

「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と利用
- (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と遺伝子同定

(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および国際コンソシアムによって作製された配列をもとにカタログ化を進めており、イネゲノム、コムギESTとの相同性比較を用いた比較ゲノム情報を含めた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た。また、約1万個のcDNAからプライマーを合成して約千マーカーからなるESTマップを作成した。このマップ上に十数の有用形質を同定し、cDNAの発現およびSNPを検出するDNAアレイシステムを用いた遺伝子型選抜システムを開発中である。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オリゴアレイシステムを共同開発した。約30万クローンからなる(3)のライブラリーと遺伝子の選抜技術が完成し。遺伝子単離のための(4)の高密度遺伝地図作製技術と合わせて、精力的に強連鎖マーカーの検出を進め、いくつかの重要な遺伝子の単離が進んでいる。また、塩トレス、酸性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。また、(5)質量分析技術を用いて醸造品質をはじめとする有用形質に関わるタンパク質の遺伝子同定が進んでいる。

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)

- a) オオムギの遺伝子配列の大量解析のために独自に開発した約14万件のcDNA配列情報について解析を進めている。完全長cDNAクローンの選抜と配列決定については、イネ完全長cDNA配列による完全長性の判定が難しいため独自にUnigeneクローンの選抜と配列決定を進めている。また、EST配列情報から得られたSNPsの実用化に向けた評価を進めている。
- b) オオムギの発現遺伝子の解析のために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、販売が開始された。また、cDNAをスポットするDNAアレイに関する目的形質を絞ったアレイを安価で高感度に利用する技術開発が進んでいる。
- c) 遺伝子のゲノム上の位置決定のためにcDNA由来のSTSおよびSNPを用いたESTのマッピングを精力的に行っており、すでに、ESTを約1,200座乗させたマップを作成した(図1)。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。さらに、このマップには有用遺伝子が多数座乗しており、育種選抜システムと合わせて特許申請、産業化を目指している。
- d) 遺伝子単離のためのBACライブラリーは約30万クローンの収集を完了し、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とこれらを用いた遺伝子の単離を行っている。また、これらの遺伝子の導入を確認するための形質転換系の効率向上を進めている。
- e) 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、公開している。また、プロジェクト内部で効率的に解析を進めるための遺伝子、タンパク関連データベースの開発も進めている。
- f) タンパク質の発現から遺伝子を推定する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、ビール醸造に関わるタンパク質とそれに関わる遺伝子が同定できている。

以上のように、ゲノム解析センターの形成に関してはライブラリーなどの開発段階から、マップ作製や遺伝子型選抜、遺伝子単離などの応用へと順調に技術開発が進んでおり、最終年度までにある程度タンパク解析や形質転換系などを利用した成果が得られると考えている。

