのモノクローナル IgA 抗体（W27）をマウスから単離し、そのターゲット分子とエピトープも同定した。W27 抗体が認識する分子はほぼすべての細菌によって発現されているが、エピトープ部分のアミノ酸配列は細菌ごとに固有であり、W27 抗体がエピトープ部分のアミノ酸配列の差異を区別して認識することも明らかにした。この抗体をマウスに経口投与することで、腸内細菌叢のバランスが変化し、マウス腸炎モデルでは W27 抗体経口投与による腸炎抑制効果も確認した。（論文投稿準備中）

本研究提案の目的は、宿主の IgA がその抗原特異性を使って多種多様な腸内細菌の共通認識分子のエピトープの差異を通して取捨選択をすることで共生関係を保持する、という我々の仮説を分子レベルで証明することである。

＜支援の内容＞

私たちがマウス腸管から取得した W27 IgA 抗体は、*Lactobacillus casei* や *Bifidobacterium bifidum* のようないわゆる善玉菌には結合せず病原菌を含む他の多くの細菌には結合して腸内細菌叢を良い状態へ変化させると予想される抗原特異性を持った抗体である。W27 抗体が結合する、あるいは結合しない細菌群とそれらの細菌の代謝機能を明らかにすることができれば、宿主が IgA 抗体を駆使して目指している良い腸内環境がいかなる状態か、を定義することができると思う。本支援では以下の二つの実験サンプルのメタゲノム解析・メタ 16S rRNA 解析を行った。

１、W27 抗体投与実験前後の糞便由来の DNA を使って 16S rRNA 解析を行い、腸内細菌叢が W27 投与により有意に変化するデータをすでに得ている。本支援では同じサンプルを用いて、腸内細菌叢のメタゲノム解析を行い、抗体の経口投与前後の腸内環境の違いを細菌の種類だけではなく微生物の機能という観点から詳細に検討する。W27 投与マウス　4匹の抗体投与前後、計 8 サンプルのメタゲノム解析を支援いただいた。

２、腸管内容物を IgA 抗体に対する抗体で染色して IgA 結合細菌群と IgA 非結合細菌群にセルソーターで分離する事が可能である。この方法を応用して、W27 IgA 抗体による腸内細菌叢制御の選択基準を明らかにすることができると考える。具体的には、IgA が全く腸管内に存在しない AID ノックアウトマウスの盲腸内容物を W27 抗体で染色する。セルソーターで W27 抗体結合細菌と W27 抗体非結合細菌に分離し、DNA を抽出後に 16S rRNA 解析とメタゲノム解析を行う。AID ノックアウトマウス４匹からサンプルを抽出し、計８サンプルそれぞれのメタゲノム解析と 16S rRNA 解析の支援をいただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

メタゲノム解析、およびメタ 16S rRNA 解析は進行中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

解析結果が未だないため、該当なし。

＜支援成果公表リスト＞

解析結果が未だないため、該当なし。

公募支援課題：2010～2011 年度

ゼブラフィッシュ近交系の樹立／ゼブラフィッシュ初期精原細胞異常変異体からの精原幹細胞増殖・分化因子の同定

若手研究（B）／新学術領域研究

新屋 みのり・国立遺伝学研究所系統生物研究センター

＜背景・目的＞

小型魚類であるゼブラフィッシュは頻繁に利用されているモデル動物の一つであるが、長年、遺伝的に均一な近交系が樹立されてこなかった。そこで支援依頼者は、2005 年よりゼブラフィッシュの野生型系統である India を用い、メダカやマウスでの近交系の定義である 20 世代以上の兄妹交配を試みた。途中、継代が難しい時期があったものの、2010 年（支援依頼時）には 16 世代目の個体を得ることができ、2011 年には 20 世代目に到達した。IM（India-Mishima）系統と名付けたこの系統は、世界で初めてのゼブラフィッシュ近交系であった。

継代途中のコンタミネーションには十分注意を払っていたが、その可能性を明確に排除する必要がある。また、IM 系統の利用を考えたとき、この系統内にどの程度の多型が残っているのか、そしてその多型はゲノム上のどこにあるのかを把握しておくことは重要である。さらに、樹立に成功した近交系を自分自身だけではなく、世界中の研究者に広く利用してもらうためには、利用しやすい形で情報を公開することが大切だと考えた。そこで、以下に述べる一連の支援を依頼した。

＜支援の内容＞

次世代シークエンサーによるゲノム配列決定（2010 年度）、およびそのデータを遺伝学的解析に利用するためのデータベース構築（2011 年度）について支援を受けた。

ゲノム配列決定に用いたサンプルは、兄妹交配 14 世代目の IM 系統 2 個体（継代ペア）であった。得られた配列を既に公開されているゼブラフィッシュゲノム配列に対してマッピングし、公開配列との間の多型、および配列決定された近交系 2 個体間の多型も検出・集計して頂いた。更に、今後様々な遺伝学的解析にて IM 系統を有効に活用するため、既知配列および多型情報、IM 系統の配列情報、IM 系統と既知配列間の多型情報などを含めたゲノム関連情報を集約したデータベース、およびその情報を利用しやすくするためのビューワーの作成支援を行って頂いた。尚、このデータベース構築支援については、大阪大学の中谷明弘特任教授との共同研究として進めた。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在 IM 系統は、近交系の定義を満たすだけの継代を行い、近交系として兄妹交配による維持を続けている。現時点で飼育している全ての個体が、配列決定された 2 個体に由来する。従って、支援によって得られた多型情報より、近交系 IM 系統の遺伝的背景がどの程度以上均一であるかを推定できる。また、他系統を基に作成されたゼブラフィッシュ公開ゲノム配列との間にどの程度の多型が存在するのかを知ることができる。

14 世代目の 2 個体間の一塩基多型は 0.14%程度であったことから、コンタミネーション等なく近交系化が進行できており、現存の IM 系統内には 0.14%以下の多型しか存在しないことが推定できた。マウス等のデータと照合しても、近交系として十分に均一であると言える。また、公開配列との間には 1%程度の一塩基置換が存在していた。従って、ゼブラフィッシュは系統間多型に富んでおり、遺伝学的な解析を行う良いツールであることが改めて確認できた。

本支援により作成されたデータベースは、IM 系統を用いた様々な順遺伝学的および逆遺伝学的解析を円滑に進めることを可能にするものである。近年、ゼブラフィッシュにおける逆遺伝学的手法として TALEN（Transcription Activator-Like Effector Nucleases）や CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）を用いたゲノム編集技術が急速に広まりつつある。これらの解析において当該データベースは活用することにより、解析の効率化を図ることができる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

IM 系統は分与も開始しており、既に国内外に 10 数件程度送付している。支援により得られたゲノム配列や多型情報は、IM 系統に付加価値を与える重要な基盤情報である。ガン研究やメチル化に関する研究など、幅の広い研究分野に携わる研究者からの分与依頼を受けており、我々が当初考えていた以上に多様な分野の発展に貢献することが期待できる。本支援により得られたデータおよびそのデータベースを一般に公開したことにより、IM 系統の分与先においても活用でき、効率的に研究を進められると考えている。

IM 系統 2 個体それぞれとゼブラフィッシュ公開ゲノム配列との比較、および IM 系統内の多型調査により、兄妹交配によって多型が失われつつある中でも、特に免疫等の生体防御関連の遺伝子においては多型が維持されることが明らかになりつつある。このような解析をゲノム全体に更に拡大させることにより、ゼブラフィッシュが種として維持されるために必要なゲノムの多様性がどういったものかを探れる可能性が出てきたと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2012 年度

枯草菌細胞内への細胞周期回路の人工合成

新学術領域研究

末次 正幸・立教大学理学部生命理学科

＜背景・目的＞

DnaA の ChIP-Seq 解析：

大腸菌ゲノム複製開始蛋白質 DnaA は、DnaA box と呼ばれる 9 bp の DNA 配列に結合する。DnaA box は複製開始点 *oriC* 上にクラスターを成して存在するだけでなく、ゲノム上に約 300 カ所散在し、遺伝子発現制御や複製開始制御に機能している。科研費研究課題は DnaA 活性の細胞周期オシレーションに着目したものである。DnaA の活性型（ATP 結合型）と不活性型（ADP 結合型）とで、DnaA box DNA 断片自身に対する結合能は大きく変わらない。一方で近年、細胞周期制御されるいくつかのプロモーターや *oriC* DNA に対するフットプリント解析から、DnaA の ATP 結合型特異的に結合するような DNA 部位がある事が分かってきた。しかしながら、そのコンセンサス配列は不明瞭であり、ゲノムスケールでの結合領域同定もなされていない。そこで、「ゲノム支援」活動による支援を受け、活性型 DnaA（ATP 結合型）と不活性型 DnaA（ADP 結合型）における大腸菌ゲノム（4.6Mb）上への結合部位を ChIP-seq により同定し、その差異を明らかにすることを試みた。

＜支援の内容＞

以下に示す変異株を利用することで細胞内に約 2000 分子ある DnaA の ATP/ADP 結合型レベルを操作する事が可能である。これらの株から DnaA を回収し、結合している DNA を回収する。回収された DNA の配列解読について、次世代型 DNA シーケンサを用いた支援をお願いした。

（解析に用いた大腸菌株について）

Strain-1） MG1655 野生株（ネガティブコントロール）

Strain-2）Strain-1, *his-strep-dnaA**[1], Δ*dnaA**[2]

Strain-3）Strain-2, Δ*oriC*, Δ*rnhA**[2]

Strain-4）Strain-3, Δ*hda**[3] ［ATP-DnaA 蓄積変異］

Strain-5）Strain-3, pTaq-*hda**[4]［ATP-DnaA 減少変異］

*[1] His および Strep タグ融合 DnaA のクロマチンタンデムアフィニティー精製(ChAP)を行った。

*[2] DnaA の ATP/ADP 型レベルの操作は、ゲノム複製開始の異常をもたらし、細胞増殖を阻害する。このため、*dnaA*, *oriC* 欠失株を使用し、二次的な影響を排除する工夫を施した。

*[3, 4] DnaA-ATP 加水分解因子（不活性化因子）の欠損株および過剰発現株

＜支援によって得られた研究成果＞

大腸菌複製開始 DnaA のゲノムワイドな結合パターンを得る事ができた。得られた結合領域には、これまで個々にその結合が示されてきた複製開始領域、DnaA 再活性化領域、転写プロモーター領域も含まれており、その相対的な結合頻度の違いも知る事ができた。ネガティブコントロールでもみられる非特異的な結合が多く検出されているという問題が有るものの、今後、DnaA の細胞周期制御因子としての役割を研究していく上で、貴重な情報となるものである。さらに、DnaA 活性レベルに応じた結合パターンの変化を知るため、DnaA 活性制御の変異株（上記、Strain-3～Strain-5）を用いた同様の解析を行った。しかしながら、これらの変異株では十分に特異的な結合パターンを得る事ができなかった。こちらについては今後、変異株の設計から見直し、再検討する必要がある。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

大腸菌 DnaA 蛋白質は、染色体複製開始領域にメインに結合するものの、それ以外のゲノム上の多様な領域にも結合していることを確認する事ができた。DnaA の細胞周期制御因子としての機能解析は、現在、本支援によって検出されたゲノム領域の１つをターゲットとして進めている。今後、この領域の解析が進んだ後に、DnaA 活性レベルに応じた結合パターン変動のゲノムスケールでの解析に再度挑戦する予定である。

公募支援課題：2015 年度

アトピー性皮膚炎感染黄色ブドウ球菌の病原性基盤

基盤研究（C）

菅井 基行・広島大学大学院医歯薬保健学研究科

＜背景・目的＞

代表的な皮膚感染症原因菌である黄色ブドウ球菌は、アトピー性皮膚炎（Atopic dermatitis, AD）の増悪化にも関連し、難治化の要因の一つである。本研究は、黄色ブドウ球菌の AD 皮膚への菌の付着・定着性を、フィラグリン欠損マウスと野生型マウスを用いて検討し、AD 皮膚に感染する株特有の皮膚定着機構を解明することを目的とする。本研究の遂行により、AD 増悪化における黄色ブドウ球菌の初期の感染メカニズムを理解し、慢性疾患の予防的なコントロールにつながる情報基盤を確立する事ができると考えられる。

＜支援の内容＞

黄色ブドウ球菌（ゲノムサイズ約 2.9Mb）の AD（アトピー性皮膚炎）の遺伝的基盤を明らかにするために、申請書に記載した３つの研究計画に必要な計１８２株のゲノム解読を依頼した。１８２株は MiSeq にて解読して頂いた。加えて、各系統の代表１０株については、コンプリートゲノムを取得するために、PacBio 及び HiSeq での解読を行って頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

黄色ブドウ球菌のゲノム解読のためのライブラリー調整における問題点が明らかとなった。Illumina 社の Nextera でライブラリー作成した場合、高いシーケンスバイアス（シーケンスカバレージの不均一性）が生じることが認められた。その為、Kmer 頻度が低く、アセンブル効率が非常に悪かった。そこで、Nextera のような transposome による DNA 断片化と adaptor ligation を同時に行う手法ではない他のキットを用いて比較検討を行った。その結果、黄色ブドウ球菌では従来法のライブラリー調整キット（Illumina 社 TruSeq や KAPA Biosystem 社キットなど）では良好な Kmer 頻度のピークが認められ、シーケンスバイアスは低かった。したがって、黄色ブドウ球菌でのライブラリー調整法におけるシーケンスバイアスの現象は、transposome を用いた Nextera 系に限って生じる現象であることが判明した。この予備検討の結果を踏まえ、182 株のドラフトゲノム配列を得るために、ライブラリー調整キットとして、最も high-throughput に適している KAPA Biosystem 社 HyperPlus kit を採用して MiSeq リードを取得した（2016/1/20 に配列データを外付け HDD にて受取った）。

一方、各系統の代表１０株については、PacBio 及び HiSeq で解読していただき、PacBio リードのみでエラー修正およびアセンブリを行って頂いた後、それに HiSeq のリードをマッピングすることで検出されたエラーも修正した環状配列が得られた（2016/1/4 にアセンブルデータをメール添付にて受取った）。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

配列データは揃ったので、今後の予定として、申請書に記載した３つの研究計画に従って、情報解析を行い、AD 由来黄色ブドウ球菌クローンのアトピー性皮膚への菌の付着・定着機構を分子生物学的に究明すること、加えて、市中感染型 MRSA-ST8 グループの比較ゲノム解析により、糖不応答性の毒素産生制御機構の解析を行う予定である。

ライブラリー200 株の全株のゲノム配列データ、ならびに、各系統の代表株の完全ゲノム配列が取得できたことで、これまでの CGH ベースの系統比較から、ゲノム配列レベルでのより高精度な系統比較解析が可能となる。さらに、毒素遺伝子を持つファージや MRSA 型の Clade などの進化系統解析も行っていく予定である。

さらに、黄色ブドウ球菌ゲノムのライブラリー調整法の違いで、シーケンスバイアスが存在することが判明したことから、何故このようなシーケンスバイアスが生じてしまうのか、今後、そのメカニズムの解析が必要である。

＜支援成果公表リスト＞

2016/1/20 に配列データを受取った段階なので、これから、詳細なゲノム解析が進行する。そのため、論文等の公表した項目はありません。

公募支援課題：2015 年度

動物多細胞性進化メカニズムの分子生物学的解明

研究活動スタート支援

菅 裕・県立広島大学生命環境学部

＜背景・目的＞

動物の多細胞体制の進化にはどのような遺伝子が新たに作られることが必要だったのか？或いはどのような遺伝子が単細胞の時代から存在し、それが多細胞体制の構築にあたり転用されるようになったのか？こうした問題の解決には、動物に系統的に近縁な単細胞生物のゲノムを多数解読し、動物や他の原生生物のゲノムと比較することが必要である。しかしながら、現在、動物のゲノムは多数決定されているものの、動物に近縁な単細胞生物のゲノムは３種類しか決定されていない。信頼性の高い比較ゲノム解析のためには、この数を増やすことが必要である。

＜支援の内容＞

動物に近縁な単細胞生物としては、従来立襟鞭毛虫が知られていたが、最近、イクチオスポレアと呼ばれる原生生物グループが発見された。そのうちの２種、*Amoebidium parasiticum* および *Sphaeroforma arctica* の全ゲノム配列決定を行う。予備的な解析から、この２種はゲノム中に多くの繰り返し配列を持ち、配列決定がかなり困難であることが分かっている。そこで支援側の専門的な知識と技術の助けを借りたい。もし必要であれば、PacBio の超ロングリードも含めて支援をお願いする。

＜支援によって得られた研究成果＞

2015 年９月１５日にサンプルを送付した。現在配列決定作業中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

現時点ではまだデータがなく、したがって解析も行われていないが、プロジェクト完了後の展開としては、以下が予想される

１）比較ゲノム解析
既存の動物ゲノムと立襟鞭毛虫ゲノム、及びフィラステレアゲノムと合わせて、比較ゲノムの手法による「動物多細胞体制進化の分子メカニズム」研究を展開させる。特に、動物多細胞性の進化にあたりどのような遺伝子が増加したのか、どのような遺伝子が新しく作られたのか、あるいは新しく作られたのではなく昔から存在したのか、に着目して解析を行う。

２）単細胞生物が持つ「多細胞的な」遺伝子の機能解析
比較ゲノム解析により発見された、一見単細胞生物には必要がないと思われる「多細胞的な」遺伝子の機能解析を行う。特に、得られたゲノム配列を活用し、ゲノム編集の適用に重点を置く。

＜支援成果公表リスト＞

現在のところなし。

公募支援課題：2015 年度

バイオフィルムマトリクス成分の新機能の開拓

若手研究（A）

杉本 真也・東京慈恵会医科大学医学部

＜背景・目的＞

バイオフィルムは微生物により形成される膜状の構造体であり、医療の現場では、血管内留置カテーテルやペースメーカーなどの医療器具の表面に形成される。バイオフィルムを形成する病原細菌のなかでも黄色ブドウ球菌は、ヒトに種々の化膿性疾患・肺炎・骨髄炎・心内膜炎などを引き起こし、主要な院内感染菌として重要視されている。バイオフィルム内部の細菌は抗菌剤や免疫系・貪食細胞系の働きに高度の耐性を示すため、バイオフィルムに関連する感染症（バイオフィルム感染症）は慢性化・難治化の一途をたどることが多い。現代社会において、バイオフィルム感染症の的確な予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。

これまでに申請者らは、バイオフィルム感染症の主要な起因菌である黄色ブドウ球菌のバイオフィルムマトリクスに、低分子 RNA が存在し、バイオフィルム形成に重要であることを発見した。しかし、これらの低分子 RNA が細菌によって産生（分泌）されたものなのか、もしくは培地（外環境）中の RNA を捕捉したものなのかは不明であった。そこで本研究では、バイオフィルムマトリクス中に含まれる低分子 RNA および培地中の RNA の塩基配列を網羅的に解析する。それと並行して、バイオフィルムの形成において重要であるが、その配列や構造など不明な点の多い細胞外 DNA についても塩基配列を決定し、ゲノム配列と比較する。これらにより、バイオフィフィルムに重要な細胞外核酸の実体解明を目指した。

＜支援の内容＞

バイオフィルム形成能の高い黄色ブドウ球菌臨床分離株 2 株（MR10 株及び MR23 株）についての新規ゲノム配列と細胞外 DNA 配列（全 4 検体）を決定した。その後、得られたゲノム配列上に細胞外 DNA のリードをマッピングした（九大、林 G）。また、MR10 株のバイオフィルムマトリクス、培養前の培地及び培養終了時の培地上清に含まれる RNA を RNA-seq(3 検体)により解析した（東大、菅野・鈴木 G）。

＜支援によって得られた研究成果＞

バイオフィルム形成能が高く、それらの性質が全く異なる黄色ブドウ球菌臨床分離株 2 株（細胞外多糖に依存したバイオフィルムを形成する MR10 株及びタンパク質に依存したバイオフィルムを形成する MR23 株）のドラフトゲノム配列を決定した。現在、アノテーションの付与と 2 株間における比較ゲノム解析を進めている。また、得られたドラフトゲノムに対してゲノム DNA 及び細胞外 DNA のリードをそれぞれマッピングしたところ、それらのパターンやカバー率は酷似していた。このことから、細胞外 DNA は溶菌等によりゲノム全長が細胞外へ排出され、バイオフィルムマトリクス内に取り込まれている可能性が高いと考えられる。

また、バイオフィルムマトリクスに含まれる RNA を解析した結果、黄色ブドウ球菌に由来する特定の RNA がバイオフィルムマトリクスに含まれていることが分かった。さらに、バイオフィルム形成時に使用した培地に由来する RNA もバイオフィルム内に取り込まれている可能性が示唆された。今後、黄色ブドウ球菌のドラフトゲノム上にマッピングされなかった RNA（すなわち培地に由来する RNA）のアノテーションの付与を行う予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

バイオフィルムの形成に極めて重要な役割を果たす細胞外 DNA の由来や配列はこれまで不明であった。バイオフィルム内の一部の菌が溶菌等により自身のゲノム DNA を細胞外へ排出する可能性と、何らかのメカニズムで一部の配列を能動的かつ選択的に分泌する可能性について、長らく議論されてきた。本研究で得られた成果は、この論争に一石を投じる重要な知見であり、後者を支持するものである。

また、ある種の細菌において、RNA が細胞外に存在することがすでに報告されていたが、細胞外での RNA の機能や排出（分泌）のメカニズムは十分に理解されていない。本研究では、細胞外に排出された低分子 RNA がバイオフィルム形成において重要な役割を果たすという新しい現象の発見に基づき、その実態解明の糸口を掴むことが出来た。本支援課題を推進することにより、特定の塩基配列を持った核酸がバイオフィルム形成に重要な役割を果たしていることが明らかになれば、それらの時空間的な動態（局在変化など）の観察を可能とするオリゴヌクレオチドや、バイオフィルム形成を制御しうるアプタマーの設計にも繋がると考えられる。これらのゲノム科学に立脚した研究を展開することで、RNA を巡る新たな概念の誕生とバイオフィルム感染症の予防法・治療法の開発に繋がると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2013 年度

根粒共生における宿主細胞と根粒菌の相互認識機構の解析

新学術領域研究

寿崎 拓哉・基礎生物学研究所共生システム研究部門

＜背景・目的＞

マメ科植物と根粒菌の共生器官である根粒の初期発生過程では、根粒菌感染によって宿主植物根の一部の皮層細胞が脱分化し、細胞分裂が誘導され根粒原基が形成される。その一方で、根粒菌は感染糸と呼ばれる管状の構造を介して宿主細胞に侵入することができる。根粒共生の成立には、「根粒の発生」と「感染糸を介した根粒菌感染」が同調的に進行することが必要不可欠であることが知られているが、個々の事象の制御機構や、その同調性を制御する機構は未解明な点が多い。本研究は、根粒発生および感染糸形成の遺伝的制御機構を明らかにすることにより、根粒共生成立の基盤となる宿主細胞と根粒菌の間で行われる情報のやりとりの分子メカニズムを解明することを目的にしている。

＜支援の内容＞

マメ科のモデル植物ミヤコグサの *vagrant infection thread 1*（*vag1*）変異体では、根粒の形成が不全となる一方で、感染糸の形成は一見正常に起こる。しかし、個々の感染糸は表皮上をさまようように伸長し、皮層細胞に侵入することができない。このことから、*vag1* 変異体では、根粒発生プログラムの異常だけでなく、根粒菌を宿主細胞へと誘導する機構も破綻していると考えられる。*vag1* 変異体の特徴的な感染糸の表現型から、*vag1* 変異は根粒菌の宿主細胞への誘導に関わる宿主植物側の遺伝子のみならず、宿主からのシグナルの応答に関与する根粒菌側の遺伝子の発現パターンにも影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、根粒初期発生過程における宿主・根粒菌双方の遺伝子発現プロファイルを取得するための、根粒菌感染初期の野生型と *vag1* 変異体それぞれにおける RNAseq 解析の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

宿主植物側の RNAseq を行い、*vag1* 変異体において特異的に発現変動する遺伝子群を同定した。また、感染糸中に存在する根粒菌側の遺伝子については、RNAseq により、根粒菌感染時に発現誘導される 360 遺伝子を同定した。このうち、56 遺伝子は *vag1* 変異体において発現誘導が起こらないことがわかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

感染糸の中に存在する根粒菌はきわめて少数であるため、それに由来する根粒菌 RNA も極微量であったが、SMARTer 法により、極微量 RNA から cDNA ライブラリーを作成することに成功した。感染糸中の根粒菌の RNAseq 解析はこれまで報告例がなく、本研究の進展は根粒共生の分子メカニズムの理解に貢献するだけでなく、植物-微生物相互作用研究の新たな方法論を提示できると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2012 年度

全自動実験進化システムによる多剤耐性菌の創出と進化プロセスの解析

若手研究（B）

鈴木 真吾・理化学研究所生命システム研究センター

＜背景・目的＞

生物の柔軟かつ頑強な進化能を理解し制御することを目指し、本課題では大きな社会問題となっている多剤耐性菌を対象に、その進化プロセスを解明することを具体的な目的とした。薬剤耐性菌の研究を推進していく上で一般的な手法は、臨床現場から得られた耐性菌の表現型・遺伝型を解析していくというものである。しかしながらこのような手法では、耐性化プロセスにおける経時的な変化を追跡することができない。そこで本研究では、臨床現場から得られる薬剤耐性菌にこだわらずに、薬剤耐性能をもたない大腸菌野生株を対象に実験進化的手法を用いることで複数系列の耐性菌を創出し、その遺伝型解析を行うことで多剤耐性化の進化プロセスの解明を取り行った。

＜支援の内容＞

耐性能を持たない大腸菌野生株から多剤耐性菌を実験進化的に創出し、どのような変異の蓄積およびそれによる機能改変により多剤耐性化し得たのか明確に記述するため、作用機序の異なる 33 種類の抗生物質を個別に添加した環境下で独立な 4 系列での進化実験を行った。それぞれの薬剤について、その濃度を変化させた複数の環境下で菌体を培養し、菌体の増殖が確認された最も高い薬剤濃度の環境から 24 時間周期で次の環境へ植え継いだ。およそ 3 ヶ月間この植え継ぎ培養を行ったところ、31 種類の薬剤について増殖を可能とする薬剤濃度の有意な上昇が見られ薬剤耐性大腸菌の取得に成功した。つづいて、どのような変異が導入されることによって薬剤耐性化がなされたのか解明するために、11 種類の薬剤に対して得られた 44 株の薬剤耐性大腸菌株のゲノム変異解析を次世代シーケンサにて行なったところ、それぞれ 5～20 個程度の塩基置換・挿入・欠損を同定した。

これらの結果を元に、本支援にて遺伝子変異がどのような順番にて導入されたのかその経時変化の解析を行った。具体的には、上記にて同定された遺伝子変異が薬剤耐性化プロセスのどの時点で導入されたのか経時的な解析を行うために、1 週間ごとに（計 12 回）冷凍ストックされた進化途中株の同箇所の塩基配列の解析を依頼した。このような研究では、変異箇所の PCR アンプリコンをサンガー法にて配列解析することが一般的な手法であるが、本研究では合計でおよそ 5000 箇所の PCR アンプリコンの解析が必要となり、これをすべてサンガー法にて解析することは非常に困難である。そこで本支援解析では、次世代シーケンサ（FLX junior）を用いて遺伝子変異導入のダイナミクス解析を包括的に行うこととした。薬剤耐性大腸菌の最終進化株にて同定された変異箇所を、それぞれの進化途中株（−80℃ストック）を鋳型に PCR により増幅した。この際、複数株にて同様の遺伝子変異が存在する場合にはそれぞれ固有のバーコードタグを PCR プライマーに付加し、どの薬剤耐性進化系列に由来する PCR アンプリコンなのか区別できるようにした。つづいて同じ日にストックされた進化途中株由来の PCR アンプリコンをすべて混合しバーコードタグを付加することで、その PCR アンプリコンの由来がいつストックされたものかわかるようにした。このように作製したおよそ 5000 箇所の PCR アンプリコンをすべて混合して FLX junior にて配列解析を行った後、それぞれのタグ配列を参照し同定された遺伝子変異が薬剤耐性化プロセスのどの時点で導入されたのか解析した。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援により遺伝子変異の導入された順番が判明した。この結果を元に、遺伝子変異を実験進化させていない元株に同定された順番通りに導入した変異体ライブラリーを作製し、変異体ライブラリーに対する各薬剤の最小増殖阻止濃度を求めることで、それぞれの変異の耐性能への寄与を定量し耐性能の向上を評価することが可能となった。さらに、同定された変異を個別に組み込んだライブラリーの作製およびその寄与も定量することで単独変異による耐性能の向上量の合計と順番通りに組み込んだ際の向上量を比較することが可能となったので、今後、エピスタシスの有無や変異の寄与の度合いを薬剤の種類や複数の進化系列間において比較することで、薬剤耐性進化プロセスの特性を抽出する。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

近年、単独の薬剤に対してその耐性能を進化させた細菌類は、他の作用機序を持つ薬剤にも交差耐性を示すことや、その逆に、ある薬剤に対しては元の株よりも弱くなってしまうという超感受性を示すことが報告されており、我々も同様の結果を観察し報告している。交差耐性や超感受性に関わるいくつかの機構が解明されているが、現状では不明な点も多々残されている。本支援により我々が得た変異遺伝子の導入された順番と様々な薬剤に対する耐性能を比較することにより、耐性株のゲノム変異解析だけでは得られ難い表現型−遺伝型の相関を解析することが可能となった。これらの知見は、複雑な交差耐性および超感受性を引き起こす分子機構の解明につながるとともに、薬剤耐性菌の出現を抑制する薬剤投与指針の設計や、新たな薬剤の開発にもつながる。

＜支援成果公表リスト＞

なし。

公募支援課題：2015 年度

RNA エピジェネティックスと高次生命現象

基盤研究（S）

鈴木 勉・東京大学大学院工学系研究科

＜背景・目的＞

生体内の RNA は転写後にスプライシングやエディティング、RNA 修飾といった様々なプロセシングを受けて成熟する。これまで、RNA 修飾の研究は tRNA や rRNA などの存在量の多い RNA を中心に解析が進められてきたが、最近の次世代シーケンサーを使用した網羅的な解析により、mRNA や non-coding RNA 中に様々な修飾が見つかりつつあり、エピトランスクリプトームという新しい概念が提唱されている。本研究では次世代シーケンスを活用することで、RNA 修飾部位の特定や RNA 修飾の機能を明らかにすることを目指す。具体的には、以下の 3 つのサブテーマを予定している。①ヒトにおける A-to-I RNA エディティングの調節機構、②tRNA メチル化酵素欠損に起因する非症候性 X 連鎖知的障害の発症機構、③生化学的手法と次世代シーケンスを組み合わせた N^4 アセチルシチジンの網羅的同定。

近年、RNA の修飾部位をゲノムワイドに同定するために、生化学手法と次世代シークエンサーを組み合わせた様々な技術が開発され、真核生物の mRNA や non-coding RNA にイノシン(I)や N^6-メチルアデノシン(m^6A)などの修飾塩基が大量に同定されている。これらの転写後修飾は細胞内での遺伝子発現を制御し、発生や分化、ストレス応答など様々な重要な生命現象への関与が明らかにされており、RNA 修飾の重要性が高まりつつある。

I 修飾は、細胞の核内で形成された二本鎖 RNA が ADAR と呼ばれる二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミネースに認識され、アデノシン(A)が脱アミノ化されて I へと変化することで生じる。I は化学構造上、グアノシン(G)と類似しているためシトシンと塩基対形成が可能であることから塩基情報上、A から G への変化を意味し、それゆえ A-to-I RNA エディティングと呼ばれている。I 修飾は霊長類のトランスクリプトーム内に豊富に存在することが知られ、当研究室では独自の解析技術を用いることで、ヒト成人脳 RNA 中に約 30,000 箇所の新規 I 修飾部位を同定した。

当研究室の先行研究で ADAR1 と相互作用する二つの RNA ヘリケース(RNA ヘリケース 1, 2 と呼ぶ)をノックダウンしたところ 3'非翻訳領域(UTR)内の Alu 配列中に存在する I 修飾の効率が顕著に変動する現象を見出した。この結果は RNA ヘリケースが RNA の二次構造を変化させることで RNA エディティングを制御する可能性を示唆している。本支援の下で deep-seq を実施し、RNA ヘリケースが制御する RNA エディティング部位の網羅的探索とその機能解析を目的とした。

＜支援の内容＞

8 条件のヒト神経膠芽腫細胞 A172 (Mock, Luc siRNA, ADAR1 siRNA 2 種類, RNA ヘリケース 1 siRNA 2 種類, RNA ヘリケース 2 siRNA 2 種類)から精製した polyA+ RNA から Illumina 社の strand-specific な RNA-seq のキットを用いて cDNA ライブラリーを調製した後、国立遺伝研・比較ゲノム解析研究室の豊田敦先生に送付し、Hiseq2500 を使用して 150bp ペアエンドの Rapid ランモードで、3 フローセル分のシークエンス解析を実施して頂いた。シークエンス解析後の情報解析は、研究員を同研究室に派遣し、野口英樹先生のご指導の下、ヒトリファレンスゲノム(hg38)へのマッピングを行い、RNA エディティング効率の変動解析や ADAR1 ノックダウン時にスプライシング頻度が増加した Alu エキソン領域の抽出を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られたリードをヒトゲノムへマッピングした結果、各サンプルとも約 90%のリードが正しい strand の方向でゲノムへアライメントされた。リボソーム RNA の混入率は 1%以下であり、非常に良好な結果が得られた。マッピングデータから 30,000 箇所の I 修飾部位を対象にカバレッジが 20 以上の部位を抽出し、I 修飾効率を算出した。RNA ヘリケースをノックダウンしたサンプルとコントロールの I 修飾効率を比較することで、I 修飾が有意に変動している部位を多数同定した。これらの結果は 2 つの RNA ヘリケースがヒトのトランスクリプトーム全体の I 修飾を制御することを示唆している。今後は、変動した I 修飾部位における配列や二次構造の特徴を明らかにしていく予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援研究により RNA ヘリケースがトランスクリプトーム全体の I 修飾を制御する可能性を見出した。RNA エディティングはイントロンや 3'UTR などの mRNA のプロセシングや遺伝子発現を制御するシスエレメントが存在する領域に存在するため、RNA ヘリケースによる RNA エディティング制御を介した新規の遺伝子発現機構が存在する可能性がある。今後は、RNA ヘリケースがどのようなメカニズムが I 修飾の変動を引き起こすかや、I 修飾の変動が具体的にどのような生命現象に関与するかを探究していく予定である。

＜支援成果公表リスト＞

Okada, S. et al., *Methods in Enzymology*, 560, 331-353(2015)
Suzuki, T. et al., *Nature Protocols*, 10, 715-732 (2015)
Sakurai, M. et al., *Genome Research*, 24, 522-534(2014)

公募支援課題：2015 年度

ヒト唾液細菌叢に内在し、腸内炎症に関わる細菌の同定とその機能の解明

若手研究（B）

須田 亙・慶應義塾大学医学部

＜背景・目的＞

ヒトの唾液細菌叢は唾液と共に常時腸内に到達し、腸内細菌となり得る菌種を含むことが想定される。ヒト腸内細菌叢においては、その構成的破綻が炎症性腸疾患(IBD)と関連することが知られていたが、申請者らはこれまでの研究で IBD 患者の唾液細菌叢が健常者とは大きく異なる構造を示すことを発見した(DNA Res., 21:15-25, 2014.)。本研究では、以上の背景を踏まえ、ヒト唾液細菌叢に内在し、腸内炎症に関わる細菌の探索・同定とその機能の解明を目的とする。具体的には、IBD 患者および健常者の唾液細菌叢を無菌マウスに投与したノトバイオートマウスである「ヒト唾液マウス」を作成し、その腸内細菌叢の解析から、 唾液細菌叢に内在し腸内に定着可能な細菌群を特定する。また、各ヒト唾液マウスの大腸粘膜固有層における炎症性 T 細胞の集積量を解析することで、炎症に関与する細菌種(群)を同定する。さらに、同定された炎症関連細菌のゲノム解析を行うことによって、その機能的特徴を明らかにする。

＜支援の内容＞

ゲノム支援では、ヒト唾液細菌叢を投与したマウスの糞便細菌叢から抽出した菌叢 DNA の 16S rRNA 遺伝子 V1-2 領域に対し、Miseq によるアンプリコンシークエンシング(ペアエンド)の支援を受ける予定である。これにより 10,000~20,000 リード/検体の 16S 配列データを取得し、マウス腸内に定着した菌種の組成を明らかにすることを目的とする。約 150 検体のマウス糞便細菌叢を解析することで、炎症に関与する細菌を同定し、単離を試みる。
上記の工程を経て、単分離した菌種からゲノム DNA を調整し、 ゲノム支援においてホールゲノムショットガンシークエンシングを行う予定である。本計画では、Miseq(ペアエンド)を用い、100~200 Mbase(ゲノムの x30~50 程度)のデータを得ることを想定している。得られたドラフトゲノムデータから、菌種の系統や機能について解明する予定である。

＜支援によって得られた研究成果＞

研究進行中のため、支援による結果がまだ得られていない状況であるが、支援によって下記の成果が得られることが期待される。

① ヒト唾液と腸内細菌の相関関係の解明
② ヒト腸内における炎症に関与する細菌の種類およびその性質と炎症誘発に関する作用機序の解明

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援によって常在細菌叢による腸内炎症の作用機序が明らかにされることで、これまで対症的な療法しか無かった炎症性腸疾患に対する、積極的な治療 法の開発に繋がることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2013 年度

環境メタゲノミクスで富栄養淡水湖沼での新しい窒素循環像を探る

基盤研究（A）

諏訪 裕一・中央大学理工学部

＜背景・目的＞

富栄養湖（北浦）で anammox 活性が高い地点と，実験室的に anammox の活性が維持されているバイオリアクターの微生物群から得たメタゲノム DNA の配列決定を行い，それぞれの微生物群集構造と窒素循環を担う主な機能に関与する遺伝子群の存在量と由来生物種情報をもとに，比較解析する。

メタゲノム配列中の遺伝機能予測には、リファレンスとなる微生物ゲノムデータが必要となるが，本研究の主要な対象である，anammox 微生物のゲノムデータはきわめて少数で，尚且つ完成ゲノム情報は皆無である。この状況を打開するため，北浦での優占 anammox 微生物である，*Candidatus* Brocadia 属を実験室にて集積し, このメタゲノム情報から Brocadia ゲノムを再構築する。

＜支援の内容＞

1) Anammox 集積培養および北浦底泥の total community DNA のメタゲノム解析： 集積培養メタゲノム用 total community DNA，1 試料，および北浦底泥メタゲノム解析用 DNA サンプル 4 試料（3 地点より採取）について， MiSep で 1,300 万~ 3,500 万 paired end（インサートサイズ 300~400 bp）で塩基配列を決定した。メタゲノムデータについて，リードの R1, R2 アセンブルを行って得られた 400bp 以上の配列を、分担研究者の髙見が行う遺伝子領域推定，MAPLE (Metabolic And Physiological potentiaL Evaluator)システムによる生理・代謝機能解析に供試した。これとは別に、メタゲノム中の 16S rDNA データに基づく門および科レベルでの生物種分類を行った。

2) 集積培養系における優占種のゲノム構築：Anammox 微生物の集積培養を確立し，その total community DNA を抽出した。メタゲノム DNA から PacBio を用いて anammox 微生物をはじめとする優占種のゲノム再構築を実施。

＜支援によって得られた研究成果＞

1) Anammox 集積培養および北浦底泥の total community DNA のメタゲノム解析：

・16S rDNA をもとに，各試料における生物種分類を行った。その結果，anammox 集積培養，および北浦堆積物いずれにおいても共通して，*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Chloroflexi* の 3 門に属する生物種が頻度高く検出された。Anammox 集積培養では，anammox 菌が属する *Planctomycetes* 門の生物種が予想通り高い頻度で検出された。

・一方、16S rDNA は、生物種によりそのコピー数がまちまちなため、生物種組成の推測に用いることができない。そこで、MAPLE システムにより検出されたリボソームタンパク質遺伝子の由来生物種組成から、各メタゲノムサンプルの門レベルでの生物種組成を割り出した。リボソームタンパク質の由来生物種から anammox 微生物の全体に占める割合を調べたところ、最も anammox 活性の高い地点では、全体の 0.3%、最も低い地点では 0.08%と見積もられた。この結果から、anammox 活性の程度は、anammox 微生物の存在量に依存すると考えられた。

2) 集積培養された anammox 微生物のゲノム構築：PacBio を用いて，anammox 微生物である，*Candidatus* Brocadia 属のゲノム再構築を行った。現在最終確認を行っているが，これまでで最小の contig 数 2 までゲノムが再構築された。一方、これと同時に優占種の一つである *Armatimonadetes* 門のゲノムが再構築されたので、現在マニュアルアノテーションを実施している。

3) メタゲノムの機能ポテンシャル解析： Anammox 微生物と共存菌との関係を推測する手がかりを得るため，取得されたメタゲノム情報から MAPLE システムを用いて代謝機能ポテンシャルを可視化した。この解析によって，次の結果が得られた。

Anammox 活性が最も高い地点では，逆に硝化と脱窒の活性が低かった。同地点では，硝化と脱窒の代謝機能モジュールの abundance も低かった。一方，anammox 活性が最も低い地点では、硝化と脱窒の活性および代謝機能モジュール abundance のいずれもが高かった。anammox 活性が上記 2 地点の中間の地点では *Betaproteobacteria* および *Gammaproteobacteria* が脱窒反応を担い，興味深いことに，上記 2 地点ではこれまで脱窒菌の分離例のない *Deltaproteobacteria* が脱窒能を持つ可能性も示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

1) Anammox 集積培養および北浦底泥の total community DNA のメタゲノム解析：

・メタゲノム情報から anammox 微生物が環境中に占める割合を推測し，anammox 活性に差が見られる環境中における微生物群集構造の実像に迫ることができた。

・淡水湖沼と anammox 微生物の集積培養系とで，微生物群集構造に共通性見られ，anammox 微生物とその他の微生物との関係には，ある普遍性が存在する可能性が示唆された。

2) 集積培養された anammox 微生物のゲノム構築：本研究において、anammox 反応を担う Brocadia と共存菌として知られる *Armarimonadetes* 門の未培養菌のゲノム情報が得られたことで、集積培養系における生態系構築原理の解明や環境中における anammox 菌の役割の解明へ向け、大きな一歩を踏み出したと考えられる。今後これらのゲノム情報とメタゲノム情報を総合的に解析することで、窒素代謝における anammox の意義や anammox 微生物の実情にせまれるものと期待される。

＜支援成果公表リスト＞

なし（現在準備中）。

公募支援課題：2012～2013 年度

南極氷床底面から検出された 72 万年以上前の微生物探査

若手研究（B）

瀬川 高弘・情報・システム研究機構　新領域融合研究センター，国立極地研究所

＜背景・目的＞

南極氷床ドームふじ基地でのアイスコア掘削により，南極氷床下の氷試料と岩盤由来の粒状物試料が得られた．これらは少なくとも 72 万年以上前に封じ込められた可能性が強く，南極氷床下の環境を推定されうる試料の中で，最も優れた試料の一つであると言える．本研究の目的は，この特異な極限環境から得られた微生物を解析し，その機能の解明から，「人類に残された最後のフロンティアのひとつ」とされた南極氷床下の生態系や環境を解き明かすことである．これより微生物の生理・生態を解明することは，人類にとって未知である極限環境下における生態系の実体と成立過程の解明に，重要な役割を果たすと考えられる．しかし，現存していたとしても同細菌の分離培養は低温・高圧下の極限環境に生息していること，試料年代が古いことから困難が予想され，今のところ成功していない．

本研究では，培養不能細菌の少数細胞からのゲノム完全長取得法を応用して，培養を介さずにゲノム解析を行ない，その機能解明からこれまで未知であった南極氷床下の生態系の推定を試みた．

＜支援の内容＞

南極の氷床底面から採取された試料および，南極氷床底部の環境と比較するためにアイスコア試料からの，ゲノムライブラリーの作成およびゲノム配列解読の支援をおこなって頂いた．氷河試料中の細胞密度は低いため，DNA 抽出産物や微量細胞から，phi29 を用いた少数細胞からの全ゲノム増幅手法や，古代試料からの DNA ライブラリー構築に優れた Ancient Illumina sequencing library 法を用いてゲノム増幅をおこなった．増幅バイアスなどの影響を低減するため，同一 DNA サンプルを分けて，5 本独立に全ゲノム増幅をおこない解析用サンプルとした．これらのサンプルに関して，ゲノム支援活動により，ゲノムライブラリー作成やイルミナの Hiseq および Miseq シークエンサーを用いた遺伝子解読をおこなって頂いた．

＜支援によって得られた研究成果＞

南極氷床底部試料のメタゲノム解析により得られた配列に対して相同性検索をおこない，ターゲットの遺伝子配列由来と考えられるリード抽出や微生物群の系統推定，遺伝子群の機能の解析をおこなった．その結果，２００から４００種類の多様な微生物群を検出することができた．興味深いことに氷床下から得られたメタゲノム配列を解析した結果，シアノバクテリアを含む各種バクテリアおよびアーキアなどが検出され，ドームふじ基地から得られた南極氷床下試料には多様な微生物群が存在している事が明らかになった．これらの微生物は，これまでの分析結果とは高い相同性を示さず，現在調べられている南極の雪氷や土壌，湖沼等の環境には生息していないことが分かった．同細菌群は既知のものとは大きく異なる配列を持つことから，これは南極氷床下などの極限環境に適応している特異な系統であることが示唆された．南極氷床下の環境推定をおこなうためにゲノム情報は非常に有効であることが分かり，これまで推定困難であった氷床下環境の物理化学的な性質予測への貢献にも繋がると予想される．

しかしながら，分析を実地した国立極地研究所のクリーンルームが故障していることが判明し，氷床下の微生物という細胞数が希薄かつ試料年代が古い試料に対して，十分なクリーンな環境下で分析を遂行することができなかった．アイスコアは年代の古い試料であるため DNA の状態が非常に悪く，そのためゲノムライブラリー中にはバックグラウンドである実験室などからのコンタミネーション配列が多く混在している．現在，これらの微生物種のゲノムにコードされている遺伝子群の機能分布は，情報・システム研究機構　新領域融合研究センターの近藤伸二特任研究員が進めている段階である．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

南極氷床底部試料からのメタゲノム解析に加え，微量細胞からのゲノムシーケンシングをおこない，南極氷床下という極限環境における生態系の実体に迫ることができた．また，16S rRNA 遺伝子のみならず，複数の機能遺伝子群の検出に成功できたことは，氷に封じ込められた太古の微生物の解明を可能にすることが期待される．

本研究は，古代試料からの微量 DNA の増幅やゲノム解読をおこなうことで，試料年代の古い試料からのゲノム解析をおこなうことに成功した．今後，氷試料のみならず博物館などに貯蔵されている様々な古代試料からの「古代 DNA 研究」に応用できることが期待される．

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2010 年度、2012 年度、2015 年度

ヒメミカヅキモの性フェロモン受容体同定と特性解析

基盤研究（C）

ヒメミカヅキモの性染色体領域解析による生殖様式進化の解明

基盤研究（B）

関本 弘之・日本女子大学理学部

＜背景・目的＞

本研究で注目した単細胞接合藻類であるヒメミカヅキモは、陸上植物ともっとも近縁な単細胞藻類であることが支持されており、また遺伝子導入系も確立し、植物の有性生殖の基本部分解明のためのモデル生物と位置づけられる。これまで、遺伝的に異なる＋、－型細胞の間で有性生殖して、接合子を形成するヘテロタリック株（他殖系統）を用いた研究を進めており、有性生殖または性発現に関連する 88 種の遺伝子群が明らかにされている。しかしながら、これらはいずれも両接合型ゲノムに存在している遺伝子であり、これらを統御している接合型特異的なゲノム領域、性決定遺伝子の実体については不明であった。

そこで本研究では、ヒメミカヅキモ＋型, −型それぞれの系統保存株について、新型シークエンサーを用いて、概要ゲノム配列を決定することとした。ゲノムアセンブルの後、これまでに得ている片方の接合型特異的に存在する遺伝子のマッピングを足がかりとして、両ゲノムの比較を行い、性染色体領域の特定、性決定遺伝子の同定を目指すこととした。

＜支援の内容＞

１．ヒメミカヅキモの＋型細胞（NIES-67 株）、−型細胞（NIES-68 株）それぞれの系統保存株について、HiSEQ2000 を用いて、0.18, 0.25, 0.3, 0.5 kb の paired-end library、3 kb, 5 kb, 10 kb の mate-pair library を決定した。

２．ヒメミカヅキモの＋型細胞（NIES-67 株）、−型細胞（NIES-68 株）それぞれの系統保存株について、BAC ライブラリーを作製した。

３．ヒメミカヅキモの栄養増殖期、有性生殖期の計 8 種のステージから調製した RNA について、HiSEQ2000 を用いた transcriptome 解析を行った。

４．NIES-67 株、NIES-68 株それぞれについて、P6-C4 ケミストリーを用いた PacBio による全ゲノムシークエンスを行った。

５．PacBio 及び Illumina データのハイブリッドアセンブリを行うための、ヒメミカヅキモ用解析アルゴリズム設計を進めた。

６．ヒメミカヅキモの交配子孫株（17 株）のイルミナ index シーケンスを行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

A. HISEQ2000 によるゲノム解析

ヒメミカヅキモの概要ゲノム解析については、国立遺伝学研究所・豊田先生のもと、HiSEQ2000 を用いて、＋型および−型それぞれの配列が決定された。k-mer 頻度解析によるゲノムサイズ推定では 370-380 Mb となった。一方、ALLPATHS-LG による解析で、＋型および−型ゲノムの Contig N50 が 5.5 kb 及び 8.5 kb に、scaffold N50 が 70 kb 及び 64 kb になり、scaffold 長の合計は約 250 Mb になった。scaffold は十分につながっていない理由として、ヒメミカヅキモのゲノムにおいて大規模な 2〜3 コピー領域が存在して異なる多型があるという複雑な現象が関連していると考えられた。k-mer グラフで２倍から３倍に相当するピークが認識でき、さらに、scaffold に+型、−型それぞれのリードデータをマッピングしたときの厚みの比が、1:2, 2:3 になる領域が多数見られることから、系統によってそのコピー数も異なっていると考えられる。状況は、ヘテロ接合度の高い 2 倍体ゲノムと似ているので platanus を試みたが、アセンブリーが終了しなかった。

B. ＋型および−型細胞からの BAC ライブラリー作製

理化学研究所・黒木先生により、各系統株の BAC ライブラリーが作製された。−型細胞の BAC ライブラリーは平均約 106 kb インサート、384 well plate で 106 枚分、＋型細胞の BAC ライブラリーは平均約 86 kb インサート、384 well plate で 134 枚分となった。

C. Transcriptome 解析

生活環の様々なステージから 35 条件を選び RNA を調製し、東大新領域・鈴木穣先生の支援により transcriptome データを取得した。Trinity によるアセンブルの結果、142150 contig が得られ、現時点ではかなり多くの isoform を含むことが示唆された。またこの結果は、ゲノム解読の結果から推定されたゲノム内に大規模な 2〜3 コピー領域が存在して異なる多型がある状況を反映しているとも考えられた。

得られた contig 配列から、−型で特異的に発現する 90 配列を絞り込み、−型ゲノムのみに存在すると思われる 2 配列を絞り込んだ。＋型と−型を掛け合わせて子孫株を取得し、連鎖解析を行ったところ、１つの配列のみが－型の子孫株と完全に連鎖していた。この配列を持つ遺伝子は転写因子をコードしており、－型細胞特異的に存在していることから、*CpMinus1* と名付けられた。この遺伝子を持たない＋型細胞に対して、強制発現を行ったところ、得られた形質転換体全てではないが、−型細胞への性転換に成功した。この遺伝子を含む−型 scaffold は 124.8 kb であったが、該当する scaffold は＋型細胞から見いだされて

おらず、−型を決定づける性染色体様領域である可能性が高い。

D.　P6-C4 ケミストリーを用いた PacBioRS II による全ゲノムシークエンス

国立遺伝学研究所・豊田先生のもと、＋型および−型それぞれのゲノム配列を、P6-C4 ケミストリーを用いた PacBioRS II にて取得した。それぞれ 23 セルずつ取得しており、380 Mb として x30 の depth となる予定である。

E.　PacBio データ及び Illumina データのハイブリッドアセンブリを行うための、解析アルゴリズム設計

Illumina short read データと、PacBio データとを組み合わせて、極力エラーをキャンセルした精度の高い全ゲノム配列を取得することとした。そのため、東大新領域・笠原博士の支援を受け、ヒメミカヅキモのゲノム特性に合わせた専用の解析アルゴリズムの設計を進めた。

F.　交配子孫株（17 株）のイルミナ index シーケンス

交配子孫株＋型 7 系統、マイナス型 10 系統について Illumina Index シーケンシングを行い、領域を連鎖群に分離することによってアセンブリーを支援するデータとした。この結果をもとに、性表現と連鎖する可能性のある領域を絞り込み、同定した scaffold 特異的 PCR プライマーを設計し、対応する BAC クローンをスクリーニングする予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

概要ゲノム配列の中から、これまで陸上植物、もしくは多細胞のシャジクモまでで知られていたいくつかの転写因子群（クラス２ *KNOX* 遺伝子、*HD-ZIP* 遺伝子など）が発見された。また、クラミドモナスなどの緑藻には存在せず、陸上植物に存在する転写因子ファミリー（20 種類）のうち、15 種類がヒメミカヅキモのゲノム中に存在していることが判明した。一方、栄養生殖期、生殖生長期の切換に関わる転写因子である *Leafy* については、存在が見られなかった。陸上植物の多細胞化、多細胞生殖器官形成などにおいて、ゲノムレベルでどのような進化が起こってきたのかについて、実体解明が進むことが期待された。

両接合型細胞のゲノムを比較し、さらに、transcriptome データの結果を概要ゲノムデータと照らし合わせることで、−型細胞ゲノムのみに存在し、親株どうしの掛け合わせにより得られた子孫株の性表現（−型であること）と完全に連鎖する *CpMinus1* 遺伝子の発見に至った。*CpMinus1* 遺伝子は、bZIP 型の転写因子をコードしており、さらにこの遺伝子を＋型細胞で強制発現したところ、＋型から−型へと性転換し、＋型細胞との混合により接合することが明らかになった。しかしながら、交配相手と混ぜずに形質転換体を単独で接合誘導条件においた場合、少数ではあるが、予想に反して、クローン内でペアをつくり接合子を形成することが判明した。この事実は、①*CpMinus1* 遺伝子産物により−型細胞としての性質が発揮するようになったこと、②形質転換体は、依然として＋型細胞としての性質もわずかに保持していること、を示唆している。また、この結果は、＋型細胞としての振る舞いに関わる未知遺伝子 *CpPlus1*、またはその振る舞いを抑制する未知遺伝子 *CpMinus2* の、いずれか、または双方が存在し、*CpMinus1* とセットとなり、ヘテロ株の性表現を決定することも示唆しており、この関係が崩れることで、クローン内で接合子をつくるホモタリック株（ホモ株）化する可能性も想定された。

一方、ヒメミカヅキモのヘテロ株には、これまで用いてきた基準株（交配群 IE）に加えて、生殖隔離した少なくとも３つの交配群（IIA, IIB, IIC）が存在している。また、それぞれに近縁なホモ株が発見され、交配群 IIB に属するヘテロ株は、近縁なホモ株（kodama20 株）と部分的な他家接合反応を示す。ホモ株の RNAseq 解析の結果、*CpMinus1* オルソログ遺伝子の発見に至った。この遺伝子の発現を抑制した形質転換体では、自家接合能力が低下し、近縁なヘテロ株との混合により、他家接合する傾向が高まったことから、ヒメミカヅキモにおける他殖、自殖といった生殖様式が、性決定遺伝子群の働きにより、比較的容易に転換しうることが示唆された。

＜支援成果公表論文リスト＞

なし

公募支援課題：2013~15 年度

ゼブラフィッシュの骨格筋に対する微重力環境の影響　基盤研究（C）

Pathway 解析による微重力環境下筋萎縮メカニズムの解明と原因療法の開発　基盤研究（C）

瀬原 淳子・京都大学再生医科学研究所

＜背景・目的＞

人体は微重力環境におかれると、その反応として筋萎縮を起こす。つまり、地上においては重力負荷を受けることにより筋肉を維持する機構が働いているのである。ゼブラフィッシュの宇宙滞在実験により微重力環境を起因とする筋萎縮および運動抑制・加齢を起因とする筋萎縮の分子基盤をトランスクリプトーム解析/Pathway 解析を中心に比較し、その共通点および相違点を同定することにより筋萎縮/筋肉維持メカニズムを明らかにする。

さらには、各筋萎縮条件下で発現変動が認められる遺伝子群を指標に、強制運動等の対症療法ではなく原因療法の開発を試みる。

＜支援の内容＞

ゼブラフィッシュの運動抑制、加齢、宇宙滞在（軌道上２日後、軌道上約１カ月後、地上帰還後２日後、地上帰還後約１カ月後）条件下における骨格筋トランスクリプトーム解析。

また、原因療法の対象候補分子である myostatin 過剰発現および活性阻害条件下における骨格筋トランスクリプトーム解析。

＜支援によって得られた研究成果＞

運動抑制および加齢において多数の遺伝子に発現量の変化が確認された。運動抑制による筋萎縮は廃用性筋萎縮と考えられており、プロテアソーム系の活性化が既に知られている。今回のゼブラフィッシュ運動抑制においても多数のプロテアソーム関連遺伝子の発現増加が認められた。このことはゼブラフィッシュにおいても運動抑制によって廃用性筋萎縮が誘発されていることを示唆しており、ゼブラフィッシュが筋萎縮研究のモデル動物として有用であることを示す結果である。また、微重力環境滞在による筋萎縮が廃用性筋萎縮に非常に類似していると考えられていることからも、ゼブラフィッシュで廃用性筋萎縮の傾向が確認されたことは非常に興味深い結果である。

一方、加齢に関しては運動抑制と同様にいくつかのプロテアソーム関連遺伝子の発現増加が認められたが、運動抑制では変化が認められなかった遺伝子に関しても多数発現量が変化した遺伝子が確認された。これらの遺伝子の中には筋萎縮性疾患の原因遺伝子も含まれており、新規の加齢による筋萎縮メカニズムの解明に役立つ結果である。

宇宙滞在実験に関しては、軌道上２日後、軌道上約１カ月後、初めて成功した地上帰還後のゼブラフィッシュを試料として用いトランスクリプトーム解析を行った。軌道上約１カ月後の解析結果より、これまでの報告と同様の発現変動を示す遺伝子も確認されたが、逆の変動を示す遺伝子も多数確認され、非常に興味深い結果が得られた。また、経時的（地上→軌道上→地上）な遺伝子発現変動を解析することにより、宇宙滞在および地球帰還に対して早期に発現量が変化する遺伝子を同定することができた。これらの遺伝子の中には、既に筋萎縮との関連が報告されている遺伝子も含まれており、詳細な解析を進めるにあたり対象とする因子の選定に非常に有用なデータが得られた。

また、宇宙滞在による筋萎縮の原因療法の開発を目的として候補因子である myostatin の過剰発現および活性阻害条件下における骨格筋トランスクリプトーム解析を行った。その結果、宇宙滞在により発現変動が確認された遺伝子への影響が確認され、宇宙滞在による筋萎縮の原因療法として myostatin 活性抑制の可能性が示唆された。

これらの結果は宇宙空間滞在における筋萎縮メカニズムや原因療法の開発だけでなく、高齢者や長期入院患者における骨格筋維持・回復など、予防や治療法の開発にも貢献すると考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゼブラフィッシュの筋萎縮研究のモデル動物としての有用性および宇宙滞在条件下の筋萎縮研究におけるトランスクリプトーム解析の有効性を確認することができた。現在宇宙実験において安定的かつ長期的に用いられている脊椎動物は水棲生物（ゼブラフィッシュやメダカ等）に限られており、水棲実験装置を完備するのは世界でも日本だけである。このことからも世界的に広く実験動物として使用されているゼブラフィッシュを用いた筋萎縮研究の可能性を確認できたことにより、今後の宇宙実験のみならず筋萎縮性疾患等の研究においても新たな筋萎縮研究の分野を開拓することができた。また、新たに国際宇宙ステーション（ISS）の「きぼう」日本実験棟の船内環境を利用する実験テーマ（フィジビリティスタディテーマ）に選定され、より詳細な解析を目的とした宇宙滞在実験を行う機会を得ることができた。

＜支援成果公表リスト＞

発表準備中。

公募支援課題：2013 年度

マイマイカブリのゲノム塩基配列と適応形態遺伝子

新学術領域研究

曽田 貞滋・京都大学大学院理学研究科

＜背景・目的＞

特定の餌動物への専門化が，ひとつの系統群の形態的多様化と種の多様化，すなわち適応放散をもたらす場合がある．世界の温帯域とその周辺に分布する地表性捕食者オサムシ類 1000 種以上のうち，約半数はカタツムリ（陸貝）食に専門化している．これらの貝食性オサムシは，捕食行動の違いに関連して，巨頭型と狭頭型の分化を示す．巨頭型は，比較的小さい陸貝の殻を噛み破って軟体部を食べ，狭頭型は比較的大きな陸貝の殻の中に頭部を突っ込んで軟体部を食べる．本研究では，日本固有の貝食性オサムシ，マイマイカブリ *Damaster blaptoides* では亜種間でこの形態分化が起こっており，ゲノムサイズが比較的小さく，ゲノム解読を試みながら，適応的形態分化の遺伝子を解明する上で有用な研究対象である．本研究では，マイマイカブリのゲノムを解読すると同時に，亜種間の形態差に関する高精度の QTL マッピングを行う．また代表的な亜種について，トランスクリプトーム比較，ゲノム塩基配列のリシーケンシングを行い，適応形態進化の遺伝的基盤を解明する．

＜支援の内容＞

マイマイカブリ粟島亜種（アオマイマイカブリ *D. b. fortunei*）マイマイカブリの全ゲノム配列解読に利用する，Nextera Matepair Kit による 20kb インサートのメイトペアシーケンスデータの取得．（当初は fosmid によるインサート長 40kb のメイトペアシーケンスが行われる予定であったが，依頼したサンプルでは様々な条件で試みても fosmid ライブラリーのタイターが十分量に達せず，Nextera Matepair Kit による 20kb シーケンスに変更された．）

＜支援によって得られた研究成果＞

インサート長 180 bp，500 bp のペアエンドシーケンス，本支援で得られたインサート長 20 kb のメイトペアシーケンスとこの支援とは別に得たインサート長 2.5 kb, 3.5 kb, 4.5 kb, 7 kb, 11 kb のメイトペアシーケンスのデータを使い，Platanus 1.2.1 によるアセンブルとスキャフォルディングを行った．その結果，全長約 180 Mb，scaffold N50 が約 3.5 Mb のゲノム配列がアセンブルされた．また，PacBioRS によって平均最大サブリード長 1,654bp，ゲノムサイズ 40 倍のシーケンスを取得しており，得られたスキャッフォルドに対し PBjelly 13.10.22 によるギャップクロージングを行った結果、contig N50 を改善させることができた．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究では，ゲノム解読に加えて，マイマイカブリの狭頭型・巨頭型亜種間の形態差に関与する遺伝子の探索のために，RAD シーケンスを用いた連鎖地図作成と形態形質の QTL 解析，各発育ステージにおける亜種間のトランスクリプトーム比較解析を行った．RAD-seq 法によって獲得した分子マーカーを使い連鎖解析を行った結果，染色体と同数の連鎖群から構成される高密度連鎖地図を作製することができた．この連鎖地図を用いて QTL マッピングを行った結果，マイマイカブリ外部形態に関わる QTL 領域を特定することができた．今後はアセンブル結果に基づいたアノテーション情報と遺伝子発現解析結果をもとに，この QTL 領域の遺伝子特定を進める．以上の結果は，オサムシ類の適応進化をゲノムレベルで議論する上で非常に意義深い結果であるとともに，今後，昆虫形態の多様化を比較ゲノム的なアプローチで解明する上で重要な研究結果となることが期待できる．

＜支援成果公表リスト＞

曽田貞滋・小沼順二・藤澤知親（2014）陸貝食オサムシの巨頭型と狭頭型：適応的形態分化はどのように起こるのか？　ゲノムで進化の謎を解く！第 10 回．細胞工学 33(10)：1080−1084.（査読無）

公募支援課題：2010～2012 年度

転写制御ネットワークから見る原口形成と原腸胚オーガナイザーの進化のメカニズム

基盤研究（B）

平良 眞規・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

脊椎動物初期発生の原口形成と原腸胚オーガナイザーは基本的ボディプラン形成において重要な役割を担う。この発生様式が真正後生動物の進化の過程でどのように獲得されたかを遺伝子レベルで解析し、その進化シナリオを作成することは重要な研究課題である。これまでこのような課題を実証的に解析する有効な手段がなかったが、近年、種々の生物のゲノムの解読と免疫沈降・シーケンス（ChIP-seq）法が開発されたことで、現存の真正後生動物の転写制御ネットワークを網羅的に解析することが可能となり、それに基づいて進化シナリオを作成することが原理的に可能となった。そこで本研究は、まず両生類の原腸胚を用いて ChIP-seq 法の有効性を検証しつつ、オーガナイザーにおける転写制御ネットワークを解析することで、その基礎を確立することを目指した。

＜支援の内容＞

菅野研究室から支援を受け、ネッタイツメガエル（*Xenopus*/*Silurana tropicalis*）の原腸胚を用いた ChIP-seq 解析と原腸胚の RNA-seq 解析における、massive parallel sequencing を行っていただいた。ChIP-seq 解析で用いた抗体は、6 種類の転写因子 Otx2、Lim1 (Lhx1)、Gsc (Goosecoid)、Mix1、VegT、Sia (Siamois)と、転写活性化共役因子の p300、転写抑制共役因子の TLE/Groucho、ヒストン修飾の H3K4me1、H3K27ac である。RNA-seq 解析では、原腸胚の全胚ならびに、原腸胚から切り出した頭部オーガナイザー領域、背側領域、腹側領域、帯域などから抽出した全 RNA を用いた。ChIP-seq 解析におけるピーク検出は、X. tropicalis ゲノム配列データベース ver. 4（2012 年まで使用）および ver. 7 に切り替えた当初は、菅野研究室で使われていた自作のピーク検出ツールを用いた解析で支援を受けた。その後、ピーク検出の標準ツールとされる MACS を用いて当研究室で行うこととし、そのためのトレーニングで支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

1）Otx2、Lim1、Gsc の ChIP-seq 解析ならびに RNA-seq 解析

Otx2、Lim1、Gsc は脊椎動物の頭部オーガナイザーに発現するホメオドメイン転写因子である。これらは頭部オーガナイザーの形成と機能に重要であることが 1990 年代前半より調べられてきていたが、どのような遺伝子群を制御しているか、またこれら 3 者は機能的にどのように関連しているかについては、不明な点が数多く残されていた。そこで Otx2、Lim1、Gsc の ChIP-seq 解析を行うことで、それらの標的遺伝子を網羅的に解析し、さらにそれらに加えて、転写活性化と抑制を示す指標として、転写活性化共役因子 p300、転写抑制共役因子 TLE/、ならびに活性化型ヒストン修飾の H3K4me1、H3K27ac の ChIP-seq 解析を行った。抑制型ヒストン修飾の H3K27me3 は報告されているデータを用いた。

これらのデータを基に、まず遺伝子のシス制御モジュール（cis-regulatory module: CRM）の同定を行った。ChIP-seq ピークには偽ピークが含まれることは確率論的に予想され、また転写因子の結合部位が必ずしも CRM とは限らないため、転写因子と転写共役因子のうち少なくとも 2 つのピークが重なった領域を CRM と仮定して解析することとした。一方、制御される遺伝子は、CRM に最も近傍の遺伝子とした。

発現パターンによる遺伝子の分類は、RNA-seq データを基に行い、頭部オーガナイザー特異的遺伝子などが含まれる領域特異的遺伝子と、領域特異性のないユビキタス遺伝子に分類した。これらを用いて、遺伝子の領域特異性と p300 と TLE の関係性を調べた結果、領域特異性と関連があると従来報告されていた p300 よりも、TLE の方がより強い関連性をもつこと、および遺伝子あたりの TLE 結合 CRM の数が多いほど領域特異性が強まることを見出した。つまり領域特異的遺伝子は、発現していない領域で TLE を介して発現が抑制されていることに他ならない。今回の解析のように、全胚を用いた ChIP-seq データは、発現をしている細胞としていない細胞が混在するため、同一の CRM に p300 と TLE のピークが重なることになる。Otx2 は領域特異的な遺伝子を制御すると考えられることから、Otx2 が結合する CRM の中から、TLE も結合している Otx2/TLE 結合 CRM に注目した。

Otx2/TLE 結合 CRM は全部で 13,443 個が同定された。それらに近傍の遺伝子を調べた結果、予想外にも頭部オーガナイザー遺伝子ばかりでなく、胴部オーガナイザーや腹側に発現する遺伝子も含まれていた。この事実から我々は、Otx2 は頭部オーガナイザー遺伝子を活性化する一方で、頭部オーガナイザーに発現していない遺伝子を抑制するのではないかと予想した。さらに、この活性の違いをもたらすのが、転写活性化因子として機能する Lim1 と、転写抑制因子として機能する Gsc ではないかと考えた。つまり Otx2 は Lim1 と共に遺伝子を活性化し、一方 Otx2 は Gsc と共に遺伝子を抑制する、という作業仮説を立てた。それを検証するため、まず Otx2/TLE/Lim1 結合 CRM と Otx2/TLE/Gsc 結合 CRM の 2 群に分け、それらに特徴的な転写因子結合配列を MIME プログラムにより解析したところ、前者は Lim1 結合配列が、後者には Otx2/Gsc 結合配列が濃縮されていた。そこで Otx2/TLE/Lim1 結合 CRM の中で Lim1 結合配列をもつものを type I（1250 個）、Otx2/TLE/Gsc 結合 CRM のうち Otx2/Gsc 結合配列をもつものを type II（1039 個）として、さらに検討

した。その結果、type I CRM は頭部オーガナイザー遺伝子の近傍に、type II CRM が非頭部遺伝子の近傍に主として存在した。さらにアフリカツメガエル胚の予定外胚葉領域を用いたレポーター解析により、type I CRM は、Otx2、Lim1、Gsc の 3 者を共発現させた状況（頭部オーガナイザーカクテル）で活性化された一方、type II CRM は同じ頭部オーガナイザーカクテルで抑制された。これらの結果を基に、我々は Otx2 の役割として以下のモデルを提唱した。すなわち、数千の遺伝子は、近傍の CRM に Otx2 が結合することで、自身が頭部領域いると認識でき、それに基づき頭部領域での発現の有無を決めるというものである。Otx は、左右相称動物の頭部に共通して発現しているので、これらの動物では Otx を頭部領域の指標として用い、それを基に個々の遺伝子は CRM の多様化（type I、type II など）を通じて頭部における発現の有無および発現量を選択し、その結果様々な頭部を進化させてきたと推定される。これは、共通の制御因子を使いながら、進化の過程で形態を大きく変えることが可能であることをうまく説明できるものである。

２）Mix1、VegT、Sia の ChIP-seq 解析

胚葉特異的に組織や器官は分化していくが、そのとき使われる enhancer は内胚葉形成のときに予め developmentally poised enhancer としてエピジェネティックにマークされている、というモデルが提唱されている。しかしそれを実証した例は非常に少なく、したがってその一般性は不明である。転写因子の Mix1 と VegT は初期の内胚葉形成に関わることが示唆されているが、我々は、内胚葉系列の developmentally poised enhancer の形成にも関わるのではないかとの作業仮説をたて、その検証を行った。その結果、原腸胚期には発現していないが、神経胚期から尾芽胚期以降の内胚葉系列の器官で発現する遺伝子近傍の CRM に Mix1 と VegT が結合している例を多数見出した。現在これらの CRM が developmentally poised enhancer かどうかをレポーター解析により検討している。

Sia はアフリカツメガエル胚の背側化因子の Wnt シグナルで発現誘導され、背側化および頭部決定を行う転写因子である。そこで Sia の標的遺伝子を網羅的に解析することで、頭部形成に直接関わる遺伝子群を同定し、かつ Sia と協調的に機能する転写因子の同定を行った。その結果、Sia は Otx2、Mix1、TLE、p300 のピークと重なる CRM が最も多くあり（type A と命名）、かつこの CRM は頭部オーガナイザー遺伝子の近傍に有意に濃縮していることがわかった。さらねレポーター解析で、type A CRM は頭部オーガナイザーでの発現をもたらすことが示された。以上より、Sia は type A CRM を介して Otx2、Mix1 と協調的に頭部形成に関わることが示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ChIP-seq や RNA-seq を自ら行うことは不可能だったが、「ゲノム支援」により、*X. tropicalis* 胚にそれが適用できるかを検討し、実際これらの方法が非常に有効であることが判明し、大きく展望を拓くことができた。

＜支援成果公表リスト＞

論文発表

Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano, Masanori Taira (2014). Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification. Nat. Commun. 5, 4322 (article number).

学会発表

Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Haruka Someya, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Ken Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano, Masanori Taira "Genomics Study of the Spemann-Mangold Organizer: Occupancy of Tissue-Specific cis-Regulatory Modules by Otx2 and TLE/Groucho for Embryonic Head Specification." （安岡、口頭発表 ; PD 口頭発表賞を受賞） 15th International Xenopus Conference、Asilomar (California, USA) (2014 年 8 月 24 日～30 日）

Yuki Honda, Yoshiaki Kirigaya, Yuuri Yasuoka, Saya Imai, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Makoto Asashima, Sumio Sugano, Masanori Taira “ ChIP-Seq analysis of Transcription factor Siamois for mechanisms of head organizer formation” 第 36 回分子生物学会年会、神戸（2013 年 12 月 3 日～6 日）

Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Yukiko Tando, Kaoru Kubokawa, Ken W. Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano and Masanori Taira "Otx2 and TLE/Groucho occupancy marks tissue-specific cis-regulatory modules for head specification" 第 35 回分子生物学会年会、福岡（2012 年 12 月 11 日～14 日）

Yuuri Yasuoka, Yutaka Suzuki, Shuji Takahashi, Norihiro Sudou, Yoshikazu Haramoto, Yukiko Tando, Kaoru Kubokawa, Ken W. Cho, Makoto Asashima, Sumio Sugano and Masanori Taira "Massively parallel regulation of head and non-head genes by Otx2, Lim1 and Gsc is based on evolution of the head organizer in the chordate" 日本発生生物学会第 45 回大会、神戸（2012 年 5 月 28 日～31 日）

公募支援課題：2013 年度

RNA 編集様式の亜種間差を利用したエネルギー代謝関連・量的形質遺伝子の探索

基盤研究（C）

高田 豊行・情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 系統生物研究センター

＜背景・目的＞

NGS 解析は塩基配列の計測を通して、これまで不可能であった包括的な疾患関連遺伝子の探索を可能にしつつある。例として、本研究が目的とする RNA 編集に関する研究では、ヒトの B 細胞の解析により、転写後の RNA 編集によるアミノ酸置換が複数検出された（Li et al. Science 2011）。また、中枢神経系で最も活発に RNA 編集に機能する酵素 Ader（アデノシンをイノシンに変換する）を対象にして、マウスの 15 系統の RNA 編集を受ける塩基の同定と変化率の比較を行い、この酵素が関与する RNA 編集の系統間多様性について報告した例（Danecek et al. Genome Biology, 2012）などもある。本研究が対象とするエネルギー代謝関連表現型と RNA 編集酵素の関わりについては、血中の脂質運搬に重要なアポリポ蛋白質の 1 つである ApoB の mRNA が Apobec1 により編集を受ける事が哺乳類で初めて発見されている（Chen et al. Science, 1987; Powell et al. Cell, 1987）。また、Apobec1 の遺伝子破壊個体は、血中の低比重リポ蛋白コレステロールの値が顕著に上昇するが（Hirano et al. JBC, 1996; Morrison et al. PNAS, 1996）、これは Apobec1 の ApoB を適正なサイズのリポ蛋白に翻訳するために必要な RNA 編集機能が喪失するためである。

申請者らは、実験用近交系マウスである C57BL/6J (B6; *Mus musculus domesticus*)系統と日本産野生由来の MSM/Ms (MSM; *Mus musculus molossinus*)系統をツールにして、ヒトの「量的形質」に関わる遺伝因子やそれらが関わるネットワークを単離・同定するための研究を行っている。特に、B6 の遺伝的背景に MSM の染色体を丸ごと一本ずつ置換して樹立したマウス亜種間コンソミック（染色体置換）系統の大規模表現型解析と、結果のデータベース化を行い、一部を公開している（Takada et al. Genome Res. 2008; Takada & Shiroishi, Exp. Anim. 2012）。本申請課題が対象とするエネルギー代謝関連表現型については、各種のコンソミック系統を B6 と比較して、体重、脂肪率（体重に対する体脂肪割合）、および血中の各種コレステロール値を変動させる遺伝因子が存在する染色体を複数検出している(Takada et al. Genome Res. 2008)。さらに、申請者らは MSM 系統のゲノムをリシークエンスして、ゲノム多型情報を公開しているが（Takada et al. Genome Res. 2013; Takada et al. Mammal. Genome 2015）、B6-MSM 間には、本申請課題が対象としている RNA 編集に関与する複数の酵素にアミノ酸置換が存在することが観察されている。本申請ではこのような状況をふまえ、マウスのエネルギー代謝に関係した量的形質の分子基盤に RNA 編集が関わっているのではないかという仮説を得、これを検証する事で、エネルギー代謝表現型に関わる RNA 編集酵素の多様性の単離・同定へ繋げる。

＜支援の内容＞

本支援課題では、マウスのコンソミック系統群から、体重や血中の各種コレステロール値など、エネルギー代謝関連表現型に特徴のある系統、およびコントロールとして B6 および MSM 系統の肝臓サンプルを対象に、NGS による遺伝子発現解析の支援を受けた。具体的な支援内容は、マウス実験系統 B6、MSM およびコンソミック系統 2 種（4 系統）の雌雄各 3 頭、計 24 種の肝臓より精製した RNA 試料をイルミナ社 HiSeq にり解析したデータである（ペアエンド 100bp、30-70M リード、QV30: >93.26%)。また、これらのデータの DDBJ（DRA）への登録についてもご支援いただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援により受けた結果の 2 次解析から、遺伝子発現の系統間差および RNA 編集受容候補 SNP に関する情報を得た。この結果には、既知の RNA 編集受容塩基を検出することができている。B6 および MSM とも、発現遺伝子の RNA 編集受容候補遺伝子数は，発現変動遺伝子（DEG）が発現変動の無い遺伝子（non-DEG）よりも 2 倍以上多かった。さらに、遺伝子機能（GO Term）に関する情報解析を行った結果、転写や代謝、さらには器官発生の調節に関する遺伝子群が観察された。現在これらが B6 および MSM のエネルギー代謝表現型の系統間差に関わるかを各種実験により検討している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

マウス個体ベースの遺伝子発現解析については、これまで「遺伝子発現量の違い」と「ゲノム配列上の発現部位」の探索研究が主であったが、「ゲノム支援」を活用した高精細な解析により、「翻訳されるタンパク質に変化をもたらす RNA 編集の亜種間差」についても網羅的に探索研究を行うことが可能になった。また、本研究で行った遺伝子発現解析から、マウスのエネルギー代謝表現型の差異に、ゲノム編集の亜種間差が関わる可能性が示唆された。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

モデルマウスを用いた新規摂食・脂肪蓄積調節遺伝子の機能解明

新学術領域研究

高田 豊行・情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 系統生物研究センター

＜背景・目的＞

マウス（*Mus musculus*）には、ヒトのさまざまな体質や疾患に類似した表現型を示す多数の実験用系統が存在し、疾患関連因子の探索に威力を発揮している。申請者らは、この実験動物「マウス」をツールにして、体重やある種の疾患に対する感受性など「量的形質」の原因遺伝子や、それらが機能するネットワークを単離・同定するための研究を行っている。これまでに、実験用近交系マウスである西ヨーロッパ産亜種の C57BL/6J（B6; *Mus musculus domesticus*)系統と日本産亜種の MSM/Ms(MSM; *Mus musculus* molossinus)系統を利用して樹立されたマウス亜種間コンソミック（染色体置換）系統群を利用して、エネルギー代謝関連形質のスクリーニングによる包括的な表現型解析を行った結果、過食・肥満を起こすコンソミック系統を発見した（Takada et al. Genome Res. 2008）。最近、この過食・肥満を起こす原因が、1 種類の遺伝子に起きた塩基置換に起因する可能性が高いことを突き止めた（投稿準備中）。この遺伝子はマウスのみならず、ヒトをはじめとした哺乳動物に広く保存されているが、データベース上の名称が与えられているものの、機能に関する報告は無い。そこで、当該遺伝子の機能を明らかにするとともに、塩基置換による機能変化が、過食・肥満を引き起こす原因を解明することにより、ヒトの摂食異常やこれが原因で起こる肥満、さらには関連する疾患研究に役立つ情報を得ることができると考えた。申請者のこれまでの研究から、当該遺伝子を対象としたレポーター遺伝子の発現を観察したところ、脳の間脳から延髄にかけての広い範囲で遺伝子の発現が予測された。次に、公共のデータベースを利用して、当該遺伝子の発現動態を確認したところ、数種類（数百～2 千 bp）の転写産物が報告されていた。申請者のこれまでの解析から、脳における標記遺伝子の発現は、B6 と比較して、コンソミック系統および遺伝子破壊マウスともに低いことが確認できているが、MSM 系統由来アレルを持つ標記コンソミック系統におけるそのバリエーションは不明である。本支援では、当該遺伝子の機能や、その発現に関する解析を行うため、PacBioRS ll に代表される、一分子リアルタイム DNA シーケンサによる完全長 cDNA の解読を希望した。これにより、摂食･肥満に関わる当該遺伝子のスプライシングバリエーションの検出、正常と変異保持マウスで脳において発現が変動している遺伝子、さらにはそれらが属するパスウェイなど、過食･肥満に関わる脳内での関連遺伝子発現ネットワークの同定が期待でき、当該遺伝子の機能とその破綻による肥満発症の原因を明らかにできると考えた。

＜支援の内容＞

本申請では、PacBio シーケンサによる完全長 cDNA 解読を MSM、B6、コンソミック系統、遺伝子破壊系統の雌雄、計 8 種について行っていただいた。サンプルは 10 週令の動物を対象とし、脳より精製した RNA から完全長 cDNA を作製し解析に供した。本支援で対象とする遺伝子の転写産物は、おおむね 2-3kb と予測されたので、各サンプルに対して、1-3kb および 3-6kb の完全長 cDNA を対象にした 2 種類のライブラリーを作製いただき、それぞれを解析していただいた。得られた解析結果は、フィルタリング前の状態で、サンプル 1 種につき、両方のライブラリーを合わせて平均 60 万リードについての解析情報をいただいた。また、これらのデータから当該遺伝子を含む発現遺伝子検出のためのマッピングや、全長 cDNA の配列数を含む情報解析についても行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援により解析いただいた結果から、当該遺伝子に関して、これまで検証が非常に困難だった MSM 系統のスプライシングフォームのバリエーション、各種動物における複数遺伝子の遺伝子発現動態の概要、正常と変異保持、さらには遺伝子破壊動物間の脳で発現が変動する遺伝子群の一部が明らかになった。現在、各系統のスプライシングフォームの検証、発現が変動している遺伝子が関わるパスウェイの探索など、過食･肥満に関わる脳内での関連遺伝子発現ネットワークの同定を進めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、肥満の原因遺伝子と考えられる当該遺伝子について、これまでは非常に困難であった複数のスプライシングフォームの同定を一分子シーケンシングにより行うことができた。しかも、関連する解析ノウハウを構築できたことも大きな成果である。しかしながら、対象遺伝子の転写産物が少ないこともあり、論文化の際にはさらに多くの転写産物を解析する必要があると考えられることから、標的遺伝子の cDNA ライブラリーからの濃縮などによる解析の必要があると思われる。MSM 系統の当該遺伝子についても複数の選択的スプライシングフォームが存在していたため、タンパク質は合成されないものの、RNA は転写されていることが確認できた。さらに、遺伝子破壊動物は、当該遺伝子に関する転写を確認できなかったが、これは解析リード数が他と比較して半分程度なのが影響している可能性も考えられる。今後は、本支援による結果に加えて、マイクロアレイや短鎖並列型シーケンサなどによる遺伝子発現解析を行い、補完的な解析を進める必要があることも確認できた。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2013 年度

新規転写伸長制御因子ＭＥＤ２６の標的遺伝子解明と急性白血病への関与についての解析

若手研究（A）

高橋 秀尚・北海道大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

多くのヒト遺伝子で RNA ポリメラーゼ II（Pol II）が転写開始直後に一時停止していることがわかり、遺伝子発現において転写伸長の過程が重要な役割を果たしていることがわかってきた。Pol II の一時停止が解除され、Pol II が RNA 合成を再開するためには、転写伸長因子が遺伝子領域へとリクルートされ、Pol II の一時停止を解除する必要がある。申請者はメディエーター複合体のサブユニット Med26 が転写伸長因子複合体“Super elongation complex”（SEC）を *c-Myc* や *Hsp70* などの遺伝子領域にリクルートし、それらの転写伸長を促進することを明らかにした【Takahashi H, et al. ***Cell*** 2011】。さらに、申請者は Med26 と結合するもう一つの転写伸長因子複合体“Little elongation complex”（LEC）を同定した。本研究では Med26 が SEC と LEC をそれぞれどのような遺伝子領域にリクルートするのかについて明らかにする。

また、興味深いことに、SEC のサブユニットの ELL、AF4、AFF4、AF9 や ENL の遺伝子は MLL（Mixed Lineage Leukemia）遺伝子と混合型急性白血病で高頻度に染色体転座がみられる。最近の研究で、転座の結果生じた MLL 融合タンパク質によって SEC が *Hox* などの白血病関連遺伝子領域にリクルートされ、その遺伝子の発現を異常に亢進させることが混合型急性白血病の発症メカニズムの 1 つであることがわかった。このことから、混合型急性白血病において、メディエーター複合体が Pol II と共に（Med26 と SEC との結合を介して）白血病関連遺伝子領域にリクルートされ、それらの発現を亢進させている可能性が考えられる。本研究では混合型急性白血病において Med26 が Pol II と共に白血病関連遺伝子領域にリクルートされるのかについても明らかにする。

＜支援の内容＞

●HEK293T 細胞を用いた Med26、AFF4（SEC のサブユニット）、KIAA0947（LEC のサブユニット）の ChIP（クロマチン免疫沈降）シークエンス解析。

●野生型の MLL を発現する細胞（REH 細胞）と MLL-SEC サブユニットの融合タンパク質を発現する混合型急性白血病細胞（RS4-11 細胞：MLL-AF4 を発現）を用いた Med26 の ChIP シークエンス解析。

●HEK293T 細胞を用いた Med26、AFF4（SEC のサブユニット）、KIAA0947（LEC のサブユニット）、TAF7 の ChIP（クロマチン免疫沈降）シークエンス解析。

＜支援によって得られた研究成果＞

（1）Med26 の ChIP-seq 解析によって、Med26 が存在する遺伝子領域が網羅的に明らかとなった。それらの遺伝子の中で、タンパク質をコードする遺伝子は SEC によって制御され、*small nuclear RNA*（*snRNA*）などの *non-coding RNA* 遺伝子は LEC によって制御されることが示唆された。

（2）LEC のサブユニットの KIAA0947 の ChIP-seq 解析によって、KIAA0947 が存在する遺伝子領域が網羅的に明らかとなった。本解析によって、LEC が *snRNA* 遺伝子や他の *non-coding RNA* 遺伝子領域に存在することが明らかとなった。

（3）TFIID のサブユニットの TAF7 の ChIP-seq 解析によって、TAF7 が存在する遺伝子領域が明らかとなった。本解析によって、TAF7 は Med26 や KIAA0947（LEC のサブユニット）と共に *snRNA* 遺伝子領域に存在することが明らかとなった。HEK293T 細胞を用いて TAF7 をノックダウンすると、*snRNA* 遺伝子領域における LEC のリクルートの増加がみられたことから、TAF7 は Med26 による LEC のリクルートを阻害することが示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本解析によって、Med26 と TAF7 の標的遺伝子が明らかとなった。Med26 と TAF7 に共通する標的遺伝子は、SEC と LEC の標的遺伝子を共に含んでいることが予測された。本ゲノム支援によって得た結果を基に、Med26 がどのようにして、SEC と LEC を異なる遺伝子領域にリクルートするのかに関するメカニズムの解析を行う。さらに、TAF7 が、Med26 による SEC や LEC のリクルートを阻害するのかに関して、さらに解析を行いたい。

＜支援成果公表リスト＞

Takahashi H., Takigawa I., Watanabe M., Anwar D., Shibata M., Tomomori-Sato C., Sato S., Ranjan A., Seidel CW., Tsukiyama T., Mizushima W., Hayashi M., Ohkawa Y., Conaway JW., Conaway RC., Hatakeyama S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. ***Nature Commun.***, 6, 5941, 2015.

公募支援課題：2014 年度

Med26 によってリクルートされる新規転写伸長複合体 LEC の機能解明

新学術領域研究

高橋 秀尚・北海道大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

非常に多くのヒト遺伝子で RNA ポリメラーゼ II（Pol II）が転写開始直後に一時停止していることがわかり、遺伝子発現において転写伸長の過程が重要な役割を果たしていることがわかった。Pol II が一時停止を解除され、RNA 合成を再開するためには、転写伸長因子が遺伝子領域へとリクルートされる必要がある。申請者はメディエーター複合体のサブユニット Med26 が、その N 末端ドメイン（NTD）によって、2 つの異なる転写伸長因子複合体 Super elongation complex（SEC）と Little elongation complex（LEC）を、それぞれ異なる遺伝子領域にリクルートすることを明らかにした。本研究では、Med26 がどのようなメカニズムで、SEC と LEC をそれぞれ異なる遺伝子領域へとリクルートするのかについて明らかにする。

＜支援の内容＞

●Med26 がどのような遺伝子の制御に関わっているのかを明らかにするために、Control の siRNA、Med26 の siRNA をそれぞれトランスフェクションした HEK293 細胞を用いて、RNA-seq 解析を行った。

●Med26 のノックアウトマウスより線維芽細胞（Med26-/-）を樹立し、野生型のマウス線維芽細胞と Med26-/-マウス線維芽細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。

●Med26 の NTD（1-113）の 61 番目の R（Arg）と 62 番目の K（Lys）を A（Ala）に置換した変異型（Med26-mut）は、SEC や LEC との結合能を失う。そこで、Med26-/-マウス線維芽細胞を用いて、野生型 Med26 と変異型 Med26 をそれぞれ安定に発現する細胞株を樹立した（Med26-/- + Med26-wt、Med26-/- + Med26-mut）。これらの細胞を用いて、RNA-seq 解析を行い、Med26-/- + Med26-mut 細胞において転写が抑制される遺伝子の網羅的な解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

Med26 を HEK293 細胞でノックダウンすることによって、*c-Myc* や *Hsp70* のみならず、*c-Jun* などを含むさまざまな腫瘍関連遺伝子の発現が低下することがわかった。このことから、Med26 は腫瘍に関連する遺伝子の発現を制御することがわかった。また、興味深いことに、*Histone* 遺伝子などの一部の遺伝子群において、Med26 のノックダウンによって、その発現が増加することも判明した。

また、マウス線維芽細胞株（Med26-/- + Med26-wt、Med26-/- + Med26-mut）を用いた解析によって、*RASGRP2*（*RAS guanyl-releasing protein 2*）や *Wnt6*（*Wingless-type MMTV integration site family, member 6*）などの遺伝子の発現が、変異型 Med26 を発現する細胞に比べ、野生型の Med26 を発現する細胞において、特異的に上昇することが判明した。これらの遺伝子は腫瘍の増殖にも関連していることから、Med26 は腫瘍関連遺伝子領域に SEC や LEC をリクルートすることによって、それらの遺伝子領域で Pol II の一時停止を解除し、腫瘍の増殖に寄与している可能性が示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

Histone 遺伝子の mRNA は、通常はポリアデニル化（PolyA 付加）されない。ところが、本解析によって、Med26 をノックダウンすることによって、*Histone* 遺伝子の mRNA がポリアデニル化されることがわかった。このことから、Med26 をノックダウンすることにより、RNA-seq 解析における *Histone* 遺伝子群の発現が、見かけ上、増加していたことがわかった。この結果は、Med26 を含むメディエーター複合体が *Histone* 遺伝子群の転写終結の制御に機能していることを示唆しており、今後の解析が重要となる。

＜支援成果公表論文リスト＞

Takahashi H., Takigawa I., Watanabe M., Anwar D., Shibata M., Tomomori-Sato C., Sato S., Ranjan A., Seidel CW., Tsukiyama T., Mizushima W., Hayashi M., Ohkawa Y., Conaway JW., Conaway RC., Hatakeyama S.: MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. ***Nature Commun.***, 6, 5941, 2015.

公募支援課題：2015 年度

Pol2 の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明

新学術領域研究

高橋 秀尚・北海道大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

近年のゲノムワイドな解析により、非常に多くのヒトの遺伝子（約 30%と示唆される）で、転写開始直後に RNA ポリメラーゼ II（Pol II）がプロモーター近傍（転写開始点の 20～50 塩基下流）で一時停止していることが明らかになり、遺伝子発現の制御で転写伸長のプロセスが重要な役割を果たしていることがわかってきた。Pol II の一時停止は原がん遺伝子 *c-Myc* を始め、発現の迅速あるいは同調した誘導が必要な熱ショック遺伝子 *Hsp70*、血清応答性遺伝子や発生制御遺伝子など、多くのヒト遺伝子においてみられる。Pol II の一時停止が解除され Pol II が新生 RNA の合成を再開するためには転写伸長因子の働きが必要である。ところが、これらの転写伸長因子が、どのようにして特定の遺伝子領域に時期特異的にリクルートされるのかについて未知であった。申請者はこれまでに、メディエーター複合体のサブユニット Med26 が、2 つの異なる転写伸長因子複合体” Super elongation complex”（SEC）と” Little elongation complex”（LEC）を、それぞれ異なる種類の遺伝子領域にリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を促進することを明らかにした。これまでの解析から、Med26 は SEC を *c-Myc* や *Hsp70* 遺伝子などのタンパク質をコードする遺伝子領域に、LEC を *small nuclear RNA* 遺伝子などの *non-coding RNA* 遺伝子領域にリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を促進することがわかった【Takahashi H, et al. ***Cell*** 2011】【Takahashi H, et al. ***Nature Communications*** 2015】。

本研究では、Med26 が SEC や LEC をどのような遺伝子領域にリクルートするのかについて網羅的に明らかにする。さらに、Med26 がどのようなメカニズムによって、SEC と LEC をそれぞれ異なる種類の遺伝子領域へリクルートするのかについて明らかにする。

＜支援の内容＞

●Med26、SEC、LEC によって発現が制御される遺伝子を網羅的に明らかにするために、Med26、AFF4（SEC のサブユニット）、KIAA0947（LEC のサブユニット）をそれぞれノックダウンした HEK293 細胞を用いて RNA-seq 解析を行う。

●LEC によって発現が制御される遺伝子をさらに網羅的に明らかにするために、Micrococcal nuclease を用いた ChIP 法により、LEC サブユニットの KIAA0947 や NARG2 の ChIP-seq 解析を行う。

●LEC のサブユニットの NARG2 には RNA との結合に機能すると予想されるドメインが存在する。このことから、LEC は標的遺伝子より転写される新生 RNA、あるいは未知の non-coding RNA と結合することによって、標的遺伝子領域に特異的にリクルートされる可能性も考えられる。そこで、LEC のサブユニットの KIAA0947 や NARG2 の RIP（RNA immunoprecipitation） や CLIP （ cross-linking immunoprecipitation）シークエンス解析を行い、LEC と結合する RNA の網羅的同定を試みる。

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究の遂行により、Med26 と SEC、あるいは Med26 と LEC によってそれぞれ制御される標的遺伝子が、さらに網羅的に解明されることが期待できる。また、LEC と RNA との結合が、Med26 による LEC のリクルート機構に関与していることが明らかとなれば、Med26 による SEC や LEC の標的遺伝子決定機構の一端が明らかになることも期待できる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

前年度からの支援によって、Med26 は一部の遺伝子（mRNA がポリアデニル化されない遺伝子）の転写終結の制御に機能していることが示唆された。本研究の推進により、Med26 が SEC や LEC を遺伝子領域にリクルートすることによって、転写伸長のみならず転写終結の制御にも機能することが明らかとなる可能性がある。メディエーター複合体の転写終結における機能はほとんど未知であることから、本研究の遂行は、遺伝子発現制御の研究においても、1 つのブレークスルーとなることが期待できる。

＜支援成果公表リスト＞

現在、論文の投稿準備を行っている。

公募支援課題：2014 年度

陸上植物の水獲得に機能する根の水応答機構の解明

新学術領域研究

高橋 秀幸・東北大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

1930 年代に提唱されたコロドニー・ウェント説は植物科学の主要な理論の一つである。本仮説では、屈性を発現する器官は、環境刺激に応答したオーキシン輸送の変化により、オーキシンの偏差分布が誘導され、偏差成長が誘導され、屈曲が生じる、と屈性を説明している。申請者は現在までに、水分屈性の発現にオーキシン輸送を必要とする植物種（イネ、キュウリ、エンドウ）と、オーキシン輸送を必要としない植物種（シロイヌナズナ、ミヤコグサ）があることを見出した。そして、これら全ての植物種の重力屈性はオーキシン輸送を必要とすることを確認した。本研究では水分屈性の特性が異なる植物種の水分屈性時と重力屈性時の遺伝子発現を網羅的に解析･比較し、偏差的に発現する遺伝子群の品種間での差異、および、同一植物種間屈性間での差異を見出すことを目的として、解析を行った。

＜支援の内容＞

静置条件下でも根の水分屈性を発現し（水分屈性>重力屈性)、オーキシン輸送阻害剤感受性水分屈性を発現する植物種として、イネ（*Oryza sativa*）を、静置条件下でも根の水分屈性を発現し（水分屈性>重力屈性)、オーキシン輸送阻害剤耐性水分屈性を発現する植物種として、ミヤコグサ（*Lotus japonicas*）を、そして、静置条件下では水分屈性を発現できず、クリノスタット条件下で水分屈性を発現し（水分屈性<重力屈性)、オーキシン輸送阻害剤感受性水分屈性を発現する植物種として、キュウリ（*Cucumis sativus*）を用いた。そして、水分屈性を発現させているイネとミヤコグサの根の遺伝子発現を解析するため、寒天培地上で生育させた芽生えを用い、水分勾配刺激を与え、生育させた芽生えの、高水分側（寒天側）と低水分側（反寒天側）に切り分けた根、をそれぞれサンプリングし、RNA を抽出した。

また、重力屈性を発現しているイネ、ミヤコグサ、キュウリの根の遺伝子発現を解析するため、イネとミヤコグサは垂直に置いた寒天培地上で生育させた芽生えを用い、キュウリは水分吸収性のプラスチックに種子を差し込んで垂直に生育させた芽生えを用い、芽生えを横倒して、重力刺激を与え、生育させた芽生えの上下に切り分けた根、をそれぞれサンプリングし、RNA を抽出した。

これらの RNA からの Oligo-dT ビーズを用いた poly(A) RNA の精製、poly(A)-RNA の断片化、cDNA の合成、各検体識別用のインデックスタグを含むアダプターのライゲーション、Illumina Hiseq™ 2500 によるシークエンス、得られた塩基配列 （FASTAQ ファイル） の TophHat（2.1.10）によるゲノム塩基配列へのマッピング、cuffdiff による発現解析を支援して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

キュウリの重力屈性を発現させた根の上側と下側での発現の差異が、他の遺伝子と比較して有意に認められる 38 遺伝子を見出した。これらのうち、19 遺伝子が下側で高発現し、オントロジー解析の結果、オーキシン誘導性遺伝子群が、重力屈性時に根の下側で発現していることが示された。下側で高発現する 19 遺伝子は、オントロジー解析した結果、特定の遺伝子群に属していなかった。したがって、キュウリの根の重力屈性を引き起こす主要因は、根の下側に蓄積するオーキシンであることが、本解析からも支持された。

一方、イネの重力屈性を発現させた根の上側と下側、および水分屈性を発現させた根の高水分側と低水分側での発現の差異が、他の遺伝子と比較して有意に認められる遺伝子（$q < 0.05$）は見出せなかった。また、ミヤコグサの重力屈性を発現させた根の上側と下側での発現が、他の遺伝子と比較して有意に差異があると示された 42 遺伝子（$q < 0.05$）中 3 遺伝子がリボソーム RNA であり、また、水分屈性を発現させた根の高水分側と低水分側での発現の差異が、他の遺伝子と比較して有意に差異があると示された 29 遺伝子（$q < 0.05$）中 15 遺伝子がリボソーム RNA、あるいはリボソームタンパク質をコードする遺伝子だった。したがって、今回のイネとミヤコグサの RNA-Seq は、mRNA の蓄積を正確に検出できたとは言いがたい結果であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

現在、キュウリの根の水分屈性時に偏差的発現をする遺伝子を RNA-Seq により解析した結果と、支援によって得られた解析結果とを比較している。本比較解析により、キュウリの根の重力屈性と水分屈性の発現機構の類似性と相違性が明らかになると期待される。また、今回、RNA-Seq の解析結果が思わしくなかったイネとミヤコグサについては、屈性を発現させる実験方法、および解析に用いる植物種の選定を含め、再検討し、本研究課題の水分屈性の発現機構の植物種間差が生じる機構の解明を目指し、研究を展開してきたいと考えている。

＜支援成果公表論文リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

褐藻の青色光応答反応の解析

基盤研究（C）

高橋 文雄・立命館大学生命科学部

＜背景・目的＞

2007 年に、新奇の転写因子型青色光受容体、オーレオクロム（AUREOCHROME）を発見した。オーレオクロムは、褐藻やケイ藻を含む黄色植物（独立栄養ストラメノパイル）のみによく保存されており、黄色植物共通の重要な機能を担っていると推定できる。オーレオクロムは黄色植物に属する黄緑藻フシナシミドロでは青色光誘導分枝形成に関与しているが、褐藻やケイ藻はじめ他の黄色植物での機能は全く未解明である。本研究の目的は、室内実験で培養系を確立した褐藻ヤハズグサ（*Dictyopteris*）とアカモク（*Sargassum*）を用いて、どのような光反応がオーレオクロムによって制御されているかを明らかにし、黄色植物共通の標的反応を推定することである。

＜支援の内容＞

RNAseq（トランスクリプトーム）解析

光は、植物（真核光合成生物）にとって、光合成だけでなく光受容体を介した信号として用いられ、形態形成反応や運動反応を引き起こす。陸上植物を含む緑色植物では、突然変異体や形質転換体植物を使用し、大規模なゲノム解析やトランスクリプトーム解析が行われ、その光受容体の全貌が明らかになってきた。しかし、水域に繁茂し、進化・系統的に大きく異なる黄色植物は、緑色植物のようなゲノムデータベースは少なく、光受容体の存在に対するデータは乏しい。本申請では、古くから光形態形成反応が観察され、実験室内で培養が可能になった黄色植物に属する褐藻類（昆布やワカメの仲間）を用い、mRNA の大規模解析を行い、光受容体の探索を主な目的とする。具体的な材料はゲノム情報が乏しい褐藻ヒバマタ科（ゲノムサイズ約 1000 Mb）に属するアカモクの栄養藻体で発現している mRNA を、次世代シークエンサーを用いて解読することにより、アカモクゲノムに含まれる光受容体遺伝子群と主要遺伝子のカタログ化を目的とする。このデータをもとに、様々な光培養条件下の遺伝子の発現機構を調べる。

＜支援によって得られた研究成果＞

アカモク雄株 4 サンプル（光条件を変換した）のトランスクリプトーム解析を行い、データベース構築を昨年度中に終了させた。アセンブル、アノテーション等は、然るべき研究者と共同して行い、4 サンプル間の発現量の差を調査した（http://bioinfo.med.niigata-u.ac.jp/takahashi2/）。まず青色光受容体 8 遺伝子検出し、形態形成に関与すると考えられるオーレオクロムとクリプトクロームの分子が各 5 遺伝子、2 遺伝子あることがわかった。一方で 4 サンプル間の遺伝子の増減を調べたところ、興味深いことに myb-like の転写因子の発現の差が顕著に表れることが分かった。また他の転写因子群（c6-type）の遺伝子群も発現差があることも分かった。現在 real time PCR を行い、近日公開・論文作成を予定している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

得られたトランスクリプトームデータと RT-PCR の複合法で重要な遺伝子の全長単離も行っている。それらが早期に実現すれば、科研費申請の内容である、光受容体タンパク等の精製・分光解析等の研究を進めたいと考えている。

支援を受けたことによって、機能的なタンパク質の発現より、転写因子タンパク質の発現に差がみられたことから、遺伝子上流のプロモーター配列の取得を試みることが必須となった。現在、PacBio を用いたゲノム解読を行って、転写因子群が結合する配列取得を試みた。現在、取得したゲノム配列を用いてプロモーター解析を行っている。

本ゲノム支援によって、光条件下で発現の増減する遺伝子群が転写因子が多数であったことから、ゲノムを解読を試みる至った。下流の転写因子カスケードが、黄色植物ではじめて解析された例になると思われる。

＜支援成果公表リスト＞

＜学会＞

吉川伸哉（福井県大・海洋）　細川真美（福井県大・海洋）　上井進也（新潟大・理）　奥田修二郎（新潟大・歯）　笠原賢洋（立命館・生命）　高橋文雄（立命館・生命）

RNA-seq による褐藻アカモクの青色光受容体の解析

日本藻類学会

2016 年 3 月 19－20 日予定　日本歯科大学（東京）

公募支援課題：2015 年度

HP1 と FACT の共役によるグローバルな転写制御機構

新学術領域研究

高畑 信也・北海道大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

ヘテロクロマチン高次構造は一過的に転写される長鎖非コード RNA（lncRNA）を反応基質とする RNAi に依存して確立される特徴を持ち、いったん確立されたヘテロクロマチンは FACT を含む複数のエフェクタータンパク質によって安定に維持されるモードに移行する。FACT がヘテロクロマチン化領域内でサイレンシングに寄与する分子メカニズムを遺伝学的・生化学的に解析した結果、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 と FACT が物理的に強く相互作用して lncRNA の転写を制御してヘテロクロマチンを安定維持する事を見いだした。更に興味深い事に申請者らは HP1 と FACT によるクロマチン制御系はユークロマチン上でヒストン H3K9 のメチル化（H3K9me）非依存的にも起きる現象である事を発見しており、本研究課題ではその分子メカニズムと生物学的意義の解明を目指す。

＜支援の内容＞

本研究では、分裂酵母ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 とそれに物理的に結合して遺伝子発現調節に関わる FACT 複合体のグローバルなクロマチン制御機構を探る事を目的としている。このシステムは RNAi 因子・クロマチンタンパク質・ヘテロクロマチンタンパク質が相互作用しつつ、ヘテロクロマチンのみならず、ゲノム上の多くの遺伝子の転写を制御している事を想定している為、以下の通り ChIP−seq と RNA-seq を計画した。

・ヘテロクロマチン関連因子変異株を用いた HP1 分裂酵母ホモログ Swi6 の ChIP−seq　計３サンプル
・ヘテロクロマチン関連因子変異株を用いた HP1 分裂酵母ホモログ Chp2 の ChIP−seq　計３サンプル
・ヘテロクロマチン関連因子変異株を用いた FACT 構成因子 Spt16 の ChIP−seq　計４サンプル
・ヘテロクロマチン関連因子変異株を用いた RNA-seq　計２０サンプル

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究はヘテロクロマチン形成因子の中でも特に中心的な役割を果たすヘテロクロマチンタンパク質とその相互作用因子 FACT 複合体に着目して解析をすすめた。HP1/Swi6 の ChIP−seq 解析結果から、ヘテロクロマチン内では HP1/Swi6 がヘテロクロマチンのエピジェネティックマークとして知られる H3K9me と非常に高く共局在している事が明らかとなった。また H3K9me の消失に伴い、この HP1/Swi6 のヘテロクロマチンへの結合もまた消失する事が明らかとなった。同時にユークロマチン上での HP1/Swi6 の分布を調べたところ、極めて興味深い事に転写終結点（TTS: Transcriptional Termination Site）近傍に高度に濃縮して結合している事が明らかとなった。この HP1/Swi6 の TTS への濃縮はヘテロクロマチン上における HP1/Swi6 の結合様式とは異なり、H3K9me にまったく依存しておらず、HP1/Swi6 の持つ DNA 結合活性によって TTS へ濃縮されている事が推測される。

FACT の ChIP−seq 解析には FACT 構成因子の中でもヒストン H2A/H2B シャペロン活性を持ち、HP1/Swi6 と物理的に結合する Spt16 を用いた。ヘテロクロマチン上への Spt16 結合は *swi6+*遺伝子破壊株で部分的に損なわれているが明らかとなり、HP1/Swi6 に依存したヘテロクロマチン上への FACT のリクルートンメント機構が裏付けされた。またユークロマチン上では HP1/Swi6 が高度に濃縮する TTS 近傍に対してやはり FACT も濃縮されている事が明らかとなった。またこの時、*swi6+*遺伝子の欠失や HP1/Swi6 との結合が切れる Spt16 変異体の分布を観察すると TTS への高度な濃縮が解消され、gene body に対してほぼ均一に分布するような変化が観察された。また RNA-seq で得られた転写産物の解析から *swi6+*遺伝子欠失株や FACT 変異株でもセンス鎖の転写終結は正常に起きることが観察された。しかし、その一方で HP1/Swi6 や FACT が高度に TTS に蓄積していた遺伝子群ではアンチセンス鎖の転写産物量が増加していることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

近年の報告ではヒストン H3K9me 依存的ヘテロクロマチン形成には非常に多岐に渡る因子群の関与が示されている。加えてそれらの因子群はヘテロクロマチン形成のみならずクロマチン制御にかなりグローバルに関わっている事を示唆する結果が報告され始めている。例えばヘテロクロマチンアイランドと呼ばれる H3K9me の小規模な分散がユークロマチン上で見られる事象が報告されているがそれが持つ本質的な意味は未だに不明である。本支援で研究対象とした HP1/Swi6 は H3K9me に依存しない状態で遺伝子の TTS 近傍へ高度に濃縮されており、その局在は FACT と相互依存している。TTS 近傍に高度に蓄積するような因子は現在までにあまり例がなく、TTS 近傍で何が起きているかを詳細に解析する為の大きな足掛かりになると展望できる。

＜支援成果公表リスト＞

Suzuki S. et al., Nucleic Acids Research, in press

公募支援課題：2010 年度、2011 年度

胸腺における自己形成と自己認識

特定領域研究

髙濵 洋介・徳島大学疾患ゲノム研究センター

＜背景・目的＞

獲得免疫系による生体防御には、リンパ球の抗原受容体が有用な抗原認識特異性レパトアを確立することが不可欠である。T 細胞の抗原受容体（TCR）レパトアは、胸腺皮質での正の選択と、それにつづく胸腺髄質での自己寛容確立を主とする、多段階の細胞運命分岐制御を通じて形成される。我々は最近、有用 CD8T 細胞の正の選択に必須な「胸腺プロテアソーム」の固有構成鎖 β5t を欠損するマウスでは CD8T 細胞の正の選択に異常が生じ、一部のアロ反応性やウイルス抵抗性に欠失があることを明らかにした。しかし、TCR レパトアが分子構造においてどのように変容しているかを具体的に描出するには至っていない。本研究では、「有用レパトア」をもつ正常マウスの CD8T 細胞と、アロ反応性や抗ウイルス抵抗性をうまく発揮することのできない「役立たずレパトア」をもつ β5t 欠損マウスの CD8T 細胞から得られた RNA をもとに、次世代型 DNA シーケンサによる網羅的配列決定によって TCRβ V 領域の N 末端側配列を抽出し、抗原認識多様性部位配列情報を網羅的に比較することを目的とした。

＜支援の内容＞

正常マウスの CD8T 細胞と β5t 欠損マウスの CD8T 細胞から得られた RNA をもとに、東京大学の菅野博士と鈴木博士らの支援によって Illumina Genome Analyzer による RNA-seq 解析を行なった。また得られたデータからコンピュータ解析を行い、TCRβ 抗原認識多様性領域（CDR3 領域）の配列情報を網羅的に検索した。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られた RNA-seq 解析データについて、TCRVβ 鎖 33 種それぞれの N 末端部分をタグ配列として使用することにより、TCRβ 鎖 CDR3 領域の多様性をアミノ酸配列情報により描出することに成功した。CDR3 領域の全長は読み切ることが困難であったため、タグ配列の直後 4 アミノ酸（CDR3N 末端）に焦点を絞り、β5t 欠損群と対照群の間で配列を比較した。2 回の実験から、Vβ 出現頻度に両群の差が顕著な Vβ8.1 や Vβ9 を含む複数の CDR3 において配列の明らかな違いが認められた。また、一部の配列（Vβ8.1 における ASRT や Vβ5.1 における ASSY）は、β5t 欠損マウスで全く検出されなかった。このように、「有用レパトア」と「役立たずレパトア」の一端を描出することができた。一方、得られる TCR 配列が一度の解析で 1000 程度と少数、リード長が短く完全長 CDR3 配列を得ることが困難、といった技術的な問題点が判明した。今後これらの問題を克服しつつ、TCR レパトア「有用性」の全容解明を進める。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで、TCR レパトアは極めて多様であるとの認識は共有されつつも、その分子構造の実像は明らかではなかった。本研究は、次世代型シーケンサによる解析を用いて、膨大な多様性を有する TCR レパトアの解明を目指す新たな試みであった。この度の支援を受けて、その基本的手法を確立するとともに、改善すべき課題を明らかにすることができた。今後、本研究で得た結果を基に技術を改良しつつ解析を進めることによって、生体を防御する免疫システムに不可欠の TCR レパトア「有用性」の実体に分子基盤を与えるとともに、その変容を客観的に評価する技術を確立していく目途が立った。将来的に T 細胞レパトアの人為的制御による免疫ポテンシャルの強化、免疫関連疾患の根治的治療法の開発につながると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Takada K, et al. *Nature Immunology*. 16, 1069-1076, 2015.

