

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

## 研究進捗状況報告書の概要

### 1 研究プロジェクト

学校法人名	学校法人 関西大学	大学名	関西大学
研究プロジェクト名	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		
研究観点	研究拠点を形成する研究		

### 2 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

これまでの生命科学の進歩は、遺伝子 DNA の塩基配列(ゲノム情報)の解読による所が大きい。この過程には、Sangerシーケンシング法を用いた蛍光キャピラリーDNA シーケンサーが貢献してきた。本学でも、ハイテク・リサーチ・センター整備事業や戦略的研究基盤形成支援事業で、当時の最新の蛍光キャピラリーDNA シーケンサーが導入され、研究を促進してきた。しかし、近年の生命科学では、さらに進化した次世代 DNA シーケンサーが登場し、逐次 DNA 合成を用いた超並列シーケンシングとメタゲノム解析(生物群のなかの多数の個体のゲノム情報を同時に得る)が可能となり、これを用いたゲノムとエピゲノム解析が急速に進んでいる。しかし、私立大学にはこの次世代 DNA シーケンサーがほとんど導入されていないため、従来の微生物のジェネティクスの研究成果や神経細胞の神経突起伸長におけるエピジェネティクスの研究成果、植物細胞の遺伝的機能解析の研究成果を発展させることが困難であった。本プロジェクトでは、次世代 DNA シーケンサーのベンチトップ型を導入し、従来はできなかったメタゲノム解析を含むゲノム・エピゲノム解析を共同で行う。同一の研究方法のもとに連携し発展させ、DNA シーケンサーを目的別に性能評価し、最適で能率的な解析手段を採用することにより、従来の研究成果を飛躍的に発展させる。そして、ヒトの健康向上を目指し、有用微生物(D-アミノ酸生産菌、環境ホルモン分解菌)の全ゲノム解析による分子育種、有害微生物(食品汚染菌)の全ゲノム解析による防除法開発、動物神経細胞のエピゲノム解析による神経変性疾患の治療法開発、植物細胞のエピゲノム解析による機能性食品の開発を行うことにより、世界的な健康生命研究拠点を形成することを目的とする。また、多方面の研究分野を包括し発展させ、ヒトの健康向上と世界的な健康生命研究拠点形成を目指して、生物種の違いにより3研究チーム(微生物ゲノム研究チーム、動物細胞エピゲノム研究チーム、植物細胞エピゲノム研究チーム)が共同研究を行う。

### 3 研究プロジェクトの進捗及び成果の概要

微生物ゲノム研究チームでは、老川、山中が日本酒醸造工程から単離された乳酸桿菌 2 株(*Lactobacillus sakei* LT-13、*L. sakei* LK-145)及び乳酸球菌 2 株(*Leuconostoc mesenteroides* LT-38、*L. mesenteroides* LK-151)の4株の乳酸菌を対象として、本事業で導入した次世代 DNA シーケンサーを用い、4株すべての乳酸菌ゲノムのドラフト配列マップを構築することに成功するとともに、新規 D-アミノ酸代謝関連酵素を発見した。また松村は、ビスフェノール A(BPA)分解能を有する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を対象として、本事業で導入した次世代 DNA シーケンサーを用い本菌ゲノムの *de novo* 解析を行い、本菌ゲノムのドラフト配列マップを構築することに成功した。また、食品汚染菌である枯草菌には過酸化水素や有機ペルオキシドに対する未知の耐性化因子が存在することを明らかにした。

動物細胞エピゲノム研究チームでは、池内、下家、木村(学外研究員)は、本事業で導入した次世代 DNA シーケンサーを用いて抗 Ac14H3 抗体による ChIP-Seq(chromatin immunoprecipitation-sequence)解析を実施し、PC12 細胞の神経突起伸長作用を有する Nur77 遺伝子(*nur77*)プロモーターの活性化が 20 個の遺伝子(*vom2r3*, *srd5a1*, *papd7*他)によることを明らかにした。

植物細胞エピゲノム研究チームでは、吉田及び細見は、双子葉モデル植物であるシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)を対象として、培地への亜セレン酸添加が同植物の mRNA の発現量に及ぼす影響と、Selenocysteine methyltransferase のホモログ遺伝子である Homocysteine S-methyltransferase (At-HMT-3)の *in vitro* における機能解析を行い、亜セレン酸添加によってグルタチオン-S-トランスフェラーゼとセレノシステインβ-リアーゼ等の遺伝子の発現量が増加していることを明らかにした。また山中は、At-HMT-3 について、大腸菌を宿主とする発現系の構築を行い、不溶性画分への発現に成功した。また丸岡(学外研究員)は、Nur77 が転写因子として作用し得る下流の遺伝子群についての機能解析を実施した。

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

**平成 25 年度選定「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」  
研究進捗状況報告書**

1 学校法人名 学校法人 関西大学                      2 大学名 関西大学

3 研究組織名 ゲノム・エピゲノム研究ユニット

4 プロジェクト所在地 大阪府吹田市山手町3丁目3番35号

5 研究プロジェクト名 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

6 研究観点 研究拠点を形成する研究

7 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
老川 典夫	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科	教授

8 プロジェクト参加研究者数 8 名

9 該当審査区分 理工・情報                      生物・医歯                      人文・社会

10 研究プロジェクトに参加する主な研究者

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
老川 典夫	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	微生物のゲノム解析	全体総括、研究チーム1の総括、D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種
松村 吉信	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授 (前:准教授)	微生物のゲノム解析	環境ホルモン BPA 分解菌 <i>Sphingomonas</i> 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種
下家 浩二	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	動物細胞のエピゲノム解析	神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発(ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC 阻害剤系を中心に)
吉田 宗弘	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	植物細胞のエピゲノム解析	研究チーム 3 の総括、セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と機能性食品の開発
細見 亮太	先端科学技術推進機構・ 化学生命工学部・助教	植物細胞のエピゲノム解析	セレン(Se)に着目した新しい機能性食品の開発
山中 一也	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・准教授	植物細胞のエピゲノム解析 微生物のゲノム解析	セレン(Se)に着目した新しい機能性食品の開発 D-アミノ酸に着目した新しい機能性食品の開発
(共同研究機関等) 木村 博信	大阪大学・ 蛋白質研究所・助教	動物細胞のエピゲノム解析	神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究
丸岡 弘規	倉敷紡績・ 技術研究所・研究員	植物細胞のエピゲノム解析	セレン耐性植物(及び神経細胞)のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究

(様式1)

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

## &lt;研究者の変更状況(研究代表者を含む)&gt;

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
微生物のゲノム解析	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	土戸 哲明	食品汚染菌の全ゲノム解析と 食品汚染菌の防除法の 開発

(変更の時期:平成 26 年 4 月 1 日)



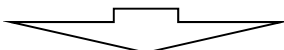
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
鳥取短期大学・ 生活学科・助教	先端科学技術推進機構・ 化学生命工学部・助教	細見 亮太	セレン(Se)に着目した 新しい機能性食品の開発

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
動物細胞のエピゲノム 解析	先端科学技術推進機構・ 研究員	池内 俊彦	神経細胞のエピゲノム解析とゲノ ム DNA のメチル化機構の研究

(変更の時期:平成 27 年 4 月 1 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
JNC 株式会社・ 主任研究員	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・准教授	山中 一也	セレン(Se)に着目した新しい機 能性食品の開発 D-アミノ酸に着目した新しい機 能性食品の開発

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

## 11 研究進捗状況(※ 5枚以内で作成)

### (1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

本プロジェクトでは、次世代 DNA シーケンサーのベンチトップ型を導入し、それにより従来はできなかったメタゲノム解析を含むゲノム・エピゲノム解析を共同して行う。同一の研究方法のもとに連携し発展させ、DNA シーケンサーを目的別に性能評価し、最適で能率的な解析手段を採用することにより、従来の研究成果を飛躍的に発展させる。そして、ヒトの健康向上を目指し、有用微生物(D-アミノ酸生産菌、環境ホルモン分解菌)の全ゲノム解析による分子育種、有害微生物(食品汚染菌)の全ゲノム解析による防除法開発、動物神経細胞のエピゲノム解析による神経変性疾患の治療法開発、植物細胞のエピゲノム解析による機能性食品の開発を行うことにより、世界的な健康生命研究拠点を形成することを目的とする。本プロジェクトでは、次世代 DNA シーケンサーという同一の研究方法のもとに、多方面の研究分野を包括し発展させ、ヒトの健康向上と世界的な健康生命研究拠点形成を目指して、生物種の違いにより 3 研究チーム(微生物ゲノム研究チーム、動物細胞エピゲノム研究チーム、植物細胞エピゲノム研究チーム)が共同研究を行う。

### (2) 研究組織

#### 【研究代表者の役割】

研究代表者は、全体の責任者としてプロジェクト全体を統括し、研究を円滑に進めている。

#### 【各研究者の役割分担や責任体制】

研究体制は、対象とする生物種の違いにより 3 研究チームから構成するが、生物種の枠を越えて、またゲノム・エピゲノムの枠を越えて、同一の研究方法のもとに連携を図っている。3 研究チームは、微生物ゲノム研究チーム(研究チーム 1)、動物細胞エピゲノム研究チーム(研究チーム 2)、植物細胞エピゲノム研究チーム(研究チーム 3)とし、研究チーム 1 を老川が、研究チーム 2 を下家(当初は池内が担当していたが退職に伴い平成 27 年 4 月から担当変更)、研究チーム 3 を吉田が統括する。また山中は、研究チーム 1 及び 3 に所属し、チーム間の連携を強化している。

#### 【プロジェクトに参加する研究者の人数、院生・PD の人数と活用状況】

研究活動を推進するために、8 名の各研究者の下、研究チーム 1 では、PD1 名、定時職員 2 名、院生のべ 7 名(内 RA4 名)、学部生のべ 9 名、研究チーム 2 では、院生のべ 6 名、学部生のべ 8 名、研究チーム 3 では定時職員 1 名、院生のべ 4 名(内 RA4 名)がプロジェクトに参加し、若手の育成にも貢献している。

#### 【研究グループ間の連携状況】

(プロジェクト評価体制より抜粋)各研究チーム内の研究発表会を 1 ヶ月に 1 度、全体のプロジェクト会議を 6 ヶ月に 1 度実施し、生物種の枠を越えて、またゲノム・エピゲノムの枠を越えて連携を図っている。研究者が複数のチームに在籍し、連携の強化を図っている。

#### 【研究支援体制】

本学先端科学技術推進機構の全面的な管理事務のバックアップの他、試薬や機器等の購入、PD の雇用などに当たり大学の法人部局や進捗状況のチェックする研究推進部からも万全の支援を得ている。

#### 【共同研究機関等との連携状況】

客員研究員(中田氏)とは月 2 回メール会議をしている。学外共同研究員(木村氏、丸岡氏)とは月 1-2 回の頻度で会議をしている。メールでも頻繁にやり取りし、学内研究発表会において進捗状況報告や研究に関する討論を行っている。

### (3) 研究施設・設備等

#### 【研究施設の面積及び使用者数】

HRC302 室:46.62 m<sup>2</sup>(6 名/日), HRC303 と 304 室:71.207 m<sup>2</sup>(6 名/日), HRC305 室:101.678 m<sup>2</sup>(8 名/日)  
第 4 実験棟動物飼育室:28.5 m<sup>2</sup>(3 名/日), 2015 年度に整備。動物実験は、関西大学動物実験委員会の規定に基づいて実施。

#### 【主な研究装置、設備の名称及びその利用時間数等】

- ①イルミナ次世代シーケンサーMiSeq システム:350 時間/年
- ②ロシュ次世代シーケンサーGSJunior システム:144 時間/年
- ③DNA 断片化解析システム:30 時間/年

### (4) 進捗状況・研究成果等 ※下記、13 及び 14 に対応する成果には下線及び \* を付すこと。

#### <現在までの進捗状況及び達成度>

##### 【1】微生物ゲノム研究

##### (a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発\*1a(チーム 1:老川・山中)

日本酒醸造工程から単離された乳酸桿菌 2 株(*Lactobacillus sakei* LT-13、*L. sakei* LK-145)及び乳酸球菌 2 株(*Leuconostoc mesenteroides* LT-38、*L. mesenteroides* LK-151)の 4 株の乳酸菌を対象として、本事業で導

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

入した次世代 DNA シーケンサーを用いこれら乳酸菌ゲノムの *de novo* 解析を行った。*L. sakei* LK-145 及び *L. mesenteroides* LK-151 は酒造会社の酒蔵より単離された D-アミノ酸高生産株であり、*L. sakei* LT-13 及び *L. mesenteroides* LT-38 はその対照として用いた D-アミノ酸低生産株である。まず GS junior 454 を用いて 500 base read の shotgun 解析及び 8 kb span での paired end 解析を、Ion PGM を用いて 200 base read の shotgun 解析をそれぞれ行った。その結果、4 株すべての乳酸菌ゲノムのドラフト配列マップを構築することに成功した。推定ゲノムサイズは、それぞれ 1.95 Mbp (*L. sakei* LK-145)、1.94 Mbp (*L. sakei* LT-13)、2.07 Mbp (*L. mesenteroides* LK-151)、2.01 Mbp (*L. mesenteroides* LT-38)であることが明らかとなった。また、プラスミド保有数は、それぞれ 3 つ [*L. sakei* LK-145]、1 つ [*L. sakei* LT-13]、3 つ [*L. mesenteroides* LK-151]、1 つ [*L. mesenteroides* LT-38]であることが明らかとなった。得られたリードデータの解析と推定代謝経路の解析を、それぞれ MiGAP と KEGG Automatic Annotation Server (KAAS)を用いて行ったところ、D-アミノ酸生合成酵素遺伝子は両株に共通していたものの、その塩基配列及びアミノ酸配列には相違が認められ、また、種々の L-アミノ酸及びその中間体の代謝経路の保存性には複数の相違があることが明らかとなった。

#### (b)環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種研究 \*1b (チーム 1: 松村)

ビスフェノール A (BPA) 分解能を有する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を対象として、本事業で導入した次世代 DNA シーケンサーを用い本菌ゲノムの *de novo* 解析を行った。本菌の全ゲノム解析では 755,344 個の塩基配列断片が得られ、これらの塩基配列断片を 421 個の Contig に集約し、ゲノム長は約 5.3 Mb であることが明らかとなった。また本菌が保有している約 250 kb プラスミド、約 100 kb プラスミド、約 80 kb プラスミドならびに BPA 分解に重要であると考えられる pBAR1 の個別解析を行った。各プラスミドを精製後、MiSeq によるシーケンス解読と Roche 社製 Newbler によるアセンブリー、GenoFinisher によるフィニッシング処理を行い、プラスミド配列を構築した。その結果、pBAR1 については全塩基配列 (80,317pb) の決定に成功し、さらに NCBI 塩基配列データベースと Blast プログラムを用いてコードされている遺伝子のアノテーションを完了した。pBAR1 には 67 個の遺伝子がコードされており、接合伝達関連遺伝子が 20 個、トランスポゾン配列が 14 個あることが明らかとなった。また、*bisdAB* を含む少なくとも 4 種類の遺伝子が BPA 分解に関わっていることが明らかとなった。

#### (c)食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発 \*1c (チーム 1: 土戸・松村)

食品分野で耐性菌として問題となっている枯草菌を対象として、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、有機ペルオキシドなどの活性酸素種に対する防御因子をコードする遺伝子群 (KATs, SODs, ORGs) の組合せの多重遺伝子破壊株を構築し、熱ストレスや種々の薬剤に対する感受性化および耐性化現象などの表現型を解析した。過酸化水素に対しては KATs の欠損により顕著な増殖阻害や感受性化が生じたが、ORGs の欠損では致死濃度での耐性化が確認された。t-ブチルペルオキシドでは KATs, SODs, ORGs ユニット単独や組み合わせでも致死濃度での耐性化が確認された。これらの結果から、枯草菌には過酸化水素や有機ペルオキシドに対する未知の耐性化因子が存在することが明らかとなった。また、食品分野で耐性菌として問題となっている大腸菌を対象として、抗菌性陽イオン界面活性剤である臭化トリメチルアンモニウム (CTAB) 耐性化機構を解析した。CATB 耐性大腸菌 OW66 株及び新たに取得に成功した CATB 耐性大腸菌の変異部位を本事業で導入した次世代 DNA シーケンサーを用いて解析したところ、ABC トランスポーターのサブユニットをコードしている *msbA* や *AcrAB-TolC* 薬剤排出ポンプの発現制御遺伝子である *marR* に変異が生じていることが明らかとなり、これらの遺伝子が CATB 耐性に関与することが明らかとなった。

なお、当初計画では、食品汚染菌として枯草菌を主な研究対象としていたが、平成 26 年 3 月土戸が退職したため今後は大腸菌を中心に松村が研究を展開することとした。

## [2] 動物細胞エピゲノム研究

### (a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発 \*2a (チーム 2: 池内、下家)

神経突起伸長作用を有する *nur77* 遺伝子 (*nur77*) を対象として、まず本遺伝子のプロモーター結合遺伝子群の解析を行った。その結果、*nur77* のプロモーター領域は、trichostatin A (TSA) 添加によりアセチル化ヒストン H3 の 14 番目のアセチル化リシン残基 (Ac14H3) と結合すること、その結合は C646 を共添加すると阻害されることが明らかになった。そこで、PC12 細胞の染色体 DNA から *nur77* のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したプラスミドを作成し、DLR (dual luciferase reporter) assay を行った。その結果、*nur77* のプロモーター活性は、TSA の添加により有意に上昇することが明らかとなった。このことから、*nur77* のプロモーターの活性化は、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな発現制御を受けていることが明らかとなった。そこで、HDAC (histone deacetylase) 阻害剤 (MS-275) 添加後の細胞抽出液を回収し、本事業で導入した次世代 DNA シーケンサーを用いて抗 Ac14H3 抗体による ChIP-Seq (chromatin immunoprecipitation-sequence) 解析を実施した。その結果、発現制御に関与する 20 個の遺伝子 (*vom2r3*, *srd5a1*, *papd7*, *thbs2*, *wdr27*, *ythdc2*, *sel1l2*, *vrk1*, *papola*, *ephb1*, *nsg2*, *zfp958*, *tsn*, *cdh19*, *lphn3*, *pcdh17*, *exoc2*, *lrf4*, *prrr16*, *ftmt*) が同定された。

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究 \*2b (チーム 2: 木村)**

nur77 遺伝子(nur77)の発現を上昇させる forskolin(FSK)を添加した条件と無添加の条件における nur77 のプロモーター領域の CpG island (特に Sp1 binding sites)の DNA メチル化と脱メチル化を、バイサルフェートシーケンス法によって比較解析した。その結果、nur77 の第一エキソンを含む-306~+136 塩基配列における CpG island のメチル化は変動していないことが分かった。この時、oct4 遺伝子上流配列を陽性コントロールとし、実験におけるバイサルフェート反応効率が 99%であることも確認した。以上から、nur77 発現制御には、DNA 側のメチル化は無関係であることを示唆することができた。

**[3]植物細胞エピゲノム研究**

**(a) セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発 \*3a (チーム 3: 吉田・細見・山中・丸岡)**

当初は、カイワレダイコンを主な研究対象として実験計画を立案したが、次世代 DNA シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行うターゲット遺伝子を絞るため、まず双子葉モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)を対象として、培地への亜セレン酸添加が同植物の mRNA の発現量に及ぼす影響と、Selenocysteine methyltransferase のホモログ遺伝子である Homocysteine S-methyltransferase (At-HMT-3)の *in vitro*における機能解析を行った。まず DNA マイクロアレイを用い、培地に添加した亜セレン酸ナトリウム濃度と mRNA の発現量の関係を解析した。その結果、亜セレン酸ナトリウム濃度が 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で生育阻害が起こることが明らかとなった。また、生育したシロイヌナズナ茎頂部中のセレン濃度を誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)で測定したところ、培地中の亜セレン酸が取り込まれていることが明らかとなった。さらに網羅的な遺伝子発現解析による代謝変動予測を行うため、亜セレン酸濃度 0 及び 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のシロイヌナズナ茎頂部より mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量が 10 倍以上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。その結果、亜セレン酸代謝に関連するグルタチオン-S-トランスフェラーゼとセレノシステイン  $\beta$ -リアーゼの遺伝子の発現量が増加していることが明らかとなった。さらに、GC-MS を用い、亜セレン酸ナトリウム添加培地で生育させたシロイヌナズナ中のセレン化合物の解析を行ったところ、新奇なセレン化合物であることが明らかとなった。一方、シロイヌナズナゲノム中には Ab-SMT と一次構造上の相同性を示す 3 つの Homocysteine S-methyltransferase (At-HMT-1, -2, -3) アイソザイムの存在が確認されている。そこで、Ab-SMT と高い相同性を示す At-HMTs の内、機能解析が行われていない At-HMT-3 について、大腸菌を宿主とする発現系の構築を行い、不溶性画分への発現に成功した。

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究 \*3b (チーム 3: 丸岡)**

Nur77 が転写因子として作用し得る下流の遺伝子群についての解析を行った。その結果、nur77 から生じる mRNA に対する siRNA を細胞に導入することにより、HDAC 阻害剤で上昇する NeuroD1 と Synapsin1 の発現が見られないことがわかった。従って、Nur77 は *neuroD1* あるいは *synapsin1* の上流配列に結合し、両遺伝子を発現上昇させることが示唆された。ただし、*neuroD1* と *synapsin1* の上流配列における DNA のメチル化に関する解析は終了しておらず、遺伝子発現制御の根源となる知見の取得を急務としている。

<特に優れた研究成果>(以下では各サブテーマは記号((a)(b)(c)のみを示す)

**[1] 微生物ゲノム研究 \*1a, \*1b(チーム 1)**

(a) 日本酒醸造工程から単離された乳酸桿菌 2 株 (*L. sakei* LT-13 (= *L. sakei* NBRC 15893<sup>T</sup>), *L. sakei* LK-145) 及び乳酸球菌 2 株 (*L. mesenteroides* LT-38 (= *L. mesenteroides* NBRC 3426<sup>T</sup>), *L. mesenteroides* LK-151) の 4 株のドラフトゲノムの解析を終了し、比較ゲノム解析の結果、D-アミノ酸高生産に関与すると推定される遺伝子(シスタチオニン  $\beta$ -リアーゼ遺伝子他)を発見した。

(b) ビスフェノール A(BPA)分解能を有する *S. bisphenolicum* AO1 株のドラフトゲノムと内在性プラスミド pBAR1 の全塩基配列の決定に成功し、pBR1には *bisdAB* を含む少なくとも 4 種類の BPA 分解に関与する遺伝子が存在することを発見した。

(c) 主要な抗酸化システムの多重遺伝子破壊群の構築とその表現型解析により、細胞防御システムの遺伝子破壊による耐性化獲得機構など従来の常識では考え及ばない現象を見出し、その耐性化機構の解明や、応用に関して研究を展開できた。

**[2] 動物細胞エピゲノム研究 \*2a, \*2b (チーム 2)**

(a) Nur77 によって神経突起伸長が促進され、c-Fos によって神経突起伸長が抑制されることを明らかにした。また神経突起伸長に関わる nur77 のプロモーターの活性化は、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな発現制御を受けていることを発見するとともに、その発現制御には、20 個の遺伝子が関与することを発見した。

(b) Nur77 の遺伝子発現の上昇には、DNA のメチル化に代表される DNA 側の制御ではなく、ヒストンのアセチ

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

ル化やメチル化などのヒストン側の制御が重要であることを示唆することができた。

### **[3] 植物細胞エピゲノム研究 \*3a, \*3b (チーム 3)**

(a) 培地への亜セレン酸添加がシロイヌナズナの mRNA の発現量に及ぼす影響を解明することに成功し、次世代 DNA シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行うターゲット遺伝子を発見することに成功した。亜セレン酸ナトリウム添加培地で生育させたシロイヌナズナ中に蓄積したセレン化合物は、新奇なセレン化合物であることを明らかにした。また、シロイヌナズナの At-HMT3 遺伝子は大腸菌におけるレアカodonを多量に含んでおり、*E. coli* BL21(DE3)など汎用発現用宿主ではほとんど発現が認められなかったが、*E. coli* Rosetta (DE3)を宿主として用いることにより、発現効率を著しく向上させることに成功した。

(b) *nur77* の下流に存在する分化制御遺伝子として *neuroD1* や *synapsin1* を見出した。

<問題点とその克服方法>(以下では各サブテーマは記号((a)(b)等)のみを示す)

#### **[1] 微生物ゲノム研究(チーム 1)**

(a) D-アミノ酸高生産菌のゲノム解析では、研究計画に沿って順調に研究が進んでおり、現在克服すべき問題点はない。

(b) *S. bisphenolicum* AO1 株の BAP 分解では、その代謝中間体である 4-ヒドロキシアセトフェノ(4-HAP)の蓄積、これに伴う BPA 分解速度低下、さらに、pBAR1 遺伝子不安定性による BPA 分解能の欠落が問題である。この点は、解読したゲノム及びプラスミドの遺伝情報に基づき変異株の調製を行うことで克服できると考えられる。

#### **[2] 動物細胞エピゲノム研究(チーム 2)**

(a) HDAC には、11 種のサブタイプがあり、どの HDAC を阻害することが神経突起伸長に関わるかを明らかにする必要がある。HDAC1 と HDAC2 についてはこれらに特異的な阻害剤の影響を検討したり、11 種の HDAC に特異的な siRNA を用いた解析を検討したりすることにより、神経突起伸長に重要な HDAC を明らかにしたりすることによって克服できると考えられる。

#### **[3] 植物細胞エピゲノム研究(チーム 3)**

(a) DNA マイクロアレイを用いてシロイヌナズナのセレン代謝に関わる mRNA の同定はできたが、次世代 DNA シーケンサーを用いる解析ができていない。トランスクリプトーム解析を行う上でのターゲット遺伝子を絞り込むことができたので、この情報をもとに研究を進めればこの点は克服できると考えられる。また、At-HMT3 の大腸菌での発現系の構築では、*E. coli* Rosetta (DE3)で高発現はしたが、At-HMT3 は不溶性画分に発現した。可溶性発現に効果が高いことが知られている Maltose Binding Protein タグとの融合タンパク質として発現することによってこの点は克服できると考えられる。

<研究成果の副次的効果(実用化や特許の申請など研究成果の活用の見通しを含む。)>

#### **[1] 微生物ゲノム研究(チーム 1)**

D-アミノ酸高生産及び低生産乳酸菌の比較ゲノム解析の結果、新規な D-アミノ酸代謝関連酵素が発見された。本酵素を D-アミノ酸の定量に用いたり、本酵素遺伝子を破壊した D-アミノ酸高生産乳酸菌を創製したりすることが可能であると考えられる。*S. bisphenolicum* AO1 株は、BPA だけでなく、フェノール系化合物、ピフェニル系化合物、有機塩素系化合物など、さまざまな環境汚染物質浄化菌としての利用が期待できる。

#### **[2] 動物細胞エピゲノム研究(チーム 2)**

神経突起伸長に関与する HDAC 阻害剤は、新規な抗精神薬として開発することが期待される。

#### **[3] 植物細胞エピゲノム研究(チーム 3)**

亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナに蓄積したセレンの化学形態は、アブラナ科植物で報告のある含セレンアミノ酸ではない可能性が高いため、これまでにないセレン化合物を含む新規機能性食品として期待される。At-HMT3 発現系の改良には、汎用 pET 系発現システムを元に進めている。幅広い分野で利用されている pET システムと互換性のある独自の Maltose Binding Protein 融合タンパク質の発現系の構築は、At-HMT3 だけでなく、可溶性発現が難しい各種組換え酵素の発現研究を強力にアシストするツールとなり得る。

