

## 研究課題別事後評価結果

### 1. 研究課題名「オオムギゲノム機能の開発と制御」

### 2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

武田 和義 (岡山大学資源生物科学研究所 教授)

主たる研究代表者

馬 建鋒 (岡山大学資源生物科学研究所教授(平成12年12月～))

武田 真 (香川大学農学部教授(平成12年12月～))

掛田 克行 (三重大学生物資源学部助教授(平成13年4月～))

山崎 由紀子(国立遺伝学研究所助教授(平成12年12月～))

斉藤 彰 (九州沖縄農業研究センター室長(平成12年12月～))

川崎 信二 ((独)農業生物資源研究所上席研究官(平成12年12月～))

高橋 秀和 (秋田県立大学生物資源学部助手(平成12年12月～))

伊藤 一敏 (サッポロビール(株)バイオリソース研究所所長(平成14年2月～))

### 3. 研究内容及び成果

#### 3-1. 研究課題全体の研究内容

オオムギは主要な農作物のひとつであり、一万年の栽培の歴史を経て種々のストレス耐性や農業形質などに大きな変異を生じてきた。オオムギは主要穀物の中では自殖性二倍体で染色体数も $n=7$ と少なく、ムギ類のモデルプラントとして注目されている。本プロジェクトでは「ゲノム解析」そのものをターゲットにするのではなく作物の生産性やストレス耐性の解析を視野に入れた研究を展開したいと考えた。研究代表者の所属する大麦・野生植物資源研究センターでは野生種や貴重な突然変異系統を含む1万以上のオオムギ品種を保有し、オオムギ遺伝研究の世界的な拠点の一つとして系統進化、遺伝解析などに成果を挙げており、その過程で集積された情報と材料を活用すれば世界の水準に互して一定の成果を収めることが可能な情勢にあると考えた。研究の実施に当たっては以下の内容で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た。なお、グループ別の担当課題は以下のとおり。

○ゲノム解析システムの開発(センター形成グループ:武田和義)

○遺伝子・タンパク質解析システム、形質転換系の確立、ミネラル集積機構の解析  
(機能開発解析グループ:馬建鋒)

○物理地図作成法開発と生理機能解析(物理地図生理機能グループ:武田真)

○有用特性のタンパク質解析(タンパク質解析グループ:掛田克行)

○オオムギ遺伝子データベース開発(情報システムグループ:山崎由紀子)

- 完全長 cDNA ライブラリーの開発(ライブラリー開発グループ: 斉藤彰)
- 高能率 BAC ライブラリー開発、精密連鎖地図作製と遺伝子単離(BAC 遺伝子単離グループ: 川崎信二)
- 大量シーケンス解析技術とマーカーの開発(大量シーケンス解析グループ: 高橋秀和)
- 醸造品質に関する研究(醸造品質解析グループ: 伊藤一敏)

以下本研究により得られた主要成果を述べる。

### 3-2. 研究成果

#### (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

- 約 14 万件の EST 配列に基づいて、シーケンスシステムの開発、配列の品質調整、代表クローンの選抜を行うと共に、クローンのレプリケーション、リアレイなどのシステム開発をした(センター形成グループ)。
- cDNA 由来の STS および SNP を用いた EST のマッピングを行い、約 3,000 マーカーからなるマップを作製した。また、二倍体コムギ集団に約 250 のオオムギ EST マーカーをマップした(センター形成グループ)。
- HEGS(高能率ゲノム走査)法による精密マーカーマップの作成技術を開発し、質的遺伝子に強連鎖するマーカーの作製、量的形質遺伝子座(QTL)と密接に連鎖した分子マーカーの検出および QTL を含む BAC クローンの単離に利用することなどが可能となった(センター形成グループ; BAC 遺伝子単離グループ)。
- オオムギにおける有用な PCR マーカーを開発するため、イネ cDNA 由来の STS マーカー、オオムギ EST 由来の SNP マーカー、トランスポゾン由来の MITE-AFLP マーカーなどを開発して、連鎖地図上に位置づけた(センター形成グループ; 大量シーケンス解析グループ)。
- 1H 染色体長腕の関与するオオムギ相互転座6系統をコムギと交雑し、それぞれの転座 1H 染色体をコムギに添加した系統シリーズを育成した。また、コムギの遺伝的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、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遺伝学的地図を作成した。さらに、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(FISH)用のプローブとして利用可能な低コピー配列を選抜し2個の BAC クローンを 1H 染色体に位置づけた(センター形成グループ)。
- 数千程度の遺伝子を検出可能なcDNA アレイを作成できる技術が確立し、特に植物ホルモンに関連する cDNA クローンを使用したアレイ解析を進めた。また、アフィメトリックス社の GeneChip システムの開発に関わると共に、これを用いた発現解析技術の開発を進めた(センター形成グループ)。

