

遺伝子発現と塩基多型に基づくオオムギ系統進化の推定

●佐藤 和広 ◆最相 大輔

岡山大学資源生物科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

本研究はオオムギおよび関連する植物種について、オオムギのゲノム情報を用いて系統進化的な関係を推定し、ゲノムの多様性の把握と効率的なゲノム解析の手法を確立することを目的としている。オオムギのゲノムサイズは5,000Mbと極めて大きいので、cDNA解析はゲノムの情報を得る上で効率的である。本研究では本特定領域のシーケンシングセンターの支援によって大量のオオムギESTを作成し、オオムギ遺伝子のカタログ・データベース化、遺伝子多型の検出および発現遺伝子検出法の確立などによって、オオムギ系統に存在する遺伝変異と分化を解析することとした。また、オオムギcDNA領域の塩基配列に基づいて、オオムギ野生種およびコムギを含むコムギ連(Triticeae)の近縁植物のゲノムに分布する遺伝子の変異を解析しようとした。具体的には塩基多型を用いたオオムギESTの大量マッピングおよび近縁植物へのESTマーカーの利用によって、オオムギと比較的近縁であるコムギおよびその近縁野生種の進化的な関係を推定し、オオムギに関連するこれら遺伝資源のゲノムレベルの進化を推定することとした。また、これらの遺伝変異を効率的に検出する解析システムを開発することを目的とした。さらに、配列の相同性を用いて、オオムギの属するイネ科のモデル植物であるイネとのゲノム比較が可能なデータベースの開発を目指した。

＜研究開始時の研究計画＞

- 1) オオムギ (*Hordeum vulgare*) の多様性をよく表すと考えられる、3種類の系統を選んで5種類のcDNAライブラリーを作製する。
- 2) 作製したcDNAライブラリーのシーケンス解析を国立遺伝学研究所のシーケンシングセンターに依頼する。
- 3) ESTに存在する品種間の塩基変異を確認し、アミノ酸置換による有用性などの解析を進める。
- 4) ESTデータを整理し、webでアクセス可能なデータベースを構築する。
- 5) 国際コンソーシアムで作成を進めているAffimetrix社製GeneChip®のカスタムオリゴ、ロングオリゴによるDNAアレイを共同開発し、使用法を確立する。また、Unigeneから作成したDNAアレイシステムの開発を進めて、各遺伝資源集団に特有の発現遺伝子群の検出や、突然変異系統や同質遺伝子系統を用いた特定の形質発現に関わるクロンの同定によって、オオムギの進化や分化に関わった遺伝子群を推定する。
- 6) 塩基変異を検出するより効率的なマーカー検出システムを開発すると共に、CAPS, SNPタイピングシステムなどによって、ゲノム全体をカバーした塩基変異検出を可能とする。さらに、オオムギの栽培化に関わる代表的な遺伝資源についてSNPを中心としたシーケンス多型を解析して、転写産物を遺伝的にマップする。
- 7) オオムギの近縁植物へのオオムギESTマーカーの利用によって、オオムギと比較的近縁であるコムギおよびその近縁野生種の進化的な関係を推定し、オオムギに関

連するこれら遺伝資源のゲノムレベルの進化を推定する
8) RNA抽出およびmRNAの精製技術を遺伝資源のような大規模な植物サンプルに応用できるように効率化する。はるな二条のBACライブラリーから目的のESTを含むクローンを効率よく同定するシステムを開発する。

＜研究期間の成果＞

- 1) 醸造用オオムギ「はるな二条」(発芽時の芽、幼苗の葉身、止葉期の上位3葉)、「赤神力」(栄養成長期の葉身)および野生オオムギ*H. spontaneum* (H602) (止葉期の上位3葉)のRNAを抽出し、cDNAライブラリーをそれぞれ作成した。
- 2) cDNAライブラリーを国立遺伝学研究所のシーケンシングセンターに送付して、各クロンの3'および5'の両端からランダムシーケンシングした。ESTの総数は約93,000であった。
- 3) Dynaclus v4.0を用いてblastによるクロンのクラスタリングおよびmultiple alignmentを行った。さらに、コンティグ配列に異なる塩基配列が含まれている際にその部位を検出するアプリケーションを作成して、それぞれの遺伝子型で異なる配列が2クロン以上ある場合に塩基置換とした(下図: baakは赤神力由来、rbahはH602由来のEST配列を示す)。