これらはいずれも新規な発見であり、実用化や特許申請を行っていきたいと考えている。

<今後の研究方針>

#### **[1] 微生物ゲノム研究(チーム 1)**

D-アミノ酸高生産及び低生産乳酸菌の全ゲノム解析を、ショットガン解析を繰り返し行うことによってギャップ領域をすべて解読し、完了する。またシスタチオン β-リアーゼ遺伝子を大腸菌で発現させ、*in vitro*での機能解析を行う。また、シスタチオン β-リアーゼ遺伝子破壊乳酸菌株を調製し、本破壊株の D-アミノ酸生産能を評価し、D-アミノ酸高生産の機構を明らかにする。さらに、チーム 3 と連携し、解読したゲノム中の At-HMT-1, -2, -3 ホモログ遺伝子の探索と機能解析を行う。*S. bisphenolicum* AO1 株の全ゲノム解析にはメイトメア法を用い、より精度の高い解析を行う。また、Prokaryotic Genomic Pipeline、RAST、あるいは MiGAP を用いて、遺伝子領域の特定及びアノテーションを行う。また、pBAR1 の BPA 分解に関与するプラスミド上の必要な情報を全て

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

染色体ゲノム上へ組み込み、BPA 分解の不安定性を解消する。

### **[2] 動物細胞エピゲノム研究(チーム 2)**

次世代シーケンスによって明らかになった *nur77* 上流のプロモーター配列に、Ac14H3 と共に結合することによって神経突起を伸長させる分子群の中でどの分子が重要であるかをさらに解析する。また、HDAC に対する特異性の異なる HDAC 阻害剤を利用することや HDAC のサブタイプに対して特異性のある siRNA を利用して特定の HDAC が果たす神経突起伸長作用の有無を検証する。さらに、HDAC 阻害剤添加後の細胞抽出液を RNA-Seq によって解析し、*nur77* 産物がさらに発現誘導する遺伝子(群)の解析を次世代 DNA シーケンサーによって網羅的に行う。さらに、PC12 細胞で得られた結果の一般性を確認するため、大脳皮質神経細胞(分散培養系)でも同様の結果であるかを解析する。

### **[3] 植物細胞エピゲノム研究(チーム 3)**

亜セレン酸曝露下で生育させたシロイヌナズナに含まれるセレン化合物の形態を GC-MS 及び HPLC-ICP-MS を用い同定及び構造決定する。さらに次世代 DNA シーケンサーを用いた RNA sequencing による生長阻害に關与する候補遺伝子の選抜と塩基配列決定による変異の検出及びエピゲノム解析による後天的な遺伝子制御機構を明らかにする。また現在開発中の「汎用 pET 系発現システムと互換性のある独自の Maltose Binding Protein 融合タンパク質の発現系」や真核細胞を用いた発現系を利用することで機能的 At-HMT3 の発現を行い、発現細胞や精製酵素を用いて *in vivo* 及び *in vitro* での詳細な機能解析を行う予定である。さらに、At-HMT-3 の発現制御がエピジェネティックなものであるかどうかをヒストン中の特定リシン残基のアセチル化や DNA のメチル化の検出によって確認する予定である。

また研究チーム間相互の連携をさらに深め、統合的な研究成果をも産み出せるよう努力したいと考えている。

## **<今後期待される研究成果>**

### **[1] 微生物ゲノム研究(チーム 1)**

D-アミノ酸高生産及び低生産乳酸菌 4 株の全ゲノム解析が完了し、D-アミノ酸低生産乳酸菌に特異的に存在するシスタチオン β-リアーゼの *in vitro* 及び *in vivo* での機能が解明され、乳酸菌における D-アミノ酸高生産の機構が明らかとなる。さらに、*S. bisphenolicum* AO1 株の全ゲノム解析が完了し、本菌の BPA 分解の機構が解明される。

### **[2] 動物細胞エピゲノム研究(チーム 2)**

*nur77* 発現の初期制御に関わる HDAC が特定され、神経突起伸長作用の誘導機構が明らかとなる。また、*nur77* の下流に存在する遺伝子群を明らかにすることにより、神経突起伸長に關与する細胞内分子機構が明らかとなる。さらに、大脳皮質神経細胞の初代培養系を用いた実験を同様に実施することにより、研究成果の一般性が明らかとなる。

### **[3] 植物細胞エピゲノム研究(チーム 3)**

亜セレン酸曝露下で生育させたシロイヌナズナに含まれるセレン化合物の構造とその生合成に關与する遺伝子が同定され、抗腫瘍効果や活性酸素除去活性を有している新奇なセレン化合物を強化した新規機能性食品素材の開発が期待される。また At-HMT3 の酵素科学的性質が明らかとなり、本酵素のシロイヌナズナにおけるセレン代謝への関与及びセレン代謝系全容解明に大きく寄与することが期待される。

## **<自己評価の実施結果及び対応状況>**

各研究チーム内の研究発表会を 1 ヶ月に 1 度、全体のプロジェクト会議を 6 ヶ月に 1 度実施し、生物種の枠を越えて、またゲノム・エピゲノムの枠を越えて連携を図っている。また、2 年目となる 2014 年 6 月に、関西大学研究推進委員会外部資金審査・評価部会による本プロジェクトの進捗状況等に関する内部評価を実施し、概ね高い評価を得た[添付資料 1 参照]。代表者以下、これらの評価に関する情報を全メンバーで共有し、研究にフィードバックさせていきたいと考えている。また、内部評価において、研究グループ間のより積極的な連携を求められたことを受けて、2015 年 4 月から、チーム 1 とチーム 3 及びチーム 2 とチーム 3 の連携による新たな研究にも着手することで研究拠点の形成にむけた軌道修正を行った。

## **<外部(第三者)評価の実施結果及び対応状況>**

3 年目の 2015 年 6 月、3 名の外部評価者による外部評価を実施し貴重なコメントを頂いた[添付資料 2 参照]。代表者以下、これらの評価に関する情報を全メンバーで共有し、研究にフィードバックさせていきたいと考えている。また、外部評価において、研究グループ・生物種を超えた統合的成果の創出を求められたが、2016 年 4 月からチーム 1 とチーム 3 の連携による D-アミノ酸高生産乳酸菌ゲノム中の At-HMT-3 ホモログ遺伝子の探索と機能解析に関する研究及びチーム 2 とチーム 3 の連携による At-HMT-3 の発現制御のエピジェネティックな解析に関する研究にも着手する予定であり、外部評価での指摘事項に対する軌道修正を行い、着実に成果をあげていきたいと考えている。また、最終年度にも外部評価を再度行う予定である。

さらに、毎年度末に成果報告集を発行し、学内外の関係部署に配布して広くその成果を公開している。



法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

12 キーワード(当該研究内容をよく表していると思われるものを8項目以内で記載してください。)

- (1) 次世代 DNA シーケンサー (2) ゲノム (3) エピゲノム (4) D-アミノ酸  
 (5) ビスフェノール A (6) セレン (7) 神経突起伸長 (8) 健康生命科学

13 研究発表の状況(研究論文等公表状況。印刷中も含む。)

上記、11(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付すこと。

<雑誌論文>

<p><b>[1] 微生物ゲノム研究</b> (特に優れた成果を示す論文には、【★】を付記)</p> <p><b>(a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発</b> *1a の内容に対応する成果は以下の通りである (11 件)</p> <p>(1) S. Kato, Y. Masuda, M. Konishi, <u>T. Oikawa</u>, Enantioselective analysis of D- and L-amino acids from mouse macrophages using high performance liquid chromatography, <i>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</i>, 116, 101-104 (2015). [査読有]</p> <p>(2) T. Fujii, T. Yamauchi, M. Ishiyama, Y. Gogami, <u>T. Oikawa</u>, Y. Hata, Crystallographic studies of aspartate racemase from <i>Lactobacillus sakei</i> NBRC 15893, <i>Acta Crystallographica Section F</i>, 71, 1012-1015 (2015). [査読有]</p> <p>(3) L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, José Ma García-Arenzana, <u>Y. Matsumura</u>, M. Khodabandeh, Biodegradation of bisphenol A by the newly isolated <i>Enterobacter gergoviae</i> strain BYK-7 enhanced using genetic manipulation, <i>RSC Advances</i>, 5, 29563-29572 (2015). [査読有]</p> <p>(4) L. Ray, <u>K. Yamanaka</u>, B. S. Moore, A Peptidyl-Transesterifying Type I Thioesterase in Salinamide Biosynthesis, <i>Angew. Chem. Int. Ed. Engl.</i>, 55, 364-367 (2015). [査読有]</p> <p>(5) Y. Li, Z. Li, <u>K. Yamanaka</u>, Y. Xu, W. Zhang, H. Vlamakis, R. Kolter, B. S. Moore, P. Y. Quian, Directed natural product biosynthesis gene cluster capture and expression in the model bacterium <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Scientific Reports</i>, 5, 9383 (2015). [査読有]</p> <p>(6) T. Yoshimura, N. Shibata, Y. Hamano, <u>K. Yamanaka</u>, Heterologous production of hyaluronic acid in an ε-poly-L-lysine producer, <i>Streptomyces albulus</i>, <i>Appl. Environ. Microbiol.</i>, 81, 3631-3640 (2015). [査読有]</p> <p>(7) V. Agarwal, A.A. El Gamal, <u>K. Yamanaka</u>, D. Poth, R. D. Kersten, M. Schorn, E. E. Allen, B. S. Moore, Biosynthesis of polybrominated aromatic organic compounds by marine bacteria, <i>Nature Chem. Biol.</i>, 10, 640-647 (2014). [査読有]</p> <p>(8) <u>K. Yamanaka</u>, K. A. Reynolds, R. D. Kersten, K. S. Ryan, D. J. Gonzalez, V. Nizet, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>, 111, 1957-1962 (2014). [査読有]</p> <p>(9) Y. Hamano, N. Kito, A. Kita, Y. Imokawa, <u>K. Yamanaka</u>, C. Maruyama, H. Katano, epsilon-Poly-l-lysine peptide-chain length regulated by the linkers connecting the transmembrane domains of epsilon-poly-L-lysine synthetase, <i>Appl. Environ. Microbiol.</i>, 80, 4993-5000 (2014). [査読有]</p> <p>(10) Y. Uchida, H. Hayashi, H. Washio, R. Yamasaki, S. Kato, <u>T. Oikawa</u>, Cloning and characterization of a novel fold-type I branched-chain amino acid aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon <i>Thermococcus</i> sp. CKU-1. <i>Extremophiles</i>, 18, 589-602 (2014). [査読有]</p> <p>(11) K. Okada, Y. Gogami, <u>T. Oikawa</u>, Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake, <i>Amino Acids</i>, 44, 489-498 (2013). [査読有]【★】</p> <p><b>(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 Sphingomonas 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種</b> *1b の内容に対応する成果は以下の通りである (2 件)</p> <p>(1) <u>Y. Matsumura</u>, A. Akahira-Moriya, M. Sasaki-Mori, Bioremediation of bisphenol-A polluted soil by <i>Sphingomonas bisphenolicum</i> AO1 and the inherent microbial community in the soil, <i>Biocontrol Sci.</i>, 20, 35-42 (2015). [査読有]</p> <p>(2) L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, J. M. García-Arenzana, <u>Y.</u></p>
---

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

Matsumura, M. Khodabandeh, Biodegradation of bisphenol A by the newly isolated *Enterobacter gergoviae* strain BYK-7 enhanced using genetic manipulation, *RSC Advances*, 5, 29563-29572 (2015). [査読有]

**[2] 動物細胞エピゲノム研究** (特に優れた成果を示す論文には、【★】を付記)

**(a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発** \*2a の内容に対応する成果は以下の通りである(4件)

- (1) R. Yamazoe, Y. Nishihata, K. Nakagawa, H. Aoyama, K. Shimoke, Genomic control of upregulation of GRP78 expression for promotion of neurite elongation and attenuation of cell death via PKA-mediated signaling in PC12 cells, *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*, 4(4), 150-154 (2015). [査読有]
- (2) K. Shimoke, Endocrine disrupting chemicals - inducers of epigenetic gene expression and enhancers of cell death in neurons, *Journal of Bioengineering and Biomedical Sciences*, 6(1), e122 (2015). [査読有]
- (3) T. Tomioka, H. Maruoka, H. Kawa, R. Yamazoe, D. Fujiki, K. Shimoke, T. Ikeuchi, The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the *nur77* gene, *Neuroscience Research*, 88, 39-48 (2014). [査読有]【★】
- (4) K. Shimoke, T. Tomioka, K. Okamoto, D. Fujiki, S. Uesato, H. Nakayama, T. Ikeuchi, Histone deacetylase inhibitor for neurodegenerative diseases: A possible medicinal strategy by prevention of ER stress-mediated apoptosis and neurite elongation, *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*, S1, 1-4 (2013). [査読有]

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \*2b の内容に対応する成果は以下の通りである (4件)

- (1) S. Mori, S. Nada, H. Kimura, S. Tajima, Y. Takahashi, A. Kitamura, C. Oneyama, M. Okada, The mTOR Pathway Controls Cell Proliferation by Regulating the FoxO3a Transcription Factor via SGK1 Kinase, *PLoS ONE* 9(2), e88891 (2014). [査読有]
- (2) J. Otani, K. Arita, T. Kato, M. Kinoshita, H. Kimura, I. Suetake, S. Tajima, M. Ariyoshi, M. Shirakawa, Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl-CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4, *Journal of Biological Chemistry*, 288 (9), 6351-6362 (2013). [査読有]
- (3) J. Otani, H. Kimura, J. Sharif, T. A. Endo, Y. Mishima, T. Kawakami, H. Koseki, M. Shirakawa, I. Suetake, S. Tajima, Cell cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl cytosine in mouse embryonic stem cells, *PLoS ONE* 8(12), e82961 (2013). [査読有]
- (4) T. Horii, S. Morita, M. Kimura, R. Kobayashi, D. Tamura, R. Takahashi, H. Kimura, I. Suetake, H. Ohata, K. Okamoto, S. Tajima, T. Ochiya, Y. Abe, I. Hatada, Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system, *PeerJ* 1, e230 (2013). [査読有]

**[3] 植物細胞エピゲノム研究** (特に優れた成果を示す論文には、【★】を付記)

**(a) セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発** \*3a の内容に対応する成果は以下の通りである (4件)

- (1) M. Yoshida, M. Nakagawa, R. Hosomi, T. Nishiyama, K. Fukunaga, Low Molybdenum State Induced by Tungsten as a Model of Molybdenum Deficiency in Rats, *Biological Trace Element Research*, 165, 75-80 (2015). [査読有]
- (2) 廣瀬侑太郎, 崔 懿, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の希塩酸抽出物に含まれるセレンの栄養有効性, 微量栄養素研究, 32, 1-3 (2015). [査読有]
- (3) 高井彩帆, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜鉛の過不足によるカイワレダイコン (*Raphanus sativus* L. 'Kaiwaredaikon') スプラウトの亜鉛濃度および遺伝子発現量への影響, 微量栄養素研究, 32, 34-39 (2015). [査読有]
- (4) 吉田宗弘, 高井彩帆, 山根綾子, 福永健治, 西山利正, 亜鉛強化カイワレダイコンスプラウトの調製と栄養有効性の評価, *Biomedical Research on Trace Elements*, 25, 8-13 (2014). [査読有]

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \*3b の内容に対応する成果は以下の通りである(1件)

- (1) H. Maruoka, K. Shimoke, Mechanisms of neurotrophic activities via low-molecular-weight com-

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

pounds:post-transcriptional regulation in PC12 cells and neurons, Clin. Pharmacol. Biopharmaceutics, S1, 1-3 (2013). [査読有]【★】

### <図書>

**[1] 微生物ゲノム研究**(特に優れた成果を示す図書には、【★】を付記)

**(a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発** \* 1a の内容に対応する成果は以下の通りである (4 件)

- (1) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸菌のゲノム解析:現状と D-アミノ酸に着目したゲノム情報の活用に向けて, Trace Nutrients Research, 32, 78-82 (2015).
- (2) 森田朱香, 老川典夫, クエン酸が乳酸菌の生育と代謝に及ぼす影響, Trace Nutrients Research, 32, 86-89 (2015).
- (3) 老川典夫, 日本酒の新たな呈味性成分「D-アミノ酸」, 日本醸造協会誌, 第 110 巻, 189-197 (2015).
- (4) 老川典夫, 食品に関連する乳酸菌の D-アミノ酸代謝関連酵素, バイオインダストリー, 31, 33-40 (2014). 【★】

**(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種** \* 1b の内容に対応する成果は以下の通りである (1 件)

- (1) 松村吉信, 片倉啓雄, 有用微生物培養のイロハ 試験管から工業スケールまで, 監修: 片倉啓雄, 大政健史, 長沼孝文, 小野比佐好, NTS, 5-18 (2014).

### <学会発表>

**【国際学会】**

**[1] 微生物ゲノム研究**(特に優れた成果を示す図書には、【★】を付記)

**(a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発** \* 1a の内容に対応する成果は以下の通りである (3 件)

- (1) T. Oikawa, D-Amino acid in sake: Distribution production mechanism, and function, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR-2014), Utsunomiya, Japan (2014.9). [Invited] 【★】
- (2) K. Yamanaka, Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A, Korean Society of Microbiology and Biotechnology, International Symposium and Annual Meeting, Busan, Korea (2014.6). [Invited]
- (3) S. Kato, Y. Masuda, M. Konishi, T. Oikawa, Amino acid analysis of mouse macrophage, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR-2014), Utsunomiya, Japan (2014.6).

**[2] 動物細胞エピゲノム研究**

**(a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発** \* 2a の内容に対応する成果は以下の通りである (3 件)

- (1) K. Shimoke, R. Yamazoe, T. Tomioka, K. Tsumura, Y. Nishihata, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Involvement of specific nur77 family genes during neurite outgrowth induced by forskolin and a histone deacetylase inhibitor in PC12 cells, 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, USA (2015.10).
- (2) K. Shimoke, T. Tomioka, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Up-regulation of *Nur77* by HDAC inhibitors is important for neurite outgrowth, 1st International Summit on Clinical Pharmacy, San Francisco, USA (2014.12).
- (3) K. Shimoke, T. Tomioka, H. Aoyama, Y. Nishihata, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Tricostatin A induces neurite outgrowth via expression of *Nur77* in PC12 cells, World Congress on Neurotherapeutics, Basel, Switzerland (2014.9).

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \* 2b の内容に対応する成果は以下の通りである (1 件)

- (1) K. Shimoke, H. Maruoka, Y. Hirata, D. Fujiki, S. Uesato, T. Ikeuchi, Histone deacetylase inhibitor (K-350) promotes neurite outgrowth and cell survival via histone H3 modification in neurons, Neuroscience 2013, San Diego, USA (2013.11).

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

### [3] 植物細胞エピゲノム研究

(a) **セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発** \* 3a の内容に対応する成果は以下の通りである (3 件)

- (1) R. Hosomi, K. Miyauchi, H. Arai, T. Nishiyama, M. Yoshida, K. Fukunaga, Salmon protamine decreases serum and liver lipid contents by inhibiting lipid absorption in an in vitro gastrointestinal digestion model and in rats, The 6th International Conference on Food Factors, Seoul, Korea (2015.11).
- (2) R. Hosomi, D. Yamamoto, T. Nishiyama, M. Yoshida, K. Fukunaga,  $\epsilon$ -Polylysine decreases micellar lipids solubility and enhances the fecal lipids excretion in rats, 105th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, San Antonio, USA (2014.5).
- (3) M. Takasugi, J. Kirikoshi, S. Sasayama, M. Hirata, A. Utsunomiya, R. Hosomi, K. Fukunaga, H. Arai, Inhibitory effect of  $\alpha$ -tocopherol and the analogues on release of chemical mediators from mast cells, 105th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, San Antonio, USA (2014.5).

### 【国内学会】

[1] **微生物ゲノム研究**(特に優れた成果を示す発表には、【★】を付記)

(a) **D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発** \* 1a の内容に対応する成果は以下の通りである(21 件)

- (1) 加藤志郎, 老川典夫, Genome analysis-based approach to elucidate the molecular mechanism of high-level D-amino acids production by lactic acid bacteria, 第 88 回日本生化学大会第 38 回日本分子生物学年会合同大会, 3W5-9, 神戸 (2015.12).
- (2) 吉村友宏, 柴田展行, 濱野吉十, 山中一也, ポリリジン生産放線菌 *Streptomyces albulus* を宿主とした高分子量ヒアルロン酸及び 5-アミノレブリン酸の異種生産, 日本生物工学会 2015 年度大会, 鹿児島 (2015.10).
- (3) 吉村友宏, 柴田展行, 濱野吉十, 山中一也, ポリリジン生産放線菌 *Streptomyces albulus* を宿主とした有用物質異種生産システムの開発, 日本生物工学会 2015 年度大会, 鹿児島 (2015.10).
- (4) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* 由来シスタチオン  $\beta$ -リアーゼの機能解析, 第 11 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 新潟 (2015.8).【★】
- (5) 鷲尾翼, 老川典夫, *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の耐熱性 L-アスパラギン酸オキシダーゼの分子特性の解析, 日本ビタミン学会第 67 回大会, 2-IV-21, 奈良 (2015.6).
- (6) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, D-アミノ酸を高生産する乳酸球菌のゲノム解析, 第 32 回日本微量栄養学会学術集会, 京都 (2015.5).【★】
- (7) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, D-アミノ酸高生産乳酸菌のドラフトゲノム解析, 第 62 回日本生化学会近畿支部例会, 滋賀 (2015.5).【★】
- (8) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, ゲノム解析から見た乳酸菌の D-アミノ酸高生産機構, 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会, 岡山 (2015.3).【★】
- (9) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育と外因性アミノ酸取り込みとの関連, 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014.10).
- (10) 鷲尾翼, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 の L-アスパラギン酸オキシダーゼ ホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の精製と酵素科学的性質の解明, 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014.10).
- (11) 井上淳, 老川典夫, *Flavobacterium indicum* DSM 17447 のスレオニンデヒドロゲナーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質の解明, 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014.10).
- (12) 加藤志郎, 山崎遼, 畑安雄, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来アスパラギナーゼの酵素科学的解析, 2014 年度日本農芸化学会関西支部大会(第 486 回講演会) 日本農芸化学会創立 90 周年・関西支部創立 80 周年記念大会, 奈良 (2014.9).
- (13) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, アミノ酸添加が *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育に及ぼす影響, 第 31 回日本微量栄養学会学術集会, 京都 (2014.6).
- (14) 須田理子, 宮内一匡, 細見亮太, 吉田宗弘, 福永健治, 魚肉タンパク質がリン過剰存在下におけるカルシウムの可溶性に及ぼす影響, 第 31 回日本微量栄養学会, 大阪 (2014.6).
- (15) 山崎遼, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のアスパラギナーゼホモロ

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

グ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質の解明, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 神奈川 (2014.3).

- (16) 老川典夫, 日本酒中の D-アミノ酸の定量的解析に基づく生成機構及び呈味機能の解明と D-アミノ酸に着目した新商品開発への展望, 新アミノ酸分析研究会第 3 回学術講演会, 東京 (2013.12). [招待講演] 【★】
- (17) 青山大輝, 豊田雄資, 藤枝聡志, 池内俊彦, 下家浩二, Bisphenol A による PC12 細胞の神経突起伸長における NGF との形態的比較解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 兵庫 (2013.12).
- (18) 老川典夫, 食品中の D-アミノ酸とその機能, 日本ペプチド学会市民フォーラム 2013, 大阪 (2013.11). [招待講演]
- (19) 齊藤瑠実, 老川典夫, 乳酸菌 *Lactobacillus casei* M10-8 のアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子の網羅的発現と遺伝子産物の酵素化学的性質の解明, 第 9 回 D-アミノ酸研究会学術講演会, 大阪 (2013.9).
- (20) 老川典夫, 食品中の D-アミノ酸の定量的解析と D-アミノ酸強化新規機能性食品の開発, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9). [招待講演] 【★】
- (21) 老川典夫, D-アラニンを利用した旨み増強日本酒の製造方法, 第 99 回清酒製造技術セミナー, 東京 (2013.4). [招待講演] 【★】

**(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種** \* 1b の内容に対応する成果は以下の通りである (11 件)

- (1) 高未麗, 木場悟, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解の向上とゲノム構造解析, 第 67 回日本生物工学会大会, 2P-150, 鹿児島 (2015.10).
- (2) 御厨真幸, 中谷宗幸, 中田訓浩, 松村吉信, 自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌の変異部位の決定とその働きに関する研究, 第 67 回日本生物工学会大会, 3P-007, 鹿児島 (2015.10).
- (3) 高未麗, 木場悟, 中川直也, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解の効率化とゲノム構造解析, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 1Pp53, 大阪 (2015.9).
- (4) 中谷宗幸, 御厨真幸, 松村吉信, 嫌気条件における抗菌性界面活性剤の抗菌作用に関する研究, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 2Pp51, 大阪 (2015.9).
- (5) 中川直也, 木場悟, 松村吉信, Bisphenol A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株におけるビスフェノール A (BPA) 分解遺伝子の探索と BPA 分解能の安定化に向けた研究, 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会, 岡山 (2015.3).【★】
- (6) 木場悟, 中川直也, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析とビスフェノール A 分解遺伝子組換え体による芳香族化合物分解能の調査, 第 66 回日本生物工学会大会, 北海道 (2014.9).【★】
- (7) 新居由莉, 高未麗, 岡本早紀, 松村吉信, バイオディーゼル燃料に利用可能な油脂を生産する微細藻類の単離, 第 66 回日本生物工学会大会, 北海道 (2014.9).
- (8) 木場悟, 石田哲, 松村吉信, Bisphenol A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム配列の解析と AO1 組換え体による BPA 分解能調査, 日本農芸化学会 2014 年度(平成 26 年度)大会, 神奈川 (2014.3).【★】
- (9) 守茂山礼乃, 太田美也子, 松村吉信, 抗菌性界面活性剤処理した *Staphylococcus aureus* 細胞における活性酸素ストレスとその応答の解析, 日本農芸化学会 2014 年度(平成 22 年度)大会, 神奈川 (2014.3).
- (10) 木場悟, 石田哲, 松村吉信, ビスフェノール A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島 (2013.9).【★】
- (11) 木場悟, 上村真央, 奥野将司, 小田佳孝, 土戸昇平, 松村吉信, ビスフェノール A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).【★】

**(c) 食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発** \* 1c の内容に対応する成果は以下の通りである (5 件)

- (1) 御厨真幸, 中谷宗幸, 中田訓浩, 松村吉信, 自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性株の変異領域の解析, 日本防菌防黴学会第 42 回年次大会, 2Pp52, 大阪 (2015.9).
- (2) 御厨真幸, 中田訓浩, 松村吉信, 自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌における変異部位の決定とその働きに関する研究, 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会, 岡山

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

(2015.3).【★】

- (3) 坂元仁, 御厨真幸, 西願文哉, 寺村憲一郎, 土戸哲明, 枯草菌の抗酸化遺伝子多重欠損株を用いた“定性的ストレス感受性/抵抗性マトリックス解析”とその応用, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).
- (4) 守茂山礼乃, 太田美也子, 中田訓浩, 松村吉信, *Staphylococcus aureus* における抗菌剤界面活性剤ストレス応答の解析, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).
- (5) 中田訓浩, 松村吉信, 抗菌剤処理した大腸菌細胞の死滅過程で重要となるスーパーオキシドの発生, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).

