

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18634

研究課題名(和文) オオムギの形質転換効率に関わる遺伝子座の特定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of loci involved in transformation amenability in barley

研究代表者

久野 裕 (Hisano, Hiroshi)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：70415454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子型の制限無く形質転換を可能にするため、オオムギの形質転換効率に関わる遺伝子座TFA(Transformation amenability)の原因遺伝子の絞り込みを試みた。初めに、SNPsアレイ解析やExome解析を行い、TFAを選抜するためのマーカーを作成した。それらのマーカーを利用して、オオムギ品種「Haruna Nijo」と「Golden Promise」(GP)の交雑由来するTFAの準同質遺伝子系統を作成した。続いて、オオムギ品種「Full Pint」とGPの交雑由来倍加半数体系統を用いて形質転換実験を行い、TFAが形質転換に必要であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、オオムギの形質転換効率に関わる遺伝子座TFAの機能の確認、領域の絞り込みおよび領域内に存在する発現遺伝子の確認をすることができた。今後、TFAの原因遺伝子を単離して、それらを制御することにより、多くのオオムギ品種で形質転換が可能となる。このことにより、効率よくオオムギの有用遺伝子の機能解析が可能となり、植物育種への利用も期待できる。本成果は、ゲノム編集等のオオムギ遺伝子改変技術への応用のみならず、他の近縁作物へ適用可能と考えられ、植物科学全体の発展に貢献するであろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to narrow down the regions of TFA (Transformation amenability) loci involved in transformation efficiency in barley in order to enable genetic transformation without limitation of their genotypes. First, SNPs array analysis and exome-sequence analysis were performed to develop the selection markers for TFAs. These markers were used to generate the near-isogenic lines of TFAs derived from a cross between barley cultivar "Haruna Nijo" and "Golden Promise" (GP). Subsequently, the transformation experiment was carried out using the doubled-haploid lines derived from a cross between barley cultivar "Full Pint" and GP to clarify that TFAs were necessary for barley transformation.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：オオムギ 形質転換 再分化 カルス化

1. 研究開始当初の背景

アグロバクテリウム法による植物の形質転換成否は、植物側の遺伝子型に大きく依存している。その要素は、選抜時のカルス増殖能、カルスの再分化能、アグロバクテリウムとの相互作用(感染時の植物細胞の応答や T-DNA のホストゲノムへの挿入効率)などに大別できる。これらを併せ持つ品種・系統は、容易に形質転換が可能となる(Cheng et al. 2004)。

オオムギ(*Hordeum vulgare*)の場合、「Golden Promise」(GP)が形質転換可能な代表的品種のひとつである。しかしながら、その他の多くの品種では形質転換が困難であり(Harwood 2012)、この制約が他の品種・系統に特異的な形質遺伝子の効率的な解析を妨げている。研究代表者は、GP以外のオオムギ品種・系統における形質転換能の改善を目的として、GP が持つ形質転換に必要なゲノム領域の特定を進めている。先行実験として、形質転換が困難な品種「Haruna Nijo」(以下 HN)と GP との交配で得られた F₂ 世代の未熟胚を用いて形質転換し、成功した個体のみをジェノタイプピングする手法で、オオムギの形質転換に必要な領域を探索した。申請時点までに、合計 60 個体の形質転換体が得られ、マーカー解析によって 2H 染色体ならびに 3H 染色体において遺伝子型の顕著な分離の歪みが 3 カ所認められ *Transformation amenability 1*、2 および 3(以下 *TFA1*、2、および 3)と名付けた。これらは形質転換に必要なあるいは有利なゲノム領域であると考えられるが、申請時点では各 *TFA* の機能は明らかではなかった。

