

オオムギゲノム機能の開発と制御

岡山大学資源生物科学研究所 教授 武田 和義

1 研究実施の概要

オオムギは主要な農作物のひとつであり、一万年の栽培の歴史を経て種々のストレス耐性や農業形質などに大きな変異を生じてきた。オオムギは主要穀物の中では自殖性二倍体で染色体数も $n = 7$ と少なく、ムギ類のモデルプラントとして注目されている。本プロジェクトでは「ゲノム解析」そのものをターゲットにするのではなく作物の生産性やストレス耐性の解析を視野に入れた研究を展開したいと考えた。

研究代表者の所属する大麦・野生植物資源研究センターでは野生種や貴重な突然変異系統を含む 1 万以上のオオムギ品種を保有し、オオムギ遺伝研究の世界的な拠点の一つとして系統進化、遺伝解析などに成果を挙げており、その過程で集積された情報と材料を活用すれば世界の水準に互して一定の成果を収めることが可能な情勢にあると考えた。研究の実施に当たっては以下の内容でオオムギのゲノム解析に必要となる大規模な実験系の開発を進めた。

- (1) 遺伝子のカタログ化をするための cDNA 解析と遺伝子のマップおよび発現解析手法の開発
 - a) 約 14 万件の EST 配列に基づいて、シーケンスシステムの開発、配列の品質調整、代表クローンの選抜を行うと共に、クローンのレプリケーション、リアレイなどのシステム開発をした。
 - b) cDNA 由来の STS および SNP を用いた EST のマッピングを行い、約 3,000 マーカーからなるマップを作製した。また、二倍体コムギ集団に約 250 のオオムギ EST マーカーをマップした。
 - c) HEGS (高能率ゲノム走査) 法による精密マーカーマップの作成技術を開発し、質的遺伝子に強連鎖するマーカーの作製、量的形質遺伝子座 (QTL) と密接に連鎖した分子マーカーの検出および QTL を含む BAC クローンの単離に利用することなどが可能となった。
 - d) オオムギにおける有用な PCR マーカーを開発するため、イネ cDNA 由来の STS マーカー、オオムギ EST 由来の SNP マーカー、トランスポゾン由来の MITE-AFLP マーカーなどを開発して、連鎖地図上に位置づけた。
 - e) 1H 染色体長腕の関与するオオムギ相互転座 6 系統をコムギと交雑し、それぞれの転座 1H 染色体をコムギに添加した系統シリーズを育成した。また、コムギの遺伝的背景に添加されたオオムギ 1H 染色体に転座、欠失等の構造変異を誘発し、11 の切断点と 26 マーカーからなるオオムギ 1H 染色体に関する細胞遺伝学的地図を作成した。さらに、はるな二条の BAC ライブラリーから蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 用のプローブとして利用可能な低コピー配列を選抜し 2 個の BAC クローンを 1H 染色体に位置づけた。
 - f) 数千程度の遺伝子を検出可能な cDNA アレイを作成できる技術が確立し、特に植物ホルモンに関連する cDNA クローンを使用したアレイ解析を進めた。また、アフィメトリックス社の GeneChip システムの開発に関わると共に、これを用いた発現解析技術の開発を進めた。

- (2) オオムギ遺伝子の配列情報を整理・解析するためのデータベース開発
 - a) オオムギ EST の公開データベースを構築した。Oracle-Dynaclust システムを用い、アドレス (<http://www.shigen.nig.ac.jp/barley/>) から公開した。さらに、内部利用のための非公開データベースを構築した。
 - b) EST のうち国立遺伝学研究所との共同研究によって作製した約 93,000 配列は 3 種類の系統に由来している。これらの配列のうち異なる系統に由来するクローンが同じ Unigene に含まれている一塩基多型 (SNP) を検出するシステムを開発した。
 - c) 岡山大学が有するオオムギ EST 配列約 12 万を phred によって再度ベースコールした後、quality score20 でトリミングし、ベクターマスキングを行って 3' 端約 6 万配列を得た。こ

これらの配列から phrap によって contig 8,753, singlet 6,686 からなる Unigene を作成した。プライマー作成ソフト Primer3 によって、(a)400bp を中心として 350-500bp の cDNA 配列を増幅するプライマー対約 5,800, (b) (a)以外で 150bp 以上の cDNA 配列を増幅するプライマー対約 5,600 を作成した。

- d) EST 配列のクラスタリング解析結果を Web 上に表示する「Web ベース遺伝子発現パターンビューワ」を開発した。また、Comparative map(イネゲノム物理地図 vs オオムギ EST)の作成を進めた。
- e) 品質調整済みの EST 配列についてデータベース化を進めると共に、完全長 cDNA クローンの選抜と配列決定作業を進めた。これらの配列データを質量解析システムに組み込んで、タンパク質同定のためのデータベースを構築した。

(3) オオムギ遺伝子単離のための DNA ライブラリーの開発と利用

- a) 「はるな二条」BAC ライブラリーの開発を完了し、平均インサートサイズ 115kb で、294,912 クローンからなる大規模 BAC ライブラリーを 384 プレート 768 枚に構築した。また、PCR あるいはメンブレンでの目的クローンのスクリーニングシステムを開発した。これらのリソースを利用予定の研究分担者に送付すると共に、単離のためのスクリーニングを行い、目的のクローンを選抜した。
- b) 完全長ライブラリー作製のための RNA 単離法として(1)金属リガンドを用いた新しい全 RNA 抽出法、(2)植物全 RNA の大部分を占める細胞リボソーム RNA (28S, 18S, 5S) と tRNA と葉緑体リボソーム RNA などを、植物全 RNA から除去する新リボソーム RNA 除去法、(3)単離された mRNA の intactness 検証法としての CAP から ATG までの 5' -noncoding region について RT-PCR する方法を導入した。従来のオリゴキャップ法と Vector-Capping 法によってオオムギ種子根の完全長 cDNA ライブラリー作製し評価した。

(4) 有用遺伝子の機能推定および単離に向けた実験手法の開発

- a) オオムギにおけるアルミニウム耐性機構が根からのクエン酸の分泌であることをつきとめ、当該遺伝子を連鎖地図上にマップした。また、オオムギにおけるアルミニウム毒性と耐性の分子機構を明らかにするために、オオムギ GeneChip を用いてマイクロアレイ解析を行った。誘導された遺伝子の多くはストレス応答に関与していた。
- b) オオムギの鉄欠乏ストレス耐性遺伝子のうち鉄—ムギネ酸錯体の輸送に関与する遺伝子 (*HvYSL*) を単離し、これが鉄—ムギネ酸錯体に特異的なトランスポーターであると推定した。
- c) ミネラル高集積オオムギ品種を同定するため、穀粒に高濃度のミネラルを集積する品種のスクリーニングを行った結果、ケイ素、亜鉛、鉄、カルシウム、マグネシウムとカリウムについて大きな品種変異のあることが確認された。
- d) 水チャネル・アクアポリン遺伝子 (MIP 遺伝子ファミリー) は水と低分子化合物の輸送を担う膜タンパク質で、乾燥および塩ストレス環境下での水輸送を制御して耐性機構に深く関与していると考えられている。オオムギ EST データベースと contig 配列から、34個の遺伝子ファミリーの候補を見出しその機能を解析した。
- e) ストレス応答機構の細胞内シグナル伝達系に関与する因子として想定されるオオムギの MAPKase と CAX(Calcium proton exchanger)の遺伝子を新規に同定・単離した。
- f) 形質転換技術について、オーストラリア CSIRO の協力で、オオムギ形質転換技術の研修をうけ、その技術を導入した。GFP を導入した形質転換オオムギ T₀ の再生個体までを得ることができた。
- g) 塩ストレス抵抗性オオムギの網羅的 cDNA 配列解析を行い、品種特異的遺伝子カタログを構築し評価した。発現頻度の高い遺伝子について調査して、塩ストレス抵抗性オオムギ特異的遺伝子を 12 個検出した。
- h) オオムギの皮裸性を決定する分子機構を解明することを目的として、裸性遺伝子 (*nud*) のポジショナルクローニングを試み、はるな二条 BAC コンティグ内に皮裸性遺伝子の有

力な候補を見出した。また、連鎖マーカーによる品種の多型解析から、現在の裸麦は単一起源であると推定した。

- i) オオムギ小穂（穂軸）の非脱落化は栽培の起源と深い関連を持っている。高精度連鎖地図作成のため、小穂非脱落性遺伝子と連鎖する 26 の AFLP マーカーのクローニングとシーケンシングを行い、コムギ-オオムギ染色体添加系統や AFLP との対立性検定によって合計 9 の STS マーカーを得た。これらのマーカーを用い、野生オオムギと栽培オオムギの間で小穂非脱落性遺伝子領域の構造を調べるために、2つの F_2 分離集団を解析した。さらに小穂非脱落性遺伝子の分子マーカー密度を上げるため、イネゲノムとの相同性を用いてオオムギ EST をスクリーニングし、PCR マーカーを作製してオオムギ連鎖地図上へマップした。また小穂非脱落性遺伝子近隣分子マーカーを起点としてオオムギ品種はるな二条の BAC ライブラリーの PCR スクリーニングを行い、ラフなショットガンシーケンシングをおこなって、小穂非脱落性遺伝子に向けた染色体歩行が可能になった。

(5) 有用形質のタンパク解析技術の開発と遺伝子同定

- a) タンパク質量解析システムについては、ビール醸造形質に関わるサッポロビール社との協同研究を中心として、精力的にサンプル採取を進め大量解析の準備をした。また、新たに導入した MALDI-TOF/MS システムの調整を行って大量解析システムを構築した。麦芽形成過程で発現するタンパク質の網羅的な解析とタンパク質量図のデータベース化を目的とし、まず、オオムギの幼芽に含まれるタンパク質の同定を行った。
- b) 塩ストレス抵抗性オオムギで特異的に発現しているタンパク質群を明らかにすることを目的として、二次元電気泳動法 (2D-PAGE) によりタンパク質をスクリーニングし、塩ストレス抵抗性オオムギで特異的に発現している 6 個のタンパク質スポットを検出した。
- c) オオムギ近縁野生種 *Hordeum bulbosum* の自家不和合性 (S) タンパク質 (S 遺伝子産物) の探索と同定を目的として、二次元電気泳動 (2-DE) 法と ICAT (Isotope-coded affinity tag) 法を用いたタンパク質のディファレンシャル解析を行った。その結果 S 遺伝子座と緊密に連鎖している遺伝子を検出したものの、ノーザン分析において、当該遺伝子は雌ずい以外に、葉、根、葯でも発現しており、発現特異性は認められず、アレル間多型性が低いことから、雌ずい側 S 遺伝子ではないと結論した。
- d) オオムギ種子、麦芽、麦汁、ビールよりサンプルを調製し二次元電気泳動を行なう方法を確立した。ビールの泡持ちが優れたオオムギ品種と劣ったオオムギ品種を原料に用いて実験室規模でビールを製造し、そのタンパク質組成を質量解析により同定、比較した。
- e) ビール中のタンパク質を網羅的に解析するために pI 4-7, 6-9 に分けての二次元電気泳動、並びに一次元の SDS-PAGE を行い、得られたタンパク質スポットの質量解析を実施した。合計 87 スポットについて TOF-MS による PMF (Peptide Mass Finger-printing) 解析を行った。有意にヒットしたタンパク質のうち、オオムギ由来のタンパク質は 6 種類 (BDAI-I, LTP-1 など)、酵母由来のタンパク質が 7 種類 (Enolase 1, Acyl-CoA binding protein type 1 など) あった。同一分子量であるが等電点が異なるいくつかのスポットは同一のタンパク質種と同定される傾向にあった。
- f) ビールの重要な品質の一つである泡持ちに関連するタンパク質の同定を目的として、泡持ちの異なる 2 品種 (品種 A および B) の製麦条件 (浸麦度) を変えて麦芽を調製し、単用ビールを醸造した。このビールの質量解析を実施し、岡山大学のオオムギ EST (expressed sequence tag) 配列にヒットするタンパク質を見出した。これらの結果から、オオムギゲノム解析をビール品質の改良に応用できることが示唆された。
- g) ビール中の脂質酸化物は、ビールの品質を低下させることが知られている。ビールの老化臭として知られる 2(*D*)-ノネナールに関して、その生成経路と生成に関与するオオムギの酵素と遺伝子を明らかにした。

(6) ゲノム機能を制御するための育種システムの開発

- a) EST マップ情報を利用したジェノタイピングアレイ技術の開発を進めた。このための予備実験として、EST マップに座乗するマーカーを選抜して、代表的な遺伝資源およびマップ親の SNP 多型を解析した。
- b) EST マップを利用した高能率遺伝子型選抜システムの開発のための配列情報と利用法に関する特許出願および SNP 特許の国際出願をした。また、オオムギの主要病害である赤かび病および縞萎縮病に関して、染色体上の位置情報、マーカー情報を含めて特許出願した。
- c) オオムギ、コムギ、ライムギを含む近縁植物についてオオムギ EST マーカーのプライマー配列に基づく類縁関係を推定した。さらに、近縁野生植物でストレス抵抗性に優れたハマニシクおよびオオハマニシクについて、染色体添加コムギ系統の添加染色体の識別と同祖群を決定するために、これらの異種染色体に特異的なマーカー各々約 100 をオオムギ EST から得た。また、野生オオムギ *H. chilense* の染色体添加系統群の添加染色体をオオムギ EST マーカーで同定することに成功した。

このように、リソースの開発は順調に進み、今後タンパク質量解析や BAC ライブラリーを利用した遺伝子単離などがさらに進展すると考えられる。また、EST マップは、ゲノム配列解析の進んでいないオオムギおよびコムギにとって極めて重要なゲノムリソースであり、今後これを活用したゲノム解析技術の進展、育種技術の開発、多様性解析に基づくあらたな遺伝変異の導入などが進むと考えられる。特にジェノタイピングアレイを用いた遺伝解析、系統解析、蛋白解析などがより高速かつ高精度に行えるようになり、ゲノムの有用機能の開発と制御（育種）システムの実用化が期待される。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

1) 研究の背景

ゲノムサイエンスはシロイヌナズナなどゲノムサイズの小さいモデル生物、あるいはヒトそのものやイネなどの人間にとって重要な生物を対象として推進されてきた。オオムギは主要な農作物のひとつであり、一万年の栽培の歴史を経て種々のストレス耐性や農業形質などに大きな変異を生じてきた。オオムギは主要穀物の中では自殖性二倍体で染色体数も $n=7$ と少なく、ムギ類のモデルプラントとして注目されている。本プロジェクトでは「ゲノム解析」そのものをターゲットにするのではなく作物の生産性やストレス耐性の解析を視野に入れた研究を展開したいと考えた。世界的に分布範囲が広く、環境適応性やストレス耐性に優れたオオムギはこのような応用場面にも直結する研究を展開する上で都合の良い材料と考えたからである。また、ムギ類、特にオオムギのゲノム研究は欧米で端緒が開かれようとしており、ここで研究が立ち後れることは、日本のムギ類のゲノム研究が世界に立ち後れることを意味し、知的所有権の問題などからも猶予できないと考えた。

研究代表者の所属する大麦・野生植物資源研究センターでは野生種や貴重な突然変異系統を含む 1 万以上のオオムギ品種を保有し、オオムギ遺伝研究の世界的な拠点の一つとして系統進化、遺伝解析などに成果を挙げており、その過程で集積された情報と材料を活用すれば世界の水準に互して一定の成果を収めることが可能な情勢にあると考えた。