**[2] 動物細胞エピゲノム研究**(特に優れた成果を示す発表には、【★】を付記)**(a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発** \*2a の内容に対応する成果は以下の通りである (13 件)

- (1) 島山恵利花, 津村風帆, 井戸大記, 丸岡弘規, 富岡拓磨, 山添亮輔, 下家浩二, Forskolin によって誘導される PC12 細胞の神経突起伸長と最初期遺伝子 nur77 を介した発現機構の詳細, 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 (2015.12).
- (2) 山添亮輔, 山本宇晃, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 下家浩二, nur77 ファミリー遺伝子の発現はヒストン修飾によるエピジェネティックな分子制御機構を介している, 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 (2015.12).
- (3) 谷尾啓介, 津村風帆, 島山恵利花, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Forskolin による神経突起伸長を誘導する nur77 遺伝子上流の転写活性制御機構, 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 (2015.12).
- (4) 松浦玖実, 青山大輝, 藤枝聡志, 山添亮輔, 玄古宗一郎, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, Bisphenol A による神経突起伸長における細胞内分子機構の解析, 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 (2015.12).
- (5) 山添亮輔, 西畑慶紀, 津村風帆, 島山恵利花, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 下家浩二, Relevance between the expression of nur family genes and the neurite outgrowth through the histone modification, 日本神経化学会 2015 年度大会, 埼玉 (2015.9).
- (6) 青山大輝, 藤枝聡志, 玄古宗一郎, 松浦玖実, 山添亮輔, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, Neurite outgrowth and bipolarization in PC12 cells and cerebral cortical neurons induced by a low concentration of bisphenol A, 日本神経化学会 2015 年度大会, 埼玉 (2015.9).
- (7) 青山大輝, 篠崎遼太, 玄古宗一郎, 藤枝聡志, 水井利幸, 小島正巳, 下家浩二, 低濃度 Bisphenol A による PC12 細胞と大脳皮質神経細胞への神経突起伸長への形態的変化作用, 第 37 回日本分子生物学会, 神奈川 (2014.11).
- (8) 富岡拓磨, 津村風帆, 西畑慶紀, 森田有貴, 山添亮輔, 丸岡弘規, 池内俊彦, 下家浩二, nur77 ファミリー遺伝子の発現と神経突起伸長作用との関連性, 第 87 回日本生化学会, 京都 (2014.10)..
- (9) 富岡拓磨, 青山大輝, 山添亮輔, 河広倫, 丸岡弘規, 池内俊彦, 下家浩二, トリコスタチン A による神経突起伸長作用, 第 8 回日本エピジェネティクス研究会, 東京 (2014.5).
- (10) T. Ikeuchi, Epigenetic regulation of expression of nur77 gene during neurite outgrowth induced by low-molecular-weight compounds in PC12 cells, 関西大学先端科学技術シンポジウム, 大阪 (2014.1). 【★】
- (11) 藤木大地, 豊田雄資, 西畑慶紀, 青山大輝, 上里新一, 池内俊彦, 下家浩二, 新規 HDAC 阻害剤 K-350 による神経突起伸長作用の解析, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9). 【★】
- (12) 伏水貴穂, 豊田雄資, 池内俊彦, 下家浩二, PUMA と Bim の発現上昇を介した小胞体ストレス誘導型アポトーシスの誘導とその抑制機構, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9).
- (13) 中川一馬, 樽谷和馬, 岡野太一, 藤田亜弓, 下家浩二, 池内俊彦, PC12 細胞における小胞体ストレス誘導型アポトーシスの forskolin による抑制機構, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9).

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \*2b の内容に対応する成果は以下の通りである (2 件)

- (1) 首浦武作志, 木村博信, 田嶋正二, 多田政子, マウス ES 細胞での 5hmC 化を介した脱メチル化後の Dnmt1 の役割, 第 37 回日本分子生物学会年会, 神奈川 (2014.11).
- (2) 木村博信, 末武勲, 遠井紀江, 川上徹, 饗庭一博, 中辻憲夫, 田嶋正二, プロモーター領域でのヒ

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

ドロキシメチルシトシンのメチルシトシンに対する相対位置は遺伝子発現と相関する, 第8回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京 (2014.5).

**[3] 植物細胞エピゲノム研究** (特に優れた成果を示す発表には、【★】を付記)

**(a) セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発** \* 3a の内容に対応する成果は以下の通りである (5 件)

- (1) 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 吉田宗弘, 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナの生育抑制と遺伝子発現量の変化, 第 26 回日本微量元素学会学術集会, 北海道 (2015.7). 【★】
- (2) 廣瀬侑太郎, 崔認, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の低分子画分に含まれるセレンの栄養有効性, 第 32 回日本微量栄養素学会学術集会, 京都 (2015.5). [優秀発表賞受賞]
- (3) 丸岡弘規, 南條祐子, 松本勇樹, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 *in vivo* イメージングとその応用, 第 37 回日本分子生物学会年会, 神奈川 (2014.11).
- (4) 戸田裕子, 大塚錬, 細見亮太, 西山利正, 吉田宗弘, 福永健治, ヘモグロビンの給餌がラットの鉄及び脂質代謝に及ぼす影響, 第 31 回日本微量栄養素学会, 大阪 (2014.6).
- (5) 大塚錬, 細見亮太, 西山利正, 吉田宗弘, 福永健治, ヘモグロビン粉末給餌によるラットの血清及び肝臓脂質成分に及ぼす影響, 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 北海道 (2013.5).

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \* 3b の内容に対応する成果は以下の通りである (7 件)

- (1) 島山恵利花, 津村風帆, 丸岡弘規, 富岡拓磨, 山添亮輔, 池内俊彦, 下家浩二, dbcAMP で誘導される神経突起伸長における最初期遺伝子の発現機構, 日本分子生物学会, 神奈川 (2014.11).【★】
- (2) 津村風帆, 富岡拓磨, 山添亮輔, 河広倫, 丸岡弘規, 下家浩二, 池内俊彦, HDAC 阻害剤で誘導される神経突起伸長における最初期遺伝子発現の解析, 第 87 回日本生化学会, 京都 (2014.10).
- (3) 丸岡弘規, 頼光花, 松本勇樹, 南條祐子, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 *in vivo* イメージングとその応用, 分子イメージング学会, 大阪 (2014.5).
- (4) 富岡拓磨, 山添亮輔, 河広倫, 丸岡弘規, 下家浩二, 池内俊彦, HDAC 阻害剤で誘導される神経突起伸長における *nur77* 遺伝子発現の解析, 第 86 回日本生化学会年会, 神奈川 (2013.9). 【★】
- (5) 豊田雄資, 丸岡弘規, 藤木大地, 上里新一, 池内俊彦, 下家浩二, ツニカマイシンによって誘導されるアポトーシスの抑制と神経突起伸長に寄与する HDAC 阻害剤の作用機構, 第 56 回日本神経化学会大会, 京都 (2013.6).

<研究成果の公開状況> (上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等ホームページで公開している場合には、URL を記載してください。

<既に実施しているもの>

- ・第 18 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2014.1.23-24).
- ・第 19 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2015.1.22-23).
- ・第 20 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2016.1.21-22). (URL: <http://www.kansai-u.ac.jp/ordist/symposium/index.html>)
- ・第 1 回ゲノム・エピゲノム研究討論会, 関西大学千里山キャンパス (2016.3.12). (URL: <http://www.kansai-u.ac.jp/ordist/symposium/news/2016/02/post-44.html>)

<これから実施する予定のもの>

- ・第 21 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2017.1).
- ・第 2 回ゲノム・エピゲノム研究討論会, 関西大学千里山キャンパス (2018.3).

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

#### 14 その他の研究成果等

「13 研究発表の状況」で記述した論文、学会発表等以外の研究成果及び企業との連携実績があれば具体的に記入してください。また、上記11(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付してください。

##### 【学外共同研究】

・2014年度 蛋白質研究所共同研究員(研究チーム2:下家)

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質化学研究部門 エピジェネティクス研究室

共同研究名「特定 HDAC を介した神経突起伸長に関するエピジェネティックな分子機構の解析」

##### 【新聞報道】

・老川典夫,『大学活用法 企業の産学連携戦略 48 「菊正宗酒造 アミノ酸で伝統製法に風穴」』  
日刊工業新聞, 2013年10月4日付 17面.

・老川典夫,「D-アミノ酸が関与 D-アラニンなど3種 生醗造りに多く含有」  
化学工業日報, 2013年10月16日付5面.

##### 【受賞】

・廣瀬侑太郎, 崔懿, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の低分子画分に含まれるセレンの栄養有効性, 第32回日本微量栄養素学会学術集会 優秀発表賞 (2015.5.30). [\*3a]

##### 【企業ホームページでの公開】

・福山黒酢株式会社, 黒酢に含まれる「美容アミノ酸」

URL: [http://www.kakuida.com/kurozu/post\\_43.htm](http://www.kakuida.com/kurozu/post_43.htm)

#### 15 「選定時」に付された留意事項とそれへの対応

<「選定時」に付された留意事項>

「該当なし」

<「選定時」に付された留意事項への対応>

「該当なし」



法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

## 16 施設・装置・設備・研究費の支出状況(実績概要)

(千円)

年度・区分	支出額	内 訳						備 考
		法 人 負 担	私 学 助 成	共同研究機関負担	受託研究等	寄付金	その他(科研費・助成金)	
平成25年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	57,540	19,180	38,360				
	研究費	49,762	14,927	10,794		16,158	300	7,583 国、企業等
平成26年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	34,477	15,236	9,492		4,159	0	5,590 国、企業等
平成27年度	施設	0						
	装置	0						
	設備	0						
	研究費	36,307	14,763	10,579		5,375	0	5,590 国、企業等
総 額	施設	0	0	0	0	0	0	0
	装置	0	0	0	0	0	0	0
	設備	57,540	19,180	38,360	0	0	0	0
	研究費	120,546	44,926	30,865	0	25,692	300	18,763
総 計	178,086	64,106	69,225	0	25,692	300	18,763	

※平成27年度は予定額。

## 17 施設・装置・設備の整備状況(私学助成を受けたものはすべて記載してください。)

《施設》(私学助成を受けていないものも含め、使用している施設をすべて記載してください。)

(千円)

施設 の 名 称	整備年度	研究施設面積	研究室等数	使用者数	事業経費	補助金額	補助主体
関西大学ハイテク・リサーチ・コア	平成8年度	2,640.0 m <sup>2</sup>	32	520名	827,591	393,100	私学助成
第4学舎第4実験棟	平成2年度	5,036.77 m <sup>2</sup>	26	2,095名	1,421,400	-	法人負担

※ 私学助成による補助事業として行った新增築により、整備前と比較して増加した面積

0 m<sup>2</sup>

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

《装置・設備》(私学助成を受けていないものは、主なもののみを記載してください。)(千円)

装置・設備の名称	整備年度	型番	台数	稼働時間数	事業経費	補助金額	補助主体
(研究装置) 該当なし				h			
(研究設備) イルミナ次世代シーケンサーMiSeqシステム	25	-	1	年 350 h	25,694	17,129	私学助成
ロシュ次世代シーケンサーGSJuniorシステム	25	-	1	年 144 h	20,349	13,566	私学助成
DNA断片化解析システム	25	-	1	年 30 h	11,497	7,665	私学助成
(情報処理関係設備) 該当なし				h			

18 研究費の支出状況 (千円)

年度	平成 25 年度		
小科目	支出額	積算内訳	
		主な用途	金額
教育研究経費支出			
消耗品費	15,090	研究用物品	15,090
光熱水費	1,652	電気代	1,652
通信運搬費	0		0
印刷製本費	60	研究成果報告書	60
旅費交通費	405	出張旅費	405
賃借料	32	賃借料物品	32
報酬・委託料	55	講演料	55
(その他の雑費)	6	講演会参加費	6
計	17,300		17,300
アルバイト関係支出			
人件費支出 (兼務職員)	885		885
教育研究経費支出			
計	885		885
設備関係支出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	4,883	研究用器具備品	4,883
図書			
計	4,883		4,883
研究スタッフ関係支出			
リサーチ・アシスタント			学内0人、学外0人、外国0人
ポスト・ドクター	2,653	共同研究者	2,653
研究支援推進経費			学内0人、学外0人、外国0人
計	2,653		学内1人、学外0人、外国0人、学振0人

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

年 度	平成 26 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	13,152	研究用物品	13,152
光 熱 水 費	1,952	電気代	1,952
通信運搬費	0		0
印刷製本費	105	研究成果報告書	105
旅費交通費	582	出張旅費	582
報酬・委託料	1,041	講演料	1,041
( )			
計	16,832		16,832
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人件費支出 (兼務職員)	1,623	事務補助、研究補助	1,623
教育研究経費支出	0		0
計	1,623		1,623
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	1,725	研究用器具備品	1,725
図 書			
計	1,725		1,725
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	0		0
ポスト・ドクター	4,548	共同研究者	4,548
研究支援推進経費	0		0
計	4,548		4,548

年 度	平成 27 年度		
小 科 目	支 出 額	積 算 内 訳	
		主 な 使 途	金 額
教 育 研 究 経 費 支 出			
消 耗 品 費	13,631	研究用物品	13,631
光 熱 水 費	1,748	電気代	1,748
通信運搬費	0		0
印刷製本費	60	研究成果報告書	60
旅費交通費	506	出張旅費	506
報酬・委託料	1,424	講演料	1,424
(会議会合費)	7		7
計	17,376		17,376
ア ル バ イ ト 関 係 支 出			
人件費支出 (兼務職員)	3,187	研究補助	3,187
教育研究経費支出	0		0
計	3,187		3,187
設 備 関 係 支 出(1個又は1組の価格が500万円未満のもの)			
教育研究用機器備品	231	研究用器具備品	231
図 書			
計	231		231
研 究 ス タ ッ フ 関 係 支 出			
リサーチ・アシスタント	0		0
ポスト・ドクター	4,548	共同研究者	4,548
研究支援推進経費	0		0
計	4,548		4,548

法人番号	271014
プロジェクト番号	S1311044

学 校 法 人 名	学校法人 関西大学	大 学 名	関 西 大 学
研究プロジェクト名	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		

平成 25 年度選定

「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」

研究進捗状況報告書

## 添 付 資 料

---

資料 1 内部評価資料

資料 2 外部評価資料

資料 3 技苑「プロジェクト研究報告概要」

**「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業」に係る  
研究プロジェクトの進展状況チェックシート**

(評価者)

プロジェクト名: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	
研究期間:平成25年度～平成29年度	研究代表者(評価責任者):老川 典夫
評価対象期間:平成25年4月～平成26年9月	評価日:平成26年9月9日

上記の評価対象期間における本研究プロジェクトの研究進捗状況等は、以下のとおりである。

**1.研究組織について**

①研究プロジェクトを効率的・効果的に遂行するための責任ある研究体制となっているか。

はい【状況について:専任教員5名、先端科学技術推進機構研究員1名、客員研究員1名、学外研究員2名、ポスドクフェロー1名、定時職員2名の効率的・効果的に研究プロジェクトを遂行できる研究体制となっている。】

いいえ【理由と対応策

】

②研究者間・研究チーム間の調整・連携はとられているか。

はい【状況について:定期的プロジェクトミーティングを開催し各研究者の研究の進捗状況の確認を行うとともに研究チーム間で情報共有と連携を行っている。】

いいえ【理由と対応策

】

③研究支援体制は整っているか。

はい【状況について:本学先端科学技術推進機構に所属する専任の事務職員が予算管理や物品調達を支援している。】

いいえ【理由と対応策

】

④大学院学生・PD等を活用し、若手研究者の育成を行っているか。

はい【状況について:本研究プロジェクトに専従のPDを雇用し、次世代ベンチトップ型シーケンサーのオペレーションができる生命科学の次世代を担う若手研究者の育成を行っている。】

いいえ【理由と対応策

】

⑤共同研究機関等との連携はとられているか。

はい【状況について:大阪大学蛋白質研究所、倉敷紡績(株)技術研究所と連携を行っている。】

いいえ【理由と対応策

】

**2.研究施設・設備等の利用について**

①研究施設の整備、プロジェクトに適合した装置設備の整備、装置・設備の利用はなされているか。

はい【状況について:本学ハイテクリサーチコアに本研究プロジェクトの拠点実験室を設け、次世代ベンチトップ型シーケンサーをはじめ本プロジェクトの遂行に必要な機械装置類を適切に配置し利用している。】

いいえ【理由と対応策

】

**3.研究計画の進捗(達成)状況、これまでの研究成果等について**

①構想調査提出時(中間評価を終えた拠点では進捗状況報告書提出時)の計画と対比して、研究は進展しているか(達成度)

はい【状況について:当初計画よりも早く次世代ベンチトップ型シーケンサーを用いてサンプルの解析を開始し新規なデータを得つつある。】

<input type="checkbox"/> いいえ【理由と対応策】	】
②当初計画と差異が生じているか。 <input checked="" type="checkbox"/> 生じていない <input type="checkbox"/> 生じている【理由と対応策】	
】	
③克服すべき問題点は生じているか。 <input checked="" type="checkbox"/> 生じていない <input type="checkbox"/> 生じている【理由と対応策】	
】	
④今後の研究方針(最終年度の場合は、期間終了後の展望)は確立しているか。 <input checked="" type="checkbox"/> はい【方策について:当初研究計画通り研究を実行し構想調書提出時の目標を達成する。】 <input type="checkbox"/> いいえ【理由と対応策】	
】	
⑤構想調書に記載したメンバー全員の研究成果は公開されているか。 <input checked="" type="checkbox"/> はい【状況について:各メンバーがそれぞれ研究成果を公表している。】 <input type="checkbox"/> いいえ【理由と対応策】	
】	
<b>4.評価体制について</b>	
①自己評価は実施しているか。 <input checked="" type="checkbox"/> はい【状況について:定期的にプロジェクトミーティングを開催し各研究者が研究の進捗状況について自己評価を行っている。】 <input type="checkbox"/> いいえ【理由と対応策】	
】	
②外部評価は実施しているか。 <input type="checkbox"/> はい【状況について】 <input checked="" type="checkbox"/> いいえ【理由と対応策:構想調書記載の通り研究開始後3年目及び5年目に実施する。】 ※3年目及び5年目の年度当初のみ、外部評価結果の概要を添付してください。	
】	
③評価結果を反映しているか。 <input checked="" type="checkbox"/> はい【状況について:評価結果を反映して研究計画に遅れを生じないように研究を遂行している。】 <input type="checkbox"/> いいえ【理由と対応策】	
】	
<b>5.外部の研究資金の導入状況について</b>	
①当該プロジェクトに関連する受託研究等、指定寄付、科研費等について獲得しているか。 <input checked="" type="checkbox"/> はい【状況について:平成26年度受託研究2件、科研費1件を獲得している。】 <input type="checkbox"/> いいえ【理由と対応策】	
】	
<b>6.留意事項への対応について</b>	
①採択時の意見または留意事項への対応について(該当の有無) 該当なし <input type="checkbox"/> はい【対応内容:】 <input type="checkbox"/> いいえ	
】	
②中間評価時の留意事項について(中間評価を終えた拠点のみ)(該当の有無) 該当なし <input type="checkbox"/> はい【対応内容:】	
】	

いいえ

**7.特記事項**

研究者の変更が生じた場合はその旨を記入

【土戸哲明教授が定年退職のため本プロジェクトの研究者として研究に従事できなくなり、研究プロジェクト全体の研究力をさらに向上させるため細見亮太助教を本プロジェクトの研究者として追加した。】

※用紙が足りない場合は適宜複写してください。

## 外部資金審査・評価部会からの意見等

平成 26 年 12 月 22 日

研究代表者

先端科学技術推進機構

理工学研究科

老川 典夫 教授

研究推進委員会 外部資金審査・評価部会長  
(戦略的研究基盤形成支援事業関係)

前田 裕

研究代表者の先生におかれましては、ご多用中、種々ご協力をいただき、誠にありがとうございます。

貴プロジェクトにおかれましては、平成 27 年度に中間評価を迎えることとなりますので、学内における研究プロジェクト支援（進捗管理）の一環として「進捗状況チェックシート」及び「研究成果の概要（3年目）」をご提出いただきました。

外部資金審査・評価部会において、研究の進捗状況について検討させていただきました結果、各委員から以下のようなご意見を頂きましたので、ご報告申し上げます。

なお、今回は、専門的な研究内容よりも、共同研究としての組織的な取り組みが行われているかどうかという観点を中心に検討いたしました。

研究進捗状況報告書作成に際して、これらの意見をもとに、ご対応いただければ幸いです。

## 記

項目	コメント
1. 研究組織 について	特に問題なし。
	研究は順調に遂行されている。
	特に問題視すべき点はみられないと考えます。特記事項にもあるように退職された研究者に代わる人材も加えられており、当初計画の実施が可能な研究体制にあると考えられます。 研究者間の調整や連携も計画通りに進められていますが、成果報告を読ませていただく限り、その成果が示されていないように感じます。すなわち、同じ実験装置を用いて各グループが別個に研究を行い、その成果を発表しているだけ、と見えてしまうのが残念に感じます。 本経費が「研究拠点形成」にかかるものである以上、各グループの成果を統括して、今後の研究につながる大きな1つの土台を作っていただくように望んでおります。
2. 研究施設・設備等に	成果が上がっているのがその証拠であろうと思料します。
	研究成果を見るかぎり、装置の使用状況は適切である。



外部資金審査・評価部会からの意見等

ついて	予算申請された装置を含め、学内の装置を活用して研究が進められており、特に問題はないものと考えられます。
3. 研究計画の進捗（達成）状況・研究成果等について	問題なし。査読付き論文などはこれから多く出てくるものと期待する。
	研究を始めて1年半であり、その成果も学术论文として投稿されており、問題ない。
	26年度の研究は現時点では未完であるが、おおむね計画通りに進行していると考えられます。 ただ、申請書の計画では「確立する」、「同定する」等の文言が使われているのに対して、報告書では「調整した」、「解析を完了した」等の文言になっている点が気になります。上記3でもコメントさせていただいたとおり、現状では各グループが特定の目的の研究（もちろんそれらが重要なことは認識しておりますが）を別個に行っているように感じます。「研究拠点形成」を目的とした経費ですので、本研究期間の終了後の研究につながるような配慮を今後入れていただければ、と思います。
4. 評価体制について	問題なし。
	今回の中間報告では問題になることは無いと思料します。
	計画通り、3年目の外部評価を受けていただくようお願いいたします。
5. 外部の研究資金の導入状況について	これも順調であるように見える。
	5名の教員で科研費1件は正直少ない。もう少し努力が必要かと思料します。
	今後も外部資金の獲得にご努力いただければと考えます。
6. 留意事項への対応について	(該当しない。)
7. 特記事項について	問題なし。適切に対応している。
	特に問題ない。
	退職された研究者に代わる人材も加えられており、研究体制を維持されていることはよいことと考えられます。
8. 総合所見	順調に推移しているように思える。阪大や倉紡との共同研究あるいは連携がどのような効果を生んでいるのか、また状況はどのようなものであるか、記載があればよかったですと思います。
	外部資金をもう少し積極的に獲得していただきたい。 ゲノム解析の先にどのような科学・社会への貢献があるのか、わかりやすく記述してほしい。
	まだ、研究開始から1年半がたった段階で評価は難しいのですが、おおむね順調に研究が進行している、と考えられます。 繰り返しになって申し訳ありませんが、現時点では各研究グループが同じ装置を用いて、特定の研究を別個に行っているように見えてしまいます。もちろん、研究されている内容

## 外部資金審査・評価部会からの意見等

の重要性はわかるのですが、本研究期間が終了して、今実施されている研究に区切りが  
いたら、と考えてしまいます。

「研究拠点形成」という観点を次回報告書には入れていただければよりよいのではない  
でしょうか。その意味からも、申請書の研究計画の文面にも記述しておられた、「手法を  
確立する」という文言が生きてくるのではないかと考えられます。また、研究グループ間  
のより積極的な連携も「研究拠点形成」の1つのキーになるものと思います。

本研究により形成を試みられた「研究拠点」を活用して、本研究の申請内容を超えるよ  
うな新たな研究につなげていかれることを期待しております。

以 上

資料2.