オオムギ以外の植物では、*Brassica oleracea* とイネ(*Oryza sativa*)を用いてそれぞれ形質転換に係わる形質の遺伝解析が行われている。*Brassica oleracea* では、倍加半数体を用いた QTL 解析によって、形質転換効率に関する 3 つの遺伝子座が同定された(Cogan et al. 2002, 2004)。イネにおいては、Nishimura et al. (2005)によってカルスの再分化に寄与する *ferredoxin-nitrate reductase (NiR)* 遺伝子が単離された。その *NiR* 遺伝子の過剰発現によって、再分化が困難な品種においても形質転換体を得られている(Nishimura et al. 2005, Ozawa and Kawahigashi 2005)。ちなみに、オオムギの *NiR* 遺伝子は 6H 染色体に座乗している。

2. 研究の目的

上記のように、作物の形質転換効率は遺伝子型によって制限されており、必ずしも目的の品種や系統で形質転換体を得られるわけではない。形質転換効率を支配する遺伝子を単離し制御することができれば、作物の遺伝子型の制限無く形質転換が可能となると考えられる。本研究では、*TFA* の機能解明および *TFA* 内の発現遺伝子の同定を目的として、各 *TFA* 領域における選抜マーカーの開発、*TFA* に関する準同質遺伝子系統の育成、*TFA* 領域の絞り込み、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *TFA* 選抜マーカーの作成

HN、GP ならびに上記形質転換体(60 個体)の各 DNA を供試した。SNPs マーカー開発には、10K Infinium HD (Illumina 社)を用いた。これらのマーカーを用いて連鎖地図を構築し、*TFA* をマップした。一方、InDel マーカーの開発のため、HN、GP ならびにマッピング集団を用いて、Exome-sequence 解析を行った。Exome-sequence 解析は、先進ゲノム支援のサポートにより行った。

(2) 準同質遺伝子系統の作成

HNとGPのF₁世代を起点として、HNまたはGPを戻し交雑親とした各BC₁F₁世代を作成した。InDelおよびCAPSマーカーによって*TFA*周辺の遺伝子型を判定し、ヘテロな個体を選抜した。それらを更に戻し交雑し、BC₂F₁世代を作成した。再び*TFA*マーカーで選抜し、自殖によりBC₂F₂世代を得た。選抜した個体については、イllumina社 Infinium HD による 9k-SNPs 解析を行った。

(3) *TFA* の機能確認と領域の絞り込み

形質転換が困難な米国品種「Full Pint」(FP)とGPとの交雑に由来するDH集団202系統の中から、3つの*TFA*全てがGP型アリルである2系統(DH1およびDH2)ならびに*TFA2*と*TFA3*にFP型アリルが含まれる1系統(DH3)を選び、アグロバクテリウム法による形質転換実験を行った。ベクターとして緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子を持つpBUH3-EGFPを用いた。

(4) *BBM* および *WUS2* 遺伝子の単離と過剰発現

研究期間内に、*Baby boom (BBM)*ならびに *Wuschel2 (WUS2)* 遺伝子を導入することにより、イネ、トウモロコシ、ソルガムおよびサトウキビの複数系統で形質転換体を得られることが報告された(Lowe et al., 2016)。*BBM* および *WUS2* 遺伝子は、再分化に関わる転写因子をコードすることが知られている(Boutillier et al. 2002, Zuo et al. 2002)。そこで、本研究では、*TFA* と両遺伝子の関連を調査するために、それらを過剰発現する形質転換オオムギカルスを作成し、発現変動する遺伝子群の検出を試みた。

オオムギから *BBM* ならびに *WUS2* 遺伝子のホモログを単離し、これらを過剰発現する 4 つのコンストラクト(Ubi:*BBM*、Ubi:*BBM*+Ubi:EGFP、Ubi:*WUS2* および Nos:*WUS2*+Ubi:EGFP)を作成した。それらをオオムギへ導入し、各遺伝子の過剰発現カルスを作成した。その形質転換カルスから RNA を抽出し、マイクロアレイ(Agilent barley 44K array)解析および RNA-seq 解析を行った。コントロールとして、EGFP を導入した形質転換カルス(Ubi:EGFP)を用いた。RNA-seq 解析は、先進ゲノム支援のサポートにより行った。

