

「植物の機能と制御」

平成 12 年度採択研究代表者

武田 和義

(岡山大学資源生物科学研究所 教授)

「オオムギゲノム機能の開発と制御」

1. 研究実施の概要

オオムギのゲノム解析に必要となる大規模な実験系の開発を進めている。その主なものは以下の通りである

- (1) 全遺伝子のカタログ化をするための cDNA 解析とそのマップおよび発現解析手法の開発
- (2) オオムギ遺伝子の配列情報を整理・解析するためのデータベース開発
- (3) オオムギ遺伝子単離のための巨大 DNA ライブラリーの開発
- (4) 有用遺伝子の単離および単離に向けた実験手法の開発
- (5) 形質転換系の確立
- (6) 有用形質のタンパク解析技術の開発

(1)のカタログ化においては独自に開発した現在 12 万の遺伝子断片配列をもとにカタログ化を進めている。また、これらの配列の中で数千の一塩基多型を検出し、このうち約千個について特許申請した。また、約 1 万個の cDNA をマップするためのプライマー合成を完了し、cDNA の発現を検出する DNA アレイシステムを開発中で、予備実験を終了した。また、1 月米国で開催された国際動植物ゲノム会議において約 2 万個の遺伝子が検出可能な DNA チップシステムを共同開発することを合意した。これらの遺伝子配列情報を検索するためのデータベースを開発し(2)、近々インターネット上で公開を予定している。(3)のライブラリー開発は現在精力的に研究を進めており、目標の三分の一にあたる約 10 万クローンを作成し、平成 14 年度前半から利用法を含めた手法開発を進め、年度後半にはライブラリーが完成する予定である。このライブラリーを用いた遺伝子単離のために(4)の高密度遺伝地図作製およびマーカー検出などを進めている。形質転換技術(5)については現在もっとも優れた技術を有するオーストラリア CSIRO から技術を導入済みで、利用の体制がほぼ整った。13 年度から新たにタンパク質量分析技術を用いた有用形質の解析に着手し、予備実験を終えて大量解析の準備をしている。

2. 研究実施内容

(1) 岡山大学 センター形成グループ

国立遺伝学研究所との共同研究で進めている cDNA のシーケンス解析を約 9 万クローンについて両端から完了した。また、独自に行っている cDNA 解析を約 3 万クローン終了した。この結果につ

いて海外の主なオオムギゲノム研究グループと共同してオオムギ遺伝子のカタログ化を進め、マイクロアレイ(Affymetrix 社)を共同開発することを合意し、現在作業中である。また、これらの cDNA をマップするためのプライマーの大量合成、cDNA アレイシステムの予備実験も終了した。さらに、情報システムグループと共同してオオムギ EST データベースを開発し、これを利用して EST 中に存在する SNP を推定し、特許申請した。また、BAC 特異遺伝子グループと協力して高密度遺伝地図および BAC ライブラリーの開発を進めている。形質転換系のオーストラリアからの導入およびタンパク質分析の委託分析システムの確立などプロジェクトに新規の技術を導入した。さらに、機能開発解析グループ、物理地図生理機能グループ、ライブラリー開発グループ、タンパク質解析グループ、大量シーケンス解析グループおよび醸造品質解析グループに実験材料および情報を提供して研究の調整をはかっている。海外の研究拠点とは綿密に連絡を取り合って情報を収集するとともに、協力体制を整えている。

(2) 岡山大学 機能開発解析グループ

- ① 塩ストレス培養条件下で塩ストレス抵抗性オオムギの根で発現している cDNA ライブラリーを構築した。センターのシーケンシングシステムによって約 4,000 クローンについて両端からの塩基配列を解読し、各遺伝子の機能を推定するとともに、Unigene の同定を行った。
- ② 二次元電気泳動法による醸造オオムギがもつタンパク質の分離条件を決定した。分離したタンパク質スポットを TOF-MS や LC-MS/MS で分析するための染色条件や抽出条件について検討した。
- ③ 耐塩性、乾燥耐性に関係すると考えられる、生体膜上に存在する水チャンネルタンパク質をコードする遺伝子をオオムギおよび塩生植物のアツケシソウから単離した。また、オーストラリア CSIRO の協力で、オオムギ形質転換技術の研修をうけ、その技術を導入した。

(2) 香川大学 物理地図生理機能グループ

- ① オオムギ染色体物理地図の作成に有用な染色体特異的 DNA マーカーの開発:配偶子致死染色体を利用してコムギの遺伝背景に添加されたオオムギ1H 染色体に転座、欠失等の構造変異を誘発した。分子マーカーならびに染色体調査によりこれら構造変異の切断点を決定し、11 の切断点と26 マーカーからなるオオムギ1H 染色体に関する細胞学地図を作成した。さらに、オオムギ品種はるな二条の BAC ライブラリーから蛍光 in situ ハイブリダイゼーション用のプローブとして利用可能な低コピー配列を選抜した。
- ② オオムギのミネラル集積機構を明らかにするために、世界のオオムギ標準品種(SV)274 種類とアメリカのオオムギコアコレクション(BCCUS)135 品種を用いて穀粒中の鉄、亜鉛及びケイ素の含量を測定した。また、アルミニウム耐性の異なるオオムギ約 20 品種を用いて、アルミニウム耐性機構の解析を行った。