外部評価

「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」

◆ 外部評価委員

- ・中島 欽一 九州大学大学院 医学研究院 教授
- ・館 博 東京農業大学 短期大学部 醸造学科 教授
- ・吉村 徹 名古屋大学大学院 生命農学研究科 農学部 教授

◆ 評価日 平成27年6月-7月

◆ 評価項目

- 【1】 研究組織(研究実施体制)の適切性
- 【2】 研究プロジェクトの進捗状況・研究成果

評価コメント(まとめ)	<b>【本プロジェクトは、当初の計画に沿って着実に進展しているか?】</b>
	<p>・導入されたシーケンサーも稼働している状況が伺える。ゲノム配列も順調に決定されている。</p> <p>・研究グループ1および2については当初の計画通りに着実に研究を進展させているように思われる。一方、研究グループ3はSMTに着目した植物のセレン代謝を当初の研究課題としているが、平成25年度、26年度の成果にはこの結果はなく、行った研究は亜鉛耐性に関するものである。また、本研究プロジェクトの課題である「次世代シーケンサーの導入の貢献も明確でない。</p>
	<b>【特に優れている点】</b>
	<p>・決定された配列について細かく解析されている。また、学会などにおける発表や外部資金の獲得努力も評価出来る。</p> <p>・研究グループ1のD-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析、およびビスフェノールA分解菌のゲノム構造解析については、本研究プロジェクトのテーマに沿った着実な進展が認められる。</p>
	<b>【問題点・今後の課題】</b>
	<p>・これまでの研究展開で得られた各プロジェクトにおけるノウハウの共有が成されているかどうかの記載がなくはっきりしないが、研究の迅速かつ効率的な展開のためにも是非とも共有を図って欲しい。また、研究者活用・育成に関して、この間にどのようなポジションで何人を雇用し、どのくらい共同の研究発表会を行い、その際どのような進展が見られたかなどの具体的な記載をして欲しい。そのような機会を研究展開に役立ててもらいたい。神経系の研究に関しては、本研究で得られた成果をどのようにして、治療法開発へと結び付けるのか、もう少し具体的な記載が望まれるとともに、実現に向けた研究展開に期待したい。また、構想調書に記載されているような、「生物種の枠を超えた研究」であるからこそ得られる結果で有ることをはっきりと示すことが出来る研究展開にも期待したい。</p> <p>・今後、研究チーム間の連携を図り、研究成果の進展を期待する。</p> <p>・研究グループ3の亜鉛耐性に関する研究成果自体は評価すべきものであり、「統合的健康生命研究」の範疇に入るものとする。しかし、当初の研究計画からは逸脱しており、今後とも継続するのであれば、「当初の研究計画からの変更」を申告すべきではないだろうか。また「次世代シーケンサーによるゲノム・エピゲノム解析」については本プロジェクトの主題をなしており、より力を傾注して行かざるを得ないように思う。なお、各グループ間の連携がもう少し目に見えるものになることを期待する。</p>
<b>【期待される研究成果】</b>	
<p>・分子育種の促進、有害微生物除去法開発などの実現が期待できる。</p> <p>・各研究グループの当初計画が達成されれば、それらの結果が「健康の維持・増進」に貢献するであろうことは言うまでもない。また、微生物、植物、動物のゲノム・エピゲノム解析がどのような意義を有するかを示すよい例になるものと期待される。</p>	

## 平成25年度 技苑「プロジェクト研究報告概要」

戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

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  
研究担当者：吉田 宗弘・池内 俊彦・下家 浩二・土戸 哲明・  
松村 吉信

## 1. はじめに

老川典夫\*

これまでの生命科学の進歩は、遺伝子DNAの塩基配列（ゲノム情報）の解読による所が大きい。この過程には、プライマーを蛍光標識する方法（第1世代）やターミネーターを蛍光標識する方法（第2世代）のDNAシーケンサーが貢献してきた。しかし、近年の生命科学では、さらに進化した次世代DNAシーケンサーが登場し、逐次DNA合成を用いた超並列シーケンシングとメタゲノム解析（生物群の中の多数の個体のゲノム情報を同時に得る）が可能となり、これを用いたゲノムとエピゲノム解析が急速に進んでいる。本プロジェクトでは、次世代シーケンサーを2機種導入し、それにより従来はできなかったメタゲノム解析を含むゲノム・エピゲノム解析を共同で行う。同一の研究方法のもとに連携し発展させ、シーケンサーを目的別に性能評価し、最適で能率的な解析手段を採用することにより、従来の研究成果を飛躍的に発展させる。そして、ヒトの健康向上を目指し、有用微生物（D-アミノ酸生産菌、環境ホルモン分解菌）の全ゲノム解析による分子育種、有害微生物（食品汚染菌）の全ゲノム解析による防除法開発、動物神経細胞のエピゲノム解析による神経変性疾患の治療法開発、植物細胞のエピゲノム解析による機能性食品の開発を行うことにより、世界的な健康生命研究拠点を形成することを目的とする。したがって、研究体制は、対象とする生物種の違いにより3研究チーム（微生物ゲノム研究チーム、動物細胞エピゲノム研究チーム、植物細胞エピゲノム研究チーム）から構成するが、生物種の枠を越えて、またゲノム・エピゲノムの枠を越えて、同一の研究方法のもとに連携を図るものである。本プロジェクトでは、次世代シーケンサーという同一の研究方法のもとに、多方面の研究分野を包括し発展させ、ヒトの健康向上を目指して、

共同研究を行う。したがって、本プロジェクトは、ゲノム・エピゲノム健康生命科学というべき新しい研究分野を切り開く共同研究である。

## 2. 次世代シーケンサーによるD-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析

加藤志郎\*\*、老川典夫

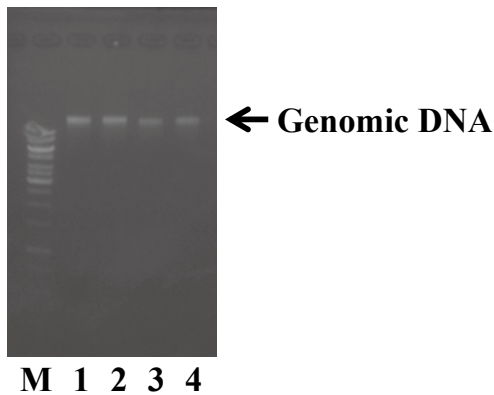
本研究で対象とする乳酸菌は、乳酸桿菌2株（*Lactobacillus sakei* LT-13、*L. sakei* LK-145）および乳酸球菌2株（*Lueconostoc mesenteroides* LT-38、*L. mesenteroides* LK-151）の4菌株である。これら4株のうち*L. sakei* LK-145および*L. mesenteroides* LK-151は酒蔵より単離されたD-アミノ酸高生産株であり<sup>1)</sup>、*L. sakei* LT-13および*L. mesenteroides* LT-38はその対照となるコントロール株である。これら4菌株の乳酸菌はいずれもそのゲノムDNAの塩基配列が解読されていない。本研究では、D-アミノ酸高生産株およびコントロール株のゲノムDNAの全塩基配列を次世代シーケンサーを用いて解読・決定し、両者を比較解析することで、乳酸菌によるD-アミノ酸高生産機構をゲノムレベルで解明することを目的とする。

まず、MRS液体培地（pH 6.2）を用いて上記4菌株の乳酸菌を培養し、菌体を回収した。なお、*L. sakei* LT-13および*L. mesenteroides* LT-38の2株は凍結乾燥状態で保存された菌体を同様のMRS液体培地を用いた回復培養を行った後に培養・集菌した。各乳酸菌について、それぞれ30℃で24時間培養した培養液5 ml相当の菌体からDNeasy Blood and Tissue Kit（Qiagen）を用いてゲノムDNAを抽出・精製した。吸光度計を用いて精製したゲノムDNAの収量算出を行うとともに、吸光度測定およびアガロースゲル電気泳動による純度評価を行った。アガロースゲル電気泳動解析の結果、各DNA

\* 化学生命工学部教授 農学博士

\*\* 先端科学技術推進機構ポスト・ドクトラル・フェロー 博士（農学）

は単一バンドにて精製されたことが確認された(図1)。各精製DNAのOD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>の値はいずれも1.8~1.9程度であり、高純度のゲノムDNAを得ることに成功した。また、それぞれのゲノムDNAの収量は4~5 µgであった。



**M: DNA Marker (200 ng)**  
**1: *L. sakei* LT-13 (40 ng)**  
**2: *L. mesenteroides* LT-38 (40 ng)**  
**3: *L. sakei* LK-145 (40 ng)**  
**4: *L. mesenteroides* LK-151 (40 ng)**

図1 菌体より抽出した各乳酸菌のゲノムDNA

次に、各乳酸菌ゲノムの全塩基配列を解読するため、精製したゲノムDNAの断片化を行った。ゲノムDNAの断片化には超音波処理によるDNA断片化装置DNA Shearing System M220 (Covaris inc.)を用いた。塩基配列決定の鋳型として用いるにあたって、適切なサイズにゲノムDNAを断片化するために、断片化条件の検討を次のように設定した5つの条件にて行った。超音波処理条件は、①Duty Factor 5%、Treatment Time 60 sec.、②Duty Factor 5%、Treatment Time 80 sec.、③Duty Factor 7.5%、Treatment Time 60 sec.、④Duty Factor 7.5%、Treatment Time 80 sec.、⑤Duty Factor 10%、Treatment Time 60 sec.とした。なお、断片化には500 ngのゲノムDNAを溶解した130 µlのTE溶液をサンプルとして用いた。超音波処理後はQiagen Mini Elute Column Kit (Qiagen)を用いて精製し、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いて断片化したDNAのサイズを評価した。2100 Bioanalyzerによる解析の結果(図2)、ゲノムDNAは条件①および②においては1,000~1,100 bpに、条件③~⑤においては900~950 bpに断片化されることが明らかとなった。次世代シーケンサーによるショットガン解析において600~900 bpのサイズのDNA断片を鋳型として用いるため、③~⑤の条件が適当であると考えられた。しかしながら、③および④の条件において断片化した際のサンプルには⑤の条件において断片

化した際のサンプルと比較して、300 bp以下の小断片が多く含まれていた。このようなサイズの小さすぎる小断片は塩基配列解読・決定のための鋳型としては適切ではない。これらの結果から、本研究においては⑤の条件においてゲノムDNAの断片化を行うことが最も適切であると考えられた。

これまでに、上記条件検討の結果決定した最適条件にて当該の4菌株の乳酸菌ゲノムDNAの断片化を行い、断片化DNAの精製を完了した。今後は断片化DNAを鋳型として用いて4菌株の乳酸菌の全塩基配列解読を行う予定である。

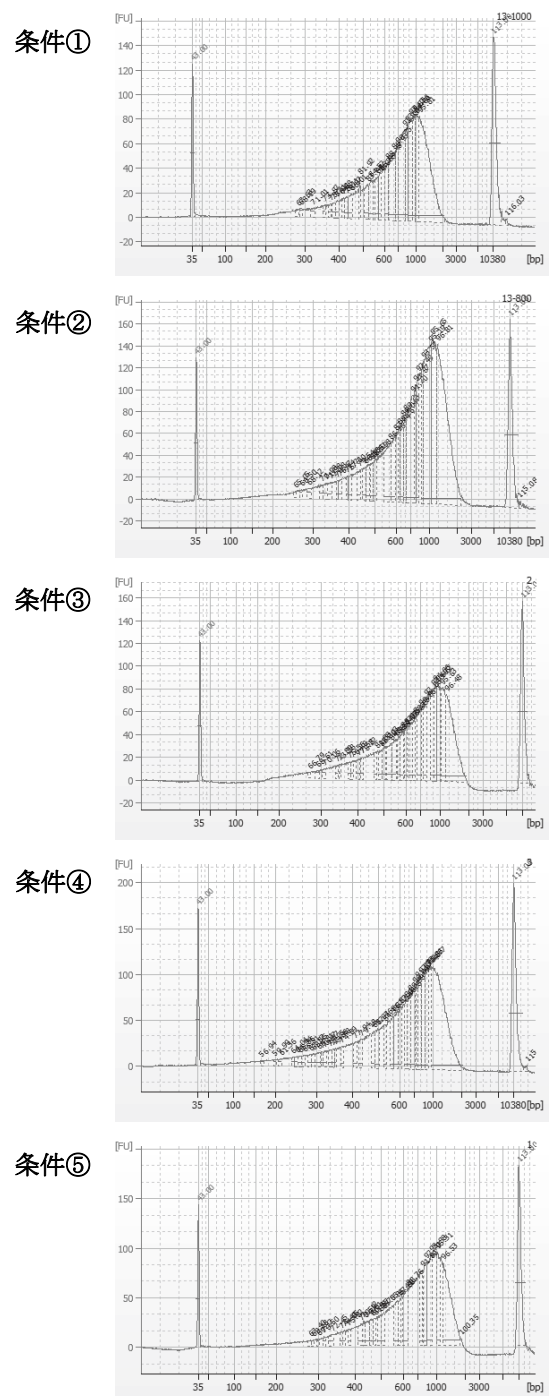


図2 ゲノムDNA断片化条件の検討

### 3. 誘導体化とGC-MSによるセレン蓄積スプラウト中の含セレンアミノ酸の同定

吉田宗弘\*

セレン (Se) はイオウの同族元素であり、自然界には含硫アミノ酸のSeアナログである含Seアミノ酸が存在する。特に、Seを蓄積した植物には、Se-メチルセレンシステイン (MeSec) をはじめとする多様な含Seアミノ酸が存在する。Se化合物の同定には、誘導結合プラズマ質量分析 (ICPMS) を検出に用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC-MS) が頻用されている。前者ではSe化合物を特異的に検出でき、後者では未知化合物の構造を推定できる。しかし、HPLC-ICPMSが有機溶媒、LC-MSが揮発性の溶媒をそれぞれ嫌うことから、両者を共通のカラム-溶媒系で実施することは困難である。したがって、Se化合物の同定においてHPLC-ICPMSとLC-MSは独立して用いられており、食品や生体中のSe化合物の同定を効率よく進めることは現在でも難しい。

一方、ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS) は、未知化合物の同定技術として古くから確立している。含Seアミノ酸のような非揮発性化合物の場合、GC-MSで分析するには誘導体化処理を行うことが必要である。近年、生体や食品中の遊離アミノ酸を固相抽出後、誘導体化処理するキット (アミノ酸誘導体化キット) が開発されており、アミノ酸類のGC-MS分析を簡便かつ短時間で実施することが可能となっている。今回、Se蓄積スプラウト中の含Seアミノ酸をこのようなアミノ酸誘導体化キットとGC-MSを用いて同定することに成功したので報告する。

Se蓄積カイワレダイコンスプラウト (Seスプラウト) は亜セレン酸ナトリウム水溶液を用いて栽培し、調製した。調製したスプラウトのSe含量は82.3 µg/g dry weightであった。また、アミノ酸誘導体化を行うためのアミノ酸分析キットEZ:faast™ (Phenomenex社、米国) は島津GLC (京都) より購入した。スプラウトの乾燥粉末100 mgに50%エタノール5 mlを加え、十分に攪拌した後、遠心分離して抽出液を調製し、分析用の試料とした。抽出液へのSeの抽出率は80.9%であった。各抽出液100 µlにアミノ酸分析キットであるEZ:faast™を用いて誘導体化処理を行い、GC-MS用の試料を調製した。GC-MSの分析条件は以下のとおりである。機器、Parvum 2 (島津、京都)；カラム、Zebron ZB-AAA (Phenomenex社、米国)；キャリアガス、ヘリウム；流

量、1.1 ml/min；気化温度、250 °C；カラム温度、110～320 °C (30 °C/min昇温)；分析時間、7分；試料注入量、2 µl；イオン源温度、240 °C；スキャン範囲、45～450 m/z；サンプリング速度、3.5 scan/s。

すでに、HPLC-ICPMSを用いた分析では、Seスプラウト中のSeの主要な分子種がMeSecであることが推定できている。そこで本実験では、Seスプラウト中に存在すると考えられるMeSecを誘導体化後、GC-MSを用いて同定することを試みた。ガスクロマトグラムにおいて、標準MeSecの誘導体由来するピークは保持時間2.87分付近に認められた。これに対して、誘導体化処理したSeスプラウト抽出液にも、ガスクロマトグラム上で、標準MeSecの誘導体と同じ保持時間を示す化合物の存在が認められた。この化合物のマススペクトルを標準MeSecの誘導体のマススペクトルと比較したところ、両者のマススペクトルはほぼ一致していた。

天然には様々なSeの安定同位体が存在する。この中で<sup>78</sup>Se、<sup>80</sup>Se、<sup>82</sup>Seの存在比(<sup>78</sup>Se：<sup>80</sup>Se：<sup>82</sup>Se)は2：4：1に近似している。このことは、マススペクトルにおいてm-2、m、m+2 m/zの比が2：4：1を示す分子イオンピークやフラグメントイオンピークが存在すれば、その化合物がSeを含有する可能性が高いことを意味する。本実験で用いたアミノ酸分析キットを用いると、アミノ酸のアミノ基がカルボキシプロピル化、カルボキシル基がプロピル化されるので、誘導体の分子量はもとのアミノ酸よりも128増加する。誘導体化処理したSeスプラウト抽出液のマススペクトルには、誘導体化MeSec (C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>NSe) の分子イオンに由来する309、311、313 m/z、および誘導体からカルボキシプロピル基 (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>COO<sup>-</sup>) が1つとれたフラグメントイオンに由来する222、224、226 m/zがいずれも約2：4：1の比で認められた。また、他にもm-2、m、m+2 m/zの比が2：4：1となっているイオンピークがいくつか存在していた。以上より、誘導体化処理したSeスプラウト抽出液のガスクロマトグラムにおいて、保持時間2.87分を示した化合物は誘導体化MeSecであり、Seスプラウト中にMeSecの存在することをGC-MSを用いて証明できたと考える。

### 4. HDAC阻害剤TSAによる神経突起伸長作用における遺伝子発現のエピジェネティックな制御機構

池内俊彦\*\*、丸岡弘規\*\*\*

ラット副腎髄質褐色細胞腫由来のモデル神経細胞であるPC12細胞は、神経分化 (神経突起伸長) の細胞内分

\* 化学生命工学部教授 農学博士、医学博士

\*\* 化学生命工学部教授 理学博士

\*\*\* 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士 (工学)

子機構の解析に多用されている。本研究では、ヒドロキサム酸HDAC阻害剤であるTrichostatin A (TSA) によるPC12 細胞の神経突起伸長作用の解析を行った。TSA によって誘導される神経突起伸長作用が、immediate early genes (IEGs) (最初期遺伝子) の1つであるnur77 遺伝子産物であるNur77 によって制御されることが明らかになった。また、TSAによるエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節に、Histone acetyltransferase (HAT)/p300 によるヒストンH3のアセチル化が重要であることが判明した。神経突起伸長がHAT/p300 阻害剤であるC646 を添加することによって抑制され、IEGsであるnur77 遺伝子の発現もC646 で抑制されることが分かった。次に、TSAによって誘導される神経突起伸長において、IEGsがどのような役割を担っているか解析を行った。nur77 とc-fosのmRNAをそれぞれノックダウンした細胞群にTSAを添加し、神経突起伸長への影響を解析した結果、c-fosをノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制が見られなかったが、nur77 をノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制を確認することができた。また、PC12 細胞にNur77 を過剰発現させた細胞群は、無血清状態にすることにより、神経突起を伸長することが分かった。以上の結果から、我々は、TSAによるPC12 細胞の神経突起伸長には、IEGsの一つであるnur77 遺伝子の発現が重要であることを明らかにした。更に、nur77 遺伝子が転写活性化の標的になっているかを確認する目的で、ChIP (chromatin immunoprecipitation) assayを用いてヒストンH3 アセチル化サイトとnur77 遺伝子のプロモーター領域との結合を確認した。解析の結果、nur77 遺伝子のプロモーター領域はヒストンH3 の14 番目のリシン残基のアセチル化サイト近傍に存在することを明らかにした。これらの結果から、TSAによって誘導されるPC12 細胞の神経突起伸長には、HAT/p300 やHDACsによるヒストン修飾を介したエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節が重要であることが明らかになった。そこで、nur77 遺伝子の発現機構を詳細に解析するため、PC12 細胞の染色体DNAからnur77 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したプラスミドを作成し、Luciferase Reporter Assayを行った。nur77 遺伝子のプロモーターの発現は、TSAの添加により有意に上昇した。これは、nur77 遺伝子のプロモーターの発現がヒストン修飾を介してエピジェネティックな発現制御を受けていることを示唆している。現在、TSA未処理条件と処理条件でのnur77 遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化と脱メチル化を、次世代シーケンサーを使用して解析している。TSAによる神経突起伸長におけるnur77 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機

構を、dbcAMPによる神経突起伸長と比較しながら、詳細に解析する予定である。

## 5. ヒストン脱アセチル化阻害剤やsiRNAをツールとした神経突起伸長作用のエピジェネティクス

下家浩二\*, 木村博信\*\*

### 5.1. 緒言

ゲノム内の塩基配列情報は、生命の全てを規定する情報であり、この配列情報こそが21世紀の分子・細胞生物学を起点とした、所謂、バイオ分野をけん引するものと考えられてきた。しかし、ヒト全ゲノム解析が終了後、様々な生物種における全ゲノム解析も終了し、明るい未来の到来を想定してきた人類は、未だにゲノム解析の不十分さに悩まされている。その理由は、発現する遺伝子が塩基配列の変化を伴わず、環境要因で容易に変化することにある。ゲノムインプリンティングの様なプログラムされた変化とは違いがあり、21世紀はエピジェネティクスというバイオ分野の新分野の解析が人類に残された課題となる。

本稿では、エピジェネティクスに関わるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による特定の遺伝子発現制御機構の解析と表現型の変化に関する新知見を紹介する。

### 5.2. ヒストン脱アセチル化酵素の働き

HDACは、ヒストンタンパク質の特定のアミノ酸残基にアセチル基を付加させる活性を有する酵素である。現在までにSirファミリータンパク質群を除き、11種類の存在が確認されている。そもそもクロマチン構造中のヒストンとDNAは、それぞれ、正と負の電荷によって結合した状態で維持されている。従って、ヒストンタンパク質中の特定のリシン残基にアセチル基が付加されると電荷による結合力が失われることから、ヘテロクロマチン化 (或いは、クロマチン構造中のヒストンタンパク質とDNAの微小な部位の露出化) され、遺伝情報を有しているDNAにRNAポリメラーゼが接触可能となり、転写が誘導される。現在では、アセチル化のほかにもメチル化、リン酸化、ユビキチン化による構造変化も知られるようになった (図3を参照)。このように一見単純な分子機構であるが、かなり緻密に制御されていることが明らかにされつつある。さらに、ヒストンタンパク質だけではなく、DNA側も脱メチル化酵素によって主にプロモーター領域における転写誘導される分子機構の存在もエピジェネティクスを理解する上で重要な現象である<sup>2)</sup>。

\* 化学生命工学部准教授 博士 (理学)

\*\* 大阪大学蛋白質研究所助教 博士 (理学)

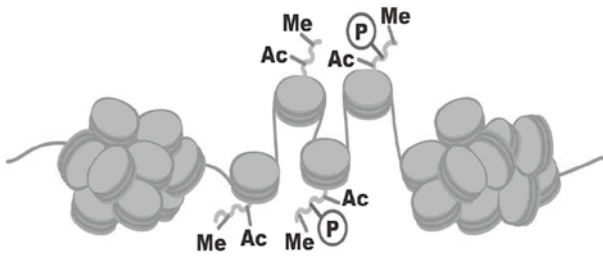


図3 クロマチン構造の模式図

ヒストンタンパク質とDNAの空間がある部位にはアセチル化 (Ac) の他にも、リン酸化 (P)、メチル化 (Me) などの修飾が見られる。

### 5.3. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やsiRNAを用いた機構解析

HDACに関する遺伝子発現制御機構の解析では、HDAC阻害剤が数多く存在し、エピジェネティクスの研究の質を向上させている。良く知られている阻害剤では、医薬品として上市されているバルプロ酸 (デパケン)、MS-275、トリコスタチンAが挙げられる。これらは、抗がん剤として開発されてきた経緯もあり (バルプロ酸は抗てんかん薬)、毒性も高いため、神経系における作用についてはごく最近になり報告されるようになった<sup>3)</sup>。神経系での作用は、神経突起の伸長作用が報告されているが、抗がん剤での薬剤濃度よりも低い濃度で十分な作用が観察されている。特に、脱髄に対するin vivoでの研究成果が注目に値する<sup>4)</sup>。このような作用の解析には、特定HDACを阻害する必要がある、メルク社からHDAC1とHDAC2に特異的な阻害剤が開発され、注目されている。私は、この薬剤と同様の特異性を有する薬剤K-560を本学の上里教授よりご分与いただき、神経突起伸長作用ではなく、神経細胞死の抑制作用を有することを見出している (manuscript in preparation)。この結果は、特定のHDACが特定の生命現象を司ることを強く示唆している。この作用解析のためには、HDAC1とHDAC2に特異的なsiRNAを用いた解析も必要と考えられ、本研究の新たな展望が開けた。注視すべき研究課題であると認識している。

## 6. 食品汚染細菌のストレスに関わる耐性関連遺伝子と暴露後の生存性との関係解析

土戸哲明\*、坂元 仁\*\*

### 6.1. はじめに

医療分野や食品製造分野では耐性菌の出現が問題となっており、それらの細菌における遺伝子の機能と生存性・耐性化・感受性化に関わる表現型の知見の重要性は

増加している。こうした情報をシステマティックに取得するため、これまでシンプルなモデル生物として大腸菌、枯草菌、酵母などで多くの研究が取り組まれてきた。これらでは単独遺伝子破壊株ライブラリーが構築され、必須遺伝子の特定をはじめ、表現型に関する多くの有用なデータが提供された。単一遺伝子の変異株を用いた逆遺伝学的解析は、分子生物学における最も標準的な手法である。この手法で表現型に違いがある場合は強力な手法となるが、表現型に違いがない場合、その遺伝子の機能解析は困難となる。この原因の1つとして、生物自体が類似した機能を持つ遺伝子を複数コードしており、それらの遺伝子産物が相補的に働くためではないかと推定される。この問題の解決には多重遺伝子破壊によるバックグラウンド活性の消去が有効であろう。さらに多重欠損した場合にしか観察されない未知の表現型を検出できれば、存在意義が不明であった未知機能遺伝子の解明の一助になると期待される。

本研究では、枯草菌におけるスーパーオキシドアニオン、過酸化水素、有機ペルオキシドなどの活性酸素種 (ROS) に対する防御因子をコードする遺伝子群の組合せの多重遺伝子破壊株を構築し、熱ストレスや種々の薬剤に対する感受性化および耐性化現象などの表現型を調査した。さらにこれらの多重欠損株で発現量が著しく増加した遺伝子をマイクロアレイにより分析し、これらの遺伝子が本当に耐性化に関与するかも調査した。本研究を通して多重遺伝子破壊を用いた新たな耐性化・感受性化に関する機能解明モデルを提示したい。

### 6.2. カタラーゼ遺伝子多重破壊によるカタラーゼ活性の増加現象と有機ペルオキシド耐性化

はじめに、枯草菌 168 株の3種類のカタラーゼを多重遺伝子破壊の標的とした。*katA*単独欠損により細胞内カタラーゼ活性は著しく低下したが、*katA*、*katX*二重欠損によりさらに低下することはなく、親株と同程度に細胞内カタラーゼ活性が回復した。*katA*、*katE*、*katX*三重欠損により細胞内カタラーゼ活性はほぼ消失した。*katA*、*katE*二重欠損により細胞内過酸化水素レベルがある閾値を低下した時、*katE*の転写を誘導し、カタラーゼ活性を正常レベルに回復させたのだろう。また、これらの単独欠損や多重欠損株は有機ペルオキシドである*t*-ブチルペルオキシドに対して高い耐性を示した。これはカタラーゼとは異なるシステムによる交叉耐性の獲得を示唆していた。

### 6.3. 多重欠損株の耐性化・感受性化パターン (RSマトリクス) の網羅的解析

上記の結果を受け、枯草菌の酸化ストレス耐性化シス

\* 化学生命工学部教授 工学博士

\*\* 化学生命工学部特任助教 博士 (工学)



テムの全貌を調査するため、カタラーゼを含めた主要な抗酸化因子の多重欠損を試みた。対象とした遺伝子は、上記の3種類のカタラーゼ (*katA*, *katE*, *katX*、以下KATs) と、3種類のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) ホモログ (*sodA*, *sodF*, *yojM*、以下包括的にSODsと表記)、有機ペルオキシド耐性に関与すると推定される5つの酵素・タンパク質 (*ahpC*, *ahpF*, *ohrA*, *ohrR*, *ohrB*、以下ORGs) の遺伝子群である。解析には致死レベルのストレスに曝して生存率の調査と、非致死レベルで増殖阻害を調査した。測定にはハンドリングの手間を大幅に簡略化でき、大規模処理に適した自動濁度測定装置と、それを用いた生育遅延解析法により生存率を求めた。その結果、過酸化水素に対しては、KATsの欠損による顕著な増殖阻害や感受性化が観察されたが、ORGsの欠損によって致死濃度での耐性化も観察された。*t*-ブチルペルオキシドでは、KATs、SODs、ORGsユニット単独や組み合わせでも致死濃度での耐性化が観察された。これらの結果は過酸化水素や有機ペルオキシドに対する未知の耐性化因子の存在を示唆している。一方、重金属系やエタノールのストレスはメナジオンによるスーパーオキシドラジカルとのRSマトリクスと類似し、次亜塩素酸によるストレスは過酸化水素でのRSマトリクスと類似していた。

#### 6.4. 多重欠損により過剰発現したMrgAの解析

多重欠損株の全遺伝子の発現量をマイクロアレイ解析し、親株と比較したところ、多重化に伴い発現量が著しく増大した遺伝子として*mrgA*と*yneN*が耐性化因子の候補として浮上した。*mrgA*、*yneN*単独欠損株の耐性挙動は親株と同じであったが、KATs、SODs、ORGsへ多重欠損したところ、*yneN*欠損では変化が観察されなかったが、*mrgA*欠損にて感受性化が観察され、耐性化にMrgAが関与していることが明らかとなった。MrgAと相同性がある大腸菌のDpsは、DNAとの結合能を持ち、フェントン反応を阻害して有毒なヒドロキシルラジカルの発生を抑えることで、酸化から細胞を保護すると考えられている。一方、枯草菌のMrgAにはDNA結合能がなく、細胞内でDNAだけでなくタンパク質も含めた生体成分のフェントン反応を阻止することで防御していることが*in vitro*実験から示唆された。

#### 6.5. まとめ

主要な抗酸化システムの多重遺伝子破壊群の構築とその表現型解析により、細胞防御システムの遺伝子破壊による耐性化獲得機構など従来の常識では考え及ばない現象を見出し、その耐性化機構の解明や、応用に関して研究を展開できた。こうした細胞のストレス応答ネット

