

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18580006

研究課題名 (和文) オオムギにおける殻粒の皮裸性の発現機構に関する分子遺伝学的解析

研究課題名 (英文) Molecular genetic analysis on the expression mechanisms of the covered and naked caryopsis in barley

研究代表者

武田 真 (TAKETA SHIN)

岡山大学・資源生物科学研究所・教授

研究者番号：40216891

研究成果の概要：

通常のおオムギは、脱穀しても実と殻が糊物質で接着していて分離できない，“皮麦”である。しかし、一部のオオムギは、穎果と穎が容易に分かれる変種で，“はだか麦”とよばれる。オオムギの穎果が皮性・裸性のどちらになるかは、単一の遺伝子座で決まる単純なメンデル遺伝に従い、皮性が裸性に対して優性である。オオムギの重要形質の1つである皮性・裸性を決める遺伝子の分子的な実体はこれまで不明であり、実と殻が接着したり、分離する機構も全くわかっていなかった。われわれのグループはポジショナルクローニングにより、オオムギの皮性・裸性の表現型を制御する遺伝子がERF転写因子であることを世界で初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：オオムギ・遺伝子・種子・皮麦・はだか麦・クローニング

1. 研究開始当初の背景

オオムギには脱穀すると穎果と穎が接着したままの皮麦と両者がきれいに分離できるはだか麦がある。皮麦とはだか麦の違いは1遺伝子によって支配され、皮性が裸性に対して優性である。皮麦は飼料や醸造用に適するのに

対し、はだか麦は食用に適し、両者は用途が異なっている。はだか麦は東アジアに多く分布し、チベットやネパールの高地では主食になっている。オオムギは食物繊維を多量に含み血中コレステロールを下げたり、冠状心疾患の危険性を低下させる健康効果を持つこと

が認められることから、今後健康に対する関心が高まるにつれ、オオムギの食品としての用途が世界的に増えると予想される。食用にははだか麦が圧倒的に有利であることから、はだか麦は今後注目されると予想される。申請者らはオオムギの皮性と裸性の違いを支配する遺伝子を単離しその機能を解明することを目指して、遺伝子の高精度マッピングを行ってきた。高精度遺伝地図が完成したことによって、物理地図の作成に進める段階にあった。そこで本課題を申請し、原因遺伝子の単離に向けた研究を開始した。研究実施中にイタリアにも同じ遺伝子の単離を進めている競合グループがいることがわかり、申請者らの日本グループとイタリアを中心とするヨーロッパのグループの遺伝子単離を巡る国際競争になっていた。

2. 研究の目的

本研究課題ではオオムギの重要形質である種子の皮性・裸性を支配する遺伝子を単離することを目的とする。そのためには皮裸性を決定する*nud*座をカバーする物理地図を完成させ、その塩基配列を解読し、アノテーションする必要がある。皮裸性の原因遺伝子を単離することで、オオムギに於いて皮麦とはだか麦の違いを決定する分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

バルクセグリガント法により約2,000の AFLPプライマー組合せを検定して連鎖バンドを探し、検出の容易なSTSマーカーに変換し、2組合せの皮性×裸性の分離集団の計2,828個体でマッピングした。オオムギのESTマーカーを用いてマッピングを行い、マッピングされたESTをアンカーとしてイネゲノム上の対応する配列を検索し、マイクロシンテニーを示すイネゲノム領域を特定した。次に、

対応するイネゲノム領域内に存在する遺伝子を探し、それらに対応するオオムギESTを検索し、新たな多型マーカーを開発してマッピングを進め、候補領域をさらに絞り込んだ。

オオムギ品種はるな二条のBACライブラリー(Saisho et al. 2007)を用い、末端側に0.04 cM離れたマーカー(sKT9)および*nud*と完全連鎖するABRS3を起点として染色体歩行を行った。

*nud*座をカバーする4個のBACクローンはショットガンシーケンスにより完全に解読した。得られた塩基配列はRiceGAASおよびTREPでアノテーションを行った。

発現解析のために、皮性品種Bowman および裸性遺伝子を連続戻し交雑により導入した準同質遺伝子系統*nud*-Bowmanを使用した。これらの系統は15°Cの自然光ファイトトロンで栽培し、開花日をマークした。開花当日および開花後1週間、2週間、3週間目の穂を採取し、穎、穎果、止葉の3部位からRNAを抽出した。逆転写後、RT-PCRにより遺伝子の発現を調査した。また、開花後2週間目の穎果を固定し、パラフィン包埋し切片を作成し、RNA *in situ*ハイブリダイゼーションに使用し、遺伝子の空間的発現を調査した。

ポジショナルクローニングの結果、原因遺伝子は脂質の合成経路を制御する転写因子であることが後述のように明らかになった。そこで、開花から1週間おきに穎果をサンプリングし、脱穎した後、脂質染色液ズダンブラックBで染色し、染色性に違いが見られるかどうかを調査した。同様の調査は穎果のテクニビットによる縦断切片を作成して行い、どの細胞層が脂質染色剤で染色されるかを詳細に調査した。

