

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22128008

研究課題名（和文）非モデル生物におけるゲノム解析法の確立

研究課題名（英文）Establishment of genome analyses methods for non-model organisms

## 研究代表者

西山 智明 (Nishiyama, Tomoaki)

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号：50390688

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 84,800,000 円

研究成果の概要（和文）：非モデル生物において、複合適応形質を特定出来るようにするため、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、アノテーション、遺伝子発現比較の手法を開発した。新規ゲノム解析において、大インサート長のメイトペアライブラリー作成技術を確立しMbレベルのスカフォールドが得られるようになり、長リードデータを出力する単一分子シーケンサーの出力のエラー補正を行って100kb以上のContig長が得られるようになった。また、遺伝子発現比較のため新規の計数正規化法を開発してRパッケージTCCとして公開し普及させた。

研究成果の概要（英文）：Genome and transcriptome sequencing, assembly, and annotation methods and expression profile analysis methods were developed to facilitate identification of genes responsible for complex adaptive traits in non-model organisms. Long mate-pair library construction enabled over Mb scaffolds and assembly utilizing long reads with single molecule real-time sequencing technology by Pacificbiosciences enabled over 100-kb contigs in multiple species. A novel robust normalization method for digital gene expression analyses were implemented and distributed in the R package TCC.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：アセンブリー ゲノム トランスクリプトーム 遺伝子発現比較

### 1. 研究開始当初の背景

複合適応形質進化の研究はダーウィン以来、国内外において多数の研究例があり、現在も多くの研究が行われている。しかし、それらのほとんどは現象の記載、数理モデルにより既存の理論で現象を説明する研究がほとんどであった。一方、複合適応形質の進化を遺伝子のレベルにまで還元した研究は技術的問題からほとんどできなかった。本研究領域では、多様な進化研究材料(昆虫、脊椎動物、植物、菌根菌、細菌)を用い、複合適応表現型の遺伝子基盤を明らかにする事を目的としている。このため、遺伝学的分子生物学的研究リソースが十分でない非モデル生物において、次世代シーケンサーを活用して、ゲノムを解析し、複合適応形質を制御する遺伝子を特定する方法を開発する事が必要であった。

### 2. 研究の目的

このため下記4項目の開発を行う。[1] 配列多型マッピングを組み合わせた全ゲノムアセンブリー法の開発: 1分子超並列シーケンサーを含む次世代シーケンサーを用いて概要ゲノムおよび分離集団の遺伝学的地図を作成するシステムを構築する。すでに概要ゲノム配列が得られているカイコについては、少ないシーケンス量で効率的に配列多型マッピングを行う方法を開発する。[2] 非モデル生物トランスクリプトーム解析のためのライブラリ調製法の開発: 以下のような非モデル生物特有のトランスクリプトーム解析の課題を克服するためのRNA-Seqライブラリの調製法を開発する。1) 微量RNAからのライブラリ調製 2) 共生系: 宿主真核生物と共生細菌両方のmRNAを同時定量するためのライブラリ調製。[3] 大量mRNAシーケンシングにもとづくアノテーションと発現プロファイリング法の開発: ゲノムのアノテーションはSOLiDなどの短いリード配列情報から遺伝子の構造決定と網羅的な発現量の測定を同時に行うシステムを構築する。[4] 発現プロファイルからの比較トランスクリプトーム解析法の開発: 網羅的発現プロファイリングから得られた測定値を解析して、意味のある違いを高感度で正確に抽出する方法を開発する。

### 3. 研究の方法

[1] 配列多型マッピングを組み合わせた全ゲノムアセンブリー法の開発  
ヒメツリガネゴケを代表例として配列多型マッピングによる遺伝子地図の作成を行った。Gransden系統とVillersexel系統の交配に由来する分離集団について、Illuminaによるシーケンシングを行ったデータを用いて、遺伝学的地図の作成法の検討を行った。ヒメツリガネゴケの分離集団のIlluminaによるペアエンドシーケンスを参照ゲノム配列にマッピングしSNPを検出した情報から、

信頼性の高いSNPを選択し、scaffoldと比較することにより、reference scaffoldの誤りを検出することができた。この観察にもとづき、ゲノムワイドに、誤り点でscaffoldを切断した上で並べ替えるプログラムを開発した。