ワークシステムの網羅的解析手法をゲノサバイボーム (Genosurvivome) 解析と名付けた。この手法による作用特性の類型化によって、バイオアッセイ法としての1次スクリーニングや種々の環境ストレスの活性酸素発生能の有無判定・種特定法としての活用も期待できる。

### 7. ビスフェノールA分解菌*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

松村吉信\*

#### 7.1. はじめに

近年の科学技術の進歩で様々な新規化合物が合成されるようになり、その一部は大量使用されるようになっている。一方で、廃棄物処理技術については、リサイクルの重要性が高まってはいるものの、そのコスト回収の困難さ故に燃焼などのエネルギー利用としての側面を除いて進んでいないのが現状である。また、最近の大気中の二酸化炭素濃度の上昇や揮発性ガスの排出量の増加による地球温暖化の問題もクローズアップされるようになり、人工合成された化合物の後処理は大きな問題となっている。さらに、ビスフェノールA (BPA) をはじめとする一部の化合物に生体の内分泌系に影響を及ぼす物質があるとの報告から、人工化合物の後処理は生態系の維持の観点からも非常に重要な事項となっている。我々の研究室では、すでに茨城県つくば市の畑土壌よりBPA分解能の高い*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株を単離し、様々なフェノール系化合物の分解能を有していることを示し、人工化合物処理に有用な菌株であることを示した<sup>5)</sup>。しかしながら、AO1株を長期保存すると一部の細胞のBPA分解能が極度に低下することを見出し、その一つの細胞をAO1L株と名付け、AO1株との比較解析を行ったところ、BPA分解能が低下しただけではなく、AO1株で分解できるほとんどすべての人工化合物の分解能がAO1L株では低下あるいは欠失していた<sup>5,6)</sup>。さらに、AO1L株ではBPA分解に必要となる*bisdAB*遺伝子も欠落していることが確認された。そこで、AO1株におけるBPAやその他の人工化合物分解能の安定性確保ならびに分解能向上のため、AO1株のゲノム構造の解析を試みた。

#### 7.2. *S. bisphenolicum* AO1株に存在する内在性プラスミドの確認

AO1株におけるBPA分解はチトクロムP450 (P450<sub>bisd</sub>)モノオキシゲナーゼシステムによる水酸化によって始まることやそのチトクロムP450やフェレドキシンをコー

\* 化学生命工学部准教授 博士 (工学)

ドする遺伝子がそれぞれ *bisdB* と *bisdA* であることを明らかにしている<sup>7)</sup>。そこで、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いて内在性プラスミドの確認を試みた。その結果、AO1株で少なくとも4種類のプラスミド断片を確認することができた(図4)。さらにAO1L株では、このうち1種類のプラスミド断片(約70 kb)の消失と新たに2種類のプラスミド断片の出現が確認された。このことから、AO1株のみで確認された約70 kb断片のプラスミドをpBAR1と名付け、塩基配列決定を行うことにした。

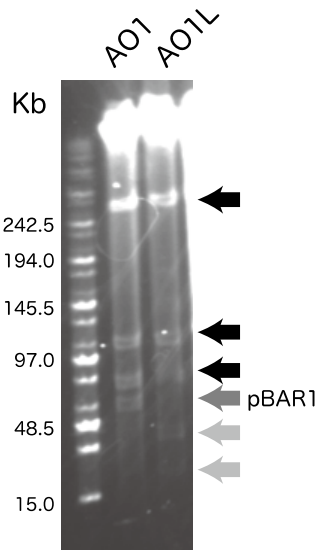


図4 パルスフィールドゲル電気泳動による内在性プラスミドの確認

黒矢印がAO1株およびAO1L株どちらも確認されたプラスミド、灰色はAO1L株だけで確認されたプラスミドを示す。pBAR1は、AO1株のみで確認された。

### 7.3. pBAR1の塩基配列決定

ABI社製のDNAシーケンサー (ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 Genetic Analyzerまたは3130xl Genetic Analyzer) でpBAR1の塩基配列決定を試みた。現在までに約50 kbの領域を解読することに成功している。その結果、pBAR1に *bisdAB* がコードされていることが明らかとなった。さらに、BPAや人工化合物分解に関わると予想される aldehyde dehydro-genase 遺伝子 (*adh*) や lignostilben- $\alpha,\beta$ -di-oxygenase 遺伝子 (*lsd*)、4-hydroxy-bezoate 3-monooxygenase 遺伝子 (*bisdF*) も確認され、pBAR1がAO1株のBPA分解能に非常に重要となる因子であることが確認された。さらに、トランスポゾンや接合伝達に関わる遺伝子も多数コードされていることから、pBAR1自身の構造上の不安定性も予想することができた。

### 7.4. *S. bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

これまでにpBAR1の塩基配列の一部領域の解読には成功しているものの、全領域の解読には至っていない。

また、現在解読できた領域ではBPA分解に関わる遺伝子は一部を除いて未解明である。そこで、次世代型シーケンサーを用いてAO1株の全ゲノム構造の解読を試みた。Rosche社の450プラットフォームで全ゲノム解析を行った結果、755,334リード、527,626,490塩基の解読に成功した。さらに、GS *de novo* assemblerプログラムによる解析から、95個のcontigに集約され、総塩基数は5,102,688塩基となった。また、この内の10個のcontigがpBAR1由来であることも確認された。CLC genomics workbenchソフトウェアでの解析では、421個のcontigとなった。さらに、得られたcontigおよびリードを用いて既読のpBAR1塩基配列と比較した結果、一部領域を除いてほぼ一致していることが確認された(図5)。それぞれの領域のcoverageを確認すると、一部領域で非常に多くのリードが重複していることが確認され、この領域は染色体やプラスミドに複数領域でコードされているものと予想された。今後、全ゲノム構造の解読を行う予定である。

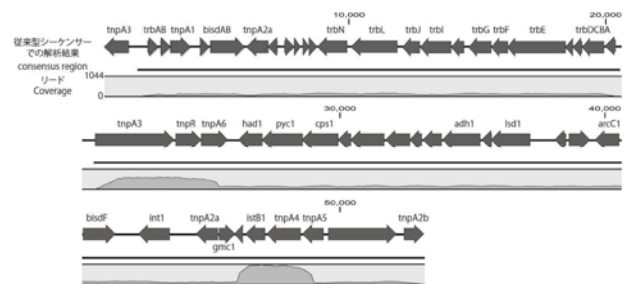


図5 次世代シーケンサーと従来型シーケンサーによるpBAR1塩基配列解析比較

リードCoverageは次世代型シーケンサーで解読されたリード数を示す。

### 謝辞

本研究の一部は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成25年度~平成29年度)」によって実施されたものである。

### 参考文献

- 1) 老川典夫, *生化学*, 85, 62 (2013).
- 2) Kimura H., *et al.*, *J. Biochem.*, 120, 1182-1189 (1996).
- 3) Maruoka H., *et al.*, *J. Biochem.*, 148, 93-101 (2010).
- 4) Abematsu M., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 120, 3255-3266 (2010).
- 5) Matsumura Y., *et al.*, *Biocontrol Sci.*, 14, 161-169 (2009).
- 6) Sasaki M., *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1158-1169 (2008).
- 7) Sasaki M., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 8024-8030 (2005).

## 平成26年度 技苑「プロジェクト研究報告概要」

戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

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  
 研究担当者：吉田 宗弘・池内 俊彦・下家 浩二・  
 松村 吉信・細見 亮太・木村 博信・  
 丸岡 弘規

## 1. 次世代シーケンサーによるD-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析

加藤志郎\*1、老川典夫\*2

## 1.1. はじめに

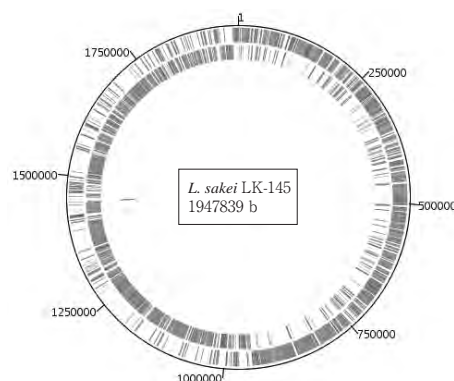
様々な食品中にD-アミノ酸が含まれ、中でも発酵食品はD-アミノ酸含量が高いことおよび含有するD-アミノ酸の種類が多様であることが知られている。近年、食品発酵過程において乳酸菌がD-アミノ酸生産に大きく寄与することが明らかとなってきた。個々の乳酸菌においては細胞壁構成成分としてこれらのD-アミノ酸が利用されているものと考えられるが、D-アミノ酸が真核生物においても重要な生理的役割を担うことが明らかにされ、さらに我々は植物芽生えの生育にもD-アミノ酸が影響を及ぼすことを明らかにしている<sup>1)</sup>。また、経口摂取（食事）による外因性D-アミノ酸が生体内において生理作用を示し得ることが示唆されつつある今日、私たちが日常摂取する食品中のD-アミノ酸生成に寄与する乳酸菌のD-アミノ酸生産機構を解き明かすことは、意義深い研究課題となっている。

本研究では、乳酸桿菌2株 (*Lactobacillus sakei* LT-13 (= *Lactobacillus sakei* NBRC 15893<sup>T</sup>)、*L. sakei* LK-145) および乳酸球菌2株 (*Leuconostoc mesenteroides* LT-38 (= *Leuconostoc mesenteroides* NBRC 3426<sup>T</sup>)、*L. mesenteroides* LK-151) の4株の乳酸菌を対象としており、*L. sakei* LK-145 および *L. mesenteroides* LK-151 は酒造会社の酒蔵より単離されたD-アミノ酸高生産株であり、*L. sakei* LT-13 および *L. mesenteroides* LT-38 はその対照として用いたD-アミノ酸生産能の低い基準株 (Type strain) である。次世代シーケンサーを用いてゲノムDNAおよび各乳酸菌が保持するプラスミドDNAの全塩基配列を解読・決定し、D-アミノ酸高生産機構をゲノムレベルで解明することを本研究の目的としている。

## 1.2. 乳酸菌のゲノム解析

本研究ではRoche社のGS junior 454 およびLife science社のIon PGMの2台の次世代シーケンサーを使用した。GS junior 454 を用いて500 base readのshotgun解析および8 kb spanでのpaired end解析を、Ion PGMを用いて200 base readのshotgun解析をそれぞれ行った。GS junior 454 およびIon PGMを用いたshotgun解析により、数十～百Mbのほぼ同程度のreadデータが得られた。shotgun解析のみのreadデータを用いた*de novo*解析では、既知の乳酸菌と比較してゲノム全長をほぼカバーしていたものの数十のContig構築に留まり、1つのScaffoldへと収束させるためにはpaired end解析の実施が必要であった。

そこで、GS junior 454 より得られた500 base readのshotgun解析および8 kb spanでのpaired end解析のreadデータを用いて、*L. sakei* LT-13、*L. sakei* LK-145 および *L. mesenteroides* LK-151 ゲノムの*de novo*解析を行った結果、3株ともにゲノムマップの構築に至った(図1~3)。

図1. *Lactobacillus sakei* LK-145のゲノムマップ

\*1 先端科学技術推進機構ポスト・ドクトラル・フェロー 博士(農学)

\*2 化学生命工学部教授 農学博士

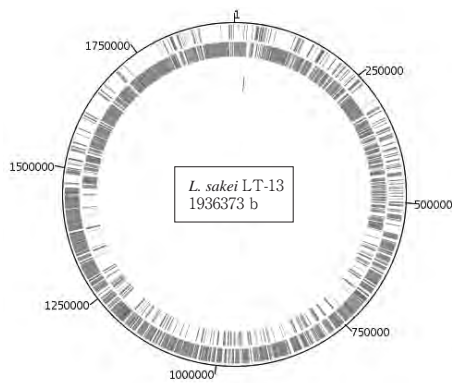


図2. *Lactobacillus sakei* LT-13のゲノムマップ

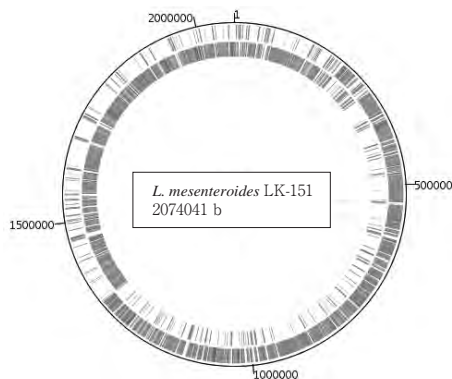


図3. *Leuconostoc mesenteroides* LK-151のゲノムマップ

各乳酸菌ゲノムの推定サイズ、GC含量、RBSおよびCDSの推定数(表1)は既報の同種乳酸菌と同程度であった。

表1. 乳酸菌のゲノムDNA

	<i>L. sakei</i>		<i>L. mesenteroides</i>
	LT-13	LK-145	LK-151
Chromosome length (Mb)	1.94	1.95	2.07
Gap region (kb)	56	41	9.4
GC content (%)	40.0	42.0	37.5
RBS	1889	1861	1956
CDS	1949	1921	2070
tRNA	43	43	35
rRNA	1	1	0

*L. sakei* LT-13、*L. sakei* LK-145 ゲノム上にはAla、GluおよびAspのラセマーゼ遺伝子が、*L. mesenteroides* LK-151ゲノム上にはAla、Glu、HisおよびLysのラセマーゼ遺伝子が1コピーずつ存在しており、D-アミノ酸合成酵素遺伝子の保存性は既知の乳酸菌と一致した。D-アミノ酸に対応するL-アミノ酸の代謝酵素遺伝子の保存性もまた既知の乳酸菌と一致しており、D-アミノ酸高生産機構解明のためにはアミノ酸を直接代謝する酵素のみではなく、周辺の広範な代謝経路の解析が必要であると考えられる。また、構築したドラフト配列中のtRNAおよびrRNAコード領域数が既知の乳酸菌と比較

して少ないことは、各ドラフト配列中に数~数十kb程度のギャップ領域が残るためであると考えられ、ギャップ領域の解析もまた必要となる。

解析に供した各乳酸菌はそれぞれ少なくとも1つまたは3つのプラスミドを保持することもまた明らかとなり(表2)、これらのプラスミドには、推定の制限酵素遺伝子、接合伝達、核酸代謝に関与する遺伝子群や推定のリポタンパク質遺伝子等がコードされていた。アミノ酸代謝に直接関与すると予測される遺伝子は見出されなかったものの、保持プラスミドの差異がD-アミノ酸生産に与える影響もまた興味深い検討課題である。

表2. 乳酸菌のプラスミドDNA

Plasmid length (kb)	<i>L. sakei</i>		<i>L. mesenteroides</i>
	LT-13	LK-145	LK-151
1	33.4	6.2	30.4
2	6.2	-	14.4
3	4.3	-	2.9

これまでに上記3株のゲノムドラフト配列構築が完了しており、現在、残る1株のドラフト配列構築および各株ゲノム配列のギャップ領域の塩基配列決定を進めている。全4株のゲノムおよびプラスミドの塩基配列を完全決定し、個々の乳酸菌のアミノ酸を中心とした代謝経路の詳細な解析を進めることで、乳酸菌におけるD-アミノ酸高生産の分子機構の解明に迫りたいと考えている。

## 2. 亜鉛強化カイワレダイコンスプラウトの調製と遺伝子発現評価

吉田宗弘\*3、細見亮太\*4

### 2.1. はじめに

亜鉛は生体内で多くの酵素タンパク質の活性発現や立体構造の維持に関わっており、細胞分裂、免疫機能の維持、創傷の治癒などに必須の微量ミネラルである。平成22年と23年の国民健康栄養調査における18歳以上の日本人成人の亜鉛摂取量中央値は、男性が7.9~8.9 mg/日、女性が6.6~7.3 mg/日であり<sup>2)</sup>、日本人の食事摂取基準における18歳以上の亜鉛の推定平均必要量である男性9~10 mg/日、女性7~8 mg/日<sup>3)</sup>を下回っている。このことは、日本人成人の半数以上は、亜鉛摂取不足のリスクが高く、推奨量(成人男性11~12 mg/日、女性9 mg/日)程度にまで亜鉛摂取量を増やすことが望ましい状態であることを意味している。しかし、日本人の主な亜鉛供給源は、穀物、魚介類、肉類であり、カル

\*3 化学生命工学部教授 農学博士、医学博士

\*4 化学生命工学部助教 博士(工学)

シウムと同様に動物性食品への依存度が比較的高いため<sup>4)</sup>、通常の食生活において十分な亜鉛摂取を確保することは難しいと考えられる。したがって、日本において亜鉛は、公衆栄養的な意味で強化食品やサプリメントに存在意義がある数少ない栄養素と思われる<sup>5)</sup>。

他方、食用植物の種子を水耕環境下で発芽・生育させたスプラウトが健康食材として着目されており、生産量も増加している。スプラウト類は、水耕に用いる溶液に添加された低分子化合物を容易に取り込むため、意図的に栄養素濃度を高めることが可能である。このようなコンセプトのもと、ビタミンB<sub>12</sub>を高濃度に含有するカイワレダイコンスプラウトがすでに市販されている。微量ミネラルに関しても、鉄強化スプラウトやセレン強化スプラウトの調製が試みられている。そこで本研究では、日本人の亜鉛摂取状況の改善に役立つと考えられる亜鉛強化スプラウトの調製を試みた。また、2014年にダイコンゲノムの塩基配列が決定したことを受け<sup>6)</sup>、カスタムオリゴDNAマイクロアレイにてスプラウトの遺伝子発現量を評価し、亜鉛強化に伴う機能性成分増大の予測を試みた。

## 2.2. 実験方法

### (1) 亜鉛強化カイワレダイコンスプラウト調製条件の検討

亜鉛強化カイワレダイコンスプラウトの調製法として、水耕栽培中に亜鉛曝露を行う方法（水耕中曝露法）を用いた。亜鉛濃度0、20、50、100、または200 µg/mLの硫酸亜鉛溶液70 mLを含ませた2.5 gの脱脂綿をポリエチレン製クリーンカップ（129 φ×88 mm、リスパック株式会社、岐阜）の底に敷き詰め、株式会社トーホク（宇都宮）から購入したカイワレダイコン（*Raphanus sativus*）の種子約2 gを播き、暗所25℃に2日間静置して発芽させ、その後蛍光灯下25℃で5日間栽培した。

### (2) DNAマイクロアレイ用亜鉛強化スプラウトの調製

亜鉛濃度0、20、100 µg/mLの硫酸亜鉛溶液を用い、水耕中曝露法で亜鉛強化スプラウトを調製した。0および100 µg/mLでは、20 µg/mLと比較し成長阻害が見られたために、0および100 µg/mLで5日間栽培した長さと同様になるよう20 µg/mLで調製した亜鉛強化スプラウトを2種栽培した（2.5 cmおよび4 cm）。採取した双葉をRNAレーター（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京）に浸漬し、分析まで-70℃保存した。

### (3) RNA抽出とDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析

亜鉛曝露がカイワレダイコンスプラウトにおける遺伝子発現量に及ぼす影響を評価するために、DNAマイクロ

アレイ解析を行った。カイワレダイコンスプラウトの双葉からTrizol（Thermo Fisher Scientific K.K., Yokohama, Japan）を用いた方法で総RNA抽出を行った。抽出した総RNAはExperion（Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA）による品質検査を行った。各50 ngの総RNAを用いて、Agilent Low-Input QuickAmp Labeling Kit, one-color（Agilent Technologies, CA, USA）によりラベリング反応を行った。DNAチップはダイコン（*Raphanus sativus* L.）の遺伝子データベース（<http://radish.kazusa.or.jp/index.html>）を用いて作成したカスタムアレイカスタムオリゴDNAマイクロアレイ（Radish, カイワレ）を使用した。Agilent社推奨のプロトコルで、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。

## (4) 統計解析

亜鉛曝露濃度がスプラウトの重量と長さ、および亜鉛濃度に及ぼす影響については、一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差についてTukey-Kramerの多重比較を用いて検定した。

## 2.3. 結果および考察

表3は、種々の水準の亜鉛曝露を行って7日間栽培後に、10本のスプラウトを無作為に選抜し、1本ずつの重量、長さおよび亜鉛含量測定した結果をまとめたものである。曝露水準が50 µg/mL以上によって明らかな生育阻害が認められた。100 µg/mL曝露の場合、重量、長さのいずれも非曝露に比較してほぼ半分の数値であった。肉眼的にも、スプラウトは曝露水準100 µg/mLにおいて、茎が曲がるなどの異常が認められた。曝露水準200 µg/mLまでは、スプラウト中の亜鉛濃度は曝露水準にほぼ比例して増加した。これらの結果、高濃度の亜鉛曝露はスプラウトの生育を阻害することが明らかとなった。今回調製した亜鉛スプラウトの亜鉛濃度は新鮮重量当たりで70～100 µg/gであることから、10 g強の摂取

表3. 亜鉛曝露がカイワレダイコン（*Raphanus sativus*）の生長および亜鉛含量に及ぼす影響

亜鉛曝露濃度 (µg zinc/mL)	重量 (mg)	長さ (cm)	亜鉛含量 (µg/g湿重量)
0	178 ± 12 <sup>c</sup>	7.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	6.3 ± 1.7 <sup>a</sup>
20	195 ± 15 <sup>c</sup>	8.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	20.8 ± 8.8 <sup>b</sup>
50	108 ± 19 <sup>b</sup>	4.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	33.2 ± 9.9 <sup>b</sup>
100	96 ± 17 <sup>ab</sup>	3.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	83.3 ± 8.0 <sup>c</sup>
200	73 ± 18 <sup>a</sup>	2.8 ± 1.4 <sup>a</sup>	190.1 ± 24.3 <sup>d</sup>

平均値±標準偏差(n = 10)。共通のアルファベットが付いていない平均値間で有意差あり(p < 0.05)。

で1 mg程度の亜鉛の摂取を実現できる。したがって、日本人の亜鉛摂取状況の改善には十分に役立つものと思われる。

一方、カイワレダイコンスプラウトの双葉から抽出した総RNAの純度 ( $A_{260}/A_{280}$ ) は、すべて1.9-2.1以内で高い値であった。また電気泳動の結果より、RNAが分解していないことを確認し、DNAマイクロアレイ解析に供した。亜鉛曝露濃度0と20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ともに長さ4 cm)、20と100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ともに長さ2.5 cm) 間で、発現量が2倍以上および0.5倍以下に変動しているものを抽出した。ダイコンゲノムには機能未知遺伝子が大半を占めているために、比較的近縁であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ゲノムを用いてBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性解析を行い、両種で第一位の相同性になった遺伝子をシロイヌナズナ遺伝子と相同性を有するダイコン遺伝子として定義し、ダイコン遺伝子のアノテーション情報とした。このアノテーション情報を利用してDAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) による発現遺伝子のPathway解析を行った。

亜鉛曝露濃度0と20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間での比較では、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に対して2倍以上変動した遺伝子は1276遺伝子あり、そのうち724遺伝子は下方制御され、552遺伝子は上方制御されていた。また亜鉛曝露濃度20と100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間での比較では、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ に対して2倍以上変動した遺伝子は1379遺伝子あり、そのうち656遺伝子は下方制御され、723遺伝子は上方制御されていた。

さらに2倍以上発現変動した遺伝子を機能カテゴリー

表4. 亜鉛曝露によって2倍以上発現変動した機能カテゴリーごとの遺伝子数

Pathway	0 vs 20 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	20 vs 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
alpha-Linolenic acid metabolism	4	7
Biosynthesis of plant hormones	-	16
Cysteine and methionine metabolism	7	-
Flavonoid biosynthesis	3	3
Glucosinolate biosynthesis	5	-
Glycine, serine and threonine metabolism	4	-
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	3	-
Nitrogen metabolism	-	4
Starch and sucrose metabolism	-	5
Valine, leucine and isoleucine degradation	4	-

(KEGG Pathway) に分類し、表4にその結果を示した。

亜鉛曝露濃度0と20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間では、主にCysteine and methionine metabolism、Valine, leucine and isoleucine degradation、Glycine, serine and threonine metabolismなどのアミノ酸代謝の変動がみられた。これは亜鉛欠乏によってアミノ酸代謝酵素遺伝子の発現量が低下したこと起因している。しかし、亜鉛存在条件下である20と100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間での比較ではアミノ酸代謝に変化はみられていなかった。一方、亜鉛曝露濃度20と100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 間ではBiosynthesis of plant hormonesやalpha-Linolenic acid metabolismといった植物ホルモン生合成系代謝で発現変動がみられた。特にalpha-Linolenic acid metabolism内のジャスモン酸類合成系代謝が亜鉛曝露濃度100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で発現増加していた。ジャスモン酸類は光合成や成長といった幅広い変化を制御する脂質ホルモンシグナル物質であり<sup>7)</sup>、高濃度の亜鉛がストレスとなり誘導されたと予測される。また亜鉛曝露濃度100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、Flavonoid biosynthesis代謝内のカテキンやケルセチン合成に関わる遺伝子発現の増大がみられることから、これらの含有量増加が期待される。さらに、亜鉛をタンパク質内に取り込むzinc finger (C3HC4-type RING finger) family proteinの発現量が、亜鉛曝露濃度100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ において3-4倍上昇していた。しかし、両比較間(0 vs 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ および20 vs 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )で亜鉛の取り込みや排出に関わる亜鉛トランスポーターに大きな変動はみられなかった。

本研究で行ったPathway解析は、シロイヌナズナと高い相同性が得られたダイコン遺伝子のみを抽出して行っているために、種間で保存性の高い代謝系遺伝子の変動ばかりが多くみられた可能性がある。以上のことから、亜鉛曝露により相当数の遺伝子発現量の変動がみられたが、まだ機能の不明確な遺伝子が多く存在している。今後、遺伝子の機能を絞り込むとともに、DNAマイクロアレイ解析で得られた代謝変動予測より、亜鉛以外に増強される機能性成分の測定へと研究を進めていきたい。

### 3. HDAC阻害剤TSAによる神経突起伸長作用における遺伝子発現のエピジェネティックな制御機構

池内俊彦<sup>\*5</sup>

本研究では、ヒドロキサム酸HDAC (histone deacetylase) 阻害剤であるtrichostatin A (TSA) によるモデル神経細胞PC12の神経突起伸長作用の解析を行っている。昨年度に、TSAによって誘導される神経突起伸長作用がimmediate early genes (IEGs) (最初期遺伝子) の1つ

