

「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) 遺伝子のカタログ化をするためのcDNA解析と遺伝子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) 有用遺伝子の機能推定および単離に向けた実験手法の開発
- (5) 有用形質のタンパク解析技術の開発

(1)においては独自に開発した現在14万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、特許申請（国内出願およびPCT出願）した。また、約1万個のcDNAからプライマーを合成して数百マーカーからなるESTマップを作成した。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、米国を中心とする国際コンソシアムで約2万3千個の遺伝子が検出可能なDNAチップシステムを共同開発した。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)、インターネット上で公開した。約30万クローンからなる(3)のライブラリーが完成し、利用法を含めた手法開発を進めている。このライブラリーを用いた遺伝子単離のための(4)の高密度遺伝地図作製技術が完成し、精力的に強連鎖マーカーの検出を進めている。また、アルミニウム耐性などストレス耐性の機能推定も進んでいる。なお、形質転換技術については予備実験を終了し、利用の体制が整っている。(5)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、大量解析が進んでいる。

2. 研究実施内容

- 1) ゲノム解析センター形成（岡山大学資源生物科学研究所：武田和義，佐藤和広，最相大輔）

研究目的：遺伝資源に含まれる遺伝子情報，DNAライブラリー情報のオンラインデータベースおよび遺伝子研究や育種に必要な材料（クローン，フィルター，DNAアレイ，系統，

雑種集団など) を供給するゲノム解析センターを形成する。cDNAおよびBACなどのDNAライブラリーを開発して遺伝子解析の基礎を作るとともに、DNAアレイ技術や高密度マップなど効率よく遺伝子を検出するシステムを開発する。また、タンパク解析から遺伝子検出に至るシステムを開発する。さらに、これらを遺伝資源に適用して大量解析するための技術を検討する。

研究の経過は以下の通りである

- a) cDNA配列情報についてはさらに解析を進め、これまでに約14万件のEST配列を得ている。これらのESTを開発したcDNAクローンについては保存体制を整備しており、クローンバンクとしての機能が整いつつある。EST配列情報から得られたSNPsについて特許出願すると共に、前年度に出願した内容とあわせてPCT出願した。また、米国を中心とする国際コンソシアムで約2万3千個の遺伝子が検出可能なAffymetrix社製GeneChipを共同開発した。
- b) 完全長cDNAクローンの選抜と配列決定については、NCBI等公開遺伝子データベースにおける登録遺伝子の変化によって完全長率の推定が難しくなっているため、イネ完全長cDNA配列の公開を待つて選抜および配列決定を進める予定である。
- c) タンパク質量解析システムについては、サンプル調整技術が確立し解析システムが稼働しており、数百の遺伝子に由来するとみられるタンパク質が同定できている。
- d) cDNA由来のSTSおよびSNPを用いたESTのマッピングはシステムが整って精力的にマップ作成を行っており(図1)、すでに、cDNA由来のSTSを用いたESTを約300座乗させたマップを作成した。現在、マップできるESTの速度は毎月100以上を維持している。
- e) 超高密度マップの作成については1,000マーカーを超える高密度マップを数ヶ月で行うシステムの開発に成功し、約1,100マーカーおよび約400マーカーの地図をそれぞれ開発した。
- f) BACライブラリーは約30万クロンの収集を完了し、引き続きライブラリーを用いた遺伝子検出システムの開発を行っている。
- g) 形質転換系は個体再生効率が低いので、効率向上に向けて調整している。
- h) オオムギゲノムデータベースは岡山大学から公開したESTを検索できるシステムを開発、公開した(図2)。
- i) DNAアレイシステムの開発はやや遅れているが、数千程度の遺伝子を検出可能なアレイを作成できる技術が確立している。

以上のように、ゲノム解析センターの形成に関してはリソース(cDNA, BACライブラリーなど)の開発が順調に進んでおり、今後タンパク解析や形質転換系などを利用した解析にプロジェクトの中心が移行する予定である。DNAアレイの開発はやや遅れているが、大きな問題はなく、次年度以降成果得られると考えている。

