

「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な大規模な実験系の開発を進めている。ゲノム解析のためのリソースとして、まず、独自に開発した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た。また、これらの配列の中で数千の一塩基多型を検出した。さらに、約1万個の独立した遺伝子(3'EST)配列からプライマーを合成して、分離集団におけるSNPを検出し、約3千マーカーからなる転写産物地図を作成した。このマップ上に十数個の有用形質を同定し、品種間のSNPを検出する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BAC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高能率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と重要な遺伝子の単離を進め、形質転換技術を導入して相補性検定に備えている。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が進んでいる。醸造品質をはじめとする有用形質については、ESTデータベースと質量分析技術を用いてタンパク質の遺伝子同定が進んでいる。

このように、リソースの開発は順調に進み、現在データベースに基づくタンパク質量解析やBACライブラリーを利用した遺伝子単離などリソースを利用した解析にプロジェクトの中心が移行し、成果を得るべく精力的に研究を展開している。また、世界で最も高密度なオオムギのESTマップは、ゲノム配列解析の進んでいないオオムギおよびコムギにとって極めて重要なゲノムリソースであり、今後これを活用したゲノム解析技術の進展、育種技術の開発、多様性解析に基づくあらたな遺伝変異の導入などが進むと考えられる。特にジェノタイピングアレイを用いた遺伝解析、系統解析、蛋白解析などがより高速かつ高精度に行えるようになる。以上のように、最終年度はオオムギゲノム研究のためのリソース開発と国際的なオオムギゲノムセンター形成を進め、これらを利用した実用的なゲノムの機能開発と制御(育種)システムの完成度を高める。

## 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) これまでに得られた約14万件のEST配列に基づいて, 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などの作業を行った. また, これら品質調整済みの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構築を進めた.

b) タンパク質量解析システムについては, ビール醸造形質に関わるサッポロビール社との協同研究を

中心として, 精力的にサンプル採取を進め大量解析の準備をした.

また, 新たに導入したMALDI-TOF/MSシステムの調整を行って大量解析のための調整を進めているが, 銀染色サンプルの測定に未だ困難が認められる.

c) 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, 2005年3月で約3,000マーカーからなるマップを作製した