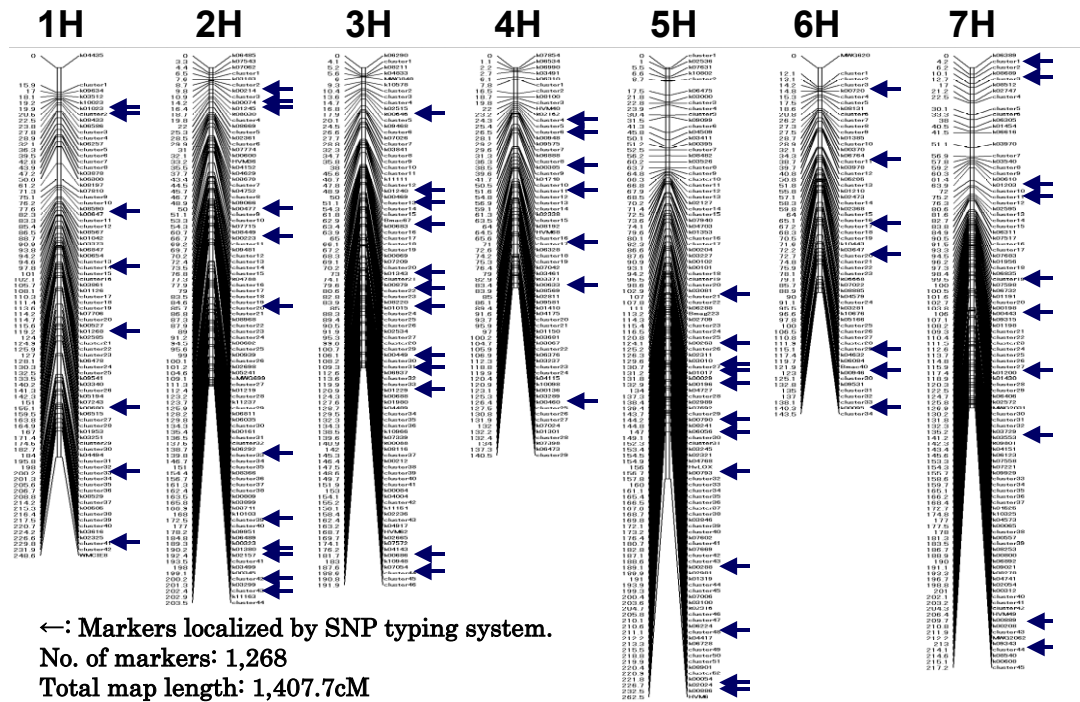


図1 オオムギのESTマップ (南角ら2004)

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)

- a) 塩ストレス抵抗性オオムギ根で発現しているcDNAライブラリー(KR)から得たESTの発現プロファイルと対照としたオオムギ (Barke) 根で発現しているcDNAライブラリー (HW) のESTの発現プロファイルをそれぞれ発現量の多いものから順位づけした結果, HWで発現していない遺伝子がKRで高発現していることを明らかとなった. また, これら遺伝子の器官特異的発現性が異なることを明らかにした. (杉本)
- b) 一次元および二次元電気泳動で分離したビール醸造オオムギで発現するタンパク質のうち, 103断片に分画した一次元電気泳動ゲルに含まれるタンパク質をLC-MS/MS分析してプロテオームデータベースを構築した. NCBIデータベースと有意に相同性を示すものは426個であり ($p < 0.05$), 冗長性のない89個のタンパク質を得ることができた (杉本)
- c) 環境ストレス, 特に乾燥と高塩濃度のストレス (塩ストレス) 環境において, 耐性向上に貢献すると考えられるオオムギの遺伝子について, その発現解析と機能解析を進めることと, 分子育種によって植物個体を得る手法として, また遺伝子機能を個体レベルで評価・解析する基盤技術としての形質転換技術について, 研究を進めてきた. 乾燥および塩ストレスに関与する遺伝子として, 水チャネルに注目して, その一つ, HvPIP2;1の解析を進めた (図2). この遺伝子産物 (タンパク質) は, 水とともに二酸化炭素も透過させていることを見出した. HvPIP2;1を過剰発現させたイネを解析すると, 二酸化炭素透過性の向上により, 葉内二酸化炭素透過性が上昇し,

その結果として光合成能力も向上したことが認められた。またこの形質転換イネは水透過性も上昇していたが、蒸散も増えおり、また水チャネル発現の抑制が効かないため、水ストレスに対しては弱くなり、塩ストレス感受性は増大していた。現在オオムギ形質転換系で、HvPIP2;1を過剰発現、および発現抑制の形質転換オオムギを製作中である。

