

第1回
ゲノム・エピゲノム研究討論会
講演要旨集

平成28年3月12日（土）

関西大学

交通及び会場案内

会場：関西大学千里山キャンパス内 学術フロンティア・コア3階会議室

大阪府吹田市山手町3-3-35

交通アクセス：



大阪（梅田）からのアクセス

阪急電鉄「梅田」駅から、千里線「北千里」行で「関大前」駅下車（この間約20分）、徒歩約5分。または京都「河原町」行（通勤特急を除く）で「淡路」駅下車、「北千里」行に乗り換えて「関大前」駅下車。

京都（河原町）からのアクセス

阪急電鉄「梅田」行で「淡路」駅下車、「北千里」行に乗り換えて「関大前」駅下車、徒歩約5分。

地下鉄利用のアクセス

地下鉄堺筋線（阪急電鉄千里線に相互乗り入れ）が阪急電鉄「淡路」駅を経て「関大前」駅に直通しています。

新幹線「新大阪」駅からのアクセス

○地下鉄および阪急電鉄利用の場合

JR「新大阪」駅から地下鉄御堂筋線「なかもず」行で「西中島南方」駅下車、阪急電鉄に乗り換え「南方（みなみかた）」駅から「淡路」駅を経て「関大前」駅下車（この間約30分）、徒歩約5分。

○JR利用の場合

JR「新大阪」駅から、JR京都線（東海道本線）「京都」方面行（快速・新快速を除く）で「吹田」駅下車（この間約5分）の後、阪急バス「JR吹田北口」停留所から「関西大学」停留所下車（この間約7分・25分間隔で運行）、徒歩約7分。

JR京都線（東海道本線）利用のアクセス

JR「吹田」駅下車の後、阪急バス「JR吹田北口」停留所から「関西大学」停留所下車（この間約7分・25分間隔で運行）、徒歩約7分。

大阪（伊丹）空港からのアクセス

大阪モノレール「大阪空港」駅から「門真市（かどまし）」行で「山田」駅下車、阪急電鉄に乗り換え「関大前」駅下車（この間約30分）、徒歩約5分。

千里山キャンパス拡大図：



会場：⑫学術フロンティア・コア

第1回

ゲノム・エピゲノム研究討論会

プログラム

平成28年3月12日(土) 13時
関西大学千里山キャンパス内 学術フロンティア・コア3階会議室

プログラム

13:00-13:05 開会挨拶 文部科学省「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」
次世代ベンチトップ型シーケンサーによる
ゲノム・エピゲノム解析に基づく統合的健康生命研究
研究代表者 老川 典夫 (関大・化学生命工)

セッション1: 研究成果発表

座長: 松村 吉信

13:05-13:25

1. 比較ゲノム解析から見出された乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* 由来新規アミノ酸ラセマーゼの
機能解析

老川 典夫^{1,2}、○加藤 志郎² (関大・化学生命工¹、関大・先端機構²)

座長: 細見 亮太

13:25-13:45

2. シロイヌナズナ由来 Selenocysteine *Se*-methyltransferase ホモログの *in vivo* 及び *in vitro*
機能解析に向けた異種発現系の構築

○山中 一也、老川 典夫 (関大・化学生命工)

座長: 老川 典夫

13:45-14:05

3. *Sphingomonas bisphenolicum* A01 株の環境汚染物質分解能の向上と安定化

○松村 吉信¹、高 未麗² (関大・化学生命工¹、関大・理工学研究科²)

座長：吉田 宗弘

14:05-14:25

4. 神経突起伸長に関わるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構

山添 亮輔¹、青山 大輝²、松浦 玖実²、谷尾 啓介²、○下家 浩二²

(関大・先端機構¹、関大・化学生命工²)

座長：山中 一也

14:25-14:45

5. セレン曝露がシロイヌナズナの遺伝子発現量に及ぼす影響

○細見 亮太、廣瀬 侑太郎、吉田 宗弘 (関大・化学生命工)

座長：下家 浩二

14:45-15:05

6. セレン曝露が植物スプラウトに与える影響と健康機能性の評価

○吉田 宗弘、細見 亮太 (関大・化学生命工)

15:05-15:15 休憩

セッション2: 特別講演

座長：老川 典夫

15:15-15:45

7. 構造基盤研究—アスパラギン酸ラセマーゼの温度環境適応

○畑 安雄¹、藤井 知実¹、山内 貴恵¹、老川 典夫²

(京大・化研¹、関大・化学生命工²)

座長：松村 吉信

15:45-16:15

8. 細菌のゲノム重複を介した環境適応

○稲岡 隆史、本山 志織、ワナシリ・ワナラット、草房 克江 (農研機構・食総研)

座長：吉田 宗弘

16:15-16:45

9. 植物を研究対象とした次世代シーケンサーの利用

○竹村 圭弘 (鳥取大・農)

座長：下家 浩二

16:45-17:15

10. ヘテロクロマチン形成の分子機構

三島 優一、木村 博信、高橋 紗央里、○末武 勲（阪大・蛋白研）

17:15 閉会挨拶

老川 典夫

18:00-20:00 懇親会

比較ゲノム解析から見出された
乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* 由来新規アミノ酸ラセマーゼの機能解析

老川 典夫^{1,2}、○加藤 志郎²
(関大・化学生命工¹、関大・先端機構²)

Functional analysis of a novel amino acid racemase from *Lactobacillus sakei* discovered from comparative genome analysis

Tadao Oikawa^{1,2}, ○Shiro Kato²
(¹Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ., ²HRC, Kansai Univ.)