	200	210
Contig1	GCTATAGATAGACGATAATA	
baak11j12	GCTATAGATAGACGATAATA	
baak4c11	GCTATAGATAGACGATAATA	
baak13b13	GCTATAGATAGACGATAATA	
rbah37d08	GCTATAGATAGACGATAATA	
rbah19j02	GCTATAGATAGACGATAATA	
rbah11d14	GCTATAGATAGACGATAATA	
rbah15j05	GCTATAGATAGACGATAATA	

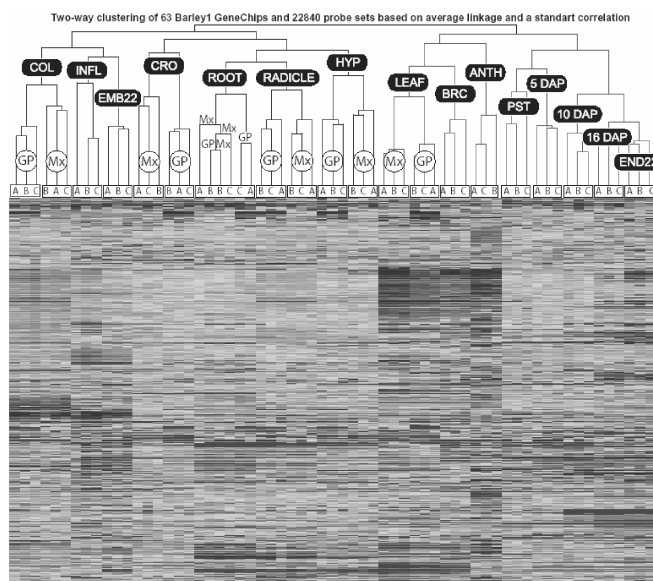
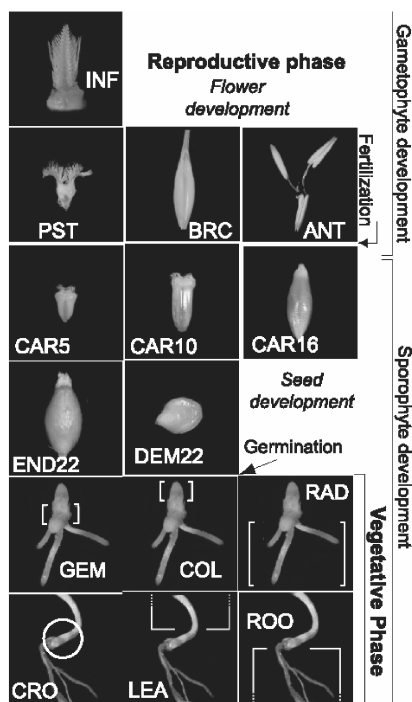
3系統の間に存在するSNPを確認したところ、約1,300のUnigeneに存在する約4,000個のSNPを検出し、少なくとも500Unigeneに存在するSNPがアミノ酸の非同義置換によることを明らかにした。このうち約1,000個については352のUnigene中に存在し、そのうち66Unigeneは明らかにアミノ酸の非同義置換に関わっていた。オオムギのSNPは進化の過程や長年の栽培過程で突然変異によって生じたと考えられ、重要な形質に関わる場合があるので、すべてのSNPの種類、存在するDNA配列およびその用途を含めて特許出願した(登録番号0202051422)。さらに全てのEST約93,000に存在する非同義置換一塩基多型(SNP)を新たに935個検出し、534個のUnigeneに位置づけた。これらのSNPはオオムギの重要形質の突然変異に関わって、品種改良などの産業利用の可能性があるので、DNA配列および用途と共に全て特許出願した(登録番号0210011138)。さらに、国内出願したオオムギESTに存在