4. 研究成果

(1) TFA 選抜マーカーの作成

Infinium HD 解析の結果、HN と GP 間で 1,131 の SNPs が検出された。この SNPs マーカーによるマッピング集団の各個体の多型情報を用いて連鎖地図を構築した。さらに、各 SNPs マーカーの分離について χ^2 検定を行い、TFA の位置を確認した(図 1)。次に、TFA 領域の両端と内部において、SNP 周辺の配列情報を基に InDel マーカーおよび CAPS マーカーを作成した。

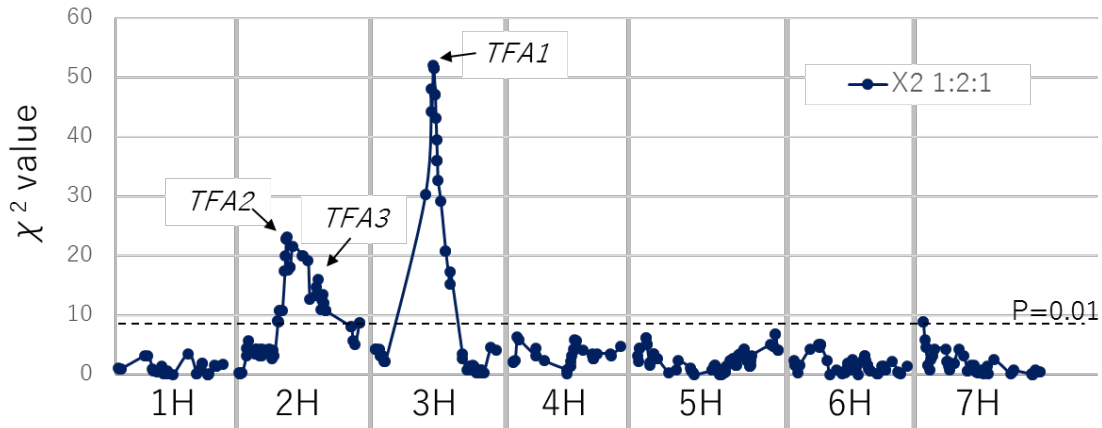


図1 形質転換オムギにおけるSNPsマーカーの分離解析 (Hisano et al. 2017より一部改変)
HNxGPのF2を用いた形質転換実験により選抜された形質転換体60個体をSNPsマーカー解析に用いた。各SNPsマーカーにおける分離比(1:2:1)についてのChi-square (χ^2) 値を縦軸に示す。横軸はマーカーポジションを示しており、左側から染色体短腕-長腕の順に並んでいる。破線は、P値(1%水準、df=2)を示し、破線より高い値は分離の歪みを示している。

(2) 準同質遺伝子系統の作成

BC₁F₁ の 48 個体(図 2A)および 200 個体(図 2B)の中から、TFAI-3 がヘテロの 9 個体(図 2C)および 12 個体(図 2D)をそれぞれ選抜した。BC₂F₁ 世代の 44 個体(図 2E)および 240 個体(図 2F)の中から、TFAI-3 がヘテロのものをそれぞれ 8 個体(図 2G)および 32 個体(図 2H)選抜した。TFA 以外の領域がおおよそ置換された個体を選抜し、BC₂F₂ 世代をそれぞれ 79 個体(図 2I)および 96 個体(図 2J)展開した。図 2I の中から TFAI-3 が全て GP に置換している 4 個体を抽出して形質転換実験を行った結果、形質転換体を得ることが出来た。このことから、TFA は形質転換に必要な遺伝子座であることが証明された。一方、図 2J からは 62 個体を選抜し、9k-SNPs 解析を行った結果、TFAI-3 の遺伝子型がそれぞれ分離した個体を得ることが出来た(図 3)。今後は、これらを用いて TFA の遺伝子同定と詳細な機能解析を行う予定である。