【目的】 次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列の解読を行い、乳酸菌の比較ゲノム解析を実施することで D-アミノ酸高生産乳酸菌における D-アミノ酸生産の分子機序を解明することを目的としている。

【方法】 酒造会社の酒蔵より単離された乳酸菌から選抜された D-アミノ酸高生産株 (*L. sakei* LK-145) および D-アミノ酸生産能の低い基準株 (*L. sakei* LT-13) を対象として、両株ゲノムの全塩基配列を次世代シーケンサー (Roche 社製 GS junior 454) を用いて解読した。ゲノム上の推定遺伝子のアノテーションおよび代謝経路の解析には、遺伝研の MiGAP および KEGG Automatic Annotation Server を利用した。得られたゲノム情報に基づいた D-アミノ酸高生産株および低生産株間の比較解析を行い、D-アミノ酸生産に寄与し得る遺伝子の探索および *in vitro* における候補遺伝子産物の機能解析を行った。

【結果・考察】 次世代シーケンサーを用いたショットガン解析、ペアエンド解析およびキャピラリーシーケンサーを用いた Gap closure を経て *L. sakei* 両株ゲノムの全塩基配列を決定した。*L. sakei* LK-145 および LT-13 のゲノムサイズ、CDS 数はそれぞれ 1.95 Mbp および 1.94 Mbp、1981 および 1938 であった。ゲノム情報に基づく推定代謝経路の比較解析から、既知のアミノ酸ラセマーゼ遺伝子が同様に保存される一方で、推定の cystathionine beta-lyase 遺伝子の保存性が D-アミノ酸高生産株および低生産株間で異なることが見出された。*L. sakei* LT-13 ゲノムにコードされる推定の cystathionine beta-lyase 遺伝子 *malY* は *L. sakei* LK-145 ゲノムには見出されない。cystathionine beta-lyase は L-cystathionine を基質として L-homocysteine、pyruvic acid および NH₃ を産生する反応を触媒する酵素であり、Cys/Met 代謝経路における重要な段階を担うことが知られている。cystathionine beta-lyase には MetC および MalY/PatB の 2 つのファミリーが存在し、大腸菌における同酵素の機能解析から MetC が Ala に対する racemase 活性を有することが *in vitro* で示されている。また、MalY の過剰発現が大腸菌 D-Ala 要求株を弱く相補することが示唆されているものの、その詳細は不明なままである。そこで、乳酸菌 *L. sakei* LT-13 由来の MalY を大腸菌を宿主として異種発現し、同精製酵素の機能解析を行った。その結果、組み換え体 MalY は cystathionine/Cys に対する beta-lyase 活性に加えて、Ala をはじめとする種々のアミノ酸に対する racemase 活性を有することが明らかとなった。本研究は MalY/PatB ファミリーの酵素がアミノ酸に対する racemase 活性を有することを *in vitro* で示した最初の報告である。

シロイヌナズナ由来 Selenocysteine *Se*-methyltransferase ホモログの *in vivo* 及び *iv*

2

vitro 機能解析に向けた異種発現系の構築

○山中 一也、老川 典夫

(関大・化学生命工)

Development of an expression system for *in vivo* and *in vitro* characterization of the selenocysteine *Se*-methyltransferase homologue from *Arabidopsis*

○Kazuya Yamanaka¹, Tadao Oikawa¹,
(¹Fac. Chem. Mater. Bioeng., Kansai Univ)

【目的】セレン(Se)は幅広い生物において必須の微量元素である一方で、高濃度では致死的影响を引き起こす。種々の高等植物の内、Se 高蓄積植物として知られるレンゲソウ(*Astragalus bisulcatus*)やブロッコリー(*Brassica oleracea*)では、Se を *Se*-methylselenocysteine (*Se*-MeSeCys)として蓄積し、更に *Se*-MeSeCys は揮発性の dimethyl diselenide (DMDSe)へと代謝された後、生体外へ排出される。この Se 代謝における鍵酵素 selenocysteine methyltransferase (SMT)は、selenocysteine (SeCys)の *Se*-メチル化により非タンパク性アミノ酸である *Se*-MeSeCys への変換を特異的に触媒する酵素であり、SeCys から誘導され得る selenomethionine(SeMet)のタンパク質への取り込みを抑制することで、高濃度 Se 環境下での植物体への毒性緩和に寄与していると考えられる。モデル植物である *A. thaliana* (シロイヌナズナ)においては、レンゲソウ由来の SMT (Ab-SMT) と高い一次構造上の相同性を示す 3 つの Homocysteine *S*-methyltransferase (At-HMT-1, -2, -3) 遺伝子の存在が確認されており、これらの内、At-HMT-1 及び-2 においては SMT 活性を示さないことが既に示されているが、At-HMT3 については SMT 活性の評価は行われていないため、本酵素の Se 代謝への関与は不明なままである。そこで、Ab-SMT と高い相同性を示す At-HMT-3 の酵素科学的性質を明らかにし、シロイヌナズナにおける Se 代謝への関与を検証することを目的として、研究に着手した。