2) 当初研究計画の概要

開始時において、本研究ではオオムギゲノムに関する遺伝情報を把握し、これらの知見を生かしたゲノム研究の拠点を形成することを目指し、大きく分けて 2 つの研究を計画した。つまり、第一期では DNA ライブラリーの作成 (a-b)、そして第二期ではこれを利用した遺伝子の機能解析 (c-e) である。

a) オオムギ cDNA クローンバンクの構築

日本のビールオオムギ品種と野生オオムギの cDNA ライブラリーを作成し、発現遺伝子の相当数について cDNA の部分配列のシーケンス (EST) を解析する。得られた EST は遺伝子データベースと参照して既報の遺伝子との同源性検索を行って機能を推定し、データベース化する。

b) バクテリア人工染色体 (BAC) によるオオムギの DNA ライブラリー構築

「はるな二条」と野生オオムギの 2 種類の BAC ライブラリーを作成する。「はるな二条」は世界最高の品質水準を有する醸造用オオムギであり、優良な醸造形質関連遺伝子を含んでいる。野生型のオオムギ (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) は進化の過程でボトルネックによって失われた有用遺伝子をはじめとして、優性の遺伝子を多く含んでいると考えられるので、劣性突然変異遺伝子のクローニングに適している。また、数年以内に 5,000Mb に及ぶオオムギゲノムも全ゲノムシーケンスの対象になることも考慮に入れて、オオムギの全ゲノムライブラリーの整列化に向けた準備をする。

c) DNA マイクロアレイを用いた遺伝子の発現解析

オオムギの遺伝子発現に関わるストレス環境などの様々な条件を与えて mRNA を分離し、DNA マイクロアレイにハイブリダイズさせて、正常な植物体と比較して発現遺伝子の差を検出し、当該遺伝子を同定する。これまでに当研究所に蓄積されている実験材料を駆使して系統間差異を踏まえた遺伝子発現解析を行う。

d) BAC を用いた遺伝子クローニング

AFLP のような多型性の検出感度の高い技術を用いて、分離集団あるいはアイソジニック系統対における目的遺伝子と強連鎖するマーカーを選抜する。数多くの集団が育成済みであり、すでに小花の形態を支配する条性 (*vrs1*) 遺伝子やアルミニウム耐性遺伝子などでマーカーが選抜されている。さらに、これまでの地図情報から有用遺伝子を多く含むと考えられている領域に注目して集中的に遺伝子を検出する。耐病性遺伝子に関する multilocus

cluster や遺伝子座の微細構造など、メンデル遺伝学的に検出された遺伝子群の存在をクローニングによって確認する。

e) オオムギゲノムデータベースの構築と拠点ネットワークの形成

検出された EST の配列情報は国立遺伝学研究所 DDBJ の国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列データと照合し遺伝子の機能を推定する。この作業によって各々の cDNA クローンの性格を明らかにする。これまでのメンデル遺伝学的な解析によって遺伝子の性格が明らかになっている系統（突然変異，同質遺伝子系統対）の情報を付加することによって形質への遺伝子の関与を推定する。これらの研究を総合して，オオムギゲノム全体に分布する遺伝子情報を集約し，これまで断片的にしか得られなかった遺伝子発現に関する情報を体系的，構造的に明らかにする。また，研究結果をデータベース化しネットワーク上で公開する。

3) その後の新展開から生まれた研究計画

当初計画はオオムギという巨大なゲノムをまず cDNA から解析し，来るべきゲノム配列解析に向けての準備を進める一方，遺伝資源として保存されている系統に含まれる重要な形質や機能については BAC ライブラリーを用いて遺伝子単離するという方向で進めた。この目標の根本は現在も不変である。ただし，現在に至ってもオオムギのゲノム配列解析の目処は立っておらず，膨大な数の遺伝資源の解析は緒についたばかりである。さらに，BAC ライブラリーの開発には予定より期間を要したため，ライブラリーを 1 種類開発したにとどまり，その整列化もスケジュール的に無理とした。また，DNA マイクロアレイは以下に記述する GenChip システムの共同開発によって大規模なシステムの独自の開発は必要ないと判断した。さらに，形質転換効率がいまだに極めて低く，遺伝子単離に極端に偏った戦略は修正すべきと判断した。その一方で新たな展開に基づいて以下のような研究を進めた。

f) EST 配列における品種多型の解析

独自に開発した 5 種類の cDNA ライブラリーからランダムにシーケンスした EST 約 5 万件，ならびに国立遺伝学研究所で作製された約 9 万 3 千の EST 配列に基づいて，配列の品質調整を行った後，データベース化した。国立遺伝学研究所との共同研究によって作製した約 93,000 シーケンスは 3 種類の系統に由来しているため，異なる系統に由来するクローンが同じ Unigene に含まれている場合に，一塩基多型(SNP)を検出した。これらの SNP を詳細に解析して，特許出願すると共に育種システムへの利用を検討した。EST の配列解析を効率的に進めるため，新たに秋田県立大学の高橋助手が研究に参加した。

g) 国際協力による DNA アレイシステムの開発

世界的にオオムギの EST が大量に開発されたのを受けて，米国を中心とし，岡山大学を含む国際コンソーシアムによって Affymetrix 社製の GeneChip を作製する計画が持ち上がった。このための EST 配列の再品質調整，データベース作製を行った。我々は GeneChip を網羅的遺伝子発現解析に，cDNA マイクロアレイを主として特異的サンプルの遺伝子発現解析に用いることを想定してその後のシステム開発を行った。

h) EST マーカーによるマップ作製と形質マッピング

遺伝地図上の位置は，EST の重要な情報の一つであり，種間のゲノム構造の比較や，モデルゲノムを利用した遺伝子単離，マーカー作製などに威力を発揮する。本プロジェクトによって大量のプライマー発注が可能となったので，岡山大学で独自に開発した EST からマーカーを開発し，オオムギで転写産物地図を構築した。EST は RFLP のプローブとして用いることも可能であるが，本研究では非冗長な EST 配列からプライマーを作製し，PCR ベースでの産物長多型，CAPS，SNPs による 3 種類のマーカーを開発した。このマップを用いて，オオムギ醸造用品種「はるな二条」と野生オオムギ「H602」の F₁ に「はるな二条」を戻し

交雑して育成した組換え染色体置換系統群 (RCSLs), および同じ交配親から育成した倍加半数体 (DH) 系統で 14 の有用形質を調査し, これらの形質に関わる遺伝子座の同定を試みた.

i) EST マーカーのコムギを含む近縁種への応用

オオムギはコムギ連の中で最も遺伝学的な解析の進んだ種であり, 経済的に重要なコムギのモデルとしても重要であると考えられる. しかし, 栽培の中心となっているパンコムギのゲノムは高次倍数性を有するので, オオムギの遺伝情報を直接利用することは難しい. 予備実験によって多くのオオムギ EST がコムギにマップ可能であると見られたので, パンコムギの 3 種類のゲノムのうち A ゲノムを提供している二倍体コムギにオオムギの EST マーカーを利用して, 二倍体コムギの遺伝地図を作製すると共に, 形質をマップしてオオムギのマップ情報と相互に比較した. さらに, オオムギおよびコムギと近縁で交雑による遺伝子導入が可能とみられる種について異種染色体に特異的なマーカーをオオムギ EST から得た.

j) EST 配列を利用したタンパク解析

オオムギ種子の発芽は麦芽製造において最も重要な過程の一つであり, 胚乳や胚では酵素活性や代謝機能の劇的な変化が起こっていると考えられる. この過程で発現しているタンパク質の同定と機能解析を行い, 醸造過程におけるそれらの変動をたどり, 理解することはビール等の品質向上に大きく貢献すると期待される. 本研究では麦芽形成過程で発現するタンパク質の網羅的な解析とタンパク質地図のデータベース化を目的とし, まず, オオムギの幼芽に含まれるタンパク質の同定を行った. この研究を進めるため, 新たにサッポロビール株式会社が麦芽, 醸造関連品質の研究に加わった. また, タンパクの質量解析はサンプル調整や遺伝子同定法などに改良の必要があるため, 植物関連のタンパク解析に経験があり, オオムギの専門家でもある三重大学掛田助教授がプロジェクトに参画した.

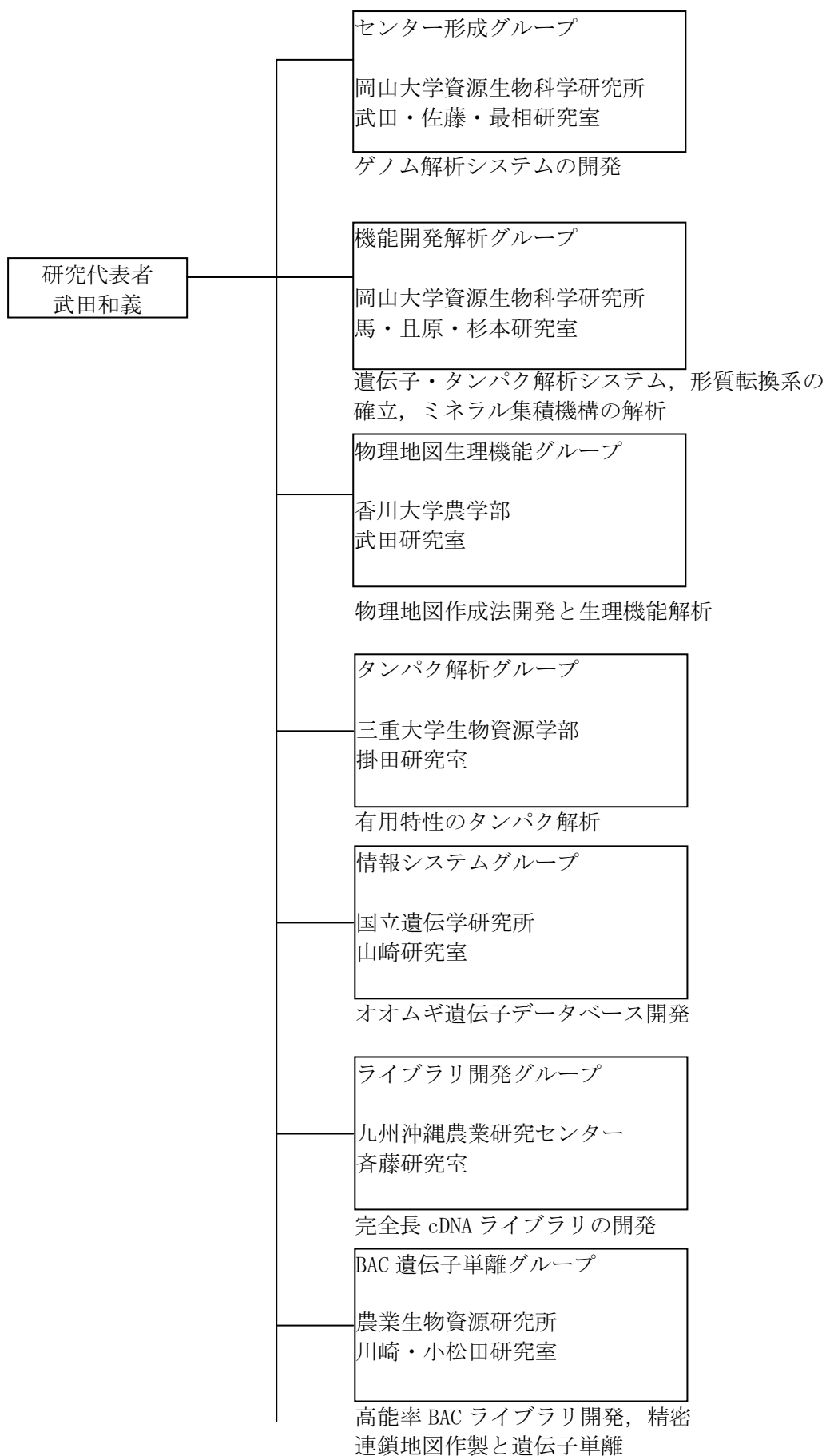
k) EST マップを利用した育種システムの開発

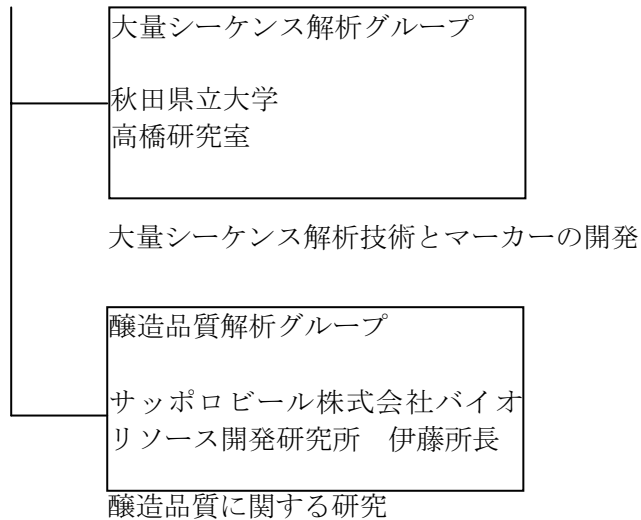
EST マップ情報と形質マッピング充実に伴って, これらを利用したジェノタイピングアレイ技術の開発を進めた. 両親を交雑して遺伝的組換えに基づいた品種改良を行う際には, 育成した系統がどちらの親の対立遺伝子を有するかを把握することが重要である. しかも, 交叉は染色分体で減数分裂ごとに高々 1 回から数回しか起きないので, 近接した位置にある対立遺伝子は組換わることなくブロックとして遺伝する. 我々が開発した上記遺伝地図の EST マーカーは, その多くが SNP に基づいており, 高能率のアレイシステムを用いて染色体上の必要なゲノム領域を正確に選抜することができる. このようなシステム開発に関わる技術とその特許化をプロジェクト後半の大きな目標に設定した.

以上の研究計画について顧みると, オオムギゲノム研究のためのリソース開発と国際的なオオムギゲノムセンターを形成すること, 醸造品質, ストレス耐性などの実用形質, オオムギの農業形質と密接に関わる小穂脱落性, 皮裸性などを中心として EST 情報, 高密度遺伝地図および BAC ライブラリーを利用して有用遺伝子の単離を進め, 形質転換によって形質発現を確認するという戦略の大筋において変更はなかった.

一方で, タンパク質の質量分析については当初計画されてはいなかったものの, ゲノム研究の方向性として必要と判断し, 精力的に整備を進めた. また, ゲノム全体に分布する必要な遺伝子を選抜して, 不良な遺伝子を排除できるゲノム育種の手法開発については, 当初大規模な研究を立案しなかったが, 結果的に本プロジェクトのテーマとして最も適切な戦略目標であり, 強力に研究を押し進めることとなった.

(2)実施体制





3 研究実施内容及び成果

3. 1 ゲノム解析センター形成（岡山大学資源生物科学研究所：武田和義，佐藤和広，最相大輔グループ）

(1)研究実施内容及び成果

実施内容

遺伝資源に含まれる遺伝子情報，DNA ライブラリ情報のオンラインデータベースおよび遺伝子研究や育種に必要な材料（クローン，フィルター，DNA アレイ，系統，雑種集団など）を開発するゲノム解析センターを形成した．cDNA および BAC などの DNA ライブラリーを開発して遺伝子解析の基礎を作るとともに，DNA アレイ技術や高密度マップなど効率よく遺伝子を検出するシステムを開発した．また，タンパク解析から遺伝子検出に至るシステムを開発する．さらに，これらを遺伝資源に適用して大量解析するための技術を検討した．

研究の成果

a) オオムギ cDNA クローンの開発と解析

独自に開発した5種類の cDNA ライブラリーからランダムにシーケンスした EST 約 5 万件，ならびに国立遺伝学研究所で作製された約 9 万 3 千の EST 配列に基づいて，配列の品質調整を行った後，データベース化した．

EST のうち国立遺伝学研究所との共同研究によって作製した約 93,000 シーケンスは3種類の系統に由来しており，異なる系統に由来するクローンが同じ Unigene に含まれている場合に，一塩基多型 (SNP) を検出した．系統には醸造用オオムギ「はるな二条」（発芽時の芽，幼苗の葉身，止葉期の上位 3 葉），在来ハダカムギ「赤神力」（栄養成長期の葉身）および野生オオムギ *H. spontaneum* (OUH602) (止

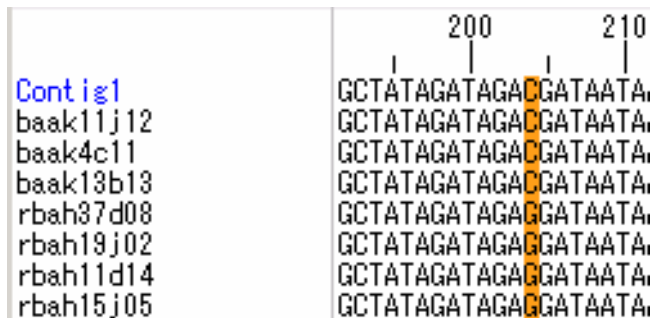


図1 オオムギ遺伝子の DNA 配列の中で基準配列（最上段）に一致する品種（2～4 段目：C）と一致しない品種（5～8 段目：G）に違い (SNP) が認められる。

葉期の上位3葉)を使用し、cDNAライブラリーをそれぞれ作成した。シーケンス解析は国立遺伝学研究所のシーケンシングセンターで行った。各クローン3'および5'の両端からシーケンス解析し、Dynaclust v4.0を用いてクローンのクラスタリングおよび multiple alignment を行った。さらに、コンティグ配列に異なる塩基配列が含まれている際にその部位を検出するアプリケーションを作成して、それぞれの遺伝子型で異なる配列が2クローン以上ある場合に SNP とした。(図1)