3kb以上の長鎖DNA配列を連続的に取得可能なPacBio RSという新型のシーケンサーから出力されるデータを用いて効果的なゲノムアセンブリーを行う方法を検討する。このため、IlluminaのデータとPacBioのデータを両方利用するALLPATHS-LGの利用及び、新規にPacBioのデータをPacBioのデータのみによってエラー訂正するプログラムspraiを開発して、エラー訂正済みPacBioデータを用いてCerella assemblerでアセンブリーを行う方法を検討した。また、Illumina等の短リードのデータによって得られたscaffoldのコンティグをPacBioのリードで繋ぐ方法について検討した。

ゲノムDNAが微量しか用意できない材料についてPacBioでの解析を可能にするため、全ゲノム増幅について検討した。このためPhi29 DNAポリメラーゼを利用したDNA増幅キットREPLI-G, Genomifyで微量DNAを増幅してPacBioで解読しアセンブリーを試みた。

短いリード長のシーケンサーで長いスキップフォールドを得るために重要なのは長いインサート長をもつメイトペアライブラリーを作製する事である。トランスポゾンを利用するNextera Matepair library prep kitの標準プロトコルより供するDNA量を増やすことによりインサート長の大きいライブラリーを安定して作る事ができるか検討した。

[2] 非モデル生物トランスクリプトーム解析のためのライブラリ調製法の開発  
市販のRNAseqライブラリの調製キットのプロトコルはリファレンスゲノムが明らかになっているモデル生物の発現定量解析を想定して作製されている。しかし、本領域では非モデル生物を対象としたde novo assemblyを行うアプリケーション多い。このため、Illumina TruSeq RNAseq library preparation kitの標準プロトコルを改変した。主な改変点は以下のとおり。1) RNA-seq de novo assemblyに有利な長めのインサート長を実現するためにRNA断片化条件を最適化した。2) PCRバイアスを最小限にするためにPCRサイクル数を標準プロトコルより少なめに設定した。

微量RNAからのライブラリー調製実験としてアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* のgermariumをレーザーマイクロダイセクションによって切り出した。複数のgermariumから精製したRNAのうち4.6 ngを、SPIA法(NuGEN社)によって増幅し、Illuminaシーケンシングライブラリーを調製した。

宿主真核生物と共生細菌両方のmRNAを同時定量するためのライブラリ調製の実験として、細胞内共生細菌ブフネラを格納する

アブラムシの共生器官から得られた total RNA を SPIA 法によって増幅し HiSeq シークエンスを行い両種のリファレンスにマッピング解析した。

non-coding RNA が発生、形態形成に関わっている例が知られており、新奇形態形質の獲得にも関与している可能性があるため、その解析技術を検討した。このため rRNA の選択的除去によるライブラリ調整を試みた。同じ RNA 試料から rRNA の選択的除去によるライブラリと polyA 精製によるライブラリを構築してシーケンシング・比較した。

[3] 大量 mRNA シークエンスにもとづくアノテーションと発現プロファイリング法の開発

参照ゲノム配列がない生物のトランスクリプトーム解析のため、Trinity を用いて mRNA のアセンブリを行い、bowtie によって元リードをマッピングして RSEM で定量するパイプラインを構築した。

新規に決定したゲノムのアノテーション法を検討した。RepeatModeler による種特異的反復配列データベースの構築と RepeatMasker による反復配列の検出。Webapollo を用いて Cufflinks transcript をもとに仮正解データセットを作り Augustus の種特異的パラメータの学習、RNA-seq を使って intron 情報、RNA-seq のリード厚み情報、exonerate による他種配列との類似性など各種のヒントを組み合わせて遺伝子モデルセットを構築した。

[4] 発現プロファイルからの比較トランスクリプトーム解析法の開発

総リード数による補正だと高発現の発現変動遺伝子数の偏りによって結果が歪むので、新たな正規化法の開発を行った。発現変動遺伝子の割合を定数として取り入れた新手法と既存の TMM 法 (Robinson and Oshlack, Genome Biol., 2010) を「発現変動遺伝子数の割合を 5%、偏りを 4:1」としたシミュレーションデータにおいて比較し、新手法のほうが真の正規化係数により近い値を返すことを確認した。

比較トランスクリプトーム解析を行うための新規正規化法 TbT の開発を行った。最近示された実際のデータの特徴 (発現レベルが低いほどバラツキが大きい) をできるだけ模倣したシミュレーションデータの作成を行い、解析を行ったどのシミュレーション条件においても、これまでに提案された二群間比較解析手法 (R パッケージ名: edgeR, DESeq, baySeq, and NBPSeg) 中で採用されている正規化法と比較した。