【方法】理化学研究所から入手した *A. thaliana* の cDNA クローン(RAFL19-23-M07)から PCR 増幅した *At-HMT3* 遺伝子を、pET-21b ベクターへクローン化し、汎用発現宿主である *Escherichia coli* BL21(DE3)における異種発現を試みたが、如何なる条件下においても不溶性顆粒(インクルージョンボディ)を形成し、機能的可溶性酵素として得ることは出来なかった。そこで、*At-HMT3* の可溶性発現検討に先立って、汎用 pET ベクターと完全な互換性を有し、可溶性発現の向上に高い効果を有することが知られているマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として目的タンパク質発現を実現する新規 MBP 融合タンパク質発現系の開発を行った。

【結果・考察】構築した MBP 融合タンパク質発現ベクターに *At-HMT3* 遺伝子をクローン化し、*E. coli* Rosetta (DE3)へ導入した。この組換え株は、期待した通り MBP-*At-HMT3* 融合タンパク質の大部分をサイトゾル可溶性タンパクとして生産した。また、C-末端ヘキサヒスチジンタグを介した Ni-アフィニティーシステムを用いた簡易精製により、MBP-*At-HMT3* 融合タンパク質を、SDS-PAGE 上で単一のバンドを示す精製タンパク質として得ることに成功した。本研究の過程で開発した新規 MBP 融合タンパク質発現ベクターを用いることにより、従来は不可能であった *At-HMT3* の可溶性発現化可能となった。今後、本酵素の *in vitro* での詳細な機能解析を進める予定である。

Sphingomonas bisphenolicum AO1 株の環境汚染物質分解能の向上と安定化

○松村 吉信¹、高 未麗²、

(関大・化学生命工¹、関大院・理工²)

3

Improvement of degradation capacity to environmental pollutants in
Shingomonas bisphenolicum AO1.

○Yoshinobu Matsumura¹, Miryo Koh²,

(¹Kansai Univ., ²Grad. Kansai Univ.)

【目的】 ポリカーボネート(PC)樹脂やエポキシ樹脂などの原料として大量に生産されているビスフェノール A (BPA) は内分泌攪乱物質として生態系に悪影響を及ぼすと示唆され、一部の PC 樹脂から BPA が溶出する事例も報告されている。このようなことからカナダでは子供用の飲用ボトルへの PC 樹脂の使用が禁止されると共に工場からの BPA 排出規制も設けられている。当研究室では BPA を完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株をつくば市の畑土壌から単離し、本菌の BPA 代謝経路を推定すると共に BPA 分解の初発反応に関わるシトクロム P450 モノオキシゲナーゼシステムの構造遺伝子 (*bisdAB*) が4種類のプラスミドの一つである pBAR1 にコードされていることを明らかにした。また、AO1 株は BPA 以外にビスフェノール類化合物、ビスフェニル類、有機塩素系化合物なども分解できるため、広範な環境汚染物質分解菌として活用できるものと考えている。しかし、AO1 株から BPA 分解能を失った AO1L 株が単離され、AO1 株の分解能の不安定性が実用化への障害となっている。これまでの研究で、pBAR1 の遺伝子構造の不安定性がその一因であると確認された。また、BPA 以外の環境汚染化合物の分解速度も BPA 分解ほど早いものではなく、さらなる改良が必要であると考えられている。本研究では、次世代シーケンサーを用いて AO1 株のゲノム構造を明らかにし、BPA を含む環境汚染物質分解関連遺伝子の特定と環境汚染物質分解能の向上並びにその安定化を目的とした。

【方法・結果】 AO1 株のゲノム DNA を次世代シーケンサー (Roche 社製と Illumina 社製) で解析し、得た断片配列を Newbler (Roche 社) でアセンブルした結果、総塩基数は 5,100,996 bp となり、98 個のコンティグに集約された。また、pBAR1 についてはこれまでのキャピラリー型電気泳動法での解析と次世代シーケンサーデータとの統合により総塩基数 80,317 bp と判明され、67 個の遺伝子が推定された。BPA 分解関連酵素遺伝子として、BPA の初発分解に関わる *bisd AB*、*adh*、*lsd*、*bisdF* が確認され、一方で有機塩素分解の初発反応に関わると示唆されている *had* も確認された。トランスポサージ遺伝子が 14 個、接合伝達に関わる遺伝子が 21 個も推定され、pBAR1 の遺伝子の約半数が DNA 断片の可動に関わるものであり、これらの存在が pBAR1 の不安定性に関していると予想している。現在は、全自動アノテーションシステムである RAST server を使用し、全ゲノム遺伝子のアノテーションを進めると共に BPA を始めとする環境汚染物質代謝経路の推定を試みている。次に、AO1 株の BPA 分解能の向上と安定化を遺伝子組換え法を用いて試みた。BPA 分解関連酵素遺伝子 *bisd AB*、*adh*、*lsd*、*bisdF* を保持するプラスミドを作製し AO1 株に導入した結果、顕著な BPA 分解能の向上は確認できなかったが、AO1L 株へ導入した結果、BPA 分解能の回復は確認できた。今後は高発現プロモーターを用いた改良プラスミドを作製し、BPA 分解能の向上を試みる予定である。