(3) 三重大学 タンパク質解析グループ

オオムギのプロテオーム解析の基礎となる二次元電気泳動法によるタンパク質の分離技術について検討したところ、アマシヤムバイオサイエンス社の Multiphor II システムを用いて、幼芽、麦芽、種子からの各抽出タンパク質を再現性よく分離することができた。またビール醸造品質に関わるタ

ンパク質の同定を目的として、用いる品種・系統、製麦・仕込み過程の条件等、解析のターゲットとするサンプルについて検討した。

(4) 国立遺伝学研究所 情報システムグループ

オオムギの3品種(赤神力、野生種、はるな二条)3組織に由来する5種類の EST ライブラリークローンの配列を用いて、クラスタリング、相同性解析、および3品種間の SNP を検出した。また、これらの情報を網羅するデータベースを構築し、一部グループ内公開を開始した。

(5) 農水省九州農試 ライブラリ開発グループ

オオムギ幼芽を用いて、オリゴキャップ法で作製された完全長リッチ cDNA クローンをランダムに 96 選び、その塩基配列解析後 BLAST 検索や GENETYX 解析などから、オリゴキャップ法について検討した。その結果、既存の不完全長 5' UTR を持つ EST 情報に完全長あるいは、より長い 5' UTR 情報を得るためには、①ライブラリーが高効率で既存の mRNA と BLASTN ヒットすること、② BLASTN ヒットしたクローンの中で既存常用より長い 5' UTR をもつものが多いこと、③ mRNA のサイズに偏りが無いことなどが重要であると考えられた。NCBI データの内 Complete cds の記載あるものだけを比較対照とすると、本年度解析したライブラリーの完全長率は 17.3% であった。現在オオムギ種子根を用いてオリゴキャップ法で完全長 cDNA を作製中である。

(6) 農水省生物研 BAC 特異遺伝子グループ

① オオムギの栽培起源に関連した遺伝子である小穂脱落性遺伝子 (btr1, btr2) と側列稔性遺伝子 (int-c) の大まかな分子連鎖地図の作製を目標とした。品種アズマムギと関東中生ゴールの交配で作成した組み換え自殖系統にテスターを交配し、雑種第1世代の表現型を調査した。小穂脱落性は btr1 座に関する検定交配では分離比が1遺伝子による 1:1 の期待値に適合し、btr1 座は予想通り 3H 染色体上に位置づけられた。btr2 座に関する検定交配では非脱落型と脱落型が 23:8 に分離し、2遺伝子による分離を示唆した。btr2 座が定説通り btr1 座近傍に存在すると仮定した場合、その表現型発現を抑制するもう一つの遺伝子 d (仮称) は 7H 染色体上の約 30cM の範囲に存在することが示唆された。側列稔性遺伝子は質的遺伝子 (int-c) として 4H 染色体短腕末端に位置づけられた。

② オオムギのゲノム解析の基盤となる精密マップの作製と BAC ライブラリーの作製を岡山大学資源生物学研究所と共同で行った。(i)HEGS/AFLP を利用したオオムギの精密マップの作製:Russia 6(二条)と H.E.S. 4(六条)との交配による F9 世代の組換え近交系統 (RI) から、95 系統を選び HEGS による高密度連鎖地図の構築を行った。100 レーンの非変性ゲル 4 枚のセットで、2 セット(最大 800 検体)を一人で毎日調査することにより、約 1000 マーカーからなる連鎖地図を約5ヶ月で構築することができた。これは、オオムギの地図としては世界最高のものである。オオムギ品種間の多型率は 4-5%とイネの日印交雑での十数%よりかなり低い、上記のような十分高い効率での地図作製が可能であることが示された。30%以上は他の交配におけるマーカーとして使用可能である。(ii)BAC ライブラリーの作製:ビール用のはるな2条から平均インサート長 105.4kb(49.5kb~177.1kb)の組換えコロニーを概算で約 84,000(約 1.8 ゲノム相当)得た。このうち、約 25,000 (384 x 65)コロニーを 384 ウェルマイクロタイタープレートに回収した。

秋田県立大学 大量シーケンス解析グループ(平成13年10月より参画)

岡山大学と国立遺伝学研究所の共同研究によって「はるな二条」、「赤神力」および「野生オオムギ(OUH602)」に由来する約43,000のオオムギESTから見いだされた一塩基多型(SNP)についてダイレクトシーケンス法を用いて再確認した。

サッポロビール株式会社 醸造品質解析グループ(平成14年2月より参画)