するSNPに関する特許5件をまとめてPCT出願し(2002.12.16付け), 2004年6月, 米国, 英国, ドイツ, フランスに各国出願した(登録番号0602101136)。

4) 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ESTデータベースを開発した(<http://harvest.ucr.edu/>) (登録番号0204021321)。本研究で開発したオオムギcDNA情報を網羅したデータベースに, 新たにイネの遺伝地図とのイネ-オオムギ比較ゲノム地図を構築し公開した。(<http://www.shigen.nig.ac.jp/barley/>) (登録番号030221446)。

5) 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社から約23,000遺伝子を検出可能なGencnChipカスタムオリゴアレイを開発し, 同社から発売した。さらに, オオムギの生育の各ステージにおける組織のmRNAサンプル(右図)をオオムギGeneChipによって発現解析し(下図), ベースラインのデータとしてデータベース化する国際共同実験を進めた(Druka et al. in press)。

また, 独自に本領域で開発した約93,000のESTから代表(最長)クローンを選抜してUnigeneを作成した。blast検索に基づいて機能別にcDNAクローンを選抜してスポットし, 予備的なDNAアレイシステムを開発した。



6) 高効率ゲノム走査法(High Efficiency Genome Scanning (HEGS) system)を用いてAFLPを主体とする1,172マーカーからなるオオムギ連鎖地図を約6ヶ月で作製した。また, システムを遺伝解析に利用する際の利点を考察した。(登録番号0309181224)

本研究によって開発されたESTに基づいて高密度転写産物地図を開発した。マップ作製には醸造用オオムギ「はるな二条」と野生オオムギ「H602」の交配から, 花粉培養法によって作出した倍加半数体93系統を用いた。まず, EST配列から設計した10,366組のプライマーに対して両親のゲノムDNAを鋳型にしてPCR反応を行い, PCR産物長多型をスクリーニングした。次に, 両親間の塩基配列の差異を検出するため, PCR産物を鋳型にしてダイレクトシーケンシングした。各配列はクロマトグラムをphredでベースコールした後, quality value 20(精度99%)以上でトリミングして低品質の配列を除去した。CLASTALWでアライメントした両親の配列に基づいてCAPSマーカーおよびSNPsマーカーを開発した。SNPsマーカーの解析にはPerkin Elmer社製のARVOsxマルチラベルカウンタを用いてAcyclo Prime法による半自動解析を行った。SNP検出用のマーカーはダイレクトシーケンシングした両親配列から高精度の配列部分にあるSNPsを同定して自動作製した。連鎖地図の作製にはMAPMAKER/EXPを使用し, LODスコア5.0以上を有意として, 連鎖群を確定した。

10,366組のプライマー対から増幅の得られた約7,700組についてマッピングを試み, PCR産物長多型240, CAPS 934, SNPs 1,717を得た。この値は, 事前の両親DNAのダイレクトシーケンシングによる多型マーカー数の推定値(5,798)と比較して5割程度の値である。アンカーとなるマップ情報既知のSSR(40)およびSTSマーカー(17)と共にこれらのESTマーカーを分析し, 合計2,948遺伝子座からなる連鎖地図を構築した(下図)。

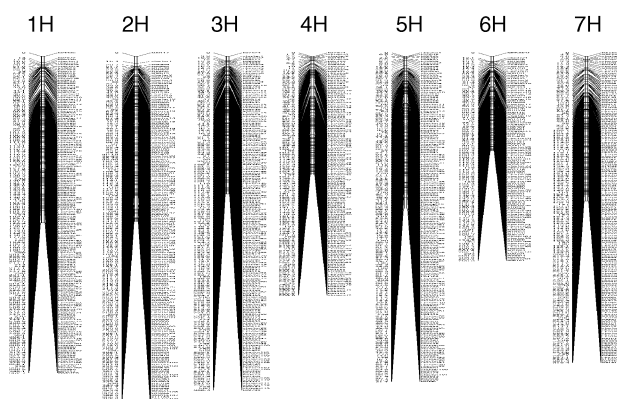


図 岡山大学が保有する3' 端オオムギESTのUnigeneに由来するプライマーを設計し, 約2,900のESTを連鎖地図上にマップした

1Hから7Hの染色体にはそれぞれ, 300以上のマーカーが座乗しており, 各染色体のマーカーのうち, イネゲノム(TIGR rice pseudomolecule release 3.0)とblastnでe-30以下の高い相同性を示すマーカーの割合は27~37%であった。従って, 各染色体とも100マーカー以上のESTについてイネゲノムとの相同性が比較できる。この連鎖地図の平均マーカー密度は0.7 cM/ locus, 全長は2,136cMと既知の報告よりも過大であり, 近接するマーカーの位置

