

1. 研究課題名 : 植物のアルミニウムストレス耐性機構
V. 大麦アルミニウムストレス耐性関連遺伝子
(群) QTL 解析に向けた [大麦分子地図作成]
2. 研究機関 : 農林水産省九州農業試験場育種工学研究室
3. 研究者 : 斎藤 彰
4. 研究協力者 : 宮崎 力 (科学技術振興事業団派遣研究員)
小内山英一 (キリンビール植物工学研究所)
佐伯知勇 (サッポロビール植物工学研究所)
5. 研究期間 : 平成7年から平成11年
6. 要約

酸性/アルミニウムストレス応答遺伝子群を量的形質座位 (Quantitative Trait Loci) と捕え遺伝子連鎖分析 (QTL mapping) するために、本研究では、日本の二条醸造用大麦 KoA と中国の六条野性大麦 Mokusekko3 由来の 120 個体 F₂ 集団を用いて RFLP 地図を作成した。1 つのアイソザイム、1 つの形態マーカー、177 の RFLP マーカーを用いて 222 座位をマップした。地図全長は 1389 cM であり、マーカー間平均距離は 6.3 cM であった。雌配偶子の組換えを表わす *Hordeum bulbosum* (Hb) 由来の倍化半数体 (DH) 集団を用いた最も代表的な大麦 RFLP 地図とその地図を比較した。共通な 60 の RFLP マーカーの順列は同様で、大きな染色体再構成は検出できなかった。共通な隣り合った RFLP マーカー間で 6 ヶ所の組換え価が異なっていた。しかし全領域にわたっては F₂ 集団と DH 集団由来の地図は非常に相同であった。本研究で新規に開発した RFLP マーカーと RFLP 地図は、酸性/アルミニウムストレス耐性関連遺伝子の QTL マッピングに有用である。

7. 研究目的

地球上の植物は、問題土壌による栄養障害、極端な高温や低温、乾燥や高湿、紫外線あるいは放射線など様々なストレスに絶えず曝されて生育している。さらに、植物に感染する病害虫やウイルスによる細胞障害も広い意味でのストレスと考えられる。植物はこのような環境ストレスに対して積極的に応答し、ストレスから回避する機構を進化の過程でストレス耐性遺伝子獲得してきたものと思われる。このような種々のストレスに対して植物がどのような耐性機構を持つかを理解するためには、生理学的耐性機構の解明と同時に、ストレス耐性に関与する遺伝子 (群) の単離同定とその発現制御機構解明することが重要である。本研究では、植物の生育に影響を及ぼす環境ストレスの中でも、近年環境汚染による土壌の酸性化や環境保全の必要性から深刻な問題となってきた酸性土壌ストレス、特に酸性土壌における遊離したアルミニウムイオンによる生育障害に注目した。作物、特に穀物生産の多くを占めるコムギや大麦はアルミニウムイオンにより生育障害を受ける¹⁾。それら作物ではその遺伝資源から、よりアルミニウムに耐性な品種を選抜し、その耐性遺伝子を一般交雑で導入している²⁾。アルミニウムに耐性の作物種は多く知られているが、優性の酸性耐性遺伝子 (*Ph*)³⁾、優性のアルミニウム耐性遺伝子 (*Alt*)⁴⁾ がすでに 2 倍体の作物は大麦とライムギで報告されている。すでに本研究「III. 酸性土壌アルミニウムストレス下における大麦種子根と冠根の

異なった応答機構」、**「IV. 酸性、アルミニウムストレス下の水耕栽培における大麦根の応答機構」**から酸性/アルミニウム耐性関連遺伝子(群)は複数あると推定された。応答遺伝子の単離はこれまでサブトラクション法, cDNA ライブラリーの多型 ARFP 法, さらには cDNA ライブラリークローンを個々に分析する DNA マイクロアレー法等により応答に特異的な遺伝子を選抜する方法が開発された。しかし、いくつか複数の遺伝子が単離された時、それらの応答に対する関連度, 寄与率を解析できない。遺伝子導入による検証が必要とされ多くの遺伝子については事実上困難である。しかし、それらの応答遺伝子群を量的形質座位 (Quantitative Trait Loci)と捕え遺伝子連鎖分析 (QTL mapping)すると、それらの応答に対する関係(優性, 劣性), 寄与率が推定できる。一方応答形質はいくつかの形質の総合であるため、形質を細分化し、それぞれの形質の遺伝子座は QTL mapping による遺伝子座に対応すると考えられる。このために、遺伝子連鎖分析用 F₂ 集団と新しい分子マーカーを開発した大麦制限酵素断片長多型(Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) 地図を作成することは重要である。本研究では、酸性・アルミニウム耐性遺伝子を持ち、2倍体で遺伝子連鎖分析ができ、また、ゲノムサイズがコムギの3分の1である大麦を材料として、アルミニウム過剰害を中心に金属ストレスに対する植物細胞の応答や耐性機構を分子遺伝学的に解明することを目的としている。従来動物・植物の形質遺伝子は生理・生化学的研究から関連する蛋白質を単離・同定し、そのアミノ酸配列情報から遺伝子を単離・同定する手法がとられてきた、しかし、今日古典的遺伝学で遺伝子座として解析された形質遺伝子は、その遺伝子座を近傍にある DNA マーカーで分子地図上にマップし、さらに両側の DNA マーカーを持った巨大ゲノミック断片をそのライブラリーから選抜し、両側の DNA マーカー間のゲノミック DNA を解析する手法(マップベースドクローニング)でいくつかの農業形質が効率的に単離・同定されている^{5, 6, 7)}。すでに本研究(III, IV)から酸性・アルミニウム耐性遺伝子は複数であることが示唆されている。そこで本研究(V)では複数の酸性・アルミニウム耐性遺伝子(群)をマップするために、RFLP マーカーを開発して大麦 RFLP 地図を作成することを目的とした。

8. 材料と方法

大麦品種：

遺伝子連鎖分析用 F₂ 集団, 120 個体を日本の二条醸造用品種 KoA × 中国六条在来種 Mokusekko3 の交配で作成した。F₁, F₂ 種子の稔性は 95%以上であった。

既存の RFLP マーカー：

本遺伝子連鎖分析を行うには RFLP を示す DNA マーカーを選択する必要がある。大麦の DNA(RFLP) マーカーとして, North American Barley Genome Mapping Project (NABGMP) から 192⁸⁾, Cornell Univ.から 46⁹⁾, ドイツのグループから 59 の総計 290 マーカー¹⁰⁾を分譲して戴いた。

新規 RFLP マーカーの開発：

ゲノミック DNA ライブラリー作成は KoA を材料とし, 認識配列 DNA がメチル化されると切断できなくなる制限酵素 HpaII でゲノミック DNA を切断し, 断片長が 0.5-1.5 kb のもの

を pBluescriptSk-の ClaI site に結合後，大腸菌宿主 JM109 に導入してクローニングした。上記ゲノミック DNA ライブラリーの全クローンに対して全ゲノミック DNA をプローブとして1あるいは数コピーのクローンを選抜した。選抜されたクローンは接頭語の JBG を付けた。一方 cDNA ライブラリーは発生的に特性が低いカルス(Igri; ドイツ二条冬大麦)由来の mRNA から常法^{1 1)}に従って，pBluescriptSk-の EcoRI, NotI site にクローニングした。それらのクローンには接頭語の JBC を付けた。

既存の RFLP マーカーと新規 RFLP マーカーの RFLP 検定：

遺伝子連鎖分析に用いた F₂ 集団の親品種からゲノミック DNA を常法^{1 2)}に従って抽出した。抽出したゲノミック DNA 5 μg を制限酵素 BamHI, BglII, DraI, EcoRV, HindIII, XbaI で消化した。消化した 5 μg DNA は 0.8%のアガロースゲル電気泳動に供し，ゲル中の DNA はナイロンフィルターに転写した。サザンハイブリダイゼーションのプローブとして用いる RFLP マーカー DNA はアイソトープ 32P や，非アイソトープ法 (ECL, DIG) で標識した。

アイソザイムと形態マーカー：

F₂ 集団の各個体の葉を破碎した液を酵素液としてデンブングゲル電気泳動後常法^{1 3)}に従いエステラーゼ I 活性染色した。大麦の条性 (二条 / 六条) を F₂ 個体当たり F₃ の 30 個体で検定した。

遺伝子連鎖分析：

F₂ 集団 120 個体中における RFLP マーカー，アイソザイムマーカー，形態マーカーの分離から，連鎖解析ソフト Mapmaker2^{1 3)}を用いてそれらの組換え価，順列を決定した。地図距離は組換え価を二重交差を考慮した Kosambi 係数^{1 4)}で変換し cM とした。また地図距離の比較は組換え頻度とその誤差値を t - 検定して判定した。

9. 結果

1) RFLP スクリーニング :

既存の 240RFLP マーカーは F₂ 集団の親品種 KoA, Mokusekko3 のゲノミック DNA (6種の制限酵素で消化した) に対して, 184 (77%) マーカーが RFLP を示した (Table 1). RFLP の頻度はマーカーの植物材料, 大麦やコムギのゲノミック DNA, あるいは大麦やオートムギの cDNA に因らずほぼ等しかった。既存のマーカー中, サザンハイブリダイゼーションパターン解析が容易な 91 マーカーをマップした。

Table 1. 既存 DNA マーカーの RFLP スクリーニングと地図にマップした数

Marker type	Barley					Wheat		Oat		Total
	genomic DNA		cDNA			sub	genomic	cDNA		
Clone name	ABG	MWG	ABC	cMWG	BCD	WG+ksu	CDO			
Screened	74	62	49	10	7	202	23	15	240	
RFLP	60	45	35	8	4	152	19	13	184	
RFLP(%)	81	73	71	80	57	75	83	87	77	
Mapped	32	21	22	2	0	77	8	6	91	
Loci detected	35	27	33	2	0	97	13	7	117	

新規開発 RFLP マーカー :

308 の HpaII ジェノミッククローン(JBG)から, 低コピークローンが 114 選抜され, このうち 57(50%) JBG クローンが KoA と Mokusekko3 の間で RFLP を示した。また, 129cDNA クローンの内 35cDNA (27%)JBC クローンが 2 品種間で RFLP を示した (Table 2)。サザンハイブリダイゼーションパターン解析が容易な 57JBG クローンと 29 JBC クローンで 103 座位をマップした。

Table 2. 新規 DNA マーカーの RFLP スクリーニングと地図にマップした数

Marker type	Barley		Total
	genomic DNA	cDNA	
Clone name	JBG	JBC	
Screened	114	129	243
RFLP	57	35	92
RFLP(%)	50	27	
Mapped	57	29	86
Loci detected	70	33	103

2) RFLP 地図作成

118 のゲノミック DNA と 59 の cDNA クローンが 120 の F₂ 集団内で分離データから、それらは 7 の連鎖群に分けられた。すでに座乗染色体が報告されている 1 コピーの既存 RFLP マーカー情報から 7 の連鎖群を 1H から 7H と対応させた。地図の全長は 1389 cM であり、177 の RFLP マーカーとによる 220 座位と、アイソザイムマーカー 1 座位、形態マーカー 1 座位の計 222 座位から構成された。染色体全域でマーカー間の平均は 6.3 cM であり、25 cM を超えるギャップは 3 カ所であった (Fig. 1)。

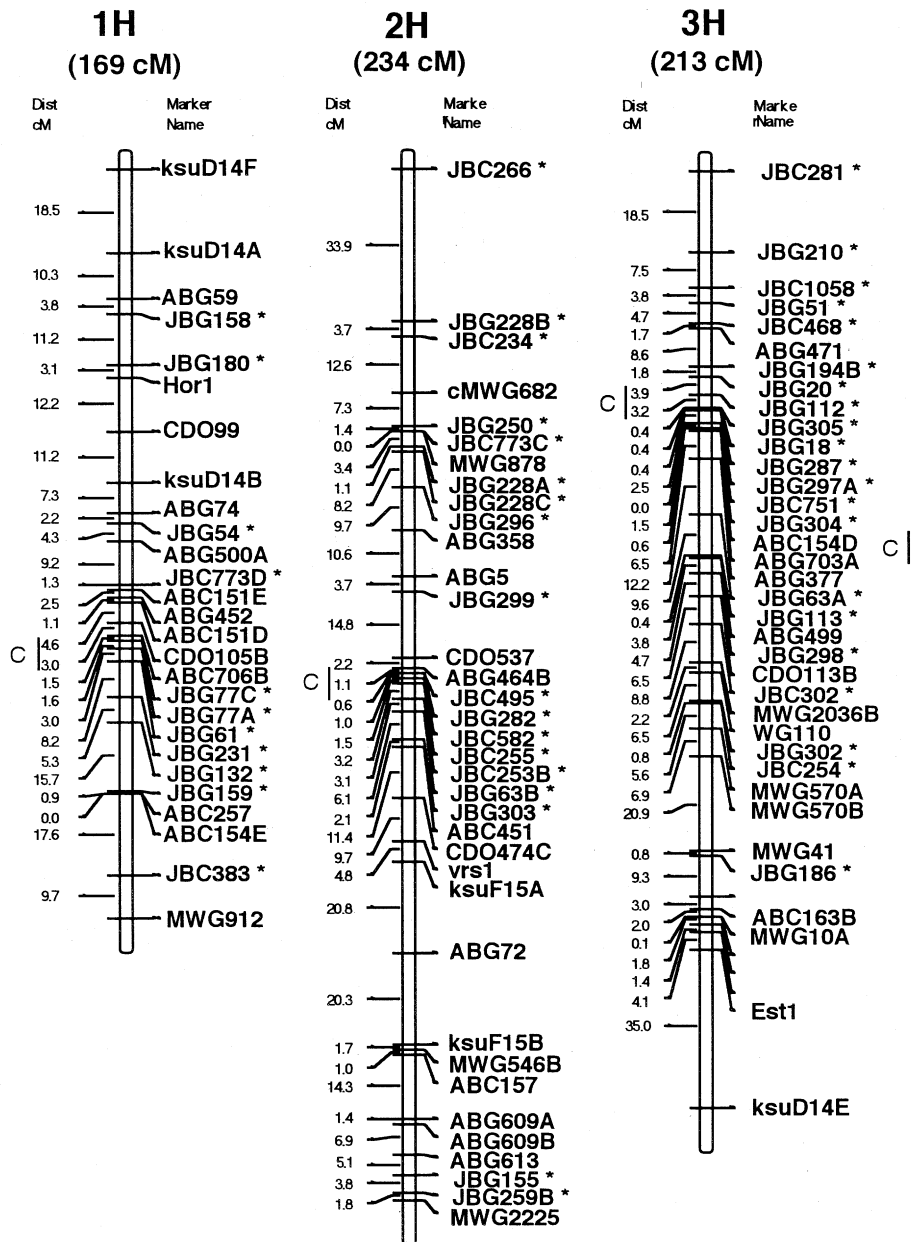


Fig. 1 Construction of barley RFLP map: Chromosome 1H, 2H, and 3H

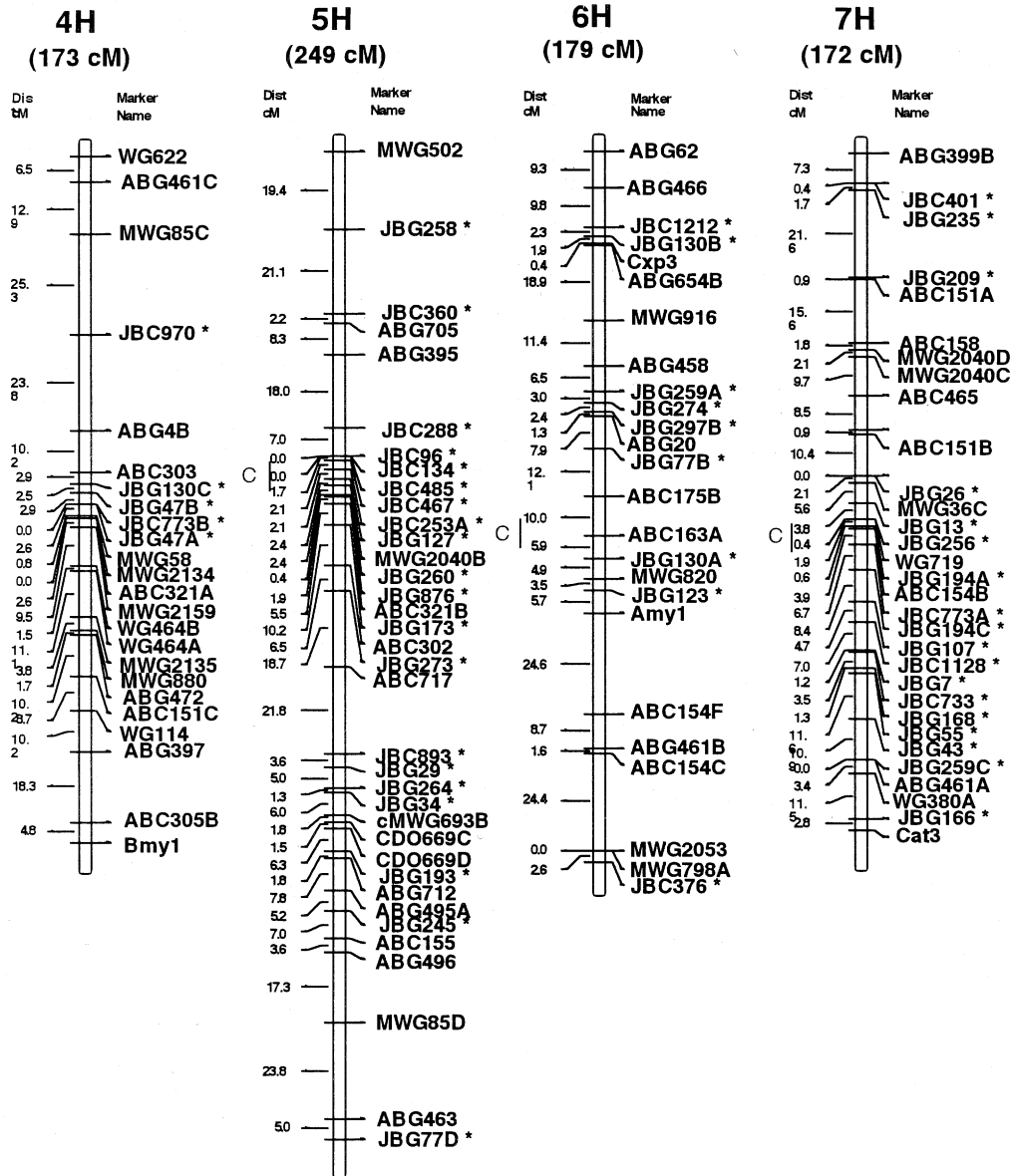


Fig. 1 continue: Chromosome 4H, 5H, 6H and 7H

重複あるいは複数座位を示す RFLP マーカー :

177 の内、24 の RFLP マーカーは 2 から 6 座位を示した。すなわち、全 222 座位の 31% にあたる 69 座位は染色体上に複数座位として位置した。さらに、69 座位の内 39 座位は同一染色体内に複数存在、すなわち重複していた。その重複した座位間の距離は 1.1 cM から 81.7 cM に及んだが、特にその 21 座位(55%)は 5cM 以内に存在していた。

マップした座位の順列 :

F₂ 集団を用いた本地図と DH 集団を用いた代表的な大麦 RFLP 地図である Steptoe x Morex の地図との間で共通な 60 の RFLP マーカーの順列に関して、それらはそれぞれの地図を 85%, 92%カバーしていた。その順列は同一であり、染色体再編成による順列差は見られなかった。

本(F₂)地図と Steptoe x Morex(DH)地図の共通マーカー間組み換え価について：

本地図と Steptoe x Morex 地図で共通な 53 のマーカー間組み換え価について、その組換え価と標準誤差を基に t - 検定しその有為差を求めた。その結果、1%有為水準で3カ所が、さらに 5%有為水準で他の3カ所が検出された。計6箇所内3箇所は染色体 5H, 6H の動原体領域にあった。他の3カ所は染色体 1Hs, 2Hs, 3HL の末端に位置していた。染色体 5H の動原体において DH 地図上の ABG395 と MWG2040B の組換え価は F₂ 地図の 1/4 に縮小していた。このことは、雌配偶子の組換えがこの領域で極端に抑制されていることを意味していた。これとは逆に、染色体 6H の動原体領域の MWG820 と Amyl-1 の間では F₂ 地図の組換え価が DH 地図に比べ縮小していた。全体的に見て、両地図に共通な RFLP マーカーによる地図全距離は F₂ 地図で 1076 cM, DH 地図で 1101 cM であり、両地図は非常に似ていた。

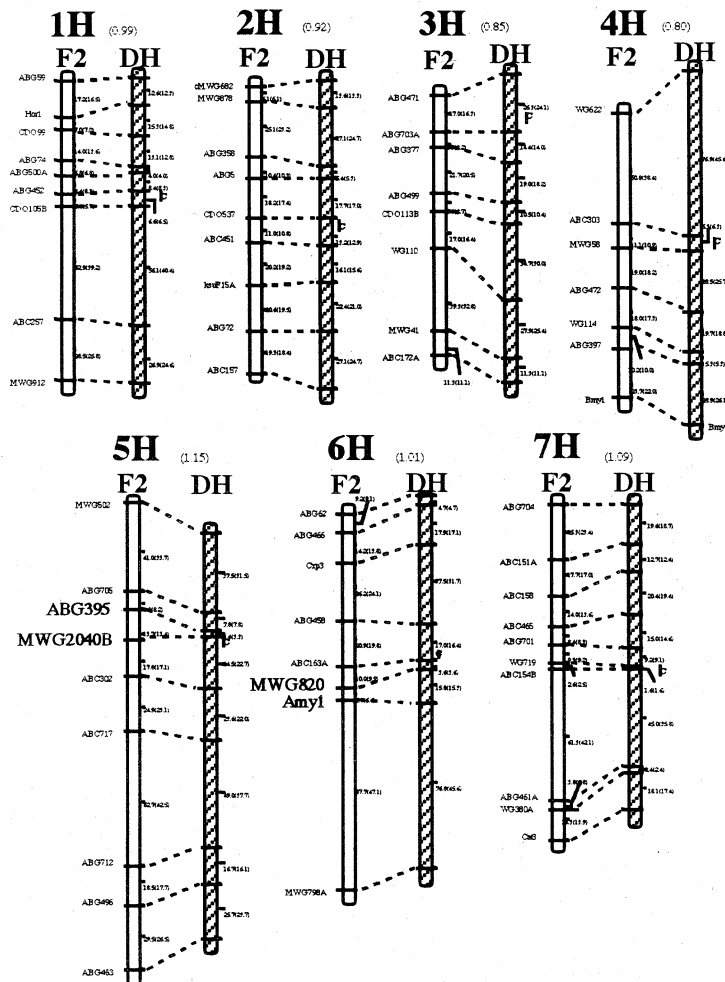


Fig. 2 Comparison of recombination between K x M (F₂) and S x M (DH) map

10. 考察

本研究では、酸性/アルミニウムストレス耐性に関連する遺伝子(群)を RFLP マーカーでその染色体上の座位を特定し、その座位の両側にある RFLP マーカー間を持つ巨大 DNA 断片を解析する手法(マップベースドクローニング)に必要な RFLP マーカーを新規に開発して大麦 RFLP 地図を作成した。現在公開された大麦 RFLP マーカーは 200 余り利用可能である。マップベースドクローニングが実施されているイネでは 2000 余りの RFLP マーカーがあるのに比べ、大麦ゲノムサイズがイネの約 10 倍であることを考えるとその数は非常に少なく、さらに開発する必要がある。RFLP は 2 品種のゲノミック DNA 配列の差に基づいているため、遺伝的に遠縁関係にあることが RFLP の頻度を高める。このことから、本研究ではヨーロッパ系の遺伝背景を持つ日本大麦 KoA と、これとは遺伝的に遠縁な中国在来 Mokusekko3 を用い、その RFLP 頻度は 2 種の日本大麦に比べ高かった(data not shown)。ゲノミッククローンと cDNA クローンを比べた時、前者の RFLP 頻度が後者の 2 倍であった。この理由の 1 つには、多くの cDNA クローンは多重遺伝子であり、サザンハイブリダイゼーションで多数バンドを示し、どのバンドとバンドが対立遺伝子座(アレリック)であるか容易に判断できないものが多く、それらは RFLP スクリーニングで排除されたことが考えられた。イネの場合、そのゲノムサイズ(460Mb)から 1 cM=230kb と推定されている¹⁵⁾。一方大麦ではそのゲノムサイズがイネの約 10 倍であることから¹⁶⁾、1cM は約 2Mb と考えられる。すなわち、大麦の場合 1cM の違いは非常に大きいことを意味する。仮に、目標とする酸性/アルミニウム耐性関連遺伝子と RFLP マーカーとの距離が RFLP 地図作成に用いられた親品種の違いで大きく異なることは、マップベースドクローニングを困難にする。このことから、DH 集団由来の大麦 RFLP 地図と F₂ 集団由来の地図の組換え価を比較することが重要となる。本研究から、DH と F₂ という遺伝子連鎖分析集団の種類の違いは地図の組換え価の大きな差を生まなかった。本研究では新たに約 100 の RFLP マーカーを開発し、それらは今後酸性/アルミニウム耐性関連遺伝子(群)のマッピングに寄与できると結論した。

11. 今後の展開

本研究では、岡山大学佐藤博士の協力で耐性品種である Smooth Awn 86, Smooth Awn 203, Colonial 2, Dayton, Murasski Mochi と感受性品種の Kearney の交配し、5 種類 (Smooth Awn 86 x Kearney, Smooth Awn 203 x Kearney, Colonial 2 x Kearney, Dayton x Kearney, Murasski Mochi x Kearney)の F₁ 種子を採取し、一部の F₂ 種子を作成した。さらに本研究 III, IV で明らかになった種子根の伸長能に関しては、酸性ストレス、アルミニウムストレス耐性遺伝子をマッピングするための Steptoe (酸性ストレス耐性) x Morex (酸性ストレス感受性)、また Steptoe (アルミニウムストレス感受性) x Morex (アルミニウムストレス耐性) 集団は NABMG から公開されている。一方、冠根の出根能に関しては、酸性ストレス耐性遺伝子をマッピングするための Harrington (酸性ストレス耐感受性) x Brindabella (酸性ストレス耐性) の DH 集団が作成された。その他の遺伝子をマップするためには、木石港 3 x Morex の集団の作成も計画中である。以上今後は酸性土壌栽培及び水耕栽培により酸性/アルミニウムストレス耐性関連遺伝子を QTL マッピングする予定

である。

1 2 . 参考文献

1. Kochian L.G., Annu. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Bio. 46, 327-260, 1995
2. Rao MI, Zeigler RA, Vera R, Sarkarung S, Bioscience 43, 454-465, 1993
3. Stolen O, Anderson S, Hereditas 80, 101-104, 1978
4. Gallego F.G., C. Benito, Theor. Appl. Genet 95, 393-399, 1997
5. Wang GL, Holsten TE, Song WY, Wang HP, Ronald PC, Plant J 7, 525-533, 1995
6. Yoshimura, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1663-1668, 1998
7. Nakamura S., et al., Mol. Gen. Genet 254, 611-620, 1997
8. Kleinhofs, A., et al., Theor Appl. Genet 86, 705-712, 1993
9. Heun, M., et al., Genome 34, 437-447, 1991
10. Graner, A., et al., Theor. Appl. Genet 83, 250-256, 1991
11. Murray, M., Thompson WF, Nucl. Acids, Res. 8, 4321-4325, 1980
12. Konishi et al., Jpn J. Genet 39, 423-430, 1989
13. Lander, ES, et al., Genomics 1, 174-181, 1987
14. Kosambi EE, Ann Eugen 12, 172-175, 1944
15. Saito, A., et al., Jpn. J. Breed 41, 665-670, 1991
16. Arumuganathan, K. and E.D. Earle Plant Mol. Biol. Rep. 9, 208-218, 1991

1 3 . 研究業績

1 3 1 . 原著論文

1. K. Saeki, C. Miyazaki, N. Hirota, T. Konishi, A. Saito and K. Ito: QTL mapping of Barley Yellow Mosaic Virus (BaYMV) resistance gene in c. Ishukushirazu on chromosome 7(5H) in barley, *Hordeum vulgare*. Theor. Appl. Genet. in press (1999)
2. C. Miyazaki, E. Osanai, K. Saeki, N. Hirota, K. Ito, T. Konishi and A. Saito: A Barley Linkage Map Using an F₂ population and its comparison with a Map Based on Female Recombination-derived Double Haploid Population. Breeding Science submitted(1999)

1 3 2 . 総説 なし

1 3 3 . 国際学会発表

1. Miyazaki, C., K. Saeki, K. Ito, E. Osanai, K. Teramura, T. Konishi and A. Saito: Towards construction of a molecular map for Japanese barley cultivars: VII International Barley Genetics Symposium Poster #116, Page 355 (1996)

1 3 4 . 国内学会発表

1. 佐伯知勇, 宮崎力, 広田直彦, 斎藤彰, 伊藤一敏, 小西猛朗: 大麦縞萎縮病

- 抵抗性遺伝子 *ym3* のマッピング, 日本育種学会講演会要旨 p95, 1998
2. 宮崎力, 小山内英一, 佐伯知勇, 広田直彦, 伊藤一敏, 小西猛朗, 斎藤彰: オオムギの F₂ 集団を用いた RFLP 地図の作成, 日本育種学会講演会要旨 p75, 1998
 3. 小山内英一, 宮崎力, 斎藤彰, 佐伯知勇, 伊藤一敏, 小西猛朗: 中国在来大麦「木石港 3」の持つ縞萎縮病抵抗性の QTL 解析, 日本育種学会講演会要旨 p76, 1998
 4. 斎藤彰, 正岡淑邦, 小林紘一, 永井尚生, 荒川祐介, 宮崎力, 羽鳥聡: 植物細胞におけるアルミニウムの作用・機能解明. 第 7 回東京大学原子力研究総合センターシンポジウム, 1998
- 1 3 5. 新聞など なし
- 1 3 6. 特許 なし

1 4 . 英訳

- (1) Research title : Tolerance Mechanisms for Aluminium stress in Plant
 Research sub-title : V. Construction of Barley molecular map for Quantitative Trait Loci of acid, aluminium tolerance in barley
- (2) Research organization : Labo. of Plant Biotech, Kyushu National Agricultural Experiment Station (KNAES)
- (3) Researcher : Akira Saito
- (4) Co-researchers : Chikara Miyazaki (JISTEC, Nagasaki)
 : Eiichi Osanai (Kirin Brewery Co. Ltd)
 : Kazuo Saiki (Sapporo Breweries Ltd)
 : Kazuhiro Sato (Okayama Univ.)
- (5) Research periods : 1995-1999
- (6) Abstract

In order to map and map-based cloning of the QTL for acid/aluminium resistance, number of available DNA markers is not enough for the Now, most of the barley RFLP linkage maps have been constructed using the doubled haploid (DH) population as a mapping material and little information is available on barley RFLP linkage map using an F₂ population., we developed new 100 DNA markers and constructed an RFLP linkage map using 120 F₂ plants derived from a cross between a Japanese two-rowed malting barley Ko A and a Chinese six-rowed landrace barley Mokusekko 3. A total of 222 loci were mapped using 177 RFLP, one isozyme and one morphological markers. The total map length was 1389 cM and the average marker-to-marker distance was 6.3 cM. We compared the Ko A x Mokusekko 3 map with the Steptoe x Morex map, which is one of the most representative barley RFLP linkage maps, based on a *Hordeum bulbosum* (Hb)-derived DH population that represents recombination in female gametes. The linear orders of 60 common RFLP markers were identical and no major chromosomal

rearrangements were detected. The difference in recombination frequencies was detected on six intervals flanked by the adjacent common RFLP markers. The reduced map length was observed on four intervals for the F_2 map and two intervals for the Hb-derived DH map. Three out of six intervals were located around the centromeric regions of chromosome 5H and 6H. On the other hand, the ration of total map length between F_2 population and Hb-derived DH population within common mapped loci was 0.98. The remarkable similarities were present at the whole-genome level between the both RFLP linkage maps. The novel RFLP markers and RFLP map in this study should be available for the further QTL mapping of acid/aluminium stress tolerant gene(s) in barley.