SNPの総数は3,901であり、特にはるな二条とH602の間に存在する多型が1,367と最も多かった。また、SNPは複数の系統間に認められる場合もあった。SNPをクラスター別に整理すると、1,312に集約できた。クラスター内に1つのSNPを有するクラスターが545と最も多いものの、むしろ複数のSNPを有するクラスターが多かった。これらのSNPについては、それぞれプライマーを設計してシーケンス解析し、ゲノム上の配列を再確認した。また、SNPの多型部位を用いてそれぞれのクラスター(EST)をマップするための手法を開発した。オオムギのSNPは、長年の進化の過程で生じたと考えられ、その発現作用は、構造遺伝子のどの位置に塩基の変化が起こるかによって異なっている。ESTは遺伝子のエクソン領域の塩基配列なので、今回検出されたSNPも当然エクソン配列の差異に由来している。また、半数近い582のクラスターにアミノ酸の変化を伴うcSNPの存在することが確認された。

b) cDNA由来のSTSおよびSNPを用いたESTのマッピング

i) オオムギESTマーカーの大規模開発

岡山大学が有するオオムギEST配列約12万をphredによって再度ベースコールした後、quality score20でトリミングし、ベクターマスキングを行って3'端約6万配列を得た。これらの配列からphrapによってcontig 8,753, singlet 6,686からなるUnigeneを作成した。プライマー作成ソフトPrimer3によって、(a)400bpを中心として350-500bpのcDNA配列を増幅するプライマー対約5,800, (b) (a)以外で150bp以上のcDNA配列を増幅するプライマー対約5,600を作成した。このうち(a)のプライマー対約5,100について増幅されるゲノム断片の多型を検出するために、栽培オオムギのはるな二条、赤神力、H.E.S.4、Russia 6およびBetzes、野生オオムギ(ssp. spontaneum) H602、はるな二条/H602のF₁、パンコムギChinese SpringのゲノムDNAをそれぞれPCR増幅し、アガロースゲル電気泳動によってバンドの有無、バンド数、バンドサイズを調査した。

それぞれのマップ集団の交雑親間におけるプライマーの増幅を確認したところ、いずれかのテンプレートで断片が得られたプライマー対の割合は72~76%であった。また、プライマー対のうちアガロースゲルによってオオムギ集団に直接マップできたのは数%であった。また、ダイレクトシーケンシングによって品種間の塩基多型を多数検出しており、SNPによって70%程度はマップできると考えている。オオムギBetzesとパンコムギChinese Springには京都大学遠藤教授の作成したBetzesのdeletion系統群が存在する。deletion系統群においてオオムギのみで増幅するマーカーは3分の1程度得られており、マーカーの染色体上の物理的な位置を決定できるとみられる。また、コムギとオオムギの両方で作製可能なマーカーは、オオムギとコムギの両者での同祖的な遺伝子の同定に利用可能とみられる。

ii) オオムギ高密度転写産物地図の開発と利用

遺伝地図上の位置は、ESTの重要な情報の一つであり、種間のゲノム構造の比較や、モデルゲノムを利用した遺伝子単離、マーカー作製などに威力を発揮する。岡山大学では独自に開発したESTからマーカーを開発し、オオムギで転写産物地図を構築してきた。ESTはRFLPのプローブとして用いることも可能であるが、本研究では非冗長なEST配列からプライマーを作製し、PCRベースでの産物長多型、CAPS、SNPsによる3種類のマーカーを開発した。

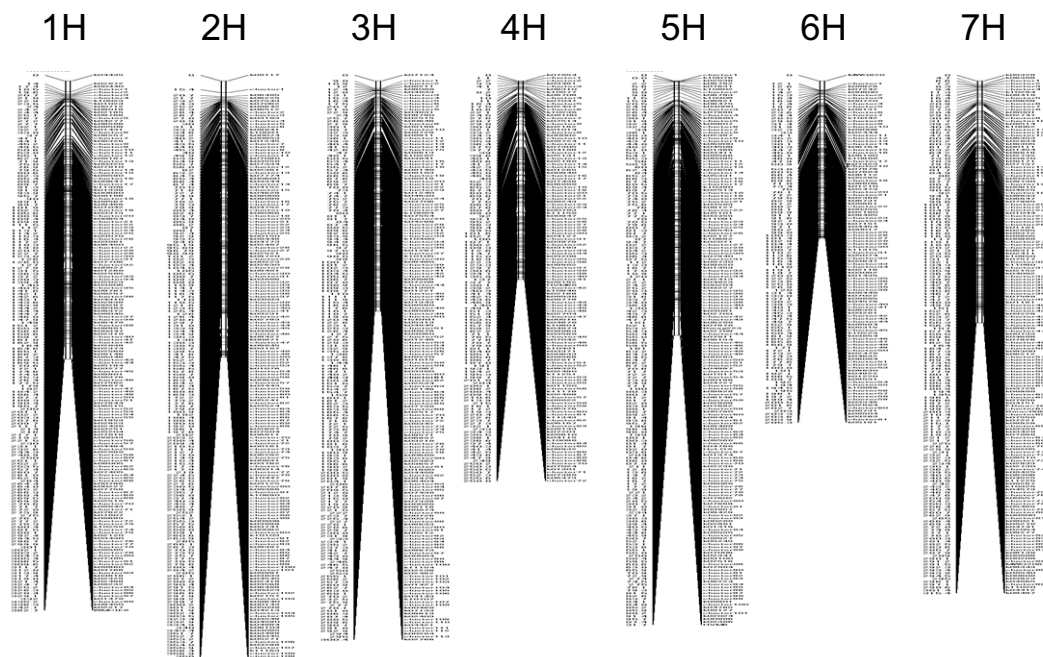


図1 岡山大学が保有する3' 端オオムギ EST の Unigene に由来するプライマーを設計し、約 2,900 の EST を連鎖地図上にマップした

マップ作製のための分離集団には醸造用オオムギ「はるな二条」と野生オオムギ「H602」の交配から、花粉培養法によって作出した倍加半数体を用いた。EST 配列から設計した 10,366 組のプライマーに対して両親のゲノム DNA を鋳型にして PCR 反応を行い、PCR 産物長多型 240, CAPS 934, SNPs 1,717 を得た。この値は、事前の両親 DNA のダイレクトシーケンシングによる多型マーカー数の推定値 5,798 と比較して 5 割程度の値である。アンカーとなるマップ情報既知の SSR (40) および STS マーカー (17) と共にこれらの EST マーカーを分析し、合計 2,948 遺伝子座からなる連鎖地図を構築した (図 1)。1H から 7H の染色体にはそれぞれ、300 以上のマーカーが座乗しており、各染色体のマーカーのうち、イネゲノム (TIGR rice pseudomolecule release 3.0) と blastn で e^{-30} 以下の高い相同性を示すマーカーの割合は 27~37% であった。従って、各染色体とも 100 マーカー以上の EST についてイネゲノムとの相同性が比較できる。この連鎖地図の平均マーカー密度は 0.7 cM/ locus、全長は 2,136cM と既知の報告よりも過大であり、近接するマーカーの位置関係に多少誤りのある可能性が示唆される。そのため、現在、イネゲノムとの相同性による補正を含めて、詳細にマーカーの位置関係を再確認する必要がある。オオムギの遺伝子数はイネと同程度の 3~4 万個程度と考えられるので、本研究で構築したマップにはオオムギの遺伝子の 1 割弱がマップされていると考えられる。また、多くのマーカーの SNPs 情報が得られているので、本研究で得られたデータを活用してジェノタイピングアレイ等、高能率なマッピングシステムの開発も可能である。

c) オオムギにおける有用形質のマッピングと選抜方法の開発

i) 高密度転写地図集団でのマッピング

オオムギ醸造用品種「はるな二条」と野生オオムギ「H602」の F_1 に「はるな二条」を戻し交雑して育成した組換え染色体置換系統群 (RCSLs)、および同じ交配親から育成した倍加半数体 (DH) 系統で、14 の農業形質を調査し、これらの形質に関わる遺伝子座の同定を試みた。

解析の結果、5 つの質的形質 (穂のロウ質欠乏; Gle (Hor), 黒穎; Blp, 閉花性; cleistogamy,

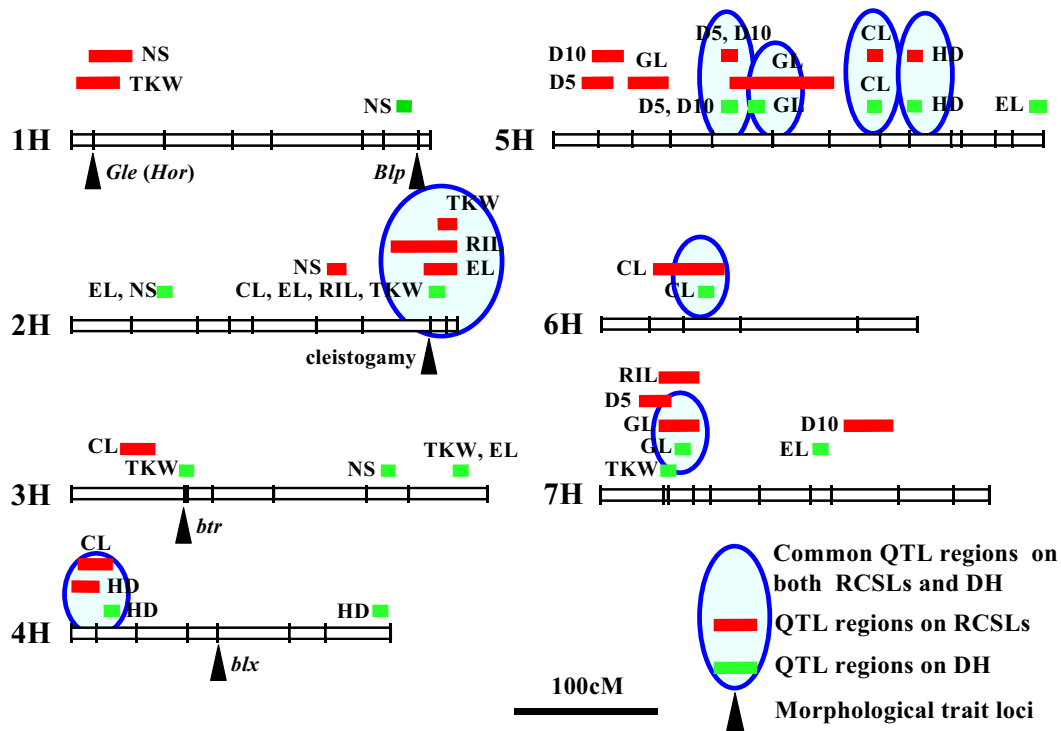


Fig. 1. A linkage map of RCSLs with five morphological markers and QTLs for nine agronomic traits. Marker names and the map distances (cM) are shown on the right and left side of each chromosome, respectively. QTL positions of the DH population (SIM and CIM) are indicated by *black boxes* on the left side of each chromosome, and those of SIM and CIM analysis in the RCSLs are indicated by *open and hatched boxes* on the right side of each chromosome, respectively.

小穂脱落性; btr, 青粒; blx) の表現型は, DH 集団と RCSLs において一遺伝子型に適合する分離比を示し, それぞれの形質を形態マーカーとして連鎖地図上に位置づけることができた. これらの遺伝子座は, 栽培種内の交雑集団で報告されているものと同じ染色体領域に存在した. さらに, 9 つの量的形質 (稈長; CL, 穂長; EL, 小穂段数; NS, 護穎長; GL, 穂軸節間長; RIL, 千粒重; TKW, 圃場出穂期; HD, 休眠性; D5 (完熟後 5 週間) および D10 (同 10 週間)) について表現型を調査し, simple interval mapping (SIM) と composite interval mapping (CIM) を用いて QTL 解析を行なった. 解析の結果, それぞれ DH 集団で 22 (SIM) および 10 (CIM), RCSLs で 15 (SIM) および 18 (CIM) の QTL を検出した. DH 集団で見出された QTL の多くは RCSLs でも検出され, RCSLs ではさらにいくつかの QTL が検出できた (Fig. 1). 複数形質の QTL が位置づけられたマーカー区間には, 特定の遺伝子の多面発現または gene cluster 領域の存在が示唆された. また, 野生種の農業形質は一般に栽培種よりも劣ると考えられているが, いくつかの QTL では「H602」由来のアレルが有用な遺伝効果を有することが明らかとなった.

ii) オオムギ赤かび病抵抗性の遺伝子座と環境変動

赤かび病に対する抵抗性が大きく異なるオオムギ品種間の交配, 「Russia 6」(二条; 抵抗性) × 「H.E.S. 4」(六条; 罹病性) と 「Harbin 2-row」(二条; 抵抗性) × 「Turkey 6」(二条; 罹病性) から, それぞれ組換え近交系統群 (RI1, RI2) を育成し, 2001 年と 2003 年に赤かび病抵抗性の QTL 解析を行い, 2H 染色体に 2 つ, 5H 染色体に 1 つの抵抗性遺伝子座を検出した (2H-1, 2H-2, 5H-1). 今回は, 醸造用品種「はるな二条」(二条; 抵抗性) と野生オオムギ「H602」(二条; 罹病性) の交配から育成された倍加半数体系系統群 (DHHS) を加えた 3 つの集団について, 2004 年に赤かび病抵抗性を評価し, QTL 解析を行った.

QTL 解析の結果, RI1 では, 2H 染色体と 4H 染色体上に QTL が検出され (Table 1), 2H 染色体の QTL は, これまでに検出したもの (2H-2) と同一であると考えられた. RI2 では, 4H,

6H 染色体上に QTL が検出された (Table 1). また, DHHS では, 2H, 4H, 5H 染色体上に QTL が検出され, 4H 染色体の遺伝子座 (4H-1) は, 罹病性の交配親 H602 由来のアレルが抵抗性を示すものだった (Table 1). また, 5H 染色体の遺伝子座 (5H-2) は, 圃場出穂日の QTL と同座または強連鎖しているとみられた.

複数年次の検定を行なった RI1 と RI2 では, 検定スコアに有意な年次間相関が認められた. しかし, QTL 近傍マーカーの遺伝子型に基づいて, 抵抗性スコアの差を調査したところ, 各 QTL の効果が年次間で変動していることが明らかとなった. 切り穂検定法は環境要因の影響を受けにくい検定法と考えられるが, 2004 年の検定では, 3 つの集団全てで検定スコアと圃場出穂日の間に有意な相関が認められ, 検定材料の生育条件が赤かび病抵抗性に影響を及ぼしている可能性が示唆された. 従って, 赤かび病抵抗性を正確に評価するためには, 検定材料の育成時の環境条件についても十分考慮する必要があると考えられる.

Table 1. QTLs for FHB resistance detected by composite interval mapping (CIM) in 2004 season

Population	Chromosome	Marker interval	Position ^{a)} (cM)	LOD ^{b)}	Var. ^{c)} (%)	Weight ^{d)}
RI1	2H-2	MEgacMacc314-FEgtaMacg677	0.0	5.0	23.7	-1.5
	4H-1	MMtgaEatc128-FMgcgEatc530	0.1	2.7	12.4	-1.1
RI2	4H-1	FMacgEcgt288-HVM67	0.3	2.2	25.5	-0.9
	6H-1	FMataEagc408-HVM11	4.1	2.7	28.6	-1.0
DHHS	2H-3	Bmag125-k04002	0.0	2.0	12.2	-1.1
	4H-1	k05042-k03289	1.2	3.2	27.7	1.4
	5H-2	HvLOX-k00835	0.5	3.1	19.7	-1.2

a): Distance of peak LOD score position from the left side marker

b): Peak LOD score in marker interval

c): Explained variance of peak LOD score

d): Estimated additive effect of Russia 6, Harbin 2-row, Haruna Nijo allele

iii) EST マップ情報を利用したジェノタイピングアレイ技術の開発

予備実験として, EST マップに座乗するマーカーを選抜して, 代表的な遺伝資源およびマップ親の SNP 多型を解析した. また, EST マップ情報とアフィメトリックス社の GeneChip システムを組み合わせたジェノタイピングする技術についても検討した. EST マップを利用した高能率遺伝子型選抜システムの開発のための配列情報と利用法に関する特許および SNP 特許の国際出願をした. また, オオムギの主要病害である赤かび病および縞萎縮病に関して, 染色体上の位置情報, マーカー情報を含めて国際出願した.

d) オオムギ EST マーカーの近縁種への応用

i) オオムギ EST に基づくオオムギ-二倍体コムギ間の連鎖地図比較

オオムギはコムギ連の中で最も遺伝学的な解析の進んだ種であり, 経済的に重要なコムギのモデルとしても重要であると考えられる. しかし, 栽培の中心となっているパンコムギのゲノムは高次倍数性を有するので, オオムギの遺伝情報を直接利用することは難しい. 本研究ではパンコムギの 3 種類のゲノムのうち A ゲノムを提供している二倍体コムギにオオムギの EST マーカーを利用して, 二倍体コムギの遺伝地図を作製すると共に, 形質をマップしてオオムギのマップ情報と相互に比較した.