公募支援課題：2014 年度、2015 年度

インフルエンザウイルスにおける分節化RNAゲノムパッケージング機構の解析（2014年度）

インフルエンザウイルス分節化ゲノムの粒子内立体配置決定（2015年度）

若手研究（B）

滝沢 直己・微生物化学研究所第3生物活性研究部

＜背景・目的＞

インフルエンザウイルスはマイナス鎖 RNA をゲノムとして持ち、ゲノムは 8 本に分節化されている。8 種 8 本のウイルスゲノム RNA が一つの粒子にパッケージングされる機構は分節の組換えで出現するパンデミックインフルエンザウイルス制圧という点で重要になると考えられるが、その分子機構は不明である。翻訳領域も含めたウイルスゲノム上の一部配列が効率的なパッケージングに必要であることから、分節間の認識には RNA-RNA 相互作用が想定されているが、その有無について証明はなされていない。そこで本研究ではインフルエンザウイルス分節化ゲノムの選別、パッケージング機構を明らかとすることを目的として、1)パッケージングに必要な翻訳領域内の塩基、2)分節間 RNA-RNA 相互作用の有無も含めたウイルス粒子内ゲノム分節の立体配置を明らかとする。

＜支援の内容＞

1)パッケージングに必要な翻訳領域内の塩基の同定

インフルエンザウイルスタンパク質である HA または M2 をコードする分節に終止コドンを挿入し、終止コドンの下流側配列の一部をランダムな配列に置き換えた組換えウイルスプールを作成した。作成したウイルスプールを MDCK-HA または MDCK-M2 細胞で継代し、継代 1 代目、3 代目、5 代目のウイルスからウイルス RNA の精製を行い、挿入したランダム配列領域を含む領域を RT-PCR により増幅し、MiSeq により Amplicon-seq を行い、継代により選択された配列について解析を行った（2014 年度）。

2)ウイルス粒子内ゲノム分節の立体配置の解明

ウイルス粒子内での分節配置を決定するために複数遺伝子の近接領域を網羅的に明らかにする 3C-seq アッセイを参考として、精製インフルエンザウイルス粒子のクロスリンク-ウイルス透過処理-RNA 部分切断-RNA ligation の系を構築した。ライブラリー作製後、MiSeq による大規模シークエンシングを行った。読み取ったリードの解析を行い、分節 RNA 間で ligation が行われているリードを抽出し、粒子内で近距離にある分節間領域の同定を行った。系の構築を確認後、HiSeq により更に大規模データの収集を行った（2014、2015 年度）

＜支援によって得られた研究成果＞

選択を受けるランダム配列について解析を行った結果、HA をコードする分節については特定の塩基が強く選択を受けることはなく、ランダム配列部位に含まれる塩基比率は継代 1 代目から継代 5 代目までほぼ同程度の割合であった。M2 をコードする分節についてはいくつかの塩基が継代 5 代目までに特定の塩基に選択されていた。特定の塩基に選択を受けた部位に変異を持つ組換えウイルスを作成し、ウイルス増殖について野生型ウイルスと比較した結果、組換えウイルスは野生型ウイルスと比較して感染性ウイルス産生量が減少していた。これら結果は、大規模シークエンスにより決定した選択を受ける塩基がウイルス増殖に関与することを示唆している。

精製インフルエンザウイルスに対してクロスリンク-ウイルス透過処理-RNA 部分切断-RNA ligation 後ライブラリーの調整を行い、MiSeq により読み取りを行うことで、ゲノム RNA 分節間でライゲーションが起こった部位について解析を行った。MiSeq による読み取りの結果、少ないリードではあるが、分節間でライゲーションが起こったリードを確認し、マッピングを行った。マッピングの結果、ゲノム分節 RNA の末端領域-末端領域のみでなく、分節 RNA の中央領域-末端領域でライゲーションが起こるリードが確認された。これら結果より、インフルエンザウイルス粒子内でゲノム RNA 分節は一方向ではなくて、逆方向でもパッケージングされる事が明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の結果により、ウイルスタンパク質の変異とは無関係な RNA の変異がウイルス増殖に影響を与えることを明らかとした。今後、得られた配列に対して更に解析を行うことで、ウイルス粒子中にパッケージングされる配列についてより詳細に明らかとする予定である。また、今回同定した塩基がウイルス増殖において果たす役割について明らかとする予定である。

ウイルス粒子内ゲノム分節の立体配置解明については、クロスリンク-ウイルス透過処理-RNA 部分切断-RNA ligation の系は確立しているので、HiSeq によるシークエンスを行いリード数を増やすことでより詳細に分節間 RNA の近接部位を明らかとする予定である。得られた結果を詳細に解析することで、塩基レベルに近い形で分節間相互作用部位を同定できると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2012～2013 年度

魚類の海水適応を支配する脳と腸の内分泌相関

基盤研究（A）

竹井 祥郎・東京大学大気海洋研究所

＜背景・目的＞

海水魚は、脱水に対処するため盛んに海水を飲み、飲んだ海水の約 90%を腸で吸収している。また、体内に侵入する NaCl を鰓の塩類細胞で濃縮して排出し、高塩分環境で体液バランスを保っている。このように、腸と鰓は魚類の最も重要な浸透圧調節器官であるが、腸や鰓における海水適応を支配する遺伝子はまだ見つかっていない。本研究では、淡水と海水双方に適応することができ、ゲノム情報が公表されているウナギとメダカを用いて、これらの器官で発現し、海水移行により発現が更新する遺伝子を同定することを目的とする。

＜支援の内容＞

海水適応遺伝子を同定するため、ウナギとメダカを淡水から海水に移行させ、移行後 1, 3 時間（初期適応遺伝子）、および 1, 7 日（長期適応遺伝子）に腸と鰓を各 5 匹ずつサンプリングして、PolyA RNA 抽出を行った。発現遺伝子解析は鈴木グループの全面的な支援を受け（全 120 サンプル）、RNA-seq 解析は岩崎グループより絶大なる支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

海水と淡水双方に適応できる広塩性魚であるが、起源的に海水魚であるウナギと淡水魚であるメダカでは、海水移行により異なる反応を示す遺伝子が多数見つかった。また、海水に直接さらされる鰓と、消化管前部による脱塩などで組成が変化した海水を受容する腸では、海水移行に反応する遺伝子に明らかな違いがあった。ゲノム情報が完備しているメダカの腸の初期反応遺伝子にはストレス遺伝子が多数あり、淡水から淡水に移行した対照群でも上昇した。しかし、浸透圧の上昇のみに特異的に反応する遺伝子を 5 種得ることができた。海水移行実験に反応したすべての遺伝子間の相互関係を String Analyses で解析したところ、互いに密接に相関していることが明らかになった。また、浸透圧に特異的に反応する遺伝子の発見は、これまで発表された遺伝子（ストレス遺伝子）とは異なるため、最初の論文として発表した。現在、これら遺伝子をメダカを用いて腸特異的にノックダウンして、メダカの優れた海水適応能における役割を調べている。

今後は、本支援で得られた貴重なデータを用いて、2 つの異なる視点から成果をまとめていく予定である。第 1 の視点は、メダカとウナギの違いである。腸における初期反応遺伝子だけをみても、両種において共通の遺伝子や異なる遺伝子が多数見つかっている。共通遺伝子は海水適応に重要な遺伝子であると考えられるが、異なる遺伝子に関しても、進化学的な 2 種の違いに関する仮説を立てて実証実験を行っている。また、輸送体や細胞接着因子など組織を作り替える長期海水適応遺伝子にも多くの異なる遺伝子が見つかっている。そのうちのいくつかはこれまでに海水適応への関与が全く知られていなかった遺伝子なので、メダカと比べウナギのより優れた適応能に関与しているのかを明らかにしたい。

第 2 の視点は、腸と鰓の違いである。外界の変化に直接反応する鰓と管腔内液に反応する腸では初期反応遺伝子に大きな違いがあることがわかった。また、腸と鰓で発現している輸送体やチャネルは異なるが、同じ輸送体でも異なるパラログが発現していることがわかってきた。これらの遺伝子が各組織のどの細胞に発現しているかを in situ hybridization で調べ、上皮細胞に発現している場合にはそれらを組織特異的にノックダウンして、海水適応能への関与を調べつつある。これらの成果は、今後 2-3 年のうちにいくつかの重要な論文として発表する。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで魚類において、DNA microarray や Subtractive Differential Display などの方法を用いて、海水移行後に発現が上昇する初期反応遺伝子が探索されてきた。それらの研究により Osmotic Transcription Factor 1 (Ostf-1)がティラピアの鰓で発見されたが、ノックダウンをしても海水適応能に変化が見られないなど、その重要性に関して多くの議論があった。今回 2 つの魚種でこの遺伝子を調べたところ、海水に移行群だけではなく、対照群でも発現の上昇が見られた。すなわち、この遺伝子はストレス全般に反応して発現が上昇することがわかった。このように、真の海水適応に関わる重要な遺伝子を同定するためには、精度の高い遺伝子解析実験を行う必要がある。また、魚類は哺乳類と比較すると生理機能にも多様性が大きいため、1 種から得られた事実が他の魚種にも当てはまるとは限らない。今回の支援により、メダカとウナギの腸と鰓における海水移行に反応する膨大な遺伝子が得られ、反応の時間経過も明らかにすることができた。今後はこれら膨大なデータから、全ての魚種に共通な海水適応遺伝子に関わる信頼できるデータを抽出して、この分野の発展に寄与できると信じている。例えば、浸透圧に特異的に反応する初期反応遺伝子(early response gene)を見つけ、それが転写調節因子の場合は標的遺伝子を明らかにして、プロモーター領域にある転写因子が結合する配列を決定する。それが明らかになった場合は、その配列を持つ遺伝子を検索して標的遺伝子を探索し、これまでとは異なるアプローチの浸透圧調節研究を提案したい。

＜支援成果公表リスト＞

Wong, M., et al., BMC Genomics 15:1134 (2014)
Ando, M., et al., Am. J. Physiol. 307:R653-R663 (2014)

公募支援課題：2012 年度

ＲＮＡ分解酵素Ｚｃ３ｈ１２ａによる免疫制御機構の解析

若手研究（A）

竹内 理・京都大学ウイルス研究所

＜背景・目的＞

炎症応答は、免疫細胞におけるサイトカインを始めとした遺伝子発現により調節されている。免疫細胞における遺伝子調節として、転写制御に加え、mRNA 安定性制御が重要である。我々は、新規 RNA 分解酵素である Regnase-1（Zc3h12a）を同定し、この分子が、１）マウスにおいて自己免疫性炎症性疾患の発症抑制に重要であること、２）マクロファージなど自然免疫細胞､T 細胞を始めとした獲得免疫系の活性化抑制に重要であること、３）Regnase-1 欠損マクロファージにおいてインターロイキン（IL）-6 を始めとした mRNA や蛋白の発現が増加していること、４）Regnase-1 は IL-6 などの mRNA をその 3’非翻訳領域を介して抑制していることを示してきた。しかしながら、IL-6 と Regnase-1 重欠損マウスにおいても炎症性疾患の著明な改善を認めず、疾患発症に関わるメカニズムは不明であった。本研究では、Rengase-1 の獲得免疫系における役割の解析から、免疫応答の RNA 制御による調節メカニズムを明らかにする事を目的とした。

＜支援の内容＞

本研究では､Regnase-1 の獲得免疫細胞、特に T 細胞における役割を解析するために Cre-loxP システムを用い、まず、Regnase-1 flox マウスを作製した。このマウスを、T 細胞特異的に Cre を発現する CD4-Cre もしくは Lck-Cre マウスと交配し、T 細胞特異的 Regnase-1 欠損マウスを作製した｡このマウスは全身で Regnase-1 を欠損するマウスと同様に重篤な致死性自己免疫疾患を発症し、T 細胞に発現する Regnase-1 の重要性が明らかとなった。また、Regnase-1 欠損 T 細胞は T 細胞受容体（TCR）刺激に対する増殖やサイトカイン産生などの反応が亢進していた。Regnase-1 タンパク質は TCR 刺激に対し、MALT1 プロテアーゼにより切断を受けて分解され、Regnase-1 による T 細胞活性化抑制機能が､免疫応答の過程でダイナミックに調節されていることが明らかとなった。

Regnase-1 が T 細胞においてどのような mRNA を標的として､T 細胞活性化を調節しているかを明らかにする目的で、野生型及び Regnase-1 欠損 CD4 T 細胞をマウスより単離し、mRNA を調製、Transcriptome 解析の支援を依頼した。

＜支援によって得られた研究成果＞

野生型、及び Regnase-1 欠損マウス脾臓 CD4 T 細胞を用いた Transcriptome 解析の結果、一群の mRNA が Regnase-1 欠損 T 細胞において野生型と比較して発現上昇していることが明らかとなった。この mRNA の中には、マクロファージでこれまでに同定されていた Il6 などに加え、c-Rel や、Icos、Ox40、Il2 などの mRNA を見つけることが出来た。更に、CD4 T 細胞をナイーブ、エフェクターの 2 種類に分けて Transcrptome 解析をしたときにも同様の結果を得た。ここで明らかになった遺伝子をレポーターシステムなどにより検討を加え、これらの分子をコードする mRNA が Regnase-1 による直接の標的となっていることを示す事が出来た。このように、Transcriptome 解析により、細胞種特異的な Regnase-1 標的 mRNA を網羅的に検討し、同定することが出来た。

また、昨年は、Regnase-1 の標的 mRNA 結合特異性を明らかにするために､HeLa 細胞に Flag でタグをした Regnase-1 を安定的に発現させた細胞株を作製し、Flag で免疫沈降､Transcriptome 解析(RIP-Seq 解析)を行い、一群の Regnase-1 標的 mRNA を得ることが出来た。これは同様に支援を頂いた Roquin 標的 mRNA と有意にオーバーラップしており、炎症関連 mRNA の調節機構の一端を明らかにすることが出来た。また、N4BP1 を始め Regnase-1 ファミリー分子欠損マウスを用いた Transcriptome 解析を行っており、この分子群の免疫調節機構解明に寄与することが期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

RNA 結合蛋白質の機能やその標的 mRNA を明らかにするには､網羅的な解析が必要不可欠である｡例えば、今回支援していただいた Regnase-1 欠損 T 細胞における Transcriptome 解析では、欠損細胞で特異的に発現上昇する mRNA として、c-Rel などこれまで考えてこなかった新規遺伝子を同定することが出来た。これは、次世代シークエンサーを用いた網羅的解析を行わずしては得ることの出来なかった知見である。この知見により、Regnase-1 により転写因子の一つ c-Rel が制御され､その結果として T 細胞活性化を制御するという新しいモデルを得ることが出来た。

また、2013 年 2014 年度の支援により Regnase-1 と Roquin の共通標的 mRNA の安定性制御のメカニズムを明らかにし，これまで全く解明されていない同一 RNA 認識配列を用いた複数の転写後調節因子による厳密な RNA 安定性制御の解明へ展開させることが出来た。

＜支援成果公表リスト＞

(1) Uehata, T. et al., Cell 153, 1036-49 (2013)
(2) Mino, T. et al., Cell 161, 1058-73 (2015)

公募支援課題：2013 年度

なぜ線虫が巨木を枯らすのか―遺伝学的手法を用いたマツ材線虫病病原メカニズムの解明

挑戦的萌芽研究

竹内 祐子・京都大学大学院農学研究科

＜背景・目的＞

病原線虫マツノザイセンチュウが伝播昆虫によってマツ属樹木に導入されることで起こるマツ材線虫病は、白砂青松を擁する日本古来の景観を壊滅状態に追い込み、今なお拡大を続けている。本病の病原機構が何に起因するのかはいまだ解明されておらず、対症療法に依存せざるを得ない現行の防除策は有効に機能していない。本研究では、いまだ謎の多い本病病原メカニズムの全容解明を目的として、独自に作出した本線虫の組換え近交系を材料としたゲノムワイドな塩基多型解析と表現系解析とを組み合わせることにより、マツノザイセンチュウの核ゲノム上にあると予想される病原性決定因子（富樫ら 2009）の特定を目指した。

＜支援の内容＞

マツノザイセンチュウ組換え近交系 17 系統及びそれらの親系統である近交系 2 系統の計 19 系統について、RAD-tag のリファレンスゲノムへのマッピングとその解析に際して支援を受けた。リファレンスゲノムには GeneDB ウェブサイト上のマツノザイセンチュウ Ka4C1 line ドラフトゲノムを使用した（http://www.genedb.org/Homepage/Bxylophilus）。ゲノムワイド関連解析により重要形質と相関が得られた遺伝子領域についてのアノテーション及び GO 解析を情報解析支援のもとで行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

国内外で深刻な被害を及ぼし続ける森林流行病であるマツ材線虫病の病原線虫マツノザイセンチュウにおいて、宿主の発病及び被害拡大に密接に関与する重要形質として、病原力、増殖力、伝播昆虫への便乗力の 3 つが挙げられる。本種は 2011 年にドラフトゲノム情報が公開されたが（Kikuchi et al., PLOS Pathogens, 2011）いまだ分子基盤の整備途上にあり、これらの重要形質を制御する遺伝子（群）についてもこれまで未解明であった。本研究では古典遺伝学的なアプローチとして、組換え近交系を新たに作出して線虫材料に供し、RAD-seq 法によるゲノム解析を行うことで病原性関連遺伝子群の推定を行った。これにより、上記の各形質に対して高い相関を持つ 3 領域をドラフトゲノム上に見出した。

続いて、各形質に高い相関を持つ 3 領域上に存在する遺伝子群を解析することで、どのような遺伝子がそれぞれの形質に関与しているかを推定した。病原力特異的な相関をもつ領域においては、ヘムペルオキシダーゼや CYP 等の代謝に関与する遺伝子が検出された。病原力に高い相関を示した領域はいずれも増殖力と高い相関が認められ、増殖力は病原力にとって切り離せない形質であることが示唆された。両形質に高い相関を示した領域には、発生や成長に関与するシグナルペプチダーゼ遺伝子が検出された。その他、増殖力と便乗力の両方に相関をもつ領域では内胚葉形成や形態形成に関与する *daf-1* 遺伝子が検出され、それぞれの形質に大きく関与していることが推察された。

今後は、本研究で見出された各重要形質関与遺伝子の候補について、引き続き遺伝子発現解析や遺伝子ノックダウン及びノックアウト等、詳細な機能解析を行い、病原性への関与の有無を検証したい。

上記のような成果が得られた一方で、本研究の精度において生物材料である組換え近交系の系統数、ならびに作出時における組換え頻度の低さの改善が課題となった。本種は雌雄異個体で有性生殖を行う点で、同じく線形動物門に属するモデル生物の *Caenorhabditis elegans* と比較して組換え近交系作出の難易度は高いと言えるが、本研究のような遺伝学的アプローチを試みる際には新たな組換え近交系の作出だけでなく、その作出法についても改良の余地があることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究の構想段階においては、マツノザイセンチュウ組換え近交系の多型解析に使用する DNA マーカーとして AFLP（amplified fragment length polymorphism）マーカー及びマイクロサテライトマーカー（SSR; simple sequence repeat）を想定して予備実験を行っていたが、いずれもゲノムとの関連付けや多型検出能の点で最適とは言えなかった。今回、ゲノム支援（情報解析支援）を受けられることになったことで、より精緻な解析が可能となる SNP（single nucleotide polymorphism）マーカーの開発に着手することができ、解析に要する時間も大幅に短縮できた。もともと操作実験を主体とするウェットな研究を行ってきた当研究室で、ゲノム情報解析主体のドライな研究を遂行することは、支援なしには不可能であったと考えられる。

また、今回の支援を通して、当研究室におけるゲノム情報解析環境（主にハード面）の整備、ならびに学生の解析技術の習得がスムーズになった。さらに、本研究以外のプロジェクトにおいても、研究計画を立てる上でゲノム情報解析を組み込むなどアプローチの選択幅が格段に広くなった。この場を借りて関係者のみなさまに感謝したい。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2014 年度

ブルーム遺伝子欠損と DNA 二重鎖切断の組み合わせによるゲノム不安定性の解析

新学術領域研究

竹田 潤二・大阪大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

腫瘍が高頻度に出現するヒトブルーム症候群の原因遺伝子であるヒトブルーム遺伝子（BLM 遺伝子）の発現を抑制すると、体細胞であっても染色体間の交差頻度が著しく上昇し、片アレルだけに変異がある細胞が両アレルに変異を有する細胞に高頻度に転換する。ブルーム遺伝子欠損状態のゲノム変化を解析するために、ブルーム遺伝子を一時的にオフにできる F１(B6×129) タイプのマウス ES 細胞を樹立し、ヘテロ接合性の消失（Loss of Heterozygosity: LOH）が生じた細胞を検出できるシステムを構築した。

ブルーム遺伝子欠損状態と DNA 二重鎖切断を組み合わせて、Aprt 遺伝子座に関し LOH が起きたクローンを選択し、解析した。なお、DNA 二重鎖切断は Aprt 遺伝子座近傍に特異的に導入した。その結果、Aprt 遺伝子座周辺に、複雑な再構成が起きていることが判明した（Yamanishi A et al. Genome Res 23: 1462-1473, 2013）。

そこで本支援においては、放射線照射によりゲノム全体にわたって DNA 二重鎖切断を導入し､同様の再構成が起きているかどうかを検討することにした。

＜支援の内容＞

放射線照射群から、ブルーム遺伝子オン１クローン、ブルーム遺伝子オフ１クローン、放射線非照射群から、ブルーム遺伝子オン１クローン、ブルーム遺伝子オフ２クローンよりゲノム DNA を抽出し、illumina HiSeq 2500 による paired-end sequencing (500-bp size range, 100-bp read length, 30 depth) により全ゲノムシークエンスを依頼した。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られたデータからゲノム再構成が起きたと思われる領域を特定するために、瀬々潤主任研究員（産業技術総合研究所）らとともに、COSMOS（Control sample based detection of structural variation）と名付けた新規ゲノム構造変異解析ツールを共同開発した（Yamagata K et al. in press)。そのツールを使った解析結果、放射線照射群でブルーム遺伝子オフの１クローンにおいて、染色体のテロメア近傍領域において再構成が集中的に起きている事が観察された。これは、ヒトのガンゲノムで報告されている Chromothripsis(Stephens PJ et al., Cell.2011)に類似していた。さらに、そのクローンから、異なった再構成を有するサブクローンが派生している事が arrayCGH (Comparative genomic hybridization)などの手法により確認できた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ヒトのガンゲノムで報告されている Chromothripsis は、同時に生じた複数のゲノム断片が再結合し、再構成領域を解析するとゲノムコピー数は､不変か減じている事が知られている。つまり、複製機構は関与していないことが、示唆されている。ところが、放射線照射群、ブルーム遺伝子オフのゲノムを arrayCGH で解析してみると、再構成集積領域において、コピー数が増加している事が判明した。このことは、ブルーム遺伝子がオフの時に見られるゲノム不安定時に起きるゲノム再構成には、複製機構が関与している事が示唆され、腫瘍化発症機構の新たなメカニズムを示している可能性があると思われる。

＜支援成果公表リスト＞

Yamagata K. et al., Nucleic Acids Res., in press

公募支援課題：2013 年度

共生体感染により変動する共生遺伝子制御ネットワークの解明

若手研究（B）

武田 直也・基礎生物学研究所共生システム研究部門

＜背景・目的＞

植物は菌根菌や根粒菌などの微生物との共生によりリン・窒素源を得ることができ、植物の環境適応や生育促進に大きく貢献している。本研究では、この共生栄養供給効果をもたらす共生微生物の宿主植物への感染機構についての解析を行い、生物間相互作用により異種生物を体内に受容する分子機構の解明を目的としている。

＜支援の内容＞

マメ科植物ミヤコグサ(*Lotus japonicus*)で同定したアーバスキュラー菌根（AM）共生・根粒共生変異体を用いて、これらの変異体が示す AM 菌・根粒菌の感染異常を反映した遺伝子発現プロファイル、非感染時の植物体の遺伝子発現プロファイルの解析を RNA-Seq により行った。また、共生シグナルを恒常的に活性化させることができる機能獲得型共生シグナル因子 gain of function CCaMK を過剰発現させた根における発現プロファイルも取得し、共生変異体で得られたプロファイルとの比較に用いた。
解析を行った変異体のうち、転写制御に関わると考えられる NSP1 と RAMI1 について、c-myc tag で標識したタンパク質を免疫沈降、DNA 調整を行ったサンプルについて、次世代シーケンスによる Chip-Seq 解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

ミヤコグサで同定した AM 菌・根粒菌の両感染過程が中途で停止する共生変異体 *cerberus* を用いて、これらの変異体が示す菌根・根粒共生体の感染異常を反映した遺伝子発現プロファイルを取得・解析した。その結果、これらの変異表現型を引き起こすと考えられる遺伝子発現の変化として、細胞壁合成酵素遺伝子群の発現変動がみられたことから、この遺伝子群に注目して研究を行うこととした。*cerberus* 変異体では感染根において Xyloglucan endotrans-glucosylase / hydrolases (XTHs) が野生型と比べ有意に低下していた。また、*cerberus* 変異体では非感染根においても XTH 遺伝子群の誘導がみられた。これらの細胞壁再構築酵素 XTH は、細胞壁中のセルロースとキシログルカンの架橋を繋ぎ変えることで植物の細胞壁の再構成を行い、硬度を変化させる酵素の１つである。共生菌である AM 菌は根の細胞間隙を縫うように伸長し、宿主根内に広がっていくことから、細胞壁の硬度と感染との関連が示唆される。また、Xyloglucan 特異的な抗体による免疫染色によって、菌根菌の周辺の細胞壁で Xyloglucan の蓄積がみられ、共生菌感染と細胞壁との関連が示唆された。さらに、*cerberus* 変異体の非感染状態における細胞壁成分を調べると、Xyloglucan の構成単糖である Xylose の含量が低下していた。このように、*cerberus* 変異体で遺伝子発現や細胞壁成分に異常がみられたことから、AM 菌の菌糸伸長に影響を与える変異表現型との相関が示唆され、CERBERUS による細胞壁硬度の制御が AM 菌菌糸伸長を制御している可能性についての研究を進めている。

別のアプローチとして、AM 共生時に誘導されるプロテアーゼ遺伝子 *SbtM1* のプロモーターから菌根共生特異的シス領域を特定し、酵母１ハイブリッド系による解析から、このシス配列と結合することで菌根共生遺伝子の転写制御を行うと考えられるトランス因子候補を同定した。この *rami1* 破壊株のトランスクリプトーム解析から、RAMI1 発現によって発現制御に干渉をうける共生遺伝子群の探索を行った。その結果、*rami1* 破壊株ではフラボノイド合成、光合成に関わる遺伝子群の発現が野生型と比べて有意に低下していた。フラボノイド合成遺伝子は AM 共生中に発現が変動する遺伝子であり、共生における機能も知られている。そのため、*rami1* 破壊株における菌根菌感染率の上昇との関連が示唆された。これらの遺伝子のプロモーター領域に RAMI1 が直接に結合することで発現制御を行っている可能性について、Chip-Seq による解析を試みたが、これらの遺伝子に対して明確な結合を示す結果は得られなかった。この実験に関しては Chip に関する条件検討が必要であり、今後の研究の課題となる。

本研究では、共生変異体の感染時・非感染時のトランスクリプトーム解析から、感染進行の各ステージで鍵となる共生遺伝子とともに、変異遺伝子から変異表現型に至る間、あるいはそれらに密接に関係した遺伝子発現と現象を見出すことができた。特に非感染時の植物体の状態が共生菌の感染に影響を与えることは、今後の共生機構の解析とその利用を考える上で重要な知見になると考えられる。今後は発見した共生遺伝子と現象の共生菌感染における機能を詳細に解析し、研究成果としてまとめていく。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで注目されていなかった遺伝子制御機構や生理現象が、共生において重要な機能を持つことが明らかとなった。この成果は、科研費においてはじめに行った次世代シーケンス解析から明らかとなった成果に対して、ゲノム支援により発展的あるいは拡張して研究を行った結果である。そのため、このゲノム支援を受けることで、本来は次の科研費研究まで待たなくてはいけない成果をあげることができ、研究の発展に大きく貢献した。

＜支援成果公表リスト＞

現在、投稿準備中

公募支援課題：2010～2011 年度、2013 年度

組織が創るマクロでロバストなコンパートメントの成立・維持のロジック

新学術領域研究

武田 洋幸・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

転写因子 Zic1(および Zic4)は体節および体節由来組織の背側において胚期から成魚まで長期間にわたり発現し続け、体幹部の背側形態を制御する。これまでの当研究室における解析から、Zic1 の発現が胚期においては外部からのシグナルにより調節されることや、成魚においては細胞自律的に維持されることを示唆する結果が得られていた。我々は、エピジェネティックなクロマチン修飾に着目することで Zic1 の長期間にわたる発現維持の分子メカニズムを解明することを目的に解析を行った。

＜支援の内容＞

①Bisulfite seq

メダカ成魚（野生型・体幹部の背側形態が腹側化する *Da* 変異体）の背側/腹側筋節

メダカ稚魚（受精後 7 日）の背側および腹側筋節

②ChIP-seq

メダカ胞胚期および成魚の背側・腹側筋節における各種ヒストン修飾（H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K27me3, H3K27Ac）

メダカ成魚肝臓における H3K4me3、H3K27me3

メダカ桑実胚期における H3K4me2、H3K27me3

③RNA seq 解析

メダカ成魚背側および腹側筋肉

＜支援によって得られた研究成果＞

Zic1 遺伝子座には胞胚期において巨大な DNA 低メチル化領域が存在し、その領域に抑制型（H3K27me3）ヒストン修飾が高レベルになっていることが明らかとなった。一方成魚の筋節においては、Zic1 の発現状態と相関して背側では活性型ヒストン修飾が高く、腹側では抑制型ヒストン修飾が高いという結果が得られたが、DNA のメチル化に関しては背側筋節において特異的な上昇が検出された。メチル化の上昇した領域は背側筋節において抑制型ヒストン修飾（H3K27me3）が減少した領域と一致しており、胞胚期において約 23kb にわたっていた DNA 低メチル化領域がプロモーター領域のみに縮小した。これらの結果から、成魚においては DNA メチル化が抑制型ヒストン修飾に拮抗し、発現を維持している可能性が示唆された。我々は成魚で観察されたクロマチン状態が確立するタイミングを明らかにするため、受精後 7 日の稚魚を用いてヒストン修飾を解析したところ、ヒストン修飾は稚魚においても成魚とほぼ同様のパターンを示した。したがってヒストン修飾のパターンは胚期においてすでに確立していると考えられる。一方で、DNA メチル化の背側特異的な上昇は観察されなかったため、DNA メチル化は孵化後に生じていることが明らかとなった。胞胚期における Zic1 のクロマチン状態が発生で重要な役割を果たす転写因子に特徴的なものであったため、我々は今回示唆された発現制御機構の普遍性について検討した。その結果、胞胚期における巨大な DNA 低メチル化領域のうち 16%が成魚筋節においてサイズが縮小することが明らかになった。これらの遺伝子は、縮小を受けない遺伝子と比較して抑制型ヒストン修飾（H3K27me3）のレベルが有意に減少しており、発現レベルも高いことが明らかとなった。さらに、孵化直後におけるゲノムワイドの DNA メチル化解析の結果から、成魚において DNA メチル化を受ける遺伝子のほとんどで孵化直後には DNA メチル化が生じていないことも明らかとなった。したがって、Zic1 の解析により示唆された、孵化後に生じる DNA メチル化による発現維持は発生に関わる重要な転写因子に普遍的な制御である可能性がある。実際にそのような転写因子の多くは生涯にわたり発現することで細胞のアイデンティティの維持に寄与すると考えられており、その発現異常は細胞の運命を変化させてしまうことから、それらの転写因子の発現制御機構の理解は極めて重要である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

この結果は、発生に重要な転写因子は多能性細胞において巨大な HMD によって強固に抑制されていることを示している。これらの遺伝子群は細胞の運命に決定的な役割を持つため、未分化状態を維持するためには強く抑制されている必要がある一方で、分化刺激に対しては迅速に発現する必要がある。未分化性と分化能の両立は多能性細胞における本質的な特徴であり、HMD のサイズによる抑制状態の制御は重要な役割を果たすと考えられる。これまでのエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる研究の多くは修飾の種類に着目したものであったが、我々はエピジェネティック修飾ドメインのサイズが遺伝子発現制御の重要な要素の一つであることを明らかにすることが出来た。今後、このようなクロマチン修飾領域のサイズ制御によって説明できる新たな生命現象の発見が期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Nakamura, R. et al., Development 141, 2568-2580 (2014)

公募支援課題：2013 年度

分子間架橋を応用した NFATc1 複合体解析による骨エピジェネティクスの基盤的研究

基盤研究 B

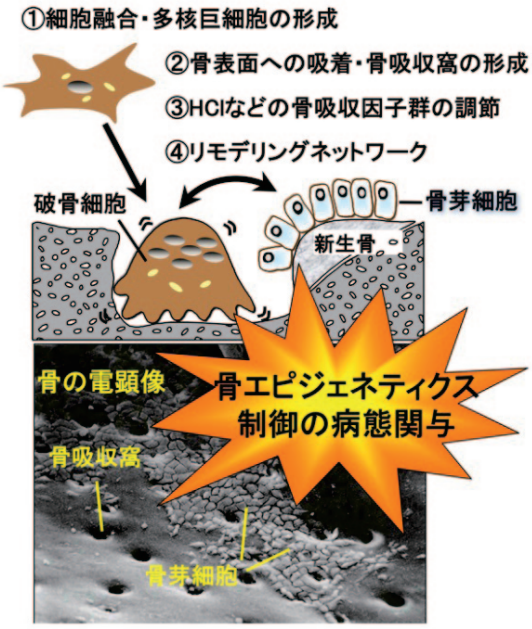
龍野一郎・東邦大学佐倉医療センター

＜背景・目的＞

(1)研究の背景

高齢化社会に伴い骨粗鬆症などの骨疾患患者の急激な増加にもかかわらず、その治療薬の選択肢は決して十分とは言えない。その病態の中心に位置する骨リモデリングは骨形成と骨吸収のバランスで制御されているが、その本質は骨芽細胞と破骨細胞の機能調節である。骨エピジェネティクス制御が次世代型創薬ターゲットとして期待される中で、骨芽細胞と破骨細胞のクロマチンレベルでの制御分子機構はほとんど明らかにされていない。我々は RAGE リガンドと AGEs シグナルの骨代謝に対する影響を解析する過程で、RAGE-AGEs シグナルが、骨芽細胞から何らかの分泌因子を介して、破骨細胞の分化調節と機能制御していることを見出した (*JCB, 2009*)。更に我々の研究チームは、転写因子複合体によるクロマチン・エピジェネティクスの機能制御をゲノムワイドで解析する手法を独自に開発してきた(*Cell. 2007*)。本研究では、これらの知見・方法論を破骨細胞分化のマスターレギュレターである NFATc1 に応用する。NFATc1 (nuclear factor of activated T cells c1) は破骨細胞分化促進因子 RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) により最も強く誘導される転写因子であり (Takayanagi H, et al. 2002 *Dev Cell*)、そのノックアウトマウスは心臓弁膜欠損を主体とする異常により胎性致死である(De la pompa JL, et al. 1998 *Nature*; Ranger AM, et al. 1998 *Nature*)。その骨特異的ノックアウトマウスでは、破骨細胞分化が抑制され Osteopetrosis (大理石病)を来すことが知られている (Asagiri M, et al. 2005 *J Exp Med*; Winslow MM, et al. 2006 *Dev Cell*)。これらの事実は、NFATc1 が破骨細胞分化のマスターレギュレターとして重要な分子であることを示している。破骨細胞分化のプロセスは大きく分けて、(1)細胞融合・多核巨細胞の形成といった形態変化から、(2)骨表面への吸着・骨吸収窩の形成といった機能発現のためのプラットフォームの形成、さらに、(3)HCl やカテプシン K などの骨吸収因子群の合成・分泌の調節、(4)骨芽-破骨細胞ネットワーク、など、複雑な過程が機能的に結びついて緻密な制御が行われている(図 1)。実際に分化の各段階の必要性に応じて、NFATc1 が、TRAP (tartrate-resistance acid phosphatase), calcitonin receptor, cathepsin K, β3- integrin などの生理作用の異なる多彩な破骨細胞特異的遺伝子を次々に転写活性化するが、これらの多種多様な下流遺伝子群をどのような分子メカニズムで、空間的・時間的な使い分けをしているが十分に解明されていない。

図1. 破骨細胞機能発現と骨リモデリング制御



(2)研究の目的

我々はこれまでに、試薬添加後の骨芽細胞から採取した conditioned medium を用いて、その破骨細胞分化に与える影響を検討する実験系を確立し、RAGE シグナルによる破骨細胞分化における骨芽細胞からの paracrine signaling の重要性を明らかにした。また、骨芽細胞-破骨細胞のクロストーク解析をするための、骨芽細胞／破骨細胞共培養実験系を構築している。また、転写因子複合体によるクロマチン・エピジェネティクスの機能制御をゲノムワイドで解析する手法を開発している。本研究では、これらのシステムを応用・融合し、破骨細胞分化のマスター転写因子 NFATc1 を解析対象として、生化学的な転写複合体解析技術と次世代型シークエンサーによるゲノムワイドのエピジェネティクス・トランスクリプトーム解析を有機的に結びつけることで、骨リモデリング制御の新たな分子機構にアプローチし、骨エピジェネティクスの分子病態解明と創薬基盤の開発を試みることを目的とする。

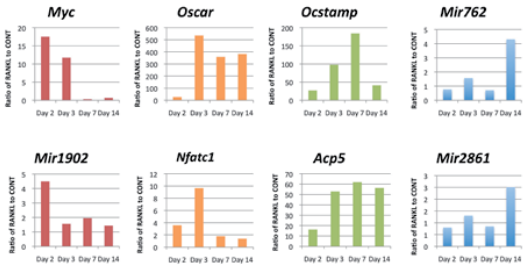
＜支援の内容＞

RNA-sequence

＜支援によって得られた研究成果＞

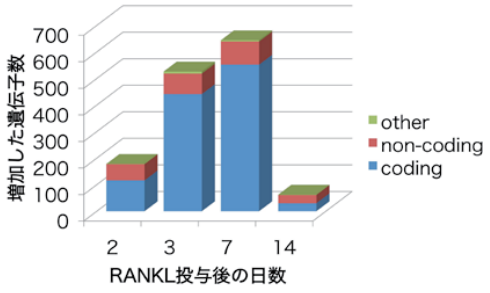
破骨細胞分化においては、破骨細胞前駆細胞(Monocyte/ Macrophage系細胞)が細胞増殖・分化・活性化を経て形態的にも機能的にも劇的な変化を遂げることが知られている。特に破骨細胞の成熟においてはDcstampやOcstampなどの蛋白を介した破骨細胞の融合・多角巨細胞化やSealing zoneに囲まれた骨吸収窩の形成、波状縁におけるカテプシンKやマトリックスメタロプロテアーゼの発現、プロトンポンプによる骨吸収窩の酸性化が重要であり、破骨細胞分化過程に於いて多くの機能的に異なる遺伝子の発現が時間的・空間的に巧妙に調節されていることが予想される。破骨細胞分化においては骨芽細胞やストローマ細胞などから分泌されるReceptor activator of NF-κB ligand (RANKL), Macrophage colony stimulating factor (M-CSF)などのサイトカイン刺激が重要であるが、これらの刺激によりどのような遺伝子がどの時間帯に発現誘導されているのかについては、未だ明らかでない部分が多い。そこで我々は、前破骨細胞系細胞 RAW264.7細胞におけるRANKL依存性に増加する遺伝子についてRNA-seqを用いて検討を行った（図1）。Micro-arrayと異なり、RNA-seq

図1：RANKL刺激により増加する遺伝子
（各時間における代表的な遺伝子を提示）



ではnon-coding RNAを含めた解析を行うため、より網羅的に遺伝子変化を捉えることが可能であり、実際に図1に示すようなMicro-RNA (*Mir1902*, *Mir762*, *Mir2861*) をはじめとして様々なnon-coding RNAがRANKL依存的に発現変化を来していることが明らかとなった。特に興味深い点として、同じRANKL下流遺伝子でも発現の増加する時期が異なり、RANKL刺激後早期にはsignal伝達に関与する遺伝子やnon-coding RNAが主に増加していることが明らかとなった一方、RANKL刺激3日後からは多くのprotein coding genesの発現増加が認められた（図２）。その傾向は７日後まで続き、１４日後には遺伝子発現はprotein-coding, non-coding genesとも劇的に減少した。

図2: RANKL投与後に2倍以上の増加を認めた遺伝子数
(RAW264.7 cells)

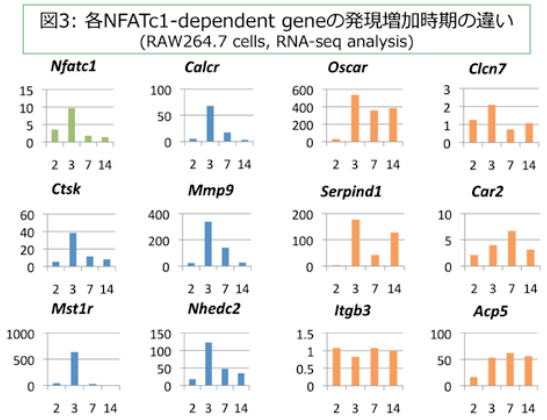


さらに、それぞれの時間における発現増加率の高い遺伝子について上位30遺伝子を確認したところ、刺激後２日目には核内シグナルに関与する癌遺伝子*Myc*やTNF receptorシグナルの細胞内への伝達に重要な*TRAF1*、またsmall nucleolar RNA, small nuclear RNA, micro RNA, transfer RNAなど多くのnon-coding RNAが同定された。一方、刺激後３日目になると破骨細胞分化のmaster regulatorである転写因子*Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1* (*Nfatc1*)の発現増加に連動して*Mmp9*, *Nhedc2*, *Ctsk*, *Atp6v0d2*など破骨細胞の骨吸収機能に重要な遺伝子の発現増加を含め、上位に占める遺伝子の殆どがprotein-coding genesであった（表１）。７日目には

表1：RANKL刺激後3日目に発現のピークを示す上位30遺伝子

Rank	RefSeq Gene ID	Official Symbol	Gene Type	Official Full Name	Ratio of RANKL to CONT 2 days	3 days	7 days	14 days
1	232790	Oscar	protein-coding	osteoclast associated receptor	27.00	535.40	358.00	382.00
2	435626	Rufy4	protein-coding	RUN and FYVE domain containing 4	20.80	522.50	2.29	9.50
3	17395	Mmp9	protein-coding	matrix metallopeptidase 9	22.14	337.68	140.10	25.56
4	97086	Nhedc2	protein-coding	Na+/H+ exchanger domain containing 2	17.96	322.57	47.00	35.00
5	12142	Prdm1	protein-coding	PR domain containing 1, with ZNF domain	46.60	96.18	31.80	2.68
6	13038	Ctsk	protein-coding	cathepsin K	5.27	38.16	11.32	8.11
7	11785	Apbb1	protein-coding	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1	16.12	35.20	12.50	2.46
8	12768	Ccr1	protein-coding	chemokine (C-C motif) receptor 1	15.59	34.44	8.24	1.35
9	17179	Mark	protein-coding	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	3.16	33.73	4.24	3.30
10	620235	Siglec15	protein-coding	sialic acid binding Ig-like lectin 15	4.33	31.03	3.84	2.55
11	67426	Adck3	protein-coding	aarF domain containing kinase 3	9.90	29.69	4.16	4.96
12	14871	Gstt1	protein-coding	glutathione S-transferase, theta 1	20.36	26.37	2.40	3.69
13	242341	Atp6v0d2	protein-coding	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D2	10.65	26.16	1.24	1.27
14	69772	Bdh2	protein-coding	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2	5.77	17.89	5.50	1.24
15	14284	Fosl2	protein-coding	fos-like antigen 2	5.14	17.81	2.10	1.25
16	259302	Srgap3	protein-coding	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3	4.05	12.72	5.77	1.17
17	20708	Serpinb6b	protein-coding	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b	2.98	10.97	3.77	2.98
18	18798	Plcb4	protein-coding	phospholipase C, beta 4	3.23	10.64	1.77	0.70
19	15531	Ndst1	protein-coding	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	2.79	10.43	1.14	1.15
20	328232	Gfod1	protein-coding	glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1	1.76	10.14	3.79	0.89
21	11732	Ank	protein-coding	progressive ankylosis	2.99	10.01	3.10	1.23
22	18018	Nfatc1	protein-coding	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1	3.56	9.65	1.78	1.38
23	66175	Mustn1	protein-coding	musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	1.93	9.43	1.39	1.18
24	20779	Src	protein-coding	Rous sarcoma oncogene	3.21	8.79	1.38	1.77
25	110877	Slc18a1	protein-coding	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1	1.97	8.53	1.41	1.57
26	75600	Calml4	protein-coding	calmodulin-like 4	2.68	8.38	7.67	2.11
27	74901	Kbtbd11	protein-coding	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	2.64	8.31	2.56	0.95
28	56857	Slc37a2	protein-coding	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 2	3.10	8.15	2.13	1.35
29	387141	Mir22	miRNA	microRNA 22	1.44	7.57	0.92	0.93
30	240756	Klhl12	protein-coding	kelch-like 12	3.54	7.41	1.32	1.22

上位30遺伝子の全てがprotein-coding genesであり、破骨細胞融合・多核巨細胞化に重要な*Ocstamp*や破骨細胞活性化に重要な*Acp5*などの発現が高いことが



確認され、RANKL刺激後７日目のRAW264.7細胞が破骨細胞として成熟段階にあることが推測された。

これまでの検討から、RANKL下流遺伝子それぞれにおいて発現増加する時期が異なることが確認されたが、転写因子NFATc1の下流遺伝子にも同様の事象が認められるかについて、過去にconditional knockout mice を用いて同定された NFATc1-dependent genes (Aliprantis AO, et al. *J Clin Invest* 2008; Charles JF, et al. *Bone* 2012) を参考に検討した。すると予想した通り、*Calcr, Ctsk, Mmp9*など*Nfatc1*と類似の発現変化を認める遺伝子がある一方で、*Oscar, Clcn7, Serpind1*などの２相性の発現変化を示す遺伝子や、*Car2, Acp5*などの発現のピークが*Nfatc1*と異なる遺伝子が確認された（図３）。このことは、これらの遺伝子の発現に*Nfatc1*が関与するものの、*Nfatc1*以外のシグナルからの遺伝子発現調節やNFATc1の転写後修飾の存在を示唆しており、以上の結果から、破骨細胞分化における多彩な遺伝子発現調節機構の存在が明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援によって得られた解析結果から、RANKL依存性破骨細胞分化におけるdynamicな遺伝子発現調節機構により、破骨細胞の多彩な機能・形態変化がもたらされている可能性が示唆された。また、転写因子NFATc1の翻訳後修飾の存在も示唆されたため、現在我々はTandem affinity purificationとLC-MS/MSにより同定した新たなNFATc1結合分子の機能解析を行っており、これらの結果について現在、論文投稿準備中である。

＜支援成果公表リスト＞

日本内分泌学会、アメリカ内分泌学会

公募支援課題：2010 年度　2012 年度

p53 転写因子複合体によるクロマチン機能調節と iPS リプログラム制御機構の解明

基盤研究（B）

田中 知明・千葉大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞
近年の再生医療の進歩は、目覚ましい進歩を遂げており、臨床応用への期待が高まっている。しかしその一方で、幹細胞維持や分化制御についての詳細なメカニズムは未知の点も多い。その中で、我々は幹細胞制御と分化のキーファクターとして転写因子 p53 に着目した。p53 は癌抑制遺伝子として古くから知られているが、近年核リプログラミングの制御や ES 細胞の初期分化への関与が明らかになっている。本研究では、p53 や核の初期化に必須の転写因子を中心に、クロマチン機能とエピジェネティクスを制御する転写因子複合体ネットワークに重要な分子を網羅的に同定することで、幹細胞制御の根底で作用する核内シグナルとクロマチン制御メカニズムに分子生化学的にアプローチし、次世代型シークエンサーによるゲノムワイドの epigenetics・トランスクリプトーム解析と有機的に結びつけることで、効率的で革新的な iPS 作製、分化制御に対する技術やにつなげる。

＜支援の内容＞
次世代型シークエンサーによる non-coding RNA を含めた転写産物のエピジェネティクス・トランスクリプトーム制御の解析について支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞
ES/iPS 細胞におけるゲノムワイドの解析を行うことにより、ES/iPS に特異的に発現する p53 依存的な non-coding RNA を含めた転写産物のエピジェネティクス・トランスクリプトーム制御の解析を行った。その中でも特に、iPS と ES に共通する長鎖の蛋白に翻訳されない RNA(inc RNA)候補が 1292 遺伝子検出された。

特に Chr5 から読み出される linc RNA に関して、ChIP-seq を合わせて施行して、その発現プロファイル解析と epigenetic パターンを解析した。TSS 解析にて転写開始点の明らかなピークを認め、RNA-seq から約 102,4kb に渡る転写産物が確認された。転写開始点領域近傍に NANOG の結合が観察され、また読み出し領域に一致して、active ヒストンコードである AcK9-H3、3meK4-H3 と同時に、repressive ヒストンコードである 3meK27-H3 のピークが認められた。これらの結果は、bivalent な epigenetic regulation を受ける linc RNA の存在を示唆していた。さらに、p53 依存的に DNA 傷害にて転写誘導を受ける linc RNA 候補を 72 遺伝子同定した。これらの linc RNA に対して、sh-RNA による機能的スクリーニングを施行した所、一部の linc RNA で ES/iPS の pluripotency が失われ、ES/iPS の多能性制御の一部のメカニズムとしてこれらの linc RNA が関与しているかの性が示唆された。

さらに我々は、ヒト ES/iPS 細胞分化制御における p53 の発現・機能解析を行った。Dual SMAD inhibition の系を用いて神経幹細胞への分化を行うと、神経幹細胞のマスターレギュレーターである PAX6 の発現上昇を認めるが、この分化の過程において、p53 が二相性に誘導されることが観察された。そこで、これらのメカニズムを明らかにするに当たり、CRISPR/Cas9 システムを用いて p53 ノックアウトヒト ES/iPS 細胞を作成し解析を行った。神経幹細胞分化における p53 ノックアウトヒト ES/iPS 細胞の解析では、PAX6 の発現が野生型に比してより早期から誘導されることが示され、p53 ノックアウトヒト ES/iPS 細胞では single SMAD inhibition でも PAX6 が強く誘導されることが示された。これらより p53 は ES/iPS 細胞の神経幹細胞への分化の過程で PAX6 を負に制御していると考えられた。このメカニズム解析では、クロマチン免疫沈降法を用いて、PAX6 のエピジェネティック修飾状態を調べたところ、p53 ノックアウト細胞では神経幹細胞の分化過程で H3K4 メチル化が野生型に比して強く誘導されることが明らかとなった。さらに、SCID マウスの精巣上脂肪に ES/iPS 細胞を打ち込み、テラトーマ形成を観察した所、p53 ノックアウト細胞では脳組織がより多くなる傾向を認めた。これらの結果は、p53 がヒト ES 細胞の神経幹細胞への初期分化において PAX6 の repressive な発現調節を介して、神経幹細胞分化を抑制している可能性を示した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
ゲノム支援によるトランスクリプトーム解析を通じて、ES/iPS 細胞における p53 依存的に作用する linc RNA の存在、それらが多能性維持に関与している可能性が明らかになった。さらに、p53 がヒト ES/iPS の三胚葉系への初期分化において、一部の分化に関与する遺伝子のエピジェネティック制御を変化させ、これらの制御を行っておる可能性が考えられた。
これらの成果により p53 を制御することにより、ES/iPS 細胞のリプログラミングや分化制御を効率よく行うことが可能性になるという展望が開けたと考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

Suzuki, S. et al., PNAS 107, 7461-7466 (2010)
Horiuchi, S. et al., J Immunol 186, 6378-6389 (2011)
Hosokawa, H. et al., PNAS 110, 4691-4696 (2013)
Hosokawa, H. et al., PNAS 110, 18626-18631 (2013)

公募支援課題：2010 年度

転写因子 p53 による新たな代謝調節機能と代謝環境応答のエピジェネティクス制御

挑戦的萌芽研究

田中 知明・千葉大学大学院医学研究院

＜背景・目的＞

糖尿病や肥満などの生活習慣病は様々な癌の発症を増加させることが明らかとされている。一方で、癌抑制遺伝子も細胞周期停止・アポトーシス・老化を介した癌抑制機能のみでなくオートファジー、エネルギー代謝、抗酸化作用など多岐に渡り細胞内代謝制御を制御していることが次々に明らかとなっており癌の枠組みを超えて生物学的プロセスに重要であると考えられている。そして癌と生活習慣病を結び付ける分子病態の根底に、p53 によるエネルギー・代謝調節機構の存在が推定されている。しかしながら、実際に p53 がどのようなメカニズムを介して生活習慣病の病態形成、更には生活習慣病に合併する癌の発症に関与しているか、その実体は十分に解明されていない。

＜支援の内容＞

我々はゲノム支援により次世代型シークエンサーを用いた ChIP-seq とトランスクリプトーム解析による細胞内代謝を制御する p53 下流遺伝子 としてグルタミン代謝を司る Glutaminase2(GLS2)や核酸代謝に関わる酵素に高い相同性を有する DPYSL4 など興味深い遺伝子をいくつか同定してきた。GLS2 は主にミトコンドリアに局在しグルタミンを加水分解しグルタミン酸を供給する細胞内代謝酵素である。更にメタボローム解析や生化学的手法と組み合わせることにより GLS2 はグルタミン酸からαケトグルタル酸を介して TCA 回路に作用し好気的回路を経て ATP 産生と酸素消費量を正に司る仕組みを明らかとし報告してきた。そこで生活習慣病と癌の接点として NASH に着目し、p53-GLS2 がこれら細胞内代謝制御を介して生活習慣病と生活習慣病に伴う NASH-肝癌発症に関与するのか GLS2 ノックアウトマウスを作成し生体内における役割を詳細に検討した。

＜支援によって得られた研究成果＞

GLS2 は In vitro において p53 下流遺伝子として癌の細胞増殖抑制、migration, invasion 抑制作用を有しており、GLS2 をレトロウイルスを用いて過剰発現させた肺癌細胞を SCID マウスの皮下に移植しても癌抑制効果を示すことが示された。

GLS2 はマウスにおいて肝臓、脳、膵臓といった細胞内代謝に深く関わっている臓器に高発現していた。更に、高脂肪食負荷したマウス肥満モデルにおいてマウスの脂肪、脂肪肝、NASH 肝で GLS2 の発現が有意に増加しており何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

そこで GLS2 ノックアウトマウスを作成し高脂肪食を負荷し GLS2 の生体内における役割を検討した。まず GLS2 ノックアウトマウスはメンデルの法則に従って生まれることが確認された。更に興味深いことに、高脂肪食負荷 GLS ノックアウトマウスは高脂肪食負荷 WT マウスに比較して明らかに肥満、耐糖能障害、高中性脂肪血症といったいわゆるメタボリック症候群を呈していた。高脂肪食 GLS2 ノックアウトマウスは脂肪肝や NASH を呈したが、肝癌の発症は認められなかった。そこでストレプトゾドシン皮下注射と高脂肪食負荷を組み合わせて NASH-肝癌発症マウスモデルである STAM マウスを作成し、肝癌における役割を検討した。その結果 STAM 発症 GLS2 ノックアウトマウスは WT に比較してより早期に肝癌を発症することが明らかとなった。NAH-肝癌発症に我々は GLS2 の抗酸化作用が重要な役割を果たしているのではないかと推定し、現在抗酸化剤 NAC を用いて更に検討をすすめている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

生体内において p53 によって制御されるグルタミンのマスターレギュレーターである GLS2 は生活習慣病の発症、更には脂肪肝-NASH-肝癌発症に深く関与することを見出した。NASH は生活習慣病の増加に伴い発症数は増加しているが、NASH の発症機序は不明な点が多く、確定診断には侵襲的な肝生検が必要である。更に NASH は肝硬変・肝癌への進行を防ぐため生活習慣病の改善に加えて、インスリン抵抗性改善薬ピオグリダゾンやビタミン E などの薬物治療が行われているが、現状では NASH に対する有効な治療法がないことが大きな問題となっている。よって GLS2 の NASH-肝癌発症における詳細な分子病態の解明は新しいタイプの治療開発に結び付く可能性を秘めている。また近年グルタミン代謝やαケトグルタル酸などの細胞内代謝酸物がエピジェネティック制御をも司っていることも徐々に明らかとなってきており抗酸化作用のみでなく今後その作用際なメカニズム解析につき検討をすすめていく予定である。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2010 年度

パーソナルゲノム解析に基づく ALS の疾患関連遺伝子探索と病態解明

新学術領域研究

田中 章景・名古屋大学大学院医学系研究科　現所属；横浜市立大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、運動ニューロンが特異的に障害され変性脱落する神経変性疾患であり、進行性の筋萎縮と筋力低下をきたし、発症から平均 3-4 年で死亡または人工呼吸器装着が必要となる疾患である。ALS はアルツハイマー病やパーキンソン病に比べて患者数は少ないものの、その重篤さと患者および家族に課せられる過酷な運命から、難病中の難病と言われており、その克服は喫緊の課題となっている。我々は、ALS の病態をゲノム解析から明らかにすることを目指し、患者 DNA 集積のためのシステム構築を推進してきた。2006 年より名古屋大学神経内科を中心に 30 施設以上が参加する全国規模の Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS)を立ち上げ、DNA、株化細胞、経時的臨床情報の収集を行ってきている。すでに 1000 例を超える JaCALS 検体リソースと前向き臨床情報を集積しており、これらを網羅的に解析し ALS の病態解明、治療法開発を目指す。

＜支援の内容＞

ALS のほとんどが孤発性であり、家族性のものが占める割合は 5-10%と決して高くはない。しかし、近年同定された家族性 ALS の病因分子 TAR DNA binding protein 43 kDa(TDP-43)は、孤発性 ALS の運動ニューロンにおいて、その細胞内局在が核内から細胞質へと変化しユビキチン陽性封入体の主要構成成分となっていることが明らかにされるなど、孤発性 ALS にとっても極めて重要な病態関連分子であることが示されている。新たに家族性 ALS の病因遺伝子を同定することは、孤発性 ALS 解明のためにも非常に重要であると考えられる。そこで、我々が遺伝子検体や臨床情報を集積してきた家族性 ALS の 6 家系、患者および非発症者をあわせた 11 名より DNA の提供を受け、本ゲノム支援によるゲノム解析の同意を得て、平成 22 年度のゲノム支援により次世代シークエンサーを用いたエクソーム解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

解析を行った 11 名において検出された全 SNV の数は平均して各々約 450,000 程度であり、このうち既知の多型を除外した rare なものが約 30,000 程度、そしてそのうち、非同義置換やスプライス部位の変異は約 400 程度明らかになった。一方、indel については、約 35,000 程度が同定され、そのうち既知の多型を除外した rare なものが約 2,500、コーディング領域のあるものが約 35 前後であった。そして、各々の家系について、遺伝様式、発症者・非発症者による絞り込みを行った。この結果、家系によって違いはあるが、サンプル数が比較的確保できている家系については病因遺伝子候補を SNV で数十カ所、indel で数カ所まで絞り込んだ。

支援により得られた結果を発展させるべく、支援終了後も家系内のサンプル集積を進めたが、すでに死亡していたり、協力が得られないなどの問題のため、さらなる絞り込みができるところには至っていない。他の家族性神経疾患と異なり、ALS は発症から死亡までの期間が短く家系内発症者がすでに死亡していることが多く、また極めて重篤な疾患であるため、協力を依頼しても、家族性であることが同胞に伝わるのを恐れて思うようにサンプル収集が進まないといった遺伝性難治性疾患特有の問題がある。家族性 ALS では、その病因遺伝子も heterogeneous であることからも、今後も新たな家系を発掘して解析することで、複数家系に共通する変異を見出すことができればと考えている。支援を受けてからすでに 4 年が経過しているが、そのデータは十分に活用されており、今後も新たな ALS 原因または関連遺伝子の同定につながることが期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

我々が支援を受けた平成 22 年度当時は、エクソームシークエンスに要するコストは現在よりも遙かに高額であり、個々の研究室の限られた予算においてエクソームシークエンスを行うことには大きな困難を伴った。疾患の特異性も影響し、最終的に当初目指していた家族性 ALS 新規原因遺伝子の同定にまでは至っていないが、今後新たな家系の解析により得られたデータと比較検討することで、新たな発見につながる可能性がある。さらに、これらの経験をもとに、現在、孤発性 ALS に関してもエクソームシークエンス解析を推進している。現時点において 600 例以上のエクソームシークエンスが終了しており、順次データ解析を進めているところである。エクソームシークエンスデーターをもとに構築された日本人正常コントロールのデータベースである HGVD、さらには全ゲノムシークエンスデータをベースとした東北メディカル・メガバンク機構が公開している日本人正常コントロールデータとの比較検討を行い孤発性 ALS の発症の原因となる変異を解析している。また、前向き臨床情報を活用した ALS 病態関連遺伝子の探索など、ALS 病態解明に向けたゲノム研究が現在も進行中である。

支援を通じて、エクソーム解析の威力を実感するとともにサンプル収集の重要性を再認識することができ、ゲノム研究推進に向けての基盤を構築することができた。

＜支援成果公表リスト＞

Nakamura, R. et al., Neurobiol Aging. 2015 Dec 7. [Epub ahead of print]

公募支援課題：2013 年度

植物に共生するメタノール資化性細菌の多様性と共生機構の解明

若手研究（A）

谷 明生・岡山大学資源植物科学研究所

＜背景・目的＞

Methylobacterium 属細菌は植物が放出するメタノールを利用して植物表面細菌の 10-20%を占めるほど優占化し、植物の生育を促進する。促進に関与するとされる植物ホルモンの合成能、無機物（リン、鉄等）の供給能があることが活性レベルで分かっているが、促進の詳細なメカニズムはよく分かっていない。また本属細菌はメタノールを酸化する酵素、メタノール脱水素酵素（MDH）を二つもち、それぞれカルシウムとランタノイド元素に依存する酵素であることが分かっている。この両者の金属に依存した発現や二つ存在する意義は全く分かっていない。

＜支援の内容＞

本課題では申請者が分離した、エゾスナゴケからの分離菌 *M. aquaticum* 22A 株のドラフトゲノム情報をフィニッシングして、植物との相互作用に重要な遺伝子のゲノム上の位置関係をはっきりさせ、今後の機能解析に利用する。また、22A 株をモデルとしてカルシウムとランタノイド存在下でメタノールに生育した際の網羅的トランスクリプトームを行い、金属の存在により変化するメタノール代謝経路遺伝子やその制御に関わる因子の同定に結びつける。モデル植物としてシロイヌナズナを用い、22A 株と共生時のトランスクリプトームも計画したが RNA 量が不足したため実験を行っていない。

＜支援によって得られた研究成果＞

①22A 株ゲノムのフィニッシング

すでに得られていたドラフトゲノムは contig 数が 500 と寸断されており、遺伝子の位置関係を掴みかねていた。454 と Illumina のリードを加え、47x カバレージとし、ギャップを PCR で埋めていただきフィニッシング頂いた。

トータルゲノムは 7.56 Mb、プラスミドは５つであることが分かった。PGAP, MiGAP によるアノテーションを行い 6944 の CDS を見いだした。リボゾーム RNA オペロンは 11、tRNA 遺伝子は 95 個存在した。MDH をはじめメタノール代謝に関わる酵素遺伝子群、PQQ 合成酵素遺伝子、サイトカイニン（t-zeatin）合成遺伝子、エチレン合成の阻害に関わる ACC deaminase 遺伝子, シデロフォア合成遺伝子、また運動性に関わるフラジェリン遺伝子、Type VI 分泌系遺伝子等が見いだされた。なお窒素固定、Type III, IV 分泌系は見いだされなかった。

②カルシウム、ランタノイド存在下メタノール生育時の 22A 株の RNA-Seq 解析

カルシウム及びランタノイドとして、ランタン、ホルミウム、ルテチウムの存在下で炭素源としてメタノール、及びコハク酸を用いて生育した菌体 RNA を用いて全て 3 連で RNA-Seq 解析を行っていただいた。なお RNA は riboZero によりリボゾーム RNA を除いた。リードデータを遺伝研のサーバーにある Maser で解析した。リードは①によって得られたゲノムに BWA でマッピングした。rRNA にマップされたリードを除き CDS ごとの FPKM を計算した。

まず注目されたのはカルシウム(Ca)依存の MDH である MxaF とランタノイド(La)依存の XoxF であった。これらはそれぞれの金属の存在に完全に依存して発現しており、また両金属が存在すると XoxF の発現が優先していることから、本属細菌はランタノイドを好んで利用していることがうかがえた。MDH の産物であるホルムアルデヒド以降の代謝に関わる遺伝子の発現に関してはほとんど変わらず、金属は主にメタノール酸化にのみ関わっていることが分かった。MxaF は Ca を分子内に結合するための多くのタンパク質を必要としており、それらが Ca 存在下で誘導されていることも見て取れた。また La で特異的に発現量の高い遺伝子の多くの機能は不明なものが多かった。

研究のモデルとして用いている 22A 株のゲノムが明らかになり、RNA-Seq 解析データはメタノールとそれ以外の炭素源への生育時の大きな遺伝子発現変化と、Ca,La による特異的な変化が見られ、今後の研究に非常に有益な情報基盤となった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本菌ゲノムの GC 含量は平均 69.1%であるが、La で高発現する CDS には GC 含量の低い(<60%)CDS が多いことが分かった。これらは GC 含量が大きく異なることから外来遺伝子であると考えられた。La の存在が RNA-Seq の解析自体に影響したのでなければ、本属細菌のゲノムにコードされる外来遺伝子はホストとなる植物内で重要であるという報告もあることから、それらが La 存在下で高発現することは植物との共生にも何らかの意味があると考えられた。今後再現性と transcript 構造を明らかにしてタンパク質をコードしているかどうかなど検討していく予定である。このようにゲノム支援、RNA-Seq 支援によって新規な現象の genome, transcriptome データ基盤ができあがり、希土類応答遺伝子と植物との共生の関わりの解析へと新たな足がかりが得られている。

＜支援成果公表リスト＞

Tani A., et al., Genome Announc 3(2) e00266-15 (2015)

公募支援課題：2010 年度

ショウジョウバエの記憶形成回路の構造および機能発現の分子基盤

新学術領域研究

多羽田 哲也・東京大学分子細胞生物学研究所

＜背景・目的＞
ショウジョウバエ長期嗅覚記憶形成には新たな遺伝子発現が必要であることが知られている。本研究では①長期記憶形成時に転写活性化される因子の同定、②記憶形成の中心的な分子経路である cAMP 経路を長期記憶形成特異的に修飾する分子機構の解明、の２点に焦点をしぼり、長期記憶形成機構を解明することを目的としている。具体的にはショウジョウバエ嗅覚記憶において中心的な役割を果たすキノコ体神経細胞で記憶により発現変動する遺伝子の同定を行う。

＜支援の内容＞
ショウジョウバエに対して匂いと電気刺激を繰り返し提示することにより、長期嗅覚忌避記憶（long-term-olfactory-aversive-memory）を形成させる。一定時間置いた後に解剖しキノコ体を摘出する。Total RNA をキノコ体から抽出し、逆転写・PCR 増幅により二本鎖 cDNA を作成する。完成した cDNA をシークエンシングすることにより、キノコ体で発現する遺伝子を網羅的に調べる。さらに、学習前後で比較することにより、キノコ体において記憶形成依存的に上昇する遺伝子を網羅的に調べる。長期嗅覚記憶の条件付けには、間隔を空けて刺激提示を繰り返す spaced training と間隔を空けずに繰り返す massed training があり、前者により CREB 依存性の長期記憶が形成される。本研究では spaced sample と massed sample を比較することにより、長期記憶に特異的な遺伝子変動を抽出しようと考えた。

＜支援によって得られた研究成果＞
これまでにシークエンシングにより、学習後１２時間の spaced sample＝３ペア、学習後６時間の spaced sample＝２ペア、学習後６時間の massed sample＝２ペア、における発現解析を行った（学習したサンプルと、何も刺激を加えていないコントロールのサンプルを一対として、解析時の「ペア」と呼ぶ）。12 時間後のサンプルについては、十分なタグ数が得られなかったため、６時間後のサンプルを解析した。まず６時間後の spaced sample において①発現上昇している、②発現レベルが高い、③記憶形成に関わることが知られている蛋白質の機能ドメインをもつ、という条件を設定し遺伝子を抽出した。さらにそれらの遺伝子について、④massed sample で減少しているあるいは変化しない、ものを抽出し３０遺伝子を特定した。これらの遺伝子について、*in situ* hybridization 法と Q-PCR 法を用いた確認実験を行った。

cAMP 経路を制御する因子

ショウジョウバエ記憶形成過程では cAMP 経路が主要な役割を持つと考えられており、これまでに Adenylyl Cyclase (*rutabaga* 遺伝子)や PKA などについて詳細な解析が行われてきた。本研究では、cAMP 経路を記憶形成の中心過程と見立て、長期記憶形成時に cAMP 経路を修飾する可能性のある因子を調た。Phosphodiesterase（PDE）をコードしている *dunce* 遺伝子は cAMP 量の調節を介して記憶形成に関与していると考えられているが、長期だけではなく短期記憶形成時にも働く。ショウジョウバエには少なくとも 6 つの PDE タンパクが存在するが、Dunce 以外については神経機能に関与するかどうかは不明である。そこでショウジョウバエ PDE 遺伝子についてキノコ体での発現量をシークエンシングの結果を用いて比較したところ *pde1c* がキノコ体で発現することがわかった。*in situ* hybridization を行ったところ *pde1c* がキノコ体で強く発現することを確認できた。さらに *pde1c* 遺伝子領域のトランスポゾン挿入系統を用いて記憶アッセイを行った結果、短期記憶は正常な一方で、spaced training 後２４時間における長期記憶形成が強く抑制されていた。このことは、長期記憶形成時に特異的に働くような cAMP 経路制御機構の存在を示唆している。*pde1c* 遺伝子と記憶表現系との対応関係についてさらに解析をすすめることで、記憶が固定化される機構について新たな知見が得られると期待される。

本プロジェクトによって網羅的に同定された遺伝子群は過去の報告とは必ずしも一致しない。長期記憶形成の手法が必ずしも完全に同一ではないことによる可能性もあるが、結論を導くには試行数もデータの質も充分ではない。ショウジョウバエの脳の中から該当する数千個の神経細胞を手作業で分取し、そこから RNA を抽出する方法を取ったために、十分な細胞数を確保することができず信頼性の高い結果を得られなかった。また記憶形成を扱う以上、多量な個体から出発することも難しく、結果的には当時の私たちの技術ではかなり困難なプロジェクトであった。本支援ではこれ以上継続することができず残念であった。最新の細胞バーコードラベル法などでこの課題にもう一度挑戦してみたい。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
pde1c が長期記憶に機能することは新たな知見といえる。キノコ体神経で発現する遺伝子の（ある程度の）リストが得られたことで記憶の生理学を研究する基礎的なデータを得られたことは、未だ明らかにされていないトランスミッターの同定などに寄与する可能性が考えられる。

＜支援成果公表リスト＞
該当なし。

公募支援課題：2013 年度、2014 年度

単核貪食細胞群の分化機構に関する研究

基盤研究（B）

田村 智彦・横浜市立大学医学部免疫学

＜背景・目的＞

少数の細胞から高精度のクロマチン免疫沈降全ゲノムシーケンス（chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq）を行なうことは，ゲノム医学研究においても最も重要な課題の一つと思われ，多くの研究者や企業がこれに取り組んでいる。これは，ごく微量の細胞しか得られない生体内の細胞，特にマウスの組織幹細胞や前駆細胞を扱うことの重要性に起因する。個体の生命現象を知る上で，遺伝子欠損動物を容易に作製できるマウス生体由来細胞での転写因子やヒストン修飾などの動態をゲノム規模で知る事は極めて重要であり，その研究結果の生理学的意義は，細胞株を用いた研究にくらべ遥かに高い。

単核貪食細胞（単球・マクロファージ，樹状細胞）は自然免疫及び獲得免疫の誘導に必須の免疫細胞であり，造血幹細胞から中間的な前駆細胞段階を経て産生される。単核貪食細胞の分化・産生の分子メカニズムを明らかにするためには，造血幹細胞や前駆細胞においてヒストン修飾や転写因子結合のゲノム規模での挙動を ChIP-seq を用いて解析することが極めて重要であるが，これらの細胞は生体内に少数しか存在しないため解析は困難であった。本支援課題ではまず単核貪食細胞前駆細胞の ChIP-seq 解析を行うために，少数の細胞で ChIP-seq を行う方法を開発することを目指した。さらに微量細胞による ChIP-seq 技術を用いて，単核貪食細胞の前駆細胞やそれに由来する成熟細胞における様々な種類のヒストン修飾や転写因子の結合のゲノム規模解析を行うことを目的とした。

＜支援の内容＞

2013 年度は単核貪食細胞の前駆細胞を用いて ChIP-seq を行うために，私達は転写因子 IRF8 やヒストン修飾の ChIP の条件検討を行った。そしてゲノム支援・鈴木穣先生に ChIP した DNA を次世代シーケンサーによる配列解析を行って頂いた。サンプル調整には困難を伴ったが，10 万個以下という今までの標準的なプロトコールのおよそ 10 分の 1 の細胞数で ChIP-seq が可能になった。微量細胞を用いた ChIP-seq 技術がある程度現実のものとなってきたことから，2014 年度には技術をさらに確実なものとするとともに，別の転写因子やヒストン修飾さらに複数の単核貪食細胞群前駆細胞（野生型マウス，転写因子遺伝子欠損マウス）や前駆細胞が産生する成熟貪食細胞を含めて包括的に ChIP を行い，DNA 配列解析を行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

単核貪食細胞分化における前駆細胞から成熟細胞までのヒストン修飾の動態が明らかになった（論文投稿準備中）。特に遺伝子発現とエンハンサープライミング・活性化との関係を解析する中で非常に興味深いデータが得られた。また転写因子 IRF8 や PU.1 の ChIP-seq も行い，これら転写因子が単核貪食細胞の前駆細胞においてどのような遺伝子に結合するのか明らかになった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

微量細胞による ChIP-seq が可能になったことから，生体内に存在する様々な希少細胞での ChIP-seq 解析を進めていきたいと考えている。最近，非常に少数の細胞を用いた ChIP-seq を可能にする方法がいくつか報告されているが，そのデータと私達のデータの比較を行ったところ，私達のほうが明らかにデータの質が高いことがわかっている（未発表データ）。免疫系の前駆細胞は数が少ないため，今回開発した技術が今後特に大きな力を発揮すると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

現在投稿準備中です。

公募支援課題：2015 年度

単核貪食細胞系の分化における遺伝子発現制御機構の包括的解明

基盤研究（B）

田村 智彦・横浜市立大学医学部免疫学

＜背景・目的＞

造血における分化は多段階に生じるが，各分化段階の細胞集団は必ずしも均一ではなくいくつかの亜集団によって構成されていることが，次々と明らかにされている。特に多分化能を持つ造血幹細胞・前駆細胞に，特定の細胞種のみしか産生しない細胞が相当数含まれていることがわかってきている。ただしこの「早期の運命決定」の分子機構は全く不明である。

私達は自然免疫や獲得免疫において中心的役割を担っている単核貪食細胞（単球・マクロファージ，樹状細胞）の分化・産生のメカニズムについて研究を行ってきた。その中で私達は造血の上流に位置し多分化能を持つ前駆細胞の一部に他の分画よりも高い単核貪食細胞分化能を持つ集団が存在することを見出した。しかしながら，この前駆細胞集団も単核貪食細胞のみに分化するわけではないことから，私達はこの細胞集団もまだ不均一であると推測している。そこで今回ゲノム支援・鈴木穣先生の協力を得て，造血前駆細胞の単一細胞 RNA-seq を行なうことで，基盤 B 研究の対象である単核貪食細胞の分化により深く切り込み「造血における早期コミットメント」の分子機構に迫ることができると考えている。そして最終的には「細胞集団の不均一性を作り出している仕組みとその生物学的意義」を明らかにしたい。

＜支援の内容＞

単核貪食細胞の分化における遺伝子発現制御と早期コミットメントの分子メカニズムを理解するために，多分化能を持つ造血前駆細胞における単一細胞 RNA-seq に関する支援を行って頂く。具体的には私達が単一細胞から合成・増幅した cDNA の NGS ライブラリーの作成と DNA 配列の決定を行って頂く。サンプル数は合計 400 サンプル程度の予定である。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在単一細胞から得られた cDNA の NGS ライブラリー作成と DNA 配列決定を行っていただいている。データが得られ次第，速やかに解析を行いたい。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

私達の研究室ではこれまでに単一細胞 RNA-seq を行った経験がなかった。最先端技術の導入には様々な障壁を乗り越える必要があるが，研究課題がゲノム支援に採択されたことが契機となって，単一細胞 RNA-seq 解析を行うための知識や機器を修得・準備することに繋がった。これから得られるデータを解析し，速やかに発表できるように努めたい。

＜支援成果公表リスト＞

まだデータが得られておらず支援の成果はないが，できるだけ早い段階で学会発表や論文発表ができるように努力したいと考えている。

公募支援課題：2014～2015 年度

母性 mRNA の安定的貯蔵機構

基盤研究（C）

千葉 和義・お茶の水女子大学ライフサイエンス

＜背景・目的＞

初期発生の開始に際して、卵内母性mRNAのポリA鎖は伸長し、翻訳が開始される。本研究分野の第一人者Richterらは、主にアフリカツメガエル卵を用いて、次のモデルを提唱している。『ホルモン刺激で卵母細胞が減数分裂を再開するときに、mRNAに結合したCPEB（cytoplasmic polyadenylation element（CPE）-binding protein）がリン酸化されると脱アデニル化酵素（ポリA鎖を短くする酵素）が働かなくなる。その結果、ポリAポリメラーゼによりポリA鎖が伸長する』。現在ひろく信じられているこの説によれば、GV卵でポリAが伸びないのは、脱アデニル化酵素がポリA鎖を削っているからだ。申請者らが、ヒトデ卵母細胞サイクリンBのmRNAについて調べたところ、アフリカツメガエルと同様にCPEBはGVBD時にリン酸化され、ポリAが伸長することが明らかになった。すなわちGVBD前のポリA鎖長は10塩基程度であり、GVBD後にCPEBがリン酸化されると数十塩基に伸びていた。一見Richterの説に合っているようだ。しかし、どのような仕組みでGV卵のポリA鎖長が10塩基程度に保たれているのか、なぜ脱アデニル化酵素によって、もっと削られないのかは、明らかでない。この問題は、アフリカツメガエル研究者にも、申請者が知る限り、取り上げられていなかった。分かりやすく言えば、今まで誰も不思議に思わなかったのだ。なぜ母性RNAの3’末端の短いポリA鎖が安定的に維持され得るのか、未だ不明である。

申請者らは、GV 卵における母性 RNA の安定的な維持機構を解明するためには、母性 RNA の 3’末端の構造を厳密にシークエンスする必要があると考えた。そのためには、ごく普通に用いられているポリ T をプライマーとした cDNA 作成によるシークエンス法は不適切だ（なぜならアニーリングが完全に末端からは必ずしも始まらないから）。そこで母性 RNA の 3’末端に RNA リガーゼを用いて DNA アダプターを結合させた。そしてアダプター配列から cDNA を合成して、RT-PCR 後にクローニング、そして 3’末端の完全な構造をシークエンスした。その結果、GV 卵のサイクリン B の mRNA の短いポリ A 鎖にはさらに 2～7 個のポリ U が結合しており、ホルモン処理でその U がトリミングされポリ A 伸長が起こることが明らかになった。そこで本研究では、サイクリンだけでなく他の mRNA が U 化されているか、他の動物においても U 化されているかどうかについて、次世代シークエンサーを用いて解析する。

＜支援の内容＞

お茶の水女子大学では次世代シークエンス用のサンプル調整法を開発・作成し、東京大学柏の葉キャンパス・鈴木穣先生に Illumina シーケンサーを用いてデータを取得いただき、そのデータの解析は東京工業大学・伊藤武彦先生にご協力いただいた。リボゾーマル RNA を除く、または除かずに調整した RNA3’末端に Takara 社製のビオチン付 3’ アダプターをライゲートし、RNaseT1 で断片化、ランダム 15 塩基を含む 5’ アダプターを設計・合成・ライゲートし、PCR で増幅して次世代シークエンサー用のサンプルとした。その結果、次項に示すように、U 化される mRNA と U 化されない mRNA が卵母細胞に存在することが明らかになった。しかしリードの読み始めが 5’ アダプターでなく、予想外の下流配列から始まっていたことなどから、シーケンスのクオリティが低かった。そこで 5’ アダプター相同性の高い 6 塩基を除いたシークエンス用プライマーを作成していただき、再度シーケンスしていただいたが、やはりシーケンスのクオリティは十分に確保できなかった。その原因として、リードの読み始めが、塩基配列の共通なアダプター配列となっていることが考えられた。シーケンサーの特性として、読み始めのリードが同じ配列シグナルを出すことは好ましくない。そこで、さらに 5’アダプターと 3’アダプターを改良してサンプル作成を行っている。

＜支援によって得られた研究成果＞

もっとも頻度が高かった、U 塩基 2 個の修飾を受けているリードに関して、ヒトデ RNA-seq contig のデータをマッピングしたところ、 バッチとサンプルによる差はあるが 700-2000 種類の contig にマッピングされた。したがって U 修飾を受ける mRNA は、ヒトデ未成熟卵内に多様に存在していることがわかった。U 塩基を持たないリードについても同様に確かめたところ、上位に出てくる RNA-contig ID は、U 修飾を受けているリードと受けていないリードで大きく異なることから、 U 修飾は mRNA 特異的に起きるものであることが明らかになった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

3’adapter 側には mRNA の poly(A)鎖にあたる A の連続配列があるために、読み始めの配列が A のみになり、よい結果が得られなかった。すなわち 5’アダプターにランダム 15 塩基を加えるよりも 3’adapter 側にランダム 15base を組み込むほうが、よい結果が得られると考えられた。読み始めにバリエーションの高い RNA 断片の配列となるようにするためには、3’側がランダムアダプターであるのが適切であり、ひきつづき手法を開発中である。

＜支援成果公表リスト＞

Ochi H, Saki A, Tachibana K, Hara M., and Chiba K. Block of Cdk1-dependent poly(A) elongation of *cyclin B* mRNA in MI-arrested starfish oocytes is released by intracellular pH elevation upon spawning. *Mol Reprod Dev* 83 79-87 (2016)

公募支援課題：2013 年度

アカハライモリのモデル動物化を加速する分野横断研究：技術・情報基盤構築と実践適用

基盤研究（A）

千葉 親文・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

アカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）はそのユニークな細胞特性や系統的位置から生物学の歴史に残る数多くの発見に貢献してきた我が国を代表する水棲動物（両生類）である。Japan Newt Research Community (JNRC)は、イモリ研究の最重要課題の一つである「資源化」と「モデル動物化」を推進すべく、大規模屋外養殖と実践レベルのトランスジェニック（TG）を実現化し、さらにはゲノム解読を見据えた新規アルゴリズムの開発にも着手してきた。我々は現在、これらの資源・技術・情報基盤研究を、イモリを用いる様々な研究分野に展開すべく、TG を適用する応用技術の開発と、利用価値の高い遺伝子情報の収集（データベース構築）を進めている。

遺伝子情報の収集活動においては、千葉県鴨川市系統イモリを用いて、すでに精巣（通常）、輸卵管、卵巣、胚（16 細胞期、神経胚、尾芽胚）、再生眼球（再生初期の網膜と水晶体）の mRNA-seq 解析を終了し、現在、精巣（アポトーシス現象が観察される状態の組織）、嗅上皮・鋤鼻上皮、再生肢（初期再生芽）の解析を進めている。しかし、これだけでは情報が不十分である。コミュニティ全体の研究展開を推進するためは、アカハライモリに発現する全ての遺伝子情報を網羅した reference transcriptome を構築する必要がある。

そこで、JNRC は本支援のもと、アカハライモリ reference transcriptome の構築を目指す。2013 年度は、遺伝子情報の網羅性を確保するため、正常・再生組織（脳、網膜、水晶体、心臓、脊髄）と呼吸器系組織、消化器系組織の mRNA-seq を行う。

＜支援の内容＞

再生眼球（術後 20 日）、再生眼球（術後 25 日）、再生眼球（術後 30 日）、再生眼球（術後 50 日）、再生脳、再生心臓、水晶体、内臓器官（肺、腸、膵臓、肝臓、腎臓）の mRNA-seq（Illumina HiSeq200-2500; 100bp paired-end read）。

＜支援によって得られた研究成果＞

アカハライモリ reference transcriptome の構築に十分な情報を得ることができた。具体的には、我々 JNRC 側が精巣（正常、アポトーシス）、輸卵管、卵巣、胚（16 細胞期、神経胚、尾芽胚）、再生眼球（術後 0-14 日）、正常肢、再生肢（再生芽）、嗅上皮・ジョビ上皮から約 13.6 億リードを、ゲノム支援側が、再生眼球（術後 20 日、25 日、30 日、50 日）、再生脳、再生心臓、水晶体、内臓器官（肺・腸・膵臓・肝臓・腎臓）から約 8.7 億リードを取得した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

収集した全リード情報から精度と網羅性の高い reference transcriptome ができることになる。これは、イモリがもつ遺伝子の種類や数を予測するばかりでなく、マッピングによる遺伝子の発現動態解析やキャプチャー法によるゲノム断片（転写制御領域やイントロン）の取得・解析、さらにはゲノム本体（n=12 ; 約 20Gbp）の解析に向けて有用なツールになると考えられる。我々はこれを利用して、組織ごとの転写産物予測、イモリ特異的遺伝子予測、Non-coding RNA 予測を行い、2014-2015 年度にはこれらの情報をまとめたデータベースを構築・公開する。

また、我々は同時にこれらトランスクリプトーム情報の各研究現場への実践適用を進めており、2014 年度からこの取り組みを本格化させる。すでに、対象とする生命現象に関わる候補遺伝子の探索や全遺伝子の発現動態の比較、あるいは種間比較による進化過程の考察に利用され始めている。例えば、千葉（筑波大）は、再生特異的なイモリ固有遺伝子（タンパク質をコードすると推定される）の候補を 14 個までに絞り込んでいる。また、イモリが正常な水晶体を 20 回繰り返し再生できることを証明しつつある（Tsonis・江口との共同研究）。渡邉（山形大）は、受精過程に関わる遺伝子比較から体内受精様式の進化について考察を始めている。中田（日本獣医生命科大）は性フェロモン‘ソデフリン’に対する嗅受容体の遺伝子を絞り込んでいる。

＜支援成果公表リスト＞

Endo, Y. et al. Proceeding of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms (BIOSTEC 2014), ISBN 978-989-758-012-3, 215-220 (2014).

公募支援課題：2014 年度

アカハライモリのモデル動物化を加速する分野横断研究：技術・情報基盤構築と実践適用

基盤研究（A）

千葉 親文・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

アカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）はそのユニークな細胞特性や系統的位置から生物学の歴史に残る数多くの発見に貢献してきた我が国を代表する水棲動物（両生類）である。Japan Newt Research Community (JNRC)は、イモリ研究の最重要課題の一つである「資源化」と「モデル動物化」を推進すべく、大規模屋外養殖と実践レベルのトランスジェニック（TG）を実現化し、さらにはゲノム解読を見据えた新規アルゴリズムの開発にも着手してきた。我々は現在、これらの資源・技術・情報基盤研究を、イモリを用いる様々な研究分野に展開すべく、TG を適用する応用技術の開発と、利用価値の高い遺伝子情報の収集（データベース構築）を進めている。

遺伝子情報の収集活動において、我々はアカハライモリの全 mRNA 情報を網羅した reference transcriptome データベースの構築を目指している。2013 年度支援による共同研究では、mRNA-seq（Illumina HiSeq 2000-2500；100bp paired-end read）により、我々JNRC 側が精巣（正常、アポトーシス）、輸卵管、卵巣、胚（16 細胞期、神経胚、尾芽胚）、再生眼球（術後 0-14 日）、正常肢、再生肢（再生芽）、嗅上皮・ジョビ上皮から約 13.6 億リードを、ゲノム支援側が、再生眼球（術後 20 日、25 日、30 日、50 日）、再生脳、再生心臓、水晶体、内臓器官（肺・腸・膵臓・肝臓・腎臓）から約 8.7 億リードを取得した。今年度は、これらの情報をもとに *de novo* assembly により「組織特異的 transcriptome」および「全 transcriptome」を構築する。また、これらを参照配列として、mRNA-seq/マッピングによる動的 transcriptome 解析を試みる。

＜支援の内容＞

幼生心臓（変態前）と成体心臓（変態後）の mRNA-Seq、および単離した網膜色素上皮（RPE）細胞とリプログラム中の RPE 細胞（RPE stem cell）の増幅 cDNA の次世代シーケンス（いずれも Illumina HiSeq 2000-2500；100bp paired-end read）。

＜支援によって得られた研究成果＞

全ての read データを用いて、Trinity（version 20131110）による *de novo* assembly を試行した結果、総数 697,670（N50: 2,380 b）のコンティグを得ることができた。現在、情報学的解析により他の脊椎動物との比較を進めており、近い将来、アカハライモリの「全 transcriptome」として学術雑誌に報告する計画である。同時に mRNA-seq を行った個々の組織サンプルにおいても transcriptome を構築した。これらの組織特異的 transcriptome は、各研究現場の必要性にもとづき構築したものでもあり、言わば個々の「生命現象に特化した transcriptome」である。

Reference transcriptome を利用した遺伝子発現変動解析の先駆けとして、変態前後の心臓から mRNA-seq により、それぞれ約 1 億リード得た。また、リプログラミング前後の RPE 細胞それぞれ 100 個から REPLI-g SensiPhi Polymerase システムを用いて cDNA を合成・増幅し、シーケンスした（RPE 細胞、4 試行；RPE stem cell、6 試行；合計、約 5.6 億リード）。現在、組織特異的トランスクリプトームと全トランスクリプトームを参照配列として、これらのマッピング解析を進めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本事業によって得られデータは全てコミュニティー内で共有している。一般の利用者に対しても read 情報は DDBJ/NCBI を通じて（2013 年度成果報告）、一部の transcriptome は JNRC が管理するサイト IMORI（http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/）において公開した（全ての transcriptome は 2015 年度中に公開の予定）。すでにコミュニティーにおいて、遺伝子発現解析や標的・新奇遺伝子のスクリーニングのために利用が始まっている。生殖と再生の分野においては、論文を合計 3 本発表した。具体的には、両生類の受精メカニズムの多様化の進化的道筋の解明や、成体イモリ網膜再生の主幹メカニズム（リプログラミング）の解明に繋がった。また、発生分野では、TALEN/CRISPR によるゲノム編集技術の導入と評価、変態分野では、変態時のダイナミックな組織リモデリングに関わる幹細胞の動態解析、再生分野では、肢の再生時に発現が増加するイモリ固有遺伝子の単離（現在までに 2 つを同定）と機能解析、20 回繰り返し再生させた水晶体の品質評価、生理分野では、水陸両用の嗅覚システムの解析が進んでいる。

このように、普遍性と多様性の両方の分野において、これまで困難であった遺伝子レベルの研究にようやく路が開かれた。

＜支援成果公表リスト＞

Yokoe, M. et al., Int. J. Mol. Sci. 15, 15210-15224 (2014)
Nakamura, K., et al., PLoS ONE 9, e109831 (2014)
Islam, M.R. et al., Sci. Rep. 4, 6043 (2014)

公募支援課題：2015 年度

アカハライモリのモデル動物化を加速する分野横断研究：技術・情報基盤構築と実践適用

基盤研究（A）

千葉 親文・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

アカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）はそのユニークな細胞特性や系統的位置から生物学の歴史に残る数多くの発見に貢献してきた我が国を代表する水棲動物（両生類）である。Japan Newt Research Community (JNRC)は、イモリ研究の最重要課題の一つである「資源化」と「モデル動物化」を推進すべく、大規模屋外養殖と実践レベルのトランスジェニック（TG）を実現化し、さらにはゲノム解読を見据えた新規アルゴリズムの開発にも着手してきた。我々は現在、これらの資源・技術・情報基盤研究を、イモリを用いる様々な研究分野に展開すべく、TG を適用する応用技術の開発と、利用価値の高い遺伝子情報の収集（データベース構築）を進めている。

遺伝子情報の収集活動において、我々は 2013-2014 年度の支援により、アカハライモリの組織特異的および全 transcriptome の構築を開始し、一部の情報を公開した。また、これらを参照配列として、マッピングによる遺伝子発現動態解析を試みるべく、変態前後の心臓、およびリプログラミング前後の網膜色素上皮（RPE）細胞に発現する mRNA のシーケンスを行った。今年度は、これらのシーケンスデータをもとに遺伝子の発現動態解析を行うとともに、様々な分野への transcriptome の実践適用（遺伝子の探索、発現動態解析、機能解析）をさらに推し進める。

＜支援の内容＞

第 3 世代と第 7 世代それぞれの精原細胞の mRNA および増幅 cDNA、再生心臓の mRNA、*Pax6* 遺伝子をノックダウンした RPE 細胞とリプログラム中の RPE 細胞の増幅 cDNA のシーケンス（Illumina HiSeq 2000-2500 ; 100bp paired-end read）。

＜支援によって得られた研究成果＞

2013-2015 年度の本支援との共同研究により、アカハライモリの組織特異的 transcriptome を 21、および 1 つの全 transcriptome（コンティグ数 : 694,138 ; N50: 2,294 b ; GC: 45.52%）を構築した。全 transcriptome は、*de novo* assembly で得られた全コンティグ（697,670）からバクテリア由来のものを除いたものである。これらの情報はアノテーション結果も含めて、JNRC が管理するデータサイト 'MORI'（http://antler.is.utsunomiya-u.ac.jp/imori/）からダウンロード可能にする（2015 年度内）。

これらの遺伝子情報は、イモリを用いる様々な分野で利用実績が上がりつつある。例えば、再生分野では、肢再生の様式が幼生期と変態後の成体で切り替わることや、肢再生時に発現するイモリ科固有の遺伝子が存在すること、水晶体が加齢や繰り返し再生に抗して若い状態を維持できること、などを明らかにした。また、イモリ TTX の由来の解明や *de novo* assemble アルゴリズムの改良にも繋がった。

2014 年度に得たシーケンスデータのマッピング・統計解析により、RPE 細胞のリプログラミング過程で発現量が有意に増減するコンティグを明らかにした。増加した 4,433 と減少した 6,871 は既知の遺伝子との相同性がなかった。この中には最も顕著な増加を示したコンティグが含まれていた。他方、相同性が認められたコンティグのうち、増加した 5,407 には、外傷応答や上皮-間葉転換、細胞周期、分化多能性に関連する遺伝子が多く含まれていた。減少した 8,372 には、RPE 細胞の生理機能に関連する遺伝子が多く含まれていた。

今年度の支援によって得られたシーケンス結果の解析は現在進行中である。これらは、精原細胞のアポトーシス（精子の品質管理メカニズムの一つ）を惹起する分子・細胞メカニズム、変態前後で変化する心臓の再生様式とそれを規定する分子・細胞メカニズム（2014 年度シーケンスデータも利用）、網膜再生の分子・細胞メカニズムに焦点を当てている。これらの研究課題は、他のモデル動物では解析困難な生命現象の解明に主眼があり、医療応用にも繋がる普遍的問題でもあるため、価値のある研究成果が期待できる。しかも、イモリの利点を活かした解像度の高い解析結果はマウス・ヒトを研究する際の「物差」として有用である。現在進行中であるが、我々はこれらの研究により標的・新奇遺伝子をスクリーニングし、独自の *in vitro* と *in vivo* の評価系により本格的な分子機能解析に繋げたいと考えている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援がなければ、アカハライモリ全 transcriptome の構築は困難であった。本事業の開始時点で 200 未満の cDNA 情報しかなかったこの動物の研究ポテンシャルは飛躍的に向上した。特に、最先端オミックス技術の適用が可能になってきたことは大きい。（再生分野では、メカニズム解明と医療応用への道筋が見えてきたと言ってもよい）。現在進めている標的・新奇遺伝子のスクリーニングと機能解析をイニシアティブとして、コミュニティー全体の研究スタイルが大きく変貌することは疑いない。全 transcriptome を得たことで、イモリゲノム（n=12, ~20 Gbp）の解読に向けて一歩踏み出せたと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

Inami, W. et al., Zool. Sci. (2016) in press
Sousounis, K. et al., eLife 2015;10.7554/eLife.09594. (2015)
Kudo, Y. et al., Toxicon 101, 101-105 (2015)
Endo, Y. et al., IPSJ Transactions on Bioinformatics 8, 2-8 (2015)
Casco-Robles, M.M. et al., Transgenic Res. 24, 463-473 (2015)

公募支援課題：2012 年度

発生過程で細胞運命を規定する転写因子の生涯にわたる発現制御機構

若手研究（B）

塚原 達也・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

脊椎動物において、DNA 低メチル化領域（Hypomethylated domain; HMD）は主に遺伝子のプロモーター領域に存在し、遺伝子の転写活性化に働くと考えられてきた。近年、ES 細胞など多能性を有する細胞において、抑制型ヒストン修飾である H3K27me3 および活性型ヒストン修飾である H3K4me2 の両者を含む HMD（K27HMD）が、発生・分化に重要な役割を果たす遺伝子上に多く存在することが明らかとなり、遺伝子発現制御における K27HMD の役割が注目されている。我々は、メダカ初期胚を用いた解析から、K27HMD には 4kb 以上の large K27HMD および 4kb 以下の small K27HMD という異なる特徴を持つサブタイプが存在し、前者は細胞の運命を規定する転写因子を、後者は発生に重要なシグナル分子をコードする遺伝子を多く含むことを明らかにした。興味深いことに、K27HMD のサイズと H3K27me3 レベルには正の相関があり、large K27HMD に含まれる遺伝子はより強く発現が抑制されていることが示唆された。また、分化した細胞において一部の K27HMD はサイズが縮小しており、そのような HMD に含まれる遺伝子は発現が上昇していることも見出した。これらの知見から、K27HMD はサイズ依存的に遺伝子発現の制御状態が変化するという可能性が考えられた。さらに、近年ほ乳類の成体において DNA のヒドロキシメチル化（5hmC）と遺伝子発現レベルに正の相関があることが明らかとなった。したがって、我々の見いだした K27HMD の縮小に 5hmC が関与する可能性がある。そこで我々は、これらの可能性を検証するためメダカを用いて RNA-seq・ ChIP-seq・DNA ヒドロキシメチル化解析を行った。

＜支援の内容＞

① RNA-seq解析（メダカ成魚肝臓、1細胞期、胞胚期（前期・後期）、前期原腸胚期）
② ChIP-seq解析（メダカ成魚肝臓におけるH3K4me2およびH3K27me3）
③ ハイドロキシメチル化解析（メダカ成魚肝臓、背側筋節、腹側筋節）

＜支援によって得られた研究成果＞

①1細胞期、胞胚期、前期原腸胚期の細胞を用いてRNA-seq解析を行い、large K27HMDとsmall K27HMDに含まれる遺伝子の発現レベルを比較したところ、1細胞期においては有為にlarge K27HMDに含まれる遺伝子の発現レベルが低かった。一方、胞胚期および原腸胚期においては同様の傾向が見られたものの統計的には有為な差を検出出来なかった。これは、メダカを含む魚類は母性RNAの影響を強く受けるために、初期胚におけるRNA-seqの結果は正確な転写量を反映しないことと、胞胚期や原腸胚期はzygotic gene activationというゲノムワイドに転写が強力に活性化する時期の直後であるためRNA-seqの結果が遺伝子のエピジェネティックな状態を必ずしも反映しないことが原因であると推測される。
②成魚肝臓において一部のK27HMDはサイズの縮小が認められることから、RNA-seq により遺伝子発現レベルとの関連を調べた。その結果、縮小が見られたK27HMDではH3K27me3のレベルも低下しており、遺伝子発現は上昇していることが明らかとなった。我々は筋節においても同様の結果を得ており、後期ステージに生じるK27HMDの縮小に伴う遺伝子発現レベルの亢進が多くの組織で普遍的に見られる現象であることを示唆した。さらに、成魚肝臓において縮小が認められないK27HMDに着目し、そのサイズと遺伝子発現レベルを比較したところ、large K27HMDにおいて遺伝子の発現が極めて低くなっており、強固に発現が抑制されていることが明らかとなった。この結果は、初期胚で示唆されたK27HMDのサイズ依存的な遺伝子抑制機能について、成体においても同様の機能有する可能性を示している。
③hydroxymethyl collectorを用いて成魚肝臓・背側筋節・腹側筋節における 5hmC 解析を行い、後期ステージに生じるDNAメチル化の一部は5hmCであることを見出した。しかしながら、ゲノムワイドな分布を詳細に解析したところ、後期ステージで生じたDNA メチル化によって K27HMD の縮小の起きるゲノム領域とそれ以外のメチル化された領域との間に5hmC レベルに差は見られなかった。したがって、後期ステージにおいて K27HMD 領域に生じる DNA メチル化は遺伝子発現の上昇を伴うが、特異的なヒドロキシ化は見受けられないことが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究より、成体における K27HMD の縮小と遺伝子発現に正の相関関係が、様々な組織において普遍的に見られる現象であることが示された。他グループの報告により DNA メチル化と H3K27me3 の拮抗関係が示唆されていること、K27HMD の縮小を引き起こす DNA メチル化が生じてもプロモーター領域は低メチル化状態が保たれることなどから、後期ステージに生じる DNA メチル化は H3K27me3 を抑制することで転写活性化状態の維持に寄与する可能性が考えられる。K27HMD には細胞の運命を制御する遺伝子が多く含まれることから、K27HMD の縮小はそれらの遺伝子の発現維持を介して細胞および組織の恒常性維持に働くという新たな仮説を得た。

＜支援成果公表リスト＞

Nakamura, R. et al., *Development*, 141, 2568-1580 (2014)

公募支援課題：2013 年度

活性型転移因子がイネのエピゲノムにおよぼす効果の解明と育種への応用

基盤研究（B）

築山 拓司・京都大学大学院農学研究科

＜背景・目的＞

近年、塩基配列多型に基づくアレルのみならず、エピジェネティックな修飾の違いに基づくエピアレルを利用した育種法の開発が進められている。われわれは、水稲品種「銀坊主」のγ線照射後代で得られた細粒突然変異系統 IM294 の易変性の解析過程において、動植物を通じて初めて転移活性をもつ MITE (miniature inverted-repeat transposable element)、*mPing* を同定した。われわれのこれまでの研究から、*mPing* は近傍の遺伝子の発現にストレス応答性を付与すること、*mPing* のメチル化状態がストレスによって変化する場合があること、および *mPing* は宿主のエピジェネティックな制御の影響を受けにくいことが明らかになっている。本研究は、*mPing* が宿主のエピゲノムにおよぼす効果を解析するとともに、*mPing* の転移と宿主のエピジェネティックな制御の関係を解明することで、転移因子を用いたエピゲノム育種の基盤を構築しようとするものである。

＜支援の内容＞

本支援では、*mPing* が宿主のエピゲノム状態におよぼす効果を明らかにするために、次世代シーケンサーを用いて *mPing* の内部および近傍配列のメチル化程度を大規模解析を試みた。これまでの研究から、銀坊主において *mPing* は 1,000 コピー以上存在し、そのメチル化程度はコピー間で異なることが明らかになっている。したがって、*mPing* のメチル化を解析する際には、1,000 コピー以上の挿入位置を明確に区別する必要がある。したがって、本支援では、まず、銀坊主の葉身から抽出したゲノム DNA を鋳型として、*mPing* のプラス鎖の 4 箇所に設計したプライマーを用いて Post-bisulfite Adaptor Tagging (PBAT)法で *mPing* 配列特異的なライブラリーを作成した。そして、HiSeq によるシーケンスを行った後、バイサルファイトシーケンス解析ツール Bismark によって *mPing* 配列およびイネゲノムにマッピングした。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援の結果、総リード数 146,467,644 のシーケンスデータを得た。これらのリードを Bismark によって *mPing*配列およびイネゲノムにマッピングしたところ、46,180 リード (0.03%)が *mPing* 配列にマッピングされた。これらのうち、5,652 リード (0.004%)が *mPing* 挿入位置の決定に用いることができた。*mPing* は、品種銀坊主において、1,000 コピー以上存在することが知られている。本研究において、106 箇所の *mPing* 挿入を同定し、これらのうち 21 箇所の *mPing* のメチル化程度を解析できた。その結果、*mPing* 内部のシトシンの平均メチル化程度は、CG、CHG および CHH サイトにおいてそれぞれ 95%、58%および 31%であることが明らかになった。本研究結果を基に、これまでの研究で明らかになっている 16 箇所の *mPing* 挿入位置のメチル化程度を比較解析したところ、活性型 *mPing*(転移がみられるコピー)ではほとんど全てのシトシンのメチル化が低下しているのに対して、不活性型 *mPing* (転移がみられないコピー)ではメチル化の低下はほとんど見られなかった。このことから、メチル化程度の減少が *mPing* を活性化する要因であることが確かめられた。しかし、不活性化 *mPing* の中にもメチル化程度の低いものが含まれていたことから、*mPing* は DNA メチル化のみによって不活化されないのではないかと考えられた。一方、活性型 *mPing* では、サイト特異的にメチル化の大幅な低下がみられたことから、特定のシトシン残基が転移活性に関与している可能性がある。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援の結果、*mPing* の転移は、配列中の特定のシトシン残基のメチル化によって制御されている可能性が示唆された。しかし、2013 年度は、ライブラリーの調整が不十分であったため、挿入位置を決定できたコピーが少なく、コピー間のメチル化程度を十分に比較・解析することができなかった。現在、PBAT 法を改良し、*mPing* 配列特異的なライブラリーの再構築を試みている。今後は、得られたライブラリーを用いて、上記と同様の方法で解析を行い、コピー間のメチル化状態の違いを明らかにしたいと考えている。これらの結果によって、転移因子を用いたエピゲノム育種の基盤の構築のみならず、転移因子がゲノム中でどのようにして増殖し、どのようにして進化を牽引するかを理解する重要な手がかりが得られると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし。

公募支援課題：2010 年度

パーソナルゲノム情報にもとづく脳疾患の発症機構の解明

新学術領域研究

辻 省次・東京大学医学部附属病院

＜背景・目的＞

①．筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合

筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合（ALS/PDC）は、運動ニューロン症状に加えパーキンソニズム、認知症を伴い、病理学的に広範な tau の沈着を認める特徴的な疾患である。グアムと紀伊半島に集積地があり、紀伊半島における本疾患は紀伊 ALS/PDC と呼ばれている。強い家族集積性が認められ、遺伝学的素因が発症に関わると推定されている。従来から連鎖解析が試みられているが、パラメトリック連鎖解析は困難であり、遺伝形式が必ずしも明確でなく、高齢発症であり phenocopy の存在を完全には除外できず、常識的な単一遺伝子疾患とは限らないこと等が理由として考えられてきた。今回、大家系に属する 2 名の剖検例について、全ゲノム配列解析を行っていただき、ALS/PDC の原因について検討を行った。

②．多系統萎縮症

多系統萎縮症は，自律神経障害に加え，小脳失調，パーキンソン症状，錘体路障害などの症状をきたす進行性の神経変性疾患である．原則として孤発性であり，遺伝性のない疾患と理解されてきたが，近年，多発家系が報告されるようになり，疾患関連遺伝子の探索が広く行われるようになってきた．従来，孤発性疾患の疾患感受性遺伝子探索には，頻度の高い多型をマーカーに患者群・対照群でアレル頻度の違いを探索する手法（ゲノムワイド関連解析）が広く行われてきた．このような方法で検出される疾患関連多型のオッズ比は 1～2 倍程度である．その一方，アレル頻度が 1%程度，あるいはさらに頻度の低い rare variants が疾患と関連する場合，一般にオッズ比が 2～10 倍と強い影響度を持つ因子が同定されることが多い．このような因子は集団内の頻度としては稀だが，病態に強く影響する因子であり，病態の解明や治療法の開発という点で寄与するものが大きいと考えられる．このような rare variants を中心に疾患関連変異を探索することを目標に，今回， MSA 患者 14 例，健常対象者 7 例を対象にエクソーム解析を行っていただき検討した．

＜支援の内容＞

支援によって，①．筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合患者 2 検体の全ゲノム解析，ならびに②．多系統萎縮症患者 21 検体のエクソーム解析を行っていただいた．

＜支援によって得られた研究成果＞

①．筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合

全ゲノム配列解析は HiSeq2000 を用いて行われ、BWA で参照配列 hg19 に alignment された。合計で 62.8X、72.9X のカバレッジとなり、十分なデータが得られたと考えられた。SAMtools を用いることで、それぞれ 3604450、3576323 個の一塩基置換と 587322、585433 個の小欠失・挿入が認められた。うち、遺伝子内の非同義置換とスプライス部位に存在するもので、dbSNP に存在しないものに絞ると、一塩基置換が 347、326 個、小欠失・挿入が 52、46 個認められた。その後同様に行われた、明らかな血縁関係のない 5 剖検例の全ゲノム配列解析とあわせて解析が行われたが、全症例で共通する翻訳領域の変異は見いだすことができなかった。今回剖検例という診断が確定した症例に限って解析を行ったが、共通する変異が見出せなかったことから、検出が比較的困難である構造変異、リピート伸長、イントロン・遺伝子間の変異などの可能性を考え、さらに検討を行う必要があると考えられた。

②．多系統萎縮症

MSA 患者 14 例，健常対象者 7 例を対象にエクソーム解析を行った．まず，疾患と関連する影響度の強い変異は，遺伝子産物の機能を変化させる非同義変異であるという仮定のもと，非同義変異を抽出した．非同義変異は，1 例あたり 10,000～12,000 個程度同定された．21 例，42 アレルで集計したところ非同義変異は 29,359 種類だった．42 アレル中 1 アレルの頻度の変異は 13,345 種類（45.5%），またアレル頻度 1%未満の変異は 18,850 種類（64.2%）と過半数を占めることが分かった．アレル頻度 1%未満の変異を対象に，アミノ酸変化の機能変化の予測アルゴリズムを用いて，疾患と関連する変異の候補を絞ることを試みた．dbNSFPver1.1 を用いて，Polyphen2, SIFT, MutationTaster, LRT, Phylop それぞれの予測をスコア化し，スコアの高い変異（5 点満点中 4 点以上）を抽出したところ，18,850 種類中 4,028 種類の変異に絞られた．今回の支援の範囲である MSA 患者 14 例，健常対象者 7 例の比較では，有意に関連する変異は認められなかったが，例数を増やして引き続き検討を続けていく．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

①．筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合

一般にメンデル遺伝形式が仮定できる大家系の家系解析においては，パラメトリック連鎖解析によって候補領域を絞りこむことができる．しかし，今回支援頂いた ALS/PDC のような，遺伝形式が必ずしも明確でなかったり，高齢発症で phenocopy の存在を完全には除外できなかったりするような家系の解析では，様々な可能性を仮定してゲノムワイドに検討することが必要である．今回の検討では，翻訳領域内の塩基置換変異，short indel として検出された変異の範囲では，候補として残る変異は見出せなかったため，その他の可能性（構造変異，リピート伸長，イントロン・遺伝子間の変異）について検討す

る必要が示唆された. ALS/PDC のように従来の方法ではアプローチが困難な家系に対して，網羅的な全ゲノム解析を行うことで初めて病因解明の展望が拓けたと言える.

②. 多系統萎縮症

孤発性疾患については，従来，頻度の高い多型をマーカーに患者群・対照群でアレル頻度の違いを探索する手法（ゲノムワイド関連解析）が広く行われてきた．この方法は，集団内の頻度が高く，影響度の比較的弱い変異を広く検出することができるが，頻度が低く，影響度の強い遺伝因子は検出が困難だった．エクソーム解析を行うことで初めて，頻度の低い変異を含む網羅的な翻訳領域内の変異同定が可能となり，孤発性疾患の遺伝因子全容解明につながる展望が拓けた．今回の支援の範囲では例数が少なく，単独で結論を得ることは難しいが，今後の関連解析のデザインに必要なデータが得られた点はきわめて有用だった.

なお，支援の対象の直接的な成果ではないが，支援のデータを参考にして，研究を発展させた結果，家系例などから得られた候補遺伝子アプローチによって，頻度が低く，影響度の強い多系統萎縮症の遺伝因子として，*COQ2* 遺伝子（2013 年），*GBA* 遺伝子（2015 年）を同定し報告している.

＜支援成果公表リスト＞

・The Multiple-System Atrophy Research Collaboration (Mitsui J et al.,) ***N Engl J Med***. 2013; 369: 233-44.
・Mitsui J, Tsuji S. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 2014; 452: 221-5.
・Mitsui J et al., ***Ann Clin Transl Neurol.*** 2015; 2: 417-426

公募支援課題：2010 年度

環境汚染物質添加土壌での微生物集団応答様式の研究

基盤研究（B）

津田 雅孝・東北大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

有害化学物質で汚染された土壌の浄化には当該土壌棲息細菌集団が大きく寄与する。本生態系での汚染物質分解に関与する細菌群やその汚染物質分解酵素群の提示をめざし、4 種環境汚染物質[3-クロロ安息香酸(3CB)とフェナントレン(Phn)を含む 3 種多環芳香族化合物(PAHs)]を同時添加した閉鎖系土壌(以下「先行汚染土壌」と表記)を用いて、細菌集団の菌叢と遺伝子プールの経時的変動様式のメタゲノム解析と各種菌株・分解酵素遺伝子単離・解析を実施してきた。本研究では、上記土壌で 3CB と Phn の分解に中心的役割を果たしていた各々の細菌属解明をめざした。さらに、非汚染同一土壌の滅菌化試料に先行汚染土壌由来細菌集団を「移植」し、3CB 単独添加後の菌叢・遺伝子プールの経時的変動を検討し、3CB 分解細菌属の役割検証をめざした。

＜支援の内容＞

先行汚染土壌由来で、汚染後初期に一時的に優占化した *Burkholderia* 属 6 株、そして、Phn 完全分解能を示した *Mycobacterium* 属株と *Paenibacillus* 属株のドラフトゲノム配列決定(Roche 454)。**(2)**上記滅菌化土壌に移植した細菌集団に 3CB 添加後の複数時点由来メタゲノムを用いて、細菌集団の菌叢提示用の 16S rRNA 遺伝子配列決定(Roche 454)と遺伝子プール提示用のショットガン配列決定(Illumina HiSeq 2000)。

＜支援によって得られた研究成果＞

汚染化後 1 週間で 3CB が消失し、他 3 種 PAHs が 3 週目以降に分解開始した先行汚染土壌のメタゲノム解析で、β-*Proteobacteria* 綱の *Burkholderia* 属細菌の 1 週目での急激な増加が見出され、3CB 分解へのβ-*Proteobacteria* の関与と Phn 多段階分解の前半へのβ-*Proteobacteria* 綱と後半への *Actinobacteria* 門の細菌の関与が示唆されていた。「支援」で得た *Burkholderia* 属細菌 3 株と *Mycobacterium* sp. EPa45 株のドラフトゲノムをレファレンスゲノムとした先行汚染土壌のメタゲノム再解析で各汚染物質分解に関わる細菌を属レベルで提示可能となり、以下の成果を得た。**(1-1)** 3CB 分解への *Burkholderia* 属細菌の関与、さらに Phn 分解の前半と後半への *Mycobacterium* 属と *Burkholderia* 属の各細菌の関与、が強く推定された。**(1-2)**ドラフト配列を元に *Mycobacterium* EPa45 株ゲノム完全配列を決定し、Phn 完全分解経路と分解酵素遺伝子群を示した。さらに当該遺伝子群と極めて相同性の高いメタゲノム配列が先行汚染土壌で Phn 分解時に豊富に存在し、Phn 分解前半段階への *Mycobacterium* 関与を推定できた。**(1-3)**先行汚染土壌メタゲノムから培養非依存的手法で複数取得した芳香族化合物分解酵素遺伝子群の一部は *Burkholderia* 由来で汚染化土壌のみで特異的に増加していた。

非汚染同一土壌の滅菌化試料に先行汚染土壌由来細菌集団を移植した直後には大規模な菌叢変動が起きたが、変動鎮静化の 4 週目に添加した 3CB は 1 週間で消失した。移植に使用した細菌集団、移植後の 2 時点の細菌集団、そして、3CB 汚染後の 3 時点の細菌集団から調製したメタゲノムを用いて、菌叢と遺伝子プールの変動を検討し、**(2-1)**移植直後の集団での *Burkholderia* 属を含む一部属群の即座優占化と、その後の移植時マイナー属増加を伴った菌叢組成の安定化傾向(ただ移植後 4 週時点でも、まだ菌叢変動あり)を示すこと、**(2-2)** 3CB 単独汚染により、集団内 *Burkholderia* 属細菌は先行汚染土壌の初期過程と同様の経時的変動様式を示し、*Burkholderia* 属由来の 3CB 分解酵素遺伝子量が増大した。以上より、先行汚染土壌での *Burkholderia* 属細菌の 3CB 分解への重要性を明示できた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

上述のように先行汚染土壌での効率的 Phn 完全分解には *Mycobacterium* 属細菌と *Burkholderia* 属細菌の「協調代謝」が強く推定されたが、汚染後半年間で *Mycobacterium* 属細菌は集団の 1%以下であったため、*Burkholderia* 属細菌は *Mycobacterium* 属細菌の Phn 完全分解能を協調代謝とは別機構で強化させた可能性が示唆された。一方、当該土壌からの Phn 完全分解 *Mycobacterium* EPa45 株単離過程で、本株と土壌棲息 *Burkholderia* 属細菌との強い共存関係を見出し、前者株が示す Phn 毒性を共存 *Burkholderia* 属細菌株が緩和する効果を見いだした。本効果の分子機構解明を現在検討しているが、分解菌と共存する非分解菌の役割とその機構が解明でき、自然生態系での環境汚染物質分解様式の実体の提示に繋げたい。滅菌化土壌への細菌集団移植後の経時的メタゲノム解析を「支援」に依頼したが、同一滅菌化土壌を分割した複数試料での独立検討を回避したため、複数試料間での菌叢変動の再現性は不明だった。その後の我々の複数試料での菌叢変動の長期間検討で、移植後半年で安定化に至るまでの菌叢の変動様式と組成は試料間で差異がなかった。本知見は、今後予定している閉鎖土壌系細菌集団の菌叢・遺伝子プール変動を規定する環境要因の明示と当該変動機構の解明に関して、再現性の高い成果を得る基盤になる。

＜支援成果公表リスト＞

加藤ら, J. Environ. Biotechnol. 10: 63-71 (2010)
永山ら， J. Environ. Biotechnol. 13: 51-56 (2013)
Mori, H. et al., DNA Res. 21: 217-227 (2014)
Nagayama, H. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 99: 4453-4470 (2015)
Kato, H. et al., Genome Announc. 3: e00782-15 (2015)
加藤ら. 日本微生物生態学会誌 30: 57-64 (2015)
Kato, H. et al., DNA Res. 22: 413-424 (2015)

公募支援課題：2011~2012 年度

遠隔ゲノム部位間の相互作用におけるＩＩ型ＤＮＡトポイソメラーゼの役割

基盤研究（Ｂ）

筒井 研・岡山大学自然生命科学研究支援センター

＜背景・目的＞

以前に我々はDNA トポイソメラーゼ IIβ（トポ IIβ）が神経細胞の終末分化において一群の神経関連遺伝子の転写を誘導し、成熟ニューロンの完成に必須となっていることを示した。本研究では、トポ IIβの作用点をゲノム DNA 上にマッピングする方法を開発し、この酵素が基質とする 2 本の DNA 鎖が遠隔のゲノム部位に由来するケースの存在を証明するとともに、その結果生じるクロマチン高次構造の変化が転写を制御するという仮説を検証する。

＜支援の内容＞

被支援者の研究室で調製した細胞 DNA 断片を送付し、すべて新世代シークエンサ（HiSeq2000）によりペアエンドで読んだリード配列を返してもらった。具体的には以下４種類のサンプルの解析を依頼した。１）RNA-seq 用の RNA（計３レーン分）２）トポ IIβ作用点（eTIP-seq）用の２つの DNA 画分（計６レーン分）３）遠隔作用部位解析（eTIP-PES）用のキメラ DNA 断片（計８レーン分）。４）クロマチン高次構造解析（FAIRE-seq）用の DNA（計６レーン分）。

＜支援によって得られた研究成果＞

II 型トポイソメラーゼの試験管内反応メカニズムについては既によく理解されていたが、この酵素が生細胞の核内で遠く離れたゲノム部位間の相互作用を媒介するか否かについては、永らく不明だった。本研究の主目的は、この問題を解決するために必要な技術 eTIP-PES を開発し、これを検証することである。塩基配列情報を見ながら新たな実験条件を試みるという、試行錯誤の繰り返しであったが、最終的には最小限の実験によって最大限の成果を得ることができた。以下に主な成果を挙げる。１）mRNA-seq のデータを解析し、分化が進むとトポ IIβの活性に依存して発現が誘導される遺伝子群（A1 遺伝子）と抑制される遺伝子群(C3 遺伝子)の存在を明らかにした。GO 解析によれば、これらの遺伝子群以外にも機能的特徴をもつ発現グループが同定された。発現グループごとに機能を調べると、A1 遺伝子は成熟神経細胞で、C3 遺伝子は初期の神経分化過程で働く遺伝子が有意に多く、トポ IIβが終末分化において一群の遺伝子の発現を合理的に両方向に制御していることが分かった。これらの遺伝子が占めるゲノムポジションについても、A1 と C3 はそれぞれで近くに集まるが、互いに相手を排除する傾向があるという特徴が認められた。また、A1 遺伝子には長い遺伝子長をもつ遺伝子が多く含まれ、これらは長い遺伝子間領域に隣接するという、顕著な特徴を示した。２）トポ IIβ作用点（トポサイト）を網羅的に解析し（eTIP-seq）、３つのクラス（Ts1, Ts2, Ts3）に分類した。Ts1 は転写開始部位（TSS）近傍と遺伝子に富むゲノム領域に広く分布する。Ts2 と Ts3 は遺伝子に乏しい遺伝子間領域に多く、比較的少数の密集部位（ホットスポット）を形成していた。３）eTIP-PES から得られるデータは、２箇所に由来する DNA 断片がアダプターを介して結合したキメラ配列から成る。最大の問題点であったノイズの除去は、リード数を増加させ、両端がトポサイトと一致するキメラのシグナルを選択することにより解決された。一致するトポサイトの種類によってキメラを 3 種類（Ts1, Ts2, Ts3 キメラ）に分類した。キメラの解析から得られるすべての情報（長さ、リードの方向、ゲノムポジション）を用い、Ts1 キメラは近くの DNA 鎖間の反応（PSP）、Ts2/Ts3 キメラは遠く離れた DNA 鎖間の反応（DSP）を反映していることを明らかにした。Ts2/Ts3 トポサイトのホットスポットに一致して、その内部およびホットスポット間に多くのキメラがマップされることから、これらの部位が DSP ホットスポットを形成していることが判明した。４）DSP ホットスポットの一部には、相同遺伝子ファミリーのクラスターや、セントロメアを構成する反復配列（Sat I）が高頻度に存在した。セントロメアがトポ IIβの主たる作用点の一つであることは、Sat I をプローブとする３D-FISH／トポ IIβ二重染色によって確認された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

１）本研究支援によって可能になった断端配列の大規模シークエンシングは、II 型 DNA トポイソメラーゼで想定される２つの反応様式（PSP と DSP）が生細胞の核内で実際に起こっていることを証明し、ゲノム上の部位をも特定した。この酵素の生理機能に関わる知見を格段に進めるブレイクスルーと言える。

２）トポ IIβで制御される遺伝子として、神経分化の異なる時期に発現する 2 群の神経関連遺伝子が存在し、最終分裂を境として発現が抑制される遺伝子群から誘導される遺伝子群への切り替えをトポ IIβが行っていることが明確になった。神経分化におけるこの酵素の重要性を更に追求する研究が望まれる。

３）トポ IIβによる遺伝子発現制御として、２つの機構が示唆された。遺伝子の転写領域で起こる PSP では、TSS を含む 1 kb 以下のループに作用して転写開始に関わっている。一方、ゲノムに散在する DSP ホットスポットへの作用では、グローバルなクロマチン高次構造の変化が起こり、脱凝縮される領域に含まれる遺伝子の転写が活性化される。これは新規の遺伝子発現調節機構と考えることができる。

４）本研究を通じて、トポ IIβと複合体形成など、密接な関係を持って働くタンパク質(hnRNP U と CTCF)が同定されたことから、新たな展望が開かれた。

５）トポ IIβが制御する遺伝子には自閉症や統合失調症の責任遺伝子とされるものが多い。今後、CRISPR-Cas などのゲノム編集技術を用いて、トポ IIβの DSP ホットスポットを操作することにより、精神疾患の治療を目指した応用研究が可能になる。

＜支援成果公表リスト＞

Onoda, A.et al., Nucleic Acids Res. 42, 9005-9020 (2014)
Miyaji, M. et al., J. Cell. Biochem. 116, 677-685 (2015)

公募支援課題：2015 年度

難治性感染症の原因となる休止細菌の分子機構解明

挑戦的萌芽研究

常田 聡・早稲田大学理工学術院

＜背景・目的＞

遺伝子的に同一の単一細菌種の細菌集団中であっても、ある一定の割合（約 10^{-6}）で増殖速度が通常より非常に遅いあるいは全く増殖しない細菌（休止細菌）の亜集団が生じることがわかってきた。抗生物質は細菌の増殖を標的として細胞を死に至らしめる。しかし、休止細菌は細胞増殖を行わないため、抗生物質の作用を受けず、複数種の抗生物質に対して抵抗性を示し生存し続ける。休止細菌は増殖の抑制すなわち表現型の変異であるため、遺伝子型の変異である抗生物質耐性菌とは異なり、その性質は非遺伝性であり可逆的である。上記の性質から、休止細菌は臨床現場において抗生物質治療後の感染症再燃の原因となっている。休止細菌は 1940 年代に発見されているが、感染症の再燃の問題や、性質の生物学的な興味深さにも関わらず、抗生物質耐性菌ほどは解析が進んでいない。その原因の一つは、休止細菌のマーカーが存在しなかったことであったが、申請者らは細菌細胞の増殖を標的とした世界初の休止細菌マーカー株を開発することに成功した。本研究では、休止細菌のマーカー株により休止細菌を分取し、網羅的な遺伝子発現解析を行うことで休止細菌の分子機構の全体像を捉える。

また、休止細菌は環境ストレスが加わった際に形成が促進されることが知られているが、加わるストレス刺激毎に異なる経路がはたらいていることが示唆されている。従来のような単一の遺伝子を標的とした遺伝子発現解析では細菌の経路全体の比較解析は難しく、具体的にどのような遺伝子の発現が異なっているかは明らかとなっていない。本研究課題では遺伝子発現全体像を網羅的に比較することで、環境による遺伝子経路の違いも明らかにすることが可能であり、全ての環境に共通して発現する遺伝子に注目することで、より重要な薬剤ターゲットとなる。

＜支援の内容＞

RNA-seq を用いて休止細菌の遺伝子発現解析をするための最適な条件やサンプル調整方法の提案。面接とメールによる情報交換から、以下の計画を進めることを決定した。

・RNA-seq (*Escherichia coli* K12 derivative strain)
・試料数：18 (6 samples, 3 biological replicates)
・内訳：休止細菌マーカー株を 6 つの条件で分取し、それぞれ RNA を調製する。1) 健康な細菌、2) 確率的に形成される休止細菌、3) 嫌気ストレスで形成される休止細菌、4) 飢餓状態で形成される休止細菌、5) 酸性ストレスで形成される休止細菌、6) クオラムセンシングで形成される休止細菌

申請者のサンプル調整に問題が発生し、サンプルの提供が大幅に遅れており、1 月 23 日時点で解析には至っていない。1 月末に RNA-sequencing を行い、結果を比較解析する。

＜支援によって得られた研究成果＞

指導に従ってサンプルを調製した。RNA-sequencing の結果を比較解析することによって、休止細菌形成に関わる遺伝子が明らかになると考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

培養環境を変えた際に、休止細菌形成に関わる遺伝子が異なっていた場合、既往研究とは全く異なる展望が得られる。

＜支援成果公表リスト＞

特になし。

公募支援課題：2014～2015 年度

化学修飾導入 siRNA による 1 遺伝子特異的ケムバイオケム型 RNA 干渉法の開発

新学術領域研究

程 久美子・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

RNA 干渉法は small interfering RNA (siRNA)による簡便な遺伝子ノックダウン法として広く利用されている手法であり、ゲノム創薬や従来の遺伝子治療に替わる新しい手法として、ゲノム医科学的観点からの期待も高い。しかしながら、その臨床応用への実用化がなかなか実現しない背景には、特異性や安定性などにおいて、まだ解決すべき重要な問題を抱えている現状がある。我々は、これまでに、RNA 干渉の分子メカニズム解析の結果から、有効で標的遺伝子特異性の高い siRNA の配列選択法を構築してきた。しかし、それらは塩基配列上の制限が大きいため、十分な数の siRNA を選択することが難しい。科研費の課題では、塩基配列による制限を回避するための非常に有用な手法として各種化学修飾を利用して、標的遺伝子特異的な siRNA による RNA 干渉法を構築することを計画し、実施している。

しかしながら、本課題の当初の予定を上回る重要で普遍性の高い研究成果を得るためには、より効率的な RNA 干渉法を構築する必要がある。特に、RNA 干渉に関わると考えられる二本鎖 RNA 結合タンパク質には、RNA 干渉作用を有意に促進すると考えられるものがいくつか存在する。本課題では、そのような二本鎖 RNA 結合タンパク質の siRNA や microRNA (miRNA)との相互作用について、主として RNA immunoprecipitation (RIP)-Sequence (Seq)法を用いた解析を行う。

＜支援の内容＞

RNA サイレンシングを制御する二本鎖 RNA 結合蛋白質 TRBP を発現している Flp-In HEK293 細胞株を用いた RIP-Seq（10 検体）を行った。

さらに、RNA サイレンシングを制御する二本鎖 RNA 結合蛋白質 TRBP を発現している Flp-In HEK293 細胞株および Dicer と結合できない TRBP 発現 Flp-In 細胞での RIP-Seq（16 検体）、および細胞質ー核間をシャトリングする RNA サイレンシン関連タンパク質の RIP-Seq（18 検体）を予定している。

＜支援によって得られた研究成果＞

TRBP は、HIV-1 の LTR 領域に存在するステムループ状の TAR RNA に結合する因子として同定された遺伝子である。一方で、TRBP は二本鎖 RNA と相互作用するドメインと二本鎖 RNA 切断酵素である Dicer と相互作用するドメインをもち、RNA サイレンシングを促進する作用をもつことが知られているが、その詳細な分子機構は不明であった。今回の結果から、ヒトでは 2,000 程度存在するとされている miRNA の種類によって、TRBP が好んで結合するものと結合しにくいものがあることが明らかになった。さらに miRNA の種類によっては、TRBP と相互作用している Dicer による切断が miRNA 二本鎖の片側の RNA 鎖で阻害されるような機構がある可能性も明らかになった。また、これまでは Ago タンパク質の表面に載っている成熟型 miRNA が標的とする mRNA と結合すると考えられていたが、今回の解析から TRBP も miRNA と mRNA で形成される二本鎖 RNA に結合している可能性が示唆された。このような二本鎖 RNA に TRBP が結合する可能性は十分考えられるため、TRBP は miRNA と mRNA の結合を補強するように働く場合があるのかもしれない。このような点を明らかにするために、野生型 TRBP と相互作用する長い RNA の解析も進めている。

さらに、TRBP は3つの二本鎖 RNA 結合ドメインをもつが、われわれは、TRBP が2つ目と3つ目の dsRBD の間で切断されるタンパク質であることを見出した。切断点はちょうど1、2番目の二本鎖 RNA 相互作用ドメインと3番目のタンパク質相互作用ドメインを分断する位置にあり、TRBP は切断されることにより機能的に大きく変換することが期待される。そこで、特に TRBP の構造変換がどのような機能の変換をもたらすのかという点について解明するために、野生型と、3番目のドメインが欠損し、1番目と2番目のドメインのみをもつ切断型 TRBP の両者に注目した解析を行った。その結果、3番目のドメインを欠失した TRBP は miRNA のプロセシングができないことが明らかになった。TRBP は3番目のドメインが欠失すると、Dicer との相互作用ができないために miRNA のプロセシングができない形に機能転換することが示唆された。このことを明らかにするために、Dicer との相互作用ができない TRBP の Flp-In 細胞を構築し、その RIP-Seq を行う予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまでの支援により、RNA サイレンシングに関わる二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP の新たな作用機序が明らかになってきた。また、現在、RNA サイレンシングに関わるもう 1 つの二本鎖 RNA 結合タパク質である TNRC6A についても同様に、RIP-Seq を用いて、miRNA や siRNA、およびそれらの標的 mRNA との相互作用を明らかにする予定である。このような詳細な解析により、これまで不明であった RNA サイレンシングの新たな分子機構を明らかにし、より効率的な RNA サイレンシング誘導機構の検討を行う予定である。

＜支援成果公表リスト＞

支援の成果を公表した雑誌論文はまだないが、現在準備中である。

公募支援課題：2014～2015 年度

GVHD によるホメオスタシス破綻のメカニズム

基盤研究（B）

豊嶋 崇徳・北海道大学大学院医学研究科

＜背景＞

同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: allo-HSCT)は, 難治性白血病等に対して唯一の根治的治療法となる。しかし, 移植後には移植片対宿主病(graft-versus-host disease: GVHD)・感染症等の致命的な合併症が問題となる。GVHD はドナー由来の T 細胞が, レシピエントのアロ抗原によって活性化され, 全身の臓器障害を起こす医原性の疾患であり, その予防は, 安全に移植を行うために必須である。現行の GVHD 予防は, カルシニューリン阻害剤等による強力な免疫抑制によって行われており, 移植の主目的である抗腫瘍効果を打ち消し, 日和見感染症の発症を招く可能性がある。allo-HSCT を安全に施行するためには, GVHD の病態生理を詳細に検討し, 新たな GVHD 予防法・治療法を開発する必要がある。

申請者は最近, 腸管の Paneth 細胞が GVHD の標的となることを発見した(Eriguchi et al, Blood 2012)。Paneth 細胞は, 抗菌ペプチドであるα-defensin 等を産生することによって, 病原性細菌の増殖を抑制し, 腸管の常在細菌叢を保っている。GVHD が発症すると, Paneth 細胞は速やかに減少し抗菌ペプチドの産生が低下し, 病原性細菌の著明な増殖によって腸内細菌叢の異常(dysbiosis)が生ずる。Dysbiosis は, 更なる GVHD の悪化や敗血症の発症を招く。こうした“GVHD と感染症のクロストーク”を断ち切ることは, 広汎な免疫抑制を伴わない安全かつ有効な次世代の GVHD 予防・治療法となる可能性がある。

＜目的＞

我々は, 腸管上皮増殖因子 X を投与することによりマウスの Paneth 細胞が著明に増加する事を見いだした。この Paneth 細胞の増加は, 腸管内の抗菌ペプチド濃度の著明な上昇をまねき, 腸管内微小環境に劇的な変化が生じさせる事を見いだした。さらに, 腸管上皮増殖因子 X を移植前後に投与すると, GVHD が抑制されたが, これは dysbiosis の抑制によるのではないかとの仮説に至った。GVHD と腸内細菌叢の変化が密接に結びついている事は, 我々のグループや他のグループから既に発表されており,腸内細菌叢を腸管上皮増殖因子 X によってコントロールすることにより, GVHD を抑制することができれば, これは新しい移植法の開発へのつながると考えられる。こうした仮説を証明するため, 移植前後に腸管上皮増殖因子 X を投与し, 移植後の腸内細菌叢変化を 16S rRNA 領域のシーケンスによって評価することとした。

我々は, さらに腸内細菌叢の変化が, 移植後の生着に影響を及ぼす事を見いだしている。移植後の生着のスピードや生着率は, 移植の成否を決定づける重要な要素である。移植後の腸内細菌叢の変化と, 生着の関係をさらに詳細に検討するために, 16S rRNA 領域のシーケンスによって, 生着・拒絶と腸内細菌叢の関連を解明したい。

最近, 腸内細菌叢の変化が真菌叢の変化にもつながる事が示された(Kim et al, Cell Host Microbe. 2014)。これまで我々は造血幹細胞移植後に, 腸内細菌叢をコントロールすることによって移植の成績を向上させようと考えてきた。しかし, 造血幹細胞移植の転帰には, 細菌叢だけではなく真菌叢の変化が関与している可能性も高い。我々は既に真菌の菌体成分によって肺に特異的な GVHD が発症する事をつきとめている (Uryu et al, Blood 2015)。我々は, まず造血幹細胞移植前後や GVHD の発症前後で腸内真菌叢の変化が生じているかどうかを, 18S ITS 領域のシーケンスによって解析したい。

＜支援の内容＞

1. 移植前後に様々な処置をしたマウスの糞便から DNA を抽出し, 16S rRNA 領域を増幅した PCR 産物の配列を MiSeq を使用して読んで頂いた。これらの配列を解析して頂き, 腸内細菌叢を構成する菌とその増減等を解明して頂いた。
2. 移植前後で様々な処置をしたマウスの糞便から DNA を抽出し, 18S ITS 領域を増幅した PCR 産物の配列を MiSeq を使用して読んで頂いた。これらの配列を解析して頂き, 腸内真菌叢を構成する真菌とその増減等を解明して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

1. 腸管上皮増殖因子 X は Paneth 細胞を増殖させ, 腸管へのα-defensin 分泌を増加させる: 腸管上皮増殖因子 X をnaïve マウスに 6 日間投与すると, 十二指腸から回腸までの全ての小腸領域で Paneth 細胞数が有意に増加した。Paneth 細胞が産生する抗菌ペプチドであるα-defensin の濃度を糞便中で測定したところ, α-defensin 濃度は, 腸管上皮増殖因子 X を投与したマウスで有意に上昇していた。次世代シーケンサーを使用した腸内細菌叢の解析によって, 腸管上皮増殖因子 X を投与された naïve マウスの糞便では腸内細菌叢の有意な構成変化を認められないことが判明した。これは Naïve マウスの腸内常在菌はα-denfensin に高度な耐性を持つためと考えられる。