醸造品質にかかわる主要なタンパクを検出するための試料を作成した。

3. 研究実施体制

センター形成グループ

- ① 武田和義(岡山大学資源生物科学研究所, 教授), 佐藤和広(同, 助教授)
- ② ゲノム解析システムの開発

機能開発解析グループ

- ① 杉本学(岡山大学資源生物科学研究所, 助手), 且原眞木(同, 助手)
- ② 遺伝子・タンパク解析システム, 形質転換系の確立

物理地図生理機能グループ

- ① 武田真(香川大学農学部, 助教授)馬建鋒(同, 助教授)
- ② 物理地図作成法開発, ミネラル集積機構の解明

タンパク解析グループ

- ① 掛田克行(三重大学生物資源学部, 助教授)
- ② 有用特性のタンパク解析

情報システムグループ

- ① 山崎由紀子(国立遺伝学研究所, 助教授)
- ② オオムギ遺伝子データベースの開発を担当

ライブラリ開発グループ

- ① 斉藤彰(九州沖縄農業研究センター, 室長)
- ② 完全長 cDNA ライブラリ開発

BAC 遺伝子単離グループ

- ① 川崎信二(農業生物資源研究所, 主任研究官), 小松田隆夫(同, 主任研究官)
- ② 高能率 BAC ライブラリ開発, 精密連鎖地図作製

大量シーケンス解析グループ

- ① 高橋秀和(秋田県立大学, 助手)
- ② 大量シーケンス解析技術の開発

醸造品質解析グループ

- ① 伊藤一敏(サッポロビール株式会社植物工学研究所, 所長)
- ② 醸造品質に関する研究

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Kaneko, T., W. S. Zhang, K. Ito and K. Takeda. Worldwide distribution of beta amylase thermostability in barley. *Euphytica* 121:223–228. (2001)
- Kaneko, T., W. S. Zhang, H. Takahashi, K. Ito and K. Takeda. QTL mapping for enzyme activity and thermostability of beta amylase in barley. *Breeding Sci.* 51:99–105. (2001)
- Matsuo, H., K. Taniguchi, T. Hiramoto, T. Yamada, Y. Ichinose, K. Toyoda, K. Takeda and T. Shiraishi. Gramine increase associated with rapid and transient systemic resistance in barley seedlings induced by mechanical and biological stresses. *Plant Cell Physiol.* 42:1103–1111. (2001)
- Kohyama, N., M. Fujita and K. Takeda. Correlation between barley constituents and the browning reaction in heat-treated barley pastes. *Food Sci. Technol. Res.* 7:297–299. (2001)
- L. A. Marquez-Cedillo, P. M. Hayes, A. Kleinhofs, W. G. Legge, B. G. Rossnagel, K. Sato, S. E. Ullrich, D. M. Wesenberg. 2001. QTL analysis of agronomic traits in barley based on the doubled haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theor Appl Genet* 103: 625–637. (2001)
- J. M. Costa, A. Corey, P. M. Hayes, C. Jobet, A. Kleinhofs, A. Kopisch-Obusch, S. F. Kramer, D. Kudrna, M. Li, O. Riera-Lizarazu, K. Sato, P. Szucs, T. Toojinda, M.I. Vales, R. I. Wolfe. Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theor Appl Genet* 103: 415–424. (2001)
- Kato, H., Taketa, S., Ban, T., Iriki, N. and Murai, K. The influence of a spring habit gene, *Vrn-D1*, on heading time in wheat. *Plant Breeding* 120, 115–120. (2001)
- Taketa, S., Ando, H., Takeda, K. and Bothmer, R. von: Physical locations of 5S and 18S–25S rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. *Heredity* 86, 522–530. (2001)
- Taketa, S. and Takeda, K. Production and characterization of a complete set of wheat-wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) chromosome addition lines. *Breeding Science* 51, 199–206. (2001)
- Matsui, K., Mano, Y., Taketa, S., Kawada, N. and Komatsuda, T.: Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102, 477–482. (2001)
- Noda, K., Matsuura, T., Maekawa, M. and Taketa, S. Chromosomes responsible for sensitivity of embryo to abscisic acid and dormancy in wheat. *Euphytica* 123 : 203–209 (2002).
- Ma, J. F., Ryan, P. R. and Delhaize, M.: Aluminium tolerance in plants and the complexing

role of organic acids. Trends in Plant Sci. 6, 273–278 (2001).

- Komatsuda T, Salomon B, Bryngelsson T, Bothmer Rv. Phylogenetic analysis of *Hordeum marinum* Huds. based on nucleotide sequences linked to the *vrs1* locus. Pl. Syst. Evol 227:137–144 (2001).
- Mano Y, Kawasaki S, Takaiwa F, Komatsuda T. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) cross 'Azumamugi' x 'Kanto Nakate Gold' using a simple and efficient amplified fragment–length polymorphism system. Genome 44:284–292 (2001)
- Tanno K, Taketa S, Takeda K, Komatsuda T. A DNA marker closely linked to the *vrs1* locus (row type gene) indicates multiple origins of six-rowed cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl Genet 104:54–60 (2002)

(2) 特許出願

1. 国内出願 5件
2. 外国出願 なし