\*5 先端科学技術推進機構研究員、関西大学名誉教授 理学博士

であるnur77 遺伝子産物であるNur77 によって制御されていることが明らかになった。また、TSAによるエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節に、histone acetyltransferase (HAT) /p300によるヒストンH3のアセチル化が重要であることが判明した。神経突起伸長がHAT/p300 阻害剤であるC646 を添加することによって抑制され、IEGsであるnur77 遺伝子の発現もC646 で抑制されることが分かった。本年度は、TSAによって誘導される神経突起伸長において、IEGsがどのような役割を担っているかをさらに解析した。nur77 とc-fosのmRNAをそれぞれノックダウンした細胞群にTSAを添加し、神経突起伸長への影響を調べた。nur77 をノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制が見られたので、nur77 遺伝子産物であるNur77 によって神経突起伸長が促進されていることが確認された一方、c-fosをノックダウンした細胞群は神経突起伸長の抑制が見られず、むしろ促進された。このことにより、c-fos遺伝子産物であるc-Fosによって神経突起伸長が抑制されていることが判明した。また、PC12 細胞にNur77 を過剰発現させた細胞群は、無血清状態にすることにより、TSA無添加でも神経突起を伸長することが分かった。さらに、nur77 遺伝子が転写活性化の標的になっているかを確認する目的で、ChIP (chromatin immunoprecipitation) assayを用いてアセチル化ヒストンH3 とnur77 遺伝子のプロモーター領域との結合を解析した。その結果、nur77 遺伝子のプロモーター領域は、TSA添加により(14番目のリシン残基がアセチル化された)アセチル化ヒストンH3と結合すること、その結合はC646を共添加すると阻害されることが明らかになった。これらの結果から、TSAによって誘導されるPC12細胞の神経突起伸長には、HAT/p300やHDACsによるヒストン修飾を介したエピジェネティックなnur77 遺伝子の発現調節が重要であることが明らかになった<sup>8)</sup>。そこで、nur77 遺伝子の発現機構を詳細に解析するため、PC12細胞の染色体DNAからnur77 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の5'に挿入したプラスミドを作成し、DLR (dual luciferase reporter) assayを行った。nur77 遺伝子プロモーターの発現は、TSAの添加により有意に上昇した。これは、nur77 遺伝子プロモーターの発現がヒストン修飾を介してエピジェネティックな発現制御を受けていることを示している。また、nur77 遺伝子のプロモーター領域にあるSp1 binding sites (GC-richなSp1-1とSp1-2)のどちらかを欠失させるとTSA添加による発現上昇が見られなくなった<sup>9)</sup>。現在、TSA無添加条件と添加条件でのnur77 遺伝子プロモーター領域のCpG island (特にSp1 binding sites)のDNAメチル化と脱メチル化を次世代シーケンサーを使用して解析してい

る。さらに、DNAメチル化酵素 (DNA methyltransferase, DNMT) 阻害剤であるdecitabine添加による神経突起伸長とnur77 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の関連を解析している。

#### 4. HDAC阻害剤によって誘導されるPC12細胞の突起伸長のメカニズム

丸岡弘規\*<sup>6</sup>

HDAC阻害剤 (TSA) によって誘導されるモデル神経細胞株PC12の突起伸長の制御に関与する分子に着目して解析を行った。今回は、TSA誘導初期に発現上昇する遺伝子群IEGsに着目して解析を行った。RT-PCRとウェスタンブロッティング法による解析の結果、TSA添加2時間までにIEGsの一つであるNur77の発現が上昇することを確認した。また、Nur77 遺伝子を強制発現したPC12細胞は突起伸長を誘導することや、Nur77 遺伝子をノックダウンしたPC12細胞はTSAを添加しても突起伸長効果を示さないことが分かった。以上の結果から、HDAC阻害剤TSAによって誘導されるPC12細胞の突起伸長の制御にIEGsの一つであるNur77が大きく関与していることが分かった。HDAC阻害剤 (TSA) によって誘導されるPC12の突起伸長を制御するNur77の詳細な制御機構を解析する目的で、Nur77の詳細な発現機構の解析を行った。TSA添加直後のNur77プロモーター領域と、転写開始点に位置するヒストンH3のリシン14番目のアセチル基の結合をChIP assayを行い解析したところ、TSA添加2時間で両者の強い結合が確認された。また、この時のヒストンH3のリシン14番目のアセチル基とヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) との関連に関して解析を行ったところ、TSA添加2時間までに、HATの一つであるp300のプロモーター領域がヒストンH3のリシン14番目のアセチル基と結合することが分かった。以上の結果から、HDAC阻害剤TSAによって誘導されるモデル神経細胞株PC12の突起伸長には、p300を介したIEGsの制御が関与していること、IEGsの一つであるNur77タンパクの発現が関与していることが示唆された<sup>8)</sup>。現在、p300の制御にNur77の発現が関与しているかについて、詳細な解析を行っている。また、Nur77以外のIEGsの関与についてもNGSを使用した解析を実施中である。

現在、*in vivo*における神経細胞とHDAC阻害剤の動態をイメージングする目的で、蛍光*in vivo*イメージャーを使用した解析方法の検討を実施している。これまでに検証段階として、GFPを強制発現させたヒト乳癌細胞株

\*6 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士 (工学)

(MCF7-GFP)をヌードマウス (BALB/c系統) の背部皮下に移植させ、その動態を蛍光*in vivo*イメージャーで解析することに成功している。一般的にマウス皮膚は強い自家蛍光を有しており、蛍光物質のシグナルの検出にとって大きな障壁となることが知られている。今回の解析では、マルチスペクトル解析と言う手法を使用することで、自家蛍光の見られる検出画像から蛍光タンパク (GFP) 由来のシグナルだけを取り出してくることに成功しており、マルチスペクトル解析を使用しない時よりS/N比の高い蛍光画像を得ることができることを確認している。現在、神経細胞を特異的に蛍光標識する方法を検討中である<sup>10,11)</sup>。

## 5. 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

下家浩二<sup>\*7</sup>、木村博信<sup>\*8</sup>

### 5.1. 神経突起伸長作用に関する最近の研究の動向

脳内神経細胞や末梢神経細胞では、特定の神経細胞群とシナプス結合を介した神経回路を形成している。この神経回路は、特定の表現形質を表すために様々な形態を表すように発生初期から制御されている。発生初期からの制御は、主に特定の遺伝子発現制御によって引き起こされていることが特定遺伝子のノックアウトマウスによる解析から一部が明らかにされているが、未だに不明な部分が多いのが現状である。神経幹細胞を用いた解析では、遺伝子が発現制御されることにより分化が進行し、神経回路を形成するために必須である神経突起が伸長する。これは、*in vivo*に最も近い解析手法である。しかし、分化した神経細胞は形態的に極めて複雑であることから、これまでの単一の遺伝子の解析では手法的な限界がある。したがって、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析が求められる一方で特定の神経細胞内での統一的な神経突起伸長にかかわるシグナル伝達機構の解析も求められている。生命機能の全ては、約1000種類存在するとされている神経細胞の形態的多様性と機能的多様性によってもたらされることから、その制御機構の解析には紆余曲折があった。本稿では、当プロジェクトによって得られたエピジェネティックな遺伝子発現制御を介した神経突起伸長に関わる知見を解説することにより、主に医薬における応用を見据えた研究がどこまで進展させ得るかを報告する。

\*7 化学生命工学部准教授 博士 (理学)

\*8 大阪大学蛋白質研究所助教 博士 (理学)

### 5.2. PKAを介したヒストン修飾を伴う神経突起伸長作用

PC12細胞は、末梢神経様に分化することが知られている。その際に神経突起を伸長させる。神経成長因子 (NGF) によって大きく神経突起を伸長させることも可能だが、forskolin (FSK) を添加することによりprotein kinase A (PKA) の活性化を介した神経突起の伸長作用も観察可能である (図4)。NGFはタンパク質性の因子であり、また、特定の組織にしか存在することができない。FSKは、食品に含まれる天然物であり、健康食品や医療への応用化の材料にもなり得る。そこで、FSKを試料とした研究を展開した。その結果、FSKの添加後1-2時間以内にnur77、neuroD1、synapsin遺伝子群の発現上昇を確認した。また、cAMPアナログ分子であるdbcAMP添加によっても同様の作用を示すことを確認した。さらに、nur77、neuroD1 遺伝子上流配列を用いたレポーターアッセイによる遺伝子発現活性解析では、両遺伝子共にPKAシグナル伝達による遺伝子発現調節を受けていることが明らかになった。この時、DNAが巻き付いているヒストン (ここではヒストンH3 (H3と表記)) の14番目のリシン残基がアセチル化 (Ac14H3と表記) されることが分かった。

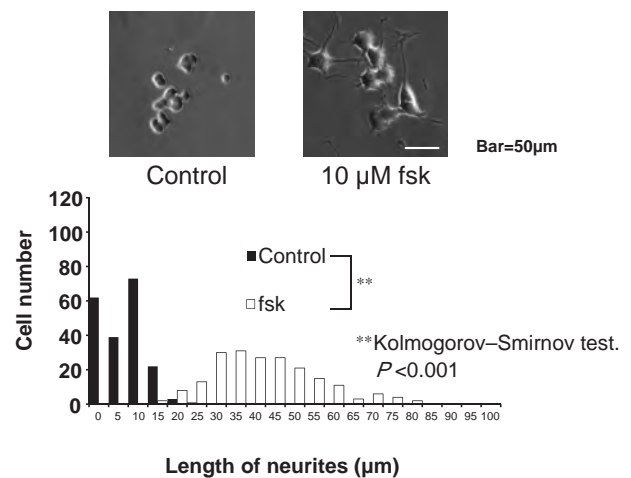


図4. PC12細胞におけるFSK添加24時間後の神経突起伸長作用

### 5.3. Ac14H3に結合するタンパク質による遺伝子発現制御

既に、ヒストンテイルに含まれる特定リシン残基のトリメチル化が遺伝子の発現制御に関与する現象が知られている。しかし、ヒストンH3の14番目のリシン残基のアセチル化 (Ac14H3) による遺伝子発現制御についての知見は全く無く、ヒストンH3の同アセチル化による遺伝子発現制御機構の存在を強く期待した。幸い、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) に用いることが可能なAcH14H3に結合する抗体が市販されていたため、同



位置に結合する遺伝子産物を解析した。その結果、FSKやヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるバルプロ酸 (VAL) によって、nur77 遺伝子産物が Ac14H3 に結合することが検出された。この事実は、極めて狭い空間で特定の小さな化学基を認識することによって開始される遺伝子発現上昇機構が存在することを意味している。さらに、その生理学的意味は、神経突起の伸長作用であることが明らかになったが (図5)、複数の遺伝子発現群から構成される神経回路の形成の基礎課程の解明にもつながる発見である。今後の神経回路の再構築を標榜した再生医療にも寄与し得る知見であることから、更なる詳細な解析結果の蓄積が強く望まれるところである。

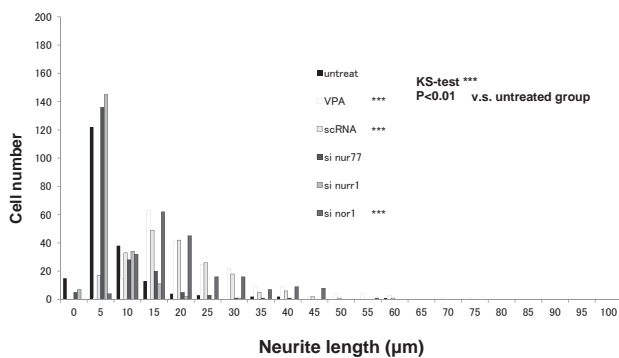


図5. siRNAによるnur77 ファミリー遺伝子群のノックダウン後の神経突起長の変化

#### 5.4. DNAのメチル化による神経突起伸長作用に関わる nur77遺伝子の発現制御

細胞・組織の分化過程で、遺伝の主体となるDNA側の修飾も知られていた。DNAの修飾部位としては、塩基であるシトシンであり、メチル基が付加される。このメチル基の付加は、メチル基転移酵素 (Dnmt) を介している。このメチル基の付加による遺伝子発現制御機構の説明としては、特定遺伝子上流に存在するシトシン残基のメチル化により転写因子複合体の結合が阻害され、結果的に下流の遺伝子の発現が抑制されるとされている。逆に、シトシン残基の脱メチル化により、下流の遺伝子の発現が上昇するとされている。この現象は、主に CpGアイランドと呼ばれる転写調節を司るDNA領域が重要であるとされている。しかし、近年の研究により必ずしも CpGアイランドのメチル化と脱メチル化による化学基の修飾が遺伝子発現の制御に関わるとは言えない現象が報告されている。加えて、開始コドン以降のシトシン残基にもメチル化が付加されているにもかかわらず、遺伝子の発現が誘導されている現象が数多くあることも報告されるようになり、シトシン残基のメチル化が遺伝子発現の抑制につながり、また、脱メチル化が遺伝子発

現の抑制につながる制御機構の存在自体に懐疑的であるのが現状である。

そのような中、我々の研究では、nur77 遺伝子上流に CpGアイランドを見出し、FSK添加後の神経突起伸長時におけるそのメチル化の有無について検討を行った。その結果、シトシン残基のメチル化状態は、脱メチル化状態であったことから、転写因子複合体の立体的な相互作用が nur77 遺伝子の発現の制御には重要であり、ヒストン側の修飾により神経突起の伸長を制御していることが明らかになった。

#### 5.5. まとめ

我々の研究では、ヒストン側の修飾とDNA側の修飾を観察することにより、神経突起伸長に関与する nur77 遺伝子の発現制御機構を明らかにした。ヒストンの修飾だけではなくDNAの修飾も観察することではじめてエピジェネティックな遺伝子発現制御が語れるが、ヒストンの修飾だけでもアセチル化以外にメチル化、リン酸化、SUMO化などの化学修飾の存在が知られており、ヒストン側とDNA側の両者の修飾による制御機構の全貌を把握するまでにはまだ時間が必要である。本プロジェクトでは、次世代シーケンサーを用いた Ac14H3 に結合する遺伝子解析も実施しているが、DNAマイクロアレイによる解析とも合わせた総合的な解析が必要であると感じている。また、それらによって得られる大量の情報から重要な情報のみを抽出する作業も早急に進めねばならないと考えている。

### 6. ビスフェノールA分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解析

松村吉信\*9

#### 6.1. はじめに

地球環境汚染は新興国の科学技術の進歩とともに広範囲に広がる様相となっている。また、有機化合物を多く含む工業廃棄物や家庭廃棄物など、日々大量に排出されるものの、その処理は、一部のリサイクル処理を除いて多くが焼却処分あるいは埋め立て処分されているのが現状で、焼却処理は多くの CO<sub>2</sub> を排出することから地球温暖化の原因ともなっている。このようなことから、合成化学物を含む有機化合物の微生物処理法の開発に関する研究に着手し、特に、内分泌攪乱作用を示すと予想されているビスフェノールA (BPA) を分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離し、有機系合成化合物分解特性を解析し、環境浄化および有機系廃

\*9 化学生命工学部准教授 博士 (工学)

棄物の生物学的処理の可能性について検討している。その中で本株がBPAだけでなく、フェノール系化合物やビフェニル系化合物、有機塩素化合物も分解可能であることが示され、AO1株の有用性が明らかとなっている<sup>12)</sup>。また、研究室だけではなく、土壌環境中でも十分に環境汚染物質分解能を発揮することが示されている<sup>13)</sup>。しかしながら、BPAを除く有機系合成化合物の分解能力は低く、それらの分解能力は非常に不安定なものであり、培養過程で分解能を失った変異型AO1株 (AO1Lなど) が確認されている<sup>14)</sup>。そこで、本プロジェクトではAO1株のゲノム構造を明らかにすると共に、AO1株の安定化ならびに有機系合成化合物分解能の強化につながるゲノム構造の改変を試みることを目的としている。昨年度の研究ではAO1株のゲノム塩基配列をRoche社製の454プラットフォームの次世代シーケンサーを用いて解読し、ドラフトシーケンスを得たが、AO1株に内在する4種類のプラスミド配列や複数存在するトランスポゾン配列などの不明な点が多く、結果としてゲノム構造や遺伝子構造を把握することはできなかった。そこで本年度は、Illumina社製のMiSeqシステムを用いた解析を加えてAO1株のゲノム構造の解析を試み、内在性プラスミドの一つpBAR1の全塩基配列の決定に成功した。さらに、pBAR1の小型化によるBPA分解活性への影響も検討した。

## 6.2. MiSeqを用いたAO1株ゲノム構造の解析

昨年度のRoche454シーケンスシステムとCLC Genomics Workbenchを用いたAO1株には全ゲノム塩基配列解析では755,344個の塩基配列断片が得られ、421個のコンティグに集約し、結果としてゲノム長は約5.3 Mbであることが確認された。これまでのパルスフィールドゲル電気泳動解析から、AO1株には染色体と少なくとも4つのプラスミドの存在が明らかだが、それぞれの配列は特定されなかった。そこで、本年度はIllumina社製MiSeqを用いて、全ゲノム解析に加えてすでに存在が明らかになっている約250 kbプラスミド、約100 kbプラスミド、約80 kbプラスミド、BPA分解に重要となるpBAR1の個別解析を試みた。パルスフィールドゲル電気泳動によるプラスミドの分離はこれまで通り成功するが、その後の抽出作業でシーケンス解析に用いるプラスミド量の確保が困難となった。そこで、Roche社製 Genopure Plasmid Midi Kitとタカラバイオ社製NucleoBond Xtra Maxiを用いてプラスミドのみを精製してMiSeqによるシーケンス解読とRoche社製 Newblerによるアセンブリー、GenoFinisher (<http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/genoFinisher/index.php>) によるフィニッシング処理を行い、プラスミド配列を構築し

た。その結果、一部構造がすでに明らかとなっているpBAR1については全塩基配列 (80,317 pb) の決定に成功し、さらにNCBI塩基配列データベースとBlastプログラムを用いてコードされている遺伝子のアノテーションが完了した (図6および表5)。pBR1には67個遺伝子がコードされており、接合伝達関連遺伝子が20個、トランスポゾン配列が14個確認された。また、*bisdAB*を含む少なくとも4種類の遺伝子がBPA分解に関わっているものと予想された。

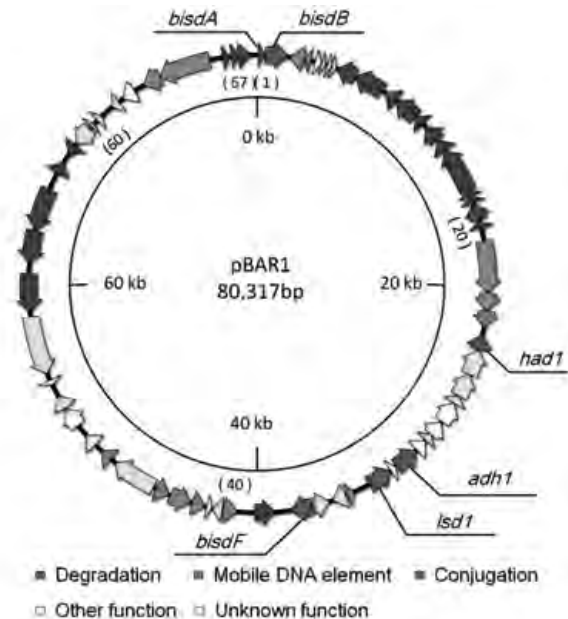


図6. pBAR1 (80,317bp) の遺伝子構造  
図中の (番号) は表5の遺伝子番号に対応している。遺伝子は矢印で示し、その機能分類も示した。

表5. pBAR1遺伝子の予測された機能

No.	Gene	Predictive function	No.	Gene	Predictive function
1	<i>bisdA</i>	ferredoxin	35	<i>orf15</i>	transposase (partial)
2	<i>bisdB</i>	cytochrom P450	36	<i>orf5</i>	transcriptional regulator, TetR family
3	<i>tnpA2a</i>	transposase of IS6100	37	<i>arcC1</i>	transcriptional regulator, ArcC family
4	<i>tnpA7</i>	transposase (partial)	38	<i>tnpA7</i>	4-Hydroxybenzoate 3-methyltransferase
5	<i>orf2</i>	hypothetical	39	<i>int1</i>	integrase-like protein
6	<i>orf4</i>	Xen family transcriptional regulator (partial)	40	<i>tnpA2b</i>	transposase of IS6100
7	<i>orf5</i>	hypothetical	41	<i>gmcI</i>	choline dehydrogenase (partial)
8	<i>orf6</i>	hypothetical	42	<i>orf10</i>	hypothetical
9	<i>orf9</i>	minicapsid TrfM (partial)	43	<i>orf11</i>	putative transposase
10	<i>orf10</i>	conjugal transfer protein TrfC	44	<i>tnpA1</i>	putative transposase (partial)
11	<i>orf11</i>	conjugal transfer protein TrfB	45	<i>tnpA2</i>	transposase of IS6100
12	<i>orf12</i>	conjugal transfer protein TrfD	46	<i>orf11</i>	TorB-dependent receptor (partial)
13	<i>orf14</i>	conjugal transfer protein TrfH	47	<i>tnpA2b</i>	transposase of IS6100 (partial)
14	<i>orf14</i>	conjugal transfer protein TrfG	48	<i>mpf</i>	MFP protein
15	<i>orf16</i>	conjugal transfer protein TrfF (partial)	49	<i>orf12</i>	hypothetical protein
16	<i>orf16</i>	conjugal transfer protein TrfE	50	<i>dam</i>	DNA methylase
17	<i>orf17</i>	conjugal transfer protein TrfD	51	<i>orf13</i>	hypothetical protein
18	<i>orf18</i>	conjugal transfer protein TrfC (partial)	52	<i>dnaQ</i>	DNA primase dnaQ
19	<i>orf19</i>	conjugal transfer protein TrfB	53	<i>tnpE</i>	conjugal transfer protein TrfE
20	<i>orf19</i>	conjugal transfer protein TrfA	54	<i>tnpF</i>	conjugal transfer protein TrfG
21	<i>tnpA3</i>	transposase Trf3 family protein	55	<i>tnpI</i>	conjugal transfer protein TrfI
22	<i>tnpR</i>	resolvase domain containing protein	56	<i>tnpL</i>	conjugal transfer protein TrfL
23	<i>tnpA6</i>	transposase (partial)	57	<i>tnpM</i>	conjugal transfer protein TrfM
24	<i>had1</i>	haloacid dehalogenase-like hydrolase	58	<i>parF</i>	chromosome (plasmid) partitioning protein ParF
25	<i>pyc1</i>	pyruvate carboxylase	59	<i>parA</i>	chromosome (plasmid) partitioning protein ParA
26	<i>orf1</i>	carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding	60	<i>tkaA</i>	kick protein
27	<i>orf15</i>	histon carboxyl carrier protein	61	<i>tkcA</i>	antirestriction protein TkC
28	<i>orf2</i>	hypothetical	62	<i>orf14</i>	hypothetical
29	<i>orf1</i>	hypothetical	63	<i>tnpR</i>	resolvase domain containing protein
30	<i>orf12</i>	4-Hydroxybenzoyl-CoA isomerase	64	<i>tnpA2</i>	transposase Tr3 family protein
31	<i>orf12</i>	hypothetical	65	<i>tnpA</i>	conjugal transfer protein TrfB (partial)
32	<i>adh1</i>	aldehyde dehydrogenase	66	<i>tnpD</i>	conjugal transfer protein TrfD
33	<i>orf7</i>	TorB-dependent receptor (partial)	67	<i>tnpA1</i>	transposase of IS6100
34	<i>orf1</i>	ligustinellone- $\alpha$ - $\beta$ -dioxygenase			

## 6.3. AO1L株に存在する変異型pBAR1の遺伝子構造

AO1L株はAO1株培養中から単離されたBPA非分解自然突然変異株である。そこで、これら2株のゲノム構造比較を試みた。AO1株のゲノム構造がドラフト状態のため、pBAR1配列のみで比較した。その結果、

AO1L株のpBAR1bにはトランスポゾン遺伝子領域を含む複数の領域で大きな欠失が確認された。また、この欠失にはBPA分解に関わる**bisdAB**領域も含まれ、AO1株のゲノム構造の不安定性がトランスポゾン遺伝子によるものと予想される結果であった(データ示さず)。そこで、現在、pBAR1からトランスポゾンおよび接合伝達に関わる全ての遺伝子を取り除いた小型化pBAR1を作製し、pBAR1の安定化を試みている。

## 7. 抗菌剤耐性菌に生じるゲノム変異の発生要因の解析

松村吉信、中田訓浩\*<sup>10</sup>

### 7.1. はじめに

日本でのウイルスを含む病原性微生物による感染症の発生は、公衆衛生管理の徹底と効果的な抗生物質の使用により、一部の例外を除いて大きな脅威とはなっていない。しかしながら、病院環境などでは、薬剤耐性菌の出現により院内感染が発生し、入院あるいは来院患者の感染症の集団発生につながり、場合によっては死亡事故として大きな社会問題となっている。これは、継続的あるいは必要量以上の抗菌剤使用が本来薬剤感受性の微生物を耐性化させているものと考えられており、薬剤耐性菌の微生物制御法の構築や薬剤耐性菌を生み出さない抗菌剤の開発やその使用方法の確立が求められている。そこで本研究では、大腸菌における抗菌剤耐性化の過程を解析し、どのように耐性株が出現するのかの原因解明を目的とした。

これまでの我々の研究で、大腸菌細胞を抗菌性陽イオン界面活性剤(第四アンモニウム塩)である臭化トリメチルアンモニウム(CTAB)で処理すると一部が比較的高い耐性を示すことを報告している<sup>15)</sup>。この研究で、親株大腸菌OW6株から取得されたCTAB耐性株OW66株のゲノム構造は、DNAマイクロアレイ法を用いた野生型株との比較ゲノム構造解析により、7カ所に変異が生じていることが確認され、これらの変異全てが薬剤耐性化につながっていることが明らかとなっている。また、OW66株が多くの抗生物質を含む抗菌剤に耐性を示す多剤耐性株であると同時にsoxR66は単独でCTAB耐性化に寄与できることから、抗菌剤耐性化に最も重要な変異であると予想されている。さらに、soxR66変異はSoxRの機能を構成性にするため、結果として細胞のスーパーオキシド応答が構成的となり、スーパーオキシドジスムターゼを含むスーパーオキシドストレス防御タンパク質群の合成量の増加につながることが確認された<sup>16)</sup>。そこで、OW66株を取得した環境とは異なる環境でCTAB

耐性株を取得し、耐性株に生じたゲノム変異を次世代シーケンサーを用いて確認し、ストレス中に生じる細胞内変化と耐性獲得との関連性に関する基礎的知見の収集を行うことを目的とした。

### 7.2. 栄養豊富な環境でのCTAB耐性変異株の取得

OW66株はグルコースを炭素源とした無機塩培地で獲得した耐性変異株である。この培地の特徴は細胞のCTAB耐性を下げる効果が知られていた。そこで、タンパク質を多く含む栄養培地(L培地)を用いて新たに耐性菌を取得した。その結果、540μMのCTABを含む培地でも生育可能な自然突然変異株を取得することができた。また、高度耐性菌分離過程で出現した低程度・中程度耐性菌も同時に単離することができた。それぞれをL-50株(低程度)、L-200株(中程度)、L-540株(高程度)と名付けた(表6)。

表6. 各変異株におけるL培地中のCTABの最小発育阻止濃度(MIC\*)

OW6株	OW66株	L-50株	L-200株	L-540株	M9-34株
30μM	100μM	40μM	200μM	100μM	30μM

\*L培地で37℃、24時間培養し、生育が確認されなかった最小濃度をMICと定義した。

また、OW66株と同様の取得方法で単離された新しい変異株をM9-34株と名付けた。この中で、L-540株については取得時に540μMのCTABを含む培地で生育が確認されていたが、その後の継体培養処理によって、100μM以上のCTABを含むL培地では生育が困難であることが確認され、安定な耐性度としてはL-200株が最も高い耐性を示す結果となった。

### 7.3. 新規Lシリーズ耐性株およびM9-34株で生じた変異部位の決定

OW66株のCTAB耐性はゲノムに生じた変異に起因することがこれまでの研究で明らかとなっている。そこで、今回新たに取得された変異株についても、変異部位の同定をIllumina社製次世代シーケンサーMiSeqを用いて行った(表7)。

その結果、これまで7種類の変異しか確認されなかったOW66株についても、9種類の変異が確認された。多くの変異株で、脂質関連を排出するABCトランスポーターのサブユニットをコードしているmsbAやAcrAB-TolC薬剤排出ポンプの発現制御遺伝子であるmarRに変異が生じており、これらの変異がCTAB耐性に関わっていると予想される。また、OW66株のCTAB耐性に関わるsoxRにもL-50株では変異が確認されており、低程度のCTAB耐性にsoxR変異が関与していると予想される。

\*10 有限会社日革研究所研究員 博士(工学)

表7. 大腸菌CTAB耐性自然突然変異株で確認された遺伝子変異部位\*

CW66	L-50	L-200	L-540	M9-34	
遺伝子名	変異部位	遺伝子名	変異部位	遺伝子名	変異部位
<i>secA</i>					
		<i>yaeT</i>	塩基置換	<i>dxr</i>	塩基置換
				<i>yaeT</i>	塩基置換
<i>msbA</i>	塩基置換	<i>msbA</i>	塩基置換	<i>intA</i>	塩基置換
		<i>stfE</i>	塩基置換	<i>msbA</i>	塩基置換
<i>ycdR</i>	塩基置換	<i>ycdR</i>	塩基置換		
		<i>marR</i>	塩基置換	<i>ycrK</i>	塩基置換
<i>ivr</i>	塩基挿入			<i>marR</i>	塩基置換
		<i>soxA</i>	塩基挿入	<i>marR</i>	塩基置換
		<i>envR</i>	塩基置換	<i>inaA</i>	塩基置換
<i>rpoN</i>	塩基欠失			<i>rnaIT</i>	塩基置換
<i>pepQ</i>	塩基置換			<i>rfaZ</i>	塩基欠失
<i>rpoB</i>	塩基置換				
<i>rpoC</i>	塩基置換	<i>rpoB</i>	塩基置換	<i>rpoB</i>	塩基置換
<i>soxR</i>	塩基挿入	<i>soxR</i>	塩基挿入		

\*大腸菌OW 6株のゲノム配列と比較し、異なっている遺伝子名をその変化とともに示した。なお、この結果はドラフトシーケンス結果より導いたものである。

なお、比較解析はドラフトゲノム配列から得られたものであり、今後、詳細に塩基配列変異の確認を行う予定である。これまでの研究で大腸菌のCTAB感受性は酸素が存在する好気条件で高く、酸素が存在しない嫌気条件では低い傾向があった。これはCTAB処理時に作用する活性酸素が好気条件で高濃度になるためであると推察されていた。また、この発生する活性酸素がゲノム変異を誘発するものと予想される。そこで、嫌気条件でのCTAB耐性自然突然変異株の取得を試みた。その結果、予想に反して500 μMのCTABを含むL培地で生育できるLana-500株が取得され、好気条件でのCTABのMICは50 μM、嫌気条件での400 μMと嫌気条件特異的耐性変異株であることが確認された。今後、Lana-500株のゲノム変異を次世代シーケンサーを用いて決定する予定である。

## 謝辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成25年度～平成29年度）」によって実施されたものである。

## 参考文献

- 1) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, D-及びL-アミノ酸添加が*Arabidopsis thaliana*芽生えの生育に及ぼす影響, *Trace Nutrients Research*, 31, 1-5 (2014).
- 2) 厚生労働省, 国民健康・栄養調査特別集計 国民健康・栄養調査(平成22年, 23年), 18, [http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkou\\_eiyouchousa\\_tokubetsushuukei\\_h22.pdf](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkou_eiyouchousa_tokubetsushuukei_h22.pdf), access on February 25 (2014).