2. 腸管上皮増殖因子 X の投与によって, GVHD によるα-defensin の分泌傷害が軽減される: マウスの同種骨髄移植後, 移植後 5 日目にはドナーT 細胞が腸管粘膜に浸潤し, GVHD が発症する。GVHD を発症したマウスでは Paneth 細胞がほとんど消失するが, 腸管上皮増殖因子 X を投与すると移植後 4 日目と 7 日目の Paneth 細胞数は, GVHD を発症するコントロールマウスに比較して有意に多かった。GVHD マウスにおける Paneth 細胞の減少は, 糞便中のα-defensin の消失を招いた。腸管上皮増殖因子 X による Paneth 細胞保護によって, 移植後 7 日目の糞便中のα-defensin 濃

度が有意に上昇していた。

3. **腸管上皮増殖因子 X の投与によって，GVHD による dysbiosis が予防され GVHD が軽減される:** 移植後 7 日目に採取した糞便から DNA を抽出し，PCR 法によって 16S rRNA 領域を増幅した後，次世代シーケンサーMiSeq を使用して配列を解読した。コントロールとして，GVHD を発症しない，同系(Syngeneic)移植を行ったマウスの糞便も解析した。これまでの研究によって，GVHD 群では Syngeneic 群に比較して dysbiosis のために細菌の多様性(diversity)が低下することが知られていたが，本研究でも Shannon 指数や Simpson 指数などの多様度指数を検討したところ diversity の低下が見られた。また，GVHD 群では Syngeneic 群と比較して *Firmicutes* 門などの常在細菌叢を形成する細菌が減少し，*Escherichia/Shigella* 等の病原性細菌の著明な増殖が見られた。驚くべきことにこうした GVHD で見られた dysbiosis は，腸管上皮増殖因子 X の投与によってほとんど完全に抑制され，菌の多様性も回復していた。PERMANOVA 解析を用いると，GVHD 群の菌叢は naïve マウスや syngeneic 群の菌叢と有意に異なっていたが，同種骨髄移植後に腸管上皮増殖因子 X を投与したマウスの菌叢は naïve マウスや syngeneic 群と有意な差を持たなかった。こうした dysbiosis の抑制は，移植後の donor T 細胞の腸管への浸潤を抑制し，GVHD を軽減し生存率も改善していた。

4. **抗菌ペプチドの投与で移植後の dysbiosis が抑制できる:** 移植後に抗菌ペプチドを経口投与し，dysbiosis が抑制されるか否かを現在解析中である。

5. **腸内細菌叢は移植後の生着に関与する**: 移植後の好中球減少期には，内因性の造血因子の産生が増加して生着を促進しているが，腸内殺菌を行うと，造血因子の産生亢進がみられなくなり，生着が遅延する事を発見した。現在，生着に関与する細菌の種類を突き止めるために，レシピエントマウスの糞便から抽出した DNA の，16S rRNA 領域の解析を行っているところである。

6. **真菌叢の変化**: マウスの同種および同系移植後の糞便を採取し，真菌層の変化を解析しているところである

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究によって，腸内細菌叢をコントロールすることが，GVHD 抑制につながることが示された。これまで臨床の現場において，抗生剤による腸内殺菌によって GVHD の予防を行っているが，抗生剤での腸内細菌叢のコントロールにはいくつかの欠点が指摘されている。腸内の常在菌は制御性 T 細胞の誘導によって，有害な免疫反応を抑制していることが知られているが，抗生剤はこうした有益な常在菌も殺菌してしまう。また，こうした広汎な抗生剤の殺菌効果は，耐性菌の繁殖を招いてしまう。我々の方法では，腸管上皮増殖因子 X による Paneth 細胞の増成による α-defensin 産生の促進，または抗菌ペプチドである α-defensin を直接投与することによって，GVHD の軽減をはかっている。α-defensin は，病原性細菌には強力な殺菌効果を持つ一方で，常在菌に体する殺菌効果は弱いことが知られている (Masuda et al. J Innate Immun 2011)。そのため，有益な常在菌を保ち，病原性細菌の増成を抑制するという，理想的な GVHD 予防法となる可能性がある。こうした新しい，腸内細菌のコントロール法は，移植のみではなく，様々な疾患に有用である可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

[論文]

現在投稿準備中

[学会等発表]

1. Teshima T. Protection of the tissue stem cell and niche system as a novel approach to control GVHD, ***2nd Australia-Japan Haematology Consortium***, Sep 11-12 2015, Brisbane, Australia.
2. Hayase E, et al. R-Spondin1 promotes Paneth cell growth, maintains intestinal microbial ecology, and ameliorates graft-versus-host disease, ***57th ASH Annual Meeting***, Dec 6th 2015, Orlando, FL, USA.
3. Teshima T. Emerging concepts on tissue injury in GVHD. ***BMT Tandem Meeting 2016***, Feb 18th 2016, Honolulu, HI, USA. (発表予定)

公募支援課題：2010 年度

メダカ逆遺伝学的手法を基盤とした個体・組織レベルでの損傷応答解析系の確立

基盤研究（Ｓ）

藤堂 剛・大阪大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

遺伝子の機能解析研究において、突然変異体は極めて有用な情報を提供する。しかしながら、目的とする遺伝子の変異体を得る逆遺伝学的手法は一部の実験モデル生物でしか利用できなかった。そこで、当研究室では、TILLING(Targeted Induced Local Lesions IN Genome)法を用いメダカにおいて逆遺伝学的手法の確立を目指してきた。TILLING 法とは、①雄親を化学変異原処理した後、正常雌と交配し、その F1 個体のゲノム DNA および精子を凍結保存し、変異導入個体ゲノム DNA ライブラリーを作成する、②ゲノム DNA ライブラリーを用い、目的遺伝子に変異が導入された個体をスクリーニングする、③変異が同定されれば、凍結精子ライブラリーから F2 個体を作成し、ヘテロ変異 F2 個体同士の掛け合わせにより F3 において変異ホモ個体を得る、という一連の手法である。ステップ２においては、効率的に SNPs（誘発変異）同定を行える HRM(High Resolution Melting)法を開発し、ライブラリーのスクリーニングを行ってきた。しかしながら、作成ライブラリーをより効率的に利用するには、よりハイスループットな SNPs 検出法の考案が必要であり、その方法論を模索していた。次世代シークエンサー(NGS)の出現は、巨大ライブラリーのスクリーニングには最適の方法であり、本支援によりその可能性を検証する事とした。

＜支援の内容＞

TILLING DNA ライブラリーは約 6000 個体からのゲノム DNA により構成されている。各個体由来 DNA の一部を NGS により解析し、目的遺伝子に導入されている変異をハイスループットに検出するプロジェクトの支援を申請した。実際には、全ライブラリーの半数サンプルについて、120 遺伝子のスクリーニングを行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

NGS 解析による SNPs 検出において、陽性と偽陽性とを区別するに必要な「陽性クローンの割合」及び「それらを検出するに必要なリード数」を事前のパイロット実験で検討したところ、50 クローンに１個の陽性クローンが存在すれば、通常のスクリーニングで検出可能である事が判明した。そこで、ゲノム DNA ライブラリーの半数を 48 個体分づつ mix し、その各々をプライマーに設定しているバーコードで分別する事により全体のスクリーニングを行う事とした。

実際には、基礎研究から応用研究まで幅広い分野で解析・利用が期待される重要遺伝子 120 個を選別し、それら遺伝子から合計 500 エキソンについて、TILLING ゲノムライブラリー中に存在する導入変異のスクリーニングを行った。これら標的遺伝子エキソンの濃縮は、合成 RNA ベイト(Agilent 社で合成)により行い、シークエンシングサンプルとした。

未解析の遺伝子も残されているが、DNA-PKcs, Cryptochrome1, Frizzled3-2, Frizzled 10, 4 種類の転写因子等、多くの遺伝子についてナンセンス変異体の検出に成功した。本法により得られる変異個体には、スクリーニングした標的配列以外にも予期せぬ変異が導入されており、これ等は正常個体とバッククロスしクリーンアップする必要がある。これ等の変異体について 5 世代のバッククロスを行った後、表現型解析を行っている。マウスでは胚性致死あるいは不妊になるモノの、メダカではヌル変異でも viable あるいは妊性を持つ等、予想外の表現型が観察されている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、極めて高いハイスループット化を実現できた。本成果により、よほど小さな遺伝子を除き、希望する遺伝子のメダカ変異体を得る手法を確立できた。逆遺伝学的手法の確立は、メダカのモデル実験動物としての重要性を増加させるのみに止まらず、他の哺乳実験動物を補完するメダカの新たな実験系の開発に重要な基盤を与えるものであると考えられる。

ここ数年の間に Transcription Activator Like Effector Nuclease (TALEN)や Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)/Cas9 (CRISPR)等のゲノム編集技術が開発・実用化されてきた。これ等の技術は標的遺伝子の特定配列にdeletionを導入できる事から、ナンセンス変異体を容易に得ることができる有用な技術である。しかしながら、これらゲノム編集技術では、小さくても数塩基のdeletion が入ってしまい、１塩基変異の点突然変異体を作成するには、効率的なノックイン等いくつかの障壁が有ると考えられる。我々が樹立したTILLING法は、ナンセンス変異のみでなく１塩基置換の点突然変異体を同時に得る事ができる点で、これ等ゲノム編集技術を相補できるものである。特に、「ゲノム支援」の支援により確立したハイスループット・スクリーニング法を確立できた事は極めて意義深いと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

無し

公募支援課題：2014 年度、2015 年度

ステロイド膜受容体の機能解析を中心とした卵成熟・排卵誘導機構の解明

基盤研究（C）

徳元 俊伸・静岡大学大学院理学研究科

＜背景・目的＞

卵成熟と排卵は受精可能な卵子の形成のための重要なステップであり、ステロイドホルモンの内、プロゲステロン類により引き起こされ、協調的に進行する。しかし、これらの現象は別々の経路により誘導されると推定されている。卵成熟促進因子の発見を端緒として卵成熟誘導機構については解明が進められたが、排卵誘導機構については不明な点が多く残されている。また、同時進行するこれらの誘導経路を区別する手段が無かったため解析は困難であった。申請者らはゼブラフィッシュにインビボで卵成熟・排卵誘導可能な生体アッセイ法を開発した。この手法により生体内で卵成熟のみを誘導された状態の卵、卵成熟・排卵の両方が誘導された卵を初めて調製することができるようになった。このことにより排卵誘導に特異的な遺伝子発現変化を捉えることが可能になった。申請者らは既にマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を進めてきたが、得られたデータには再現性、発現変動率に問題が感じられた。同時期にゲノムシクエンサーを用いた RNA-seq による発現解析技術が確立され、実用化の段階に入った。本支援に採択されたことからマイクロアレイ解析のデータと RNA-seq 解析のデータを比較し、統合することでより正確な発現変動を捉えようと考えた。

＜支援の内容＞

卵の 3 種類の状態、すなわち卵成熟も排卵も誘起されていない状態（未処理）、卵成熟のみ誘導されている状態（ジエチルスチルベストロール、テストステロン処理）、卵成熟・排卵の両方が誘導されている状態（魚類の天然の卵成熟誘起ホルモンである 17,20β-DHP 処理）の計 4 種類の卵巣から得られた RNA 試料を 1 セットとして RNA-seq 解析を依頼した。

RNA 試料間での比較を行うため 2014, 2015 年度について各 2 セット、計 4 セットのシークエンス解析を実施していただいた。2 セット目以降は自然条件下での発現変化を確認するため、ホルモン処理を行わない自然交配条件下でのサンプリング試料も加えた。ゼブラフィッシュは日の出とともに産卵を開始するので飼育条件下での点灯数時間前と点灯直前の卵巣を卵成熟期、排卵期の試料として採取し、RNA を抽出した。これら 2 サンプルを加えた計 6 サンプルとした。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られた RNA-seq 解析のデータは同一セット内の 4 あるいは 6 試料間でのデータの一致率は極めて高く解析が非常に正確に行われたと判定された。また、発現変動率についても極端に高い値を示した遺伝子も無く、この点においても信頼性の高いデータが得られたものと推定された。一方でマイクロアレイ解析のデータと照合した結果、意外にもほとんど一致は見られなかった。すなわちマイクロアレイ解析で選択した排卵に伴ない発現上昇する遺伝子群は RNA-seq 解析では期待された発現上昇はみられなかった。この結果を踏まえて自然条件下での試料を加えた 6 サンプルでの再解析を依頼した。この解析結果もセット内でのデータの安定性は十分であったが、セット間でのデータの一致が明確ではなかった。そこで 2 年目となる 2015 年にさらに 2 セットの解析を依頼し、計 4 セットのデータで比較することとなった。

以上のことから、少なくとも我々の解析においてはアイクロアレイ解析で得られたデータと RNA-seq 解析によるデータには大きな隔たりがあることが明らかになった。このことから両データを統合して発表することは困難であるとの結論に至った。アイクロアレイ解析による候補遺伝子の選択については投稿準備中である。現在、CRISR/Cas9 システムによる候補遺伝子の遺伝子破壊による遺伝子機能の証明法を導入中であるので RNA-seq 解析で得られた候補遺伝子群については機能証明まで含めた内容として数年後の発表を目指したい。

現在、4 セット目の解析が進行中であり、データが得られ次第、4 セット全体での発現変動解析を行い、RNA-seq 解析における排卵誘導遺伝子の最終的な選択を行いたい。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

マイクロアレイ解析とは異質のデータが得られたことで新たな候補遺伝子群のリストが得られた。今後、q-PCR での発現レベルの検証を行っていき、アイクロアレイと RNA-seq のデータを比較し、候補遺伝子の選択を進めていく。

＜支援成果公表リスト＞

執筆中

公募支援課題：2010 年度

パーキンソン病および認知機能関連分子とパーソナルゲノム解析

新学術領域研究

戸田 達史・神戸大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

パーキンソン病(PD)は、中高年に発症し、ドパミンニューロンの変性により振戦、筋固縮など運動障害を主症状とする頻度の高い神経疾患であり、大部分を占める弧発性 PD では疾患感受性遺伝子は明らかでない。「認知機能と遺伝子･分子」は２１世紀の神経科学の中心的テーマの１つであり、全般の知的能力に関わる一般知能因子 g は、本質的に多因子遺伝的である。また IQ が 70 未満である精神遅滞は、一般人口の 3%程度の頻度とされ､極めて頻度の高い疾患群である。本研究では、代表的な神経難病のパーキンソン病および一般知能因子や精神遅滞などの認知機能関連分子に焦点をおき、パーキンソン病、精神遅滞･自閉症の病態解明、治療法の開発、知能発現の分子メカニズムの解明を目的とする。本計画では特に、強いもしくは多数の遺伝要因が集積していると予想される家族集積患者のエクソームシークエンスをおこない、パーキンソン病遺伝子を同定することを目指した。

＜支援の内容＞

家族性パーキンソン病患者 6 検体のエクソームシークエンス実験と解析を行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

6 検体の coverage は、x423, x204, x461, x224, x200, x220 であった。Mapping rate は、86%, 86%, 86%, 85%, 84%, 84%であった。PCR duplicate は、10.5%, 5.6%, 12.8%, 7,1%, 7.5%, 8.4%であった。Insert size の分布は､213(SD 64), 230 (67), 205 (60), 229 (70), 209 (63), 213 (65)であった。DB に登録されていない rare SNV 数は、37918, 23455, 57363, 25195, 32372, 40746 であった。Indel 数としては、rare coding にかんしては、71, 45, 57, 51, 50, 51 であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

上記のデータの共通 SNV など検討したが､これらのみではパーキンソン病遺伝子同定に至らなかった。今後、別に実験済みのパーキンソン病エクソーム解析数百検体のデータを参照し、ご支援のデータを合わせて解析することにより、新規のパーキンソン病遺伝子を発見できる可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2011 年度

パーキンソン病および認知機能関連分子とパーソナルゲノム解析

新学術領域研究

戸田 達史・神戸大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

パーキンソン病(PD)は、中高年に発症し、ドパミンニューロンの変性により振戦、筋固縮など運動障害を主症状とする頻度の高い神経疾患であり、大部分を占める弧発性 PD では疾患感受性遺伝子は明らかでない。一方「認知機能と遺伝子･分子」は２１世紀の神経科学の中心的テーマの１つであり、全般の知的能力に関わる一般知能因子 g は、本質的に多因子遺伝的である。また IQ が 70 未満である精神遅滞は、一般人口の 3%程度の頻度とされ、極めて頻度の高い疾患群である。本研究では、代表的な神経難病のパーキンソン病および一般知能因子や精神遅滞などの認知機能関連分子に焦点をおき、パーキンソン病、精神遅滞･自閉症の病態解明、治療法の開発、知能発現の分子メカニズムの解明を目的とする。本計画では特に、認知機能に関連する遺伝子を同定することを目指し､IQ の差が顕著な不一致一卵性双生児、および精神遅滞家系を用いた大規模ゲノム再シーケンシングを目的とする。

＜支援の内容＞

IQ 差の最も大きい不一致一卵性双生児 2 組 4 検体の全ゲノム（IQ 差は、1 組は 45、もう 1 組は 30（1 SD = 15））、精神遅滞家系 2 家系 6 検体のエクソームの再シーケンシング（1 家系は母親と兄弟が、もう 1 家系は兄弟が罹患している家系）、およびその情報解析のゲノム医学支援

＜支援によって得られた研究成果＞

精神遅滞家系のエクソーム再シーケンシングにより､1 家系から既知の精神遅滞原因遺伝子上の変異を見出した。もう 1 家系からは、新規の原因遺伝子候補を同定した。不一致一卵性双生児の全ゲノム再シーケンシングは、試料提供元での倫理委員会で承認が得られず、支援を断念した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

原因不明の精神遅滞１家系についての原因遺伝子の同定に成功し、確定診断することができた。もう１つの原因不明の精神遅滞家系から同定された精神遅滞原因遺伝子候補については、これまで他の精神遅滞患者の変異検索を行っているが、今のところ発見には至っていない。さらなる解析を行うことにより、新規の精神遅滞原因遺伝子の同定へつながることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

加齢脳におけるメゾ回路の機能障害

新学術領域研究

殿城 亜矢子・千葉大学大学院薬学研究院

＜背景・目的＞

学習によって形成される記憶は、不安定な短期記憶から安定な長期記憶へと固定化される。長期記憶の形成には、特定の遺伝子発現およびタンパク質合成が必要であることが知られている。このような安定な記憶の形成能は加齢に伴って低下するが、その分子メカニズムはまだ解明されていない。我々はショウジョウバエの嗅覚記憶システムをモデル系として加齢依存的な記憶形成能の変化を解析し、タンパク質合成依存的な長期記憶の形成が加齢に伴い低下していることを明らかにしてきた。一方で、短期記憶の形成やタンパク質合成非依存的な長期記憶の形成は、加齢に伴い顕著な変化が見られなかった。このことより、タンパク質合成依存的な長期記憶の形成過程が加齢により特異的に障害を受けていることが示唆された(Tonoki and Davis.*„JNeurosci*.,2015)。そこで、脳内の遺伝子発現や長期記憶の形成過程で発現変化する遺伝子プロファイリングを若齢個体と老齢個体で比較解析を行い、候補遺伝子群から遺伝学的スクリーニングを行うことで加齢に伴う記憶低下の原因となる責任遺伝子群を網羅的に同定することを目的とした。

＜支援の内容＞

（１）加齢に伴う遺伝子プロファイリングの変化：ショウジョウバエ若齢個体(10 日齢)と老齢個体(30 日齢）の脳 RNA をそれぞれ 3 サンプルずつ回収し、RNA quality check の後、次世代シークエンサー解析(RNA-seq)を行っていただいた。

（２）長期記憶形成過程で変化する遺伝子プロファイリング：長期記憶形成には、繰り返し学習が必要であることが知られている。若齢個体（10 日齢)、老齢個体（30 日齢）それぞれにおいて、繰り返し学習後、6 時間・24 時間の脳 RNA をそれぞれ 3 サンプルずつ回収し、RNA quality check の後、次世代シークエンサー解析(RNA-seq)を行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

（１）加齢に伴う遺伝子プロファイリング変化の解析により、老化により脳内で発現が上昇する遺伝子群（log2FoldChange(FC)<0）831genes、2 倍以上上昇する遺伝子群（log2FC<-1）38genes、老化により脳内で発現が低下する遺伝子群(log2FC>0)1235genes、2 倍以上低下する遺伝子群(log2FC>1)38genes のリストを得た。

（２）長期記憶形成過程で変化する遺伝子プロファイリングの変化解析により、繰り返し学習後 24 時間に発現量が上昇する遺伝子群を若齢 851genes、老齢 1389genes、低下する遺伝子群を若齢 373genes、老齢 904genes のリストを得た。これら遺伝子群について GeneOntology 解析を行った結果、”microtubule binding”,”protein serine/threonine kinase activity”, “calmodulin binding”GO Term において優位に高い出現頻度を持つことが明らかとなった。一方で同様の GOTerm は老齢個体において、その発現頻度は若齢個体に比較して優位に低いことが明らかとなった。これらのことから、老齢個体においては先に列挙した GOTerm に含まれる遺伝子群が変化しないことが、タンパク質合成依存的な長期記憶が低下する原因の一つであることが示唆された。

これらの解析を元に現在、候補遺伝子群の網羅的遺伝学スクリーニングを行っている。具体的には、加齢に伴い変化する遺伝子群とこれまで記憶形成に関与する網羅的遺伝学的スクリーニングにより得られた遺伝子群(Walkinshaw et al.,*Genetics*., 2015)を比較解析した。これより、(a)加齢により遺伝子発現量が上昇する、かつ記憶低下に関与する可能性がある遺伝子群を 4 遺伝子（Gene name: *SA*, *amon*, *gycbeta100B*, *cp190*）、(b)加齢により遺伝子発現量が低下する、かつ記憶低下に関与する可能性がある遺伝子群 53 遺伝子（Gene name: *galactokinase*, *knockdown*, *glutamate receptor binding protein*, *CG6739*, *CG13272* 等）を同定した。現在、（a）で同定された遺伝子群について、(i)場所特異的に遺伝子を発現させることが可能な Gal4-UAS 遺伝子発現系および(ii) 時期特異的に遺伝子を発現させることが可能な Gal4-UAS 遺伝子発現系である“gene-switch システム”（Roman et al., *PNAS*, 2001）を用いて、神経細胞特異的かつ時期特異的にそれぞれの遺伝子をノックダウンさせた個体を作成し、さらにそれぞれの個体における記憶能の測定を進めている。これまでに、*amon* について若齢個体・老齢個体両者においてノックダウンさせた個体で記憶の上昇がみられたことから、加齢により発現量が上昇することで記憶の低下に寄与する遺伝子候補の一つであると考えている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援の成果によって、加齢に伴い脳内で発現低下することで記憶低下の原因となる遺伝子群、加齢に伴い脳内で発現上昇することで記憶低下の原因となる遺伝子群、繰り返し学習後に発現へんかする遺伝子群、老齢個体において繰り返し学習後に発現変化しないことでタンパク質合成依存的な長期記憶形成低下の原因となる遺伝子群を得ることができた。上記のように、これらの遺伝子群から順次網羅的遺伝学スクリーニングを行う予定である。これらの結果から、老化にともなう記憶低下の原因となる遺伝子群を効率的に同定することが可能になると考える。

＜支援成果公表リスト＞

現在、準備中

公募支援課題：2015 年度

老化に伴う代謝恒常性の破綻による記憶低下機構の解明

新学術領域研究

殿城 亜矢子・千葉大学大学院薬学研究院

＜背景・目的＞

学習や記憶機能は、加齢にともなって低下する。遺伝的もしくは環境的に寿命を操作した長寿命個体は、加齢性記憶低下の発症が遅れることが種を通じて知られている。たとえば、カロリー制限をおこなった個体や成長ホルモンを低下させた個体では、長寿であるだけでなく老化個体における記憶低下が抑制される。寿命制御に関する研究は、インスリンシグナル経路を中心に行われ、これらの寿命制御機構は線虫からショウジョウバエ、マウスに至る進化の過程で保存されている。哺乳類においては加齢にともない、インスリン分泌能の低下やインスリン抵抗性の増大など、代謝恒常性が破綻することも知られている。これらの知見より、加齢にともなう生体内の代謝恒常性の破綻が記憶機構を変化させ、加齢性記憶低下を誘起する可能性が考えられる

我々はこれまでに、ショウジョウバエ嗅覚記憶をモデルとして、老化個体では安定な記憶が形成されないこと、記憶固定のプロセスを担う機能が低下していることを明らかにしてきた（Tonoki A and Davis RL., PNAS., 2012）。匂いと電気刺激を組み合わせた連合学習により獲得された記憶は、時間の経過とともに忘却される。老化個体では、記憶を獲得する能力は若齢個体に比較して顕著に低下しないが、記憶を維持・固定する能力が低下していることが示唆された。また、我々は体内の恒常性と記憶機能の関与について、以下を明らかにしてきた。(1) 遺伝学的にインスリン産生を一過的に抑制したハエ個体において嗅覚記憶を測定したところ、学習機能は正常だが記憶を維持する能力が低下する。(2) インスリン産生を老齢個体で同様に抑制させても、記憶低下は亢進しない。(3) インスリン様ペプチドの一部やその関連因子の発現量は、加齢により低下する。

これまでの結果を踏まえ、本研究課題では体内の代謝恒常性の破綻が記憶機能に与える影響を明らかにすることで、加齢性記憶低下の原因を理解したい。本公募支援課題では、生体内の代謝恒常性の変化が、記憶形成に関与する分子ネットワークに与える影響についてトランスクリプトーム解析を通じて評価することで、老化に伴う記憶低下が生じるメカニズムの理解に迫ることを目的とする。

＜支援の内容＞

2015 年度の支援課題のため、サンプル準備が現在進行中ではあるが支援予定の内容を以下に記す。

生体内の代謝変化により脳内で発現変化する遺伝子群を同定したい。またそれらを老齢個体においても比較する。具体的にはショウジョウバエ（*Drosophila Melanogaster*、ゲノムサイズ：122,653,977)の i)野生型･若齢個体(ハエ 10 日齢)、ii)野生型・老化個体（ハエ 30 日齢)、iii)代謝を変化させた若齢個体、iv)代謝を変化させた老齢個体における脳 RNA サンプルを回収して、次世代シークエンサー（RNA-seq）により遺伝子プロファイリングを比較することを予定している。具体的には、代謝の変化により脳内で発現量が上昇する、もしくは低下する遺伝子群を抽出し、それらリストについて若齢個体と老齢個体で比較する。また、得られた遺伝子プロファイリングより GeneOntology 解析を行い、生体内の代謝恒常性の変化が脳内の遺伝子ネットワークに与える影響を明らかにする。

＜支援によって得られた研究成果＞

生体内の代謝変化により影響する脳内遺伝子プロファイリングを比較することで、生体内の代謝恒常性が変化した際に影響する分子ネットワークを抽出することが可能であると考える。これら同定した分子ネットワークが実際に記憶機能に影響しているかどうかを明らかにするために、分子ネットワーク内の遺伝子発現量を改変させた老齢個体において、嗅覚記憶を行動解析により測定することを予定している。

さらに同定された遺伝子群について、(i)場所特異的に遺伝子を発現させることが可能な Gal4-UAS 遺伝子発現系および(ii) 時期特異的に遺伝子を発現させることが可能な Gal4-UAS 遺伝子発現系である“gene-switch システム”（Roman et al., *PNAS*, 2001）を用いて、神経細胞特異的かつ時期特異的にそれぞれの遺伝子発現を改変した個体を作成し、さらにそれぞれの個体における記憶能の測定を進めることを予定している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後得られる予定である結果の解析により、生体内の代謝恒常性の変化が与える脳内の分子ネットワークを明らかにできると考える。さらに、記憶維持能との関連性について検討することで、生体内の代謝と記憶形成に関与する分子ネットワークの関連について、本支援のトランスクリプトーム解析を通じて評価することができると考える。

＜支援成果公表リスト＞

準備中

公募支援課題：2015 年度

ベシクルを介した微生物間ネットワークの解明とそのデザイン方法の創出

若手研究（A）

豊福 雅典・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

細菌は細胞外にメンブランベシクル(MV)と呼ばれる膜小胞を放出する。この MV は，細菌間や細菌−宿主間でやりとりされる。従って，MV の中身の解析はどのような物質が細胞間で伝達されうるのか解明する上で重要である。これまでの研究で，MV には毒素因子や細胞間シグナル物質が含まれることが報告されている。

さらには，細菌間での遺伝子の水平伝播に MV が関与するとの報告もある。細菌における遺伝子の水平伝播は教科書的には 1)細胞外 DNA を取り込む形質転換，2)ファージを介した形質導入，3)接合伝達，によって行われると説明されてきた。 MV が第 4 の遺伝子の水平伝播の担い手であれば，既存の可動性遺伝子の概念が大きく押し広げられることが期待される。

実際に, MV に DNA が含まれていることが多数の細菌で報告されているが，そのシークエンスについて解析した例はほとんどない。そこで本課題では，MV に含まれる DNA シークエンスを明らかにすることによって，どのような遺伝子が MV に含まれており，水平伝播しうるのか明らかにすることを目的とした。

＜支援の内容＞

本支援では，グラム陰性細菌の *Burkholderia cenocepacia* H111 及び *Paracoccus denitrificans* Pd1222 とグラム陽性細菌の *Bacillus subtilis* 168 及び *Clostridium perfringens* 13 の MV に含まれる DNA(以下 mvDNA)について解析した。また，mvDNA 配列が環境や MV 形成機構依存的か解析するために，*B. cenocepacia* H111 及び *B. subtilis* 168 については，二種類の条件下で回収した MV の mvDNA をシーケンシングした。上記の計 6 サンプルを本支援でシーケンシングし，さらには本支援で，得られたシーケンスをゲノム情報に対してマッピングした。マッピングの結果, どのような遺伝子が MV に含まれ, その配列に偏りがあるかどうか, FPKM 値を計算することで解析を行った。本支援によってすでに 6 サンプルすべてのシーケンシングが完了している。そのうち，*P. denitrificans* Pd1222 と *B. subtilis* 168 については，マッピングも完了し，残りの株についても引き続きマッピングを行っている。

＜支援によって得られた研究成果＞

申請者は *Pseudomonas aeruginosa* を用いた先行研究で， MV 形成に関与する遺伝子を見出している(Nature communications リバイス中)。*P. denitrificans* Pd1222 について, 全ゲノム領域が MV に含まれているものの，興味深いことに，そのうちの特定の領域が非常に多く蓄積されていることが確認された。本領域は *P. aeruginosa* の MV 形成に関わる遺伝子のホモログも含んでおり，同様の機構で MV が放出されている可能性がある。一方で，*B. subtilis* 168 については全ゲノム領域がほぼ等量含まれていた。このことは, DNA はランダムに MV 含まれることを示唆する。*B. subtilis* 168 の MV 形成因子を現在同定しており，当該 MV 形成機構を踏まえると，妥当な結果となった。さらに，環境条件の違いで MV に含まれる DNA 配列に大きな差異が観察されるかどうか解析中である。以上，本支援によって MV に含まれる DNA 配列が明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

MV に含まれる遺伝子は細菌間で水平伝播することが知られていたが, 実際に MV にどのような DNA が含まれているのかについてその詳細は明らかとなっていなかった。

本支援によって, MV に含まれる DNA 配列が明らかとなり，水平伝播しうる遺伝子を理解する上で重要な知見が得られた。ゲノム情報が蓄積されていくにつれ，細菌のゲノム編成に水平伝播がいかに関わっているかが明らかとなってきているが，どのように遺伝子が伝播されたのかについては，完全には理解されていない。本支援成果は MV が遺伝子の水平伝播の担い手として重要であることを示唆する。

最終的に遺伝子が宿主に取り込まれるためには，DNA の制限系や相同組換えなど, 他の要因が介在するが，本解析によると，ゲノムの大多数は細胞間で伝播する可能性がある。今後，遺伝子マーカーなどを用いて，実際にどのゲノム領域が水平伝播するのか，またその際の限定因子は何であるのか等解析するための基礎的な知見が得られた。

MV の中身を調べることは，MV がどのように形成されたかについても重要な示唆を与える。本成果で mvDNA 配列が明らかになったことで， MV 形成に関わる因子を絞り込むことができた。今後遺伝子欠損株の作製を通じて，MV 形成に関わる遺伝子を同定する予定である。MV 形成機構はまだ完全に解明されておらず, MV の生物学的な役割を考えると，その形成機構の解明は大きな課題である。さらに，MV はワクチンなどにも利用されており，遺伝子組換え技術を適用しやすいこともあって，MV が盛んに応用されつつある。MV を大量に提供できるかが今後の課題となるが，MV 形成機構の解明は MV の大量生産に繋がる可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2014 年度

セントロメア再編の分子メカニズム

新学術領域研究

中川 拓郎・大阪大学大学院理学研究科

＜背景・目的＞

染色体の異常により癌などの遺伝病が引き起こされる。染色体のセントロメア領域は正確な染色体分配に重要である。興味深いことに、ヒトを含む多くの真核生物のセントロメアにはリピート配列が存在するため、同腕染色体形成やロバートソン転座などの染色体再編が起こる。これまでの研究から、DNA 相同組換えや細胞周期チェックポイントなどが染色体再編の抑制に重要であることが明らかとなった。しかし、染色体再編そのものの分子メカニズムはいまだ解明されていない。

そこで、我々は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いてセントロメアでの染色体再編に必要な因子 Factors of Centromere rearrangement (FOC)を同定し、FOC の役割と機能を明らかにする。更に、精製 FOC 蛋白質を用いて試験管内でセントロメア再編を再構成することで、セントロメア再編の分子メカニズムに迫る。本研究により得られる成果は、セントロメアに限らずトランスポゾンなどに由来するリピート間で起きる染色体再編の普遍的なメカニズムの理解に役立つと考えられる。また、がんの再発を予防する薬剤の開発にも貢献すると考えられる。

＜支援の内容＞

分裂酵母 *S. pombe* の新規変異株とコントロール株のゲノム DNA を林哲也先生（九州大学）のご協力によりリシーケンスして頂いた。そして、それらの間の塩基配列と比較することで、変異部位を決定した。以下にその詳細を説明する。

（1）ゲノム DNA は Positive pool と Negative pool の２つのサンプルを１セット。これを３セットと野生株のゲノム DNA を合わせて計７サンプルの酵母株のゲノム DNA を MiSeq（Illumina 社）を用いてペアエンド法によりリシークエンスして頂いた。細胞を亜硝酸で処理したため数多くの変異がゲノム DNA に導入されていた。そこで、Pooled Linkage Analysis (PLA)と呼ばれる方法を採用した。PLA 法では独立した変異株のゲノム DNA をプールした後にリシーケンスを行うため、比較的多くの重複（100x coverage）で塩基配列の解読を行って頂いた。

（2）リシーケンスにより得られた塩基配列情報を公開されている分裂酵母のゲノム配列にマッピングする。また、Positive pool と Negative pool で比較解析して、変異部位を特定するバイオイフォマティックス解析もご支援頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

今回、リシークエンスとバイオインフォマティックスをご支援頂いたことにより、目的としていた染色体再編に必要な新規遺伝子 FOC1 の同定に成功した。FOC1 の役割を詳しく解析する為に遺伝子破壊株を作成した結果、興味深いことに、FOC1 は DNA 相同組換え因子 Rad51 の破壊株で起きる染色体再編に特に重要であることが分かった。また、*foc1* 破壊株は DNA アルキル化剤（メチルメタンスルホン酸 MMS）などに対して高い感受性を示すこと、そして、その DNA ダメージ感受性は *rad51* を破壊することでより高くなることが分かった。これらの結果から、DNA 組換え修復に於いて Rad51 とは独立に、Foc1 は働き、染色体再編を引き起こす因子であると考えられる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回、分裂酵母の新規変異株のスクリーニングに次世代シーケンスを導入した。このご支援により、従来の手法では困難なケース、あるいは、大規模スクリーニングを行うケースなどでは、次世代シーケンスを活用することが非常に有効であることが明らかとなった。今後の研究にも次世代シーケンスを活用する道すじが開かれた。

ヒトの場合、BRCA2 などの相同組換え因子に変異があると異常染色体が高頻度で形成されることで乳がんなどのがんが誘発されることが知られている。今回のスクリーニングにより同定した FOC１は酵母からヒトに至るまで広く真核生物に保存されている。したがって、今後、培養細胞を用いて、FOC1 の役割や機能を解析することでヒトに於ける染色体再編のメカニズムも明らかになると期待している。

＜支援成果公表リスト＞

投稿論文準備中

公募支援課題：2012 年度

人為起源物質分解能をモデルとした環境中での細菌の機能進化を司る分子基盤の解明

基盤研究（B）

永田 裕二・東北大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

代表的な環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH)は化学合成により生産された典型的な人為起源物質であり、γ-HCH 分解細菌が環境中で如何にして出現したかを「ゲノム」と「分解酵素遺伝子」に着目して解明する研究を「人為起源物質分解能をモデルとした環境中での細菌の機能進化を司る分子基盤の解明」(基盤研究(B) 平成 22~24 年度）で実施した。その過程で、実際の環境中では、単独の分解細菌ではなく、複数の細菌種からなるコミュニティによってγ-HCH が代謝されている可能性が示唆された。すなわち、日本の HCH 異性体汚染土壌試料から、γ-HCH を唯一の炭素源とした無機液体培地で集積培養を行ったところ、複数の細菌種からなるコミュニティが集積され、液体培地を用いた段階希釈法でも単独の分解細菌を分離することができなかった。さらに、本細菌コミュニティから平板希釈法を繰り返すことで、γ-HCH を唯一の炭素源として生育する *Sphingobium* sp. TKS 株とγ-HCH の分解活性を有さない *Pseudomonas* sp. TKP 株を単離した。一方、インドの HCH 異性体汚染土壌試料から、t-HCH (α-, β-, δ-, γ-HCH の混合物)を含む低栄養液体培地による集積で得られた細菌コミュニティからも、同様にγ-HCH を唯一の炭素源として生育する *Sphingomonas* sp. MM-1 株とγ-HCH の分解活性を有さない *Pseudomonas aeruginosa* MTB-1 株を単離した。

＜支援の内容＞

以上の背景の元、γ-HCH 分解細菌コミュニティの構造と機能の解明を目的として、以下の３項目のゲノム支援を受けた。ゲノム支援における 454 および illumina による解析から得られたリードデータの概要を併せて記す。① 日本の HCH 異性体汚染土壌試料由来のγ-HCH 分解細菌コミュニティのメタゲノム解析 （total read として、454 で 1 Gb 程度、illumina で 5.5 Gb 程度）② 単離した *Pseudomonas* sp. TKP 株のゲノム解析（total read として、454 で 240 Mb 程度、illumina で 50 Mb 程度）③ 単離した *Pseudomonas aeruginosa* MTB-1 株のゲノム解析（total read として、454 で 200 Mb 程度、illumina で 500 Mb 程度）

＜支援によって得られた研究成果＞

支援データを元に TKP 株と MTB-1 株の全ゲノム配列を完全決定し、論文発表した。MTB-1 株は *Pseudomonas aeruginosa* 株と最も近縁であり、データベース上の *P. aeruginosa* ゲノム完全決定株と全体的に高い類似性を示した。MTB-1 株特異的な領域は phage/island と推定された。一方、TKP 株は *P. fluorescens* SWB 株や *P. poae* RE*1-1-14 株と比較的高い類似性を示したが、種レベルでは特定できず、情報の少ない *Pseudomonas* 属株の全ゲノム配列を決定できた。これら 2 株は理研 JCM で入手でき、バイオリソースとして一般に利用可能である。また、MTB-1 株、TKP 株共にγ-HCH 代謝に関与する *lin* 遺伝子群、およびγ-HCH 代謝中間体の代謝に関与すると推定される遺伝子群は見出されなかった。一方、メタゲノム解析により、γ-HCH 分解細菌コミュニティには、TKS 株と TKP 株以外にも属レベルで異なる複数株が存在していることが明らかになった。*Cupriavidus* (β-proteobacteria) の割合が最も高く、それに *Sphingobium* (α-proteobacteria)、*Pseudomonas* (γ-proteobacteria) が続くという結果となった。以上の結果から、コミュニティの遺伝的構造に関する情報を得ると共に、その形成意義として、γ-HCH 分解代謝におけるコミュニティ構成細菌株による積極的な代謝の分業の可能性は低いとの結論に至った。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

メタゲノムリードデータから主なコミュニティ構成菌株と考えられる *Cupriavidus* sp. TKC 株、*Achromobacter* sp. TKA 株、*Hyphomicrobium* sp. TKH 株の単離に成功した。γ-HCH 分解細菌コミュニティは、γ-HCH を唯一の炭素源として含む無機寒天培地上で、TKS 株単独の場合より長期間に渡って持続的にγ-HCH を分解可能な巨大コロニーを形成する場合があり、これら単離細菌株がこのようなコロニー形成に関与している可能性が考えられる。今後、これら単離細菌株と本ゲノム支援で得られた情報を利用して、γ-HCH 分解細菌コミュニティの形成原理の解明、および複数細菌株からなるコロニーの時空的形成過程とその機構の解明へと研究を展開していく予定である。

＜支援成果公表リスト＞

論文発表

Ohtsubo Y et al. 2014. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* MTB-1, isolated from a microbial community enriched by the technical formulation of hexachlorocyclohexane. Genome Announcements **2:**e01130-13.

Ohtsubo Y et al.. 2014. Complete genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain TKP, isolated from a γ-hexachlorocyclohexane-degrading mixed culture. Genome Announcements **2:**e01241-13.

データベース登録

Pseudomonas aeruginosa MTB-1 株 (JCM 19686)
全ゲノム配列 Acc No **CP006853**　公開

Pseudomonas sp. TKP 株 (JCM 19688)
全ゲノム配列 Acc No **CP006852**　公開

公募支援課題：2011 年度

ブルーリ潰瘍対策に有用な早期診断法及び治療法開発に関する研究

基盤研究（C）

中永 和枝・国立感染症研究所ハンセン病研究センター

＜背景・目的＞

ブルーリ潰瘍は *Mycobacterium ulcerans* 感染によって生じる壊死性の難治性潰瘍を特徴とする皮膚疾患で、主として熱帯・亜熱帯地域で見られる。WHO の定めた 17 疾患、Neglected Tropical Diseases のひとつとして、その対策が進められており、世界で毎年数千人規模の新規患者が登録されている。本邦では 1980 年 *M. ulcerans* 近縁の ”*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*” （*M. shinshuense*）感染による皮膚潰瘍の一例が初めて報告された。

M. ulcerans の病原性の主体は他の抗酸菌種にはみられないユニークなマクロライド mycolactone によるもので、細胞死や免疫細胞の抑制、痛みの抑制などを引き起こすものと考えられている。この mycolactone を産生する生合成酵素群はすべて約 170kbp の巨大な plasmid に code された形で一細胞あたり 1-2 コピーが存在する。*M. ulcerans* のゲノム研究は、最初にガーナのブルーリ潰瘍罹患者より分離(1999 年)された Agy99 株について、全ゲノムの詳細な解析結果が報告され、その後多くの株についてクロモゾーム遺伝子が比較解析されてきた。しかし、これまでの報告では *M. shinshuense* のについての詳細は不明瞭なままである。本邦のブルーリ潰瘍は 2015 年 12 月末までに計 57 例が確認され症例数は年々増加し、*M. shinshuense* のゲノム解析の必要性は増している。

＜支援の内容＞

日本で最初に分離された “*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*” ATCC 33728 株（毒性脂質 mycolactone を産生し黄色コロニー、ShT-P 株）および、ATCC 33728 株より得られたコロニーの色調および病原性の異なる株（アイボリー色のクローン ShT-N）の計 2 株についての全ゲノム解析および日本の臨床分離株 25 株との比較ゲノム解析の支援。

支援は平成 23 年度から 27 年度まで、最初に ShT-P および ShT-N の 2 株について Roche454GS FLX を用いた解析。次に ShT-P 株に関してプラスミドを除く約 250 か所のギャップクロージング。さらに Illumina を用いたシークエンスの確認。次に、日本の臨床分離株 25 株についての Illumina を用いたシークエンス解析。さらにプラスミド解析とシークエンスの確認を目的として、ShT-P 株に関して PacBio を用いた解析。それらに加えて、直接の技術指導として、全ゲノムデータのアノテーション法および解析方法についての指導を、また遺伝研にてスーパーコンピューター使用の指導を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

我々は日本で最初に分離された”*Mycobacterium ulcerans* subsp. *shinshuense*” ATCC 33728 株について(毒性脂質 mycolactone を産生し黄色コロニー、ShT-P 株）Roche 454 GS FLX を使用して 全ゲノム解析を試み、約 250 か所の gap を close することでクロモゾームの全シークエンスを獲得し、さらに PacBio での解析結果を加え、より精度の高い全シークエンス結果を得た。*M. shinshuense* ATCC33728 株(5,899,681 bps)には大規模な re-arrangement が生じていることが確認され、5027 個の CDS, 46 個の tRNA, 451 個の pseudogene, 245 個の PE/PPE family（うち 96 個は pseudogene), 221 個の insertion sequence（うち 37 個は欠損変異)を有することが判明している。この結果は、*M. marinum* の約 6.6Mbps と比較すると小さいものの、ガーナで分離された *M. ulcerans* Agy99 株の 5.6Mbps より大きい。また、CDS 数は *M. marinum* が 5424 個、Agy99 が 4160 個、*M. shinshuense*5027 個で、さらに pseudogene 数は、*M. marinum* が 65 個に対して、Agy99 は 771 個、*M. shinshuense* が 245 個で、*M. shinshuense* は *M. marinum* と Agy99 の中間型を示しているものと考えられた。現在、日本の臨床分離 25 株(最初の支援を受けた ATCC37728 を合わせて 26 株)と、他の *M. ulcerans* の相違等を解析中である。

しかしながら、病原性の要と目される巨大 plasmid は、多くの繰り返し配列と高い GC 含量のため、PacBio での解析でも限界があるものと思われ、正確なシークエンス解析まで、今一歩の状態である。また、一つの菌について、plasmid が 1-2 コピーのみなので、plasmid の分離も難航しており、plasmid の解析が次の課題である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本邦のブルーリ潰瘍患者から分離された臨床分離 26 株の解析で、これまでサンガー法による一部の短いシークエンス解析だけでは困難であった、分離株間の異同性の解析が進展しつつある。これによって日本国内の分子疫学的知見が蓄積されるとともに、ブルーリ潰瘍対策への応用が可能となろう。

他方、これまでに、*M. ulcerans* と同様の mycolactone 様の毒性脂質を code する巨大 plasmid を有する抗酸菌群（mycolactone producing mycobacteria：MPM)が罹患したカエルや魚から分離されている。本邦でも、罹患した魚群やカメなどから *M. ulcerans* と近縁の抗酸菌が分離されており、これら日本の MPM 研究の発展も考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

Yotsu, RR. et al.,J. Dermatol. 39, 587-593(2012)
Nakanaga, K. et al., J.Dermatol. 40,151-159(2013)
Nakanaga, K. et al., JJID 66,83-88(2013)
Ohtsuka,M.et al.,JAMA Dermatol.150,64-67(2014)
Yotsu, RR. et al.,J. Dermatol. 42,1-9(2015)
Sugawara, M.et al., J. Dermatol. 42,588-595(2015)

公募支援課題：2012～2013 年度

高病原性ストレプトコッカス・ミチスは存在する：その病原性と疫学の研究

基盤研究（C）

長宗 秀明・徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

＜背景・目的＞

ヒト口腔内常在性の連鎖球菌の一種である *Streptococcus mitis*（SM）は、一般的に非・低病原性の日和見感染菌として認識されている。しかしながら、SM は代表的なヒト病原性の連鎖球菌である肺炎球菌（*S. pneumoniae*）の類縁菌であることに加え、これらの菌種で構成されるミチス-肺炎球菌群連鎖球菌（MGS）の他の構成菌種においても、ヒトに対する病原性との関連に関する報告が近年散見されるようになり、MGS のヒトへの病原性が改めて注目されている。我々は、先行研究において SM の中に膜孔形成毒素であるコレステロール依存性細胞溶解毒素（CDC）をコードする遺伝子を保有し、強い細胞障害性を示すのみならず、β-ラクタム系抗生剤に耐性を示す SM が存在することを見出した。加えて、これまでに、SM において肺炎球菌とのゲノム交雑を示唆する報告も成されている。そこで我々は、このような SM の諸特性をゲノム情報に基づいて明らかにしていくことを目的として、ゲノム支援事業のサポートを受けて SM 株のゲノム配列の取得と解析を行った。

＜支援の内容＞

2012 年度は、9 株の SM 株と 1 株の SM 類縁株を対象とし、illumina MiSeq および Roche 454 GS FLX を用いて配列解析を行い、Newbler によるアセンブリを行った。2013 年度には、さらに 36 株の SM 株と 4 株の SM 類縁株の計 40 株について、illumina MiSeq を用いたドラフトゲノムの追加取得を行った。さらに 2014 年度には、共同研究として、CDC 遺伝子の保有パターンを指標に代表的な SM 株を 10 株選定してゲノムフィニッシングを試みると共に、その内の 2 株については PacBio を用いた解析も行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

まず、2012 年度の解析では、SM 株および SM 類縁株（計 10 株）のドラフトゲノム情報（coverage：×59.9～×152.1、contig 数：30～68、scaffold 数：2～5）を得た。得られたゲノム配列情報に基づいて Average nucleotide index（ANI）解析によるゲノム配列レベルの比較検討を行った結果、SM には亜系統に分類するのが適当と判断されるような系統の異なる菌株群の存在が強く示唆された。この結果より、SM はゲノム構造の多様性が著しく、SM を系統学的に検討するためにはさらに SM 株のゲノム情報が必要であるという結論に至った。

ところで、肺炎球菌と同じく、SM においても薬剤耐性菌の発生が懸案事項となっている。肺炎球菌におけるβ-ラクタム系抗生剤に対する耐性化は、ペニシリン結合タンパク質（PBP）における特定のアミノ酸変異に起因することが報告されている。そこで得られた SM 株のドラフトゲノム配列情報から PBP をコードする遺伝子の配列情報を抽出して検討した結果、β-ラクタム系抗生剤耐性化に寄与すると考えられている PBP のアミノ酸配列変異を伴う遺伝子配列の変異が確認され、SM のβ-ラクタム系抗生物質耐性化には 3 種の PBP（PBP1A、PBP2B、PBP2X）における耐性化アミノ酸点変異が相加的に寄与していることが推測された。

続く 2013 年度の解析では、さらに 36 株の SM についてドラフトゲノム情報（coverage：×73.1～×209.4、scaffold 数：25～119）を得た。得られたゲノム配列情報より肺炎球菌の MLST 解析で使用されている 4 種のハウスキーピング遺伝子（*ddl*, *gdh*, *rpoB*, *sodA*）の部分配列を抽出してコンカテマー化し、ClustalW でアラインメント後に MEGA を用いて系統樹を作成した。その結果、SM の基準株を含むネオタイプ群および肺炎球菌群、さらに SM と肺炎球菌のハイブリッド株的な特性を示す *S. pseudopneumoniae*（SPpn）はそれぞれクレードを形成したが、他の SM 株では特定のクレードを形成しなかった。

さらに 2014 年度には、CDC をコードする遺伝子の保有パターンを指標として代表的な SM 株を 10 株選定し、ゲノムフィニッシングを試みた。しかしながら、20bp 程度から数百 bp のタンデムリピートから成るギャップの存在により、サンガー法によるフィニッシングは困難であった。そこで、10 株中の 2 株について PacBio での解析を行った結果、2 株中の 1 株について完全長配列の取得に成功した。なお、他の株については結果的にフィニッシングを達成できなかったが、それぞれの株のゲノム内に存在するタンデムリピートの多くについて、その構造を決定することができた。

ところで、SM では、特徴が異なる 3 種の CDC［① 肺炎球菌が産生する CDC である pneumolysin のホモログである mitilysin（MLY）、② SM の Nm-65 株が産生する SM 由来ヒト血小板凝集因子（Sm-hPAF）、③ 我々が新たに見出した 5 ドメイン型 CDC（ExD-CDC）］を様々なパターンで複数保有する株の存在が確認されている。今回の解析における被検株について CDC 遺伝子の保有パターンに基づいた検討を行った結果、CDC 遺伝子の保有パターンについては系統的に明確な規則性は確認されなかった。しかしながら、各 CDC 遺伝子の周辺配列にフォーカスした解析の結果から、Sm-hPAF およびそのホモログをコードする遺伝子の周辺構造の保存性は高く、特に上流域はほぼ完全に保存されていることが判明した。また、下流域の遺伝子構造は大きく 2 パターンに分類され、その一方は SPpn 由来 Sm-hPAF ホモログをコードする遺伝子の下流域と同様の遺伝子構造であった。また、SM オリジナルの ExD-CDC をコードする遺伝子の周辺構造についても比較的保存されており、Sm-hPAF と同様に上流域

の遺伝子構造の保存性が高く、下流域は大きく 2 パターンの遺伝子構造に分類された。一方、MLY をコードする遺伝子の周辺構造には比較的多様性があることが確認されると共に、この領域が scaffold の末端となっている解析結果も多く見られた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援事業により得られた SM の全ゲノム配列を用いた高精度な系統解析により、多様な SM 株から成る SM の集団構造が明らかとなり、さらに CDC ファミリーをコードする遺伝子領域の解析によって、SM が保有するこれらの遺伝子の周辺構造は CDC の種類ごとにパターン化が可能であった。それらの結果から、SM 株の進化に対応した CDC をコードする遺伝子のレパートリーの変化および多様性の拡大が推定された。ゲノム支援事業に基づいたこれらの研究成果から、ヒトに対して病原性を示す肺炎球菌の類縁菌でありながら未だに不明な点が多い SM について、CDC をコードする遺伝子を保有して細胞障害性を発揮するサブグループの病原性の再評価に資する重要な情報を提供できるものと期待される。

今後の展望として、SM およびその類縁株を含めたゲノム配列の情報を用いた高精度な系統解析をさらに進めることにより、MGS の系統進化的な位置付けや SM の高病原性株の出現メカニズムの解明に繋がる情報が得られるのではないかと期待している。そして本研究を、ヒト病原体として重要な肺炎球菌を含む MGS による感染症予防や疾患・病態の治療、また SM の薬剤耐性化の抑制などに貢献する有意義な情報を提供できる重要な感染症ゲノム医学研究として、さらに発展させていきたい。

＜支援成果公表リスト＞

論文準備中

公募支援課題：2010 年度

歯周病細菌の病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌機構の全容解明

基盤研究（A）

中山 浩次・長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

＜背景・目的＞

歯周炎は40歳以上の日本人の半数以上が罹患している慢性感染症であり、歯の喪失の最大の原因である。我々はこれまでに偏性嫌気性細菌である歯周病原菌群におけるプロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送、病原因子輸送の機構の解析を行い、新たな分泌輸送系、Type IX 分泌機構を *Porphyromonas gingivalis* から見出た。その機能について *P. gingivali* において変異株を用いた詳細な解析を行ってきた。歯周病原菌群の一つである *Prevotella intermedia* にも本機構の類似の遺伝子が分布することを確認している。しかし本菌では遺伝子操作などの分子生物的研究の基盤が確立してない為に解析が進んでいない。そこで *P. intermedia* においての病原因子輸送機構の網羅的な解析を目指した。これまでに予備的実験により *P. intermedia* の臨床分離株 1 株(OMA14)から次世代シークエンサー（Roche 454）を用いた解析により、85 個の contig からなる draft 配列を得ていた。そこで本研究支援によりこの *P. intermedia* の臨床分離株 1 株の全ゲノム配列を決定し、そのゲノム構造の解析と、ゲノム情報の公開を目指した。

＜支援の内容＞

これまでに *P. intermedia* の臨床分離株 1 株(OMA14)から次世代シークエンサー（Roche 454）を用いた解析により、85 個の contig からなる draft 配列を得ていたが、8kb 超の重複配列の存在の為にこれ以上の解析を進めることができなかった。そこで本ゲノム支援を活用することにより、*Pre. intermedia* OMA14 株の完全長の全ゲノム配列を決定し、その詳細な解析を目指した。

具体的には下記の支援を依頼した。

(1) *Pre. intermedia* OMA14 株の fosmid ライブラリーの作成。
(2) 上記ライブラリーからランダムに選択した約 700 クローン（重複度；10ｘ）の両末端配列の決定。
(3) 上記の結果を利用した contig の整列、および整列した contig 間の gap closing（PCR による closing と fosmid clone の塩基配列決定）。
(4) *Pre. intermedia* OMA14 株の全ゲノム塩基配列のクオリティーを上げるための Illumina あるいは SOLid を用いた resequencing 解析。これまでの data（次世代シークエンサー（Roche 454）解析、fosmid ライブラリー解析）に合わせて再 assemble をおこなう。
(5) （４）での解析結果の contig 整列が正しいか確認する。メタノール固定した菌体を用いて物理的な制限酵素切断パターンを optical mapping 法にて検出、（４）のゲノム配列から予測される制限酵素切断パターンと比較、検証する。

検証済みの data から遺伝子抽出を MiGAP ソフトにて行う。

＜支援によって得られた研究成果＞

今回の支援により high quality な *Pre. intermedia* OMA14 株の完全長全ゲノム配列を決定した。本菌は 2 個の環状染色体、2,280,262 bp と 867,855 bp を持ち、それぞれに 1996 個と 801 個の遺伝子が存在することを明らかにした。*Pre. intermedia* ゲノム配列についてはこれまでに１株（strain 17）で報告されているが、その株のゲノムと比較すると、第二クロモゾームが約 300 kb 大きいこと、大規模なゲノム構造の再編成がみられることが明らかになった。

得られたゲノム配列には Type IX 分泌機構に必須の遺伝子群が全て存在する事を確認した。

また、ゲノム配列のさらなる解析により、*Pre. intermedia* のゲノムには多様多数の転移性遺伝因子が存在することを明らかにした。OMA14 株には conjugative transposo（CTn）が 3 種 6 コピー，mobilizable transposon（MTn）が 6 種 15 コピー存在していた。また strain17 のゲノムには CTn2 種 2 コピー、MTn6 種 7 コピーが存在していた。前述のゲノムサイズの株間の差はこれらの複数の転移性遺伝因子の挿入によることが示唆された。このように OMA14 株のゲノムには数十 kbp の CTn が複数存在する事から Fosmid クローンを用いた解析と、optical mappinng による配列確認なしには全ゲノム配列を決定することは不可能であったことも示された。

またゲノム全長にわたって 188 bp の反復配列が OMA14 株から 177 個、strain 17 株から 184 個見いだされた。homology 検索と特異的な PCR による解析から *Pre. intermedia* と *Pre. nigrescens* 等の近縁種以外にはこの配列は検出されなかった。これらの結果からこの反復配列が *Pre. intermedia* と *Pre. nigrescens* に特異的なものと考えられたことからこれを PINSR(*Prevotella intermedia-nigrescence* specific repeat）とした。PINSR を今後 *Pre. intermedia* の検出、同定に用いることができると考える。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

P. intermedia は他の歯周病原菌と異なって妊娠性歯周炎、思春期性歯周炎との関連が知られているが、その機構は未解明である。本支援を基に得られたゲノム情報を活用することで、本菌の病原性、病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌機構の比較を行うことができた。本支援後の展開として、得られたゲノム情報をもとに病原遺伝子等の遺伝子特異的な変異株の作成を目指している。

＜支援成果公表リスト＞

Naito, M.. et al., DNA Research (in press)

公募支援課題：2013 年度

アジア人種の食と腸内フローラと健康に関する調査研究

基盤研究（B）

中山 二郎・九州大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

「食と体と健康」に関するライフサイエンスへの関心が日々高まってきている今日、多民族が混在するアジアは、ユニークで健康効果の高い食文化の宝庫でもあり、「食と体と健康」の疫学フィールドとして注目されている。一方、近年の腸内細菌学の発展により、500～1000 種の細菌から構成される腸内フローラは、食と健康を繋ぐインターフェースとして非常に重要な役割を果たしていることが分かってきた。そこで、我々は、アジア諸外国・計 10 ヶ国の研究グループと共同で Asian Microbiome Project (AMP)を立ち上げ、アジア各地域における食と腸内細菌叢と健康状態について、詳細かつ網羅的に調査し、基盤データベースを構築している。そして、そのデータベースを多次元的に解析し、人種と食と腸内細菌叢と健康の間の関連性を数多く見出すことを目標としている。これらの知見は、アジア発の腸内細菌を介する健康食品や医薬開発にも大きく貢献すると期待されるところである。

＜支援の内容＞

AMP では、第一期研究（Phase I study）として、各国特有の食を摂取する機会がより多いと期待される児童（７歳～１１歳）を対象に、食と腸内細菌叢の調査を行った。そして 16S rRNA 遺伝子による菌叢解析は科研費基盤研究 B 海外学術調査により独自に行い、303 名の菌叢プロファイルデータを得た。本ゲノム支援研究では、この Phase I study で対象としたサンプルの中から特徴的な菌叢プロファイルを有する 36 サンプル（バンコク 7 サンプル、コンケン 6 サンプル、ジョグジャカルタ 5 サンプル、バリ 5 サンプル、福岡 9 サンプル、韓国 4 サンプル）を選択し、ショットガンメタゲノム解析を行っていただいた。

各糞便サンプルより抽出した細菌ゲノム DNA を精製し、Illumina Nextera Kit でシーケンス用の DNA 断片を調整し、Illumina HiSeq により 150 bp のペアエンドショットガンシーケンスを行った。結果、各サンプルあたり平均約 10Gb の配列を得た。ヒトゲノムに相当する配列は、ヒトゲノム配列リファレンスデータベース hg38 に対して、得られた配列を Bowtie および BMTagger のプログラムを用いてマッピングさせることで検出し、除去した。得られたペアー配列を連結し、平均長 170 base の断片の配列が各サンプルあたり 11.1±8,5 M 本を得た。それらを Bowtie2 でマッピング、Platanus-UD でアッセンブルして、各サンプルあたり約 40 万本（平均長 671 bp）の contig を得た。MetaGeneMark による予測遺伝子数は各サンプルあたり約 55 万であった。次に、それらの配列を用いて、KEGG Gene Blast を行った。その結果、約 70%がヒットした。最終的に、KEGG 解析から遺伝子の機能カテゴリーごとの存在比データを得た。

＜支援によって得られた研究成果＞

我々が基盤研究（B）により独自に解析した AMP Phase I においてサンプリングしたアジア 5 ケ国の小学児童 303 名の 16S rRNA の配列解析結果から、アジア児童の腸内細菌叢が大きく 2 つのタイプ分けされることを見出している。一つはプレボテラ属細菌を優占菌とする P タイプ、もう一つは、バクテロイデス属およびビフィズス菌を優占菌とする BB タイプである。これらは、欧州の MtetaHIT のグループが発見したヒト腸内細菌の大きな 3 つのタイプ（エンテロタイプ）に相当すると考えられる。

今回のゲノム支援研究で得られたメタゲノム解析から、P タイプおよび BB タイプの細菌叢コミュニティーがコードするタンパク質の機能構成の特徴を見出すことができた。特に興味深い特徴として、BB タイプには、胆汁酸生合成酵素遺伝子の存在比が高かった。また、P タイプには、アミラーゼやペクチナーゼ関連の遺伝子の存在比が高かった。BB タイプは日本、中国、台湾に多く、インディカ米由来の難消化性デンプンを多く摂っているインドネシアやタイの子ども達に比べて腸管における脂質の濃度が高く、胆汁酸の濃度も高くなり、プレボテラなど胆汁酸に対する耐性が低い細菌を保持できなくなっているのではないかと推察される。

また、P タイプと BB タイプにコードされるタンパク質の機能構成を全体比較すると、両者の関係が、アメリカ人とアフリカ人の関係(Yatsunenko et al., Nature 2012)に類似していた。つまり東南アジアにおいても欧米化の影響が腸内フローラに現れていると考えられ非常に興味深い。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

16S rRNA の配列情報からは得ることができなかった腸内細菌叢の機能情報を詳細に得ることができた。特に、我々が進展させているアジア人の腸内フローラの比較研究では、食と健康のインターフェースとしての腸内フローラの機能を理解することを最終目標としていることから、今回のメタゲノム研究により大きくゴールに近づくことができたと考える。今後より詳細にデータを解析し、できれば新たにサンプルとそのメタゲノムデータも収集していくことで、アジアの多様な食が、それぞれ宿主にどのような影響を与え、その結果どのようにアジア人の健康に影響を及ぼしているか、広く、深く、正確に理解していきたいと考える。

＜支援成果公表論文リスト＞

東佳那子，中山二郎，腸内細菌学雑誌 29, 135-144 (2015).

公募支援課題：2015 年度

アジア人種の食と腸内フローラと健康に関する調査研究

基盤研究（B）

中山 二郎・九州大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

21 世紀の幕開けとともに爆発的に進展したゲノム科学の技術革新は、腸内共生菌学にも多大なる波及効果を及ぼし、腸内共生菌と宿主の健康の関係について次々とメスを入れている。特に最近では、1000 種にのぼると言われる共生菌群において、どの菌がどのように宿主に影響を与えているか、詳細なデータが示されるようになってきた。

このような時代背景の中、米国 NIH 主導の Human Microbiome Project(HMP)、欧州では Metagenomics of Human Intestinal Tract (MetaHIT)と、多人数の腸内フローラデータを収集する大規模プロジェクトが進行している。そして、アジアでも、自身の腸内フローラのデータを自分たちの手により収集しようという機運が高まり、2009 年にアジア乳酸菌学会連合のメンバーが中心となり、Asian Microbiome Project (AMP)を始動した。Phase I study では、それぞれの国の食文化を反映する家庭食を主とする小学児童を対象に、5ヶ国 10 都市で調査を行った（Nakayama et al., 2015. Sci. Rep)。計 303 名の糞便サンプルについてメタ 16S rRNA解析を行い、得られた細菌組成データを基に、主成分分析を行った。その結果、興味深いことに、アジア人の腸内フローラは大きく二つのタイプにクラスタリングされることが判明した。一つは、プレボテラ属細菌をコアとする P タイプで、インドネシアとタイに多く見られる。一方、日本、中国、台湾の児童はビフィズス菌とバクテロイデス属を豊富に有する群に属し BB タイプと命名した。

続いて 2013 年度に、ゲノム支援研究の支援を受け、上記 303 サンプルから、特徴的な細菌組成を示した 36 サンプルを選択し、ショットガンメタゲノム解析を行った。その結果、BB タイプには胆汁酸脱抱合酵素遺伝子がより豊富で、P タイプにはαアミラーゼの遺伝子がより豊富であることが示された。各国の食習慣アンケート調査結果を照合して、P タイプの人はインディカ米やジャワニカ米などジャポニカ米に比べると難消化性デンプンを多く含む米の摂取量が多く、そのためプレボテラ属などαアミラーゼを有する細菌が多くなっているのに対し、BB タイプでは、難消化性デンプンや食物繊維摂取量が少なく、腸管の胆汁酸量が高くなり胆汁酸感受性のプレボテラ属細菌が生息できなくなっている、という作業仮説を立てるに至っている。

2014 年度には、P タイプの多いインドネシアと BB タイプの多い日本にて出生した乳幼児を対象に糞便細菌叢の解析を行った。その結果、大変興味深いことに、P タイプのインドネシアの出生児は離乳後一旦バクテロイデスが豊富なフローラを構築するがその後まもなく P タイプに転換することが判明した。そして、この事実から我々は、乳幼児の糞便細菌叢の経時変化を食事調査と、ゲノム支援研究によるメタゲノム解析をリンクさせて進展させることで、P と BB の腸内フローラタイプが構築されていくダイナミズムの理解に迫りたいと考えている。

＜支援の内容＞

これまでの AMP における研究成果から、アジア人の腸内フローラは、日本や中国に多いビフィズス菌・バクテロイデス属細菌を豊富に含む BB タイプと、インドネシアやタイに多いプレボテラ属細菌を豊富に含む P タイプの２つのタイプに大きく分かれることが示されている。そして、P タイプと BB タイプは離乳後まもなくの幼児期に形成されることも判明した。本支援研究では、日本とインドネシアの母親と乳幼児の月・年齢ごとの糞便サンプルのショットガンメタゲノム解析を行い、①母親と子の間の腸内細菌叢の相関、②ビフィズスフローラからバクテロイデスフローラを経由してプレボテラフローラが形成されるまでの、細菌コミュニティーの機能変化、③日本とインドネシアの乳幼児の生後の腸内フローラ変遷の相違とそれを生む要因、以上を明らかにすることを計画している。

＜支援によって得られた研究成果＞

上記ショットガンメタゲノム解析を現在実施中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

「食と体と健康」に関するライフサイエンスへの関心が日々高まってきている今日、多民族が混在するアジアは、ユニークで健康効果の高い食文化の宝庫でもあり、「食と体と健康」の疫学フィールドとして注目されている。一方、近年の腸内細菌学の発展により、500～1000 種、100 兆個の細菌から構成されると言われる腸内フローラは、食と健康を繋ぐインターフェースとして非常に重要な役割を果たしていることが分かってきた。本研究にて、無菌状態からこのような高度な生態系がヒトの腸管にて形成されていく過程をゲノムレベルでモニタリングすることにより、その生態系を四次元に理解することが可能になり、さらには宿主の成長も与える影響も多くの情報が得ることができると期待される。あと２ヶ月間でのデータ解析の進展に強く期待する。

＜支援成果公表論文リスト＞

無し

公募支援課題：2012～2013 年度

全ゲノム解析による家族性 IgA 腎症の原因遺伝子の探索

基盤研究（C）

成田 一衛・新潟大学大学院医歯学総合研究科

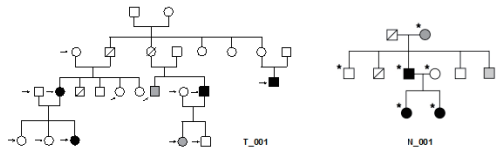
＜背景・目的＞

腎生検で確定診断した IgA 腎症患者において、一見孤発例と思われる症例でも約 5-10%に尿異常や腎不全の家族歴が観察され、IgA 腎症による腎不全で肉親をドナーとする腎移植を行うと、移植直前のドナー腎糸球体に 2～3 割ほどの頻度で IgA の糸球体沈着が観察される。IgA 腎症の発症に遺伝要因が関与していると考えられる。

本研究の目的は、家族性 IgA 腎症の疾患感受性遺伝子を同定し、それを通して本症の発症機序をより詳細に理解することである。家族性 IgA 腎症の原因を明らかにするために、多数の家系を対象とした連鎖解析が行われてきたが、現在までに責任遺伝子は同定されていない。近年、高速シーケンサによる大量の遺伝子配列情報から家族性希少疾患を中心とした疾患遺伝子の解明が進んでいる。今回、家族性 IgA 腎症にもこの解析方法を試みた。

＜支援の内容＞

2012 年度は、家族性 IgA 腎症 2 家系について 20 名、2013 年度は 10 家系について、30 名のエクソーム解析の支援をいただいた。



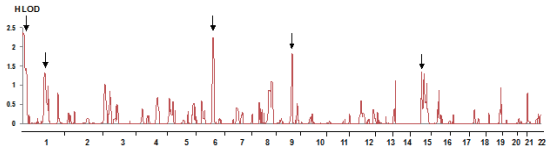
T_001 家系　　N_001 家系

2012 年度：エクソーム解析が行われた家族性 IgA 腎症 2 家系

＜支援によって得られた研究成果＞

2012 年度は、IgA 腎症が 3～4 名以上認められる 2 家系を対象としてエクソーム解析が行われた。これに先立ち支援依頼者らは IgA 腎症 4 名を含む家系（N_025）のエクソーム解析を行い、全エクソンの配列情報からフィルタリングを行い、罹患者にのみ共通する 13 の variant が選別された。上図の N_001 家系では 12、T_001 家系では 12 の variant が選別されたが、3 家系で共通する変異は認められなかった。N_025 家系では、*EEA1* p.F161Y は連鎖解析で LOD スコアが最も高い領域内に認められ、家系内 co-segregation が完全に一致した。さらに他の 27 家系において *EEA1* 変異スクリーニングを行い、F161Y とは異なる変異（R1262W, N1072K, E1010G）を認め、日本人データベースと比較し、*EEA1* 変異は家族性 IgA 腎症に有意に多く認められた。EEA1 は初期エンドサイトーシス小胞間の融合からソーティングに必須の蛋白である。IgA 分子のトランスサイトーシスにも関与しており、粘膜免疫異常から IgA 腎症の発症に関与する可能性がある。また、T_001 家系での候補遺伝子変異群にはリンパ球優位に発現する遺伝子が含まれており、IgA 腎症の発症に関与する可能性がある。

2013 年度は、比較的小規模な 10 家系について、エクソーム解析と連鎖解析を統合し、候補遺伝子変異の同定を試みた。エクソーム解析によって得られた SNV/ins/del から、アミノ酸置換を伴い、頻度が低く（Human Genetic Variation Database で 1%以下）、そして罹患者のみに認められる SNV/ins/del を各家系毎に絞り込んだ。また、エクソーム解析で得られた 10 家系の SNV データを用いて、全ゲノム連鎖解析（linkdatagen, merlin）を行った。全ゲノム連鎖解析では、パラメトリック解析で LOD スコア＞1.3 を示す 5 領域（1p36, 1p12-12, 6q16-21, 9q22, 15q21）が検出された。各家系間で共通して認められる SNV/ins/del をリスト化し（44 variants）、さらに連鎖解析のピーク領域に存在する variant に絞り込んだ（6q21, 15q21）。



2013 年度：家族性 IgA 腎症 10 家系の連鎖解析

6q21 には、B リンパ球に発現し、形質細胞への分化を調節する遺伝子の SNV が含まれており、アミノ酸置換の影響も大きいと考えられた。B リンパ球から形質細胞への分化異常が粘膜免疫に与える影響について、IgA 腎症の発症との関連を患者リンパ球で現在、検討している。

ゲノム支援を通じて得られたこれらの候補遺伝子について今後、孤発例の変異スクリーニングや機能解析を行い、IgA 腎症の原因遺伝子としての証明を進めて行く。これにより、IgA 腎症の病態の解明がさらに進むと思われる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、家族性 IgA 腎症の遺伝背景の概略が明らかにされつつある。IgA 腎症の発症には多くのステップが関与しており、多因子疾患として各家系の遺伝背景は異質性が強い。必ずしも全ての遺伝要因を同定できるとは限らないが、浸透率の高い家系を対象に解析を進めることで原因遺伝子を確実に同定することは可能と考えられる。国際共同研究で IgA 腎症の GWAS の解析結果が報告されているが、合わせて本研究により rare variants/mutations を同定し、IgA 腎症の病態の全貌解明、また創薬に向けた治療ターゲットの探索も期待される。

＜支援成果公表リスト＞

現在、英文論文を準備中

公募支援課題：2014 年度

ホロゲノム解析による IgA 腎症の病態解析と治療ターゲット探索

基盤研究（B）

成田 一衛・新潟大学大学院医歯学総合研究科

＜背景・目的＞

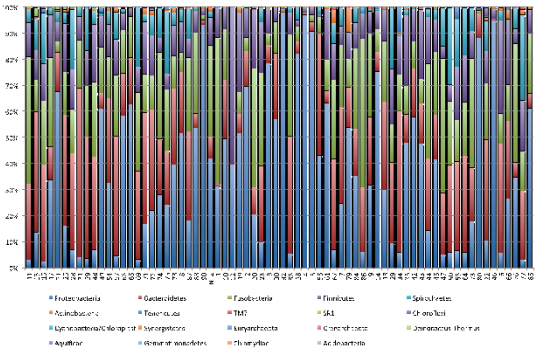
糸球体メサンギウム領域への免疫グロブリン A(IgA)沈着を特徴とする IgA 腎症は、最も頻度の高い原発性糸球体腎炎であり、慢性腎不全の主な原疾患の一つでもある。その発症には、細菌抗原等の環境因子と遺伝的背景両者の関与が想定され、現在まで本症の疾患感受性遺伝子は部分的に明らかになってきたが詳細は不明である。今まで環境因子と遺伝的背景とは、それぞれ別個に研究されてきたため、それらの関連を評価することは不可能であった。しかも、ヒトは自身の細胞数の 10 倍以上の微生物細胞を有しているが、その大半は培養不可能であり、解析できなかった。

“ホロゲノム”とは、ホストゲノムだけでなく、生体内に存在する全ての環境微生物ゲノム、さらにはエピゲノム解析も同時に行い、それらを包括的に評価する方法で、近年の解析技術の進歩により初めて可能となったものである。本研究はこれを、IgA 腎症の発症・進展機序解明に応用する。

IgA 腎症では半数以上の症例で血清 IgA 値が上昇し、IgA の産生・代謝に異常がある。ヒンジ部 O-結合型糖鎖修飾の異常を持つ糖鎖不全 IgA1 分子は、自己凝集、代謝遅延、メサンギウム細胞・基質への高親和性などの性質があり、本症の原因に直結していると考えられる。この IgA1 の O-結合型糖鎖の形成不全は、(原因は分かっていないが)主に扁桃粘膜で生じ、それが IgA1 の糸球体への沈着と炎症を惹起する重要なステップであること、そして糸球体メサンギウム細胞側の異常も重要であることが分かっている。

口蓋扁桃の異常が本症発症において重要な役割を果たすことは、臨床的事実からも明らかである。扁桃摘出術の有効性は良く知られており(Xie Y, et al. Kidney Int 2003, 63:1861 他)、扁桃摘出と副腎皮質ステロイドパルス療法を早期に行うと、70%以上の寛解率が得られる。一方、口蓋扁桃で糖鎖不全 IgA1 が産生される本質的な機序は未解明である。しかも、軽症早期例に対して侵襲を伴う外科的治療と大量ステロイド療法を必要とするという問題も解決されていない。そのためこの治療は、国外では全く認知されておらず、最近の KDIGO ガイドラインでは“行わないことを推奨”されている。したがって、臨床的な有効性を RCT で証明するとともに、その有効性を説明するメカニズム自体を明らかにすることが必須であり、わが国のこの分野に携わる者の責務でもある。

申請者らは今回の申請に先立ち、IgA 腎症、習慣性扁桃炎、小児扁桃肥大症例の摘出扁桃の深部陰窩組織から DNA を抽出し、16S rRNA V4 領域のゲノムシークエンスを決定した。IgA 腎症で、Fusobacterium, Prevotella, Treponema, などが主たる細菌属レベルであることが明らかとなった。



＜支援の内容＞

現在までに行われた 16S rRNA 解析で IgA 腎症で主たる細菌群と認められた、Fusobacterium 属，Prevotella 属についてドラフトゲノムシークエンスを行い、公的データベースなどと比較を行う。IgA 腎症に特異的な細菌株が存在するか、ゲノム比較解析を行なう。

＜支援によって期待される研究成果と現状＞

IgA 腎症患者では一見正常な扁桃でも摘出して観察すると深部では病巣感染が認められ、また嫌気性菌などが関与している可能性もあり、通常の扁桃培養では検出できない可能性がある。網羅的な細菌ゲノム解析により IgA 腎症の扁桃組織における細菌叢の全貌が明らかとなれば、IgA 腎症の発症における細菌感染の役割が明らかとなり、扁桃生検による診断法の開発や、扁桃摘出治療の理論的な根拠につながると思われる。

IgA 腎症では糖鎖不全 IgA1 の産生が亢進し、さらには糖鎖不全 IgA1 ヒンジ部に対する抗体が産生されて免疫複合体を形成し、腎糸球体メサンギウム領域へ沈着して糸球体腎炎が惹起される、multi-hit theory が提唱されている。扁桃細菌ゲノム解析で明らかとなった細菌群がこれらの免疫反応を惹起するか扁桃培養細胞で確認する。またこれらの細菌群の菌体成分が免疫抗原である可能性もあり、主要な細菌群の菌体成分に対する抗体を作成し、血中での抗体価の測定や、腎生検組織においてこれらの菌体成分を含む免疫複合体が存在するかどうか検討を行う。IgA 腎症に特異的な細菌群は抗菌薬を使用した新たな治療ターゲットになる可能性が大きいと考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

成果がまとまり次第、英文論文を投稿予定

公募支援課題：2014 年度

甲虫の角（ツノ）形成遺伝子ネットワークの進化メカニズムの解明

新学術領域研究

新美 輝幸・基礎生物学研究所進化発生研究部門

＜背景・目的＞

本研究は、複合適応形質として昆虫の多くの系統で独立に獲得された角（ツノ）に着目する。昆虫を取り巻く様々な環境の中で、繁殖戦略との相互作用を通して進化した新奇適応形態である角には、他の生物群に比類のない極めて多様な形態が存在する。研究材料には、雄にのみ顕著に発達した角を持つカブトムシ、またカブトムシとはそれぞれ独立に角を獲得したオオツノコクヌストモドキおよびファイルキクイムシなど角形質を有する様々な昆虫を用いる。これら昆虫の利点や申請者がこれまでに確立した遺伝子機能解析法を生かし、主に次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析により角形成を制御する遺伝子を同定し、角形成遺伝子ネットワークの進化メカニズムを解明する。最終的には、種･科･上科レベルで異なる昆虫種を用いた比較解析により、進化の新しい共通理論の構築を目指す。

これまでにカブトムシでは、網羅的なゲノム解析技術を駆使して顕著な性的二型形質である角の形成メカニズムを解明するため、ゲノム解読や RNA-seq 法を用いた比較トランスクリプトーム解析を行ってきた。ゲノム解読は、scaffold N50 が 2.4 Mb と良好な結果が得られ、ゲノムサイズは約 638 Mb であることが判明した。また、角原基の RNA-seq 解析により、性間比較および性内比較により発現差のある遺伝子をリストアップし、RNAi 法による機能解析スクリーニングにより、多数の角形成遺伝子の同定に成功した。

本ゲノム支援プロジェクトでは、カブトムシにおける角形成遺伝子ネットワークの全貌解明に向け、転写開始点に近い転写因子結合サイトの特定に有効な TSS-seq 法により、カブトムシの角原基で発現する遺伝子について転写開始点の網羅的同定を試みた。

＜支援の内容＞

TSS-seq 法による転写開始点の網羅的同定

上述した RNA-seq 解析と同様に、前蛹 6 日の野生型の雌雄それぞれの各原基（試料数 4；雄頭部角、雄前胸部角、雌頭部角相当領域、雌前胸部角相当領域）をサンプルに用いライブラリーを作製し、オリゴキャップ法に基づく TSS-seq 解析を行った。各ライブラリーについて 100 M リード程度（発現量の低い転写因子の転写開始点でも認識できる程度の解析規模）の配列情報を取得することを目指した。

＜支援によって得られた研究成果＞

HiSeq2500 にて 36 bp Single End の条件でシークエンスを行ったところ、雄頭部角原基は 75.7 M リード、雄前胸部角原基は 122.6 M リード、雌頭部角相当領域原基は 84.2 M リード、雌前胸部角相当領域原基は 47.7 M リードと良好な結果が得られた。現在、共同研究者と共に今回得られた TSS-seq 情報をこれまでに解読したカブトムシゲノム概要配列に対してマッピングを行っている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまでに、転写因子をコードする性決定遺伝子 *doublesex* (*dsx*)は角形成に極めて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。本支援により得られるゲノムワイドな転写開始点情報に加え、現在解析中の Dsx のゲノムワイドな結合配列情報を統合することにより、*dsx* 標的遺伝子のゲノムレベルでの詳細な同定が可能となる。これら標的遺伝子の候補について、RNAi 法による機能解析を行い角形成への関与を検証する。以上の解析により、角形成遺伝子ネットワークにおける *dsx* の役割の解明を目指す。

また、転写開始点の網羅的同定により非モデル昆虫においても有効な新規 *in vivo* エレクトロポレーション法（Ando and Fujiwara, 2013）を用いたプロモーター領域のレポーターアッセイを容易に行うことが可能となり、さらなるゲノム機能の解明に資することが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

なし（本支援内容で得られた結果をカブトムシのゲノム解読の論文に含めて発表する予定である。）

公募支援課題：2014 年度、2015 年度

テントウムシに関連した擬態斑紋をもたらすゲノム・遺伝子相関の解明

新学術領域研究

新美 輝幸・基礎生物学研究所進化発生研究部門

＜背景・目的＞

本研究は、ナミテントウの極めて多様性に富む斑紋多型およびテントウムシに関連した擬態斑紋に着目する。研究材料には、各種テントウムシおよびテントウムシとは独立に擬態斑紋を獲得したテントウノミハムシを用いる。申請者が世界に先駆けてナミテントウにおいて同定した翅全体の斑紋パターンを決定する転写因子をコードする遺伝子（斑紋プレパターン遺伝子）に焦点を絞り、材料に用いる昆虫の利点や申請者がこれまでに確立した遺伝子機能解析法を活かし、斑紋多型をもたらすゲノム変化、テントウムシ科内の異なる斑紋パターンや独立に獲得された擬態斑紋をもたらす遺伝子発現制御領域などのゲノム変化、さらに複雑な対立遺伝子構成が生じたゲノム要因を特定し、擬態斑紋がもたらされたゲノム・遺伝子相関を解明する。

＜支援の内容＞

2014 年度

(1) ナミテントウのドラフトゲノム解読

(2) RNA-seq を用いた比較トランスクリプトーム解析

2015 年度

(3) TSS-seq 法による転写開始点の網羅的同定

(4) ヒメカメノコテントウ及びダンダラテントウのドラフトゲノム解読

＜支援によって得られた研究成果＞

2014 年度

(1) ナミテントウのドラフトゲノム解読

サンプルには雌成虫を用いた。Platanus を用いたアセンブルの結果、Scaffold N50 が 1.6 Mb と非常に良好な結果が得られた。また、ゲノムサイズも明らかとなった。次に、遺伝子構造予測を行った。今後は、今回得られたゲノム情報を利用して、斑紋多型をもたらすゲノム上の要因を特定する。

(2) RNA-seq を用いた比較トランスクリプトーム解析

翅原基を RNA 抽出のサンプルとし、統計的に発現量に有意差のある遺伝子をリストアップするため、biological replicate は 3 サンプル準備した。合計 18 のライブラリーを作製し、HiSeq 2500 を用いて 100 bp Paired End の条件でシークエンスを行ったところ、各サンプルにつき 15～81 M read の配列を得ることができた。

2015 年度

(3) TSS-seq 法による転写開始点の網羅的同定

現在、サンプル準備中。

(4) ヒメカメノコテントウ及びダンダラテントウのドラフトゲノム解読

サンプル送付済み。現在、解析中。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

前年度のゲノム支援によりゲノム解読を行ったナミテントウとはそれぞれ独立に斑紋多型を獲得したヒメカメノコテントウ及びダンダラテントウに着目した。ナミテントウに加え、本ゲノム支援において、独立した斑紋多型をもつヒメカメノコテントウ及びダンダラテントウのゲノム解読を行うことにより、顕著な斑紋多型を有する 3 種のテントウムシの比較ゲノム解析が可能となる。最近、申請者は RNAi 法を駆使することにより、ヒメカメノコテントウにおいてナミテントウとは異なる斑紋プレパターン遺伝子の同定に成功した。本研究では、これまでに同定した斑紋プレパターン遺伝子に焦点を絞り、3 種間でゲノム構造の比較及びこれまでに確立した種々の遺伝子機能解析を通して、斑紋多型を生じさせる複雑な対立遺伝子構成をもたらすゲノム要因を特定することを目指す。

＜支援成果公表リスト＞

なし（現在解析中であり、解析結果が得られた段階で論文の内容を検討する。）

公募支援課題：2015 年度

昆虫翅の起源と多様化メカニズムの解明とその応用

基盤研究（B）

新美 輝幸・基礎生物学研究所進化発生研究部門

＜背景・目的＞

飛翔器官として獲得された昆虫の翅は、昆虫の多様化に伴いそれぞれの昆虫目において特徴のある翅へと進化してきた。甲虫（鞘翅目昆虫）の場合、体の保護機構を果たすため前翅が硬化した鞘翅へと変化し、後翅は飛翔器官としての役割を維持している。37 万種という圧倒的な種数を誇る甲虫(鞘翅目昆虫)を特徴付ける形質は前翅が硬化した鞘翅であるが、その鞘翅形成メカニズムの解明はあまり進んでいない。昆虫では一般に、中胸に存在する前翅がデフォルトの形態とされ、後胸を特徴付けるホメオティック遺伝子である *Ultrabithorax*（*Ubx*）により後翅に変化がもたらされている。これに対し、鞘翅目昆虫では興味深いことに、他の昆虫とは逆の現象が観察される。つまり、*Ubx* の RNAi により飛翔のための後翅が前翅の特徴を持つ鞘翅へと変化するのである。この現象は鞘翅の進化における大きな謎となっている。

本ゲノム支援では、この進化上の謎を解くため、(1) 正常発生過程の翅原基の RNA-seq を用いた比較トランスクリプトーム解析及び (2) 研究代表者が既に確立した RNAi 法を利用して鞘翅形成の鍵となる転写因子をコードする遺伝子の機能阻害によって発現が変化する遺伝子の網羅的な同定を目指す。実験材料には、昨年度のゲノム支援によりゲノム概要配列を決定したナミテントウを用いる。

＜支援の内容＞

(1) 正常発生過程の翅原基の RNA-seq を用いた比較トランスクリプトーム解析

(2) RNAi 処理個体の RNA-seq を用いた比較トランスクリプトーム解析

＜支援によって得られた研究成果＞

(1) 正常発生過程の翅原基の RNA-seq を用いた比較トランスクリプトーム解析

サンプル送付済み。現在、解析中。

(2) RNAi 処理個体の RNA-seq を用いた比較トランスクリプトーム解析

サンプル準備中。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本ゲノム支援では、正常発生過程の翅原基の比較トランスクリプトーム解析および鞘翅形成の鍵となる転写因子をコードする遺伝子の RNAi 処理区と対照区の比較トランスクリプトーム解析を行うことにより、これまで不明である鞘翅形成遺伝子群ならびに鞘翅形成の鍵となる転写因子の標的遺伝子群の候補を網羅的にリストアップする。次に、昨年度のゲノム支援により解読したナミテントウのゲノム情報を利用して、これら候補となる標的遺伝子のプロモーター上流域など発現制御に関与する可能性のある領域について鞘翅形成の鍵となる転写因子の結合コンセンサス配列の有無を検索して、直接の標的遺伝子である可能性を検討する。続いて、研究代表者が確立した larval RNAi 法を用いて機能解析を行うことにより、鞘翅形成過程における各遺伝子の役割を明らかにすることにより、鞘翅形成の全貌解明に迫る。さらに、鞘翅形成過程において重要な役割を果たすことが判明した遺伝子については、ショウジョウバエの飛翔用の前翅の発生過程において異所的に発現させることにより、飛翔用の翅から鞘翅へと形態的な変化を引き起こす機能を有するか否かについても検証する。以上のような loss-of-function および gain-of-function 実験を通して鞘翅目昆虫の進化に伴い生じた鞘翅の進化プロセスの推定を行う。

＜支援成果公表リスト＞

なし（結果が得られた段階で論文の内容を検討する）。

公募支援課題：2013~2014 年度

新規形質獲得のゲノム基盤とその進化的起源

新学術領域研究

二階堂 雅人・東京工業大学大学院生命理工学研究科

＜背景・目的＞

「平行進化」とは、系統的に異なるグループの生物が、似た生息環境に適応するためにそれぞれが独立に似通った形態形質を獲得することである。これは新規形質の獲得において自然選択が重要であることを色濃く示唆し、形態進化のメカニズムを理解する上で重要な現象である。東アフリカの大地溝帯に位置する三大湖、ビクトリア湖、マラウィ湖、タンガニィカ湖には、それぞれに固有な種が数百を超えて生息しているが、これらのシクリッドは湖を超えて似た形質をもつことが知られており、上に述べた平行進化の好例といえる。本研究では、どの三大湖におけるシクリッドでもかならず観察される「唇の肥大化」という平行進化形質に着目し、その獲得メカニズムを明らかにしようと考えている。具体的には、シクリッド祖先集団がいかなる遺伝的基盤（変異サイト）をもち、それに対してどのような自然選択が働くことで「唇の肥大化」という平行進化が起きたのかを明らかにする。

＜支援の内容＞

唇の肥大化しているシクリッド種（*Haplochromis chilotes*）と肥大化していない種（*H. sauvagei*）の 2 種を対象に、全ゲノム配列の決定（リシーケンス）、異種間雑種系統の構築から遺伝子地図の作製、QTL マッピングをおこなってきた。本ゲノム支援においても、これまでの研究の流れをくんで上記 2 種についての解析を依頼した。まず 2013 年度には、2 種の唇組織について菅野・鈴木 GP に RNA-seq を実施していただいた。その目的は、2 種間の唇組織における様々な遺伝子発現の絶対量を比較することで、唇の肥大化に関与する遺伝子を探索することにある。試料数に関しては、*H. chilotes* 唇組織 RNA x 4 個体分と、*H. sauvagei* 唇組織 RNA x 4 個体分で、それぞれに個体毎に Tag 標識し Hiseq2000 を用いて 2 レーン分の配列データを得た。この支援による解析によって目的遺伝子の絞込みに成功したため、2014 年度はシス変異領域の特定をすることが目的となった。そこで上記 2 種に加えて、アウトグループとなる種（*L. rufus*）の野生個体を各 6 個体について、全ゲノム配列データの収集（各種 1 レーン）をしていただいた。アセンブル作業は東工大・伊藤 GP に実施していただいた。解析を進めるにあたり目的遺伝子の周辺領域が多型に富んでおり、正確なアセンブルをおこなうため追加のシーケンスも実施していただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

ビクトリア湖産シクリッド *H. chilotes*（唇厚）と *H. sauvagei*（唇薄）の異種間雑種系統の QTL 解析の結果、連鎖群 22 において LOD 値が 10 を超える領域が検出され、このマーカー近傍に MAGP4 遺伝子群（ゲノム解析によれば 7 コピー）が存在することが明らかとなった。2013 年に実施した RNAseq データを Broad Institute によって決定されたビクトリア湖産シクリッド *Pundamilia nyererei* のドラフトゲノム配列、および MAGP4 遺伝子領域を含む *H. chilotes* の BAC clones の配列（4 clones）に対してマッピングすることで MAGP4 遺伝子群の発現を種間比較した。その結果、7 コピーある MAGP4 遺伝子のうち、MAGP4-CD 遺伝子のみが、*H. chilotes* の唇組織において顕著に発現量が低いことが明らかとなり、これは qPCR によっても確認された。MAGP4 は弾性繊維（エラスチン）の形成に関与し、この遺伝子を含むゲノム領域の欠損はヒト遺伝病（Smith-Magenis Syndrome）を引き起こすことが知られているが、その SMS の特徴の 1 つが唇の肥厚であることが記載されている。私は *H. chilotes* における唇の肥大化が MAGP4 遺伝子の発現低下に起因するエラスチン繊維の形成不全によるものであると予想した。実際に、エラスチカワンギーソン染色法を用いてシクリッドの唇真皮におけるエラスチン繊維の構造を種間比較したところ、*H. chilotes* において、明らかにエラスチン繊維が減少していることも明らかとなった。私は、この MAGP4-CD 遺伝子の発現量低下が *cis* 領域への変異によるものと予想し、その変異の特定を目指してビクトリア湖産シクリッド 3 種の野生個体各 6 個体について全ゲノム配列の決定をしていただいた。解析の結果、MAGP4-CD 領域は反復配列の挿入や重複が多く、解析に用いるリード数を増やす必要性が出てきたため、現在はその作業をして頂いているところである。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで我々のグループにおける進化解析研究では候補遺伝子を予想して個別に遺伝子配列比較をおこなっていたが、本支援による網羅解析によって、まったく予想もしていなかった遺伝子（MAGP4 遺伝子）の発現量変化を検出することができたのは成果として重要であった。QTL マッピングをしても、それ以降の遺伝子探索が難しいのが常であったが、今回は RNAseq を実施していただいた事によって、大きな研究上の進展があった。そして、この cis 領域を他湖のシクリッドを含めて種間配列比較することや自然選択の有無を検出することで、唇の肥大化に関わる平行進化のメカニズムを明らかにしていきたい。

＜支援成果公表リスト＞

Kudo, Y. et al., ***GENE*** 560, 156-164 (2015)

Brawand, D. et al., ***Nature*** 513, 375-381 (2014)

Nikaido, M. et al., ***Genome Biol. Evol.*** 6, 1135-1144 (2014)

公募支援課題：2015 年度

広範な脊椎動物に共通の新規フェロモン受容体の解析

基盤研究（C）

二階堂 雅人・東京工業大学大学院生命理工学研究科

＜背景・目的＞

現在の地球上には実に多様な生物が存在しているが、この莫大な種多様性は生物のもつ化学感覚による種内・種間レベルでの認知によって巧妙に維持されてきた神秘の産物ともいえる。その中でも特に高等脊椎動物にとって、嗅覚やフェロモン感覚は非常に古くから存在する原始感覚であり、生殖や同種認知など、生命活動にもっとも基本的な行動に不可欠であることが分かっている。今回、我々はポリプテルスやシーラカンスなどの古代魚から陸生の哺乳類ほぼ全てに渡る広範な脊椎動物ゲノム中に共通のフェロモン受容体遺伝子（新規に発見された未同定遺伝子で ancV1R と名付けた）が存在することを明らかにした（図 1・表 1 参照）。このことは、脊椎動物の進化の歴史のなかで、水生から陸生へのダイナミックな環境変化があったにも関わらず、5 億年以上もの間、共通のフェロモン受容システムがずっと維持されてきたこと、さらには魚から哺乳類まで共通の生殖システムが存在することを示唆する。これは、進化学・生理学的にも非常に驚くべき発見である。本研究では、この新規フェロモン受容体遺伝子の機能を広範な脊椎動物について調べ、いまだに存在が知られていない魚から哺乳類まで共通のフェロモン受容システムの実態を明らかにする。

＜支援の内容＞

本研究を進めるにあたり予想外な発見として、硬骨魚の中でも真骨魚類には ancV1R が存在しないが、これまでゲノム配列が公開されているいくつかの下位条鰭類（俗にいう古代魚）のグループには ancV1R が存在することである（表 1 参照）。進化的なタイミングを考慮すると、ancV1R が軟骨魚類の分岐後に誕生した後、多くの脊椎動物では高度に保存されつつも、真骨魚類においては偽遺伝子化（消失）したと考えられる。真骨魚類の嗅上皮においては、フェロモン受容細胞（鋤鼻神経細胞）と匂い受容細胞（嗅神経細胞）が器官として区画化されていないことが知られていることから、この ancV1R がこれらの神経細胞の区画化（つまり鋤鼻器官の形成）に関与している可能性もあり興味深い。ただし、下位条鰭魚類と真骨魚類の系統的な関係性は曖昧であり、特に原始的な真骨魚類であるアロワナ類に関しては、まだ ancV1R が存在する可能性もある。また、下位条鰭類や原始的な真骨魚類における嗅上皮の詳細な構成（区画化があるか否か）は明らかになっておらず、脊椎動物における ancV1R と鋤鼻器官形成の関連性を明らかにする上では、上記の魚種の嗅上皮における ancV1R の有無や、嗅覚受容体遺伝子の発現パターンを知ることが非常に重要である。現時点では多くの下位条鰭類や原始的な真骨魚類に関して、全ゲノム情報が明らかになっておらず、さらには古くに分岐した魚類ではオーソログ遺伝子でも種間で配列がおおきく異なっているため PCR によって ancV1R などの嗅覚受容体遺伝子群の単離することは極めて困難である。そこで、本支援において、これまで全ゲノム配列の報告がないグループについて、嗅上皮のトランスクリプトーム解析を支援していただきたい。対象種としては、下位条鰭類からチョウザメ、スポッテットガー、そして原始的な真骨魚類から、アロワナ、パントドン、モルミルス、ナイフフィッシュを計画している。現段階では、各 1 種について 1 個体の嗅上皮由来 total RNA の配列情報を Hiseq2500 により 1 レーン分（PE）取得していただきたいと考えている。また、参照配列がないことから TRINITY による *de novo* アッセンブルを実施していただく予定である（東工大・伊藤 GP に依頼）。

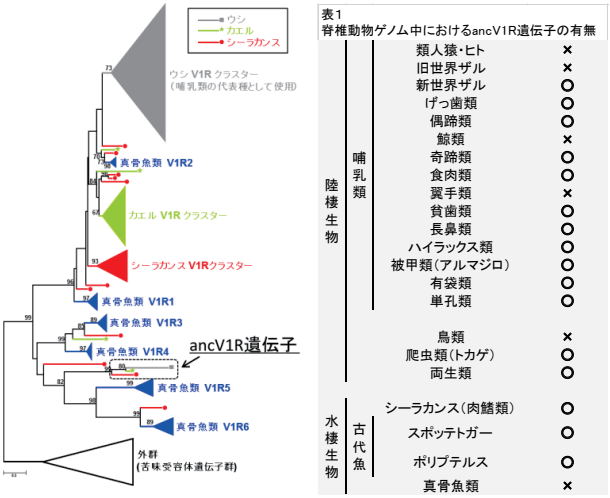


図 1 .脊椎動物の V1R 遺伝子の系統樹

＜支援によって得られた研究成果＞

現段階において上記の魚種について嗅上皮から total RNA を抽出しているところであり、これから支援を実施していただく予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援によって下位条鰭類および原始的な真骨類における ancV1R の有無が明らかになると共に、これらの魚種においてはどのような嗅覚受容体遺伝子が存在し、それらが発現しているのかを明らかにすることができる。それ以外にも、下位条鰭類から真骨類に進化をしていくにあたり、嗅覚受容体遺伝子（OR, V1R, V2R, TAAR など）のレパートリーがどのように変化していったかについても、明らかにすることができると期待している。

＜支援成果公表リスト＞

現在のところ、まだ支援内容を論文として公表していない

公募支援課題：2013 年度

下痢症患児由来の大腸菌における病原遺伝子・薬剤耐性遺伝子のパンゲノム解析

基盤研究（C）

西　順一郎・鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・微生物学分野

＜背景・目的＞

腸管凝集性大腸菌（Enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC）は HEp-2 細胞付着試験で凝集性付着を示す大腸菌と定義され、腸管粘膜に biofilm を形成し、小児・成人の下痢症の原因となる。一般の臨床検査室では検査されておらず、臨床的重要性が十分評価されていない。EAEC の PCR による同定には転写因子 AggR の遺伝子（*aggR*）が用いられているが、*aggR* を持たない atypical EAEC も多数みられる。EAEC には遺伝的多様性がみられるが、多数の株を対象とした系統解析の報告は少ない。また、EAEC のゲノム解読はプロトタイプ 042 株など 2 株だけであり、多くの EAEC 株を対象としたゲノム比較は行われていない。本研究では系統解析とゲノム解析を通じて、わが国の EAEC の多様性と特徴を明らかにすることを目的とした。

＜支援の内容＞

対象は鹿児島県の小児下痢症患児由来の *aggR* 陽性大腸菌 138 株と atypical EAEC 22 株および大阪府公衆衛生研究所で分離された *aggR* 陽性大腸菌 31 株。Atypical EAEC は biofilm assay でスクリーニングし、HEp-2 細胞付着試験で確定した株を用いた。対象株の病原遺伝子、基質拡張型 β ラクタマーゼ（ESBL）遺伝子 *bla*CTX-M、血清型を調べ、MLSA (multilocus sequence analysis）を行った。さらに、イルミナ MiSeq で系統の異なる 25 株ドラフト配列を決定し、主要な病原因子の分布を blast 検索した。

＜支援によって得られた研究成果＞

MLSA による系統解析では、*aggR* 陽性大腸菌は大腸菌の系統群 A、B1、B2、D の 4 つに広く分布していた（図 1）。ST200 (O126:H7 など)、ST40 (O111:H21 など)、ST3570 (O86a:H27 など)は、鹿児島と大阪の両方で分離され、また 1990 年代後半にはすでに検出されており、わが国に以前からみられる主要な EAEC であると推定される。

一方、*aggR* 陽性で B2 に属する O25:H4:ST131 のクローンは、2003 年以後鹿児島で出現しており（図 1)、これらの株は古典的な EAEC が保有する染色体由来の EAEC 病原遺伝子 *pic*、*shET1*、*aaiC* を持っておらず、尿路病原性大腸菌(UPEC)の付着遺伝子 *afaB* を持っていた（図 2)。したがって、世界的に蔓延している UPEC O25:H4:ST131 が EAEC の病原プラスミドを獲得して出現したことが示唆された。さらにこのクローンは *bla*CTX-M-14 を保有しており、ESBL を産生していることも明らかになった。

Atypical EAEC は系統群 A と B2 に分布し、O 血清群は UT (untypable)が多かった。ゲノム解析では EAEC に特有な病原遺伝子はみられず、古典的な EAEC とは全く異なる系統であることがわかった。

aggR 陽性株としてゲノム解析を実施した株の中には、*aggR* および EAEC のその他の病原遺伝子がほとんどみられない株もあり、PCR の疑陽性や病原プラスミドの脱落の可能性が考えられた。

図1　MLSAによる系統樹と主要なSTタイプの年次推移

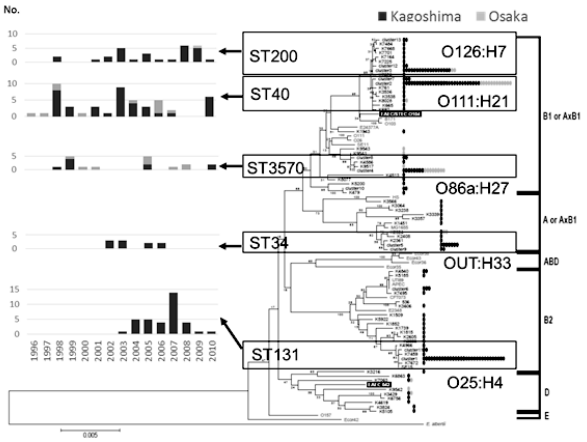


図2　ゲノム解析の対象株とblastによる病原遺伝子の分布

	strain names	ST	serotypes	phylogroups	EAEC																		ESBL	total length (Mbp)
					plasmid										chromosome				UPEC					
					AAF																			
						1	2	3	4	5														
					aggR	*aatA*	*aap*	*aggA*	*aafA*	*agc3A*	*tibA1*	*aafA*	*pet*	*astA*	*sepA*	*sig*	*pic*	*shET1*	*aaiC*	*hlyE*	*yfcA*	*afaB*	CTX-M-14		
Typical	K7132	ST200	O126:H27	B1 or AxB1	P	P	P		H				P	P		H	PD	P	P	PS		H		5.1
	K5131	ST40	O111:H21	B1 or AxB1	P	P	P					P		P		P	P	P	P	PS		H		5.1
	K9529	ST40	O111:H21	B1 or AxB1	P	P	P					P		P	PD	P	P	P	P	PS		H		4.9
	K9543	ST295	O126:H12	B1 or AxB1	P	P	P					P				P	P	P	P	P		H		5.0
	K1076	ST3570	O86a:HNM	B1 or AxB1	P	P	P			P					P	P	P	P	P	P				5.2
	K4513	ST162	OUT:H19	B1 or AxB1																PS	H	H		4.8
	K8077	ST3750	O164:H10	B1 or AxB1	P	P	P	H								P	P	P	P	PS	H	H		5.0
	K5200	ST540	OUT:H30	B1 or AxB1															P					4.5
	K2824	ST10	O86a:H2	A or AxB1	P	P	P					P					P	P	P	P		H		4.9
	K5186	ST34	OUT:H33	A or AxB1	P	P	P	H								P	P	P	P	P	H	H		5.1
	K7975	ST131	O25:H4	B2	P	P	P					P								PX	H	P	P	5.3
	K5922	ST1873	OUT:H4	B2											P					PX				5.2
	K7691	ST95	O91:HND	B2				H												PX		H		5.1
	K7063	ST501	O86a:H1	D	P	P	P	H									P	P	P	P	H	P		5.2
	K6863	ST714	O20:H1	D																P	H		P	5.1
	K9542	ST1032	O126:H31	D	P	P	P	H									P	P	P	P	H	H		5.2
	K3429	ST38	OUT:HND	D				P							P					P	H			5.1
	K4619	ST31	OUT:H18	D	P	P	P	P									PD	PD	P	P		P25		5.1
Atypical	K3293		OUT:HND	B1 or AxB1															P					4.6
	K3566		OUT:H12	A or AxB1															PS					5.3
	K3064		O86a:H4	A or AxB1															P	H				4.6
	K3339		OUT:HND	A or AxB1															PS					4.6
	K3857		OUT:H21	A or AxB1															P					4.8
	K3216		OUT:H15	D															P	H				5.0

＜支援によって開かれた新たな展望＞

わが国で分離される EAEC の系統解析を初めて実施でき、わが国で広がっている主要なクローンの存在を確認できた。また、経年的にみることで、10 数年の範囲でクローンの変遷を明らかにすることができた。とくに UPEC が EAEC の病原遺伝子と ESBL (CTX-M)遺伝子を獲得して広がっていることがわかり、腸管外病原性大腸菌と下痢原性大腸菌の間で、病原遺伝子・薬剤耐性遺伝子の水平伝播が著明に進んでいることが示唆された。凝集性の強い EAEC がこれらの遺伝子の水平伝播にどのように関わっているのか、今後の新たな研究課題である。また、EAEC の同定には *aggR* だけでは不十分であり、EAEC の再定義に基づいた検出法の再検討も必要となった。

＜支援成果公表リスト＞

Phylogenetic analysis of EAEC isolated in Kagoshima and Osaka, Japan, revealed emergence of CTX-M-14-producing EAEC O25:H4:ST131. Imuta N. et al (in submission)

公募支援課題：2014 年度

菌類のエキソン、イントロン構造の進化機構の解明

基盤研究（C）

西田 洋巳・富山県立大学工学部

＜背景・目的＞

菌類のエキソン・イントロン構造には多様性が見られる。すなわち、担子菌類（Basidiomycota）では、イントロン数が他の系統群よりも多く、イントロンサイズは小さい。他方、子嚢菌酵母（Saccharomycotina）では、イントロン数が少なく、イントロンサイズは種によって幅がある。糸状子嚢菌類（Pezizomycotina）は担子菌類と子嚢菌酵母の中間的な特徴を持っている。しかし、子嚢菌類（Ascomycota）を構成している系統群の一つである古生子嚢菌類（Taphrinomycotina）のゲノム情報は分裂酵母 *Schizosaccharomyces* 属菌種に限られており、この系統群のゲノムの多様性や特徴については不明である。

これまでの研究により、エキソン領域はイントロン領域よりも塩基組成におけるグアニン・シトシン（GC）含量が高く、ヌクレオソーム形成頻度も高いことが示されている。そこで、本研究では、古生子嚢菌類に属する *Saitoella complicata* のゲノム DNA、発現 RNA、ヌクレオソーム DNA 断片をそれぞれシークエンスし、*S. complicata* におけるゲノムの特徴と *Schizosaccharomyces pombe* の特徴を比較することを目的とした。なお、*S. complicata* は分裂ではなく、出芽で増殖するが、細胞表層は子嚢菌酵母型をしているにもかかわらず、内生分芽型（enteroblastic）の担子菌酵母で見られる出芽様式を持っている。

＜支援の内容＞

S. complicata のゲノム DNA のシークエンスへの支援（林哲也先生・小椋義俊先生）、ヒストン脱アセチル化阻害剤トリコスタチン A（TSA）を 1 μg/mL, 2 μg/mL, 3 μg/mL 加えた条件で培養した *S. complicata* より抽出した RNA のシークエンスへの支援（鈴木穣先生）、TSA を 0 μg/mL（コントロール）, 3 μg/mL 加えた条件で培養した *S. complicata* より抽出した単一ヌクレオソーム DNA 断片のシークエンスへの支援（鈴木穣先生）を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

S. complicata のゲノム DNA シークエンスにより、104 コンティグ（N_{50}, 239 Kbp）、全長 14.1 Mbp を決定、公開した。これは古生子嚢菌類において、*Schizosaccharomyces* 属菌種以外で初めてのゲノム情報となる。また、RNA マップ情報を考慮し、6933 のタンパク質コード領域、7119 の転写ユニットを明らかにし、公開した。ゲノム塩基配列および遺伝子注釈付けによって、エキソン領域（n = 20524）の平均 GC 含量が 52.4%、イントロン領域（n = 13591）の平均 GC 含量が 48.0%であることがわかった。

ヌクレオソームを形成している DNA 断片における 2 塩基配列パターン（ゲノムシグネチャ）を比較したところ、*S. complicata* は *Sch. pombe* と大きく違っていることを明らかにした。*S. complicata* のそれは、担子菌類である *Mixia osmundae* の 2 塩基配列パターンの方に類似していた。この結果は、ヌクレオソーム形成は各真核生物種で高度に維持されており、進化系統上近縁な生物種間であってもその制御が異なっていることを示している。*S. complicata* のゲノム GC 含量が 52.6%であり、*Sch. pombe* の 36.0%と大きく違っており、*M. osmundae* の 55.5%に近いことと関連があると考えられ、生物系統よりもゲノム塩基組成の方にヌクレオソーム形成が強く関連していることを示唆している。

TSA 濃度が 3 μg/mL の場合には、明らかな出芽異常が顕微鏡により観察されたにもかかわらず、TSA 濃度依存的に遺伝子発現が 25%以上増加した遺伝子数は 154、減少した遺伝子数は 131 と極めて少なかった。これら遺伝子発現に変化が生じた遺伝子におけるヌクレオソーム位置の変化もほとんど見ることができなかった。また、TSA 濃度が 3 μg/mL のときのヌクレオソーム形成領域の 2 塩基配列パターンとコントロールを比較しても顕著な違いは見られなかった。これらのことは、ヒストンアセチル化の亢進によるヌクレオソーム形成変化は極めて限られており、*S. complicata* におけるヌクレオソーム形成パターンは高度に保存、維持されていることを示している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

S. complicata のゲノム塩基配列および遺伝子注釈は公開、発表したが、RNA マップおよびヌクレオソームマップ解析の結果は現在論文投稿中である。

真核生物において、ヌクレオソーム形成は細胞の維持のために極めて重要である。しかし、今回の実験結果によって、進化系統が近いにもかかわらず、ヌクレオソーム形成様式（ヒストンと DNA 塩基配列との関係）が違い、系統的に離れていてもゲノム塩基組成が似ている場合に、ヌクレオソーム形成様式が似ていることがわかった。これは、進化において蓄積している DNA の塩基置換（突然変異）とヌクレオソーム形成が関連しており、塩基組成依存的にヒストンと DNA との相互作用が生じていることを意味している。真核生物における DNA の塩基配列の機能的な意味を解明する糸口になると確信する。

＜支援成果公表リスト＞

Yamauchi K et al. (2015) Genome Announcements 3:e00220-15

公募支援課題：2010 年度

胎児型腎臓幹細胞の成体腎での再活性化

挑戦的萌芽研究

西中村 隆一・熊本大学発生医学研究所

＜背景・目的＞

糸球体や尿細管からなる腎臓の最小機能単位をネフロンと呼ぶ。成体の腎臓は再生しない臓器であるが、胎児期にはネフロンが前駆細胞から形成される。しかしこのネフロン前駆細胞は、マウスでは生直後に、ヒトでは誕生前に、すべて分化して消失してしまう。成体腎臓内でネフロン前駆細胞を再活性化できれば、新たなネフロンの形成が可能になるかもしれない。そのためにはネフロン前駆細胞で働く転写因子ネットワークとその標的同定が必須である。

我々は､核内因子 Sall1 が腎臓発生に必須なこと、ネフロンがその元になる細胞群（ネフロン前駆細胞）から由来し、このネフロン前駆細胞及び分化初期のネフロンに Sall1 が発現することを報告してきた(Nishinakamura et al., Development 2001; Osafune et al., Development 2006)。ネフロン前駆細胞が未分化のまま自己複製しながら少しずつネフロンに分化していくことが、腎臓形成に極めて重要である。このバランスの制御には、Wnt シグナルによる分化促進と転写因子 Six2 による抑制が関与していることが他グループから報告されているが、依然未解明な点が多く、ネフロン前駆細胞における Sall1 の役割も長い間謎のままだった。そこで本研究では、成体腎での再活性化に向けての基盤として、胎児期ネフロン前駆細胞における Sall1 と Six2 の標的遺伝子群を同定し、その制御機構を解明することを目的とした。

＜支援の内容＞

ネフロン前駆細胞の維持と分化を制御するSall1とSix2の分子機構を解明するために、発生期の腎臓を用いてSall1抗体及びSix2抗体によるクロマチン免疫沈降シークエンス（ChIP-seq）を行った。具体的には我々がマウス胎生16.5日の腎臓を用いてChIPを行い､沈降DNAを東京大学の菅野研究室に送って、高速シークエンサーによるシークエンス解析及びマッピングを支援していただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

我々はまずSall1がネフロン前駆細胞の自己複製と維持に必須であることを見いだした。ネフロン前駆細胞特異的にSall1をノックアウトしたところ、腎臓は小さくなってネフロンもほぼ消失した。ネフロン前駆細胞の自己複製能が低下して分化してしまい、さらにその分化した初期ネフロンも細胞死を起こしてしまうためであった。次いで、薬剤誘導性のSall1ノックアウトマウスを作製し、マイクロアレイ解析によって、Sall1が、ネフロン前駆細胞においては下流遺伝子の転写を促進して未分化状態を維持し、分化中の初期ネフロンでは　異常な転写を抑制することが判明した。さらにChIP-seq解析によって、Sall1とSix2の標的遺伝子がかなり重複し、かつ結合部位が近傍（500bp以内）に位置するものが多いことが明らかになった。つまりネフロン前駆細胞においてSall1はSix2とともに、重要な腎臓形成遺伝子群(Osr1, Robo2, Eya1など）の制御領域に直接結合していた。Sall1の結合するコンセンサス配列も同定された。またSall1とSix2はタンパク同士でも結合した。一方、Six2が存在しない初期ネフロンにおいては、Sall1はMi2/NuRD複合体と結合して転写を抑制していた。この場合の標的遺伝子（Nkx6.1など）はSix2のそれ（Wnt4,Fgf8など）とは異なり、かつ制御領域への直接結合を介さないことも判明した。このようにSall1は、Six2と一部重複するものの異なるメカニズムで、ネフロン前駆細胞では活性化因子、初期ネフロンでは抑制因子として、この２つの未熟な細胞集団を維持していることが解明された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の成果は、成体腎においてネフロン前駆細胞を再活性化する際の基盤的知見となることが期待される。また我々はヒト iPS 細胞からのネフロン前駆細胞の誘導に成功しており（Taguchi et al., Cell Stem Cell 2014)、ヒトネフロン前駆細胞を人為的に増幅する技術開発にとっても有用である。

培養細胞を使った ChIP-seq は既にルーチンワークの領域である。しかし発生学は非常に微量のサンプルを扱う領域であるため、ChIP-seq の成果は少ない。今回の成果は発生学とゲノム科学の融合の一例であり、今後、臓器形成における網羅的な分子ネットワーク解明の進展が期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Kanda, S. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 25, 2584-2595 (2014)

公募支援課題：2015 年度

表現型可塑性：生態学と分子発生学の統合的研究

基盤研究（A）

西村 欣也・北海道大学大学院水産科学研究院

＜背景・目的＞

生物が織りなす多様な表現型は生物種によるゲノムの多様性に依ると言っても過言ではないが，環境に応じた表現型可塑性は，変動する環境の中で生物が生き抜くために非常に重要なものであるだけでなく，種分化の引き金となる可能性がある．エゾサンショウウオ(*Hynobius retardatus*)の幼生は捕食・被食，競争などの状況で表現型可塑性による形態・行動の多型を示し，それらの表現型は生態学的適応機能を持つため，生態学の対象として研究が蓄積されてきた．しかし，可塑性の発生学的基盤についてはほとんど分かっていない．本申請課題では，本種を対象として表現型可塑性に関与する遺伝子配列パターンについて，地域集団の集団遺伝学的比較分析，生態学的比較分析を行うことによって，自然選択による可塑的表現型デザインの進化プロセスを明らかにする．

＜支援の内容＞

本申請課題では，本種を対象とした RAD (restriction-site-associated DNA)-seq による大規模な集団多型解析を行うことを希望した．従来，非モデル生物の遺伝多型解析は数遺伝子座に限定されていたが、塩基配列解読技術の発達により，RAD-seq のようなゲノムワイドでの遺伝多型解析が可能となった．先行研究からエゾサンショウウオの被食者によって誘導される可塑的変化は，地域集団によって異なることが知られている．しかし，その遺伝的背景については mtDNA 断片を用いた解析が報告されているのみで，この多様性がどのようにして獲得され，進化してきたかは未だ不明な点が多い．その過程を明らかにするためにRAD-seq解析によって得られた情報を活用する．本研究では，先行研究での mtDNA ハプロタイプの分布を考慮し，特に特徴的な表現型をしめす襟裳地域集団とその他の地域集団を比較するため，北海道内の５つの地域で偏りなく卵の採集をおこなった．各集団について 20 個体，合計 100 個体からゲノム DNA を抽出したのち、ゲノム DNA を EcoRI, BglII の２つの制限酵素で切断した．切断されたゲノム断片にアダプター配列の付加などの前処理をおこない、Hiseq で 4 レーン分のペアードエンドシークエンシングをおこなった．

＜支援によって得られた研究成果＞

シークエンシングの結果，366,238,834 リード（3662388 リード/sample）のリードが得られた．すでに各地域集団の表現型の可塑的変化の情報は取得しているので，今後これらの表現型情報と今回の支援によって得られた遺伝情報を統合的に解析し，脊椎動物における可塑性の進化機構の遺伝的基盤に迫る予定である．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後、RAD-seq 解析の結果得られた遺伝情報を活用することで，以下のような新たな研究が展開されることが期待される．

1）エゾサンショウウオの表現型可塑性に関連した集団遺伝構造解析：RAD-seq により得られたデータから集団間の関係とその進化史を推定する．襟裳集団を中心とした地域集団は，他の集団と異なる可塑的変化を示すが，このような進化が自然選択の結果生じたのか，祖先において集団のボトルネックを経験し，中立な変異が蓄積した結果なのかは明らかではない．また，現在，地域集団間でどのような遺伝的交流があるかも不明である．RAD-seq によって産生される多型データを活用することで，このような問題にアプローチする．脊椎動物の表現型可塑性の遺伝的背景については，先行研究が乏しいため，本課題の結果からその概要が明らかになれば、他の研究者に有益な情報を提供できると期待される．

２）表現型可塑性の進化を引き起こす責任遺伝子の推定： 多型解析の結果から各集団において自然選択を受けている座位に偏りがあれば，その領域を特定する．自然選択を受けている座位は，集団間の可塑性の違いと関係している可能性があるので，その領域に存在する遺伝子の機能を推定する．我々は既にエゾサンショウウオのトランスクリプトームデータを保有しているので，高い選択圧を受けている座位が遺伝子領域と一致すれば，可塑性の進化と相関する遺伝子を選別することができる．有力な候補遺伝子が見つかった場合，定量 PCR を用いて可塑性誘導時に実際に遺伝子発現が上昇しているかを確認し，必要であれば機能阻害実験をおこなう．

＜支援成果公表リスト＞

・準備中

公募支援課題：2012～2013 年度

シャジクモ概要ゲノムの解読と遺伝学的地図の同時構築による陸上植物進化の解明

基盤研究（B）

西山 智明・金沢大学学際科学実験センター、坂山 英俊・神戸大学大学院理学研究科

＜背景・目的＞

シャジクモ目は、陸上に近縁なシャジクモ藻類のなかでも、半数体において器官組織分化を示す複雑な体制をもっている藻類である。このため、陸上植物の２倍体での多細胞体制の獲得に関わるゲノム進化を解明するためには枢要な位置を占める。

シャジクモはシャジクモ目の中でゲノムサイズが 2.3Gb と比較的小さく、実験室内で生活環を完結できる。このため、シャジクモをゲノム解読の対象に選定し、シャジクモのゲノム解読を目指すこととした。また、シャジクモには生態的に異なるニッチェをもつ種内多型があり、この間の交配が可能である。

＜支援の内容＞

・シャジクモ S276 株(浅水型)のインサート長 250bp の PE ライブラリーの調整と両端から 150 塩基(PE150)のシーケンシング 5 レーン
・各種の大きさのメイトペアライブラリーのシーケンシング PE100 2 レーンと PE150 7 レーン
・シャジクモ S277 株(深水型)のインサート長 250bp の PE ライブラリーのシーケンシング PE150 1 レーン

＜支援によって得られた研究成果＞

支援によって得られた S276 株のリードデータをアセンブルして、Scaffold_N50 長 2Mb を越えるアセンブリーを得た。

このアセンブリーに S277 株の配列をマッピングしたところ、map されるリードが著しく低い scaffold が同定され、おそらく、S276 株の培養に共存していたバクテリアの DNA の混入であると推定した。バクテリアの混入と推定される配列を除いて得られたシャジクモの配列は、11,808 scaffold 計 1.75Gb, N50 2.26Mb で、90%が 550kb 以上の scaffold に含まれていた。

以前に得ていた RNA-seq のデータ及び、シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケのアミノ酸配列との類似性情報を利用し、Augustus によってこのアセンブリー上の遺伝子構造予測を行い、35883 遺伝子座に 36877 転写産物の遺伝子モデルを得た。

このゲノムアセンブリーとアノテーションの評価として CEGMA によって非常に保存的な 248 の遺伝子セットのどれだけがゲノム上あるいは予想転写産物配列上で見つけられるかを調査した。その結果、ゲノムでは 57%complete, 76% partial で見つかり、転写産物では 87.5% complete, 91.9% partial で発見された。ゲノム配列を直接用いる解析で値が低くなるのは、イントロン・エクソンを CEGMA が正しく識別出来ない事があるのに対して、遺伝子構造予測によって得られた転写産物配列ではエクソンが適切に連続して得られているためであると考えられる。

こうして得られた遺伝子モデルを調べると、陸上植物の発生を制御する遺伝子の多くについてホモログが見つかる事が確認出来た。また、ヒメツリガネゴケのゲノムには見つからなかった遺伝子のホモログもあった。

遺伝学的地図を構築するには、交配分離集団が必要である。ここで、シャジクモは自殖可能であるため、外交配由来の子孫と自殖による子孫を識別する必要がある。深水型の S277 株のリードを S276 のアセンブリーにマッピングし多型を抽出した中から、多型サイトが BamHI の認識配列の有無になる部分を選抜し、当該領域を増幅するプライマーを設計した。切断されて生じる断片長が異なるように複数領域を同時にマルチプレックス PCR で増幅して、組替えを検出出来るようにした。このプライマーセットを用いて、共培養の子孫株の遺伝子型判定を行う事で、実用的な効率で交配由来子孫株を同定する事ができ、約１００株の交配子孫株を同定した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