#### 4. 研究成果

[1] 配列多型マッピングを組み合わせる例としてヒメツリガネゴケの分離集団シーケンスデータからの遺伝学的地図作成 scaffold 訂正と super scaffolding を進めた結果、26 本の連鎖群に並べることができた。

これは、従来染色体が 27 本であるとされていたことと一致しない。ヒメツリガネゴケの染色体を再観察して検証を進めている。

Illumina と単分子シーケンサーのデータを組み合わせたゲノムアセンブリ法では、*Burkholderia sp.* については Allpaths-LG を用いて 24 Scaffold までにする事ができた。

また、ネムリユスリカについて短リードで構築した Scaffold の Gap を PacBio のデータで埋める解析を行った。フクロユキノシタに置

いては sprai でエラー補正した PacBio のデータで Gap を埋める解析を行った。PacBio データを用いたアセンブリについて、笠原らが開発した sprai を用いて PacBio read を補正する方法により、バクテリアではほぼ染色体サイズのアセンブリが得られるようになった。真核生物のコモウセンゴケゲノム (0.3 Gb) においても Contig N50 80 kb に至っている。

長距離の scaffolding をする 10 kb 程度までのインサートメイトペアライブラリを実現した。これを用いたフグ 2 種、カブトムシ、ヤマトシロアリ、マイマイカブリのゲノム解析においては、それぞれ scaffold N50 1Mb 以上の高品質なアセンブリ結果を得た。

また、PacBio を用いたゲノム解読では、必要なゲノム DNA 量が 10 マイクログラム以上と多いという問題があったが、増幅を行うことにより 10 ng 程度で解読する手法を実現した。

[2] レーザーマイクロダイセクションによって得られた微細組織サンプルの RNA-seq に成功した。アブラムシ *Acyrtosiphon pisum* の germarium をレーザーマイクロダイセクションによって切り出した。複数の germarium から精製した RNA を増幅し Illumina シークエンスした結果、リードの約 50% をゲノムにマップする事ができた。

細胞内共生細菌 *ブネラ* を格納するアブラムシの共生器官から得られた total RNA を SPIA 法によって増幅し HiSeq シークエンスを行い、宿主真核細胞と共生原核細胞の同時 RNA-seq に成功した。両者の Ribosomal RNA の混入は約 50% であった。これは、真核細胞と原核細胞を含む共生・寄生系のトランスクリプトーム解析に広く応用できる。

同じ RNA 試料から rRNA の選択的除去によるライブラリと polyA 精製によるライブラリを構築してシーケンシング・比較した結果において snoRNA などの non-coding RNA が濃縮されていることを確認した。

[3] トランスクリプトーム *de novo* assembly から転写産物量を推定するため、Trinity-bowtie-RSEM の解析フローによって転写産物量を推定できるようになった。特に Trinity の GraphFromFasta ステップのメモリ使用量を抑制し、大量の入力データでも現実的なメモリ使用量でアセンブリを行う事が可能になった。

RNA-seq の de novo アセンブルによってコンティグを構築しアノテーションを行なうパイプラインを構築した。さらにそのアノテーション情報を web インターフェイスで閲覧・検索可能なサーバーを構築するフレームワークを開発した。コンティグや ORF の配列情報のほか、BLAST 検索結果、モチーフ検索結果、オーソログ同定結果、組織間発現比較データなどを扱うことが出来る。カプトムシ、キスゲ、シロアリ、アブラムシの RNA-seq データに適用し、班員に活発に利用された。

領域内でアセンブリに成功した新規ゲノムが複数ある。RepeatModeler による種特異的反復配列データベースの構築と RepeatMasker による反復配列の検出。Webapollo を用いて Cufflinks transcript をもとに仮正解データセットを作り Augustus の種特異的パラメータの学習、RNA-seq を使って intron 情報、RNA-seq のリード厚み情報、exonerate による他種配列との類似性など各種のヒントを組み合わせて遺伝子モデルセットを構築する実例をつくり領域内で共有した。

[4] 総リード数による補正だと高発現の発現変動遺伝子数の偏りによって結果が歪むので、新たな正規化法の開発を行った。発現変動遺伝子の割合を定数として取り入れた新手法と既存の TMM 法 (Robinson and Oshlack, Genome Biol., 2010) を「発現変動遺伝子数の割合を 5%、偏りを 4:1」としたシミュレーションデータにおいて比較し、新手法のほうが真の正規化係数により近い値を返すことを確認した。

