

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580007

研究課題名（和文） オオムギにおける β グルカン合成酵素遺伝子の単離と機能解析

研究課題名（英文） Isolation and characterization of beta-glucan synthase genes

研究代表者

武田 真 (TAKETA SHIN)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：40216891

研究成果の概要（和文）：(1,3;1,4)- β -D-グルカンはイネ科の組織で高濃度で見られ、特にオオムギの細胞壁多糖の主要な成分である血糖値や血中コレステロール濃度を下げるなど健康効果がある。我々は、オオムギのゲノム中にある7種類の β グルカン合成酵素様遺伝子のうち、HvCslF6が主要な合成酵素であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

(1,3;1,4)- β -D-glucans (mixed-linkage glucans) are found in tissues of members of Poaceae (grasses), and are particularly high in barley (*Hordeum vulgare*) grains have beneficial effects on health. Our present results demonstrate that, among the seven CslF and one CslH genes present in the barley genome, HvCslF6 has a unique role and is the key determinant controlling biosynthesis of (1,3;1,4)- β -D-glucans.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：オオムギ、遺伝子、細胞壁多糖、生合成

1. 研究開始当初の背景

オオムギはトウモロコシ、コムギ、イネおよびダイズに次いで世界第5位の生産量を誇る主要穀物である。オオムギの主な用途は飼料と醸造用であるが、我が国を含む東アジア地域では人間の食用にも供される。オオムギの特徴として可食部である種子の胚乳中の水溶性食物繊維の含量が他のイネ科作物の約10倍

多いことがあげられる。オオムギの食物繊維はグルコースが β -1,3-1,4結合した、 β -1,3-1,4-D-グルカン(以後 β グルカンと略記する。)が主成分である。オオムギを食用にするには β グルカン量が高いことが好ましい。一方、ビール醸造には、 β グルカン量が高いと、濾過フィルターが目詰まりをおこし濾過

に長時間を要するため、 β グルカン量は低いことが好ましい。 β グルカンは双子葉植物には存在せず、単子葉植物に特異的に検出される。 β グルカンはイネ科作物では茎葉の他、子実にも分布している。オオムギの子実で β グルカンは可食部である胚乳の内部組織に多く分布している。機能性物質として重要な β グルカンの生合成に関しては多数の遺伝子が関与する複雑な過程であると考えられており、未だ不明な点が多く、今後の研究が待たれる。

最近、オーストラリアのグループによって、イネの全ゲノム情報をもとに、 β グルカン生合成に関与するとみられるイネ遺伝子が特定され、またイネとオオムギの遺伝子配列の類似性を手がかりに、オオムギの β グルカン生合成に関与する遺伝子が7種類報告された。しかし、これらの多数の遺伝子がオオムギの β グルカン合成過程をどのように制御し、オオムギで高 β グルカン含有量をもたらしているかは不明である。オオムギはゲノムサイズが大きく、全ゲノム塩基配列情報がないこと、また形質転換が難しいなどの研究上の制約があり、オオムギ固有の有用形質である β グルカン含量を決める遺伝機構は十分解明されたとは言えない。

2. 研究の目的

我々は、作物研究所(つくば市)の塔野岡卓司氏と共同して、オオムギでEMS処理により誘発された半矮性突然変異体のなかに β グルカン量が著しく低下している1系統を見出し、この系統の β グルカンを欠く特性は7H染色体長腕に座乗する劣性1遺伝子

(beta-glucan-less, 遺伝子記号bg1)に支配されることを明らかにした。さらに、オオムギのEST情報の解析と遺伝子マッピングにより、bg1がセルロース合成酵素様遺伝子Fグループの6番目の遺伝子(*Hordeum vulgare* cellulose synthase-like group F6, HvCs1F6

と略記する)であることを示唆する予備的なデータを研究開始以前に得ていた。

本研究では、 β グルカンレス突然変異体のHvCs1F6遺伝子を解析し、突然変異箇所を特定するとともに、なぜその部位が突然変異すると β グルカン含量が極度に減少し β グルカンレスの表現型を示すのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