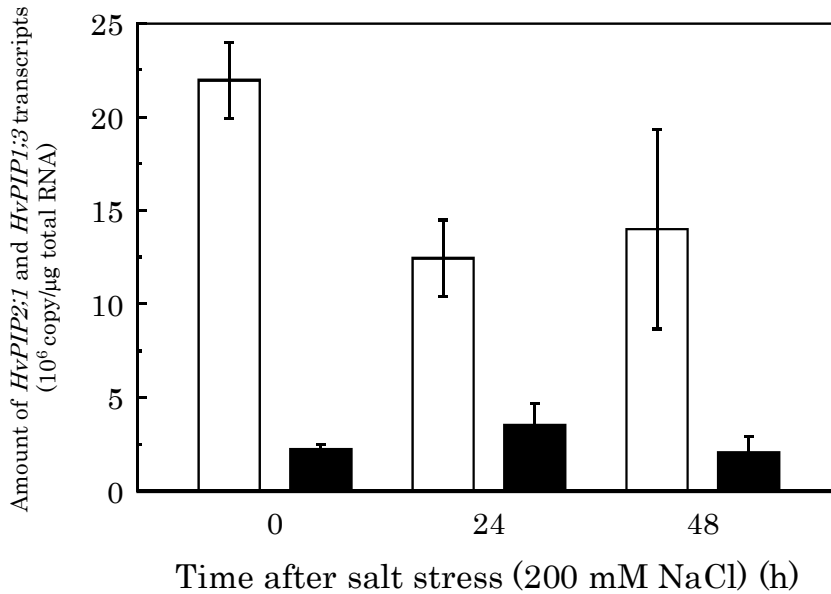


図2 塩ストレス後の HvPIP2;1 RNA (□) and HvPIP1;3 RNA (■) の発現量

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)

a) オオムギの重要形質である皮裸性を決定する遺伝機構を解明することを目的として研究を進めている。皮裸性遺伝子座に密接連鎖する分子マーカーの開発を進め、本遺伝子座を挟み込む共優性のPCRマーカーを得た。裸性品種と皮性品種の交配に由来する合計995個体の分離集団を用いて高精度マッピングを行ったところ、裸性遺伝子はマーカーsKT3とsKT5の間にそれぞれ0.5cMおよび1.5cMの距離をおいて位置することがわかった。さらに、995個体の分離集団でも、2種類のPCRマーカーは皮裸性遺伝子座と共分離することを確認した。共分離マーカーを用いてはるな二条BACライブラリーをスクリーニングし、物理地図の作成を開始した。一方、共分離マーカーの1つであるsKT7を用い、世界各地の野生種なら

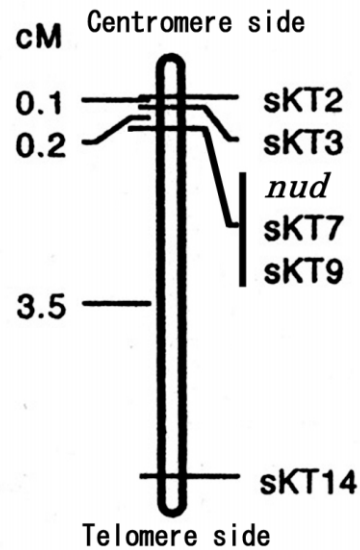


図3 裸遺伝子(*nud*)の精密地図

びに栽培種計259系統における多型性の調査を行った。この遺伝子座の対立遺伝子IVは皮性栽培系統には全く見出されないが、全ての裸性栽培系統が例外なくこの対立遺伝子を有していることを見出した。このことから、現在の裸麦は単一起源であると推定した。(武田)

- b) アルミニウムによるクエン酸の分泌に関与する遺伝子のマッピングを行った。マッピングにはF₃でアルミニウム耐性をヘテロ接合で有するF₄の集団60個体を用いた。4H染色体に座乗するSSRマーカーHVM3, Bmag353とBmac310とクエン酸の分泌量との連鎖分析を行った結果、三つのマーカーともクエン酸の分泌量と連鎖していることをつきとめた。QTL解析の結果、クエン酸分泌に関与する遺伝子はBmag353付近にあり、これはアルミニウム耐性遺伝子と同じ位置にあることが明らかとなった(図4)。またアルミニウム耐性品種むらさきもちと感受性品種Morexの根の先端から膜タンパク質を抽出し、二次元電気泳動で比較検討した結果、耐性品種に特有の膜タンパクを見つけ、これらのタンパクのLC-MS解析を行った。

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)

オオムギおよび近縁野生種のタンパク質発現解析における二次元電気泳動(2-DE)法とICAT(Isotope-coded affinity tag)法の有効性を比較・検討した。モデルサンプルとして*H. bulbosum*の雌ずいタンパク質を用い、2種類の自家不和合性(S)遺伝子型間で発現タンパク質のプロファイルを比較した。2-DE法を用いた場合には、各遺伝子型に特異的なタンパク質スポットが4個得られ、LC-MS/MS解析によりこれらのタンパク質を同定した。一方、イオン交換HPLC分画後のサンプルをICAT法により分析した場合には、遺伝子型間で差異の

