

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380007

研究課題名(和文)オオムギ耐塩性ゲノム育種システムの開発

研究課題名(英文)Development of genomics assisted breeding system of salt tolerant barley

研究代表者

佐藤 和広 (Sato, Kazuhiro)

岡山大学・その他部局等・教授

研究者番号：60215770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：耐塩性のオオムギから高速cDNA解析で取得した塩基配列とは異なる二条の完全長cDNA配列を比較してゲノムワイドなSNP検出システムを開発した。組換え自殖系統および染色体組換え置換システムをアレイシステムでタイピングし、マップ作製と、置換部位の同定を行った。これらの系統の塩ストレス耐性を評価して、耐性のQTLと置換部位のマッピングを行った。一方、すでにサブトラクション法で単離した耐性遺伝子の形質転換体を作製し、耐性の形質評価を実施している。また、主要な耐性遺伝子の絞り込みとマーカー開発を行った。さらに、耐性遺伝子を含む染色体組換え置換システムを同定して同質遺伝子系統としての活用を図った。

研究成果の概要(英文)：cDNA sequences are generated by an efficient analysis system and aligned with full length cDNA sequences of Haruna Nijo to develop genome wide SNP detection system. The array system is used to genotype recombinant inbred lines and recombinant chromosome substitution lines for genetic map development and estimation of substitution segments. Salt tolerance of these lines are evaluated to map tolerance QTLs and their responsible substitution segments. On the other hand, a previously isolated tolerance gene by subtraction method is used to make transgenic plant to evaluate its salt tolerance. Markers are also developed to narrow down tolerance genes. The recombinant chromosome substitution lines carrying tolerance gene segments are developed to be used as isogenic lines for salt tolerance.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：耐塩性 不良環境耐性 オオムギ DNAマーカー 遺伝子単離 形質転換 cDNA

1. 研究開始当初の背景

乾燥した中近東に起源するオオムギは、塩類に対する耐性の強いことが知られている (Harlan 1995)。岡山大学では世界各地から収集した約7千系統のオオムギの発芽および幼植物の耐塩性を評価し、耐性に差のある系統を用いて遺伝解析を行ってきた (Mano et al. 1996)。分離集団を用いた遺伝解析の結果、発芽および幼植物での耐塩性はいずれも量的に遺伝した。さらに、予備的な QTL 解析によって、耐塩性にかかわる複数の遺伝子座の存在が明らかとなった (Mano et al. 1997)。発芽時の耐塩性については、発芽床に海水を与えても発芽する高度に耐性の系統を見いだした。また、幼植物で高度耐性を示す系統の塩処理によって誘導される転写産物をサブトラクション法によって選抜し、遺伝子配列を決定した。その結果、その遺伝子は *O*-methyltransferase をコードすることが明らかとなった (Sugimoto et al. 2003)。一方で、この遺伝子が耐性に対してどの程度の作用を示すのかは未だ不明であり、また、耐性が複数の遺伝子座に制御される複雑な遺伝を示すことから、耐性系統にはさらなる耐性遺伝子の存在することが示唆される。

研究開始時点までにオオムギのゲノム育種のための環境は急速に整備されてきた。研究代表者が約3千の EST の座乗する遺伝地図を作成したのに続いて (Sato et al. 2009)、1,536 の SNP が同時検出可能なマイクロアレイによって約3千の EST からなる地図が完成している (Close et al. 2009)。また、これらのマーカーシステムを応用して、染色体組換え置換系統が開発されている (Sato and Takeda 2009)。さらに、完全長 cDNA の完全解読 (Sato et al. 2009) など、遺伝子同定のためのツールは着々と整備されており、遺伝様式が明快に解析できる材料が整っていれば、ポジショナルクローニングは容易になりつつある。また、オオムギでは極めて困難とされてきた形質転換法についても、最近の研究代表者のグループの研究によって、実施可能であることが明らかとなってきた。