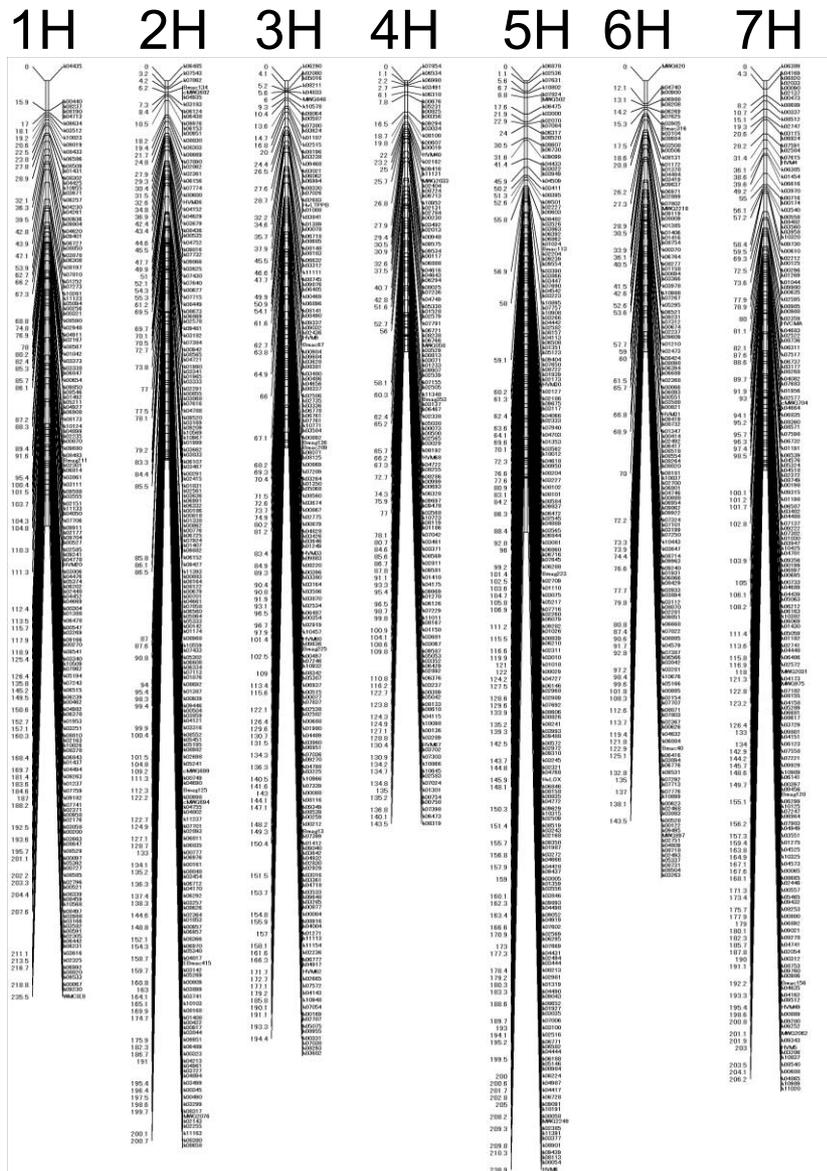


図1 岡山大学が保有する3' 端オムギESTのUnigeneに由来するプライマーを設計し, 約2,800のESTを連鎖地図上にマップした

(図1) また、二倍体コムギ集団に約100のオオムギESTマーカーをマップし、十数形質の農業特性のQTLを同定した。

- d) 「はるな二条」BACライブラリーの開発を完了し、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、目的のクローンを同定した。
  - e) 未だ個体再生効率が低いものの、形質転換体の作製に成功した。
  - f) DNAアレイシステムの開発は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システムを用いた発現解析技術の開発を進めている。
  - g) ESTマップ情報を利用したジェノタイピ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。また、ESTマップ情報とアフィメトリックス社のGeneChipシステムを組み合わせたジェノタイピングする技術についても検討した。国際オオムギESTコンソシアムを形成している米国、ドイツ、フィンランド、英国のプロジェクトと共同でAffymetrix社製オオムギGeneChipの発現データベースに関する大規模な国際共同実験を進め、成果を論文投稿した。
  - h) 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(計14件)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。
  - i) 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ンニクおよびオオハマニンニクについて、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。
- 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遺伝子のORF領域をイネ由来ユビキチンプロモーター下流に挿入したプラスミドを構築し、イネ(日本晴)に導入した。その結果、エチレン合成に関与するACC酸化酵素遺伝子を導入した形質転換体の根の伸長が促進されることが明らかとなった。また、二次元電気泳動プロファイルから特定した塩ストレス抵抗性オオムギ根で特異的に発現するタンパク質スポットについてLC-MS解析した結果、酸化還元に関与する酵素など環境ストレスで誘導されるタンパク質と同定した。
  - b) 二次元電気泳動プロファイルから特定した塩ストレス抵抗性オオムギ根で特異的に発現するタンパク質スポットについてLC-MS解析した。