関係に多少誤りのある可能性が示唆される。そのため、イネゲノムとの相同性による補正を含めて、詳細にマーカーの位置関係を再確認している。

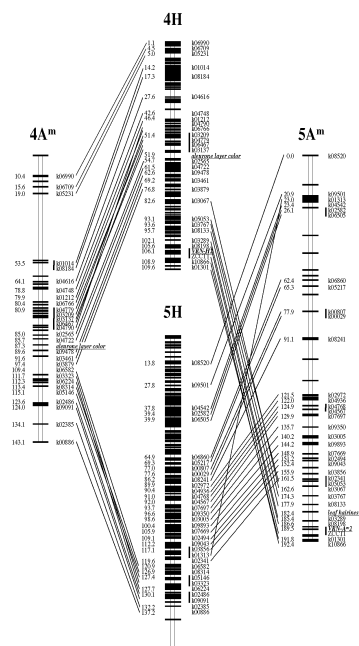
オオムギの遺伝子数はイネと同程度の3~4万個程度と考えられるので、本研究で構築したマップにはオオムギの遺伝子の1割弱がマップされていると考えられる。また、多くのマーカーのSNPs情報が得られているので、本研究で得られたデータを活用してジェノタイピングアレイ等、高能率なマッピングシステムの開発も可能である。

7) 本研究で開発した3' 端オオムギESTのUnigeneに由来するプライマーを設計し、二倍性コムギの分離集団に約250のオオムギESTをマップしたところ、第4、第5同祖群以外についてはゲノムの構造がほぼ一致していることが明らかとなった。

第4、第5同祖群の連鎖地図を下図に示した。オオムギ4H染色体長腕と二倍性コムギ5Am染色体長腕ではESTマーカーの並びに高い相同性が示された。この領域はコムギAmゲノムと栽培オオムギゲノムの間に転座と逆位が報告されている(Dobcovsky et al. 1996)が、本研究で得られたオオムギESTマーカーでみる限り、逆位は認められなかった。

この4HL/5AmL領域には播性遺伝子(sgh1/ZCCT1)の座乗することが知られている(Takahashi and Yasuda 1971; Liuling et al. 2004)。そこでコムギRI集団で低温処理せずに出穂日のQTL解析を行うと共にZCCT1の遺伝子配列に基づいてプライマーを作製しマップしたところ、ZCCT1マーカーの近傍にQTLが位置した。また、オオムギDH集団でも同様に出穂日をQTL解析し、同時にZCCT1をマップしたところ、4H染色体長腕で同位置となった。このように4HL/5AmL末端領域はオオムギESTマーカーならびに播性遺伝子について並びが保存されていることが明らかになった。

オオムギで増幅が認められるが、コムギでは増幅の認められない1,421個のオオムギESTマーカーを用いてコムギにオオムギの染色体を添加した系統とのPCR増幅を確認し、701個のマーカーをそれぞれの染色体に割り振った。このうち75個が1H,127個が2H,119個が3H,94個が4H,108個が5H,81個が6Hそして97個が7Hに座乗した。オオムギBetzesのコムギChineseSpringのテロソミックアディクション系統を用いてこれらのESTの約90%を各腕に割り振った。さらに7Hに関する構造変異を有する19系統を用いてこれらのESTのうち7Hに座乗する90のESTの物理的な位置を決定した(登録番号0602101117)。