二倍体コムギ *Triticum boeoticum* Boiss. (KT1-1) と *T. monococcum* L. (KT3-5) の交配由来の組換え近交 (RI) 系統 (F₁₀ 世代) の連鎖地図 (96 RFLP マーカー, Shindo *et al.* 2002) 中に, オオムギ EST 由来の PCR マーカーを位置づけた. KT1-1 と KT3-5 を鋳型として 2,695 のオオムギ EST プライマー対で PCR を行い, 得られた増幅断片の塩基配列を解析した. KT1-1 と KT3-5 間で多型を示したプライマー対について, 93 系統の遺伝子型を調査し, 243 のオ

オムギ EST 由来のマーカーを含む，合計 342 マーカー，全長 1,038.5 cM の連鎖地図を構築した．マーカー密度は 3.0 cM/locus であった (図 1)．

3 つの質的形質 (青粒，葉面の毛茸，春化要求性) と 12 の量的形質 (稈長，穂長，穂軸節間長，小穂段数，芒長，護穎長，千粒重，草型，脱落性，圃場出穂日，休眠性) について，RI 系統の表現型を調査した．質的形質の表現型は RI 系統において一遺伝子型に適合する分離比 (1:1) を示し，それぞれの形質を形質マーカーとして連鎖地図上に位置づけることができた．量的形質については QTL 解析 (simple interval mapping) を行ない，合計 28 個の QTL を検出した．形質マーカーや検出した QTL の一部は，オオムギの倍加半数体集団で報告されているものと相同な染色体領域に見つかった．以上のように，二倍体コムギの

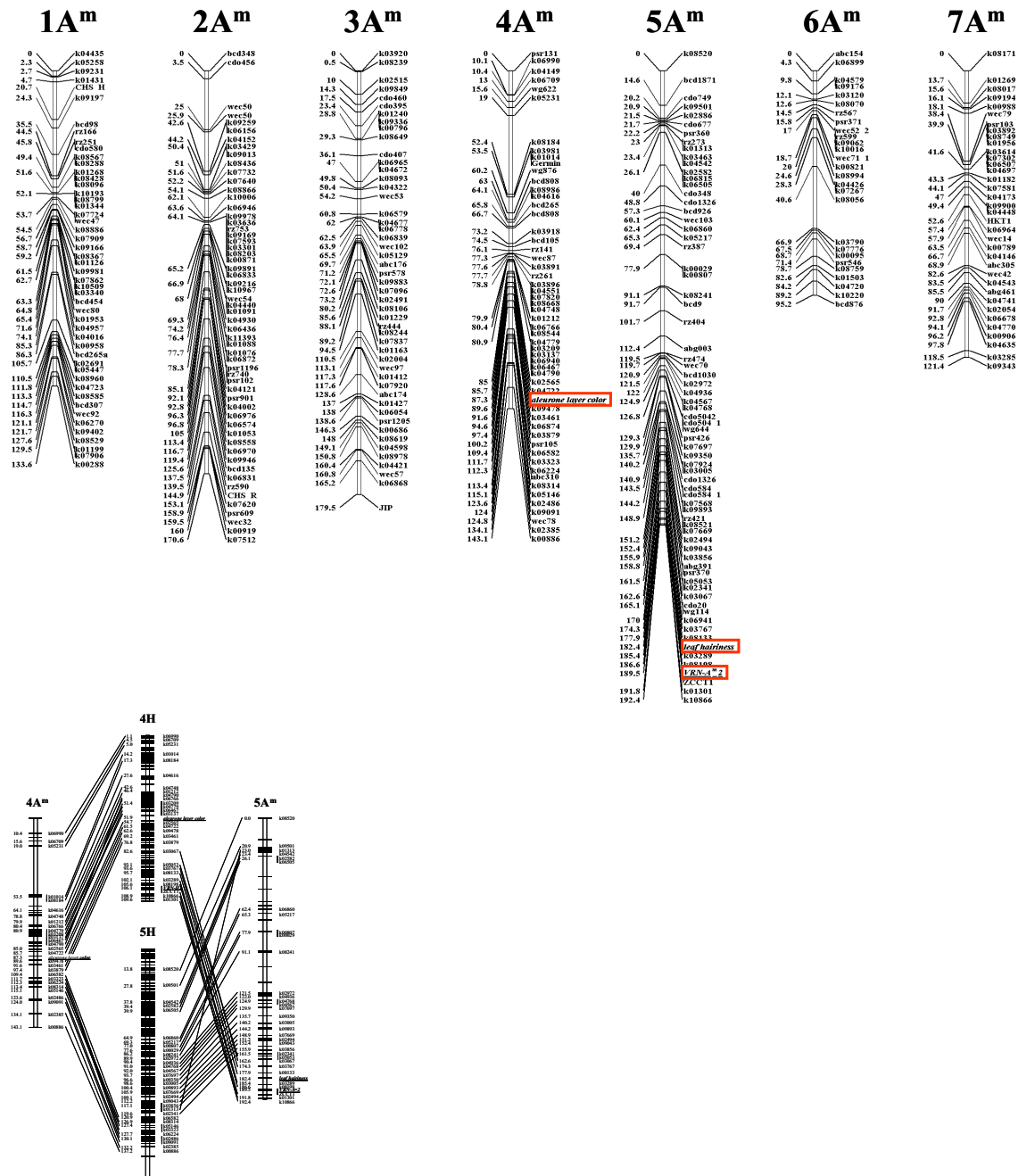


図 1 オオムギ EST マーカーによる二倍体コムギマップ (上) およびオオムギおよび二倍体コムギにおける第 4 および第 5 同祖群の対応 (下)．3 つの質的形質は赤棒で示した．

連鎖地図にオオムギ EST 由来の PCR マーカーを統合することにより，オオムギのゲノム解析によって得られた知見をコムギの解析に利用することが可能である。

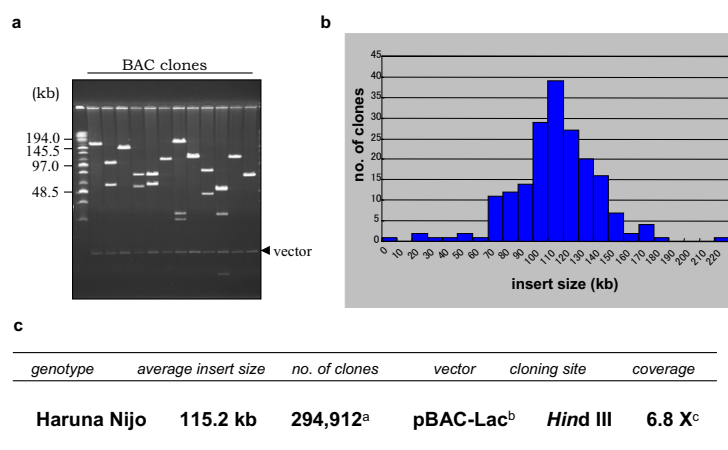
ii) オオムギ近縁種におけるマーカー開発

オオムギ，コムギ，ライムギを含む近縁植物についてオオムギ EST マーカーのプライマー配列に基づく類縁関係を推定した。さらに，近縁野生植物でストレス抵抗性に優れたハマニンニクおよびオオハマニンニクについて，染色体添加コムギ系統の添加染色体の識別と同祖群を決定するために，これらの異種染色体に特異的なマーカー各々約 100 をオオムギ EST から得た。また，野生オオムギ *H. chilense* の染色体添加系統群の添加染色体をオオムギ EST マーカーで同定することに成功した。

e) 「はるな二条」の BAC ライブラリー構築（生物研川崎氏との共同研究）

オオムギはゲノムサイズが約 5,000Mb あり，これはイネの約 10 倍に相当するが，イネ科植物では高度のシntenニーの保存性が知られており，またコムギ連の中でオオムギは最も単純なゲノム構成を持つことから，ムギ類のモデルとして位置付けることができる。このオオムギでポジショナルクローニングや比較ゲノム構造解析等を進める場合，DNA ライブラリーはマーカーや相同配列を用いたオオムギの遺伝子単離のためのプラットフォームとして必須のリソースであることから，本研究では，こうしたオオムギゲノムの研究基盤として使用できるような Bacterial artificial chromosome (BAC) ライブラリーの構築を試みた。現在のところ，オオムギでゲノム解析を進めるのに十分な巨大 DNA ライブラリーは，北米の醸造用品種 'Morex' から作製されたもの (6.3 ゲノム相当) が唯一報告されているだけであり，他の生物種の例に照らしてみても充足しているとは言い難く，また日本独自のオオムギゲノム研究を展開する上でも，独自のライブラリー構築の必要性はきわめて高い。

BAC ライブラリー構築には，日本の醸造用品種「はるな二条」を用いた。制限酵素 *Hind* III で部分消化後，BAC ベクター pBAC-Lac に連結して 294,912 クローン (384 穴プレート×768 枚) からなるライブラリーを構築した。平均のインサート長は 115.2 kb で，葉緑体ゲノムの混入程度が約 1.7% であることから，ライブラリー全体ではおよそ 6.8 ゲノム分に相当すると期待される。



a, 384-well microtiter plate x 768 plates. b, Asakawa et al. *GENE* 191: 69-76 (1997). c, Calculation based on haploid genome size of 4,873 Mb (Arumuganathan and Earle, 1991). The representation of chloroplast DNA sequence in the library was approximately 1.7% (data not shown).

(a) Not I analysis of randomly selected 12 Haruna Nijo's BAC clones. (b) The size distribution of insert DNA of randomly selected 191 Haruna Nijo's BAC clones. Average insert size; 115.2kb. (c) Property of Haruna Nijo BAC library.

f) オオムギマイクロアレイの開発

オオムギでは、米国を中心として、岡山大学も含む国際コンソーシアムによって Affymetrix 社製の GeneChip が開発されて、ゲノム全体を網羅する遺伝子発現解析が可能となった。このため、我々は Affymetrix 社製 Genechip を網羅的遺伝子発現解析に、cDNA マイクロアレイを主として特異的サンプルの遺伝子発現解析に用いることを想定している。

i) cDNA アレイ開発の予備実験

岡山大学が有するオオムギ cDNA ライブラリのうち 3 種類から 1,536 個の遺伝子クローンを選抜した。それぞれのクローンを鋳型にした PCR によって増幅し、全クローンの PCR 産物を 2 反復ずつ各ガラス単体上にスポットし、ハイブリダイゼーションに用いた。オオムギ発芽種子(吸水から 4 日目)、葉身(出穂期の上位 3 葉)、葉鞘と稈(播種後 2 ヶ月)、幼穂(3~5cm)、根(播種後 2 ヶ月)からそれぞれ全 RNA を抽出、標識したものをプローブとして用いて、55°C、18 時間ハイブリダイズし、アレイをスキャナで読み取った。読み取り結果は解析ソフトウェアを用いてシグナル強度を検出し、コントロールスポットのシグナル強度を用いて補正した。各組織のサンプルは 2~4 枚のアレイを反復して解析し、反復平均値をクローンの発現量とした。

シグナル強度の値に基づいて各組織で発現の強かった上位 50 クローンを選択した。そのうち、発芽種子(吸水 4 日目)では 16 クローン、幼穂では 2 クローン、根(栄養生長期)では 2 クローンが 2 倍以上、葉身では 4 クローンが 1.5 倍以上各組織に特異的に発現したが、葉鞘と稈では顕著に発現したクローンは見られなかった。一方、全ての組織で発現するハウスキーピング的遺伝子が 4 クローン見られた。これらの結果から、試作した cDNA マイクロアレイは組織によって顕著に発現するクローンを検出できることが明らかになった。

g) タンパク質量解析システムの開発

ビール醸造形質に関わるサッポロビール社との協同研究を中心として、精力的にサンプル採取を進め大量解析の準備をした。また、新たに導入した MALDI-TOF/MS システムの調整を行って大量解析システムを構築した。麦芽形成過程で発現するタンパク質の網羅的な解析とタンパク質地図のデータベース化を目的とし、まず、オオムギの幼芽に含まれるタンパク質の同定を行って、システムの安定性を確認した。

(2)研究成果の今後期待される効果

オオムギ関連ゲノムリソースの開発は順調に進み、本研究を開始する前と比較するとオオムギの遺伝子関連研究の基礎は格段に向上した。今後は本プロジェクトでも進めてきたタンパク質量解析や BAC ライブラリーを利用した遺伝子単離などリソースを利用した解析がますます加速されるとみられる。また、現在世界で最も高密度なオオムギの EST マップは、ゲノム配列解析の進んでいないオオムギおよびコムギにとって極めて重要なゲノムリソースであり、今後これを活用したゲノム解析技術の進展、育種技術の開発、多様性解析に基づくあらたな遺伝変異の導入などが進むと考えられる。特に高能率のジェノタイプングアレイを用いた遺伝解析、系統解析、蛋白解析などがより高速かつ高精度に行えるようになると、実用的なゲノムの機能開発と制御(育種)システムの利用に発展することが期待でき、産業界にも大きな効果があると考えられる。

3. 2 機能解析開発グループ (岡山大学資源生物科学研究所：馬建鋒，且原眞木，杉本学)

(1)研究実施内容及び成果

a) オオムギにおけるアルミニウム耐性機構の解明と耐性遺伝子のマッピング (馬)

アルミニウムイオン毒性は世界の耕地面積の3～4割を占める酸性土壌での主な作物生育阻害因子である。アルミニウムイオンは数マイクロの濃度で速やかに根の伸長を阻害し、根による養水分の吸収機能を低下させる。オオムギは一般的にアルミニウム耐性が弱いとされているが、世界各地由来のオオムギ数百品種を用いてアルミニウム耐性の程度を調べた結果、品種によってアルミニウム耐性が大きく異なることがわかった。そのうち、アルミニウム耐性の異なるオオムギ21品種を選んで検討した結果、アルミニウム耐性品種はアルミニウム処理によって根からクエン酸が分泌されていることをつきとめた(図1)。しかも、オオムギにおいてアルミニウムによるクエン酸の分泌は他の植物と異なり、特徴的なパターンを示す。さらに、アルミニウム耐性と根からのクエン酸の分泌量との間に高い正の相関があることが認められ、根からのクエン酸の分泌がオオムギのアルミニウム耐性機構であることをつきとめた。

クエン酸の分泌量に関与する遺伝子のマッピングを行った結果、アルミニウム耐性に関与する遺伝子と同じく、染色体4Hに座乗し、SSR マーカーHVM3, Bmag353 と Bmac310 と連鎖していることをつきとめた(図2)。これらの結果はクエン酸の分泌に関与する遺伝子がアルミニウム耐性と密接に連鎖しているか、あるいは耐性遺伝子そのものであることを示しており、クエン酸の分泌がオオムギにおけるアルミニウム耐性機構であることを支持している。

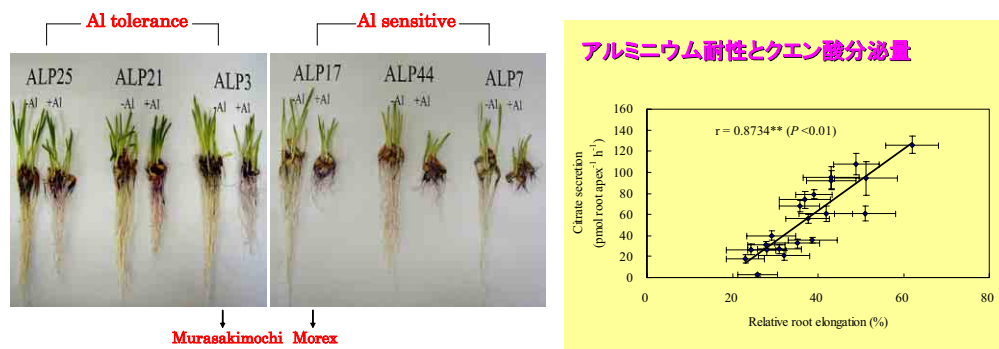


図1 アルミニウム耐性におけるオオムギの品種間差とアルミニウムによるクエン酸分泌との関係

オオムギにおけるアルミニウム毒性と耐性の分子機構を明らかにするために、オオムギ GeneChipを用いてマイクロアレイ解析を行った。Alにより2倍以上の発現誘導を示した遺伝子はアルミニウム耐性品種ムラサキモチ，アルミニウム感受性品種Morexでそれぞれ149, 211遺伝子であり、また1/2以下に減少した遺伝子はそれぞれ90, 122遺伝子であった。誘導された遺伝子の多くはストレス応答に関与しており、ムラサキモチではタンパク質分解の関連遺伝子の増加が、MorexにおいてはABCトランスポーターの誘導が特徴的であった。有機酸代謝に関連した遺伝子の変動はMorexにおいてイソクエン酸リアーゼの増加が認められたのみであった。またムラサキモチにおいてはAlにより誘導される輸送体タンパク質は認められなかったが、複数の輸送体タンパク質がMorexに対し恒常的に高い発現を示していた。

Linkage map on chromosome 4H
Al tolerance and citrate secretion

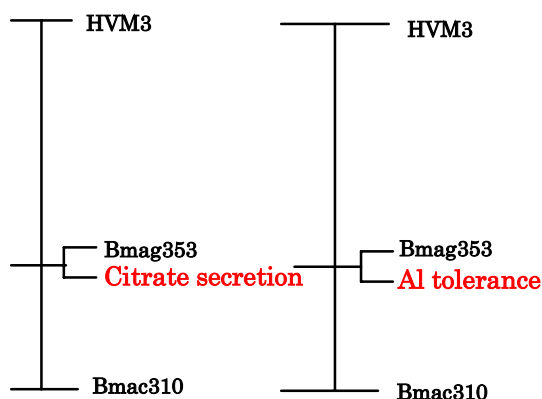


図2 アルミニウム耐性とクエン酸の分泌に関与する遺伝子の染色体座乗位置

b) オオムギの鉄欠乏ストレス耐性遺伝子のクローニングと機能解析 (馬)