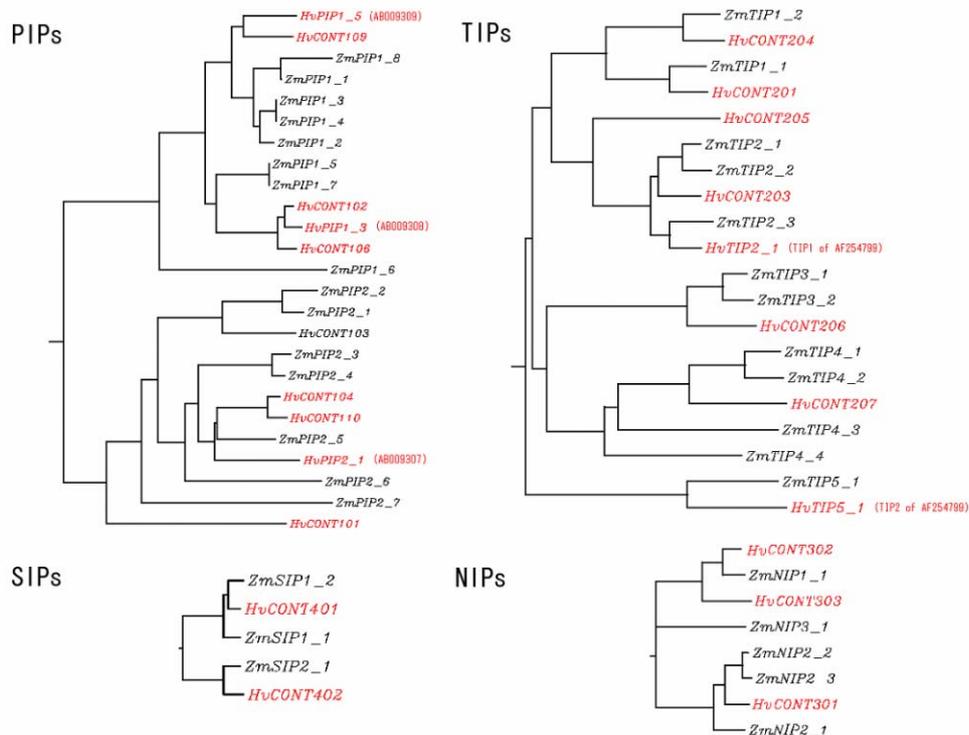


図2 オオムギのMIPs (赤字HvCONTxxx:ただしDB検索による推定上の配列をふくむ)とメイズMIPs (ZmXIPxxx)との相同性. 記号はPIP, plasma membrane MIP; TIP, tonoplast MIP; NIP, nodulin-like MIP; SIP, small basic MIPを示す.

c) オオムギにとって中程度の強さの塩ストレス (100 mM NaCl) 環境下で, オオムギ根の水透過性と, 主要な原形質膜型水チャネルタンパク (アクアポリン)HvPIP2;1のタンパク量が低下することを確認した. オオムギ根の水透過性にかかわる未知のアクアポリンを検出するため, オオムギのESTデータベースからMIP遺伝子と考えられる (ほぼ) 完全長のContigを新規に21個同定した. このうち9個についてはPCR産物が得られ, その塩基配列も確認して, 発現していることを確かめた.

### 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, 種子の皮裸性を決定する遺伝子を単離し, その機能を解明することを目的として研究を進めている. 本年度は裸性遺伝子 (*nud*) 座を岡山大学で開発されたESTマーカーを用いてマッピングし, 2つのオオムギEST間に位置づけた (図3). 次に, *nud*を挟み込むオオムギESTに高い相同性を示すイネESTを検索したところ, イネ第6染色体長腕に該当するESTが見つかり, その間の距離は約370kbであった. この区間のイネゲノム配列情報を元にマーカー開発を進めた結果, オオムギ*nud*座に対応するイネ第6染色体上の領域を約80kbに絞り込むことができた. このように, オオムギ*nud*座とイネの対応する染色体領域の間にはマイクロシンテニーが