オオムギ品種‘赤神力’をEMS処理して得られた半矮性系統OUM125(岡山大学資源生物科学研究所附属大麦・野生植物資源研究センターより分譲)は種子の β グルカン含量が検出限界以下の β グルカンレス系統である。六条・裸性・渦性(ブラシノステロイド受容体の異常による矮化)の遺伝的背景では植物体が弱性を示すため、OUM125を二条・皮性・並性(正常稈長)の品種‘ニシノホシ’で4回戻し交雑した同質遺伝子系統(bg1-ニシノホシと略記)を育成した(作物研究所 塔野岡卓司氏より分譲)。bg1-ニシノホシをニシノホシと交雑したF2世代約200個体を養成済みで、個体別に播種前の半粒用いて β グルカン含量を比色定量法で調査するとともに、葉身からDNAを抽出済みである。bg1の分子マーカーを用いた高精度マッピングを行った。さらに、我々の予備的なマッピングデータではbg1はセルロース合成酵素様遺伝子グループFの6番(HvCs1F6)と染色体の座乗位置が近く、同一である可能性が極めて高い。そこでHvCs1F6遺伝子の配列を2つの同質遺伝子系統で決定し、突然変異部位がないかどうかを調査した。なお、オーストラリアのオオムギ品種‘Sloop’のHvCs1F6遺伝子のcDNA配列データは公表済みなので、その情報を利用してPCRプライマーを設計し、遺伝子の全長をクローニングした。さらに、イントロンや5’および3’非翻訳領域(UTR)

ならびに制御領域の塩基配列を決定するために、オオムギ品種'はるな二条'の大腸菌人工染色体(BAC)ライブラリーからHvCs1F6遺伝子の全長を含むクローンを選抜し、その塩基配列を決定した。

bgl-ニシノホシおよびニシノホシ, ならびにbgl-赤神力および赤神力の2対のbgl遺伝子に関する同質遺伝子系統対を用い、HvCs1F6遺伝子の発現を幼植物から種子形成の様々な生育段階で調査し、遺伝子発現に組織特異性や系統間での違いが見られるかどうかを調査した。さらに、種子、茎葉の β グルカン量を比色法により定量する。調査は植物体の生育期間を通して経時的に行う。また、HvCs1F6以外のセルロース合成酵素様遺伝子の発現も対照として調査した。

オオムギのHvCs1F6遺伝子が β グルカン合成能力を持つかどうかを検定するために、野生タバコの葉中で外来遺伝子を一過的に発現させる系を用いて、 β グルカンを全く持たない野生タバコ(*Nicotiana benthamiana*)にHvCs1F6遺伝子をアグロバクテリウム法で一過的に導入して発現させ、 β グルカンの合成が起こるかどうかをfluorophore-assisted-capillary electrophoresis (FACE)分析法で調査した。なお、種子や幼植物の β グルカンの定量は β グルカンを比色定量する市販のキットを用いて行った。

4. 研究成果

(1, 3;1, 4)- β -D-グルカン(混合型グルカン)はイネ科の組織で見られ、オオムギで特徴的に高い値を示す。本研究では(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンレス突然変異体を3系統特定し、それらが調査した全ての組織で(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンを完全に欠くことを示した。

突然変異体のうち1系統は岡山大学で赤神力をEMS処理した半矮性系統(OUM125)に由来

し、2系統は栃木県農業試験場でサチホゴールデンをアジ化ナトリウム処理して得られた突然変異系統(KM27およびKM30)に由来する。後者2系統は冬場の寒さで現れる葉枯れを指標として予備選抜をした11系統の中から種子の(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンを測定して選抜した。

(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンレスの表現型は7H染色体長腕に座乗するHvCs1F6の多型と完全に連鎖していた。(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンレス突然変異体のそれぞれはコード領域内のことなる位置に1塩基置換を有し、高度に保存されたアミノ酸残基の置換を引き起こすことがわかった。(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンレス突然変異体では胚乳から抽出した膜画分での(1, 3;1, 4)- β -D-グルカン合成酵素活性が完全に欠損していた。HvCs1F6 cDNAを*Nicotiana benthamiana*の葉に導入し一過的に発現させた系でも、正常遺伝子が活性を示すのに対し、(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンレス突然変異体では(1, 3;1, 4)- β -D-グルカン合成酵素活性が欠損していた。タバコ葉で合成された(1, 3;1, 4)- β -D-グルカンはDP3/DP4比が穀類でみられる値に比べて低かった。これらの結果より、オオムギゲノム中に存在する7種類のCs1Fおよび1種類のCs1Hの中でHvCs1F6は特異な性質を有しており、(1, 3;1, 4)- β -D-グルカン合成の鍵となる酵素であることが明らかとなった。