栽培オオムギ*Hordeum vulgare*と野生近縁種*H.chilense*はコムギの改良に有用と考えられる特性を有する。本研究では、*in situ*ハイブリダイゼーションおよびオオムギのESTマーカーを用いて*H.vulgare*の染色体と対応する*H.chilense*の染色体の特徴付け、比較をした。*H.vulgare*、*H.chilense*、利用可能なコムギ-*H.chilense*添加系統の有糸分裂期の染色体について4種類の反復配列AG, AAG, 5S rDNA, および45S rDNAを用いてFISH(蛍光*in situ* ハイブリダイゼーション)解析した。AAG配列によるFISHによって*H.chilense*と*H.vulgare*の染色体を区別でき、2つの種間のFISH信号の様式は大きく異なった。45S rDNA信号は両方の種の2組の染色体の上で観察されたが、5S rDNA信号は*H.vulgare*では4組の染色体、*H.chilense*では1組の染色体で観察された。AG反復配列は*H.vulgare*のすべての染色体の動原体部分にFISH信号が認められたものの、*H.chilense*では認められなかった。これらの結果は2つの種の染色体が高度に分化していることを示唆する。2つの種の同祖性を研究するために、*H.vulgare*由来の209のESTマーカーを*H.chilense*の個々の染色体に割り当てた。コムギ*H.chilense*添加系統および置換系統を用いて140のESTマーカーが*H.chilense*のそれぞれの染色体に割り当てられた。10個のESTしか割り当てられなかった染色体2HchS以外では平均26のESTマーカーが各染色体に割り当てられた。*H.chilense*に割り当てられた90パーセントが同祖の*H.vulgare*染色体に位置したので、2つの種の発現配列は高度に保存されているとみられた。これらのESTマーカーはこれらの種からコムギのゲノムに導入された染色質を検出するのに役立つと考えられる(登録番号0602101057)。

オオムギの1,165のESTプライマーセットをコムギおよびコムギ連の幅広い変異を包含する10種に適用した。プライマーの増幅率はオオムギからの系統学的距離と関連が認められた(下図)。それぞれの種とコムギとの間で多型を示す多数のマーカーが得られ、コムギの遺伝的背景に添加された異種染色体の同定に有用であることが期待される。

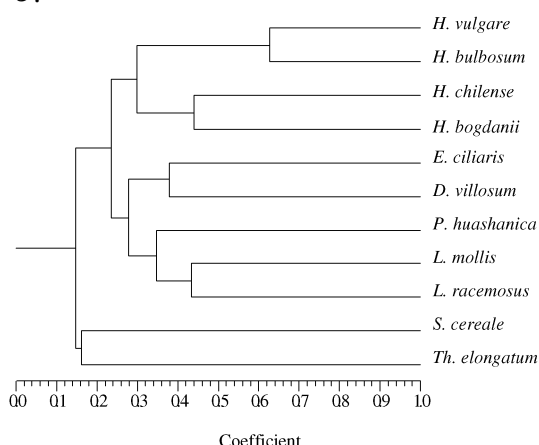


図 オオムギESTマーカーによる増幅程度に基づく近縁種の類似度

さらに、コムギ連野生植物、ハマニクおよびオオハマニクの染色体添加コムギ系統を育成した。添加染色体の識別と同祖群を決定するために、オオムギのESTマーカーから、これらの異種染色体に特異的なマーカーを選抜し、それぞれ94および100の特異的なマーカーを得た(登録番号0602101048)。

8) オオムギ葉身からRNAを自動抽出する手法を開発した。国産醸造オオムギはるな二条のBACライブラリー

(平均インサート長115kb, 6x, 30万クローン) について、PCRプールと高密度フィルターを用いたESTスクリーニングシステムを導入した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

1) 1999年末までにNCBIのESTデータベース上にオオムギのシーケンスはわずか80件しかなく、EST情報は極めて乏しかった。しかし、2000年から複数のオオムギESTプロジェクトが精力的に解析を進めた結果、2002年10月までには約35万のESTが登録された。このうち約4分の1は本プロジェクトの貢献であり、数量的にはドイツに次いで2番目に多かった。また、質の面でも、病害抵抗性や優性遺伝子の多い野生オオムギが含まれていること、3' および5' 端の両方が含まれていること、さらにトリミングの精度が高く、SNPの検出などの面からもすぐれていることなどから、国際的にも高く評価された。