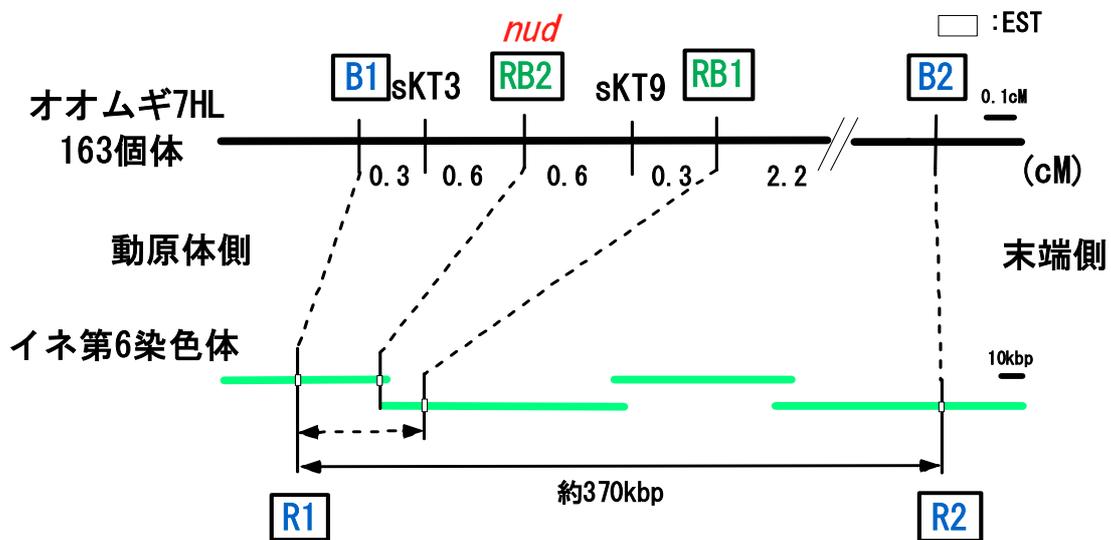


図3 オオムギ7H染色体長腕nud座領域のイネとの比較マッピング．イネ第6染色体長腕の領域とマイクロシンテニーを示すことが明らかになった．1511個体からなる分離集団を用いた高精度マッピングではsKT3とsKT9はnudからそれぞれ0.40および0.07cMの距離に位置していた．

みられることがわかった．これと並行して，*nud*座に密接に連鎖するマーカーをプローブとしてはるな二条BACライブラリーをスクリーニングし，*nud*座をカバーする物理地図の作成に着手した．

- b) 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，オオムギのAffymetrix Genechipを用いてマイクロアレー解析を行った．アルミニウム感受性品種Morexにおいて異なるアルミニウム濃度で処理した根の先端を比較した結果， $5 \mu\text{M}$ のAlによって発現が2倍以上増減する遺伝子は1438遺伝子， $10 \mu\text{M}$ のAlによって発現が2倍以上増減する遺伝子が1232遺伝子存在し，うち931個遺伝子はアルミニウム処理濃度 $5 \mu\text{M}$ の場合と共通している．またアルミニウム耐性品種Murasakimochiでは，さらに多くの遺伝子がアルミニウム処理によって発現され，現在アルミニウム毒性と耐性との関連を調べている．

一方，オオムギのミネラル集積機構を明らかにするために，およそ700品種のオオムギ穀粒におけるカルシウム，マグネシウムとカリウムの含量を測定し，品種間差を明らかにした．

#### 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)

ICAT (Isotope-coded affinity tag)法を用いて，野生オオムギ*H. bulbosum*における2種類の自家不和合性(S)遺伝子型間で異なる発現を示す雌ずいタンパク質の検出を行った．イオン交換HPLCで分画した13フラクションをMALDI-TOF MSにより分析した結果，2つのサ

サンプル（遺伝子型）間で発現量が2倍以上異なるシグナルが計95個、どちらかのサンプルに特異的なシグナルが計120個認められた。今回の目的の自家不和合性タンパク質（S遺伝子産物）は後者の特異的なシグナルに相当すると予想されたため、当該シグナルのいくつかを分取し、MS/MS解析を行った。しかし、複数シグナルの混在などが原因となり良好なMS/MSデータが得られなかったため、各シグナルのペプチド配列の同定には異なる質量分析法を検討する必要があると考えられた。

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）

岡山大学から公開したESTを検索できるオオムギゲノムデータベースを開発・公開中である。未公開のEST情報についての整理を行うと共に、データベース公開に向けた準備を進めている。これらの配列を含めたESTデータベースにGene Ontologyによるアノテーションを加える作業を行っている。また、イネゲノム配列情報の更新に伴い、オオムギとイネの比較マップの更新作業を行っている。

6) DNAライブラリ開発（九州沖縄農業研究センター：斉藤 彰）

「はるな二条」は発根・伸長初期において水耕栽培のpH4.8では伸長し、pH4.6では伸長が抑制されることから、低pHストレス応答遺伝子単離用の完全長cDNAライブラリー作成法の改良を試みた。pH4.8あるいはpH4.6のpH条件下で水耕栽培したオオムギ品種「はるな二条」の根から全RNAを抽出し、さらにリボゾームRNAを除去したmRNAを用いてcDNAライブラリーを作成した。その結果、従来のoligo-dT法によるpolyA+mRNA濃縮に比べよりmRNAが濃縮されたことが示された。

