

平成23年 5月 30日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2009～2010
 課題番号： 21710205
 研究課題名(和文)
 遺伝子発現解析によるキャッサバの環境応答機構の理解および情報基盤整備
 研究課題名(英文)
 Building of a cassava information resource and understanding of environmental stress responses
 研究代表者
 櫻井 哲也 (SAKURAI TETSUYA)
 独立行政法人理化学研究所・ゲノム情報統合化ユニット・ユニットリーダー
 研究者番号： 90415167

研究成果の概要(和文)：

公共データベース GenBank(NCBI)および理研キャッサバ完全長 cDNA の配列データを用いて、約 22,000 の目標遺伝子配列から各々 60 塩基プローブ配列を選んだキャッサバオリゴマイクロアレイチップを開発した。この開発したマイクロアレイチップを用いて、キャッサバの 3 品種、2 ストレス条件についてのマイクロアレイ実験を行い、各品種、ストレス条件についての異なる遺伝子発現プロファイルを獲得できた。CAGE 法についても、同様に各条件の遺伝子発現解析を行い、2 つの解析手法による遺伝子概観を獲得した。

研究成果の概要(英文)：

We developed a oligo custom microarray chip which includes approximately 22,000 60-mer probes. The microarray chip was designed by using the ESTs from GenBank (NCBI) and flanking sequences of RIKEN cassava full-length cDNA. Using the microarray chip, we were able to outline gene expression among 3 cassava accession and the 2 stress experimental conditions. Moreover, we performed gene expression profiling via CAGE method, obtained the different gene expression profiles from the 2 methodological aspects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：植物、作物、ゲノム、トランスクリプトーム、環境応答、データベース

1. 研究開始当初の背景

毎年 7000 万人もの世界人口が増加を続けている(国連 World Population Prospects)今日、作物増産は非常に重要である。しかし、

地球温暖化による降水地域、降水量の変化、乾燥地域の拡大や耕地の酷使による酸化、地下水位の低下、塩蓄積といった土壌劣化により、年間に 600 万ヘクタールもの耕地が、作物の生育に適さない

土地となっている(FAOSTAT 2004-2005)。このため、これまで農地として適さないとしてきた問題のある土地での作物生育を可能にすることが、作物増産にとって大きな課題の1つといえる。さらに、温暖化現象の原因となっている二酸化炭素などの温室効果ガス排出削減に向け、化石燃料に替わる循環型エネルギー開発へのバイオマス利用技術開発が重要である。一方、アメリカやブラジルでは、サトウキビやトウモロコシ等を原料としたバイオ燃料製造の急増が、食糧や家畜用飼料の価格を押し上げる原因となっている。したがって、カーボンニュートラルな植物バイオマス利用を検討する際には、食糧との競合を十分に考慮する必要がある。

熱帯低木キャッサバ(*Manihot esculenta*)は、幹の根元に放射状に塊根(芋)が実る澱粉作物であり、全世界でおよそ10億人の人々の食糧源であり、アフリカ、東南アジア、中南米を中心とした国々で盛んに栽培され、その年間生産量は2億トンにのぼる。乾燥地、酸性土壌、貧栄養土壌といった様々な悪環境下での生育が可能であり、澱粉の高い生合成能力を持つことから、植物全般の環境ストレス耐性、生産性の向上に関わる有用遺伝子の探索やそのメカニズム解明に適する作物と考えられ、その成果は、食糧問題、環境問題への貢献に直結する。生産量の半分以上が製紙などの産業原料として長く利用されており、食糧との競合問題になり難い対象として、特にアジアでの活用が期待されている。

申請者らにより、収集したキャッサバ完全長 cDNA を用いた他植物種との比較解析を行うことで生物としての概要獲得、ストレス応答性遺伝子の示唆など網羅的研究に関する成果が報告されている(Sakurai T, Plata G et al, BMC Plant Biology 2007, 7, 66)が、現状としてはキャッサバの分子生物学的な研究、オミックスワイドな研究が進んでいるとはいえず、例えば、公共データベース GenBank/DBJ/EMBLへ登録されているキャッサバの EST(Expressed Sequence Tag、発現配列タグ)は、2008年10月現在、76566配列に過ぎない。しかし前述のように、米国エネルギー省(DOE-JGI)によるキャッサバゲノム配列解読プロジェクトが進行していることをはじめ、分子生物学、遺伝学、育種から農法におよぶ世界を結ぶコミュニティが形成されており、本課題のような網羅的研究の成果応用は現実的といえる。