#### (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

- オオムギ EST の公開データベースを構築した。Oracle-Dynaclust システムを用い、アドレス(<http://www.shigen.nig.ac.jp/barley/>)から公開した。さらに、内部利用のための非公開データベースを構築した(センター形成グループ;情報システムグループ)。
  - EST のうち国立遺伝学研究所との共同研究によって作製した約 93,000 配列は3種類の系統に由来している。これらの配列のうち異なる系統に由来するクローンが同じ Unigene に含まれている一塩基多型(SNP)を検出するシステムを開発した(センター形成グループ;情報システムグループ)。
  - 岡山大学が有するオオムギ EST 配列約 12 万を phred によって再度ベースコールした後、quality score20 でトリミングし、ベクターマスキングを行って 3' 端約 6 万配列を得た。これらの配列から phrap によって contig 8,753、singlet 6,686 からなる Unigene を作成した。プライマー作成ソフト Primer3 によって、(a)400bp を中心として 350-500bp の cDNA 配列を増幅するプライマー対約 5,800、(b) (a)以外で 150bp 以上の cDNA 配列を増幅するプライマー対約 5,600 を作成した(センター形成グループ)。
  - EST 配列のクラスタリング解析結果を Web 上に表示する「Web ベース遺伝子発現パターンビューワ」を開発した。また、Comparative map(イネゲノム物理地図 vs オオムギ EST) の作成を進めた(情報システムグループ)。
  - 品質調整済みの EST 配列についてデータベース化を進めると共に、完全長 cDNA クローンの選抜と配列決定作業を進めた。これらの配列データを質量解析システムに組み込んで、タンパク質同定のためのデータベースを構築した(センター形成グループ)。
- (3) オオムギ遺伝子単離のための DNA ライブラリーの開発と利用
- 「はるな二条」BAC ライブラリーの開発を完了し、平均インサートサイズ 115kb で、294,912 クローンからなる大規模 BAC ライブラリーを 384 プレート 768 枚に構築した。また、PCR あるいはメンブレンでの目的クローンのスクリーニングシステムを開発した。これらのリソースを利用予定の研究分担者に送付すると共に、単離のためのスクリーニングを行い、目的のクローンを選抜した(BAC 遺伝子単離グループ;センター形成グループ)。
  - 完全長ライブラリー作製のための RNA 単離法として(1)金属リガンドを用いた新しい全 RNA 抽出法、(2)植物全 RNA の大部分を占める細胞リボソーム RNA( 28S, 18S, 5S)と tRNA と葉緑体リボソーム RNA など、植物全 RNA から除去する新リボソーム RNA 除去法、(3)単離された mRNA の intactness 検証法としての CAP から ATG までの 5'-noncoding region について RT-PCR する方法を導入した。従来のオリゴキャップ法と Vector-Capping 法によってオオムギ種子根の完全長 cDNA ライブラリー作製し評価した(ライブラリー開発グループ)。
- (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
- オオムギにおけるアルミニウム耐性機構が根からのクエン酸の分泌であることをつきとめ、当該遺伝子を連鎖地図上にマップした。また、オオムギにおけるアルミニウム毒性と耐

性の分子機構を明らかにするために、オオムギ GeneChip を用いてマイクロアレイ解析を行った。誘導された遺伝子の多くはストレス応答に関与していた(機能開発解析グループ;センター形成グループ)。