この、シャジクモ S276 株のゲノム解読と S277 株の多型検出により、自殖でない交配株が得られたので、この分離集団の多型解析により scaffold を染色体スケールのスーパースキャッフォールドにくみたて、シンテニーを検討する事ができるようになると期待される。

また、異なる条件に適応して異なる形質を持つ株間の分離集団であるので、形質を測定してマッピングすることにより適応形質がどのような遺伝的変化によって進化したのかの実態に迫る事ができると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2011 年度

性染色体領域の解析に基づく「雌雄性の誕生」に関する進化生物学的研究

基盤研究（A）

野崎 久義・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

メスとオスの誕生、すなわち原始的な同型配偶から雌雄の配偶子をもつ生物への進化は最も興味深い進化生物学上の問題であるが、その分子遺伝学的基盤は不明であった。最近我々は有性生殖の進化のモデル生物群である “群体性ボルボックス目”のプレオドリナからオス特異的遺伝子“*OTOKOGI*”(*PlestMID*)を単離することに成功し、雌雄の性と同型配偶の交配型との対応関係をつかむことに成功した（Nozaki et al. 2006, Cur. Biol.）。この遺伝子の発見はこれまで困難とされてきた群体性ボルボックス目の性特異的遺伝子を含む“性染色体領域”（性決定遺伝子領域）の解析(Ferris et al. 1997, PNAS 94: 8634-8639)を現実的に可能なものした。本研究では性特異的遺伝子およびそれらが存在する性染色体領域の分子・ゲノム・細胞レベルの比較生物学的解析を群体性ボルボックス目の同型配偶から異型配偶・卵生殖の有性生殖の各進化段階の生物群で実施し、「雌雄性」が誕生した分子細胞学的な基盤を明らかにすることを目的としている。

＜支援の内容＞

2011 年度は緑藻群体性ボルボックス目で群体化した初期段階であり、同型配偶の有性生殖のゴニウム（*Gonium pectorale*）の相補的交配型のプラス株とマイナス株の全ゲノム解析の支援を得た。

＜支援によって得られた研究成果＞

我々はゴニウムの性染色体領域のゲノム解読を目的に平成 23 年度ゲノム支援を得た。その結果、オルガネラゲノム完全配列（Hamaji et al. 2013, PLoS ONE）と核ゲノム配列（Hanschen et al. 原稿中）が構築された。ゴニウムとこれまでの他の群体性ボルボックス目のオルガネラゲノム(Smith and Lee 2010, MBE; Smith et al. 2013, MBE)を比較すると、細胞数の増加と共にオルガネラゲノムの非コード領域が増加していることが考えられた。このような非コード領域の増加現象は 1 個体あたりの細胞数が増加すること＝集団サイズが縮小することが原因であるとするミューテーショナルハザード説（mutational-hazard hypothesis）(Lynch 2007. The origins of genome architecture. Sinauer Assoc.)で説明される。

また、これまで縮重プライマー法では取得することのできなかったゴニウム配偶子の「融合」に関する遺伝子 *GCS1*(*HAP2*) のホモログ（*GpGCS1*）の配列が核全ゲノム配列情報から明らかになった。*GpGCS1* は非常に G+C 比の高い配列であり、全ゲノム解析がなければ得られないものと考えられた(Kawai-Toyooka et al. 2014, Eukaryotic Cell)。一方、ゴニウム核全ゲノムを探索した結果、クラミドモナスとボルボックスの性染色体領域に存在した多くの遺伝子のホモログがゴニウムの性染色体領域以外の常染色体領域に確認され、性染色体と常染色体領域間の頻繁な遺伝子の進化的移動が示唆された（Hamaji et al. 投稿中）。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゴニウムの性染色体領域はクラミドモナスと比較すると非コード領域が増大するが、ボルボックスの性染色体領域で明らかになった新規メス・オス特異的遺伝子（Ferris et al. 2010, Science）のホモログはゴニウムの全ゲノムレベルで検出されなかった。従って、ボルボックスの新規メス・オス特異的遺伝子の起源を明らかにするには、よりボルボックスに近縁な群体性ボルボックス目の同様に全ゲノム解析が必要であることが明らかになった。

全ゲノムドラフト配列の結果、これまで 2 年間かけて縮重プライマー法で探索して不成功であった配偶子融合に関連する遺伝子 *GCS1* ホモログ *GpGCS1* を得る事ができた。得られた *GpGCS1* の cDNA 配列は GC 含量が 72%であり、とても従来の PCR 法では探索できないことと新型シーケンサーの威力を改めて理解できた。新型シーケンサーでドラフト配列を得て希望の遺伝子を得るという新たな方法論を体験でき、今後このような方法を駆使して、非モデル生物でも十分に研究ができるという展望が拓けた。

＜支援成果公表リスト＞

Hamaji, T. et al., PLoS ONE 8, e57177 (2013)

Kawai-Toyooka, H. et al., Eukaryotic Cell 13, 648-656 (2014)

公募支援課題：2012 年度、2014 年度

性染色体領域の比較解析に基づく「雌雄性の誕生」の進化生物学的研究

基盤研究（A）

野崎 久義・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

メスとオスのはじまりは我々人類の長年の命題であり、生物学的には同型配偶から卵と精子をもつ生物への進化である。我々は性進化のモデル生物群「群体性ボルボックス目」のプレオドリナからオス特異的遺伝子“*OTOKOGI*”を単離することに成功し、雌雄の性と同型配偶の交配型との対応関係を初めて明らかにした（Nozaki et al. 2006, Curr. Biol.16: R1018）。本遺伝子の発見はこれまで困難とされてきた群体性ボルボックス目の性決定遺伝子が位置する「性染色体領域（MT）」のゲノム解析の実現性を示唆した。最近我々は卵生殖ボルボックスの雌雄 MT を解読し、同型配偶クラミドモナスと比較した(Ferris et al. 2010, Science 328: 351)。その結果、MT は拡大・両極化され、13 個の雌雄に特異的な新規遺伝子を発見した。しかし、両極端な生物の MT の比較であり、進化中間段階の研究の必要性が議論された（Charlesworth & Charlesworth 2010, Curr. Biol. 20:R519）。本研究の目的は、群体性ボルボックス目の同型配偶から異型配偶・卵生殖の各進化段階の生物で MT 全域を明らかにし、比較ゲノム・進化生物学的解析を実施し、「雌雄性の起源」並びに「メスらしさ」と「オスらしさ」の獲得進化の直接的な原因となった分子遺伝学的な基盤を明らかにすることである。

＜支援の内容＞

2011 年度支援を受けたゴニウムよりボルボックスにより近縁な同型配偶のヤマギシエラ（*Yamagishiella*）、雌雄性をもつユードリナ（*Eudorina*）は雌雄性の進化の解明のための比較研究に重要である。このために *Eudorina* sp. と *Yamagishiella unicocca* の両性の核全ゲノムを構築した。

＜支援によって得られた研究成果＞

Eudorina sp. と *Yamagishiella unicocca* の両性の核全ゲノムデータが得られた。その結果、クラミドモナスのマイナス特異的遺伝子である *MID* のホモログが *Eudorina* sp. オス株と *Yamagishiella unicocca* マイナス株でそれぞれ性特異的に検出された。また、クラミドモナスのプラス特異的配偶子接着遺伝子である *FUS1* ホモログが *Eudorina* sp. メス株と *Yamagishiella unicocca* プラス株でそれぞれ性特異的に検出された。以上に結果はより系統的に基部に位置するゴニウム（Hamaji et al. 投稿中）と同じであった。卵生殖のボルボックスでは *FUS1* ホモログが認められないが（Ferris et al. 2010, Science）、異型配偶の *Eudorina* sp. に認められるので、本遺伝子の消失は異型配偶化以降の段階で配偶子の接着様式の進化に伴って起きたことが推測された（野崎ら 2014 年新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議）。一方、クラミドモナスとゴニウムの同型配偶の両種でマイナス交配型（*MID* をもつ）だけに認められ（Hamaji et al. 2009, J. Phycol.）、卵生殖のボルボックスでは雄だけに偽遺伝子として認められる（Ferris et al. 2010）*MTD1* ホモログは *Eudorina* sp.と *Yamagishiella unicocca* のそれぞれの両性のゲノムに認められた。また、これまでにクラミドモナスやゴニウムにそのホモログの認められなかったボルボックスのメス特異的遺伝子のホモログが *Yamagishiella unicocca* のゲノムには認められなかったが、2 遺伝子が異型配偶の *Eudorina* sp.の両性のゲノムに検出された。従って、性特異的遺伝子は進化段階・系統によっては両性に存在する場合もあることが明らかとなった（未発表）。

Eudorina sp.と *Yamagishiella unicocca* の色素体ゲノムが決定した。共に環状ゲノムであったが、のものが大きく、同じ細胞数の Eudorina sp. のものよりもリピートが多く検出された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

群体性ボリボックス目で細胞数は同じだが有性生殖が異型配偶の *Eudorina* sp. と同型配偶の *Yamagishiella unicocca* のゲノム比較からこれまでその起源が全く不明であったボルボックスメス特異的のホモログが両種の両性で明らかになった。このことは両性のゲノムで新規遺伝子が進化し、卵生殖のボルボックスに進化する以前に片方の性のゲノムに偏在する進化が推測された。更に両種のゲノム解析を進展させ、性染色領域を明らかにし、性染色体の進化と共に議論する必要がある。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2015 年度

ショウジョウバエ Neo 性染色体を用いた Y 染色体の退化過程の解明

挑戦的萌芽研究

野澤 昌文・国立遺伝学研究所 生命情報研究センター

＜背景・目的＞

性染色体が生じると、通常 Y 染色体は多くの遺伝子を失い退化していく。しかし、ほとんどの生物の Y 染色体は起源が非常に古く、既に大部分がヘテロクロマチン化しているため、その退化過程を明らかにすることができない。そこで本研究では、最近性染色体が独立に生じた 3 種のショウジョウバエを用いて、Y 染色体の退化過程を解明することを目的とする。本研究を完遂させ、Y 染色体からの遺伝子消失過程を明らかにする。また、転移因子の蓄積による Y 染色体のヘテロクロマチン化の過程を解明する。

＜支援の内容＞

最近性染色体を獲得した 3 種のショウジョウバエのうちの 2 種（*Drosophila albomicans* と *D. americana*）のメスについて、PacBio シーケンス（約 100×）を行っていただいた（一部現在進行中）。また、この 2 種のオスとメスの両方について Illumina シーケンス（約 50×）を行っていただいた。また、PacBio シーケンスデータを用いたゲノムアセンブルも行なっていただいた（現在アセンブルと精度検証を同時進行中）。

＜支援によって得られた研究成果＞

D. albomicans に関しては、既にメスの DNA を用いた PacBio シーケンスが完了し、アセンブルまで終了している。現在、アセンブルの精度を検証中であるが、コンティグの N50 が約 22Mbp、総コンティグ長の 8 割は 9 本のコンティグで構成される、という結果となり、これまでの Illumina シーケンスでは考えられないほど高精度なゲノム配列が決定できたのではないかと考えている。Illumina シーケンスについては、オスメス両方で行っていただいた。PacBio アセンブリが完了次第、オスとメスの Illumina リードをマッピングし、カバレージ比から性染色体の退化の程度を推定する予定である。

D. americana については、同質遺伝子系統の確立を行う以前に、ハエの飼育に手間取り、なかなか DNA の抽出を行うことが出来なかった。11 月に入り、ようやく DNA を抽出するだけのハエが集まり、12 月末までに DNA 抽出が完了した。PacBio シーケンスについては、*D. albomicans* と同様の精度のメスゲノム配列が得られることを期待している。Illumina シーケンスについては既にオスメス両方の DNA を用いたシーケンスが完了している。PacBio アセンブリが完了次第、*D. albomicans* 同様オスメスそれぞれのリードをマッピングし、カバレージ比から性染色体の退化の程度を推定する。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

PacBio シーケンスによるゲノム配列決定を行ったことで、これまで解析することが困難であった遺伝子外領域、特に反復配列を含む領域にも焦点を当てることが可能となった。これにより、性染色体化に伴い、どのように反復配列が蓄積していくのか、また蓄積した反復配列がどのように遺伝子領域の退化に関与しているのかを解明する足掛かりになったといえる。

また、本支援を受けたことで、研究予算を当初計画に含まれていなかった RNA-seq に使用することが可能になった。これにより、ゲノム配列からだけでは困難な遺伝子の「機能性（すなわち機能遺伝子か偽遺伝子か？）」について、遺伝子発現の有無という新たな情報を付加することができる。したがって、より精度の高い遺伝子アノテーションを行うことが可能となるはずである。したがって、Y 染色体の遺伝子領域の退化過程について、当初計画を上回る知見が得られることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2014 年度

分岐年代推定に関わる諸問題

基盤研究（C）

長谷川 政美・統計数理研究所

＜背景・目的＞

古顎類は現生鳥類を構成する二大クレードの一つで、飛翔能力のない走鳥類（ダチョウ、エミュー、ヒクイドリ、キーウィ、レア）と飛翔能力を持つシギダチョウ類から成る。現生古顎類はいずれも南半球に分布しており、ゴンドワナ超大陸の分裂と古顎類の系統進化の関わりが古くから示唆されてきた。

しかしながら、近年の分子系統学的研究による系統樹が必ずしもゴンドワナ超大陸の分裂パターンと一致しないこと、年代学的にも形態学的にも祖先的と考えられる化石古顎類は主に北半球から見つかっていること、古顎類の祖先種は飛翔能力を持っていた可能性が示唆されていることもあり、古顎類の系統進化がゴンドワナ超大陸の分裂によるものなのか、あるいは、偶発的に海を越えた大陸間の移動により起きたのか、大きな論争となっている。

進化の過程で起きた生物学的なイベント、とりわけ地史学的イベントと生物進化の関わりを考えるうえで、信頼性の高い分岐年代推定は必要不可欠である。しかしながら、現生鳥類に関しては分岐年代推定値が極めて不安定で地史学的イベントとの比較が難しい。また現生走鳥類は種数が非常に限られており、タクソンサンプリングの面で限界があった。

そこで申請者らは絶滅走鳥類であるエピオルニスとモアに注目した。どちらも過去 1000 年間ほどの間に絶滅した大型の走鳥類である。モアに関してはニュージーランドと言う冷涼な環境に分布していたこともあり、1990 年代から古代 DNA の研究が進んでいた。2001 年には早くもミトコンドリアゲノムが決定され、2015 年には核ゲノムレベルのデータが報告されている。しかし、エピオルニスに関してはマダガスカルと言う温暖湿潤環境下に分布している生物であったため DNA の保存状況が悪く、分子進化学的な研究が進んでいなかった。そこで本研究では世界に先駆けてエピオルニスのゲノムレベルのデータを決定し信頼性の高い分岐年代推定を行った。

＜支援の内容＞

ゲノム支援のご協力でシーケンシングを行った。膨大な量の極めて断片化したリードが得られたが、その分析が非常に困難であった。しかしながら東京工業大学・黒川顕研究室のサポートの下、精度の高いアッセンブルとアノテーションを行うことが出来た。

＜支援によって得られた研究成果＞

前述のようにマダガスカル島は温暖湿潤環境下のため DNA の保存状況は極めて劣悪であったが、エピオルニス科 2 種のゲノムデータを決定することが出来た。

ゲノムレベルのデータを解析することで、分岐年代推定値も極めて安定した値となった。加えて推定値の標準誤差も極めて小さい値であった。このことにより、地史学的なイベントと系統樹の分岐パターンを高い精度で議論することが可能になった。

本研究で得られた知見は、古生物学的にも鳥類学的にも重要であったこと、方法論上の意味において分子系統学的にも重要であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

古代 DNA 研究は、これまで主に冷涼な地域に生息していた生物を対象として行われてきた。本研究では温暖湿潤なマダガスカル島に生息していたエピオルニス類の核ゲノムレベルのデータを決定できたことに大きな意義がある。こうして得られた古代 DNA 学上の方法論は、マダガスカル島やその他の温暖かつ湿潤な地域の絶滅生物相の多様性の理解に大きな影響を与えることが期待される。

またミトコンドリアのみならず複数の核遺伝子の塩基配列の決定に成功できたことは、温暖湿潤地域由来の絶滅生物の『集団ゲノム遺伝学』を可能にすることが期待される。それは古生物学試料のみからはどうしても調べることが出来ない、種の定義(species delimitation)の問題や、集団サイズの歴史的な変動の問題に高い精度で光を当てることが出来ることを示している。このようにして、種レベル、種内の多型レベル両方の意味で、失われた生態系がどれだけの多様性を秘めていたのか、そしてそれらがどのように変動をしてきたのかを解き明かすことが期待される。

本研究は、大陸移動と生物進化の関わりをテーマとしており、数百万年～数千万年という時間スケールを対象としている。そのため本研究は分子進化学、古代 DNA 学、生物情報学、古生物学、鳥類学、解剖学、さらには地球物理学にいたるまで諸分野の専門家との共同研究により遂行された極めて学際性の高い研究であった。今後の古代 DNA を用いた『集団ゲノム遺伝学』により、さらに短い数百年～数万年という時間スケールで起きた遺伝的多様性の変動にも高い精度で解析することが出来るようになることが期待される。これは生物とヒトとの関わりを解き明かすのに大変に適した時間スケールである。そのため上記の諸専門分野のみならず、考古学や文化人類学と言ったさらに多様な分野との連携が出来ることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

論文投稿中。国際誌への論文発表後に一般向けに書籍の出版を予定している。

公募支援課題：2013 年度

ヒトと媒介蚊体内におけるデングウイルス準種の網羅的遺伝子解析

挑戦的萌芽研究

長谷部 太・長崎大学熱帯医学研究所

＜背景・目的＞

デングウイルスは常時蚊とヒトの間で交互に維持され、細胞成分・構造、体温、免疫システム等全く環境の異なる宿主の体内において違った選択圧を受けながら短時間の内に行き来している。これまでのデングウイルス研究はデング患者または媒介蚊から培養細胞を用いて分離されたウイルス（選択圧のかかったウイルス）を中心に解析・研究されてきた。我々はフローサイトメトリーを用いてデング患者の血液細胞の解析、及び、分離ウイルス株の細胞向性について研究を行い、B リンパ球が患者体内でのデングウイルスの増殖や動態に重要な役割を持つこと、そして細胞向性の異なるウイルス準種が同一患者に感染していることを解明し報告した（Kinoshita H, et al. Jpn J Infect Dis. 2009 Sep;62(5):343-50)。蚊の体内で好んで増殖するウイルス準種、ヒトの体内で好んで増殖するウイルス準種、ヒトに感染し病態に関連するウイルス準種等の存在が推測されるが、それぞれの宿主内でのデングウイルス準種の全体像は解明されていない。

本研究ではデング患者の血液中に存在する全てのデングウイルス準種の全遺伝子領域を対象に次世代シーケンサーを応用してウイルス遺伝子を網羅的に解析し、デング患者体内でのデングウイルス準種の全体像を解明し、デングウイルスの細胞向性、宿主依存性、及び、病原性との関連について検討を行う。

＜支援の内容＞

デング患者体内に存在するデングウイルス遺伝子の多様性(ウイルス準種)について解析することを目的として、RT-PCR 診断でウイルス遺伝子陽性が確認された DENV-1 感染患者血漿 16 検体、DENV-2 感染患者血漿 15 検体から Total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて cDNA 合成を行った後、各種プライマーの組み合わせで全ウイルス遺伝子領域の増幅を行った。それぞれの PCR 産物をゲノム支援協力機関である宮崎大学フロンティア科学実験総合センターの林哲也教授のご協力を得て、次世代シーケンサー（*MiSeq, Illumina Inc.*）を用いて網羅的に解析していただきました。

＜支援によって得られた研究成果＞

当初の予定では患者血漿に存在するデングウイルス RNA から直接 cDNA を合成し、遺伝子増幅を行わないで、RNA シーケンスすることを予定していたが、患者（DENV-1 患者 16 名、DENV-2 患者４名）血漿中のウイルス RNA 量を定量してみた結果、解析に十分量の RNA を患者血漿から準備することが困難であることが判明したため、RT-PCR 法を用いてデングウイルス遺伝子を増幅後、次世代シーケンサーで解析する方法に変更した。しかし、ウイルス遺伝子領域によっては患者血清から直接 RT-PCR 増幅することが意外に難しく、目的の全ウイルス遺伝子領域を解析することが出来なかった。DENV-1 に関しては構造タンパク遺伝子領域（Core、PreM/M、Envelope）と非構造タンパク遺伝子領域の 1 部(NS-1、NS-2A、NS-2B、NS-3）の領域（nt 57-4465）について、DENV-2 では、構造タンパク遺伝子(Core、PreM/M と Envelope の 5’端前半）の領域（nt 83－1861）と主に NS-5 から非翻訳領域 3’－UTR の遺伝子領域（nt8855－10349）の次世代シーケンスデータについて解析・検討を行った。

これまでの解析結果から、ベトナム中部で 2013 年に流行した DNNV-1、及び、DENV-2 流行株のドミナントなウイルス遺伝子の配列（Genotype 及び Sub-genotype）が確認された。DENV-2 の解析結果から NS-5 タンパク遺伝子の 3’末端の終止コドンの配列が変化し、NS-5 の 3’端に更に 27 アミノ酸が付加される塩基配列が確認された。これとは別に同一の患者体内に 4 種類のリコンビナントウイルス遺伝子が混在していると考えられる症例が確認された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

デングウイルスの NS-5 蛋白は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ酵素（RdRp）活性を有し、ウイルス遺伝子の転写に重要な役割をもつ。今回、デング患者血漿中に存在する DENV-2 の NS-5 タンパク遺伝子に確認された変異は NS-5 の蛋白構造、及び、RdRp 活性に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。この患者から分離されたウイルス株にも同じ現象がおきているのか遺伝子解析を行ったが同様の変異は確認できなかった。この現象は生体内での DENV-2 の増殖中に存在するマイナーなウイルス準種であることが示唆された。

次世代シーケンサーを用いた患者血清中のデングウイルス準種の解析とは別に、DENV-1, 2, 3, 4 それぞれの血清型感染患者血漿を C6/36 細胞(蚊由来）と Vero 細胞（サル由来）の培養細胞に接種して分離したそれぞれのウイルス株について培養上清から Total RNA を抽出し、cDNA 合成を行い次世代シーケンサーによる解析を行った。DENV-1 と DENV-2 のウイルス株で C6/36 細胞（蚊）と Vero 細胞（哺乳類）での住み分けに関与すると考えられるウイルス遺伝子領域が確認された。それぞれの分離ウイルス株のクローニング、及び、この遺伝子変異を感染性クローンに導入した組換ウイルスを作成し、ウイルス学的性状の比較解析を行っている。

今後も継続してデング患者体内に存在するウイルス準種と培養細胞内に存在するウイルス準種を解析することにより、ウイルス細胞向性に関与するウイルス遺伝子のメカニズムを解明していきたい。また、患者体内のデングウイルス準種と病態についての関連性について解析を進めていく予定である。

公募支援課題：2010~2011 年度

少数遺伝子変化による新奇複合適応形質進化の分子機構解明

新学術領域研究

長谷部 光泰・基礎生物学研究所生物進化研究部門

＜背景・目的＞

生物の進化には，複数の形質が進化して初めて適応的となった例が見られる．例えば，植物を餌とする昆虫（植食性昆虫）では，メス成虫が新たな植物に卵を産む好みと，幼虫がその植物を食べて成長できる能力の両方が進化しないと寄主転換が起こらない．このように複数の形質が進化して初めて適応的となる場合，進化の途上で適応的ではなくむしろ生存に不利な段階を経ると考えられ，既存の進化理論だけでは説明が難しい．本研究では，植食性昆虫の寄主転換に焦点をあて，クルミホソガという小型蛾類をモデルとして，メス成虫の産卵選好性と幼虫の耐性の責任遺伝子を同定することで，複合的な適応進化をその分子実体にまで還元して理解することを目的とした．それとともに，次世代シーケンサーなどを活用した新実験研究手法の開発を行い，非モデル生物を用いた責任遺伝子の同定というチャレンジングなテーマを推進することで，進化生物学に新たな研究分野を創出し，そのさきがけとなることを目指す．

＜支援の内容＞

1) クルミホソガの寄主適応遺伝子座の特定のため，クルミレースとネジキレースそれぞれのドラフトゲノム解読を以下の要領で行っていただいた．

クルミレース

Paired-end library
- Insert size 180 bp, 2 レーン，HiSeq2000
- Insert size 300 bp, GAIIx 2 レーン，HiSeq2000 1 レーン
- Insert size 500 bp, GAIIx 2 レーン，HiSeq2000 1 レーン

Mate-pair library
- Insert size 3 kb, 1 レーン，HiSeq2000
- Insert size 5 kb, 1 レーン，HiSeq2000
- Insert size 5 kb, 1 レーン，Nextera, HiSeq2000

ネジキレース

Paired-end library
- Insert size 180 bp, 2 レーン，HiSeq2000
- Insert size 300 bp, 2 レーン，HiSeq2000
- Insert size 500 bp, 2 レーン，HiSeq2000

Mate-pair library
- Insert size 3 kb, 1 レーン，HiSeq2000
- Insert size 5 kb, 1 レーン，HiSeq2000
- Insert size 5 kb, 1 レーン，Nextera, HiSeq2000

2) クルミホソガのジーンモデル推定と，発現比較解析のため，両レースに対して，幼虫全身，成虫全身，メス頭部，メス触角，オス頭部，オス触角の各部位，発育段階および性別に対して RNA-seq を行っていただいた．使用した NGS はいずれのサンプルも GAIIx であり，各サンプルともに 101 bp の paired-end で 40 M read ほどのデータを得ている．

3) 責任遺伝子座の特定のため，2 つのレースの交雑から得られた backcross 世代のメスを 172 個体作成し，各個体の産卵選好性を調べるとともに，各個体を 300 bp のインサートサイズにて，ゲノムサイズ（推定 330 Mb）の 3 倍程度の厚みで HiSeq2000 にてシークエンシングを行っていただいた．

4) 以上の解析により，全 31 本のクルミホソガ染色体のうち，1 本の染色体の約 180kb のゲノム領域がネジキへの寄主転換に関わったことが推定されたため，ゲノムサイズ（推定 330 Mb）の 10 倍の規模（384 プレート 250 枚）で Fosmid libarary を作成していただいた．

＜支援によって得られた研究成果＞

支援を得られたことにより，非モデル生物ではあるが，寄主転換という複合適応形質の進化を探る上で大変好適な実験系であるクルミホソガのゲノム情報が整い，複雑な進化事象をその遺伝基盤まで還元して議論する土台が整った．具体的には，両レースともに N50 が数十 kb ほどの scaffolds からなるドラフトゲノムが整備でき，それらにマップ可能な発現データが蓄積できた．また，backcross を用いた順遺伝学的な解析より，幼虫が新寄主であるネジキを利用できる能力は 31 本中のたった 1 本の染色体上のごく限られた領域で決まっているが，メス親の産卵の好みはこの染色体とは異なる複数の染色体上に座乗していることが示唆された．また，産卵選好性に関わる染色体の 1 本では，同じ染色体上の複数の箇所に責任遺伝子が存在することが推定されており，産卵選好性遺伝子がまとまって存在するゲノム領域の存在が示唆された．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで複合的な形質の進化に関しては，スーパージーンのように，互いに物理的に連鎖した遺伝子どうしの協調的な進化で説明されてきた．しかし，いったん連鎖関係が生じた対立遺伝子間では組み換えが困難となり，植食性昆虫の寄主転換のように，繰り返し新たな表現型が生じてきたことを説明するのは困難であった．

本研究では，協調的な進化が必要な責任遺伝子間であっても物理的な連鎖は見られなかった．これは両遺伝基盤間の組み合わせに相当な自由度が維持されていることを示しており，揃うことが重要な複合適応形質の進化に関してこれまでにない視点が得られたことになり，新たな研究の展開が期待できる．

＜支援成果公表リスト＞

現在，投稿準備中である．

公募支援課題：2012 年度

高二酸化炭素条件下で変動する遺伝子群とその進化起源

新学術領域研究

花田 耕介・九州工業大学。若手研究者フロンティア研究アカデミー

＜背景・目的＞

大気 CO2 濃度上昇や温暖化などの地球環境変化は不可避である。そのため、野生植物のもつ環境適応力を最大限利用し、将来の高 CO2 環境において最適な光合成・物質生産システムに関係する遺伝子をモデル生物で同定し、その遺伝子情報を利用して農法開発することは重要である。先行研究では、世界中で自生しているシロイヌナズナのゲノム関連解析により、高 CO2 下で成長速度に関係する多数の遺伝子群を同定している。同定された遺伝子は、発現上昇あるいは下降によって高 CO2 下で成長が早くなることが見出されている。そこで、本支援課題では、生態株間で、どの塩基の点変異あるいはメチル化によって、発現が上昇あるいは下降するのかを明らかにする。さらに、同定された遺伝子が、他の植物種でも類似した機能を示すかを発現パターンから把握する。

＜支援の内容＞

シロイヌナズナ生態株（30 個）の塩基多様性およびメチル化多様性を推進するためのリシークエンス解析およびバイサルファイトシークエンス解析を推進した。さらに、他の植物種においての遺伝子発現パターンを把握するために、シロイヌナズナ、ハクサンハタザオ、ハマダイコンおよびイネで mRNA-seq 解析を推進した。

＜支援によって得られた研究成果＞

遺伝子発現の違いの原因として、塩基の点突然変異に多くの研究は焦点を当てている。しかし、別の要因として、エピジェネティクスの変化も存在する。特に DNA メチル化は、次世代に継代されることが明らかになっているため、遺伝子発現の違いの大きな原因となる可能性がある。ゲノム全体では、DNA メチル化と発現強度が相関しているサイトを持つ遺伝子は 46%あり、DNA 配列変異と発現強度が相関しているサイトを持つ遺伝子は 42%あることを見出した。一方、DNA メチル化あるいは DNA 配列変異のどちらが原因で、生態株間で発現が異なるかがあいまいな遺伝子は 12%しか存在しなかった。これらの結果は、種内の小進化における発現の差を生み出す変異は、DNA メチル化あるいは DNA 配列変異のどちらかに二極化し、DNA 変異と DNA メチル化が同レベルで遺伝子発現を調整していることを示唆していた。

高 CO2 応答に関係する遺伝子においては、遺伝子発現を大きく変動すると考えられる変異源を同定した。その変異源によって、遺伝子発現が変動するかの実験的な裏付けを現在、行っている。

高 CO2 下で成長速度に関係する多数の遺伝子の中には、アノテーションされてはいないが、申請者によって推定された短い遺伝子が含まれていた。短い遺伝子は、遺伝子として同定されていない傾向にあるため、申請者は、短い遺伝子を推定することに特化した方法を開発し、植物のモデル生物種であるシロイヌナズナで、多数の短い遺伝子を新規に推定することに成功している。これらの短い遺伝子の転写単位を明らかにするために、シロイヌナズナ、ハクサンハタザオ、ハマダイコン、イネで転写単位の同定を次世代シークエンス解析で行った。その結果、シロイヌナズナおよびイネのように高精度にゲノムが確立されている植物種において 4000 個、10000 個の新規の短い遺伝子領域を同定した。さらに、シロイヌナズナの近縁種であるハクサンハタザオ、ハマダイコンの mRNA-seq 解析を行うことで、近縁種においても新規の短い遺伝子が発現されているかを把握した、系統が離れている単子葉のモデル生物であるイネにおいても mRNA-seq 解析を行うことで、遠い系統関係を示す植物種でも新規に同定された短い遺伝子が発現を示しているかを把握した。

高 CO2 応答に関係する遺伝子においては、近縁種においては、すべての種でシロイヌナズナと同様な発現パターンを示すことを見出した。イネにおいては、75%の遺伝子で類似した発現パターンを示していた。この結果は、着目している遺伝子と同様な機能が幅広い植物種で同様な機能を持つことを明らかにした。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

発現の多様性に、ゲノムレベルでメチル化と塩基の変異が、同程度に、関わっているかを明らかにした。様々な研究者がメチル化の多様性を把握するために、シロイヌナズナの生態株のデータベース化したいと考えている。

新規遺伝子の転写単位の同定に関しては、今までは、マイクロアレイでしか確かめていなかったが、配列レベルで確認でき、転写が確実になった。これは、高精度にゲノムが整備されているモデル生物でも、未同定の遺伝子がかなり存在することを示唆している。今後は、新規遺伝子の具体的な機能に迫っていきたい。

＜支援成果公表リスト＞

招待講演

- 花田　耕介　「様々な条件下でトランスクリプトーム解析をやり続けることでみえること」明日の植物科学を探る、植物グローバル研究プロジェクト、奈良先端大学、2012 年、11 月
- 花田　耕介　「次世代シークエンサーを利用したゲノムレベルの進化解析の最前線」、2014 アジレントゲノミクスフォーラム、東京、2014 年、6 月

(Selected Talk)

- Hanada K. Functional analysis of small genes hidden in plant genomes. 3rd European Workshop on Peptide Signalling and Activity in Plants. Ghent University, 2015 Sep, Belgium

公募支援課題：2013 年度

分子生物地理からの新海洋区系

新学術領域研究

濵崎 恒二・東京大学大気海洋研究所

＜背景・目的＞

海洋において普遍的に分布するプランクトン（水中を浮遊する生物の総称，細菌，藻類，原生動物から各種無脊椎動物まで多様な生物種を含む）は，海洋生態系を構成し，地球規模での炭素や窒素の循環を駆動している．本研究では，新学術領域「新海洋像:その機能と持続的利用」の計画研究として，メタ遺伝子解析によって海洋プランクトンの種多様性，遺伝的多様性を大洋スケールで評価し，新しい海洋区系の確立を目指す．海盆スケール以上での，プランクトンの多様性，分布特性を網羅的に把握することはこれまでにない試みであり，生物資源や物質循環の変化予測のための生物基盤情報の確立につながる．

プランクトンの多様性や分布といった生物地理を把握する目的においては，系統群や機能群を特徴付ける一部の遺伝子を指標としたメタ遺伝子解析によるマッピングが有効と考えられる．しかし，「なぜそのような分布になっているのか？」といった生物地理パターンが形成されるメカニズムを理解するには生物群集の機能を把握し，様々な環境要因との関係を知る必要がある．そこで，本ゲノム支援では，生態系タイプの異なる3つの海域（北太平洋亜熱帯，赤道，南太平洋亜熱帯）の表層海水試料を対象に，メタゲノム解析と KEGG モジュールを用いた機能解析を行う．メタ遺伝子解析による生物地理パターンの比較に加えて，メタゲノム解析による機能ポテンシャルの比較を行うことによって，海洋プランクトン群集の動態をこれまでにない新たな側面から捉えることができると期待される．

＜支援の内容＞

外洋域表層海水試料のメタゲノム解析．北太平洋亜熱帯，赤道，南太平洋亜熱帯の 3 海域から 3 点，2 種類のフィルター画分の合計 18 試料について，MiSeq による 250bp ペアードエンドシーケンスを行い，試料あたり平均 1360 万リードの配列情報を得た．情報解析については，遺伝子同定と細菌主要系統群の既知ゲノム配列へのマッピングを行った．

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究では，KEGG モジュール解析システム Metabolic And Physiological potentiaL Evaluator (MAPLE)を用いてモジュールの充足率，頻度，由来微生物種のデータを得た．また，全配列を用いて，海洋の優占系統群である *Prochlorococcus*（24 株），SAR11（14 株），及び *Verrucomicrobia*（22 株）のゲノムデータへマッピングし，サンプル間比較を行った．

充足されているモジュール（機能）の種類とヒット数をもとに、その機能プロファイルの類似度をサンプル間で比較したところ，海域の違いに関わらず浮遊生活群集と粒子付着性群集で有意に二分された．このことから，浮遊生活と付着生活では群集全体がもつ機能ポテンシャルが大きく異なることが分かった．さらに，この違いに大きく寄与した機能を調べるために，類似度百分率分析（SIMPER）を行ったところ，鉄，亜鉛，リン酸，アミノ酸，糖などの膜輸送系モジュールのヒット数に大きな違いが見られた．同様に，海域間の違いについても，膜輸送系モジュールの違いが寄与していた．その他，付着性群集には浮遊群集に比べて，メタンなど C1 化合物の代謝に関わるホルムアルデヒド同化経路が極端に多く見られたことが特徴的であった．

赤道域と南太平洋亜熱帯の超貧栄養海域間の機能プロファイル比較では，尿素の輸送系モジュールに大きな違いが見られた．優占系統群である *Prochlorococcus* ゲノムデータへのマッピングでも，貧栄養海域で尿素の輸送関連タンパク質の RPKM 値が高い．さらに，尿素の分解産物であるシアネートの輸送タンパク質や分解酵素は超貧栄養海域でのみ多いことがわかった．こうした違いは，海域毎の *Prochlorococcus* エコタイプの違いによると考えられた．以上のことから，有機態も含めて極端に窒素源に乏しいこれらの環境では，再生窒素の効率的な利用のために，尿素やシアネートの利用能が適応への鍵となっていることが示唆される．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

貧栄養海域は、全海域面積の半分近くを占めながら微生物学的知見の乏しい海域である．本研究の比較メタゲノム解析により，貧栄養海域に生息する細菌群集の機能的な特徴を示した．特に窒素源に関する知見は新たな物質代謝過程の重要性を示唆し，これらの海域の窒素循環像を変える成果として今後の進展が期待される．また，付着性細菌群と自由生活性細菌群のニッチを決める要因として，膜輸送系の重要性を初めて示唆した．海洋細菌の生物地理パターンを決めるメカニズムを解明する糸口として，今後の進展が期待される．

＜支援成果公表リスト＞

論文公表準備中

公募支援課題：2012～2014 年度

治療効果を指標とした新規抗生物質探索法の確立

若手研究（A）

浜本 洋・東京大学大学院薬学系研究科

＜背景・目的＞

多剤耐性菌による細菌感染症が世界的に深刻な問題となっている。多剤耐性を示す黄色ブドウ球菌(MRSA)をはじめとする多剤耐性菌の中には、既存の抗生物質が全く効果を示さない菌株さえ出現しており、新規アッセイ法に基づく抗菌薬の開発手法の確立が望まれている。これまでの研究で、カイコ感染モデルを用いた治療効果を指標とした探索により、新規抗生物質ライソシン E を発見した。ライソシン E は、沖縄の土壌より分離された *Lysobacter* sp.が生産する。実用化のためには、その生産性の向上が必要とされるため、ゲノム情報を解析し生産遺伝子を明らかにすることを試みた。

また、ライソシン E は宿主成分によって抗菌活性が亢進することを明らかにしている。そのメカニズムを解明する目的で、宿主成分によって引き起こされる菌体側の変化について、網羅的遺伝子発現解析により検討した。

さらに、本研究では新たな抗菌薬の標的候補として、宿主内で発現上昇する遺伝子に着目した。これまでのマイクロアレイ解析では不可能であった、宿主に感染した状態における黄色ブドウ球菌の網羅的な遺伝子発現手法を、次世代シークセンサーを用いて確立することを目指した。

＜支援の内容＞

(3) 支援を受けた具体的な内容

(i) 新規抗生物質ライソシン生産株の全ゲノム解析について

支援内容：ライソシン生産株 RH2180-5 (*Lysobacter sp.*)の de novo 解析（100bp, pair end）を行い、4 億リードについて解析した。

(ii) 宿主因子である血清及びサーファクタントによる黄色ブドウ球菌の遺伝子発現変動解析について

支援内容：TSB 培地、及び TSB 培地に宿主成分（血清、及びサーファクタント）を添加した培地において培養した、黄色ブドウ球菌（OD=0.3 及び 1.0）から抽出した 6 つの RNA について RNA-Seq 解析（いずれも 36bp、2000 万リード程度）を実施した。

(iii) マウスに感染した黄色ブドウ球菌の遺伝子発現解析

支援内容：PBS を投与したマウス（3 個体）から摘出した腎臓由来の RNA、及び黄色ブドウ球菌 NEMAN 株を注射したマウス（4 個体）から摘出し、黄色ブドウ球菌を濃縮したサンプルから抽出した RNA、濃縮していない RNA（1 個体）について、RNA-Seq 解析(いずれも 36bp、7000 万リード程度)を実施した。さらに、肝臓由来から分離したサンプルについて、リボソーム除去した RNA としていない RNA について、それぞれ RNA-Seq 解析（いずれも 36bp、8000 万リード程度）を実施した。

また、黄色ブドウ球菌の異なる臨床分離株 USA300、及び MW2 が感染したマウスから、それぞれ 2 個体の腎臓から分離した RNA について、RNA-Seq 解析（いずれも 36bp、7000 万リード程度）を実施した。

＜支援によって得られた研究成果＞

(i) 新規抗生物質ライソシン生産株の全ゲノム解析

ライソシン E の生産量について改善するため、カイコシン生産株 RH2180-5 のゲノムについて *de novo* 解析を行い、ライソシン E 生産遺伝子、及び、C 源及び N 源のトランスポーターについて解析した。その結果、平均長 290Kb、全長 5.7Mb の、224contig からなるフラグメントを得た。得られた配列を MiGAP で自動アノテーションを行い、Non-Ribosomal Peptide Synthetase (NRPS)を検索した結果、ライソシン E の生産遺伝子と考えられるものを見いだした(図 1)。ライソシン生産遺伝子は 27.7Kb と 19.5Kb の 2 つの NRPS と、efflux transporter から構成されており、その NRPS のドメイン解析から予想されるペプチド配列は、ライソシンのアミノ酸配列と矛盾がなかった。現在、論文をとりまとめており、近日中に投稿する予定である。また、本株のエネルギー取り込みに必要なトランスポーターの解析を行った結果、C 源として多数のマルトーストランスポーターが見いだされた。また、N 源についてはライソシン E に含まれるイソロイシンやロイシンなどのアミノ酸トランスポーターが複数見いだされ、それぞれ生産性の向上のための培地の検討に役立てた。

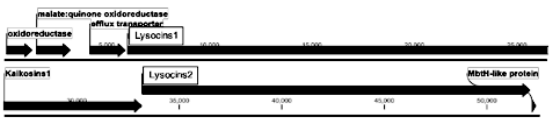


図 1　ライソシン生産遺伝子の構造

(ii) 宿主因子である血清及びサーファクタントによる黄色ブドウ球菌の遺伝子発現変動解析

黄色ブドウ球菌は、誤嚥などに伴う肺炎を引き起こす起因菌であることが知られている。肺胞は、表面張力を保つために、肺サーファクタントを分泌しており、黄色ブドウ球菌は肺に侵入後、最初に接触すると考えられる。また、肺サーファクタントは、黄色ブドウ球菌の治療薬であるダプトマイシンの活性を抑制するなど、感染治療において重要な役割を果たすと考えられる。そこで、黄色ブドウ球菌と肺サーファクタントによる相互作用について RNA-Seq 解析により検討した。その結果、血清添加では発現上昇せず、肺サーファクタントで特異的に発現上昇する複数の遺伝子を見い

だした(図 2)。その、発現変動を RT-PCR で確認した結果、*essS, psiA, hlgB* 遺伝子が大きく遺伝子発現変動していることが分かった(図 3)。その３つの遺伝子の発現上昇が引き起こす、肺サーファクタント中の因子を同定した結果、パルミチン酸が発現上昇を引き起こす候補であることが分かった。その遺伝子発現においては、ストレス応答に関わる転写因子である *sigB* 遺伝子が関与すると考えられた。また、この３つの遺伝子を破壊した黄色ブドウ球菌株を、マウスの肺感染モデルを用いて検討した結果、いずれも殺傷性が低下していること、及び肺におけるそれぞれの遺伝子破壊株の存在数が低下していることが明らかになった。従って、肺サーファクタントに特異的に応答し、病原性に関わる遺伝子が、黄色ブドウ球菌に存在することが初めて明らかになった。

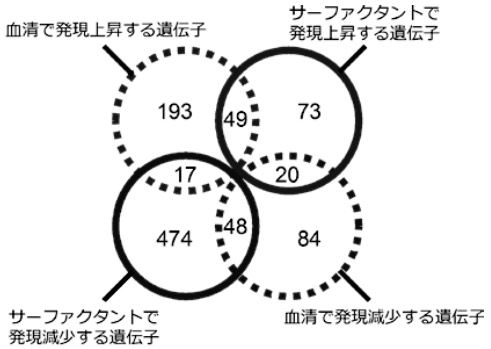


図２　宿主因子の培地添加に対する黄色ブドウ球菌の応答の RNA-Seq 解析結果

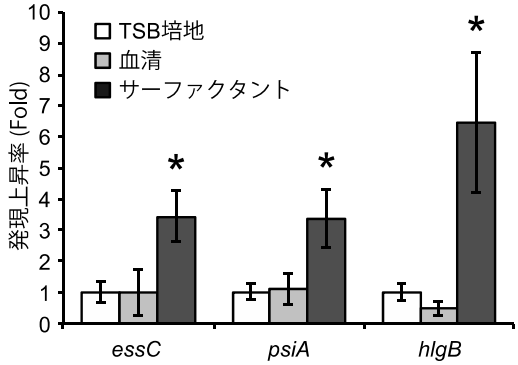


図 3　サーファクタントに応答した遺伝子の発現上昇

(iii) マウスに感染した黄色ブドウ球菌の遺伝子発現解析

細菌の病原性を明らかにするためには、宿主内での遺伝子発現の全貌は明らかにする必要がある。しかしながら、これまでは適切な菌の濃縮手段がなかったため、実際の感染臓器においてどのような振る舞いをしているか明らかにすることはできなかった。そこで、本研究において、私は感染させたマウスから摘出した臓器をビーズで破砕し、黄色ブドウ球菌を濃縮することにより、効率よく RNA を抽出する技術を確立した。まず最初に、マウス由来の RNA の混入が黄色ブドウ球菌の遺伝子発現解析に与える影響を解析するため、PBS を注射したマウスから抽出した RNA について、RNA-Seq 解析を行った。その結果、マウス由来のリードは、ほとんど黄色ブドウ球菌のゲノムにはマップされなかった。従って、混入してくるマウスの RNA は、黄色ブドウ球菌の遺伝子発現解析において無視できると判断した。また、菌の濃縮効果について検討した。その結果、黄色ブドウ球菌と投与したマウスの腎臓から、黄色ブドウ球菌を濃縮せずに RNA を抽出した場合も、得られた配列はほとんど黄色ブドウ球菌のゲノム上にマップされなかった。一方、黄色ブドウ球菌を投与したマウスの腎臓を破砕後、黄色ブドウ球菌を濃縮した場合、全リードのうち 4.6%が黄色ブドウ球菌ゲノム上にマップされた。さらに、リボソーム RNA 等の非特異的にマップされたリードではない、特異的に遺伝子上にマップされたリード数についてカウントした結果、何れのサンプルでも安定して 20 万以上存在した。これは、ほぼすべて黄色ブドウ球菌の遺伝子について、少なくとも１つ以上のリードが結合しており、３個体について解析することで十分に統計学的に意味のある遺伝子発現解析が可能であった。従って、他の手法と異なり、ビーズを用いてマウスの臓器由来の RNA を除き、黄色ブドウ球菌を濃縮する技術は、黄色ブドウ球菌の宿主内における網羅的な遺伝子発現解析ができると判断した。

実際の解析は、２回のテクニカルリプリケートを実施し、TSB 培地(OD=1.0, n=3)と、マウスの腎臓における黄色ブドウ球菌の遺伝子発現(Day 2, n=3)を RPKM で比較し、それぞれのサンプルについて normalize 後、Empirical Analysis of DGE (FDR corrected)で統計解析を行った。その結果、262 遺伝子が有意に２倍以上発現上昇していた (FDR corrected p<0.01)。黄色ブドウ球菌に存在する、ほとんどの病原性因子の発現が 10 倍以上上昇していた。また、エネルギー生産に関わる遺伝子群（特に嫌気呼吸に関わる遺伝子)、鉄の獲得に必要な遺伝子群、核酸合成に関わる遺伝子群などが、血清やサーファクタントを添加した培地での培養条件では見られないほど高い発現量を示した。また、これまで病原性との関連が知られていない、トランスポーターや機能未知遺伝子も多数存在している。これらの遺伝子について、破壊株を作成し、その病原性を検討した結果、複数の機能未知の遺伝子が病原性に関わっていることが明らかになってきた。さらに、黄色ブドウ球菌において報告されている non-cording 領域の発現について検討した結果、２倍以上発現上昇している領域が８個見いだされた。このうち、453 倍発現量が増加している領域を欠損させると、病原性の低下が認められた。

さらに、より菌数が少ない肝臓における黄色ブドウ球菌の遺伝子発現解析にも成功した。その結果、腎臓と肝臓とで共通して 88 遺伝子が発現上昇していた。また、肝臓単独で発現上昇した遺伝子が 504 個見いだされた(図 4)。特にファージ由来の遺伝子の発現量が大きく変動しており、今後、腎臓と肝臓における黄色ブドウ球菌の遺伝子発現の差を与える因子を解析する必要がある。

さらに、NEWMAN 株と、CA-MRSA である MW2 及び USA300 について、それぞれ 145 及び 119 遺伝子が共通して２倍以上発現上昇し、それぞれ CA-MRSA 単独で発現上昇していたのは 35 及び 16 遺伝子であり、発現上昇する遺伝子群はよく一致し

ていた。発現が共通しない遺伝子群の中に、病原性発揮において重要な遺伝子が存在しており、それらが病原性の差を説明する可能性がある。

現在、共通して遺伝子発現上昇している、病原性への寄与が明らかではない遺伝子について、破壊株を網羅的に作成し、それらの病原性における役割を検討している。また、機能未知遺伝子の生化学的な解析を行っており、新たな病原性発揮機構を明らかにしていく予定である。

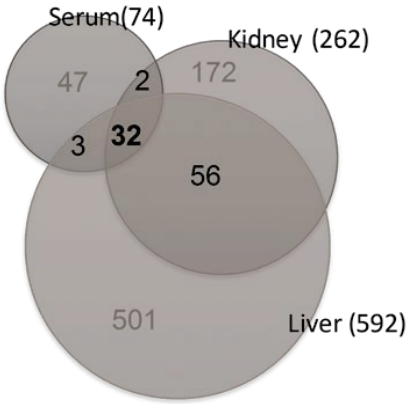


図 4 黄色ブドウ球菌の各臓器内で有意に発現上昇する遺伝子数

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援によって、新規抗生物質初めて宿主内における黄色ブドウ球菌の遺伝子発現の網羅的な解析が可能となった。これまで、黄色ブドウ球菌の

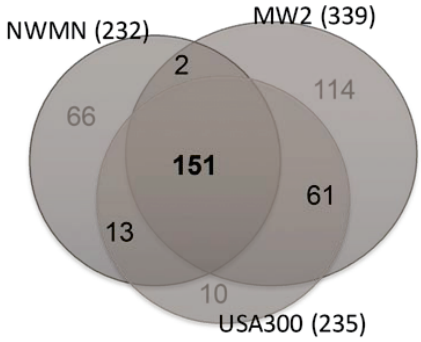


図5 異なる菌株間の腎臓において有意に発現上昇する遺伝子数

病原性に関わることが明らかになっていない、新規遺伝子群を複数見いだすことができたことから、新たな黄色ブドウ球菌の病原性発揮機構を明らかにすることが可能になったと考えられる。今後は、発現上昇が認められた遺伝子の黄色ブドウ球菌の病原性発揮、または、宿主の防御機構の解明を行い、黄色ブドウ球菌の感染時における宿主–病原体相互作用の全貌を明らかにできると期待している。この解析の結果、病原性の発揮に必要な因子を標的とした、これまでとは異なる機構に基づく、新規感染症治療薬の開発が可能になると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

論文

1. Ishii, K., et al., *Infect Immun.* 82, 1500-1510 (2014)

公募支援課題：2014 年度

ミトコンドリア移植による哺乳類ミトコンドリアゲノムのパラダイム変換

基盤研究（A）

林 純一・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞
現在、ミトコンドリア呼吸欠損に関係する哺乳類ミトコンドリアゲノムのパラダイムの骨子は以下の２点（A, B）である：
パラダイム（A）：ミトコンドリアゲノムに存在する遺伝子の遺伝子産物は全てミトコンドリア内膜に局在し、酸素呼吸による ATP 合成に関与する；
パラダイム（B）：ミトコンドリアゲノムに呼吸欠損を誘発する突然変異が生じるとミトコンドリア病のみならず、老化や老化関連疾患も誘発する（老化ミトコンドリア原因説；がんミトコンドリア原因説）。しかし、国内外の多くの研究者の支持を得ているこれらのパラダイムは、その大部分が状況証拠をベースに構築されており、注意深い検証が必要である。

目的 A：最近、我々は**パラダイム（A）**を大きく変換させうる発見、すなわちミトコンドリアゲノム（mtDNA）の病原性突然変異（呼吸活性を低下させる変異）ではなく、多型突然変異（呼吸活性に影響を与えない変異）をもつ細胞を自然免疫系が非自己と認識し、その細胞を除去する仕組の存在を発見した（Ishikawa et al. JEM 2010）。そこで、本研究では、その存在が想定されるミトコンドリア抗原（mtDNA にコードされるにもかかわらず細胞表面に局在する抗原）とその多型突然変異を同定することにより、mtDNA の遺伝子産物がミトコンドリア抗原として細胞表面にも局在し、自然免疫細胞により非自己と認識されるという仕組みを明らかにすることを目的とした。

目的 B 加齢に伴うミトコンドリア呼吸機能低下の原因について、広く受け入れられているのは「mtDNA 突然変異の蓄積が原因」とする仮説（老化ミトコンドリア原因説）である。しかし、最近我々は老化したヒト由来繊維芽細胞の mtDNA に突然変異が蓄積していないこと、この細胞を iPS 化後、再度繊維芽細胞に分化させるとミトコンドリア呼吸活性が回復することなどを明らかにし**パラダイム（B）変換**に成功した（Hashizume et al. Sci Rep 2015）。この事実は、老化に伴うミトコンドリア呼吸活性低下の原因は、mtDNA や核 DNA に突然変異が蓄積するためではなく、ミトコンドリア呼吸活性に関係する核コードの遺伝子の「可逆的」な発現調節が原因であることを示唆している。本研究は、加齢に伴うミトコンドリア呼吸機能低下に関係する核コード遺伝子のエピジェネティックな調節機構を検証することを目的とした。

＜支援の内容＞
A. mtDNA に様々な多型突然変異をもつサイブリッド（核は B6 系統の P29 細胞由来）を樹立し、その比較からミトコンドリア抗原の同定を試みてきたが、驚くべきことに、非自己である SAMP1 系統由来の mtDNA を導入したサイブリッド(P29mtSAMP1)から非自己の mtDNA を完全に消去し、自己である B6 系統の mtDNA を再導入したサイブリッド(P29(SAMP1)mtB6)でも、自然免疫系がこれを非自己と認識し、そのサイブリッドを攻撃することが明らかとなった。この事実は、核 DNA でも mtDNA でもない、未知の細胞質遺伝因子（ウイルスかもしれない）がミトコンドリア抗原をコードしていることを強く示唆している。
そこで、**ゲノム支援**により核とミトコンドリアの両ゲノムが B6 系統由来である P29mtB6 および P29(SAMP1)mtB6 について、RNA-seq による網羅的発現プロファイルを取得した。
B. 加齢に伴うミトコンドリア呼吸機能低下に関係する核遺伝子のエピジェネティックな調節機構を検証するため、**ゲノム支援**により若年者と高齢者由来繊維芽細胞株とそれを iPS 細胞化後に繊維芽細胞に分化させた細胞株でバイサルファイト解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞
A. P29(SAMP1)mtB6 において発現が認められ、かつ P29mtB6 では発現していない遺伝子産物を探索することで、核 DNA にも mtDNA にもコードされない未知のミトコンドリア抗原の候補としてマウス内在性レトロウイルスの env 遺伝子に相当する ENSMUSG00000073777 と Gm3168 が同定された。
B. 原因遺伝子の一つであることが示唆されている核コード遺伝子の GCAT および SHMT2 の各発現調節領域のメチル化状態の比較を行ったが、老化との明確な相関関係は見出せなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
A. マウス内在性ウイルスの env 遺伝子の発現誘発により、自然免疫系がその細胞を非自己と認識している可能性が示唆された。今後はこの可能性を証明するため env 遺伝子の発現抑制により自然免疫系の認識から解除されることを立証する必要がある。
　一方、この仮説が立証されなかった場合は他の細胞質因子の探索が必要である。「RNA-seq」解析は poly A を付加された mRNA に限定されるため、未知 RNA に対してはランダムプライマーを用いた cDNA ライブラリー、未知 DNA に対しては shotgun ライブラリーを作製し原因因子の特定が必要である。
B. これらの遺伝子以外の遺伝子のメチル化によるエピジェネティック調節を検証することが必要である。また、これらの遺伝子に共通する制御因子の探索も重要と考えられる。

＜支援成果公表リスト＞
なし

公募支援課題：2011 年度

共通のゲノム異常に起因する新規症候群の定義と病態解析

若手研究（B）

林 深・東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンター

＜背景・目的＞

発達遅滞や多発奇形などの表現型を呈する先天異常症は全人口の 2-3%に存在するとされる難治性疾患であるが、臨床症状や染色体検査などで診断できる先天異常症は約 2 割で、残りは原因不明のまま診断未確定となっているのが現状である。申請者らは全国 23 の医療機関とコンソーシアムを形成して、臨床的に診断がつかず染色体核型正常である多発奇形を伴う発達遅滞症例 (MCA/ID)645 例を収集し、主にマイクロアレイを用いた多段階スクリーニングによって 155 例 (24.0%)に疾患原因となる CNV を見出してきた。一方で、これらの解析で原因同定に至らなかったものの、表現型などから同一のゲノム異常に起因する新規症候群であることが強く示唆される症例を経験している。

そのため本支援では、本研究では従前の解析では原因の同定に至らなかった先天異常疾患症例の解析を行い、疾患原因の探求と新規疾患原因遺伝子の同定を試みた。

＜支援の内容＞

１．骨系統疾患の家系例における罹患患者 2 例 (MCG1, 2)の whole genome resequence (WGR)

２．共通のゲノム異常に起因することが疑われる孤発例の先天異常疾患 2 検体 (MCG3, 4)の WGR

＜支援によって得られた研究成果＞

１．骨系統疾患の家系例

得られた変異の中から既知の SNP と同義変異を除外し、以下の変異を得た。

MCG1: 392 (SNV: 307, indel: 85)
MCG2: 375 (SNV: 283, indel: 92)

これらのうち MCG1, 2 に共通する遺伝子変異として 45 箇所を絞り込み、疾患原因候補とした。

それぞれの変異をサンガーシークエンスで確認し、罹患同胞 7 名に存在してかつ非罹患同胞 5 名に存在しない変異を疾患原因遺伝子候補として抽出したが、表現型に連鎖する有意な変異は見いだされなかった。

２．共通のゲノム異常に起因することが疑われる孤発例の先天異常疾患２検体

「背景・目的」の項目で詳述した MCA/MR 症例のスクリーニングにおいて、重度精神遅滞・長く細い顔・歯叢生・歯肉肥大・細長い四肢・指趾などの類似した phenotype を共有する 5 症例を見いだしていた。このうち 2 症例はアレイ CGH 解析によって 3p26.1-p25.3 領域に約 1Mb のヘテロ欠失を検出し、3 症例は欠失を認めなかった。これらの症例が同一の機序により発症しているとの仮説の下、ゲノムアレイで異常を認めない 2 例を解析対象とした。得られた変異から既知の変異をフィルタリングし、同義変異を除外し、結果として以下の変異を得た。

MCG3: 695 (SNV: 597, indel: 98)
MCG4: 367 (SNV: 288, indel: 79)

これらの変異につき、下記の検討を行った。

１．3p26.1-p25.3 における変異

当初の候補領域である 3p26.1-p25.3 において、MCG3, 4 に共通する同一遺伝子における変異は見出されなかった。また、MCG3 または 4 におけるエクソン内変異は 3 箇所に見つかったが、いずれも遺伝子機能から有意な候補遺伝子とは判断しなかった。

２．その他の領域における変異

◎MCG3,4 が同一の機序で起こっていると仮定した場合

6 遺伝子において、MCG3,4 がそれぞれ異なる変異を有していた。このうち、機能的に疾患との関連が疑われたのは SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体をコードし、ハプロ不全が症候群性の発達遅滞の原因となることが報告されている *ARID1B* (6q25.3)におけるミスセンス変異であった。しかし、両親のスクリーニングにおいてこれらは父親に由来する rare SNP であると考えられたため、候補遺伝子からは除外した。

◎MCG3,4 が異なる機序で起こっている場合

MCG3,4 のいずれかに、のべ 7 遺伝子のナンセンス変異が見出された。このうち、機能的に疾患との関連が疑われたのは神経ペプチドと結合する内在性成膜蛋白をコードし、大脳皮質に高発現する *NPBWR2*(20q13.33)であった (MCG3)。しかし、両親のスクリーニングにおいてこれらは父親に由来する rare SNP であると考えられたため、候補遺伝子からは除外した。

なお、残存するミスセンス変異はのべ 655 箇所であり、機能的な絞り込みは困難であると考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

遺憾ながら現時点では両症例における有意な疾患原因遺伝子は見出されていない。平成 25 年度の支援課題で効率よく候補遺伝子を絞り込めた経緯を勘案すると、孤発例先天異常疾患における候補遺伝子の探索には両親・患児のトリオを対象とした解析が必須であると考えられ、今後の課題としたい。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2013 年度

小脳・脳幹部低形成を伴う発達遅滞を呈する疾患群の包括的病態解明

基盤研究（B）

林 深・東京医科歯科大学硬組織疾患ゲノムセンター

＜背景・目的＞

Xp11.4 に座位する *CASK* は哺乳類の中枢神経系において強発現する MAGUK 蛋白をコードし、典型的には、女性における機能喪失型変異が小頭症を呈する小脳脳幹部低形成（MICPCH)の原因となる一方で、男性における機能喪失型変異は致死と成ることが報告されている。申請者らは MICPCH における CASK 欠失症例を世界で初めて報告したことを皮切りに、40 例以上の新規 MICPCH 症例を収集し、疾患原因探索を行ってきた。この過程で約 7 割の症例に *CASK* の機能喪失型変異を同定した一方で、変異陰性例や男性症例などの非特異的症例を経験しており、MICPCH における *CASK* 以外の疾患原因の存在を示唆していた。

そのため本支援では、*CASK* 陰性例に対するゲノムの網羅的な解析と病態解明を行い、MICPCH の病態を、ゲノム異常と分子メカニズムの面から包括的に理解することを目的とした。

＜支援の内容＞

従前の解析では MICPCH の原因が不明であり、倫理的同意の得られた 3 症例（以下 MIC1~3 とする）に対し、患児と両親のトリオを対象とした全エクソンシークエンスの支援を依頼した。なお、MIC1 は女性、MIC2, 3 は男性である。

＜支援によって得られた研究成果＞

MIC1~3 の患児と両親のトリオを対象とした全エクソンシークエンスにより、得られた 1 塩基変異(SNV)と挿入欠失（indel)を抽出した上で既知の変異をフィルタリングし、SNV からは同義変異を除いたデータを得た。結果として得られた新規変異ならびに両親由来変異は以下の通りである。

MIC1 合計 512 (de novo: 200, inherited: 312)
MIC2 合計 608 (de novo: 287, inherited: 321)
MIC3 合計 571 (de novo: 258, inherited: 313)

今回対象とした症例はいずれも孤発例であることから、疾患に関連する可能性のある変異は下記のものであるという仮説を立てた。

１．患児における de novo 変異
２．男児における母親由来の X 染色体上の変異
３．ホモ接合変異
４．複合ヘテロ変異

そのため、上記変異からリード数の少ない変異や非コード領域の変異を除外し、患児に特異的な変異を絞り込んだうえでこの条件に合致する変異を検索し、さらにサンガー法による確認を行った。

その結果、MIC1 では、*CASK* のエクソン 18 における 1 塩基挿入を検出した（c.1677_1678insG, p.R559Afs*20)。本変異が従来のサンガー法で見逃されていたのはエクソンの 3’側に近い同一ヌクレオチドが連続するところの 1 塩基挿入であったため、アーチファクトと判断されていたためと考えられた。

MIC3 では、最終的に候補となる遺伝子変異は 3 個に絞り込まれた。この中から、*ITPR1* (3p26.1)のエクソン 58 におけるミスセンス変異を疾患原因として同定した（c.7753A>C, p.T2585P)。*ITPR1* のヘテロ接合変異は脊髄小脳変性症（SCA)15 型, 29 型の原因となることが知られている。特に SCA29 は乳幼児期に発症する精神運動発達遅滞と小脳萎縮を呈する一方で、小頭症は *CASK* 変異例ほど著明ではなく、これらの特徴はいずれも MIC3 の表現型に合致していた。また、常染色体上の遺伝子のハプロ不全であることから男性症例であることの矛盾もなく、本変異が MIC3 の疾患原因であると考えられた。

なお、MIC2 では候補遺伝子変異を 5 個まで絞り込んだものの、いずれも機能的に MICPCH の病態を説明する変異であるとは考えにくく、疾患原因の同定には至らなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

近年の大規模なゲノム解析の利用には人員的・金銭的・経験的にまださまざまな制限が存在しているが、本支援による全エクソン解析により、申請者らの従前の研究コホートにおいてブラックボックスであった症例の候補遺伝子の探索を行うことができた。

染色体解析、マイクロアレイ、ターゲット遺伝子のシークエンスといった従来のゲノム解析技法では原因特定に至らなかった症例においても 3 例中 2 例の疾患原因の特定に至ったことは、次世代シークエンサーのポテンシャルを再認識する結果であった。1 例はサンガー法で見逃されていた変異であること、もう 1 例は多数の亜型を持つ疾患のしかも多数のエクソンを持つ原因遺伝子変異であったことから、従前の技法では変異同定に至らなかった可能性が高く、本研究における大変重要な結果となった。

＜支援成果公表リスト＞

論文作成中

公募支援課題：2010 年度

新世代 DNA 塩基配列決定技術を用いた大腸菌 pan-genome の解明

基盤研究（B）

林 哲也・宮崎大学フロンティア科学実験総合センター

＜背景・目的＞

細菌ゲノムの特徴の一つは大量の外来性遺伝子の存在である。同じ菌種内でも菌株間での高いゲノム多様性が存在することが多く、様々な菌株が保有するゲノム情報の総和をその菌種の pan-genome と呼ぶ。pan-genome の実体を解明するには多数の菌株のゲノム情報が必要であるが、重要菌種における pan-genome の解明は新世代シーケンサーの登場によって現実的なものとなってきた。種々の細菌の中で、大腸菌は、病原性の有無やタイプなど、菌株によって様々な形質の多様性を示すことから、ゲノム多様性研究において非常に魅力的かつ重要な解析対象である。また、新世代シーケンサーを用いた配列解析においては必須となるレファレンスゲノム情報も充実している。本研究では、ゲノム解析が行われていないタイプの大腸菌株を対象とした大規模ゲノム解析を行い、大腸菌における pan-genome の実体の解明を目指す。

＜支援の内容＞

上記の研究の一環として、以下の支援を受けた：（1）腸管侵入性大腸菌（EIEC）４株とヒト下痢症由来及びトリ由来の *Escherichia albertii* ４株の 454 による概要配列の取得、(2)そのうち、EIEC １株、*E. albertii* 1 株については完全長配列の決定、（3）イルミナによる re-sequencing (配列精度向上のため)

＜支援によって得られた研究成果＞

(1) *E. albertii* に関して：本菌は臨床検査室では大腸菌との区別が難しい大腸菌近縁種で、最近独立した菌種であることが確定した新興病原体である。支援により、4 株のドラフト配列（Bird_3 株, HIPH08472 株、CB9786 株, EC06-170 株）を取得したのちフィニッシング作業を行い、1 株（CB9786 株）の完全配列を取得した。

(2) 腸管侵入性大腸菌（EIEC）に関して：今回の支援で、4 株の概要配列を取得できた。EIEC のゲノムには IS やファージなどのリピート配列が多く、フィニッシング作業は困難を極めたが、１株（M_EIEC2 株） についてはフィニッシングが終了し、完全配列を取得した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

(1) *E. albertii* に関して：支援の結果を受けて、残り 3 株の完全配列を自前で決定した。その後、4 株のアノテーション作業を行い、さらに自己資金によって 26 株のドラフトゲノム配列を取得し、*E. albertii* 内でのゲノム比較解析を実施した。また、解析した *E. albertii* 全株と既知の大腸菌ゲノム（44 株）、ドラフト配列が登録されている大腸菌の近縁菌種（*Escherichia fergusonii* を含む、19 株）との比較解析を行った。これらの解析から、当初の予定を超えて、*Escherichia* 属のコアゲノムを *E. albertii* のコアゲノムを同定できたほか、*E. albertii* と大腸菌との遺伝的な性状の類似点と相違点を網羅的に同定し、本菌種の生物学的・遺伝的特性の解明ができた。特筆すべき知見の一つは、運動性が無いとされている本菌において、鞭毛合成系遺伝子群が予想に反して完全に保存されおり、さらに奇妙なことに、走化性関連遺伝子群が完全に欠落していることである。さらに、本菌種に特異的なゲノム領域を同定（185 領域、計 210 kb）し、得られた配列情報をマーカーとして、PCR による本菌の簡便な同定法を作成できた。以上の結果は、成果論文２に発表した。なお、Shiga toxin (Stx2f) 産生株である HIPH 08472 については、大腸菌の Stx2f 産生株との比較を進めており、独立した論文にする予定である。さらに、*E. albertii* 29 株の O 抗原合成系に関しても、ゲノム論文発表後に、別論文として発表準備をしている。また、上記の PCR による本菌同定法を用いて、*E. albertii* による集団感染事例を同定しており（世界初）、これについても論文発表済みである(成果論文１)。

(2)腸管侵入性大腸菌（EIEC）に関して：支援の結果（４株の概要配列の取得、その中の１株の完全配列取得）を受けて、他の３株についても自前でフィンッシング作業を行い、完全配列を決定できた。アノテーション等も修了しており、IS 配列に由来する大量のリピート配列の処理に時間を要しているが、現在、EIEC 間、EIEC と他の大腸菌、EIEC と赤痢菌との比較ゲノム解析を進めている。EIEC は赤痢と類似した臨床症状を示し、病原メカニズムとしても類似の機構が想定されているが、歴史的な背景もあって、行政的にはまったく異なった対応がとられている。したがって、臨床的には赤痢菌と EIEC の区別が問題となっているが、今回ゲノム配列を決定した 4 株の EIEC は、それぞれ異なる大腸菌進化系統に属するため、上記のゲノム比較によって、赤痢菌と EIEC との遺伝的な違いだけでなく、EIEC の本質（EIEC に共通なゲノム特性）が解明でき、赤痢菌との区別という臨床的な課題解決のための情報基盤が確立できると期待している。

＜支援成果公表リスト＞

1. Ooka, T, et al.: A human outbreak case associated with *Escherichia albertii*. **Emerg. Infect. Dis.** 19(1):144-146, 2013.

2. Ooka T, et al.: Defining the genome features of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. **Genome Biol Evol,** *7(12): 3170-3179*. 2015.

公募支援課題：2011 年度

polymicrobial disease のメタゲノム解析とその臨床応用

基盤研究（B）

林 哲也・宮崎大学フロンティア科学実験総合センター

＜背景・目的＞

ウシの趾乳頭腫症 Papillomatous Digital Dermatitis（PDD）は、近年新たに提唱された疾患概念である polymicrobial disease の１つと考えられる複数の細菌種による感染症であり、本疾患の場合は原因菌種と考えられるものの多くが難培養性細菌である。本研究では、メタゲノム解析を中心としたアプローチにより、PDD の原因菌群の同定とその生物学的性状を明らかにし、polymicrobial disease としての PDD の本質を解明する。さらに、得られたゲノム情報を基に、難培養菌の分離・培養法・遺伝子改変技術の確立や早期診断法やサーベイランス法などの開発を目指す。

＜支援の内容＞

上記のように、PDD は、歯周病や細菌性膣症などとともに、代表的な polymicrobial disease の１つであり、難培養性細菌を含む複数の細菌種による感染症と考えられている。我々は、メタゲノム解析による起因菌種群の同定と各菌種の遺伝学的特性の解明、及びそれらの情報の臨床応用（疫学ツール開発等）を目指しており、ウシ由来ＤＮＡを含む PDD 病変由来サンプルのメタゲノム解析に関して、以下の支援を受けた。サンプルとしては、種々の予備的実験の結果に基づき、十分量の細菌由来 DNA を含み、典型的な菌組成を有する検体の一つをメタゲノム解析の材料として選定した。また、*Treponema phagedenis* は、PDD 病変の最優勢菌種の１つで、かつ、唯一分離培養できている菌種であり、我々自身によって完全配列を決定している。PDD および *T. phagedenis* に関連した支援内容は以下の通りである

1) MiSeq による shotgun sequencing データの取得（15 ラン分）
2) MiSeq による 2 Kb の mate-pair sequencing データ取得（5 ラン分）
3) 454 による 8 Kb および 4 Kb の mate-pair sequencing データの取得（それぞれ、2 ラン及び 3 ラン分）
4) 上記のメタゲノム配列データのアッセンブリ
5) *T. phagedenis*（配列決定株）の RNA-Seq 解析（対数増殖期と定常期）

＜支援によって得られた研究成果＞

MiSeq による shotgun sequencing データ（15 ラン分）、2 Kb の mate-pair sequencing データ（5 ラン分）、454 による 8 Kb および 4 Kb の mate-pair sequencing データ（それぞれ、2 ラン及び 3 ラン分）が取得できた。さらに、情報支援を受けて、これらの配列データのアッセンブリ及びクラスタリングを行い、15～20 程度の菌種（クラスター）のドラフト配列が取得できた。*T. phagedenis*（２株）に関しては、自前で配列の精度向上のための MiSeq による re-sequencing を行い、高精度完全配列を取得できた。また、支援の中で RNA-seq によるトランスクリプトーム解析の結果を得た。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援で得られたデータ等は、上記の通りである。しかし、その後、自前の費用で別サンプルを同様なメタゲノム解析した結果、この第 2 のサンプルの方が支援で解析したサンプルよりも遙かに細菌由来 DNA 量の多く、主要病原菌種群のゲノム再構成に適していることが判明した。そのため、支援で解析したサンプルは比較解析用としてそのまま残し、第 2 のサンプルを使って主要病原菌種群のゲノム再構成を行うこととした。また、この解析（メタゲノム配列からのゲノム再構成）は、東工大の伊藤らが進めているメタゲノム用のアッセンブラーの開発と連動して行うこととした。そのため、アッセンブリ及びクラスタリングはまだ最終的な形にはなっていない。しかし、最終版のメタゲノム配列は取得でき、これをベースとして、主要菌種ゲノムのフィニッシングを行っている。既に、10 菌種の環状染色体配列が得られており、そのうち 5 菌種についてはギャップのない完全配列となっている。他の 5 菌種の完全配列取得に加え、さらに 5～8 ゲノムの環状化（できればその完全配列取得）を目指して、現在解析作業を進めているが、メタゲノム解析による polymicrobial disease の主要構成菌種のゲノムの網羅的な再構成としては世界で初めての成功例となる可能性がある。さらに、複数のサンプルのメタゲノム解析を進めており、その比較解析（この段階で本支援の成果が活かされる）により、PDD の起因菌種群の同定と各菌種の遺伝学的特性の解明、及びそれらの情報を利用した疫学ツール開発等につながると期待している。

本症は、1974 年以降、世界各国で多発しており、国内でも全国に発生が拡大しているが、病変部に激しい疼痛を伴うために罹患牛では過度のストレスによる体重減少や泌乳量低下などを引き起こしている。また、一度発生した牛舎では発生が繰り返され（根絶が困難）、経済的損失も大きい感染症として畜産業界で問題視されていることから、PDD のゲノム解析の成果は社会への還元が強く期待できる。

なお、*T. phagedenis* の RNA-Seq データに関しては、ゲノム論文の中のデータの 1 つとして発表する予定であり、現在論文を準備中であるが、本菌のゲノム上に存在する数百コピーも存在する MITE と転写単位との関係を RNA-Seq によって明らかにできている。

＜支援成果公表リスト＞

まだ、論文発表には至っていない。

公募支援課題：2012 年度

相互作用解析と発現解析による２型糖尿病遺伝素因の解明

基盤研究（C）

原 一雄・東京大学医学部附属病院

＜背景・目的＞

全ゲノム関連解析(GWAS)によってこれまで 100 近くの 2 型糖尿病感受性領域・遺伝子多型が同定されているが、そのほとんどが直接的に 2 型糖尿病への易罹患性に影響しているのではなく、真の原因遺伝子多型と連鎖不平衡にある標識遺伝子多型であると考えられている。真の原因遺伝子多型を同定出来れば（fine mapping）、遺伝子多型による 2 型糖尿病発症リスクの予測精度が向上し､2 型糖尿病の発症機序や原因遺伝子を標的とした新規治療薬の開発につながることが期待される。申請者らはこれまで *KCNQ1, UBE2E2, C2CD4A/B* 遺伝子の非翻訳領域に日本人で2型糖尿病と関連する遺伝子多型を複数同定した。これらの領域について、公共のデータベースにない新たな遺伝子多型を target re-sequence を行って同定し、それを参照パネルとして BioBankJapan の GWAS のサンプルについて genotype imputation を行い、 2 型糖尿病との関連を検討する。また、外科的に切除したヒト脂肪組織から RNA を抽出し *KCNQ1, UBE2E2, C2CD4A/B* 遺伝子発現レベルの定量を行っており、新規に同定した遺伝子多型が発現レベルに関連(eQTL)するか解析し、これらの領域における原因遺伝子多型候補を絞り込む。

＜支援の内容＞*KCNQ1, UBE2E2, C2CD4A/B* 遺伝子の計 5Mb の DNA 配列について capture 法を用いて target re-sequence を行った。2 型糖尿病 500 例、非糖尿病 100 例について得られたシークエンスデータについて CCRaVAT を使用して、２型糖尿病と近傍の遺伝子発現レベルとの関連を検定した。target re-sequence を実施する際の試薬と 1 次解析について全面的に支援して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

Target re-sequence によって、公開されている遺伝子多型データベースには報告のない *KCNQ1, UBE2E2, C2CD4A/B* 領域の遺伝子多型を網羅的に同定した。2 型糖尿病 500 例と非糖尿病 100 例で２型糖尿病との関連解析を予備的に行ったが、サンプルサイズが小さいため多重検定による有意水準の補正を行った後に 2 型糖尿病と有意に相関した遺伝子多型は認められなかった。また、新たに同定した遺伝子多型の中で近傍の遺伝子の発現レベルと有意に関連したものも、予備的検討では認められなかった。現在、Target re-sequence に使用しなかった 2 型糖尿病 500 例、非糖尿病 900 例について今回新たに同定した多型について遺伝子型のタイピングを進めている。また同じ試料について DNA メチル化を定量している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞*KCNQ1, UBE2E2, C2CD4A/B*領域について、今回target re-sequenceで同定した遺伝子多型の遺伝子型と既にconventionalなアレイによってタイピングされている遺伝子型の情報を統合することで、日本人では最も密度の高いgenotype imputation用の参照パネルを作製することが出来る。作製した参照パネルを利用すればBioBankJapanの2型糖尿病と非糖尿病のサンプルについて精度の高いimputationを行うことが出来るため、これらの領域における原因遺伝子多型の絞り込みに役立てることが出来る。また、遺伝子発現レベルやDNAメチル化の程度についてサンプルを増やして解析することによって、DNAメチル化の程度を変化させることによって*KCNQ1, UBE2E2, C2CD4A/B*遺伝子の発現レベルに影響を与える遺伝子多型の同定が可能と成る。さらに、ENCODEの情報など遺伝子発現を制御するDNAの配列情報と照らし合わせることによって、本領域が2型糖尿病感受性にどのようなメカニズムで影響を与えているかを解明するための重要な情報となることが期待される。本支援により、２型糖尿病の発症に関与原因遺伝子多型の候補を絞り込むことに成功すれば、他の疾患についても応用が可能であるため、波及効果が大きいと考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

支援成果雑誌論文：Hara K, et al. Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. Hum Mol Genet. 23:239-246, 2014（査読有）

学会発表： Comprehensive evaluation of type 2 diabetes susceptibility loci in East Asians by using 1000 Genomes Project data. Hara K, Fujita H, Johnson TA, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kadowaki T. American Society of Human Genetics 62nd Annual Meeting November 6-10, 2012 San Francisco, California（査読有）

公募支援課題：2010 年度

慢性低紫外線環境ストレスによるゲノム損傷応答と耐性機構に関する研究

科研費種目基盤研究（B）

菱田 卓・大阪大学微生物病研究所

＜背景・目的＞

生物が持つゲノム DNA 上では、様々な内的・外的要因によって DNA 損傷が常に起こっている。主要な外的要因の一つである紫外線は、ピリミジンダイマーと呼ばれる隣り合うピリミジン塩基間の架橋による DNA 損傷を引き起こし、DNA 複製や転写を阻害する。ヌクレオチド除去修復（NER)は、紫外線損傷を修復する主要な経路であり、バクテリアからヒトまで高度に保存されている。我々は、紫外線損傷応答の解析にあたり、自然環境に類似した環境下で研究を行うことが重要であるという点に着想し、慢性低線量率紫外線照射（CLUV; chronic low dose UV）下で酵母細胞を培養できる実験系を構築した。CLUV 環境において､NER 欠損細胞は野生型細胞と遜色なく増殖することができるため、これまで困難であった NER 欠損細胞におけるゲノム安定性について調べることが可能である。そこで、本支援研究では、CLUV 環境下における NER 欠損細胞のゲノム安定性について詳細に解析するため、全ゲノム配列を対象とした変異スペクトラム解析を行った。

＜支援の内容＞

CLUV 下で２日間培養した酵母細胞と非照射コントロールからゲノム DNA を精製し、国立遺伝学研究所の豊田先生の支援により、次世代型シーケンサ（Illumina 110x2）を用いて全ゲノム配列を決定した。その後、東京工業大学の黒川先生の支援により、非照射細胞の全ゲノム配列を鋳型として、照射細胞由来のゲノム配列において検出される変異箇所の同定及び情報解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

今回の支援研究では、CLUV 照射後の酵母ゲノムを用いて次世代型シーケンサによる全ゲノム変異スペクトラム解析を行った。その結果、CLUV 照射細胞由来のサンプルにおいて、各サンプルに約 100 から 200 個の SNP を同定することが出来た。遺伝子コーディング領域(Co)と非コーディング領域（NCo）間の比較から、C（シトシン）から T（チミン）への変異は Co で有意に増大していることがわかった。この C→T 変異の増大は、前進突然変異検出系のレポーター遺伝子（*CAN1* 遺伝子）を用いた変異スペクトラム解析においても観察された。これらの結果から、C→T 変異は、Co 領域特異的な現象であることが明らかとなった。また、Co における転写鋳型鎖及び非鋳型鎖間の変異スペクラム解析から、C→T 変異が転写鋳型鎖において有意に増大していることを見いだした。さらに、CLUV による C→T 変異誘発には損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼζとηが関与していることがわかった。

C→T 変異誘発機構として考えられるのは、シトシンの脱アミノ化によるウラシル(U)への変換である。先行研究から、シトシン残基を含むピリミジンダイマーや一本鎖 DNA 領域において、シトシン脱アミノ化頻度が劇的に上昇することが報告されている。したがって、シトシンを含むピリミジンダイマーの形成と転写の停止に伴う一本鎖領域の形成がシトシンの脱アミノ化を促進した結果、ピリミジンダイマー内の C が U へと変異し、この変異箇所を鋳型として損傷乗り越え型ポリメラーゼが DNA 合成を行うことで C→T 変異の増大が起こったと考えられる。本研究により、紫外線損傷による複製阻害に先立つ転写の阻害が C→T 変異の誘発に関与していることが示された。このことは、ゲノムのランダムな場所において発生している様々な損傷においても、ゲノム上で発生する場所や転写等がゲノム安定性に大きな影響を与えることを示唆している。今後は、本研究をさらに発展し、様々な変異株を用いて慢性的な DNA 損傷ストレス環境における全ゲノム変異スペクトラムを行うことで、転写と非転写領域間の変異誘発機構の違いやその分子機構について明らかにできることが期待できる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回のゲノム支援によって､DNA 損傷による変異誘発メカニズムの解析に酵母全ゲノムの変異解析が非常に有効な手段であることが示された。実際、従来型のレポーター遺伝子に依存した変異解析では、個々の実験系に依存したバイアスが常に存在し、さらに、非コード領域における変異解析は困難であった。しかしながら、次世代型シーケンサを用いた全ゲノム解析を用いることでこの障害を取り除き、コード／非コード間の変異誘発機構の違いなどを明らかにすることが可能となった。さらに、ゲノム全体で起こった変異を詳細に調べることで、変異ホットスポットの同定の他、テロメア、セントロメア、複製開始点などのゲノム上の機能性配列や特徴的なクロマチン構造と突然変異との関連性も議論が可能となる。これらの詳細な解析には、より多くの変異箇所と複数の変異株を用いた解析が必要であるが、現実的には可能なレベルと思われる。また、本研究から明らかになった転写活性に依存した突然変異の誘発機構は、遺伝子の変異に直結するため、その分子メカニズムの解明は今後益々重要な分野となっていくことが期待できる。

＜支援成果公表リスト＞

Haruta, N., Kubota, Y., and Hishida, T., Chronic low-dose ultraviolet-induced mutagenesis in nucleotide excision repair-deficient cells. Nucleic Acids Res. 40(17):8406-15,2012.

公募支援課題：2012 年度

樹状突起形態・機能の神経活動依存的制御の分子機構

若手研究（S）

尾藤 晴彦・東京大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

経験に基づく情報を神経回路内に長期的に「書き込む」ためには、一過性の電気的シグナルを何らかの化学的シグナル伝達機構によって増幅・固定・貯蔵し、長期間にわたる読み出しを可能とする分子機構が必要となる。この詳細は未だ大きな謎である。従来、受動的に電位を伝播する構造と考えられた樹状突起が、近年、実は神経活動受容後の電気的シグナルと化学的シグナルの統合のために必須なコンパートメントであることが明らかになっている。そこで本研究課題では、樹状突起シグナリングを、

①シグナル統合のコンパートメントとなる樹状突起の形成・成熟の分子機構、

②シナプス活動により発生した局所シグナルが神経細胞体まで伝わり、転写・翻訳・細胞骨格動員などの機構の活性化により、細胞全体の応答性が変化する分子機構、

③細胞全体の応答性の変化が、最初のシグナルを発生したシナプスの性質を選択的に、かつ長期的に修飾する分子機構、

の３つの側面から徹底的に解明を試みる。さらに、得られた分子機構に関する知見を元に、樹状突起形態・機能に改変を加え、「情報書き込み」機能を操作する可能性を探索する。

＜支援の内容＞

上記の目標②に関して、シナプス活動依存的な遺伝子発現は、記憶・学習の素過程である長期的な神経可塑性や神経回路再編成に必須であると考えられている。このため、大脳における活動依存的遺伝子群のプロファイリングはこれまで数多く試みられてきた。しかしながら、サンプルとして用いる個々の細胞の神経履歴は統一されていないため、結果の再現性が乏しく統一的な理解には至っていない。そこで支援依頼者らは神経活動依存的な遺伝子発現レポーターをもつトランスジェニックマウスを開発し、その大脳の海馬領域から活性化した細胞のみを単離する系を構築した。本支援においては単離神経細胞 10 個～20 個程度を出発材料に作製した微量 cDNA 4 サンプル（含む対照群）に関して、菅野研・鈴木研チームによってライブラリ - 作成および大規模シークエンシングを行っていただいた。また、シークエンスデータのマウスゲノムへのマッピングやリードのカウント等の解析に関してもご支援いただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

数百ピコグラム程度のごく少量の total RNA からの神経細胞のトランスクリプトームはこれまでほとんど報告がないため系の構築を手探り状態から開始したが、細胞単離法や RNA 抽出法、さらに cDNA 化法の検討を「ゲノム支援」のご協力によって進めることができ、HiSeq2000 による mRNA-Seq に成功した。得られた RNA-Seq データから活性化ニューロンにおける遺伝子発現プロファイルを求めたところ、神経活動に応答して発現量が増加する遺伝子および減少する遺伝子の候補リストが得られた。この結果を従来法である海馬組織全体からの RNA-Seq 結果と比較したところ、単一神経細胞プールから得た本支援の結果では神経活性化による遺伝子発現変化が大きく、また変動を示す遺伝子の数も多いことが明らかになり、本法の優位性が示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本方法は神経細胞の細胞タイプ別や細胞の存在する位置別に遺伝子発現解析を行えることができる画期的な方法である。これは多様な細胞種から構成されており、かつ、部位や位置による機能差が明らかである脳神経の遺伝子発現解析法に非常に適していると考えられる。本支援においては数十個単離細胞を集めた細胞プールで解析を行ったが、cDNA 化の効率を向上させることにより単一神経細胞への応用の展望がひらけた。なお、本法を用いて共同研究者の奥野浩行（京都大学）が引き続き 2013 年度および 2014 年度の支援課題として「ゲノム支援」の支援を受けて研究を進めている。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2012 年度

新規遺伝子改変動物と患者 iPS を利用した分子病態に基づくてんかんの革新的治療開発

基盤研究（A）

廣瀬 伸一・福岡大学医学部

121058; :熱性けいれんの 10 家系 の exome 解析

＜背景・目的＞

熱性けいれん（Febrile Seizures: FS）は、日本人の 5-10%程度が経験するにもかかわらず、その分子病態はわかっていない。通常 FS は、月齢 6～6 歳で発作を生じるため、脳の未熟さが原因とされている。しかし、熱性けいれんと同時期に有熱時にてんかん発作を生じる難治性てんかんである Dravet 症候群は電位依存性ナトリウムイオンチャネルのα１サブユニットを構成する SCN1A 遺伝子の変異により引き起こされる。また、日本人で 5-10%、欧米で 3%と人種差もあり、家族内での集積が見られ、遺伝子異常の関与が示唆される。そこで、FS の責任遺伝子を同定すべく次世代シークエンサーでのエクソーム解析を実施する支援を受けた。

＜支援の内容＞

我々が、これまで収集した約 300 症例の FS の中で、FS と関与があると考える SCN1A, SCN1B, GABRG2, HCN2 遺伝子変異が認められず、明確な常染色体優性遺伝を示す 10 家系の発端者に対して、ゲノム支援の支援をうけ、エクソーム・シークエンスを行い、発端者間で共通する遺伝子での変異を求めることにより病因となる遺伝子を探索した。

＜支援によって得られた研究成果＞

FS 発端者 10 名のエクソームシークエンスを終了し、データ解析を行った。エクソーム解析の結果、重複を除いた全バリアントは 2,171,629 個、全遺伝子は 13,995 個だった。新規変異かつ非アミノ酸同義置換･スプライス部位異常は 2,829 個のバリアント、2,444 個の遺伝子だった。このなかで、成人脳に発現するバリアントは 840 個、遺伝子は 740 個だった。しかし、10 名に共通する遺伝子は存在しなかった。9 名において 4 つの新規バリアントを共有する遺伝子１つ、7 名で 22 個の新規バリアントを共有する遺伝子１個､6 名で４または５つの新規バリアントを共有する遺伝子 2 個、5 名でそれぞれ 5, 2, 1, 5, 5, 1, 4 個の新規バリアントを共有する遺伝子 7 個を抽出した。5 名で 5 つのバリアント、つまり全員が異なるバリアントを保持する遺伝子に GPR98 遺伝子を同定した。GPR98 遺伝子は、2002 年に FS の表現型への関与が示された遺伝子であった。現在、本遺伝子のＦＳとの有意性確認のため、家系内での表現型分布の一致をみると当時に、他の家系を調査中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後、FS を引き起こす遺伝子が同定されることにより、初回発作時にてんかん発作との鑑別が困難だった FS に対して有用な検査手法を提供することが可能になる。それにより、FS の分子レベルでの病態解明が進むことが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2012 年度

新規遺伝子改変動物と患者 iPS を利用した分子病態に基づくてんかんの革新的治療開発

基盤研究（A）

廣瀬 伸一・福岡大学医学部

121059：良性家族性新生児てんかんの家系 9 検体の exome 解析

＜背景・目的＞

良性家族性新生児てんかん（Benign Familial Neonatal Epilepsy: BFNE）は生後 2～3 日に部分発作を主とするてんかん発作である。家族性の BFNE では常染色体優性遺伝形式をとる。通常、てんかん発作は乳児期には自然寛解し発達に影響を及ばさない予後良好なてんかんである。現在までに、責任遺伝子として脳内に発現するカリウムイオンチャネルである電依存性 KCNQ チャネルを構成する KCNQ2, KCNQ3 遺伝子の異常が判明している。また、BFNE と同じ表現型を呈し、家族歴のない孤発発症の症例は良性新生児けいれん（Benign Neonatal Seizures: BNS）として知られており、KCNQ2, KCNQ3 の新生変異が報告されている。病態の基盤は遺伝子レベルでも同じであり両疾患は家族性と孤発発症の違いとなっている。しかし、この 2 つの遺伝子の変異は約 70%の症例で同定されるが残り 30%では臨床的に BFNE (BNS)と診断されるにも変異を同定できない。近年、予後不良な難治性疾患である早期乳児てんかん性脳症で KCNQ2 遺伝子変異が同定されている。なぜ、同じ遺伝子の変異に関わらず重症度の異なる 2 つの疾患を生じるのかは不明である。

我々も、臨床的 BFNE（BNS）患者 50 名超に対して KCNQ2、KCNQ3 遺伝子に対して変異探索を実施したが、変異が同定されない患者を約 30%程度経験した。また、幾つかの症例では、軽度の発達遅滞やてんかんを発症する症例が見られた。そこで、変異の同定できない患者の責任遺伝子を同定する事により、BFNE（BNS）の病態を解明し、発作を引き起こす脳内ネットワークを同定する事を目的とした。

＜支援の内容＞

新生児期に限定されるてんかんである良性家族性新生児てんかん（Benign Familial Neonatal Epilepsy: BFNE）の病態解明に向けて、ゲノム支援より、BFNE 発端者８名と BNS 発端者 1 名に対してエクソーム解析で責任遺伝子を同定する支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援の支援を受け、常染色体優性遺伝を呈する BFNE 家系の発端者 8 名と孤発発症の BNS 発端者 1 名に対してエクソーム・シークエ通する遺伝子を探索する。SNP data bas を用いた novel variant 抽出に加え、3 名の既知の遺伝子に変異を持った症例で認められる variant を持った遺伝子を除外し責任遺伝子の候補を抽出する。ンスを行い現在 8 名終了し 1 名のシークエン中である。いずれも KCNQ2 と KCNQ3 に対する直接シークエンス法と MLPA 法で遺伝子異常が同定されなかった家系であった。

全エクソーム解析の結果、直接シークエンス法で同定されなかった変異が、BFNE と BNS の 1 名ずつの 2 名に KCNQ2 変異、BFNE の 1 名に KCNQ3 変異が認められた。

KCNQ2, KCNQ3 に変異を持たない 6 名に対して共通する遺伝子を探索する。SNP data bas を用いた novel variant 抽出に加え、3 名の既知の遺伝子に変異を持った症例で認められる variant を持った遺伝子を除外し責任遺伝子の候補を抽出する。また今後はトリオサンプルを用いる予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後、データ解析により責任遺伝子同定が可能となれば、分子レベルでの病態解明が期待できる。また、本疾患の責任遺伝子を網羅することにより、BFNE（BNE）の病態を解明することが可能になると考える。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2013 年度

新規遺伝子改変動物と患者 iPS を利用した分子病態に基づくてんかんの革新的治療開発

基盤研究（A）

廣瀬 伸一・福岡大学医学部

１３１０７４；孤発発症の夜間前頭葉てんかん（NFLE)患者 10 検体のエキソーム解析

＜背景・目的＞

NFLE は 10 歳前後で発症し、睡眠時に生じる群発する運動発作を特徴とする。発作は非特異的な前兆で始まり、過動、強直、ジストニー運動を伴う。夜間の発作が主であり睡眠時異常行動や夜驚症、ヒステリーと誤診されることがある。また、薬剤に対しては約 70%でカルバマゼピンの少量投与が有効であるが、残り 30%は不応であり、他の抗てんかん薬に対しても抵抗性がある。家族歴を有する NFLE は、常染色体優性夜間前頭葉てんかん（ADNFLE）と呼ばれ、約 70%で常染色体優性遺伝する。1995 年に ADNFLE ではニコチン性アセチルコリン受容体α4 サブユニットをコードする *CHRNA4* とβ2 サブユニットをコードする *CHRNB2* に異常が見つかっている。しかしながらこの 2 つに異常が見られたのは ADNFLE 家系の約 10%であり、欧米の大家系では、ほとんどの家系この 2 つに連鎖がないことが報告されている。また、2012 年に全エクソーム解析にて重度の発達遅滞を呈する ADNFLE 家系発端者で、カリウムチャネルを構成する *KCNT1* 遺伝子に変異が報告されたが対象患者が重度の発達遅滞を合併した児であり、*KCNT1* は同時に乳児悪性焦点移動性部分発作患者でも全エクソーム解析で同定された。ADNFLE は遺伝子異常が同定された最初の非器質性てんかんでありながら、その他の責任遺伝子は不明であり分子病態の理解が困難な疾患である。

我々は、これまで ADNFLE の 5 家系と NFLE の 20 家系の発端者 25 名に対して *CHRNA4, CHRNA2, CHRNB2* に対してサンガーシークエンス法と MLPA 法で変異を探索した。結果、ADNFLE の 1 家系に対して *CHRNB2* に V286L 変異を同定した。また、*KCNT1* 変異も探索したが変異はみられなかった。そこで、ゲノム支援より孤発発症の典型的な NFLE 発端者 10 名に対して、エクソーム解析で責任遺伝子を同定することをも目的とした。

＜支援の内容＞

睡眠に関連した発作を特徴とする夜間前頭葉てんかん（Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy: NFLE）の病態解明に向けて、責任遺伝子を同定すべく次世代シークエンサーでのエクソーム解析を実施する支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

既知の遺伝子に変異を持たない孤発発症 NFLE 発端者のうち典型的臨床経過を呈しカルバマゼピンに反応良好であった 10 名に対してエクソームシークエンスを実施している。現在までに 9 名のシークエンスが終了し、現在残り 1 名のシークエンス中である。シークエンス終了後、全バリアントからアミノ酸置換を伴う新規の変異かつ中枢神経発現遺伝子でフィルタリングし候補遺伝子を絞り込む。残りの 14 家系においてサンガー法にて候補遺伝子の変異の有無と臨床症状との分布を確認し遺伝子を同定する。また、他の部分てんかんにおいても変異の有無を確認することにより NFLE の責任遺伝子であることを立証する。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後、データ解析により責任遺伝子同定が可能となれば、分子レベルでの病態解明が期待できる。また、同定した遺伝子に患者と同じ変異を導入したラットを作成し、既に作成済みの CHRNA4 遺伝子変異をもつラットと比較することにより、NFLE の病態と発症となるカスケードを同定し、新規治療薬の標的分子を探索する展望が拓ける。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2012-2013 年度

プロゲステロン抵抗性に着目した、早産の治療標的分子の検索

若手研究（A）

廣田 泰・東京大学医学部産婦人科

＜背景・目的＞

新生児の死亡や後障害の原因となる早産は難治性かつ反復性の疾患であることが知られており、医学が進歩した現代でも制御が困難である。世界では毎年 1300 万件の早産とそれに伴う 300 万件の死産が起こっていることや、年間 100 万件の新生児死亡のうちほぼ 30%が早産に起因したものであることは、この問題の深刻さを示している。早産の原因として感染・炎症、子宮の過伸展、子宮頸管の異常などが考えられているが詳細は未だ明らかでなく、現在の治療法は子宮収縮抑制剤や抗生剤などの対症的なアプローチに限定されている。このように、早産に対する新たな視点からの基礎研究の展開が緊急の課題である（Hirota Y, et al. Nat Med 2010）。

プロゲステロン（P）投与は副作用の少ない早産の予防法として、以前から行われてきた。早産高リスク群である子宮頸管短縮症例や反復早産症例においては P 投与の有効性が示されている（Meis PJ, et al. NEJM 2003; Fonseca EB, et al. NEJM 2007）。一方で早産の高リスク群である双胎では P 投与でも早産を防ぐことができない（Norman JE, et al. Lancet 2009）。早産のリスク因子によるPの有効性の違いやPが無効な症例（2～4 割は無効）の存在から、本研究者は、早産における P 応答遺伝子誘導能の低下した状態、いわゆる「P 抵抗性」という新しい概念を提起した（Hirota Y, et al. Nat Med 2010）。P が無効の症例では P 作用に対するより一層強い抵抗性が存在する可能性が推測される。

妊娠の場である子宮内膜は、エストロゲンと P という 2 つの卵巣ホルモンによって妊娠に適した状態になる。特に、P は哺乳動物において着床と妊娠の維持に必須で、「妊娠ホルモン」と呼ばれるほどである。また P は核内受容体である P 受容体（PR）を介して、排卵、着床、脱落膜化（妊娠に伴う子宮内膜間質細胞の分化）、妊娠維持に関わる遺伝子の転写を活性化するが、妊娠に重要な Pの作用経路には未だ不明な点が多い。ヒトでは妊娠初期は卵巣から、中期から後期は胎盤が Pの供給源となり、P 濃度は分娩まで徐々に増加する。ヒトでは分娩前の P 低下は起こらないが、機能的な P 作用の低下、つまり P 応答性遺伝子活性化の抑制が起こると考えられている。ヒトに PR 拮抗剤 RU486 を投与すると子宮頸管熟化（子宮頸部組織の軟化）と子宮収縮が誘発され分娩に至ることから、ヒト分娩における P-PR シグナル減弱の重要性が示唆される。

本研究では、妊娠維持や分娩に重要であるプロゲステロン・シグナルのターゲット遺伝子・蛋白を抽出するため、ヒト子宮内膜由来細胞の初代培養系を用いて、核内受容体であるプロゲステロン受容体 PR の転写調節領域を ChIP-seq および RNA-seq を用いて網羅的に検討することとした。

＜支援の内容＞

2012 年度の支援としては、ChIP-seq の解析を依頼した。

具体的な解析対象であるヒト初代培養系の細胞についての詳細を下記に述べる。まずコントロール（正常検体）として使用したヒト子宮内膜間質細胞は下記の①～④である。

①妊娠前の細胞＝非妊娠子宮（筋腫などの良性疾患で子宮全摘の手術検体）から分離培養したヒト子宮内膜間質細胞

②妊娠前期の細胞＝妊娠初期妊娠組織（妊娠初期の人工流産検体）から分離培養したヒト子宮内膜間質（脱落膜）細胞

③正期産で陣痛前の細胞＝陣痛発来前の選択的帝王切開手術（骨盤位（さかご）や帝王切開既往などの理由による帝王切開）の胎盤から分離培養した子宮内膜間質（脱落膜）細胞

④正期産で陣痛・経腟分娩後の細胞＝正期産・経腟分娩後の胎盤から分離培養した子宮内膜間質（脱落膜）細胞

また早産の検体としては、下記の⑤および⑥を用いた。

⑤早産で陣痛前の細胞＝陣痛発来前の選択的帝王切開の胎盤から分離培養した子宮内膜間質（脱落膜）細胞

⑥早産で陣痛・経腟分娩後の細胞＝早産・経腟分娩後の胎盤から分離培養した子宮内膜間質（脱落膜）細胞

妊娠時期、特に分娩前後での比較、および正常産と早産の比較によって、ヒト子宮内膜細胞の PR の転写調節領域の変化に着目した。前述のコントロールである妊娠の 4 つの時期および早産（経腟分娩・帝王切開）の各群において、個人から得られた細胞をプロゲステロンで刺激し、各細胞を用いて P 刺激有・無しの検体を用いて PR 抗体による ChIP-seq を行った。2012 年度は、上記 ChIP-seq 解析につき支援を受け、sequence データが得られた。

また同様の細胞検体を用いて P 刺激の有無でのトランスクリプトの変化を調べるために RNA-seq を行い、2013 年度は RNA-seq 解析についてのゲノム支援を受け、sequence データが得られた。

＜支援によって得られた研究成果＞

Sequence データは、その後の解析方法が難しく、ようやくデータ分析ソフトを手に入れ、大まかな道筋が得られた。一つは、P に対する反応性は、妊娠前後で変化が認められ、妊娠前の方は高く、妊娠後にはすでに P に対する反応遺伝子数は減っているというデータが得られた。今後は、その遺伝子の持つ機能と、P とその核内受容体が制御する遺伝子発現制御を結びつけるための、解析を行う予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今までの生殖研究分野において、妊娠経過を網羅的に解析したものはなく、今回の支援を受けたことによって、妊娠経過に伴う、プロゲステロン・シグナルのダイナミックな変化のデータベースが構築できるものと期待され、それをもとに分娩機転や、早産発症予防のマーカー探索等に利用できる可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし。

公募支援課題：2014 年度

子宮–胚間の協調的なエピゲノム調節と胚活性化

新学術領域研究

廣田 泰・東京大学医学部産婦人科

＜背景・目的＞

卵巣から排卵した卵子は卵管内で精子と受精した後卵割を行い、着床前期胚として卵管内で発育し、着床直前に子宮内に移入し、子宮による作用によって胚が活性化し着床能を獲得し、子宮への接着反応（attachment reaction）を開始し、着床によりさらにトロフェクトダームおよびICMの細胞分化が加速する。胚のエピゲノム変化として、着床を契機に胚のDNAメチル化がダイナミックに促進されることがわかっている。着床直前という、初期胚発生の後半の過程において、子宮 - 胚間の協調的な作用が重要と考えられているものの、その分子・細胞の作用メカニズムについては不明のままである。また、着床までの過程における胚自身の研究は進んでいるものの、子宮内の微小環境と胚発生という観点の研究はこれまで十分に行われてこなかった。齧歯類の研究から、初期胚の発生は子宮からの刺激がなければ胚盤胞の状態で休眠状態（dormancy）になって止まるが、エストロゲンの刺激を子宮が受けると、子宮内膜からの何らかの生理活性物質の分泌によって胚は活性化し、胚の接着反応が開始するという、胚盤胞活性化（activation）の機構が存在すると考えられている。本研究では、この胚の初期発生の最終段階に際して起こる「卵巣ホルモンによる子宮内膜の着床能の獲得→子宮内膜による胚盤胞活性化→子宮への胚の接着反応」の過程の分子メカニズムを、マウスを用いてエピゲノムの観点から検討し、子宮による着床に向けた初期胚活性化の分化調節機構の詳細の解明を目指す。子宮内という未だブラックボックスである微小環境で起こるエピゲノム変化が機能的にどのように胚着床と関わっているかについて明らかにする。

＜支援の内容＞

マウスの着床においては、腟栓を認めた日を day1 とすると、day2 から卵巣からのプロゲステロン（P_4）産生が増加し、P_4 の持続的な影響下に、day4 において子宮内膜の増殖能のダイナミックな変化（上皮増殖抑制・間質増殖亢進）がおこり、子宮が着床能を獲得する。そして卵巣由来の 17β エストラジオール（E_2）が一時的に増加し、この刺激によって子宮が反応し胚活性化の局面に入る。day4 夕に胚の活性化が起こり、EGFR 発現、β-catenin 活性化、FAK/PI3K 活性化が認められ、day4 深夜に子宮への接着反応が始まる。この中で、day4 朝の卵巣からの E2 シグナルが開始する前に卵巣除去し、一定の P4 をマウスに投与し続けることで、胚が休眠状態（dormant）を維持し続け、さらに E2 を投与することで着床が開始する（activation）着床遅延モデルが存在する。このモデルを用いて、遺伝子発現並びにヒストン修飾、DNA メチル化状態を網羅的に解析するために、以下のサンプルを用意し、2014 年度は、RNA-seq とヒストン修飾抗体の ChIP-seq、ならびに DNA メチル化抗体を用いた MedIP-seq の解析を依頼した。

① 休眠状態の胚盤胞（dormant blastocyst）
② 活性化状態の胚盤胞（activate blastocyst）
③ 着床不全を示すマウスの dormant blastocyst
④ 着床不全を示すマウスの activate blastocyst

を用意し、①と②に関しては、RNA-seq、H3K4 メチル化抗体あるいは、H3K27 メチル化抗体を用いた ChIP-seq、そして DNA メチル化に特異的に結合する mdm2 を用いた MedIP-seq の解析支援を受け、③と④に関しては、RNA-seq の解析支援を受け、sequence データが得られた。

＜支援によって得られた研究成果＞

Sequence データは、その後の解析方法が難しく、ようやくデータ分析ソフトを手に入れ、RNA-seq に関して①と②の解析を行ったところ、Dormant blastocyst に対し、Activate blastocyst で 2 倍以上発現が高かった遺伝子は 2000 遺伝子ほど、逆に 2 分の一以下に下がっていた遺伝子は 1000 遺伝子ほどであった。今後は、ヒストンのメチル化状態と、DNA メチル化状態との複合解析を行い、また着床不全マウスにおける Activate blastocyst における遺伝子変化も含めて、エピゲノム変化と着床における遺伝子の機能解析を行う予定である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

着床前期胚の発達の最終段階において、「着床能を持った子宮が胚を活性化し、子宮－胚間の相互作用によって着床が成立する」という概念は以前から提唱されてきたものの、その機構の詳細は未だ不明である。本研究では、初期胚発生の最終段階の過程を、P_4 により子宮が着床能を得る過程と、その子宮が胚を活性化する過程に分け、それに関わる胚側のエピゲノム変化を調べる。特に、胚盤胞の活性化の際に起こる、胚盤胞のエピゲノム変化について重点的に検討する。子宮内環境は胚の生育にとって重要といわれていたが、どのような機序で影響を受けているかは明らかでなかった。本研究は子宮内環境による胚のエピゲノム調節を明らかにするという独創的な研究であり、本研究によって母体（子宮）による初期胚発育に対する影響を明らかになれば、将来的に不妊症の原因解明だけではなく、胎児発育遅延や妊娠高血圧症候群などの妊娠中の合併症の解明、出生後の児生育との関連についての理解や生活習慣で起こる各種疾患の病因・病態の解明にまでつなげることができるかもしれない。

＜支援成果公表論文リスト＞

該当なし。

公募支援課題：2010~2012 年度

脳時計ニューロンにおける光シグナリングと概日リズム制御の分子解析(2010-2011)

基盤研究（Ｓ）

生存戦略としての体内時計システムの分子解剖(2012)

基盤研究（Ｓ）

深田 吉孝・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

睡眠覚醒リズムやホルモンリズムに代表されるように、さまざまな生理現象が約 24 時間周期の規則的な変動を示す。これらの概日リズムは、時計遺伝子の転写・翻訳に基づく負のフィードバックループからなる計時機構に基づいている。哺乳類の概日時計において中心的な役割を果たすのは、PAS-bHLH 型転写因子である時計タンパク質 CLOCK と BMAL1 であり、これらのヘテロ二量体がゲノム上の時計シスエレメントである CACGTG を主配列とする E-box に結合し、様々な臓器でそれぞれ多数の遺伝子の転写リズムを生み出す。分子時計の転写制御で重要な役割を果たす時計シスエレメントとしては、E-box のほかに D-box と RRE が知られており、これら三者の DNA シスエレメントはそれぞれ単独では互いに大きく異なる時刻に活性化され、互いに異なる位相で転写産物を作り出す。RRE 依存的な転写は、転写活性化因子 ROR と転写抑制因子 REV-ERB によって制御されている。最近、REV-ERB タンパク質に対する抗体を用いた ChIP-Seq 解析が行われ、この転写因子が一日の中でリズミックな DNA 結合プロファイルを示すことが明らかとなった。一方、D-box の転写は PAR-bZIP 型の転写因子である DBP、HLF および TEF によって活性化され、同じく bZIP 型の転写因子 E4BP4 により拮抗的に抑制される。しかし、これらの転写因子の DNA 結合リズムや他のシスエレメントとの相互作用は充分に理解されていない。E-box・D-box・RRE という 3 つの時計エレメントがそれぞれ独自の結合リズムを刻み、その総和（あるいはベクトル平均）として転写リズムが作られるのか、それともこれらのリズミックな結合リズムを生み出す転写因子の間で何らかの機能的な相互作用が存在するのかは不明である。

＜支援の内容＞

本研究は、ゲノムワイドに一日サイクルで時計シスエレメントに結合するタンパク質の状態を把握すると共に、上述した時計シスエレメントの間での相互作用の実体と結合タンパク質の時刻依存的なダイナミズムを浮き彫りにすることを目的とする。さらに、鍵となる時計タンパク質の特異的抗体を利用した ChIP-Seq 解析を行うとともに、野生型マウス及び時計遺伝子の変異マウスにおいて RNA-Seq 解析を遂行した。

＜支援によって得られた研究成果＞

2010 年から 2012 年の 3 年間にわたって「ゲノム支援」のサポートを受け、以下の成果を挙げた。まず、CLOCK に対する自作モノクローナル抗体を用いて ChIP-Seq 解析を行った。昼と夜の時刻においてマウスから肝臓を摘出し、解析対象とした。比較対象として、ChIP 実験前の試料(input)と共に control IgG を用いた ChIP 試料を調製した。さらに恒暗条件においたマウスから 3 時間ごとに、一日八つの時刻に肝臓を摘出し、同様の ChIP-Seq 解析を行った。これと並行して、各時刻の肝臓試料の一部から total mRNA を調製し、その mRNA 及び small RNA に対して RNA-Seq 解析を行った。このように正確に記述した全転写産物の発現プロファイルを CLOCK-ChIP-Seq の結果と比較解析することにより、CLOCK の一日にわたるリズミックな結合が生み出す転写リズムをゲノムワイドに解き明かし、原著論文として報告した。また、新しいバイオインフォマティクス技術 MOCCS を開発し、CLOCK が結合する E-box の配列特性を浮き彫りにすることができた。これらは、東京大学 大学院新領域創成科学研究科 鈴木穣 准教授との共同研究として超並列型シークエンサーを用いて配列決定し、東京大学 大学院理学系研究科 岩崎渉准教授との共同研究として *in silico* 解析を行った。

次に、これまで明らかになった E-box を介した転写リズムに加え、D-box を介した転写リズムの分子基盤と生理的意義に迫った。具体的には、まず D-box による直接的な制御分子を絞り込むために、D-box を介した転写を活性化する転写因子の一つである DBP に対する抗体を自作した。DBP は遺伝子近傍に E-box 配列を持ち、mRNA 量とタンパク質量の両方に顕著なリズム性を示すことを確認した。そこで、DBP タンパク質量の多い時刻と少ない時刻の 2 つの時刻においてマウスから肝臓を摘出し、DBP 抗体を用いた ChIP-Seq 解析を行った。この時、比較対象として、ChIP 実験前の試料(input)と共に control IgG を用いた ChIP 試料を調製した。ChIP-Seq 解析の結果、2,725 ヶ所の時刻特異的な DBP 結合部位を同定した。さらに、DBP が結合する DNA 領域の配列情報を利用して、D-box の認識配列を正確に記述することに成功した。この解析においては、E-box 配列の決定に利用した MOCCS 解析をさらにバージョンアップすることにより、これまで困難であった（６塩基より）長い塩基長の認識配列に適応する方法を確立した。今後、DNA 結合タンパク質（転写因子）の ChIP-Seq データからその認識配列を決定するツールとして大きな威力を発揮すると期待できる。一方、ChIP 解析に適応可能な E4BP4 抗体が自作出来たので、今後、この新しい E4BP4 抗体を用いた ChIP-Seq 解析に挑戦する。

このように、E-box と D-box の ChIP-Seq 解析や RNA-seq と並行し、E-box と D-box の機能欠損が概日時計の出力リズムに与える影響を解析した。この目的に向け、E-box の転写活性化因子 *Bmal1* の欠損マウスと D-box の転写抑制因子である *E4bp4* の欠損マウスを用いて RNA-Seq 解析を行った。この実験では、12 時間ずつの明暗サイクルで飼育したマウスから 6

時間ごと、一日の四時刻において肝臓を摘出し、total mRNA から調製した mRNA に対して RNA-Seq 解析を行った。時計遺伝子の *Bmal1* 欠損マウスでは、期待していたように E-box からの出力リズムに加えて数多くの遺伝子のリズム性に異常が見られた。これに対し、*E4bp4* 欠損マウスにおいては、時計遺伝子など、リズムの指標となる遺伝子産物には大きな異常が見られない一方で、200 を超える遺伝子の発現時刻プロファイルに顕著な変化が検出された。D-box のリズム出力としての重要性に迫る重要な基礎データと言える。

次世代シーケンサーを用いたこれまでの研究により、概日時計が生み出す RNA リズムの 7-8 割には転写そのものに明瞭なリズムが検出されないことが判明し、遺伝子発現リズムには転写後の制御が重要な役割を果たすことが明らかにされた。その分子メカニズムとして、miRNA による遺伝子発現制御や RNA のメチル化修飾などが提唱されているが、多様な RNA リズムの形成機構には、未だ多くの謎が残されている。申請者がこれまで推進してきた CLOCK-ChIP-Seq 解析および RNA-Seq 解析の比較から(i) A-to-I RNA 編集を触媒する酵素をコードする *Adar2* 遺伝子のイントロン領域に CLOCK が結合すること、ならびに(ii) CLOCK が *Adar2* 遺伝子をリズミックに発現制御していることを見出した。そこで本研究の後半では、リズミックな A-to-I RNA 編集部位を網羅的に同定することを目的として、これまでの RNA-Seq 解析と比べて合計のリード数を増やし、新たに RNA-Seq 解析を行った。この解析では、恒暗条件においたマウスから 4 時間ごとに、一日の 6 つの時刻に各時刻 2 個体から肝臓を摘出し、これらの試料の RNA-Seq 解析を行った。この RNA-Seq データを詳細に解析することにより、数多くの A-to-I RNA 編集部位においてその修飾効率に時刻依存性が見られることを明らかにした。その中には、コードするタンパク質のアミノ酸配列を変化させるような編集部位も含まれていた。さらに上記解析と並行して、*Adar2* 欠損マウスの肝臓を材料とした RNA-Seq 解析を同条件で行った。その結果、リズミックな RNA 編集部位の大部分が ADAR2 依存的な RNA 編集であることを見出した。驚くべきことに、*Adar2* 欠損マウスにおいては、数多くの遺伝子発現リズムが消失あるいは減弱しており、*Adar2* が数多くの遺伝子発現リズムを生み出す鍵分子であることを明らかにした。一方、*Adar2* 欠損マウスにおいては CRY2 タンパク質が過剰蓄積し、その結果、マウスの輪回し行動リズムと遺伝子発現リズムの短周期化が観察された。この CRY2 のタンパク質量の減少には miRNA が強く関わり、*Adar2* 欠損マウスを用いた miRNA-Seq 解析においては、*Cry2* を標的とする miRNA の発現量が変化していることを見出した。この実験では、Adar2 欠損マウスとそのコントロールマウスより、一日の二つの時刻において各 2 個体より small RNA を調整して解析を行った。これらの結果、遺伝子発現リズムおよび概日時計の周期決定において ADAR2 が極めて重要な役割を担うことが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

マウスを正確な 12 時間毎の明暗サイクルで飼育する事により、さまざまな時刻の CLOCK 結合 DNA 配列を解析し、マウス肝臓ゲノムにおける CLOCK の結合領域を網羅的に決定した。この結合領域のほぼ全てにおいて、CLOCK の DNA 結合が概日リズム性を示すことを明らかにした。これに加え、同一試料から得られた total RNA に対して RNA-Seq 解析と small RNA-Seq 解析を行い、一日の中でリズミックに発現している mRNA と数多くの miRNA を同定した。概日時計の研究分野においては、たった一つの遺伝子の変異が個体の睡眠・活動リズムなどの生理現象に直結するという特徴がある。例えば、哺乳類で初めて発見された時計遺伝子 *Clock* は順遺伝学により同定されたが、この変異マウスでは行動リズムの周期が 28 時間に延びるという周期異常を示す。このように、時計遺伝子の変異は概日時計の周期に大きな影響を与えることが報告されている。しかし、単一遺伝子の変異によって完全にリズム性を消失する強い表現型を示す時計遺伝子は *Bmal1* のみである。そこで本研究では、全身の時計振動が停止している *Bmal1* 欠損マウスを用いて RNA-Seq 解析を行った。その結果、野生型で見られた時刻依存的な転写産物量の変動はほぼすべて消失することが判明した。一方、*E4bp4* 欠損マウスは、時計振動には大きな影響が見られず、時計出力の一部のみ完全に停止するという興味深い表現系を示すことが明らかとなった。*Bmal1* や *E4bp4* の欠損マウスは、成長障害、免疫疾患、あるいは突然死など、多様な病態を発症しており、本研究で得た基礎データはその疾病発症メカニズムに迫る切り口となり得る。

このように、「ゲノム支援」によるサポートを受けて ChIP-Seq 解析および RNA-Seq 解析を行うことにより、概日時計制御を受ける数多くの新規遺伝子を同定することができた。これらの遺伝子の機能は、代謝、血液循環、ガン、アポトーシス、細胞周期など、様々な生理現象や病態と密接に関連している。それらの生命現象と概日時計の関わりを分子レベルで解明することは、概日時計分野のみならず医学的応用の見地からも重要であり、我々の得た膨大なデータが重要なリソースになることは間違いない。

＜支援成果公表リスト＞

Yoshitane, H. et al., Mol. Cell. Biol., 34, 1776-1787 (2014)

公募支援課題：2011～2013 年度

環境オミクス手法による寒冷圏水界の微生物学的硫黄循環の解明

基盤研究（B）

福井 学・北海道大学低温科学研究所

＜背景・目的＞

生態系における硫黄循環は、炭素及び窒素を始めとする各種生体元素の循環とも密接に結びついた重要なプロセスである。自然環境下における生態系内での硫黄動態と、これに関与する微生物の生態については依然不明な点が多い。これまで、環境中の微生物を解析するための手法としてはメタゲノミクス等の DNA を対象としたものが主流となってきた。これらは強力な手法であるが、遺伝子の存在から示唆される潜在的な機能が実際に発現しているか否かについては別の方法による検証が必要となる。本研究では、メタゲノミクスとメタプロテオミクスと組み合わせた「環境オミクス手法」により、現場に存在する微生物群集の潜在的な能力と実際に機能している代謝経路を網羅的に解析することを試みた。ゲノム支援のもとでは、硫黄循環の卓越する単純なモデル系として、硝酸蓄積硫黄酸化細菌とその付着菌からなる集合体の解析を行った。硝酸蓄積硫黄酸化細菌は、バクテリアとしては非常に大きな体サイズを持ち、その表面には特定の付着菌が生息している。これらの付着菌と硫黄酸化細菌の間にはなんらかの相互作用が存在すると予想される。

＜支援の内容＞

硝酸蓄積硫黄酸化細菌のなかで唯一の淡水種である *Thioploca ingrica* とその付着菌からなる複合体の解析を実施した。複合体のメタゲノム解析によって、そこに含まれる微生物群の構成を明らかにするとともに、*Thioploca ingrica* および主要付着菌のゲノム再構成を試みた。淡水湖沼の底泥堆積物中から採取した試料より DNA を抽出し、ゲノム支援のもとでメタゲノム解析を実施した。シーケンスデータの取得、アセンブル、PCR によるギャップクローズ、アノテーション、遺伝子の機能分類、代謝マップとの対応付け、近縁種との比較、系統解析等の総合的な支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

メタゲノム解析の結果、解析対象とする微生物複合体が *Thioploca ingrica* と特定の付着菌から構成されていることが確認された。取得したメタゲノムデータをもとに、*Thioploca ingrica* の完全ゲノムを再構築することに成功し、さらに主要な付着菌のドラフトゲノムを得た。

Thioploca のゲノムを解析した結果、海産の近縁種で推定されていたものと同様の硫黄酸化経路や炭酸固定経路を有していることが明らかになった。また、硝酸から分子状窒素への完全な脱窒を行うための遺伝子が全て揃っていることが明らかとなった。一方で、海産の近縁種で知られている硝酸のアンモニアへの異化的還元に必要とされる遺伝子を有していないことが確認された。その他、窒素固定やリン代謝、浸透圧調製等に関わる遺伝子の存在が確認された。

Thioploca ingrica の主要付着菌が持つ機能が、海産近縁種の付着菌と共通するか否かをドラフトゲノムから推定した。付着菌のゲノムからは、異化的硫酸還元、嫌気的アンモニア酸化といった機能に関与する遺伝子は見出されず、*Thioploca ingrica* との相互作用の機構は海洋でのケースと全く異なっていることが強く示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援によって得られたゲノム情報を用いることによって、*Thioploca ingrica* のプロテオーム解析が可能となった。ゲノム解析に供したものと同様に準備した試料から抽出したタンパク質を電気泳動と HPLC によって分離し、質量分析によってマススペクトルデータを取得した。支援によって得られた *Thioploca* ゲノムから構築したデータベースを参照することで、*Thioploca* が現場において発現していたタンパク質の同定が可能となった。検出されたタンパク質は実際に発現していたものの一部であることが示唆されたが、硫黄酸化、硝酸呼吸、無機炭酸固定等に関わる酵素群は高頻度で検出された。これにより、ゲノム解析とプロテオーム解析の組み合わせが環境中の微生物、特に培養不能な微生物の環境中での機能を推定するうえで有効な手段であることが示された。

また、大型硫黄酸化細菌と付着菌の緊密な関係性が再確認された一方で、近縁種で提唱されている無機硫黄化合物やアンモニアを介した共生関係が成立していないことを示唆する結果が双方のゲノムから得られた。付着菌が生合成系の一部を欠き、硫黄酸化細菌に依存している可能性も示され、従来の知見からは予期し得なかった新たな観点から硫黄酸化細菌と付着菌の関係を捉えなおす契機となった。

Thioploca ingrica とその近縁種は、細胞内に高濃度の硝酸イオンを蓄積するという際立った特徴を持つ。この機能を持つ硫黄酸化細菌は、水界の物質循環に大きな影響を及ぼしていることが明らかとなっているが、全て未培養あり詳細な研究が妨げられている。支援の成果である *Thioploca* のゲノムは、このグループでは初めて得られた完全ゲノムである。これにより、未だに明らかとなっていない硝酸イオン蓄積機構の解明のために重要な手掛かりが提供された。

＜支援成果公表リスト＞

Kojima, H. et al., The ISME Journal, 9, 1166-1176 (2015)

