

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880025

研究課題名(和文) オオムギの形質転換成否を左右する遺伝因子の同定

研究課題名(英文) Identification of genetic factors affect the success or failure of the transformation in barley

研究代表者

久野 裕 (Hisano, Hiroshi)

岡山大学・その他部局等・助教

研究者番号：70415454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：形質転換可能なオオムギ品種「Golden Promise」を交配親とした遺伝解析集団を用いて形質転換の成功に必要なゲノム領域を探索したところ、染色体1番(1H)、2番(2H)、3番(3H)、6番(6H)、7番(7H)のそれぞれ一部に関連遺伝子が存在することが推定された。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、「Golden Promise」のカルスに特異的な発現パターンを示す遺伝子を4308個検出した。オオムギカルスに内在する植物ホルモン分析を行ったところ、カルスの再分化にはオーキシンが正の作用を、アブシジン酸とサリチル酸が負の作用を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We explored the genomic regions required for genetic transformation by using a mapping populations generated from barley cv. Golden Promise, which was a reliable cultivar for transformation. As a result of this, the partial region of chromosome No. 1H, No. 2H, No. 3H, No. 6H and No. 7H were estimated as the positions of candidate genes. Then we isolated 4308 genes which expression patterns were specific in Golden Promise by a comprehensive gene expression analysis using microarray. In the analysis of phytohormone, we identified that auxin showed a positive effect in regeneration of barley callus, although abscisic acid and salicylic acid showed negative.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：植物ホルモン 再分化 マイクロアレイ オオムギ 形質転換

## 1. 研究開始当初の背景

オオムギは、イネ、コムギ、トウモロコシに次ぐ主要なイネ科の作物であり、cDNA やゲノム概要配列などのゲノムリソースが整備されている。しかし、形質転換系が確立されているイネに比べて、オオムギは汎用な形質転換法が整備されておらず応用研究も遅れている。

「Golden Promise」は、オオムギの中で唯一安定して形質転換体を得られる突然変異品種である (Harwood 2012, J. Exp. Bot. 63: 1791-1798)。これまでに、国内外の限られた研究室でアグロバクテリウム法によって「Golden Promise」の形質転換の成功例が報告されている (Vyrubalova et al. 2011, Biologia Plantarum 55: 213-224)。国内では、申請者が所属する研究室によって「Golden Promise」由来の形質転換体を得ているが (Fujii et al. 2012, Nature Commun. 3: 713)、その作製効率は概ね 5%程度にとどまっている。一方で、優良品種である「はるな二条」や「Morex」は、全ゲノム解読が進行中であるなどゲノム情報が豊富に蓄積されているが、形質転換は今のところ非常に困難である。「Golden Promise」は我が国の栽培条件では極晩生で病害にも弱いなど、応用研究の材料として相応しくないことから、「はるな二条」等の優良系統でも安定して形質転換できる実験系を確立することが応用研究の進展において必要・急務である。

オオムギ形質転換の成否には、以下の 4 点が重要なポイントとして挙げられる。

- (1) アグロバクテリウムが未熟胚に感染するか
- (2) 未熟胚からカルスが誘導されるか
- (3) カルス増殖が旺盛か
- (4) カルスから再分化可能か

これまでに申請者が所属する研究室では、GUS 遺伝子 (レポーター遺伝子) の一過性発現検定によって、「はるな二条」と「Golden Promise」の両方の未熟胚にアグロバクテリウムが感染することを確認している (山根ら、未発表)。また、アグロバクテリウムを感染させていない「はるな二条」と「Golden Promise」の未熟胚からのカルス誘導も確認している (山根ら、未発表)。ただし、「はるな二条」由来のカルスは継代培養すると徐々に水っぽくなり、増殖と再分化が困難であった。従って、「はるな二条」は上記条件(1)と(2)は満たしているが、条件(3)と(4)に関わる部分で「Golden Promise」との間に違いがあると考えられる。

## 2. 研究の目的

申請者は、オオムギの遺伝子機能解析やタグライン作製などのポストゲノム研究・応用研究を大規模に進めることを前提とした高効率転換系の確立を目指している。それに先

立ち、複数の有用品種で形質転換可能なプロトコルを作製することを目標として、「はるな二条」と「Golden Promise」ならびにそれらを両親とする染色体置換系統を用いて、オオムギ形質転換の成否の要因を解明しようとした。本申請研究では、以下の 3 点を明らかにすることを目的に研究を進めた。