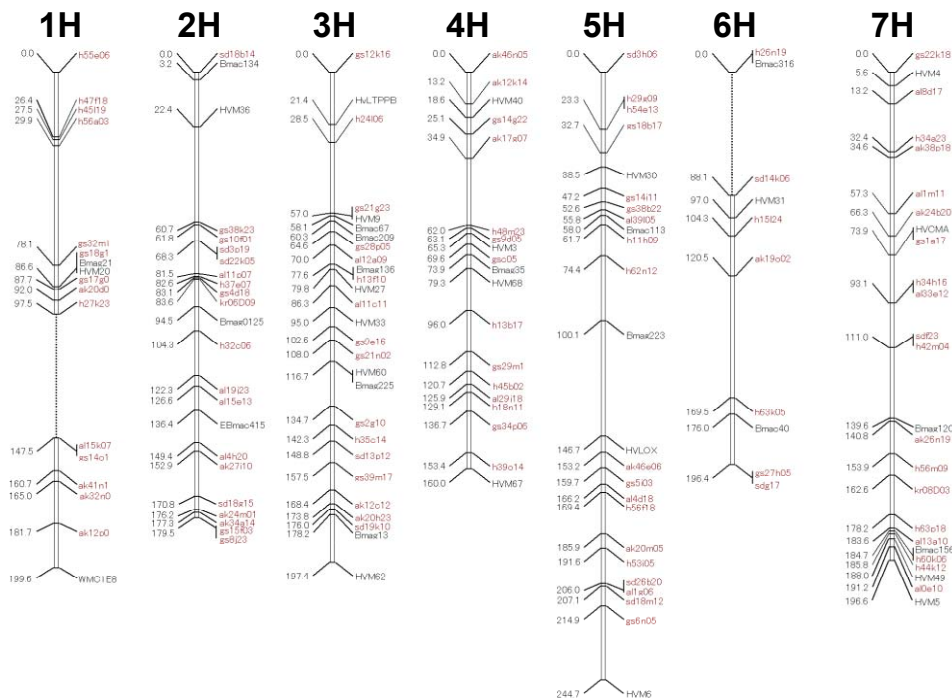


図1 オオムギのESTマップ (南角ら2003)

図2 公開したESTデータベース (<http://www.shigen.nig.ac.jp/barley/>)

2) ゲノム機能解析開発 (岡山大学資源生物科学研究所: 且原真木, 杉本 学)

環境ストレス (特に耐塩性と乾燥耐性とこれらストレスによる細胞障害 (細胞死)) に関与する遺伝子の同定, 品種間差, 発現解析, タンパクレベルでの解析, ストレス耐性遺伝子の発現解析システムの確立や遺伝子産物の機能解明を行うことを目的として以下の研究を実施した.

- a) 塩ストレス条件下で培養した塩ストレス抵抗性オオムギの根で発現しているcDNAライブラリーから得たESTの発現プロファイルを解析した.
- b) ビール醸造オオムギで発現するタンパク質を一次元および二次元電気泳動で分離し, 質量分析した.
- c) 形質転換法によってGFPを導入した形質転換オオムギT₀の再生とオオムギ水チャンネル遺伝子について発現量と変化を解析し, T₀の再生個体までを得ることができた.
- d) 環境ストレスは特に耐塩性と乾燥耐性とこれらストレスによる細胞障害 (細胞死) に関与する遺伝子に関して研究が進んでおり, 形質転換系および遺伝子発現確認システムによって最終的な成果を確認する段階に来ている.

3) 物理地図作製と生理機能関連遺伝子の単離 (香川大学農学部: 武田 真, 馬 建鋒)

BACクローンを利用したゲノム情報と染色体情報の統合, オオムギ染色体物理地図の作成と有用遺伝子単離への利用, ミネラル集積機構の解明と関連遺伝子の単離を目的として以下の研究を実施した.

- a) オオムギ品種はるな二条のBACクローン約600個からドットプロットによる1次スクリーニングとFISHによる2次スクリーニングを行い, 染色体マーカーとして有用なクローンを3個得, それらの座乗位置を決定した. 一方, バルク分析によって皮裸性遺伝子座と1 cM以下の距離で密接に連鎖するAFLPマーカーを開発し, PCRマーカー化を行った.
- b) オオムギにおけるアルミニウム耐性機構は根からのクエン酸の分泌であることをつきとめた. また, このアルミニウムによるクエン酸の分泌パターンは他の植物と異なっていた. オオムギにおける鉄と亜鉛の集積の違いはこれらのミネラルの転流能力や蓄積能力に依存することが小さく, 主に根による吸収と獲得に由来することを明らかにした.

4) 有用形質のタンパク解析 (三重大学生物資源学部: 掛田克行)

二次元電気泳動法を用いて自家不和合性遺伝子, 穀粒品質関連遺伝子, ストレス耐性遺伝子などのタンパク解析と遺伝子同定を行うことを目的としている. 本年度はオオムギの種子, 麦芽, 幼芽の全タンパク質の二次元電気泳動分析を行い, 各サンプル間での泳動プロファイルを比較した. さらにタンパク質の発現パターンを比較するための新規な手法, ICAT (Isotope-coded affinity tag)法を用いて有用形質関連タンパク質を同定するための予備的調査として, タンパク質試料の抽出, 標識, 質量分析等について検討した.