公募支援課題：2010～2011 年度

デジタル遺伝子発現解析による微細藻類の CO_2 濃縮･水素発生関連遺伝子の同定と利用

基盤研究（B）

福澤 秀哉・京都大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

本研究では、微細藻類を用いたバイオ燃料や有用物質生産の需要が高まっている背景を受け、デンプンや脂肪酸の合成を律速する最大の要因である細胞内への CO_2 濃縮能の制御機構の解明と強化、有用物質生産の生産力強化を目指した遺伝子ソースの探索を目標とする。

＜支援の内容＞

本支援では、CO_2 濃縮関連遺伝子（CO_2 輸送体遺伝子・調節因子等）の網羅的同定に必要な、様々な環境ストレス条件下における RNA 発現データの取得ならびにゲノムのドラフト配列の取得を依頼した。

細胞の培養環境のなかでも CO_2 濃度の変動に対する緑藻ゲノムの発現応答を、RNA-seq データと完全長 cDNA を取得し、その発現情報をゲノムデータベース Kyoto Chlamydomonas Genome Database (KCGD)を構築した。特に、野生型 C9 株および CO_2 濃縮機構のマスター制御因子 CCM1 の変異株、さらにその変異相補株について（１）高 CO_2 濃度で培養した場合、（２）高 CO_2 濃度で培養した後、低 CO_2 ストレスに移して 20 分後、1 時間後、2 時間後、4 時間後、6 時間後の RNA-seq データを取得した。また C9 株において他の環境因子（光, N 源, S 源、P 源）のストレス前条件とそれぞれのストレス条件下（光については強光）で培養した細胞について RNA-seq データ（データポイントごとに約 1,000-2,000 万リード）を取得し、ストレス処理によって発現のレベルが変化する遺伝子（モデル）の情報を得た。

米国 JGI による緑藻クラミドモナスのゲノム解析に用いられた CC-503 株（雌型：Merchant et al Science 318: 245-250 (2007)）は、日本の多くの研究者が利用している野生株 C9（雄型：mating-type minus strain）と比べて多くの塩基配列の違いが含まれている事が判明したため、C9 の全ゲノムの再シーケンスが必要になった。まず、予備的に 5 種類の BAC クローンに対して 454 にてシーケンス解析を行い、GC リッチな緑藻ゲノムもアセンブルが可能であることを確認した。次に、緑藻クラミドモナス C-９株の 120 Mbp のゲノムを、454 で再シーケンスし、CC-503 株をレファレンスゲノムとしてアセンブルした。

＜支援によって得られた研究成果＞

取得された RNA-seq データの一部をクラミドモナス遺伝子発現データベース（KCGD）に統合し、公開した。これにより、 (1)CO_2 欠乏により誘導/抑制される遺伝子群、(2) 窒素欠乏条件したで誘導/抑制される遺伝子群、(3)環境中の CO_2 濃度及び窒素濃度の変化の情報を遺伝子の発現制御に伝達するメカニズム、(4)水素発生を行う培養条件で発現する遺伝子、等を解析する基盤が構築された。実際にこれらの情報を利用することで、細胞膜に局在する無機炭素輸送に関わる因子 LCI1（Ohnishi et al. 2010）、光と CO_2 に依存して葉緑体内を移動する CCM に必須な因子 LCIB（Yamano et al. 2010, 2014）、CCM のマスターレギュレータ CCM1 のオルソログ因子（Yamano et al. 2011）、CCM を制御する新規調節因子 CAS（Wang et al. 2014）、窒素欠乏条件においてトリアシルグリセロール蓄積を制御する因子 TAR1（Kajikawa et al. 2015）、CCM における重炭酸イオン輸送体 HLA3 と LCIA（Yamano et al. 2015）の発見につながった。

454 を用いて得られたゲノム配列は、35,699 種類のコンティグから構成されており、96.4MB をカバーしていた。これはクラミドモナスのゲノム 111.1MB の 86.7%に相当する。ペアエンドシーケンスの配列情報を元に、ギャップ配列を含めて連結し、13,032 種類の Scaffold 配列を取得した。100 Mb を超える真核微生物（特に光合成生物の代表である緑藻クラミドモナス、ボルボックス、クロレラ）については、いまだにドラフトゲノム状態であり、紅藻シゾンを除いて完全解読された例はない。今回、再シーケンスを支援していただいたクラミドモナス野生株（C-9 株）は、緑藻の世界標準株にもなっており、微細藻類の遺伝情報解析の基準となることが期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで、遺伝子をコードしているとは予想されていなかったゲノム領域に新規な遺伝子が多数存在し、環境変化に応答して発現調節を受けていることが明らかになりつつある。このことは、従来の限られたゲノムアノテーションによる遺伝子予測にとらわれない、ストレス誘導性の新規な遺伝子の発見につながることを示している。

＜支援成果公表リスト＞

Ohnishi et al. Plant Cell 22: 3105-3117 (2010)
Yamano et al. Plant Cell Phys. 51: 1453-1468 (2010)
Yamano et al. Photosynth Res. 109: 151-159 (2011)
Matsuo et al. Plant Cell Phys. 52: 333-343 (2011)
Fukuzawa et al. Advances in Photosynthesis and Respiration 34: 625-650 (2012)
福澤秀哉他 光合成研究 22: 174-184 (2012)
Yamano et al. Photosynth Res. 121: 193-200 (2014)
Wang et al. Photosynth Res. 121: 175-184 (2014)
Kajikawa et el. PLoS ONE 10:e0120446 (2015)
Kajikawa et al. Plant Phys. 168: 752-764 (2015)
Yamano et al. PNAS 112: 7315-7320 (2015)

公募支援課題：2011 年度

がんにおけるＤＮＡ高度メチル化を指標としたバイオマーカーの探索

被災地対応

福重 真一・東北大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

がんにおける DNA メチル化とそれによって転写抑制される遺伝子の探索は、腫瘍形成過程の分子レベルでの理解に重要なだけでなく、これらの遺伝子が、がんにおける１）リスク評価、２）早期診断、３）予後予測、４）治療時の遺伝子再発現の観察などバイオマーカーとして利用できる可能性をもつため、がんの診断・治療にとって重要な課題となっている。我々は、がんにおいて DNA メチル化により転写抑制された遺伝子を網羅的に探索するため、メチル化遺伝子を特異的に転写再活性化する MeTA（methyl-CpG targeted transcriptional activation）法を開発した。MeTA 法ではメチル CpG 結合蛋白の構成要素であるメチル CpG 結合ドメイン（MBD）に転写因子 NFκB の転写活性化ドメイン（AD）を繋いだ融合遺伝子 FLAG-NFκB(AD)-MBD を細胞内に導入し、メチル化遺伝子の再活性化を引き起こす。MeTA 法により転写抑制されたメチル化遺伝子を高効率で探索できるだけでなく、一般的な方法では見落とされていたメチル化遺伝子を探し出すことが可能となった。本研究では MeTA 法と遺伝子発現マイクロアレイを組み合わせることによってがん細胞において高度にメチル化した CpG island、およびその制御下にある遺伝子を見つけ出し、バイオマーカーとしての可能性やがんへの関与を検討することを目的とした。

＜支援の内容＞

本支援では、MeTA 法を実施したヒト胎児腎細胞株 293T を用いて FLAG 抗体による ChIP-Seq をおこない、FLAG-NFκB(AD)-MBD 蛋白がどの遺伝子のどの領域に結合しているのかを検討して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

以前の遺伝子発現マイクロアレイの研究により 293T 細胞で MeTA 法によりベクタートランスフェクションに比べ 5 倍以上発現が上昇する遺伝子は計 137 あった。このうち ChIP-Seq により FLAG-NFκB(AD)-MBD 蛋白が結合していた遺伝子は 128（93.4%）であった。また、128 遺伝子中 112 遺伝子（87.5%）で転写開始点から 1kb 以内に結合していることが判明し、全体の 81.8%（112/137）の遺伝子では FLAG-NFκB(AD)-MBD 蛋白の転写開始点周辺への結合がメチル化遺伝子の転写再活性化に重要な働きをしていると考えられた。また、FLAG-NFκB(AD)-MBD 蛋白が結合した 112 遺伝子のうち 99 遺伝子(88.4%)が CpG アイランドを含むことから MBD はこの領域を目がけて結合するものと考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援が得られるまでは、MeTA 法により転写再活性化した遺伝子を遺伝子発現マイクロアレイによりスクリーニングし、がん細胞株や手術切除標本を用いプロモーター領域のメチル化や遺伝子発現について解析をおこなっていたが、実際に転写再活性化を引き起こすと考えられる蛋白がゲノム上のどこに結合しその威力を発揮するのかこれまで良くわからなかった。本支援により FLAG-NFκB (AD)-MBD 蛋白の結合部位や結合配列が明らかになり、これらの情報と MeTA 法による転写再活性化を結びつけて考えることができるようになった。

また、同時にこれらの結果は、本来、メチル CpG 結合蛋白のゲノム上の結合部位を示す可能性が高く、その結合部位における特性やがんにおけるメチル CpG 結合蛋白の役割の解明にも大きく寄与する可能性をもつと考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2012 年度

挿入的クロマチン免疫沈降法によるエピジェネティック制御機構の解明

新学術領域研究

藤井 穂高・大阪大学微生物病研究所

＜背景・目的＞

エピジェネティクス制御の分子機構の解明には、エピジェネティック制御を受けているゲノム領域の生化学的・分子生物学的解析が欠かせない。そのためには当該ゲノム領域の生化学的単離が必要である。申請者らは、これを実現するため、生体内のクロマチン構造を保持したまま特定のゲノム領域を単離する新規な方法として、挿入的クロマチン免疫沈降法（insertional chromatin immunoprecipitation: iChIP）を開発した。本研究提案では、iChIP 法を用いて、エピジェネティック機序によって制御されている特定ゲノム領域を単離して分子生物学・生化学的解析を行う際の方法論を確立するとともに、モデル系を用いてエピジェネティック制御機構の解明を目指す。モデルとして、(1) ゲノム上の異なった領域間の「しきり」として働くインスレーター領域に結合している分子の網羅的同定とその機能解析、(2) B 細胞分化誘導とその維持に重要な役割を果たしている *Pax5*遺伝子発現調節に関わるエンハンサーの網羅的同定とその機能解析、を行う。

＜支援の内容＞

1. *Pax5* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域の同定

ニワトリ（*Gallus gallus*)の B 細胞株である DT40 細胞の *Pax5* 遺伝子の転写開始点近傍に LexA の認識配列を挿入した細胞を樹立した。この細胞に、FLAG タグ付き LexA 蛋白質である 3xFNLDD を発現した。この細胞（3xFNLDD: LexA-Pax5 (B)）での Pax5 蛋白・mRNA の発現は野生型 DT40 細胞と同等であり、この細胞を用いて、iChIP-Seq 法により、*Pax5* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域を同定した。実際には、この操作は抗 FLAG 抗体による ChIP-seq 解析である。陰性対照として、3xFNLDD のみを発現させた細胞株、3xFNLDD: LexA-Pax5 (B) 細胞に、転写因子 C/EBPβを発現させることによりマクロファージ様に分化させた細胞株 3xFNLDD: LexA-Pax5 (M) 及び、偶発的に B 細胞の形質を失った 3xFNLDD: LexA-Pax5 (N) を用いた。

1 回目の解析では、
(1) 3xFNLDD 発現細胞株; (2) 3xFNLDD: LexA-Pax5 (B)
の 2 種類を解析した。

2 回目の解析では、
(1) 3xFNLDD 発現細胞株; (2) 3xFNLDD: LexA-Pax5 (B)
(3) 3xFNLDD: LexA-Pax5 (M); (4) 3xFNLDD: LexA-Pax5 (N)
の 4 種類を解析した。

こうした解析によって、B 細胞特異的に *Pax5* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域が同定した。

2. *Pax5* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用している RNA の同定

(1) 3xFNLDD 発現細胞株; (2) 3xFNLDD: LexA-Pax5 (B)
を用いて *Pax5*遺伝子転写開始点近傍と相互作用している RNA を同定した。具体的には、iChIP 操作後に、クロスリンクを解除し、RNA を精製して、逆転写反応後、RNA-seq を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

1. *Pax5* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域の同定

支援により、*Pax5*遺伝子転写開始点近傍と B 細胞特異的に相互作用している多数のゲノム領域の同定に成功した。加えて、その領域を CRISPR 系を用いて欠失させると、*Pax5* 遺伝子発現が減弱することを見出した。この結果は、この領域が *Pax5*遺伝子発現の制御に重要であることを示唆するものである。今後、ゲノム間相互作用による遺伝子発現制御機構の解明が期待される。

2. *Pax5* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用している RNA の同定

支援により、*Pax5*遺伝子転写開始点近傍と B 細胞特異的に相互作用している RNA の同定に成功した。現在、その RNA が、*Pax5*遺伝子発現に果たす役割を、shRNA によるノックダウン実験等によって解析している。今後、RNA による遺伝子発現調節の新しい機構が明らかにされることが期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援により、iChIP-Seq 法が、ゲノム領域か相互作用の検出に利用可能であることが示された。ゲノム領域間の相互作用が作り出す核内三次元構造の解明は、ゲノムプロジェクト・ENCODE プロジェクトに次ぐ、米国 NIH の次期重点プロジェクトとなっていることもあり、今後の飛躍的な発展が期待される分野である。iChIP-Seq 法は、そのための必要不可欠な基盤技術であり、そうした基盤技術が日本で生み出されたことの意義は大きい。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2013 年度

挿入的クロマチン免疫沈降法（iChIP）による細胞分化制御因子の転写機構の解明

新学術領域研究

藤井 穂高・大阪大学微生物病研究所

＜背景・目的＞

転写制御の分子機構の解明には、転写制御を受けているゲノム領域の生化学的・分子生物学的解析が欠かせない。そのためには当該ゲノム領域の生化学的単離が必要である。申請者らは、これを実現するため、生体内のクロマチン構造を保持したまま特定のゲノム領域を単離する新規な方法として、挿入的クロマチン免疫沈降法（insertional chromatin immunoprecipitation: iChIP）を開発した（*J. Biosci. Bioeng.*, 2009; 日本・米国特許成立見込み）。本研究提案では、iChIP 法を用いて、転写制御を受けている特定ゲノム領域を単離して分子生物学・生化学的解析を行う際の方法論を確立するとともに、これを用いて転写制御機構の解明を目指す。

＜支援の内容＞

1. *Foxp3* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域の同定

マウス（*Mus musculus*）の C57BL/6 個体で、*Foxp3* 遺伝子の転写開始点近傍に LexA BE を挿入したラインを樹立した。このマウスと、3xFNLDD を発現させたトランスジェニックマウスを交配させて、iChIP 解析用のマウスを作製した。このマウスから T-reg と、対照細胞としてナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、iChIP-Seq 解析を行った。その 2 種類について iChIP-Seq 解析を行った。

2. enChIP-Seq 解析によるゲノム領域間相互作用の検出

ヒト繊維肉腫細胞 HT1080 を用いて、IFNγ誘導遺伝子である *IRF-1* 遺伝子座と相互作用するゲノム領域を enChIP-Seq 法を用いて同定し、IFNγ刺激の有無により比較した。また、ヒト赤白血病細胞 K562 を用いて、βグロビン遺伝子座の 5'HS5 遺伝子座と相互作用するゲノム領域を enChIP-Seq 法を用いて同定し、酪酸刺激による分化の有無によって比較した。

＜支援によって得られた研究成果＞

1. *Foxp3* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域の同定

支援により iChIP-Seq 解析を行ったが、用いた E4P4-3xFNLDD Tg では、T-reg での 3xFNLDD 蛋白質の発現が弱く、十分強いシグナルを得ることができなかった。そこで、組換え 3xFNLDD 蛋白質を用いた *in vitro* iChIP 法、もしくは、T-reg 内でも十分な 3xFNLDD の発現がある CAG-3xFNLDD Tg を用いて再び iChIP-Seq 解析を行う予定である。

2. enChIP-Seq 解析によるゲノム領域間相互作用の検出

支援により enChIP-Seq 解析によってゲノム領域間相互作用が検出できることを示した。これによって、ゲノム領域間相互作用の検出が他の方法を用いるよりも極めて簡単にできるようになった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援によって、ゲノム領域間相互作用を信頼度が高く同定できる新しい方法 iChIP-Seq 法/enChIP-Seq 法を開発することができた。近年、ゲノム領域間相互作用がゲノム機能発現調節に重要な役割を果たす可能性が示唆されており、iChIP-Seq 法/enChIP-Seq 法は、今後、ゲノム領域間相互作用を同定するための標準的な方法になることが期待される。従って、生命科学の様々な領域に与えるインパクトは極めて大きいと考える。

＜支援成果公表リスト＞

Fujita, T. et al., bioRxiv, 036160 (2016)

公募支援課題：2015 年度

遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法による細胞分化制御因子の転写機構の解明

新学術領域研究

藤井 穂高・大阪大学微生物病研究所

＜背景・目的＞

申請者らは、生体内のクロマチン構造を保持したまま特定のゲノム領域を単離する新規方法として、insertional chromatin immunoprecipitation (iChIP) 法及び engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法からなる遺伝子座特異的 ChIP 法を開発した。そして、遺伝子座特異的 ChIP 法と次世代シークエンス法を組み合わせることにより（iChIP-Seq/enChIP-Seq 解析）、特定ゲノム領域と相互作用する他のゲノム領域の網羅的同定に成功した。本研究提案では、iChIP-Seq 法と enChIP-Seq 法を用いて、解析対象ゲノム領域と相互作用する他のゲノム領域を網羅的に同定し、ゲノム領域間相互作用がゲノム機能発現調節に果たす役割を解析する。こうした解析により、ゲノム領域間相互作用の同定法を確立するとともに、ゲノム機能発現調節の分子機構の解明を狙う。

＜支援の内容＞

1. *Foxp3* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域の同定

マウス（*Mus musculus*）の C57BL/6 個体で、*Foxp3* 遺伝子の転写開始点近傍に LexA BE を挿入したラインを樹立した。このマウスから T-reg と、対照細胞としてナイーブ CD4 陽性 T 細胞を単離し、組換えタグ付き LexA 蛋白質を用いた *in vitro* iChIP-Seq 解析を行った。対照として、野生型 C57BL/6 個体からも T-reg とナイーブ CD4 陽性細胞とを単離し、*in vitro* iChIP-Seq 解析を行った。*in vitro* iChIP-Seq 解析に用いる細胞は、input を入れると 8 点であった。

2. 不活性化 X 染色体に結合する RNA の網羅的探索

上記で作成した *Foxp3* 遺伝子プロモーター領域に LexA BE を挿入したマウスと、X 染色体に GFP 遺伝子を組み込んだマウスを交配して生まれたメスの個体では、GFP 陽性細胞では、LexA BE が組み込まれた X 染色体は不活性化されている一方、GFP 陰性細胞では、LexA BE が組み込まれた X 染色体は活性化状態にある。この系を利用して、X 染色体の活性化状態が異なる細胞集団を単離して、*in vitro* iChIP-RNA-Seq 解析を行い、不活性化 X 染色体特異的に結合している RNA を網羅的に同定する。

3. 3xFLAG-dCas9 Tg マウスを用いた enChIP 法による転写機構の解析

CAG プロモーターを用いて、全身の細胞で 3xFLAG-dCas9 トランスジーンがゲノム中に挿入されている Tg マウスを作製する。次いで、様々な組織由来の細胞を単離して、これに各細胞で発現している遺伝子プロモーター領域に対する gRNA を、レトロウイルスベクター発現系を用いて発現させる。こうして樹立した細胞を用いた enChIP-Seq 解析を行う。各遺伝子について、少なくとも 2 種類の gRNA を用い、gRNA を発現させていない対照細胞が必要であり、少なくとも 2 種類の組織について行って組織特異的な相互作用を検出するため、1 セットで 3 種類 x 2 = 6 種類の細胞を用いる。解析に用いる遺伝子は 1 – 3 種類程度を想定していることから、合計で 6 – 18 種類程度（input を入れると 12 – 36 種類程度）になる。

＜支援によって得られた研究成果＞

1. *Foxp3* 遺伝子転写開始点近傍と相互作用しているゲノム領域の同定

支援の結果、T-reg 特異的に *Foxp3* 遺伝子プロモーターと相互作用するゲノム領域の網羅的同定に成功した。

2. 不活性化 X 染色体に結合する RNA の網羅的探索

2 点のサンプルを送付したが、量が希少であったため、マウスの匹数を増やして再試行する予定である。

3. 3xFLAG-dCas9 Tg マウスを用いた enChIP 法による転写機構の解析

トランスジェニックマウスの作製に時間を要したため、2016 年 1 月 24 日現在では、サンプルを送付していない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

T-reg 特異的に *Foxp3* 遺伝子プロモーターと相互作用するゲノム領域の網羅的同定に成功したことにより、*Foxp3* 遺伝子の発現調節機構に関する新しい知見がもたらされる。加えて、特定の遺伝子座だけでなく、ゲノム DNA が形成する核内三次元構造の決定とその生理的な意義の解明に向けて、重要な一歩が踏み出されたと考える。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2015 年度

in vitro enChIP 法の技術基盤の確立およびゲノム機能解析への応用

基盤研究（C）

藤田 敏次・大阪大学微生物病研究所

＜背景・目的＞

ゲノム上では、転写をはじめとする様々なゲノム機能が遺伝子座特異的に制御されている。興味対象とするゲノム領域におけるゲノム機能の分子機構を解明するには、細胞内において当該ゲノム領域に結合している分子を網羅的に同定することが理想的である。そこで、申請者らは、任意の塩基配列に結合できる人工 DNA 結合分子を細胞内で発現させ、それが結合する解析対象ゲノム領域を細胞から単離する方法として engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) 法を開発してきた。単離したゲノム領域に結合している分子を質量分析法や次世代シーケンス解析などで網羅的に同定することで、当該ゲノム領域が有するゲノム機能の分子機構を解明することができる。

本研究では、enChIP 法の発展的方法論として、人工 DNA 結合分子の細胞内での発現を必要としない、*in vitro* enChIP 法の技術基盤を確立する。さらに、本方法論を応用することで、遺伝子発現制御機構の分子機構を解明する。

＜支援の内容＞

本研究では、まず、CRISPR 系を利用した *in vitro* enChIP 法の技術基盤を確立する。具体的には、より効率がよく、また、より汎用性の高い方法論にするため、実験系の最適化を進めながら、解析対象ゲノム領域（*IRF-1* 遺伝子プロモーター領域）を特異的に単離できる実験手法を確立する。実験手法が確立された後、以下の研究支援を依頼する。

(1) 近年、エンハンサー領域や遺伝子座制御領域といったゲノム領域が、遠方の遺伝子プロモーター領域と相互作用することで遺伝子発現を制御することが知られている。例えば、グロビン遺伝子群発現制御領域 HS が、遠方のグロビン遺伝子群などと相互作用することで遺伝子発現を制御することが知られている。そこで、*in vitro* enChIP 法を利用して、解析対象とするゲノム領域を単離した後、当該ゲノム領域と相互作用しているゲノム領域を次世代シーケンス解析（*in vitro* ChIP-Seq）で同定する。

(2) 近年、ノンコーディング RNA を含む RNA が遺伝子発現制御に関与することが報告されている。そこで、*in vitro* enChIP 法を利用して、解析対象とするゲノム領域を単離した後、当該ゲノム領域に結合している RNA を次世代シーケンス解析（*in vitro* enChIP-RNA-Seq）で同定する。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援によって本研究が達成される結果、*in vitro* enChIP 法が、ゲノム間・ゲノム内相互作用およびゲノム結合 RNA を同定するノンバイアス方法として広く利用されることが期待される。また、ゲノム全体に渡って結合分子の網羅的同定が行えるようになることで、“ゲノムインターラクトーム解析”の発展が期待できる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本方法論によってゲノム結合 RNA がノンバイアスに同定できるようになれば、今後、RNA を介した遺伝子発現制御機構の解明に本方法論が利用されるとともに、RNA を介した病態発症機構の解明やそれを標的とした新規治療薬の開発にもつながる。

＜支援成果公表リスト＞

なし（現時点）

公募支援課題：2010 年度

メリステム制御の基盤を支える植物幹細胞の不等分裂の分子機構の解明

特定領域研究

藤田 知道・北海道大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

植物の分裂組織（メリステム）は、幹細胞の増殖と分化のバランスにより制御されている。しかし、植物幹細胞が不等分裂により自己複製した娘幹細胞と分化した娘細胞を生み出す分子制御機構は、まだ多くの点で解明がすすんでいない。私たちは不等分裂の全行程が容易に観察できるヒメツリガネゴケの幹細胞に着目し、この過程に関わる因子を多数同定しており、これら因子と細胞周期制御因子、細胞骨格因子などとの関係を明らかにし、不等分裂が細胞周期の進行とともにどのように制御されているのかについて、研究をすすめている。

そこで本研究では、細胞周期制御因子であるサイクリン依存性キナーゼに着目し、このキナーゼが細胞周期進行と幹細胞の自己複製、分裂様式の制御にどのように関わっているのかを調べる。さらに私たちは、これまでの研究により、ヒメツリガネゴケの幹細胞の分裂様式が、植物ホルモンであるアブシジン酸(ABA)により、不等分裂から等分裂に切り替えられることを見出した。ABA 誘導性の等分裂の分子機構を解明し、不等分裂制御系との相違点を明らかにするとともに、分裂様式の切り替えの分子機構の解明を目指す。

＜支援の内容＞

ヒメツリガネゴケをストレスホルモンであるアブシジン酸（ABA）処理し、等分裂を誘導した。この過程、すなわち ABA 処理後各時点(0, 1, 3, 8, 24, 48 時間後、5 日後、10 日後)での遺伝子発現プロファイルを RNA-seq の支援を受け比較した。ABA 添加により細胞周期の制御や細胞極性の変化が生じていることがこれまでの細胞観察などから明らかにできていたので、これらの制御に関わる遺伝子の変動を網羅的に検討した。

また細胞周期進行に必須であり、細胞分裂や不等分裂制御に関わることが知られているサイクリン依存性キナーゼ CDKA の遺伝子破壊体と野生型において mRNA, small RNA の RNA-seq を行った。動物や酵母とは異なり、植物の cdka 遺伝子破壊体は致死とはならず、とりわけヒメツリガネゴケの cdka 遺伝子破壊体は通常培養条件下では外見上問題なく成長する。その一方で、高温などのストレス条件下では cdka 遺伝子破壊体の成長は野生型に比べて著しく阻害され、偏光屈性や細胞形態の異常といった細胞極性異常やストレス抵抗性異常など多面的な異常を示すことから、高温ストレス下における野生型と cdka 遺伝子破壊体の発現遺伝子の網羅的比較も行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

ABA 処理後の原糸体細胞における遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較することにより、既知の細胞周期制御因子の動態の全貌を把握でき、ABA 処理による細胞分裂様式の変動にどのようなしくみが関わっているのかを考察することが可能になった。一般には、ABA 処理により細胞周期の進行が阻害され、そのメカニズムとして、細胞周期阻害因子の発現が誘導されることが主要因だとされていた。しかし本研究では、予想に反して細胞周期制御に関わる遺伝子の多くは、細胞周期の進行阻害因子も含めて、いずれもダウンレギュレートされていることが明らかとなった。また ABA 処理後５日を過ぎたあたりからこれらの遺伝子発現が再び上昇することが確認できた。この応答は ABA 処理に対する細胞の馴化反応を見ているのかもしれず、今後 ABA 処理による遺伝子発現変動を解析していく上で、注意しておく必要がある。

また cdka の遺伝子破壊体は、通常培養下では野生型と区別なくほぼ健全な状態で成長する。このことと一致して、両者の発現遺伝子プロファイルはほとんど変わらないことがわかった。この一方で、高温ストレス処理による遺伝子発現の変化は cdka 遺伝子破壊体と野生株とでは異なることが明らかとなった。その中でも、代謝系の遺伝子群や熱ストレス応答遺伝子群、トランスポーター遺伝子群、細胞内輸送系に関与する遺伝子群などの発現が両者で異なっていることが明らかとなった。これらの結果より、CDKA は単に細胞周期の進行を司るだけでなく、ストレス依存的な情報伝達の制御にも関っていると考えられ、環境応答と細胞成長の恒常性のバランスを保つために CDKA が重要な役割を担っている可能性が考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ABA 処理時の RNA-seq の結果より、既知の細胞周期阻害因子はほとんどで発現が低下していることが明らかとなり、ABA 依存的な細胞周期の進行抑制制御は、未知の細胞周期阻害因子が存在するか、ABA 処理による細胞周期進行の阻害メカニズムに新たなしくみが存在する可能性が考えられ、少なくとも植物では、これまでに考えられてきた以上に複雑な細胞周期制御のしくみの存在とその発見の糸口が得られた。またこれまで CDKA は細胞周期制御のエンジンとして、細胞周期進行の鍵因子として認識されてきたが、本支援により CDKA は細胞周期の進行を司るだけでなく、ストレスなどの外部環境応答と細胞成長の恒常性のバランスを保つために重要な役割を担っていることが考えられ、そのネットワークの全貌解明への手がかりを得ることができた。

＜支援成果公表リスト＞

（論文発表準備中）

公募支援課題：2012 年度

メリステム制御の基盤を支える植物幹細胞の不等分裂の分子機構の解明

特定領域研究

藤田 知道・北海道大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

植物の分裂組織（メリステム）は、幹細胞の増殖と分化のバランスにより制御されている。しかし、植物幹細胞が不等分裂により自己複製した娘幹細胞と分化した娘細胞を生み出す分子制御機構は、まだ多くの点で解明がすすんでいない。私たちは不等分裂の全行程が容易に観察できるヒメツリガネゴケの幹細胞に着目し、この過程に関わる因子を多数同定しており、これら因子と細胞極性形成因子、細胞周期制御因子、細胞骨格因子などとの関係を明らかにし、不等分裂が細胞周期の進行とともにどのように制御されているのかについて、研究をすすめている。

本研究では、不等分裂する幹細胞において、過剰発現により等分裂を誘導できる遺伝子として単離してきたもののうち、特に等分裂誘導能や細胞の極性形成抑制能が高いと考えられる 2 種類の遺伝子に注目する。そしてこれらの過剰発現や機能抑制により不等分裂から等分裂を誘導する過程において、mRNA の変動と small RNA の変動を RNA-seq により調査し、これらに共通に変動する因子群の特定を目的とする。このような研究により、不等分裂から等分裂への切り替えや極性形成抑制に関わる現象が、どのような遺伝子ネットワークや遺伝子群をターゲットとしているのかを推定することが可能になると期待できる。またこれらに関わる共発現遺伝子群や低分子 RNA の同定を試みることで、このような制御に関わる新奇制御因子や低分子 RNA を見出すことが期待できる。

＜支援の内容＞

原糸体幹細胞の不等分裂から等分裂への頻度を上昇させる植物特異的転写因子(16o)の過剰発現体および機能抑制体における RNA-seq を行った。この転写因子を発現誘導してから 0, 6, 12, 24, 48 時間後、および機能抑制を誘導してから 0, 12, 48 時間後の発現変動転写物を網羅的に検討した。

また ABA 依存的に誘導される等分裂と類似した等分裂の誘導に関わる機能未知の細胞壁関連タンパク質(n1p)の過剰発現時（発現誘導後、0, 6, 12, 24, 48 時間後）の RNA-seq の支援を得た。

＜支援によって得られた研究成果＞

原糸体幹細胞の等分裂の頻度を上昇する転写因子 16o の過剰発現で 2 倍以上発現が上昇し、かつ機能抑制で 1/2 以下に発現が減少する遺伝子群を探索したところ、水チャネルをコードするアクアポリンや同族の MIP 遺伝子メンバーを同定することができた。これらの遺伝子産物は、幹細胞の液胞膜や細胞膜を介した水の出入りを制御することにより、細胞の浸透圧調整に関わっている可能性が高く、浸透圧調整の異常が、細胞サイズあるいは、細胞質や各種オルガネラの非対称分配の制御の異常につながっている可能性が考えられ、その結果、分裂様式が不等分裂から等分裂に変化するという可能性が考えられた。

また 16o の過剰発現により発現が 1/2 以下に減少し、16o の機能抑制で 2 倍以上発現が上昇する遺伝子群として、タンパク質の分泌制御や極性制御に関わる因子を同定することができた。

さらに 16o を過剰発現したときには、余り変化せず、この機能抑制で発現が 1/2 倍以下に減少したものとして、細胞壁の合成に関わる遺伝子群を同定することができた。幹細胞が不等分裂する際に、細胞の一部分が先端成長し、細胞の形を非対称に作り上げていくことが必要となる。16o は、このような過程における細胞壁形成の制御にも重要な役割を果たしていると考えられた。実際、16o の機能を抑制した細胞では、浸透圧に対する抵抗性が低下しており、今回の RNA-seq の結果より同定された遺伝子機能の低下から推測される表現型とよく一致していた。

また、ABA 依存的な等分裂の誘導に関わると考えられた細胞壁関連タンパク質 n1p の過剰発現により発現変動した遺伝子群を調べた結果、細胞極性制御に関わる LRR 型細胞膜キナーゼ遺伝子群、低分子量 G タンパク質遺伝子およびその活性化遺伝子群などの発現が影響を受けていた。さらに興味深いことに細胞壁の進展制御に関わるエクスパンシン遺伝子群の発現も変動していた。n1p タンパク質自体は、転写因子ではなく膜タンパク質であり、直接これらの遺伝子の発現調節は行っていないと考えられるが、間接的に細胞極性や細胞形態の制御遺伝子の発現調節に影響を与えることで、細胞の非対称性の確立に関与し、結果として不等分裂と等分裂の制御に関っているものと考えられた。

本支援でサポートいただいた small RNA の変動解析、また 1 回目の支援の結果をあわせた不等分裂過程における共発現遺伝子群の解析は、まだ結論を出すまでに至っておらず、今後の課題である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

幹細胞が不等分裂する過程で、細胞の非対称性を確立することは重要である。今回、16o 転写因子が、細胞の浸透圧を制御し、細胞の形を変化させるとともに、細胞極性と細胞壁の構成も制御し、不等分裂を制御している可能性が考えられた。不等分裂過程の重要な複数ステップを同時に制御している可能性のある転写因子を同定できた意義は大きい。現在、同定できた因子の不等分裂過程における機能解析を行い、本支援で得られた仮説の検証を進めている。

＜支援成果公表リスト＞

（論文発表準備中）

公募支援課題：2015 年度

メタゲノム法を用いた環境機能分子およびその生合成遺伝子の探索と解析

若手研究（A）

藤田 雅紀・北海道大学水産科学研究院

＜背景・目的＞
海洋無脊椎動物からはこれまでに数多くの医薬品候補となる生理活性物質が得られているが、その多くは微量成分であり、供給の問題から有効利用されていない。それら機能分子は無脊椎動物の共生微生物由来と考えられているが、膨大な種の共生菌が存在しており、その生産菌および生合成遺伝子も不明であり、また培養もできていない。
それら機能分子の生合成遺伝子の特定、生産菌の同定、さらにはゲノムの解析により、生産菌の分離培養につながる情報が得られると期待される。また、それは発酵による物質生産を可能とするものである。
そこで、抗ガン活性物質である mycalolide 類を含む熊本県天草産 *Mycale* 属海綿をモデルとして、本方法論を検討することとした。*Mycale* 属海綿の微生物群衆解析の結果、700 を超える菌種が見出された。一方、存在率上位 10 種程度で 98%以上を占めており、mycalolide 類の生産量から、本物質はそれら主要な共生菌により生産されると推測された。また、予備的なメタゲノム解析をしたところ、断片的ではあるが生合成遺伝子と推測される配列が見出された。
そこで、生合成遺伝子の全長の決定と、生産菌の同定、さらにはゲノム情報から代謝系に関する情報を得るため、*Mycale* 属海綿のメタゲノム解析を本支援により実施した。また、本方法論の一般性を確認するために、やはり抗ガン物質である eleutherobin 類を含む *Eleutehrobia* 属刺胞動物についてもメタゲノム解析を行った。

＜支援の内容＞
熊本県天草産の *Mycale* 属海綿および *Eleutherobia* 属軟サンゴから調製した共生細菌画分メタゲノムに対して、ライブラリの調整及び Illumina MiSeq 250 bp ペアエンドの条件にて、それぞれ 4 Gbp のリード取得の支援を受けた。
また、遺伝研スーパーコンピューターを用いた情報解析の講習および実際の利用の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞
Mycale 属海綿共生細菌メタゲノムから取得した約 4 Gbp のリードデータおよび、予備調査で取得していた 2 Gbp のデータを種々の条件でアセンブルしたところ、合計 131 Mbp のコンティグ（最大長 282 kbp, N50 1110 bp）を得た。それらに対して、二次代謝生合成遺伝子検出ツールである antiSMASH(http://antismash.secondarymetabolites.org/)による解析を行ったところ、予備調査で得られていた mycalolide 生合成遺伝子の候補配列に加え、生合成経路のほぼ全てを説明可能な全長約 120 kbp の生合成遺伝子配列を明らかにした。
得られた配列を詳細に検討した結果、生合成遺伝子はゲノム中で大きく二つに分割して存在している事が明らかになった。また、mycalolide は細胞毒性を有する最終産物として生合成されるのではなく、不活性な前駆体として生産され、その後必要に応じて活性化される、二段階の生産経路である事が示唆された。
さらに、生合成遺伝子の上流および下流の遺伝子の相同性、およびコンティグのカバー率やマッピングの結果から生産菌のものと推測される 16 S rRNA 配列の相同性から、生産共生細菌は存在率が約 5%程度の未解析なウェルコミクロビウム門細菌であることが強く示唆された。
一方、*Eleutherobia* 属刺胞動物共生細菌画分から取得したメタゲノムデータを同様にアセンブルした結果、最大で合計 329 Mbp のコンティグ（最大長 40.5 kbp, N50 247 bp）を得た。全般的に大きなコンティグを得ることができず、これはメタゲノム DNA 調製時に宿主ゲノムが混入したせいと考えられた。本方法論の適用拡大を検討するにあたって、共生細菌メタゲノム DNA の調製法に課題を残した。
しかしながら、得られたコンティグに対して、ターゲット物質である eleutherobin 類生産への関与が予測されるテルペン環化酵素・糖転移酵素の配列を指標に相同性検索をしたところ、短いコンティグではあったが多くのヒットを得た。現在、それら候補となるコンティグが一つの生合成遺伝子クラスターを形成するという情報までには至っていない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
これまで、*Mycale* 属海綿からの mycalolide 類生産菌の分離の試みはあったものの、生合成遺伝子が不明であったため、そもそも存在するのかどうかすら判断不能であった。本支援により、その生合成遺伝子が判明したため、それを指標に生産菌の培養可能性を検討する事ができる。また、今回得られたデータには生産菌のほぼ全てのゲノムデータが含まれているため、その詳細な解析により培養可能化につながる情報も得られると期待される。
さらには、生合成遺伝子クラスター全長あるいは一部をクローニングし、異宿主にて発現することで、化合物の全体、あるいは化学合成するうえでの重要中間体の生産が期待される。
一方、*Eleutherobia* 属刺胞動物メタゲノム解析の結果は、目的とした生合成遺伝子と断定するだけの情報を得ることはできていない。しかしながら、多くの候補断片配列を取得しており、情報科学的および実験的な解析を検討し、低品質検体からの生合成遺伝子検出法の開発を行う予定である。

＜支援成果公表リスト＞
該当なし

公募支援課題：2012～2013 年度

アブラナ科植物の雑種強勢の分子機構の解明を目指して

新学術領域研究

藤本 龍・新潟大学大学院自然科学研究科/神戸大学大学院農学研究科

＜背景・目的＞

動植物では、同一種内のある特定の組合せの両親間の交雑により得られた一代雑種（F_1）個体が、両親の特性よりも優れた形質を示す雑種強勢（ヘテローシス）という現象が知られている。『両親間のどのような相互作用によって、雑種強勢が誘導されるか』は生物学的に非常に興味深い現象である。また、雑種強勢は、動植物の育種改良（収量増加等）において、重要な遺伝現象であり、植物では、現在、数多くの作物、野菜において、一代雑種品種が育成されている。よって、雑種強勢が収量増大に効果的で、農学的に重要な特性であることは既に明白である。しかし、最良の雑種強勢を示す両親系統の選抜では、育種家の経験と勘によるところが大きく、雑種強勢の分子機構は未だほとんど明らかとなっていない。

そこで、本研究では、初期生育時の F_1 と両親系統の転写、エピジェネティックな修飾状態を比較することで、雑種強勢の分子機構の解明を目指す。

＜支援の内容＞

2012 年度

RNA-sequencing

播種後 2、6 日の子葉、及び播種後 10、14 日の第 1、2 葉を用いた RNA-seq 解析のためのシークエンス（ペアエンド、リード長: 100 bp、3 系統（両親と F_1）x 4 ステージ = 12 サンプル）、及び、ゲノムブラウズによる可視化。

Small RNA sequencing

播種後 2 日の子葉と播種後 14 日の第 1、2 葉を用いた small RNA sequencing のためのシークエンス（シングルエンド、リード長: 36 bp、3 系統（両親と F_1）x 2 ステージ = 6 サンプル）、及び、ゲノムブラウズによる可視化。

Chromatin immunoprecipitation sequencing

播種後 2 日の子葉と播種後 14 日の第 1、2 葉を用いた ChIP-seq（H3K27me3; ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化）解析のためのシークエンス（シングルエンド、リード長: 36 bp、4 系統（両親と F_1 x 2）x 2 ステージ x 2（input、IP）=16 サンプル）、及び、ゲノムブラウズによる可視化。

Methylated DNA immunoprecipitation sequencing

播種後 2 日の子葉と播種後 14 日の第 1、2 葉を用いた MeDIP-seq 解析のためのシークエンス（シングルエンド、リード長: 36 bp、3 系統（両親と F_1）x 2 ステージ x 2（input、IP）= 12 サンプル）、及び、ゲノムブラウズによる可視化。

2013 年度

RNA-sequencing

F_2 分離集団の中から、播種後 6 日の子葉面積と播種後 14 日の第 1、2 葉の面積おいて、それぞれ面積が小さい個体群と大きな個体群を選抜し、RNA-seq による転写比較解析のためのシークエンス（ペアエンド、リード長: 100 bp、4 系統（F_2 大小個体群 x 2 反復）x 2 ステージ = 8 サンプル）、及びゲノムブラウズによる可視化。

Small RNA sequencing

播種後 2 日の子葉と播種後 14 日の第 1、2 葉を用いた small RNA sequencing のためのシークエンス（シングルエンド、リード長: 36 bp、3 系統（両親と F_1）x 2 ステージ = 6 サンプル）、及び、ゲノムブラウズによる可視化が行われた。

Chromatin immunoprecipitation sequencing

播種後 2 日の子葉と播種後 14 日の第 1、2 葉を用いた ChIP-seq 解析のためのシークエンス（シングルエンド、リード長: 36 bp、3 系統（両親と F_1）x 5（抗体の種類）= 15 サンプル）、及び、ゲノムブラウズによる可視化。

Genome sequencing (for QTL-seq)

F_2 分離集団の中から、植物サイズの大きさ、上位 10%、下位 10%の植物からバルクで DNA を抽出した。ゲノム DNA のシークエンスの支援を受けた（ペアエンド、リード長: 100 bp、2 系統（上位と下位 10%）x 4 ステージ = 8 サンプル）。

＜支援によって得られた研究成果＞

RNA-sequencing

本支援により決定されたシークエンスを元に、F_1 と両親系統について 4 つの生育ステージでゲノム全体の遺伝子の転写レベルについて明らかにした。そして、F_1 と両親の平均値（MPV; Mid parent value）の間で発現レベルが異なる遺伝子（非相加的遺伝子発現）を見出した。非相加的遺伝子発現を示した遺伝子は、4 つの生育ステージでそれぞれ異なっていたことから、生育ステージ特異的に転写のプロファイルが変化することが明らかとなった。Gene Ontology 解析を行ったところ、播種後 2 日では、細胞分裂に関与する遺伝子の発現レベルが F_1 で有意に増加していた。表現型の調査では、F_1 は、播種後 4 日に細胞数の増加により子葉の面積の増加していたことから、播種後 2 日に見られた細胞分裂に関与する遺伝子の発現上昇との関連性が示唆された。また、播種後 10 日では転写因子の発現レベルが低下する傾向が見られ、ストレス応答系の遺伝子は、複数の生育ステージで F_1 と MPV で発現レベルが変化する傾向が見られ

た。

RNA-seq の特徴として、SNPs を利用して F_1 の転写産物について両親のどちらの対立遺伝子由来のものであるかを区別できる点が挙げられる。そこで、得られたシークエンス情報を元に両親系統間の SNPs を調べたところ、合計で約 19 万箇所の SNPs を同定し、そのうち、エキソン領域に見られる SNPs は約 10 万箇所あった。少なくとも 1 つ以上の SNPs を持つ遺伝子は、12,745 個であった。得られた SNPs 情報を用いて、両親系統間の発現レベルの差（比率）と、F_1 の転写産物の対立遺伝子の比率（SNPs の比率で解析）を比較することで、F_1 の対立遺伝子において、どの程度両親の発現レベルの差が反映されているかを調べた。4 つの生育ステージにおいて、両親系統間で発現レベルが異なる遺伝子は全部で 1,951 個あり、その内 SNPs を持つものは 1,236 個（63.4%）であった。1,236 個の遺伝子のうち、両親系統での発現量の比率と、F_1 における対立遺伝子の SNPs 比率を比較した結果、112 個（9.1%）の遺伝子で両者に有意な差が見られた。よって、ほとんどの遺伝子（～90 %）では、F_1 の対立遺伝子において両親系統の発現比率を反映した状態で発現していることが示された。このことが、F_1 においてほとんどの遺伝子が相加的な遺伝子発現を示す要因であると考える。

SNPs 情報を元に、リファレンスゲノム上で、各染色体（2n=20）に等間隔に分布するように RFLP マーカーを作成し、各染色体に 10 マーカー、合計 100 マーカーを作成した。作成した DNA マーカーは制限酵素 *Eco* RI を用いて、かつアガロースゲルで多型の判定が可能であることから、分離集団の遺伝子型判定にかかる労力とコストを大幅に軽減できるようになった。以上より、RNA-seq から高確率で DNA マーカーを作成できたことから、今後、QTL 解析やファインマッピングの際に、必要な位置に迅速に DNA マーカーが作成できる準備が整った。

Small RNA sequencing

本支援により決定されたシークエンスを元に、F_1 と両親系統で 2 つの生育ステージについて、small RNA の転写量の違いを比較した。Small RNA のサイズの分布は 24 nucleotide (nt)-small RNA の占める割合が最も高かった。この傾向は、系統間やステージによる違いはなかった。

植物では、一般的には 21nt の small RNA は micro RNA（miRNA）に分類される。今回決定したシークエンスの内、21nt-small RNA の中には、既に報告がある miRNA が多く含まれていた。しかし、miRNA の発現量は、両親系統と F_1 でほとんど差が見られなかった。このことから、miRNA は雑種強勢や F_1 で見られる mRNA の発現レベルの変化には大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

次に、DNA のメチル化との関係性が示唆されている small interfering RNA (siRNA)について、解析した。24nt-small RNA を用いてクラスター解析を行い、両親系統と F_1 を比較した。両親系統と F_1 ともに、6 万程度のクラスターが検出された。その内、10%程度が両親系統間で異なる場所に検出されたのに対して、片親と F_1 との比較では、1%以下の違いしか見られなかった。よって、クラスターの分布は両親系統間で異なる傾向にあるが、F_1 は両親系統の中間型を示し、F_1 で特異的な siRNA の発現量の変化はあまり見られないことが明らかとなった。

Chromatin immunoprecipitation sequencing

Brassica rapa では、ChIP-seq の研究報告がないことから、ChIP による DNA の濃縮を確認する領域も報告がなかった。そこで、H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3、H3K36me3 抗体を用いた ChIP を評価できる領域を探索し、それぞれのヒストンメチル化抗体を用いた ChIP のポジティブ/ネガティブコントロールプライマーセットを作製した（Kawanabe *et al.* in press）。

ChIP-seq については、Model-based Analysis for ChIP-Seq（MACS）法を用いて、5 つのヒストン修飾の分布について、両親系統と F_1 で比較した。それぞれのヒストン修飾について、両親系統と F_1 で異なる領域を明らかにできた。現在、遺伝子の発現レベルに与える影響や、雑種強勢との関連性について、詳細な解析を行っている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、未だ報告のない *B. rapa* でのエピゲノム情報を明らかにできた。得られたエピゲノム情報は、今後 *B. rapa* で様々なエピジェネティクスの研究を行っていく上で基礎的な情報となり得ると考える。実際に、我々は現在、生物、非生物ストレス下でのエピゲノムを今後調べて行く予定である。また、RNA-seq は当初、発現解析に重点をおいて解析を進めてきたが、RNA-seq により得られた SNPs 情報を用いて効果的に DNA マーカーを作成することができ、実際に作成した DNA マーカーを利用して QTL 解析を行った。QTL 解析には当初、既報の SSR マーカーを利用する予定であったが、両親系統間の遺伝距離が想像以上に近く、既報の SSR マーカーでは多型が得られる頻度（16/735 マーカー）が低かったことからも、RNA-seq を利用した DNA マーカーの設計はとても有効的であった。さらに、ゲノム支援により、QTL-seq といった新しい研究手法に挑戦することができた。解析はまだ終了していないが、従来法による QTL と QTL-seq の比較解析ができ、同じ領域に QTL が検出されれば、今後、QTL-seq により労力の削減が可能になると期待できる。また、エピゲノム情報と転写解析を比較して、両親系統と F_1 で発現レベルが異なる遺伝子や、エピジェネティックな修飾状態が異なる領域をスクリーニングしており、今後、雑種強勢との関連性を明らかにしたいと考える。

＜支援成果公表リスト＞

Kawanabe T. et al., Gene Genet. Syst. in press.

公募支援課題：2015 年度

アブラナ科植物の雑種強勢関連領域の同定

若手研究（A）

藤本 龍・神戸大学大学院農学研究科

＜背景・目的＞

動植物では、同一種内のある組合せの両親系統間の交雑によって得られた一代雑種（F_1）個体が、両親の特性よりも優れた形質を示す雑種強勢（ヘテローシス）という現象が知られている。雑種強勢は、農作物の育種改良（高収量性等）において重要な遺伝現象であり、現在、数多くの農作物において、一代雑種品種が育成されている

本研究では、アブラナ科野菜であるハクサイ（*Brassica rapa* L. var. *pekinensis*）の雑種強勢の分子機構の解明を目指す。具体的には、QTL 解析やアソシエーション解析等の遺伝学的な解析から、雑種強勢や収量性に関わる領域あるいは遺伝子の同定を試みる。また、ゲノム全体でのエピジェネティックな修飾状態を調べるエピゲノム解析を行い、両親系統と F_1 のエピゲノムの違いが発現或は形質（雑種強勢）に及ぼす影響を明らかにする。これら、遺伝学的解析、エピゲノム解析、RNA-sequencing (RNA-seq) による転写解析の結果を統合することで、雑種強勢の分子機構を解明することを目的とする

＜支援の内容＞

Restriction site Associated DNA (RAD) sequencing

GWAS (Genome-wide association studies)を行う為に、24 系統間の SNPs 情報が必要であることから、RAD-seq のシークエンスを支援希望している。現在、RAD-seq の為のシークエンスライブラリーを作成しており、2016 年 2 月に送付予定。

Bisulfite-sequencing

両親系統と F_1 で Bisulfite-sequencing により、3 系統間の DNA メチル化レベルの比較を行う。そのためのシークエンス解析。13 系統のゲノム DNA を送付済み。

＜支援によって得られた研究成果＞

RAD-seq

ハクサイ近交系 24 系統と渡辺採種場の優良父親系統 6 系統を交配し、46 組合せの F_1 種子を得ている。また、これら 46 系統の播種後 6 日での子葉面積、播種後 21 日目の本葉の面積、圃場試験による最終的な収量のデータを得ている。また、ハクサイ近交系 24 系統間で、作型ごと（開花時期が同じ）に総当たり交配を行い、～150 組合せの F_1 を作成し、播種後 6 日での子葉面積、播種後 21 日目の本葉の面積、圃場試験による最終的な収量のデータを得ている。GWAS (Genome-wide association studies)を行う為に、24 系統間の SNPs 情報が必要であることから、RAD-seq を行う。

Bis-seq

今まで両親系統と F_1 について、ゲノム全体の DNA のメチル化やそれぞれのヒストン修飾（H3K4me3、H3K9me2、H3K27me3、H3K36me3）について調べてきた。それぞれ、MACS (Model-based Analysis of ChIP-Seq data)を用いて、両親と F_1 でエピジェネティックな修飾状態が異なる領域を特定している。この際、2012 年に支援を受けた MeDIP-seq は、DNA のメチル化されている領域が、セントロメア領域に集中していることから、リファレンスゲノムにマップされるリードが少なくなり、定量化して系統間で比較するのが難しかったことから、Bisulfite-sequencing により、3 系統間の比較を行う計画である。現在までに、母親系統について、成熟葉を用いて、パイロット実験を行い、リファレンスゲノム上での、DNA のメチル化レベルを Bis-seq により定量化できることを確認した。そこで、両親系統と F_1 で Bis-seq により、3 系統間の DNA メチル化レベルの比較を行う。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

現在、シークエンスデータの取得待ちである。今回の支援では、当初の科学研究費の予算申請では、予算の都合上断念していた解析が実行できることが期待できる。特に、Bis-seq では、1 塩基レベルでの DNA メチル化レベルを F_1 と両親系統で比較でき、MeDIP-seq では明らかにならなかった DNA のメチル化レベルが異なる領域を見出すことが期待でき、本研究の目的である雑種強勢の分子機構の解明にも有用な情報が得られると考える。

＜支援成果公表リスト＞

なし。

公募支援課題：2010～2012 年度

昆虫の擬態紋様形成の分子機構と進化プロセスの解明

新学術領域研究

藤原 晴彦・東京大学大学院新領域創成科学研究科

＜背景・目的＞

体表の紋様や体色によって捕食者を攪乱する擬態は広範な生物種に認められるが、その形成メカニズムはほとんどわかっていない。アゲハなどの鱗翅目昆虫は幼虫・蛹・成虫の各ステージで複雑な擬態紋様を示し、さらに近縁種間で環境に高度に適応した斑紋が見られる。アゲハは、多様な擬態紋様形成メカニズムとその進化的成立過程を解析するのに最適な素材である。特に、沖縄などに生息するシロオビアゲハは、雌の一部のみが同所域に生息する毒蝶ベニモンアゲハに似せるベイツ型擬態を示し、100 年以上前のダーウィンの時代より多くの研究者の注目を集めてきた。そこでアゲハなどの鱗翅目昆虫の擬態紋様システム（①アゲハ科幼虫の斑紋形成・切替えと食草適応、②アゲハ蛹体色の環境応答的変化、③シロオビアゲハのベイツ型擬態④カイコ紋様変異系統の原因と遺伝子ネットワーク）に着目し、次世代ゲノム解析技術と分子遺伝学的な手法を組み合わせ、擬態の責任遺伝子と制御機構、さらには擬態の成立・進化機構を明らかにする。

＜支援の内容＞

(1)アゲハチョウ科の分子遺伝学的解析の基礎となる参照ゲノム配列として、ナミアゲハ(*Papilio xuthus*)及びシロオビアゲハ（*Papilio polytes*）の全ゲノム配列解析の支援を受けた。(2)配列のアセンブルとシロオビアゲハの既知遺伝子情報（6000 遺伝子以上）や RNAseq 配列などを利用した遺伝子予測とアノテーション作業の支援を受けた。(3)シロオビアゲハゲノムの Fosmid ライブラリーを用いて、擬態遺伝子の責任遺伝子の絞り込みを容易にするために、原因遺伝子領域近傍のクローンの配列解析の支援を受けた。(4)シロオビアゲハの責任領域の構造を明確にするために、Fosmid ライブラリーの Back-end sequence の解析支援を受けた。(5)アセンブルしたゲノム情報の公開（PapilioBase: http://papilio.nig.ac.jp/（遺伝研）、http://papilio.bio.titech.ac.jp/papilio.html（東京工大））に関して支援を受けた。(6)ベイツ型擬態の原因遺伝子（*H*）もしくは、その下流にある遺伝子発現の動態の詳細を調べるために、シロオビアゲハの擬態型♀と非擬態型♀と♂の翅のステージ毎（前蛹期、蛹期前期、後期）のサンプル（合計 9 種類）の RNA-seq の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

（シロオビアゲハ・ナミアゲハゲノム概要配列）

ドラフトゲノム配列解析結果より、シロオビアゲハゲノムは 227Mb, ナミアゲハゲノムは 244Mb のゲノムサイズを持つことが類推された。カイコやタバコスズメガなどの蛾のゲノムサイズが 500Mb 前後であるのに対し、現時点で知られる蝶のゲノムはいずれも 250Mb 程度以下であることから、鱗翅目昆虫の中でも蝶のゲノムはコンパクトである傾向が明らかとなった。一方、シロオビアゲハ、ナミアゲハの ScaffoldN50 はそれぞれ 3.67Mbp、6.20Mbp と十分に長く、今後の研究に有用な２種類の全ゲノムシーケンスデータベースが構築できた。アゲハチョウ科のチョウの参照ゲノム配列としてこれほど高い精度のものは現時点では他にはなく、今回の配列解読は本申請だけでなく、国内外の多数のアゲハ研究者にとって大きな恩恵を与えると考えられる。

シロオビアゲハ及びナミアゲハゲノムの詳細な情報に関しては、Nishikawa et al. (2015) Nature Genetics, 47, 405-409.を参照していただきたい。

（シロオビアゲハの擬態遺伝子座 H 領域の同定）

本支援では、シロオビアゲハに関してはベイツ型擬態の原因遺伝子 *H* の責任領域を決定することを目標とした。以前から進められていた AFLP マッピングで、第 25 番染色体上に H 遺伝子座の原因領域があることが判明していた。そこで、シロオビアゲハのゲノム配列をもとに詳細な SNP を設計し、各個体における表現型とゲノムの配列多型性(SNP)との連関解析を行った。その結果、第 25 染色体の *doublesex (dsx)*遺伝子近傍に責任遺伝子領域があることを見出した。

（擬態遺伝子座 H における染色体逆位構造の発見）

シロオビアゲハの概要ゲノム配列は、研究室内で 4 世代継代飼育した雌 1 匹（擬態遺伝子座に関して Hh の擬態型表現型を示す個体：擬態型 H は非擬態型 h に対して優性）の DNA を元に決定された。ゲノムデータに含まれる多数の heterozygous な配列は、父母由来染色体の SNP もしくは DNA 上の微小な heterogeneity を反映したものと当初予想した。しかし、より詳細な解析を行った結果、概要ゲノム配列には 100kb 以上に亘って相同染色体間で配列の異なる領域が 15 箇所含まれていることがわかった。そのうち 14 箇所は性染色体 ZW（鱗翅目昆虫は雌ヘテロ）にマップされたが、1 箇所だけ常染色体 25 番の *dsx* 近傍にマップされた。

ゲノム配列から得られた長大なヘテロ領域の情報が、連鎖解析で得られた H 遺伝子座と完全に一致したのは予想外の結果だった。そこで、*dsx* 領域の構造を詳細に調べたところ、H（擬態型）の第 25 番染色体（以下 H 染色体）由来の配列と、h（非擬態型）の第 25 番染色体（以下 h 染色体）由来の配列の 2 種類が存在することがわかった。H 染色体と h 染色体では *dsx* 遺伝子と近傍領域 130kb が完全に逆向きになり、染色体逆位構造をとっていることが判明した。

（擬態遺伝子座 H の由来）

dsx の近傍遺伝子を他の鱗翅目昆虫で比較すると、遺伝子のシンテニーから h 染色体が祖先型で、H 染

色体は h 染色体から派生したと考えられた。H 染色体と h 染色体の逆位領域における配列の相同性は、逆向きでも正向きでも非常に低い（逆位領域の外側は 99%以上の相同性であるのに対して）レベルだった。ナミアゲハの当該領域と h 染色体を比較した相同性のレベルと H 染色体と h 染色体の相同性のレベルはそれほど変わらなかった。ナミアゲハとシロオビアゲハは約 40MYA に分岐したと考えられることから、H 染色体に逆位が生じたのは極めて古い時代で、40MYA に近い年代と推測された。染色体逆位領域では一般に組換えが抑制されることから、H 染色体と h 染色体には長期に亘る進化の過程で大量の変異が導入・蓄積して、組換え抑制により互いに分化した可能性が考えられる。H 染色体の逆位領域内部の遺伝子に蓄積された変異によって擬態形質が生み出され、組換え抑制により自然集団内で安定に保持されてきたと類推される。

（スーパージーンとしての擬態遺伝子座 H）

本支援により得られたシロオビアゲハの RNA-seq の情報を元に、H 染色体の逆位領域 130kb に含まれる遺伝子を推定した。その結果、当該領域には逆向きの *dsx* 遺伝子が完全に含まれ、さらに h 染色体には存在しない未知の遺伝子 U3X と、動物全般で広く保存されている転写調節因子 UXT が含まれていた。これらの遺伝子は全て、擬態型の雌の翅では強く発現する一方、非擬態型の雌の翅では発現が抑制されていた。以上の結果は、3 つの遺伝子がいずれも擬態型形質に関わっていることを示唆する。複雑な適応形質の原因は、染色体の 1 箇所に局在する複数の遺伝子群によって制御されるという仮説が古くから提唱されており、そのような遺伝子群は supergene（スーパージーン）と呼ばれている（Schwander et al (2014) Current Biol.24,R288）。シロオビアゲハの H 遺伝子座もその候補の一つとして挙げられてきたが、本研究によりその可能性が強く示された。

一方、長大な領域が原因となって多型性を示すような複雑な適応現象では、ゲノム配列を決定し、ヘテロ領域を探索するだけで原因遺伝子が決定できる可能性がある。本研究はそのような方法論を初めて示したという点で画期的である。

（*dsx* の擬態形質における機能的役割）

H 染色体上の *dsx*（以下 *H_dsx*）と h 染色体上の *dsx*（以下 *h_dsx*）では、アミノ酸レベルで 15 箇所の変異が見られた。*dsx* は雌雄の性分化を制御する極めて重要な転写因子であるにも関わらず、これほど大量の変異が同じ生物種のゲノム中に蓄積しているのは極めて特異である。大量のアミノ酸変異の蓄積は、染色体逆位で変異が固定されてきたという上述の仮説を支持する。また、H_dsx で変化したアミノ酸配列の一部が下流の遺伝子ネットワークの変更を可能とし、擬態形質を生み出すようになった可能性が示唆された。

一方、シロオビアゲハのベイツ型擬態では雌の一部のみが擬態型となり（HH もしくは Hh 型）、他の雌（hh 型）と全ての雄は非擬態型となる。このように性に依存して異なる表現型を示すことから、*dsx* がシロオビアゲハの擬態型形質を制御する本体である可能性が強く示唆された。そこで、RNA-seq などで発現を比較すると、擬態型の雌の翅では *H_dsx* が蛹の初期に強く発現する一方、*h_dsx* の発現はそれほど発現していなかった。逆に、雄の翅においては、*h_dsx* に比べると *H_dsx* はほとんど発現していなかった。この結果は、擬態型の雌の翅においてのみ、H 染色体上の *dsx* 遺伝子が発現し、また雄の翅においてはそのような発現誘導が起こらないように、*dsx* 遺伝子のシス制御領域に変異が生じたと考えられた。

以上の結果から、H 染色体では、「アミノ酸の変異によって Dsx の機能が変わった」、もしくは「*dsx* の発現制御領域が変化した」か、二つの可能性が考えられた。擬態形質の誘導に両者のどちらが関与しているか、もしくは両方とも関与しているのかについては、今後詳細に検討する必要がある。

（翅紋様の機能解析系の構築と *dsx* の機能証明）

dsx などの候補遺伝子が擬態形質形成に本当に関わっているかを調べるためには、RNAi などによって遺伝子発現を抑制し、翅の紋様形成等に影響を与えるかを調べる必要がある。しかし、鱗翅目昆虫では一般に RNAi が効率的に起こらないことが知られていた。そこで我々は、蛹脱皮直後の翅に siRNA をガラスキャピラリーで注入後、electroporation によって翅の真皮細胞に siRNA を効率的に導入するシステムを構築することに成功した。

この手法を用いて、H 染色体上の *dsx*（*H_dsx*）の発現のみをノックダウンする siRNA を設計し、擬態型となる雌の後翅 1 枚へ導入したところ、擬態型に特徴的な辺縁部の赤いスポットの形成が抑制され、さらに非擬態型に特徴的な白い帯状の紋様があらわれた。一方、h 染色体上の *dsx*（以下 *h_dsx*）のみをノックダウンする siRNA を設計し、擬態型雌の翅に導入したが、何の変化も見られなかった。これらの結果は、*H_dsx* のみが擬態紋様形成に関与し、*h_dsx* にはそのような能力がない可能性を示唆する。*H_dsx* は擬態型形質を誘導すると同時に、非擬態型形質の発現を抑制する働きをしていることが示された。

以上を総合すると、本支援で得られたシロオビアゲハのゲノム情報から、シロオビアゲハのベイツ型擬態の原因遺伝子座のみならず、そこで起こっている大幅な染色体再編成の実体を明らかにすることができた。さらに、本支援で得られたナミアゲハゲノム配列との比較などから、染色体再編成の進化的起源も類推することができた。

（シロオビアゲハの翅紋様・色素形成過程）

無毒なシロオビアゲハの雌がモデルの毒蝶であるベニモンアゲハにどのような仕組みで紋様を似せるのかについては、それぞれの紋様や色素の形成過程を比較する必要がある。本支援で得られた RNA-seq の情報をもとに、シロオビアゲハの翅の擬態型と非擬態型の各領域で発現している遺伝子を比較した。その結果、擬態型で翅の中心部に存在する白斑と非擬態型で翅全体に広がる白い帯は異なる色素（色素合成系）によって生じていることがわかった。非擬態型の翅の白い帯はキヌレニンと N-beta acetyl dopamine が結合して生じるのに対し、擬態型の白斑ではキヌレニン合成系が関与しないことが示された。

一方、擬態型の翅辺縁部に見られる赤いスポットだけで顕著に発現している遺伝子として、Toll シグナル経路の snake, spätzle、メラニン形成経路の ProPO, yellow、NBAD とキヌレニン合成経路の遺伝子などが

同定された。この結果は、通常は自然免疫系で機能している Toll シグナル経路の一部を紋様形成に転用し、NBAD とキヌレニンを基質としてメラニン合成系を利用して酸化・架橋して赤色を作り出している可能性を示す。シロオビアゲハでは、ベニモンアゲハの翅の赤色色素とは異なる経路で赤色を作り出している可能性があり、収斂的な形質が生み出されるメカニズムを解明する上で興味深い。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

日本人の多くに馴染みの深いアゲハは、日本国内では、総研大、京大、JT 生命誌研究館、名古屋大、山口大、広島大などで多様なレベルの研究が行われており、そのゲノム配列情報は各研究の進展にとって利用価値は大きい。シロオビアゲハとナミアゲハはアゲハチョウ科の中では系統的に少し離れた位置にあり、これらの 2 種の参照ゲノム配列の存在は、他のアゲハチョウ科のチョウのゲノム配列決定を今後容易にするだろう。シロオビアゲハと同様に雌に限定されたベイツ型擬態を示すナガサキアゲハや、シロオビアゲハのモデルである毒チョウのベニモンアゲハのゲノム情報も容易に調べられると思われる。両データによって国内外の様々な研究が飛躍的に進展することが期待される。幼虫の食草に合わせた紋様形成の分子機構を解明することで、生息環境への適応など、ゲノム情報を基盤とした生態学的な研究の発展を牽引することも期待できる。また、カイコゲノムとの比較も含めアゲハチョウ科全体や鱗翅目昆虫におけるシンテニーから染色体進化や形質進化について重要な情報が得られると考える。本申請は、アゲハチョウ科での紋様の多様化の原因を探る全く新たな進化発生学的研究を次世代シーケンサーによって実現し、そのような方法のモデルケースになりうると考える。国外では、タテハチョウ、ジャノメチョウ、ドクチョウなどの翅の紋様形成進化、次世代シーケンサーを利用したゲノム解析も急速に進められている。ベイツ型擬態の遺伝子基盤は世界的にも多くの研究者の注目しており、欧米などで進められている butterfly base との情報交換や情報統合ができれば世界的にも大きな貢献になる。

＜支援成果公表リスト＞

・Futahashi, R. et al., *Evol Dev* 12, 157-167 (2010)
・Shirataki, H. et al., *Evol Dev* 12, 305-314 (2010)
・Yamaguchi, J. et al., *PLoS One* 6, e25469 (2011)
・Ando, T. et al., *Dev Biol* 357, 53-63 (2011)
・Futahashi R. et al, *BMC Biol* 10:e46 (2012)
・Shirai, H. et al., *PLoS One 7(11) e49348* (2012)
・Ando, T. et al, *Development* 140, 454-458 (2013)
・Yamaguchi, J. et al., *Nat Commun* 4, e1857 (2013)
・Nishikawa, H. et al, *Sci. Rep* 3, e3184 (2013)
・Yoda S. et al., *Nat Commun* 5, 4936 (2014)
・Edayoshi M. et al., *PLoS One* e0121736 (2015)
・Nishikawa H. et al., *Nat Genet* 47, 405-409 (2015)

公募支援課題：2014 年度

ゲノム編集によるショウジョウバエの環境適応の解析

基盤研究（C）

布施 直之・京都大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

生物は地球上の様々な環境に適応し進化してきた。近年のゲノム科学の進歩によって多数の生物種のゲノム配列が決定されているが、ゲノムと環境適応を直接結びつけた例は少なく、環境適応の分子メカニズムは未だ多くの謎が残されている。さらに、環境適応は複合的な形質と考えられるが、それを制御する遺伝子ネットワークの全体像も明らかではない。

私達は、60 年間 1500 世代に渡って暗闇で継代されたショウジョウバエ（暗黒バエ）を用いて、環境適応の分子メカニズムを調べている（Fuse et al., Springer Briefs in Biology, 2013）。暗黒バエは形態的に大きな変化がないが、暗所で野生型ハエより優位に子孫を残すことから、暗闇に適応していることが示唆された。次世代シーケンサーを用いて暗黒バエの全ゲノム配列を決定し、約 22 万の 1 塩基多型（SNP）を同定した（Izutsu et al., PLoS ONE, 2012）。この中から暗闇適応に関与する SNP を同定するために、暗黒バエと野生型ハエを混合した集団を明所と暗所で継代した。49 世代目の集団ゲノムを解析したところ、暗所の集団で頻度が上昇する約 6000 の SNP を同定し、これらの SNP が 3 つの選択パターン（暗所で正の選択、明所で負の選択、その両方）に明確に分離することを見いだした。暗所で選択されるゲノム領域を絞り込み、暗闇適応に関わる遺伝子の候補として 84 遺伝子を同定した（Izutsu et al., G3: Genes, Genomes, Genetics, 2016）。暗黒バエの SNP が候補遺伝子に与える影響は、2 つの可能性が考えられる。1 つは、SNP が遺伝子のコード領域にあり、アミノ酸置換によって遺伝子産物の活性を変化させる可能性である。もう 1 つは、SNP がイントロンや遺伝子間領域にあり、遺伝子の発現を変化させる可能性である。過去の研究例では、環境適応に関わる遺伝子変異として、両者の可能性が指摘されている。暗黒バエの遺伝子発現を調べることで、後者の可能性を検証し、暗闇適応に関わる遺伝子の絞り込みに利用する。

＜支援の内容＞

暗黒バエの遺伝子発現の全体像を理解し、光環境による遺伝子発現の変化を調べるために、トランスクリプトーム解析を行った。暗黒バエと野生型ハエを通常の明暗サイクル（C）条件と恒暗（D）条件、恒明（L）条件で飼育し、成虫メスの全身から RNA を抽出した。この際、概日リズムの影響を排除するために、6 時間毎に集めた 24 時間分のサンプルをまとめて RNA 抽出を行った。さらに、親のエピジェネティックな影響を排除するために、暗黒バエは約 30 世代 C 条件で継代し、各条件で発生させ飼育した成虫をサンプルに用いた。3 条件で飼育した暗黒バエと野生型ハエ（Oregon-R 系統）を 3 レプリカづつ、さらに 2 種の他の野生型系統（RAL-774、Urbana-S 系統）を 1 レプリカづつ、合計 24 サンプルから RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

各サンプルで平均 26M リードの配列データが得られた。各リードをショウジョウバエのレファレンスゲノムへマッピングし、遺伝子のアノテーション情報から各遺伝子のリード数を定量化した。TMM 法を用いてリード数を補正し、相対的な遺伝子発現量を計算し、サンプル間の遺伝子発現を比較した。

光環境（L、C、D 条件）による遺伝子発現の変化を調べたところ、野生型ハエでは約 110 の遺伝子（全遺伝子の約 0.7%）が発現変動した。一方、暗黒バエでは、これらの遺伝子の多く（約 7 割）が光環境によって発現変動しなかった。この結果は、光環境に対する遺伝子発現の応答が暗黒バエでは弱くなっていることを示している。また、系統間の遺伝子発現を比較したところ、約 900 の遺伝子の発現が異なり、その多く（約 7 割）は D 条件で発現量が異なっていた。このことは、系統差は、遺伝子発現に大きな影響を与え、D 条件でその影響がより顕著になることを示唆した。

合計 973 の発現変動遺伝子（DEG）を同定した。DEG を発現変動のパターンからクラスタリング解析を行い、8 つのグループに分類した。遺伝子ネットワークの解析から、それぞれのグループは、機能的にも相互作用している遺伝子群であり、同じカスケードで発現が制御されていることが示唆された。1 つのグループは、野生型ハエの C 条件で発現が低い遺伝子群であり、概日リズムで制御され自然免疫に関与する遺伝子が多く含まれていた。これらの遺伝子の発現は、暗黒バエでは光環境で変化せず低いレベルで抑えられていた。自然免疫は睡眠との関連が示唆されているが、その役割は不明な点も多い。これらの結果から、暗黒バエでは概日リズムで制御される生理機能のバランスが変化していることが示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノムとトランスクリプトームの統合解析から、暗所で選択されるゲノム領域にマップされる DEG として、概日リズムで制御され神経系で発現するセリンプロテアーゼホモログを同定した。この遺伝子の機能は未知であるが、他の生物のホモログの情報から、概日リズムで制御される神経ペプチドのプロセッシングに関与することが推定されている。今後、ゲノム編集技術を用いて、この遺伝子の機能と暗黒バエ SNP の影響を検証する。

＜支援成果公表リスト＞

現在、論文を準備中である。2016 年 3 月の投稿を目指している。

公募支援課題：2010 年度

高浄化効率を誘導する異種微生物間ネットワーク構造の解明

科研費種目：挑戦的萌芽研究

二又 裕之・静岡大学学術院工学領域

＜背景・目的＞

主に農業や排水処理などの複合微生物系を対象とした分野において、微生物生態系の解析が先進諸国を中心に進展してきた。その目的は、どのような微生物生態系がシステムの安定性や健全性を維持しているのかを理解する為である。しかし、未だ微生物生態系の制御法が確立されたとは言い難い。

これまで我々は、フェノールを唯一の炭素源とする培地を用いて土壌を接種源とした連続集積培養を好気条件下で行い、細菌群集の構造と機能を解析してきた [2)]。興味深いのは、一定運転条件下で細菌群集の構造変遷が生じること。さらには、連続集積培養という極低濃度で炭素源が供給される培養方法においては炭素源に対して親和性が高い細菌が集積されるはずであるのに、フェノールに対して親和性の低い *Variovorax* 属細菌が最終的に優占化したことである。この結果は、*Variovorax* 属細菌の優占化には、微生物間に何らかの相互作用が生じているのではないか。さらには、このメカニズムを解明することでより効果的な微生物生態系の制御法、更には微生物生態系が成り立っている原理を見いだせるのではないかとの着想を導くに至った。

そこで上記リアクターから分離した菌株を用いたモデル微生物生態系を構築し、群集構造の変化や相互作用を遺伝子レベルで把握する為、まず、供試菌株のゲノム解析を目的とした。

＜支援の内容＞

Pseudomonas sp. C8 株、*Ralstonia* sp. P-10 株、*Comamonas testsuteroni* R2 株、*Variovorax* sp. HAB24 株の合計 4 菌株の 454 ドラフトゲノム解析（ペアエンドとフラグメントの合計 2 ラン分）の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

上記 4 菌株のゲノム解析の結果、*Pseudomonas* sp. C8 *Ralstonia* sp. P-10 株および *Comamonas testsuteroni* R2 株のフェノール代謝経路の大凡の把握に成功した。そのため、当初の予定を変更し、上記 3 菌株を用いフェノールを唯一の炭素源とする連続集積混合培養を実施し、微生物群集の動態解析を実施した。その結果、予想とは異なる菌株間相互作用と微生物群集の動態が観察された。

フェノールの分解は、phenol hydroxylase によってカテコールに変換されることから始まる。その後は catechol 1,2-dioxygenase (C12D)によるオルト開裂、または catechol 2,3-dioxygenase (C23D)によるメタ開裂を経る経路が報告されている。P-10 株および R2 株は C23D 経路を有していた。さらに P-10 株は C12D 経路を有していた。一方で、C8 株は C12D 経路を持ち、C23D 経路の下流に位置する遺伝子群も有していた（Fig.1）。また、それらの遺伝子は多くの制御因子によって制御されていた。この結果より代謝経路を柔軟に変化させることで環境に適応し、かつ代謝産物を共有することで共存状態を維持していることが示唆された。

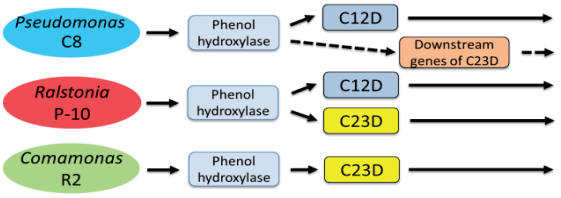


Fig. 1 Phenol-metabolic pathway

なお、*Pseudomonas* sp. C8 株および *Comamonas testsuteroni* R2 株については、その後の追加解析によってほぼコンプリートにまで解析を進める事ができた。一方、*Ralstonia* sp. P-10 株および *Variovorax* sp. HAB24 株では、コンティグが数百存在し、推定されたゲノムサイズも同属細菌のそれに比べると倍程であった。それらの細菌では、巨大プラスミドあるいは複数個ゲノムが存在する事が知られており、それらが影響した可能性もある。上記 2 菌株については、別途解析を進めていく予定としている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

複合微生物系における微生物の動態を理解するためには、微生物間の相互作用は極めて重要である。他の菌株由来の物質によって他の菌がどのように反応するのかを遺伝子レベルおよび代謝レベルで理解する事が求められる。本支援よって、ゲノム情報が得られたため、現在はアノテーションを進めつつ、相互作用を引き起こしている物質およびその遺伝子（あるいは生成過程）を明らかにする予定である。

また、本支援の成果から、Fig.1 に示した 3 菌株混合連続集積培養系における微生物の動態と機能遺伝子の発現を個別に追う事が可能となった。現在、特異的プライマーをデザインし、飢餓状態に対する応答、あるいは定常状態における共存機構の理解を進めている。これに伴い、メタトランスクリプトーム解析ならびにメタボローム解析の結果とリンクさせながら研究を進める予定であり、これら一連の成果から、微生物生態系の動的安定性の原理の理解と、微生物複雑系を適切に制御する手法の開発が期待される。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中である。間接的な成果として、

Haruta et al. Microbes Environ. 28,285-294 (2013)
Fatma et al., Frontiers in Microbiol. 20, 1148 (2015)

公募支援課題：2011 年度

ラボオートメーションを活用した大腸菌人工進化実験による適応進化ダイナミクスの解析

若手研究（A）

古澤 力・理化学研究所 生命システム研究センター

＜背景・目的＞

生物システムは一般に、環境の変化に応じて表現型と遺伝子型を柔軟に変化させ、その環境に適応することが可能である。その適応進化の過程における表現型の変化は、ゲノム変異に起因する進化的な機構と、ゲノム変異に依らない適応的な機構の双方に依存する。柔軟かつ頑強な適応進化のダイナミクスを理解するためには、この２つの機構の相互作用が本質的であると理論的にも予想されるが、その実験的な解析はほとんど行われていない。この適応と進化のダイナミクスを時系列に沿って詳細に解析するためには、実験室の制御された環境下で人工進化実験を行い、その過程における表現型と遺伝子型の変化を経時的に定量するという構成的なアプローチが有効となる。

＜支援の内容＞

我々の研究グループでは、エタノールストレス環境下での大腸菌の人工進化実験を行い、1000 世代程度の培養の結果として、親株と比較して 2 倍程度の比増殖速度を持つエタノール耐性大腸菌株を取得した。この独立に得られた 6 株の耐性株を、マイクロアレイによる遺伝子発現解析とキャピラリー電気泳動質量分析器（CE-MS）によるメタボローム解析に供したところ、それらの親株に対する表現型の変化には高い類似性が見られた。一方で、次世代シーケンサによるゲノムワイドの変異解析を行ったところ、固定された変異の数は数個のオーダーであり、また耐性株の間でのオーバーラップは少数であった。このことは、耐性株で共通に生じた表現型の変化を、ゲノム配列の変化によって説明することが難しいことを示唆している。そこで本研究では、このエタノール耐性をもたらした表現型変化がゲノムメチル化に依るという仮説を立て、次世代シーケンサを用いたゲノムワイドなメチル化部位の解析を行い、エタノール耐性株と親株のメチル化のパターンを定量的に比較することにより、ゲノム配列に依らない細胞状態の記憶メカニズムの解明を目的とした。ゲノム支援プログラムでは、このゲノムワイドなメチル化部位の同定を行うための次世代シーケンサ解析において、サンプル調整のプロトコル開発と次世代シーケンサ解析の実施に関して支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究では、メチル化依存性を持つ制限酵素である DpnI を用いて、大腸菌のゲノムワイドなメチル化部位を解析した。この手法によって、大腸菌の主要なゲノムメチル化酵素である Dam の標的配列について、そのメチル化の度合いを定量することが可能となる。まず、抽出したゲノムをその活性にゲノムメチル化が必要な制限酵素である DpnI によって処理し、2 つの制限酵素（EcoP15I, PvuII）の認識配列を持つ適当なアダプターをライゲーションする。この断片を EcoP15I 処理した後に、ストレプトアビジンとビオチンの結合を利用して磁気ビーズによって回収し、さらに PvuII 処理をすることによってメチル化されたゲノム周辺の 24bp 程度の DNA タグを回収することが出来る。この DNA タグを Illumina Hiseq による解析に供し、得られた配列を大腸菌ゲノムにマッピングすることによって、メチル部位とそのメチル化の度合いを定量した。結果として、親株とエタノール耐性株には、メチル化パターンには大きな差異が無いことが示された。この結果は、次世代シーケンサ PacBio を用いたゲノムワイドなメチル化部位の解析によっても同様に示され、進化実験によって得られたエタノール耐性能に依らないことが示された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

若手 A として採択された本研究課題の目的は、人工進化過程における微生物の表現型をトランスクリプトームやメタボローム解析で、そして遺伝子型の変化を次世代シーケンサによるゲノム変異解析によって高精度に定量し、その両者の対応を解析することによって適応進化のメカニズムを解明することにある。本ゲノム支援のプログラムにより、それらオミックス解析に加えて、エピゲノムというもう一つの軸を加えることによって、表現型と遺伝子型を繋ぐ新たな可能性を提示することが出来ると期待されたが、今回の結果はゲノムメチル化に関しては進化実験における表現型の変化と相関をしていないことが示された。一方で、エタノールストレスに限らずに、塩ストレスなど変化など様々な環境下での進化実験から、ゲノム配列の変化に依らない表現型メモリー機構の存在が示唆されている。こうした現象を解析するために、ゲノム構造の変化など様々なエピジェネティクス機構の解析を進める必要があり、今回の支援でゲノムメチル化が関与している可能性を除外できたことは、今後の研究にとって大きな意味を持つ。こうした研究の展開はゲノム支援によってなされたものであり、この研究において成果を挙げることが出来れば、生物システムの適応能や進化能を理解する全く新たな視点を提供すると期待できる。

＜支援成果公表論文リスト＞

Horinouchi, T. et al., BMC Evo. Biol. 15, 180 (2015)

公募支援課題：2012 年度～2013 年度

配列特異的ＤＮＡメチル化酵素によるエピゲノム工学：合成生物学・ゲノム工学の拡張へ

新学術領域研究

古田 芳一・マサチューセッツ工科大学

＜背景・目的＞

ゲノム DNA の配列情報だけでなく、各塩基の修飾情報であるエピゲノムについて研究が盛んに行なわれている。特に真核生物においては、遺伝子領域近辺もしくは遺伝子領域内のシトシンのメチル化が、その遺伝子の発現を制御する例が多く知られ、疾患との関係がある場合もあり、注目されている(Suzuki & Bird, Nat Rev Genet, 2007)。

一方、バクテリアにも DNA メチル化酵素による DNA 塩基のメチル化は数多く起こっているが、塩基修飾の種類が真核生物と比べて多様であり、一部の修飾については真核生物で用いられた解析手法が適用できない。さらに認識配列が多様であり、これらの要因により、DNA メチル化の詳細やその遺伝子発現への影響はほとんど調べられていない。近年使用可能となった高出力シークエンサーの PacBio RS を用いることで、バクテリアにおける DNA 塩基修飾を一塩基レベルの精度で解析できるようになり、バクテリアにおけるエピゲノムの機能解析が可能となった (Davis et al, Curr Opinion Microbiol, 2013)。

DNA メチル化酵素を多く持つバクテリアとしてピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)があげられる。ピロリ菌はヒトの胃に感染するグラム陰性細菌であり、世界人口の半数が感染していると言われている。ゲノム比較解析により、ピロリ菌のゲノムは、他の種と比較して多数のメチル化酵素をコードしており、また菌株によってそのレパートリーも多様であることが明らかとなっている(Kawai et al, BMC Microbiol, 2011)。さらには同じオルソログでも部分配列の単位で多様化が起こることが見つかっており、エピゲノムが菌株間で多様となっていることが示唆されていた(Furuta et al, PLoS ONE, 2011; Furuta et al, Nucleic Acids Res, 2012)。こうしたエピゲノムの多様性が、ピロリ菌株の進化に寄与しているかどうかを調べるため、特定のメチル化酵素遺伝子の欠損株を作成し、トランスクリプトームにどのような変化を与えるかについて解析を行った。

＜支援の内容＞

a) メチル化酵素配列認識遺伝子の有無でのトランスクリプトーム比較

ピロリ菌のⅠ型メチル化酵素の配列認識遺伝子には、組換えを介した多様化メカニズムが存在し、これによりメチル化配列を多様化していると考えられる(Furuta et al, PLoS ONE, 2011)。この配列認識遺伝子の一つを欠損させ、メチル化パターンを変化させた株について、RNA-seq を行い、メチル化パターンの変化によるトランスクリプトームへの影響を検出した。転写開始点解析(TSS-seq)用のライブラリも作成し(Sharma et al, Nature, 2010)、メチル化パターンの変化による転写開始点の変化についても解析した。

ピロリ菌 P12 株の配列認識遺伝子を薬剤耐性遺伝子に置換した欠損株(HPYF1)と、薬剤耐性遺伝子を配列認識遺伝子の下流に挿入したコントロール株(HPYF2)の 2 株について、通常の RNA-seq ライブラリを各株 2 サンプルずつ、TSS-seq ライブラリを各株 2 サンプルずつ、計 8 ライブラリを解読していただいた。TSS-seq ライブラリについては、各株 1 サンプルずつ追加でシークエンシングを行ったため、合計 10 ライブラリのシークエンシングを行っていただいた。得られたリードについて、BWA (Li & Durbin, Bioinformatics, 2009)を用いてマッピングを行い、各遺伝子のリード数を計算し、DEseq (Andres & Huber, Genome Biol, 2011)を用いて発現量比較解析を行った。

b) メチル化酵素遺伝子の水平伝達が トランスクリプトームに与える影響

ピロリ菌ゲノムの比較から、細菌はメチル化酵素遺伝子の組換えや水平伝播を介して、頻繁にゲノムメチル化パターンを変換していることが示唆された 。メチル化酵素遺伝子の水平伝達が細菌の環境適応に与える影響を解明するため、メチル化標的配列が既知の II 型および III 型メチル化酵素をコードする遺伝子を導入した大腸菌 MG1655 派生株のトランスクリプトーム解析を行った。コントロール株含め 14 株について合計 28 の cDNA ライブラリを作製していただき、mRNA-seq を行った。

さらにピロリ菌について、前年度に引き続いて、メチル化酵素配列認識遺伝子の有無でのトランスクリプトーム比較を行った。コントロール株とメチル化酵素遺伝子ノックアウト株の 14 株について、合計 28 の cDNA ライブラリを作製していただき、mRNA-seq を行った。発現変動解析には bwa, samtools, bedtools (Li, Bioinformatics, 2011), edgeR (Robinson et al, Bioinformatics, 2010), TCC (Sun et al, BMC Bioinformatics, 2013) などのツールを用いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

a) メチル化酵素配列認識遺伝子の有無でのトランスクリプトーム比較

配列認識遺伝子の欠損株と、コントロール株のトランスクリプトームを比較した結果、一つのオペロン中の複数の遺伝子の発現が有意に変化することが見出された。ノックアウトした配列認識遺伝子のメチル化ターゲット配列がこのオペロン中にあり、長いパリンドローム配列中にあることから、メチル化によってゲノム DNA の高次構造の取りやすさに変化が生じることで、発現制御を行っていることが示唆された。

TSS-seq に関しては、転写開始点の網羅的検出に成功した。メチル化特異的な有意な変化は検出できなかったものの、今後様々な条件下で TSS-seq を解析することにより、新たな転写開始点制御のメカニズムを発見できることが期待され、解析手法の下地ができたと言える。

b) メチル化酵素遺伝子の水平伝達が トランスクリプトームに与える影響

大腸菌へのメチル化酵素遺伝子水平伝達、ピロリ菌のメチル化酵素遺伝子ノックアウトの両研究それぞれにおいて、トランスクリプトームに影響を与えるメチル化酵素遺伝子、トランスクリプトームにほとんど影響を与えないメチル化酵素遺伝子があることが判明した。RNA-seq データを解析した後、発現変動遺伝子、既知の転写因子結合部位とメチル化標的配列の相対的位置関係を調べたところ、各メチル化酵素遺伝子にユニークに発現変動している遺伝子のいくつかについて、上流部においてメチル化標的モチーフが認められた。あるメチル化酵素遺伝子にユニークに発現変動している遺伝子群の上流部においては、転写因子結合部位とメチル化標的部位のオーバーラップが認められた。これは DNA メチル化が転写因子のプロモーター領域 DNA への結合に正または負の影響を与えることが、トランスクリプトーム変化の直接的原因であることを示唆する。大腸菌のトランスクリプトーム解析の結果に基づき、メチル化酵素の保持が大腸菌の生育に正に作用する条件を予想し、その環境での菌の生育パターンを調べたところ、ある条件ではメチル化酵素の保持によって菌の生育がよくなることが判明した。これは、ゲノムメチル化状態の変化が適応進化の原動力となる可能性を示唆する

＜支援によって開かれた新たな展望＞

a) メチル化酵素配列認識遺伝子の有無でのトランスクリプトーム比較

支援いただいたトランスクリプトーム解析とは別に、PacBio RS シークエンサーを用いたピロリ菌のメチロームの解析を行った。本支援の成果と組み合わせることにより、ピロリ菌のゲノム全体のメチル化パターンの多様性と、トランスクリプトームとの関係を考察することが可能となった。ピロリ菌株内のメチル化パターンの多様化により、「トランスクリプトームを多様化させることで、適応進化を行う」、というピロリ菌の進化仮説を支持する結果が得られた (Furuta & Kobayashi, Mobile Genet Elements, 2012)。

b) メチル化酵素遺伝子の水平伝達が トランスクリプトームに与える影響

大腸菌のトランスクリプトーム解析と形質解析の結果からメチル化酵素遺伝子の導入によって、細胞の形質を操作するエピゲノム工学の実現可能性が高まった 。

ピロリ菌の標的配列が不明のメチル化酵素をコードする遺伝子 ノックアウト株については SMRT シークエンサーを用いたメチローム解析を平行して行っている。ゲノム支援で得られたトランスクリプトーム解析の結果とメチル化サイトの位置を対応させることで、ピロリ菌におけるメチル化による遺伝子発現制御の機構とそれに依存する病原性の発現の機構が明らかになる予定である。

＜支援成果公表リスト＞

Furuta Y, et al., PLoS Genet. 10(4):e1004272 (2014).

公募支援課題：2010～2012 年度

高等植物のノンコーディング RNA の代謝と遺伝子発現の制御

若手研究（B）

高等植物の多様な RNA サイレンシング経路の制御機構

基盤研究（C）

星野 敦・基礎生物学研究所

＜背景・目的＞

本研究では、高等植物におけるノンコーディング RNA と多様な RNA サイレンシング経路による遺伝子発現の制御機構を解明する。RNA サイレンシングの動態が花の模様として現れる、アサガオ（*Ipomoea nil*）の突然変異体を材料にする。アサガオの研究では、ゲノム情報の乏しさが障壁になっていた。そこで本支援において、野生型標準系統の全ゲノムを解読した。アサガオのゲノムは染色体数が 2n=2x=30、サイズは約 750 Mb である。

＜支援の内容＞

東京古型標準型（TKS）の全ゲノム配列を解読するための、大規模ゲノム情報生産支援と、情報解析支援を受けた。具体的な内容は以下の通りである。

1. ゲノムシークエンス
   3 種類のプラットフォーム（GS FLX、Illumina、PacBio）を利用した。
2. RNA-seq
   花、葉、茎、根、胚、種皮の 6 組織について mRNA を解析し、アノテーションに用いた。
3. RAD-seq
   TKS とアフリカ系統を交配して得た F2、207 個体について 2 つのライブラリーを解析し、連鎖地図の作成に用いた。
4. BAC-end シークエンス
   27,648 クローンについて、両末端配列を解析し、アセンブリの検証に利用した。
5. BAC クローンの全長シークエンス
   100 kb のインサートサイズをもつ 5 クローンを解読し、アセンブリの検証に利用した。
6. アセンブリなどの情報解析
   de novo アセンブリ、連鎖地図の作成、遺伝子のアノテーション、全ゲノム重複などを解析していただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

アサガオのドラフトゲノムを得ることができた。コンティグとスキャフォールドの N50 は、3.2 Mb と 3.5 Mb であり、当初の目標を大幅に上回る。支援開始時は、GS FLX と Illumina のリードをハイブリッドアセンブリする計画であったが、最終的に PacBio のリードを *de novo* アセンブリした。これにより劇的に N50 が向上した。また、1,045 の RAD マーカーからなる連鎖地図を作成した。これにスキャフォールドをマップすることで、全ゲノムの 85% をカバーする pseudo molecule が得られた。アセンブリの正確性の検証は、CEGMA 解析や、連鎖地図、BAC-end 配列、BAC の全長配列、EST 配列、RNA-seq のリードとの比較解析により行った。いずれの解析でも、正確性の高さが証明された。一方、小数のスキャフォールドで連鎖地図との不一致がみられたが、アセンブリを見直すことで完全に一致させることができた。RNA-seq のリードは遺伝子のアノテーションに利用し、41,000 の遺伝子をみいだした。また、アサガオとおなじナス目に属するトマトとジャガイモのゲノムと比較することで、ナス科とヒルガオ科が分岐したあとに、それぞれで全ゲノム重複がおきたことが明らかになった。

ドラフトゲノムを解析することで、アサガオの主要な変異原である *Tpn1* ファミリーのトランスポゾンを網羅的に同定し、1956 年に作成された古典連鎖地図にマップされていた渦遺伝子を同定できた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

従来の NGS に比べて PacBio を利用すると、非常に長いコンティグが得られることが示された。本研究でのゲノム解読のストラテジーは、当面のあいだゲノム解読の主流になると思われる。ごく最近になって、2 つの植物ゲノムが PacBio を使って解読され、アサガオに近い N50 が報告されている。

ドラフトゲノムは古典連鎖地図とも良く一致するため、地図上にマップされた遺伝子を同定することが容易になった。実際に渦遺伝子を同定し、ブラシノステロイドホルモンの合成酵素をコードすることを明らかにした。アサガオには多くの突然変異が知られ、それらの原因遺伝子の同定も、ドラフトゲノムや RAD マーカーを利用したマップベースクローニング法により進むであろう。

転移に必要な転移酵素をコードする自律性トランスポゾンの有力候補を含む、322 の *Tpn1* ファミリーのトランスポゾンをみいだした。これらの配列情報は、遺伝子の同定や育種などに活用できる。

アサガオの模様にかかわる RNA サイレンシングについても、ノンコーディング RNA の代謝、制御にかかわる遺伝子を網羅的に解析することが可能になったので、新たな展望が開けると思われる。

バイオリソースとしてのアサガオの付加価値が向上し、リソースの利用拡大につながると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

ドラフトゲノムをまとめた論文を投稿中である。

公募支援課題：2015 年度

「魔法形質」による種分化の分子進化過程

若手研究（A）

細 将貴・京都大学白眉センター

＜背景・目的＞

一般に、種分化は多数の遺伝子が複合的に関わって達成されると考えられているが、巻型の逆転によるカタツムリの一遺伝子種分化は、その例外としてよく知られている単純な種分化システムである。本研究では、台湾の南東部において左巻きへの進化を平行的に複数回起こしていることのわかっている Satsuma 属カタツムリを対象に、新型シーケンサーを用いた全ゲノム塩基配列解読、遺伝子アノテーション、および全ゲノム関連解析の一連のアプローチによって一遺伝子種分化の原因遺伝子を推定する。副産物として大量に得られる中立マーカーを元にした系統地理学的な解析と組み合わせることにより、種分化におけるゲノム進化過程を時間・空間的に高い解像度で復元することが可能になる。

＜支援の内容＞

台湾に生息する Satsuma 属カタツムリの一種（近年記載され、ゲノム支援の申請書とは異なり現在は文信左旋栗蝸 Satsuma wenshini と呼ばれる）を対象に、Illumina HiSeq2500 を用いて de novo アセンブリをおこなう。

＜支援によって得られた研究成果＞

シーケンシング結果

国立遺伝学研究所の Illumina HiSeq2500 を使用し、ペアエンド計 411Gbp（アダプタ・低クオリティ領域のトリム後 364Gbp）、インサートサイズ 3kbp, 8kbp, 12kbp のメイトペア各 48Gbp, 46Gbp, 48Gbp（同 30Gbp, 29Gbp, 29Gbp）を得た。

k-mer 出現回数分布によるゲノムの性質の考察

Paiered-ends *k*-mer（*k* = 32）出現回数分布から、シークエンスエラーによるとみられる少数回の出現回数におけるピークの他に、60 回と 30 回の出現回数にピークを検出した。これらはそれぞれ、ホモ領域とヘテロ領域に対応すると考えられる。*k*-mer 数をホモ領域ピーク値で割ることでゲノムサイズを推定したところ、3,931Mbp という値を得た。*k*-mer のリピート率は 37.7%であった。

同じ軟体動物であるカキと比較すると、ヘテロピーク高／ホモピーク高は 2/3 程度と低く、ヘテロ接合は比較的低いことがわかった。しかし推定ゲノムサイズは 6.8 倍、リピート率は 1.5 倍と高く、*de novo* アセンブリには障害が多い可能性が示唆された。

de novo アセンブリによるドラフトゲノム構築

データ量やリピート配列率の大きさにより既存のプログラムの異常終了が頻発したため、大容量データに対応した Platanus の派生版を適用し、*de novo* アセンブリをおこなった。scaffolding を可能にするため、用いる contig は長さが 250bp 以上のもののみに限定した。結果、スキャフォールドの total size が 4,029Mbp（コンタミおよびミトコンドリアゲノムを除く）と推定値に近く、N50 長も約 300kbp となるドラフトゲノムを構築することができた。

コンタミネーション候補配列の除去

得られたスキャフォールドを NCBI Bacteria genome DB, RefSeq viral DB に BLASTN で照合し、大腸菌および枯草菌に対応する 5 本計 5.6kbp というごく僅かなコンタミネーション候補配列のスキャフォールドを検出した。これらはドラフトゲノムから除去した。

ミトコンドリアゲノム配列の構築

ミトコンドリアゲノムはカバレッジが高いため、特別にパラメータを調整してアセンブリをおこなった。その結果、環状になることの確認できた、15,298bp の完全ミトコンドリア配列を構築することができた。

構築された配列を NCBI nt DB に BLASTN で検索し、太守のミトコンドリアに相同性を持つ頃を確認した。なお、相同性の高い上位 5 種は、いずれも *S. wenshini* の属するマイマイ上科に含まれるものだった。

リードマッピングおよび Core Eukaryotic Genes (CEGs)によるドラフトゲノムの評価

Bowtie2 を用いてリードマッピングをおこなった。その結果、92.41%（>95%の identity に限定すると 78.12%）の配列をマップすることができた。これにより、Coverage depth の分布に見られる、ヘテロ領域に対応するピークを縮めることができたが、identity の閾値によってピーク高が違ったため、ハプロタイプ間の相同性が低い非マージヘテロ領域の存在が示唆された。ただし、ピーク高はカキよりも小さく、解析を進めることができないほどの問題ではない。

CEGMA を用い、ゲノム配列中の Core Eukaryotic Genes (CEGs)を検出した。その結果、complete CEGs は 58.06%、partial CEGs を含めると 91.53%となった。exon の大部分は構築できているが、intron 部分で分断されている遺伝子が多いという可能性を示唆する。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回得られたドラフトゲノムの質は、GWAS を最終目標とした今後の解析にほぼ必要十分と思われた。しかしながら RNA-seq によるアノテーションにより引き出せる情報量は飛躍的に増すと考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

なし。

公募支援課題：2010 年度

創薬ターゲットとしてのトリインフルエンザ抵抗性分子の同定

若手研究（B）

細道 一善・東海大学

＜背景・目的＞

近年、野鳥や家禽において感染が報告されているトリインフルエンザは新型インフルエンザへと変異し、ヒトへ感染する可能性もあることから、重要な感染症の一つであり、新たな治療法の確立が必要とされている。本研究課題では強病原性 H5N1 型トリインフルエンザウイルスとの関連が最も強く示唆されているニワトリ MHC ハプロタイプの知見から、MHC 領域存在するトリインフルエンザウイルス抵抗性の主働遺伝子を同定し、その機能とネットワークを明らかにすることを目的とし、ゲノム創薬として新たな治療法への発展を目指す。

申請者らはこれまでにヒトの全エクソン領域シーケンスを進めており、bwa による mapping、samtools による変異候補の検出により、一塩基置換による疾患候補多型を検出している。さらに bwa と samtools によって検出された Indel について実際に PCR 法とサンガーシーケンスによりタイピングすると Mapping エラーに起因する偽陽性を多く含むことが確認され、一方で、ヘテロにコールされた変異候補が実際は数 bp の Indel である例も認められている。よって、疾患の原因となる変異が Indel によるものであった場合、多くの偽陽性 Indel が真の Indel 検出の障害となる、または、検出できない可能性も考えられる。高精度の Indel 検出法の確立によって、疾患候補変異の検索対象として Indel の網羅的な検出が可能となり、アミノ酸欠失および挿入、フレームシフトによるアミノ酸翻訳エラーなどの形質に影響の大きい変異の検出が可能となる。ゲノム全体を網羅する構造変異の正確な検出法が今後必要であり、高精度 Indel 検出法の確立という本申請課題は全ゲノム(エクソン)領域シーケンスにおける最重要課題の一つである。

＜支援の内容＞

全ゲノム(エクソン)領域シーケンスにおける高精度挿入欠失検出法の開発

＜支援によって得られた研究成果＞

全エクソン領域シーケンスの Indel 検出ツールとして、マッピングソフトの LAST をベースにした variant 同定のパイプラインシステムの提供を受けた。リードのエラー率が比較的高い場合に LAST をマッピングツールとして利用すると、samtools や GATK といった他の variant 同定ツールに比べて特に有効であるとの結果を得た。一方で全エクソンの解析には検出のための解析に時間を要することから、より限定的な領域の再解析が有効であることが示唆された。そこで、薬剤副作用関連 HLA アレルを含む日本人に頻度の高い HLA ハプロタイプのホモ接合である細胞株 7 サンプルおよび胞状奇胎 10 サンプル由来の DNA をテンプレートとして HLA 領域のリシーケンスを GAIIx (Illumina) により行った。シーケンスの結果、多くの新規多型情報が得られ、より細分化された HLA ハプロタイプの分類が可能であることが示唆された。新規 Indel は認められなかったが、Ticlopidine の副作用、肝内胆汁うっ滞との関連が示唆されている A*33:03 を持つ HLA ハプロタイプのリシーケンスから、HLA-A のセントロメア側 500kb に位置する TRIM15 にこのハプロタイプ特異的なアミノ酸変異(p.T489P)が 1 カ所認められた。支援頂いた LAST をベースにした variant 同定のパイプラインシステムはアライメントが困難な領域について高い性能を発揮することが示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援による成果として LAST をベースにした variant 同定のパイプラインシステムは高精度な Indel の検出に極めて有効なツールであり、今後、増え続ける全ゲノム(エクソン)領域シーケンスの精度の高い variant 同定に極めて有効であると考えられた。一方で、ヒト全ゲノム(エクソン)の解析のためには解析速度の問題解決も期待される。本支援申請は一般的な Indel 検出の精度についてのみであったが、今後、実際の疾患原因遺伝子同定などの解析に用いることでゲノム医科学においても極めて有効なツールとなることが期待される。

公募支援課題：2012～2013 年度

家族性 IgA 腎症で例示されるエクソーム解析による原因遺伝子同定プロトコールの確立

若手研究（B）

細道 一善・国立遺伝学研究所総合遺伝研究系

＜背景・目的＞

本研究課題は、家族性 IgA 腎症を対象とし、全エクソンシーケンスによる疾患原因変異の同定、疾患発症機序の解明、ならびにこれら一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコールを確立することを目指している。

＜支援の内容＞

家族性 IgA 腎症罹患者 30 サンプルの全エクソンシーケンス

＜支援によって得られた研究成果＞

2012 年度のゲノム支援により、家族性 IgA 腎症罹患者 4 名を含む 1 家系の全エクソンシーケンスによって IgA のトランスサイトーシスに関わり、腎臓で発現する EEA1 に原因候補となる変異を同定した。この変異(rs144833802)は 1000 ゲノムプロジェクトで日本人 2 名のみに認められ、申請者らがこれまで全エクソンシーケンスした 118 名に 1 名のみ認められたが、孤発例 228 名において全く認められず、EEA1 の全エクソンのシーケンスからもアミノ酸置換を伴う変異を認めなかった。よって同定した変異は極めて Rare な変異であることが予測された。このような事例は今後、別の疾患における全エクソンシーケンスでも起こりうることであり、本研究課題の目的である、”一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコールを確立する” という内容の遂行の為には、家系ごとに原因遺伝子が異なる、すなわち Locus Heterogeneity の問題を解決する必要があった。

そこで、この問題を解決する戦略の一つとして 2013 年度のゲノム支援課題として、24 家系由来の家族性 IgA 腎症罹患者 30 サンプルの全エクソンシーケンスの追加の支援を頂いた。全エクソンシーケンスの結果、24 名の発端者のうち 5 名に *EEA1* の変異(p.R1262W、p.N1072K および p.E1010G)が認められた。これらの変異は前述の家系で認められた変異 p.F161Y と異なるものであり、p.R1262W は 3 名、p.N1072K および p.E1010G は 1 名に認められた。いずれの変異も 1000 ゲノムプロジェクトで 1%以下の頻度であるにもかかわらず 24 名中 5 名と高頻度に認められたことから、*EEA1* の変異は家族性 IgA 腎症の 20%を説明しうると考えられた。今後、同様の戦略により、*EEA1* に変異を認めない家族性 IgA 腎症罹患者の原因遺伝子同定が期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本申請では家族性 IgA 腎症を例として、家系ならびに孤発例のエクソームの結果を精査することで疾患原因検索のためのプロトコールを精査した。今後、浸透率や機能的な変化を考慮した追加の情報のため、連鎖解析として merlin、関連解析として plink および VAAST を用いて必要サンプル数も含めた条件検討を進めている。全エクソン配列決定から原因遺伝子同定をおこなうエクソーム解析は強力な手法であるが、多くの医学研究者にとってどのように解析を進めればいいのか、暗中模索のところがある。実際のところ、本研究でエクソーム解析による疾患遺伝子同定を目的とした汎用性の高いプロトコールが確立すると、多くの医学研究者が臨床現場と一体化して試みることが可能となり、これまで解析されてこなかった多くの希少疾患の原因遺伝子が同定されると期待でき、医学研究において大きな波及効果がある。

公募支援課題：2013 年度

家族性 IgA 腎症で例示されるエクソーム解析による原因遺伝子同定プロトコールの確立

若手研究（B）

細道 一善・国立遺伝学研究所総合遺伝研究系

＜背景・目的＞

本研究課題は、家族性 IgA 腎症を対象とし、全エクソンシーケンスによる疾患原因変異の同定、疾患発症機序の解明、ならびにこれら一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコールを確立することを目指している。一連の原因遺伝子同定から情報解析技術を駆使したプロトコールを確立する、という課題が進展する一方で、研究の総括には、確立したパイプラインをゲノム医科学研究者に広く利用してもらうためのシステムが必要と考えられる。一方でヒトゲノム情報はその取り扱いに際して配慮が必要であり、セキュリティ面ではクローズ環境での解析が望ましい。クローズ環境を担保したスーパーコンピューター等の解析システムが利用できれば、倫理面に配慮しながらも共同研究者間の解析パイプラインや解析結果の共有が可能となり、研究の進展が期待される。

＜支援の内容＞

解析パイプラインを DDBJ の p-galaxy にて構築する。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援により、我々が確立したパイプラインを DDBJ の p-galaxy (https://p-galaxy.ddbj.nig.ac.jp)にて構築する支援を頂いた。研究者は fastq ファイルをアップロードし、適切な設定を選択した後、実行するのみで各種の結果を得ることが可能である。bwa、samtools、GATK および annovar といった通常の多型・変異検出に加えて、臨床的意義の高い HLA 遺伝子の解析パイプラインも下流の解析の一つとして実装して頂いた。

HLA はヒトの免疫応答の入り口としての役割を果たす重要な分子であり、HLA タイピングは極めて臨床的意義が高い。HLA が適合しないものはすべて異物と認識して攻撃を始めてしまうことから、造血幹細胞移植や臓器移植では HLA の適合性が重要視される。また、がんワクチン療法に用いるガンに特異的なペプチド・ワクチン開発は特定の HLA を基に開発されている。加えて HLA は 100 以上の疾患ならびに薬剤副作用と関連することから、HLA タイピングが必要となる分野は多岐に渡り、その重要性から高精度のタイピングが期待される遺伝子の一つである。

DDBJ の p-galaxy はグラフィカルインターフェイスによる極めて操作性に優れたシステムであることに加え、多様化する解析手法にも対応可能な柔軟さも兼ね備えたシステムであり、個々の解析を組み合わせることにより、そのパイプラインを共有することも可能である。高い利便性の一方で、倫理面への配慮などの今後の課題も大きい。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ウェブベースのグラフィカルインターフェイスを持つ p-galaxy 上で解析を実行することで、必要項目を画面上で選択し、実行するのみでバイオインフォマティクスの専門知識を必要とせずに誰でも解析結果を得ることが可能となっている。一方で、ヒトゲノム情報における倫理面への考慮からクローズ環境での解析も望ましい、今後スーパーコンピューター等の解析システムを利用しつつ、セキュリティ面でのクローズ環境も担保しつつ、共同研究者間の情報共有も可能な利便性の高いシステムの構築が期待される。スーパーコンピューター上の仮想マシンなどによる実現などに向けた今後の展望が期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Hosomichi, K. et al., BMC Genomics 14, 355 (2013)
Hosomichi, K. et al., BMC Genomics 15, 465 (2014)

公募支援課題：2014～2015 年度

同種造血幹細胞移植成績向上を目指した KIR ハプロタイプ解析手法の確立

基盤研究（C）

細道 一善・国立遺伝学研究所総合遺伝研究系、金沢大学医薬保健研究域医学系

＜背景・目的＞

ナチュラルキラー細胞(NK 細胞)は、HLA を認識する受容体である KIR を有する。KIR は約 150kb ほどの領域に遺伝子クラスターを形成しており、活性型と抑制型に大別される 15 遺伝子と 2 偽遺伝子でコードされ、遺伝子の有無には個人差があることが知られている。実際に複数のハプロタイプのゲノム配列が決定され、ハプロタイプによって含まれる遺伝子数が異なる。ハプロタイプ間の機能的差異として含まれる活性型と抑制型の KIR の遺伝子数が個々で異なることから、これらのバランスによって NK 細胞の抑制と活性が調節されている。近年、組織適合性抗原 HLA 型に加え、キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)型を適合させることが移植の成功の鍵であることが明らかとなっている。同種造血幹細胞移植(HSCT)は NK 細胞の反応性に対する感受性が高く、ドナー由来の活性化 KIR 遺伝子は AML に対する同種 HSCT での再発を予防や死亡率の低下と関連する。同種 HSCT の成功のもう一つの鍵となる KIR についても NGS を用いた迅速なタイピング手法の開発が求められているが、現在おこなわれているのは PCR 法による増幅の有無によるタイピングのみで、KIR 領域のゲノム配列決定やそれに基づく多型解析法の開発のニーズは高いにも拘わらず、現在のところ全く報告がないのが現状である。

本研究では、“クリニカルシーケンス”の実用例の一つとして、次世代シーケンサー(NGS)による KIR ハプロタイプのタイピング手法の確立することにより HSCT の成績の向上を目指す。さらに、この手法を基盤にした KIR ハプロタイプの集団遺伝学的解析、霊長類 KIR 領域の比較ゲノム解析ならびに KIR と関連分子の相互作用の機能解析から免疫の進化を含めた KIR 関連免疫システムの理解を目的とする。

＜支援の内容＞

同種造血幹細胞移植成績向上を目指した、臍帯血バンクの移植ペア症例での KIR および HLA 領域のリシーケンス

＜支援によって得られた研究成果＞

2014 年の支援により 96 検体の KIR および HLA 領域のリシーケンスの支援を頂いた。すなわち、Immuno Polymorphism Database (IPD)の IPD-KIR ならびに IMGT/HLA にアレルが登録されている 42 遺伝子を対象に遺伝子全長をカバーするオリゴプローブ(ターゲット長 442 kb)を SeqCap EZ choice (ロシュ)でカスタムデザインし、96 検体のプレプールによるシーケンスキャプチャー法によりライブラリを調整した。ライブラリ作成には SureSelect QXT Kit(アジレント)を用い、MiSeq(イルミナ)にて計 600bp のペアエンドシーケンスを行った。このデータから既知 CNV を有する 8 つの KIR 遺伝子について depth によりコピー数の検出が可能であった。またコピー数が 1 である検体からハプロタイプとしての完全長遺伝子配列が決定された。実際に複数のハプロタイプのゲノム配列が決定され、ハプロタイプによって含まれる遺伝子数が異なること、これらの遺伝子の数を含む KIR ハプロタイプを本手法で決定できることを確認した。ハプロタイプ間の機能的差異として含まれる活性型と抑制型の KIR の遺伝子数が個々で異なることから、これらのバランスによって NK 細胞の抑制と活性が調節されていると考えられる。2014 年の支援によりシーケンス手法ならびにタイピング手法を確立するに至った。そこで、2015 年の支援により実際に移植に用いられた臍帯血バンクの移植ペア 960 症例の解析のシーケンスの支援を頂いている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援申請により HSCT の成績の向上が期待される KIR タイピング手法が確立された。NGS を用いた KIR ハプロタイプの高解像度のタイピングにより、臍帯血同種 HSCT におけるドナーとレシピエント間の KIR と移植成績の関連性を明らかにすることができれば、HLA に加えて KIR をタイピングする意義を提案でき、すみやかに同種 HSCT への応用、移植成績の向上が期待でき、臨床ならびに医学研究において大きな波及効果がある。

公募支援課題：2014 年度

異所性脂肪蓄積の遺伝素因と環境因子の検索と前向き追跡調査での検証

基盤研究（C）

堀田 紀久子・大阪大学医学部附属病院未来医療開発部

＜背景・目的＞

非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）には単純性脂肪肝から炎症や繊維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）まで含まれる。単純性脂肪肝は人口の約 20-30%に認められるが、NASH にまで進展するのは 2-3%である。これまでに NAFLD の GWAS を行い、発症・進展に関わる領域として *PNPLA3* 遺伝子を含む領域を同定した。GWAS で同定した NAFLD 感受性領域についてターゲット・リシークエンスを行い、詳細な解析を行ってきた。NAFLD 患者の多くは肥満であり、過食などの環境因子も重要である。NAFLD 感受性領域に存在する *PNPLA3*、*SAMM50*、*PARVB* 遺伝子上に存在する 4 個の CpG islands のメチル化を NAFLD 患者の肝臓から抽出したゲノムを用いて次世代シークエンサーにて解析してきた。*PARVB* 上流に存在する CpG26 のメチル化は繊維化が進行している症例で低下していた。*PNPLA3* 上流の CpG99 は繊維化が進行している症例でメチル化が増加し、*PNPLA3* mRNA 発現量も低下していた。この変化には *PNPLA3* 上の rs738409 の遺伝子多型が影響することを報告してきた。NAFLD の進行にゲノムのメチル化が関連していることが示唆されたので、全ゲノムのメチル化解析をイルミナ社の HumanMethylation450 BeadChip を用いて行った。

全ゲノムのメチル化解析を行ったのと同一肝生検組織から抽出した 60 症例分の RNA をゲノム支援によって次世代シークエンサーによる解析を行い、NAFLD 進行に重要な遺伝子の同定することを目的とする。

＜支援の内容＞

全ゲノムのメチル化解析を行ったのと同一肝生検組織から抽出した 60 症例分の RNA シークエンス実験結果の Fastq ファイルを頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

RNA シークエンスの Fastq ファイルを FastX によりアダプター配列除去後、TopHat にてマッピングを行い、Cufflinks にて発現量を計算した。Cuffdiff により発現変動遺伝子の同定を行った。Cuffdiff の結果を CummeRbund にて全体的な解析を行った。発現変動遺伝子は約 2400 存在していた。これらの遺伝子について、KEGG、Go Ontology、DAVID による pathway 解析を行った。さらに WGCNA による分子ネットワーク解析を行った。

発現している RNA に存在する遺伝子多型について Plink/seq による解析をおこなった。

繊維化軽度群と進行群ではクラスター解析（MDS 解析、dendrogram 解析）により発現パターンが異なっており、2 群に分かれることが判明した。これは病理学的によく使われている分類と一致しており、RNA 発現パターンと病理学的な結果を結びつける結果であった。

Pathway 解析にて発現変動遺伝子のうち繊維化の進行とともに増加する遺伝子は主に 2 種類の遺伝子群に分かれることが判明した。繊維化の進行とともに減少する遺伝子も主に 2 種類の遺伝子群に分類された。これらの遺伝子群は NAFLD の病態を反映する結果であり、NAFLD の病態が RNA 発現量に関連していることが示唆された。

その他にも NAFLD の進行に重要な遺伝子群を同定することができた。

Plink/seq による解析により、レアな遺伝子多型が集簇している遺伝子が存在していることが判明した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

NAFLD 繊維化進行に伴い発現が変動する遺伝子群の同定により、NAFLD の病態解明に近づいたと考えられる。発現変動遺伝子のうち現時点では機能が不明なものも多く存在し、今後は機能が不明な遺伝子についての検討が必要となると考えられる。また、発現変動遺伝子のうち最も上流に存在する key となる遺伝子を同定することにより、さらに詳細な NAFLD の繊維化メカニズムが明らかにされることが期待できる。

HumanMethylation450 BeadChip によるゲノムワイドなメチル化解析も行っており、発現変動遺伝子がゲノムのメチル化と関連しているのか検討できる。また、ゲノムワイド多型解析も予定しており、遺伝子多型、ゲノムのメチル化、RNA 発現解析を同一症例で検討することが出来るようになると考えている。RNA シークエンス解析では発現遺伝子の多型も同定できているので、germline との比較により somatic な遺伝子多型を同定することが出来る。

＜支援成果公表リスト＞

論文作成中

公募支援課題：2011 年度

バーコード導入型ベクターによる変異動物細胞解析システムの構築

挑戦的萌芽研究

堀江 恭二・奈良県立医科大学医学部

＜背景・目的＞

我々はこれまで、遺伝子トラップ法で網羅的に作製したヘテロ変異体 ES 細胞から、ホモ変異体を迅速に誘導する方法を開発してきた(Nature Methods 8: 1071-1077, 2011)。本手法では、テトラサイクリンシステムを用いて、マウス ES 細胞において Bloom 遺伝子を一過性に低下させ、細胞周期の 4N の時期に相同染色体間組換えを誘発し、細胞分裂の過程で両アレルともに変異アレルが引き継がれた娘細胞を単離する。本手法を用いて、これまでに約 2,000 株のヘテロ変異体と約 200 株のホモ変異体を単離済みであり、ES 細胞の分化誘導系を適用することで、多能性や初期分化を制御する遺伝子を同定してきた。しかし、多数の変異体の解析を個別に進めていては、培養、凍結、融解等の実験操作に要す労力が膨大化するため、現実的には解析の対象にできる変異体の数が極めて制限されることを痛感した。そこで本研究課題では、個々の細胞株を特異的な塩基配列（バーコード）で標識し、異なるホモ変異体をプールした細胞集団において効率的に表現型解析を行う手法を開発した。

＜支援の内容＞

60 塩基のバーコード配列を 2 コピーずつ有すレトロウイルスベクターを 87 種類作製した。次に、これらのレトロウイルスベクターを、既に単離済みのホモ変異体 ES 細胞、および野生型の ES 細胞へ導入した。これらの ES 細胞をプールし、様々な分化誘導実験を行ったのちに、ゲノム DNA を抽出した。バーコード配列を PCR で増幅後、ゲノム支援の協力を得ることで、次世代シーケンサを用いて各バーコード配列の read 数をカウントし、全てのバーコードに対する各バーコードの比率を計測した。この値の分化過程での変化が野生型 ES 細胞と異なる場合、そのバーコードで標識された変異体は表現型を有す可能性が高いと考えた。

＜支援によって得られた研究成果＞

実験計画段階で最も危惧されたのは、PCR による増幅効率の差により導入されるバイアスである。そこで、変異 ES 細胞を用いた実験を行う前に、バーコード導入用プラスミドを等量ずつプールした鋳型 DNA を調製し、それをマウスのゲノム DNA によって、1 細胞あたり 1 コピーのバーコードが導入された場合と同等になるように希釈した。この鋳型 DNA に対して、バーコード領域の PCR での増幅とシーケンスを独立して 3 回行った。その結果、異なるバーコード間の増幅効率は異なるものの、各バーコードの出現頻度の差は 3 回の実験においてほとんど差がなかった。これより、バーコードの定量性の再現性は極めて高く、当初危惧された PCR によるバイアスは問題にならないことが明らかとなった。

次に、バーコードを導入した ES 細胞のプールに対して、LIF 無しの血清含有培地を用いた多系譜への分化誘導、N2B27 無血清培地による神経系への分化誘導、OP9 フィーダー細胞を用いた中胚葉系への分化誘導を行った。分化異常をきたした変異細胞を特定するために、SSEA1（未分化細胞）、Flk-1（中胚葉系）、PSA-NCAM（神経系）などのマーカーの発現が高い細胞、或いは低い細胞を cell sorter で分離し、各細胞集団からゲノム DNA を抽出してバーコードの存在比率を計測した。その結果、易分化性を示す変異体、分化抵抗性を示す変異体、特定の系譜への分化異常を示す変異体、多系譜への分化異常を示す変異体など、様々なパターンの異常を示す変異体を特定できた。この中には、分化抵抗性を示すことが既に知られている Grb2、Ptpn11、Ctbp2 の変異体や、易分化性を示すことが知られている Nr5a2 の変異体も検出されており、本手法の有効性が証明された。また、LIF 無しの血清含有培地において分化抵抗性を示した変異体の中でも最も表現型が強かった 2 つの変異体は、原因遺伝子がコードするタンパク質が複合体を形成することが知られており、この点からも、本手法により機能的に意味のある遺伝子が同定されることが示された。一般に、分化誘導実験においては、たとえ同一の細胞株を用いた場合でも、実験ごとに分化効率が異なることが知られており、表現型の同定を困難にする要因のひとつになっている。一方、本手法では、全細胞をプールして培養するために、すべての変異体が同一の培養条件下で比較され、この点も実験精度の向上に寄与していると考えている。予想外の結果として、変異体を単独で分化誘導した場合と他の変異体との集団の中で培養した場合で表現型が異なるものも同定した。これは、この変異体の表現型が周囲の環境に依存することを示しており、通常の表現型解析では特定できない表現型をも明らかにできたと考えている。現在、本手法で同定した変異体の中でも、特に興味深いものについて、詳細な表現型解析を行っている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、バーコードを用いた変異体の表現型解析の定量性が極めて高いことが示された。さらに、変異体を集団として解析することで、個々の変異体の解析では同定できない表現型を明らかにできることも示された。近年、CRISPR/Cas9 システムをはじめとするゲノム編集技術の進展により、変異細胞のリソースは指数関数的に増加しており、これらリソースを有効活用するための新たな手法が望まれている。本支援で得られた知見は、膨大化する変異体を有効に活用するための指針になると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2012 年度

マウス ES 細胞の維持に必須な遺伝子群の網羅的探索

挑戦的萌芽研究

堀江 恭二・奈良県立医科大学医学部

＜背景・目的＞

我々はこれまで、マウス ES 細胞の多能性を制御する遺伝子群を、多数のホモ変異体の表現型をスクリーニングすることで、系統的に同定しようと試みてきた。具体的には、相同染色体間組換えを利用して多数のホモ変異体マウス ES 細胞を単離する技術を開発し、変異 ES 細胞株に対して種々の分化誘導を行うことにより、表現型を解析してきた（Nature Methods 8: 1071-1077, 2011）。しかし、ES 細胞自体の自己複製能や未分化性の維持に必須な遺伝子は、ホモ変異体の単離自体が不可能なため、新たな手法の開発が必須と考えるに至った。このような遺伝子に対しては、conditional に遺伝子を破壊し、破壊前後での表現型を比較することが有用と考えられる。