HvCs1F6の自然変異をオオムギ29系統を用いて調査したところ、変異の大部分はイントロン領域にあった。

HvCs1F6の遺伝的改変により、食用や醸造用などの異なる用途に適した(1, 3;1, 4)- β -D-グルカン量の制御が可能になるとみられる。特に、遺伝子組み換え技術を利用すれば、種子特異的にHvCs1F6の発現を抑制し(1, 3;1, 4)- β -D- β グルカンを欠失したオオム

ギ系統が育成可能と見られる。同時に、植物体ではHvCs1F6を発現させて正常な含量の(1,3;1,4)-β-D-βグルカンを有するようになれば生育は健全になり収量低減のデメリットを抑えられると期待される。このようにしてβグルカンフリーの遺伝子組み換え(GM)オオムギ実用化への道が近づくと期待される。なお、この研究は作物研究所、埼玉大学およびCSIRO(オーストラリア)との共同研究として行われたものである。

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2件)

- ① Taketa, S., Yuo, T., Tonooka, T., Tsumuraya, Y., Inagaki, Y., Haruyama, N., Larroque, O. and Jobling, S.A. :Functional characterization of barley betaglucanless mutants demonstrates a unique role for Cs1F6 in (1,3;1,4)-β-D-glucan biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 63(1): 381-392 (2012). 査読有り
- ② Tonooka, T., E. Aoki, T. Yoshioka and S. Taketa: A novel mutant gene for (1-3, 1-4)-β-D-glucanless grain on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7H. *Breeding Science* 59: 47-54 (2009). 査読有り

[学会発表] (計4件)

- ① Jobling SA. and Taketa, S. オオムギ Cs1F6 遺伝子の特性解析とその操作による穀粒における 1,3;1,4-β-D-グルカンレベルの改変。Fourth Conference on Biosynthesis of Plant Cell Wall. 淡路 2011年10月4日。
- ② 武田 真. オオムギ種子関連遺伝子の単離と解析。第27回資源植物科学シンポジウム並びに第3回植物ストレス科学研究シンポジウム、平成23年3月7日、倉敷 p. 8-9. (2011)

- ③ 湯尾崇央・塔野岡卓司・山下優子・武田 真. オオムギにおける(1-3, 1-4)-β-D-グルカンレス突然変異の原因遺伝子の特定. *育種学研究* 11(別2) 154 (2009). 2009年9月26日、北海道大学

- ④ 高橋飛鳥・柳沢貴司・山下優子・南角奈美・漆川直希・湯尾崇央・佐藤和広・武田 真. オオムギβグルカン含量を高める遺伝子 amo1 のマッピング. *育種学研究* 12(別2) 41 (2010). 2009年9月26日、北海道大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称：オオムギのβ-グルカン欠失遺伝子、合成遺伝子及びその利用

発明者：塔野岡卓司・吉岡藤治・青木恵美子・武田真

権利者：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構，国立大学法人岡山大学

種類：特許

番号：特願2009-045393

出願年月日：2009.02.27

国内外の別：国内

名称：オオムギのβ-グルカン欠失遺伝子、合成遺伝子及びその利用

発明者：塔野岡卓司・吉岡藤治・青木恵美子・武田真

権利者：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構，国立大学法人岡山大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/052939

出願年月日：2010.02.25

国内外の別：国外

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/grf/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 真 (TAKETA SHIN)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：40216891

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

塔野岡 卓司 (Tonooka Takuji)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所

研究者番号：

円谷 陽一 (Tsumuraya Yoichi)

埼玉大学大学院理工学研究科・教授

研究者番号：10142233

春山 直人 (Haruyama Naoto)

栃木県農業試験場栃木分場

研究者番号：

SA Jobling

CSIRO, Australia

研究者番号：