鉄欠乏ストレスは世界の耕地面積の 3 割を占めるアルカリ土壌での主な作物生育制限因子である。オオムギは不溶性の鉄を獲得するために根から鉄キレート物質であるムギネ酸を分泌し、鉄-ムギネ酸錯体のまま輸送するという巧みな機構を持っている。我々は鉄-ムギネ酸錯体の輸送に関与する遺伝子 (*HvYSL1*) を単離した。この遺伝子は主に根に発現し、鉄欠乏によって強く誘導された。 *In situ* hybridization を行った結果、この遺伝子の mRNA は根の表皮細胞に局在していることが明らかとなった。さらに、この遺伝子にコードされているタンパク質の抗体を用いて、免疫染色した結果、*HvYSL1* は表皮細胞の細胞膜に局在していることがわかった(図 3)。 *HvYSL1* 遺伝子を酵母の鉄吸収欠損株に導入し、相補性実験を行った結果、鉄-ムギネ酸の共存下では、酵母の生育が回復したが、ニコチンアミン-鉄の共存下では回復しなかった。またアフリカツメガエルの卵細胞に *HvYSL1* の cRNA を注射して、各種金属錯体に対するレスポンスを調べたところ、鉄-ムギネ酸錯体の時のみ電流の変動が見られた。これらのことは *HvYSL1* が今まで報告されたトランスポーターとは異なり、鉄-ムギネ酸錯体に特異的なトランスポーターであることを示している。

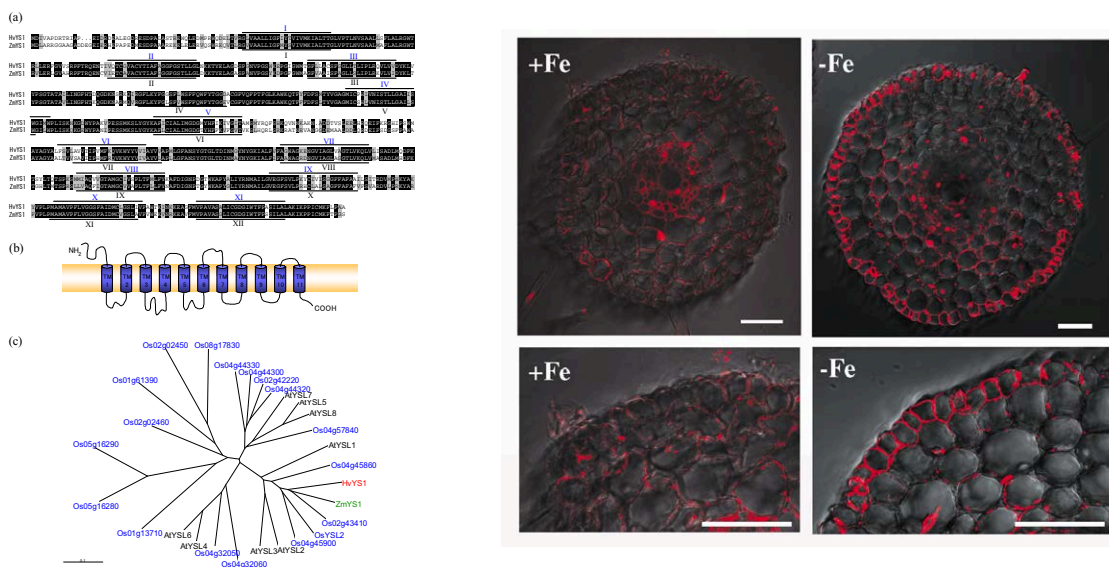


図3 鉄-ムギネ酸錯体トランスポーター遺伝子 *HvYSL1*(左)と *HvYSL1* の細胞局在性(右)

c) ミネラル高集積オオムギ品種のスクリーニング (馬)

オオムギは醸造用や食料用、飼料として広く使われている食用作物であり、オオムギに含まれるミネラルは我々にとって重要な直接あるいは間接的な供給源である。オオムギのミネラル集積機構を明らかにするために、まずオオムギの穀粒に高濃度のミネラルを集積する品種のスクリーニングを行った。同一土壌で栽培した世界各地に由来するオオムギ標準品種 (SV) 274 品種とアメリカのオオムギコアコレクション (BCCUS) 135 品種の穀粒を用いて測定した結果、SV についてケイ素は検出限界から 4381ppm、亜鉛は 24.7ppm から 62.3ppm、鉄は 8.8ppm から 75.5ppm までの変異が認められた。条性、皮裸及び地域との関連を調べた結果、ケイ酸含量は皮麦のほうが裸麦よりはるかに高かった。しかし、ほかの特性とミネラル含量との関連が認められなかった。またケイ酸、亜鉛と鉄含量の間の相関も認められなかった。BCCUS についてはケイ素が検出限界から 3716ppm、亜鉛が 18.7ppm から 72.2ppm、鉄が 7.9ppm から 58.5ppm までの変異があった。また標準品種と同様に裸麦のケイ素含量が皮麦のより低かったが、それ以外に特性とミネラル含量との関連が認められなかった。そのほか、カルシウム、マグネシウムとカリウムの含量も測定した。

ミネラルの局在性を調べたところ、ケイ素は主に穀皮に局在していたのに対し、鉄と亜鉛は胚と胚乳に局在していた。またミネラル含量の高いと低い数品種を異なる土壌と気候条件下で栽培して、ミネラル含量の変動を調べた結果、ミネラル含量は遺伝的に制御されていることを明らかにした。これらの基礎的データは今後オオムギのミネラル集積機構の解明や集積に関する遺伝子の単離に寄与する。

d) 水チャネル・アクアポリン遺伝子 (MIP 遺伝子ファミリー) の同定 (且原)

アクアポリンは水と低分子化合物の輸送を担う膜タンパク質である。乾燥および塩ストレス環境下での水輸送を制御して耐性機構に深く関与していると考えられている。遺伝子としては歴史的経緯から MIP 遺伝子とも呼ばれるこれらの遺伝子について、オオムギ EST データベースと contig 配列から、34 個の遺伝子ファミリーの候補を見出した (図 1)。これらオオムギアクアポリン遺伝子について、イネゲノムデータから同定したイネアクアポリンや、すでに報告があるトウモロコシの遺伝子を対象としてオルソログ解析を行った。また原形質膜型アクアポリン (PIPs) と考えられる 11 個については RT-PCR によって発現を検出した。また耐塩性がきわめて強い塩性植物アツケシソウからもアクアポリン遺伝子を単離した。

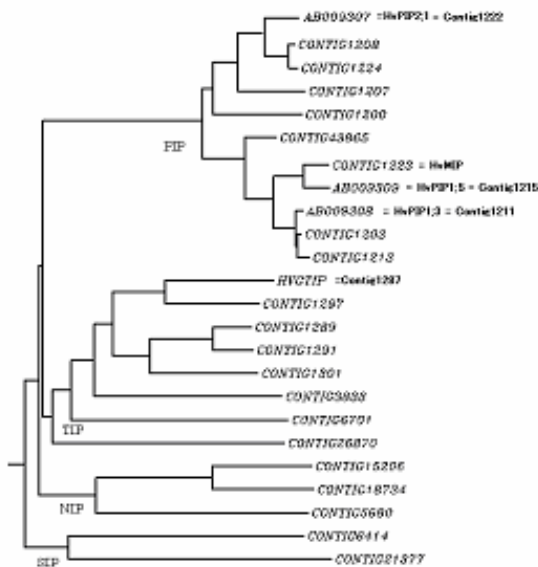


図 1
オオムギの MIP 遺伝子ファミリー

PIP: 原形質膜型

TIP: 液胞膜型

NIP: Nodulin-like MIP

SIP: Small basic MIP

すでに全長 cDNA が DNA データバンクに登録済みのものはアクセッション番号を、他のものは contig 番号で表記した。

e) アクアポリンの発現解析・機能解析 (且原)

オオムギ PIPs の発現に対する塩ストレス, 浸透ストレス, 重金属ストレス, 酸化ストレスによる影響を, real time PCR によって定量的に解析した. 原形質膜型 HvPIP2;1 は, オオムギアクアポリンファミリーの中でも最も発現量が多いものの一つであった. HvPIP2;1 遺伝子が実際に水輸送活性をもつアクアポリンをコードしていることをアフリカツメガエル卵母細胞の発現系で確認した. HvPIP2;1 の転写産物および翻訳産物の発現量は強い塩ストレスによって抑制的に制御されていた. これは塩ストレスによる脱水を軽減するためと考えられた. HvPIP2;1 を形質転換イネで強制的に高発現させると, その根の水透過性は上昇した. さらに HvPIP2;1 を過剰発現させたイネでは葉内二酸化炭素透過性が上昇しており, その結果として光合成能力も向上したことが認められた (図2). このことは, アクアポリンが水以外にも二酸化炭素の膜透過を担っており, アクアポリン活性によって光合成速度が制御される可能性を示唆している. また HvPIP2;1 過剰発現イネでは蒸散も増えおり, また水チャネル発現の抑制が効かないため, 水ストレス (乾燥ストレス) に対しては弱くなり, 塩ストレス感受性は増大していた.

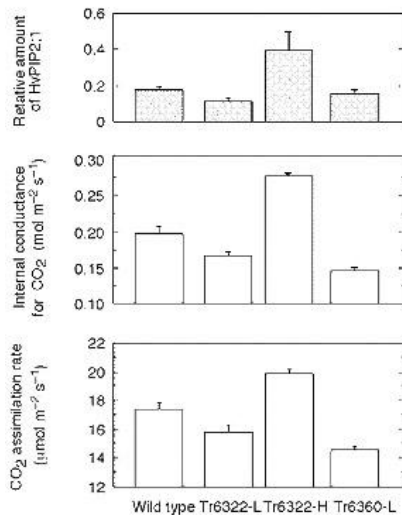


図 2

アクアポリンと二酸化炭素透過性

HvPIP2;1 を過剰発現している形質転換イネ (Tr6322-H 系統) では二酸化炭素透過性が上昇し (中段)、光合成の同化速度も上昇している (下段)。

f) 環境応答機構におけるカルシウムシグナリングを制御する因子 (且原)

ストレス応答機構の細胞内シグナル伝達系に関与する因子として想定されるオオムギの MAPKase と CAX (Calcium proton exchanger) の遺伝子を新規に同定・単離した. 前者は生育温度によって発現が制御されていた. 後者 (*HvCAX1-1*) は細胞質で濃度が上昇したカルシウムをシグナル伝達が終了したのちに液胞に移行させて細胞質カルシウム濃度を下げするために機能している. *HvCAX1-1* は 200mM NaCl の塩ストレスによって一過的に発現が上昇し, その後は発現が減少した (図3). *HvCAX1-1* はカルシウム輸送活性を欠損する酵母の形質を相補した. Site-directed mutagenesis による変異 *HvCAX1-1* の機能解析により, Lys³⁸⁴ と Gly³⁸⁵ が *HvCAX* のカルシウム輸送活性発現に重要であることを見出した.

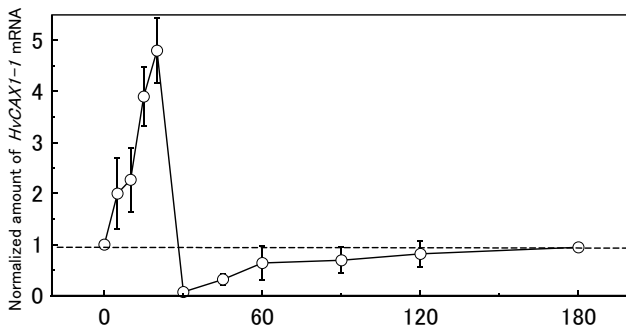


図 3

HvCAX1-1 の相対的発現量の変化.

Time=0 で 200 mM NaCl を水耕栽培しているオオムギ根に与えたのち 180 分後まで *HvCAX1-1* 転写産物を real-time RT-PCR によって定量した.

g) オオムギ形質転換（且原）

分子育種によって植物個体を得る手法として、また遺伝子機能を個体レベルで評価・解析する基盤技術としての形質転換技術について、オーストラリア CSIRO の協力で、オオムギ形質転換技術の研修をうけ、その技術を導入した。GFP を導入した形質転換オオムギ T₀ の再生個体までを得ることができた（図4）。

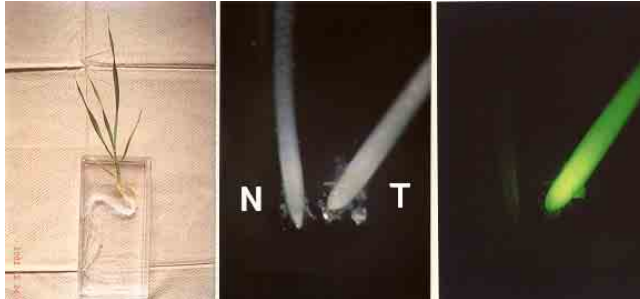


図4
形質転換オオムギ。
GFP で形質転換した T₀植物（写真左）および非形質転換体の根（N）と形質転換体の根（T）を通常の明視野（写真中）と蛍光（写真右）で見たところ。

h) 塩ストレス抵抗性オオムギで発現する遺伝子とタンパク質の解析（杉本）

塩ストレス抵抗性オオムギがもつ特異的遺伝子探索やストレス抵抗性に関与する遺伝子の集積を目的として、塩ストレス抵抗性オオムギの網羅的 cDNA 配列解析を行い、品種特異的遺伝子カタログを構築し評価した。塩ストレス抵抗性に関与する遺伝子の発現が最も顕著と思われる根に焦点を当て、0.1M 塩化ナトリウムを含む培養液で生育させた塩抵抗性オオムギ K305 の根から調製した mRNA を用いて cDNA ライブラリーを構築し、ランダムに選択した 6,432 個の cDNA を 3' と 5' の両端から塩基配列を解析してその EST を phred/phrap 法で解析した結果、冗長性のない 5,726 個の EST を得た。対象としてオオムギ Barke の根 cDNA ライブラリーを同様に解析してそれぞれ発現頻度の高い順に整列させ比較した結果、Barke で発現していない遺伝子が塩ストレス抵抗性オオムギで高発現していることが明らかとなった（表）。

表. Contig の発現頻度

Ranking	塩ストレス抵抗性オオムギ (1,173contigs)			Barke (1,130contigs)		
	member	%	Identification	member	%	Identification
1	57	3.9	No hits 特異的	48	4.1	Heat shock protein 70
2	49	3.3	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	35	3.0	Tubulin α-2 chain
3	36	2.4	No hits 特異的	29	2.5	GST
4	36	2.4	Tubulin α-2 chain	24	2.1	ATP/ADP translocator
5	35	2.4	28S ribosomal RNA gene	23	2.0	No hits
6	29	2.0	18S ribosomal RNA gene	22	1.9	No hits 特異的
7	29	2.0	PR-1 protein gene 特異的	22	1.9	S-adenosylmethionine decarboxylase
8	27	1.8	No hits 特異的	20	1.7	No hits
9	27	1.8	BsiI gene	17	1.5	Methionine synthase
10	24	1.6	No hits 特異的	17	1.5	Phenylalanine ammonia-lyase
11	24	1.6	No hits	17	1.5	Stress- and defence-related gene
12	23	1.6	ACCOX 特異的	17	1.5	No hits
13	23	1.6	Tonoplast intrinsic protein	16	1.4	Enolase
14	23	1.6	No hits	16	1.4	Tubulin alpha-3
15	22	1.5	Transmembrane protein	16	1.4	SAM
16	21	1.4	S-adenosylmethionine decarboxylase	16	1.4	IAA1 protein
17	19	1.3	V-ATPase	15	1.3	Elongation factor-1 alpha
18	18	1.2	No hits	14	1.2	Putative impotin
19	18	1.2	No hits 特異的	14	1.2	Malate dehydrogenase

発現頻度 10 以上の遺伝子について調査したところ、塩ストレス抵抗性オオムギ特異的遺伝子が 12 個認められ、エチレン合成に関与するエチレン酸化酵素や生体防御タンパク質である PR-1 と PR-15 をコードする遺伝子、またデータベースに登録されている配列と相同性を示さない 9 個の機能未同定遺伝子であることが明らかとなった。これら特異的遺伝子の EST 配列からプライマーを合成し塩ストレス抵抗性オオムギ RNA を鋳型にした RT-PCR を行ったところ、予想される大きさの遺伝子断片が増幅することを確認した。ノーザンハイブリダイゼーションにより、これら遺伝子の塩ストレス発現誘導性や発現部位特異性が異なる事を明らかにした。

次に、塩ストレス抵抗性オオムギで特異的に発現しているタンパク質群を明らかにすることを目的として、二次元電気泳動法 (2D-PAGE) によりタンパク質をスクリーニングし、その構造を解析した。0.1M 塩化ナトリウムを含む培養液で培養した塩ストレス抵抗性オオムギと塩ストレス感受性オオムギの根のタンパク質抽出液を調製し、固定化 pH 勾配ゲル (pH 4-7) を用いた等電点電気泳動を行った後、ゲルストリップをアルキル化処理し、12-14% SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。分離したタンパク質を銀染色で検出した結果、塩ストレス抵抗性オオムギで特異的に発現している 6 個のタンパク質スポットを検出することができた。これらタンパク質スポットを nano LC-MS/MS 解析と NCBI データベースに対する Mascot サーチを行った結果、スポット 1, 2, 3, 4, 5, 6 はそれぞれ PR-10 タンパク質、カフェイン酸-O-メチルトランスフェラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、デヒドロアスコルビン酸還元酵素、パーオキシダーゼと同定された。

i) オオムギの網羅的タンパク質マップ構築のためのプロテオーム解析 (杉本)

生物種独自の網羅的タンパク質マップのデータベース構築を目的として、電気泳動ゲル全領域に含まれるタンパク質の解析を行った。20°C で催芽 5 日目の醸造用オオムギ「はるな二条」のシュートを用いてタンパク質抽出液を調製した。一次元電気泳動では、タンパク質抽出液を 12.5% SDS-PAGE を行い CBB 染色し、タンパク質を含む上端から下端の間を均等に 103 個のゲル断片に分割した。二次元電気泳動では、固定化 pH 勾配ゲル (pH 4-7) を用いた等電点電気泳動を行った後に上記 SDS-PAGE を行い、タンパク質を含む領域を 884 個のゲル断片に分割した。一次元電気泳動のゲル断片は nano LC-MS/MS と Mascot サーチにより、二次元電気泳動のゲル断片は MALDI-TOF MS と MS-Fit サーチによりタンパク質の同定を行った。2D ゲルについて分子量 50-70kDa, pI 4-7 を網羅する 170 ゲル断片を解析したところ、植物のタンパク質と相同性を示すタンパク質を 98 個のゲル断片から検出した。同定した 57 個のタンパク質のうち、9 個はオオムギ由来タンパク質と相同性を示し、16 個のタンパク質は複数のゲル断片に存在していた。エノラーゼは分子量 52.3-57.3kDa, pI 5.44-5.53 を網羅する 3 個のゲル断片に認められ、オオムギ完熟種子タンパク質の 2D ゲル分析で同定されている分子量 60kDa, pI 5.5 付近にある 2 つのエノラーゼスポットと非常に一致していた。プロテインジスルフィドイソメラーゼは水平に連続する 3 個のゲル断片と別に 1 個のゲル断片に認められ、オオムギ完熟種子タンパク質の 2D ゲル分析で同定されている分子量 67kDa, pI 5.0 付近にある 6 個の同タンパク質スポットと一致していた。多くのアイソフォームが知られている HSP70 は pI 4.45-5.62 を網羅する 14 個のゲル断片に認められた。一次元電気泳動について 103 個のゲル断片に含まれるタンパク質を LC-MS/MS 解析したところ、NCBI データベースと有意に相同性を示すタンパク質は 426 個あり (p<0.05)、冗長性のない 56 個のタンパク質を得ることができた。同定されたタンパク質はアミノ酸配列から推定される分子量の大きさにほぼ沿った順に分離され、このうちオオムギ由来タンパク質と相同性を示すものは 26 個あり、2D ゲル解析で同定されたエノラーゼ、プロテインジスルフィドイソメラーゼ、HSP70 は分子量に相当するゲル断片に検出された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

(馬)

オオムギにおけるミネラル吸収機構の制御は、土壌や作物の栄養条件によって引き起こされるストレスへの適応や生産物の用途を拡大の観点から極めて重要であり、産業的な効果も大きい、中でもアルミニウム耐性はオオムギのミネラルストレスの中でも最も重要なものの一つであり、耐性遺伝子の機能が明らかになったこと、さらに単離に向けてマッピングが完了した意義は大きい。GeneChip で検出された遺伝子の中に当該遺伝子が存在している可能性も少なからずあるとみられる。オオムギにおける鉄—ムギネ酸錯体の輸送は鉄欠乏に対してオオムギが有するエレガントな耐性獲得のシステムであり、この遺伝子の単離は作物の鉄欠乏に対する適応を考える上で大きな手がかりを与えるものである。

(且原)

アクアポリンは動植物を含めて存在し、水輸送を担うのシステムとして近年大きな注目を集めている遺伝子群である。また、カルシウムシグナリングは塩ストレス耐性に関わる要因として重要である。これらをいち早くオオムギで同定し、その機能を解析できたことは、乾燥、湿害、塩などのストレス耐性の制御機構を解明する上で大きな成果であり、温暖化や塩害など地球環境の悪化に対する植物側の適応を考える上で重要である。

(杉本)

本研究で構築した塩ストレス抵抗性オオムギ特異的遺伝子カタログは、従来では探索不可能な遺伝子を網羅するものであり、新規な環境ストレス抵抗性遺伝子を発見する新たなスクリーニングツールとして利用することにより環境ストレス抵抗性植物の開発や作出に有用な情報を提供するものと期待できる。また、塩ストレス抵抗性オオムギが他の植物が環境ストレスに抵抗性を示すために誘導する遺伝子がコードするタンパク質と同様なものを複数にわたり発現することを明らかにして塩ストレス抵抗システムの全体像を把握することができた結果、塩ストレスに対し強固な抵抗性植物の作出が期待できる。

タンパク解析システムにおいては、現在主に二次元電気泳動法により分離されたタンパク質スポットのデータベースが構築されているが、解析されているタンパク質スポットは限定的であり、起源が異なる生物間ではスポットプロファイルが一致しない等の問題も考えられる。2Dゲル断片を用いたMALDI-TOF MS解析法は迅速に効率よく2Dタンパク質マップの作製が可能であることを示すものであり、生物種独自の網羅的タンパク質マップのデータベース構築のための強力なツールとして期待できる。

3. 3 物理地図生理機能グループ (香川大学農学部 武田 真)

(1) 研究実施内容及び成果

a) オオムギ 1H 染色体の物理地図の作成に有用な染色体特異的 DNA マーカーの開発

1H 染色体長腕の関与するオオムギ相互転座 6 系統をコムギと交雑し、それぞれの転座 1H 染色体をコムギに添加した系統シリーズを育成した。また、*Aegilops cylindrica* の配偶子致死染色体を利用してコムギの遺伝的背景に添加されたオオムギ 1H 染色体に転座、欠失等の構造変異を誘発した。分子マーカーならびに染色体調査によりこれら構造変異の切断点を決定し、11 の切断点と 26 マーカーからなるオオムギ 1H 染色体に関する細胞遺伝学的地図を作成した。さらに、オオムギ品種‘はるな二条’の BAC ライブラリーから蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) 用のプローブとして利用可能な低コピー配列を選抜した。オオムギ品種‘はるな二条’の BAC クローン約 600 個からドットプロットによる 1 次スクリーニングと FISH による 2 次スクリーニングを行い、染色体マーカーとして有用なクローンを 3 個獲得した。そのうちの 2 個の BAC クローンが 1H 染色体に位置づけられた (図 1)。今回選抜した BAC クローンは染色体のランドマークとして有用である。

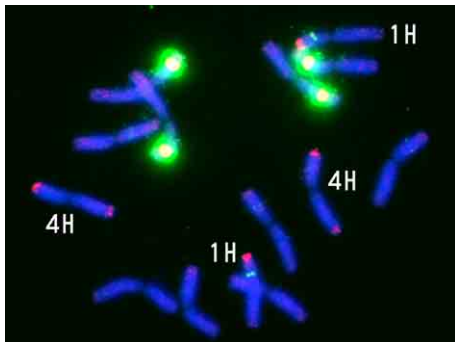


図 1 低コピー配列を含む BAC クローンをを用いた FISH. 1H 染色体短腕末端と 4H 染色体の両方の腕の末端にシグナル (赤色) がみられる。緑は 18S-25S rDNA プローブ。

b) オオムギ皮裸性遺伝子座領域の高精度遺伝マッピングおよび物理マッピング

オオムギは穎果と穎が糊状物質で固着した「皮ムギ」と両者が分離できる「裸ムギ」に大別され、前者は醸造および飼料用に、後者は主に食用に用いられる。したがって、オオムギの皮裸性は収穫物の用途を規定する農業的に重要な形質である。皮裸性は単一の遺伝子の違いで決まり、裸性が皮性に対して劣性である。このように穀粒のタイプに皮性と裸性がみられることはイネ科作物のなかでオオムギ固有の特徴である。オオムギの皮裸性を決定する分子機構を解明することを目的として、裸性遺伝子 (*nud*) のポジショナルクローニングを試みた。まず、バルク分析によって皮裸性遺伝子座と密接に連鎖する AFLP マーカーをスクリーニングした。AFLP マーカーを SCAR マーカー化し、皮裸性遺伝子座に密接連鎖する検出の容易な PCR マーカーの開発を行った。裸性品種と皮性品種の交配に由来する合計 2,380 個体の分離集団を用いて高精度マッピングを行い、裸性遺伝子を 2 つの共優性マーカー sKT3 と sKT9 の間にそれぞれ 0.6 cM および 0.06 cM の距離で位置づけた。さらに、*nud* 座を挟み込む SCAR マーカーを岡山大学の高密度 EST マップ上に位置づけ、*nud* 遺伝子を挟み込む 2 つの EST を特定した。これらの EST に高い相同性を示すイネ EST を検索したところ、イネ第 6 染色体長腕に該当する EST が見つかり、その間のイネ染色体上の物理距離は約 370 kb であった。この区間のイネゲノム配列情報を元にマーカー開発を進め、オオムギ *nud* 座に対応するイネ第 6 染色体上の領域を約 80 kb に絞り込むことができた。これらの結果から、オオムギ *nud* 座とイネの対応する染色体領域の間にはマイクロシテニーがみられることがわかり、イネのゲノム情報が新たなオオムギマーカーの開発に有効に利用できることが明らかになった (図 2)。

次に、*nud* 座に密接連鎖するマーカーをプローブとして‘はるな二条’ BAC ライブラリーをスクリーニングし、*nud* 座をカバーする物理地図の作成を試みた。現在までに約 400 kb にわたる BAC コンティグが構築できた。このコンティグ上で末端側のマーカーと *nud* 遺伝

子との間に組換え体が検出され、こちら側の物理的境界は決定できたが、動原体側では BAC コンテイング上の先端のマーカースKT3 と *nud* 遺伝子との間の組換え個体は得られておらず、動原体側での *nud* 座の物理的境界は未決定である。しかし、人為的に誘発された複数の裸性系統のアレルの解析などから、これまで構築してきた BAC コンテイング内に皮裸性遺伝子の有力な候補を見出した。

一方、*nud* 座から末端側に 0.06 cM に位置する PCR マーカー sKT7 を用い、世界各地のオオムギ野生種ならびに栽培種計 259 系統における多型調査を行った。この遺伝子座の対立遺伝子 IV は皮性栽培系統には全く見出されないが、裸性栽培系統は例外なくこの対立遺伝子を有していた。このことから、現在の裸麦は単一起源であることが強く示唆される。

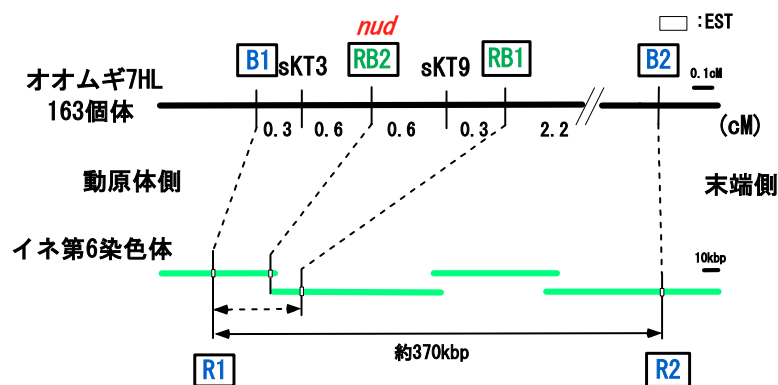


図2 オオムギ 7H 染色体長腕 *nud* 座領域のイネ第 6 染色体とのマイクロシンテニー。オオムギ遺伝地図は‘コビンカタギ’×‘Triumph’ 163 個体での結果に基づく。

(2) 研究成果の今後期待される効果

オオムギの 1H 染色体をモデルとして、高精度の細胞遺伝学的地図を作成し、遺伝子が密に存在する領域を特定した。そのような領域を集中的に解析することで、有用な遺伝子が効率的に単離できるものと期待される。また、本研究で開発したオオムギ 1H 染色体をコムギの遺伝的背景で検出できる PCR マーカーは、オオムギ遺伝子のコムギ育種へ利用を図る際の選抜のために有効に利用できると考えられる。

一方、オオムギ皮裸性遺伝子については有力な候補を特定することができた。形質転換等による証明が今後の課題として残るが、本研究で特定した候補遺伝子はオオムギの皮裸性の分子的基盤を理解するために有用な知見を提供すると考えられる。現在、裸ムギの利用は世界的にみると我が国を含む東アジアに限定されているものの、裸ムギは搗精の手間があまりかからず、容易に食用に供すことができ、多量 of 食物繊維を含み機能性食品として優れるなど多くの長所を有している。そのため、世界的に裸ムギへの関心が高まるにつれ、本研究で得られた知見を利用して各国の気候条件に適した裸ムギ品種が育成され、その用途も多方面に広がると期待される。

3. 4 タンパク解析グループ (三重大学生物資源学部 掛田克行)

(1) 研究実施内容及び成果

オオムギ近縁野生種 *Hordeum bulbosum* の自家不和合性(S)タンパク質 (*S* 遺伝子産物) の探索と同定を目的として、二次元電気泳動(2-DE)法と ICAT (Isotope-coded affinity tag) 法を用いたタンパク質のディファレンシャル解析を行った. *S* タンパク質 (♀側) は、開花期の雌ずいで発現し、*S* 遺伝子型間で高度な多型性を示すと予測される. そこで 2-DE 法と ICAT 法を用いて、開花期の雌ずいタンパク質を 2 つの *S* 遺伝子型 (S_2S_2 , S_3S_3) 間で比較し、いずれかの遺伝子型で特異的に検出されるタンパク質 (またはペプチド) の探索を行った.

2-DE 解析では、*S* 遺伝子型以外の遺伝的背景を均一にするため、 S_2S_2 および S_3S_3 遺伝子型それぞれについて、10 個体の成熟雌ずいから抽出したタンパク質を等量ずつ混合して分析用サンプルとした. 銀染色後の二次元電気泳動パターンを 2 つの *S* 遺伝子型間で比較した結果、再現性のある遺伝子型特異的スポットは、pI 6-9 領域では認められなかったが、pI 4-7 領域では S_2S_2 より 2 種類 (Spot No. 1 と No. 3)、 S_3S_3 より 2 種類 (Spot No. 2 と No. 4) 検出された (図 1). これらのタンパク質スポットの LC-MS/MS 分析および Mascot search

の結果、Spot No. 1 と No. 2 は共に p23 co-chaperone と、Spot No. 3 と No. 4 は共に Universal stress protein (USP) と同定され、これらをそれぞれ LC-12 および LC-34 とした. これらの cDNA コード領域全体の配列を 3 つの *S* 遺伝子 ($S_1 \sim S_3$) ホモ型から RT-PCR により増幅し、シーケンス解析した. LC-12 では、3 つのアレルの配列が完全に一致したため、このタンパク質は *S* 遺伝子産物ではないと考えられた. 一方 LC-34 では、3 つのアレルの推定アミノ酸配列の間で 4 箇所の多型が認められ、 S_2S_2 と S_3S_3 における 2-DE スポットの泳動度の差異もこの多型に基づくことが確認された. 分離集団 662 個体を用いた連鎖分析の結果、LC-34 遺伝子と *S* 遺伝子座との間で組換えは認められず、この遺伝子が *S* 遺伝子座と緊密に連鎖していることが示された. 一方ノーザン分析において、LC-34 遺伝子は雌ずい以外に、葉、根、葍でも発現しており、発現特異性は認められなかった. このことと、アレル間多型性が低い (1.2%) ことから、LC-34 遺伝子は雌ずい側 *S* 遺伝子ではないと考えられた.