近年の CRISPR/Cas9 システムの登場により、遺伝子破壊を迅速に行うことが可能となった。多数の遺伝子を網羅的にカバーする guide RNA ライブラリも報告され、我々が対象としているマウス ES 細胞においても、全遺伝子を網羅した遺伝子破壊が可能となっている。しかし、これらの報告では、ライブラリを細胞へ導入した時点から恒常的に遺伝子が破壊されるため、マウス ES 細胞の自己複製能や未分化性の維持に必須な遺伝子に関する変異体は、解析時には既に細胞群から消滅しているため、定量的な評価が困難である。

そこで、本研究では、薬剤依存性に Cas9 が発現するベクター系を構築し、マウス ES 細胞の遺伝子を conditional かつ網羅的に破壊する実験系の構築を試みた。Cas9 の発現ベクターは、Cre 依存性に発現するように我々が独自に構築した。Cre には 4-hydroxytamoxifen（4HT）により制御される ERT2-Cre 融合蛋白を用いた。本来の目的である、「遺伝子破壊により消滅する変異体」を特定するためには、4HT 添加による遺伝子破壊効率が極めて高い必要あり、十分な評価実験が必要である。そこで、本研究ではまず、我々が構築したベクター系の効率の評価を行うことを目的として、破壊効率の低い遺伝子も含めて広く検出できるように、遺伝子破壊効果を positive に選択できる表現型解析を対象にした。具体的には、遺伝子破壊後に ES 細胞を分化誘導し、分化抵抗性を示した細胞群を積極的に選択した。guide RNA 領域の PCR での増幅と次世代シーケンサによる guide RNA 配列の定量により、分化抵抗性に寄与した変異遺伝子を特定した。

＜支援の内容＞

4HT で活性を制御できる ERT2-Cre 融合蛋白遺伝子を、恒常的な遺伝子発現で実績のある Rosa26 遺伝子座へ knock-in したマウス ES 細胞に対して、約 19,000 個のマウス遺伝子をカバーする guide RNA ライブラリを導入した。4HT を添加して Cas9 を conditional に発現誘導することで、guide RNA による遺伝子破壊を誘導した。さらに、4HT を添加した細胞群と未添加の細胞群の各々に対して、無血清培地 N2B27 において、複数の条件で分化誘導を行った。分化誘導に抵抗性を示した細胞を、Gskb/Mek inhibitor と LIF を添加した N2B27 無血清培地で選択した。分化誘導と分化抵抗性細胞の選択を 4 回繰り返し、分化誘導前と分化誘導後の各点でゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA から guide RNA 領域を PCR で増幅後、本ゲノム支援によって、次世代シーケンサで各 guide RNA の read 数を計測した。各 guide RNA 配列に対応する遺伝子の同定も、本ゲノム支援の協力を得て遂行し、分化誘導を繰り返す過程で濃縮される変異体を特定した。

本ゲノム支援からは、シーケンスと情報解析のみならず、シーケンスに至るまでのサンプル調製の方法についても、多くのご支援をいただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

分化誘導を繰り返すごとに様々な変異体が濃縮されていく過程を、次世代シーケンサを用いた guide RNA 配列の出現頻度の推移により、定量的に計測できた。複数の分化誘導系の評価を同時に行えたことは、各変異遺伝子の分化過程における役割を系統的に理解する上で有用であった。我々の実験系の特徴である 4HT 添加による遺伝子破壊誘導の効果の有効性も示すことができた。本実験では、guide RNA ライブラリの構築を 3 回行っているが、ライブラリ中の各 guide RNA 配列の read 数の計測によって、ライブラリの質的評価も行うことができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、CRIPSR/Cas9 ライブラリによる遺伝子破壊を、培地への 4HT 添加により conditional に行えることが証明された。今回の実験では、モデル実験系として、分化誘導に対して抵抗性を示す変異体の同定を行ったが、このような表現型の同定は、表現型を示した変異細胞を積極的に選択することが可能なので、conditional な遺伝子破壊は必ずしも必須ではない。Conditional な遺伝子破壊が必須となるのは、遺伝子破壊によって変異細胞が細胞集団から速やかに消滅される場合である。この場合、消滅した変異細胞を特定するためには、消滅前にその変異細胞が存在したことを定量的に計測しておく必要があり、conditional な遺伝子破壊の重要性が高くなる。分化誘導後の特定時期での遺伝子破壊が必要な場合にも、conditional な遺伝子破壊法は有効であろう。今回の支援によって確立した conditional な遺伝子破壊の実験系は、益々広がりをみせる CRISPR/Cas9 システムの応用性を高める上で有用と考える。

＜支援成果公表リスト＞

無し

公募支援課題：2013 年度

ゲノムコピー数低下領域に特化した日本人若年糖尿病の発症機構の解明

基盤研究（B）

堀川 幸男・岐阜大学医学部附属病院

＜背景・目的＞

我々は２型糖尿病のインスリン分泌不全を解明するために、単因子モデルである若年糖尿病 MODY(maturity-onset diabetes of the young)の成因解明を行ってきた。分子遺伝学的な解析により、現在までに６種類の主たる原因遺伝子が同定されている(MODY1-6)。欧米人ではこれらが MODY 全体の 80%を占めるが、日本人では 25%に過ぎず、75%が未知である。我々は全エクソンシークエンスに続く候補変異の絞り込みと、これに加えて、シークエンス時に得られた多型情報からの連鎖解析を合わせて進めることにより、真の MODY 遺伝子変異の効率のいい同定を目指している。そして最終的に変異タンパクの機能解析により、糖尿病におけるインスリン分泌不全の発症機序に関する新たな理解を得るとともに、新規 MODY の臨床像を確立する。

＜支援の内容＞

我々は、準備実験で 2 家系の 13 名の全エクソンシークエンスを施行した。候補変異の絞り込みの結果、MODY 罹患状態と矛盾しないそれぞれ 48, 144 個の遺伝子変異が同定された。ところが、別の 30 家系についてこれら候補遺伝子の変異を検討したところ、家系間で共通する候補遺伝子は認められなかった。これは家系間で原因が異なる、いわゆる Locus Heterogeneity によるものと考えられた。そこで”新規 MODY 遺伝子の同定”の為には、なるべく家系情報の多い多数の MODY 家系の全エクソンシーケンスを進めることが結局近道であると判断した。そのため、本支援では新規に獲得した家系人数の比較的多い MODY 家系 3 家系の 30 サンプルについて全エクソンシーケンスを行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

新規に取得できた 18 名で構成される MODY 大家系ならびにそれぞれ 3 名、4 名および 5 名で構成される 3 家系の MODY 家系の全エクソンシークエンス解析を試行した。検出されたエクソンの多型･変異から、非同義置換、スプライスサイトの塩基置換または挿入欠失を選択し、次いで The Human Genetic Variation Database における日本人 1,208 名の頻度情報からレアバリアントを選択、家系内 co-segregation から原因候補となる変異を検索した。加えて、エクソームの結果から HapMap の SNPs を抽出、連鎖解析を実施し、これまで解析してきた家系も含めた高 LOD スコアを示すゲノム領域の同質性・異質性を精査した。その結果、染色体 9 番と 22 番にモデルを超えた共通のピークを認め、それぞれ 12 個、14 個の候補アミノ酸変異を獲得した。本手法は、希少疾患では一般に有効だが、我々が対象とする MODY では若年発症の 2 型糖尿病との差別化が難しいという困難な問題が存在するので、時に罹患状態を適宜変えながら、変異の絞込みを進める必要があったが、これは非常に時間と手間がかかる作業であった。そこで本課題のために、連鎖における不完全浸透率を考慮しており、罹患状態の設定変更にも強くレア変異も落としにくく、アミノ酸変異、家系内連鎖解析、変異アリルの頻度解析を統合した尤度比検定に基づく pVAAST という解析プログラムを設定・使用した。浸透率の下限値を高く設定する必要がある小家系では、確かに従来の手法と結果は同様だが、Polyphen2 や SIFT の値に基づいて実際にランキングにしてくれるので、上から順に検討できるようになった。一方、大家系では高い LOD スコアを示す変異が優先されてランキング上位に来るものの、アミノ酸変異の影響が大きい変異は LOD が低くてもそれなりに上位に来るので、これまでのフィルタリングではとらえることができなかった候補遺伝子も獲得できるようになった。実際大家系では、浸透率を 0－1 で変化させることによって、一度の解析で全体像を見ることができるようになった。そこで本 MODY 大家系の浸透率の下限値を 0.95 にしたところ、候補遺伝子変異が 3 個に絞り込めた。さらに正常コントロールを 24 名から最終的に 197 名にしたところ候補遺伝子変異を 1 つに絞り込むことができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今後、家系間で原因遺伝子が異なる、いわゆる Locus Heterogeneity の MODY での貢献度についての知見が得られることが期待されるので、他の少人数 MODY 家系でも検証を進めていく。新規 MODY 遺伝子の同定は、変異タンパクのインスリン分泌不全惹起機構の解明に繋がり、その後の詳細な臨床表現型を用いた病態解析により、新規 MODY の臨床像の確立が期待される。また個々の MODY 家系にとっては、遺伝子変異を同定し、その変異と表現型の関連を見いだす事は、早期診断や遺伝カウンセリングを可能にするとともに、オーダーメイド医療を可能にする。
インスリン分泌機構について知見が集積されてきたが、依然インスリン分泌予備能の民族差を明快に説明する遺伝素因は不明である。欧米人で認められるインスリン抵抗性ではなく、インスリン分泌不全が日本人コモン 2 型糖尿病病態の本質であることも疑いなく、新規 MODY 遺伝子同定からインスリン分泌不全病態解明までの本研究知見は、その病態解明や治療法の開発に展開し貢献する事は疑いない。

＜支援成果公表リスト＞

塩谷真由美、他
遺伝子異常による糖尿病
糖尿病学　西村書店　pp250-256, 2015

公募支援課題：2011 年度

染色体の空間的配置と組織特異的遺伝子発現制御機構の解明

若手研究（B）

堀家 慎一・金沢大学学際科学実験センター・ゲノム機能解析分野

＜背景・目的＞

15q11-q13 領域は，ゲノム刷り込み遺伝子が複数存在する代表的なゲノム刷り込み領域であり，父性発現遺伝子の異常によるプラダーウィリ症候群(PWS)，母性発現遺伝子の異常によるアンジェルマン症候群（AS）の発症が知られている。程度の差はあるものの共に精神遅滞が認められ，特に AS は自閉症と共通の症状が認められることなどから，自閉症への 15q11-q13 領域の刷り込み遺伝子の関与もまた強く示唆される。しかしながら，これまでに精神遅滞などの脳機能障害の原因遺伝子の同定には至っていない。近年，15q11-q13 領域に存在する低分子核小体 RNA（snoRNA）と精神発達障害との関連が指摘されている。一般に，snoRNA は rRNA の成熟に関与する低分子 RNA であり，リボースのメチル化（box C/D 型）やウリジン残基の擬ウリジル化（box H/ACA 型）を手助けする役割を果たしていることが知られているが，15q11-q13 領域に存在する HBII-52 snoRNA は脳特異的に発現し，セロトニン受容体 5HT-2C 前駆体 mRNA の RNA エディティング部位及び選択的スプライシングを制御し，PWS や自閉症の発症機序に関わっている可能性が指摘されている。

そこで，本研究ではヒト 15 番染色体を 1 本保持したトランスクロモソミックマウス（Tc マウス）を作出し，その脳組織における遺伝子発現プロファイルを RNA-seq 解析により正常マウスのものと比較し，HBII-52 の過剰発現に伴うスプライシング異常を網羅的に明らかにする。Tc マウスに保持されたヒト染色体は，組織特異的・時期特異的遺伝子発現を受け，HBII-52 の脳特異的遺伝子発現もまた Tc マウスで維持されている。本 Tc マウスは，これまで難しかった生理的条件下での snoRNA の過剰発現を可能にし，さらに神経発達障害の原因となりうるスプライシング異常の同定に有用であることが期待される。

【資料編】

＜支援の内容＞

近年，社会問題となっている自閉症のモデルマウスになるヒト 15 番染色体を保持したマウスでどのような遺伝子のスプライシング異常があるのか，次世代シークエンサをもちいた解析によって明らかにする。そこで，正常マウス 3 匹，ヒト 15 番染色体を保持したマウス 3 匹において，RNAseq の解析を行った。取得した RNAseq の raw data を，Tophat -> Cufflinks (Cuffdiff)というパイプラインにかけ，どのようなスプライシング異常があるのか検討した。

＜支援によって得られた研究成果＞

ヒト 15 番染色体を保持したマウスで，27 遺伝子のスプライシングパターンに異常をきたしていることが明らかとなった。現在，これらのスプライシング異常を示した遺伝子の機能と脳機能との接点を解析中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

自分たちだけでは，なかなか次世代シークエンサを用いた解析を行うのは困難であるが，本支援の結果，たいへん有意義に次世代シークエンサを使用できる機会を与えて頂き，今後，さらに次世代シークエンサを使った実験計画をたてられるようになった。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2011 年度

シングルセル・ゲノミクスの確立による環境微生物の遺伝子資源化と生態系解明

最先端・次世代研究開発支援プログラム

本郷 裕一・東京工業大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

シロアリの高効率な木質分解能力の大部分は、腸内共生微生物群集の活動によるものである。その微生物群集はシロアリに特異的な原生生物、真正細菌、古細菌で構成され、原生生物が細胞内と細胞表面に特定の原核生物を共生させる多重共生系を構築している。これらの微生物は現時点で培養不能であり、共生機構の解明はゲノム解析を含む分子生態学的手法に拠らざるを得ない。

イエシロアリ（*Coptotermes formosanus*）は世界的な木材の大害虫で、その木質分解は腸内原生生物 *Pseudotrichonympha grassii* が主に担っている。その細胞内に共生する *Candidatus* Azobacteroides pseudotrichonymphae（Bacteroidales 目細菌）の完全長ゲノム配列解析は既に完了している（Hongoh et al. 2008 Science）。同ゲノム解析により、*Ca.* A. pseudotrichonymphae は窒素固定、窒素再利用、アミノ酸・ビタミン合成、水素吸収などで、宿主原生生物と宿主シロアリの生存を支えていることが示唆された。

本郷は、この多機能共生体の存在こそが、イエシロアリが世界的大害虫として繁栄できる理由だと考察したが、同様の腸内共生複合体を持つミゾガシラシロアリ科の他種シロアリは害虫ではなく、あるいは少なくともイエシロアリのような深刻な害虫ではない。そこで、ミゾガシラシロアリ科各属のシロアリ種の腸内原生生物 *Pseudotrichonympha* spp.が保有する細胞内共生 *Ca.* Azobacteroides 細菌の比較ゲノム解析を行うため、ゲノム配列取得支援を依頼した。

＜支援の内容＞

Ca. Azobacteroides spp.も宿主原生生物の *Pseudotrichonympha* spp.も培養不能種であるため、まず原生生物を 1 細胞だけマイクロマニピュレータで分取し、その細胞内に含まれる共生細菌から等温全ゲノム増幅法によって DNA サンプルを調製した。計 8 サンプルについて、Illumina MiSeq (v1)による、各 2 Gb 程度のペアエンド配列取得を依頼した（遺伝研、豊田敦特任准教授）。得られた配列断片の情報解析と PCR による gap closing は自前で行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られたゲノム配列を解析したところ、8 サンプル中 2 サンプルで、*Ca.* Azobacteroides 細菌の環状染色体配列再構築に成功した。残りのサンプルについては、サンプルに内在する（木片などの）コンタミネーション量が多く、また当時は MiSeq の read 長が 150 bp しかなかったこともあり、解析に使用可能な品質のゲノム配列は取得できなかった。

解読済みであったイエシロアリの *Ca.* Azobacteroides pseudotrichonymphae ゲノムと比較したところ、ミゾガシラシロアリ科他属に共生する *Ca.* Azobacteroides 細菌は、窒素固定能など大部分の主要な代謝系を共有していたものの、驚くべきことに F-type ATPase を欠損していた。イエシロアリの *Ca.* Azobacteroides pseudotrichonymphae は、宿主原生生物の細胞質から木質加水分解産物である単糖を取り込み、酢酸に発酵して ATP を産生する。この反応に（NAD^+再生産のため）共役する形でフマル酸呼吸を行い、プロトン勾配を利用した F-type ATPase による効率的な ATP 産生も行う。これにより、一分子の N_2 を $2NH_3$ にするのに 16ATP も必要とする窒素固定反応を推進可能だと考えられる。ところが、今回解読したゲノム情報に基づく代謝系予測では、フマル酸をコハク酸に還元できるものの（これができないと発酵不能）、フマル酸呼吸による ATP 産生は不可能であるため、結果として窒素固定能力はかなり減退していると予想された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本ゲノム支援でゲノム配列を取得するまでは、*Ca.* Azobacteroides 細菌は、宿主シロアリ属によらず、ほぼ同様の機能を保有すると予想していたのだが、大きな相違が発見された。本支援では残念ながら 2 サンプルしか解析可能な品質の配列を得られなかったが、その解読結果は、網羅的な比較ゲノム解析に再挑戦する動機を与えてくれた。

ゲノム支援の後、新たに全ゲノム増幅サンプルを調製し、*Ca.* Azobacteroides 細菌の網羅的比較ゲノム解析を継続中である。これまでに、別属の宿主シロアリ種から取得した *Ca.* Azobacteroides 細菌ゲノムは、窒素固定遺伝子オペロンと F-type ATPase の両方を喪失、あるいはさらに別属シロアリ種由来の *Ca.* Azobacteroides 細菌では、窒素固定オペロンを喪失するが F-type ATPase は保持する、など重要な相違が見出されている。

現在、宿主シロアリの生理・生態調査も行っており、本ゲノム支援で得られた結果は、さらに大きな比較ゲノム・ゲノム進化学的研究へと発展している。成果はまだ論文化していないが、途中経過を発表した国際学会では、ポスター賞を受賞している（2013, 第１８回国際窒素固定会議）。

＜支援成果公表リスト＞

論文準備中である。

公募支援課題：2011 年度

腸内環境と免疫システム構築の統合的理解とその応用

最先端・次世代研究開発支援プログラム

本田 賢也・東京大学大学院医学系研究科 （現所属）慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室

＜背景・目的＞

制御性 T 細胞(Treg 細胞)は免疫を抑制する機能を持つ。免疫疾患や自己免疫疾患では、過剰な免疫反応に対して Treg 細胞による抑制がうまく働かない(Treg 細胞の数が少ない)ことが、その発症の一要因と考えられている。このため Treg 細胞数を人為的にコントロールすることは、免疫系疾患の治療や軽減・予防につながると期待される。申請者らはマウスを用いた実験から、マウス腸内細菌種のうちグラム陽性菌で芽胞を形成するクロストリジウム属菌が Treg 細胞の誘導に必須であることを解明したが（Science, 2011)、ヒトおける Treg 細胞誘導菌種は未同定であった。本申請では、ヒト糞便細菌を定着させ Treg 細胞誘導がみられたマウス腸内容物の菌種組成を、次世代シーケンサーを用いた網羅的 16S 解析することでヒト由来 Treg 細胞誘導菌株の同定を試みた。

＜支援の内容＞

制御性 T 細胞を誘導するヒト腸内細菌種を同定するため、健常人の便からスタートし、腸内容物をクロロホルム処理と希釈処理を加えながら、連続的に無菌マウスに移植していった。その間、Treg 細胞が誘導されたマウスを選択して行くことにより、Treg 細胞誘導細菌をマウスにおいて濃縮していった。各ステップのマウスの腸内細菌叢の菌種組成を明らかにするため、ゲノム支援において、次世代シーケンサーを用いた網羅的 16S 解析の支援をうけた。各糞便検体より抽出した細菌叢のゲノム DNA の 16S rRNA 遺伝子 V1-2 領域を PCR 増幅後、高速シークエンサーである 454 GS FLX Titanium (Roche 社)を用いたバーコードシークエンシングに供与することで、1 検体あたり平均 10,000 リードの配列データを取得した。得られた配列データの情報学的解析(Operational Taxonomic Unit: OTU 解析、OTU 代表配列のデータベース照会による菌種帰属)を介して細菌叢の菌種組成を求めた。

＜支援によって得られた研究成果＞

菌種を絞り込むための一連の作業を繰り返した結果、最終的には少なくとも 23 種類からなる Treg 誘導能をもつヒト由来細菌を混合物として分離した。この細菌混合物から個々の菌を分離培養することを試み、最終的に 17 菌種の培養に成功した。分離した 17 菌種を混合し、無菌マウスに投与したところ、その Treg 誘導能は 23 菌種の混合物とほぼ同程度の Treg 誘導能が認められた。今回発見した 17 菌種の全ゲノム配列を解析した結果、17 菌種はすべてが Clostridium 属細菌であり、そのうち 5 菌種は既知の菌種と系統的に遠縁にあたる新菌種であることが明らかになった。今回分離した 17 菌種のすべてが Clostridium 属のサブグループ XIV、XVIII、IV に属していた。また、17 菌種を投与したマウスは、非投与群に比し腸炎及び下痢を有意に抑制することも示された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

制御性 T 細胞を強力に誘導する 17 菌株のヒト腸内細菌種を同定・単離することができた。これらはアレルギーや腸炎マウスモデルにおいて抑制効果があったため、アレルギーや炎症性腸疾患に対する新たな治療法として臨床応用出来る可能性がある。

＜支援成果公表リスト＞

Atarashi, K. et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. Nature 500, 232-236, (2013).

公募支援課題：2013 年度

ソシオゲノムの進化：カースト分化を規定する遺伝子群の解明

新学術領域研究

前川 清人・富山大学大学院理工学研究部（理学）

＜背景・目的＞

動物には，極めて高度な社会性を獲得したグループが存在する。アリ・ハチ類（約 1 万種）とシロアリ類（約 2,600 種）が，種数の上で他を圧倒する存在である。彼らは，後胚発生の過程で，遺伝的にはほぼ同一の兄弟姉妹から明確に役割と形態の異なるカースト（生殖虫・兵隊・ワーカー）を分化させ，それらのカースト間の分業体制を維持することで適応度を高めている。つまり社会性昆虫がもつゲノム（＝ソシオゲノム）には，「1 つの設計図」のなかに複数の表現型（カースト）の設計図が織り込まれており，個体としての表現型が協調して「コロニーという総体」を作り上げる設計図をも織り込まれているという点で，他の生物と一線を画す。特にシロアリでは，各カーストの役割や形態が特殊化しているため，コロニーから各カーストを切り離して維持することは不可能である。したがって，進化の過程では，各カーストを特徴づける形質と，協調や分業をもたらす複数の因子がほぼ同時に獲得されたと考えられるが，それらの実体（遺伝子）は未だ明らかではない。近年，彼らが示す複雑な社会行動の分子基盤を総合的に明らかにすることを目指す融合科学（ソシオゲノミクス）が注目されているが，これまではゲノム解読で先行するアリ・ハチ類が中心となってきた。それらとは完全に独立に社会性を獲得したシロアリでのゲノム解析は，研究者人口の不足やゲノムサイズが大きいなどの理由から大きく立ち後れてきたのが現状である。そこで本研究は，シロアリにおいて，他に類を見ない高品質かつ高解像度のゲノムデータを取得して，各カーストを生じさせる遺伝子および遺伝子産物の相互作用を特定すると共に，カースト間の協調をも制御するソシオゲノムの構造や進化過程を明らかにすることを目指した。

＜支援の内容＞

まず，日本最普通種であるヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus* を用い，ヘテロ接合度の低いことが予想される個体から高純度の DNA を抽出した。次に本支援のサポートを受けて，抽出した DNA のメイトペアライブラリー（3k, 5k, 8k, 10k）の作製とシーケンスを行った。また，共同研究者（重信准教授）が中心となり，基礎生物学研究所にてペアエンドライブラリー（250 と 800bp）の作製とシーケンスも行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

シーケンスされたデータを元に *de novo* genome assembly を行った結果，予想ゲノムサイズは 924 Mb であり，number of contigs: 63,310，number of scaffolds: 5,817，scaffold N50: 1,967 kb, contig N50: 37.5 kb, total scaffold length: 881.3 Mb となった。動物門で広く保存されている全ての *Hox* 遺伝子が，同一の scaffold 上にタンデムに並んでいることも確認された。次に，*de novo* prediction および evidence-based prediction により遺伝子予測を行った。現在，遺伝子モデル OGS1.0 をリリースしており［number of genes: 15,591, N50: 2,103, total bases: 21,604,383 (21.6 Mb)］，このモデルを元に，各種ホルモンやセルラーゼ関連遺伝子など，約 20 のカテゴリーに分けてアノテーションを進めた。アノテーションの結果を遺伝子モデルにフィードバックさせることで，より高品質なモデルを構築することができた。

続いて，各カースト（生殖虫・兵隊・ワーカー）間の雌雄別の発現遺伝子と，各カースト分化時に特異的に働く遺伝子および遺伝子発現の変化を RNA-seq で解析した。特に後者の解析では，これまで全くのブラックボックスであった分化過程の初期の遺伝子発現に注目した。各カーストの分化を誘導し，分化前後と分化過程の個体（頭部と胸腹部を別々に 3 コロニー分 72 ライブラリー）を解析に用いた。その結果，各カーストの形態を特徴付ける形態形成因子やその上流にある発生運命決定に関与すると考えられる遺伝子が特定された。更に，各カースト分化過程で特異的に発現する遺伝子のうち，カースト分化の中枢因子である幼若ホルモン（JH）に関連する遺伝子の数は，ワーカー分化過程では少なく，兵隊や生殖虫の分化過程では顕著に多く見られた。異なる遺伝子や同一遺伝子の別コピーが，それぞれ特異的な部位で発現することも明らかになった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまでゲノミクスがほとんど進展していなかったシロアリ類において，高品質かつ高解像度のゲノム配列を解読することに成功した。現時点で既に 2 種のシロアリのゲノムが報告されているが，本種は系統的・生態的に，またゲノムサイズもそれらのほぼ中間にあたり，温帯域での家屋害虫として応用的にも重要なグループである。本研究により，シロアリでも比較ゲノミクスを遂行することができるリソースが整ったと言える。今後，各個体での Bisulfite sequencing を行うことにより，本研究での RNA-seq の結果と付き合わせて，各カースト分化時に如何なる遺伝子がメチル化されるのかなど，シロアリにおけるエピジェネティック解析を強力に進めることもできるだろう。更に，本種で明らかになった各カーストの分化を規定する候補遺伝子について，ゲノム構造や発現調節部位，遺伝子重複や co-option の程度，アイソフォームの機能などの情報を，他種のシロアリやシロアリの姉妹群（キゴキブリ）と比較解析することで，シロアリ系統内で生じた多様化やソシオゲノムの進化を総合的に理解できるようになると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

・林良信 他．しろあり，164: 2－11 (2015).
・複数の投稿論文を準備中

公募支援課題：2014 年度

B 細胞最終分化系譜における非コード RNA 発現制御機構の解析

基盤研究（C）

前田 和彦・大阪大学免疫学フロンティア研究センター・微生物病研究所

＜背景・目的＞

獲得免疫を担う抗体は、多様な抗原に対してレパートリーを備えている。抗体産生細胞は、胚中心 B 細胞を起点にプラズマ細胞、あるいは記憶 B 細胞へと分化するが、どのような仕組みで抗体産生能を長期に維持しているのかは明らかではない。この分化過程では、成熟 B 細胞で特異的発現する活性型シチジン脱アミノ化酵素（AID）を介した分子制御機構が必須である。抗原刺激を受けた B 細胞は、末梢リンパ組織の胚中心において、免疫グロブリン(Ig)の V 領域に体細胞突然変異（somatic hypermutation; SHM）の誘導、S 領域を介して IgM から IgG などの他のクラスへとスイッチ(class switch recombination; CSR)をする。SHM/CSR には活性型シチジン脱アミノ化酵素 AID による C→U 変異導入が必須である。AID の cofactor として機能する GANP は、タンパク質、DNA、RNA レベルで AID を起点とした分子機構に関与することが示唆される。本研究の目的は、GANP の RNA 認識に着目して、どのような仕組みで B 細胞最終分化系譜において miRNA/mRNA の発現変化を引き起こすのか、なぜ選択的 miRNA/mRNA の発現と核外輸送が行なわれているのかという分子基盤の解明を目指す。

＜支援の内容＞

本支援研究では GANP と脱アミノ化酵素 AID/APOBEC の未解明な基礎研究を進めるため、「GANP の標的 RNA の決定とゲノム結合領域の探索」を行う。大規模ゲノム情報生産支援活動の A ゲノム配列解析「ChIP-seq 解析」及び B トランスクリプトーム解析の「新型シーケンサによる RNA-seq 解析」の支援を受けた。対象生物はヒト Ramos B 細胞株で、異なる二種類の抗体による ChIP-seq（3 検体）と RIP-seq（3 検体）、Pull down-seq（3 検体）を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

N 末及び C 末に対する抗 GANP 抗体による ChIP-seq では、N 末抗体を用いた検体では約 2,800 万リード、C 末抗体を用いた検体では 3,500 万リードが 96%以上の品質でリード数を達成した。ゲノムマッピングでは、N 末抗体検体で 78%、C 末抗体検体で 10%のカバレッジであった。C 末抗体を用いた Ramos B 細胞由来細胞可溶化溶液に対するウエスタンブロット法の結果、数本の短い GANP 分子が同定された。この知見は、ヒト細胞ではショート型 GANP の存在が確認されていることと一致している。C 末抗体の ChIP-seq 解析の結果、miR-17-92 を含む 3,7,13,17 番染色体上に有意に enrichment していることが認められた。このことは、C 末抗体による GANP のゲノムアクセスに、何らかの選択性があることが示唆された。

一方、同じく RIP-seq では、二つの抗体ともに約 5,000 万リードを得た。リボソーム RNA が約 85%を占め、ユニークヒットは約１%であった。RPKM 値 0 以上を得た遺伝子は約 7,000 を数え、RPKM 値 50 以上では、N 末抗体で約 45 遺伝子、C 末抗体で約 65 遺伝子であり、ほぼ共通の遺伝子がヒットしていた。その多くは、非コード RNA や miRNA であった。当初予測していた遺伝子群を含め、多くの RNA 種が検出された。さらに、Cap-dependent mRNA の捕獲対象として m7 結合 RNA 抽出を行ったが、不明瞭な結果になった。

次世代シーケンスを用いて得られた配列情報が、有意かどうかについて、バイオインフォマティクス解析を展開するとともに。個別遺伝子を絞って検証を進めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

遺伝子変異導入は、抗体の多様性において必須メカニズムである一方で、その逸脱は我々の体細胞のゲノムに傷を入れる危険性を孕んでいる。近年、シチジン脱アミノ化酵素によるゲノム変異蓄積ががん発症前患者で認められている。内在性 AID/APOBEC 分子の標的化を解明することによって、体細胞ゲノムに変異を入れずに発がん・感染を阻止することが可能ではないかと考えられる。GANP にはゲノムアクセス領域に選択性があることが示唆されたと共に、種々の RNA と結合することが見出された。この知見は、さらなる展望としてこれらの RNA 種が、どのよう遺伝子変異導入のステップで作用しているのか、さらに詳細な解析が必要であるものと考えている。近年、AID の抗体遺伝子座アクセスには、AID がガイド RNA として抗体遺伝子座で発現しているアンチセンス RNA を利用しているのではないかという報告もある。B 細胞の正常分化過程においても、精緻な RNA 制御機構が、SHM や CSR 等の抗体遺伝子多様性獲得機構に必須であることが強くされていることを解明していくことが必要であると考えられる。また、RNA 代謝制御機構の破堤は AID/APOBEC を介した発がんを誘発するという知見からも、GANP 及び AID/APOBEC を取り巻く分子制御機構をひも解く上では、さらに基質となりうる核酸 DNA/RNA がどのようなスイッチがオン・オフして作用しているのか、GWAS 解析を踏まえながら展開して行く必要があるものと考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2013 年度

ウミウシの盗葉緑体現象に注目した遺伝子水平伝播による複合適応形質の伝播機構の解明

新学術領域研究

前田 太郎・基礎生物学研究所　共生システム研究部門

＜背景・目的＞

軟体動物ウミウシ類の一部の種は、藻類の葉緑体を細胞内に取り込み、光合成を行う（盗葉緑体現象）。通常の藻類では核にコードされる光合成関連遺伝子が、光合成に必須である。先行研究では、これらのの藻類核の遺伝子がウミウシ核に水平伝播していると考えられていたが、ウミウシのゲノム解読はなされておらず、本当にウミウシのゲノム中に藻類由来の遺伝子が存在するかは不明確であった。

＜支援の内容＞

ウミウシのゲノムを解読し、藻類からの遺伝子水平伝播の有無を検証するために、ウミウシ類チドリミドリガイ(*Plakobranchus ocellatus*)とコノハミドリガイ*(Elysia ornata*) のゲノムシーケンシングを支援して頂いた。具体的には、illumina型シーケンサーによるペアードエンドシーケンシング（インサート長250 bp, 600 bp）及びメイトペアライブラリ(3 kbp, 5 kbp, 10 kbp)の作成、及びシーケンシングランを実施して頂き、生データを頂いた。さらに遺伝子領域を決定するためのRNAseqデータを獲得して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

藻類遺伝子の水平伝播は検出されない

ゲノム支援によって、チドリミドリガイとコノハミドリガイについて良好なゲノム解読を獲得できた。しかし藻類に由来する遺伝子は見つからず、今まで考えられていた、水平伝播よる光合成活性の維持機構を否定する結果を得た。すなわち、ウミウシ中には光合成に必要な遺伝子の大部分がDNA・RNAレベルでは存在せず、にも関わらず光合成活性を数ヶ月にわたって維持することが示された。新たな分子機構として、ウミウシに取り込まれる前に藻類中で作られた光合成タンパク質の維持などが考えられた。

ウミウシ側の盗葉緑体関連遺伝子候補を選出

他の軟体動物と比較して、ウミウシで特異的に100倍ほどに遺伝子重複している遺伝子群を発見した。さらに、組織間の比較RNAseq解析の結果、これらの遺伝子が、葉緑体の局在する腸管中で有意に高発現することも確認され、これらの遺伝子がウミウシ中での藻類由来タンパク質の長期間保持に関連していることが示唆された。また、これらの遺伝子のいくつかにはタンパク質のN端側に、葉緑体への輸送を促す 数十個の特徴的な配列「葉緑体移行シグナル」が付加されていた。これらのシグナルが動物細胞中でも働いているのかは、今後の解析が必要である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

盗葉緑体現象は藻類遺伝子の水平伝播ではなく、葉緑体中に存在するタンパク質の水平伝播（流用）によることが示唆された。これはタンパク質の伝播によって形質が直接伝播するという新しい形質進化機構の可能性を示唆している。また、ウミウシが本来持っている遺伝子のいくつかが、光合成活性の維持に関与することが示唆された。今後、これらの遺伝子に着目した分子生物学的解析によって盗葉緑体現象の機構が明らかになると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

Whole kleptoplast DNA sequences and their transcriptomic profile in Plakobranchus ocellatus (Gastropoda). The intron may be a key to plastid longevity in sea-slug.
投稿準備中

公募支援課題：2013 年度

永久歯先天性欠如の空間的制御機構を解明するための変異タンパク質立体構造解析

挑戦的萌芽研究

槇 宏太郎・昭和大学歯学部

＜背景・目的＞

永久歯先天性欠如は、顎顔面領域に見られる最も頻度の高い疾患の一つである。特に下顎前歯先天欠如は日本人に多いとされる。一方、申請者らはヒトゲノムにおけるすべてのエクソン領域の配列を決定し、原因変異を同定する先進的手法である “Exome sequencing（全エクソンシーケンス)”から、下顎前歯先天性欠如の原因と考えられる興味深い候補 3 遺伝子変異を同定した（未発表データ)。本申請課題では他の罹患者についてこれらの変異の存在を確証するとともに、タンパク質立体構造解析から永久歯先天性欠如に認められる空間的制御機構（原因変異が永久歯先天性欠如の歯種の違いを生み出す機序）について解明することを目的とする。

＜支援の内容＞

下顎前歯の先天欠如を有する他の家系ならびに孤発例　計 24 名について超高速シーケンサを用いて exome/target sequence capture による二次的な解析および variation についての functional annotation の支援

＜支援によって得られた研究成果＞

下顎前歯先天欠如はパノラマX線写真により診断した。日本人と韓国人の第 3 大臼歯を除く 1 歯または 2 歯の下顎前歯のみに先天欠如を有する 1 家系 32 孤発例を対象者とした。先天異常を有するものは除外した。優性遺伝形質を呈する罹患者 3 名を含む日本人 1 家系ならびに 32 孤発例について本支援による解析を含む全エクソンシーケンスを実施した。

アミノ酸変異がタンパク質の機能にあたえる影響を予測する SIFT、PolyPhen2 による検索から 12 候補変異が抽出された。これまで永久歯先天欠如を惹起することが既に知られている MSX1、PAX9、AXIN2 などの候補遺伝子内変異の有無を確認した。32 検体中 5 検体が AXIN2 に変異を認めた。 一方、6 検体にカルシウム依存性の細胞接着分子をコードするこれまで先天欠如に関与することが知られていない新規遺伝子内変異が同定された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで非症候群永久歯先天欠如の罹患に関与することが知られていない新規の遺伝子が同定できた。この遺伝子同定は先天欠如の歯数、部位多様性を部分的に説明する可能性が示唆されるものである。

＜支援成果公表論文リスト＞

未

公募支援課題：2011 年度

心臓イオンチャネルの遺伝子異常と機能破綻の分子基盤

新学術領域研究

蒔田 直昌・長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

＜背景・目的＞
本研究の目的は、致死性不整脈をきたす未知の原因遺伝子を解明し、その分子病態を細胞・組織・臓器の各レベルで統合的に機能評価すること。その目的のために、特発性心室細動 (IVF)、進行性心臓伝導障害(PCCD)に着目し次世代シークエンサーを用いたエクソーム解析を行い、さらに疾患 iPS 心筋細胞、コンピュータによる細胞・組織・臓器レベルのシミュレーションを行うことである。

＜支援の内容＞
本研究では、致死性不整脈の新たな病態を究明するために、3 家系(A～C)の家族性不整脈のエクソーム解析を行った。いずれの家系の発端者にも、既報の疾患原因遺伝子に変異がないことをサンガー法で確認している。dbSNP, 1000 Genome database, Exome Variant Server に登録がなく、アミノ酸置換やスプラシング異常をきたす可能性のある単一塩基または 挿入欠失 variation のうち、罹患者に共通するが非罹患者には見られないという条件でフィルタリングした。

＜支援によって得られた研究成果＞
リストアップされた遺伝子のうち、機能・発現パターンデータ、過去の GWAS、Cardiovascular Gene Ontology Annotation Initiative などを参考にして、不整脈関連の有力候補遺伝子を選択し、発端者・家族の DNA をサンガー法で再シークエンスし cosegregation を確認した。

〈家系 A〉 進行性心臓伝導障害(PCCD)； 罹患者 3 名、非罹患者 3 名。Exome 解析の結果、21 個の SNV と 3 個の Indel が同定された。再シークエンスによって家系内 cosegregate が、染色体 21 の遺伝子 A1 と染色体 16 の遺伝子 A2 に確認された。さらに他の PCCD 家系(n=38)について A1, A2 の遺伝子解析を行ったところ、A1 に 2 個と A2 に 3 個の rare variation が同定された。これらの variation は東京大学および理研の Exome database に登録がなかった。A1、A2 の心筋・心臓刺激伝導系における生理的機能や発現パターンは知られていない。刺激伝導系特異的に GFP が発現する TG マウスを用いて抗 A1 抗体を用いて胎生期から経時的に心筋の免疫組織染色を行ったところ、A1 は胎生早期から刺激伝導系に特異的に発現していることが判明した。以上から A1 は PCCD の新たな原因遺伝子である可能性が濃厚であり、現在 CRISPR ノックインマウスを作成し、今後心電図解析を予定している。

〈家系 B〉家族性洞不全症候群(SSS)；罹患者 4 名、非罹患者 4 名。Exome 解析の結果、6 個の SNV と 2 個の Indel が同定された。再シークエンスによって、17 歳の 1 名を除く家族に cosegregate が、染色体 2 の遺伝子 B1 と染色体 10 の遺伝子 B2 に確認された。またこれらの variation は東京大学および理研の Exome database に登録がなかった。他の SSS 発端者(n=23)の解析では B2 に変異はなかった。

〈家系 C〉特発性心室細動(IVF)；罹患者 2 名、非罹患者 1 名。Exome の結果、SNV 74 個, Indel 22 個が特定された。再シークエンスによって家系内 cosegregate が、染色体 12 の遺伝子 C1 と染色体 2 の遺伝子 C2 に確認された。また、他の IVF 発端者 24 人中 1 人に同一 C1 変異を認めたが、この変異は理研の非心疾患患者 exome data でも 731 例中 2 例に認められており、その病的意義は現時点では確定的ではない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
3家系のExome解析により遺伝性不整脈の新たな分子病態を解明できる可能性が示された。しかし今回のスクリーニングでは、最終的な原因遺伝子の決定には至っておらず、その他の生物学的知見やより多く患者の集積と遺伝子解析によって、疾患発症における負荷因子を検証する必要がある。

＜支援成果公表リスト＞
未発表

公募支援課題：2014～2015 年度

外来種の侵略性に関る遺伝的基盤の解明

基盤研究（B）

牧野 能士・東北大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞
世界各地で外来種が生態系を破壊する問題が深刻化しているが、他の地域から持ち込まれた生物種の全てが新規環境に定着しているわけではない。特定の種が世界各地で独立に何度も侵略的外来種となっている背景には、これらの種に共通する遺伝的な基盤があると考えられるが、その詳細は全く分かっていない。本研究では、特に国内外で問題となっている侵略的外来種アメリカザリガニ (*Procambarus clarkii*) の全ゲノム配列決定を実施し、(1)環境適応能力の高さを生み出す遺伝的多様性の調査、(2)新規環境に侵入した少数個体が近交弱勢を起こさずに繁殖成功する遺伝的背景の解明を目的とする。遺伝的構成から生物の侵略性を推察できるようになれば侵略種の拡散防止や在来生物保全の観点からも重要な研究となる。

＜支援の内容＞
ゲノム支援のサポートを受けて、アメリカザリガニのゲノム配列の決定を行った。Illumina Hiseq2000 で塩基配列を決定後、ゲノムアセンブラーplatanus を用いて de novo ゲノムアセンブリを実施した。また、連鎖地図作成のため F2 個体の RADseq シークエンスを行う(現在進行中)。

＜支援によって得られた研究成果＞
ゲノム配列未知のアメリカザリガニの全ゲノム配列決定 (ゲノムサイズ 2.6Gb)を実施した。累代飼育を行ってきたメス 1 個体よりゲノム DNA を抽出し、Paired-end ライブラリ、および、長さの異なる Mate pair ライブラリを作成し、次世代シークエンサー(Illumina HiSeq 2000)により約 100x のカバレッジで塩基配列決定を行った。ゲノムアセンブラーplatanus を用いて、得られた配列の de novo アセンブリを行い、N50 が 410kb のドラフトゲノム配列を得た (全長 2.4Gb)。

アメリカザリガニのゲノムサイズは 2.6Gb と非常に大きく、ゲノムのアセンブリは容易ではなかった。また、ドラフトゲノム配列を RepeatModeler で解析したところ、反復配列が極めて多いことが分かった。このような理由から Scaffold 数は 50 万以上と非常に多かった。これら Scaffold を繋ぐために、連鎖地図の作成を行っている。2 系統のアメリカザリガニを掛け合わせて F2 個体を取得し、ゲノム DNA を抽出した。これらの DNA から RADseq ライブラリを作成し、ゲノム支援のサポートと受けてシークエンスを実施する予定である(現在進行中)。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
RepeatModeler と RepeatMasker を用いてドラフトゲノム配列の反復配列のマスクを行い、augustus により遺伝子の予測を行った。遺伝子領域の推定は以後のゲノム解析の基礎情報として有用である。

アメリカザリガニのゲノム配列が得られたことで、国内外個体のリシークエンスが可能となった。国内野外個体(仙台)と米国在来個体のゲノムリシークエンスを行い、得られた read を参照配列にマッピングして SNP を得た。遺伝的多様性を調べるため、コールされた SNP を用いて Watterson theta を推定したところ、在来個体は国内導入個体よりも遺伝的に多様であることが分かった。また、ゲノムシークエンスに用いた個体の Watterson theta の推定も行ったところ、他個体と比較して theta が低く、累代飼育により遺伝的多様性が低下していることが示された。

国内に導入されたアメリカザリガニの集団構造を調査するため、国内 4 地点 (札幌、青森、鎌倉、沖縄)からサンプリングした野外集団 (8 個体をプール)のゲノムリシークエンスを実施した。また、ゲノム配列の種間比較を行うため近縁の *Procambarus* 属 4 種 (*Procambarus alleni* 、 *Procambarus fallax* 、 *Procambarus acutus*、*Procambarus zonangulus*)を用いたゲノムリシークエンスを行った。現在、遺伝的変異の集団間比較、種間比較を行っている。

現在、得られたドラフト配列からさらに精度の高いゲノム配列を得るため連鎖地図の作成を行っている。連鎖地図を取得できれば、より精度の高い遺伝子予測や比較ゲノム解析が可能になる。

＜支援成果公表リスト＞
なし。

公募支援課題：2014～2015 年度

全ゲノム重複後に消失する遺伝子パターンの実験的検証

挑戦的萌芽研究

牧野 能士・東北大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

本研究の目的は全ゲノム重複(Whole Genome Duplication, WGD)の直後に起きる大規模な遺伝子消失パターンを実験的に明らかにすることである。WGD により全ての遺伝子が倍加することから生物の進化に重大な影響を及ぼしてきたことが分かっている。一方、WGD 直後には重複して冗長となった遺伝子が大規模に消失していく事も知られている。申請者らはこれまでに、WGD 後の遺伝子の消失・保持パターンはランダムではなく、量的均衡遺伝子や機能遺伝子クラスターなどの遺伝子群が脱落しにくい事をゲノム情報学的な理論解析から明らかにしてきた。本研究では、高等植物、脊椎動物の進化に重要な機能を担ってきた進化の大イベント WGD を、酵母を用いて実験室レベルで再構築することに挑戦し、申請者らの理論的予測の正しさを証明する。

＜支援の内容＞

倍数体酵母を長期連続培養して生じた突然変異のパターンを調査し、申請者らの提案する仮説(量的均衡遺伝子の保持、遺伝子クラスターの保持)を検証するため、異質倍数体酵母として *Saccharomyces pastorianus* および *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 42981 株を用いた。*Z. rouxii* ATCC 42981 株はゲノム配列が未知であったため、ゲノム支援のサポートを受けて Paired-end ライブラリ、および、長さの異なる Mate pair ライブラリを作成し、ゲノム配列の決定を行った。

また、同質倍数体として突然変異率の高い 2 倍体出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* rad52 欠失株を用いった。同質倍数体株を用いてゲノム配列の決定を行うと、相同染色体のどちらで突然変異が生じたか検出することができない。この問題を解決するため、ゲノム支援のサポートを受けて平均リード長が非常に長い一分子シークエンサーPacBio によるシークエンス、および、異なる長さの mate pair ライブラリのシークエンスを行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援のサポートを受けてゲノム配列が未知であった異質倍数体酵母 *Z. rouxii* ATCC 42981 株のゲノムシークエンス、および、platanus による de novo ゲノムアセンブリを実施した(N50: 750kb、#scaffold: 188)。異質 4 倍体酵母 *Z. rouxii* ATCC 42981 株のゲノム構成のうち、ゲノム配列が未知であった *Z. pseudorouxii* 部分のゲノム配列が明らかとなった。augustus により遺伝子予測を行い、約 9000 の遺伝子を得た。ゲノム配列が既知である 2 倍体 *Zygosaccharomyces rouxii* CBS732 株の全 ORF 配列を用いて相同性検索を行い、identity の分布を調査した。その結果、54%の遺伝子が CBS732 株の遺伝子と 95%以上の相同性を持ち、残りの 46%の遺伝子は identity が 95%以下であり(88%あたりにピーク)、異質倍数体の特徴をよく反映していた。

また、ゲノム支援のサポートにより Hiseq2000 および PacBio を用いて、250 世代まで培養した 2 倍体酵母 *S. cerevisiae* rad52 欠失株 4 株のリシークエンスを行った。Hiseq2000 由来の short read 配列を参照ゲノム配列にマッピングして、突然変異の生じた座位を網羅的に取得した。紫外線照射により効果的に突然変異が導入されており、1 株あたり平均で 165 のヘテロ接合座位を得た。遺伝子クラスターの維持パターンを解析するため、複数の突然変異座位を有する PacBio 由来の long read を収集した。得られたデータを解析し、連続的な長い染色体領域(ハプロタイプ)の決定を行った。解析の完了した 250 世代目 4 株において得られたハプロタイプ数は多い株で 20 を超えたが、10 以下の株も存在していた。これは座位間の距離が離れたハプロタイプの決定に利用可能な read が long read に限定されるためである。Pacbio によるシークエンスはコストが高く、また 250 世代では得られた突然変異数が多くなかったため、世代数を 1000 世代にまで伸ばした rad52 欠失株を取得し、異なる長さの mate pair ライブラリを作成しシークエンスを実施中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

世代時間が短く、進化実験に利用できる異質倍数体生物は多くない。研究開始当初は利用できる酵母は *Saccharomyces pastorianus* 1 種だけであったが、本支援により *Z. rouxii* ATCC 42981 株のゲノム配列も利用できるようになり、異質倍数体を用いた長期連続培養後のリシークエンスをスムーズに実施することができた。

同質倍数体株を用いてゲノム配列の決定を行うと、相同染色体のどちらで突然変異が生じたか検出することができないが、Pacbio を用いた long read シークエンスにより 15kb を超えるハプロタイプの決定も実現できた。1000 世代継代培養した酵母のゲノム配列は現在シークエンス中であり、これらのゲノム配列を解析することでさらに多くのハプロタイプの決定が期待できる。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2015 年度

CHERP が制御する mRNA 選択的スプライシングの新たな分子機構の解明

挑戦的萌芽研究

増田 誠司・京都大学大学院生命科学研究科

＜背景・目的＞

遺伝情報は、ゲノム DNA から mRNA 前駆体として転写された後、5’末端のキャッピング、スプライシング、3’末端の poly(A)付加を受け成熟 mRNA となる。成熟 mRNA は核膜を通過して細胞質に輸送され、タンパク質へと翻訳される。加えて、ヒトを含む高等真核生物では１つの遺伝子から異なるエキソンを組み合わせることで複数の成熟型 mRNA を生み出している。このメカニズムを選択的スプライシングと呼び、高等真核生物において遺伝子の数を遙かに超えるタンパク質の発現を生み出す原動力となっている。しかし、ヒトにおける選択的スプライシングの分子機構はいまだ未解明の部分が多く残されている。

CHERP は、発見当初細胞内 Ca シグナリングの制御に関わる因子と報告された（*Biochem. J.*, 373, 133-143, 2003)。最近、CHERP が mRNA スプライシングを行うスプライソソーム因子であることや(*J. Biol. Chem.*, 288, 355-67, 2013)、スプライシングに関わる因子特有のドメインも存在することから(*J. Biol. Chem.*, 288, 33361 - 33375, 2013)、核内での生理機能と Ca シグナリングとの関係が注目されている。

報告者は、mRNA プロセシングに関する研究を行ってきた。この過程で、mRNA スプライシングを制御する U2AF と相互作用する因子として CHERP を同定し、その機能解析を開始した。CHERP をノックダウンすると、通常は細胞質に局在する mRNA が核内に滞留した。さらに、IP_3R2 mRNA の選択的スプライシングパターンが体細胞型から神経細胞型に変化した。次いで免疫沈降と質量分析からは、CHERP が U2AF だけでなく３’スプライス部位を決定する U2 snRNP とも強く相互作用することを見いだした。また Ca 濃度の変化により相互作用する因子が変化した。これら一連の解析から、CHERP は mRNA の選択的スプライシングに関わる新規因子であり、３’スプライス部位選択を制御すると推測している。

前述のように mRNA の選択的スプライシングは、ゲノムにコードされる遺伝子の数を遙かに超えた数のタンパク質を発現させるメカニズムであり、選択的スプライシングを受ける遺伝子の数（割合）は、生物の高等化や複雑化に伴って多くなる。このため、選択的スプライシングは生物進化を理解する上でも重要な研究課題となっている。しかし、ヒトにおける選択的スプライシングの分子機構は十分にわかっていない。報告者は、ヒトにおける選択的スプライシングを新規因子 CHERP が新たな分子機構により制御する可能性を見いだしつつある。本研究は、CHERP の制御する遺伝子を網羅的に解析するとともに、CHERP による選択的スプライシングの新規原理を提示する。加えて、ヒト遺伝病の約 20%で生じる mRNA スプライシング異常に伴う難治性疾患の分子標的としての CHERP の有効性を評価する。同時に CHERP による Ca シグナリングを介した選択的スプライシング制御の可能性を評価することを目的としている。

＜支援の内容＞

CHERPは､新規のメカニズムで選択的mRNAスプライシングを制御すると考えている。ここではCHERPの結合するRNA配列をPER-Clip (Photoactivatable -Ribonucleoside-Enhanced UV crosslinking and immunoprecipitation) 法により単離する。その後、結合RNA配列情報を次世代シークエンサーにより決定する。またコンセンサス結合配列決定の支援を希望した。これにより、選択的mRNAスプライシングの新たな分子機構を解明していくことを希望した。必要なサンプル数は、Ca濃度変化によるCHERPのRNA結合性変化を含めて可能であれば３サンプル程度を希望している。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在、支援要のサンプルの最終調整中であり、現時点でゲノム支援により得られた成果はない。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

該当なし。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし。

公募支援課題：2013 年度

転写開始点と翻訳制御の網羅的解析を通じた高温条件下における翻訳制御機構の解明

若手研究（B）

松浦 秀幸・大阪大学大学院薬学研究科

＜背景・目的＞

近年、動物や酵母、植物などの様々な真核生物種において、同一遺伝子座から転写開始点の異なる多様な mRNA が転写されていること、また、その多様性の程度が遺伝子ごとに異なることが明らかとなってきた。現状、こうした転写開始点のばらつきにどのような生理学的意義があるのか、明らかとなっていない。一方、筆者らはシロイヌナズナ培養細胞を用いて、mRNA 5'非翻訳領域(5'-UTR)の 5'末端近傍配列が、高温ストレスによって引き起こされる mRNA 翻訳状態の変化を規定する重要な因子であることを見出した。転写開始点が mRNA 5'-UTR の 5'末端位置を規定することを考えると、転写開始点のばらつきが、翻訳状態変化に影響していることが強く推察される。本研究では、植物における転写開始点のばらつきと環境ストレスに応答した mRNA の翻訳状態変化の関連性をゲノムスケールで解析することにより、転写開始点のばらつきが有する生理学的な意義や転写開始点のばらつきと翻訳制御の間に存在する遺伝子発現制御機構に関する新たな知見の獲得を目指した。

＜支援の内容＞

転写開始点の網羅的な決定には、理化学研究所に置いて独自に開発され、キャップ構造を有する mRNA の 5'末端近傍配列とその発現量を、次世代シークエンサーを用いて網羅的に解析可能な Cap analysis of gene expression (CAGE) 法を用いた。本ゲノム支援においては、CAGE ライブラリーを HiSeq 2500 に供することで独自に得た CAGE タグデータの情報解析を支援いただいた。支援いただいた内容としては、マッピングされた CAGE タグの 5'末端位置のカウントや、CAGE タグへのアノテーション付け、特定の領域内での CAGE タグのばらつきの程度を示す指標値である shape index の計算、遺伝子集団の機能分類解析、異なるサンプル間での CAGE タグ分布の変化を示す指標値の算出など、データ分析の多岐に渡る様々な局面において支援をいただいた。また、データ解析や論文作成の過程においても、データ解析の方向性、データの提示方法等に関して、多数の有益な助言をいただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究では、転写開始点のばらつきと環境ストレスによって引き起こされる mRNA 状態変化の関係性をゲノムスケールで明らかにすることを目指した。そのため、mRNA の翻訳状態を解析するポリソームプロファイル解析と mRNA の 5'末端配列を解析する CAGE 解析を実施し、ゲノムスケールでの連関解析を行った。その結果、同一遺伝子の mRNA であっても、転写開始点の違いによって翻訳状態変化が異なる場合が多数存在すること、さらには、こうした転写開始点のばらつきが環境ストレスに応答した翻訳状態変化の基盤、すなわち翻訳段階における遺伝子発現制御の基盤として重要な役割を果たしている可能性を見出した。転写開始点のばらつきの重要性は、転写開始点のばらつきと遺伝子機能の関連解析の結果からも強く示唆された。詳細は割愛するが、本研究を通じて、植物細胞の環境変化に応じた遺伝子発現制御機構において、転写開始点のばらつきが果たす重要な役割に関する新たな概念を提唱することができた。

上記の通り、本研究ではタンパク質をコードしている mRNA の上流部分に位置する転写開始点に主に焦点を当てて解析を進めた。その一方で、タンパク質やペプチドをコードしていないと推察されるアンチセンス RNA と翻訳制御の関係性についても、予備的な検討を進めた。その結果、活発に翻訳されている mRNA 群を含むポリソーム画分に存在するアンチセンス RNA 候補群を得ることができ、さらにはそれらアンチセンス RNA 候補が対応するセンス RNA の翻訳効率に影響を与えている可能性を見出した。

未だ検証するべきことが多数残されている状況ではあるが、今後の研究を通じてアンチセンス RNA と翻訳制御という新たな研究テーマへの展開が大いに期待される研究成果が得られた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本研究では、情報解析支援を通じた多角的なデータ分析の結果、転写開始点のゆらぎと環境ストレスに応答した mRNA 翻訳状態変化との間に、当初予想していた以上に重要な関連性がある可能性を見出した。本研究を通じて得られた新規仮説は、植物のストレス応答機構の解明研究にとどまらず、真核細胞における環境応答性の遺伝子発現制御機構の解明研究に、これまでにない新しい視点を提供するものであり、今後の更なる研究が期待される。

また、本支援の結果、「アンチセンス RNA と翻訳」という当初全く予想していなかったテーマへの展開につながり得る成果も得られた。詳細に検証するべき項目が多数残されているが、本成果は、斬新性の高い新たな研究テーマの今後の展開に向けた重要な端緒となった。

＜支援成果公表リスト＞

該当無し。現在二報の論文を執筆中である。

公募支援課題：2014 年度

聴覚機能解明および聴覚細胞再生モデルとしての新規誘導型障害マウスの開発

基盤研究（C）

松岡 邦枝・東京都医学総合研究所ゲノム医科学研究分野哺乳類遺伝プロジェクト

＜背景・目的＞

聴覚機能の中核を担う内耳において、音刺激の電気刺激への変換には蝸牛内に存在する内有毛細胞（IHC）および外有毛細胞（OHC）の 2 種の有毛細胞が必須である。我々が鋭敏な聴力を得られるのは、OHC の精密な増幅機構によるものであり、OHC は伸縮運動によって微弱な音刺激を増大させ、逆に過大に強い音刺激の場合には抑制的に音を伝達するという極めて重要な役割を担っている。我々は、OHC の機能および分化機構を解明し、聴覚障害の治療に役立てることを目的として、ジフテリア毒素（DT）の投与により OHC を特異的に破壊することのできる OHC-TRECK マウスを開発した。本研究では、OHC の形成あるいは聴覚機能の維持に関与する遺伝子を探索し、そのメカニズムを明らかにするために、OHC の形態形成に重要な生後初期あるいは形成後の 2 つのステージで DT の投与により OHC を破壊し、DT 投与後および非投与の OHC-TRECK マウスおよび野生型マウスの内耳蝸牛における遺伝子発現を網羅的に比較することで、DT 投与 OHC-TRECK マウスにおいて発現量が著しく減少する遺伝子を探索し、OHC の機能に重要な役割を担う OHC 特異的発現遺伝子を同定することを目的として RNA-seq 解析を行った。

＜支援の内容＞

生後 1 日あるいは 4 週齢の OHC-TRECK マウスおよび野生型マウスに kg 体重当たり 50 μg の DT を投与し、7 日後に内耳蝸牛より total RNA を調整した。「ゲノム支援」には、2 つのステージの DT 投与および非投与の OHC-TRECK マウスおよび野生型マウス、計 8 サンプルからのライブラリー作製およびペアエンドシークエンスに対する支援をいただき、各サンプルについて 27～150×10^6 resds のデータを得ることができた。

＜支援によって得られた研究成果＞

出生直後に DT 投与を行った場合の遺伝子オントロジー解析において、DT 投与 OHC-TRECK マウスで発現減少を示した遺伝子群には、予想したように”auditory receptor cell differentiation”、”sensory perception of sound”、”stereocilium bundle tip”、”hair cell differentiation”等、聴覚関連の GO term が得られた。しかしながら、生後 1 日に DT を投与した場合、7 日後では 20～60%程度 OHC が残存していることが判明し、S/N 比が低下してしまったため、現在の所 OHC の形成に重要な遺伝子の同定には至っていないが、現在さらに詳細に検討中である。

形態形成後に DT 投与を行った場合には、投与 7 日後の OHC-TRECK マウスでは 90%以上の OHC が消失し、高度の難聴となる。DT 投与 OHC-TRECK マウス蝸牛では *Myo15*、*Strc*、*Pres*、*Kcnq4*、*Pou4f3* 等難聴原因遺伝子として同定されている遺伝子の顕著な発現減少が認められ、本解析の適切性が裏付けられた。また、アセチルコリンレセプター・グルタミン酸レセプター・K^+トランスポーター・グリシントランスポーター・陽イオンチャネル等神経伝達に関与する遺伝子（*Chrna10*、*Chrna9*、*Slc12a5*、*Slc6a5*、*Slc7a10*、*Slc1a1*、*Slc10a6*）および *Slc6a11*、*Slc32a1*、*Gad1*、*Gad2*、*Gabra1*、*Gabra2*、*Gabra3*、*Gabrg1*、*Gabrg2*、*Gabrg3* 等 GABA 作動性ニューロンに発現する遺伝子群の著しい発現減少が認められた。これらの結果は、OHC の消失により、聴神経ネットワークに障害が生じていることを強く示唆している。さらに、DT 投与後の OHC-TRECK マウスにおいて、EF-hand 型の Ca^{2+}結合タンパク質をコードする oncomodulin 遺伝子（*Ocm*）およびタンパク質脱リン酸化酵素の強力な阻害活性をもつ G-substrate をコードする protein phosphatase 1 regulatory subunit 17（*Ppp1r17*）の劇的な発現減少が認められた。*Ocm* および *Ppp1r17* の著しい発現減少は、RNA-seq 解析に先行して行った内耳全体の RNA を材料としたラフなマイクロアレイ解析でも認められており、RT-PCR でも実証された。特異抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った結果、OCM タンパク質および PPP1R17 タンパク質はそれぞれ OHC に特異的に発現していることが判明した。*Ocm* は OHC および前庭の有毛細胞に発現することが報告されているが聴覚における機能は全く不明である。一方、*Ppp1r17* は小脳プルキンエ細胞や網膜アマクリン細胞で発現するという報告があるが、聴覚における発現および機能は全く知られていない。OCM および PPP1R17 の OHC における役割を明らかにすることで、聴覚機構の新たなメカニズムが解明されると期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、OHC の機能解明のための鍵となる OHC 特異的発現遺伝子として *Ocm* および *Ppp1r17* の 2 種の遺伝子を抽出することができた。既に、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を行い、*Ocm*-KO マウスを樹立し、*Ocm* の欠損により聴覚障害を呈することを確認した。*Ppp1r17* についても現在ゲノム編集による KO を作製中である。*Ocm*-KO マウスおよび *Ppp1r17*-KO マウスの表現型を詳細に解析することにより OHC における役割をそれぞれ明らかにし、聴覚メカニズムの理解に繋げたい。

＜支援成果公表リスト＞

該当無し

公募支援課題：2013 ～ 2014 年度

HTLV-1 bZIP factor による炎症性疾患発症機構の解析

基盤研究（B）

松岡 雅雄・京都大学ウイルス研究所

＜背景・目的＞

HTLV-1 関連疾患において、HTLV-1 の pX 領域にコードされる Tax が主な病原因子と考えられてきたが、生体内では発現が抑制されていることから病原性の分子機序には不明な点が多く残されていた。我々は HTLV-1 のマイナス鎖にコードされている *HTLV-1bZIP factor(HBZ)*遺伝子が全ての ATL 症例で発現している唯一のウイルス遺伝子であることを見出し、HBZ により炎症、発がんが惹起されることを明らかにした（Satou Y, PLoS Pathog, 2011）。これまでの解析から HBZ が様々な転写因子やヒストン修飾酵素と結合することが判明しており、遺伝子発現異常やシグナル伝達の異常を引き起こすと考えている。我々は HBZ が Smad2/3、ヒストンアセチル化酵素 p300 と結合することで TGF-β/Smad 経路を活性化することを報告した（Zhao T, Blood, 2011）。本支援では HBZ によるヒストンアセチル化異常と遺伝子発現異常を網羅的に解析し、炎症及び発がんの分子機構を明らかにすることを目的とした。

＜支援の内容＞

マウス CD４陽性細胞にレトロウイルスベクターにより HBZ を導入した細胞を用いて RNA-seq を行い、HBZ が遺伝子発現に与える影響を解析した。さらに、同様に調製したサンプルを用い、抗 AcH3、AcH4、AcH3K9、AcH3K27、AcH3K14、AcH3K18 抗体、およびアセチル化酵素 p300、脱アセチル化に関与する転写抑制共役因子 NCOR2 に対する抗体を用いて ChIP-seq を行い、HBZ がヒストンのアセチル化に与える影響を解析した。

＜支援によって得られた研究成果＞

HBZ がヒストンアセチル化を介して、遺伝子発現を攪乱している遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子には、免疫の抑制機能に重要と考えられる Foxp3 などの転写因子や IL-10 などの抑制性サイトカイン、制御性 T リンパ球の表面マーカーの一つである CCR4 に加え、PD-1、TIGIT などの免疫共抑制性受容体が含まれており、HBZ が宿主の免疫抑制を誘導することが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援により、HBZ がエピジェネティックな機構を介して発現を制御する遺伝子を包括的に解析し、多くの免疫関連遺伝子が同定された。特に、免疫共抑制性受容体 TIGIT が HBZ による病原性に関わっていることが見出された。TIGIT は PD-1 とともに、抑制性共シグナルを伝達する免疫チェックポイント分子である。さらに詳細な解析により、これらの分子が HTLV-1 感染者において抗ウイルス免疫抑制に関与している可能性が示唆された。これらの分子は近年、がんに対する免疫チェックポイント療法のターゲットとして注目されており、HTLV-1 関連疾患の新規予防法、治療法開発への応用が期待される。

＜支援成果公表リスト＞

Yasuma, K. et al. PLoS Pathogens 12(1): e1005372 (2016)

公募支援課題：2011 年度

性的二型と闘争・求愛行動の進化

新学術領域研究

松尾 隆嗣・東京大学大学院農学生命科学研究科

＜背景・目的＞

動物のオスでは、体の一部が著しく発達するとともにその部位を用いた儀礼的な闘争行動や求愛行動を示す例がしばしば観察される。このような形態と行動の密接な関係は複合適応形質を構成しており、その進化には形態形成と神経機能という２つの異なる分子メカニズムが関与している。本研究ではキイロショウジョウバエの近縁種 *Drosophila prolongata* を対象にオス特異的な形態と闘争・求愛行動の進化を解析する。*D. prolongata* の前脚はオスでのみ肥大・着色しており、オス間での闘争行動、及びメスに対する求愛行動に用いられる。いずれの行動も、前脚に性的二型のない近縁種に比べて高度に複雑化しており、肥大した前脚が重要な役割を果たす。*D. prolongata* はキイロショウジョウバエと非常に近いゲノム配列を持っており、キイロショウジョウバエのゲノム情報や遺伝子解析手法を有効に活用することができる。本研究では、*D. prolongata* のオス特異的な形態と特徴的な闘争・求愛行動の進化に関わる遺伝子を同定し、複合適応形質の進化メカニズムを推定することを目的とした。

＜支援の内容＞

GS-FLX (Titanium) 3プレート分の解析

D. prolongata および近縁種である *D. kurseongensis*、KB866（未記載種）の頭部で発現している遺伝子について RNA-seq 解析を行った。このうち支援を受けたのは、

１．ロシュ社の専用ライブラリ構築キットの現物支給

２．完成したライブラリ３種を用いたそれぞれ１回ずつのシーケンスラン

の２点である。ライブラリの構築・クオリティチェックはすべて被支援者側で行い、完成したライブラリは支援者の研究室まで持参した。また、得られた配列データの解析はすべて被支援者側で行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

GS-FLX は比較的長いリードが得られるため、ゲノム未知の非モデル生物においても転写物を正しく再構築できるとの期待のもと解析を行ったが、アセンブリソフトウェア性能の飛躍的な進歩により、ショートリードでもデプスがあれば十分に転写物配列を再構築できるようになった。一方 GS-FLX はシーケンスエラーが多く、得られるリード数も少ないため、全く役に立たなかった。以降は HiSEQ を用いて解析を進めた。

１．闘争性を制御する遺伝子の同定

闘争性の高い *D. prolongata* と、闘争性の低いその近縁種２種との間で、脳内遺伝子発現プロファイルを比較することにより闘争性を制御する遺伝子の同定を試みた。その結果、*D. prolongata* で発現量が特異的に変化している遺伝子群を特定した。

２．闘争性を制御する遺伝子ネットワークの進化メカニズム

闘争性の高いテナガショウジョウバエで特異的に発現量が変化している遺伝子群と、キイロショウジョウバエで闘争性に関連して発現が変動する遺伝子群とを比較した。その結果、両者に共通する遺伝子が見つかったが、その数は両者が無関係だと仮定した場合に比べて統計的に有意に多くはなかった。したがって、闘争性の進化にかかわる遺伝的メカニズムは種内変異や可塑性を制御する機構とは異なることが示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

解析技術の過渡期であったとはいえ、支援を受けた内容は目的に鑑みて非力かつ不十分なものであった。より適切なプラットフォームや解析サイズでの支援を得られていればと残念に思う。

＜支援成果公表リスト＞

Setoguchi, S. et al., Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 282, 20151377 (2015)
Kudo, A. et al., Entomological Science 18, 221-229 (2015)
Yang, B. et al., Plos One 10, e0121261 (2015)
Fujii, T. et al., Insect Biochemistry and Molecular Biology 61, 62-68 (2015)
Ohta, S. et al., Applied Entomology and Zoology 50, 457-463 (2015)
Sugimoto, T.N. et al., Journal of Insect Physiology 81, 48-51 (2015)
Setoguchi, S. et al., Journal of Ethology 32, 91-102 (2014)
Ohta, S. et al., Applied Entomology and Zoology 49, 89-95 (2014)
Nagamine, K. et al., Springerplus 3, 539 (2014)
Harada, E. et al., Plos One 7, e29710 (2012)
Matsuo, T., Applied Entomology and Zoology 47, 137-142 (2012)
Tomioka, S. et al., Genes & Genetic Systems 87, 323-329 (2012)
Mitaka, H. et al., Molecular Biology Reports 38, 1787-1792 (2011)
Nakai, Y. et al., Journal of Neuroscience 31, 12759-12766 (2011)
Takahasi, K.R. et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 15276-15281 (2011)

公募支援課題：2011, 2012 年度

大規模分子遺伝疫学的解析による痛風発症リスクの個人差評価法及び早期予防法の開発

若手研究（A）

公募支援課題：2013, 2014 年度

分子遺伝疫学的解析による痛風の病態解明とゲノムテーラーメイド医療への応用

基盤研究（B）

松尾 洋孝・防衛医科大学校

＜背景・目的＞

痛風は、高尿酸血症に引き続いておこる生活習慣病で、激痛を伴う関節痛を生じるほか、高血圧、腎臓病、心臓病、脳卒中などのリスクとなることが知られている。生活習慣の欧米化および高齢化に伴い患者数が増加しており、食生活を含む生活習慣や遺伝的要因の関与が考えられていた。しかし、非常に稀な先天性尿酸代謝異常による痛風以外は、大部分の痛風の原因は不明なままであった。申請者（松尾）らは、防衛医大、東大、東京薬科大、慈恵医大、名古屋大を含む 11 大学・機関の研究者と共同研究チームの代表として、「トランスポーターの分子機能を指標とした大規模な遺伝子解析」を行い、尿酸排泄トランスポーター遺伝子 *ABCG2* が、痛風の主要な病因遺伝子であることを世界に先駆けて発見した。

これまでにわかっていたヒトの尿酸トランスポーターは申請者らが報告した URAT1（*Nature*, 2002）と GLUT9（*Am J Hum Genet*, 2008）の 2 つのみで、共にヒトの腎臓における尿酸再吸収トランスポーターであることも申請者らが報告していた。ヒトにおいて尿酸は、3 分の 2 が腎臓から尿中へ、残りの 3 分の 1 は主に腸管から大便中へ排泄されることが知られていた。3 つ目の尿酸トランスポーターである ABCG2 は、腎臓や腸管に発現していることから、これらの臓器から体外への尿酸排泄に関わるトランスポーターであることが示唆され、これによりヒトにおける尿酸排泄と再吸収の分子機構モデルの提唱が可能となった。さらに、*ABCG2* 遺伝子のありふれた遺伝子変異パターンの個人差が、血液中の尿酸値の個人差および痛風発症リスクの個人差につながることが分かった。この研究は、ありふれた生活習慣病の 1 つである痛風において、主要な病因遺伝子を初めて発見するとともに、その病態解明のための重要な証拠を見いだしており、新たな視点からの予防法や治療薬の開発につながることが期待される。

さらに、痛風は、高尿酸血症のごく一部（1 割程度）にしか認められないため、その遺伝学的背景には、尿酸値変動に関わる *ABCG2* などの遺伝子の他、関節部の炎症に関わる未知の遺伝子が深く関わっている可能性が指摘されている。これまでに尿酸値の変動に関わるゲノムワイド関連解析（GWAS）は全世界的に実施されているが、臨床診断された多数例の痛風を対象とした GWAS は実施されていなかった。本研究では、臨床病型の情報が充実している日本人の痛風症例を対象とした GWAS とそれに基づく大規模 2 次スクリーニングを実施することで、痛風の発症に関わる重要な遺伝子の同定を目指した。さらにこの GWAS で同定された新規遺伝子領域を含むゲノムワイド有意な領域を次世代シーケンサーでリシーケンスをすることで、GWAS のみでは同定できない rare variant 及び common variant を含む causal variant の同定も目指した。さらに分子機能解析を併用することで、生活習慣病の 1 つである「痛風・高尿酸血症の病態の全容解明」を目指し、その成果をもとに「ゲノムテーラーメイド医療のモデルとしての確立」を目的として本研究を行った。

＜支援の内容＞

2011 年度は、痛風 945 例、コントロール 1,213 例を対象とした Human OmniExpress（イルミナ）による GWAS（1 次スクリーニング）を実施した。これは、収集した痛風症例を対象に GWAS を行い、痛風の新規病因遺伝子の同定を探索するものであり、1 次解析のみで 3 つのゲノムワイド有意な痛風関連遺伝子領域を同定した。症例解析の多くを、「ゲノム支援」の支援をうけて実施させていただくことができた。

上記の GWAS 後の解析として、2012 年度には 2 次スクリーニングの一部について支援をうけ、TaqMan 解析による痛風 1,048 例、コントロール 1,334 例を対象とした replication study を行ったところ、痛風発症リスクを有意に上昇させる遺伝子が、新規のものも含めて 5 つ同定された。

2013 年度には、痛風関連遺伝子領域の候補となる数千 SNP についてカスタムチップ（iSelect、イルミナ社）を用いたさらなる大規模 2 次スクリーニング解析を「ゲノム支援」の支援のもと実施した。

さらに 2014 年度は、我々が同定をした痛風関連遺伝子領域の次世代シーケンサー等によるリシークエンスをご支援いただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

2011 年度の支援による痛風 945 例、コントロール 1,213 例を対象とした GWAS の 1 次解析と、2012 年度の支援による TaqMan 解析による痛風 1,048 例、コントロール 1,334 例を対象とした replication study を行ったところ、痛風発症リスクに関連するゲノムワイド有意な 5 つの遺伝子領域が見出された（*Ann Rheum Dis*, 2015）。このうち 2 つは既知の尿酸トランスポーター遺伝子（*ABCG2* と *SLC2A9*）であり、他の 3 つは代謝との関連が報告されているものであっ

た。すなわち、糖や脂質の代謝に関連する *GCKR* の rs1260326、コレステロールや糖尿病に関連する *MYL2-CUX2* の rs2188380、グルタミン酸シグナリングに関連する *CNIH-2* の rs4073582 である。また、後二者の遺伝子は新規に同定された痛風関連遺伝子であった（業績１）。さらに、見出された SNP のなかで、尿酸トランスポーター遺伝子 *ABCG2* 及び *SLC2A9* の SNP は痛風の臨床分類（腎負荷型及び腎排泄低下型）に対して異なるパターンで関連を示すことも明らかとなった。また、臨床データに対する各 SNP のリスクアレルの影響力は、痛風の臨床分類の基準となる尿中尿酸排泄量や尿中尿酸排泄率に有意な相関関係を示した。痛風・高尿酸血症の臨床ガイドラインでは、臨床分類により使用する薬剤の種類が異なる。しかし、臨床分類を実施するための検査所見として蓄尿データを必要とするため、臨床の現場ではガイドライン通りの病型の診断や薬剤の選択が困難な状況である。上記の我々の成果では、いくつかの SNP を確認するだけで、痛風・高尿酸血症の病型の判断や使用すべき薬剤の選択が可能となるコンパニオン診断にも今後活用できる可能性を示唆することができた（業績１）。

さらに 2013 年度の「ゲノム支援」活動により、「GWAS 後の大規模 2 次スクリーニング」であるカスタムチップを用いたタイピングも終了し、新規のものも含めて複数の痛風関連遺伝子を同定し、現在論文投稿準備中である。また、痛風の臨床的サブタイプごとに GWAS を実施することで、痛風全症例を対象とする GWAS では検出されなかった複数の新規遺伝子座を同定することもできた（論文投稿準備中）。これらの研究により尿酸の排泄経路特異的な、高尿酸血症および痛風の新規予防法および治療法への応用の可能性という一般臨床の場に還元しやすい成果も得られている。

2014 年度は、我々が同定をした痛風関連遺伝子領域の次世代シーケンサー等によるリシークエンスを痛風 480 例、コントロール 480 例を対象として実施し，現在データ解析を行っている。

上記に加えて、申請者らは 2013 年度に「遺伝子 ABCG2 の変異は若年性痛風の主要な病因遺伝子である」および「痛風遺伝子は腎臓と腸管の両方に作用して痛風を起こす」という 2 つの論文報告を、ゲノム支援班の支援の成果であることを明記して「*Scientific Reports*」誌に発表した。同様に 2014 年度は「痛風予備軍には飲酒や肥満よりも遺伝子が強く影響する」という論文報告を、ゲノム支援班の支援の成果であることを明記して「*Scientific Reports*」誌に発表した。

以上のように本研究の目的である、（１）「痛風・高尿酸血症の病態の解明」、さらに、（２）「ゲノムテーラーメイド医療のモデルとしての確立」、の達成にむけて研究が進展し、成果が得られたと考えられる。

今後、痛風・高尿酸血症の分子病態の全容解明及び、ゲノムテーラーメイド予防・医療の実現化につながる成果を目指せるよう、ゲノム支援で進展させることができた本研究をさらに発展させるように努力していく所存である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで本研究分野で行われてきた GWAS は、「尿酸値の変動」を主眼にしたものであった。しかし、これまでの「ゲノム支援」活動により、「痛風」という common disease を主眼とした GWAS とそのサブタイプ別解析や replication study を行うことができ、*ABCG2* 以外の複数の候補病因遺伝子が新たに発見された。痛風は他の common disease よりも、遺伝的要因が強いとされる疾患である。すなわち、遺伝子検査を通した、特に日本人における痛風・高尿酸血症の新規予防法および治療法の開発という、一般臨床の場に還元しやすい成果が得られるという展望が期待できる。

＜支援成果公表リスト＞

1. Matsuo, H. et al. Genome-wide association study of clinically-defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. ***Ann Rheum Dis*** (Epub ahead of print) (2015).
この論文については、防衛医大・久留米大・遺伝研より共同プレスリリースされ、読売や朝日をはじめとする主要紙に掲載された。
2. Sakiyama, M. et al. The effects of URAT1/SLC22A12 nonfunctional variants, R90H and W258X, on serum uric acid levels and gout/hyperuricemia progression. ***Sci Rep*** (in press) (2016).
3. Sakiyama, M. et al. Ethnic differences in ATP-binding cassette tansporter, sub-family G, member 2: Genotype combinations and estimated functions. ***Drug Metab Pharmacokinet*** 29: 490-492 (2014).
4. Nakayama, A. et al. Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. ***Sci Rep*** 4: 5227 (2014).
この論文については、防衛医大よりプレスリリースされ、日経をはじめとする主要紙に掲載された。
5. Matsuo, H. et al. ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate underexcretion and renal urate overload. ***Sci Rep*** 4: 3755 (2014).
この論文については、防衛医大よりプレスリリースされ、日経をはじめとする主要紙に掲載された。
6. Matsuo, H. et al. Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout. ***Sci Rep*** 3, 2014 (2013).
この論文については、防衛医大・東京薬科大・東大より共同プレスリリースされ、日経や読売をはじめとする主要紙や、NHK ニュースなどで報道された。

このほか、GWAS（第 2 報）の成果等を投稿準備中である。

公募支援課題：2014 年度

ニューロンにおける DNA 増幅現象の研究

基盤研究（C）

松尾 亮太・福岡女子大学国際文理学部

＜背景・目的＞

ナメクジを含む軟体動物腹足類の脳には、巨大なニューロンが多数含まれ、その核ゲノム DNA は大幅に増幅していることが知られている。そして、こういった DNA 増幅が、体の成長、肥満に応じてニューロンでの物質合成を高めるべく起こる適応的な現象であることが分かっている（Yamagishi et al. 2011）。さらに我々は、このゲノム DNA 増幅が、倍数化であることも示している（Yamagishi et al. 2012）。これは、各ニューロンが転写している遺伝子セットがどのようなものであるかに関わらず、全てのゲノム領域が一様に増幅されているということを意味する。しかしながら、各転写産物（RNA）が倍数化に応じて一様に（同じ割合で）増えているのかどうかは明らかにはなっていない。そこで、本研究では脳の特定のニューロンで発現する全転写産物の量を、体重増加促進群（肥満群）と体重増加抑制群（絶食群）との間で比較し、それらの存在率が両者の間で変わらないのか否かを調べることを目的とした。また同時に、ニューロンの倍数化は、投射先の臓器から得られる何らかの逆行性シグナルにより引き起こされる可能性が示唆されているため（Matsuo et al. 2013）、肥満群と絶食群の心臓で発現する mRNA 全体を比較することで、この因子を探索することも目指した。

＜支援の内容＞

エサを与え続けて太らせた肥満群と、絶食により体重増加を抑制した絶食群からそれぞれ巨大ニューロン VGC（visceral giant cell）を単離し、そこから得られた total RNA を対象として、トランスクリプトーム解析を実施して頂いた。また同時に、それぞれの心臓由来 RNA についてもトランスクリプトーム解析を行い、脳ニューロンに DNA 増幅を引き起こす因子の探索も行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

これまでに、体重増加抑制群に比して体重増加促進群の VGC で発現が増加する転写産物として、NdWFamide を同定している。そして現在は、その逆の発現変化を示している転写産物を探し出す作業を行っている。具体的には、支援を受けたトランスクリプトーム解析の結果から、体重増加抑制群の VGC に比して体重増加促進群の VGC で発現が減少している転写産物を複数選び出し、それらが実際に VGC で発現し、その量が変化していることを *in situ* hybridization により確認する作業を進めている。これまでに、PRQFVamide、pedal peptide 3、PTSP-like peptide、FMRFamide、5-HT transporter、cardioactive peptide、新規 neuropeptide precursor、vesicular monoamine transporter、myomodulin2、bradykinin-like peptide、FMRGFamide2、abdominal peptide-11、LFRFamide、cerebrin、molluscal insulin-like peptide、neuropeptide Y の 16 種の遺伝子について、VGC での発現の確認を試みたが、残念ながらいずれも VGC 近傍の小型ニューロンで発現するものばかりであった。これは、体重増加抑制群の VGC を単離する際、VGC 以外のニューロンまでも一緒に摘出してしまっていることが原因であると思われる。つまり、体重増加促進群についてはうまく VGC を単離できているのであるが、体重増加抑制群ではそのその小ささから、VGC 以外にその近くの小型ニューロンが混入してしまっていることが考えられる。

現在は、体重増加抑制群と体重増加促進群の脳全体を用いて別に行ったトランスクリプトーム解析の結果を利用し、体重増加促進群の VGC で発現が減少している転写産物の探索を行っている。具体的には、体重増加促進群の脳で発現低下が認められた secretogramin、peptide glycine mono-oxygenase、synaptotagimin、importin3 の 4 つについて、VGC での発現状況を確認中であり、今後、さらに調べる遺伝子数を増やしてゆく予定である。また、支援を受けている心臓由来 RNA のトランスクリプトーム解析の結果についても、順次解析を進めてゆく。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

これまで、ナメクジを用いたトランスクリプトーム解析は世界的に見ても全く行われていなかったため、今回支援を受けた網羅的な RNAseq 解析の副産物として、オクトパミン合成系関連遺伝子（投稿中）、視覚関連遺伝子であるオプシンなど、多くの遺伝子情報が得られた。現在も、今回のトランスクリプトーム解析の結果を利用して多方面へ研究を展開している。さらに、NCBI のパブリックデータベースへ登録、公開したことで今後、（数は少ないかもしれないが）ナメクジの分子生物学研究を行う研究者の助けにもなるであろうと考えている。今回のトランスクリプトーム解析で得られた情報は、この先、ナメクジの神経科学がさらなる発展を遂げるためのきっかけになるであろう。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2012 年度

花成を制御するフィトクロムＢのシグナル伝達機構の解明

特定領域研究

松下 智直・九州大学大学院農学研究院

＜背景・目的＞

フィトクロムは植物の主要な光情報受容体であり、赤色光依存的に転写因子と相互作用し、様々な遺伝子の転写制御を行うことで、植物の光応答を制御すると考えられている。しかし我々は最近、順遺伝学的解析からフィトクロムの信号伝達に特異的に関わる因子として、選択的スプライシングに働く新奇 SR 様蛋白質 RRC1 を同定した。その結果、フィトクロムが、転写制御だけではなく、RRC1 を介して選択的スプライシング制御も行う可能性が浮上した。

そこで本研究では、フィトクロムによって RRC1 の機能が調節される分子機構の解析と、フィトクロムシグナルによってスプライシングパターンが変化する遺伝子をシロイヌナズナゲノムにおいて探索することで、フィトクロムによる RRC1 を介した選択的スプライシング制御の検証を行う。

＜支援の内容＞

我々は最近、植物の主要な光受容体であるフィトクロムが、従来知られている転写制御だけでなく、我々が順遺伝学的に同定した新奇スプライシング制御因子 RRC1 を介して選択的スプライシング制御も行うことで、多層的な遺伝子発現制御を行うことを発見した。そこで、このフィトクロムによる新奇制御機構の全体像を把握し、その生理学的意義を明らかにするために、シロイヌナズナにおいてその標的遺伝子を網羅的に同定することを試みた。さらに、フィトクロムによる選択的スプライシング制御が高等植物に普遍的な現象であることを確かめるために、単子葉のモデル植物であるイネにおいても、フィトクロムシグナル依存的にスプライシングパターンを変化させる遺伝子の探索を試みた。これら２つ目的を達成するために、本「ゲノム支援」の支援を受け、次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq 解析を行った。

まず、フィトクロムによる選択的スプライシング制御のシロイヌナズナでの標的遺伝子の網羅的同定に関しては、シロイヌナズナの野生株とフィトクロム変異体の黄化芽生えに連続赤色光を 0, 1, 3 時間照射後、それぞれのサンプルから抽出した RNA を用いて、pair-end read、1 read = 101bp の条件で mRNA-seq 解析を行った。一方、フィトクロムによる選択的スプライシング制御のイネにおける標的遺伝子の探索に関しては、イネの野生株とフィトクロム変異体の芽生えを暗所もしくは赤色光条件で 1 週間生育させ、そこから抽出した RNA を用いて single read、1 read = 76bp の条件で mRNA-seq 解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

本「ゲノム支援」の支援を受け、次世代シーケンサーを用いた mRNA-seq 解析により、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の標的遺伝子を網羅的に同定した。その結果、シロイヌナズナゲノム内にて、1000 を超える遺伝子が、定常状態での mRNA 量を変化させることなく、その選択的スプライシングパターンを、フィトクロム依存的に、赤色光に応じて 1 時間以内に素早く変化させることが明らかとなった。さらに、フィトクロムによる転写制御の主な早期標的遺伝子が、過去の報告通り転写因子であるのに対して、フィトクロムによる選択的スプライシング制御を赤色光照射後 1 時間以内に受ける主な遺伝子は RNA スプライシング関連遺伝子であることが明らかとなった。これらの結果から、フィトクロムは、赤色光受容後 1 時間以内に、転写因子遺伝子に対して転写制御を、そして RNA スプライシング関連因子遺伝子に対して選択的スプライシング制御を、それぞれ別々に同時に行うことで、赤色光に応じた転写カスケードと選択的スプライシングカスケードをゲノムワイドに誘導するというモデルが示唆された。また、光シグナル伝達関連遺伝子にて、フィトクロムによる選択的スプライシング制御が有意に高頻度で認められ、その中でも特に、概日時計や COP/DET 経路の主要構成因子をコードする遺伝子がフィトクロムによる選択的スプライシング制御を有意に受けることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

植物の主要な光受容体であるフィトクロムはこれまで、専ら転写制御を介して光応答を引き起こすと考えられていた。そのような背景の中、我々は本「ゲノム支援」の支援を受けることで、フィトクロムが転写制御に加えて、それとは異なる標的遺伝子に対して選択的スプライシング制御も行うことを世界に先駆けて発見した。選択的スプライシングは、プロテオームの多様性を大幅に増大させるだけでなく、例えば蛋白質の細胞内局在を変化させるなど、さらに異なる階層での制御をも可能とする。これらは、転写調節では為し得ない制御である。したがって、本支援を受け、フィトクロムによる選択的スプライシング制御の全体像が把握されたことにより、植物が環境の変化に応答して、より多くの情報をゲノムから引き出し発現するために、多階層に渡る多彩な制御機構を駆使する様が明らかとなった。

＜支援成果公表リスト＞

Shikata, H. et al., *PNAS* 111, 18781-18786 (2014)

公募支援課題：2014~2015 年度

ゲノムに潜む鎮痛ペプチド・エンドモルフィンは酸化ストレスの RNA 編集で誕生する

挑戦的萌芽研究

松島 綾美・九州大学大学院理学研究院化学部門

＜背景・目的＞

エンドモルフィンは、1997 年にウシの脳から単離された神経ペプチドである。これには強力な鎮痛作用がある・。さらに、アトピー患者を苦しめる痒（かゆ）みとの関連があることも判明し、最近、非常に注目されている。しかし、意外なことに、未だにエンドモルフィン遺伝子は不明のままなのである。

申請者は最近、エンドモルフィン類似の前駆体遺伝子の存在に気がついた。これより「ゲノム中に遺伝子が見つからないのは、酸化ストレスなど特殊条件の下で、mRNA が転写後の修飾、すなわち RNA 編集を受けてエンドモルフィン遺伝子が完成するからだ」と作業仮説をたてた。そこでこの証明に挑戦する。神経ペプチド遺伝子には、複数のペプチドを前駆体として同時にコードする場合が多い。そのため、新規に見つかるエンドモルフィン遺伝子にも、未同定の神経ペプチドも同時にコードされる可能性が非常に高く、本研究の新規鎮痛薬および抗痒薬開発に対する影響は計り知れない。

＜支援の内容＞

エンドモルフィンは、わずかアミノ酸４つからなる神経ペプチドである。YPWF-NH_2（アミノ酸１文字表記）のアミノ酸配列を持つエンドモルフィン-1 と、３番目のアミノ酸が異なる YPFF-NH_2のエンドモルフィン-2 が知られている。これら両方とも 1997 年に仔ウシ脳から単離され、その後ヒトでも存在が確認された。しかも、モルヒネを凌ぐ強力な鎮痛作用を発揮する。このペプチドに相当する塩基配列は、図１の通りである。そこで、現在までに、ペプチドが単離されているにも関わらず、これをコードする前駆体遺伝子が不明であるのは、（１）mRNA の発現時期が限られるなどの理由で既存データベースには登録されていない、（２）既存データベースにあるが、遺伝子として検出されていない、の２通りの可能性しかない。

アミノ酸配列	相当する塩基配列	塩基縮重数
KYPFFG	AAR UAY CCN UUY UUY GG	64
KYPWFG	AAR UAY CCN UGG UUY GG	32
RYPFFG	AGR UAY CCN UUY UUY GG	64
RYPWFG	AGR UAY CCN UGG UUY GG	32
RYPFFG	CGN UAY CCN UUY UUY GG	128
RYPWFG	CGN UAY CCN UGG UUY GG	64

図１　エンドモルフィンに相当する塩基配列
アミドペプチドなので GR もしくは GK のアミノ酸配列を持つ。

まず、2014 年度は、（１）の可能性を念頭に置き、エンドモルフィンが発現していると期待される時期の脳の網羅的 mRNA シークエンス解析を実施した。これには、マウス新生仔脳を用いたまた、2015 年には、引き続き（１）で得られたデータのから標的 mRNA を見つけるための解析支援を受けるとともに、（２）の既存ゲノムデータベースにあるが、イントロンがペプチド配列を分断する等の理由で検出されていないことを想定して、既存データベースより標的遺伝子を見つける新規なアルゴリズム構築を目指す高度情報解析支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

まず、本支援に先立ち、ETS データベースより YPWF-NH_2および YPFF-NH_2に相当する塩基配列の検索を実施した。その結果、該当する配列が見出されたが、相当部位のゲノム配列を調べたところ、YPGF-NH_2のペプチドがコードされている可能性があった。そこで、本支援の網羅的 mRNA シークエンスと並行して RT-PCR で標的 mRNA 配列をクローニングしたところ、実際にゲノムから推定される YPGF-NH_2が mRNA として発現していることが判明した。この配列には、シグナルペプチドと推定される領域が存在し、ペプチドとして機能していることが推定された。しかし、このようにエンドモルフィンに相当する YPWF-NH_2および YPFF-NH_2は得られなかった。そこで、YPGF-NH_2がエンドモルフィン同様の活性を持つのかを解明するために、このペプチドを化学合成し、結合試験を実施した。ペプチド合成は、Fmoc 手動固相合成法で行い、HPLC により精製を行った。得られたペプチドの結合能は、細胞で発現したオピオイド受容体の膜標品に対する、[^{3}H]エンドモルフィンの競合結合試験で評価した。その結果、確かに結合することが判明した。しかし、エンドモフィン YPWF-NH_2および YPFF-NH_2と比較して非常に弱い結合であった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

現時点では、目的としたエンドモルフィン遺伝子は見つかっていない。そこで、ゲノムデータベースで、イントロンがペプチド配列を分断する等の理由で検出されていないことを想定して、高度情報解析支援を受け、エンドモフィン遺伝子を探索中である。これにより、たとえ目的遺伝子が見つからなくとも、新規ペプチド探索のアルゴリズム開発が期待され、本支援による非常に有用な将来的展望が見込まれる。

＜支援成果公表リスト＞

Matsushima, A. et al., *Peptide Science 2014*, 281-282 (2015).

公募支援課題：2014 年度

新世代ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性

基盤研究（S）

松島 綾美・九州大学大学院理学研究院　（分担研究者）

＜背景・目的＞

ビスフェノールＡは内分泌撹乱化学物質としての低用量作用が懸念されているプラスチック原料である（図１）。申請者らは特異的ターゲットとしてエストロゲン関連受容体γ型（ERRγ）を世界に先駆けて発見し、報告した。そして、ビスフェノール A が胎児(仔)期の脳神経成長に影響する可能性を突き止めた。「ビスフェノールＡが ERRγに特異的に結合する」ことを起点とし、『ビスフェノールＡはヒトをはじめとするホ乳類の脳神経細胞の成長に抑制的に働くのではないか？』 そして、『ERRγ が特異的に結合し、調節する神経成長因子の転写制御要因・核内受容体があるのではないか？』などの緊要の課題の着想に至った。本研究ではまず、この分子機構を解明する。一方で、ビスフェノールＡの代替としてビスフェノールＡＦ、Ｂ、Ｃ２、Ｅ、Ｚなどを原料とする新プラスチックが続々と開発され、生成量が急激に増大している。こうしたなか、これらの内分泌撹乱作用はまだあまり調べられていない。そこで、さらに本研究ではこうした新世代ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性、内分泌撹乱作用の分子機構を解明する。本課題申請者・松島綾美は、基盤研究（S）「新世代ビスフェノールの核内受容体を介したシグナル毒性（研究代表者：下東康幸)」の分担研究者である。

＜支援の内容＞

マウスなど実験動物で、これまでにプラスチック原料・ビスフェノールＡの低用量効果が指摘されている。低用量効果とは、ごく微量の暴露で、生殖系や脳神経系に悪影響を及ぼすことをいう。我々は、世界に先駆けてビスフェノールＡが複数の核内受容体に非常に強く結合することを明らかにした。しかし、依然として低用量効果の分子メカニズムは不明である。そこで、低用量効果の分子メカニズムを解明するために、妊娠マウスにビスフェノールＡを食餌し、まずは胎仔脳に発現している核内受容体全 49 種について、mRNA の塩基配列解析を１つ１つマンパワーで実行した。その結果、ビスフェノールＡが結合する核内受容体のみならず、結合しない核内受容体でも塩基変異がビスフェノールＡにより誘発されていることが判明した。そこで、ビスフェノールＡによる塩基変異のメカニズムを解明し、低用量効果の発現メカニズムの本質に迫るために、本課題研究では、ビスフェノールＡを妊娠マウスに食餌することにより、ビスフェノールＡ暴露胎仔マウスのゲノムに生じるメチル化をバイサルファイト解析により網羅的に解析した。これをコントロールのマウスと比較した。さらに、ビスフェノールＡ暴露胎仔マウスの脳に発現する全 mRNA を網羅的にシークエンスにより解析した。さらに、RNA もメチル化を受ける可能性がある。そこで、RNA のメチル化部位を解析するために、RNA を N6-methyladenosine(m6a)抗体で免疫沈降し、RNA-seq を行った。

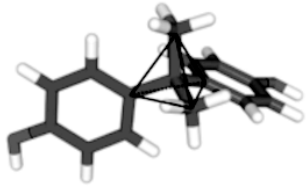


図１　ビスフェノールＡの最安定構造
２つのフェノール骨格を持ち、２つのメチル基が存在する。

＜支援によって得られた研究成果＞

2014 年度のゲノム支援採択課題である本申請研究では、まず、ビスフェノールＡを食餌した妊娠マウスおよびコントロールの通常食餌の妊娠マウスの胎仔脳を、14.5 日齢で摘出した。これらより、total RNA を抽出し、ゲノム支援によって RNA-seq を実施した。その結果、とくに注目している核内受容体について、FXRβの mRNA 発現量がビスフェノールＡを食餌することで有意に増加することが判明した。また、脳神経系で発現が知られている複数の遺伝子について、ビスフェノールＡを食餌することで有意に減少することが判明した。その他に、ビスフェノールＡを食餌することで有意に変動した遺伝子が約 20 種存在し、現在、これらについてその生理的意義を誠意に解明しているところである。また、ビスフェノールＡ暴露胎仔マウスのゲノムに生じるメチル化については、バイサルファイト解析の報告を受けて、現在、解析中である。メチル化の総量、部位、について面白いことが見えそうである。さらに、RNA のメチル化部位の解析については、イントロン部位にメチル化が増える傾向があるように見えた。これらのデータについて、詳細に統計的有意性を現在解析している。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

塩基変異を現在のシークエンスデータから導けないか、ポリＡ付加部位の解析ができないか、などについて、高度な解析が必要であると考えられた。変異傾向、頻度、などを網羅的に解析する。究極的には、変異がどのレベルで誘発されているのかを、ゲノム DNA との配列比較により明らかにするために、鋭意に今度の取り組みを行いたい。

＜支援成果公表リスト＞

本支援による成果は、現在、学会および論文発表として準備中である。

公募支援課題：2015 年度

ビスフェノール低用量効果はタンデムに並ぶ核内受容体が誘起する

若手研究（A）

松島 綾美・九州大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

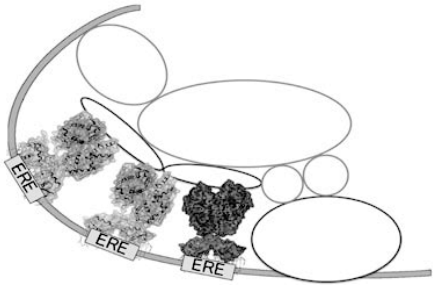
有害環境化学物質・ビスフェノールＡが注目されている。なぜなら、ごく微量の暴露で胎仔や乳幼児などの脳神経系に対する悪影響が懸念されているからである。ビスフェノールＡの代替となる新世代ビスフェノールの使用も増加している。その一つであるビスフェノールAFが､エストロゲン受容体α型(ERα）に非常に強く結合し、活性化するアゴニストとして働くが、β型（ERβ）には活性を阻害するアンタゴニストであるという意外な新発見をした。内在性の女性ホルモン・エストロゲンは、ERαにもERβにも同様にアゴニストとして働く。この作用特性とは、大きく異なる。この要因を解明することは、新世代ビスフェノールの悪影響の分子メカニズム解明に通じるのみならず、核内受容体の制御にかかわる重要な知見を与えると強く期待される。さらに、ERαの活性が、ビスフェノールＡにより、名前は似るが全く別の受容体であるエストロゲン関連受容体γ型（ERRγ）が存在すると約 10 倍も増強される新奇な現象を見出した。これまでの緻密な転写活性試験と立体構造解析に基づき、「DNA 上のタンデムな ER 応答配列に複数の核内受容体が結合し、互いの転写因子複合体に影響することによる、いわば『転写協同制御』がビスフェノール低用量効果の本質である」と考えられたため、本研究ではこれの分子メカニズムを解明する（図)。そして、こうした新奇分子機構に基づく核内受容体を標的とした治療薬への道を拓く。

＜支援の内容＞

申請者らの研究室において、複数の核内受容体で、ビスフェノールＡの暴露によりポリアデニル化部位異なるアイソフォームが誘導される事が判明した。さらに、ビスフェノールＡ暴露マウス脳にはゲノム配列とは一致しないmRNAの塩基配列変異が生じる事も明らかになった。これを受け、2015 年度にゲノム支援の解析支援として採択された本申請研究では、既に得られた配列データをもとに、①ポリアデニル化部位の変動を網羅的に解析するための情報解析と、② mRNA に生じるゲノム配列とのミスマッチの網羅的な解析の支援を受けた。これらは、高度な情報解析支援に該当し、自力では解析できないため本支援がなくては実施できないものであった。

一方で､ERαとERRγが共存するとエストロゲン様活性が約10倍も増強される奇妙な現象の分子メカニズムの解明は、生体内にERやERRのアイソフォームが存在するという、核内受容体の生理機能の解明に繋がる必要不可欠な課題である。申請者は、核内受容体が結合する応答配列はゲノム上にタンデムにいくつも存在することが多いことに注目した。そこで本支援で解析法を教授頂く事により③ ゲノム上にこうした核内受容体のホルモン応答配列が、どのような間隔で、いくつ並んでいるのかを解析し、遺伝子転写の増強活性研究の有用なターゲットも見つけようとしている。

当然ながら、全部一度には実施できないため、まずは支援打ち合わせにより、上述の③の課題である核内受容体のホルモン応答配列探索について、ERα-ERRγの増強が見られたものと同じ間隔で並ぶ転写応答配列を標的として解析した。ホルモン応答配列の認識は、ゆるいため、想定配列の組み合わせの数も多く、時間が必要となった。



タンデムに並んだ核内受容体による転写因子複合体のイメージ。
ERE は DNA 上の ER 応答配列を表す。

＜支援によって得られた研究成果＞

ポリアデニル化部位の解析データソースとして、一般的な RNA-seq 解析を利用出来れば、生命現象の新規なメカニズム解明研究が既存のデータを用いて実施可能になる。これらのゲノム解析研究における意義は大きい。これらの解析結果を受けて、ポリアデニル化部位変異の要因としてビスフェノールＡやその分解ラジカルによる塩基修飾の新奇メカニズムが想定しており、鋭意に取り組んでいる最中である。また、シークエンス解析の講習会などを通じて、これまで情報処理を専門としてこなかった申請者らも基本的な解析が少しでもできるようになった意義は非常に高い。

＜支援成果公表リスト＞

本支援による成果は、結果がまとまり次第、学会および論文発表として発表する。

公募支援課題：2013 年度

異種ゲノムの不適合性が引き起す雑種の不妊・発育不全現象の遺伝的制御機構

新学術領域研究

松田 洋一・名古屋大学大学院生命農学研究科動物遺伝制御学研究分野

＜背景・目的＞

種間雑種における不妊や発育不全、致死などの雑種不和合性は、接合後生殖隔離障壁として、種の分化や維持に貢献すると考えられるが、その遺伝的基盤は不明である。哺乳類や鳥類では、種間雑種における不妊や発育不全の報告例は多く、その障害は通常ヘテロ型の性染色体構成をもつ個体（哺乳類では XY 雄、鳥類では ZW 雌）で顕著に現れる（ホールデンの法則）(Haldane 1922) ことが知られている。

ニワトリとニホンウズラは人工授精によって雑種胚を得ることができ、稀に不妊の F_1 雑種雄が生まれるが、雌個体が孵化することはなく、この結果はホールデンの法則によくあてはまる。我々は、ウズラ卵とニワトリ精子の人工授精を行い、F_1 雑種の胚発生を観察した結果、1) 受精卵の約 75%が孵卵開始後 2 日までに死亡し、その後も連続的に雌雄をともに致死が発生すること、2) 10 日頃から雌雄比に偏りが生じること、3) 受精卵のうちの約 5%が孵化することを見出した。また、死亡胚には有意な染色体の分離異常が生じていないことを明らかにした。

本研究では、F_1 雑種の発育不全と雌特異的な胚性致死に関わる遺伝子の発現異常を特定し、初期胚の発生停止の発生学的基盤、および胚性致死の雌への偏りの遺伝的基盤の解明を目指す。

＜支援の内容＞

放卵直後の胚盤葉期（stage X）と孵卵 8 時間前後の前原条期（stage XIII/XIV）のウズラ胚、ニワトリ胚、雑種胚を対象として、高速シーケンサーを用いた mRNA-sequencing 解析の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

発現遺伝子の網羅的な解析結果をもとに、雑種胚におけるニワトリアレルとウズラアレルの発現量を算出し、胚盤葉期から前原条期に移行する際の遺伝子発現の増減のパターンを親種と比較した。その結果、原条形成において重要な遺伝子のいくつかで、雑種のニワトリとウズラの両アレルで発現が低下することが示唆された。このことから、前原条期における発生停止は原条形成の不全によって起こる可能性が示唆された。また、同一ステージにおける親種と雑種の発現量の比較によって、雑種雌の Z 連鎖遺伝子において高頻度に発現異常がみられたことから、Z 連鎖遺伝子の不完全な発現制御によって雌に偏った致死が起こる可能性が示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

F_1 雑種の胚性致死は、初期発生時に集中して起こる傾向があることから、今回得られたデータをさらに解析することで、胚が死亡する前後に起きる遺伝子発現の異常を特定できる可能性がある。それによって、雑種胚が致死となる原因について手がかりが得られるかもしれない。この時期の致死率には明確な雌雄差は存在しないが、胚体では性特異的な遺伝子の発現異常が起こっている可能性が高い。雌特異的な変動遺伝子を検出し解析することによって、雌に選択的に起こる胚性致死の原因についても手がかりが得られるかもしれない。

鳥類は発生学研究に広く用いられるモデル動物であるが、今回対象とした stage X や stage XIII/XIV のような初期胚のトランスクリプトーム解析は、これまであまり行われていなかった。今回、ゲノム支援によって高品質のライブラリーの作製と詳細な RNA-seq 解析を行なっていただいたことによって、微量サンプルを用いた解析であったにもかかわらず、十分量のデータが得られ、サンプル間でのデータのばらつきは低く抑えられた。また、多数の検体を解析していただいたことで再現性も確保された。同様の手法で他の初期発生ステージについても遺伝子発現解析が行えることがわかった。

公募支援課題：2010 年度、2011 年度、2013 年度

腸管寄生線虫における肺移行の意義

特定領域研究

発現遺伝子解析によるベネズエラ糞線虫の感染機構の解明

基盤研究（C）

出芽酵母を用いた寄生線虫由来の長寿遺伝子の単離

挑戦的萌芽研究

丸山 治彦・宮崎大学医学部

＜背景・目的＞

糞線虫（genus Strongyloides）はヒトや家畜を含む脊椎動物に感染する腸管寄生線虫であり、これまでに 50 種程度が記載されている。Strongyloides 属線虫は自由生活世代と寄生世代の両方を持ち、自由生活世代の線虫は雌雄による性生殖を行うが、寄生世代はメスのみの単為生殖により卵を産出するなど興味深い生活環を持つ。その中でベネズエラ糞線虫はラットを自然宿主とし、実験室での維持が容易であることから、モデル腸管寄生線虫のひとつとして賞用されている。本研究では、本線虫の全ゲノムを明らかにすることで、宿主認識、皮膚侵入、体内移行、宿主体内での生存など、寄生生物としての様々な能力を司る分子メカニズムの理解を目指す。

＜支援の内容＞

＜2010 年度＞

・Roche 454 : genomic fragment library を 3 ランと cDNA library を 2 ラン

・454 リードを用いた genome および transcriptome の *de novo* assembly

＜2011 年度＞

・Roche 454 : paired end library (8 kb)を 1 ラン

・Solexa : pair-end および 3kb mate pair を各 1 レーン

・ベネズエラ糞線虫ゲノム fosmid library の作成、品質チェック

・イルミナリードを用いた genome assembly

・HiSeq2000 : ベネズエラ糞線虫（寄生世代メス各種発育段階）RNAseq 2 レーン

＜2013 年度＞

・HiSeq2000 : ベネズエラ糞線虫（自由生活世代メス成虫）RNAseq 1 レーン

＜支援によって得られた研究成果＞

(1) ヘテロ接合性を考慮した新規アセンブラの開発

線虫の *C. elegans* などと比較すると、ベネズエラ糞線虫ゲノムのアセンブルは既存のアセンブラではきわめて難しいことが支援の初期段階に分かった。その原因としてゲノムのヘテロ接合性が高いことが考えられたため、共同研究者の伊藤武彦教授のグループが新規アセンブラの開発に着手し、ヘテロ接合性の高い新規生物種ゲノムに適用できるアセンブラ Platanus の開発に成功した。Platanus によりベネズエラ糞線虫ゲノムのアセンブルは、ALLPATHS-LG、Velvet、SOAPdenovo2、MaSuRCA よりも大幅に改善された。

(2) ベネズエラ糞線虫ゲノムの概要配列の決定

ゲノム支援により、全くのゼロからのスタートであったベネズエラ糞線虫ゲノムの概要配列を決定することができた。支援班によるデータ産出とアセンブルに、オプティカルマップの結果（サンガー研究所との共同研究）を加えて、トータルサイズ 55.5Mb、断片数 653、平均長 85.0 kb、最長断片長 15,118 kb、N50 断片数 5、N50 最低長 2,127 kb のゲノムを得ることができた。これまでに公表された線虫ゲノムは、完全ゲノムである *C. elegans* を除くと N50 断片長は 50k~1M の間であり、ベネズエラ糞線虫のアセンブリはそれらと比較して明らかに高品質である。

(3) ベネズエラ糞線虫の遺伝子予測

ゲノム支援によるベネズエラ糞線虫の RNAseq データにより、ベネズエラ糞線虫の遺伝子予測が可能となった。最初に 500 遺伝子のマニュアルキューレーションをおこない、キューレーション済遺伝子を用いて遺伝子予測ソフト Augustus (Stanke *et al.*, 2006) をトレーニングした。その結果ベネズエラ糞

線虫に最適なパラメータが確立され、ベネズエラ糞線虫は18,048個のタンパク質コード遺伝子を持っていることが明らかとなった。

ゲノム支援によってベネズエラ糞線虫ゲノムのアセンブルが進んでいたことにより、2012 年 3 月にイギリスのサンガー研究所から共同研究の打診があり、同年 5 月より糞線虫類 4 種（ヒト糞線虫、ネズミ糞線虫、ベネズエラ糞線虫、乳頭糞線虫）と近縁 2 種（*Parastrongyloides* と *Rhabditophanes*）の比較ゲノム研究に参加した。

その結果、糞線虫類では遺伝子数とイントロンの減少によるゲノムサイズの縮小がみられること、糞線虫では染色体レベルでのシンテニーは保存されていたが、染色体内では例外的な頻度のリアレンジメントがあることが分かった。同様の遺伝子リアレンジメントはミトコンドリアゲノムでも観察されており、糞線虫属内では、なんらかの機序によるゲノムの急速な進化が起きていることが示唆された。

さらに、自由生活世代と寄生世代の RNAseq の比較により、アスタシン様メタロプロテアーゼや TCP/CAPS domain-containing プロテインをコードする遺伝子が寄生世代に特異的に高発現制御されていることが明らかとなった。また、アウトグループ線虫種（*Parastrongyloides* と *Rhabditophanes*）との比較ゲノムにより、これらの遺伝子は Strongyloides 属線虫のゲノムで特異的に重複増加していることが明らかとなり、本線虫の寄生性に極めて深く関与していると考えられた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

★糞線虫類の寄生適応研究

糞線虫類ではアスタシン様メタロプロテアーゼファミリーの著しい増大が確認され、寄生におけるプロテアーゼ研究の重要性がはっきりした。詳細な発現解析によって、増大したファミリー遺伝子がどのように使い分けられているか等の研究が可能になった。

比較ゲノムを実施した糞線虫 4 種の関係では、ヒト糞線虫とネズミ糞線虫がひとつのクレードを、乳頭糞線虫とベネズエラ糞線虫が別のクレードを形成していることが分かった。さらに、クレード間では染色体数や雌性生殖器の構造にも違いがあった。ネズミ糞線虫とベネズエラ糞線虫はどちらもラットを自然宿主とするが、別のクレードに属しており、独立してラットへの寄生能を獲得したと推測された。寄生虫の進化と適応について実験動物を用いた研究の基盤が形成されたと考えられる。

★糞線虫野生株の遺伝的多様性の研究

糞線虫類のドラフトゲノムが決定されたことにより、ヒトやネズミの糞線虫の遺伝的多様性解析が可能になった。これは、糞線虫の分布拡大や病原性研究の端緒になる。われわれは、琉球大学第一内科との共同研究を既に開始し、ヒト由来の糞線虫単一虫体の SNP 解析が可能であることを示している。

★糞線虫以外の寄生虫ゲノム研究

一連のゲノム支援によって、ゲノム情報が全くない段階から概要配列の決定に至るまでの、ゲノム解析の経験が蓄積され、糞線虫以外の寄生虫についてもゲノム解読を進める態勢が整備された。当研究室では、「芽殖孤虫のゲノム解読による条虫類幼虫における無性増殖機構の解明」が 2014 年度の基盤研究(C)に採択された。芽殖孤虫症は 1905 年の最初の症例（東京）以降の世界の累計報告数が 20 例以下と、きわめて稀な疾患であるが、治療法がなく致死率 100%とされる。同疾患の病原体のゲノム解読は、寄生虫の病原性研究に大きく寄与すると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

1) Hunt V.L., et al., Nature Genetics 48 (2016) in press
2) Hino, A., et al., Parasitology International, (2016) in press
3) Tanaka, R., et al., PLoS ONE 9, e110769 (2014)
4) Hino, A. et al., Parasitology 141, 1736-1745 (2014)
5) Kajitani R, et al. Genome Res. 24 (8): 1384-1395 (2014)
6) Nagayasu E., et al., PLoS One. 8 (3): e58458 (2013)
7) Nagayasu E., et al., Parasitol Int. 62 (1): 57-65, (2013)

公募支援課題：2015 年度

芽殖孤虫のゲノム解読による条虫類幼虫における無性増殖機構の解明

基盤研究（C）

丸山 治彦・宮崎大学医学部

＜背景・目的＞

芽殖孤虫は、きわめて希であるが致命的な寄生虫である。症状はきわめて特異であり、「ワサビの根のよう」と表現される虫体が皮下をはじめとした体内各臓器で増殖し、皮下や内部臓器に多発性の腫瘤を形成して組織を破壊し、細菌感染や出血をともなって致命的な転帰をとる。有効な治療法は外科的な虫体の摘出だけとされる。

芽殖孤虫が擬葉類条虫のプレロセルコイドであることは以前から指摘されていたが、その本体は不明で、かつては何らかのウイルスに感染したマンソン孤虫ではないかと疑われたことがあった。近年、わが国の研究グループによってミトコンドリア酵素の配列が決定され、芽殖孤虫はマンソン裂頭条虫とごく近縁の独立種であることが明らかになったが、これらの研究で得られた生物学的なデータはごく限られており、成虫は何か、なぜ芽殖孤虫のプレロセルコイドは人体内で増殖するのかなど、芽殖孤虫の謎自体は解き明かされていない。幼虫段階における無性的な増殖は、円葉類条虫である包虫でも病原性の本体をなすものであり、その分子メカニズムの解明は、条虫類の生物学の理解に大きく貢献するだけでなく、幼虫を標的とした新規薬剤の開発にも欠かせない。そこでわれわれは、芽殖孤虫およびマンソン裂頭条虫のゲノムを解読して詳細に比較し、芽殖孤虫のゲノムに特異的に起きている変化を明らかにして、芽殖孤虫、引いては条虫類の幼虫が無性的に増殖するメカニズムを明らかにする。

＜支援の内容＞

芽殖孤虫とマンソン裂頭条虫について以下のシーケンス解析とデータ出力。

・Illlumina ペアエンドライブラリー作成（PE600）と HiSeq（250bp x 2）1 ラン

・メイトペア：MP3kb、MP8kb、MP15kb と HiSeq（150bp x 2）1 ラン

＜支援によって得られた研究成果＞

ゲノム支援以前のデータとして、芽殖孤虫 1 個体由来の DNA から PCR free ライブラリー、3kb Mate-pair ライブラリー、8kb Mate-pair ライブラリーを作成し、Illumina HiSeq 2500 および MiSeq により各 18Gbase、16Gbase、5Gbase のデータを取得している。リードの QC および k-mer 解析により、芽殖孤虫の推定ゲノムサイズは約 1Gbp と予測され、これまに解読された条虫ゲノムと比較して大きいことが明らかとなった。De novo アセンブリーは MaSuRCA、Platanas、AllPath-LG を試みたが、いずれからも満足な結果が得られず、リードの厚みの不足が要因であると考えられた。マンソン裂頭条虫についても同様のライブラリーでリードを獲得し、解析を行っている。

並行して、mRNA リードを芽殖孤虫 2 サンプルから Illumina HiSeq 100bp PE により獲得した（各 7Gbase）。RNA リードの Trinity による de novo アセンブリーは約 30,000 コンティグにまとまり、配列は他の条虫の遺伝子に高い類似性を示した。

現在、ゲノム支援により獲得した新規 DNA リードを用いて de novo アセンブリーを試みている。ゲノム解読後は芽殖孤虫とマンソン裂頭条虫との詳細な比較を行い、芽殖孤虫が無性的に増殖するメカニズムを明らかにする。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

生物学的意義は、条虫類の進化を深く理解できるようになることと、条虫の幼虫段階における無性増殖の仕組みの解明に手がかりが得られることがあげられる。

条虫の中でこれまでに概要ゲノムが決定されているのは、多包条虫 Echinococcus multilocularis、単包条虫 E. granulosus、有鉤条虫 Taenia solium、Hymenolepis microstoma の 4 種で、いずれも円葉類に属する。陸上で生活史が完結する円葉類は条虫の中でも特殊化が進んだグループであり、今回ゲノム支援を希望する擬葉類（芽殖孤虫とマンソン裂頭条虫を含む）とは大きく異なる。擬葉類条虫は、水棲節足動物を第 1 中間宿主として要求するなど円葉類よりも祖先型に近いと考えられており、そのゲノムの解読により条虫類全体の構造を明らかにできると考えられる。

マンソン裂頭条虫と芽殖孤虫はごく近縁でありながら、マンソン裂頭条虫の幼虫（プレロセルコイド）は宿主内で個体数が増えないのに対し、芽殖孤虫のプレロセルコイドは宿主内で無限に増殖し病害性を発揮するという大きな違いがある。一般的に条虫類は終宿主に比べて中間宿主に対しては強い病害性を示すことが多いが、とくに多包条虫のように中間宿主内で無性的に増殖する場合では宿主は死に至る。マンソン裂頭条虫ゲノムと芽殖孤虫ゲノムの詳細な比較により、芽殖孤虫の無性的な分裂増殖のメカニズムを明らかにでき、現在は有効な薬剤が存在しないエキノコックス症の病原メカニズムの解明にも直接つながる。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2013～2015 年度

細菌感染および免疫システムオートファジーに関わる遺伝子発現ネットワークの解明

若手研究（A）

丸山 史人・京都大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

ヒトの主要な病原性細菌である A 群レンサ球菌（Group A Streptococcus；GAS）は、ヒトにおいて多彩な病態を示し、まったく症状を示さない不顕性感染。から、化膿性炎症や致死率の極めて高い劇症型 A 群レンサ球菌感染症などの起因菌となる。このような多彩な疾患を引き起こし、例年のように流行を引き起こすことから、その疾患発症機構の解明に向けて多くの研究が推進されている。その一環として、当研究室で決定した劇症型感染症由来の SSI-1 株を含め（Genome Res., 2003）、これまでに 14 株ものゲノム情報が決定されている。さらに、申請者らが臨床分離株 52 株のドラフトゲノムの取得・解析を行った結果（未公表）、GAS ゲノムの最大約 1/5 が細菌のウイルスであるバクテリオファージ（ファージ）由来であること、また各菌株特異的な遺伝子群の多くがファージ由来であり、ほぼすべてのファージに病原性遺伝子群が存在することが明らかとなった。申請者らはこのファージ獲得に関して、ファージなどの外来性遺伝因子に対する獲得免疫機構を担う Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats（CRISPR）領域との関係性に着目した解析を行ってきた。その結果、種全体としては CRISPR によるファージへの抵抗性を保持しているが、同属の他種よりもその活性は弱く、CRISPR を欠失して数多くのファージを獲得している株（上記の SSI-1 株など）の存在などが明らかとなった（PLoS One, 2011, BMC Genomics, 2009）。加えて、70 株を用いた多株比較ゲノム解析から、本菌においては CRISPR 欠失により多種多様なファージを獲得している系統がある一方、CRISPR を保持する株では、獲得するファージの「種類」を規定する系統がいる可能性が示された（未公表）。いずれの場合においても、A 群レンサ球菌のゲノム進化においてファージの寄与が非常に高いことは明らかである。一方、A 群レンサ球菌は感染時、ヒト上皮細胞内へ侵入するが、侵入した菌の大部分は細胞内のオートファジーと呼ばれる機構によって分解・除去される。オートファジーに免疫機能があることを当研究室が初めて報告するとともに（Science, 2004）、細胞による侵入細菌の認識機構の研究を進めることで、その制御に関わる因子群を明らかにしてきた（PLoS Pathog, 2010, Cell Microbiol, 2012）。

その後、細胞内へ侵入した一部の細菌はオートファジーによる分解を逃れていること、逃れた菌はオートファジーによる「異物としての認識」を受けていないというデータを得ている（未公表）。そこで、感染細胞内の GAS について ORF マイクロアレイ、タイリングアレイによる発現解析を行った結果、病原遺伝子や機能未知遺伝子の他、ファージの組込みや転移に関与する遺伝子群の発現が感染によって亢進しており、これはオートファジーの存在の有無でも大きく異なっていた（未公表）。また、ファージ由来のインテグラーゼ遺伝子を欠損した変異株では、ファージ由来遺伝子だけでなく、ゲノム上の様々な遺伝子の発現が通常の培地のものとは大きく変化していた（未公表）。以上の予備データから、本菌は細胞内へ侵入後、一部はオートファジーにより除去されてしまうものの、残りの一部の菌は細胞内環境に「適応」することにより、細胞内生存を可能としたと考えられる。上記の宿主侵入後にファージ遺伝子群が活性化するという結果に加え、本菌のファージがヒト上皮細胞の存在下で誘導され（Infect. Immun., 2003, 71:7079）、誘導されたファージが形質導入能を持つこと（Infect. Immun., 2003, 71:3782）が報告されていることから、本菌は細胞内でファージの誘導・獲得を介したゲノム多様化を行い、感染時には、動的な遺伝子発現変化により適応しているのではないかと考えた。さらに、GAS の発現変化に対抗する宿主のオートファジー関連遺伝子群の発現制御機構、寄生菌−宿主遺伝子発現ネットワークを明らかにしたいと考えて、本研究計画の企図に至った。

構想を踏まえ、本研究では細胞内寄生性細菌である GAS のファージに着目した細胞内での多様化・生存戦略の解明と細胞内の免疫システムオートファジーの遺伝子発現制御ネットワークの解明に焦点を絞り、次の研究を計画した。

I) GAS 大量ゲノム情報を用いて、特にファージと CRISPR との関係性から本菌の多様化・進化機構を明らかにする。

II) 感染後経時的な GAS と宿主の同時トランスクリプトーム解析（RNA-seq, TSS [Transcription Start Site]-seq） により、遺伝子発現ネットワークをオートファジーとの関わりを明らかにし、菌側の生存および宿主側の感染防御に重要な因子を同定する（感染時特異的な新規 non-coding RNA、antisense RNA、転写開始点なども決定する）。

III) ジャーファーメンターを用いた細胞内環境再現実験系（I, II より予測された重要な遺伝子に影響を与える化学因子を用いる）で GAS の細胞内生存戦略機構を発現レベルで実証するとともに、連続培養を継続することによりゲノム多様化を再現する。

本研究は、予備データから得られた知見を基に、「細胞内」での経時的な細菌・宿主「両者」の攻防をオートファジーの関わりから発現レベルで明らかとし、その結果としての寄生菌ゲノム多様化機構を宿主との相互作用という観点から、ゲノム、トランスクリプトーム、in vitro 再現実験で明らかにする点に特色がある。本研究が達成されれば、病原細菌における感染細胞内を病原性発揮の場としてだけではなく、病原性進化・多様化の場としてもみなすことができる点で、今後の当該分野に与える学術的影響は非常に大きい。また、本菌は、本年度にみられるような、致死率の高い劇症型感染症の流行を引き起