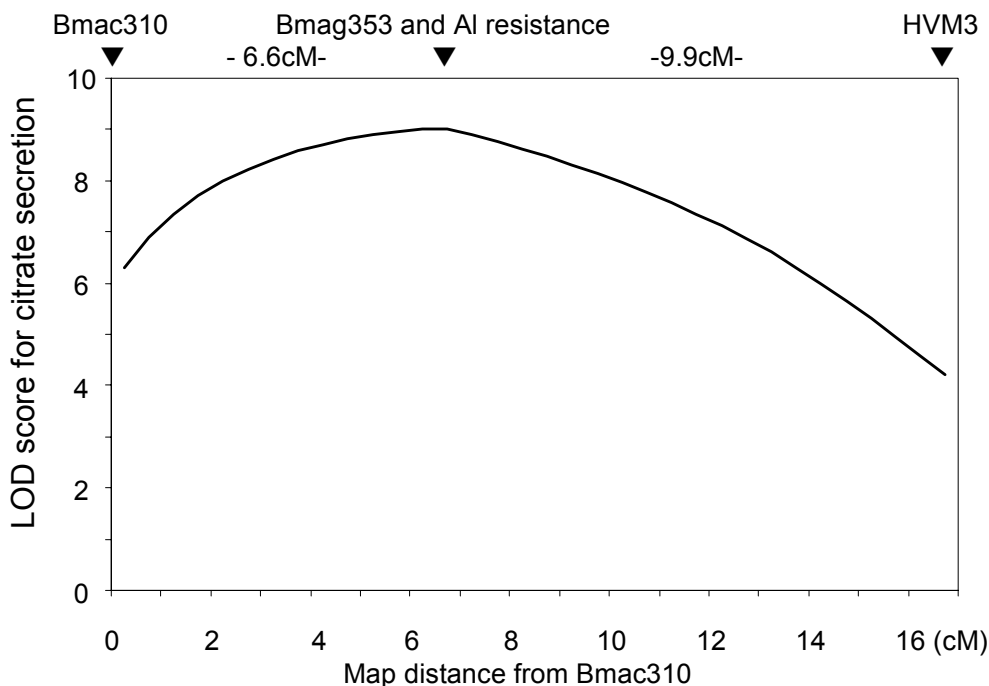


図4 アルミニウム(AI)耐性とクエン酸分泌QTLの地図上の位置

あるペプチド断片が数十種類見出された。このことから、ICAT法を用いれば、2-DE法よりもはるかに感度よく、2つのサンプル間での発現タンパク質の違いを検出できることがわかった。

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)

今年度は遺伝子発現情報のWeb公開用システムの開発を行った。クラスター解析の結果ファイルを入力ファイルとし、発現パターンをツリー画像とビットマップ画像に出力してwebブラウザ上に表示し、さらに利用者がインタラクティブに範囲指定、拡大表示、詳細情報へのアクセスなどができるようなビューワを試験開発した。解析ソフトの形式に依存しないので、アレイ解析の結果でも、EST配列情報のみを使ったクラスタリング解析結果でも同様に利用できる。

6) DNAライブラリ開発 (九州沖縄農業研究センター：斉藤 彰)

オオムギの酸性土壌ストレス耐性遺伝子には酸性度耐性遺伝子を基盤に、Ca感受性遺伝子、AlやMnなどの金属過剰耐性遺伝子など複雑である。酸性土壌耐性の基盤となる酸性度耐性遺伝子を解析これらの遺伝子を単離するためには、発現部位や発現時期などに特異的な試料から抽出したmRNAを解析することが重要である。15年度は酸性土壌ストレスの基盤となる酸性度ストレスオオムギ種子根由来完全長cDNAライブラリーをDayton, pH5.0の種子根を用いて定法に従い作成したが、試料が少量に限られ良質なライブラリーを作成できなかった。

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)

a) 小穂非脱落性遺伝子単離のために高密度連鎖地図を作製した。東亜と西域の品種を交配して育成した組み換え自殖系99系統に2種類 (btr1およびbtr2) のテスターを検定交配し雑種第1代の小穂脱落性を調査した。AFLP解析のためのプライマーにはEcoRI+3とMseI+3を64種類ずつ組合せた合計4096通りを供試し、バルク分離型解析法等によって最終的に84のAFLPマーカーを6.7cMの範囲内にマッピングし、平均0.08cM/locusの高密度を達成した (図5)。上記84のうち74マーカーを利用してオオムギ野生種及び栽培型の系統関係を解析し c X結果, 当初の予想通り裁