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

a) 二つの小穂非脱落性遺伝子*Btr1*と*Btr2*の微細な構造解析を行う目的で、ア

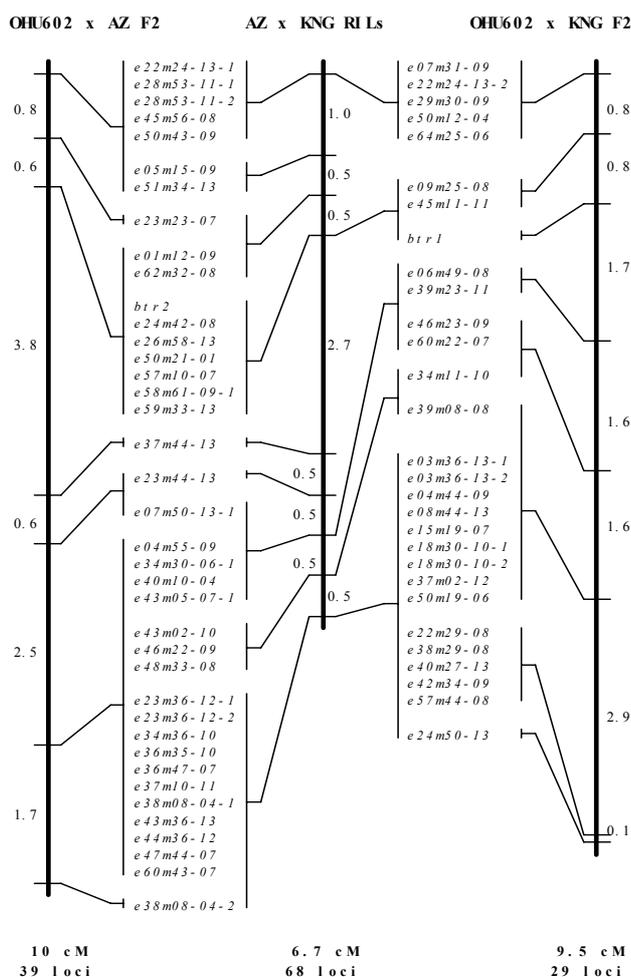


図4 オオムギの小穂脱落性複合遺伝子座 (btr1/btr2) のAFLP精密地図. 中央の地図は66マーカーからなる。

ズマムギ (*Btr2*) × 関東中生ゴール (*Btr1*) の F<sub>2</sub> 集団 (約 1000 個体) を使って、小穂非脱落性遺伝子 AFLP マーカーから作成した STS マーカーで連鎖地図を作成した (図 4)。小穂非脱落性遺伝子を挟み込むマーカー間で組換えが認められた個体について、*Btr1* および *Btr2* 型の品種 (系統) を検定交配した。また同じ組換え個体を自殖により小穂非脱落性遺伝子領域に関してホモ化し、このホモ個体にたいしてもおなじ *Btr1* および *Btr2* 型の品種 (系統) を検定交配した。次年度に雑種個体の表現型から各組換え個体の遺伝子型を推定し、*Btr1* および *Btr2* の詳細なマッピングを行うとともに、両遺伝子座間の組み換えの有無を調査する。

- b) オオムギ成熟種子を用いた簡易形質転換システムの開発: これまで、オオムギの形質転換は未熟胚を用いて特定の品種でしか行うことができなかった。このため、成熟種子を用いていつでも手軽に簡便により広い品種でオオムギの形質転換を行う系を開発している。これまでに、transient な系で 35 SGUS 遺伝子の導入が十分満足行くレベルで発現されることを確認し、stable な系での転換を目指す。萩尾 (生物研)、武田 (香川大)、掛田 (三重大) との共同研究。
- c) 武田 (香川大) らとの共同研究として、皮裸性遺伝子の単離を目指し、周辺物理地図もかなりの部分が完成しつつある。