2) また、国際的なESTコンソーシアムによって、Affymetrix型カスタムオリゴアレイGeneChipを開発することが2002年1月の国際学会で合意された。この基礎となったのが、コンソーシアムのESTを同一基準でトリミングし直したデータベースHarvESTである。GeneChipは3' 端から600-1000bpの配列を利用するので、3' 端の配列が必須である。本プロジェクトの3' 配列はコンソーシアム中最多であり、GeneChipシステムの作製には特に大きな貢献をした。

3) オオムギのGeneChipシステムは植物で2番目のシステムであり、国際オオムギESTコンソーシアムがアラビドプシスに次いで、イネ科植物ではじめてのシステムを開発したこと、さらに、コンソーシアムで発現データベースを共同作成していることは、植物系ゲノム研究の中ではモデル的な成果となった。

4) 本研究で出願したオオムギの大量SNP特許は、遺伝子特許の大量申請の流れに沿って行われたものであるが、出願内容は国際的にみても大規模であった。

5) はるな二条のBACライブラリーは公開されているライブラリーとしてはオオムギで2つ目であり、スクリーニングシステムが確立したことで、我が国独自のESTとゲノムライブラリーによる遺伝子単離システムが可能となった。

6) 開発中のESTマップはオオムギで最も完成度の高い遺伝地図として国際的にも評価されており、今後のオオムギのゲノム解析に大きく貢献することが期待されている。

7) 多様性を主眼においた植物系のゲノム解析は少ない。多くの先進国で未だ作物へのGMOの導入が否定的なので、種内や近縁植物における病害・ストレス抵抗性などのゲノム情報を利用した効率的な導入が注目されている。その際にオオムギESTを利用したマーカーシステムが効率的に利用されることが考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1) SNPの特許申請はデータ量が膨大であり、データ整理に手間取って外部公開に時間がかかった。

2) 独自開発のマイクロアレイシステムは、システムの制御が難しく、アレイの作成が遅れた。遺伝子の塩基レベルの変異を効率的に検出できるシステムが開発できなかったため、系統間差異の解析が予定通り進まなかった。また、ロングオリゴアレイについてはGeneChipシステムが開発されたこともあって、開発しなかった。

〈今後の課題〉

オオムギの遺伝解析では農業的に重要な遺伝子の単離と選抜技術の開発が重要な研究テーマとなっている。オオムギのBACライブラリーは米国および我が国においてそれぞれ一つずつ開発・公開されている。米国ではこれらのBACクロンのコンティグ作製とESTからのオリゴプローブの合成によって、オオムギゲノムの遺伝子領域の推定が進められている。また、我が国では文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトおよび農林水産省多様性ゲノム解析でオオムギの完全長cDNA解析が大規模に行われており、これらの遺伝子領域の解析を中心にして、今後部分的なゲノムの配列解析が進むものと考えられる。米国およびドイツではBACのフィンガープリンティングが進められており、2-3年の後にはゲノム配列の解析が開始されることが考えられる。その際に用いられるBACライブラリーは我が国以外では米国品種Morexが用いられる予定であり、我が国で開発したはるな二条のライブラリーの解析は単独で行う必要がある。

オオムギの形質転換は未だに容易でなく、遺伝子ノックアウトや単離した遺伝子の導入などに支障をきたしている。また、形質転換が可能な系統も限定されているが、欧米の研究室によっては優れた系をすでに導入しているところもあり、オオムギの遺伝子解析のためには是非とも確立すべき技術である。