2. 研究の目的

バイオマス利用技術の開発は、温室効果ガスの排出抑制による地球温暖化防止に対して直接的に貢献する。一方、原油価格高騰を背景にアメリカやブラジルでは、サトウキビやトウモロコシ等を原料としたバイオ燃料

製造の急増が、食糧や家畜用飼料の価格を押し上げて問題となっている。したがって、カーボンニュートラルな植物バイオマス利用を検討する際には、食糧との競合を十分に考慮する必要がある。熱帯低木キャッサバは、生産量の半分以上が産業原料として利用され、食糧利用と競合し難い上、様々な悪環境下での生育が可能であり、澱粉の高い生合成能力を持つことから、バイオ燃料開発のみならず、植物全般の環境ストレス耐性、生産性の向上に関わる有用遺伝子の探索やそのメカニズム解明に適する作物と考えられる。

米国エネルギー省(DOE-Joint Genome Institute)によるキャッサバゲノム塩基配列解読プロジェクトが進行中であり、それに先駆け、オリゴマイクロアレイを開発/実験、および CAGE法といった5'末端タグプロファイリング法を用い、ストレス条件下におけるキャッサバ転写産物の発現プロファイルを解析することで、ストレス応答機構の理解に迫るほか、品種間での発現プロファイルを比較することによるキャッサバ有用品種の選定など育種領域への成果が期待される。さらに、データベース構築など円滑な情報参照環境の整備を行い、研究推進に貢献する。

3. 研究の方法

(1) キャッサバオリゴマイクロアレイ設計

公共データベース GenBank よりキャッサバ cDNA 配列データ 76,652 を収集した。混入した他生物由来配列データの排除、反復配列のマスクといった前処理を行い、マイクロアレイプローブ設計に使用できることが確認できた 76,568 cDNA 配列を得た。マイクロアレイプローブ設計に使用できることが確認できた cDNA 配列をシーケンズアセンブラ cap3(Huang X, Madan A, Genome Res 1999, 9, 868-877)で処理することで配列の冗長性を排除した後、この cDNA 配列を蛋白質に翻訳し、既知の蛋白質との類似性を得ることで、cDNA 配列の方向(sense/anti-sense)など、ハイブリダイゼーション反応に関する配列品質を確認した。以上の処理を経た配列データを目標遺伝子配列とし、Agilent社提供のマイクロアレイプローブデザインツール eArray を使用して 60塩基のマイクロアレイプローブを設計した。

(2) マイクロアレイ実験

遺伝子発現プロファイルの獲得の際して、TAI16、ECU72、PER417-003の3種のキャッサバを用いた。それぞれを発根培地にて生育し、土壌へ移植後1ヶ月の植物体の葉から RNA を抽出した。土壌から抽出し1時間放置処理することで、乾燥ストレス下における条件とした。

(3) CAGE

マイクロアレイ実験と同様の品種、処理を行った個体の葉から RNA を獲得し、CAGEを行った。参照ゲノム塩基配列は、JGI v1.1を用いた。

(4) データベース構築

マイクロアレイプローブ設計時に得られる cDNA に関連データ等をデータベース化する。ゲノム配列に基づきデータ統合を行い、表現環境としてジェネリックブラウザ GBrowse (Stein LD et al, Genome Research 2002, 12, 1599-1610) を採用した。

4. 研究成果

(1) キャッサバオリゴマイクロアレイ設計

図 1 のような処理手順を経て、21,522 目標遺伝子配列から 60 塩基のプローブを設計することができた。各プローブを 1 セットに 2 か所実装し、1 チップ当たり 4 つのマイクロアレイ実験の実施が可能なアジレント社マイクロアレイチップの 4 x 44k プローブの形式を採用した。