比較トランスクリプトーム解析を行うための新規正規化法 TbT の開発を行った。実際の RNA-seq カウントデータの特徴(発現レベルが低いほどバラツキが大きい)をできるだけ模倣したシミュレーションデータの作成を行い、解析を行ったどのシミュレーション条件においても、これまでに提案された二群間比較解析手法 (R パッケージ名: edgeR, DESeq, baySeq, and NBPSeg) 中で採用されている正規化法以上の性能を示すことを確認した。

23年度に開発したタグカウントデータ正規化法 (TbT法) は、正規化時に「発現変動遺伝子 (DEG) 検出・排除」のステップを組み込んだ頑健な正規化法であるが、計算コストがかかるという問題が残されていた。ここで提唱した正規化戦略 (DEG elimination strategy; DEGES) を一般化し、DEG検出法をパラメトリックな方法に切り替えた正規化法の開発を行った。TbT法とほぼ同精度かつ100倍程度高速な DEGES に基づく複数の正規化法を R パッケージ TCC に実装した。

上記比較トランスクリプトーム解析パイプラインを実装した R パッケージ TCC (ver. 1.2.0) を Bioconductor 上で公開し、論文発表を行った (Sun, Nishiyama et al., BMC

Bioinformatics, 2013)。また、解析可能な実験デザインの拡張 (2群間比較用のみから 3, 4群間用まで対応) を行った。さらに、R パッケージ TCC で利用可能な実験デザインの拡張を行った。具体的には対のデータ (paired data) への対応を可能にした。また、多群間比較 (特に 3群間比較) における性能評価を行い、複製ありの場合には内部的に edgeR を用いた手順が良く、複製なしの場合には内部的に DESeq2 を用いた手順が良いことを確認した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件) (全て査読有り)

(1) Izuno A, Hatakeyama M, Nishiyama T, Tamaki I, Shimizu-Inatsugi R, Sasaki R, Shimizu KK, Isagi Y. (2016) Genome sequencing of *Metrosideros polymorpha* (Myrtaceae), a dominant species in various habitats in the Hawaiian Islands with remarkable phenotypic variations. *Journal of plant research* 129:727-736

(2) Wu, T., Kamiya, T., Yumoto, H., Sotta, N., Katsushi, Y., Shigenobu, S., Matsubayashi, Y., and \*Fujiwara, T. (2015). An *Arabidopsis thaliana* copper-sensitive mutant suggests a role of phyto-sulfonine in ethylene production. *Journal of experimental botany*. 66: 3657-3667.

(3) Toyota, K., Miyakawa, H., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Ogino, Y., Tatarazako, N., Miyagawa, S., and \*Iguchi, T. (2015). NMDA receptor activation upstream of methyl farnesoate signaling for short day-induced male offspring production in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC genomics* 16, 186.

(4) Toyokura, K., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Fukaki, H., Tatematsu, K., and \*Okada, K. (2015). Mutations in Plastidial 5-Aminolevulinic Acid Biosynthesis Genes Suppress a Pleiotropic Defect in Shoot Development of a Mitochondrial GABA Shunt Mutant in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology*. 56: 1229-1238.

(5) Kinoshita, A., ten Hove, C.A., Tabata, R., Yamada, M., Shimizu, N., Ishida, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Takebayashi, Y., Iuchi, S., et al. (2015). A plant U-box protein, PUB4, regulates asymmetric cell division and cell proliferation in the root meristem. *Development* 142, 444-453.

(6) Bourguignon, T., Lo, N., Cameron, S.L., Sobotnik, J., Hayashi, Y., Shigenobu, S., Watanabe, D., Roisin, Y., Miura, T., and Evans, T.A. (2015). The evolutionary history of termites as inferred from 66 mitochondrial

genomes. *Molecular biology and evolution* 32, 406-421.

( 7 ) Blankenburg, S., Balfanz, S., Hayashi, Y., Shigenobu, S., Miura, T., Baumann, O., Baumann, A., and \*Blenau, W. (2015). Cockroach GABAB receptor subtypes: molecular characterization, pharmacological properties and tissue distribution. *Neuropharmacology* 88, 134-144.