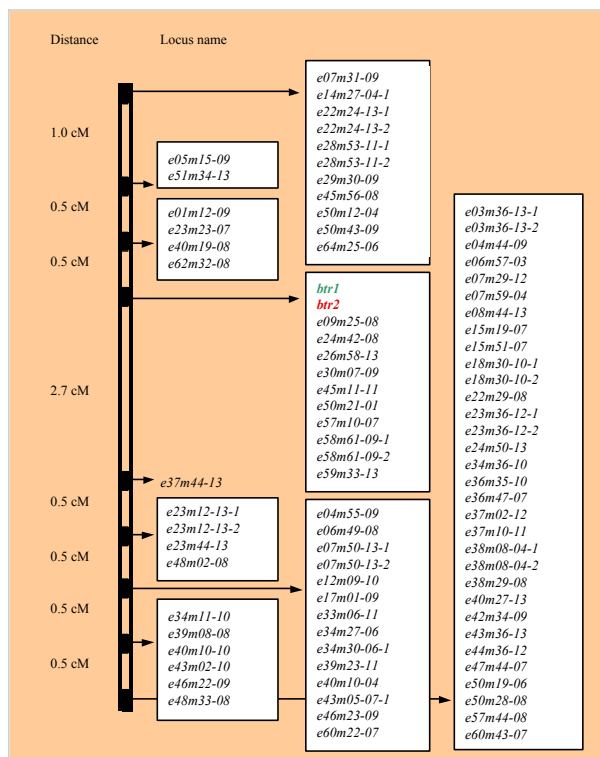


図5 小穂脱落性遺伝子btr1, btr2の精密マップ

培品種は東亜と西域に明瞭に分岐し、野生系統のいくつかがその各枝に近縁に位置づけられた。本研究の結果は栽培オオムギが複数の地点で栽培化されたことを示唆するが、明確な結論を下すには小穂非脱落性遺伝子本体の構造解析を待たなければならない。（小松田）

b) BACライブラリーを利用した選抜システムの高度化、特に裸性遺伝子の単離に関して強連鎖マーカーの効率的な選抜方法の確立とポジティブBACクローンのスクリーニング法を検討した。（川崎）

8) 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）

1塩基多型（SNP）マーカーは、従来の多型検出が困難であった近縁品種間においても利用可能なDNAマーカーとして期待されている。昨年度はRFLPマーカーからSNPマーカーに変更・最適化して、近縁種間の雑種でSNPマーカーのマッピングを行った。本年度はESTライブラリー由来のSNPマーカーの作成ならびにマッピングを行った。ESTの選抜は、WanamakerとCloseによって開発されたHarvESTを利用し、Unigene情報を抽出してローカルBlastデータベースを構築し、既知のcDNAマーカーの塩基配列をBlast検索して行った。新規に作成したSNPマーカーのマッピングならびにムギ類（オオムギ、コムギおよびライムギ）のゲノムの比較を行った。その結果、増幅される塩基配列が単一の時にはEST由来のマーカーは有効であったが、コムギへの利用にはプライマーの特異性やヘテロ接合個体の安定した検出法が必要とみられた。一方、Unigene情報は完全長cDNAでないため相同の遺伝子族（homologous gene family）が存在する場合、プライマーの作成には特に注意が必要とみられた。

9) 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，金子隆史，岡田吉弘，金田弘挙，黒田久夫）

麦芽および醸造品質に関わるタンパク質を明らかにするために、タンパク質サンプル調製、二次元電気泳動およびペプチドフィンガープリンティング法による質量解析により、データベースによる遺伝子/タンパク質の同定を行なう。本年度は大麦種子、麦芽、麦汁、ビールよりサン