- オオムギの鉄欠乏ストレス耐性遺伝子のうち鉄-ムギネ酸錯体の輸送に関与する遺伝子(HvYS1)を単離し、これが鉄-ムギネ酸錯体に特異的なトランスポーターであると推定した(機能開発解析グループ)。
- ミネラル高集積オオムギ品種を同定するため、穀粒に高濃度のミネラルを集積する品種のスクリーニングを行った結果、ケイ素、亜鉛、鉄、カルシウム、マグネシウムとカリウムについて大きな品種変異のあることが確認された(機能開発解析グループ;センター形成グループ)。
- 水チャネル・アクアポリン遺伝子(MIP 遺伝子ファミリー)は水と低分子化合物の輸送を担う膜タンパク質で、乾燥および塩ストレス環境下での水輸送を制御して耐性機構に深く関与していると考えられている。オオムギESTデータベースと contig 配列から、34個の遺伝子ファミリーの候補を見出しその機能を解析した(機能開発解析グループ)。
- ストレス応答機構の細胞内シグナル伝達系に関与する因子として想定されるオオムギのMAPKinaseとCAX(Calcium proton exchanger)の遺伝子を新規に同定・単離した(機能開発解析グループ)。
- 塩ストレス抵抗性オオムギの網羅的 cDNA 配列解析を行い、品種特異的遺伝子カタログを構築し評価した。発現頻度の高い遺伝子について調査して、塩ストレス抵抗性オオムギ特異的遺伝子を12個検出した(機能開発解析グループ;センター形成グループ)。
- オオムギの裸性遺伝子(nud)のポジショナルクローニングを試みはるな二条BACコンティグ内に皮裸性遺伝子の有力な候補を見出した。また、連鎖マーカーによる品種の多型解析から、現在の裸麦は単一起源であると推定した(物理地図生理機能グループ)。
- オオムギ小穂(穂軸)の非脱落性遺伝子と連鎖する26のAFLPマーカーのクローニングとシーケンシングを行い、コムギ-オオムギ染色体添加系統やAFLPとの対立性検定によって合計9のSTSマーカーを得た。これらのマーカーを用い、野生オオムギと栽培オオムギの間で小穂非脱落性遺伝子領域の構造を調べるために、2つのF2分離集団を解析した。さらに小穂非脱落性遺伝子の分子マーカー密度を上げるため、イネゲノムとの相同性を用いてオオムギESTをスクリーニングし、PCRマーカーを作製してオオムギ連鎖地図上へマップした。また小穂非脱落性遺伝子近隣分子マーカーを起点としてオオムギ品種はるな二条のBACライブラリーのPCRスクリーニングを行い、ラフなショットガンシーケンシングをおこなって、小穂非脱落性遺伝子に向けた染色体歩行が可能になった(BAC遺伝子単離グループ)。

(5) 有用形質のタンパク解析技術の開発と遺伝子同定

- 塩ストレス抵抗性オオムギで特異的に発現しているタンパク質群を明らかにすることを目的として、二次元電気泳動法(2D-PAGE)によりタンパク質をスクリーニングし、塩ストレス抵抗性オオムギで特異的に発現している6個のタンパク質スポットを検出した(機能開発解析グループ)。
  - オオムギ近縁野生種 *Hordeum bulbosum* の自家不和合性(S)タンパク質( S 遺伝子産物) の探索と同定を目的として、二次元電気泳動(2-DE)法と ICAT (Isotope-coded affinity tag)法を用いたタンパク質のディファレンシャル解析を行った。その結果 S 遺伝子座と緊密に連鎖している遺伝子を検出したものの、ノーザン分析において、当該遺伝子は雌ずい以外に、葉、根、蒴でも発現しており、発現特異性は認められず、アレル間多型性が低いことから、雌ずい側 S 遺伝子ではないと結論した(タンパク質解析グループ)。
  - オオムギ種子、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う方法を確立した。ビールの泡持ちが優れたオオムギ品種と劣ったオオムギ品種を原料に用いて実験室規模でビールを製造し、そのタンパク質組成を質量解析により同定、比較した(醸造品質解析グループ;センター形成グループ)。
  - ビール中のタンパク質を網羅的に解析するために pI 4-7、6-9 に分けての二次元電気泳動、並びに一次元の SDS-PAGE を行い、得られたタンパク質スポットの質量解析を実施した。合計 87 スポットについて TOF-MS による PMF (Peptide Mass Finger-printing) 解析を行った。有意にヒットしたタンパク質のうち、オオムギ由来のタンパク質は 6 種類(BDAI-I, LTP-1 など)、酵母由来のタンパク質が 7 種類(Enolase 1, Acyl-CoA binding protein type 1 など)あった。同一分子量であるが等電点が異なるいくつかのスポットは同一のタンパク質種と同定される傾向にあった(醸造品質解析グループ)。
  - ビールの重要な品質の一つである泡持ちに関連するタンパク質の同定を目的として、泡持ちの異なる 2 品種(品種 A および B)の製麦条件(浸麦度)を変えて麦芽を調製し、単用ビールを醸造した。このビールの質量解析を実施し、岡山大学のオオムギ EST (expressed sequence tag) 配列にヒットするタンパク質を見出した。これらの結果から、オオムギゲノム解析をビール品質の改良に応用できることが示唆された(醸造品質解析グループ;センター形成グループ)。
  - ビール中の脂質酸化物は、ビールの品質を低下させることが知られている。ビールの老化臭として知られる 2(E)-ノネナールに関して、その生成経路と生成に関与するオオムギの酵素と遺伝子を明らかにした(醸造品質解析グループ;センター形成グループ)。
- (6) ゲノム機能を制御するための育種システムの開発
- EST マップ情報を利用したジェノタイプングアレイ技術の開発を進めた。このための予備実験として、EST マップに座乗するマーカーを選抜して、代表的な遺伝資源およびマップ親の SNP 多型を解析した(センター形成グループ)。