#### 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)

オオムギの EST 由来の Unigene の高密度な連鎖地図が作製されている (南角ら 2002)。一方、相同の遺伝子族 (homologous gene family) の塩基配列には相同領域がみられるので、PCR 法によってマッピングする場合には PCR プライマーの作製に工夫が必要である。そこで Unigene 由来の PCR 増幅断片をプローブにオオムギの染色体への FISH を試みた。はじめにオオムギの染色体 (2n=14) を識別するために、2種の rDNA をプローブに用い「はるな二条」の染色体に 3重染色の FISH を行い、1H~3H、5H および 6H 染色体を確認した。次にコピー数が単一で連鎖地図の位置が報告されている EST 情報を元にプライマーを作製して PCR 法で FISH に用いるプローブを増幅させた。このプローブを「はるな二条」の染色体に FISH したところ、強いシグナルは検出されなかった。現在、プローブの調整法やハイブリダイズ条件を検討している。

#### 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)

- a) 泡持ちの異なる 3つの品種による単用醸造試験を実施し、得られたビールのタンパク質の二次元電気泳動を行なった。スポットの濃度と各品種の麦芽分析値を用いて泡持ち (NIBEM 値) との重相関解析を実施し、3種のタンパク質が泡持ちに影響する事が確認された。これらのタンパク質の質量解析を実施したところ、3種のうち 2種類は大麥由来、1種類は酵母由来であった。浸麦度を変えた麦芽を用いた試験は、品種 A では浸麦度の上昇に伴い、NIBEM 値の低下が認められたが、品種 B では泡持ちは高いまま維持された。これらのビールサンプルについてタンパク質解析をおこなったところ、二次元電気泳動では分子量約 30kDa 以下に違いが観察され、「泡持ち」の良い品種 B に特異的に存在するスポットや「泡持ち」の変化と同調するスポットが確認さ

れ，‘泡持ち’との関連が示唆された(図5)．また，混濁に関与するタンパク質については，混濁物質中のタンパク質を二次元電気泳動で解析したところ，5つのサンプルに共通して存在するスポットが見出された．このタンパク質の質量解析を実施したところ大麦由来のタンパク質であることがわかった．

b) ビールのカーボド臭(保存劣化による生ずる成分)の原因

物質であるトランス-2-ノネナールの生成に関与する脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼについて，部分精製を行い，酵素化学的性質を明らかにした．

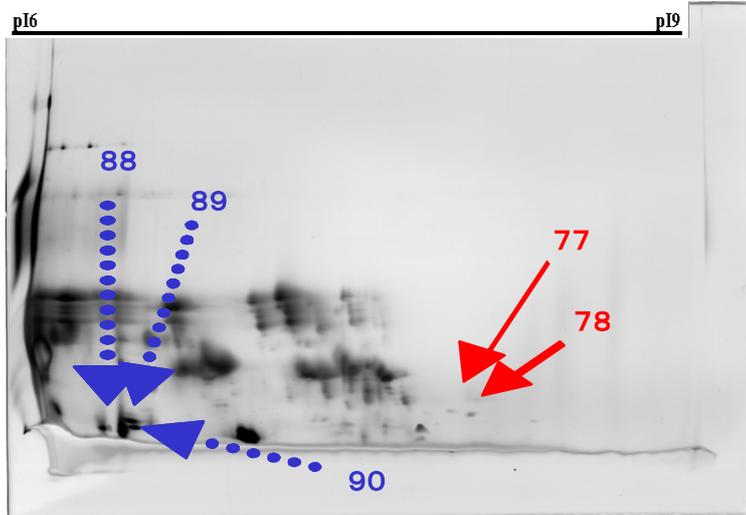


図5 二次元電気泳動では分子量約30kDa以下に‘泡持ち’の良い品種に特異的に存在するスポット(赤矢印)や‘泡持ち’の変化と同調するスポット(青矢印)が確認され，‘泡持ち’との関連が示唆された．これらのタンパク質を質量解析によって同定した．

### 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且原眞木(岡山大学資源生物科学研究所，助教授)，杉本学(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 齊藤彰（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