神経突起伸長に関わるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構
山添 亮輔¹、青山 大輝²、松浦 玖実²、谷尾 啓介²、○下家 浩二²
(関大・先端機構¹、関大・化学生命工²)

4

The molecular mechanisms leading to neurite outgrowth
via specific gene expression and its epigenetic control

Ryosuke Yamazoe¹, Hiroki Aoyama², Kumi Matsuura²,
Keisuke Yatsuo², ○Koji Shimoke²

(¹ORDIST, Kansai Univ., ²Fac. Chem. Material. Bioengin., Kansai Univ.)

【目的】これまでに当研究室では、*nur77* 遺伝子が神経突起伸長に重要な働きを担っていることを見出してきた。この *nur77* 遺伝子産物である Nur77 は転写因子として知られているが、常時、核内に局在しているのではなく細胞質基質内にも存在する特殊な転写因子である。そこで、この Nur77 の作用で発現上昇する下流に位置する遺伝子を同定し、Nur77 に関する分子機能の解析を行うことで更なる特殊性の有無やエピジェネティックに発現制御する仕組みの有無などを見出すことを目的としている。

【方法】神経突起を伸長させる能力を有する PC12 細胞に対し、細胞内 cAMP 濃度を上昇させるフォルスコリン (FSK) やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤 (HDACi) を添加し、24、48 時間後の神経突起長を測定した。同様に E17 ラット大脳皮質神経細胞の DIV0 から DIV1 にかけて HDACi やビスフェノール A (BPA) を添加し、神経突起長を測定した。また、それらの細胞抽出液中の *nur77* 遺伝子の mRNA を RT-PCR 後、アガロース電気泳動に供し EtBr 染色後に検出した。Nur77 やその下流に存在する遺伝子産物群の発現は western blotting により検出した。同時に、histone H3 の修飾の有無も特異的抗体を用いて western blotting により検出した。さらに、*neuroD* 遺伝子の上流約 2 kb をクローニングし、レポーターアッセイを行い、Nur77 が *neuroD* 遺伝子の発現に関与するかを確認した。HDACi によって発現上昇する遺伝子群は、次世代シーケンサーを用い、14 番目のリシン残基がアセチル化された histone H3 の抗体 (抗 K14 H3 抗体) による ChIP-sequence を行うことで見出した。

【結果・考察】FSK や HDACi を添加すると 24 時間後に有意な神経突起の伸長が観察された。その際、Nur77 の発現の上昇も観察された。そこで、*nur77* 遺伝子に対するエピジェネティックな制御について解析したところ、FSK 添加後 1-2 時間において、histone H3 にある 14 番目のリシン残基のアセチル化 (Ac14H3) の亢進を見出した。また、*nur77* 遺伝子のプロモーター領域と histone H3 のリシン 14 番目のアセチル基とが結合することを ChIP アッセイにより明らかにした。Nur77 による発現調節遺伝子群を解析した所、*synapsin1* と *neuroD* を見出すことが出来た。*neuroD* については、レポーターアッセイによっても下流に位置する遺伝子として確認することが出来た。次に、Ac14H3 と共にどのような遺伝子産物が *nur77* 遺伝子上流のプロモーター領域に結合しているかを解析するために、HDACi 添加後の細胞抽出液を回収し、抗 Ac14H3 抗体による ChIP-Sequence 解析を実施した。その結果、20 個の遺伝子が同定された。

セレン曝露がシロイヌナズナの遺伝子発現量に及ぼす影響

○細見 亮太、廣瀬 侑太郎、吉田 宗弘

(関大・化学生命工)

5

Influence of Selenium Exposure on Gene Expression Profiles in *Arabidopsis thaliana*

○Ryota Hosomi, Yutarou Hirose, Munehiro Yoshida

(Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University)

【目的】 セレン(Se)は高等動物、および一部の細菌類においては、酵素機能などを持つタンパク質中にセレノシステイン残基として存在しており、生存に必須の微量元素である。一方、植物においては、Se を特異的に要求するタンパク質は発見されていないが、高セレン環境下における Se-メチルセレノシステインをはじめとする特殊な含セレンアミノ酸の生成が知られている。このような特殊なアミノ酸の生成は、高 Se 環境下の植物において特異的な代謝系が誘導されることを示唆している。本研究では、高等植物が持つ基本的な遺伝子を備えたシロイヌナズナに亜セレン酸を段階的に添加し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によって、亜セレン酸投与に伴い変化の生じる代謝系を検索した。