( 8 ) Yoshida, K., Makino, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Hasebe, M., Kawata, M., Kume, M., Mori, S., Peichel, C.L., Toyoda, A., *et al.* (2014). Sex chromosome turnover contributes to genomic divergence between incipient stickleback species. *PLoS genetics* 10, e1004223.

( 9 ) Uehara, M., Wang, S., Kamiya, T., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Fujiwara, T., Naito, S., and \*Takano, J. (2014). Identification and characterization of an Arabidopsis mutant with altered localization of NIP5;1, a plasma membrane boron channel, reveals the requirement for D-galactose in endomembrane organization. *Plant & cell physiology* 55, 704-714.

( 1 0 ) Takeshita, K., Shibata, T.F., Nikoh, N., Nishiyama, T., Hasebe, M., Fukatsu, T., Shigenobu, S., and Kikuchi, Y. (2014). Whole-Genome Sequence of *Burkholderia* sp. Strain RPE67, a Bacterial Gut Symbiont of the Bean Bug *Riptortus pedestris*. *Genome announcements* 2, e00556-14.

( 1 1 ) Sakakibara, K., Reisewitz, P., Aoyama, T., Friedrich, T., Ando, S., Sato, Y., Tamada, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Kurata, T., *et al.* (2014). *WOX13*-like genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 141, 1660-1670.

( 1 2 ) \*Matsui, H., Takahashi, T., Murayama, S.Y., Uchiyama, I., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Matsumoto, T., Kawakubo, M., Horiuchi, K., Ota, H., *et al.* (2014). Development of New PCR Primers by Comparative Genomics for the Detection of *Helicobacter suis* in Gastric Biopsy Specimens. *Helicobacter* 19, 260-271.

( 1 3 ) Kodama, Y., Suzuki, H., Dohra, H., Sugii, M., Kitazume, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., and \*Fujishima, M. (2014). Comparison of gene expression of *Paramecium bursaria* with and without *Chlorella variabilis* symbionts. *BMC genomics* 15, 183.

( 1 4 ) Gusev, O., Suetsugu, Y., Cornette, R., Kawashima, T., Logacheva, M.D., Kondrashov, A.S., Penin, A.A., Hatanaka, R., Kikuta, S., Shimura, S., *et al.* (2014). Comparative genome sequencing reveals

genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge. *Nature communications* 5, 4784.

( 1 5 ) Furuta, Y., Namba-Fukuyo, H., Shibata, T.F., Nishiyama, T., Shigenobu, S., Suzuki, Y., Sugano, S., Hasebe, M., and Kobayashi, I. (2014). Methylome diversification through changes in DNA methyltransferase sequence specificity. *PLoS genetics* 10, e1004272.

( 1 6 ) Miyamoto, M., Motooka, D., Gotoh, K., Imai, T., Yoshitake, K., Goto, N., Iida, T., Yasunaga, T., Horii, T., Arakawa, K., *et al.* (2014). Performance comparison of second- and third-generation sequencers using a bacterial genome with two chromosomes. *BMC genomics* 15, 699.

( 1 7 ) Wang, Z., Pascual-Anaya, J., Zadissa, A., Li, W., Niimura, Y., Huang, Z., Li, C., White, S., Xiong, Z., Fang, D., *et al.* (2013). The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nature genetics* 45, 701-706.

( 1 8 ) Takahara, M., Magori, S., Soyano, T., Okamoto, S., Yoshida, C., Yano, K., Sato, S., Tabata, S., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., *et al.* (2013). TOO MUCH LOVE, a novel Kelch repeat-containing F-box protein, functions in the long-distance regulation of the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Plant & cell physiology* 54, 433-447.

( 1 9 ) Tabata, R., Kamiya, T., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Yamada, M., Hasebe, M., Fujiwara, T., and \*Sawa, S. (2013). Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior* 8, e22534.

( 2 0 ) Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K., and \*Kadota, K. (2013). TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC bioinformatics* 14, 219.

( 2 1 ) \*Shigenobu, S., and Stern, D.L. (2013). Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 280, 20121952.

( 2 2 ) Shibata, T.F., Maeda, T., Nikoh, N., Yamaguchi, K., Oshima, K., Hattori, M., Nishiyama, T., Hasebe, M., Fukatsu, T., Kikuchi, Y., *et al.* (2013). Complete Genome Sequence of *Burkholderia* sp. Strain RPE64, Bacterial Symbiont of the Bean Bug *Riptortus pedestris*. *Genome announcements* 1, e00441-13.