2. 研究の目的

オオムギは穀物の中で最も塩害に強く、塩類集積や砂漠化した進行した土壌でも栽培されている。本研究では岡山大学で耐塩性極強と判断されたオオムギ系統の耐性遺伝子を同定するために、ゲノム解析的な手法を活用して、耐性系統の cDNA 解析、高能率マーカー開発、耐性遺伝子の高速 SNP マッピングを行う。耐性系統が保有する主要な耐性遺伝子を絞り込む。さらに、染色体組換え置換を用いた耐塩性オオムギ系統を開発して実用性の高い耐性遺伝子を利用する。

3. 研究の方法

耐性のオオムギから高速 cDNA 解析で取得した塩基配列とはるな二条の完全長 cDNA 配列を比較して SNP 検出用アレイシステムを開発する。組換え自殖系統および染色体組換え置換系統をアレイシステムでタイピングし、マップ作製と、置換部位の同定を行う。これらの系統の塩ストレス耐性を評価して、耐性の QTL と置換部位のマッピングを行う。一方、すでにサブトラクション法で単離した耐性遺伝子の形質転換体を作製し、耐性の形質評価を行う。また、主要な耐性遺伝子の絞り込みとマーカー開発を行う。さらに、耐性遺伝子を含む染色体組換え置換系統を開発して上記形質転換体と共に遺伝子作用を比較確認する。

4. 研究成果

実施中に本研究に直接関連する完全長配列の追加公開 (Matsumoto et al. 2011) およびオオムギゲノムの物理地図と遺伝子領域の配列公開 (IBSC 2012) など大きな進展があり、ゲノム育種を目的とする本研究の内容は当初の提案より豊富なゲノム情報を活用して整理することが可能となった。

(1) 高度耐性オオムギの高速 cDNA 解析

耐性系統の cDNA 解析：塩ストレスに高度耐性を示すオオムギ系統に塩ストレス処理をしたサンプルおよび対照サンプルの cDNA ライブラリーを作製し、Roche 社製次世代型シーケンサーでショットガン解析を行った。配列の整列およびベクター配列等のトリミングを行って cDNA 配列を取得した。

SNP 情報の取得：cDNA の公開されているオオムギ品種「はるな二条」の完全長配列 (Sato et al. 2009) に加えて、Matsumoto et al. (2011) が大量の完全長解析を実施し合計約3万クローンのオオムギ完全長 cDNA 配列が利用可能となった。この手法で取得した耐性オオムギ由来の cDNA 配列を Roche 社製 Newbler Mapper v2.6 で完全長 cDNA 配列にマップし、同一遺伝子由来の cDNA 配列を整理して塩基配列の差異を確認し、マーカーとなる塩基多型 (SNP) 情報を取得した。また、オオムギ完全長配列を用いた SNP の同定方法は、二倍体コムギの cDNA 配列の解析にも応用可能であることを示した (Iehisa et al. 2012)。

これらの完全長 cDNA 配列について Mayer et al. (2011) のイネ科植物とのシンテニーを活用した Genome Zipper によって、ゲノム上の位置情報の推定が可能となり、さらに、2012 年に公開されたオオムギのゲノム概要配列 (IBSC 2012) によって 2 万 6 千あまりの

遺伝子についてオオムギの物理地図を用いた位置情報が利用可能となった。また、完全長クローンを染色体に直接マップして、組換えに基づく遺伝地図と染色体上の物理位置との対応関係を示すことも一部可能となった(Karafiátová et al. 2013)。

(2) はるな二条/耐性系統の分離集団を用いた遺伝地図作成と染色体置換系統群の開発

遺伝地図作成：AおよびBの2組合せのはるな二条/耐塩性のA組換え自殖(F_9 世代)96系統およびB組換え自殖(F_7 世代)79系統、これらのA染色体組換え置換(B_3F_6)98系統およびB染色体組換え置換(B_3F_3)95系統を両親と共に圃場で栽培し葉身から高純度DNAを抽出調整し、SNPアレイシステムを利用して、2組の組換え自殖系統群および両親の遺伝子型を解析した。これらの情報をもとに、Muñoz-Amatriaín et al. (2011)のSNP地図およびIBSC(2012)のゲノム位置を参照して連鎖地図を作製した。

染色体置換系統群の開発：上記組換え自殖系統によって作製した連鎖地図情報を参照して、染色体組換え置換系統の遺伝子型判定を行った。それぞれのゲノム領域において、最少の系統で全ゲノムを包括するセットを選抜したところ2種類の集団において40系統程度が必要であると考えられた。この結果は同じSNP解析システムを用いた別の置換系統作成例(Sato et al. 2011)において39系統を必要としたこととも一致した。

(3)耐塩性の評価とQTL解析：当初予定していた耐塩性の評価方法は、予備試験の結果、水分の蒸発量の大きい生育箱外部の個体の塩濃度が高くなって耐性が低く評価されるため、個体検定には不適と判断し、水耕培養による評価を実施した。Hoagland溶液で2葉期に栽培した幼苗にNaClを100mM、さらに1週間毎に100mMづつ合計300mMを処理した。処理後3週間目に地上部の葉枯れ程度を調査して、スコアリングした。この条件で、2組の組換え自殖系統および染色体組換え置換系統を各々3反復で検定した。その結果A組換え自殖系統において染色体1Hと6H(図1)、お

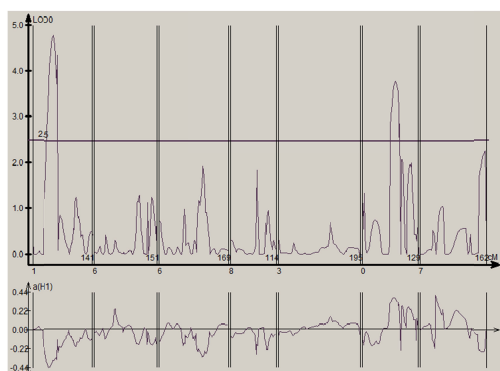


図1 耐塩性QTLのLOD(上部)および相加効果(下部)(左から染色体1H-7H)

よびB組換え自殖系統において染色体2HにQTLを検出した。

(4)O-methyltransferaseをコードする遺伝子の形質転換体作成：研究代表者ら(Sugimoto et al. 2003)がRNAサブトラクション法によって既に単離した耐性候補遺伝子を過剰発現するコンストラクトを作製し、形質転換の容易なオオムギ品種「Golden Promise」を用いてアグロバクテリウム法による遺伝子導入を実施した。選抜マーカーであるハイグロマイシンに抵抗性を示した再分化個体についてPCR法による導入遺伝子を確認したところ、独立した10個体(系統)の T_0 植物を得ることが出来た。現在、全ての系統について後代を展開し、導入遺伝子の分離とその遺伝子発現量の調査を進めている。一方で、形質転換体の育成環境において高濃度の塩処理後の廃棄物の滅菌処理が難しいことが判明したため、同時並行で現在別な耐塩性の評価方法を考案して実験を実施中である。

(7)耐塩性の精密地図作製と耐塩性同質遺伝子系統の育成：染色体組換え置換系統で耐性遺伝子座が存在すると認められる系統の B_3F_2 種子を増殖して、SNP検出システムを用いて耐性遺伝子座の座乗位置についてヘテロの個体を選抜し、種子を大量増殖した。これらの種子について耐性遺伝子座を挟み込むマーカーを作製し、組換え型を選抜して、ゲノム情報を活用しながら耐性遺伝子の遺伝子座付近の精密遺伝地図を作製した。さらに、耐性遺伝子座を確実に選抜可能なマーカーも作成した。さらに、この領域が効率的に置換された組換え置換系統を「はるな二条」の耐塩性同質置換系統とした。