4. 研究成果

マッピングの結果、*nud*座はsKT3と

sKT9 間の 0.64 cM の範囲に絞り込めた。これらの隣接マーカーを Sato et al. (2004) のオオムギ高精度 EST マップに位置付け、*nud* を挟み込む EST マーカーを特定した。それらの隣接 EST マーカーに相同性を示すイネ EST クローンはイネ第 6 染色体長腕上に約 370 kb 離れて位置していた。この区間に予測されているイネ遺伝子をもとに新たな多型マーカーを開発した。

sKT9 を起点とし、合計 7 回の染色体歩行を行った結果、*nud* 座は約 235 kb のオオムギ BAC コンテグで完全にカバーできた。この領域を網羅する 4 本の BAC クローンをシーケンスし、アノテーションを行ったところ、*nud* 候補領域内には 1 つの非トランスポゾン遺伝子だけが存在することがわかった。その遺伝子は ERF(ethylene response factor)転写因子の 1 種で、シロイヌナズナで脂質の生合成を制御する WIN1(WAX INDUCER 1)/SHN1(SHINE 1)と相同性を示した。世界各地の裸麦 100 系統を調査したところ、全てに共通して ERF 転写因子を含む同一の領域(17 kb)が欠失していたことから、裸麦は単一起源と考えられた。さらに、2 系統の x 線誘発裸性突然変異体で ERF 転写因子の機能的に重要とされる領域にアミノ酸置換を起こす点突然変異が見つかった。一方、皮性 159 系統はいずれも 17-kb の欠失を有しないことが判明した。*Nud* の自然変異を、多様な起源の皮性 33 系統(栽培種 12 系統および野生種 11 系統)において調べた。5'-非コードおよび 3'-非コード領域を含む *Nud* の約 1.7-kb 領域のシーケンシングにより、はるな二条の標準配列と比較して 16 の部位で様々なタイプのヌクレオチド多形が検出された。コード領域において、11 のタイプの 1 ヌクレオチド置換が検出され、全て第 2 エキソンに存在した。4 つの非同義置換は全て、

AP2/ERF ドメイン。「mm (middle motif)」, または「cm (C-terminal motif)」モチーフの外に存在した。ヌクレオチド変化はまた、第 1 イントロン、ならびに 5'-非コード領域および 3'-非コード領域においても観察された。様々なマイクロサテライト多型も同様に見いだされた。3'-非コード領域において、84-bp のタンDEM重複がほとんどの栽培種において検出されたが、シーケンシングした野生種はこれを有しなかった。このようなポジションナルクローニングの結果に基づき、ERF 転写因子が *Nud* であると結論した。

Nud 遺伝子は穎果で特異的に発現し、発現のピークは開花後 2 週目で、種皮に発現が局在している。脂質染色(スダンプラック B)すると皮麦では開花後 2 週目から果皮が濃染されるが、裸麦では染まらない。皮麦では *Nud* が果皮表面に脂質を分泌させ、それにより内外穎との接着が起こると考えられる。裸麦の *nud* はヌル遺伝子であるが、遺伝子発現が穎果特異的に制御されているため、他の農業形質に悪影響を与えることなく実用性のある作物となったと考えられる。

オオムギ属の野生種には種子は小さいが乾燥や塩害などの不良環境に耐性を示すものがある。今後、ERF 転写因子に注目して品種改良を行えば、皮性の野生種を食用に適した裸性に効率よく改変できると期待される。

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)

- 1) 武田 真: オオムギの実と殻を分ける遺伝子の特定. バイオインダストリー26, 60-67 (2009). 査読無
- 2) Taketa, S., Amano, S., Tsujino, Y., Sato, T., Saisho, D., Kakeda, K., Nomura, M., Suzuki, T., Matsumoto, T., Sato, K., Kanamori, H., Kawasaki, S., Takeda, K.

Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 105:4062-4067(2008). 査読有

- 3) Taketa, S., T. Awayama, S. Amano, Y. Sakurai, and M. Ichii: High-resolution mapping of the *nud* locus controlling the naked caryopsis in barley. Plant Breeding 125, 337-342 (2006). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- 1) 武田 真. オオムギの皮裸性遺伝子の単離と機能解析. 日本育種学会第 114 回講演会.. 育種学研究 10(別 2):4. 2008 年 10 月 11 日 滋賀県立大学 彦根
- 2) 天野里子・栗山貴也・最相大輔・佐藤和広・武田和義・川崎信二・松本隆・武田 真. (2006)オオムギ皮裸性遺伝子座を包含する BAC コンティグの構築. 育種学研究8(別2) 66. 2006 年 9 月 23 日 愛媛大学 松山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

イネ科植物の種子の皮性・裸性を支配する遺伝子の利用, 松本隆・武田 真・武田和義・佐藤和広・最相大輔・掛田克行, 独立行政法人農業生物資源研究所, 特願 2008-50901, 2009 年 2 月 29 日出願, 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

- 1) 武田 真ら, 野生オオムギ 実と殻分け食用に改良, 山陽新聞, (発表日2008-03-05), 2008.
- 2) 武田 真ら, 大麦 実と殻分ける仕組み解

明, 四国新聞, (発表日2008-03-05), 2008.

3) 武田 真ら, 大麦、食用に適か不向きか 違い決める遺伝子発見 岡山大研究グループが世界初, 毎日新聞 岡山地方版, (発表日2008-05-08), 2008.

4) 武田 真ら, オオムギの皮麦と裸麦の違い 岡山大 世界初、遺伝子を特定, 朝日新聞 岡山地方版, (発表日2008-05-08), 2008.

5) 武田 真ら, 裸麦と皮麦、判別の遺伝子, 読売新聞 岡山地方版, (発表日2008-05-06), 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 真 (TAKETA SHIN)

岡山大学・資源生物科学研究所・教授

研究者番号 : 40216891