( 2 3 ) Hoepflinger, M.C., Geretschlaeger, A., Sommer, A., Hoeffberger, M., Nishiyama, T., Sakayama, H., Hammerl, P., Tenhaken, R., Ueda, T., and \*Foissner, I. (2013). Molecular and biochemical analysis of the first ARA6 homologue, a RAB5 GTPase, from green algae. *Journal of experimental botany* 64, 5553-5568.

( 2 4 ) Hayashi, Y., Shigenobu, S., Watanabe, D., Toga, K., Saiki, R., Shimada, K., Bourguignon, T., Lo, N., Hojo, M., Maekawa, K., *et al.* (2013). Construction and characterization of normalized cDNA libraries by 454 pyrosequencing and estimation of DNA methylation levels in three distantly related termite species. *PloS one* 8, e76678.

( 2 5 ) \*Nishiyama, T., Miyawaki, K., Ohshima, M., Thompson, K., Nagashima, A., \*Hasebe, M., and \*Kurata, T. (2012). Digital gene expression profiling by 5'-end sequencing of cDNAs during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens*. *PloS one* 7, e36471.

( 2 6 ) \*Kadota, K., Nishiyama, T., and Shimizu, K. (2012). A normalization strategy for comparing tag count data. *Algorithms for molecular biology* 7, 5.

( 2 7 ) Gallot, A., Shigenobu, S., Hashiyama, T., \*Jaubert-Possamai, S., and \*Tagu, D. (2012). Sexual and asexual oogenesis require the expression of unique and shared sets of genes in the insect *Acyrtosiphon pisum*. *BMC genomics* 13, 76.

( 2 8 ) \*Hojo, M., Maekawa, K., Saitoh, S., Shigenobu, S., Miura, T., Hayashi, Y., Tokuda, G., and Maekawa, H. (2012). Exploration and characterization of genes involved in the synthesis of diterpene defence secretion in nasute termite soldiers. *Insect molecular biology* 21, 545-557.

( 2 9 ) \*Shigenobu, S., and Wilson, A.C. (2011). Genomic revelations of a mutualism: the pea aphid and its obligate bacterial symbiont. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 1297-1309.

( 3 0 ) Price, D.R., Duncan, R.P., Shigenobu, S., and \*Wilson, A.C. (2011). Genome expansion and differential expression of amino acid transporters at the aphid/*Buchnera* symbiotic interface. *Molecular biology and evolution* 28, 3113-3126.

( 3 1 ) \*Kadota, K., and Shimizu, K. (2011). Evaluating methods for ranking differentially expressed genes applied to microArray quality control data. *BMC bioinformatics* 12, 227.

( 3 2 ) Ishikawa, M., Murata, T., Sato, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Imai, A., Kimura, M., Sugimoto, N., Akita, A., Oguri, Y., *et al.*

(2011). *Physcomitrella* cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *The Plant cell* 23, 2924-2938.

( 3 3 ) Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M.H., *et al.* (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nature cell biology* 13, 853-859.

( 3 4 ) \*Banks, J.A., Nishiyama, T., Hasebe, M., Bowman, J.L., Gribskov, M., dePamphilis, C., Albert, V.A., Aono, N., Aoyama, T., Ambrose, B.A., *et al.* (2011). The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332, 960-963.

〔学会発表〕(計 58 件)

〔図書〕(計 1 件)

( 1 ) 門田幸二 (2014). トランスクリプト  
ーム解析 (共立出版). 2 4 0 頁

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r\\_seq.html](http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r_seq.html) R を用いて配列情報を解析する方法の紹介

<http://koke.asrc.kanazawa-u.ac.jp/HOWTO/> 平易なハウツー

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西山 智明 (NISHIYAMA, Tomoaki)

金沢大学・学際科学実験センター・助教

研究者番号 : 50390688

(2) 研究分担者

重信 秀治 (SHIGENOBU, Shuji)

基礎生物学研究所・生物機能解析センター・特任准教授

研究者番号 : 30399555

門田 幸二 (KADOTA, Koji)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号 : 60392221

(3) 連携研究者

笠原 雅弘 (KASAHARA, Masahiro)

東京大学・新領域創成科学研究科・講師

研究者番号 : 60376605

(4) 研究協力者

山口 勝司 (YAMAGUCHI, Katsushi)