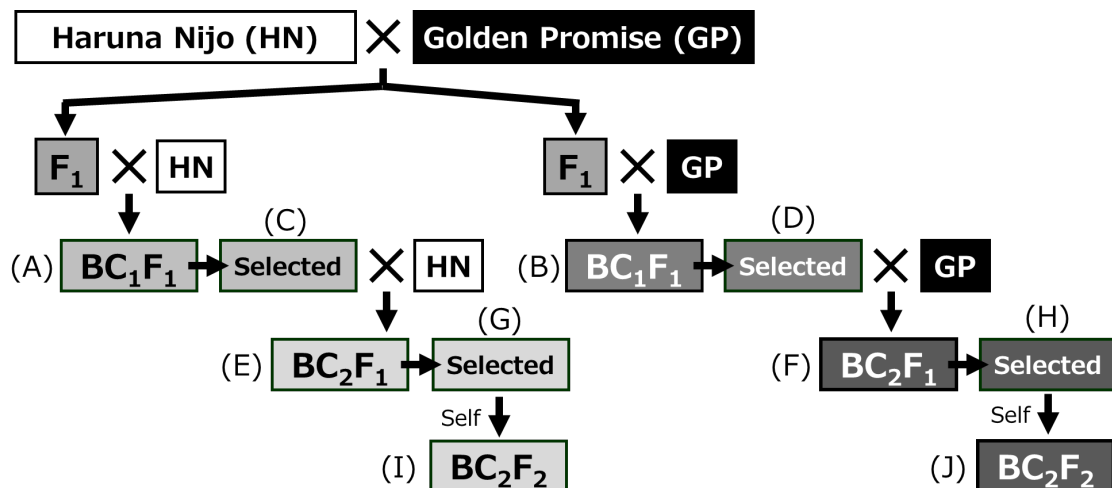


図2 TFA領域に関する準同質遺伝子系統作成の概要

(C), (D), (G) および(H) は、TFA領域周辺のInDel またはCAPS マーカーによりそれぞれ(A), (B), (E) および(F)から選抜された。