プルを調製し二次元電気泳動を行ない、質量解析による蛋白質の同定を進めている。そして、ビール泡持ちの優れた大麦品種と劣った大麦品種を用いてビールを製造し、そ

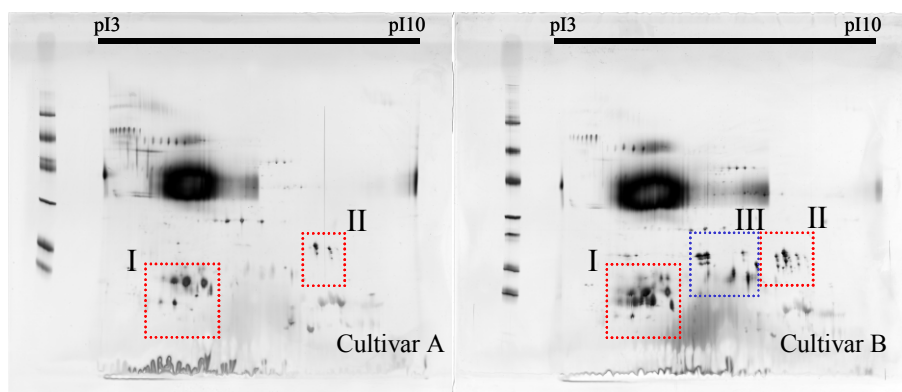


図6 泡持ちに差の見られる2品種で製造したビールの二次元電気泳動像。タンパクのスポットに明らかな差異が認められる。

の蛋白組成を比較することにより、泡持ちに関連する候補蛋白質を同定した。また、香味耐久性・泡持ちなど、ビール品質に大きな影響を与える大麦由来脂質酸化酵素のキャラクタライズを行い、詳細な酵素化学的解析を試みた。そして麦芽中の脂質酸化物を分解する酵素活性が9-脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼであることを酵素化学的に示し、この酵素がビール老化臭の一種である紙臭の原因物質“*t*-2-ノネナル”の生成に関与することを明らかにした。

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ライブラリの開発

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

- Rikiishi, K., T. Matsuura, M. Maekawa, K. Noda and K. Takeda. 2003. Genetic analysis of tissue culture traits in barley cultivar 'Lenins'. *Plant Breeding* 122:99-104.
- Zhang Wensheng, Kaneko Takafumi, Takeda Kazuyoshi 2004. β -amylase Variation in Wild Barley Accessions. *Breeding Science* 54: 41-49.
- Domon, E., Y. Yanagisawa, A. Saito and K. Takeda. 2003. Single nucleotide polymorphisms genotyping by polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for barley waxy gene. *Plant Breeding* 123:225-228.
- Makiko Chono, Ichiro Honda, Haruko Zeniya, Koichi Yoneyama, Daisuke Saisho, Kazuyoshi Takeda, Suguru Takatsuto, Tsuguhiro Hoshino, and Yoshiaki Watanabe. 2003. A Semidwarf Phenotype of Barley uzu Results from a Nucleotide Substitution in the Gene Encoding a Putative Brassinosteroid Receptor. *Plant Physiology* 133: 1209-1219.
- K. Hori, T. Kobayashi, A. Shimizu, K. Sato, K. Takeda and S. Kawasaki. 2003. Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. *Theor. Appl. Genet.* 107: 806-813.
- Z. Zhao, J. Ma, K. Sato, K. Takeda. 2003. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 217: 794-800.
- M. Sugimoto, Y. Okada, K. Sato, K. Ito, and K. Takeda. 2003. A root-specific O-methyltransferase gene expressed in salt-tolerant barley. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 966-972.
- Matus, A. Corey, T. Filichkin, P. M. Hayes, I. Vales, J. Kling, O. Riera, K. Sato, W. Powell and R. Waugh. 2003. Development and characterization of recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donot alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Genome* 46:1010-1023.
- M. Sugimoto and K. Takeda. 2003. Structure and function of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like protein from barley. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 23: 397-403, 2003.
- Katsuhara, M., Koshio, K., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K. 2003. Over-expression of a barely aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 44:1378-1383.
- Katsuhara, M., Koshio, K., Shibasaka, M., Kasamo, K. 2003. Expression of an aquaporin at night in relation to the growth and root water permeability in

barley seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition* 49:883-888 (2003)

- Kikuchi, S., Taketa, S., Ichii, M. and Kawasaki, S. Efficient fine mapping of the naked caryopsis gene (nud) by HEGS (High efficiency genome scanning)/AFLP in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 73-78 (2003).
- Ma, J. F. and Furukawa, J.: Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97: 46-51 (2003).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：33件 (CREST研究期間累積件数：45件)