- 3) M. Yoshida, S. Kikunaga, J. Yamauchi, M. Tsubota-Utsugi, H. Kodama, A. Morita, T. Esashi, Dietary reference intakes for Japanese 2010, *Microminerals*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 59, 91-102 (2013).
- 4) 厚生労働省, 平成23年国民健康・栄養調査報告, 第1部 栄養素等摂取状況調査の結果, 98-100, <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h23-houkoku-04.pdf>, access on February 25 (2014).
- 5) 吉田宗弘, ミネラル, 下村吉治編, サプリメントのほんとうとウソ, ナップ, 東京, 39-64 (2013).
- 6) H. Kitashiba, F. Li, H. Hirakawa, T. Kawanabe, Z. Zou, Y. Hasegawa, K. Tonosaki, S. Shirasawa, A. Fukushima, S. Yokoi, Y. Takahata, T. Kakizaki, M. Ishida, S. Okamoto, K. Sakamoto, K. Shirasawa, S. Tabata, T. Nishio, Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome, *DNA Res.*, 21, 481-490 (2014).
- 7) 小柴恭一, 神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学 第2版, 講談社, 東京 (2010).
- 8) T. Tomioka, H. Maruoka, H. Kawa, R. Yamazoe, D. Fujiki, K. Shimoke, T. Ikeuchi, The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the *nur77* gene, *Neuroscience Research*, 88, 39-48 (2014).
- 9) K. Tsumura, T. Tomioka, R. Yamazoe, H. Kawa, H. Maruoka, K. Shimoke, T. Ikeuchi, Analysis of expression of immediate early genes including *nur77* gene during neurite outgrowth induced by HDAC inhibitors in PC12 cells, 日本生化学会, 京都 (2014).
- 10) 丸岡弘規, 頼光花, 松本勇樹, 南條祐子, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 *in vivo*イメージングとその応用, 分子イメージング学会, 大阪 (2014).
- 11) 丸岡弘規, 南條祐子, 松本勇樹, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 *in vivo*イメージングとその応用, 日本分子生物学会, 横浜 (2014).
- 12) 松村吉信, 生産と技術, 64, 66-70 (2012).
- 13) Y. Matsumura, *Biocontrol Sci.*, 20, 35-42 (2015).
- 14) M. Sasaki, *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1158-1169 (2008).
- 15) K. Nakata, M. M. Koh, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 1895-1905 (2010).
- 16) K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *J. Appl. Microbiol.*, 110, 568-579 (2011).

## 平成27年度 技苑「プロジェクト研究報告概要」

戦略的研究基盤形成支援事業プロジェクト

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  
研究分担者：細見 亮太・下家 浩二・松村 吉信・  
吉田 宗弘・山中 一也

## 1. D-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析と新規

## D-アミノ酸生成酵素の同定

加藤志郎\*<sup>1</sup>、老川典夫\*<sup>2</sup>

## 1.1. はじめに

今日では、L-アミノ酸のみならずその鏡像異性体であるD-アミノ酸もまた真核生物の生命活動において重要な役割を担うと考えられている。また、哺乳動物において、経口摂取（食餌）・腹腔注射・静脈注射等による外因性D-アミノ酸投与が生体内D-アミノ酸の変動を誘起することや、D-アミノ酸の関与が示唆される疾病症状の緩和等の生理作用を示し得ることが報告されている。このような状況の背景として、食品中のD-アミノ酸含量およびその生成機序に対する関心が高まりを見せており<sup>1)</sup>、本研究では乳酸菌を対象としてゲノム解析に基づく同菌のD-アミノ酸生産機構の解明を目的としている。

## 1.2. 乳酸菌のゲノム解析

本研究では、日本酒の発酵工程に用いられる乳酸菌を対象としており、酒造会社の酒蔵より単離されたD-アミノ酸高生産株 (*Lactobacillus sakei* LK-145、*Leuconostoc mesenteroides* LK-151) およびその対照として用いたD-アミノ酸生産能の低い基準株 (*Type strain*) *L. sakei* LT-13 (= *L. sakei* NBRC 15893<sup>T</sup>)、*L. mesenteroides* LT-38 (= *L. mesenteroides* NBRC 3426<sup>T</sup>) の4株を解析に供した。

Roche社製の次世代シーケンサーGS junior 454を用いた500 base readのshotgun解析および8 kb spanでのpaired end解析より得られたリードデータを基に *de novo*解析を行い各株ゲノムのドラフト配列を構築し、残ったギャップ領域の塩基配列をキャピラリーシーケンサーにて解析することで4株の乳酸菌ゲノムの完全長塩

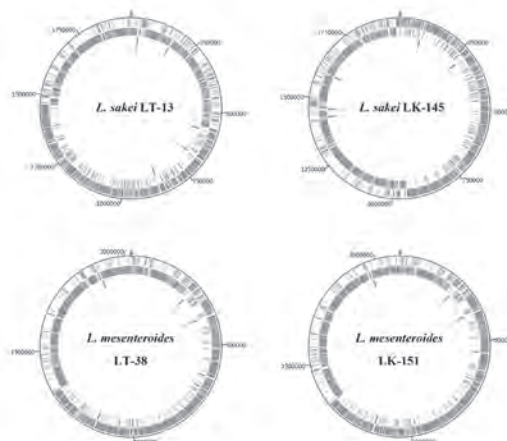


Fig. 1. ゲノムマップ

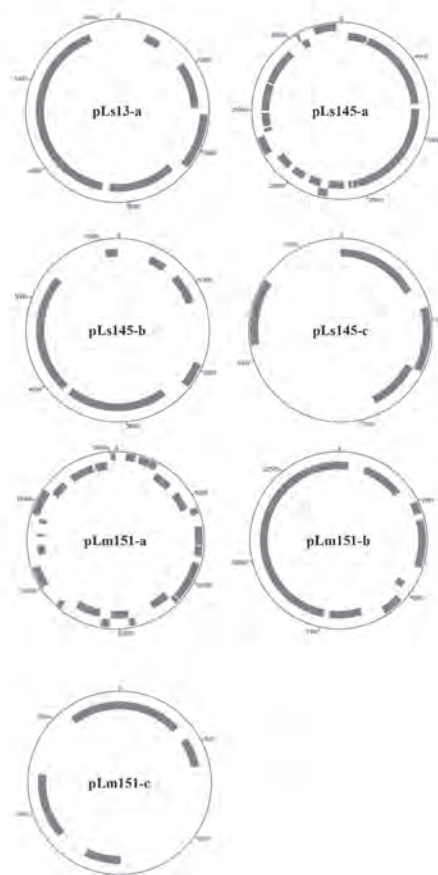


Fig. 2. プラスミドマップ

\*1 先端科学技術推進機構ポスト・ドクトラル・フェロー 博士(農学)

\*2 化学生命工学部教授 農学博士

基配列解読を完了した。構築したゲノムマップおよびプラスミドマップをFig. 1 およびFig. 2 にそれぞれ記載した。国立遺伝学研究所のMiGAPを利用して、解読した各乳酸菌ゲノム中のCoding sequence (CDS) 推定および各遺伝子産物の機能推定、RBS推定、GC含量決定、tRNAおよびrRNAの推定を行った。また、検出された各乳酸菌が保持するプラスミドについてもMiGAPを利用した同様の解析を実施した。4株の乳酸菌全てにおいておよそ2,000程度の推定遺伝子が検出され、その数および推定機能ともに既報の同種乳酸菌と高い類似性を示した。推定のRBS数、GC含量、RNA遺伝子数もまた同様であった。現在、D-アミノ酸高生産株および低生産株間における比較ゲノム解析を実施ししており、D-アミノ酸生産能への寄与が予測される遺伝子の探索を進めている。

### 1.3. 比較ゲノム解析による新規D-アミノ酸合成酵素の同定

構築した完全長ゲノム情報に基づく遺伝子機能予測から*L. sakei* LK-145 および*L. sakei* LT-13のD-アミノ酸代謝酵素遺伝子を探した結果、既知のD-アミノ酸合成酵素（アスパラギン酸ラセマーゼ、グルタミン酸ラセマーゼおよびアラニンラセマーゼ）についてはそのOpen reading frame (ORF) 領域および推定のプロモーター領域内の塩基配列の相違は認められるものの、ORFの保存数および各ORF周辺のゲノム構造は共通していた。また、配列情報に基づく遺伝子機能予測からは他のD-アミノ酸合成酵素または分解酵素と予測される遺伝子は見出されなかった。そこで、KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) を用いて両株が有する代謝経路を推定し、経路間の比較解析を実施したところL-システイン代謝経路の保存性が異なることが見出された。D-アミノ酸生産能の低い基準株*L. sakei* LT-13が有する*malY*遺伝子は、推定のシスタチオンβ-リアーゼをコードするが、同遺伝子はD-アミノ酸高生産株*L. sakei* LK-145ゲノム中には見出されない。そこで、*malY*遺伝子周辺のゲノム構造に着目して*L. sakei* LT-13 および*L. sakei* LK-145間の比較をした結果、同遺伝子を含む9つの遺伝子から成るおよそ8 kbの挿入領域が存在することが明らかとなった (Fig. 3)。同挿入領域に存在する9つのORFは、PRDドメインタンパク質(2)、アミノペプチダーゼ(2)、PTSタンパク質(3)、RDDファミリータンパク質(1)およびMalYをそれぞれコードすると予測される。PRDドメインタンパク質は、PTSシステムの制御への関与が予測されるタンパク質であり、PTSシステムは細菌における重要な糖源取り込み系である。また、ゲノムデータベースにて公開されてい

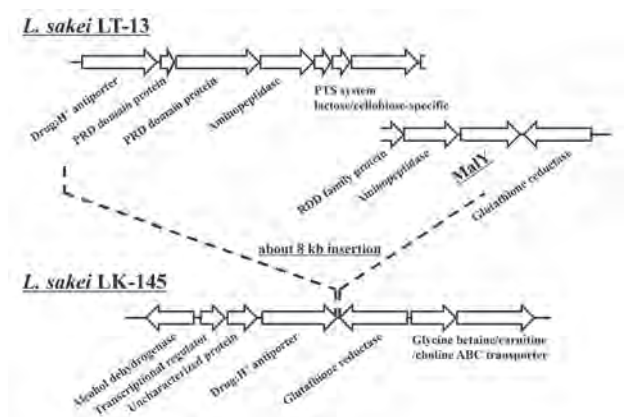


Fig. 3. *malY*遺伝子周辺のゲノム構造

る乳酸菌のゲノム情報を探索すると、いくつかの乳酸菌においてゲノム上に*malY*遺伝子が保持されており、*L. sakei* LT-13と同様に*malY*遺伝子はPTSシステム関連遺伝子と同一クラスター内に位置している。これらのことから、乳酸菌における糖代謝とMalYの機能との間に何らかの関連があるものと予測される。

シスタチオンβ-リアーゼは、シスタチオンをホモシステインとピルビン酸、およびアンモニアに分解する反応を触媒する酵素であり、システイン代謝系の重要な段階を担う酵素である。大腸菌は同酵素遺伝子を2つ (*metC*および*malY*) 有しており、MetCがシスタチオンβ-リアーゼ活性に加えて、アラニンに対するラセミ化活性を有することが組み換え体酵素を用いた*in vitro*および大腸菌相補実験による*in vivo*において示されている。一方でMalYは、D-アラニン要求性大腸菌に過剰発現することでその生育を極めて弱く相補することが報告されているものの、その詳細は不明なままである。本ゲノム解析の結果、*L. sakei* LT-13は*malY*遺伝子のみを有している (*metC*遺伝子が欠失している) ことが明らかとなり、また、*L. sakei* LT-13の推定システイン代謝経路において、シスタチオンβ-リアーゼが担う段階の前後を触媒する酵素をコードする遺伝子もまた欠失していることから、MalYがシステイン代謝とは異なる生理的役割を担うのではないかと考えられた。そこで、大腸菌を宿主として同酵素を異種発現し、精製した組み換え体酵素の機能解析を行ったところ、MalYは種々のアミノ酸に対するラセミ化活性を有することが明らかとなった (未公開データ)。現在、組み換え体酵素を用いた詳細な機能解析を進めるとともに、同酵素の*L. sakei* LT-13におけるD-アミノ酸代謝との関連の解明を目的として*malY*遺伝子破壊株の作製を試みているところである。

## 2. 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナの生育抑制と遺伝子発現量の変化

吉田宗弘<sup>\*3</sup>、廣瀬侑太郎<sup>\*4</sup>、細見亮太<sup>\*5</sup>

### 2.1. はじめに

セレンは高等動物、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、セレンを特異的に要求するタンパク質は発見されていないが、特殊な含セレンアミノ酸の生成が知られている。意図的にセレンを強化した野菜類からSe-メチルセレノシステイン（多くのセレン強化野菜類）、 $\gamma$ -グルタミル-Se-メチルセレノシステイン（ニンニク、ニラなどの $\gamma$ -グルタミルペプチドを合成できる植物）、セレノホモランチオニン（一部のセレン強化野菜類）などが同定されている<sup>2)</sup>。このような特殊なアミノ酸の生成は、高セレン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、DNA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。

### 2.2. 実験方法

#### (1) 亜セレン酸曝露シロイヌナズナの調製

シロイヌナズナの培養には、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（MS培地）を用いた。長日条件の光周期のもと、無菌的に25°Cで栽培した。1週間培養後、1粒の種子から得られた葉をすべて採取し重量を測定後、セレン含量を測定した。DNAマイクロアレイ用のサンプルは、開花段階まで培養したシロイヌナズナの茎頂部をRNAレーター（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京）に浸漬し、分析まで-70°Cで保存した。

#### (2) セレン含量の測定

葉を秤量後、ケルダールフラスコに移し、濃硝酸5 mLを加え、不溶物がなくなるまで加熱した。冷却後、過塩素酸2 mLを加え、過塩素酸の白煙が生じるまで加熱灰化した。灰化した試料に超純水を加えて容量を10 mLとし、0.45  $\mu\text{m}$ フィルターでろ過したものをセレン測定試料とした。試料溶液中のセレンの定量は、誘導結合プラズマ質量分析法により行った。使用機種はICPMS-8500（島津製作所）、分析質量数は82、内部標準はロジウムとした。

#### (3) RNA抽出とDNAマイクロアレイ解析

シロイヌナズナ茎頂部からRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いた方法で総RNA抽出を行った。抽出した総RNAはNanoDrop1000を使用しRNA濃度を測定し、バイオアナライザー (Agilent Technologies) による品質検査を行った。各50 ngの総RNAを用いて、Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies) によりcDNAの合成、cRNAのラベルと増幅を行った。DNAチップはArabidopsisオリゴDNAマイクロアレイ Ver.4.0 (Agilent Technologies) を使用した。Agilent社推奨のプロトコルで、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。

#### (4) マイクロアレイデータ解析

Ratioが2倍以上または0.5倍以下およびZ-Scoreが-2以下または+2以上に変動している遺伝子を抽出した。発現変動遺伝子のアノテーション情報を利用してGene Ontology (GO) のBiological Processに基づいてDAVID (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) の gene-annotation enrichment analysis<sup>3)</sup> と Quick GO (<http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>)<sup>4)</sup> によって解析した。また、Pathway解析はDAVIDにおいてKEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) を利用して解析した。

#### (5) 統計解析

セレン含量については、一元配置分散分析を用いて検定し、個々の栽培条件ごとの差についてTukey-Kramerの多重比較を用い、p値が0.05以下を有意差ありとした。また、DNAマイクロアレイデータは、Benjamini p値が0.05以下を有意差ありとした。

### 2.3. 結果および考察

Fig. 4に、1週間培養したシロイヌナズナから採取した葉の重量とセレン含量を示した。亜セレン酸未添加と比較し、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意に葉重量の減少が確認された。亜セレン酸曝露によって、葉に含まれるセレン含量は用量依存的に上昇し、培地中の亜セレン酸が取り込まれていることが明らかになった。またDNAマイクロアレイ用サンプル調製時において、培地中の亜セレン酸濃度1および5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では開花段階までの生育日数は亜セレン酸未添加と大差がなかったが、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では開花段階までに7日間余計にかかり、明らかな生育阻害がみられた。また、開花段階到達時のシロイヌナズナの長さは亜セレン酸濃度に応じて段階的に短くなる傾向があり、特に10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ では著しく短くなった。

次に、網羅的な遺伝子発現解析による代謝変動予測を行うため、シロイヌナズナ茎頂部よりRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析に供した。Table 1に亜セレン

\*3 化学生命工学部教授 農学博士・医学博士

\*4 理工学研究科

\*5 化学生命工学部助教 博士 (工学)

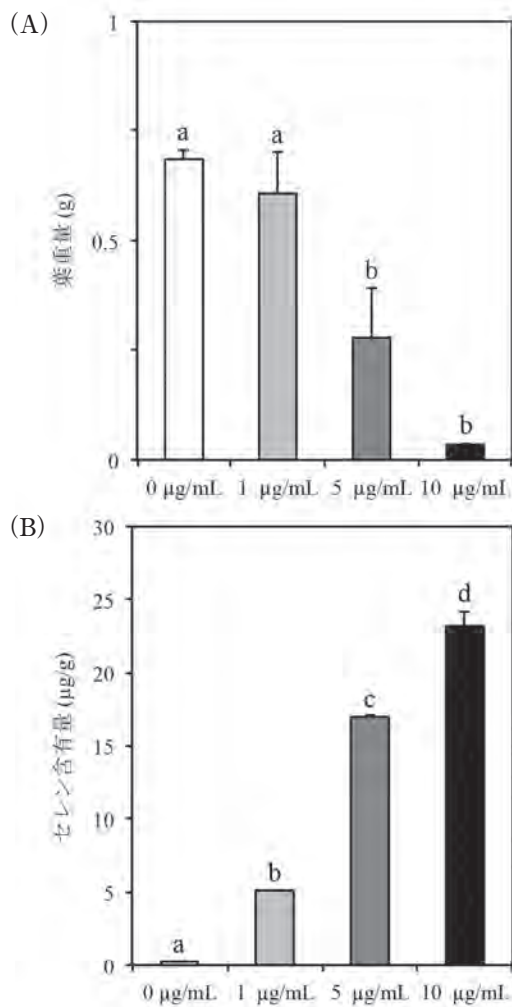


Fig. 4. 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナの葉重量 (A) とセレン含有量 (B) 平均値±標準誤差 異なるアルファベット間で有意差あり (p < 0.05)

酸未添加と比較した際、2、5、10倍以上変動した遺伝子数を示した。亜セレン酸 10 µg/mLでは1、5 µg/mLと比較して、多くの遺伝子の変動が見られた。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。発現上昇した遺伝子セットには、主に酸化還元、グリコシド代謝、硫黄化合物代謝などのGO termが顕著に濃縮されていた。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ため、生長に関わる機能をもつ遺伝子の発現が抑えられた結果、生育阻害がみられたと考えられる。

亜セレン酸 10 µg/mLでは明らかな生育阻害が見られることから、遺伝子の発現変動が亜セレン酸曝露の影響か、または生育阻害による二次的な影響であるかを判断することが出来ない。そのために、以後のマイクロアレイ解析では明らかな生育阻害が見られず、葉に含まれるセレン含量が有意に増加していた1 µg/mLと比較した。

Table 1. 亜セレン酸曝露によって変動したシロイヌナズナ茎頂部の遺伝子数

	2倍以上		5倍以上		10倍以上	
	上昇	低下	上昇	低下	上昇	低下
1 µg/mL	1006	1717	202	249	52	43
5 µg/mL	663	1499	146	233	57	73
10 µg/mL	7045	11343	2073	6502	868	4500

亜セレン酸未添加との比較

未添加と1 µg/mL間の発現変動遺伝子について、Gene-Annotation Enrichment Analysisを行った。発現上昇した遺伝子セットには、defense response、innate immune response、response to organic substanceなどのGO termが顕著に濃縮されており、発現低下した遺伝子セットで濃縮されたGO termにおいては、response to heat、response to temperature stimulus、response to high light intensityなどストレス応答に関わる遺伝子が濃縮されていた。

次に、2倍以上発現変動した遺伝子をDAVIDのKEGGアノテーションを用い、発現変動遺伝子中に濃縮されたKEGGパスウェイを検討した。発現が上昇したパスウェイとしてStilbenoid、diarylheptanoid and gingerol biosynthesis、Limonene and pinene degradation、Phenylpropanoid biosynthesisなどの代謝変動が見られた。一方、発現が低下したパスウェイとして、Phenylpropanoid biosynthesis、Alanine、aspartate and lutamate metabolismといったアミノ酸代謝において発現変動がみられた。

さらに、KEGGパスウェイ中のSelenocompound metabolismに含まれる遺伝子を選抜し、各遺伝子の亜セレン酸未添加との発現変動倍率をTable 2に示した。

亜セレン酸 1、5 µg/mLにおいては2倍以上発現変動を示した遺伝子は見当たらなかった。10 µg/mLにおいては、セレノシステインをセレンとアラニンに分解する

Table 2. 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナ茎頂部のセレン化合物代謝遺伝子の発現変動倍率

Entry	Gene name	Definition	1 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL
AT5G49810	MMT	methionine S-methyltransferase	0.77	1.05	1.20
AT3G55400	OVA1	methionyl-tRNA synthetase	1.09	1.00	1.70
AT4G13780		probable methionine--tRNA ligase	1.05	0.97	0.85
AT1G64660	MGL	methionine gamma-lyase	0.75	1.19	0.50
AT3G03780	MS2	methionine synthase 2	0.86	1.54	<0.01
AT5G17920	ATMS1	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	0.82	0.93	1.40
AT5G20980	MS3	methionine synthase 3	0.96	1.15	1.38
AT3G57050	CBL	cystathionine beta-lyase	1.10	1.00	1.88
AT1G33320		Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferases superfamily protein	1.56	1.05	2.03
AT3G01120	MT01	cystathionine gamma-synthase	0.79	1.17	1.09
AT1G08490	CPNIFS	cysteine desulfurase 2	1.00	1.16	2.37
AT2G17420	NTRA	NADPH-dependent thioredoxin reductase A	0.69	0.84	0.86
AT1G19920	APS2	ATP sulfurylase 2	1.01	1.11	1.20

亜セレン酸未添加との比較



cysteine desulfurase 2 (selenocysteine lyase) の遺伝子が含まれていた。また、亜セレン酸代謝に関連するグルタチオン合成系の glutathione S-transferase の発現上昇がみられ、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亢進が生じていると推定できる。本研究では、最も活発に細胞分裂していると考えられる莖頂部を用いて、マイクロアレイ解析に供した。そのために他の部位では異なる代謝変動を起こしている可能性がある。今後、得られた情報をもとに、リアルタイムPCRを用いて他の部位での遺伝子発現量を測定する必要があると考えられる。さらに、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンシングによるセレン含有アミノ酸に関与する候補遺伝子の選抜と、塩基配列決定による変異の検出およびエピゲノム解析による後天的な遺伝子制御機構を明らかにしていきたい。

### 3. エピジェネティックな遺伝子発現を介した神経突起伸長作用

下家浩二<sup>\*6</sup>、細見亮太、木村博信<sup>\*7</sup>、丸岡弘規<sup>\*8</sup>

#### 3.1. はじめに

神経細胞は、特定の神経細胞群とシナプス結合を介した神経回路を形成している。この神経回路の形成過程では、特定の遺伝子群の発現が制御されることにより分化が進行し、神経回路を形成するために必須である神経突起が伸長する。この神経突起伸長過程で、エピジェネティックな分子機構で特定の遺伝子群の発現上昇がいかにかに引き起こされているかを解析することが本プロジェクトで求められている課題である。この課題の達成のために、DNAのメチル化と脱メチル化による遺伝子発現制御の解析を専門とする木村博信博士、ヒストン修飾による遺伝子発現制御機構の解析を専門とする丸岡弘規博士、生命体での特定分子の作用の解析を行う実験動物の取り扱いを専門とする細見亮太博士、細胞生物学的に神経突起伸長作用を解析することを専門とする本稿筆頭著者の下家浩二が、それぞれの専門性を生かすことにより、分子・細胞・個体（生体内）に関する生命現象の全てを俯瞰した研究結果を得るべく研究を実施した。本稿では上記の研究体制の下、医療にも応用が期待される神経突起伸長作用に関する研究がどこまで進展したかを報告する。