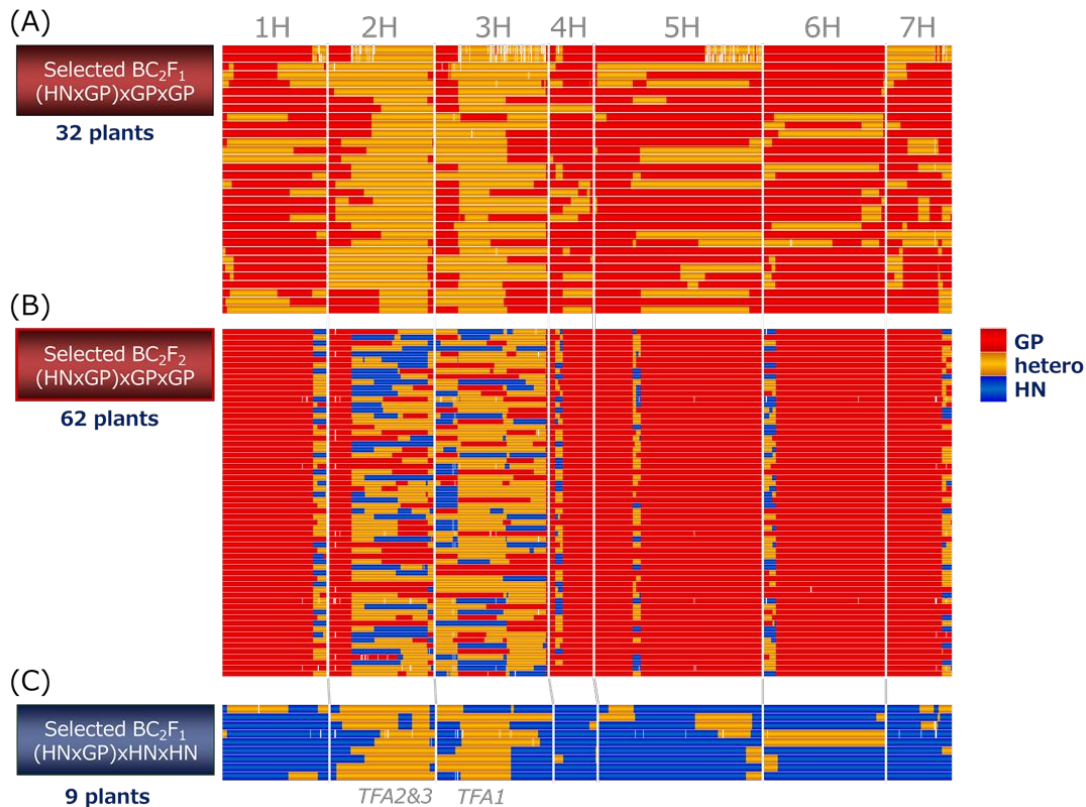


図3 選抜した後代個体のグラフィカルジェノタイプ
 (A)は図2H、(B)は図2J、(C)は図2Gにそれぞれ相当する。
 マーカーは、左側から染色体短腕-長腕の順に並んでいる。

(3) *TFA* の機能確認と領域の絞り込み

FP と GP の交雑に由来する倍加半数体を用いたアグロバクテリウム感染実験の結果、DH1 と DH2 においてハイグロマイシン耐性カルスならびに再生シュートが得られ、形質転換植物を得ることができた(表 1)。一方、DH3 からは、耐性カルスが 1 つ得られたが、形質転換個体は得られなかった。

本研究では、選んだ 3 系統のうち、3 つの *TFA*s が GP 型アリルである 2 系統で形質転換が成功したことから、それらの導入によって任意の遺伝子型に形質転換能を付与できる可能性が示された。すなわち、GP との交雑と *TFA* ベースの選抜は、形質転換可能なオオムギ系統の作成法として有効であると考えられる。一方で、DH3 における *TFA2* と *TFA3* の FP 型アリル領域には、形質転換に重要な遺伝子が存在することが示唆された。

表1 GP、FPおよびFPxGPの倍加半数体を用いた形質転換実験の概要(Hisano et al. 2017より改変)

系統名	アグロバクテリウム感染に用いた未熟胚の数	アグロバクテリウム感染後に生存した未熟胚の数	ハイグロマイシン耐性カルスの数	緑色シュート再分化数	形質転換効率
		(A)		(B)	(B/A, %)
GP	336	248	—	94	37.9
FP	54	38	1	0	0.0
DH1	252	224	99	53*	23.7
DH2	193	97	38	15*	15.5
DH3	104	63	1	0	0.0

*PCRにより導入遺伝子を確認し、全て形質転換体であることを確認した。

(4)BBM および WUS2 遺伝子の単離と過剰発現

マイクロアレイ解析の結果、コントロールに比べて、多くの遺伝子が発現変動していることが明らかとなった。図 4 に fold changes (FC) が 5 以上および 0.2 以下の遺伝子数を示す。Ubi:BBM と Ubi:BBM+Ubi:EGFP においては、103 の遺伝子で発現量が増加し、222 で減少した。一方、Ubi:WUS2 と Nos:WUS2+Ubi:EGFP においては、増加が 2、減少が 28 遺伝子であった。これらの遺伝子には、再分化と密接に関わる遺伝子が含まれると考えられる。一方で、両遺伝子の過剰発現カルス、非形質転換カルスの継代培養過程または再分化過程について RNA-seq 解析を行った。その結果、*TFA* 領域内には合計 2,000 以上の発現遺伝子が存在することが明らかとなり、さらなる絞り込みが必要である。現在、*TFA* 遺伝子またはその関連遺伝子の単離に向けて発現変動解析や多型解析を行っている。

