

平成21年3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780005
 研究課題名 (和文)
 トウモロコシのトランスポゾンを利用したオオムギミュータントパネルの構築
 研究課題名 (英文)
 Development of Ds insertion barley lines via Agrobacterium-mediated transformation
 研究代表者
 最相 大輔 (SAISHO DAISUKE)
 岡山大学・資源生物科学研究所・助教
 研究者番号：90325126

研究成果の概要：

生物の設計図といわれるゲノムの全塩基配列が次々と明らかになるにつれて、生物が持つ機能や応用に向けた研究は大きく様変わりし、その情報を利用して研究を進める上で必須の研究手法やリソースの整備が求められている。本研究では、世界的に主要な農作物であるオオムギを材料に、ゲノム科学的な研究を進める上で必須と考えられる形質転換法の確立と、それを利用した突然変異体パネルの構築に向けた基礎的な研究を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	240,000	3,840,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：オオムギ・形質転換・トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

オオムギは、それ自身が世界的に生産高で4番目に位置する重要な穀物であり、歴史的にも遺伝学の研究材料として広く用いられてきた。加えて、細胞遺伝学的・ゲノム科学的研究から、オオムギとコムギとは同祖のゲノムを有し、且つイネ科のモデルであるイネとも高度にゲノム構造の相同性が保存されている

ことが明らかとなっている。従って、イネで得られた遺伝学的・育種学的に重要な知見をオオムギの遺伝研究に反映させることは、オオムギ育種可能性を大きく広げるだけでなく、パンコムギを始めとした広くムギ類作物の育種にとっても重要な意味を持つ。

岡山大学は、アジアにおけるオオムギ研究の拠点として長い研究の歴史を誇る。近年は

ゲノム研究の基盤整備を積極的に進めており、これまで、

- (1) 約1万点のオオムギ系統を所有し、
 - (2) 約14万のオオムギESTから約1万の unigenes を取得、
 - (3) 約3,000のESTをオオムギ染色体に位置付け連鎖地図を構築(Sato et al. 2004).
 - (4) 6.8ゲノム分に相当する294,912 (384マイクロタイタープレート768枚分)クローンからなるBACライブラリーを作製した(Saisho et al. 2003).
 - (5) 国際的な協力の下、Affimetrix社製の 22k Barley Gene Chip を作製(Close et al. 2004).
- を整備、開発してきた。

2. 研究の目的

ゲノム研究を推進する上では、以下の6つの条件が必要と考えられている。

- (1) 全ゲノムの解読、
- (2) 形質転換系の確立、
- (3) タグライン集団の存在、
- (4) 突然変異コレクション、
- (5) 実験材料や手法の情報ネットワーク、
- (6) マイクロアレイ等の大規模遺伝子発現解析。

イネの10倍以上に当たる約5,000 Mbのゲノムサイズのため、オオムギの全ゲノム解読の実現可能性は低いにせよ、それ以外の条件については近年研究基盤の充実が図られており、オオムギはムギ類作物のモデルとしてだけでなく準モデル植物としても研究の進展が期待できる。しかしながら、イネやトウモロコシのような転移活性を持つ内在因子が報告されていないオオムギでは、効率の良い形質転換系の開発の遅れもあって、大規模なタグライン集団の作製が不十分といえる。近年の分子遺伝学的研究においてタギング系統を用いた

逆遺伝学的手法の重要性は非常に高く、オオムギのタグライン集団の育成は急務の課題といえる。

本研究では、形質転換型の確率とそれを利用してトウモロコシのトランスポゾンAc / Dsを用いたオオムギミュータントパネルの構築に向けて、必要な基礎的な研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では、アグロバクテリウムを介したオオムギ形質転換系の確率と、それを利用したDs挿入系統及びAcTPase系統の作出に取り組む。即ちDs末端逆位反復配列内に選抜マーカー(*bar*)遺伝子を導入したプラスミドを、胚培養を介したオオムギ形質転換で安定した形質転換効率が報告されているバイナリーベクターpWBVec8 (Wang et al. 1998)を用いて作製し、オオムギ品種‘Golden Promise’の未熟胚にアグロバクテリウムを用いて導入する。得られる耐性カルスから再分化してくる個体(T_0 世代)の取得を目指す。再分化個体(T_0 世代)については、pWBVec8が持つ*HPT*遺伝子(ハイグロマイシン耐性)による培地上での選抜に加えて、PCR法及びサザンブロット法により導入遺伝子の有無およびコピー数を確認し、Dsの導入が確認できた個体のみ自殖種子を得る(T_1 世代)。ハイグロマイシン耐性カルスおよび再分化個体が効率的に得られない場合に備えて、pIG121Hm (Hiei et al., 1994)等の別のバイナリーベクター上での導入断片の構築・導入や、アグロバクテリアの菌株による形質転換効率の検討も並行して進める。

4. 研究成果

Ds末端逆位反復配列内に選抜マーカー(*bar*)遺伝子を導入したコンストラクトを、胚培養を介したオオムギ形質転換で、安定した形質転換効率が報告されているバイナリーベクターpWBVec8 (Wang et al. 1998)を用いて

作製した。このコンストラクトをアグロバクテリウムに導入した後、醸造用オオムギ品種‘Golden Promise’の未熟胚にアグロバクテリウムを用いて感染させ、マーカー抗生物質耐性カルスの形成および植物体の再生を試みた。

培地中のアミノ酸組成の変更や、窒素供与体の変更、減圧浸透法によるアグロバクテリウムの感染等、種々の条件を変更しながら感染条件を検討し、3年の研究期間中に、10,000を超える未熟胚にアグロバクテリウムを感染させた。その結果、ほぼ全ての実験ロットにおいて選抜マーカーであるハイグロマイシン耐性を示すカルスを得た。しかしながら、何れのカルスからも再分化植物体を得ることはできなかった。アグロバクテリウムを介したオオムギ形質転換は欧米を中心に組み立てられており、数報の論文報告はあるものの、それらの結果は再現するのは困難であるとの情報もあり（私信）、カルス形成能や再分化能力に関する遺伝解析も含めて、今後更に広範な基礎的な研究を行い、検討を重ねる必要がある。

上記のコンストラクトをパーティクル・ガン法により、同じく‘Golden Promise’の未熟胚への導入を試みた。約500の未熟胚に対してパーティクル・ガンによる遺伝子導入を行った。その結果、現在までに5個体の再生植物を得た。これまでにPCR法による選抜マーカー遺伝子の導入を確認しており、現在ゲノミック・サザンブロット法による導入遺伝子の有無やコピー数の確認に取り組むと共に、次世代の自殖種子を得ているところである。今後Ds挿入断片の特徴付けを実施したうえで、AcTPase導入系統との交雑によってその転移性の有無などを確認し、導入系統の固定を図り変異体パネルの作成に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Rikiishi, K., D. Saisho, K. Takeda: Uzu, a barley semi-dwarf gene, suppresses plant regeneration in calli derived from immature embryos. (査読有り) *Breed. Sci.* 58: 149-155, 2008

②D. Saisho and M. D. Purugganan: Molecular phylogeography of domesticated barley traces expansion of agriculture in the Old World. (査読有り) *GENETICS* 177: 1765-1776, 2007

③浅野賢治・最相大輔・芦荻基行・松岡信草型変異から見たイネとオオムギの栽培化. (査読無し) *蛋白質 核酸 酵素* Vol. 52: 1931-1936, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

最相 大輔 (SAISYO DAISUKE)

岡山大学・資源生物科学研究所・助教

研究者番号：90325126

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し