○EST マップを利用した高能率遺伝子型選抜システムの開発のための配列情報と利用法に関する特許出願および SNP 特許の国際出願をした。また、オオムギの主要病害である赤かび病および縞萎縮病に関して、染色体上の位置情報、マーカー情報を含めて特許出願した(センター形成グループ)。

○オオムギ、コムギ、ライムギを含む近縁植物についてオオムギ EST マーカーのプライマー配列に基づく類縁関係を推定した。さらに、近縁野生植物でストレス抵抗性に優れたハマニシクおよびオオハマニシクについて、染色体添加コムギ系統の添加染色体の識別と同祖群を決定するために、これらの異種染色体に特異的なマーカー各々約 100 をオオムギ EST から得た。また、野生オオムギ *H. chilense* の染色体添加系統群の添加染色体をオオムギ EST マーカーで同定することに成功した(センター形成グループ)。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表		招待:口頭		ポスター		報道	特許
国内	国外	国内	国外	国内	国外		
7	89	132	14	7	45	14	58

○研究の性質上、ハイインパクトジャーナルには公表されていないものの、専門誌に十分な数の論文が掲載されており、単子葉植物ゲノム研究分野で十分な存在感を示した。

○研究の課題からも出願し易いものではあるが、5 年間で国内・海外(PCT7件、内2件は各国移行済み)58件と、質量ともずば抜けており特筆に値する。ライセンスアウト、ロイヤルティー収入も期待できる実用性の高いものがあり、今後のライセンスの結果に興味もたれる。また、かかる知財を活用したベンチャー企業(岡山大麦ゲノムテクノロジー株式会社)を立ち上げたことも評価してよい。

##### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

○総合的には、麦類のモデルとしての大麦ゲノム育種の基盤を形成する種々のゲノムリソース、データベースを確立しておりその意義は大きい。また、実際に企業の参画を得て、実用的に利用可能な形質の特定を行ったことの価値は高く、ゲノム育種の強みを実証することに成功している。下記のように多くの顕著な研究成果を挙げており、基礎研究での国際的なリーダーシップの獲得と産業応用への可能性の両方に大きく寄与している。

- \* 大量の EST 解析と SNP の検出
- \* 国際コンソーシアムによる Gene Chip の開発と商業化
- \* 少量サンプルによる完全長 cDNA ライブラリー作成技術の開発

\* 詳細な遺伝地図の作成

\* はるな二条のBACライブラリー作成による日本産大麦の国際標準化

\* ビール会社等との協力による商品育種への応用

\* 鉄欠乏土壌への対応等に寄与しうる遺伝子単離への貢献

\* 大学発ベンチャー企業設立

○ 科学技術への貢献に関しては、麦類のモデル研究としての大麦のゲノム解析を大きく進展させたことの学問的意義とともに、それ以上に麦類のゲノム育種を大きく進展させ、禾穀類の分子育種、比較ゲノムを進展させたことの意義は高く、小麦等他の麦類への応用が期待される結果となっている。また、国際コンソーシアムを立ち上げ、大麦 gene chip を開発するなど国内外にその存在感を示すとともに国際的センターとしての役割を果たしている。

○ 今後の展開としては、大麦ゲノム育種はもとより麦類全体(小麦を含め)の分子育種の展開が期待できる。特にストレス耐性、裸性遺伝子や小穂非脱落性遺伝子などの単離に肉薄していること、ビール醸造形質に関わる有用遺伝子の利用が実用化に向けて進んでいることなど、大いに期待できるものである。さらに大麦ゲノム研究の中核として国際的にも認められてきており、また大麦育種リソースの世界的センターとしての役割をこれからも果たして欲しい。

#### 4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

○ 受賞歴としては、日本育種学会奨励賞(2003)(武田 真);日本農学賞(2004)(武田和義);読売農学賞(2004)(武田和義);日本育種学会論文賞(2004);日本育種学会論文賞(2004);日本植物生理学会論文賞(2004);日本農芸化学会中四国支部奨励賞(2004)(杉本 学)以上6件。

○ その他特記事項として、International barley EST database HarvEST(2002)(佐藤和広);Barley EST clone search database(2002)(山崎由紀子、佐藤和広);Barley EST Homology search Database(2002)(山崎由紀子、佐藤和広);Barley gene database on the public DNA database(2002)(山崎由紀子、佐藤和広);大麦EST-イネゲノムマップ(2004)(山崎由紀子、佐藤和広)などのデータベースを作成・公開するなど、基盤・応用研究の土台を構築したことは特筆に値する。国内外の研究者、育種企業からの利用は多い。

○ また、岡山大学の大麦遺伝資源の維持と活用に本プロジェクトが寄与したことは、研究成果とは別な意味で評価出来よう。