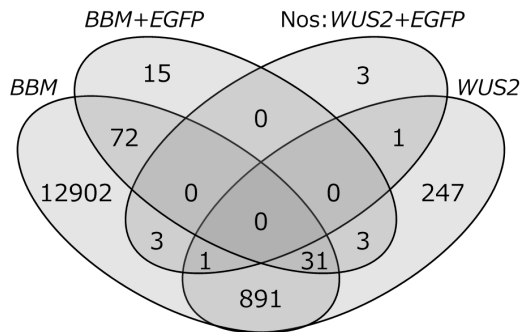
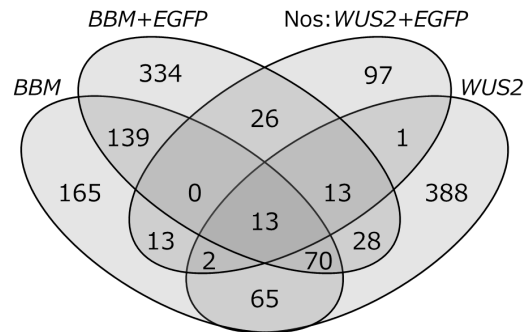
(A) Up-regulated genes (FC>5)**(B) Down-regulated genes (FC<0.2)**

図4 *BBM*および*WUS2*遺伝子の過剰発現による*mRNA*レベルの変動の概要

*BBM*または*WUS2*を過剰発現するカルスを用いてマイクロアレイ解析を行った。コントロールとして *EGFP*を過剰発現する形質転換カルスを用いて、それぞれ3反復の実験を行った。(A)は各遺伝子により発現増加(Fold change >5)した遺伝子の数、(B)は発現抑制 (Fold change <0.2)された遺伝子の数を示す(t-test, $p < 0.05$)。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 4 件)

1. Matsushima, R. and H. Hisano (2019) Imaging Amyloplasts in the Developing Endosperm of Barley and Rice. *Scientific Reports* 9: 3745.(査読あり)
2. Mashiguchi, K., H. Hisano, N. Takeda-Kamiya, Y. Takebayashi, T. Ariizumi, Y. Gao, H. Ezura, K. Sato, Y. Zhao, K.-i. Hayashi, et al. (2018) *Agrobacterium tumefaciens* Enhances Biosynthesis of Two Distinct Auxins in the Formation of Crown Galls. *Plant and Cell Physiology* 60: 29-37. (査読あり)
3. Hisano, H., B. Meints, M.J. Moscou, L. Cistue, B. Echávarri, K. Sato and P.M. Hayes (2017) Selection of transformation-efficient barley genotypes based on TFA (transformation amenability) haplotype and higher resolution mapping of the TFA loci. *Plant Cell Reports* 36: 611-620. (査読あり)
4. Hisano, H. and K. Sato (2016) Genomic regions responsible for amenability to *Agrobacterium*-mediated transformation in barley. *Scientific Reports* 6: 37505. (査読あり)

(学会発表) (計 16 件)

(1) 国際学会

1. Hisano H., Munemori H., Sato K.. Identification and application of TFA genomic regions that confer transformation amenability in barley. 2nd International Barley Mutant Workshop, Dundee, Scotland, 25-27 June, 2018
2. Hisano, H. Identification of TFA genomic regions that confer amenability to *Agrobacterium*-mediated transformation in barley. PAGXXV2017 (Plant and Animal Genome), San Diego, CA, U.S.A., January 14-18, 2017
3. Hisano, H. and Sato, K. TFA Genomic Regions Confer Amenability to *Agrobacterium*-Mediated Transformation in Barley. PAGXXV2017 (Plant and Animal Genome), San Diego, CA, U.S.A., January 14-18, 2017
4. Hisano, H., Motoi, Y. and Sato K. Identification of the genomic region responding to amenability of *Agrobacterium*-mediated transformation in barley. 12th International Barley Genetics Symposium. Minneapolis, MN, U.S.A., June 26-30, 2016.