5) ゲノム情報システムの開発 (国立遺伝学研究所：山崎由紀子)

本プロジェクトで得られた成果を総合して、オオムギゲノムに分布する遺伝子情報を集約し、データベース化してインターネット公開することを目的としている。本年度は昨年度構築したESTデータベースのスキーマを大幅に変更し、異なる手法を用いたクラスタリング解析結果やプライマー情報を新規追加し、これらの詳細検索も可能とした。旧システムはDYNACLUST (相同解析およびクラスタリングソフト) 依存であったためマシン間移行が困難であったが、新システムでは非依存とした。また公開データバンクに登録済みの配列情報およびその相同解析結果のデータベースは、個別に構築したオオムギの系統情報データベースと統合した。イネの最新マップ情報を基に、オオムギESTのイネ相同配列をイネマップ上に表示し、比較解析を可能とした。マップ上のクローンに関する検索システムも構築中である。

6) DNAライブラリ開発 (九州沖縄農業研究センター：斉藤 彰)

完全長cDNAライブラリーを用いたDNAクローンの整理統合技術の開発、遺伝子の単離と機能推定に関わる新しい技術開発を目的としている。本年度はオオムギの酸性土壌耐性遺伝子を単離のために、代表的感受性品種Dayton, 非感受性品種Kearney を用いた水耕実験 (20mM MES-NaOH, pH3.8~pH5.6の0.2毎に調整) により、それらの耐酸性を解析した結果、1) pH5.0以上ではDaytonの種子根が伸長するが、pH4.8以下では伸長が阻害され、2) pH5.2以上ではKearneyの種子根は伸長するが、pH5.0以下では伸長が阻害されることが明らかになった。すなわち、①pH5.0とpH4.8におけるDayton種子根mRNA由来の完全長cDNAライブラリーおよび②pH5.2とpH5.0におけるKearney種子根mRNA由来の完全長cDNAライブラリーの比較によって、種子根伸長に特異的に発現が制御されている遺伝子を同定し、さらに③pH5.0において伸長するDayton種子根mRNAと伸長しないKearney種子根mRNA由来の完全長cDNAライブラリーを比較することによって、オオムギの酸性度耐性遺伝子が同定できると考えられた。

7) 高能率BACライブラリーに基づくオオムギ特異的遺伝子の単離 (農業生物資源研究所：小松田隆夫, 川崎信二)

醸造用オオムギ「はるな二条」のBACライブラリーを完成する。また、AFLPおよびSSRなどのマーカーによる超高密度マップの作成技術を開発する。目的遺伝子領域を標的とした部分マップによって、分離集団あるいはアイソジニック系統対における目的遺伝子と強連鎖するマーカーを選抜し、遺伝子単離に向けてBACクローンの選抜と配列解析などを担当している。

a) 岡山大学資源生物学研究所と共同で作成したBACライブラリーの3Dプール化と、高密度メンブレンの作成を行った。また、昨年作成したHEGSによる高密度ゲノムマップをもとに、赤かび病抵抗性の精密QTL分析を行った。はるな二条から作成したBACライブラリーは最終的に平均インサートサイズ115kbで294,912クローンとなり6.8ゲノムをカバーしている。これを、384穴のプレート768枚に収納し、各プレート毎にまとめたDNAを3次元アレイシステムにまとめると共に、8プレートづつを1枚の高密度メ

ンブレンにドットプロットしてPCRと最小限のハイブリの組み合わせでクローンの同定が可能である。

昨年作成した高密度ゲノムマップを用いて赤かび病抵抗性のQTL分析を行い、3カ所のQTLを第2染色体に2カ所(A, B)と第5染色体に1カ所(C)見出した。Aは条性遺伝子の多面発現と考えられ、Cは単独では効果がないが他の遺伝子座と共存すると強い効果を発揮する。

- b) 小穂非脱落化に関連する新規遺伝子の検出を目的にQTL解析をおこなった。オオムギ品種アズマムギ (btr2) と関東中生ゴール (btr1) の交配で作成した組み換え自殖系統 (RILs:F11世代) を用いた。RILs x 夏大根麦 (btr1) の交配では、3H染色体上に全表現型分散の72%を説明する単一のQTLを検出し、このQTLはbtr1と同一であった。RILs x 早木曾2号 (btr2) の交配では、3H染色体上に全表現型分散の70%を説明するQTLを検出し、このQTLはbtr2と同一であった。またこれ以外に5H染色体と7H染色体上に全表現型分散の5%と10%を説明する新規のQTLを検出した。以上の結果、関東中生ゴールの小穂非脱落化はbtr1のみに支配されているが、アズマムギと早木曾2号の小穂非脱落化はbtr2の他に2つの遺伝子によって支配されていることが明らかになった。この結果は、野生種からの変化の程度に違いのあることを示唆する。今後のbtr2の高精度マップ作成には同質遺伝子系統作成による1因子化が必要である。