【方法】 亜セレン酸ナトリウム濃度 0、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とする寒天培地を用いて、シロイヌナズナを無菌的に、長日条件の光周期のもと、25°C で開花段階まで培養した。シロイヌナズナの茎頂部から総 RNA 抽出を行い、各 50 ng の総 RNA を用いて、ラベリング反応を行った。DNA チップは *Arabidopsis* オリゴ DNA マイクロアレイ Ver. 4.0 を使用した。ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャンにより遺伝子発現強度を数値化し、各サンプル間で遺伝子発現量を比較した。発現量が 10 倍以上および 0.1 倍以下に変動しているものを抽出し、GO Biological Process のアノテーションに基づき Gene-Annotation Enrichment Analysis を行った。また Pathway 解析は DAVID において KEGG を利用して解析した。

【結果・考察】 培地中の亜セレン酸ナトリウム濃度が 1 または 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合、開花段階までの日数は亜セレン酸ナトリウム未添加の対照と大差がなかったが、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合は明らかに長かった。また各シロイヌナズナ中の Se 濃度は用量依存的に上昇していた。マイクロアレイでの遺伝子発現解析においては、亜セレン酸ナトリウム未添加を対照として比較すると、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの添加では遺伝子発現量の変化は大きくなかったが、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の添加では遺伝子発現量の大きな変化が認められた。未添加と亜セレン酸曝露 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を比較すると、10 倍以上変動した遺伝子は 5368 遺伝子あり、そのうち 868 遺伝子は上方制御され、4500 遺伝子は下方制御されていた。発現低下した遺伝子セットには、主に細胞周期、生長、花粉発育に関わる GO term が顕著に濃縮されていた。個別に発現変化量の大きい遺伝子を検索したところ、亜セレン酸代謝に関連するグルタチオン合成系のグルタチオン-S-トランスフェラーゼとセレノシステインをセレンとアラニンに分解するセレノシステイン β -リアーゼの遺伝子が含まれていた。亜セレン酸曝露下のシロイヌナズナでは、亜セレン酸によるグルタチオンの消費と過剰に生成したセレノシステインに対応するための代謝充進が生じていると推定できる。一方、セレノシステインメチルトランスフェラーゼのホモログであるホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ 1 および 2 遺伝子発現量は 0.22 および 0.64 倍に減少していた。GC-MS による Se 化合物の同定を検討したが、セレノシステイン、セレノメチオニン、セレノシスチン、Se-メチルセレノシステインでないことが明らかになった。

セレン曝露が植物スプラウトに与える影響と健康機能性の評価

○吉田 宗弘、細見 亮太

(関大・化学生命工)

6

Effects of Cruciferous Sprout, was Exposed of Selenium
on growth parameters in plant and health functions in mice

○Munehiro Yoshida, Ryota Hosomi

(Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University)

【目的】セレン(Se)は高等動物、および一部の細菌類においては生存に必須の微量元素である。一方、植物においてはSeを特異的に要求するタンパク質は発見されていないが、高Se環境下においてはSeメチルセレンシステイン(MeSeCys)をはじめとする特殊な含Seアミノ酸の生成が知られている。このような特殊な含Seアミノ酸の中には、抗腫瘍効果などの機能を有するものが存在しており、機能性食品や医薬品の原料として注目を集めている。しかし、Seはきわめて有害な元素であり、多くの植物は高Se環境に対する耐性が小さい。したがって、高Se環境に対する耐性が大きく、含Seアミノ酸を効率良く生産できる種を選抜する必要がある。植物種子を水耕栽培によって発芽・生育させることによって得られるスプラウトは、閉鎖環境下で短期間に相当量の植物体を得ることができるため、Seのような有害性も大きい物質を植物に取り込ませるにあたって有用と考えられる。以上より、本研究では、いくつかの植物種子を高Se環境下・水耕栽培によって発芽・生育させ、高Se環境への耐性の大きな植物種の選抜を試みた。さらに高Se曝露により生産したカイワレダイコンスプラウトの摂取が大腸前癌病変形成に及ぼす影響について検討した。

【方法】**植物スプラウトの生育**:高Se環境下での発芽と生育を検討した植物種は以下の12種である。アブラナ科、カイワレダイコン、ブロッコリーとブロッコリー・シャスター、カラシナ、ガーデンクレス、クレソン、ルッコラ:マメ科、リョクトウ、シロツメクサ:ヒガンバナ科、タマネギと黄玉葱:セリ科、パセリ。クリーンカップに脱脂綿を敷き、その上に各種子(100-150粒以上)を並べた。この状態で、水または10 ppmのSe(亜セレン酸ナトリウム)を含む溶液50 mLを静かに注ぎ、種子を浸した。そして発芽するまで暗所25°Cに静置し、発芽後は明所25°Cに置き、1週間前後生育させた。**大腸前癌病変への影響**:4週齢の雄A/Jマウスを無作為に7群にわけ、低セレン餌料(対照群餌料)給餌による1週間の予備飼育後、セレン欠乏餌料に対し0.1もしくは2.0 ppmになるよう亜セレン酸ナトリウムまたはSe曝露カイワレスプラウト粉末を混合した餌料を給餌した。餌開始と同時に大腸前癌病変(ACF)誘起物質である1,2-ジメチルヒドラジン(DMH:15mg/kg)を背部に皮下投与(週1回9週)した。飼育終了後、麻酔下で大腸を摘出しACFを計測した。