本研究で開発された遺伝地図は現在世界で最も高密度であり、オオムギゲノムに存在する遺伝子の1割弱がゲノム上に同定されているとみられる。オオムギとイネは共通祖先を持つとされているので、この遺伝地図を用いてイネのゲノム配列からオオムギのゲノムの相同領域を推定したり、マーカーを作製したりすることが可能である。また、本研究で示されたように、オオムギはコムギおよびライムギなどとゲノムの共通性が高いのでムギ類におけるゲノム解析のモデルとなっている。この共通性を利用して複雑なゲノム構造を有する異質六倍体のパンコムギの解析にオオムギを利用することは有効である。さらに、オオムギのESTマーカーは高度のストレス耐性を有する近縁の野生植物にも利用可能なので、今後これらの有用遺伝子の栽培植物への導入にも威力を発揮する。このように、相同性の高いゲノムの情報を活用しながら、特異的なゲノム構造と遺伝子の解析を効率的に進めることが、オオムギのゲノム解析の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1.0309181224

Hori, K., Kobayashi, T., Shimizu, A., Sato, K., Takeda K., and Kawasaki, S. Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. Theor. Appl. Genet. 107: 806-813 (2003).

2.0602101048

Hagras, A.A., M. Kishii, K. Sato, H. Tanaka and H. Tsujimoto. Extended application of barley EST markers for the genomic analysis of wheat and barley-related species. Breed. Sci. 55:335-342.(2005)

3.0602101057

Hagras, A. A., M. Kishii, H. Tanaka, K. Sato and H. Tsujimoto. 2005. Genomic differentiation of *Hordeum chilense* from *H. vulgare* as revealed by repetitive and EST sequences. Genes and Genetic Systems 80: 147-159. (2005)

4.0602101117

Nasuda, S., Kikkawa, Y., Ashida, T., Rafiqul Islam, A. K. M., Sato, K., and Endo, T.R. 2005. Chromosomal allocation and deletion mapping of barley ESTs. *Genes and Genetic Systems* 80: 357-366.

5.(in press)

Druka, A., G. Muehlbauer, I. Druka, R. Caldo, U. Baumann, N. Rostoks, A. Schreiber, R. Wise, T. Close, A. Kleinhofs, A. Graner, A. Schulman, P. Langridge, K. Sato, P. Hayes, J. McNicol, D. Marshal and R. Waugh. An atlas of gene expression from seed to seed through barley development. *Functional & Integrative Genomics* (2006)

2) データベース／ソフトウェア

1.0204021321 佐藤和広: オオムギ国際ESTデータベースHarvEST. <http://harvest.ucr.edu/>

2.0302211446 佐藤和広:Barley EST database.
<http://www.shigen.nig.ac.jp/barley/>

3) 特許など

1.0202051422 (全4件)

佐藤和広・武田和義・小原雄治. 2001.植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法. 特許出願番号 (特願2001-387059)

佐藤和広・武田和義・小原雄治. 2001.植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法. 特許出願番号 (特願2001-387131)

佐藤和広・武田和義・小原雄治. 2001.植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法. 特許出願番号 (特願2001-403299)

佐藤和広・武田和義・小原雄治. 2001.植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法. 特許出願番号 (特願2001-403300)

2.0210011138

佐藤和広・武田和義・小原雄治. 2002. 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列, 及びそれを利用する方法. 特許出願番号 (特願2002-327515)

3.0602101136

佐藤和広・武田和義・小原雄治. 2004. 遺伝子に生じた一塩基多型(SNP), およびその利用. (PCT出願2002年, 各国出願2004年) 出願番号 (PCT/IB02/05403)

4) その他顕著なもの、

1.毎日新聞 全国版 オオムギ3品種間に遺伝子の違い 1,000カ所.2002年1月30日

2.日経産業新聞 全国版 一塩基多型オオムギで1,000種発見.2002年1月30日

3.日本工業新聞 全国版 オオムギのSNPを大量発見.2002年1月30日

4.日本農業新聞 全国版 大麦遺伝子塩基の違い発見.2002年1月30日

5.日刊工業新聞 全国版 オオムギのスニップ野生種などで約1千個2002年1月30日

6.化学工業日報 全国版 オオムギ遺伝子のSNPを大量検出.2002年1月30日

7.日経バイオビジネス 2002年4月号pp.78-79 岡山大学がオオムギSNP解析を加速 保存1万品種に分子育種の光

8.生物系特定産業技術研究推進機構 ブレインテクノロジー第92号pp.10-12オオムギ遺伝子に存在する一塩基多型を約4,000個発見.2002年6月15日