こし得る病原性細菌でありながら、多くのヒト環境において常在している細菌であり、このような細菌の病原性進化機構の解明は、臨床的にも重要な知見となる。また、本研究により、感染に応答した遺伝子発現制御によってどのようにオートファジーをコントロールしているのかが明らかとなれば、新規制御タンパク質や機能性 non-coding RNA 等の同定、そして炎症系等の他の免疫系との共通因子や制御因子の発見が期待でき、オートファジー研究において一つの大きな突破口となると考えた。

＜支援の内容＞

2013 年度は、「大規模ゲノム情報生産支援」のなかで、病原性細菌である A 群レンサ球菌（*Streptococcus pyogenes*、ゲノムサイズ 1.9 Mbp）151 株のドラフトゲノム配列を取得していただいた。申請者が抽出したゲノム DNA について、ライブラリの作製（インサート長 500 bp 程度)、シーケンス（1 サンプルにつき 150Mbp 程度）を Illumina 社の HiSeq2000 を用いて, 101 bp paired end で実施(合計 23Gbp 程度）していただいた。
2014 年度は、A 群レンサ球菌及び人獣共通感染症原因菌（*Streptococcus suis, Streptococcus gallolyticus*）237 株のドラフトゲノム配列の取得をお願いした。
2015 年度は、A 群レンサ球菌 *Streptococcus pyogenes* 4 株（劇症型 2 株＋非劇症型 2 株）の、メチローム（PacBio P6-C4 試薬により 4 検体）とトランスクリプトーム（HiSeq 2000 により RNA-seq を 12 検体）配列取得をお願いした。

＜支援によって得られた研究成果＞

高速シーケンサーの性能の向上によって、細菌多株ゲノム解析は世界的に推進されている。その 一方で、国内の細菌学における研究においては、これらの利用は限定されている。その原因として、細菌学には菌だけでなく免疫学の実験・知識の要求量が多いため、サンプル調製及び解析に対する技術的な要求が高いことが考えられる。そのため、国内での細菌多株ゲノム比較解析の報告は極めて限定されている。国外においては、アメリカの 1 グループが A 群レンサ球菌の多株ゲノム解析を推進している。しかし、特定の抗原型（M3, M49）の細菌株に限定した菌株にのみ着目、そして、それらが劇症型の疾患を引き 起こす機構にのみ着目しており、本研究で明らかにしようとしている本菌種の進化機構、および真に疾患の発揮機構を明らかにする上で重要と考えられる網羅的な抗原型の菌株を用いた研究は存在していなかった。依頼者は、支援を受けるに先立ち、108 株の本種の菌株での研究を推進しており、本菌株の多様化、病原性発揮機構の解明が可能な状態にあることから、ゲノム医学に占める本研究の重要性は高く、基礎ゲノム科学、特にゲノム微生物学に対して重要な知見を示すことができると考えていた。そのため、本支援に先立ち GenBank より、(ドラフト）ゲノム、および Short Read Archive から全ての S. pyogenes (GAS) 配列データと種々のメタデータ(生育条件、単離元、臨床データなど) を取得した(199 株分)。分類に利用される表面抗原の M タンパク質の型や、臨床情報、基質利用能などの生化学的なデータを収集し、これらを元にデータベースを構築した。特に M タンパク質は 100 種類以上あり、病原性にも関与していることから重要性が高い。そこで型の異なる 50 株程度の A 群レンサ球菌株（国立感染症研究所）からゲノム配列を Illumina GAIIx にて独自に取得した。そして、メタデータによる分類に加え、すべての GAS が共通して保有する遺伝子セット（core-genome）や GAS 全体で一株でも保有する遺伝子セット（Pan-genome）を決定した。遺伝子ごとの変異速度についても算出し（dN/dS)、正の選択がかかっている遺伝子種を調べ、本菌で重要なゲノム再編成のパターンや、ファージ、 CRISPR についても予測を加えることで本種の多様化機構の一 部を明らかにしていた。本「ゲノム支援」を受けることができたため、予備検討から統計的に実証困難であった、本菌株で重要な劇症型の菌株に特異的なアミノ酸置換の同定が、菌株数を 151 株に増やすことで可能となった。すなわち「人喰いバクテリア」化という本菌種おいて重要な遺伝子型を明らかにするという重要な課題を世界に先駆けて達成することができた。具体的な結果を示すと、まず、本種の多様化においては、獲得免疫システムである CRISPR とファージが主要な役割を果たし、種内で 2 つのグループが存在することがわかった。そして、これには CRISPR の欠失が重要であることがわかった。また、それぞれのグループの特徴として、CRISPR を保有するグループはゲノムを構成する遺伝子数がほぼ一定で保守的であり、一方、CRISPR を欠損したグループは多様なファージが出入りし、Pan-genome が大きく、さらに Core-genome サイズが CRISPR 保有型に比べ小さくなっていた。すなわち、「ファージを介したゲノム縮小という新奇ゲノム進化機構」の存在を明らかにすることができた。しかし、CRISPR 欠損型には劇症型株が多く含まれる原因の解明が重要な課題として残されている。この原因としては 3 つの可能性が考えられる。すなわち、i) 劇症型特異的遺伝子は存在しないため、劇症型特異的 SNPs の関与、ii) ファージによってもたらされる病原因子の組み合わせ、iii) ファージがもたらすメチラーゼによるメチル化の病原遺伝子発現への影響である。そこで、2015 年度の現在進行中の支援である、上記 ii), iii)のメチローム、トランスクリプトーム、網羅的 TSS 情報を得ることによって、GAS ゲノム内のファージがもたらす本菌の病原性を規定するエピジェネティックな影響が明らかになると考えている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本「ゲノム支援」を受けることができたため、劇症型の菌株に特異的な SNPs を 40 程度同定することができた。すなわち、SNPs に関する、いわゆるウェットの実験を追加することで「人喰いバクテリア」化という GAS おいて最重要な表現型の解明を世界に先駆けて達成できる展望が開かれた。さらに、2014 年度も引き続き、支援を受けることが決定したことから、ヒトだけに特異的に棲息する本菌種に加えて、人獣共通感染症であり、ヒトに劇症型の疾患を示す *S.suis, S.gallolyticus* のゲノムデータを合わせて解析することが可能となり、宿主特異性を規定する機構や、約 75 種類知られるレンサ球菌属に普遍的なヒト疾患発症機構の解明が可能になるものと考えられる。前述のように国外においては、アメリカの 1

グループが GAS の多株ゲノム解析を推進している。しかし、特定の抗原型（M3, M49）の細菌株に限定した菌株にのみ着目、そして、それらが劇症型の疾患を引き起こす機構にのみ着目しており、本研究で明らかにしようとしている 3 菌種の進化機構、および真に疾患の発揮機構を明らかにする上で重要と考えられる網羅的な抗原型を含む菌株を用いた研究は存在していない（宿主特異性を研究するうえで有用な *S.suis*、*S.gallolyticus* については申請者らのグループのみである)。本支援により 256 株の GAS の菌株での研究を推進し、本菌株の多様化、病原性発揮機構の解明に関して上述のような極めて重要な知見を得ており、さらに人獣共通感染症である *S.suis*、*S.gallolyticus*のゲノムデータが得られれば、レンサ球菌属で普遍的な劇症化因子が明らかになると考えられることからゲノム医学に占める本研究の重要性は極めて高い。また、支援の成果として、GAS は同一種でありながら、細菌の獲得免疫機構である CRISPR に規定され、亜種化（新規のゲノム縮退機構）が進んでいることを情報的に明らかにしたが、さらに人獣共通感染症の 2 種のゲノムデータにより、病原細菌の宿主特異性決定機構が明らかになると期待できる。

さらに、本 2015 年度の支援により、世界で毎年５０万人もの死者をだす GAS の「人食いバクテリア」化という表現型の原因解明が、世界に先駆けて達成されることとなり、その重要性は極めて高いといえる。

これまで、GAS の劇症型化に関しては、個別の病原因子の重要性や多くの病原因子を制御する二成分制御系の CovRS への変異の重要性が議論されている。しかしながら、特定の系統の菌株のみ、特に劇症型の菌株のみの比較解析から得られた知見に留まっているのが現状である。本申請は、本支援により広い系統、非劇症株を敢えて数多く用いることで得られた結果に基づき着想した内容であり、同様の研究は、他の細菌種を含めても例がない。

原核生物のメチローム解析は、技術の進展により急速に広まっている。また、細菌の個別のメチラーゼの制限修飾以外への影響を調べている研究は増えつつあるものの、メチロームの病原性への影響については、2012 年の病原性大腸菌のファージ上のメチラーゼの例に限定されている。GAS のメチローム解析の例は存在せず、また、GAS 株間のメチラーゼ数の違いはファージ上にコードされている（全て制限酵素がなく単独で存在）にも関わらず、先行例は存在していない。この点にかんしても、本ゲノム支援によって開かれた新たな展望は、極めて広く今後、多大な実験的実証が望まれる。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし。

公募支援課題：2012 年度、2013 年度

大腸癌の発癌や進展に深く関与しうる長鎖 ncRNA の量的・質的な異常の探索

若手研究（A）

丸山 玲緒・札幌医科大学医学部

＜背景・目的＞

mRNA と類似の構造を取りながらも、タンパク質に翻訳されることのない長鎖非コード RNA (long non-coding RNA; lncRNA) が細胞・生命活動において重要な役割を担っている可能性があることが、ここ数年で明らかになってきた。lncRNA の一つである HOTAIR の過剰発現は乳癌における明らかな独立した予後不良因子であることが報告されたが（Gupta, Nature, 2010)、その HOTAIR が複数のクロマチン調節蛋白と結合し、あたかも転写調節因子のように標的となる遺伝子領域をエピジェネティックに制御していることが明らかとなり(Tsai, Science, 2010)、また同様の機能を持つと思われる lncRNA がマウス ES 細胞における機能的スクリーニングにおいても多数同定された(Guttman, Nature, 2011)。これらの最近の知見を総合すると、癌においてもこれまで同定されてきた癌遺伝子や癌抑制遺伝子と同様に重要な病的意義をもつ lncRNA が存在する可能性が高い。それらの量的な異常（増幅や欠失、DNA メチル化による抑制など）や、質的な異常（突然変異や染色体転座による融合遺伝子など）が発癌において第一義的な原因、ドライバー因子となっている可能性が十分にある。

本研究では内視鏡によって得られる臨床検体を、次世代シークエンサーを用いて分子レベルで統合的・包括的に解析することにより、癌における長鎖 ncRNA の量的・質的な異常を同定し、消化器癌において“p53 の突然変異”と同程度の強いインパクトを持ちうる lncRNA の異常が果たして存在するか否かを明らかにすることを試みた。

＜支援の内容＞

2012 年度は、lncRNA を含む全エクソン領域のエキソーム解析を、早期病変を中心とした大腸癌 50 検体（11 症例 39 病変）で施行して頂いた。国立遺伝学研究所の井ノ上逸朗先生の研究室にて、Agilent SureSelect Human All Exon V5 + lncRNA (early access)を用い、lncRNA 領域を追加で capture したライブラリを作成した。豊田敦先生の研究室にて 150pb+150bp の Paired end でシークエンスを行った。得られたデータの 1 次解析、2 次解析を遺伝研の井ノ上先生並びに東京大学の森下真一先生の研究室で施行して頂いた。

2013 年度は、本研究を更に補強するべく、lncRNA の発現量の正確な定量や splice variant、fusion gene の探索を目的として、大腸癌の癌部・非癌部（2012 年度にエキソーム解析を施行した同一検体を含む）32 検体の RNA-Seq 解析を施行した。鈴木穣先生の研究室にてライブラリの作成、並びに 100bp+100bp の Paired end の RNA-Seq の施行、更に TopHat 等を用いたデータの 1 次解析を施行して頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞

2012 年度に施行したエキソーム解析では KRAS, BRAF, TP53 等の既知の遺伝子変異に加え、新規の遺伝子変異や lncRNA 領域の変異が複数同定された。その中でも特に、①KRAS 変異と相互排他的に変異を認める lncRNA、②de-novo 発癌に関与しうる新規の遺伝子変異の 2 点に着目して、更なる検証を行った。初めに、同定されたこれらの変異をサンガー法により複数の検体で検証したところ、数種類の lncRNA で高頻度に変異が認められた。これらの変異に関しては、IonPGM を用いたカスタムのアンプリコンシークエンス解析により、更に多くの臨床検体での検証を行った。最終的に絞り込まれた lncRNA の変異の病的意義については、臨床病理学的な検証を行うとともに、癌細胞における機能的意義に関しての分子生物学的な検証も併せて行っている。

2013 年度に施行した RNA-Seq 解析では、癌において高発現を認める lncRNA のリストを作成することができた。さらに TCGA 等の公共データベースや自施設のデータを統合的に解析し、消化器癌において病的意義を持つ可能性のある lncRNA 候補の絞り込みを行った。いくつかの lncRNA に関しては、癌細胞におけるノックダウン実験等を行い、癌細胞に与える影響を検証した。また RNA pull-down 実験や質量分析により、lncRNA と結合するタンパク質を同定し、その分子作用機構の解明を進めている。更に RNA-Seq 解析により lncRNA を含む fusion gene の候補や splicing variant が複数同定され、検証作業を進めている。

また本支援で施行して頂いたエキソーム解析や RNA-seq 解析では、lncRNA に限らず coding 遺伝子に関しても並行して解析を進めており、それによる副次的な成果として、上記①、②に関連する coding 遺伝子の新規の変異や、腫瘍血管新生に重要と思われる遺伝子の発現異常も同定し得た。現在、それらの機能的・病的意義の検証を並行して進めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本制度により、多検体でのエキソーム解析（含 lncRNA）と RNA-Seq 解析の支援を頂き、癌における lncRNA の異常を包括的に探索することで、ある程度の数の lncRNA が癌において量的・質的変化を示すことを明らかにすることができた。今後はこれらの候補 lncRNA の病的意義に関して、一つ一つ丁寧に検証していくことが最も重要であると思われた。lncRNA はまだまだ未開拓な領域であり、この候補リストの中から真に病的意義のあるものを同定しえた場合には、それを標的とする全く新しい治療戦略が生まれる可能性もあると思われた。

＜支援成果公表リスト＞

該当無し

公募支援課題：2010 年度

出芽酵母の転写単位確定とノンコーディングＲＮＡ発現の全貌把握

若手研究（Ｂ）

三浦 史仁・東京大学大学院理学系研究科

＜背景・目的＞

真核生物ではゲノムのいたるところから転写が起こり、多くの ncRNA が発現している。しかし、多様な ncRNA の存在を示唆する大規模解析が行われているにもかかわらず、ncRNA の全貌を正確に把握することは難しい。これは RNA-Seq などの従来のトランスクリプトーム解析では１つ１つの転写物の転写範囲を確定することが原理上困難であったためだと考えられた。そこで、本研究では独自に開発した Cloning-free GIS 法を用いて出芽酵母の転写単位を確定し、同時に ncRNA 発現の全貌を把握することを目指した。特に減数分裂期の転写物に注目し、そのヌクレオソーム構造との関連に注目して動態解析を行うことにした。

＜支援の内容＞

Cloning-free GIS 法では転写物を環状化した後に、5′ 末端と 3′ 末端の連結部分を取り出してこれらを同時に配列決定する。この結果、１つの転写物の転写開始点と転写終結点を同時に決定することが可能となる。本研究では、出芽酵母の野生株および ncRNA を分解する機構に関わっている rrp6 の欠損株、さらには、我々の過去の研究から多くの ncRNA が出現していることが明らかになっている出芽酵母の減数分裂期の細胞を対象とし、Cloning-free GIS により ncRNA の転写範囲の確定を試みることにした。

支援班へ依頼したのは、この Cloning-free GIS により調製した鋳型および、同一サンプルから同時に調製した MNase-Seq の鋳型の配列決定であった。シークエンサーの空き状態を勘案して、比較的スケジュールに余裕がある SOLiD システムを選択して配列決定を実施していただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

SOLiD システムによる配列決定が支援担当研究室で進められた。しかし、残念なことに配列決定が機械的トラブルで途中停止するといった事故が起こってしまった。支援担当者等の努力により、ランの停止直前までに取得が完了していたデータからの塩基配列抽出がなされたものの、得られたリードの質が十分でなく、結局これらのリードのほとんどが解析に利用できなかった。つまり、残念ながら支援によって新たに得られた成果は全くなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

特になし

＜支援成果公表リスト＞

特になし

公募支援課題：2010 年度

長期縦断大規模ゲノム疫学研究による生活習慣病発症の遺伝因子に関するエビデンス 構築

基盤研究（B）

三木 哲郎・愛媛大学大学院医学系研究科

＜背景・目的＞

我々は、かねてより本態性高血圧の感受性遺伝子解析に取り組み、特定領域研究「ゲノム医科学」（ミレニアム・プロジェクト）や「応用ゲノム」での研究活動を通じて新規高血圧感受性遺伝子 ATP2B1 を同定した。ATP2B1 と高血圧との関連は、世界の 27 万人を対照とした解析でも再現され、これまでに明らかとなった高血圧感受性遺伝子の中で疾患寄与率が最も高い。ATP2B1 は細胞膜上のカルシウムポンプをコードする遺伝子であり、我々は ATP2B1 の血管平滑筋特異的ノックアウトマウスでは顕著な血圧上昇を示すことを示した。また、このノックアウトマウスでは、血管平滑筋細胞内のカルシウム貯留が亢進しており、その結果として大血管の収縮が亢進することが、高血圧を引き起こすメカニズムであることも解明した。加えて、カルシウム動態に関連する TRIC-A の遺伝子多型も高血圧と関連することも明らかにし、細胞内でカルシウム動態に関わる分子群が本態性高血圧の発症に重要な役割を果たすことを明示した。

しかしながら、ヒトの本態性高血圧や血圧レベルに対する ATP2B1 や TRIC-A 遺伝子多型の影響はさほど強くなかった。海外で行われた遺伝性高血圧の原因遺伝子解析の結果を参照すると、これら遺伝子にはゲノムワイド関連解析では検出されないようなレアバリアントが存在し、血圧調節に大きく関わっていることが推察された。

そこで「ゲノム支援」では、III 度以上の本態性高血圧患者を対象としたエクソーム解析を行い、①ATP2B1 および TRIC-A 等カルシウム動態に関わる遺伝子上のレアバリアント、ならびに②これまでの GWAS で同定された感受性遺伝子上のレアバリアントと本態性高血圧の関連を明らかにすることを目的とした。

＜支援の内容＞

以下の基準を満たす高血圧患者 30 例を対象としたエクソーム解析の支援を受けた。

血　圧：未治療時の血圧が 180/110mmHg（Ⅲ度高血圧）以上
性　別：男女とも
家族歴：少なくとも片親にあり
肥　満：BMI 25kg/m^2 未満
年　齢：60 歳以下（採血時）あるいは発症年齢 50 歳以下

＜支援によって得られた研究成果＞

Ⅲ度以上の高血圧患者 30 名のエクソーム解析の結果、公共のデータベースに収載されていない 9,438 のレアバリアントが同定された。しかし、この中で本研究のターゲットである ATP2B1 や TRIC-A にマップされたものは皆無であった。東アジア人において、ATP2B1 に次いで強く血圧と関連する遺伝子として、ゲノムワイド関連解析から同定された SNP の効果量が 1mmHg 以上の 2 つの遺伝子（FGF5、CNNM2）についても同様に検討したが、新規レアバリアントは見つからなかった。CASZ1（効果量 0.5 mmHg）には 3 つのレアバリアントがエクソン 11、19、21 に見いだされた。また、PLCD3（効果量 0.2 mmHg）にも 2 つのレアバリアントが見つかっているが、統計学的に血圧との関連を示唆する成績は得られなかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

米国フラミンガム研究では、地域住民約 3,000 人を対象に遺伝性高血圧の原因遺伝子を網羅的にシークエンスした結果、本態性高血圧と関連するいくつかの新規レアバリアントを同定している。対象集団の中で、それらを 1 つ以上保有するケースの血圧平均値は、対照と比して大きく異なることが報告された。

本研究開始時には、上記の例示のように、本態性高血圧のような多因子疾患においても、レアバリアントが量的形質に強く関与しているものと考えられ、地域住民を対象としたエクソーム解析で候補となる変異を絞り込めるものと期待されていた。しかし、本研究のエクソーム解析で実際に同定されたレアバリアントは予想以上に多様であった反面、ゲノムワイド関連解析で同定された感受性遺伝子にはレアバリアントが殆ど見当たらないこと、また、研究の規模が 30 例と比較的少数であったことから、エクソーム解析の結果から特定の変異あるいは遺伝子と高血圧との関連を統計学的に結びつけることは困難であった。このことは本研究に限らず世界的に同様である。今後の遺伝子解析技術の進歩によって、より迅速・安価に多数例のディープシークエンスが可能になれば、これまでに見つかっていないレアバリアントや遺伝子と高血圧との関連が描出されることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2014 年度

トランスクリプトーム情報を基盤にした骨芽細胞と脂肪細胞の分化機構の統合的解析

基盤研究（C）

水野 洋介・埼玉医科大学ゲノム医学研究センター

＜背景・目的＞

間葉系幹細胞は脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、筋細胞など、様々な細胞種への分化能を有する。特に脂肪細胞と骨芽細胞への分化については、そのバランスを調節するメカニズムは骨粗鬆症や生活習慣病の発症や病態と密接に関連する。我々はこれまで、骨髄間葉系幹細胞が骨芽細胞や脂肪細胞へ分化する際の遺伝子制御ネットワークを描出し、骨芽細胞や脂肪細胞への分化を調節する遺伝子やマイクロ RNA (miRNA)を同定してきた。

一方で、ゲノム上の１つの遺伝子ローカスからは、実際には単一の RNA のみが発現するのではなく、転写開始点や使われるエクソンなどが異なる多くの RNA バリアントが発現し、それらが生体内の組織や細胞の種類によって繊細に使い分けられていることが分かってきた。さらに、マイクロ RNA 以外にも様々な非コード RNA（ncRNA）が機能性 RNA として生体内の様々な現象に関与していることが明らかになってきている。そこで本研究では、間葉系幹細胞が脂肪細胞分化及び骨芽細胞分化する際に発現量が変動し、分化の調節に関わる RNA バリアントや ncRNA を網羅的に同定する事を目的とした。

＜支援の内容＞

今回我々は、同一遺伝子の中でも転写開始点や使われるエクソン、3’UTR 末端の長さが異なる RNA バリアントと ncRNA に着目し、間葉系幹細胞が脂肪細胞分化および骨芽細胞分化する際の調節に関わる RNA バリアントや ncRNA を同定することを目的として、マウス間葉系幹細胞に脂肪細胞分化誘導刺激または骨芽細胞分化誘導刺激を加え、経時的に細胞を採取して全 RNA を抽出した。採取する具体的なタイムポイントとしては、誘導刺激添加時を 0 として、1 時間後、12 時間後、2 日後、4 日後、6 日後、10 日後を設定した。コントロールとして誘導刺激を加えない細胞も用意し、同様のタイムポイントで細胞を採取した。分化後のサンプルについては、qRT-PCR 法による分化マーカー遺伝子の発現定量を行い、また脂肪細胞分化サンプルでは BodyP による脂肪滴染色、骨芽細胞分化サンプルではアルカリフォスファターゼ染色を行い、誘導刺激を加えることにより細胞が適切に脂肪細胞や骨芽細胞に分化していることを確認した。採取した細胞から全 RNA を抽出し、得られたそれぞれの全 RNA サンプルについて、Agilent strand specific kit を用いて、poly A selection も行ってライブラリ調整を実施した。得られた合計 19 のライブラリについて、HiSeq2500 を用いて 100b paired end で RNA-Seq 法によりシーケンスを実施し、転写物の同定と定量を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

19 サンプルの各々において、約 2000 万～6200 万のリード数、かつ 92%以上の配列で Q30 以上のリード品質が確保された配列解析結果を得ることができた。得られた配列タグをゲノムにマッピングし、個々の遺伝子についてエクソン単位でのタグ数をカウントした。分化サンプルで特徴的な発現変動が捉えられていることを確認するため、まず脂肪細胞分化を促進する転写因子 PPARγに着目した。PPARγでは、脂肪細胞分化時に特に重要な働きを持つバリアント（アイソフォーム）として PPARγ2 が知られており、PPARγ2 は固有の転写開始点から始まる特徴的な第一エクソンを有している。今回の脂肪分化サンプルで PPARγ領域について調べたところ、実際に PPARγ2 の特徴を示す第一エクソンの発現量が著しく上昇していることが確認できたことから、今回の分化サンプルを用いた RNA-Seq 解析データには、分化特異的な転写開始点や選択的エクソンを含む遺伝子バリアントを検出するのに十分な情報が含まれていると考えることができた。実際に PPARγ以外の遺伝子領域で、分化に伴って転写開始点やエクソン別発現パターンが変動する遺伝子が検出された。さらに、これまでの我々の研究成果で、特定の転写因子が骨芽細胞分化と脂肪細胞分化のスイッチ役を担い、骨芽細胞分化を促進する機能を持つことを報告してきたが、こうした遺伝子において、3’UTR の長さが異なるバリアントが骨芽細胞分化時に発現していることを新たに見出した。これらのバリアントの中に、実際に脂肪細胞分化、骨芽細胞分化を制御する物が含まれている可能性が示唆される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

科研費本体ではコストの問題もあり、当初は RNA バリアントの検出に関してエクソン発現アレイを中心に解析を進める予定であった。エクソン発現アレイでは ncRNA も含めた既知の RNA について、エクソンレベルでの発現変動を一定精度で効率よく検出することができる。しかしエクソン発現アレイのみでは、転写開始点や 3’UTR の長さが異なるバリアントを区別して定量する事には限界がある。今回ゲノム支援により、全 19 サンプルについて比較的高いリード数で RNA-Seq を実施して頂いた。これにより、エクソン毎の発現定量はもとより、転写開始点や 3’UTR の長さが異なる転写物の発現変動、さらに未知の ncRNA の発現変動も併せて検出することができるようになった。今後得られた発現データを更に詳細に解析することにより、分化を制御する特定の RNA バリアントや ncRNA を同定し、遺伝子レベルよりもさらに一歩踏み込んだ詳細な分化制御 RNA ネットワークの解明に大きく寄与することが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

公募支援課題：2010 年度

個体内における電離放射線誘発突然変異成立過程の解明

基盤研究（Ｓ）

三谷 啓志・東京大学大学院新領域創成科学研究科

＜支援の内容＞

それぞれの両親から異なるアレルを１コピーずつ受け継ぐF1においては、親とは異なる新たな発現制御が見られることがある。本研究では、ゲノムの解析が進んでいるモデル生物のメダカ近交系統を材料として、「ゲノム支援」により遺伝的に離れた集団に由来する近交系統間（北日本集団 HNI 系統、南日本集団 Hd-rR）の交雑個体の組織（腸）を材料としてアレル間に発現量が偏る（allelic imbalance, AI）遺伝子の網羅的転写解析を行った。この両近交系統間には、ゲノム領域で 3.4%の single nucleotide polymorphism（SNP）、遺伝子コード領域において1.8%のSNPが存在するにもかかわらず両系統のF1交雑個体は健康で生殖可能である。このような多くのSNP が蛋白質コード領域と転写制御領域のあるアレルがF1やそれ以降の世代で共存したときにどのように転写ネットワークとして制御されるのか、特に遺伝子発現ストレスとして放射線応答誘導の種内での違いは、これまで注目されておらず、新規のアプローチとして着手した。

本研究では両近交系統およびF1成魚６個体の腸を材料にIllumina® Genome Analyzer IIx（GA）による網羅的な転写産物の解読（RNA-seq).の支援を受け、親系統、F1系統ならびにF1系統にγ線５Gy照射４時間後の解析を行った。解析は、Seq sample kit （イルミナ社）を用いて、プロトコール通りに処理後、1サンプルあたり解析用フローセル 1 レーンを用いて 36 塩基長のシングルエンド法で行った。SNP の検出処理からは，1 レーンあたり約 18 万 SNP ポジションにおける 800 万リード分の情報が出力された。遺伝子発現量の定量法に，コード領域上にマッピングされたリード数（塩基数）の総和を用いた。SNPが検出された各ポジション上のリード数の総和を遺伝子ごとに算出し、総発現量およびアレル発現量を Read per kilobase of exon per million mapped reads(RPKM)補正した。これらの解析技術については、大学院生への指導も支援していただき実施した。

＜支援によって得られた研究成果＞

F1 交雑個体および親系統間で共通して検出されている約 5300 genes について SNP 解析した。解析した遺伝子群の中では、系統間で大きく発現量の異なる遺伝子が多く見られ、南日本集団 Hd-rR に発現量の高いアレルがより多く見られた。遺伝子の発現量がアレル間で偏る遺伝子では、親系統間で発現量の低い方のアレルの発現がF1で増える傾向があった。また、親系統またはF1で見ても遺伝子発現のアレル間の偏りとアミノ酸置換率に相関が見られなかった。さらに転写制御ネットワークの解析の進んでいる放射線ストレス曝露によるアレル転写制御を10Gy 4時間後で行った。その結果、非照射時に比べて遺伝子発現制御が見られる遺伝子群にアレル間で誘導率に偏りがある遺伝子を発見した。この遺伝子群のひとつを定量的RT-PCRによって解析したところ、RNA-seq解析と同様に、F1における片方のアレルの発現増加およびそのアレル由来の親系統における発現増加も確認された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ヒト集団間のアミノ酸置換について選択圧が示唆されるものについてメダカ野生集団間でスクリーニングした先行研究では多くの遺伝子に相同位置にメダカでも選択圧がかかっている実例が認められており、それらの多くは、何らかのヒトと共通した環境適応に関連すると考えられている。今回。交配個体を用いることでメダカの豊富に存在する地域集団のアレル間発現多型性を RNA-seq 解析により定量的かつ再現性のあるデータを把握することができた。さらに放射線応答時の遺伝子発現量の誘導にも興味深い多型性を示す遺伝子が同定された。これらは、自然環境に生じた転写の量的制御機構もタンパク質のアミノ酸置換変異とは別に、種内の多様性を生み出す原動力であることを示している。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし

公募支援課題：2010 年度、2012 年度

リシーケンシングによる関節リウマチ感受性稀少変異の探索

基盤研究（C）

光永 滋樹・東海大学医学部

＜背景・目的＞

関節リウマチ（RA）は全身性自己免疫の多因子疾患であり、滑膜の炎症と過形成、自己抗体の産生、関節および骨破壊により特徴付けられ、さらに心血管、肺、精神的および筋肉の障害といった全身性の様相を呈する。RA の原因は完全には解明されていないが、RA 発症リスクの約 60%が遺伝要因であり、そのうち 1/3 は HLA であると考えられている。遺伝要因解明のため、これまでに Common Disease-Common Variant 仮設に基づく全ゲノム関連解析やそれらのメタ解析が行われてきた。10 万例以上の症例を対象にした最近のメタ解析によると、これまでに同定された HLA 領域以外の 100 余りの RA 感受性遺伝子では、欧米人で 5.5%、アジア人で 4.7% しか遺伝要因を説明できていない。一方、残りの遺伝要因を説明するために Common Disease-Multiple Rare Variants 仮説が提案されている。これによると、種々の遺伝子に存在し通常の全ゲノム関連解析では検出できない稀少／低頻度の SNV が遺伝要因の残りの部分に寄与しているとされる。

全ゲノム関連解析に代わる解析手法としてエクソーム解析や、全ゲノム関連解析で見いだされた疾患感受性遺伝子の多量検体でのエクソンの塩基配列解析が、稀少／低頻度 SNV 探索のために導入されてきた。実際に高トリグリセリド血症、RA、アルツハイマー病等で、疾患感受性遺伝子での稀少／低頻度 SNV の集積が報告されている。そこで我々は、Common Disease-Multiple Rare Variants 仮説に基づき、RA 感受性の稀少／低頻度 SNV 同定のためにエクソーム解析を行った。

＜支援の内容＞

辻省次先生（東大・医・神経内科）、 加藤和人先生（阪大・医・医の倫理と公共政策学）、井ノ上逸朗先生（遺伝研・人類遺伝）を支援担当者として、2010 年度は関節リウマチ患者のエクソーム解析 19 例、対照群 2 例、2012 年度は関節リウマチ患者のエクソーム解析 20 例の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

2010 年度の支援により、19 例の関節リウマチ（RA）患者のエクソーム解析結果と、非自己免疫疾患患者のエクソーム解析結果 44 例とを比較した。RA 感受性遺伝子の場合、アミノ酸変異をともなう low/rare variant の 1 遺伝子あたりの数は対象群よりも多いと考えられるので、その値を比較し、RA 感受性候補遺伝子の絞り込みを行った。その後、患者群 48 例、対象群 48 例で SNV の validation と 1 次スクリーニングを行い、p 値が 0.1 以下のものは患者群 432 例、対象群 432 例で関連解析を行った。絞り込んだ 15 遺伝子のなかで 1 次スクリーニングの p 値が 0.1 以下のものは *BTNL2, NOTCH4, MYPN* の 3 遺伝子だけであった。これら 3 遺伝子に存在する SNV の関連解析で得られた最も低い p 値は、*NOTCH4*: p = 4.02E-12、*MYPN*: p = 0.0047、BTNL2: p = 4.55E-09 であった。*BTNL2* は最も強い RA 感受性遺伝子として知られている *HLA-DRB1* と、やはり RA 感受性遺伝子として報告されている *NOTCH4* の間に存在し、どちらからも 170 kb の距離にある。そのため検出された関連はそれらの遺伝子との連鎖による可能性も考えられた。しかし、それらの遺伝子の RA 感受性アリルで補正を行っても完全連鎖にある 3 つの SNP は RA との有意な関連を保持していた（*DRB1*04:05, *04:01, *10:01*: p = 0.0156, rs2071282-T in *NOTCH4*: p = 0.00368）。よってこれらの結果から、*BTNL2* は *HLA-DRB1* および *NOTCH4* からは独立して RA 感受性を付与すると考えられた。

2012 年度の支援により RA 患者のエクソーム解析例が増えたので、共同研究者から提供された症例も含め、RA59 例、対照群 93 例で、エクソーム解析データの quality control のための絞り込みを行った後、両群の比較を行った。稀少／低頻度 SNV にフォーカスするため、またこれまでの全ゲノム関連解析で同定されている可能性が高いと考えられるため、対照群で 5%よりも大きい MAF をもつ遺伝子は解析の対象から除外した。Common Disease-Multiple Rare Variants 仮説によれば RA 感受性遺伝子には稀少／低頻度 SNV が集積していると考えられるので、比較は gene-burden test により行った。107 遺伝子で有意差（$p < 0.05$）が検出された。

107 遺伝子中の *NDUFA7* は 17 番目に小さい p 値を示し（p = 6.68E-03）、27.1%の RS 患者が *NDUFA7* に SNV を有していた。さらに以下の理由によりこの遺伝子に着目した：1) NDUFA7 はミトコンドリア電子伝達系の Complex I のサブユニットのひとつである、2) 活性酸素（reactive oxygen species, ROS）の 90% はミトコンドリアで産生される、3) 酸化ストレスが RA 発症に関係しているとの多数の報告がある。

それで次に、RA59 例のエクソーム解析で検出された *NDUFA7* の 3 つの SNV について、432 例ずつの RA 患者と対照群で関連解析を行った。関節破壊が重篤なもの（432 例中 293 例）では gene-burden test で有意な関連が認められた：p = 0.011 OR = 1.81, 95% CI = 1.14 – 2.90。

RA 発症には酸化ストレスの関与が考えられており、例えば酸化ストレスマーカーである尿中の 8-hydroxylguanin が RA 患者では有意に増大している。ミトコンドリアは ROS の供給源であることから、症例／対照関連解析で RA と有意な関連が認められた遺伝子に存在する SNV が、電子伝達系におけ

る電子の漏出と、漏出した電子による ROS の産生を増大させている可能性が考えられた。そこでミトコンドリア電子伝達系の Complex Ⅰ – Ⅴ および complex assembly factors のサブユニットについて、59 例の RA 患者エクソーム解析結果について再解析を行ったところ、59 遺伝子で 105 の SNV が検出された。この中から gene-burden test でオッズ比が 1 以上の 3 遺伝子 *SDHAF2*, *SCO1, ATP5O,* 5 SNV を選び、432 例ずつの RA 患者と対照群で関連解析を行った。その結果、*NDUFA7*, *ATP5O*, *SDHAF2*, *SCO1* の 4 遺伝子、8 SNV を用いた pathway-burden test で、関節破壊が重篤なもの（432 例中 293 例）では有意な関連が検出された：p = 1.56E-04、OR = 16、95% CI = 1.43 – 3.28 （432 例全体では p = 6.58E-03、OR = 1.70、95% CI = 1.15 – 2.53）。

本研究で検出された RA 感受性 SNV は、各 SNV の頻度が低いこともあり、RA の有病率を 1%としたとき、liability threshold model により説明できる遺伝要因 0.13%であった。

本研究において、RA 患者では対照群に比べ、Complex Ⅰ – Ⅴ で構成されるミトコンドリア電子伝達系、およびその complex assembly factors に SNV が集積していることを pathway-burden test で示した。RA 発症には酸化ストレスが関与していると考えられており、自己抗体である抗 CCP 抗体の産生、滑膜における炎症と過形成、関節や骨破壊の症状が観察される。ROS は p38MAPK の活性化および DNA 損傷により p53 を活性化することが報告されている。また p53 に変異を誘導することも知られており、RA 患者では滑膜に変異した p53 が観察され、その変異は 80%が G/A および T/C transitions であり、NO や酸素ラジカルによる変異に特徴的なものである。活性化 p53 は PADI4 を活性化し、タンパク質の異常なシトルリン化を促進するので抗 CCP 抗体の産生につながると考えられる。さらに活性化 p53 は NFkB を活性化することにより炎症を引き起こすことが報告されている。抗 CCP 抗体も炎症に関与していると考えられる。関節および骨破壊についても、ROS による mTOR の活性化が破骨細胞および fibroblast-like synoviocytes を活性化するので、ROS の関与が考えられる。ミトコンドリア電子伝達系およびそれに関連した complex assembly factors に集積した SNV により電子の漏出とそれによる ROS の産生が増大するとすれば、上述のように RA 患者に特徴的な症状の少なくとも一部については説明可能である。

今回解析の対象とした稀少／低頻度 SNV は 59 例の RA 患者のエクソーム解析で検出されたものである。ミトコンドリア電子伝達系の Complex Ⅰ – Ⅴ は 97 種類の遺伝子にコードされたタンパク質により構成され、その構成には 35 種類の assembly factors が関与している。エクソーム解析の症例数を増やせばそれらの他の遺伝子での稀少／低頻度 SNV も検出されると考えられるので、今後ミトコンドリア電子伝達系に関連した遺伝子を対象に症例数を増やして検証する必要がある。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

2010 年度の支援により同定した *BTNL2* は B7 ファミリーに属するが、その受容体は不明であり、これまで知られている B7 ファミリー受容体（CD28, CTLA-4, PD-1, ICOS 等）には結合しないこと、BTNL2-Fc の可溶性キメラタンパク質を用いたマウスでの実験から、炎症性疾患における negative co-stimulatory 分子であることが報告されている。さらに同様なキメラタンパク質を用いて、BTNL2 は T 細胞活性化の過程において、Foxp3 の de novo の発現を促進し、iTreg を誘導することが最近報告された。よって免疫学的な面からも BTNL2 が RA 発症に関与している可能性が高いと考えられ、今後の機能解析により自己免疫疾患としての RA の理解が進むと考えている。

2012 年度の支援により RA のエクソーム解析例が増えたのでより詳細な関連解析が可能になった。これにより、ミトコンドリア電子伝達系に関連したたんぱく質をコードする遺伝子に稀少／低頻度 SNV の集積がみられることを明らかにした。RA 発症には酸化ストレスの関与が考えられてきたが、この SNV の集積は酸化ストレスについての遺伝学的根拠を与えると考えられる。今後、集積している SNV により実際に電子の漏出およびそれによる ROS の産生が増大することを明らかにする必要がある。

＜支援成果公表論文リスト＞

Mitsunaga, S. et al, J Hum Genet. 58, 210-215 (2013)
Mitsunaga, S. et al, J Hum Genet. 60, 449-454 (2015)

公募支援課題：2012～2013 年度

不完全変態昆虫（コオロギ）の胚形成における位置情報の形成と細胞移動のメカニズム

若手研究（A）

三戸 太郎・徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部

＜背景・目的＞

昆虫の発生メカニズムについてはショウジョウバエで詳しく研究されているが、ショウジョウバエの発生様式は昆虫の中でも特殊である。発生メカニズムの進化を理解するためには、より祖先的な発生様式の種との比較研究が不可欠であり、このために我々はフタホシコオロギ（*Gryllus bimaculatus*）をモデルとして研究を行ってきた。また、コオロギなどの不完全変態類昆虫の幼虫の脚は切断後再生可能であり再生メカニズムの研究にも有用である。これまでに本種において、RNA 干渉、トランスジェニック個体の作製、さらに遺伝子ノックアウトの技術を導入することに成功し、遺伝子機能解析の技術的基盤を確立してきた。コオロギにおける機能ゲノミクスのさらなる展開を目指し，イルミナ Hiseq 等により全ゲノムシーケンスを進めてきた。しかし、ゲノムサイズが比較的大きく（約 1.7Gbp）、アセンブルが難航していた。ゲノム解読を早期に完了させ、フタホシコオロギにおける機能ゲノミクスをさらに発展させるために、ゲノム支援によるサポートを得てシーケンス解析を進めた。

＜支援の内容＞

2012 年度： 情報解析支援（担当：伊藤武彦先生・東工大）

フタホシコオロギ（*Gryllus bimaculatus*）の全ゲノム解読を目的とし、イルミナ Hiseq によるシーケンスデータのアセンブルの支援を受けた。

2013 年度： 大規模ゲノム情報生産支援（担当：伊藤武彦先生・東工大； 豊田敦先生・遺伝研）

アセンブル結果のさらなる向上を目指し、長鎖（10kb，20kb）メイトペアデータ解析、およびフォスミド末端配列解析によるアセンブル結果の検証の支援を受けた。得られドラフトゲノム配列に対するアノテーションについても支援いただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

2012 年度： Platanus によるショートリードアセンブルにより、stats が下記のように大幅に向上した。

支援前：コンティグ総塩基数 約 1.9Gb; 総スキャフォールド数 約 300 万個；スキャフォールド N50 約 1.4kb.

支援後：コンティグ総塩基数 約 1.5Gb; 総スキャフォールド数 約 6 万個；スキャフォールド N50 約 504kb.

本アセンブル結果を用いて主要な発生関連遺伝子について調べたところ、コオロギの遺伝子サイズはショウジョウバエやトリボリウムなど他の昆虫と比較して顕著に大きい傾向があることがわかった。また、Wnt ファミリーの一部の遺伝子にシンテニーの存在が示唆された。さらに、コオロギゲノムに、完全変態類の昆虫では見つかっていない種類の Wnt 遺伝子が存在することが明らかになった。

2013 年度： 支援を通じ、次のようなアセンブリの stats を得た： コンティグ総塩基数 約 1.5Gb; 総スキャフォールド数 約 49,000 本；スキャフォールド N50 約 5.8Mb. 加えて、fosmid エンドシーケンスを利用したアセンブリの検証により、上記のドラフトゲノムが十分なクオリティーを有することが確認された。

最新のアセンブル結果をもとに、支援担当者との共同研究としてアノテーション作業を進めた。遺伝子数は約 22200 個と推定された。特に、発生に関わる遺伝子座の解析を進め、少なくとも数 Mb に渡る単一の Hox 遺伝子クラスターの存在が示された。また、Wnt 遺伝子ファミリーについて、遺伝子数やクラスター構造の詳細が明らかなった。ゲノムに散在するリピート配列の種類や頻度についても情報が得られている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム機能研究： フタホシコオロギでは、発生・再生の他、神経科学的な研究などのモデル種でもある。得られたゲノム配列情報を用いてゲノム改変実験などを進めることで、様々な生命現象をゲノム機能の観点から解析することが可能になった。

比較ゲノム研究： ショウジョウバエやトリボリウム、カイコなどを含む完全変態類の昆虫と比べ、より分岐の古い不完全変態類の昆虫のゲノム科学的研究は遅れている。不完全変態昆虫のゲノム解析は一部の種で進められているが，モデル種の多い完全変態類に比べるとまだ圧倒的に情報が不足している。本支援により、比較ゲノム解析を通じた昆虫ゲノムの進化の研究をさらに進展させるための重要な情報基盤が得られた。

＜支援成果公表リスト＞

フタホシコオロギゲノム解読について、投稿準備中である。

公募支援課題：2015 年度

嫌気条件下での酸素発生型光合成のパラドックスを解く

挑戦的萌芽研究

蓑田 歩・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

原始ラン藻が、無限に存在する水を電子供与体とする酸素発生型光合成を獲得したことで生存範囲の拡大に成功すると同時に、現在の好気的な地球環境の基礎をつくったことは広く知られている。しかし、そこには、それまで嫌気条件下で低濃度に存在する酸素のストレスを回避しながら生きてきた生物が、有毒である酸素を発生するという大きなパラドックスが存在する。そこで、本研究では、100% CO_2 通気でも光合成による増殖が可能であることが報告されている、紅藻のイデユコゴメ類と嫌気性ラン藻を研究材料として、嫌気条件下での酸素発生型光合成について、嫌気条件下での光合成のメカニズムを①生理学的解析に併せて、②遺伝子発現と③代謝物解析により探る。

＜支援の内容＞

本研究では、嫌気チャンバーと嫌気化試薬を利用することで、絶対嫌気条件(酸化還元電位:-270 mV)と高度嫌気条件(酸化還元電位:-150 mV)となる嫌気培養条件を確立し、紅藻 *Galdieria sulphuraria* と嫌気性のラン藻 *Plectonema boryanum* が、それぞれ、絶対嫌気条件と高度嫌気条件で、酸素発生型光合成を行うことをみいだした。

ラン藻や一部の藻類には、嫌気条件で機能する代謝系が保存されており、原始ラン藻の痕跡としての絶対嫌気条件下での酸素発生型光合成のメカニズムを探ることを目的として、嫌気条件下で、酸化還元電位の上昇と酸素発生が起きる 6 時間の遺伝子発現を経時的に調べた。

＜支援によって得られた研究成果＞

現在、解析中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援によって得られた、*G. sulphuraria* と *P. boryanum* の遺伝子発現データをもとに、嫌気条件下での酸素発生型光合成を可能にする代謝制御などの手がかりが得られることが期待される。

G. sulphuraria のゲノムには、嫌気バクテリアからの多くの遺伝子の水平転移が報告されている(。嫌気バクテリアから水平転移により獲得された因子が、*P. boryanum* よりもさらに高度な嫌気条件下での酸素発生型光合成を可能にしていることが予想され、新規の光合成調節機構のメカニズムの解明に繋がることが期待される。

＜支援成果公表リスト＞

蓑田　歩 100% CO_2 という極限における光合成の「未知」化学と工業 68,709-711(2015)

公募支援課題：2013 年度，2014 年度

Regnase-1 の作用機構から探る自然免疫応答における転写後調節の解明

若手研究（B）

三野 享史・京都大学ウイルス研究所

＜背景・目的＞

自然免疫は病原体感染を最初に認識し，炎症性サイトカインを介し急性炎症を引き起こす。この初期認識に関わる細胞種として自然免疫細胞であるマクロファージや樹状細胞などが知られ，これらの細胞は炎症性サイトカインやインターフェロンの産生，病原体の貪食，T 細胞を始めとする獲得免疫系の活性化などにより病原体の排除を行う。炎症性サイトカインは炎症の調節において中心的な役割を果たしており，その産生は厳密にコントロールされている。そして，我々は自然免疫において RNA 分解酵素 Regnase-1 (regulatory RNase-1, Zc3h12a, Mcpip1) が *Interleukin-6* (*Il-6*)や *IL-12p40* などのサイトカイン mRNA の分解を行うことで過剰な免疫応答を抑制するサイトカイン産生のブレーキ役を担っている事を見出した(Nature 458, 1185-1190, 2009; Nat. Immunol. 12, 1167-1175, 2011; Cell 153, 1036-1049, 2013)。これに対し，RNA 結合蛋白質 Roquin は *Icos* や *Tnf* などをコードする mRNA の分解を誘導することで免疫応答を制御することが報告されている(Nature 435, 452-458, 2005; Cell 153, 869-881, 2013)。Roquin は標的 mRNA の 3′-非翻訳領域(3′-UTR)に存在するステムループ構造と結合し，脱アデニル化酵素複合体である CCR4-NOT 複合体をリクルートすることにより標的 mRNA の分解を誘導する。しかしながら，Regnase-1 の標的となる mRNA の特異性や作用機構，および，Regnase-1 と Roquin の制御機構の関係性については解明されていない。また，Regnase-1 ノックアウトマウスは炎症性サイトカインの亢進による慢性炎症の他に貧血などの症状を示している。これは，免疫細胞以外において，これまで分かっていない Regnase-1 の新たな標的 mRNA が存在する可能性を示唆している。そこで，本支援では，以下に示す 3 点を達成し，自然免疫における転写後調節に関わる Regnase-1 の作用機構を解明するとともに，自然免疫応答における転写後調節の新たな作用機構を解明することを目的とした。

1. Regnase-1 の標的 mRNA の結合配列(領域)の同定
2. Regnase-1 と Roquin の共通標的 mRNA の同定
3. Regnase-1 の新たな標的 mRNA の探索

＜支援の内容＞

Regnase-1 の標的 mRNA を網羅的に解析するために，RNA-immunoprecipitation sequencing (RIP-seq)を行なった。すなわち，Flag-Regnase-1 を細胞内で発現させて，細胞の免疫刺激前後に抗 Flag-tag 抗体で IP し，Regnase-1 と結合している mRNA について次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。加えて，Regnase-1 と Roquin の共通標的 mRNA を同定するために，Roquin の標的 mRNA を RIP-seq により同様に網羅的に解析した。更に，Regnase-1 と Roquin の二重変異(Regnase-1$^{-/-}$/Roquin$^{san/san}$)のマウス胎仔由来線維芽細胞(MEF)を用いて transcriptome 解析(mRNA-seq)を行なった。

更に，免疫制御に直接関与しない Regnase-1 の新たな標的 mRNA を網羅的に同定するために，Regnase-1 ノックアウトマウスの免疫細胞以外の組織(肝臓や十二指腸など) における transcriptome 解析(mRNA-seq)を行なった。

また，我々の研究室で現在解析を進めている自然免疫応答の制御に関係していると考えられる遺伝子について，そのノックアウト細胞における transcriptome 解析(mRNA-seq)を行なった。現在，得られたデータを解析中である。

＜支援によって得られた研究成果＞

Regnase-1 の RIP-seq により，Regnase-1 の新たな標的 mRNA (*Nfkbiz, Nfkbid, Ptgs2, Mafk, Id1, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl3* など)が同定された。分子生物学的実験により更に検討を加えたところ，Regnase-1 は新規に同定された mRNA を細胞内で分解し，3′-UTR に存在するあるステムループ構造を標的としていることが分かった。Regnase-1 が標的とするステムループ構造は，pyrimidine-purine-pyrimidine (UAU/UGU)のループ配列を有し，少なくとも 2-bp 以上の G-C pair をステム配列に必要であるいう特徴を有していた。興味深いことに, このステムループ構造は Roquin が認識するステムループ構造と非常に類似していることが分かった(Cell 153, 869-881, 2013)。そこで，Regnase-1 と Roquin の標的 mRNA の配列が重複しているかどうかを検討するため，Roquin と結合する mRNA を RIP-seq により網羅的に同定し，Regnase-1 と結合する mRNA と Roquin と結合する mRNA の相関を GSEA 法により統計的に解析した。その結果，Regnase-1 と結合する mRNA と Roquin と結合する mRNA は統計的に有意に重複していることが分かった。更に，Regnase-1 と Roquin の二重変異(Regnase-1$^{-/-}$/Roquin$^{san/san}$)の MEF を用いた transcriptome 解析より，Regnase-1 と Roquin の共通の標的 mRNA 発現量は Regnase-1 と Roquin の二重変異細胞においてそれぞれのシングルノックアウト細胞よりも顕著に増加していた。これは，Regnase-1 と Roquin が共通の標的部位を認識して mRNA 安定性を制御していることを示唆している。以上の支援による成果を元に，Regnase-1 の作用メカニズムについて更に検討したところ，Regnase-1 と Roquin は同じステムループ構造をもつ mRNA を分解するが，Roquin はストレス顆粒などに局在し翻訳が不活性化した状態の mRNA を分解するのに対し，Regnase-1 は粗面小胞体に多く存在し UPF1 の

ヘリカーゼ活性に依存して翻訳が活性化した状態のmRNAを分解していた。Regnase-1とRoquinはそれぞれ炎症の早期と後期において機能するが，mRNAの分解において重複性をもっていた。したがって，Regnase-1とRoquinが共通したmRNAを時空間的に異なる分子機構により分解することにより，炎症に関連するタンパク質の発現を厳密に制御していることが明らかになった(Cell 161, 1058-1073, 2015)。

Regnase-1ノックアウトマウスにおいて免疫細胞以外の組織の細胞(肝臓や十二指腸など)のmRNA-seqにより，鉄代謝に関係することが知られているいくつかの遺伝子をRegnase-1の新たな標的mRNAとして同定することが出来た。現在，Regnase-1ノックアウトマウスを用いた*in vivo*実験および分子生物学的(*in vitro*)実験などにより，Regnase-1がどのように鉄代謝を制御しているか解析を進めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により，Regnase-1とRoquinの標的mRNAがオーバーラップしており，類似したステムループ構造を標的としていることが分かった。これは，2つの異なるRNA結合蛋白質Regnase-1とRoquinが共通の標的配列を認識してmRNA安定性を制御することで免疫応答を厳密に調節していることを示しており，複数の転写後制御因子による同一RNA認識配列を用いた厳密なRNA安定性制御という新しい展望が拓けた。今後，これらの成果を元にして，更に自然免疫におけるmRNA安定性制御の分子メカニズムが明らかになれば，自己免疫疾患へ至る原因の解明に繋がると考えられる。

更に，Regnase-1ノックアウトマウスにおいて免疫細胞以外の組織(肝臓や十二指腸など)のmRNA-seqによる成果より，Regnase-1による鉄代謝制御の解明という新しい展望が拓けた。これまで，鉄代謝について多くの基礎研究が進められてきたが，これまで知られていなかった新たなRegnase-1による鉄代謝制御機構の解明は貧血を代表とする鉄代謝疾患へ至る原因の解明に繋がると考えられ，加えて鉄代謝疾患の治療法の開発に繋がると期待される。

＜支援成果公表リスト＞

1. Mino, T. et al., Cell 161, 1058-1073 (2015)
2. Mino, T. et al., Oncotarget 6, 17869-17870 (2015)

公募支援課題：2014 年度

腎線維化に寄与する非翻訳 RNA の同定およびその転写制御機構の解明

若手研究（B）

三村 維真理・東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科

＜背景・目的＞
慢性腎不全の進行には腎尿細管間質領域の慢性的な低酸素状態が増悪に寄与することが報告されてきた。依頼者は、慢性腎不全の進行にヒストン修飾酵素 Ezh2(enhancer of zeste homolog 2)が HIF1 とともにどのように寄与するのか、その標的となる転写産物を同定し、エピジェネティックな分子メカニズムを明らかにすることを目的として以下の実験を進めている。Ezh2 を阻害する Dznep(3-deazaneplanocin A)を慢性腎不全モデルマウスに 2 か月間投与すると腎臓の線維化が軽減されることを見出した。そこでマイクロダイセクションによって尿細管細胞のみを切り出し、RNA-seq により網羅的な遺伝子発現量の変化および Dznep によって変化する非翻訳 RNA(lincRNA)を同定することを計画している。
＜支援の内容＞
虚血再灌流マウスモデルに Dznep を投与し、1 週間後および 8 週間後の RNA-seq を依頼者所属の研究室で施行した。その raw date から遺伝子および lincRNA の発現変化を解析した。in vitro については正常ヒト近位尿細管上皮細胞株 HK2(human kidney-2)および RPTEC(Normal Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells)株を用いて低酸素および Dznep 刺激により発現が変動する lincRNA および small RNA を同定するため、RNA-seq および small RNA-seq を計 26 レーン施行した。また、in vivo のサンプルについては RNA-seq の raw data から発現変動などの結果を解析する支援を受けた。
＜支援によって得られた研究成果＞
虚血再灌流による急性障害によって発現が変化する遺伝子群 322 個、および lincRNA14 個を同定した。さらに NCBI のデータベースに登録されているマウスの lincRNA 総数 3712 個のうち、急性虚血再灌流障害後 8 週間の慢性腎障害出現時点で尿細管細胞において発現が低下する lincRNA は 656 個、Dznep の 8 週間継続投与により vehicle 投与に比べて発現が上昇する lincRNA407 個を同定した。
さらに、虚血再灌流障害後 Dznep を 8 週間投与したマウスは腎尿細管間質の線維化が軽減したことから RNA-seq によって得られた尿細管の遺伝子発現変化のうち、線維化関連遺伝子群(Col1a1; collagen 1α type1, Col3; collagen type3, Col4; collagen type4, MMP2; matrix metallopeptidase2, CTSL; cathepsin L, MMP9; metallopeptidase9, TIMP1; matrix metallopeptidase inhibitor 1, TIMP2; matrix metallopeptidase inhibitor 2, TIMP3; matrix metallopeptidase inhibitor 3)の発現変化に着目した。その結果、in vivo サンプルにおいて、虚血再灌流障害により発現が上昇するものの、Dznep 投与により発現が低下する遺伝子群は TIMP1, TIMP2 などが認められた。さらに、in vitro のサンプルにおいて、RNA-seq の結果を調べたところ、低酸素刺激により発現が上昇するものの Dznep 投与に伴い発現が低下する遺伝子は HK2 細胞では TIMP2 であった。RPTEC 細胞では Dznep を投与した際に TIMP2 の発現低下が認められた。TIMP2 は MMP2, MMP9 などのコラーゲン分解酵素を抑制する働きがあることが知られており、TIMP2 によりコラーゲンが蓄積するすなわち線維化促進遺伝子群の一つである。Dznep を投与することにより in vivo においても in vitro においても線維化促進遺伝子 TIMP2 が抑制されることにより腎尿細管間質の線維化が軽減する可能性が考えられた。
そこで、Dznep 投与により TIMP2 を抑制する働きのあるエピジェネティックな因子を同定するため、small RNA-seq に着目した。HK2 および RPTEC に対して低酸素刺激および Dznep を投与した際の small RNA-seq の解析結果から、NCBI に登録されている microRNA1341 個のうち低酸素刺激により発現が低下し、Dznep 投与により発現が上昇する microRNA142 個を同定した。その中で TIMP2 を標的とする microRNA を target scan による配列特異性により検討したところ、microRNA-221, microRNA-130a の 2 つが候補として考えられた。
＜支援によって開かれた新たな展望＞
ヒストン修飾阻害薬 Dznep による線維化軽減効果に寄与するエピジェネティックな因子を同定し、その分子メカニズムを明らかにすることが本研究の目的であるが、RNA-seq の結果から TIMP2 をはじめとした線維化促進遺伝子群の発現が Dznep によって抑制されることを新たに見出した。さらに、TIMP2 を抑制するエピジェネティックな因子の一つとして Dznep により発現が上昇する microRNA 候補を small RNA-seq の結果から明らかにすることができた。本研究はゲノム支援による RNA-seq, small RNA-seq の施行および解析結果から得られた知見をもとに新たな線維化軽減メカニズムを検証することにより進めていくことができた。今後は、Dznep により発現が上昇する microRNA-221, microRNA-130a が in vivo, in vitro において TIMP2 の発現を抑制し、線維化を軽減するかどうかを検証していく予定である。

＜支援成果公表リスト＞
該当するものなし

公募支援課題：2010~2012 年度

ヘリコバクターピロリの胃粘膜感染機構と炎症惹起メカニズムの研究

基盤研究（B）

宿主応答撹乱を誘導するヘリコバクターピロリ由来ｎｃＲＮＡの同定

挑戦的萌芽研究

ヘリコバクターピロリ胃粘膜長期感染に必要な宿主・菌体因子の時空間的動態解析

基盤研究（B）

三室 仁美・東京大学医科学研究所

＜背景・目的＞

ヘリコバクターピロリ（*Helicobacter pylori,* ピロリ菌）は、世界人口の約半数が感染している大規模感染症起因菌であり、胃粘膜に持続感染して、胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫、胃がんの原因となる。一連の３課題を通して、以下３つの関連プロジェクトを遂行した。

（１）本菌はこれまで、人種別系統株の網羅的解析により、ホモサピエンスの進化とともに地域的分化を遂げていることが明らかにされてきていたが、数多くのゲノム解析株をピロリ菌病原性研究に活用する上で、致命的な問題点があった。すなわち、ゲノム情報既解析株のほぼすべては実験動物感染モデルに使用できない株であるため、ゲノム情報を、動物実験から得られる病原性解析へ有機的に活用できていなかった。ヒトの感染症状と類似した病態を示すスナネズミへの感染株 ATCC43504 株と、遺伝的背景が確立しており多数の遺伝子改変動物が作製されているマウスへの感染株 SS1 株、さらに、SS1 派生株であり高病原性マウス感染株である PMSS1 株のゲノム構造、遺伝子組成、ならびに発現パターンを比較することで、ヒトに病原性を示す上で重要な菌体因子の同定が可能となるばかりではなく、各感染ステージで重要な新たな病原因子探索への応用が可能となる。

（２）ピロリ菌は IV 型分泌装置 (TFSS)からエフェクタータンパク質 CagA を感染宿主細胞内に注入して病原性を発揮することが知られている。TFSS は遺伝的に細菌の接合システムであり、ある種の細菌では TFSS によって DNA を移行させる。そこで、菌体の non-coding RNA が宿主内に注入される可能性を検証するために、ピロリ菌の small RNA の同定を行い、感染細胞内への移行の可否を検討する。

（３）ピロリ菌は菌体の形状に関してユニークな特性がある。胃内の微好気環境ではらせん状の形態を示し、胃粘膜に付着感染を成立させるが、嫌気性の腸管内に流入した菌体は球状体となる。先行研究において、ピロリ菌による胃炎惹起は、胃局所での菌体と宿主細胞との相互作用においてのみ着目して解釈されていたが、実際は、腸管内の抗原取り込み器官であるパイエル板を介して胃炎が惹起されていることを明らかにした (PNAS, 2007)。さらに、微好気環境でのらせん状菌と、腸内環境での球状菌では、パイエル板上皮層侵入透過親和性が異なるデータを得ている。そこで、らせん状菌と球状菌の遺伝子発現の違いを網羅的に RNA-seq にて解析することで、それぞれの菌体での遺伝子発現の相違と制御を明らかにする。

＜支援の内容＞

ゲノム解析：ヘリコバクターピロリ SS1, PMSS1, ATCC43504 株の全ゲノム配列決定を決定していただいた。具体的には、*de novo* 解析により全ゲノム配列を決定し（Roche 454 GS FLX Titanium）、Sanger 法でのフィニッシングを行っていただいた。また、クロージングされた配列について、Illumina 社 MiSeq にて homo-polymer のエラーを除去していただいた。

RNA-seq 解析：ヘリコバクターピロリ SS1, PMSS1, ATCC43504 株のらせん状菌および球状菌について、RNA と small RNA の RNA-seq 解析を行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

（１）ゲノム解析により、マウス高病原性株(PMSS1) と低病原性株 (SS1)では、10 kbp ほどのリピート配列部分でインバージョンが存在し、リバーシブルな変化を起こしていることが判明した。また、TFSS 構成成分をコードしている遺伝子の配列の違いが病原性に寄与している可能性が示唆された。現在病原性の違いに関して実験的に確認検討している。また、これらの配列解析により、(２)および(３)での small RNA および total RNA 解析による参照配列として利用することが可能となった。

（２）ピロリ菌 3 株のらせん状菌の small RNA 解析により、3 株に共通して存在する複数の small RNA 候補配列を同定した。実験的にこれら菌体の small RNA が、感染細胞内に存在するか否かを検討した結果、複数の新規 RNA エフェクター候補分子を同定した。現在 RNA エフェクター候補分子の宿主感染細胞内での作用を、実験的に検証している。

（３）ピロリ菌 3 株のらせん状菌および球状菌の small RNA 解析から、嫌気性培養で得られた球状菌において、特異的に発現が増大する small RNA を同定した。実験的に当該 small RNA の欠損変異株を作製し、発現の差異を検討した結果、呼吸鎖に関わる

遺伝子群の発現を制御していることが明らかとなった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本ゲノム支援により、今までゲノム情報が不明であったピロリ菌動物実験株３株の全ゲノム情報が明らかとなった。これにより、実験株ごとの特性が明らかになったばかりでなく、これらの株を用いた遺伝子改変株の作製効率が大幅に向上した。さらには、ピロリ菌のタンパク質ショットガンプロテオーム解析による新規病原因子探索において、解析していただいたゲノム塩基配列情報を参照データとすることで、新規病原因子探索が可能となる。今後さらなるピロリ菌病原性研究の飛躍的進展が期待できる。

さらに、微好気培養および嫌気培養における実験株の total RNA および small RNA の網羅的解析から、ピロリ菌の環境適応に重要な small RNA を同定し、それが発現制御する遺伝子群の同定の足がかりを得ることができた。

これらの研究結果は、ピロリ菌をはじめとする病原細菌の small RNA 研究の発展に寄与することが期待でき、当初の計画を上回る、病原細菌による病原性研究への著しい貢献が期待できる。

公募支援課題：2015 年度

大腸菌リボソームの可塑性と表現型進化の機構解明

基盤研究（B）

宮崎 健太郎・産業技術総合研究所生物プロセス研究部門

＜背景・目的＞

細胞内の翻訳装置であるリボソームは、機能的な重要性と構造の複雑性から、「種固有性」が極めて極めて高い分子であると信じられている。これに対し、最近我々は、16S rRNA を欠損した大腸菌の生育を、異種微生物由来の 16S rRNA で相補できることを見出し、リボソーム成分の生物種間和合性、リボソームの構造・機能の可塑性を明らかにした。さらに、翻訳系を改変されたこれらの変異株に劇的な表現型変化を見出した。

そこで本研究では、大腸菌の生育を相補しうる様々な外来 16S rRNA を大規模にスクリーニングし、種間和合性の範囲、その分子基盤を明らかにとともに、外来 16S rRNA を含むリボソームにより駆動する大腸菌変異株の表現型を観察する。さらに様々な条件のもと実験室進化を行い、適応株を分離する。16S rRNA 変異がリボソームの翻訳機能をどのように変え、さらに異種 16S rRNA により生育することを余儀なくされた変異株が、どのように適応進化するのか？翻訳系の改変が生物の表現型、振る舞いにどのように影響するかについて、ゲノム解析及びトランスクリプトーム解析を通じ明らかにすることを目的とする。

＜支援の内容＞

異種微生物由来の 16S rRNA 遺伝子により生育を相補された大腸菌変異株のうち、大腸菌 16S rRNA 遺伝子との配列相同性が特に低い変異株について、トランスクリプトーム解析を行う。また、16S rRNA 置換により生育が不良となった変異株の実験室進化（連続培養）により獲得した生育復帰変異株について、全ゲノム解析（イルミナ社、Nextera XT PE によるシーケンス解析並びに変異点マッピング）及びトランスクリプトーム解析を行う。

＜支援によって得られた研究成果＞

まず、当研究室で保管している、16S rRNA 遺伝子置換実験の宿主となる大腸菌 16S rRNA 遺伝子欠損株（大腸菌 16S rRNA 遺伝子のセルフクローニングにより生育相補されたΔ7Eco 株）について、全ゲノム解析を行った。親株である SQ171 株をテンプレートとした SNP 解析の結果、数個の変異を同定した。合わせて 16S rRNA 遺伝子欠損を補うために導入されたレスキュープラスミドについても配列データを得た。

一方、Δ7Eco 株に含まれる大腸菌 16S rRNA 遺伝子をメタゲノム由来 16S rRNA により置換するスクリーニング実験を行い、大腸菌とは進化系統的に「門」レベルで異なる 16S rRNA を含む変異株（NS5 株）を単離した。NS5 株は Eco 株と比べて著しい生育不良を示し、生育倍化速度も 1/3 程度に低下した。

次に、NS5 株を 37℃、栄養培地にて連続培養を行い、増殖復帰株の獲得を目指した。初発 NS5 株を 3 系統（A, B, C）に分け、全く同一の条件で進化を施行した。対数増殖期に菌体を植え継ぐ方法で 2 週間継代培養を行い、最終的に、各系統から 3 株ずつ（A1-A3, B1-B3, C1-C3）を寒天培地上で単離した。単離された変異株より市販キットを用いてゲノム DNA を調製し、九州大学大学院 林哲也先生・小椋義俊先生の支援を受け、全ゲノム解析を行った。

変異株の比較ゲノム解析を行った結果、各系統のいずれの 3 株も独立した変異株であった。各株の変異を詳細に検討した結果、A 系統及び B 系統の各 3 株において、同一のリボソームタンパク質をコードする遺伝子内にアミノ酸置換を伴う塩基変異を見出した。A 系統、B 系統では別々のアミノ酸置換であり、これらの変異が適応進化の原因であることが強く示唆された。次に、大腸菌リボソームの立体構造をもとに変異点の構造上の位置を確認したところ、16S rRNA と変異アミノ酸部位との距離が 3Å以内であることが判明し、変異により相互作用が変化した可能性が示唆された。

一方、C 系統においては、A, B 系統とは別のリボソームタンパク質中に塩基置換を見出した。これらは 3 株間で共有されていた。

以上、異種微生物由来の 16S rRNA によりもたらされたリボソームの構造上・機能上の不具合が宿主の生育低下を招いたが、その不具合をゲノム上のリボソームタンパク質内の変異により解消され、生育速度の回復（リボソーム活性の向上）につながったと推察された。

また、ゲノム解析のなされた変異株については RNAseq 解析も予定しており、増殖速度と遺伝子発現プロファイルとの関連を調べていきたい。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回発見されたリボソームタンパク質変異を個別にあるいは組み合わせて野生型ゲノムに導入し、生育の復帰を確認する。リボソームは複雑な分子であり、RNA-RNA、RNA-タンパク質、タンパク質−タンパク質間に無数の相互作用が存在する。これらの配列−構造−機能相関を解明することは至難の技であったが、16S rRNA 置換変異による機能低下→□進化実験による復帰変異体の獲得→次世代シーケンサーを駆使した比較ゲノム解析という行程により、それが可能であることを示すとともに、複雑な分子の深い理解につなげたい。

＜支援成果公表リスト＞

特になし

公募支援課題：2015 年度

クローン細胞集団における一細胞レベルの不均一性の包括的理解とその応用技術の創成

若手研究（A）

宮崎 亮・産業技術総合研究所生物プロセス研究部門

＜背景・目的＞
細菌のような原核単細胞生物のクローン細胞集団であっても、個々の細胞レベルで表現型の不均一性が観察される。この表現型の不均一性は、培養環境が均一で安定した条件下や、細胞同士の接着が起きない液体培養時でも観察されることから、何らかの細胞内成分の確率論的ゆらぎによって生じると予想される。本研究では、細菌のクローン細胞集団において一細胞レベルの表現型の不均一性が生まれる分子メカニズムを解明することを目的とする。そのアプローチとして、表現型の異なるサブ細胞集団のトランスクリプトームを比較することで、表現型の違いを生み出す分子基盤を明らかにする。

＜支援の内容＞
細菌集団の不均一性解析のモデルとして利用している環境細菌 *Pseudomonas putida* での RNA-seq を行った。具体的には、本菌の染色体上に存在する可動遺伝因子（ICE）が活性化した細胞と非活性化細胞を同一のクローン細胞集団から分取し、それぞれから回収した微量 total RNA を用いて、次世代シーケンサーによる RNA-seq を行った。サンプル数は、異なる 2 点のサンプリング時間で 2 つの細胞集団（活性化細胞と非活性化細胞）から quadruplicate で RNA をサンプリングするため、計 16 サンプルとなる予定である。

＜支援によって得られた研究成果＞
本サンプルが poly-A tail を含まない細菌由来の mRNA であること、GC 含量の高い（約 62%）RNA であること、ならびに数十 ng という微量の total RNA からのスタートであることから、前例のない難易度の高い cDNA ライブラリー調製になると予想されたため、支援担当者と相談して、まず最初にトライアルとして 2 サンプルを RNA-seq 解析に供した。その結果、ライブラリー調製の行程に工夫を加えることで、数十 ng の total RNA から十分な質のライブラリーが構築できた。さらに、次世代シーケンサーの total read 数を増やすことで、ゲノム全体で遺伝子発現解析が可能な程度の read 数と、リファレンスゲノムへの 99%以上のマッピング効率を得ることができた。以上の成果から、細菌由来の微量 total RNA からの RNA-seq 法を確立した。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
上述の成果から、これまで困難であった細菌由来の微量 total RNA からの RNA-seq が可能となり、今後はサンプル数を増やし、統計的に遺伝子発現解析をすることが可能となる。既に残りの RNA サンプルの調製に取りかかっており、支援期間内に全サンプルを提供できる予定である。
本支援で構築した手法は、クローン細胞集団において表現型の不均一性が生まれるメカニズムを分子レベルで解明する際に有効なアプローチであるが、その他にも、微小環境に生息する微生物のメタトランスクリプトミクスなど、微量 RNA を対象とする研究にも応用可能である。また、将来的には細菌一細胞トランスクリプトミクスの実現に向けた基盤研究にもなるだろう。

＜支援成果公表リスト＞
該当なし

公募支援課題：2014 年度

ショウジョウバエ PGC の形成を制御する遺伝子ネットワークの解明

新学術領域研究

向 正則・甲南大学理工学部

＜背景・目的＞

ショウジョウバエの初期胚の後極には生殖質があり、これを取り込む形で始原生殖細胞（PGC）が形成される。生殖質に含まれる母性因子が、生殖細胞の形成および分化に必要であることが知られている。これまでにいくつかの母性因子（Nanos, Pgc など）が同定されており、これらの因子が PGC 中での体細胞性遺伝子の発現を抑制することが知られている。この転写抑制が PGC の形成、分化に重要であることが報告されている。これに対して、PGC 中で遺伝子発現を活性化する機構については不明な点が多い。胚期の PGC 中で *vasa*, *nanos* などの生殖細胞性遺伝子の zygotic な発現が開始することが明らかになっているが、生殖細胞性遺伝子の発現を活性化する転写因子や、その転写制御機構について知見が乏しいのが現状である。

母性因子 *maternal factor for meiosis*（Mamo)は BTB/POZ–C_2H_2 型 zn finger ドメインをもつクロマチン制御因子で、PGC に母性供給される。Mamo を欠いた PGC 中で、生殖細胞特異的に発現する代表的な遺伝子のひとつ *vasa* 遺伝子の zygotic な発現が低下することが判明している。このことから Mamo が生殖細胞性の遺伝子の発現の活性化に関与することが示唆される。しかし、*vasa* 以外の Mamo の標的遺伝子は不明である。Mamo の標的遺伝子を探索することを目的として、Mamo の活性化型フォームである MZD の強制発現が、遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析することを試みた。

＜支援の内容＞

Gal4/UAS システムを用いて、MZD をショウジョウバエ初期胚中で強制発現した胚（MZD-OE 胚）と野生型胚からそれぞれ RNA を抽出し、これを材料として、RNA-seq 解析を行った。MZD によって遺伝子発現が増加する遺伝子群の同定を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

MZD-OE 胚の RNA-seq 解析から、MZD 強制発現により、特定の遺伝子の発現が増加すること、さらに、いくつかの特徴的な機能をもつ遺伝子の発現が増加することが明らかになった。具体的には、これら遺伝子の中に、卵形成に関わる遺伝子、減数分裂に関与する遺伝子、さらにトランスポゾンの転移の抑制に関わる遺伝子が含まれることが判明した。GO 解析によっても、この結果を支持する結果が得られている。これらの遺伝子は、生殖細胞の分化、さらに品質管理に重要な役割をもつことが知られている。現在、RT-PCR 等により発現上昇の確認を進めている。さらに、発現制御機構の解析、それぞれの遺伝子の機能解析を進めている（論文作製中)。また、MZD-OE 胚において、シグナル伝達に関わるいくつかの遺伝子の発現が増加することが分かった。そこで遺伝学的解析を行い、MZD とこれらの遺伝子との間の機能的な相互作用を検討した。その結果、いくつかのシグナル伝達関連遺伝子が MZD と遺伝学的な相互作用をもつことが明らかになった。Mamo が生殖細胞中のシグナル伝達関連遺伝子の発現制御を介して、生殖細胞と体細胞間のシグナル伝達の制御に関与すること、このシグナル伝達が生殖細胞分化に関わる可能性を示唆する結果が得られ始めている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

減数分裂関連遺伝子と Mamo の関係

本支援による RNA-seq 解析によって、母性因子 Mamo の活性化フォーム MZD が、一群の生殖細胞関連遺伝子の発現を活性化することが示唆された。特に、減数分裂は生殖細胞を特徴付ける重要な性質である。これまでに減数分裂の細胞学的解析は進んでいるが、生殖細胞が減数分裂を遂行する能力をどのようにして獲得するのかについて、不明な点が多く残されている。本解析によって得られた知見は、Mamo が減数分裂関連遺伝子の発現制御に関わる新たな可能性を示唆する。今後、減数分裂関連遺伝子の発現を生殖細胞中で制御する分子機構の解析を進めて行く予定である。生殖細胞が減数分裂を遂行する能力を獲得し、維持する機構の理解に繋がることが期待できる。

生殖細胞の品質管理に関わる遺伝子発現制御機構

Mamo の標的遺伝子の候補として、トランスポゾンの転移の抑制に関わる遺伝子が見つかってきた。これまでに予想していなかった新たな Mamo の制御ターゲットであり、新しい研究のきっかけになると予想できる。生殖細胞の品質管理は、種の存続にとり、非常に重要な問題である。品質管理の制御機構を遺伝子発現制御のレベルから解析する予定である。

生殖細胞の分化制御に関わる生殖細胞–体細胞間のシグナル伝達

MZD により発現上昇する遺伝子として、シグナル伝達に関わるいくつかの遺伝子が同定された。生殖細胞–体細胞間のシグナル伝達に関わると予想される。本研究をきっかけとして、生殖細胞分化に関わる新たなシグナル伝達が明らかになることが期待できる。

Mamo の多数の標的遺伝子が明らかになることで、制御機構の共通性、多様性が明らかになると予想できる。Mamo を中心とした PGC の制御ネットワークの解析が大きく進展することが期待できる。他の動物種の制御ネットワークの理解にも貢献できると予想している。

＜支援成果公表リスト＞

論文作製中です。

公募支援課題：2012 年度

科研費課題名　C_4型作物の分子育種へ向けたC_4型光合成誘導システムの解明

科研費種目　　最先端・次世代研究開発支援プログラム

氏名・所属　　宗景　ゆり・奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

＜背景・目的＞

トウモロコシやサトウキビなどに代表されるようにC_4型光合成を営む作物は、CO_2濃縮機能を持つため、乾燥・高温・強光条件下での生産性が非常に高い。被子植物においてC_4型代謝経路は様々な属で進化的に獲得されている。このことから、C_3型からC_4型への進化過程の解明によりC_4化因子が明らかになれば、コムギやイネ等のC_3型作物を分子育種によりC_4化することが可能になると期待できる。本研究では、同じ属内にC_3型、C_3-C_4中間型、C_4型の種が数多く現存するキク科 *Flaveria* 属植物のうち、別種間で交雑可能な C_3-C_4 中間種 *Flaveria floridana*、C_4 様種 *Flaveria brownii* を用いた量的形質遺伝子座(QTL)解析を行うこと目的とし、ゲノム情報の解析を行う。

＜支援の内容＞

次世代高速シーケンス（Illumina Hiseq）によって得られたC_3-C_4中間型 *Flaveria floridana* の全ゲノムの Paired-end リード情報をもとに de novo アセンブルを行った。de novo アセンブルには PLATform for Assembling NUcleotide Sequences (Platanus) genome assembler v1.0.0 (東工大)を使用した。

＜支援によって得られた研究成果＞

アセンブル結果は下記のとおりであった。
総コンティグ数 ： 34,677,115
平均カバー数 ： 13.0
総スキャフォルド数 ： 8,799,194
最大スキャフォルド長: 67608 bases
N50 ： 266 bases
スキャフォルド総塩基数 ： 1.8 Gbases

*F. floridana*は、染色体数が18本(2倍体)であり、フローサイトメトリーにより、ゲノムサイズは約 1.4 Gbases であることが推定されている。de novo アセンブルによって得られたスキャフォルド総塩基数は、1.8 Gbases と推定ゲノムサイズよりも多く、N50 の値は 266 bases と比較的低い値であったことから、アセンブルしきれていない断片が多く残っていると考えられる。この原因として、*F. floridana* のゲノムサイズが大きいことが挙げられる。また、シーケンスに使用したゲノムサンプルは 1 個体から抽出したものであるが、*F. floridana* は自殖によって系統が維持できない種であることから、ゲノムがヘテロ接合体である箇所が存在した可能性が挙げられる。

本支援により得られたドラフトシーケンス情報をもとに、C_4型代謝酵素をコードする遺伝子群、C_4化に伴って、発現レベルが上昇する遺伝子群の配列を Blast 検索したところ、すべての配列を取得することができた。この事から、遺伝子をコードする領域は、アセンブルによってほぼカバーされていると考えられる。

本支援と並行して、QTL 解析に使用するもう片方の種、*F. brownii* についても、全ゲノムシーケンスを行い、ドラフトゲノム配列を取得した。また、これらのゲノム配列から、コード領域の予測を行った。*F. floridana* と *F. brownii* の両ゲノム配列をいくつかの遺伝子について比較したところ、コード領域の配列は相同性が非常に高いことが明らかになった。一方、非コード領域には多くの挿入または欠失配列が存在し、両種間での相同性が低いことが明らかになった。

C_3-C_4中間種 *F. floridana* と C_4様種 *F. brownii* の交雑種は、F_2 世代まで生育させることが可能であることが明らかになっている。また、C_3-C_4 中間種では CO_2 濃縮は C_3 型光合成の光呼吸に依存する形で部分的に駆動するのに対し、C_4 様種では、CO_2 濃縮は C_4 型代謝経路に依存していることが明らかになっている。これら F_2 集団において、これらの CO_2 濃縮能に関わる C_4型形質の分離が確認された。そこで両種のドラフトゲノム配列をもとに、分子マーカを作成し、C_4 代謝酵素をコードするいくつかの遺伝子の遺伝子型と発現量の連鎖解析を行った。これら結果は現在投稿準備中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

支援により、*F. floridana* のドラフトゲノムシーケンスを取得することができた。また、これらの情報をもとに、遺伝子型と C_4型の形質の連鎖解析を行うことができた。今後は、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)解析により遺伝子地図を作成し、さらに C_4型形質と連鎖するゲノム領域の絞り込みを行う予定である。この解析により、C_4 型形質を誘導するゲノム変異を特定することができれば、進化過程を模倣したゲノム変異の導入により、作物の C_4化分子育種技術へ応用することが期待できる。

国際イネ研究所を中心として形成される国際コンソーシアムの「C_4 rice プロジェクト」により、C_3型光合成様式をとるイネを C_4化するプロジェクトが進められている。現在、このプロジェクトのメンバーとの共同研究により、キク科 *Flaveria* 属植物の情報基盤整備を進めている。今後、情報基盤整備の確立により進化過程を解析することで、C_4 化に関わる遺伝子を同定できれば、イネの C_4化プロジェクトにも大きく貢献できると期待できる。

公募支援課題：2011 年度、2012 年度

動的クロマチン高次構造であるヘテロクロマチンの構造・機能ネットワークの解明

基盤研究（A）(2011 年度)

非コード RNA に制御されるヘテロクロマチン形成場の解析

新学術領域研究（2012 年度）

村上 洋太・北海道大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

遺伝情報の発現制御や維持にはエピジェネティックな制御が本質的に重要である。クロマチン高次構造はこのエピジェネティックな制御の根幹をなす物である。本研究では特異でかつダイナミックなクロマチン高次構造であるヘテロクロマチンに着目しその全貌を明らかにする事を最終的に目指している。

2011 年度の研究課題は分裂酵母をモデル生物として、ヘテロクロマチンの形成と機能制御に関与する因子群をできうる限り網羅的に同定し、さらにそれらの因子が形成する複雑なネットワークの一端を明らかにしようとするものである。

2012 年度の研究課題では複数ある分裂酵母のヘテロクロマチン形成システムのうち、特にヘテロクロマチン領域から転写される非コード RNA とその RNA から RNAi 機構により合成される siRNA に依存するヘテロクロマチン形跡系に着目した。siRNA 合成の場はクロマチン上に局在する非コード RNA を足場にして形成されるが、その形成機構、とくに非コード RNA がクロマチン上に局在する機構は定かでない。本研究はこのクロマチン上に局在する非コードＲＮＡによる RNAi の機能場形成機構の解明を目的とした。

＜支援の内容＞

(1) ヘテロクロマチンによる遺伝子抑制に欠損を示す変異株のスクリーニングの結果得られた変異株 7 株について全ゲノム配列シーケンシングをおこない、原因遺伝子の同定を試みた。

(2) 以下のクロマチンタンパク質のゲノムワイドな分布の ChIP-sequencing 法による解析の支援を受けた。

① ヒストンシャペロン FACT の構成因子 Pob3, Spt16
② ヒストン H3K36 特異的メチル化酵素 Set2 および Set2 の C 末欠失変異体
③ ジメチル化およびトリメチル化ヒストン H3K36 の分布
④ セントロメア特異的ヒストン H3 バリアント CenpA の野生型及びクロマチンリモデリング因子 RSC 欠損株での分布の比較
⑤ ヘテロクロマチンを規定するヒストン H3K9 メチル化のゲノムワイドな分布の野生型およびヘテロクロマチン因子 Epe1 欠損株での比較。
⑥ RNA ポリメラーゼ II（RNAPII）および、その C 末の繰り返し配列ドメイン（CTD）の２番目、５番目、７番目セリンがリン酸化された RNAPII の分布の比較。

＜支援によって得られた研究成果＞

１）(1)のヘテロクロマチン変異株 9 株のゲノムシークエンシングの結果、7 株は既知のヘテロクロマチン関連遺伝子の変異株であったが、2 株はヘテロクロマチンに関連することが報告されていない遺伝子に変異をもつものであった。現在、これらの遺伝子がどのようにヘテロクロマチン形成・機能に関与するか解析をおこなっている。

２）①の解析により FACT: Pob3, Spt16 ともにゲノム全体に広く分布することが確認され、general なヒストンシャペロンとしての機能が裏付けられた。また、現在行っている FACT の機能解析のための基礎データとなっている（Takahata et al. in preparation）

３）② ③の変異体を含む Set2 及び H3K36 のジメチル化・トリメチル化のゲノムワイドな分布の解析結果を既存の RNA ポリメラーゼ II の分布と比較することで、Set2 が RNA ポリメラーゼ II と協調的に H3K36 を段階的にメチル化するメカニズムを明らかにした。（Suzuki et al. Nuc. Acid. Res. 2016）

４）CenpA の局在は動原体形成領域に限局されているが、④の解析結果から、クロマチンリモデリング因子 RSC の変異株ではその分布が動原体領域周囲のヘテロクロマチン領域に拡張することが明らかになった。これは RSC が CenpA の正確な局在に寄与することを示している。(Tsunemine et al. in preparation)

５）Epe1 はヘテロクロマチン・ユークロマチン境界形成やヘテロクロマチン内転写活性化能をもつ因子であるが、⑤の解析により、Epe1 欠損により、ユークロマチン上に異所的ヘテロクロマチンが形成され、表現型の変化を誘起することを見いだした。これは Epe1 が異所的ヘテロクロマチンン形成によるエピジェネティックな変異発生を抑制していることを示している。（Sorida et al. in preparation）

６）ゲノムワイドな解析の結果、以下のような各リン酸化のパターンがあきらかとなった。
５番目のセリンのリン酸化（S5P）：S5P の分布は RNAPII の分布とほぼ一致し、転写中の RNAPII は常にこのリン酸化を受けていることがわかる。

２番目のセリンのリン酸化(S2P) : S2P は転写開始直後は低く、その後中間から終結にむけて高くなる。この分布は他の生物と同じで、S2P が、転写伸長、終結､転写された RNA の 3'プロセシングに関与すると言う報告と矛盾がない
７番目のセリンのリン酸化(S7P) : S7P は転写開始直後と終結点付近にピークをもつ分布を示した。これは S7P が転写の開始と終結､および転写された RNA のプロセシングに関与する可能性を示す結果である。
　これらの結果をもとに、さらに詳細な各種解析の結果以下の結論を得た。
1) ヘテロクロマチンにおいて S7P を認識して RNAi 因子 Chp1 が転写中の RNAPII に呼び込まれる。Chp1 は転写された RNA に結合すると同時にヘテロクロマチンに結合し、RNA をクロマチン上に留め RNAi 因子の集合することで、その後の siRNA 合成～ヘテロクロマチン形成を誘導する。(Kajitani et al. 投稿中)
2) CTD の 7 番目のセリンをアラニンに置換した変異株では 1)の反応がおきなくなり、ヘテロクロマチンが崩壊する。それ以外にも一群のユークロマチンの遺伝子発現が増大する結果を得た。興味深いことに、これらの遺伝子は RNAi 因子の変異でも同様の発現上昇がおこる。実際､これらの遺伝子の RNA は Chp1 と結合していた。つまり、ユークロマチンにおいてもヘテロクロマチン形成とは独立して S7P と RNAi の相互作用を使い一部の遺伝子制御が行われている。（Kajitani in preparation）

＜支援によって開かれた新たな展望＞

　ヘテロクロマチン形成・機能に関与する因子について、ゲノムワイドの解析をおこなうことで、今まで認識されていなかったヘテロクロマチン領域以外での機能が見えてきた。今後、このような情報を蓄積・解析することで、ゲノム全体にわたるより高次なエピジェネティック制御機構が明らかになることが期待できる。
　４）の Epe1 の結果は、エピゲノムの恒常性維持と言う観点で重要な知見で有り、モデル生物の分裂酵母だけでなく、高等な真核生物でも同様なシステムが存在する事が予想される・
　最近 non-coding RNA の機能、特にクロマチン構造制御における役割が注目されている。non-coding RNA がクロマチン制御に直接機能する場合、転写された RNA がクロマチン上に局在する必要がある。7）の解析結果は未知であったその局在機構の一つを示すものである。CTD の S7 リン酸化は高等真核細胞で良く保存されており､Chp1 に似た因子も多く存在する事から、類似した機能がほ乳類で使われている可能性も高く，今後の研究の展開が興味深い。

＜支援成果公表リスト＞

Suzuki et al., Nuc. Acids. Res. in press (2016)

公募支援課題：2013～2014 年度

家族性急性リンパ性白血病の原因遺伝子の探索

基盤研究（C）

盛武 浩・宮崎大学医学部

＜背景・目的＞
急性リンパ性白血病(Acute Lymphoblastic Leukemia: ALL)は小児がんで最も高頻度に発生する疾患である。本邦での年間発症数は 500 例程度である。九州山口小児がん研究グループ(Kyushu Yamaguchi Children's Cancer Study Group: KYCCSG)は 13 施設が参加し 1984 年から治療研究を行ってきたが、年間 50 例程度の ALL の登録により現在までに約 1,200 例の治療経験がある。これらの中で家族内小児 ALL 発症は 8 例、4 家系のみであった。ALL 家族内発症の報告は世界的にも極めて珍しく、この研究により家族性 ALL 責任遺伝子並びに発症宿主因子を同定し、小児 ALL の新規発症機構を明らかにしたい。

＜支援の内容＞
KYCCSG から同意が得られた 3 家系に加えて、本邦の他グループへも対象患者経験の有無について調査を行い本研究参加の同意及び検体提供が得られた 2 家系の計 5 家系（38 検体）の次世代シーケエンス法による全エクソンシーケエンス解析、また 2014 年に申請した 3 家系（25 検体）については高密度 SNP アレイ解析も行って頂いた。

＜支援によって得られた研究成果＞
５家系のうち１家系の白血病罹患者に共通のアミノ酸置換を伴う ETV6 胚細胞変異が認められた。ETV6 は小児 ALL 細胞で最も頻度の高い ETV6-RUNX1 融合遺伝子を形成する遺伝子として広く知られ、その機能喪失により ALL 発症と関与している事は認識されていたが、胚細胞変異の報告はなかった。2015 年に我々と同じ様にエクソーム解析を用いて家族性白血病の家系をとおして ETV6 胚細胞変異を認めた報告が 3 報続いた（Zhang et al. Nature Genetics; Noetzli et al. Nature Genetics; Moriyama et al. Lancet Oncology）。既報告ではいずれも血小板低下を伴っており、我々の症例では血小板数が正常である点が異なる。既報告では機能解析をとおして変異型 ETV6 がドミナントネガティブ効果により正常機能を喪失すること、細胞内局在に異常をきたし通常核内に存在する ETV6 蛋白が細胞質に局在すること、などが証明されている。我々の症例で認められた ETV6 変異についても既報告と同じ機能喪失型変異であるかどうかを確認するために同様の解析を計画中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞
ETV6 胚細胞変異が小児 ALL に存在する事が証明された。Moriyama らの報告(Lancet Oncology)では、家族性白血病家系で ETV6 変異を見出した後に 4,405 例の ALL 患者で ETV6 のターゲットシーケンスが施行され 35 症例に胚細胞変異を見出しており、その頻度は約 1%となる。ALL 発症に ETV6 が極めて重要な機能を有している事が再認識された。ETV6 胚細胞変異は、遺伝性がん症候群の代表格として知られる TP53 胚細胞変異に起因する Li-Fraumeni 症候群ほどではないが、既報告からは他のがん種においてもがん化に関与していることが想定される。今回の ETV6 変異の機能解析をとおして発がんの新規発症機能を見出したい。また、小児 ALL 患者に 1%存在するとされる ETV6 胚細胞変異患者のスクリーニングの必要性、それら患者の治療方針および治療終了後のフォローアップ方法についても検討されるべき重要な課題と思われる。

＜支援成果公表リスト＞
現在、機能解析を行いながら並行して投稿準備中である。

公募支援課題：2012 年度

先端ゲノム・トランスクリプトーム解析技術を用いた環境微生物の共生原理の解明

新学術領域研究

守屋 繁春・理化学研究所

＜背景・目的＞

ムカシシロアリ（*Mastotermes darwiniensis*）腸内に共生する巨大（300-500 μm）な Parabasalia 門原生生物 *Mixotricha paradoxa* は、メタン生成古細菌（*Methanobrevibacter* 属）を細胞内に多数保有するものと、全く持っていないものの２系統がある。
そこで、これら２系統の *Mixotricha* の共生微生物について、その比較メタゲノム解析を行うことで、細胞内共生体（この場合はメタン生成古細菌）の有無による宿主原生生物の代謝系の相違を抽出し、共生生物間相互作用解明へと繋げる。
また、既にゲノム解読されている、自由生活型の *Methanobrevibacter* 属メタン生成古細菌２種のゲノムと比較することで、細胞内共生に伴う共生体のゲノム進化を明らかにする事も可能である。

＜支援の内容＞

・系統１：共生メタン生成古細菌を保有する *Mixotricha* 共生系のメタゲノム解析
・系統２：共生メタン生成古細菌を保有しない *Mixotricha* 共生系のメタゲノム解析

両系統より構築したシーケンスライブラリーを用いて、HiSeq2500 を用い、250bp pair end にてフローセル１枚分シーケンスを実施し、リード情報の提供を受ける。

＜支援によって期待される研究成果と現状＞

シロアリ腸内共生原生生物として、２系統の *Mixotricha* が生息するムカシシロアリの取得において、生息地であるオーストラリアでの採集できても、その腸内共生系を自然環境から切り離した状態で安定に保持することが難しいという現象のために、サンプルの調整に困難を生じ、サンプル提供が大幅に遅れた。

このため、２０１６年１月現在シーケンスライブラリーの構築を完了し、支援班における解析の途上にある。

本支援で生産されるデータは、メタン生成古細菌の有無によるメタトランスクリプトームデータのレファレンスとして用いることで、日和見的細胞内共生における共生体−宿主間の代謝接続点に関する情報を提供すると同時に、自由生活型の *Methanobrevibacter* 属メタン生成古細菌２種のゲノムとの比較によって、非常に共生の歴史の浅い共生体において起きているゲノム縮退や EGT のような共生特有の現象の様態を明らかにする事に貢献すると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

1. Kumiko Kihara, Yumiko Nakanishi, Masahiro Sugimoto, Nathan Lo, Yuichi Hongho, Shinji Fukuda, Shigeharu Moriya; Comparative metabolomic analysis of termite hindgut microbiota; ; 2nd International Symposium Matryoshka-type Evolution of Eukaryotic Cells; 2015 年 9 月; Tsukuba
2. 木原久美子, 中西裕美子, 杉本昌弘, 本郷裕一, 福田真嗣, 守屋繁春; 腸内代謝産物から観るリグノセルロース分解機構のシロアリ種間比較; 第 30 回微生物生態学会; 2015 年 10 月 ; 土浦
3. 木原久美子, 中西裕美子, Nathan Lo, 本郷裕一, 福田真嗣, 守屋繁春；原生生物１細胞のメタボロミクス解析の現状～シロアリ腸内共生原生生物を例に～；第３回マトリョーシカ型生物学研究会; 2014 年 07 月 11 日～13 日; 神戸大学
4. 木原久美子, 中西裕美子, Nathan Lo, 本郷裕一, 福田真嗣, 守屋繁春；環境微生物の代謝産物をシングルセルで観察できるか～ムカシシロアリの腸内共生原生生物ミクソトリカを例に～；第 29 回日本微生物生態学会大会; 2013 年 11 月 23 日～25 日; 鹿児島大学

公募支援課題：2013 年度

酵母におけるプロセス負荷の原理の解明

挑戦的萌芽研究

守屋 央朗・岡山大学異分野融合先端研究コア研究室

＜背景・目的＞

私たちはこれまでに、酵母細胞をモデルとして細胞内で様々な細胞内のコンパートメントに局在化するモデルタンパク質 GFP（局在化 GFP）を大量発現させ、それらがどれだけ発現した時に細胞の増殖を阻害するかを調べてきた。この増殖阻害は、それぞれのタンパク質が局在化する際に使われるプロセスへの負荷であると考えられる。そこで本研究では、プロセス負荷を生じさせる原理を明らかにすることを目的とし、局在化 GFP を大量発現している酵母株の転写応答（１）、局在化 GFP の大量発現による増殖阻害を回避することができる様になった変異株等の解析（２）、同様に多コピー化により増殖阻害を回避できる遺伝子の同定を行う（３）。

＜支援の内容＞

上記３つの支援を予定していたが、サンプル調製が当初の予定通りに進まず、１のみの解析にとどまった。具体的には、局在化 GFP を大量発現している細胞、並びに細胞増殖を阻害する未知の遺伝子を過剰発現している細胞における転写解析（RNAseq 解析を行った。

＜支援によって得られた研究成果＞

RNAseq によって得られたデータを解析し、局在化 GFP の過剰で引き起こされる転写応答を同定する事ができた。特に、テロメア近傍のストレス応答遺伝子の発現に変化が見られたが、これは通常の転写因子による転写誘導ではなく、クロマチンの構造変化によることが予想された（未発表）。一方、未知遺伝子の解析では、この解析によりわずかな過剰発現により細胞増殖を阻害する小さな遺伝子 *OTO1*（ORFan Toxic when Overexpressed１）を新たに同定することに成功した（Makanae ら 2015）。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援では、残念ながらサンプル調製が当初の予定通りに行かなかったこと、また支援班との連携がうまく行かなかったことから、当初予定した目的を達することはできなかった。一方で、得られた RNAseq データの解析により被支援者自身で RNAseq のデータ解析が行えるようになり、今後次世代シーケンシングで得られたデータの解析が自前でできるようになったことは大きい。次世代シーケンス解析のハードルが下がったことから、本支援期間中に達成できなかった、上記目的の２や３の解析も自前で行う計画を立てている。

＜支援成果公表リスト＞

原著論文

Makanae K, Kintaka R, Ishikawa K, Moriya H., Small Toxic Protein Encoded on Chromosome VII of Saccharomyces cerevisiae., PLOS One. 2015;10(3):e0120678.

学会発表

酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会（口頭発表）「出芽酵母ゲノムに（たまたま）コードされていた、毒性のある小さなタンパク質」　守屋央朗、石川浩史、金高令子、蒔苗浩司

公募支援課題：2011~2012 年度

内在変異蓄積法による新たな量的デザインマウスの開発

挑戦的萌芽研究

八木 健・大阪大学大学院生命機能研究科

＜背景・目的＞

生物集団の進化や遺伝的多様性は、集団中に新たに発生する変異が、世代を超えて自然選択や遺伝的浮動の作用を受けた結果として生じる。しかしながら、高等動物において、世代を超えた、変異の発生から蓄積までの過程で、どのような選択が働き、その結果として、個体や集団の表現型にどのような影響が現れるか、ほとんど分かっていない。私たちは、実験用マウスを長期間、継代することで、複数の変異蓄積系統の樹立してきた。発生する変異の影響をより効果的に解析するため、通常の野生型マウス(C57BL/6 系統)を用いた変異蓄積系統に加えて、突然変異率を高めた mutator マウス系統(DNA 複製に必須な DNA ポリメラーゼδの複製正確性を下げたマウス)を用いた変異蓄積系統も樹立した。これまでの 10 年間で、最大 27 世代継代がなされた複数の変異蓄積系統の樹立に成功しており、Mutator マウスの変異蓄積系統では、量的形質も含めて表現型形質が多様化し、繁殖能力が大幅に低下するなど、野生型では認められない様々な形質異常が観察された。

＜支援の内容＞

本支援では、豊田敦先生（遺伝学研究所）らとの共同研究により、Mutator マウスの変異蓄積マウス系統由来の 5 個体(継代開始時のマウスも含む)と野生型マウスの変異蓄積系統由来の 2 個体について全ゲノムを対象として再シークエンシング(coverage 40×以上)を実施した(合計 7 個体：2011 年度、2012 年度に分けて実施)。本支援では、その後の変異 call の条件検討まで含めて協力していただいた。その結果、変異蓄積系統(Mutator:2 系統、野生型:2 系統)の継代過程で発生し、系統中に蓄積された de novo 変異(塩基置換、挿入欠失、構造変異)を高精度で同定する(偽陽性率: 0%, 偽陰性率:0.02%)ことに成功した。

＜支援によって得られた研究成果＞

①マウス(野生型 C57BL/6)の世代あたりの変異率の測定に世界で初めて成功した。これまで、哺乳類の世代当たりの変異率(塩基置換型)は、ヒト、チンパンジーでしか測定されておらず、マウスでは不明だった。野生型マウスの変異蓄積系統の解析により、ヒトの約半分に相当する 5.4×10^{-9} (/bp) (95%信頼区間：4.1×10^{-9} - 6.7×10^{-9})であることが世界で初めて明らかになった。また、transition 型変異や CpG 領域での変異率が高いなど、ヒトの de novo 変異で知られているのと同様の特徴が観察され、生殖系列で発生する変異の特徴は種を超えて保存されることが明らかになった。

②Mutator マウスの変異率の推定に成功した。全ゲノム解析の結果、我々が変異蓄積系統を樹立した Mutator マウスの変異率は、野生型の約 17 倍(9.4×10^{-8}/bp)であった。様々なタイプ(transition, transversion ともに)の変異頻度が増加しており、誘発される変異の種類に偏りが少ないことが確認された。また、挿入欠失型変異の発生頻度も野生型の約 10 倍に増加していた。Mutator マウスの継代で観察された表現型形質の変化（「小鳥のように鳴くマウス」など数多くの表現型異常を示す変異体の誕生、体重などの量的形質の多様性の拡大など）は変異率増加の結果だと考えられる。また、Mutator マウスの継代では、繁殖能力が著しく低下し、多くの系統が断絶する一方で、27 世代以上継代された系統も存在する。このことから、マウス系統を維持するために許容可能な変異率の上限が 9.4×10^{-8} (/bp)程度であることが示唆された。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

①実験室内マウス進化モデルが確立された。機能的な変異も含めて、多くの変異の蓄積が確認され、継代過程の全個体のゲノム DNA が保存されている本実験系では、集団中で新たに発生する変異が、どのように系統中に広がり、固定に至るか、表現型データとともに、その全課程を解析することが可能になった。これにより、これまで困難だった、集団遺伝学や分子進化学の理論モデルの実験的な検証が可能になる。また、これまでの解析で、量的遺伝学モデルを用いた解析により、変異分散の測定にも成功しており、量的形質を捉えた新しい遺伝学モデルとしても、利用可能である。本実験モデルを利用することで、多くの未解明の遺伝学上の問題を解明していくことが可能になると考えられる。

②圧倒的に多数の機能的変異の蓄積を基盤とした遺伝学リソースの創出に成功した。Mutator マウスの変異蓄積系統(系統あたり 7,000 変異以上が蓄積)では、既存の mutagenesis(ENU 処理では 2,200 変異程度が誘発)と比べて、多くの変異が蓄積されており、繰り返す継代とともに変異を蓄積させるため、そこで蓄積された変異には致死変異が少ないなど、これまでにない特徴も持っている。本モデルの変異リソースとしての有用性を調べるため、日本マウスクリニック(理研 BRC:若菜茂晴チームリーダー)の協力のもと、本支援で全ゲノム解析が実施されたマウス系統から作出した F2 マウスについて、網羅的な表現型スクリーニングを実施した結果、解析した個体全体の 63%では何らかの異常が認められた(ENU 処理では最大でも 22%)。本モデルを利用すれば、これまで解析できなかった変異間の相互作用まで含めた解析も実施可能になると考えられる。これらの知見を組み合わせれば、「量的形質の自在なデザインを可能にする新たな実験手法」が構築できると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

Uchimura, A. et al., Genome Research 25(8), 1125-1134 (2015)
Uchimura, A. et al., Genes and Genetic Systems 89, 93-95 (2014)

公募支援課題：2015 年度

発生過程における概日リズム成立原理の解明

基盤研究（B）

八木田 和弘・京都府立医科大学大学院医学研究科

＜背景・目的＞

哺乳類の概日時計は初期胚には振動が見られず、発生が進むにつれてリズムが出現してくる。このときに見られる「周期変化がほとんどなく振幅が次第に増大する」という現象は、哺乳類概日時計の発生過程で最大の特徴であり、本研究課題では、時計遺伝子の転写リズムおよび代謝リズムなども含めた概日時計システムの発生過程における成立メカニズムを解明する。特に、概日時計の成立前後での DNA メチル化状態および遺伝子発現リズムの網羅的解析により、概日時計成立プロセスを司る鍵となる仕組みを解き明かす。これにより、概日時計の成立過程におけるリズム振幅変化の原理を理解し、概日時計の出力低下（振幅低下）が背景にあるとされる自閉症や認知症に合併する睡眠リズム障害の病態理解にもつながる概日時計成立原理の体系的理解を目指す。

これまで、我々を含む世界のいくつかのグループから、発生早期には概日時計の振動が見られず、器官形成が完了した胎生後期になって初めてリズム発振が見られるようになることが明らかにされている。本研究課題では、これまでの知見を踏まえて、マウス胎仔の組織を用いて、*in vivo* で発生に伴う概日時計形成メカニズムを解析し、リズム振幅制御因子を同定する。

マウス胎仔の線維芽細胞を用いた解析では、E10.5 日齢の胚では概日時計のリズムが無く、E15.5 日齢の胎仔細胞では明瞭なリズムが見られる。従って、本研究課題では、発生過程におけるマウス胎仔の組織で概日時計が形成されることによって遺伝子発現ネットワークがどのように変化していくのかを解析し、生体における時間情報の創出とその表出の原理に迫ることを目的とする。

＜支援の内容＞

本ゲノム支援によってサポートを希望する解析としては、マウス胎仔組織のリズム発現前とリズム発現後でそれぞれ４時間おきに２日間連続サンプリングした試料の RNA-seq である。

＜支援によって得られた研究成果＞

本ゲノム支援により、マウス胎仔組織の網羅的遺伝子の経時的発現プロファイルが得られた。まだ現在のところ解析が終了しておらず、明確な実験結果および結論は導き出されていないが、これまでにない有用なデータであると考えている。特に、これまで多くの論文で発表されている成体における網羅的遺伝子発現リズムのデータと比較検討することにより、概日時計が発生する過程において遺伝子発現ネットワークがダイナミックに変化する様を捉えられている。今後の詳細な検討により、我々の長年の研究テーマである「哺乳類における、概日時計の発生がもたらす生物学的意義」に大きな進展が得られるものと感じている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援により、次世代シーケンサーなどの研究機器類やそれを運用するスタッフの問題など、研究資源が乏しく不可能であった研究が可能になった。ゲノム支援によって得られたデータの解析から、あらたな発見があり、当初の予想を超えた展開が期待できる状況である。特に、概日時計の発生メカニズムにおける細胞分化機構とのリンクは申請者自身の発見であり、オリジナルな成果をもとに黔球を積み重ねているものにとって、他の研究者が公表しているオープンなデータベースが活用できる部分が非常に少なく、どうしても自ら大規模な遺伝子解析を行わざるを得ない。その点で、ゲノム支援によるサポートにより、オリジナルな研究をさらに発展させることができることは非常に貴重な機会を得たと思っている。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2014 年度

三次元の体を構築するための体軸間相互作用の分子メカニズム

基盤研究（C）

谷口 俊介・筑波大学生命環境系

＜背景・目的＞

多細胞生物が三次元の体を構築するためには、一次軸(e. g. 背–腹)、二次軸(e. g. 左–右)の各体軸に沿った細胞・組織・器官の正確な分化と配置が必要である。さらにこの三次元構築を実現する為には一つの軸形成が単独で正常に進行するだけでなく、各体軸同士が綿密な情報交換を行なうことが必要不可欠である。

本基盤研究における２つの体軸間相互作用の解析にはバフンウニ胚を用いていたが、新たなモデル動物としてハリサンショウウニを構築し（Yaguchi et al., 2015 Dev Growth Differ)、それを用いた実験から種間を超えた共通原理を探ることを試みた。ハリサンショウウニは卵が非常に透明であり、マイクロインジェクションやマイクロマニピュレーションといった操作が簡易であることからこれまでのバフンウニを中心に使用してきた日本のウニ研究に対し、新たなモデル生物の提供となる可能性を秘めている。しかしその一方で、遺伝子の基盤となる情報がほぼ完全に欠落しているため、ハリサンショウウニのモデル動物化の過程の第一歩として、transcriptome データ取得をゲノム支援により試みた。

＜支援の内容＞

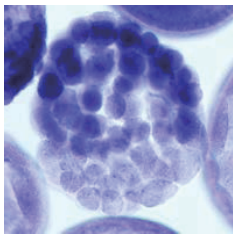
発生ステージごとのトランスクリプトーム解析を行った。ステージとしては２細胞期（１時間)、３２細胞期（３時間)、孵化前胞胚期（７時間)、間充織胞胚期（１１時間)、原腸胚期（１８時間)、プリズム幼生期(３０時間)、プルテウス幼生期(４８時間)の７つの発生段階サンプルを使用した。それぞれのステージから必要量の totalRNA を単離した。そのサンプルをもとに、ゲノム支援においてライブラリーを作成後、次世代シーケンサーHiSeq により解析し、各ステージの fastq データを取得した。それぞれの情報は DDBJ データベースに登録した（公表時期未定)。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援により、ハリサンショウウニの７ステージ分の transcriptome 構築に必須となる次世代シーケンサーデータを得ることができた。そのデータをもとに、共同研究者とともにアッセンブルを行い（Trinity を使用)、各ステージの transcriptome データを完成させた。また、それぞれの contig に対して blast search が可能になる local なデータベースを作成した。

ステージごとの transcriptome 情報の構築により、遺伝子情報がほぼ報告されていなかったハリサンショウウニの発現遺伝子情報を広い範囲で網羅的に得ることができた。既にゲノム情報や発現遺伝子情報が報告されているアメリカムラサキウニ *Strongylocentrotus purpuratus* の胚発生ステージの transcriptome データと比較しても遜色ないものを得ることができた。

実際に科研費課題研究テーマにおいて必須となる体軸形成因子のいくつかを、得られた情報から取得し、ハリサンショウウニ胚を用いて *in situ* hybridization を行った。例として *foxQ2* を示す(図：桑実胚期の発現パターンで、胚の前端側半分の領域の細胞全てで発現している)。*foxQ2* は予定前端部神経外胚葉に最も早期に発現する zygotic な転写因子で（Tu et al., 2006 Dev Biol; Yaguchi et al., 2008 Dev Cell)、前後軸形成過程の指標となるとともに、背腹軸形成阻害因子でもあるため体軸間相互作用研究において必須となる転写因子である。



背景・目的で記したように、ハリサンショウウニの卵は非常に透明であるため、そこから発生した胚もまたバフンウニ胚と比較して非常に透明である。そのため、図のように空間的遺伝子発現の解析において、標的遺伝子が発現しており、染色された細胞と非発現細胞が明確に区別できる。また、この図では示していないが、より後期のタイミングでは mRNA が転写直後に核周辺に集積する様子も見られ、これまでウニ胚の *in situ* hybridization では細胞単位での mRNA 発現様式の観察しかできなかったものが、細胞内の位置にいたるまで観察・議論の対象となる可能性を見いだした。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援により、ハリサンショウウニの発生各ステージの transcriptome 情報が蓄積されたことは、科研費課題研究を推進するのみならず、今後のウニ研究において非常に有益である。ステージごとの transcriptome データの取得は *S. purpuratus* に次いで２例目となるため、特に、発生学と進化学において種間を超えた共通原理の発見に大きな貢献をもたらすと思われる。また、遺伝子機能解析に必須であるノックダウンを実行する際には、モルフォリノアンチセンスオリゴを目的遺伝子の 5'UTR に対してデザインする必要があるが、本支援にて得られた情報には高い確率でそれらの情報も含まれているため、5'RACE をすることなくノックダウンの作業へと進むことができ、作業の効率を上げることに貢献できる。

＜支援成果公表リスト＞

該当なし。

公募支援課題：2014 年度

大量発生予察に向けたオニヒトデ集団の広域受精遺伝子解析

若手研究（B）

安田 仁奈・宮崎大学テニュアトラック推進機構

＜背景・目的＞

サンゴ礁生態系は生物多様性が非常に高く、世界人口の2割の生活に関与する重要な沿岸生態系である。近年、サンゴを食べるオニヒトデが特に西太平洋において頻繁に大量発生し、サンゴ礁生態系における最大の脅威となっている。オニヒトデの大量発生は、オニヒトデ自身のもつ生態学的特徴による自然発生的要因と近年の陸源負荷等による人為的要因の両方により引き起こされていることが考えられる。これまでの研究では特に、オニヒトデ大量発生の人為的要因の検証に重きが置かれており、自然発生的要因についてはほとんど検証されていない。

近年、大量発生と収束を繰り返すウニにおいて、精子が卵を認識するタンパク質であるbindinをコードする遺伝子領域のアミノ酸変異が、受精率に大きな影響をおよぼし、大量発生と収束に深く関連することが示された。このことから、ウニと同じ棘皮動物であるオニヒトデにおいても受精に関連する遺伝子が自然発生的に大量発生を引き起こす一因である可能性が考えられる。実際、オニヒトデの精巣から同定した受精遺伝子binidn領域はウニ同様に遺伝的多様性が高いことが分かってきた。さらに室内受精実験において、精子濃度が高い方が受精効率の良い精子と、逆に精子濃度が低いほど受精効率の良い精子の存在が明らかとなってきた。しかし、bindin 遺伝子領域は構造が複雑であり、発現遺伝子解析のみでは遺伝子の全体像は不明なままである。

また一方で、オニヒトデはインド洋・太平洋に幅広く分布する種であり、近年の報告によるとインド洋と太平洋では最終氷河期に海水面の低下によって異所的に種分化した近縁別種であることがわかっている。オニヒトデのような海洋無脊椎動物において、気候変動による異所的種分化がゲノム全体の分化にどのように影響しているのかは分かっていない。そこで、ゲノム支援により、ことにより、インド洋種および太平洋種のゲノムレベルでの違いを明らかにする。

＜支援の内容＞

ゲノム支援により、豊田 敦先生らのご協力により（国立遺伝学研究所）オニヒトデのインド洋種 1 個体および太平洋種 2 個体（宮崎・ハワイ）の全ゲノムの配列を読んでいただいた。また、遺伝子領域を同定するために、オニヒトデの棘、胃、管足、肝、精巣のトランスクリプトーム解析を鈴木穣先生ら（東京大学大学院新領域創成科学研究科）のご協力により行っていただいた。ゲノムおよびトランスクリプトームのデータ解析（アセンブル、アノテーション、アライメント）は、東京工業大学の伊藤武彦先生、梶谷嶺先生らに全面的にご協力いただいた。バインディン遺伝子の構造解析等に関して、九州大学の林哲也先生及び小椋義俊先生にご協力いただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

宮崎、タイ、ハワイのオニヒトデの全ゲノム解析よりゲノムサイズが、408～428Mbp であることが推定できた。ミトコンドリアの全長配列も新たに得られ、インド洋種であるタイの個体は太平洋種と塩基配列の相同性が約 91%の相同性であるのに対し、太平洋種同士では約 99%の相同性と改めて大きく分化していることがわかった。全ゲノムの相同性についても、インド洋種と太平洋種の間では 98%の相同性であるのに対し、太平洋同士の間では約 99%とミトコンドリアと整合するデータが得られた。しかし一方バインディン遺伝子は遺伝子領域の長さが 4449～4716bp であることがわかり、CDS の相同性は、完全に中立なミトコンドリアとは異なり、ハワイとタイの間で最も近く(97.08%)、太平洋種同士であるはずのハワイと宮崎の間で最も遠く（94.32%）なった。これらのことから、受精に関連する遺伝子であるBindin遺伝子では中立遺伝子とは異なる独自の進化を遂げていることが推定された。また、Bindin 遺伝子の構造解析を行ったところ、最も長いエクソン領域では、約 250bp のリピート領域が、個体ごとにリピート領域の長さが異なっていることがわかった。また、さらに下流域側にも相同性の高い短いリピート領域が存在していることがわかった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援により、イントロン領域を含む 9 つのBindinのエクソン領域とその構造を明らかにすることが出来た。さらにこの中に、リピートを含む多型性の高いエクソン領域を同定することができたため、今後、その領域の生態学的・進化学的意味を受精実験との照合を出来るようになった。また、全ゲノム解析を行ったことにより Bindin と他の遺伝子との比較が出来るようになったため、Bindin の進化のなぞを紐解く上で大きな情報を得られたといえる。

今後､3 個体の全ゲノム配列の比較から同祖理論に基づく集団史の推定を行うことによって､2 種が最終氷河期に種分化してから個体群密度がそれぞれどのように変遷してきたのかを明らかにしたいと考えている。それにより、インド太平洋に住む非モデル生物である海洋無脊椎動物の氷河期から現在における集団史を明らかにすることができると期待できる。

＜支援成果公表リスト＞

解析および投稿準備中

公募支援課題：2010～2011 年度

免疫系の恒常性維持および破綻機構の解明に基づく自己免疫疾患の治療法開発

若手研究（S）

安友 康二・徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

＜背景・目的＞

免疫疾患の発症の背景には環境要因に加えて遺伝的要因が深く関わることが知られている。しかし、多様な遺伝的要因がその発症には関与していると考えられることと、それぞれの変異の疾病発症における寄与率が低いことから、遺伝的要因を同定する事に関して困難を極めているのが現状である。

どのような遺伝的要因が免疫疾患の発症に関与しているかについてのアプローチの一つとして、家族性免疫疾患の原因遺伝子を同定する方法が有効である。実際に、各種の家族性免疫疾患の解析から、新しい知見が得られてきている。そこで我々は、家族性の炎症性腸疾患および原因不明の免疫疾患の原因遺伝子をエクソーム解析法を用いて同定する事を本研究の目的とした。家族性免疫疾患の原因遺伝子を同定する事は、非常に稀な疾患の病態を解明することだけにとどまらず、頻度の高い疾患の病態の理解にも貢献できる可能性があると考えられる。

＜支援の内容＞

家族性炎症性腸疾患の家系例、家族性免疫不全症の家系例を用いて、エクソーム解析の支援を受けた。

＜支援によって得られた研究成果＞

得られたエクソーム解析の配列結果をもとにして、家系内で共通する変異の同定を試みた。家族性疾患であるために、家系内のサンプルを用いた連鎖解析およびホモ接合体マッピングなどの手法を用いて染色体上の候補領域を狭小化し、その候補領域に存在する変異について検索をすすめた。

家族性炎症性腸疾患に関しては、常染色体劣性遺伝形式で発症すると考えられ候補遺伝子としては 20 を越える変異が残り、配列の解析だけではどれが原因となる変異であるかは明らかではなかった。そこで、それぞれの遺伝子の臓器での発現パターンの解析を加えた。現在、その発現パターンを基盤として、候補遺伝子を数個にまで絞り込み、それぞれの遺伝子機能が変異によってどのように変化するかについて培養細胞を用いた検討をすすめている。

家族性の免疫不全症に関しては常染色体優性遺伝形式で発症すると考えられることから連鎖解析を組み合わせて候補変異の同定を試みた。その結果、候補になりうる変異は 5 個までに絞り込むことができた。5 個の遺伝子の各種細胞での発現パターンを解析したが、候補をさらに絞り込むことができるだけの知見を得ることはできなかった。そこで、5 個の遺伝子のそれぞれについて、遺伝子改変マウスを作製してその遺伝子機能の役割を解析することを試みている。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

ゲノム支援によるエクソーム解析により、通常の解析では絞り込むことができなかった、家族性炎症性腸疾患と免疫不全症の候補変異を同定する事ができた。未だ原因となる変異を同定するに至ってはないが、本支援によりその絞り込みをできたことから、今後の機能解析によって原因変異を同定する可能性が開けてきたと考えている。

＜支援成果公表リスト＞

公表はなし。

公募支援課題：2012～2013 年度

東南アジアにおけるピロリ菌分子疫学研究：新規病原因子の探求と人類移動の解明

基盤研究（B）

山岡 吉生・大分大学医学部

＜背景・目的＞

Helicobacter pylori（ピロリ菌)は人類に広く蔓延し、胃癌や十二指腸潰瘍のリスクファクターとして知られている。ピロリ菌のタイプと胃癌発症率には相関が見られ、菌の毒性の差が疾患発症率の地域差に寄与していると考えられる。また、ピロリ菌は人類とともに地球上を移動してきたことから、ピロリ菌の遺伝子型を解析・分類することによって、世界の諸民族がどのような経路をたどって移動してきたかを推測することができる。このような背景から、我々はピロリ菌のゲノム解析を通じて、1) ピロリ菌の新規疾患関連遺伝子の探索、2) アジア地域における人類集団の移動経路の推定、の２つの命題に取り組んだ。

＜支援の内容＞

2012 年～2013 年度に、1)ピロリ菌の新規疾患関連遺伝子の探索のために 109 株、2) アジア地域における人類集団の移動経路の推定のために 308 株、合計 417 株のピロリ菌ゲノムを HiSeq2000 によって読み取っていただいた。地域内訳は以下の通りである。

1)ピロリ菌の新規疾患関連遺伝子の探索

大分	81 株
ベトナム	28 株

1)アジア地域における人類集団の移動経路の推定

インドネシア	12 株
コロンビア	25 株
タイ	20 株
ドミニカ	20 株
日本	17 株
ネパール	18 株
バングラディシュ	11 株
ブータン	20 株
ベトナム	126 株
ミャンマー	20 株
モンゴル	10 株
その他	9 株

＜支援によって得られた研究成果＞

ピロリ菌はゲノムの構造変異が多いため、リファレンスマッピングではなく *de novo* アセンブリによってコンティグを作成した。コンティグ数は各株に対して 50～100 個であり、アセンブル結果は良好であった。さらに ORF 予測を行い、解析に十分な数の遺伝子配列を得た。

新規疾患関連遺伝子の探索という目的に関しては、大分で採取された 81 株（胃癌 19 株、十二指腸潰瘍 14 株、特発性血小板減少性紫斑病 31 株、MALT リンパ腫 12 株、胃炎 5 株）について、相同遺伝子 396 個の解析を行い、各アミノ酸座位でのアミノ酸頻度を疾患群ごとに比較して、有意差のある座位を同定した。また、相互ブラスト検索によって、特定の疾患群の菌で有意に多い・少ない遺伝子を探索した。アセンブリが完全ゲノムではないので遺伝子頻度の比較は正確にはできないが、次世代シーケンサーによるゲノム読み取り株以外の多数の株に対しても PCR 法を用いて検証を行っている。

人類集団の移動経路の推定については、ピロリ菌と宿主のヒトの系統関係が並行的であることを利用して推定を行った。これまでに我々は、沖縄に本州と異なる系統のピロリ菌集団が２つ存在することを明らかにしてきた。１つは推定分岐年代が 1 万 5 千年前の菌集団で、台湾からニュージーランドにかけて存在する菌集団（hspMaori）と近縁性が見られる。推定分岐年代の 1 万 5 千年前は縄文時代に相当し、日本列島に先住していた縄文系の人々が、後の弥生系の人々の流入により北端と南端に残ったという「日本人二重構造説」と合致する。

もう１つは推定分岐年代が 3 万年以上前と非常に古く、集団構造解析からインド・タイなど南アジアに存在する菌集団（hpAsia2）との関連性が推測されたが、これまで近縁の株は見つかっていなかった。しかし、2012 年度にシーケンスしていただいたネパール株の中に沖縄株と近縁のものがみつかり、沖縄株の由来に関する新たな知見を得た。現生人類の拡散は、アフリカから複数の移動の波があったと推測されているが、推定分岐年代 3 万年以上前のピロリ菌集団は、縄文時代より早い時期にも琉球列島に人類が到達していた可能性を示唆している。この他、多くの島嶼からなるインドネシアにも系統的に多彩なピロリ菌集団が見られ、疫学的な調査結果とともにゲノムデータの解析結果をまとめた。これらの結果は論文化し、現在投稿準備中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

我々は日本を含むアジア 11 カ国と、南北アメリカ大陸のアラスカ、コロンビア、ドミニカをカバーする世界最大級のピロリ菌の臨床分離株を保有し、長年にわたってピロリ菌の分子疫学研究を行ってきた。

ピロリ菌の集団解析には、従来 7 つのハウスキーピング遺伝子配列を利用する Multi loucus sequence typing (MLST)が用いられていたが、ゲノム支援によるシーケンスデータによってゲノムの 90%以上に相当する配列が得られ、解析対象をゲノム規模に広げることができた。また、疾患関連遺伝子の探索も、PCR 法で個々の遺伝子を調べる方法から、大量の遺伝子を網羅的に比較する方法に移行した。このように解析範囲を広げることで、我々が保有しているピロリ菌分離株とそれらの臨床情報が最大限に活用でき、新規な疾患関連遺伝子やピロリ菌集団の探索が進展した。

＜支援成果公表リスト＞

Binh, TT et al. Genome Announc. 14;1(6). pii: e00912-13 (2013)
Suzuki, R et al. Infect Genet Evol.12,203-213 (2012)

公募支援課題：2014 年度

東南アジアにおけるピロリ菌分子疫学研究：新規病原因子の探求

基盤研究（B）

山岡 吉生・大分大学医学部

＜背景・目的＞

Helicobacter pylori(ピロリ菌)は胃炎をはじめとして、胃潰瘍、十二指腸潰瘍(DU)、胃ガン、胃 MALT リンパ腫および特発性血小板減少性紫斑病など、さまざまな疾患を引き起こすことが知られている。疾患の発症には食習慣などの環境因子や宿主側の感受性も影響するが、現在我々は菌側が持つ疾患関連遺伝子をターゲットとした研究を行っている。

ピロリ菌の疾患関連遺伝子としては *cagA* (cytotoxin-associated gene A)、*vacA* (vacuolating cytotoxin A)がよく研究されており、東アジア株は欧米株と比較してこれらの遺伝子が強毒型である頻度が高いことが知られている。しかし、*cagA*, *vacA* の遺伝子型が同じ株に感染しても、発症する疾患には違いが見られ、疾患に関連した遺伝子が他にも存在する可能性が考えられる。　これまでの病原遺伝子の研究は、PCR とサンガー法で遺伝子を一つずつ調べる手法が主流であったが、我々は種々の疾患から検出された臨床検体株のゲノムを読み取り、大規模な遺伝子解析を行うことで、これまでに知られていない病原因子を同定することを目的とした。

＜支援の内容＞

大分およびベトナムで採取されたピロリ菌 200 株のゲノムを HiSeq2000 で読み取っていただいた。内訳は下記の通りである。大分株 : 54 株; ベトナム株 : 127 株;　その他（プロテオーム用など）: 19 株

＜支援によって得られた研究成果＞

本課題は 2012 年～2013 年に支援していただいた課題（東南アジアにおけるピロリ菌分子疫学研究：新規病原因子の探求と人類移動の解明）に引き続き、新規病原因子の探索に的をしぼったものである。前年度までのデータと合わせて、大分株 135 株、ベトナム株 155 株のデータが得られた。

我々はまず大分株 135 株の解析を行った。疾患の内訳は胃ガン 41 株、十二指腸潰瘍 46 株、胃 MALT リンパ腫 11 株、特発性血小板減少性紫斑病 31 株、胃炎 6 株である。これらの株のゲノム配列から ORF を予測してブラストデータベースを構築し、福井株（F57）の遺伝子をクエリとして検索を行った。その検索結果を元にシングルコピーの相同遺伝子を決定してアラインメントを作成し、疾患群間でアミノ酸頻度に差が見られる座位を探索した。

その結果、胃 MALT リンパ腫由来株と胃ガン由来株の間で、3 遺伝子 4 座位でアミノ酸頻度に有意な差があり、さらに胃 MALT リンパ腫株ではこれらの座位間に連関があることを発見した。この結果については、現在論文にまとめている段階である。また、疾患ごとに遺伝子頻度の比較を行い、胃 MALT リンパ腫と胃ガンの間で、有意な頻度差がある遺伝子を 2 つ発見した。ただし、この結果はショートリードデータを元にしているため、アセンブリーエラー等で遺伝子配列が得られず偽陰性となっている可能性が考えられる。今後 PCR で検証しつつ、次世代シーケンスを行っていない他の臨床株についても調査を行って、遺伝子頻度の差が本物かどうか確認する予定である。

アミノ酸頻度や遺伝子頻度以外に、遺伝子機能の on/off の切り替えに関与している可能性のある塩基リピートの解析、病原性遺伝子群に特徴的な低 GC 含量遺伝子クラスターの同定など、様々な視点から疾患関連遺伝子の探索を進めている。

ベトナム株は大分株ほど疾患の多様性はないが（胃ガン、胃炎、十二指腸潰瘍）、大分株の解析から得られた結果と比較することで、疾患関連遺伝子が地域特異的なものなのか、それとも普遍的なものなのか、判断することができる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

初期に発見されたピロリ菌病原因子は、*cagA* や *vacA* などのように、主にピロリ菌の生物学的特性から *in vitro* の実験でクローニングされて得られたものであった。その後ピロリ菌の完全ゲノムデーが発表され始めると、少数の株のゲノムデータをもとに疾患に関与すると考えられる領域を予測し、PCR やサンガー法によって遺伝子を一つ一つ調べて疾患との関連性を確かめる方法が主流となった。我々も同様の手法で OipA および DupA の 2 因子を発見したが、このような方法は魚の一本釣りのように腕と勘と運に頼るところが大きく、思いがけない未知の病原遺伝子を発見するのは困難である。

ゲノム支援によって、豊富な臨床株コレクションの中から疾患情報を完備した 300 株近い株のゲノム情報が得られたことで、病原遺伝子の探索範囲が大幅に拡大した。我々は既に新規な病原遺伝子の候補を見いだし、検証段階に入っている。日本のピロリ菌はほとんどが強毒型の病原遺伝子を持っているが、全てが胃ガンを引き起こすわけではなく、病態はさまざまである。このような違いを説明できる病原遺伝子はまだ見いだされていない。胃マルトリンパ腫や特発性血小板減少性紫斑病といった多彩な疾患もターゲットに入れて網羅的な遺伝子解析を行うことで、新規疾患関連遺伝子を発見し、診断や治療に役立てることができると考えている。

＜支援成果公表リスト＞

Sgouras, DN et al. 20 Suppl 1:8-16(2015)
Uotani, T et al. Expert Opin Ther Targets. 6:1-14 (2015)
Binh, TT et al. Antimicrob Agents Chemother. 59:2343-2348 (2015)
Binh, TT et al. Genome Announc. 3. pii: e00051-152015 (2015)

公募支援課題：2010 年度

先天性疾患と集団間の遺伝的変異から顎口腔領域に関連する形質の遺伝因子を解明する

基盤研究（B）

山口 徹太郎・昭和大学歯学部

＜背景・目的＞

顎口腔領域に関連した形質には歯の形態や頭蓋顎顔面形態など強い遺伝性を有するものが少なくない。一方、先天性疾患においては歯の数・形態の異常、特異な頭蓋顎顔面形態などの表現型を呈するものがある。本課題研究者らは先天性疾患の原因遺伝子が健常集団においてもその遺伝的役割を担い形質に関与することを明らかにした。さらに、シャベル状歯など集団間における形質出現の頻度差といった集団遺伝学的視点が候補遺伝子の絞り込みに有用であることも経験した。遺伝因子の解明は顎離断等の手術を要する顎変形症や歯槽と歯の大きさの不均衡によって生じる叢生など咬合異常の病態理解に寄与することから、本申請では顎口腔領域に関連した形質について先天性疾患の表現型をヒントに集団遺伝学の応用から遺伝因子を解明することを目的とする。

＜支援の内容＞

250 人における DNA マイクロアレイ（イルミナ社）によるゲノムワイド関連解析

＜支援によって得られた研究成果＞

変形性関節症は関節軟骨ならびに軟骨下骨に及ぶ退行性病変である。本研究はゲノムワイド関連解析により東アジア人集団における顎関節変形性関節症の疾患感受性遺伝子の同定を目的とする。日本人罹患者 86 名非罹患者 143 名、韓国人罹患者 39 名、非罹患者 178 名を対象とした。顎関節における変形性関節症の罹患の有無はパノラマＸ線写真により診断した。各個人の遺伝子型はイルミナ OmniExpress を用いて決定した。日本人と韓国人は個別に患者対照関連解析を行い、両者の結果をメタ解析で統合し、p-value を算出した。関連解析の結果、$P<10^{-5}$ の有意水準でこれまで関連が報告されていない新規の 3 遺伝子座位が同定された。これまでに顎関節変形性関節症に対するゲノムワイド関連解析の報告はなく、原因遺伝子の同定は病態の理解に寄与することができる。

永久歯先天欠如は歯科矯正臨床において高頻度に認められる。特に第三大臼歯欠如においては約 30%程度との報告がある。本研究は、東アジア人集団における第三大臼歯欠如に関与する遺伝因子の探索および顎顔面形態との関連性を明らかにすることを目的とする。日本人集団 298 名および韓国人集団 230 名を対象とした。歯科用エックス線写真と第三大臼歯抜歯既往の有無の確認を目的とした患者への問診から第三大臼歯欠如を判定した。日本人集団および韓国人集団は個別に症例対照関連解析を行い、両者の結果をメタ解析で統合し、p-value を算出した。$P<10^{-5}$ の有意水準で興味深い複数の遺伝子座が同定された。本研究は、第三大臼歯欠如について初めて GWAS を実施したものであり、関連を示唆する複数の多型を同定した。第三大臼歯欠如に関与する感受性遺伝子の同定および顎顔面形態との関連性の解明は永久歯の形成に必要な未知の遺伝因子同定に寄与することが期待できる。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

当初の研究班のみでは不可能であったサンプル数でのゲノムワイド関連解析が実現した。また、質の高い遺伝統計学的解析が実施された。

＜支援成果公表リスト＞

Yamaguchi T, et al. Oral Dis. 20, 2014, 409-415.
Haga S, et al. J Hum Genet, 58, 2013, 799-803.