【結果・考察】**植物スプラウトの生育**:検討した12種中、ブロッコリー、クレソン、ルッコラ、シロツメクサ、パセリの5種はSe曝露下ではまったく発芽しなかった。また、カラシナ、ガーデンクレスの2種は、発芽したものの、途中でカビがはえて生育しなかった。したがって、検討した12種の中で、1週間以上生育させることができたのは、タマネギ、黄玉葱、カイワレダイコン、リョクトウモヤシ、ブロッコリー・シャスターの5種だけであった。**大腸前癌病変への影響**:セレン欠乏餌料群では大腸の平均ACF数は4.3であったが、セレンの添加により有意にACF数が抑制されていた。また2.0 ppmのSe曝露カイワレスプラウト粉末給餌群は、亜セレン酸給餌群よりもACF数が低下する傾向にあった。Se曝露によってカイワレスプラウト中に蓄積されたMeSeCysが、大腸前癌病変抑制効果を発揮したと推測される。

構造基盤研究—アスパラギン酸ラセマーゼの温度環境適応

○畑 安雄¹、藤井 知実¹、山内 貴恵¹、老川 典夫²

(京大・化研¹、関大・化学生命工²)

7

Structural Studies on Temperature Adaptation of Aspartate Racemase

○Yasuo Hata¹, Tomomi Fujii¹, Takae Yamauchi¹, Tadao Oikawa²,

(¹Institute for Chemical Research, Kyoto University, ²Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University)

【目的】 近年、D-アミノ酸が生体内や食品中などから発見され、その重要性に着目した研究が活発になされようになってきている。アミノ酸のラセミ化を触媒するラセマーゼの研究も同様である。我々は、低温環境下で生育する乳酸菌 *Lactobacillus sakei* NBRC 15893 由来の低温～常温性アスパラギン酸ラセマーゼ (LsAspR、サブユニットあたり 234 残基) と 90℃以上の極限環境下で生育し 95℃で最大活性を示す超好熱性古細菌 *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来アスパラギン酸ラセマーゼ (TlAspR、サブユニットあたり 228 残基) の立体構造を X 線結晶解析により決定し、両構造を比較することによりタンパク質の温度環境に対する適応機構の解明を試みた。

【方法】 両酵素は 20℃のシッティングドロップ蒸気拡散法で結晶化された。LsAspR は 20mg/ml 濃度のタンパク質溶液と 25%(v/v) PEG-MME550、5%(v/v) 2-プロパノール、0.1M 酢酸ナトリウム (pH4.8) の沈殿剤溶液で、TlAspR は 12mg/ml 濃度のタンパク質溶液と 24% (w/v) PEG1500、0.2 M L-プロリン、0.1 M HEPES (pH7.5) の沈殿剤溶液で結晶が得られた。データ収集は PF の放射光を用いて -173℃で行った。分子置換法で初期位相を決定した後分子モデルの修正と精密化を繰り返し、LsAspR は 2.6Å分解能で、TlAspR は 1.6Å分解能で結晶構造を決定した。

【結果・考察】 AspR 分子は二個の同一サブユニットからなる分子内に二回回転対称軸をもつ二量体であり、N 末端側ヘリックス同士を接近させて二量体を形成している。LsAspR では、A-サブユニット 231 残基、B-サブユニットが 223 残基が明瞭な構造を採っていた。TlAspR では、A-サブユニット 226 残基、B-サブユニット 227 残基が明瞭な構造を採り、A-サブユニットでは結晶化に用いた L-プロリン 1 個が結合していた。各サブユニットは N-末端ドメイン (TlAspR では残基番号 1-101 と 213-228) と C-末端ドメイン (TlAspR では残基番号 102-212) の二つのドメインからできていて、各ドメインは中央 β-シートの周辺に α-ヘリックスが存在する構造をとっている。両ドメイン間の隙間に活性部がある。隙間中で厳密に保存されたシステイン残基や正電荷を帯びた残基の空間配置から、LsAspR の活性残基は Cys84 と Cys196、TlAspR では Cys83 と Cys194 であると考えられ、各酵素の二個のシステインは互いに向かい合っている。TlAspR では、LsAspR に比べて二量体形成面で各サブユニットの β-シート間や α-ヘリックス間の水素結合や疎水性相互作用が多く生じている。また、LsAspR に比べてイオン対の数が多く、分子表面ではイオン対のネットワークが形成されている。更に、分子の体積は、LsAspR に比べて TlAspR の方が小さく、TlAspR はよりコンパクトで硬い構造をとっているようである。このように、TlAspR は分子表面やサブユニット間の相互作用を強化することにより立体構造を安定化させて耐熱性を得ていると考えられる。

Bacterial adaptation mediated by genomic segmental amplification

○Takashi Inaoka, Shiori Motoyama, Wannasiri Wannarat, Katsue Kusafusa
(National Food Research Institute, NARO)