(2) 国内学会

5. 久野裕・宗森広美・関真秀・鈴木穰・佐藤和広 幹細胞化関連遺伝子を過剰発現するオオムギカルスにおける網羅的遺伝子発現解析. 第10回中国地域育種談話会, 鳥取, 12月15-16日, 2018
6. 久野裕・宗森広美・関真秀・鈴木穰・佐藤和広 幹細胞化関連遺伝子を過剰発現する形質転換オオムギカルスにおいて発現変動する遺伝子の検出. 第13回ムギ類研究会, 横浜, 11月26-27日, 2018
7. 久野裕 品種の壁を越える: オオムギの形質転換や再分化を可能にするゲノム領域の同定. 日本植物学会第82回大会・シンポジウム「植物細胞のリプログラミング制御 ~その鍵は動的恒常性の維持と打破にあり~」. 広島, 9月14-16日, 2018
8. 久野裕・宗森広美・佐藤和広 形質転換能遺伝子座に関わるオオムギ準同質遺伝子系統の開発. 日本育種学会第133回講演会, 福岡, 3月25-26日, 2018.
9. 久野裕 品種の壁を越える: オオムギの形質転換効率に関わる遺伝子座の同定とその利用. 第12回ムギ類研究会, 京都, 12月16-17日, 2017
10. 久野裕・Patrick M. Hayes・佐藤和広 オオムギの形質転換能に関わるゲノム領域の同定. 分子

生物学会, 神戸, 12月6-9日, 2017

11. 久野裕・宗森広美・元井由加・佐藤和広 オオムギの形質転換効率に関する遺伝学的解析. 第9回中国地域育種談話, 東広島, 11月25-26日, 2017
12. 久野裕・宗森広美・西村秀希・佐藤和広 Baby boom1ならびに Wuschel2に制御されるオオムギ遺伝子の単離. 日本育種学会第132回講演会, 盛岡, 10月7-8日, 2017
13. 久野裕 品種の壁を越える: オオムギの形質転換に必要なゲノム領域の探索と利用. 第35回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会 シンポジウム, さいたま市, 8月29日-31日, 2017
14. 久野裕・宗森広美・元井由加・新海典夫・瀬々潤・豊田敦・佐藤和広 オオムギの形質転換効率に関わる遺伝子単離に向けたDNAマーカー開発. 日本育種学会第131回講演会, 名古屋, 3月29-30日, 2017
15. 久野裕・安東広美・元井由加・Patrick M. Hayes・佐藤和広 形質転換可能なオオムギ系統を作る方法. 日本育種学会第130回講演会, 鳥取大, 9月24-25日, 2016
16. 久野裕・安東広美・元井由加・佐藤和広 オオムギの形質転換効率に関わるゲノム領域の特定. 第34回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会, 信州大, 9月1-3日, 2016

[図書](計0件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 形質転換感受性のオオムギの作出方法

発明者: 佐藤和広、久野裕

権利者: 国立大学法人 岡山大学

種類: 特許

番号: PCT/dP2017/023218, 特願 2018-524182(P2018-524182)

出願年: 2017

国内外の別: 国際

○取得状況(計0件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

岡山大学資源植物科学研究所 次世代作物共同研究コア

作物イノベーション研究チーム - オオムギ遺伝子改変班 -

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/bgm/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 佐藤和広(岡大植物研)、宗森広美(岡大植物研)、新海典夫(産総研)、瀬々潤(産総研)、豊田敦(遺伝研)、関真秀(東大新領域)、鈴木穰(東大新領域)

ローマ字氏名: SATO Kazuhiro, MUNEMORI Hiromi, SHINKAI Norio, SESE Jun, TOYODA Atsushi, SEKI Masahide, SUZUKI Yutaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。