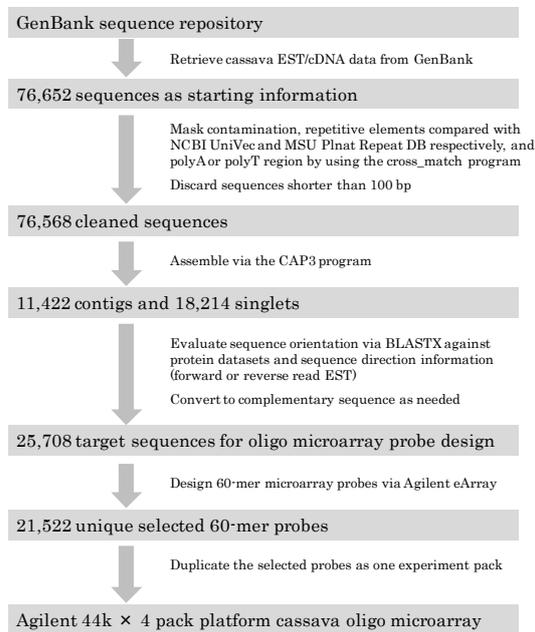


図 1 マイクロアレイ設計の流れ

(2) マイクロアレイ実験

3 品種のキャッサバ植物体について、土壌から摘出し 1 時間放置することで、乾燥ストレス処理を行った (図 2)。各品種、処理区について 3 個体の葉から RNA を抽出し、マイクロアレイ実験を行った。各々の実験の変動係数 (CV) を図 3 に示す。この結果より、どの実験についても、90% 以上のプローブが CV 値 0.5 以上を満たし、マイクロアレイチップの品質に問題がないことを示した。



図 2 (左) 対照個体、(右) 乾燥処理

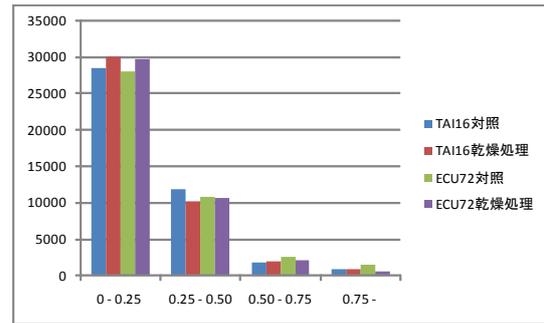


図 3 マイクロアレイ実験の再現性。(縦軸) プローブ数、(横軸) CV 値

(3) CAGE

マイクロアレイ実験と同様の RNA を使い、CAGE を行った。約 300 万の 36 塩基の配列 (タグ) をゲノム塩基配列へマップさせることができた。各品種、ストレス条件によるタグ数の違いを獲得した。

(4) データベース構築

マイクロアレイプローブ設計時に得られる cDNA に関連データ等をデータベース化する。ゲノム配列に基づきデータ統合を行い、表現環境としてジェネリックブラウザ GBrowse (Stein LD et al, Genome Research 2002, 12, 1599-1610) を採用した。21,522 目標遺伝子配列をはじめ、その配列を構成する要素、既知遺伝子との類似性、タンパク質ドメインなどの注釈を付加し、すべての情報について、検索可能な機能も実装した (図 4)。

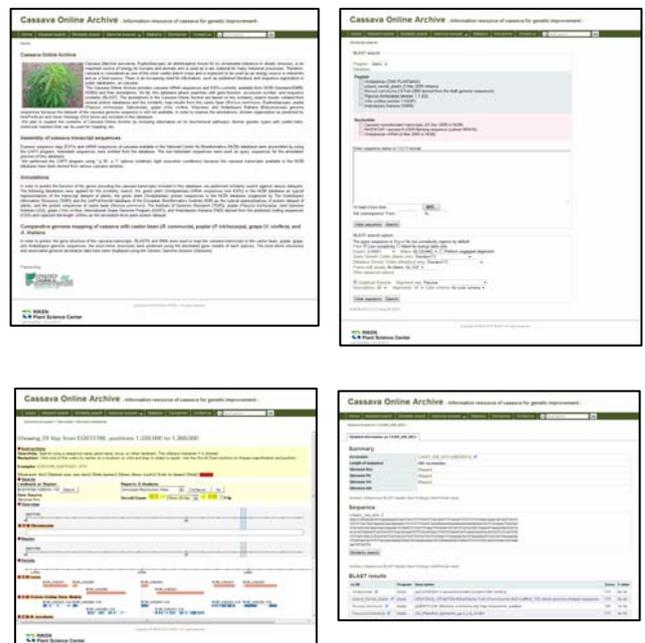


図 4 データベース画面。(左上) トップ、(右上) 類似性検索、(左下) ゲノムマップ、(右下) 配列詳細情報

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)

[学会発表] (計2件)

① Tetsuya Sakurai, RIKEN's activities toward cassava functional genomics, Special Seminar on Advanced Molecular Breeding Technologies and Functional Genomics Study for Plant Improvement, 2010年2月1日, Mahidol University, Bangkok, Thailand

② Tetsuya Sakurai, Takuhiro Yoshida, Kenji Akiyama, Kazuo Shinozaki and Manabu Ishitani, Development of Cassava Database: Cassava.psc.riken.jp, Plant & Animal Genomes XVIII Conference, 2010年1月11日, San Diego, USA

[その他]

ホームページ等

<http://cassava.psc.riken.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 哲也 (SAKURAI TETSUYA)

独立行政法人理化学研究所・ゲノム情報統合化ユニット・ユニットリーダー
90415167

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし