



岡山大学
資源生物科学研究所
准教授
博士（農学）
佐藤和広

昭和 56 年 北海道大学農学部卒業
平成元年 北海道立農業試験場研究員
平成元年 岡山大学資源生物科学研究所
助手
平成 5 年 同上 助教授（現准教授）

オオムギ遺伝地図を利用した遺伝子単離法の改良

はじめに

オオムギでは産業的に重要な形質を解析するための遺伝子地図作製が進められており、これらの形質に関する遺伝子の単離と選抜技術の開発が重要な研究テーマとなっている。単離された遺伝子からは遺伝子の構造そのものに関わる多くの情報が得られると同時に、品種間の比較によって、形質そのものを制御する遺伝子多型を利用した効率的な育種システムの開発が可能である。現在、オオムギの遺伝子単離は他の生物種との遺伝子の相同性や、高密度な遺伝地図を用いた、いわゆるマップベースクローニングによって進められているが、イネなどゲノム配列が既知の生物種に比べて、単離の効率は極めて低い。オオムギの遺伝的な機能を最大限に発揮させるためには遺伝子の塩基配列を知り、その機能を推定すると共に、タンパク質、抗体などを含めた遺伝子産物の制御技術を開発することが必要である。このためには遺伝子の高速な解読技術の導入が不可欠である。

近年、これまで主流だったサンガー法とは異なる高速な配列解析法が開発されて、注目を集めている。中でも、454社が開発した並列配列解析法による配列解析は4時間で20Mbpの解析能力を有しており、菌類等イントロンのない小さなゲノムはショットガン法によって一回の解析で全ゲノムの配列解析が可能である。ただし、それぞれの読みは平均100塩基しかないために、反復配列の多い高等生物、中でも高等植物への応用は難しいと考えられる。本研究は、このような最近開発された並列DNAシーケンサーによって、目的とする遺伝子から産生されたmRNA配列に基づいて、「はるな二条」の遺伝子を有するゲノムライブラリーをスクリーニングし、遺伝子配列を解析する技術の改良を試みた。

オオムギのゲノム配列解析は準備段階であり、大規模な遺伝子配列決定は少なくとも2008年以降になると考えられる。その中で、遺伝子単離技術の改良は必須である。また、オオムギはコムギ、ライムギを含めたムギ類のモデルゲノムとして利用できるため、オオムギの遺伝子配列を利用したコムギの遺伝子単離を進める上でも、本研究は重要である。さらに、数年後に想定されている米国品種「Morex」を利用したゲノム配列解析が行われ

際には、2つの異なる高品質なビールオオムギの遺伝子配列を容易に取得できる。このような遺伝子配列間の品種間差異を利用して、塩基多型によるマーカー作製や表現型との関連などの育種学的、遺伝学的な情報を得るための基礎を本研究で作ることができる。

塩基配列解析法

4H染色体上の極近傍にマップされている8つのESTマーカーおよび1つのSSRマーカーそれぞれを含む9つの「はるな二条」BACクローンをPCR法によりスクリーニングし(図1; Saisho et al. 2007)、DNAを分離して、等量混合の後に454社に送付して受託解析した。マーカーでは標準的プロトコルに従ってショットガンライブラリーを作成し、DNA断片と解析用ビーズを含むエマルジョン溶液中でPCR反応を行った後、ビーズの洗浄と計数を行った。このビーズの周りにPCR産物の付着したサンプルを160万穴のピコタイタープレートに収め、並列DNAシーケンサーGS20で配列解析した。解析はパイロシーケンス法によって標識された塩基を1反応ずつ168回繰り返して、約20万個のビーズの配列を並列して解析する手法によった。解読した配列は解析装置に付属のアセンブラおよびphrapで遺伝子配列を含む整列配列を取得した。整列配列は選抜に用いたEST(cDNA)配列およびその他のオオムギ由来の配列との相同性を比較すると共に、イネゲノムのための自動遺伝子予測システム(RICEGAAS)によって遺伝子予測を試みた。

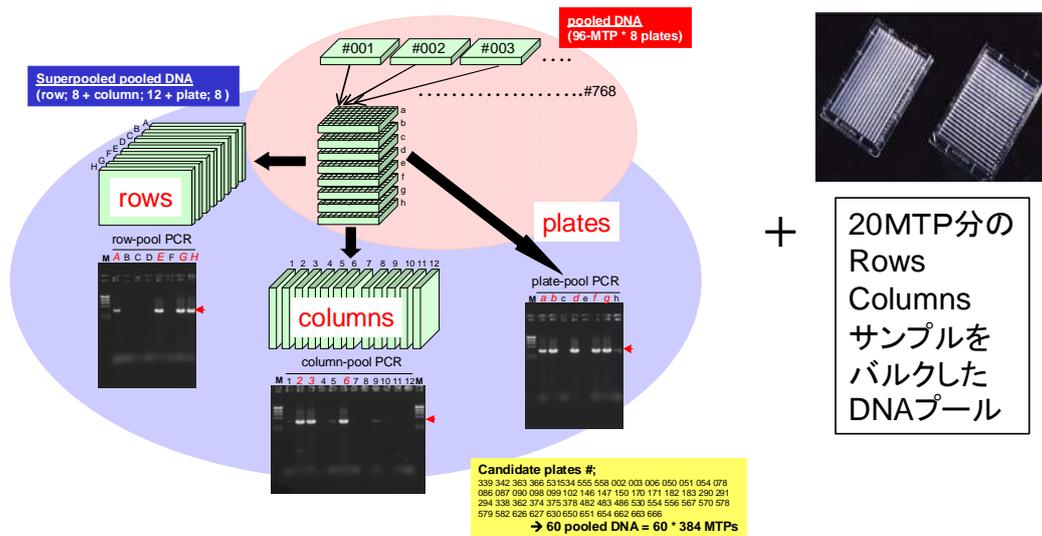


図1 はるな二条 BAC ライブラリーからの目的クローンの選抜システム。約 30 万クローンが 768 枚のプレートに収められており、各プレートから抽出した DNA を 3 次元的に組み合わせる目的のクローンのあるプレートを同定し (左)、プレートの Row、Column 別に混合したサンプルを併用して (右)、PCR67 回で目的クローンを同定する。

配列解析の効率と遺伝子同定精度

本研究で用いたオオムギの BAC ライブラリーの平均インサートサイズは 115kb なので (Saisho et al. 2007)、20Mb の解読を行うと一度に 8-9 クロンを 20 倍の読みで解析できることになる。本実験の解析では 1 回の解析で 22.7 万の読みが得られ、23.4Mb の品質調整済みの塩基を解読した (平均 103 塩基/読み)。この結果を国立遺伝学研究所のスーパーコンピュータによって整理して 1,159 の整理配列を作製し、最長の配列は 45kb 程度になった。この整理配列とマーカーの EST 配列を相同性解析したところ、全ての EST 配列がいずれかの整理配列に高精度にヒットした。ヒットした整理配列の塩基数は 1 クロンを除いて 8,628bp から 33,950bp と十分に長かった。さらに EST のうち 4 組 (3' および 5') について完全長 cDNA 配列を整理配列と相同性解析したところ、blastn スコアで e-168 から 0 (完全一致) の高精度でヒットした (図 2)。従って、得られた整理配列の中には EST あるいは完全長 cDNA を全て含むゲノム配列が存在し、遺伝子の全長配列が含まれている可能性の高いことが示唆された。また、現在利用可能な全てのオオムギ EST 配列および未公開の完全長 cDNA 配列を本実験の整理配列と相同解析したところ、BAC クローンあたり 3-4 個の遺伝子様配列の存在することが確認された。従って、EST マーカーで同定した BAC クロンを解析すれば、複数の遺伝子が同時に解析できることが示唆された。

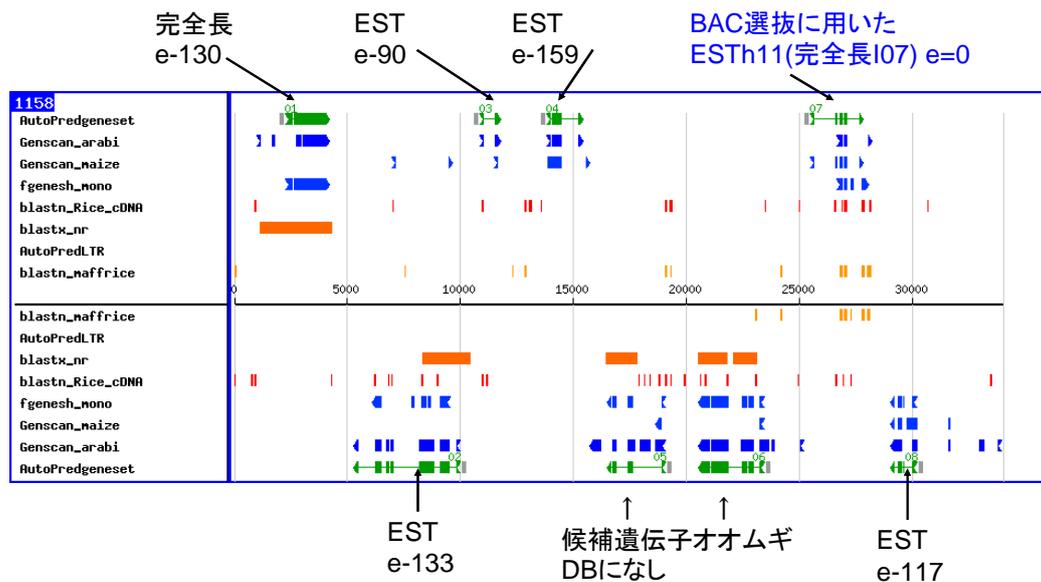


図 2 並列配列解析によって得られた 33kb の整理配列およびイネゲノム自動アノテーションシステム (RICEGAAS) による遺伝子予測とオオムギ EST および完全長 cDNA のマッピング

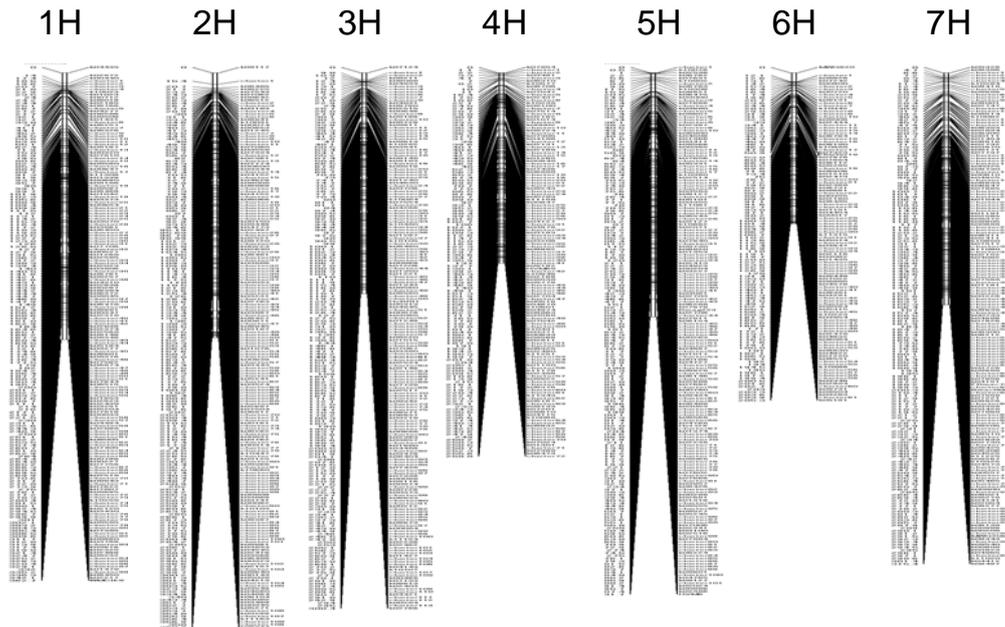


図3 岡山大学で作成した2,890のオオムギESTを含む高密度転写産物地図

遺伝子単離への応用

遺伝地図を利用したオオムギ遺伝子の単離はこれまで高々十例ほどが報告されているにすぎず(Furukawa et al. 2007, Taketa et al. 2008)、しかも一つの遺伝子の単離に数年を要するのが普通である。また、産業上重要な形質の多くが含まれる量的な遺伝子座はほとんど単離されていない。このため、遺伝子配列の取得を容易にするためにはイネのように鋳型となる系統の遺伝子のゲノム配列の解析が必須である。オオムギのゲノム配列解析を行う際に、イネやアラビドプシスのようにBAC等のクローンを整列化して、クローン単位で配列解析し、ギャップを全て埋める手法を利用することはいまだ困難と考えられている。そのため、特定の染色体をフローサイトメトリー等の手法を用いて収集し、これに基づくBACライブラリーの作製、遺伝子領域を選択的に抽出するフィルトレーションなどの技術を用いて、遺伝子領域のみを効率的に配列解析する手法が考案されている。

一方、本研究で提案しているゲノム配列解析法は、遺伝地図を利用して目的とする遺伝子領域の遺伝子配列のみを能率的に取得できるので、比較的小規模な研究グループにおいて導入しやすい研究手法である。我々が開発した約3,000の非冗長ESTからなる転写産物地図は、現在世界で最も高密度なオオムギの遺伝地図であり、オオムギゲノムの遺伝子の1割弱が同定されているとみられる(図3)。オオムギとイネは共通祖先を持つとされているので、この遺伝地図を用いてイネのゲノム配列からオオムギのゲノムの相同領域を推定し、イネのゲノム情報を利用することが可能である。イネの12倍以上とみられるオオ

ムギゲノムを解読することは、予算的、技術的に多くの困難を伴うことが予想されるが、本年からドイツを中心とする北ヨーロッパ諸国で全ゲノムにわたる「Morex」の BAC のフィンガープリンティングおよび整列化がすすんでいる。一方、我々は「はるな二条」のゲノムを鋳型として、BAC ライブラリー、未公開配列を含めて約 20 万の大量の EST および現在進行中の完全長 cDNA 解析、高密度転写産物地図および染色体組換え置換系統 (Hori et al. 2005) の全てについて独自にリソース開発を進めてきた。このような「はるな二条」のリソースを利用して、「Morex」のゲノム鋳型とした「はるな二条」の並列シーケンシング、および「はるな二条」の cDNA による「Morex」ゲノムへのマッピングなどが将来的に可能となる。

以上のように、マップを利用したオオムギの遺伝子単離技術は新しい技術の導入によってめまぐるしく変化している。このような手法によってオオムギの遺伝子単離は大きく前進しているので、醸造や生産性にかかわる重要な遺伝子の単離も目前に迫っている。

参考文献

- Hori, Kiyosumi, Kazuhiro Sato, Nami Nankaku and Kazuyoshi Takeda. 2005. QTL analysis in recombinant chromosome substitution lines and doubled haploid lines derived from a cross between *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* and *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. *Molecular Breed.* 16: 295-311.
- Saisho, Daisuke, Eriko Myoraku, Shinji Kawasaki, Kazuhiro Sato and Kazuyoshi Takeda. 2007. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome (BAC) library for Japanese malting barley 'Haruna Nijo'. *Breed. Sci.* 57:29-38.
- Furukawa, Jun, Naoki Yamaji, Hua Wang, Namiki Mitani, Yoshiko Murata, Kazuhiro Sato, Maki Katsuhara, Kazuyoshi Takeda and Jian Feng Ma. 2007. An Aluminium-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* 48:1081-1091.
- Taketa, Shin, Satoko Amano, Yasuhiro Tsujino, Tomohiko Sato, Daisuke Saisho, Katsuyuki Kakeda, Mika Nomura, Toshisada Suzuki, Takashi Matsumoto, Kazuhiro Sato, Hiroyuki Kanamori, Shinji Kawasaki, and Kazuyoshi Takeda. 2008. Barley grain with adhering hulls is controlled by an ERF family transcription factor gene regulating a lipid biosynthesis pathway. *PNAS* (in press)