(1) 染色体置換系統を用いた形質転換成否に関わる遺伝子座 (領域) の染色体断片レベルでの決定。

(2) 「はるな二条」と「Golden Promise」に由来するカルスを用いたマイクロアレイ解析による発現量が異なる遺伝子の同定。

(3) オオムギカルスにおける、サイトカインやオーキシンなどの細胞増殖・組織形成に関わる植物のホルモンの分析。

## 3. 研究の方法

### (1) 交配後代を用いた遺伝的解析

申請者が所属する研究室の佐藤和広教授によって、「Golden Promise」と「はるな二条」を交配した後代に「はるな二条」を 3 回戻し交雑した後、自殖して得た部分的染色体置換系統 (以下 BC3F7-HGP) が 87 系統作出されている。戻し交雑を 3 回行っているため、各系統の染色体は、理論上 15/16 が「はるな二条」由来、1/16 が「Golden Promise」由来である (ちなみに、これはオオムギ染色体腕のゲノム量に相当する)。これまでに、カスタム作製した SNP アレイシステムによって、BC3F7-HGP 各系統の置換部分を明らかにしている。本研究では、BC3F7-HGP から選抜した全ゲノムを包括した 40 系統ならびにその両親である「はるな二条」と「Golden Promise」を用いて、オオムギの形質転換の成否について分析した。具体的には、BC3F7-HGP から得られる未熟胚を用いて形質転換体の作製を試みた。遺伝子供与体として pIG121Hm (GUS 遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子が含まれたバイナリーベクター) を持つアグロバクテリウム株「EHA101」あるいは「AGL1」を用いた。

また、同時並行で、「Golden Promise」を交配親に用いた組換え自殖系統 (RIL-HGP) や野生オオムギ系統「H602」と「Golden Promise」との交配後代による分析も試みた。

### (2) 「Golden Promise」由来のカルス特異的発現遺伝子の網羅的解析

「Golden Promise」と「はるな二条」のから未熟胚を採取し、カルス誘導培地 (MS 基本培地 + 5mg/L Dicamba) に置床して、25 でカルスを誘導した。誘導開始から 1 ヶ月後のカルスを再びカルス誘導培地に継代したものを「MSD 処理区」、同様に再分化培地 (MS 基本培地 + 3mg/L BAP) に継代し 16 時間日長で再分化誘導したものを「MSB 処理区」として、それぞれ処理開始から 1 週間後に RNA を抽出した。遺伝子発現解析には、これらの RNA

ならびにオオムギ用オリゴ DNA マイクロアレイ (4 K、アジレント社製) を用いた。

### (3) オオムギのカルスにおける植物ホルモンの解析

「Golden Promise」と「はるな二条」ならびに「Morex」の完熟種子を発芽させ、子葉、子葉鞘、根に分解し、それぞれを外植片としてカルス誘導および再分化を行った。さらに、上記 3 品種の未熟胚からカルス誘導を行い、再分化を行った。これらのカルスから含有物質を抽出し、微量生物物質・植物ホルモン解析装置(LC/MS/MS)によって植物ホルモンを定量した。なお、未熟胚由来のカルスに関しては、(2)と同様に MSD 処理区と MSB 処理区を設けた。これらの結果をもとに、カルスの再分化と内在する植物ホルモン量の関係を考察した。

## 4. 研究成果

### (1) 交配後代を用いた遺伝的解析

BC3F7-HGP から選抜した全ゲノムを包括した 40 系統に由来する未熟胚を用いて形質転換を試みたが、形質転換体は 1 つも得られなかった。Tyagi et al. (2010, Crop Sci., 50: 1697-1707) のカルスにおける再分化能の QTL 解析によれば、その再分化には少なくとも 4 つのゲノム領域(染色体 2 番(2H)、3 番(3H)、6 番(6H)、7 番(7H)) が関わっている。BC3F7-HGP は、大半が「はるな二条」のゲノムに置き換わっているため、「Golden Promise」が持つ形質転換に必要な要素の組み合わせが欠損していると推測される。

一方、並行して実施していた「H602」と「Golden Promise」との交配後代(「Golden Promise」を戻し交雑している)を用いた実験では、形質転換体を得ることが出来た。そのゲノム置換領域を調査したところ、Tyagi et al. (2010) が指摘している再分化に必要な QTL 領域は、全て「Golden Promise」に置き換わっていた(2H、3H、6H、7H)。また、1 番染色体(1H)の一部で、形質転換に必要と考えられる領域が検出された。イネで見いだされたカルスの再分化に影響を及ぼす ferredoxin-nitrate reductase (Nir) 遺伝子をマッピングしたところ、6H に座乗したものの、形質転換に必要な領域とは異なった。今後は、RIL-HGP を用いて形質転換実験を行い、見いだされた領域内の原因遺伝子の絞り込みを行う予定である。

### (2) 「Golden Promise」由来のカルス特異的発現遺伝子の網羅的解析

マイクロアレイによる遺伝子発現解析の結果、「Golden Promise」と「はるな二条」間での発現量の差が 2 倍以上の遺伝子が合計 4308 個検出された(表 1)。そのうち、MSD あるいは MSB の片方の処理区でのみ発現差異が見られる遺伝子が 3030 個、品種間の遺伝

子発現の強弱が処理区で逆転した遺伝子が 81 個それぞれ検出された。「Golden Promise」は、カルスの増殖や再分化能が「はるな二条」に比べて優れており、これらの遺伝子の一部はその表現型に關与する遺伝子であると推測される。また、MSD と MSB の両処理区で発現差が見られた遺伝子は 1197 個であり、これらは処理区に依らない品種間の発現差異であることを示している。発現差異が見られた遺伝子の中には、植物ホルモン(オーキシン、アブシジン酸、ジャスモン酸、ジベレリン)に關連したものが含まれていた。

表1 2品種の未熟胚由来のカルス間で2倍以上の発現差異が認められた遺伝子数

発現量	両処理区	MSD処理区	MSB処理区	処理区で逆転	
Golden Promise > はるな二条	555	294	1119	27 (MSD), 54 (MSB)	
Golden Promise < はるな二条	642	631	986	54 (MSD), 27 (MSB)	
小計	1197	925	2105	81	
					合計 4308

\*MSD処理区はカルス誘導培地に継代したもの、MSB処理区は再分化誘導したものをそれぞれ示す。

### (3) オオムギのカルスにおける植物ホルモンの解析

各品種・組織由来のカルスの再分化率を調査したところ、品種間では「Golden Promise」由来のカルスの再分化率が最も高く、組織間では未熟胚由来のカルスの再分化率が最も高かった。「Morex」由来のカルスは、どの組織由来のカルスもほとんど再分化しなかった。

次に、各カルスにおける植物ホルモン分析を行った。その結果、インドール酢酸(オーキシン)の含有量は、「Golden Promise」の未熟胚由来のカルスで最も高く、「Golden Promise」の根由来のカルスや「Morex」由来のカルスで低い値を示した(図 1)。ゼアチン(サイトカイニン)の含有量は、品種間では「Golden Promise」由来のカルスが高く、組織間では子葉由来のカルスで高い傾向を示した。これらの植物ホルモンは、カルスの増殖や再分化に大きく影響しているものと考えられる。

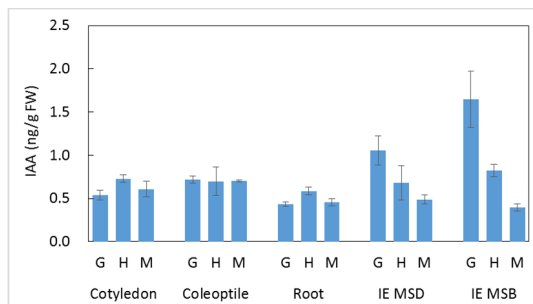


図1 オオムギカルスにおけるインドール酢酸の含有量(IAA) G; Golden Promise, H; はるな二条, M; Morex, Cotyledon; 子葉鞘由来のカルス, Coleoptile; 子葉鞘由来のカルス, Root; 根由来のカルス, IE; 未熟胚由来のカルス, MSD; MSD処理区, MSB; MSB処理区

一方、再分化率が低いカルスの中で、「はるな二条」の未熟胚由来のカルスでアブシジン酸が、「Morex」由来のカルス全般でサリチル酸が多く検出された。これらの植物ホルモンは、カルスの再分化に負の影響を及ぼしているものと予想される。現在、マイクロアレイの結果とこれらの結果を関連付け、植物ホルモン関連遺伝子のマーカー作製を行っている。

#### 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)

[学会発表](計3件)

久野 裕 (研究代表者)、松浦 恭和、森 泉、山根 美樹、佐藤 和広 「オオムギの異なる組織に由来するカルスのホルモン分析」 日本育種学会第124回講演会、2013年10月13日、鹿児島大学 (口頭発表)

久野 裕 (研究代表者)、西村 秀希、佐藤 和広 「マイクロアレイによるオオムギカルスの網羅的な遺伝子発現解析」 日本育種学会第125回講演会、2014年3月22日、東北大学 (ポスター発表)

Hiroshi Hisano (研究代表者), Hideki Nishimura, Takakazu Matsuura, Izumi Mori, Miki Yamane and Kazuhiro Sato 「Microarray and hormone analysis of the calli derived from different organs and genotypes in barley. EUCARPIA Cereals Section ITMI Joint Conference, 2014年6月29日-7月4日、ワーゲニゲローデ、ドイツ (ポスター発表)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

久野 裕 (HISANO, Hiroshi)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：70415454