【目的】 細菌が薬剤耐性を獲得する遺伝的要因には、突然変異のほか、耐性遺伝子を含むゲノム領域の多コピー化(ゲノム重複)がある。このようなゲノム重複を介した薬剤耐性化においては、環境中の選択圧により生存に適したコピー数の耐性遺伝子を有する細胞が選抜されるため、ゲノム中の遺伝子コピー数は環境中の薬剤濃度変化に応じて増減することになる。細菌の薬剤耐性変異に関する研究は数多くあるが、ゲノム重複を介した薬剤耐性に関する研究は少なく、その知見は極めて乏しい。そこで我々は、ゲノム重複を介した細菌の薬剤耐性機構について研究を行っている。

【方法】 枯草菌や大腸菌等から抗生物質耐性変異株を取得し、定量 PCR にて耐性遺伝子のコピー数を測定することによってゲノム重複株を選抜した。重複領域の同定には、定量 PCR や次世代シーケンサー等を用いて決定した。

【結果・考察】 ゲノム重複は、最初の2コピー化ステップとその後の多コピー化ステップの2段階のステップによって進行すると考えられている。最初の2コピー化ステップは RecA に依存した相同組換え又は RecA に依存しない非相同組換えのいずれかによって進行するが、多コピー化ステップでは2コピー化ステップにより生じた相同配列間で RecA に依存した相同組換えにより進行すると考えられている。

枯草菌 168 株はゲノム中にテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetB*)を有しており、高頻度で *tetB* 遺伝子を含む領域の重複が起こることがわかった。*tetB* 遺伝子の両側には約 180bp の直列反復配列が存在するにもかかわらず、93% (55 株/59 株) の遺伝子重複株が非相同配列間で遺伝子重複を起こしていた。一方、大腸菌 W3110 株では、アンピシリン耐性株の 3.8% (8 株/208 株) において多剤排出システム AcrAB をコードする遺伝子を含む領域が2コピー化することがわかった。また、サルモネラではセフトキシム耐性株において CMY-2 β -ラクタマーゼ遺伝子を含む領域が多コピー化することも明らかになった。これら大腸菌及びサルモネラの遺伝子重複株のすべてにおいて、同じ挿入配列(IS)で挟まれた領域が重複していたことから、大腸菌やサルモネラでは主に相同配列間で RecA に依存した遺伝子重複が起こりやすいと考えられる。このように枯草菌ではゲノム重複は配列に依存せず、ゲノム上のあらゆる場所でランダムに生じるのに対して、大腸菌やサルモネラでは IS 等の相同配列で挟まれた特定の領域で遺伝子重複が生じやすくなっているものと推察できる。

9

Utilization of next-generation sequencer in plant research

○Yoshihiro Takemura¹ (Faculty of Agriculture, Tottori University)

【目的】大量の配列情報を読み解くことができる次世代シーケンサーの利用は、ゲノムサイズが大きい高等植物へも広がっており、植物科学研究、農学研究にも革新的な変革をもたらしつつある。次世代シーケンサーを活用することで、非モデルの植物における分子機構の解明も容易となり、新たな遺伝子マッピング法による有用遺伝子の同定は、農作物の育種においても重要視されている。私たちは、このような優れた次世代シーケンサーの特性を利用して、明期終了時の短時間遠赤色光照射 (EOD-FR) 処理がトルコギキョウの成育に及ぼす生理的作用を明らかにし、梨においては低温要求性に関与する DNA マーカーの探索を目的としての RAD-seq 解析を行った。

【方法】『トルコギキョウへの EOD-FR 処理の影響』トルコギキョウ‘ボレロホワイト’を用い、遠赤色光を日没直前から 3 時間照射する EOD-FR (EOD) 処理区と照射を行わない対照区を設けた。処理開始日から約 2 週間後に採取した両処理区の葉を用い、HiSeq2000 (illumina) による RNA-seq 解析を行った。de novo アセンブリ後は、両処理区間で有意な発現量の差を示す遺伝子 (FDR \leq 0.001) を DEG として選抜し、GO 解析および KEGG パスウェイ解析を行った。

『梨の低温要求性に関与する DNA マーカーの探索』梨の芽の自発休眠打破に必要な低温要求量が少ない台湾梨と日本梨の後代である F₂ 系統から、少低温要求性および多低温要求性個体を選抜し RAD-seq 解析を行った。4 塩基認識 (MseI) および 6 塩基認識 (EcoRI) の 2 種の制限酵素を用い、シングルカットおよびダブルカットの断片を併用しての ezRAD-seq を行った後、de novo アセンブリ後に RAD タグ配列内の SNPs や INDELS を個体間で比較した。

【結果・考察】『トルコギキョウへの EOD-FR 処理の影響』対照区と EOD 処理区の主茎長は、それぞれ 8.1cm および 13.4cm であり、平均節間長の値も EOD 処理区で有意に高かった。また、RNA-seq 解析の結果から、処理区間で有意な発現量の差を示す 1,082 個の DEG が選抜され、対照区および EOD 処理区においてそれぞれ 462 および 602 個が DEG として得られた。KEGG パスウェイ解析の結果からは、EOD 処理により発現量が増加する DEG としてジベレリンの合成に関与する *GA20ox* をコードする遺伝子が確認され、処理後 3 時間後の茎における同遺伝子の発現量は、対照区に比べ 10 倍以上の高い値を示した。さらに DEG の中からは、ジベレリンによる誘導と細胞伸長への関与が報告されている転写因子 *PRE1* と高い相同性を示す *bHLH135* (CL7761) が確認され、EOD 処理によるこれらの遺伝子の発現量の増加が初期成育の節間伸長に影響を及ぼしていると推察された。

