

オオムギ染色体DNAライブラリーの構築とゲノム解析への利用

●村田稔 ◆坂本亘 ◆小倉豊

岡山大学資源生物科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

本研究では、マイクロダイセクション法により、オオムギの特定染色体、腕、部位を切り取り、その領域特異的なDNAライブラリーを構築し、ゲノム解析に利用する。具体的には、PCRで増幅した染色体DNAをプローブとして、その領域に座乗する遺伝子（cDNA）やBACクローンを特定し、詳細な分子遺伝地図を作製することを目的とする。ゲノムサイズの大きなオオムギのような植物では、シロイヌナズナ等で行われている網羅的なゲノム解析法だけでは、対処できない。それ故、特定の染色体、腕、部位に絞ったボトムアップ式のアプローチが必要だと考えられる。従来植物では、マイクロダイセクションによるDNAクローニングは、反復配列などに限られていた。しかし、我々が開発した方法では、低コピー配列もクローニング可能で、短時間に染色体の一部を切り取り回収できる利点を有している。さらにオオムギについては、三染色体などの異数体、転座系統や欠失系統（染色体の特定部位を欠失）が育成されており、これらを用いることにより、染色体の特定領域を正確にマイクロダイセクション法により切り出し、DNAを増幅できる。また、オオムギでは、遺伝地図上の特定領域に遺伝子が集中していることが報告されているが、本研究から実際の染色体上のどの領域が遺伝子リッチなのかも明らかとなり、将来、作物の改良や食糧増産に大きく貢献することになると考えられる。

＜研究開始時の研究計画＞

本研究は、染色体操作、DNA操作及び情報解析からなり、本度中にオオムギ染色体すべての腕のマイクロダイセクション、DNA増幅とクローニングを行い、染色体腕別のDNAライブラリーを確立する。過剰染色体の片腕を欠いている系統から、特定染色体の腕だけをマイクロダイセクション装置（PALM）で切り取り、DOP-PCRでDNAを増幅する。腕をさらに細分し、その部位だけのダイセクションも検討する。増幅DNAは、染色体特異性をFISH（蛍光 in situハイブリダイゼーション）、サザン法で検定後、クローン化し、シーケンシングを行う。また、増幅したDNAをプローブとして、cDNAライブラリーをスクリーニングし、腕特異的なcDNAクローンを選抜する。このために、ダイレクトセクション法も検討する。

＜研究期間の成果＞

マイクロダイセクションにより切り取った単一の染色体から、そのDNAを増幅することに成功している。しかし、オオムギではその形態から染色体を同定することが困難なため、マイクロサテライトマーカーなどによる判別を試みている。増幅したDNAの特異性を検定するために、FISH（蛍光 in situハイブリダイゼーション）を行ったが、散在型反復配列が含まれているため、染色体の同定は困難であった。現在、原因となる反復配列の特定と、これら反復配列を増幅したDNAから除去する試みを行っている。

コムギなどを用いたこれまでの解析から、増幅したDNA断片には、ESTや既知遺伝子のコーディング領域とホモロジーを示す配列がかなりの割合（～40%）で含まれていることがわかった。そこで、これら遺伝子に相当するcDNAの直接選抜を試みた。プローブには、マイクロダイセクトした染色体からDOP-PCRで増幅したDNAを用い、これをビオチン化した。cDNAは、幼穂からポリA+mRNAを抽出した後、SMART（クローンテック）により合成した。cDNAには、マイクロサテライトを含むものがあるため、ゲノミックDNAから調整したCot1 DNAをプレハイブリダイゼーションの段階で加えた。2回の直接選抜を行い、PCRを行ったところ、スミアの中に数本のバンドが観察された。

＜国内外での成果の位置づけ＞

オオムギに特定した場合、ジョンインネスセンター（英国）、カンサス州立大学、カリフォルニア大学デイビス校（米国）、CSIRO（オーストラリア）をはじめ世界各国で、RFLP、RAPD、AFLPなどのDNAマーカーのマッピングが進められている。国内では、当研究所で、大量EST解析が開始されている。しかし、特定の染色体または腕特異的なDNAライブラリーの構築は進んでいない。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

増幅したDNAの中に散在型反復配列が含まれているため、染色体の同定は困難であった。原因となる反復配列の特定と、これら反復配列を増幅したDNAから除去する必要がある。

＜今後の課題＞

巨大なゲノムを有する生物種から、効率的に、目的とする遺伝子を単離、同定する手段として、マイクロダイセクション法は有用である。しかし、PCR等でDNAを増幅する必要があり、その際、いかにして非特異的な増幅を防ぐかが問題となる。DOP-PCR法に変わる増幅法の検討が必要であろう。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

- 4) その他
1. Murata, M., Sakamoto, W. Construction of chromosome-specific DNA libraries by laser-microdissection. Plant and Animal Genome IX, San Diego, Jan.13-17, 2001, p.94.
2. Murata, M. Construction of chromosome-specific DNA libraries by laser-microdissection. Wheat Inf. Serv. 92:32, 2001.
3. Ohdan, T., Murata, M. Cloning of DNA fragments from wheat chromosomes by microdissection. Genes Genet. Syst. 76:449, 2001.
3. 村田稔. 染色体ダイセクション法マニピュレータ、「クロモソーム-植物染色体の技術」、谷口研一、福井希一編、養賢堂（印刷中）。