公募支援課題：2013 年度、2014 年度、2015 年度

ヒト腸内細菌叢代謝機構の解明

若手研究（A）

山田 拓司・東京工業大学大学院生命理工学研究科

＜背景・目的＞

ヒト腸内細菌叢は特殊な代謝経路を持っており、腸管内においてビタミンなどを生合成することが知られている。本研究計画の目的はヒト腸内細菌叢による低分子化合物の代謝経路を明らかにすることであり、独自の代謝機能データベースの構築作成および、疾患における代謝機能の変動をデータベース化する。ここでは以下の項目に焦点をあて研究を進める。

①ヒト腸内細菌叢における酵素反応ネットワークの構築

②ヒト腸内における複数の細菌種による化合物分解経路の同定

③細菌叢代謝系多様性とクローン病などの疾病との関連の解明

当初の科学研究費の申請課題（科学研究費若手研究 A）はヒト腸内の細菌叢による代謝経路の解明とそのデータベース作成であり、その最終年度後半に疾病患者と健常者の間の比較を予定していた。今回の支援によるデータにより、腸内環境の代謝能力多様性と疾病との関連性をより大規模なデータによって明らかにすることができると期待される。

＜支援の内容＞

支援内容は、ヒト糞便サンプルから抽出された細菌叢 DNA のメタゲノムシーケンシングである。DNA 抽出後のサンプル調整は林哲也教授（宮崎大学、現九州大学）、Ilumina Hiseq を用いたメタゲノムシーケンシングは豊田敦准教授（国立遺伝学研究所）からのサポートを受けている。本支援は 2013、2014、2015 年の連続した支援を頂いた。サンプルの詳細としては健常人の糞便サンプルを計 140 例（2013 年度 60 例、2014 年度 60 例、2015 年度 20 例）、大腸がん患者及び炎症性腸疾患患者の糞便サンプルを計 220 例（2013 年度 60 例、2014 年度 60 例、2015 年度 100 例）となっている。2015 年度の支援については現在シーケンシングが進められている。平成２７年度は同一患者から得られた時系列サンプリングである。

各サンプル当たり 5 から 6 Gbps の総配列量（約 3000 万 read）を上記プラットフォームから得ることができた。これらの配列量は共生細菌叢メタゲノムとしてこれまで報告されている研究例と比較しても十分な量であり、以後の解析に用いることができると考えられる。

＜支援によって得られた研究成果＞

本研究における研究成果として、以下の二例を挙げることができる。すなわち、１）大規模な日本人腸内細菌叢メタゲノムデータから得られる日本人標準の腸内細菌環境の同定、及び、２）疾患時（大腸がん）に特異的に変動する疾患マーカー細菌及び遺伝子の発見である。大腸がんに関しては、日本人大腸患者に対するマーカー候補となる細菌種および細菌由来遺伝子を数種類特定している。特筆すべき点として、300 症例を超える大規模研究を実現することができ、これまでの研究報告では成し得なかった大腸がんの進行程度に沿った腸内細菌叢の特徴をつかむことができた。現在論文報告の準備を進めている。

また、数百項目に渡る生活習慣や食生活などの疫学データを同時に集めており、これまでは定量化が困難であった生活習慣が健康状態へ与える影響を細菌叢の変化という点で定量化することが可能である。これらのデータを用いることで、菌叢情報を取り入れた食品開発、創薬、そして疾病の早期発見などが期待される。さらに、メタボロームデータを同時に取得しているため、腸内細菌、代謝化合物、そして食生活習慣とそれぞれの関連性を明らかにすることも期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

この結果により、疾病において腸内細菌由来のマーカー細菌や遺伝子を明らかにすることができれば、個人毎に疾病リスクと関連付けられた菌叢情報を用いた診断が可能になると考えられる。 テーラーメイド医療などのゲノム医学が臨床まで到達しつつある現在、共生細菌叢のメタゲノム解析の利用は今後のゲノム医学において中心的な役割を担うと考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

1. Fecal metagenomic analysis of colorectal cancer cohort、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、2015 年 10 月 8 日-10 日

公募支援課題：2014 年度

エフェクターと宿主標的分子間相互作用を基軸としたサルモネラ感染分子機構の解明

基盤研究（A）

山本 友子・千葉大学大学院薬学研究院

＜背景・目的＞

細胞内寄生細菌であるサルモネラが細胞に侵入・増殖する際、エフェクターと呼ばれるタンパク質性病原因子を 3 型分泌機構により移行させ、宿主高次機能をハイジャックすることで、菌の感染に有利な環境を構築する。感染過程における宿主環境の変化は、サルモネラの遺伝子発現プロファイルに影響し、エフェクター産生および分泌の時空間的制御を可能とする。サルモネラ感染後の宿主高次機能の変化は多岐にわたっており、未知のエフェクターの存在が示唆されていた。我々は、in silico インタラクトーム解析法を確立することで、機能未知の新規エフェクターを得た。未知エフェクターの宿主内ターゲット分子・生化学的経路を同定することが、感染時に生じる宿主高次機能変化解明につながると考えられる。

サルモネラによる宿主高次機能変化に伴い、自然免疫に関わるサイトカインなどの遺伝子発現が感染の段階に応じて変化する。また、核内 long non-coding RNA（lncRNA）が自然免疫制御の一翼を担うことが、近年注目されている。これらの背景に基づき解析を進めたところ、サルモネラエフェクターが long non-coding RNA 制御に関与することを示唆する結果を得た。そこで、感染細胞における RNA プロファイリングに基づいたエフェクター機能解析を行った。

＜支援の内容＞

サルモネラを感染、継時的に採取した HeLa 細胞の機能遺伝子および lncRNA 発現を明らかにするため、野生株および 3 型分泌機構欠損株、エフェクター欠損株の各種サルモネラ感染細胞における RNA-seq 解析を行った。また、遺伝子変動における RNA 分解の重要性が示唆されていることから、秋光信佳博士（東大）らが開発した BRIC-seq 法により、サルモネラ感染時における RNA 分解制御についてもゲノムワイドに解析した。

＜支援によって得られた研究成果＞

サルモネラを感染させた後 18 時間経過した HeLa 細胞において、核内 lncRNA の一つである NEAT1 が有意に増加していた。3 型分泌装置である SPI1 または SPI2 を欠損させたサルモネラを感染させたときには、NEAT1 の増加は認められなかった。サルモネラ感染により NEAT1 以外の lncRNA が制御される可能性について検討するため、各株を感染させた HeLa 細胞から抽出した RNA の網羅的解析を行った。サルモネラ感染で発現誘導される NFκB1、NFκB2、RELB などの増加が確認できた。そこで、lncRNA について解析したところ、野生株感染において linc00173、RP11-378A13 など多数の lncRNA 量が増加していることが明らかとなった（図 1）。更に、PROMPTs（Promoter upstream transcripts）なども優位に増加していた。これらは、感染 2 時間では変化が見られなかったものの、感染 6、18 時間と感染時間が長くなるにつれて顕著に増加した（図 1）。一方、SPI1 欠損株および SPI2 欠損株感染細胞においては、感染 18 時間が経過しても、lncRNA などの増加は見られなかった。このことから、サルモネラは SPI1 依存的に細胞侵入後、SPI2 依存的に細胞内で増殖する過程で、lncRNA を増加させることが示唆された。我々が同定した機能未知エフェクター GogA の関与について検討したが、GogA 単独では寄与しないことも明らかとなった。

サルモネラによる lncRNA 制御機構を明らかにするため、BRIC-seq 法を用いて RNA 分解を解析した。その結果、サルモネラ感染では lncRNA の安定性が増加することが明らかとなった。以上より、サルモネラは、3 型分泌機能依存的な機能により、宿主細胞内の lncRNA 安定性を増加することが示唆された。

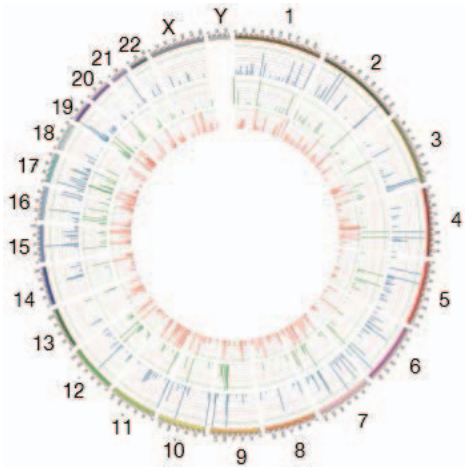


図 1 サルモネラ感染 HeLa 細胞における lncRNA 変動解析（赤：2 時間、緑：6 時間、青：18 時間）

＜支援によって開かれた新たな展望＞

サルモネラが、2 種の 3 型分泌機能依存的を用いて宿主 RNA 分解を積極的に制御するという機構を有することを今回初めて見出した。更にこの制御は、核内 RNA 分解調節に起因する。以上より、サルモネラは複数のエフェクターの機能を連動させることで、宿主細胞内の RNA 分解を制御し、自然免疫応答などに必要な遺伝子発現を調節することが示唆された。このことは、新たな感染の分子メカニズムの提唱である。近年、核内 RNA 分解について多くの報告がされているが、その制御についての研究は緒についたところである。サルモネラ感染における RNA 分解制御の分子機構を明らかにすることは、感染症研究のみならず、RNA 分解機構の解明にもつながると考えられる。

公募支援課題：2011～2012 年度

霊長類大脳皮質領野特異的発現遺伝子の機能解析

基盤研究（A）

山森 哲雄・基礎生物学研究所脳生物研究室部門（現所属：理化学研究所脳科学総合研究センター）

＜背景・目的＞

大脳新皮質は、哺乳類に固有の６層から成る構造体であるが、生物系統学的に霊長類で急速に発達した。大脳新皮質の解析をおこなう本研究計画で用いる使用動物は、マカクザルに代表される霊長類である。我々は、これまでに、霊長類の大脳皮質領野特異的に発現している遺伝子発現の網羅的解析を differential display 法と RLCS（restriction landmark cDNA scanning）法を用いて行い、視覚野特異的発現を示す遺伝子群（OCC1/fstl1, 5HT1B, 5HT2A, testican-1, testican-2）と連合野特異的発現遺伝子群(RBP, PNMA5, SPARC, SLIT1)の２群に分かれることを報告してきた。しかし、これらの解析は遺伝子探索に留まり、近年急速に進歩した定量的な網羅解析は、行われていない。一方、大脳新皮質の解析で対象とするマカクザルのうち、特にナショナルバイオリソースプロジェクトで供給されるニホンザルのゲノム情報は、アカゲザルと比較して未整備であり、ゲノム研究の基盤が弱い。2010 年度にニホンザルゲノムの概要配列解読がスタートしたが、今後は研究の精度や効率を高めるために、実験に用いられる個体の個別ゲノム情報の整備が必要不可欠かつ急務である。ニホンザルの供給元となっている京都大学霊長類研究所では、幾つかの生息地に由来するニホンザルがその地域個体群ごとに繁殖・育成されている。家系、飼育歴、疾患履歴などが個体ごとに集計されており、新生児から老齢に至るまで多様な表現型を持つ個体が飼育されている。そのような飼育群において、既に視覚・味覚多様性や神経疾患様症状などを示す自然発生的遺伝子変異が観察されている。

これらの状況を踏まえ、本計画ではナショナルバイオリソースプロジェクトで供給されるニホンザルを中心とした個体群を対象に、エクソーム・トランスクリプトーム解析を行い、脳研究や医科学研究に用いるニホンザル個体における遺伝的バックグラウンドの特性を、個体間ならびに集団間において明らかにすることを目指した。トランスクリプトームについては、特に本研究の対象である脳領野について効率的な遺伝的バックグラウンドを提供するために、マカクザル類の胎児、新生児、成体の各発達段階における大脳新皮質の５領野（前頭連合野、運動野、体性感覚野、側頭連合野、視覚野）について網羅的発現解析を行い、大脳皮質領野特異的に発現している遺伝子の同定を行うことを目的とした。

＜支援の内容＞

ゲノム支援によって支援していただいた内容は、ナショナルバイオリソースによって供給されたニホンザルを含めた出自の異なる各個体群を対象にしたエクソーム解析と、霊長類領野特異的発現遺伝子の同定およびその発達変化を目的としたトランスクリプトーム解析である。具体的には、エクソーム解析では､京都大学霊長類研究所の各繁殖個体群から 100 個体（インド由来、中国由来のアカゲザルを含む）を選抜し、遺伝子領域における一塩基多型や小規模挿入・欠失などの変異を検出するために、ヒト用のエクソームキットを用いたシークエンスキャプチャー法によってエクソン領域約 60Mb を濃縮することにより、効率的な変異スクリーニングを行った。（2011 年度)。トランスクリプトーム解析については、2011 年度は、成体のアフリカミドリザル５個体を用いた大脳新皮質５領野（前頭連合野、運動野、体性感覚野、側頭連合野、視覚野）について、2012 年度に関しては、マカクザル（アカゲザル、カニクイザル、ブタオザル）の胎児４個体と新生児４個体から胎児に関しては４領域、新生児に関しては５領域について RNA-sequencing の支援をいただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

エクソーム解析とトランスクリプトーム解析と分けて支援によって得られた研究成果を記す。

①エクソーム解析

100 個体（ニホンザル 78 個体、インド産アカゲザル８個体、中国産アカゲザル 14 個体）のエクソーム解析を行った。ヒト全エキソームキャプチャープローブ（イルミナ社 TruSeq Exome Enrichment）を用いてサンプルあたり 20~50M リードの配列を取得した。得られた一塩基多型（345,263 個の SNV）の情報を用いて多変量解析を行った結果、ニホンザル−インド産アカゲザル−中国産アカゲザルは、はっきりと３つのクラスターを形成し、さらにニホンザルにおいても地域集団ごとにクラスターを形成する傾向が明らかになった。次に、これら 100 個体のマカクザルにおける稀な機能喪失型（Loss-of-Functional: LoF）変異数および個体の同定を試みた。その結果、実に 3115 個の遺伝子において稀な変異（Minor allele frequency が 3%以下）の LoF 変異が認められた。そのなかで、ヒト精神・神経疾患に関連が報告されている 4082 遺伝子における LoF 変異を探索した結果、701 個の遺伝子に変異が生じていることを明らかにした。また、ニホンザルとアカゲザル（インド産、中国産）で同定した変異情報を用いた集団遺伝学的解析により、ニホンザルがアカゲザルと種分岐してからニホンザルに特異的に自然選択を受けた遺伝子の探索を行ったところ、体毛の発生や脂質代謝関連遺伝子において、有意に正の自然選択を受けてきたことを明らかにした。

②トランスクリプトーム解析

2011 年度のゲノム支援によって、アフリカミドリザルの大脳皮質遺伝子発現プロファイルを５個体５領野について得ることができた。計 25 サンプルの平均リード数は、68±17M（ミリオン）で、解析対象となった 28,509 遺伝子のうち、21,527 遺伝子に対

して何らかのリードがマップされた。「研究の背景・目的」にも前述した通り、我々の研究室では、すでにいくつかの領野特異的遺伝子を同定することに成功している。そこでまず、既知の遺伝子について、RNA-seq の発現プロファイルを確認したところ、これまで我々が報告したすべての遺伝子について、予想通りの発現プロファイルが得られることが分かった。これらのうち、GDF7 遺伝子は発現量が非常に低く、競合 PCR などから全 mRNA の 0.001%程度と見積もっていたのだが、RNA-seq でも低いレベルながら検出することができた。この結果は、RNA-seq の感度の良さと、信頼性の高さを示しているものと考えている。

次に、今回のシーケンスによって新たに同定された「領野特異的」遺伝子群の特徴について述べる。ここで言う「領野特異的」遺伝子とは、5 個体の比較で、5 領野間で統計的に有意に何らかの発現レベルに差があった遺伝子のことであり、領野差が少ないものも含んでいる。我々の条件では、404 個の遺伝子が「領野特異的」と判定された。これらの遺伝子群の発現パターンの特徴を抽出するために、5 個体×5 領野の 25 サンプルについて、主成分分析（PCA）を行い、第一、第二主成分に対して各サンプルをプロットしたところ、5 つの領野は、それぞれ特有な座標にクラスターした。この結果は、各領野においては固有の遺伝子発現パターンが存在することを意味している。このプロット上で、前頭連合野と側頭連合野は、非常に近い位置にクラスターしていた。つまり、連合野同士の遺伝子発現パターンは、よく似ている。一方、連合野と、視覚野は、第一主成分に関して、ほぼ反対の位置に分離した。この結果は、我々が発見した視覚野–連合野の軸の重要性を裏付けている（上述参照）。第 2 主成分の軸で最も離れていたのは、連合野と運動野である。サルの運動野は、顆粒細胞層（4 層）がなく、Betz 細胞と呼ばれる巨大な 5 層の錐体細胞があるなど、特徴的な細胞構築をしているので、遺伝子発現においても特殊化しているものと考えられる。

2012 年度は、胎児及び新生児の大脳皮質における遺伝子発現プロファイルを調べた。HiSeq による 101bp のペアーエンドシーケンスを計 34 サンプルに対して行い、その結果、41±9M の平均リード数を得た。また、解析対象となった 28,509 遺伝子のうち、20,588 遺伝子に対して何らかのリードがマップされた。霊長類の発達段階のサンプルは、入手困難であるが、今回の解析ではそれぞれ 4 頭ずつ解析を行うことが可能となった。しかし、胎児サンプルの場合は領野の正確な同定をすることが難しく、大まかな場所分けに留まったため、サンプル間のばらつきが大きい傾向にあったが、これが生物学的なばらつきなのか、サンプリングバイアスなのかは今後慎重に検討していく必要がある。得られた 34 サンプルについて、主成分分析（PCA）を行い、第一、第二主成分に対して各サンプルをプロットしたところ、胎児由来サンプル、新生児由来サンプルとも領野でそれぞれ特有の座標にクラスターをつくり、両者間には大きな違いがあることが明らかになった。また、2011 年度に解析を行った成体のミドリザル 5 領野もあわせて解析した結果、種がより遠いにもかかわらず、マカクザル（アカゲザル、ブタオザル）新生児由来サンプルとミドリザルのアダルト由来サンプルの方が、マカクザル（カニクイザル）胎児よりも、より発現パターンが似ていることを明らかにした。このことは、個体として産まれた瞬間から胎児と比較して脳内遺伝子発現パターンが劇的に変化することを示している。これは、一部のヒトの先行研究で示唆されている結果と合致するものであった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

エクソーム解析とトランスクリプトーム解析と分けて支援によって得られた研究成果を記す。

①エクソーム解析

ナショナルバイオリソースが中心となって供給されるマカクザルに関して個体ごとの遺伝的バックグラウンドが明らかになることにより、脳科学研究をはじめとした医学・生物学的な研究の加速化が進むと考えられる。実際に、ゲノム支援によるサポートを受けた後も、より解析個体数を増やし（現在のところ 700 頭あまり）、主に精神・神経疾患関連遺伝子群を対象に、遺伝子機能異常変異個体の同定を行っている。現時点で、多くの遺伝子において遺伝子機能異常変異をキャリア（ヘテロ）として保有している個体が同定されており、それらの交配による自然発症霊長類モデルの開発へと研究を展開している。

②トランスクリプトーム解析

胎児、新生児、成体の発達段階における大脳新皮質領野における脳内遺伝子発現解析を行った。主成分分析を行うことで、遺伝子発現のマクロな領野差構造を明らかにしたが、RNA-sequencing は、遺伝子スクリーニングにおいても、効力を発揮した。例えば、視覚野特異的、あるいは連合野特異的な発現タイプに属する遺伝子で、これまで我々が同定して来た遺伝子と同等の発現差を持つ遺伝子が多数見つかった。また、側頭連合野で多く、前頭連合野では少ないパターンの遺伝子や、運動野で少ない遺伝子など、これまで見つかっていないパターンの遺伝子の同定にも成功している。大きな領野差を示す遺伝子は比較的少数だという、これまでの知見に変わりはないが、より包括的なスクリーニングができたことは間違いなく、「大脳皮質領野とは何か？」という根本的な問いを解明する重要な手がかりが得られた。

＜支援成果公表リスト＞

公募支援課題：2011 年度

軸索輸送における足場タンパク質ＪＳＡＰの役割とその分子メカニズム

基盤研究（C）

善岡 克次・金沢大学がん進展制御研究所

＜背景・目的＞

軸索輸送は神経細胞の成長と生存に不可欠であり、その障害は神経細胞死や神経変性疾患の直接の原因となる。しかし、軸索輸送制御とその破綻による神経変性機序について、分子レベルでの十分な理解には至っていない。一方で、研究代表者は、哺乳類 JNK 情報伝達経路の新規足場タンパク質（JSAP1 と命名）を発見後、足場タンパク質に焦点を当てた研究を展開してきた。これまでに、発達期小脳における JSAP1-JNK 経路の重要性を見出し、また JSAP1 欠損マウスは生直後に死亡するが、JSAP2（別名 JLP）欠損マウスは正常に生まれ、成長することなどを明らかにした。その後、JSAP はキネシン-1 結合タンパク質として再発見され、キネシン-1 モーターと積み荷を連結するアダプター分子としても機能するのではないかと考えられようになった。

最近、研究代表者らは、小脳プルキンエ細胞および背側終脳に注目した解析を行い、以下の興味深い予備的知見を得た。（イ）小脳プルキンエ細胞特異的 JSAP1,2 二重欠損マウスにおいて、プルキンエ細胞の軸索膨化及び脱落が認められる。（ロ）プルキンエ細胞の軸索膨化部に活性型 JNK およびキネシン-1 の積み荷（アミロイド前駆体タンパク質、ミトコンドリア）が選択的に蓄積する。（ハ）背側終脳特異的 JSAP1,2 二重欠損マウスの脳室が拡大する。（ニ）背側終脳特異的 JSAP1,2 二重欠損マウスの大脳皮質でグリオーシスが起こる。さらに、JSAP 欠失によって、キネシン-1 の微小管結合能が低下し、軸索変性・神経細胞死が生じるとの予備的知見を得た。このようなことから、JSAP はアダプター機能に加えて、別の機能を持っているのではないかと考えるようになった。すなわち、JSAP はキネシン-1 の微小管結合能を制御する新規制御因子であり、キネシン-1 の多様な積み荷の軸索輸送制御を通じて神経細胞の生存維持に寄与するという考えである。

上記のアイディア及び学術的背景を踏まえて、本研究では、JSAP による軸索輸送制御とその破綻がもたらす神経変性の分子機構解明を目的とする。

＜支援の内容＞

以下の２種類のサンプルについて、次世代シーケンサーによる mRNA の網羅的解析の支援を受けた。１）コントロール及び小脳プルキンエ細胞特異的 JSAP1,2 二重欠損マウス：生後 3 週齢、4 週齢、8 週齢、12 週齢、および 16 週齢マウスの小脳から調製した RNA サンプル。２）コントロール及び背側終脳特異的 JSAP1,2 二重欠損マウス：生後 0 日齢、3 日齢、7 日齢、および 14 日齢マウスの大脳皮質・海馬から調製した RNA サンプル。

＜支援によって得られた研究成果＞

上述の通り、JSAP 遺伝子改変マウスの組織学的解析から、JSAP は軸索輸送の制御因子であり、その破綻は神経細胞脱落を引き起こすことが示唆された。しかし、その詳細は不明であった。ところが「ゲノム支援」によって極めて有用な情報が得られ、次のようなことが推測された。１）神経細胞脱落に先立ってアストロサイト（グリア細胞の１つ）が活性化され、オリゴデンドロサイト（グリア細胞の１つ）は神経細胞脱落とほぼ同じ時期から減少し始める。２）神経細胞脱落開始後，数日から１週間程度遅れてミクログリアが顕著に増殖する。以上ことから、JSAP 機能喪失によって、先ず軸索変性が起こり、その後神経細胞死が誘導されると考えられる。

そこで、JSAP1,2 二重欠損が誘導可能な海馬由来神経細胞の初代培養系を構築し、分子細胞生物学的手法・免疫染色法などを用いて詳細に解析した。また、野生型および変異型（キネシン-1 重鎖あるいは軽鎖との結合能を欠く）JSAP によるレスキュー実験を行った。その結果、JSAP はキネシン-1 依存性軸索輸送の制御因子として機能することが明らかになった。また、JSAP 機能喪失は JNK とカルパインの活性を亢進させ、それらが協調的に働くことによって軸索が変性し、引き続き神経細胞死が起こることを見出した。さらに、その神経細胞死は JNK の逆行性軸索輸送に依存することを示した。以上の研究成果は、Cell Death and Differentiation 誌に発表した(Sato et al., 22:1260-1274, 2015)。また、小脳プルキンエ細胞特異的 JSAP1,2 二重欠損マウスの解析を行い、JSAP 機能喪失に起因するプルキンエ細胞の軸索変性と脱落は、上述と同様の機序によって起こることを強く示唆する結果を得た。さらに、その軸索変性・神経細胞死に対して、オートファジーが抑制的に働くことを見出した。これらの研究成果は、FEBS Letters 誌に発表した（Sato et al., 589:2805-2811, 2015)。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

本支援によって得られたシーケンスデータの情報学的解析を行い、背側終脳特異的 JSAP1,2 二重欠損マウスでは、コレステロール生合成に関わる遺伝子群が有意に発現上昇することを見出した。実際、当該 JSAP 欠損マウスの大脳皮質や海馬において、総コレステロール量が増加するという予備的な知見が得られている。近年、脳内のコレステロールの増加はアルツハイマー病をはじめとする多くの神経変性疾患と関連することが知られているが、その分子機構については、ほとんど分かっていないのが現状である。本支援によって、脂質代謝異常と神経変性疾患を繋ぐ鍵分子として JSAP が見出され、神経変性研究における新たな展開が可能となった。

＜支援成果公表リスト＞

なし

公募支援課題：2012～2013 年度

プロテオロドプシンを通して海洋生態系に流れ込む太陽光エネルギーの定量化

若手研究（A）

吉澤 晋・東京大学大気海洋研究所

＜背景・目的＞

本支援では、近年明らかとなった“太陽光エネルギーを地球生態系へ結ぶ新しいパスウェイ”であるプロテオロドプシン（PR）をゲノム上に持つ海洋細菌のゲノム解析を行った。PR はレチナールを発色団として持つ光受容タンパク質で、光エネルギーを受け取ると細胞内から H^+を輸送しプロトン駆動力を生成するいわば“光駆動型 H^+ポンプ”である。また PR 遺伝子は大雑把に言えば、海洋原核生物を対象としたメタゲノム解析で最も数多く検出され、メタゲノム解析が明らかにした最も重要な機能遺伝子の１つであると認識されている。しかしながら、PR 遺伝子を持つ細菌は極めて難培養性であり、PR 遺伝子が発見されて１０年以上が経過しているにも関わらず分離の報告はわずか１０株程度しかない。PR 遺伝子がプロテオバクテリア門、バクテロイデテス門、ユリアーキオータ門（古細菌）に幅広く存在する事および海洋表層に存在する原核生物の約半数が PR 遺伝子を持つ事を考慮すると、PR 遺伝子を持つ原核生物ゲノム情報はほとんど分かっていないと言える。

我々のグループではこれまでの研究で数十株におよぶ PR 遺伝子保持細菌の分離培養に成功しており、世界一のストック数を誇っている。本研究では、保有する PR 遺伝子保持細菌のゲノム構造を複数株で明らかにすることで、PR の発現制御機構、PR の多様化メカニズムや細菌型ロドプシンの多様性に関する幅広い理解を目指した。

＜支援の内容＞

大規模ゲノム情報生産支援：
プロテオロドプシン遺伝子保有海洋細菌のゲノム解析（7 株）。
各株に対して、GS FLX+(1/4 プレート)および MiSeq のペアエンドリード（2012 年度実施）のシーケンス支援およびフィニッシング（2013 年度実施）支援を受けた（エンドポイントは 1 scaffold）。

＜支援によって得られた研究成果＞

本支援でゲノムシーケンスを実施した海洋細菌分離株から、３つのロドプシン遺伝子を持つ株（*Nonlabens marinus* S1-08 株）が見つかった。大腸菌による異種発現ロドプシンタンパク質を用いた機能解析の結果、各ロドプシンは機能が異なり、光で細胞内から細胞外に H^+を輸送するロドプシン、光で細胞内から細胞外に Na^+を輸送するロドプシン、光で細胞外から細胞内に Cl^-を輸送するロドプシンであることが分かった。Na^+ポンプ型ロドプシンは海洋細菌から２例目の報告、Cl^-ポンプ型ロドプシンは本研究で初めて海洋細菌から見つかったロドプシンであり、ClR と命名した。また、機能の異なる３つのポンプ型ロドプシンを同一ゲノム上に持つ株が見つかったのも世界で初めてである。本研究成果は海洋細菌が海洋中に最も豊富に存在する Na^+や Cl^-イオンを利用して太陽光からエネルギーを受け取ることを示しており、海洋細菌の光エネルギー利用機構がこれまで考えられていた以上に多様であることが明らかになった。

また本研究で見つかった Cl^-輸送型ロドプシン（ClR）とこれまでに好塩古細菌でその存在が知られている Cl^-輸送型ロドプシン（ハロロドプシン）の分子系統解析の結果、ClR はハロロドプシンとは異なるクレードを形成することが分かった。この結果は、ClR がハロロドプシンとは独立に海洋環境で開発された可能性を示しており、ロドプシン機能の多様化に関する大きな知見となった。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

海洋有光層に生息する細菌の半数以上が PR 遺伝子を持つことから、PR による光エネルギー利用は有光層への適応に重大な寄与をしていると考えられている。また PR による H^+輸送は海洋細菌の様々な生理反応と関わることが示唆されていたが、ゲノム情報の不足から PR 遺伝子保持細菌に偏って存在する遺伝子の検出などの解析は困難であった。本研究では支援によって得られたゲノム情報およびデータベース上に登録された海洋細菌ゲノム情報を用いて、大規模比較ゲノム解析を行った。その結果、PR を持つ株に偏って分布する遺伝子を複数検出することに成功した。その一つは機能未知遺伝子(DUF2237)であったため、PR の生理機能と直接関係するかどうかは今のところ不明であるが、DUF2237 がシアノバクテリアや好気性光合成細菌等にも分布しており、光利用と関係する機能を持つことが予想された。本支援を受けたことで、PR 遺伝子保持細菌の有光層適応にとって重要な遺伝子が存在する可能性が高いという新たな展望が開けた。

＜支援成果公表リスト＞

Yoshizawa, S. et al., PNAS 111(18), 6732-6737 (2014)

公募支援課題：2013 年度

ハマウツボ科寄生植物の寄生形質獲得と適応進化

新学術領域研究

吉田 聡子・理化学研究所環境資源科学研究センター

＜背景・目的＞

ハマウツボ科寄生植物は、吸器と呼ばれる宿主への侵入器官を発達させ、宿主から栄養を奪って生育する特殊な生存戦略を獲得している。ハマウツボ科には条件的寄生植物と絶対寄生植物があり、その進化の過程で種子サイズや光合成能の退化などの複数形質の適応進化が生じている。本研究では、条件的寄生植物コシオガマにおける寄生過程で特異的発現を示す遺伝子の機能解析により寄生の鍵遺伝子を同定する。また、コシオガマの全ゲノムを解読し、コシオガマおよび絶対寄生植物ストライガの比較ゲノム解析により寄生形質の複合適応形質進化の過程を解明することを目的とする。

＜支援の内容＞

- 寄生植物コシオガマのゲノムシーケンス
- ロングメイトペアライブラリーの作成とシーケンス
- また遺伝子地図作製のための ddRADSeq 解析の支援

＜支援によって得られた研究成果＞

ハマウツボ科条件的寄生植物コシオガマはゲノムサイズ約 1.4 Gb の自家受粉植物で、世代時間が比較的短い、形質転換法が確立している、など研究材料として有利な性質を持ち合わせている。宿主無しでも生育できる条件的寄生植物は、多大な農業被害をもたらす絶対寄生植物であるストライガやオロバンキよりも進化的に早く生じたと考えられている。コシオガマを用いて寄生形質の獲得について解析することで、寄生転換の鍵となる吸器形成に機能する遺伝子の進化について知ることが出来る。しかし、現時点でコシオガマについて知られている遺伝子情報は非常に少なく、申請者らの研究チームがおこなったトランスクリプトーム解析にとどまる。そのため、ターゲット遺伝子を同定しても、そのコピー数の解明やプロモータの単離などに多くの労力を必要とする状況にあった。ゲノム支援により、コシオガマ野生株ゲノムのペアエンドライブラリー作成およびシーケンス、10-18 kb ロングメイトペアライブラリーの作成およびシーケンスを得、これらのシーケンスをもとに、AllPaths-LG ソフトウェアを用いてアセンブリをおこなった。その結果 N50 Scaffold が 1 Mb 以上の比較的良いアセンブルを得ることが出来た。このゲノムシーケンスをもとにしてコシオガマで寄生に特異的に発現する遺伝子や既に知られているマーカー遺伝子のホモログ、またそのプロモータ領域の単離が非常に簡易にできるようになった。その結果、オーキシン合成酵素が吸器の先端部で特異的に発現することを見いだし、寄生の鍵遺伝子の単離に成功した。また、ストライガとの比較ゲノム解析により、発芽誘導物質であるストリゴラクトン受容体遺伝子がゲノム中で重複していることを見いだした。この傾向はハマウツボ科全体で見られることが明らかとなり、寄生植物が遺伝子重複によって特異的なストリゴラクトン受容のシステムを獲得したことを明らかにした。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

コシオガマのゲノムアセンブリができたことにより、寄生植物における遺伝子の機能解析が容易になった。遺伝子地図とあわせ、比較ゲノム解析が可能になった。

＜支援成果公表リスト＞

1. 吉田聡子ら(2014) *植物の生長調節* 49, 66-73.
2. Conn et al. (2015) *Science* 349, 540-543.
3. Ichihashi et al. (2015) *Brief. Func. Gen.*, 14, 275-282.

公募支援課題：2015 年度

寄生生高等植物における寄生の分子メカニズム解明

若手研究（A）

吉田 聡子・理化学研究所環境資源科学研究センター

＜背景・目的＞

ハマウツボ科根寄生植物であるストライガやオロバンキは主要な穀物や野菜に寄生し、アフリカ地域を中心に甚大な農業被害をもたらしている。しかし、植物寄生のメカニズムはまだほとんど解明されておらず、その根本的な防除法は確立していない。本研究は、遺伝学的アプローチを用いて寄生植物の寄生の分子メカニズムの包括的理解を目指す。特に、ハマウツボ科条件的寄生植物コシオガマの変異体を用いた寄生成立に必要な遺伝子の機能解析と原因遺伝子同定を目的とする。植物寄生の分子機構を解明することは、植物間相互作用の新たな機構を明らかにするだけでなく、将来的には新しい病害寄生雑草の防除法の開発につながると考えている。

＜支援の内容＞

- 寄生植物コシオガマ野生株のロングメイトペアシーケンスライブラリー作成およびシーケンス解析
- コシオガマ変異体の F2 集団のゲノムシーケンス
- コシオガマ変異体ホモラインのゲノムシーケンス

＜支援によって得られた研究成果＞

ある表現型をコントロールする鍵遺伝子の発見には順遺伝学的なアプローチによる変異体の単離屠蘇の原因遺伝子の同定が有効な方法である。しかし、この順遺伝学的方法は、これまではモデル生物に市か用いられてこなかった。ゲノムシーケンスやマッピングマーカーが整備されていない生物種においては、仮に変異体があったとしても、その原因遺伝子の同定は困難なものであった。しかし、次世代シーケンサーの登場により、非モデル生物でもゲノムシーケンスが比較的容易にできるようになり、順遺伝学的なアプローチへの道が拓けてきた。本研究ではゲノム支援をうけて、コシオガマ野生型ゲノムの更なる整備と、変異体のシーケンスによる原因遺伝子の同定を試みた。新たなメイトペアライブラリの追加により、ゲノム精度が向上した。さらに、変異体の F2 集団をプールし、約 20-30 倍程度のカバレージのゲノムシーケンスを illumina シーケンサーで読み、野生型ゲノム上にマップすることにより SNPs の情報を得た。変異体同士の SNPs を比較することにより、非特異的な SNPs を除いて特異的な SNPs を抽出し、さらにアミノ酸配列に影響を及ぼすかどうかを確認することにより、原因遺伝子の推定を試みた。これまでに、3 ラインの変異体シーケンスを終え、いずれも数個の候補遺伝子に絞り込むことに成功した。さらに、優勢変異株について、戻り交配をしないホモ集団をシーケンスすることにより、原因遺伝子の推定を試みた。この場合は数十個の候補遺伝子が得られたが、機能的な予測から遺伝子候補を絞ることに成功した。これにより、非モデル植物である条件的寄生植物コシオガマの変異体からの原因遺伝子同定が可能であることを示すことが出来た。寄生植物の吸器形成における重要遺伝子の単離につながることが期待される。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

寄生植物の変異体からの原因遺伝子同定に成功したことにより、寄生の鍵遺伝子、吸器誘導物質への応答、吸器の形態形成に関わる遺伝子の単離ができるようになった。寄生に関わる遺伝子の単離・解析により、病害雑草である絶対寄生植物防除法の応用が期待される。また、非モデル植物での順遺伝学的アプローチが可能であることを証明したことにより、他の植物種についても応用できると考えられる。

＜支援成果公表リスト＞

Cui et al. (2016) *Plant Physiol.* In press

公募支援課題：2012 年度

ソングバードを用いた時空間制御を与える遺伝子発現系の開発と行動実験への応用

新学術領域研究

和多 和宏・北海道大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

音声発声学習の臨界期制御に関わる遺伝子群を明らかにし、その脳内機能を実験的に検証することを目的とした。そのために発声学習の動物モデルとして鳴禽類ソングバードを用いた。ヒト言語獲得も鳴禽類の発声学習も感覚運動学習を根幹とする。自ら声を出し、これを繰り返すことで記憶した音声パターンに合致する発声ができるようになる。この音声発声学習には、その学習のために最も適した時期、学習臨界期が存在する。

これまでに、音声発声学習において「声を出す」という自発的行動が、脳内分子レベルにおいても重要な意味をもつと考え、ソングバードの発声行動により発現誘導される遺伝子群の同定を試みてきた。その結果、多段階発現制御（“発声行動依存性”、“神経回路特異性”、“学習臨界期間限定性”）を受ける遺伝子群が存在することを明らかにした。これら遺伝子群の発達段階・環境に即した時空間制御こそが行動出力に付随した神経回路の生理的特性を与える物質的基盤ではないかと考え、現在研究を進めている。神経科学分野において、『臨界期を備える感覚運動学習』の理解は、分子・行動レベルでもこれまでには十分に進んでいない。この点も含め、「自発的行動に依存する学習」の神経科学的研究を推進していくことを目指している。

＜支援の内容＞

鳴禽類ソングバード zebra finch（*Taeniopygia guttata*)を用いて、発声行動依存性・脳部位特異性（歌神経核 RA）、かつ学習臨界期間限定性を兼ね備えた多段階発現制御を受ける遺伝子群を RNA-seq によって同定することを目指した。そのために当研究室でソングバード脳内の歌神経核をレーザーマイクロダイセクション法によって選択的にサンプリングし、微量 RNA を抽出した 4 サンプル分をもとに cDNA 増幅及びライブラリー化、Hiseq2000 により 100bp pair-end RNA-seq を本研究支援により施行した。

＜支援によって得られた研究成果＞

支援によって得られた研究結果としては、歌神経核 RA において、これまでに我々の研究室ですでに同定をした、発声行動依存性・脳部位特異性・学習臨界期間限定性を兼ね備えた遺伝子のほかに、530 に上る遺伝子群が脳内で同様の多段階発現制御を受けていることを明らかにすることができた。これはこれまでの DNA マイクロアレイ解析から想定していた数よりも多く、その後の脳サンプルを用いての in-situ hybridization 法による発現量の検証実験でも定性・定量的の両面で信頼性の高い膨大なデータを取得することができた。

また、微小脳領域からの抽出した微量 RNA を用いた RNA-seq による実験方法に関して、重要な知見が得られた。微量 RNA を用いた RNA-seq において、そのサンプルの増幅が重要になる。しかし、脳組織から抽出した RNA サンプルにはミトンドリア由来のものが多く含有されているために、cDNA 増幅ステップで使用する試薬・キット類によって、その増幅バイアスが大きく異なることが明らかになった。そのバイアスを低減する解決策として、2013 年に報告された Quartz-seq 法の導入により非常に安定に、また安価に微量 RNA サンプルを増幅し、次世代シークエンス解析が施行できる実験手法を確立することができた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

発声学習臨界期中と後で、脳内の発声運動制御に関わる神経核でどのような分子群が発達時期特異的に、また発声行動依存的に発現制御を受けているのか、ゲノムワイドにその全貌を理解する手がかりを得られたと考えている。今回の実験で同定されてきた遺伝子群にはこれまでの哺乳類を含めた研究では神経活動依存的な最初期遺伝子(IEG)として全く報告がない遺伝子が多く含まれており、発達時期特異的な発現制御ゆえ見落とされてきたのか、それともソングバードにおける発声学習行動ゆえに特異的な制御をうけているのか、さらなる解析が必要である。

今回、ゲノムワイドに同定した“発声行動依存性”、“神経回路特異性”、“学習臨界期間限定性”を兼ね備えた多段階発現制御の分子実態としてエピジェネティクス制御との関わりを検証すべく現在新たな実験を施行している。

＜支援成果公表リスト＞

Mori C. and Wada K., Journal of Neuroscience 35, 878-889 (2015)

公募支援課題：2013 年度

Allelic imbalance による行動表現型のゲノム拘束性と可塑性の検証

挑戦的萌芽研究

和多 和宏・北海道大学大学院理学研究院

＜背景・目的＞

本研究では、『遺伝要因』を父・母由来別のゲノム情報として分別し、生育過程における『環境要因』を介して、脳内遺伝子発現が、いかに学習行動において脳部位特異的表象されているかを明らかにすることを目的とした。

種特異的な囀りパターンを学習によって獲得する鳴禽類ソングバードの異種間ハイブリッド個体を用い、音声発声学習過程における発声行動表現型(音声発達変化・学習戦略・固定化した発声パターン)の解析を行った。これと同時に発声学習・生成のために特化した脳内ソングシステムに発現している遺伝子群を種特異的一塩基多型 (SNP)を利用し、父母アレルのどちらに由来するか定量することを目指した。これにより、行動パターンの獲得に「父方」と「母方」由来の遺伝要因の読み出しの『質』(父母アレルからの発現比)と『量』(アレル発現総量)が脳部位特異的にいかに制御されているのか明らかにしようとしている。

＜支援の内容＞

今回の支援内容では、音声発声学習・生成のために機能特化した神経回路ソングシステムにおいて発現制御をうける遺伝子群を RNA-seq によって網羅的にかつ、定量的に同定することを目指した。

これまでに種特異的な囀りパターンを学習によって獲得する鳴禽類ソングバード 2 種とその異種間交配によって作出されるハイブリッド個体を用い、発声学習環境をコントロールした上で、表出される発声行動表現型(音声発達変化・学習戦略・固定化した発声パターン等)の解析を施行してきた。その後、発声学習・生成に重要な神経核である HVC, RA 部位においてレーザー・マイクロダイセクション法によりサンプリングした微小脳部位からの RNA 抽出・増幅を行った。その後、以下の 2 点の支援をいただいた。

I) 脳内発現遺伝子群の種特異的 SNPs の抽出のため、親種 2 種各 5 個体分の全脳 RNA を個体別にアダプターを付加し、Hiseq2500、1 レーン分(計 2 レーン)の 100bp pair-end RNA-seq を実施した。その結果、個体あたり平均リード数で 71,680,526 reads の情報を得ることができた。

II) 脳部位特異的遺伝子発現情報を得るため、親種 2 種と雄・雌ペアを入れ替えた 2 タイプのハイブリッド個体(各 4 個体分)より脳をサンプリングした。発声学習・生成に重要な神経核である HVC、RA 部位から得た RNA を抽出・Quartz-amplify 法により増幅したサンプルを、個体別にアダプターを付加し、神経核 HVC、RA でそれぞれ 1 レーン分(計 2 レーン)の RNA-seq を実施した。その結果、各個体の脳部位ごとに平均リード数：102,012,395 reads の情報を得ることができた。

＜支援によって得られた研究成果＞

支援によって得られた RNA-seq 情報を用い、瀬々潤博士（産総研）との共同研究によって以下のシークエンス解析が進んでいる。

1) 発声運動制御脳部位における種特異的な遺伝子発現制御を受ける遺伝子群の探索。神経核 HVC, RA において、今回の研究で用いているハイブリッド個体の親種 2 種間で、種特異的な遺伝子発現を示す遺伝子群を探索し、その結果、統計的有意差を示す遺伝子群を抽出できた。現在、実際の脳内での発現量の違いを検証するために in-situ hybridization を実施している。また、ハイブリッド個体の脳内神経核においてもその発現量に親種の発現量の中間型になるのか、どちらかにバイアスがかかった発現を示すのか、現在検証中である。今後さらに、ハイブリッド個体が獲得した発声行動表現型と相関を示す種特異的遺伝子群の探索を進める予定にしている。

2) 種特異的発現制御を受ける遺伝子群のハイブリッド個体における Allelic imbalance 比率解析。この解析のために、脳内発現遺伝子群の種特異的 SNPs の同定を施行した。親種 2 種（5 個体分）の全脳 mRNA の RNA-seq 情報と、現在公開されている zebra finch genome 情報から、当研究室で使用しているソングバード 2 種の種特異的 SNP 情報を反映した pseudo genome 配列を新たに構築することができた。現在、共同研究を実施させていただいている瀬々研究室で開発された Homeoroq 解析によってハイブリッド各個体の HVC・RA 脳領域における Allelic imbalance 比率を解析中である。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

動物行動の学習・生成の基本原理の解明には、複雑に見える行動表現型を行動素過程に分解し、その行動エレメント表出を支える責任部位・特定神経回路にまで対応させることが必須である。鳴禽類ソングバードは世界中に 3,500 種以上が存在し、種特異的な発声パターンを学習・生成している。しかし、その学習・生成の制御に関わる神経回路（ソングシステム）はすべての種で保存されている。しかし、そこから生成される発声パターンは種特異性(時系列構造、発声持続時間、音素数等)をもつ。つまり、同じようにワイアーリングしている神経回路から種特異的な発声行動として異なるアウトプットをする。しかし、どのような神経分子基盤のもとに、種特異的な神経回路の性質・種特異的行動パターンが表出されるのか、これまで十分に理解されてこなかった。今回のゲノム支援から得たシークエンス情報を現在解析中ではあるが、交雑種ハイブリッド個体を作り得る近縁種ソングバード 2 種間で、どのような分子機能をもつどれくらいの数の遺伝子群が、脳部位ごとに種特異的に発現制御を受けているのか、その大まかな情報が得られた。これは、種特異的行動の進

化を考えていく上で大きな示唆を与えるものである
と考えている。

＜支援成果公表リスト＞
　現在、論文執筆中

公募支援課題：2013～2014 年度

結核菌臨床分離株における宿主定着・適応因子の究明と遺伝子型別技術の補完

若手研究（A）

和田 崇之・長崎大学熱帯医学研究所

＜背景・目的＞

日本国内で患者から分離される結核菌は，全体の約 80%が単一の系統群（北京型結核菌）に属し，内部分岐的には近接した小系統群によって構成されている．これらの進化学的連続性は、本菌のヒト集団内での拡散と適応，定着にアプローチする上で世界的にも類例のない集団構造を呈しており，その進化適応モデルとして重要である．中でも STK 群，ST3 群と名付けられた系統株は世界的には稀であるが，国内では逆に分離頻度が高く，何らかの遺伝的要因の存在が示唆されている．本研究ではこうした特異性に着目し，以下の２点を明らかにすることを目的としてゲノム支援を依頼した．(1) 全国各地由来の STK 株，ST3 株の系統関係から，これらの国内での拡散経緯を推定すること．また，遺伝多型解析に基づく伝搬経路解明に資する遺伝的特異性を見出すこと．(2) 進化上連続性のある国内結核菌株を選抜してゲノム完全長配列を決定し，それらのゲノム構造変化と宿主適応に関わる重複遺伝子群の多様性分析から、その進化戦略に関する遺伝要因を究明すること．

＜支援の内容＞

(1) の目的のため，国内 4 地域（東北，関東，九州，沖縄）由来の STK 群，ST3 群結核菌（計 30 株）からゲノム DNA を抽出し，Illumina ショートリードの配列データ獲得を依頼した．(2) の目的のため，北京型結核菌の系統分岐を網羅するように選択した菌株について，Illumina メイトペアショートリード（計 23 株）および PacBioRSII（計 12 株）ロングリードの配列データ獲得を依頼した．

＜支援によって得られた研究成果＞

(1) 複数地域由来の臨床分離株における変異解析および分子系統樹から，STK 群，ST3 群はともに分離地域に関係なく分岐時期がそれぞれ集中しており，いずれも短期間のうちに流行拡散し，その後国内固有群として広く定着した経緯が示唆された．各地域間に系統的な偏りは無く，国内の結核菌株は全国的に均質な集団構造となっていることが判明した．

(2) STK/ST3 各系統群は，ゲノム比較に基づく分子系統樹によってより詳細な亜群構成を認め，内部分類可能であった．現在国内の結核公衆衛生において利用される遺伝型別（反復配列多型（VNTR）解析）と比較すると，こうした内部系統分岐の違いに関わらず同一の VNTR 型を呈する菌株が ST3 群において多数存在することが示され，同群における VNTR 型別が菌株の異同を正しく反映しない可能性が示唆された．一方，STK 群ではそうした不一致は見いだされず，VNTR 型別による異同判定の信頼性は高いと考えられた．

(3) 国内の系統上代表的な菌株の完全長ゲノム配列について，PacBio RSII 解析対象とした 12 株すべてにおいて約 4.4Mb の環状コンティグ（各株につき 1 本）を得た．自動アノテーションによってそれぞれ約 4,050 遺伝子が予測され，その 90%を超える予測遺伝子において，標準菌株 H37Rv（総遺伝子数 4,018）との BLAST 双方向ベストヒットとしてオーソログ関係が推定された．また，本データから国内分離株は H37Rv ときわめて相同性が高いゲノム構造を持ち，組み換えによる構造変異は低頻度であることが確認された．一方，そうした構造変異が認められる領域は，相同遺伝子群である PE/PPE 遺伝子および *esx* 遺伝子の近傍に多く認められ，これらの遺伝子が重複や転座によって多様度を高めている可能性が示唆された．

＜支援によって開かれた新たな展望＞

(1) ST3/STK 株の地理系統的均質性について

結核の発症は数十年にわたる長期潜伏を伴うことが多いため，日本全体の結核菌が地理遺伝学的に均質である理由としては，国内固有群（STK/ST3）の分岐年代が非常に古いか，国内全域規模の流行が過去において発生し，それが現代の固有性を形成した可能性が挙げられる．これらの原因究明には，ゲノム比較によって見いだされた変異データに基づく集団遺伝学的解析が必要であるが，今後のデータ蓄積や過去の保存分離株を対象としたゲノム解析によって正確に決定づけられることが期待される．

(2) 遺伝多型解析における分析精度について

臨床分離株の遺伝多型解析は結核の感染源追及に役立てられており，結核対策上で重要な情報を提供する．系統的な差異が患者年齢層や薬剤耐性化の頻度と相関することは先行研究によって知られており，本研究成果ではそれに加えて伝播経路推定における指針として有用であることが示された．本課題代表者は，結核菌解析において汎用的な遺伝型（VNTR）から系統群を高精度に推定する手法を開発しており（Seto J, Wada T, et al., Infect Genet Evol, 2015），本成果と合わせて日本国内の結核分子疫学の向上に寄与しうるものとなっている．

(3) 国内北京型結核菌の完全長ゲノム配列決定

北京型結核菌は他系統より病原性が高いと考えられているが，その遺伝学的根拠は不明である．国内株は同系統における分子進化の痕跡を強く残しており，結核菌の進化適応戦略の解明において基礎情報として完全長ゲノムデータが大きな意味を持つことが期待できる．

＜支援成果公表リスト＞

支援の成果を公表した雑誌論文のリストを簡略型（筆頭著者，雑誌名，巻，発行年，最初と最後の頁）で記載

該当なし（執筆中）

公募支援課題：2013 年度

難治性不整脈症候群の不整脈基盤に関与する新たな遺伝的背景の解明と個別化治療の確立

基盤研究（C）

渡部 裕・新潟大学医歯学総合病院

＜背景・目的＞

特発性不整脈症候群は QT 延長症候群や特発性心室細動といった頻脈性不整脈を来たすものと、洞不全症候群や房室ブロックといった徐脈性不整脈に分けられ、いずれも突然死を来たしうる。 様々な不整脈症候群において原因遺伝子が明らかになっており、大部分はイオンチャネルやその修飾蛋白の遺伝子である。

突然死を来しうる特発性不整脈症候群は遺伝性疾患であることが広く知られているが、原因遺伝子は十分に解明されておらず、その機序は不明な部分が多い。 このため不整脈を来たすリスクの層別化に必要な知見は十分でなく、また不整脈発作を予防するための新たな治療法の開発も必要である。 本研究は、特発性不整脈症候群の臨床像並びに遺伝的背景と不整脈発生の機序の解明と、遺伝子型を考慮した新たな個別化治療（Tailar made therapy）の開発を目標とする。

＜支援の内容＞

大規模ゲノム再シーケンシング

Brugada 症候群や特発性心室細動、QT 延長症候群といった様々な不整脈に罹患した 40 症例を対象として、心臓に発現し電気生理活動への関与が示唆されている遺伝子約 400 種（約 3.0MB）を対象として、target sequence capture での再シーケンシングを行っていただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

今回の支援によって遺伝子解析を行った 40 症例の再シーケンシング結果と、。支援を受ける前に行った同様の再シーケンシングの結果を合わせて不整脈の新たな原因遺伝子の検索を行った。

若年性の重症型 QT 延長症候群やカテコラミン感受性多形性心室頻拍の原因遺伝子を同定した。この遺伝子変異による変異蛋白の機能解析を行うことにより、カルシウムイオンへの結合能に異常を生じることが不整脈発症の機序として推察された。さらに特発性心室細動の新しい原因遺伝子を同定し、現在培養細胞を用いた機能解析を行っている。また、たこつぼ型心筋症に伴う QT 延長症候群を来す新たな遺伝子変異も同定した。

また、本研究で行われた遺伝子解析の結果はすでに個々の症例に還元されており、原因遺伝子を考慮した薬物療法や生活指導といった不整脈発作予防が行われている。

現在はさらに症例を追加している。すなわち、様々な遺伝性不整脈に罹患した 96 症例を対象として、心臓に発現し電気生理活動への関与が示唆されている遺伝子約 500 種に対して、target sequence capture での再シーケンシングを行っている。

今後は、これら合計 170 余家系の複数症例に共通して変異が存在する遺伝子を検索し、不整脈症候群の新たな原因遺伝子の同定を目指す。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

遺伝性不整脈症候群の発症の原因となる新たな原因遺伝子を複数同定した。また、この遺伝子解析で同定した変異の情報を症例に還元し、遺伝子診断や不整脈発作予防、治療の選択といった臨床応用を行った。

今後はさらに症例を追加することにより、新たな遺伝性不整脈症候群の原因となる遺伝子が同定され、新たな機序が解明されることが期待される。

＜支援成果公表論文リスト＞

Makita N, Watanbe H, et al., Circ Cardiovasc Genet. 2014 Aug;7(4):466-74

公募支援課題：2014 年度

炎症性刺激によるクロマチン構造の動的制御メカニズムの解析

基盤研究（A）

和田 洋一郎・東京大学アイソトープ総合センター

＜背景・目的＞

共同研究者の藤井は、ゲノム機能の生化学的解析を行うための方法として遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法（遺伝子座特異的 ChIP 法）を開発した。遺伝子座特異的ChIP法は、insertional ChIP（iChIP）法と engineered DNA-binding molecule-mediated ChIP（enChIP）法とから構成される。CRISPR 系を用いた enChIP 法では、CRISPR 複合体が、標的ゲノム領域以外のゲノム領域に結合することによるオフターゲットサイトの混入が問題となっている。この問題を解決するため、異なる種由来の CRISPR 複合体に別々のタグを付加し、これらを用いて標的ゲノム領域のタンデム精製系（sequential enChIP 法）の開発を目指した。

また、遺伝子発現制御では転写のみならず RNA 分解制御も重要であるとの観点から、哺乳動物細胞の全RNAの分解速度を測定できるBRIC-seq法を用いたRNA 分解測定も合わせて実施した。このデータを元に、遺伝子発現制御における転写と RNA 分解とのそれぞれの寄与の程度を定量的に解析することを目指した。

＜支援の内容＞

*Interferon Regulatory Factor-1（IRF-1）*遺伝子座に対して、ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を用いて、FLAG タグ付きの *S. pyogenes* 由来 dCas9 と PA タグ付きの *S. thermophilus* 由来 dCas9 による enChIP を実施し、それぞれ単独とタンデム精製系との比較を行った。また、IFNγ 刺激の有無による相互作用ゲノム領域の異同について検討した。サンプル 12、インプット 12 の合計 24 サンプルについて、enChIP-Seq 解析を実施していただいた。

また、ヒト培養細胞の RNA 分解測定をゲノムワイドに測定した。さらに、RNA 結合タンパク質の PUM1 と PUM2 の RNA 分解制御における役割を検討した。本研究の実施にあたり、RNA-seq 解析を 60 サンプル解析していただいた。また、RAN-seq データの一次解析についても支援していただいた。

＜支援によって得られた研究成果＞

タンデム精製系を用いた enChIP-Seq 解析を実施し、IFNγ 刺激の有無による相互作用ゲノム領域の異同について検討した。その結果、そのどちらの条件下でも、*IRF-1* プロモーター領域と特異的に相互作用するゲノム領域を検出できなかった。この結果の解釈として、(1) HT1080 細胞では、この領域は他のゲノム領域と相互作用していない、(2) タンデム検出系では、２回の enChIP を行うため、特異性の向上と引き換えに収率が小さくなることから、感度の低下を招いている。といった可能性が考えられる。

転写制御に加えて、RNA 分解制御が遺伝子発現制御に与える影響の程度を whole transcriptome レベルで評価することが可能になった。特に、今回、RNA 結合タンパク質の重要性も合わせて解析することによって、RNA 分解制御の一端を解明できた。

＜支援によって開かれた新たな展望＞

今回の支援によって、sequential enChIP 法に関する基礎的な知見を得ることができた。この知見は、今後、sequential enChIP 法の収率の向上及び特異性の向上に向けた改良を進める上で重要である。今後は、タグの検討や、Cas9 orthologs の検討を進めて、系の最適化を進めて行く。

遺伝子発現レベルの規定において、転写と RNA 分解のそれぞれの寄与率を定量的に解析することを予定している。

＜支援成果公表リスト＞

投稿準備中

６．公募課題の支援依頼者から寄せられた活動評価アンケート
（謝辞及び活動継続希望だけのコメントは省略しています。）

1. 実験（技術）そのものを支援していただくことが研究費（税金）の最も効率的な使い方だと思います。たとえゲノム配列解読に必要な経費が獲得されても、実験と解析のノウハウがなければ、研究費の無駄遣いになりがちです。コスパ的に最高の仕組みである「ゲノム支援」に感謝です。このような支援プログラムがあるからこそ、小さな研究グループでも、質の高い研究への展開と効率的に研究推進が可能となります。支援活動による研究チームのマッチングにより、今後、多様な共同研究が生まれることを期待しています。また、支援成果のフォローは支援後 5 年まではしておいたほうがよろしいかと思われます。
2. 迅速に対応して頂きました。解析結果についての相談についてものっていただき、ご支援をいただけて本当によかったです。日本のバイオ関連研究の柱だと思いますので、支援活動は今後も継続していかれることを強く希望いたします。
3. 生命科学領域でメガデータの解析から得られる情報はますます重要な位置づけとなっている現状をふまえ、ゲノム支援の更なる拡大と、迅速な対応が可能な体制強化を強く望みます。
4. 良かった点；支援を依頼したときにすぐに対応していただき、他の共同研究に比べても格段に早く結果を出していただけた。また、シークエンスの解析についても支援研究室の技術補佐員の方が非常にご丁寧に解析方法を指南していただいた。
   悪かった点、改善すべき点；拡大班会議が、非常に大人数で、非常に多様な研究活動を、非常に短い時間で発表することになっており、発表側としてはあまり実りのない班会議となっているのではないか。できれば、支援を受けた側の発表はポスターだけとし、最近のゲノム関連での技術進展についての発表をメインにするとか、もう少し研究内容が近い課題だけを集めた小さい班会議をにするとか、という工夫があるとよいのではないかと思う。
5. 支援期間 1 年は短く、予備的なデータを得ることはできたが、最終的に期待していた成果を出すまでには至らなかった。
6. 折々のミーティングにご招待いただいたのですが、都合が合わず残念ながら参加できませんでした。ただ、ミーティングの題目がシークエンスの技術的な面を志向したものが多かったようにも感じられました。少し趣向を変え、支援の結果の活用例を支援された側が話すような、Biological な内容を表に出したものがあってもよかったかと思います。
7. 本研究では、RNA-seq のデータ取得にとどまらず、得られたデータを研究目的に特化してコンピュータ解析する技術を、試行錯誤しつつ新たに開発する必要があった。そのため、RNA-seq データ取得について支援いただいた「ゲノム支援」関係者各位に多

大な労力と時間の負担をおかけし、結果的には関係者各位の善意に依存するかたちで支援いただいた。データ解析に対する支援体制も併せて確立されるとよりよいと思う。

8. 情報解析支援スタッフのマンパワーが不足しているということは理解していますが、現在に至るまで「ゲノム支援」によるパイプラインは未構築で、今後の見通しも十分でないことを、とても残念に思っています。その一方で、担当の方から、「ゲノム支援」スタッフ外のバイオインフォマティクスを専門とする研究者を紹介していただき、自作パイプラインについて直接、アルゴリズムのチェックを受けることができました。期限付きのポスドクの身分としては、「ゲノム支援」によるパイプライン構築を待つのは半ば諦めて、自作パイプラインに基づいたメソッドを研究成果として取りまとめたいと考えております。情報解析分野の人材育成が急務だということは共通認識になっていると思いますが、研究の最前線で活躍するようなスペシャリストの育成のみならず、ユーザーへの教育といった普及・啓蒙活動の企画が充実していれば、もっと積極的に本制度を活用できたのではないかと思います。私の課題に対しては、旅費などの持ち出し分に対して、とても割高な費用対効果となってしまったと感じています。
9. 支援が決定してから実際に配列決定が終了するまでに時間がかかり、とても単年度では終了できない。また、ゲノム関係の論文は執筆に時間がかかる。従って、支援期間は最低２年間必要である。
10. 全ゲノムを手に入れることができ、研究は大いに進展した。しかし、ゲノム関係の論文はまとめるのに時間がかかり、出版までには至っていないものが多いので、数年後に成果報告をすべきである。
11. 基本的には、各種解析を極めて献身的に支援してもらって感謝しています。初期の段階では支援班のどなたが何の担当なのかがわからず、こちらから連絡が困難だった時期もあり、戸惑うことも多かったような気がします。また、支援班の方も研究者であるので、こちらから依頼するのに気が引けるという側面もあり、ビジネスライクなやり方も導入する必要があるのかと思います。
12. ゲノム支援において，提出したサンプルを迅速に解析して頂き，非常に有り難く，感謝申し上げます。現在の研究では網羅的解析が必要不可欠であり，是非とも，この支援体制を何らかの形で今後も継続して頂きたいと思います。
13. 業者による外注解析では困難だったサンプルを、試行錯誤の上、見事に解析していただいた点はまさにゲノム支援の実力と経験によるものであり、大変満足している。改善すべき点を挙げるとすれば、相談内容に対するメールレスポンスの遅れなどで、サンプルの提供時期が遅れてしまった点がある。おそらく採用決定直後は、他からも多くの問い合わせやサンプル提供があったために対応が遅れたものと予想されるので仕方がないと思われるが、改善可能ならば是非お願いしたい。
14. 実際の実験計画をヒアリングした上で、支援方針を決めていただけるところが非常に良かった。極めて有用な研究支援活動である。

15. ChIP-seq の解析に関する初心者向けの Web コンテンツがあるとよい。
16. ゲノム支援の枠組みは、既存の科学研究費のプロジェクトを有効に推進する非常に優れた取り組みであると思います。特に、高額な次世代シークエンサーを共同利用したり、データ解析の手法や登録についての助言を受けたりするなど、有形無形の支援効果がありました。
17. 複数種かつ多コピーの転移性遺伝因子(CTn, MTn)がゲノム中に存在していた本菌株の高品位ゲノム配列の決定は本支援事業の助けなしには行えない成果だと思います。また支援後も支援側の共同研究者との情報交換があったからこそ、新規 CTn,MT n の存在について解析を行うことができました。今後も情報交換の場を持つことができればと思います。またデータベースへの配列の登録は自力で行いましたが、DDBJ の HP の手引きだけではかなり難航しました。もうすこし初心者向きの手引きがあれば助かると思います。（とくに BioSample, BioProgect のところで混乱し、DDBJ の担当者に複数回相談する必要がありました。）
18. とても良い取り組みだと思われたと同時に、個別に細かいところまで対応して頂いており、支援者の大変さを気遣うばかりでした。この場を借りて厚く感謝申し上げます。微生物に関連する最近の論文を見ると分離菌のゲノムを片っ端から決めるようなものもあり、スケールがまだ海外に追いついていない感じも受けます。PacBio でのサポートもあればなお良いと思います。支援活動が引き続き資金面でサポートされるように願います。
19. 支援担当代表者の先生に、サンプル送付に関して事前の確認メールを何度お送りしても、レスポンスがもらえなかったために、サンプル送付が大幅に遅れてしまったこと。しかし、その後、実際にシーケンスやデータ解析を担当して下さった方々には、大変迅速かつ丁寧なご対応をいただきました。
20. 個別の遺伝子解析では到底困難であった代謝ネットワークの再構成を達成することができたのは，ゲノム支援を受けたかたこそである。
21. 2 年間支援を受けた RNA-seq 解析では、精度の高い配列分析と得られた膨大なデータから重要なデータを掘り出す Bioinformatics の技術、双方が極めで重要であるが、東京大学大学院新領域創成科学研究科の鈴木グループと理学系研究科の岩崎グループから最高の支援を受けることができた。そのため、私のような生理学研究者でもゲノム科学分野で信頼できる研究を行うことができたと感謝している。得られたデータがあまりにも膨大であること、および支援を受けた最終年度で科研費が途切れたことがあり、まだ第 1 報の論文を発表しただけであるが、極めて興味深い未発表のデータが数多く得られており、今後一つずつ発表をしていく予定である。
22. ゲノム配列決定やそのデータ処理など、自分のスキルや研究費だけではとても行えない解析を支援していただけたのは、何より有り難かった。ただ、データ処理の部分は企業の方が行ったこともあり、処理条件のかなり細かい部分にまで踏み込んで一つ一

つ依頼をしなくてはならず、更にデータ処理上のミスも重なり、結構時間がかかってしまった。

23. 千葉大学には次世代型シークエンサーがなく、研究に限界がありますが、本支援により研究が広がりよりよい研究に発展可能です。大変感謝しております。昨年度は、インフォマティクスの修得に東大柏キャンパスの鈴木先生の教室に 1 週間ポスドクがお邪魔し、トレーニングを受けました。その後もメールや電話で相談にのって頂いており、大分教室内で解析ができるようになりました。
24. 実際のシークエンス支援のみならず、様々な人的なネットワーク構築にも大変にお世話になりました。ご支援をいただいたおかげで自身の研究の幅をゲノム科学に広げる大きな要因になったと思います。
25. 支援側の先生方は、当初予定の配列決定に留まらず、検出された双子間不一致箇所に対し、異なる手法での確認作業までしていただきました。このおかげで、スムーズに論文にすることができました。
26. 活動当初は NGS によるシーケンスは高価で、本支援が大変役だった。シーケンス自体の価格は下がってきているので、今後は、オールジャパンで情報解析の体制構築・人材育成に資金を投じた方がよいと思う。
27. 費用のかかる次世代シーケンス解析を支援していただき研究が大変サポートされた。支援を担当してくださった先生とのコミュニケーションがうまくとれなかったのが残念だった。
28. 活動を継続してほしい。特に研究アイデアがシーズ段階の時に支援を頂けたため、結果をもとに次のラウンドのグラントを得ることができた。
29. こちらの希望に沿って実験をデザインしていただき、高精度かつ大量のデータを出していただいた。また、データの受け渡しも速やかであり、すぐにデータ解析を実施することができた。できればゲノム支援を今後も是非継続していただきたい。
30. 基盤 C だけでは困難な研究支援を頂き研究が飛躍的に進み大変感謝しております。解析支援は別の支援になるようですが、解析支援ほどではなくても、解析方法などについて tool などの suggestion だけでもいただけると良かったと思います。
31. 迅速に対応していただき、かつ的確なアドバイスをいただいたことで、研究を飛躍的に展開できるデータを取得することができました。
32. 申請者個人だけではどうしても進めることができなかった、トランスクリプトーム解析および全ゲノム解析にトライするきっかけを与えていただいた支援であり、非常に感謝しています。
33. 引き続き今までのような、次世代シーケンサーを稼働させてデータを取得して頂く公募型支援活動の一層の充実と継続を強くお願い申し上げます。一方で、得られたデータのインフォマティクス解析は、できるだけインハウスで行える体制を整えるよう引き続き努めます。

34. 支援全体に関して、年度を超えて追加したい解析に関するルール（解析可否の条件、経費など）をご検討いただけると有り難いです。
35. このような研究課題が支援の対象になるのかわかりませんでしたが、採択していただけたことで、新しい挑戦的なアイデアを試すことができ、研究の幅が広がりました。深く感謝いたします。全くの未経験者でしたので、NGS サンプル調製について、親切に何度も相談にのっていただけたことは、非常に助かりました。何をどのように勉強したらよいかなど、いちいちお尋ねするのが気が引けますので、基本的な情報を得られるウエブサイトを作っていただけると助かると思います。拡大班会議で、データ解析についての打ち合わせや、他の研究者からの情報収集が行えたことは、非常に良かったです。データ解析について、これまで、全て行っていただいていますが、自分たちの手でもすこしは解析できるようになりたく、今後、基本的な解析法についてのウエブサイト、講習会、あるいは webinar などがあればよいと思いました。
36. 今回私達は微量細胞を用いた ChIP-seq 解析を支援して頂いた。サンプルの調整が非常に困難であり，データが得られるかどうか不安であったが，ゲノム支援・鈴木穣先生の確かなシーケンス技術に支えられて，素晴らしいデータを得ることができた。ゲノム支援に参加する前までは前駆細胞における ChIP-seq は夢のようなものであったが，それが現実に可能となったことは私達の研究にとって大きな前進である。また次世代シーケンサー用ライブラリの作成方法に関して詳細に指導して頂き，現在は私達の研究室でもライブラリ作成を行うことができるようになり，研究技術の底上げに大きい効果があったと感じている。ヒアリングの際にサンプルの調整方法に関して丁寧に対応して頂き，実現可能な計画を立てることができた。また班会議に参加することで単一細胞解析に関する有用な情報を得ることができた。
37. 非常に効果的な支援が受けられた。特に、プロジェクト毎に最適化されたデータ解析支援はたいへんありがたかった。
38. 後も新しく登場するシーケンサを導入して、購入を考慮している国内ユーザー代わって毒見をすると同時に、メーカーサイドとは一味違うトラブルシューター・アドバイザー的な役割もはたして欲しい。
39. 生物を知っている研究者が解析に関わるアドバイスを初心者に対しても親身になってして頂けたのがとても助かった。自身の次世代解析に関する知識も深まったと感じている。伊藤先生には、現在もアセンブル作業を実施していただいており、共同研究の幅も広がった。
40. シークエンスのみならず、シークエンスサンプル調製、データの見方、解析、登録など多岐にわたり丁寧に相談に乗っていただき、次世代シークエンスにまだ不慣れな研究者にとって大変有用でした。
41. 現在、多くの機関やラボが MiSeq を保有しており、小規模ゲノム・転写産物解析であれば、自前で行えるようになっています。しかし、HiSeq2500 や PacBio を使用する解

析では、このような支援が決定的に重要です。今後も何らかの形で、このような支援が行われることを希望します。

42. 解析の仕方について不明な点があればメールで連絡をとり、すぐに返事がもらえたのでとても助かった。解析の条件を変更してやり直してもらう依頼も快く引き受けていただき、すぐに再解析してもらえたのでとても助かった。
43. 悪かった点：サンプルの紛失。多くのサンプルが集中することもあり、気の毒な点もあるかと思います。
44. 本支援により、科研費の予算と、これまでの人脈では手が出せなかった解析が大規模に行なえ、今後に繋がる成果が出ました。
45. 研究を進めるにあたって、研究内容の相談等も含めた支援は本研究の推進に大きく貢献していただいたと感じています。また、次世代シーケンスの金銭的な支援にも、若手研究者には大きなものでした。ただ、当初、成果報告等が多くありましたので、事前にその説明があった方がよいと思いました。
46. 担当者の先生には懇切丁寧に対応していただき、また、取得した配列も早急にお送りいただきましたこと、深く感謝いたします。今回の支援結果を論文や学会発表に活用できなかったが、うまくシーケンスができなかった場合に、さらに次回にサポートしていただけるような仕組みがあればよいと感じました。
47. 科研費の研究課題では成し得ない規模の解析をしていただけたことで、コミュニティ全体の目標が実現に向けて動きだすことができました。本当に感謝しております。データの質や量は言うまでもなく、サンプルのやり取りの際の対応や、データ解析の講習会を設けてくださるなど、親切できめ細かい対応もよかったと思います。
48. ゲノム支援の活動はたいへん意義深く、これなくしてはコミュニティー全体の研究展開は難しかったと思います。最先端の解析機器と技術情報を集約したゲノム研究の中枢として、これからも活動を継続していただきたいと願います。しかし、研究現場の増加するニーズに対応するためには、解析機器だけでなく、人的にも計算資源の面でもパワーアップする必要があるのではと感じます。また、イモリのように生命科学にとって重要な位置にある生物でも、ゲノムが巨大なため、ゲノム解読がなされていないものがまだまだいます。ゲノム情報は現代オミックス技術をフル活用するためにはどうしても必要です。大型ゲノムを解読する新たな概念のシーケンサーや方法論についても、導入や開発などを検討していただけると、サイエンスのすそ野がより広大になり、支援活動の必要性・重要性が益々高まると考えます。
49. 得られた生データの解析を通して若い世代のバイオインフォマティクス育成に大きな貢献があった。支援期間が一年区切りとなっている為に研究成果の成熟度という点でやや不満が残った。
50. 支援対象の元となる科研費の申請時点では、採択後にゲノム支援を受けられるかどうかが予想できないので、研究計画を立てる際に難しい面があると感じました。

51. 支援全体として、担当者の方と密に連絡を取らせていただき、相談しながら進めることが出来ました。一概に BAC ライブラリの作製といっても、材料によっては高分子 DNA の調整方法が異なるため、条件検討に時間を費やしてしまいました。新鮮な葉からの核単離が必要であったため、BAC 作製を担当していただいた横浜理研の所内で同じ植物を栽培している研究者から材料提供を受けました。また、条件検討中に、葉に含まれるデンプン量が高分子 DNA の制限酵素処理に影響することが判明したため、鉢植え植物の暗所処理を行いました。 根気強く条件検討を行っていただいたおかげで、目的の規模の BAC ライブラリを作製していただくことができました。
52. 単一細胞やごく少数の細胞からの RNA-Seq 法が確立されていなかった試行錯誤の時期にご支援いただき研究の方向性を見定めることができ大変感謝しております。
53. 自分の研究費や地方私立大学の研究設備では実施が困難なメタゲノム解析を、国際的にもトップクラスの研究グループに支援班としてやって頂くことができたことは大変有難かった。また、シーケンスだけではなく、試料調製や情報解析に関して多くのアドバイスを頂いた他、研究内容に関して興味を持ってディスカッションやアドバイスの機会も頂くことができた。班会議は、分野を超えたディスカッションが行える貴重な機会であり、異分野融合の共同研究のきっかけにも成り得ると思われる。悪い点はほとんどなかったが、シーケンス後の大量のデータへのリンクを頂いたが、自分のパソコンにダウンロードすると処理能力を超えてしまうため、データをアップロードしてオンラインで解析できるようなシステム（JGI の IMG データベースのような）があれば良いと思った。また、今回の解析では、コガタルリハムシ（*Gastrophysa atrocyanea*）のメタゲノム解析に用いた DNA の質があまりよくなかったため、目的とする遺伝子を発見することができなかった。このような場合に、新しい試料で再解析をして頂くことが可能であれば、大変有難いと思う。
54. 支援していただけるサンプルの数に制限が設けられていたので、繰り返し支援をお願いすることができなかった。サンプルの準備に不確定要素の大きい実験に関しては、試行錯誤が必要であり、こういう形での共同研究の難しさを実感した。最終的には、自ら次世代シーケンサーを動かすこととなった。
55. 支援も予算的に非常に助けられたが、異分野融合で新たゲノムサイエンス手法・技術に触れられたことが一番重要であった。
56. サンガー法による特定遺伝子領域の集団解析で支援を受けた。多量の集団サンプルに対し、塩基配列レベルの多型性を精緻に解析することで、従来は不十分であった自然選択の評価を統計学的厳密さをもって定量的に行なう道が拓けた。大変満足している。
57. シークエンス自体はコスト的にも大変助かりましたが、サンプル送付からエクソームシークエンスの結果が返ってくるまでにやや時間がかかり過ぎではなかったかと考えます。
58. 資金が無いが、実施したかった研究が達成できたことは大変良かった。若手一人では

経験がないことも、経験豊富な支援研究者が協力していただいたことはとても勉強になった。また、支援活動をとおして、研究課題だけでなく他の研究においても有意義な知識や経験を得、多くの研究者と面識を持てたことはとてもよかった。

59. アイデアを持っているが、高額な次世代シークエンサーを保持せず、シークエンス、バイオインフォマティクス、ゲノム科学の知識が乏しい研究者にとって目的達成を実務の点でフォローして頂けたことが大変良かった。当時、知識なく不勉強でアイデアとして出せなかったが、孤発発症の場合はトリオでのシークエンスが目的を達するためには適しており、遠慮なく積極的な指導を頂けたらと考える。
60. トリオでのシークエンスができたため、結果がうまく出ない場合も次の研究に繋がるデータを得ることができた。また、実務の研究者と対話しながら進められたことは学ぶことが多く大変有意義でよかった。
61. NGS による解析は、素人が自前でやろうとすると莫大な労力・時間・コストがかかり、非常に効率が悪いです。このような活動により、プロの研究者と施設にシークエンス解析を支援して頂けると、研究全体の効率がとても上がると思われます。ただ、その際には研究計画の質が重要になるので、申請書を吟味して支援課題を選ぶ今のシステムは継続するべきであると考えます。日本のゲノム研究のレベルを上げるためには、このような支援活動は必ず継続されるべきです。
62. 検体数がどの程度可能であったか遠慮があった。
63. ゲノム科学を発展させるためにも、研究支援とともに、研究者のコミュニティの維持・発展が重要であり、そうした目的でもゲノム支援が大きな役割を果たして欲しいと期待します。
64. 会議については、他のゲノム系学会の前後日、または同時開催していただけると時間と費用の関係でありがたいです。
65. 試料調製や送付手続き、データ解析についても効率的な仕組みとなっておりスムーズに支援を受けることができた。
66. 提出した DNA 試料が不十分であったようで Fosmid 作成が不成功に終わったが，柔軟に対応していただき，20kb インサートのメイトペアシーケンスデータを取得していただいたため，結果的にはゲノムアセンブルの強化につながった.
67. 想定していた以上のリードを取得していただき、データの信頼性が高まったと思います。また、遺伝研におけるデータ解析講習会に担当学生およびポスドクを参加させて頂けたことに感謝しています。一方、支援当初の打合せでは、リードアッセンブルは宿主植物と共生菌のリードを振り分けてから行うことで同意していただいたと理解しましたが、結局、時間が無かったのか、あるいは担当者が変わったなどで、（作業開始時に確認したにも関わらず）両者のリードを振り分けずにアッセンブルされてしまい、送られてきたアッセンブルデータはまったく使い物になりませんでした。リードの *de novo* アッセンブルは、スーパーコンピューターでも数日かかる大変な作業で、適切に

処理できない（する時間がない）のであれば中途半端な対応はせず、最初からサポートしないと明言すべきで、そうしていただいていれば、お互いに時間も労力も浪費せずに済んだと思います。我々も最初からサポートがないことがわかっていれば、自力でアッセンブルする準備（担当者のトレーニングなど）を事前に整えることができたはずで、限られた期間内にもっと解析を進められたと考えています。

68. 支援者との連携がうまく行かなかった点が反省点である。もう少し解析についてのすり合わせを被支援者自身が積極的に行えばよかったのかもしれない。支援者にどの程度のエネルギーをさいてもらえるかが明確でなく、共同研究や受託研究とどのように違うのかをイメージすることが難しかった。
69. エクソームの WET 解析援助は資金面で非常に有り難かった。DRY 解析は期待していたサポートとは異なり、支援依頼者側にエクセルの変異リスト一覧からの絞り込みを指示され難渋した。DRY 解析担当者の人材育成および確保が重要と思われる。
70. 支援活動により、RNA-Seq の鋳型調製、シーケンス、得られた配列情報の登録を行っていただき大変助かりました。RNA-Seq のデータ解析についても講習会に参加しご指導いただきましたが、時間が短かったことなどもあって自分で解析できるようになるまでには至らなかったので、もう少しサポート頂けると大変助かります。
71. どのような質問事項に対してもいつも迅速かつ丁寧に対応していただいた。どのようなサンプルに対しても柔軟に対応していただけた。
72. この数年で次世代シークセンサーが低廉化し、所属機関でも所持できるところも増えているが、まだまだリード数や、解読量が非常に高性能な次世代シークセンサーは、いまだ高価で有り、一機関で導入しても費用対効果の点で問題があり、共通機器として導入される例はほとんどない。また、民間業者による高性能な次世代シークセンサーによる受託解析はいまだ高価であり、実績があるプロトコールによる実験に利用は限られる。本研究課題のような宿主に感染した黄色ブドウ球菌の網羅的な遺伝子発現解析という、手法が確立してない研究を遂行するには、当初は予定してなかったさまざまな条件検討が必要であった。また、細菌による感染の成立過程を解析するためには、これまで成功した条件よりも、さらに少数の菌で遺伝子発現解析を行う必要が出てくる。従って、これからも次世代シークセンサーを用いた解析のための、実践的なプロトコールが確立しておらず、条件検討が必要なプロジェクトについて、ゲノム支援によるご支援をこれからも頂ければ、我が国のライフサイエンスの基盤の向上に役に立つと期待される。
73. 大変に良かった点としましては、通常の研究活動では分野が違う先生方と合同の班会議で、まったく未経験の、しかも最先端の研究に触れることができた点です。
74. ゲノム支援で雇用しているコーディネーター的な若手バイオインフォマティクス研究者（？）の方が、積極的に支援課題の成果に関わってもらえるともっと良かったと思います。

75. バイオインフォの先生方のご負担がとても大きく恐縮でした。もう少し自分自身も学ぶこと、バイオインフォの人材育成の必要性を痛感しました。
76. 次世代シーケンサーの登場により細菌ゲノム情報はこれまでに無いスピードで蓄積しつつある。一方でフィールドワークを行い、実際に細菌を分離する生態研究者がゲノム解析をすることは、まだ幾分か敷居が高いという感覚があった。この感覚は、実際にどの研究室が原核生物のゲノム解析を行っているのか等の具体的な情報が不足していることに起因している。しかしゲノム支援では、希望する解析内容を申請することで、研究内容に最適な研究室による解析の支援を受けることができ、非常に満足のいく成果が得られた。本支援を受けたことで目的株のゲノム解析を世界に先駆けて行うことができたのは、非常に有益であったと考える。
77. 本研究を遂行するにあたり、ゲノム支援による支援は極めて効果的だったと考えている。というのも、次世代シーケンサは高価であるために各研究室レベルで保有することは困難であり、企業にシーケンスを外注するのもまた高い費用がかかってしまうため、このようなエピゲノム解析を行う上でゲノム支援のようなシーケンスのサポート体制が存在していたことは大きな助けとなるからである。これらの解析は特にスタートの時期にこのようなサポートが大きな助けとなる。さらに我々は、支援側の東京大学鈴木穣博士とも適宜得られた結果についてディスカッションを行うことで実際のサンプル調整から研究の方向性に到るまで多くの助言をいただき、それを研究にフィードバックすることができた。
78. 本支援の合同班会議では、異分野の研究成果を聞くことができるとともに、自分自身の成果を他の分野の先生方に紹介させていただく機会を賜り、非常に有意義なもので毎年参加させていただきました。さらに情報解析講習会の企画・開催もされており、私も参加させていただき情報解析手法を学ぶことができました。このように本支援は、研究を発展させるために非常に有意義なものですので、今後も継続されることを熱望いたします。
79. 支援者とは、全体会議でご紹介頂いた後は主にメールで議論し、議論の中で生物学と情報学との隔たりが感じられた。TV 会議を行うことでスムーズに支援を進めることができました。我々が生データを目で見てよく吟味してきたこと、支援者がこちらの依頼に答えるためにその生データを用いて逐一ソフトウェアの動作確認をして下さったことが、スムーズに支援が進んだ要因と考える。
80. これまでほぼゲノム科学、バイオインフォマティクスに縁の無かった研究者が NGS を利用し、新しい可能性を切り開く機会として非常によく機能していたと思う。一方、支援側にどこまで依存して良いのか、判断が難しかった。
81. RNA の送付後、迅速に RNA-seq 解析まで持って行っていただき感謝いたします。情報解析講習会の回数をもっと増やしていただけるとありがたいと思います。
82. 非常に微量な DNA 量に対して、増幅の提案をしていただいたりして、かなり難しい解

析をしていただいたこと、感謝しております。現在までに得られた sequence のデータを基に、解析データの方向性や解釈などについて情報解析講習会の開催をご検討して頂ければと希望しております。

83. 支援自体とても有り難いことであり、悪い点はないと思っております。ただ、参考になればと思い、感じたことを述べます。支援決定 (6 月)から半年以内(〆切が 12 月)に試料を調整してお送りするのは、扱っている実験材料によっては難しいことも多いと思います（私の実験材料はこれに該当し、年明けの後も、試料の再調整の途上にあります。先生方には事情をご理解いただき、お待ちいただいているので感謝しています)。また、報告書提出までの半年強で成果を得るのは（論文公表はもとより、学会発表などですら）テーマに依ってはたいへん困難です。できれば一年後、すなわち、支援年度の次年度の末に報告する等の方が、得られた成果の実体をきちんと記載できる報告書となり、趣旨としては適切なのではないかと感じます。

84. 実際支援をしてもらう時点で、支援を受ける側に具体的な解析の流れのイメージあっても、それが正しいのかそうでないのか検証するような視点でアドバイスなど受けられたら良かったと思います。情報解析側の常識について、今後支援を受ける側が独り立ちして解析し情報解析分野の研究を進めていけるような支援があったらより良かったと思います。本支援では、コマンドラインでコンピュータを使ったことがない研究者が、自身で簡単ながら解析パイプラインを構築するきっかけとなるスクリプトの書き方などを教えてもらいました。実践的な解析例となるプログラムを実際に見せてもらい解説してもらうような支援をしてもらえたことが良かったと思います。

85. 他の研究プロジェクトとは異なり、生物系・生命科学系・医学系など広い分野の研究者が情報を共有し、議論する場があったこと。研究者に研究費が配分されることはなくても、ゲノム分野をリードする研究者と議論しデータを共有する点は優れた共同研究制度といえる。

86. リードを取得していただいたのちに、３日間お邪魔して、データ解析を教えていただきました。そもそも UNIX すら扱った経験がなかった当方に、パッケージのインストールから始まり、種々の解析ツール野使い方を教授していただけたことは、本当にありがたいことでした。その後、さらに他の NGS 解析を学ぶ際の基礎となる訓練を受けさせていただけたことは、今支援を受けることができましたもう一つの大きな収穫でした。

87. ライブラリ作成後、解読していただきましたが、リード長が異常に短いということで、解決策について相談に乗っていただいております。テクニカルな知識が当方に欠如していることからも、本支援は本当にありがたく思っております。

88. Pacbio シーケンサーを用いた高価なシーケンシングの支援に感謝します。また、マルチプレックス法という日本では普及していない新手法にチャレンジしていただいたことにも感謝しています。

89. 以前よりゲノムワイドレベルでの研究に興味を持っていましたが、このゲノム支援をきっかけとしてそれを開始する機会に恵まれて感謝しております。ゲノム支援で取得した ChIP-seq/RNA-seq データの解析で、多くの科学的知見が得られ論文発表することができました。また、私は素人レベルからスタートしましたが、現在は自らプログラムを作って解析するというレベルまで向上できたのもゲノム支援あってこそだと感謝しております。今後も自分が専門とする領域を軸として、ゲノムレベルでの研究を遂行していければと考えております。また一昨年度末より自分達の研究施設にも HiSeq 1500 が導入され、自前でシークエンス解析ができるようになりました。ゲノム支援で勉強させて頂いたおかげで、ある程度の知識を持って解析を進めることができ、順調にデータを取得しております。今後もゲノム支援で得られたデータ・知識・経験・人的ネットワークを生かして研究を発展させられるよう努力していく所存です。　　ゲノム支援では年度単位の支援が基本でしたが、時間のかかる研究では短期間で結果を出すのが難しく、まだ論文化できていないデータも残っております。例えば、ChIP-seq/RNA-seq で候補遺伝子を探索し、KO マウスを作製し、表現系を解析するような研究がそれに相当します。今回の報告書に含めることができずに申し訳なく思っておりますが、それらの研究も迅速に進めて早い時期に論文発表できるよう努力いたします。

90. 非常に助かりました。成果として目に見えてないかもしれませんが、配列情報の取り扱いが解っていない私たちに親切にご指導いただきました。一番困ったことは、この分野の入門書が無いことです。解りやすい入門書が必要です。

91. 良かった点：①被支援者の対象疾患領域に精通する研究者が支援側にいたため、単なるゲノム解析の支援ではなく、強いご支援を頂けた点。②時間的にも予定通りにサンプルの解析をしてくださったこと。③事務局が研究者が集まって討議する会を設けていただけて、勉強になった。具体的な支援が終わった後でも、ご連絡を下さったため、アップデートできた点。

92. 配列解析に関する技術革新が急速に進み，短時間でアップデートされている現状では，本ゲノム支援で構築されたような，シーケンシングと情報解析のリソースを集約して共有するしくみは，非常に有効だと感じました.

93. 一般的に、全エクソーム解析による診断確定率は 25%とされているにもかかわらず、今回の当研究解析では診断確定が 3 家系、ほぼ確定が 2 家系で、計 17%にとどまる。解析が発端者のみの解析で、トリオ解析に及んでいないことが理由の一つに挙げられる。支援施設の費用負担が 3 倍に及ぶトリオエクソーム解析の前に、発端者解析に十分労力を投入している結果、現時点ではまだ解析途中という状況にある。そのために具体的な結果公表に至っていないことを反省している。非常に高い精度、十分な厚みの coverage を呈するデータの返却をいただいたことは大変感謝しています。引き続きデータの見直しによる診断率向上を目指すつもりですが、希望としては、やはりトリ

オ解析（既に解析いただいた家系の親解析）を支援いただきたいところです。

94. 支援活動は迅速かつ正確に実施して頂き、遺伝学を中心としていた課題担当者の研究に、オミックス解析の知見が加わり果実発達に重要な遺伝子が多数同定されました。また、支援活動では度重なるトライアンドエラーも迅速対応していただきました。課題担当者もこの過程で情報解析における知識を得ることができました。極めて有意義な支援であったと感じております。

95. 次世代シーケンサーを用いた de novo でのゲノム配列解読は、多くの情報を提供してくれているが、遺伝的多様性が高いと考えられる非モデル植物である薬用植物等では、まだまだアッセンブリーが困難であるという課題がある。今後、より長鎖のライブラリーを作成する、あるいは、長鎖解読が可能なシークエンサーを用いることにより、より精密な配列決定を行うということが必要であるとかんじる。しかし、今回支援して頂いたように、ドラフトゲノム配列決定により、リファレンスとするゲノム情報をえることは重要であると考える。今後は、こうしたドラフトゲノム解析とともに、それに対応する RNA 配列解析を充実することにより、さらに、ゲノム情報を高度利用したいと考えている。なお、遺伝子情報が極めて限られた非モデル植物であったにもかかわらず、経験豊富な担当者に丁寧なゲノム解析をして頂き、通常ではえられない高精度なゲノム情報を得られたことは、極めて有意義であった。一方、得られた塩基配列に対する我々の解析能力が十分ではなく、未だに、解析途上ではあることが、反省すべき点である。この部分に関しても、より支援をお願いすべきであったと思う。なお、限られた解析ではあるが、新規生合成遺伝子等、興味深い知見が得られつつあり、その成果をできるだけ早く済ませ、公開していきたい。担当して頂きました豊田敦博士初め、支援班に厚く感謝申し上げます。

96. いつも素早く対応して頂き、本当に感謝しています。ゲノム支援がなければ自分の研究の発展はなかったと思っており、今後もこのような支援活動を続けてほしいと願っています。次世代シーケンサーはラボ単体で所持するにはコストが高すぎるため、専門家による支援は本当に必要であり有益である。

97. 残念ながら、概日リズム異常による睡眠障害である CRSD に対するゲノム研究者の重要性の認知度は低く、多くの研究プロジェクトのヒアリングの際も、「不眠」と CRSD の差異が理解してもらえない。これは、これまで多くの睡眠障害の GWAS が不眠を扱い、ほとんど有効な結果を出していないことによると思われる。我々は現在も発表を続けているが、概日リズム中枢である視交叉上核に発現する遺伝子をノックアウトすると、実にその半数が CRSD 様の概日リズム異常を示すという、驚くべきデータがある（Okamura, Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2007;72:551-6; Doi et al., Nature Commun 2: 327, 2011; Yamaguchi et al., Science 342: 85-90, 2013）。今後は、是非 CRSD のリズムと一体化した疾患の概念を理解していただき、脳機能の中でも、格別の遺伝子レベルでの制御が重要であるという実験事実を提示し続けたい。また、もう一つの GWAS 解析

の問題は、CRSD の家族歴が少ないことである。すなわち、遺伝形質があるなら、なぜ一世代前、二世代前の老人に CRSD が少ないのかという疑問がある。重要なことに、CRSD 自身は、20 世紀末に現れ、21 世紀になって急速に増加している疾患である。すなわち、これは、概日リズムが遺伝的に脆弱な家系があるが、この脆弱性は、現代のような明暗を人工的にコントロールできる状況で初めてリズム異常が惹起されると考えられる。強い社会的制約のある明暗環境での生活リズムに沿って生活している、以前の世代では、強い社会的制約の下で現在も生活しているので、疾患を引き起こさないと考えられる。これをサポートする実験に、時計遺伝子を半減させたようなマウスでは、通常時は概日リズムが保たれているが、時差条件では、固有のリズムが保てないことがわかっている。したがって、CRSD は、現代の環境変化に伴い発現する疾患であり、特有のゲノム発現の発現を理解していただき、我々にご支援を賜りたいと願う。

98. ゲノムのドラフト配列はもちろんのこと、多数の株の multilocus sequence type の決定を効率的に実施していただき、研究を進める上で大変助かりました。また、研究内容について直接お会いしてディスカッションさせてもらい、論文についても丁寧にご指導いただき深く感謝しております。

99. 支援活動の良かった点：研究を進める上で必要不可欠なゲノム情報を得られた事、また、代表的な成果について発表会が開催され研究の進め方や更なる解析手法に関する情報収集ができた事は、良かった点である。
悪かった点：当時としては、ゲノム解析に関する講習会を開催するなどの支援があれば良かったと思う。
改善すべき点：当時（数年前）と比べて、現時点では、ゲノム解析技術が著しく進展したが、「ゲノム」の裾野を広げる為にも、解析技術を広める、進化させる取り組みがもっとあっても良いと感じます。

100. 各発育段階の寄生虫のシーケンスおよびその後の *in silico*　解析においても非常に支援になりました。解析方法につき様々な方法もご教示いただき非常に感謝いたしております。

101. ゲノム科学を専門としない私のような研究者にとって，ゲノム情報とその解析の手段を世界最高レベルで得ることは，きわめて貴重な機会です。いまやゲノム科学は生物学の基盤であり，こうした研究でもブレークスルーとなると断言できます。広く生物学の分野に，こうした高いレベルの基盤を供給するこのユニークな制度である「ゲノム支援」は，我が国の科学にとって最も必要であると思います。

102. サンプルの受け渡しからシークエンス期間も妥当であり、本支援により、新学術領域の申請書類時点の予定よりも充実したデータを取得することができ、非常に効果的であった。今後もこのようなシークエンス支援が特に大きな予算規模での研究が難しい若手研究者を中心に必要であると考える。

103. 解析対象サンプル数を増やせた点が良かった。

104. 非常に少ない RNA サンプルから RNA-seq 解析をする技術がすばらしく、有り難く思っています。サンプル数について支援開始当初から見通すことは容易ではないので、後でサンプル数を増やすことができれば助かります。
105. 良かった点：報告を直接していただけたことが非常に理解の助けになりました。
改善すべき点：進捗状況がわからないことで少し不便を感じました。難しいこととは思いますが、いつ頃までにどのような状況になると予定していると知らせていただけるか、あるいは、この頃までに連絡がなければ問い合わせてほしいといった取り決めがあると気が楽だったと思います。
106. ゲノム解析は，正確なデータを得ることが最初になりますが，費用のみならず，実際の検体処理からリードデータの取得まで支援いただいたことは大変有意義でした．
科研費の申請の際に，NGS や GWAS を組み合わせたプロジェクトで応募し，それが採用されたとしても，ゲノム支援からの支援が受けられない状態になると，その科研費も遂行できない結果になる恐れをあります．そのために応募する段階では NGS や GWAS を入れにくいのが現状でした．できれば，ゲノム支援の応募を，科研費と連動できるようなシステムだと良いかと思いました．
107. 私たちは、これまでにも探索的な遺伝子発現解析を行っていたのですが、同じ RNA を元に得た RNAseq 結果の質の高さには感銘を受けました。すでに得ていた情報がすべて再確認できただけでなく、再現性の高い定量データが得られました。計画変更に対応していただいたのも助かりました。未だ論文としては、公表していませんが、まとまり次第公表したいと考えています。有難うございました。
108. ゲノムアセンブルの段階で、支援依頼者としては予期していなかった困難（heterozygosity が高いことによるアセンブル不能）に直面した。しかし、支援担当者が独自の努力をして下さり、この壁をクリアーすることができた。これは本支援活動なしには達成できなかったはずで、支援依頼者として心から感謝している。
109. 京都で行われた拡大班会議は内容が非常に充実しており、大変勉強になりました。様々な人と出会えたのも大きな成果でした。サンプルの送付に係る連絡やリマインドなども適切・丁寧で大変助かりました。遺伝研で行われた情報解析講習会では初心者にも理解しやすく解説して下さり、大変勉強になりました。
110. 複数回の支援をお願いしたが、煩瑣であったヒトゲノムの倫理的取り扱いを含め、事務手続きなどの工程が回を追うごとにスリム化された印象で、有意義な支援を受けることができた。遺伝研で行われた次世代シークエンサーのワークショップに参加したが、このような教育事業は有意義であると感じられた。こういった事業の拡充があるとありがたく思う。
111. ゲノム支援なしには、こういった大規模解析とビッグデータは決して得られませんでした。欧米において大規模解析が多くの研究室でも進んでいるなか、日本では大型予算をもつトップダウンの限られたプロジェクト中心で進んでおり、裾野を広げ 21 世紀

のライフサイエンスを日本から独自に進めていくには、ゲノム支援のようなシステムが必須と思います。

改善すべき点として、（おそらく最初一回登録すれば流れが把握できるとはおもいますが）DRA への最初の登録がとても閾が高いので、エンドユーザーでも流れに沿えば簡単に登録できる「WEB アプリ」の開発を期待します。

112. ゲノム支援発足当初と比べて、次世代シーケンサの支援体制が整った研究機関も増えてきたが、それとは対照的に、小さな研究機関では、全く体制が整っていないところが多いのが現実である。研究機関のランク付けが厳しくなされている今日では、今後もこの状況は変わらないどころか、ますます格差が広がる一方と思われ、そのような研究機関に所属する者としては、大きな危機感を抱いている。ゲノム支援の最大の長所は、極めて弱小の研究機関に所属していても、世界最高水準のゲノム解析をご支援いただけることにある。このようなゲノム支援の特性は、研究者の裾野を広げる上で多大な貢献をしてきた。今後も、所属研究機関内にゲノム解析の支援体制が皆無の研究者に対しては、是非とも門戸を広くしてご支援いただきたいと切に願う。
113. ゲノム支援は、リソースとアイデアを持っているが、高額な次世代シークエンサーを保持せず、シークエンス、バイオインフォマティクス、ゲノム科学の知識が乏しい研究者にとって大きな支援となっている。今後も継続していただきたい。また、機会があれば、大学院生やポスドクをウエット・ドライの現場で、短期の研修を実施していただければと考える。
114. 地方の小大学でゲノム研究を続けていく上で、新技術を使用する機会が得られること自体有り難いことである。もっとも、次世代シーケンサーの使用については、拠点機関との共同研究や商用サービスでも実施可能となっているため、拡大班会議を通じてゲノム解析に関する最新の動向に関する情報が得られる点がさらに有益であった。
115. 本支援をきっかけとして、研究室内の次世代シーケンサーデーター取り扱いに関する技量が急速に上昇しました。研究室内の若手には非常な刺激になりました。今後このような機会がある場合、データー解析に関する支援の大胆な拡充を希望します。
116. 私を含めゲノム解析に不慣れなウェット分野の研究者の多くにとっては、ゲノム解析に着手する際の心理的ハードルは非常に高い。「ゲノム支援」の活動は 2015 年度で完了とのことだが、ウェットの研究者とドライの研究者の橋渡しを担い、ソフトとハードの両面でサポートしていただけるゲノム支援活動の需要は間違いなく大きい。支援の規模や形は変わるにせよ、今後も継続的に、支援を求める数多くの研究者の拠り所であり続けていただくことを強く希望したい。
117. 次世代シークエンス解析は、十分な知識と経験が必要な解析技術であり、このような支援をおこなう新学術研究領域は非常に意義の高いものであることを強く実感した。現在は、もともとの研究課題では到達できないような貴重なデータを得ることができている。今後は、本研究で構築されたデータを利用して、共同研究として Impact が高

い雑誌に受理されることで、恩返しをしたいと考えている。

118. 非常に効果的な支援が受けられた。特に、プロジェクト毎に最適化されたデータ解析支援はたいへんありがたかった。

119. 申請者はゲノムライブラリーの作成や次世代シークエンシングの経験がなかったため，ゲノム支援活動により遺伝子解読をおこなって頂いたことで，これまで未知であったことが明らかになり非常に効果があった.

120. 検体数や検体の発送日などについて flexible に対応して頂き大変助かりました。また検体を準備するための方法についても詳細に検討して頂き有り難かったです。解析についても，連絡を密に取りつつ，こちらの要望を聞いて頂きながら解析して頂きました。特に不満な点は見当たりませんでした。我々にとっては大変有益な支援をして頂き感謝しております。

121. 塩基配列のシーケンシングだけでなく、得られた配列情報からどのように生物学的に重要な情報から抽出すべきか、そこまでのサポートがあったら有り難かった。個別の支援という形が一番ありがたいが、一般的なバイオインフォマティクスの解析方法等についてトレーニングコースやセミナーなどがあったらよかった。

122. 生物種ごとに、簡単な種の説明とカラー写真、ゲノム支援によって明らかになったゲノムの特徴（興味深い点）がセットになった「ゲノム生物ずかん」的なものをまとめると、次世代の「生き物好き」の心を掴めるのではないかと思っています。

123. 支援なしでは、本研究を遂行することは難しかった。「ゲノム支援」のような事業がシステムとして成立するためには、支援される側・支援する側双方に利点があり、相乗効果として学問の発展が期待されることが必須であろう。支援される側にとっては有益だったのは間違いないが、支援する側はどうだったのだろうか。ゲノム分野で世界をリードするような研究の方向づけを支援班が積極的に行っても良かったのではないかと思う。

124. 一般の研究者には困難な、サイズの大きなゲノムの解読が実現できて、とても感謝しております。想定よりも時間がかかりましたが、期待していた以上のドラフトゲノムが完成して、結果的に良かったと思っております。

125. *de novo* アセンブリ解析の支援により、研究が大きく進展しました。本支援がなければゲノム解析はとても成し得なかったので、本当に感謝しております。また、RNA-seq 解析についても、大変迅速に対応してくださいました。特にデータベース登録に関して助けていただきました。私のように支援活動に助けられる研究者は多く、日本の生命科学研究を発展させる重要な活動であると実感しています。支援活動が今後も継続されることを切に願います。

126. 2012 年度、および 2013 年度のゲノム支援をいただき、現在までに 13 家系のエクソーム解析を終了した。多因子疾患の遺伝背景は非常に多様であり、その全貌を少しでも明らかにするためにはさらに多くの家系を対象としたエクソーム解析が必要と考えら

れる。今後も何らかの形で、ゲノムシークエンス解析をサポートしていただけると本研究が発展し、本邦から成果を発表できると考えている。

127. 本支援は構成種が単純化しているものの分離培養が困難な微生物を含む複合系微生物のゲノムを解析して頂いた。多数種が混在する試料のメタゲノム解析ではなく、構成種が限られた中でのメタゲノム解析とすでにその中から分離に成功していた菌株のゲノムも併せて解析して頂いたことは大きな成果へと結びついた。本支援から得られた情報は非常に多く、これらのデータを活用して、なぜ微生物が培養困難なのか、また共生ネットワークの根幹を支えているものは何かを解析するデータとして今後活用させて頂きたい。こうした支援が引き続き受けられることを望んでいると共に、comparative genomics の解析支援を頂けると有り難い。この分野は日進月歩であり、最適なツールを使った最適な解析が何なのかは専門家でなければわからない。メタゲノムデータを扱う論文の審査をすることが多いが、特に解析パイプラインの妥当性については常々自身の審査能力を超えたものであると痛感しているところである。いずれにせよ本支援を心から感謝申し上げたい。

128. シークエンスだけでなく、その後の TophHat（2.1.10）によるゲノム塩基配列へのマッピング、cuffdiff による発現解析等のデータ解析もして頂き、大変、助かりました。また、terminal や R などの使用方法の講習会を開催して頂き、有益でした。

129. 本支援により、非常に良質のRNA-Seqデータを得られたこと、またサンプルやデータの授受に関してもスムーズな対応をしていただき、大変感謝している。今後は、このような解析手法が主流になると思うが、これから益々データ解析のステップが重要になると思われるので、基本的なデータ解析に関する講習会等をより多く企画、開催していただきたい。また、当研究室には、外国人の学生が多数所属しているが、有償・無償を問わず、国内で開催されているデータ解析の講習会はほぼすべて日本語で行われており、外国人への教育訓練が滞っている。現時点では難しいかもしれないが、将来的には英語による講習会開催も企画されると有り難い（バイオインフォーマティクスに関する研究者は、英語圏の方が多いと思われるので、不可能ではないのでは）。

130. BAC および Fosmid ライブラリーの作成、大規模なシーケンス解析、RNA-seq、FISH 用のプローブ調製など、すべての過程で期待以上に丁寧、迅速に対応していただいた。また、国際共同研究となり、連携の調整などで解読完了が遅れたため、2014 年度も継続して支援いただいてことに大変感謝している。

131. エクソーム解析や全ゲノム解析が行える次世代シーケンサーの導入施設が限られている現状において、本ゲノム支援制度は非常に優れた意義のある制度と考えられる。また、このような制度があることで、遺伝性疾患の家系内サンプル収集に対する意欲が高まり、ひいてはこれらの疾患の原因同定へのスピードが早まると思われる。

132. 支援活動による質問回答のおかげで，次世代シーケンサーの利用に抵抗がなくなりました．最終的には自分で実施できるまでになり，現在の研究課題では Illumina, PacBio

いずれも柔軟に活用できるようになりつつあります．データクオリティについて細かい要望をお伝えできる余地が少なかったために，いただいたデータ解析に少し難渋している部分が残っており，論文執筆に若干支障があります．

133. 今回 RNA-Seq 解析を依頼しましたが、RNA サンプルを送付後直ちに RNA 品質チェックを行って頂き、1 ヶ月という驚異的な速さで Fastq データを返して頂きました。またデータの品質も高く、非常に貴重なご支援を頂いた事を大変感謝しております。

134. 良かった点：痛風の GWAS 関連の研究については「ゲノム支援」活動の支援無しでは実施し得なかったプロジェクトであり、「ゲノム支援」の先生方お帯関係者の皆様に深謝いたします。今後、「ゲノム支援」の成果としての論文発表をよりよい形で報告できるように引き続き努力いたします。また、本支援を受けることにより新たな共同研究者と知り合えたことも大きな利点でした。

    改善すべき点：非常に有用なシステムですので、登録者に対し公募開始を知らせるニュースメールなどの送信があれば、よりタイムリーに情報を入手できて便利であると思います。

135. 2013 年度に関しては、ライブラリーの作製などのルーティンの部分をゲノム支援の方でやっていただけたのでよかった。

    講習会や班会議で、情報解析の話を具体的に聞く機会ができたのが良かった。また、他の研究者の発表を聞いて解析方法などを具体的に相談できたのも良かった。

136. 網羅的発現解析ならびにその解析法に関する本支援は、研究を進める上で非常に役立っている。また年に 1 度の拡大班会議は班員のさまざまなアプローチやアイデアを学ぶことができ有意義であった。より裾野の拡大が継続されることを期待したい。

    年に 1 度の拡大班会議は班員のさまざまなアプローチやアイデアを学ぶことができ有意義であるとともに、支援者と支援を受ける者が交流できる絶好の機会となっています。本支援は、共同研究であり、相互の理解がこのような形で進むことにより、研究の進行がよりスムーズに行くことにつながっており、良い試みだと思います。拡大班会議は規模が大きく主催者側の負担は大変だと思いますが、同様な班会議の継続をお願いいたします。

137. 最先端の遺伝子解析・シークエンス手法とそれによって得られる膨大なデータのインフォマティクスを同時にサポートして頂けることは、臨床をメインとする研究室にとっては非常に有意義なものでありました。引き続き、現在の体制での支援活動を継続していただきたいと考えております。

138. 藻類の雌雄決定に性特異的領域が関わる可能性が見えてきた。*Ulva partita* などは同型配偶子生殖と異形配偶子生殖の中間段階にあり、その雌雄の差は配偶子の形態の非対称性にあると考えられてきた。雌雄のトランスクリプトームデータから性特異的に存在する遺伝子を探索することと、その遺伝子がどのように配偶子の配向を決めているのかを明らかにできるだろう。

139. 実験遂行にともない生じる実験条件の変更等にも柔軟にご対応いただき順調に解析を進めることができました。ありがとうございました。
140. こちらの準備が遅い中、真摯に対応していただき、ありがとうございました。どのようにして「ゲノム支援」を進めていけばよいか分からず、サンプルの準備や送付が遅れてしまいました。また、支援担当者の先生がご多忙で、ライブラリー調整法やシーケンス結果の解析など十分に相談できなかったことが悔やまれます。「ゲノム支援」には、次世代シーケンサーの実施だけでなく、実験手法やデータ解析を相談できる体制を充実していただければと思います。今後、このような支援を受ける際は、積極的に利用していきたいと思います。「ゲノム支援」活動の益々のご発展を祈念いたします。
141. 支援前には、情報解析について経験や知識不足のためゲノム解析が停滞していました。本支援活動により情報系の研究者からのサポートが得られたことで、状況が劇的に改善されました。多くの生物系の研究者にとっては、情報系の研究者との接点をもつこと、さらに、実際に共同研究に持ち込むことは非常にハードルが高いと思います。今後も同様な支援活動が継続されることを強く願っています。
142. ご支援していただいた内容については、大変満足しています。質、量ともに高いレベルの配列データを短時間で得られたことに、驚いております。
143. 本支援によって、次世代シーケンサー解析とバイオインフォマッティクス解析を支援していただけたことは研究の発展に大変役立ち、研究成果を論文発表へとつなげることができました。また、支援担当者とのディスカッションの中で、ゲノム関連領域のトピックスや潮流を把握できたことは申請者にとって大変な財産となりました。さらに、支援担当者とのディスカッション・ミーティングに研究室所属大学院生を参加させることで、若手人材の育成にも貢献していただけました。
144. 支援決定後どのように支援プロセスが進むのかについて、被支援者側には全くビジョン・イメージが与えられなかった。「支援担当者と個別に打ち合わせるように」というだけで当事者にすべてが任されており、支援担当者と事前に面識の無かった私はその結果充分にコミュニケーションがとれず途方に暮れることになった。被支援者側からしつこく支援担当者にコンタクトしなければ何も進まない状況であったのだと気付いたのは年度の終わる直前であり、期限内で完了するために実際の支援に関わるプロセスはかなりの部分を被支援者側で受け持つことになった。当然のことながら支援担当者は多数の被支援者を抱えており、相当の負担であったと推測する。その中で被支援者はことさら声高に支援を求めなければ有効な支援を受けられなかったとすれば残念である。このような仕組みで全ての被支援者が同等の支援を受けることができたとは思えない。私の場合、実験の計画について事前にもっと協議できれば、より有意義な解析を行い成果に結び付くデータを得られたかもしれない。現在は、機器を所有する面識のある研究者と直接の共同研究の形で解析を進めており、若手で規模の小さい研究者にとって制限が多く進め方の難しいゲノム支援は今後利用することはないと感じ

ている。

145. 公正な審査がなされており、支援依頼者側視点に立った真の支援活動が行われている。我が国での微生物のゲノム解析は、NGS への対応の遅れなどが原因で、海外に比べてやや遅れていると感じられるが、この支援活動がなければ、状況はさらに悪くなると思われる。微生物のゲノム解析分野において海外の研究グループに対応するためにも、ゲノム支援活動の継続を強く要望する。

146. 念願だった BAC ライブラリーの物理地図を作成できて、BAC クローンの選択が非常に簡便になり感謝しております。既に、共同研究者にも有用に活用していただいております。

147. 年度始めの時期についても支援が行えるような方策を調えていただければ幸いです。

148. 研究グループ内だけでは行う事の不可能なゲノム解析へとステップを進める事が出来る点で、このような支援活動は、非常に有用であると感じている。最大の努力はしたものの、希少サンプルで扱いが難しかった点や、サンプル調整のやり直し等のために、準備に時間がかかってしまった点を考慮して頂いた事に、とても深く感謝している。ありがとうございました。

149. 支援をお願いするためのサンプルの準備に思いの外時間がかかってしまいました。そのため，支援の依頼を年度末の 1 回のみになってしまい，詳細な条件検討ができなかったことが残念でした。

150. 大規模シークエンスを専門としない生化学研究者である私にとって、ゲノム支援で民間の受託業者などよりも遥かに専門性の高い研究者による支援を得られたということに大きな意義がありました。即ち、今後の研究展開が格段に広がり、科学研究費補助金の大変有意義な使用ができました。

バイサルファイト解析のように、コストのかかる解析は、なかなか取り組めない解析です。そのような解析を、ゲノム支援で民間の受託業者などよりも遥かに専門性の高い研究者による支援を得られたということに大きな意義がありました。そして、これらにより新たな解析の切り口が見出され、今後の研究に大きく役立ちました。こうして科学研究費補助金の大変有意義な使用ができました。

現在、自分では到底できない高度情報解析支援を受けて、打ち合わせなどをすませております。ゲノムそして、これらにより新たな解析の切り口が見出され、今後の研究に大きく役立ちました。こうして科学研究費補助金の大変有意義な使用ができました。

151. 当研究室を含め、国内には独自に ChIP-seq 解析や RNA-seq 解析を行えない研究室は数多くあるので、この制度は ChIP-seq や RNA-seq の国内での普及に大きく貢献したと考えられる。さらに将来的にも、シーケンス等の解析機器は日進月歩でありかつ非常に高額であるので、研究室ごとに保持することはほぼ不可能であり日本全体としても不経済であることを考えると、「ゲノム支援」は非常に良い制度であり、今後も是非継続していただきたい。

＜連絡先＞
「ゲノム支援」領域代表
小 原　雄 治

大学共同利用機関法人　情報・システム研究機構
国立遺伝学研究所　系統生物研究センター　生物遺伝資源情報研究室
〒411-8540　静岡県三島市谷田 1111
Tel: 055-981-6854　　Fax: 055-981-6855
領域ホームページ：http://www.genome-sci.jp/