『梨の低温要求性に関与する DNA マーカーの探索』RAD-seq 解析により、台湾梨と日本梨との間で 56,719 の多型 (SNPs や INDELS) が同定され、そのうち台湾梨のみが保有していた多型は 23,083 個、日本梨のみが保有していた多型は 8,803 個であった。残りの多型の中から、少低温要求性 F₁ 個体がヘテロで保有する多型を選抜し、両 F₂ グループ間で得られた SNP-index をもとに少低温要求性に関与する変異箇所を 50 個に絞り込んだ。現在は、変異箇所から作成した SNP マーカーを使っての F₂ 個体と低温要求量の分かっている品種におけるバンドパターンの解析、育種への適応性試験を行っている。なお、この研究は「東京農業大学生物資源ゲノム解析センター生物資源ゲノム解析拠点事業における共同研究」として行った。

ヘテロクロマチン形成の分子機構
三島優一、木村博信、高橋紗央里、○末武勲
(阪大・蛋白研)

10

Molecular mechanism for heterochromatin formation
Yuichi Mishima, Hironobu Kimura, Saori Takahashi, ○Isao Suetake
(Institute for Protein Research, Osaka Univ.)

【目的】細胞核内では、DNA はヒストン分子の上に巻き、折りたたまれた形で存在し、その存在様式は大きく分けてユークロマチンとヘテロクロマチンの2つに分類される。ユークロマチンからは遺伝子発現される一方、ヘテロクロマチンでは発現されないことが分かっている。しかし、このクロマチン構造が、どのように形成・維持されるかについての分子機構は、明らかになっていない。その分子機構を明らかにすることを目的とする。

ヘテロクロマチンでは、ヒストン H3 の 9 番目のリシンがメチル化され、ヘテロクロマチン形成、維持には、この修飾に特異的に結合するヘテロクロマチンタンパク質1 (HP1) が重要であることが分かっている。しかし、HP1 とヒストン修飾との結合は、修飾ペプチドを基質にした研究がほとんどで、細胞核内での最少構成単位であるヌクレオソーム(ヒストンに DNA が巻きついている)に対する結合様式については明らかにされていない。本研究では、試験管内でヌクレオソームを再構成し、その結合様式を明らかにする。

【方法】リシン残基のメチル化には、3 種類(モノメチル、ジメチル、トリメチル)あり、ヒストン分子上には多数のリシンが存在する。このような条件でも、私たちは 9 番目のリシンだけをトリメチル化したヒストン H3 を調整することに成功したので、他のヒストン(H2A,H2B,H4)と混合し、ヒストン H3 の K9 だけがトリメチル化されたヌクレオソームを試験管内で再構成した。調製したヌクレオソームを用いて、HP1 の結合様式を詳細に試験管内で調べた。

【結果・考察】哺乳類の HP1 には、 α 、 β 、 γ の 3 種類がある。HP1 α は、ヘテロクロマチンに局在し、分子内のクロモドメインで、メチル化された K9 を認識するといわれている。しかし、より生体に近いヌクレオソームを基質にしたところ、クロモドメインに引き続きヒンジ領域が結合に正に働き、それに続くクロモシャドウドメインが負に制御することを見出した(Mishima et al., 2013)。

HP1 α のノックアウトマウスは致死とならない一方、HP1 γ は雄性生殖細胞の分化に必須である。細胞核内での局在も、HP1 α と違い、HP1 γ は必ずしもヘテロクロマチンに局在化しない。しかし、これまでのペプチドを基質に用いた研究では、両 HP1 に違いが見られず、生理機能の差異を分子レベルで説明することはできなかった。私たちは、ヌクレオソームを基質に用いることで、HP1 γ は単純に K9 のメチル基だけを認識するのではなく、ヌクレオソーム高次構造まで同時に認識することを示すことができた(Mishima et al., 2015)。つまり HP1 γ は、HP1 α と異なる結合様式を示すことが明らかになった。この性質は、ヘテロクロマチン形成・維持に関わる分子機構の解明の手掛かりを与えることになる。今後の分子レベルの研究により、エピジェネティックな制御機構をより詳細に分子レベルで理解できると期待している。

1. Mishima Y, Jayasinghe CD, Lu K, Otani J, Shirakawa M, Kawakami T, Kimura H, Hojo H, Carlton P, Tajima S, Suetake I*. (2015) Nucleosome compaction facilitates HP1 γ binding to methylated H3K9. *Nucl. Acids Res. In press.*
2. Mishima Y, Watanabe M, Kawakami T, Jayasinghe CD, Otani J, Kikugawa Y, Shirakawa M, Kimura H, Nishimura O, Aimoto S, Tajima S, and Suetake I*. (2013) Hinge and chromoshadow of HP1 α participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *J. Mol. Biol.* **425**, 54-70.