7) 大量シーケンス解析システム開発 (秋田県立大学生物資源科学部: 高橋秀和)

前述のゲノム解析にかかわる研究のうち、BACや完全長cDNAのショットガンシーケンシングのような大量のシーケンス解析を可能とするために、解析効率を飛躍的に高めたシーケンスシステムを開発する。また、SNPをPCR-RFLPによってマップするための手法開発とマッピングを進めている。本年度はオオムギの有用遺伝子の単離を視野に入れて、PCRベースで利用可能なDNAマーカーの開発を行った。特に一塩基多型をPCRベースで容易に検出する方法を検討し、RFLPマーカーからSTSマーカーへ変更・最適化した。

8) 醸造品質に関わるタンパクの大量解析 (サッポロビール株式会社: 伊藤一敏, 高塩仁愛, 蛸井潔, 金子隆史, 岡田吉弘)

麦芽および醸造品質に関わるタンパク質のサンプル調整とその同定および抽出、ペプチドフィンガープリンティング法による質量解析とデータベースによる遺伝子同定二次元電気泳動を中心としてタンパク質の同定を行うことを目的としている。本年度はビールを用いた2-D解析系の確立を行った。その結果、カラムによる脱塩後、凍結乾燥させることで濃縮させる方法が最も多くのスポットを検出できることが明らかとなった。ビール中に残存するタンパク質を明らかにするため、製品ビールを用いた2-D解析を実施し、プロファイリングを実施中である。

また、醸造品質 (泡持ち) に関わる主要なタンパク質を同定するため、泡持ちの異なる2品種を用いて、複数の製麦条件で、それぞれ単用で醸造し、2-D解析を実施した。その結果、①泡持ちの良い品種に特異的なスポットを複数検出した、②製麦条件の違いによるスポットの変化と、泡持ちとの関連が示唆された。現在、これらのスポットの解析を実施

中である.

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開発

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，上席研究官），小松田隆夫（同，主任研究官）
- ②高能率BACライブラリ開発，精密連鎖地図作製と遺伝子単離

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と遺伝子マッピング

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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Fujita M., K. Takeda, N. Kohyama, Y. Doi and H. Matsunaka. Genotypic variation in polyphenol content of barley grain. *Euphytica* 124:55-58. (2002)
- Domon, E., A. Saito and K. Takeda. Comparison of the waxy locus sequence from a non-waxy strain and two waxy mutants of spontaneous and artificial

- origins in barley. *Genes and genetic systems* 77:351-359. (2002)
- Raman, H., J. S. Moroni, K. Sato, B. J. Read and B. J. Scott. Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 105:458-464. (2002)
 - Katsuhara, M., Y. Akiyama, K. Koshio, M. Shibasaka, K. Kasamo. Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiology* 43:885-893. (2002)
 - Ma, J. F. Beneficial Elements: Si and Na. *In Encyclopedia of Soil Science*, Marcel Dekker, Inc. 1201-1205 (2002)
 - Ma, J. F. and Takahashi, E. Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan. Elsevier Science (2002)
 - Ma, F. F., Higashitani, A., Sato, K. and Takeda, K. Genotypic variation in Si concentration of barley grain. *Plant and Soil* 249(2): 383-387. (2003)
 - Kawahara, T., Taketa, S. and Murai, K. Differential effects of cultivated and wild barley chromosome 5H on heading characters in wheat-barley chromosome addition lines. *Hereditas* 136: 195-200. (2002)
 - Matsui K, Yoshida M, Ban T, Komatsuda T, and Kawada N. Role of male-sterile cytoplasm in resistance to barley yellow mosaic virus and Fusarium head blight in barley. *Plant Breeding* 121:237-240. (2002)
 - Matsui K, Oda S, Furusho M, Komatsuda T, and Kawada N. Evaluation of barley male-sterile cytoplasm based on fertility restoration and the effect of the cytoplasm on malting quality in Japan. *Plant Prod Sci* 5 (3):194-197. (2002)
 - Mano Y, Komatsuda T. Identification of QTLs controlling tissue-culture traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 105:708-715. (2002)
 - Nishikawa T, Salomon B, Komatsuda T, Bothmer R. von , Kadowaki K. Molecular phylogeny of the genus *Hordeum* using three chloroplast DNA sequences. *Genome* 45:1157-1166. (2002)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：5件（研究期間累積件数：14件）