- J. F. Ma, S. Nagao, K. Sato, H. Ito, J. Furukawa, and K. Takeda. 2004. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. *J. Exp. Bot.*: 1335-1341.
- I. Karsai, P. M. Hayes, J. Kling, I. A. Matus, K. Mészáros, L. Láng, Z. Bedo, and K. Sato. 2004. Genetic Variation in Component Traits of Heading Date in *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* Accessions Characterized in Controlled Environments. *Crop Sci.* 44: 1622-1632.
- J. F. Ma, A. Higashitani, K. Sato and K. Takeda. 2004. Genotypic variation in Fe concentration of barley grain. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 1115-1117.
- Domon, E., Y. Yanagisawa, A. Saito and K. Takeda (2004) Single nucleotide polymorphism genotyping of the barley waxy gene by polymerase chain reaction with confronting two-pair primers. *Plant Breed.* 123: 225-228.
- Zhang, W., T. Kaneko and K. Takeda (2004)  $\beta$ -amylase variation in wild barley accessions. *Breed. Sci.* 5: 41-49.
- Zhang, W., T. Kaneko, M. Ishii and K. Takeda (2004) Differentiation of  $\beta$ -amylase phenotypes in cultivated barley. *Crop Sci.* 44: 1608-1614.
- Saisho, D., K. Tanno, M. Chono, I. Honda, H. Kitano and K. Takeda (2004) Spontaneous brassinolide-insensitive barley mutant 'uzu' adapted to East Asia. *Breed. Sci.* 54: 409-416.
- 且原真木. 植物の根に関する諸問題-水透過性の分子機構：根における水チャネ

ル・アクアポリンの機能- 農業および園芸79:600-605 (2004)

- Y. T. Hanba, M. Shibasaka, Y. Hayashi, T. Hayakawa, K. Kasamo, I. Terashima, M. Katsuhara. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO<sub>2</sub> conductance and CO<sub>2</sub> assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 45: 521-529 (2004)
- 且原真木. 水の吸収と輸送の分子機構：水チャネル研究の新展開 根の研究 13:15-20 (2004)
- T. Liu, S. Nakashima, K. Hirose, M. Shibasaka, M. Katsuhara, B. Ezaki, D. P. Giedroc, K. Kasamo. A novel cyanobacterial SmtB/ArsR family repressor regulates the expression of a CPx-ATPase and a metallothionein in response to both Cu(I)/Ag(I) and Zn(II)/Cd(II). *Journal of Biological Chemistry* 279:17810-17818 (2004)
- Taketa, S., Kikuchi, S., Awayama, T., Yamamoto, S., Ichii, M. and Kawasaki, S. Monophyletic origin of naked barley inferred from molecular analyses of a marker closely linked to the naked caryopsis gene (*nud*). *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1236-1242 (2004).
- Taketa, S., Awayama, T., Ichii, M., Sunakawa, M., Kawahara, T. and Murai, K. Molecular cytogenetic identification of nullisomy-5B induced homoeologous recombination between wheat chromosome 5D and barley chromosome 5H. *Genome* 48: 115-124 (2005).
- Ma, J. F.: Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 11-18 (2004).
- Komatsuda T, Maxim P, Senthil N, Mano Y (2004) High-density AFLP map of non-brittle rachis 1 (*btr1*) and 2 (*btr2*) genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theor Appl Genet* 109: 986-995.
- Turuspekov Y, Mano Y, Honda I, Kawada N, Watanabe Y Komatsuda T (2004) Identification and mapping of cleistogamy genes in barley. *Theor Appl Genet* 109: 480-487.
- Komatsuda T, K. Tanno (2004) Comparative high resolution map of the six-rowed spike locus 1 (*vrs1*) in several populations of barley, *Hordeum vulgare* L. *Hereditas* 141: 68-73
- Matsui K, Kiryu Y, Komatsuda T, Kurauchi N, Ohtani T, Tetsuka T (2004) Identification of AFLP markers linked to non-seed shattering locus (*sht1*) in buckwheat and conversion to STS markers for marker-assisted selection. *Genome* 47: 469-474.
- Sameri M, Komatsuda T (2004) Identification of quantitative trait loci

(QTLs) controlling flowering time in the population generated from a cross between oriental and occidental barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) *Breed Sci* 54:327-332.

- He C, Sayed-Tabatabaei BE, Komatsuda T (2004) AFLP targeting of the 1-cM region conferring the *vrs1* gene for six-rowed spike in barley, *Hordeum vulgare* L. *Genome* 47:1122-1129.
- He C, Komatsuda T (2004) PCR-based screening BAC library and direct end sequencing of BAC clones. *Acta Genetica Sinica* 31:1262-1267.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：17件（CREST研究期間累積件数：62件）