以上の内容のうち、ゲノム情報とSNP解析については複数の論文と学会発表で公開した。また、ゲノム育種の手法については書籍として出版した。遺伝子の形質転換実験については T_1 での耐塩性を評価する予備実験を進めており、その結果を解析して論文投稿を予定している。また、耐塩性の精密マッピングと候補遺伝子の同定およびDNAマーカーの開発に関する論文の投稿も予定している。さらに、染色体組換え置換系統由来の同質遺伝子系統は種苗登録申請に向けた準備を進め、将来的に海外での中間母本としての活用を図りたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Karafiátová M., Bartoš J., Kopecký D., Ma L., Sato K., Houben A., Stein N. and Doležel J., 2013, Mapping

non-recombining regions in barley using multicolor FISH., *Chromosome Res.* 21: 739-751, 査読有り,
doi:10.1007/s10577-013-9380-x
佐藤和広, 2013, オオムギゲノム多様性の解析と育種への応用., *育種学研究* 15: 167-172, 査読無し
Iehisa, M., Shimizu, A., Sato, K., Nasuda, S., and Takumi, S., 2012, Discovery of high-confidence SNPs from large-scale *de novo* analysis of leaf transcripts of *Aegilops tauschii*, a wild wheat progenitor., *DNA Res.* 19: 487-497, 査読有り,
doi: 10.1093/dnares/dss028
The International Barley Genome Sequencing Consortium (IBSC), 2012, A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome., *Nature* 491: 711-716, 査読有り,
doi:10.1038/nature11543
Sato, K., Close, T., Bhat, P., Muñoz-Amatriaín, M., and Muehlbauer, G., 2011, Development of genetic map and alignment of recombinant chromosome substitution lines from a cross of EST donors by high accuracy SNP typing in barley., *Plant Cell Physiol.* 52: 728-737, 査読有り,
doi: 10.1093/pcp/pcr024
Matsumoto, T., Tanaka, T., Sakai, H., Amano, N., Kanamori, H., Kurita, K., Kikuta, A., Kamiya, K., Yamamoto, M., Ikawa, H., Fujii, N., Hori, K., Itoh, T., Takeda, K., and Sato, K., 2011, Construction and sequence analysis of barley 24,783 full-length cDNAs., *Plant Physiol.* 156: 20-28, 査読有り,
doi: http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.171579
Mayer, K. et al. (21 番目/27), 2011, Unlocking an archetypal 5.1 Gb Triticeae genome by barley chromosomal genomics., *Plant Cell* 23: 1249-1263, 査読有り, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.082537
Muñoz-Amatriaín, M. et al. (22 番目/27), 2011, An improved consensus linkage map of barley based on flow-sorted chromosomes and SNP markers., *The Plant Genome* Vol. 4 No. 3, 査読有り,
doi:10.3835/plantgenome2011.08.0023

[学会発表] (計6件)

佐藤和広・元井由加, cDNA 解析によるオ

オムギゲノム育種用 DNA マーカーの開発, 日本育種学会講演会, 2012 年 9 月 14 日 ~ 15 日, 京都

佐藤和広, オオムギゲノム配列の概要, ムギ類研究会, 2012 年 11 月 28 日 ~ 29 日, つくば

佐藤和広, オオムギゲノム多様性の解析と育種への応用(平成 24 年度日本育種学会賞受賞講演), 日本育種学会講演会, 2013 年 3 月 27 日 ~ 28 日, 東京

Kazuhiro Sato, Barley natural variation and adaptation to global environments., 16th Australian Barley Technical Symposium, Sofitel Melbourne on Collins, 2013, September 8 - 11, Melbourne, Australia

佐藤和広・元井由加, オオムギ遺伝資源コレクションの全ゲノム SNP フィンガープリンティング, 日本育種学会講演会, 2013 年 10 月 12 日 ~ 13 日, 鹿児島

[図書] (計3件)

福井希一・向井康比古・佐藤和広, 2013, 朝倉書店, 植物の遺伝と育種第 2 版, 238

Sato, K., Flavell, A., Russell, J., Börner, A., and Valkoun, J., Genetic diversity and germplasm management - wild barley, landraces, breeding materials. Kumlehn, J., and Stein, N., (eds.) *Biotechnological Approaches to Barley Improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer (印刷中) 査読有り

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 和広 (SATO KAZUHIRO)

岡山大学・資源生物科学研究所・教授
研究者番号: 60215770

(2) 研究分担者

久野 浩 (HISANO HIROSHI)

岡山大学・資源生物科学研究所・助教
研究者番号: 70415454