#### 3.2. ヒストン修飾を伴う神経突起伸長作用の分子機構

神経損傷後の初期段階に見られる神経突起伸長のメカニズムの詳細を解析することは、その治療法の確立に非

常に有用である。本研究では、モデルニューロン細胞であるPC12細胞を使用した突起伸長作用の初期段階のメカニズムの詳細について解析を行っている。これまでに、HDAC阻害剤であるTSAや細胞内cAMPの濃度を上昇させるforskolin (FSK)が添加24時間以内に突起伸長作用を有することや、この突起伸長時にImmediate Early Genesの一つであるnur77またはgrp78が関与していることを明らかにしている<sup>5)</sup>。今回、新たにnur77以外のnur77ファミリー遺伝子であるnurr1とnor1の突起伸長への関与の可能性について解析を行った。その際、valproic acid (VPA)やFSK存在下、siRNA添加によるknock-down実験を行い、神経突起伸長作用の関与について解析を行った。その結果、FSK添加後ではnur77ファミリー遺伝子のすべてが神経突起伸長作用に関与することが示された。また、VPA添加後ではnor1遺伝子を除くnur77ファミリー遺伝子が関与することが示された。この時、nur77遺伝子の発現上昇は、ヒストンH3のリシン14番目のアセチル化(K14H3)を伴っていることが明らかとなった。よって、K14H3が他のファミリー遺伝子の発現上昇の関与について解析を行ったところ、nurr1遺伝子の発現上昇は、(K14H3)を介していた。しかし、nor1遺伝子の発現上昇は(K14H3)を介していなかった。この結果は、胎児ラットから脳を取り出した後の大脳皮質神経細胞を用いた実験でも確認された。さらに、nur77遺伝子のプロモーター領域とヒストン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することができた。また、nur77遺伝子のプロモーター領域において、どの領域が転写活性に重要なかをプロモーターアッセイにより解析した。その結果、転写開始上流-231から-37の領域を欠損させた場合、プロモーター活性が有意に減少することが分かった。この領域内の塩基配列にはCREB結合配列と相同性が高い転写基本因子AP1結合配列と転写基本因子SP1結合配列が存在していることが判明している。そこで、このAP1およびSP1結合配列を欠損させた時のレポーターアッセイも行った。その結果、AP1およびSP1結合配列を欠損させた場合のプロモーター活性が有意に低下することが分かった。以上の結果から、FSK添加による神経突起の伸長作用では、転写基本因子AP1およびSP1がエピジェネティックなnur77遺伝子の発現上昇に重要な役割を担っていることが示唆された。

#### 3.3. DNAのメチル化とnur77遺伝子の発現制御

遺伝子の発現制御におけるDNA側の修飾（メチル化）の関与をバイサルフェートシーケンシング法やDNAのメチル化阻害剤decitabin (DCN)の添加実験で確認を試みた。その結果、nur77遺伝子上流にCpGアイランドを

\*6 化学生命工学部教授 博士（理学）

\*7 大阪大学蛋白質研究所助教 博士（理学）

\*8 倉敷紡績株式会社技術研究所研究員 博士（工学）

見出し、FSK添加後の神経突起伸長時におけるDNAのメチル化の検出を行ったが、DNAのメチル化は見られなかった。また、FSK存在下、DCNを添加したところFSK単独添加時の神経突起伸長度と変化が無かった。しかし、DCN単独添加時には、神経突起の伸長作用が現れたことからDNAのメチル化自体に神経突起伸長に関わる遺伝子群の発現制御が関わっていることが明らかになった。

### 3.4. まとめ

我々の研究では、nur77ファミリー遺伝子群に着目し、ヒストンとDNAの修飾を観察することにより、神経突起伸長に関与するエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにした。本稿では述べていないが、ヒストンのトリメチル化と遺伝子発現制御機構についても解析を終了しており、ヒストンのアセチル化とトリメチル化の役割の分担（機能の分担）についてもさらに解析が必要であると考えている。

## 4. ビスフェノールA分解菌*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株のゲノム構造解

松村吉信\*<sup>9</sup>

### 4.1. はじめに

科学技術の進歩や新興国への技術移転によって地球規模の環境汚染の広がり、特にCO<sub>2</sub>排出量の増加に伴う地球温暖化や自然分解速度の遅い合成有機化合物による環境破壊が世界的にも懸念されている。日本国においてもリサイクル技術の革新は進んでいるものの、その多くがサーマルリサイクル処理で、プロダクトリサイクルやマテリアルリサイクルなどのCO<sub>2</sub>の排出抑制が期待できる技術は少ない。我々の研究室では、合成化学物を含む有機化合物の微生物処理法の開発に関する研究に着手し、内分泌攪乱作用を示すと予想されているビスフェノールA(BPA)を分解する*Sphingomonas bisphenolicum* AO1株を単離し、有機系合成化合物分解特性を解析し、環境浄化および有機系廃棄物の生物学的処理の可能性について検討している。その研究成果として、本株がフェノール系化合物やビフェニル系化合物、有機塩素化合物など広範囲の合成化合物を分解することが可能であることが示された<sup>6)</sup>。また、研究室レベルだけではなく、土壌環境中でも十分に合成化合物分解能を発揮することが示されている<sup>7)</sup>。しかしながら、BPAを除く有機系合成化合物のAO1株の分解能力は低く、それらの分解能力は非常に不安定なものであり、培養過程で分解能を失った変異型AO1株(AO1L株など)が確認されている<sup>8)</sup>。

\*<sup>9</sup> 化学生命工学部教授 博士(工学)

そこで、本プロジェクトではAO1株のゲノム構造を明らかにすると共に、AO1株の安定化ならびに有機系合成化合物分解能の強化につながるゲノム構造の改変を試みることを目的としている。これまでの研究ではAO1株のゲノム塩基配列をRoche社製の454プラットフォーム次世代シーケンサーとIllumina社製MiSeqを用いて解読し、ドラフトシーケンスを得たが、AO1株に内在する4種類のプラスミド配列や複数存在するトランスポゾン配列などの不明な点が多く、結果としてゲノム構造や遺伝子構造を把握することはできなかった。その中で、内在性プラスミドの一つpBAR1の全塩基配列の決定に成功するとともにAO1L株pBAR1における遺伝子欠失部位の特定に成功した。さらにこれらの情報をもとに、pBAR1の小型化によるBPA分解活性への影響も宿主としてAO1株およびAO1L株を用いて検討した。

### 4.2. AO1株のpBAR1遺伝子構造解析

これまでにAO1株のドラフトシーケンスを明らかにしていたが、本年度はAO1L株のドラフトシーケンスと両株の存在する内在性プラスミドpBAR1の全塩基配列決定、さらに遺伝子アノテーションをCLC genomic workbench (Quiagen社) およびMiGAPで行った。その結果、AO1株のpBAR1にコードされている遺伝子は現在のところ67個(アミノ酸配列で30%以上相同性が確認されたORF)と推察された(Table 3)。一方で、MiGAPを用いたバクテリアコドン使用頻度およびSD配列確認による遺伝子推定では83個が確認されている。現在、メイトペアシーケンス法を用いた全ゲノム配列決定を試みている。

### 4.3. AO1株およびAO1L株のpBAR1欠失領域の特定

MiSeqを用いてAO1L株のドラフトシーケンスを明らかにし、AO1株とのゲノム構造比較を試みた結果、pBAR1で4箇所の欠失が観察された。この欠失部位の両端はトランスポゾン部位に対応し、トランスポゾンの働きがゲノム構造の欠失に深く関与しているとも予想された(Fig. 5)。またこの欠失により、BPA分解に関わる***bisdAB***とその関与が予想される***adh1***、***lsd1***、***bisdF***、***had***のすべての遺伝子が欠失していることも確認された。

### 4.4. 遺伝子組換え法を用いたAO1株およびAO1L株の改変とBPA分解に及ぼす影響

上述の結果から、BPA分解に関与する***bisdAB***と***adh1***、***lsd1***、***bisdF***、***had***の不安定性を解消することがAO1株のBPAや合成有機化合物分解能の向上に重要であると考えられる。また、Badiefarらの研究で*Enterobacter*

Table 3. pBAR1遺伝子の予測された機能

No.	Gene	Putative function	No.	Gene	Putative function
1	<i>bisdA</i>	ferredoxin	35	<i>orf8</i>	transposase (partial)
2	<i>bisdB</i>	cytochrom P450	36	<i>orf9</i>	transcriptional regulator, TetR family
3	<i>tnpA2a</i>	transposase of IS6100	37	<i>araC1</i>	transcriptional regulator, ArcC family
4	<i>tnpA7</i>	transposase (partial)	38	<i>bisdF</i>	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase
5	<i>orf3</i>	hypothetical	39	<i>int1</i>	integrase-like protein
6	<i>orf4</i>	Xre-family transcriptional regulator (partial)	40	<i>tnpA2a</i>	transposase of IS6100
7	<i>orf5</i>	hypothetical	41	<i>gmc1</i>	choline dehydrogenase (partial)
8	<i>orf6</i>	hypothetical	42	<i>orf10</i>	hypothetical
9	<i>trbN</i>	muramidase TrbN (partial)	43	<i>istB1</i>	putative transposase
10	<i>trbL</i>	conjugal transfer protein TrbL	44	<i>tnpA4</i>	putative transposase (partial)
11	<i>trbJ</i>	conjugal transfer protein TrbJ	45	<i>tnpA5</i>	transposase of IS6100
12	<i>trbI</i>	conjugal transfer protein TrbI	46	<i>orf11</i>	TonB-dependent receptor (partial)
13	<i>orf14</i>	conjugal transfer protein TrbH	47	<i>tnpA2b</i>	transposase of IS6100 (partial)
14	<i>trbG</i>	conjugal transfer protein TrbG	48	<i>mpr</i>	MPR protein
15	<i>trbF</i>	conjugal transfer protein TrbF (partial)	49	<i>orf12</i>	hypothetical protein
16	<i>trbE</i>	conjugal transfer protein TrbE	50	<i>dam</i>	DNA methylase
17	<i>trbD</i>	conjugal transfer protein TrbD	51	<i>orf13</i>	hypothetical protein
18	<i>trbC</i>	conjugal transfer protein TrbC (partial)	52	<i>dnaG</i>	DNA primase dnaG
19	<i>trbB</i>	conjugal transfer protein TrbB	53	<i>traE</i>	conjugal transfer protein TraE
20	<i>trbA</i>	conjugal transfer protein TrbA	54	<i>traG</i>	conjugal transfer protein TraG
21	<i>tnpA3</i>	transposase Tn3 family protein	55	<i>traI</i>	conjugal transfer protein TraI
22	<i>tnpR</i>	resolvase domain containing protein	56	<i>traL</i>	conjugal transfer protein TraL
23	<i>tnpA6</i>	transposase (partial)	57	<i>traN</i>	conjugal transfer protein TraN
24	<i>had1</i>	haloacid dehalogenase-like hydrolase	58	<i>parB</i>	chromosome (plasmid) partitioning protein ParB
25	<i>pyc1</i>	pyruvate carboxylase	59	<i>parA</i>	chromosome (plasmid) partitioning protein ParA
26	<i>cps1</i>	carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding	60	<i>korA</i>	KorA protein
27	<i>orf15</i>	biotin carboxyl carrier protein	61	<i>klcA</i>	antirestriction protein KlcA
28	<i>orf2</i>	hypothetical	62	<i>orf14</i>	hypothetical
29	<i>orf1</i>	hypothetical	63	<i>tnpR</i>	resolvase domain containing protein
30	<i>orf12</i>	4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase	64	<i>tnpA3</i>	transposase Tn3 family protein
31	<i>orf13</i>	hypothetical	65	<i>trbA</i>	conjugal transfer protein TrbB (partial)
32	<i>adh1</i>	aldehyde dehydrogenase	66	<i>trbB</i>	conjugal transfer protein TrbA
33	<i>orf7</i>	TonB-dependent receptor (partial)	67	<i>tnpA1</i>	transposase of IS6100
34	<i>lsd1</i>	lignostilbene- $\alpha,\beta$ -dioxygenase			

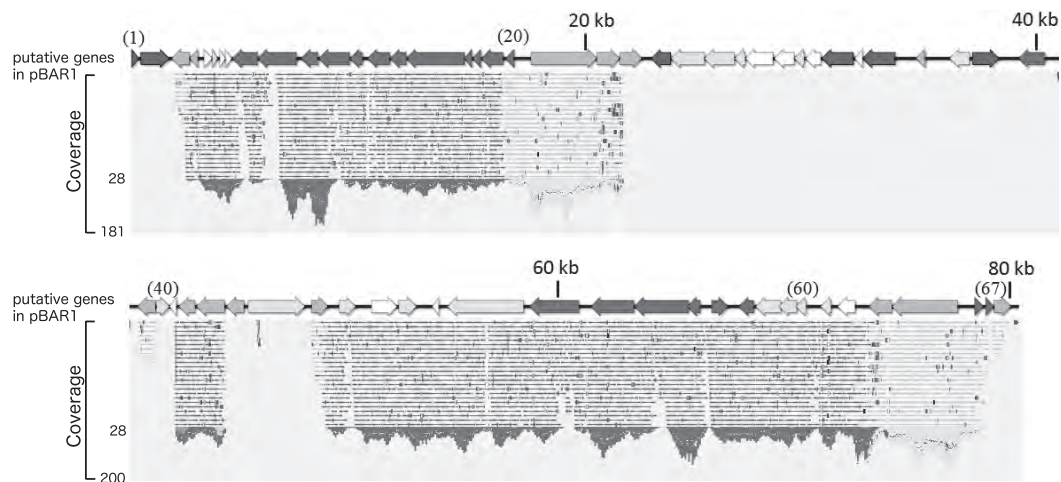


Fig. 5. AO1株およびAO1L株のpBAR1の構造比較

AO1L株ゲノムのドラフトシーケンスで得られた断片配列をAO1株のpBAR1配列と比較した。上段がAO1株pBAR1遺伝子構造で下段がドラフトシーケンス断片、Coverageは断片数を示す。AO1株pBAR1遺伝子構造上の(番号)は表1の遺伝子番号に対応している。遺伝子は矢印で示した。

*gergoviae* BYK-7の***bisdAB***組換え体でBPA分解能が向上することも報告されている<sup>9)</sup>。そこで、これら6遺伝子をコードする組換えプラスミドpJN105-bidABF-had-adh-lsdをin-fusionクローニング法で構築し (Fig. 6)、AO1株およびAO1L株に導入し、BPA分解能を調査した。その結果、AO1株では顕著なBPA分解能の向上は観察されなかったが、AO1L株ではBPA分解能の回復が観察され、*bisdAB*、*adh1*、*lsd1*、*bisdF*、*had*のすべてあるいは一部が機能していることが確認された (Fig. 7)。一

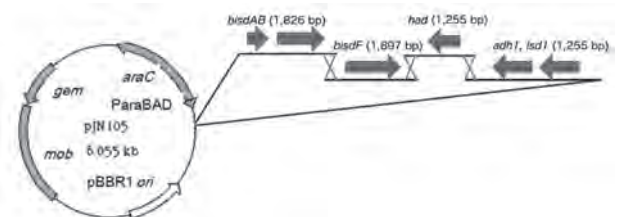


Fig. 6. pJN105-bidABF-had-adh-lsdの構造

pJN105に導入した6個の遺伝子はそれぞれ遺伝子本来のプロモーターで発現するように設計されている。

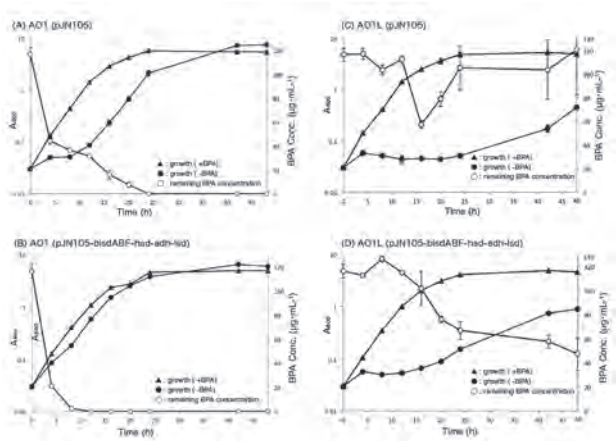


Fig. 7. 遺伝子組換え体のBPA分解能比較  
組換え体を培養し、残存BPA量 (open symbols) と培養液吸光度 ( $A_{600}$ , closed symbols) を測定した。培地には  $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}$  のゲンタマイシンを含むL培地 (L-Gm10培地, triangles) と  $115\mu\text{g}\cdot\text{mL}$  BPAを含むL-Gm10培地 (circles) を用いた。各実験は3回行い、標準誤差をエラーバーで示した。

方で、これら遺伝子の機能発現が十分でないことも予想されるため、今後、BPA代謝系遺伝子すべてを解明するとともに、それらの発現量を測定し、十分に発現していない遺伝子についてはその向上を目指す予定である。

## 5. 抗菌剤耐性菌に生じるゲノム変異の発生要因の解析

松村吉信、中田訓浩\*<sup>10</sup>

### 5.1. はじめに

病原性微生物による感染症の発生は、公衆衛生管理の徹底と効果的な抗生物質の使用により、一部の例外を除いて、大きな脅威とはなっていない。しかしながら、病院環境などでは、薬剤耐性菌の出現により、院内感染が発生し、入院あるいは来院患者の感染症の集団発生につながり、場合によっては死亡事故として報道され、大きな社会問題となっている。現時点ではその原因について解明されていないものの、継続的な必要量以上の抗菌剤使用が微生物を耐性化させているものと予想され、薬剤耐性菌の微生物制御法の構築や薬剤耐性菌を生み出さない抗菌剤の開発、それらの適用方法の確立が求められている。そこで本研究では、大腸菌における抗菌剤耐性化の過程を解析し、どのように耐性株が出現するのかの原因と耐性化仕組みの解明を目的とした。

これまでの研究で、大腸菌細胞を抗菌性陽イオン界面活性剤 (第四アンモニウム塩) である臭化トリメチルアンモニウム (CTAB) で処理すると一部が比較的高い耐性を示すことを報告している<sup>10)</sup>。この研究で、親株大腸菌OW6株から取得されたCTAB耐性株OW66株のゲノ

ム構造は、DNAマイクロアレイ法を用いた野生型株との比較ゲノム構造解析により、7カ所に変異が生じていることが確認され、これらの変異全てが薬剤耐性化につながっていることが明らかとなっている。また、OW66株が多くの抗生物質を含む抗菌剤に耐性を示す多剤耐性株であると同時に、*soxR66*は単独でCTAB耐性化に寄与できることから、抗菌剤耐性化に最も重要な変異であると予想されている。さらに、*soxR66*変異はSoxRの機能を構成性にするため、結果として細胞のスーパーオキシド応用が構成的となり、スーパーオキシドジスムターゼを含むスーパーオキシドストレス防御タンパク質群の合成量の増加につながることが確認された<sup>11)</sup>。また、昨年度までの研究で、新たに取得したCTAB耐性株においても複数のゲノム上の変異が確認され、抗菌剤処理による変異の蓄積に再現性が確認された。一方で、変異部位については一部に類似性は確認されるものの、変異の再現性が高いと判断されるものではなかった。今年度の研究では、得られている耐性菌の特性解析を試みた。

### 5.2. 新規耐性変異株の耐性度比較

これまで、CTABを含む抗菌剤の耐性度を生育を基準とした最小発育阻止濃度 (MIC) を用いてきたが、死滅を基準とした最小殺菌濃度 (MBC) での比較を新たに加えた (Table 4)。

Table 4. 各変異株におけるCTABの最小発育阻止濃度 (MIC<sup>\*a</sup>) と最小殺菌濃度 (MBC<sup>\*b</sup>)

Strain	MIC	MBC
OW6	30	100
OW66	100	300
L-50	40	100
L-200	200	300
L-540	100	300
M9-34	30	200

\*a: 各種濃度のCTABを含むL培地で37°C、24時間培養し、生育が確認されなかった最小濃度をMICと定義した。

\*b: 対数増殖期中期細胞 ( $A_{600}=0.03$ ) を各種濃度のCTABを含む緩衝液 (37°C) で1時間処理後、L培地 (37°C) で24時間培養し、生育が確認されなかった最小濃度をMBCと定義した。

その結果、野生株および多くの耐性株ではMIC値/MBC値が約1/3を示すのに対して、L-200株では約2/3、M9-34株では約1/7を示した。この結果で、L-200株やM9-34株では細胞の一部でCTAB耐性の非常に高いものが比較的多く含まれているものと予想され、それらの中にpersister cell (永生細胞) と呼ばれる休眠型細胞が含まれるものと予想された。そこで、L-200株についてCTAB処理の生残数を測定するとともに、長時間のCTAB処理で生き残った株の耐性度を再度増殖させた後の耐性度と比較した。その結果、定常初期細胞を  $100\mu\text{M}$  CTABで処理した場合、約1.0%の非常に高い

\*10 株式会社ユニオンバイテック研究員 博士 (工学)

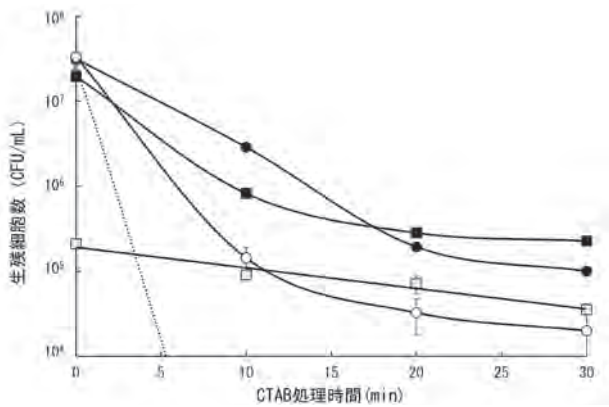


Fig. 8. pJN105-bidABF-had-adh-lsdの構造  
大腸菌細胞をL培地、37°Cで定常期初期まで培養した。CTAB処理は新鮮なL培地、37°Cで行い、初発細胞濃度は $A_{660}=0.03$ とした。生残細胞数はL寒天培地のコロニーカウント法で測定した。各実験は3回行い、標準誤差をエラーバーで示した。Open symbolsは200  $\mu$ M CTABで、closed symbolsは100  $\mu$ M CTABで処理した。Circlesは定常期初期細胞をその直後にCTAB処理した。Squaresは定常期初期細胞を100  $\mu$ M CTABで37°Cで20分間処理した永生細胞のみを使用した。なお、open squaresは永生細胞を再培養せずに、closed squaresは永生細胞を定常期初期まで再培養後CTAB処理している。

CTAB耐性の細胞集団が存在していることが確認され、その集団のCTAB耐性は再度の200  $\mu$ M 処理でも十分に確認され、この集団が休眠型細胞集団である永生細胞集団であると予想された (Fig. 8)。一方で、この永生細胞集団を再度培養するとその耐性度は初回のCTAB耐性能と同等であり、この結果もこの集団が永生細胞集団であることを示している。さらに、野生株OW6株の場合の永生細胞の出現割合は0.01%以下であったことから、L-200株が永生細胞を形成しやすい変異を有しているものと予想された。今後、CTAB処理による変異発生機構の解明とともに永生細胞の出現機構の解明も試みる予定である。

## 6. 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<sup>\*11</sup>、細見亮太、吉田宗弘、老川典夫

### 6.1. はじめに

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-methylseleno-cysteine (Se-MeSeCys) として蓄積し、さらに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 (Se-Cys) 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。実際、レンゲソウ由来のSMT (Ab-SMT) を高発現させることにより、双子葉モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 及びカラシ菜 (*Brassica juncea*)、さらに大腸菌においてもSe耐性及び蓄積が増強することが報告されている<sup>12)</sup>。また、セレン酸暴露下のブロッコリーでは、SMT遺伝子の発現及びSe-MeSeCys生産量が顕著に上昇することも確認されていることから<sup>13)</sup>、他の多くの生物においてもSMTがSe代謝の中心的役割を果たしていると言える。

一方、モデル植物である *A. thaliana* (シロイヌナズナ) においては、SMTに関する研究報告はない。しかし、同植物ゲノム上に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いることから、*A. thaliana* ではHMTホモログがSe代謝に関与する可能性が考えられる。しかしながら、先行して実施された亜セレン酸暴露した同植物のmRNAマイクロアレイ解析の結果は、予想に反していずれのHMT遺伝子の発現制御もSe暴露に対して直接的には応答しないことを示すものであった。また、At-HMT-1及び-2は、共にSMT活性を示さず、Se代謝には関与しないことが報告されている<sup>14)</sup>。しかしながら、At-HMT3については、直接的なSMT活性の評価は行われておらず、酵素レベルでのSe代謝への関与は未だ不明なままである。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。

### 6.2. 新規MBP融合タンパク質発現ベクターを用いた発現系の構築

*A. thaliana* のcDNAクローン (RAFL19-23-M07) から、At-HMT3遺伝子をPCR増幅し、pET-21bベクターへクローン化した。*E. coli* Rosetta (DE3) を宿主としてAt-HMT3の発現を試みたが、発現タンパク質のほとんどは不溶性顆粒を形成し、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、可溶性発現の向上に高い効果を有することが

\*11 化学生命工学部准教授 博士 (生物資源学)

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ベクターを構築し、これを用いた発現検討を行った。その結果、著量のMBP融合型のAt-HMT3を可溶性タンパク質として得ることに成功した。

### 6.3. 今後の展望

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。今後は、本酵素の*in vitro*での詳細な機能解析を進める予定である。

### 謝辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成25年度～平成29年度）」によって実施されたものである。

### 参考文献

- 1) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸菌のゲノム解析: 現状とD-アミノ酸に着目したゲノム情報の活用へ向けて, *Trace Nutrients Research*, 32, 78-82 (2015).
- 2) 吉田宗弘, 食品中のセレンの分布と栄養有効性, *Biomed. Res. Trace Elements*, 19, 290-296 (2008).
- 3) W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.*, 4, 44-57 (2009).
- 4) D. Binns, E. Dimmer, R. Huntley, D. Barrell, C. O' - Donovan, R. Apweiler, QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching, *Bioinformatics*, 25, 3045-3046 (2009).
- 5) R. Yamazoe, Y. Nishihata, K. Nakagawa, H. Aoyama, K. Shimoke, Genomic control of upregulation of GRP78 expression for promotion of neurite elongation and attenuation of cell death via PKA-mediated signaling in PC12 cells, *Clin. Pharmacol. Biopharma.*, 4, 150-154 (2015).
- 6) 松村吉信, 生産と技術, 64, 66-70 (2012).
- 7) Y. Matsumura, A. Akahira-Moriya, M. Sasaki-Mori, *Biocontrol Sci.*, 20, 35-42 (2015).
- 8) M. Sasaki, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1158-1169 (2008).
- 9) L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, J. M. Garcia-Arenzana, Y. Matsumura, M. Khodabandeh, *RSC Adv.*, 5, 29563-29572 (2015).
- 10) K. Nakata, M. M. Koh, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 1895-1905 (2010).
- 11) K. Nakata, T. Tsuchido, Y. Matsumura, *J. Appl. Microbiol.*, 110, 568-579 (2011).
- 12) D. L. LeDuc *et al.*, Overexpression of seleno-cysteine methyltransferase in Arabidopsis and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation, *Plant Physiol.*, 135, 377-383 (2004).
- 13) S. M. Lyi *et al.*, Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine *Se*-methyltransferase gene and *Se*-methyl-selenocysteine synthesis in broccoli, *Plant Physiol.*, 138, 409-420 (2005).
- 14) P. Ranocha *et al.*, The S-methylmethionine cycle in angiosperms: ubiquity, antiquity and activity, *Plant J.*, 25, 575-584 (2001).