ICAT 解析では、2-DE 解析と同じ雌ずい

タンパク質サンプルを用い、 S_2S_2 および S_3S_3 サンプルをそれぞれ Light 試薬および Heavy 試薬 (Cleavable ICAT Reagent, Applied Biosystems 社) で標識した. 標識サンプルを混合し、トリプシン消化後、陽イオン交換 HPLC により分画した. そのうちの 13 フラクシオンについて、MALDI-TOF MS 分析を行い、Light および Heavy 試薬で標識された (質量差 9 または 18 の) シグナル対 (ペア)、ならびに発現量の高い単独シグナルを検出した (図 2). 前者のシグナル対は計 95 対検出されたが、そのうちペアのシグナル間で発現量が 2 倍以上異なるものは 6 対のみであった. 一方、後者の単独シグナル (片方のサンプル (S_2S_2 または S_3S_3))

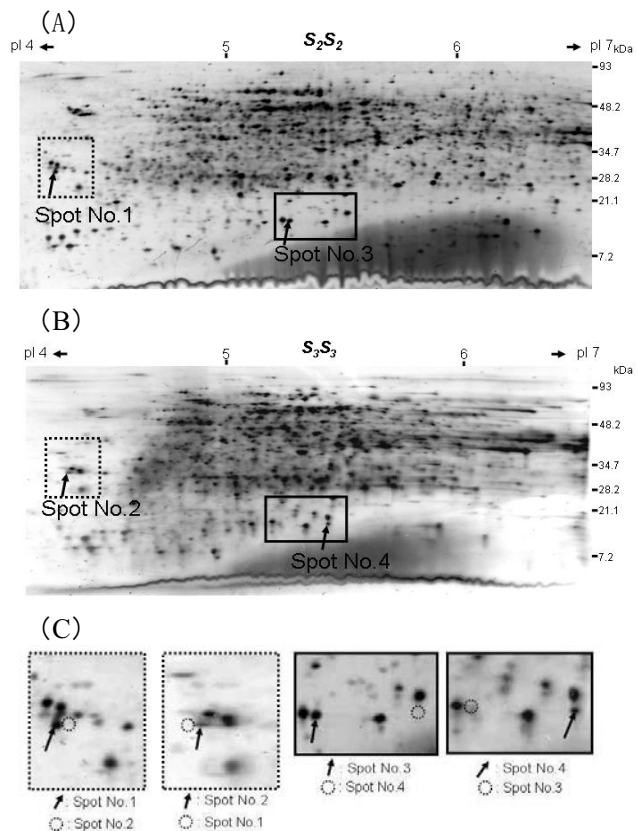


図 1 雌ずいタンパク質の二次元電気泳動パターン
(A) S_2S_2 遺伝子型 (pI 4-7) (B) S_3S_3 遺伝子型 (pI 4-7)
(C) *S* 遺伝子型特異的タンパク質スポット (矢印) 周辺の拡大図

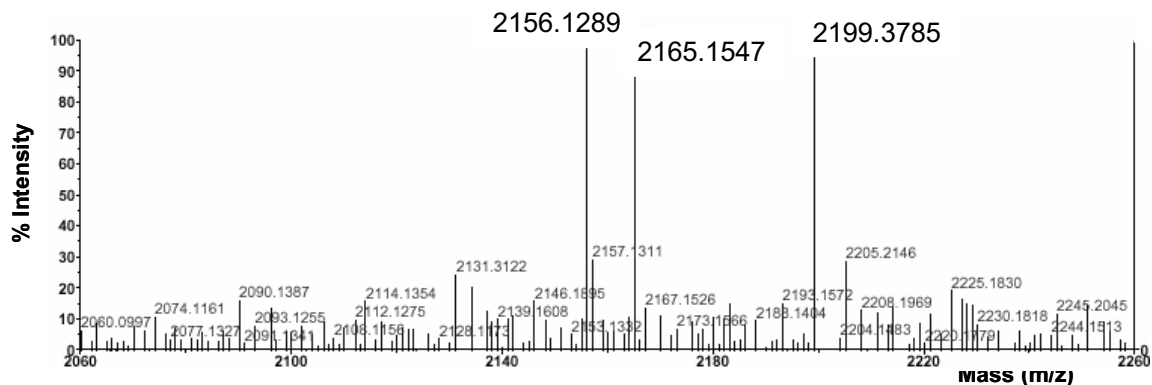


図2 MALDI-TOF MS スペクトラムの一例. Light および Heavy 試薬で標識されたシグナル対 (m/z 2156.1289 および 2165.1547) と発現量の高い単独シグナル (m/z 2199.3785)を示す.

で特異的に発現していると推測されるものは計 120 個検出された. これらの単独シグナルの中に, 目的の S タンパク質由来のシグナルが含まれている可能性があるため, 予備的に 1 フラクシオンから検出された 9 個の単独シグナルを分取し, MS/MS 解析を行った. しかし, ペプチド同定しうる MS/MS データはどのシグナルからも得られなかった. これは今回 10 個体の混合サンプルを用いたため, 検出される全シグナルの数が多過ぎ, MALDI-TOF MS によるピークシグナルの分取が困難であったことが原因であり, ペプチド配列の同定には LC-MS/MS 法などの異なる質量分析法の検討が必要と考えられた.

(2) 研究成果の今後期待される効果

オオムギ野生種 *H. bulbosum* の自家不和合性 (S) 遺伝子は雌ずい側, 花粉側ともに未同定である. 本研究でのタンパク質レベルからのアプローチによってその S 遺伝子産物を同定することはできなかったが, 二次元電気泳動 (2-DE) プロファイルの観察結果から雌ずい側の S 遺伝子産物は発現量の高いタンパク質ではないことが示唆された. また雌ずいタンパク質の 2-DE 解析に基づき, S 遺伝子座と緊密に連鎖した (組換え率 0) 遺伝子 (LC-3d) が得られた. この遺伝子は, 今後 S 遺伝子座周辺領域のゲノム解析を行う上での新たなマーカーとして有用と考えられる. 一方 ICAT 解析の結果から, ICAT 法は 2-DE 法に比べ, 発現タンパク質の差異をより高感度に検出しうることを示されたが, 検出されたタンパク質を同定するためには質量分析に用いるタンパク質試料の複雑度を下げることが重要であることが明らかとなった.

3. 5 情報システムグループ (国立遺伝学研究所 山崎由紀子)

(1) 研究実施内容及び成果

a) オオムギ EST の公開データベースを構築した. Oracle-Dynaclust システムを用い, アドレス (<http://www.shigen.nig.ac.jp/barley/>) から公開した.

公開情報

- Sequences : 92657
- Library 5 libraries
 - BaGS:Haruna Nijo/Germination/Shoots. 9255 seq (5'), 9722 seq (3')
 - BaSD:Haruna Nijo/Second leaf stage/Seedling leaves. 5251 seq (5'), 5231 seq. (3')
 - BaAL:Haruna Nijo/Adult, heading stage/Top three leaves. 8309 seq. (5'), 8179 seq (3')
 - BaAK: Akashinriki/Vegatative stage/Leaves. 11250 seq (5'), 11395 seq. (3')
 - BaH:H602/Adult, heading stage/Top three leaves. 12125 seq. (5'), 11958 seq. (3')
- Blast 検索サイト提供
- 相同解析結果 (nt, swissprot)
- Comparative map (Barley EST vs Rice EST) clone sequece 単位
- Keyword 検索機能実装

The screenshot shows the BARLEY DB website. The main content area is titled 'EST project' and includes a 'Clone Information' section with links for 'Clone Search', 'Freeward Search', and 'Details Search'. Below this is a 'Statistical information' table with columns for name, strain, stage, tissue type, and sequence counts for 5' and 3' ends. The table data is as follows:

name	strain	stage	tissue type	5'		3'	
				value [clone]	data view [pages]	value [clone]	data view [pages]
BaGS	Haruna Nijo	germination	shoots	9255	All	9722	All
BaSD	Haruna Nijo	second leaf stage	seedling leaves	5251	All	5231	All
BaAL	Haruna Nijo	adult, heading stage	top three leaves	8309	All	8179	All
BaAK	Akashinriki	vegetative stage	leaves	11250	All	11395	All
BaH	H602	adult, heading stage	top three leaves	12125	All	11958	All
-	-	-	-	46190	All	46485	All
-	-	-	total	-	-	92675	-

公開データベースのクローン summary ページ

b) 内部利用用の非公開系データベースを構築した. Dynaclust 非依存型の Oracle を DBMS として用い, 公開データベースとは独立したものとして構築した.

格納情報

- Sequences : 130734
- Library 9 libraries
 - BaGS: Haruna Nijo/Germination/Shoots. 9438 seq. (5'), 9828 seq. (3')
 - BaSD:Haruna Nijo/Second leaf stage/Seedling leaves. 5347q (5'), 5259 seq. (3')

BaAL:Haruna Nijo/Adult, heading stage/Top three leaves.9093 seq. (5'), 8494 seq (3')

BaAK:Akashinriki/Vegatative stage/Leaves. 11548 seq (5'), 11582 seq. (3')

BaH:H602/Adult, heading stage/Top three leaves. 12427 seq. (5'), 12260 seq. (3')

BaET:Haruna Nijo/Etiolated. Full length cDNA, 4854 seq. (5'), 4146 seq. (3')

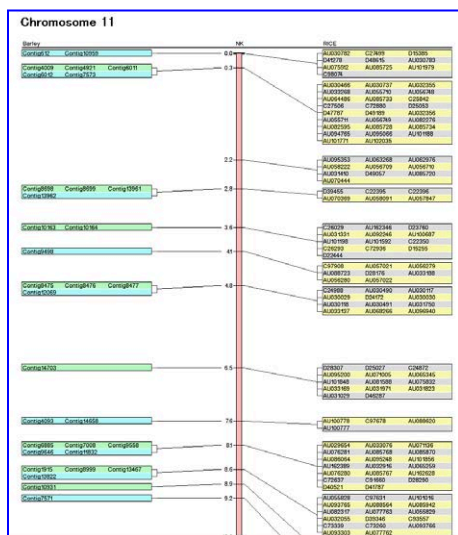
BaSH:Haruna Nijo/Shoot. 5439 seq. (5'), 4347 seq. (3')

BaSTL:Haruna Nijo/Shoot long. 4049 seq. (5'), 3486 seq. (3')

Kr: K305/Root. 4622 seq. (5'), 4515

seq. (3')

- primer 情報
- cluster, contig 情報
- 相同解析結果 (nr, nt, swissprt, GO)
- Assembling 情報,
- 品種間 SNP
- comparative map (Barley EST contigs vs Rice EST) contig 単位
- keyword 検索実装



go [summary] [contig search] [clone search] [map]

last update Aug 2003

Summary

Library	variety	stage	tissue	condition	5' sequences	3' sequences
BaGS	Haruna Nijo	germination	shoots	normal	9438	9828
BaSD	Haruna Nijo	second leaf	seedling leaves	normal	5347	5259
BaAL	Haruna Nijo	adult, heading stage	top three leaves	normal	9093	8494
BaAK	Akashinriki	vegetative stage	leaves	normal	11548	11582
BaH	H602	vegetative stage	top three leaves	normal	12427	12260
BaET	Haruna Nijo (full length)	-	-	etiolated	4854	4146
BaST	Haruna Nijo	-	shoot	-	5439	4347
BaSTL	Haruna Nijo	-	shoot long	-	4049	3486
kr	-	-	root	-	4622	4515
total					130734	68175

Search

I: clone/cluster/contig search

clone name cluster ID contig ID

<select library for clone name search >
 ALL BaGS BaSD BaAL BaAK BaH BaET BaST BaSTL kr]

<select contig type for contig search >
 ALL blast-phrap library phrap]

(wildcard * is available)

II: keyword search against the sequence homology search results

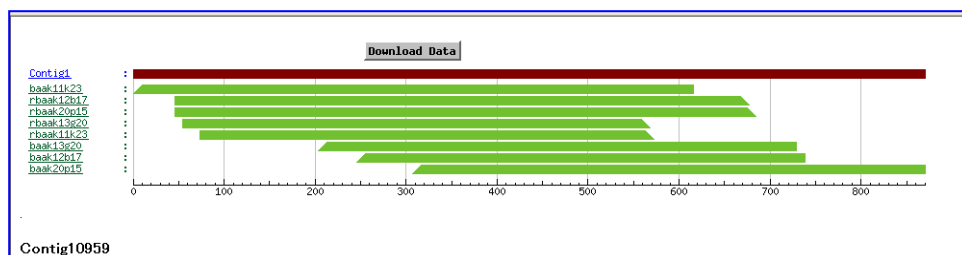
select contigs and/or clones : contigs clones

<select clone library for clones search >
 ALL BaGS BaSD BaAL BaAK BaH BaET BaST BaSTL kr]

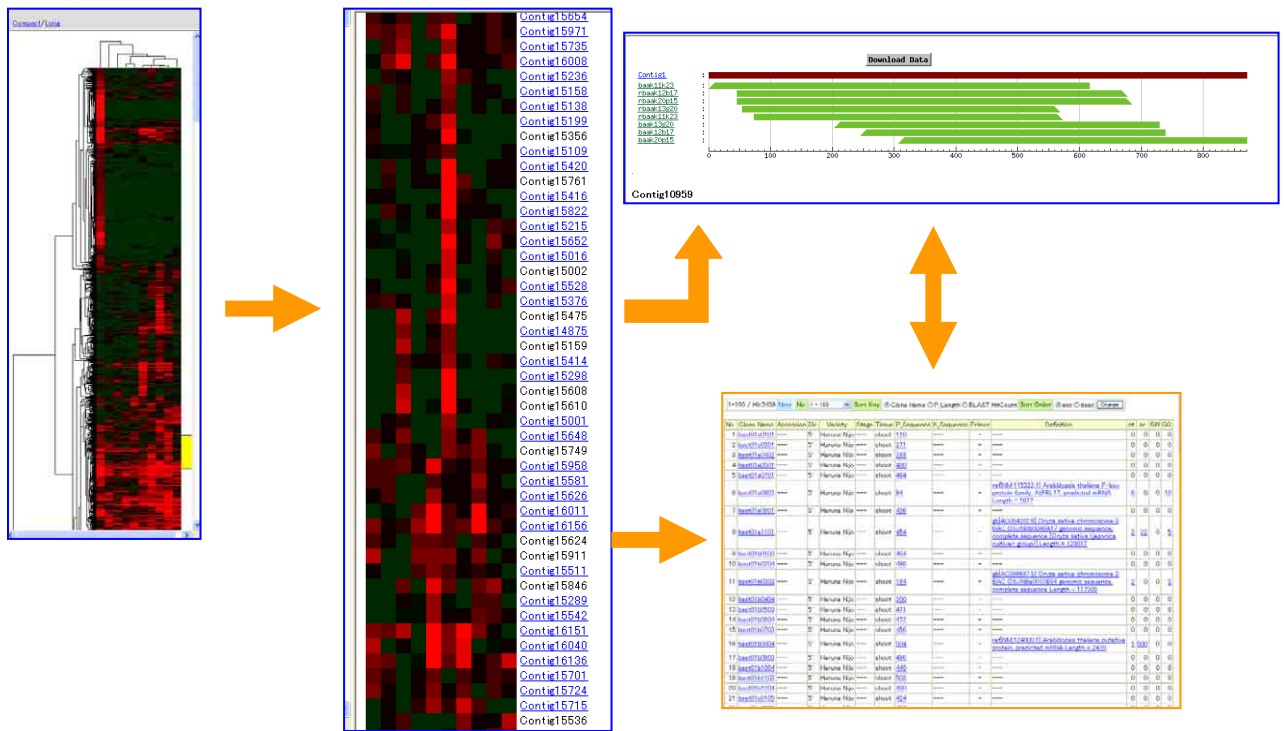
<select contig type for contig search >
 ALL blast-phrap library phrap]

query (wildcard * is available)

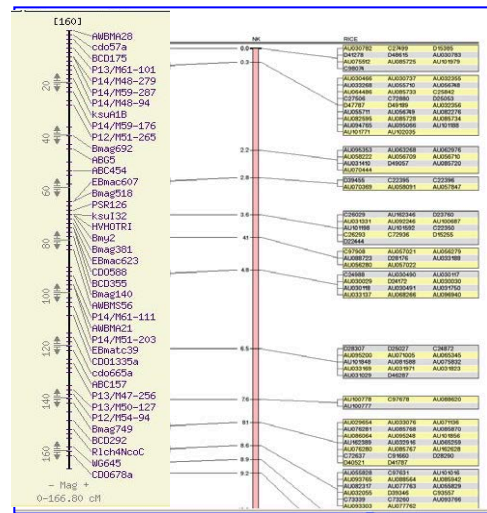
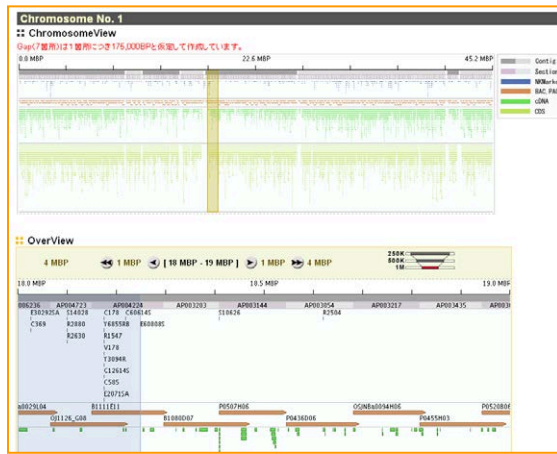
非公開データベース HP (右上), 比較マップ (左上), アセンブルビュー (下)



c) EST 配列のクラスタリング解析結果を Web 上に表示する「Web ベース遺伝子発現パターンビューワ」を開発した。



d) Comparative map (イネゲノム物理地図 vs オオムギ EST)の作成計画. オオムギの連鎖地図を用いたイネオオムギの比較マップを構築予定.



イネ物理地図 (オオムギデータを挿入予定)

オオムギ連鎖地図 vs イネ連鎖地図 (予想図)

(2) 研究成果の今後期待される効果

本研究成果はムギ類の植物全体の中で最も先行しており、特に品種間 SNP 情報は実用性が高く、ムギ類のモデルデータベースとして位置づけられる。データベースは今後も更新を続ける必要があり、EST データベースをもとに、既存の系統情報データベースとの連携とマイクロアレイによる発現情報、遺伝子機能情報、マップ情報、他の植物との比較解析情報などをさらに付加し、統合的なオオムギのデータベースを構築する計画である。

3. 6 cDNA ライブラリー開発グループ（九州沖縄農業研究センター 斉藤彰）

（1）研究実施内容及び成果

完全長 cDNA 作製法は RNA 単離法とそれに続く cDNA 作製法に大別される。RNA 単離法は全 RNA 抽出法、さらに mRNA 濃縮法では、3' 末端ポリ A を持つ mRNA を濃縮するオリゴ dT 法が一般的である。さらに近年完全長 cDNA 作製法では 5' 非翻訳領域の Cap 構造 GpppNp(N+1)p(N+2)p・・・ATG・3' を修飾し、Cap 構造を持つ mRNA を選択的に濃縮する (A) オリゴキャップ法と (B) キャップトラップ法が開発され多くの生物の完全長 cDNA ライブラリーが作製されている。しかし上記の完全長 cDNA 作製法では mg 単位の全 RNA が必要であり、またその複雑な反応工程や PCR 反応によるライブラリーの偏りなどの問題点を含むことから、より簡便な改良法が求められている。

本研究では、RNA 単離法として (1) 金属リガンドを用いた新しい全 RNA 抽出法の開発、(2) 植物全 RNA の大部分を占める細胞リボソーム RNA (28S, 18S, 5S) と tRNA と葉緑体リボソーム RNA などを、植物全 RNA から除去する新リボソーム RNA 除去法の開発、また (3) 単離された mRNA の intactness 検証法としての a) Cap から ATG までの 5' -noncoding region について RT-PCR する方法、また b) オオムギオリゴマイクロアレイ (Affymetrix 社製) 利用を検討した。さらに cDNA 作製法として (4) 従来のオリゴキャップ法と、現在最も簡便な工程 (10 μ g Total RNA) で cDNA 作製に用いられる Vector-Capping 法 (逆転写酵素のチャップ構造依存性 Terminal deoxynucleotidyl transferase 活性と、T4ligase の RNA/DNA ヘテロ 2 本鎖と DNA/DNA との結合活性、オリゴ dT ストレッチを持ったベクター) によりオオムギ種子根の完全長 cDNA ライブラリー作製しその評価を行った。

i) 低 pH ストレス耐性オオムギ探索

これまで酸性土壌中の低 pH 条件におけるアルミニウム過剰ストレスに応答する多くの遺伝子研究がされているが、低 pH ストレスに関する研究は少ない。岡山大学大麦遺伝資源センター由来のオオムギコアコレクション 380 品種について 20mM MES-NaOH で各種低 pH 条件 (pH4.6, pH4.8, pH5.0, pH5.2, pH5.4) の培養液/ (1.3L) /暗所/20°C/通気/の条件で、種子から種子根が発根・伸長し、まだ冠根が発根しない 3-4 日間水耕し、各低 pH ストレス条件下における各種子根の長さを測定し、5 本の種子根総伸長を求めた。多くのオオムギ品種は、土壌中のアルミニウムがイオン化し始める pH5.0 以下ではその種子根の発根・伸長は阻害され、その阻害度に品種間差が見られた。酸性土壌耐性品種で、そのアルミニウム過剰ストレスに対し耐性を示す「Dayton」は pH4.6 以下の酸性ストレスでは種子根は伸長せず pH4.8 以上において伸長し、一方アルミニウム非耐性品種「Kearney」は pH5.0 以上で伸長することから、pH5.2 に対する pH4.6 における種子根伸長の比を種子根の低 pH ストレス耐性評価スコアとした。また、さらに 1-2 日 (通算 5-6 日間) 水耕し、その伸長の継続性も評価値とした。それらの結果、低 pH 耐性は酸性土壌耐性の一因であると考えられた。

ii) cDNA ライブラリー作製用オオムギ

上記の評価法により「はるな二条」は「Kearney」と同様に低 pH ストレスに対して非耐性であった。「はるな二条」の初期発芽時の種子根を本研究のオオムギ完全長 cDNA ライブラリー開発の材料とした。全核酸 (RNA・DNA) 抽出：水耕栽培した根を種子から切り取り液体窒素で凍結保存した。約 1 g の根を液体窒素中で粉碎し、定法の酸性グアニジンイソチオシアネート法や Trizol (Invitrogen 社) 法、NP-40 を用いた Cytoplasmic RNA 単離法 (Invitrogen 社) などを用いたで全核酸を抽出し比較した。Trizol 法が総合的に優れ、全 RNA の純度 260/280=1.72, 260/230=1.9 で、intactness は x 1 TBE, 1% アガロース電気泳動分析の結果大きな分解はなかった。

iii) 新全核酸抽出法

前述と同様に抽出した全核酸をさらに蛋白質や多糖類などの夾雑物を除いて精製するた

めに、1) RNA を核酸溶液から選択的に塩析沈殿させる LiCl 法、2) 4 M グアニジンイソチオシアネートなどのカオトロピック塩で核酸を特異的ガラスフィルター (Si; シリカ) に結合させ、水や TE で溶出するカオトロピック法 (RNeasy; キアゲン社) を検討した。結果 LiCl 法が適していた。一方 3) 核酸はシリカ以外の金属とも結合することから、それらを担体に結合させているレジンに吸着後溶出させ、溶出された核酸について検討し、新しい核酸抽出法となる可能性を示した。

iv) 新 mRNA 精製法

イネリボゾーム遺伝子領域からリボゾーム RNA を除去するための 26SrRNA 用・18SrRNA 用プロブリガンド領域を PCR で増幅・精製し担体に結合させた rRNA トラップ粒子を作製し、全 RNA から rRNA を除去する新しい手法を開発した。mRNA の intactness 評価法: a) 根で発現されている既知 Nitrate Reductase 遺伝子の 5' non-coding 領域に約 100bp 増幅するプライマーを設計し、完全長 cDNA ライブラリー作製用全 RNA を鋳型に RT-PCR 分析で検出し、この全 RNA に含まれる NR 遺伝子 mRNA が intact であることを示した。b) オオムギマイクロアレイ (Affymetrix 社製: 23,000 の unigene 遺伝子の各遺伝子上に 20 箇所に配置された 20mer のオリゴマー、また各オリゴマーに対応する塩基突然変異したミスマッチ用オリゴマーがアレイ化されている) を用いて cDNA 作製用の抽出全 RNA について発現解析した結果、約 12,000 遺伝子の発現が検出された。発現の有無は 20mer オリゴマーに対するハイブリ結果からそれらの遺伝子 mRNA については intact であると評価した。

v) 完全長 cDNA ライブラリー作製

pH5.0 の低 pH ストレス下で 3.5 日水耕栽培した「はるな二条」種子根由来の全 RNA (10 μ g) を用いて、それに含まれる polyA+mRNA を dT-tail を持つベクター pCAP10 とアニールさせ、その mRNA を鋳型に逆転写酵素 (RT) で 1st strand cDNA を作製し、RT 酵素が持つ、mRNA の Cap 構造依存性 TdT 活性により「C」を付加し、RNA ligase によりベクター側の DNA/DNA 鎖と、cDNA 側の RNA/DNA 鎖を連結後、RNase H により鋳型 mRNA を消化して、polyI で鋳型領域を修復させたベクター-cDNA ライブラリーを作製した。一部をエレクトロポレーションで DH10B に形質転換しライブラリーサイズを算定し、形質転換菌からプラスミドを単離してそのインサートサイズ (mRNA サイズ) を測定した。さらに、5' 側シークエンス (約 500bp) を NCBI のデータベースで検索して完全長を評価した。

「はるな二条」の種子根の完全長 cDNA ライブラリーのサイズは 6.6×10^4 と低い値であった。これは少量の全 RNA (10 μ g) を使用しているためであり、mRNA の完全長を保ち分解しないような mRNA 濃縮法の改良が必要と考えられた。しかし、全 RNA の 1% が polyA+mRNA であるとするれば、その 10 μ g からプラスミドベクターでは $10^5 \sim 10^6$ のライブラリーが作製できることが一般的であることや、本研究では少量の全 RNA (10 μ g) で作製できたことを考慮すると、本ライブラリーサイズは妥当な値とも考えられた。またインサート率は 85%、インサートサイズ平均は 1.3kb であり、今後形質転換前にサイズセレクションするなどの改良の必要性が考えられた。完全長率については、NCBI で相同性のあるものについては 90% が完全長 (最大長) と高品位に評価された。相同性のないものについても前者と同様と考えられるが、この手法がキャップ依存性の「G」付加を伴うことを考慮すると最大 42% となり、全体として、72% に及ぶと評価した。

最終目的としてのオオムギ完全長 cDNA ライブラリー手法開発について、一般的に cDNA ライブラリー作製は容易でないことが知られる根を材料に、本研究成果によるオオムギ根完全長 cDNA ライブラリー作製法はほぼ確立できたと結論された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

従来のカオトロピック・シリカ (Si) 法による核酸抽出法は非常に広く利用されている。本研究で検討された新しい金属による核酸抽出法は簡便であり、実用化されることが期待される。また、これまでの全 RNA からのオリゴ dT による mRNA 濃縮法は、5' のキャップ構

造のない分解 mRNA をより濃縮する．これに比べ本研究で検討された rRNA 除去は，完全長 cDNA ライブラリー作成に有効であると考えられた．さらにオリゴキャップ法やキャップトランプ法に比べ，簡便な手法である V-Capping 法を用いれば，少ない RNA 量，特に全 RNA (10 μ g) で完全長 cDNA が作製できることが示された．今後，RNA 量が限られるサンプルについて容易に完全長 cDNA 作製が期待できれば，これまで多量な RNA 量を得られるサンプルを中心として開発されてきた EST を補足し，より完全な cDNA データベースを構築することが期待できる．

3. 7 BAC 遺伝子単離グループ (農業生物資源研究所 川崎信二, 小松田隆夫)

a) 高能率BACライブラリーに基づくオオムギ特異的遺伝子の解析 (川崎)

オオムギは、ゲノムサイズが 4.9 Gb とイネと比較してゲノムサイズが 10 倍以上巨大なことから、当計画開始時にはゲノム解析のための infrastructure の整備はイネより大幅に遅れていた。オオムギのゲノム研究の世界的な標準の構築を目指して、HEGS(高能率ゲノム走査)法による世界最高品質の精密マーカーマップの作成と、BAC (バクテリア人工染色体) による高品位ゲノムライブラリーの作製を試みた。また、これらを利用してオオムギの赤かび病抵抗性の精密 QTL マッピングと、オオムギの裸性遺伝子(nud)の精密マッピングを行い、最終的には nud 遺伝子を単離することを試みた。

i) オオムギの高密度マップの作成と赤かび病抵抗性遺伝子群の精密 QTL 分析

赤かび病抵抗性の Russia6 (二条) と感受性の H.E.S.4 (六条) の RI(Recombinant Inbredline)F9 世代 125 系統を用いて HEGS/AFLP 法を主として用い、精密マップを作製する。得られた高密度マップを元に、切り穂検定法による各系統の抵抗性の検定とを組み合わせ、従来にない精度での精密 QTL 分析を行った。

HEGS/AFLP システムによる 100 レーンの非変性ゲル 4 枚のセットを用い、1 日 2 セット(最大 800 検体)を一人で分析を行った。1172 マーカー (共優性マーカー999) からなる全長 1595.7 cM の連鎖地図 (マーカー密度 1.4 cM / locus) を約 5 ヶ月の短期間でかつ低いコストで、一人の研究者により構築することができた (図 1 :Hori et al. 2003)。連鎖地図には 1134 の AFLP (888 が共優性)、34 の SSR, 3 つの STS, 1 つの形態マーカーが含まれている。今回はバンドの自動認識・記録ソフト F2-HEGS を開発したことにより、データ解析の飛躍的な効率化が可能となった。

HEGS システムを用いて構築した高密度連鎖地図は、量的形質遺伝子座 (QTL) と密接に連鎖した分子マーカーの検出や QTL を含む BAC クローンの単離に利用することができ、実際に赤かび病抵抗性の精密 QTL 分析がこれにより可能になった。

また、裸性遺伝子 nud の精密マッピングでは HEGS/AFLP マーカー s KT3/9 が目的遺伝子の flanking marker として有効に働き、またこれらを含む近傍マーカー 4 種が育種のためのマーカーとして確立されて特許となった他、その後の物理地図作製にも大きく貢献した。

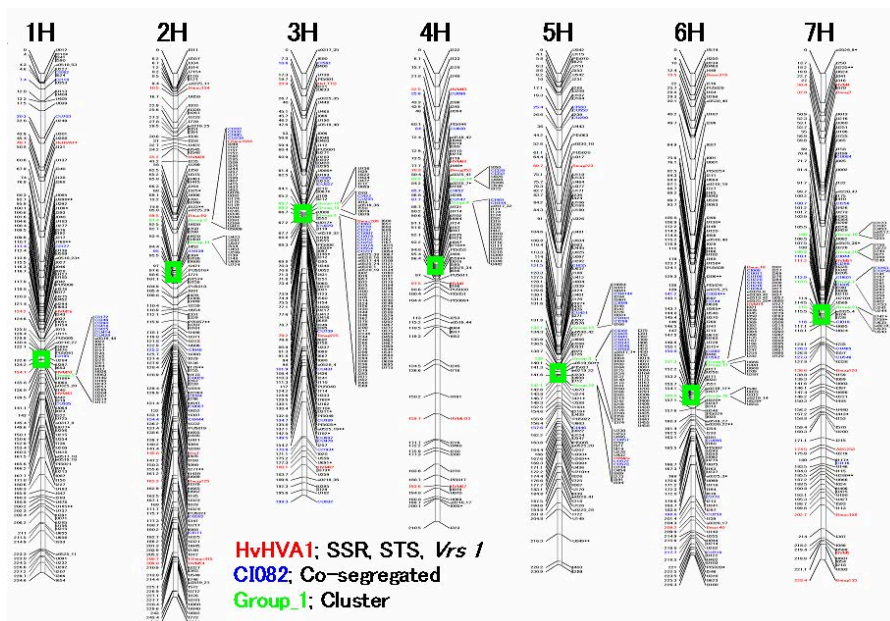


図 1. オオムギ Russia6 (二条) と H.E.S.4 (六条) との組換え近交系 F9 世代 125 系統の HEGS/AFLP による精密マップ. 1174 座位を含み、全長 1576.2 cM に及ぶ(Hori et al. 2003).

ii) BACライブラリーの作製 (川崎)

醸造用の代表的優良品種である「はるな二条」の緑葉からプロトプラストを作製し、アガロースプラグに包埋した後に SDS・ProteinaseK 等により DNA だけを残してタンパク質と脂質を分解・溶解して除去した。プラグのまま制限酵素による部分分解処理によりゲノム DNA を適度な長さに切断したものを pBACLAC のプラスミドと接合して大腸菌に electroporation により形質転換し、コロニーピッカーで 384 プレートに保存した。

オオムギの BAC ライブラリーの作製においては、日本の代表的醸造品種である「はるな二条」から平均インサートサイズ 115kb で、294,912 クローンからなる大規模 BAC ライブラリーを 384 プレート 768 枚に構築した。オオムギのゲノムサイズを 5 GB とするとこれは、約 6 ゲノムに相当する。これから、PCR によるクローン同定用に 0.9 ゲノム相当×2 の三次元 (3D) ゲノムライブラリーを試験的に作製し、29 の SSR マーカーで対応クローンを検索したところ平均 2.3 クローンを同定することができ、ライブラリーの品質が確認された。図 1 において緑の枠で示したマーカーの組換えが抑制されたクラスター部位はセントロメア領域に対応すると予想される。

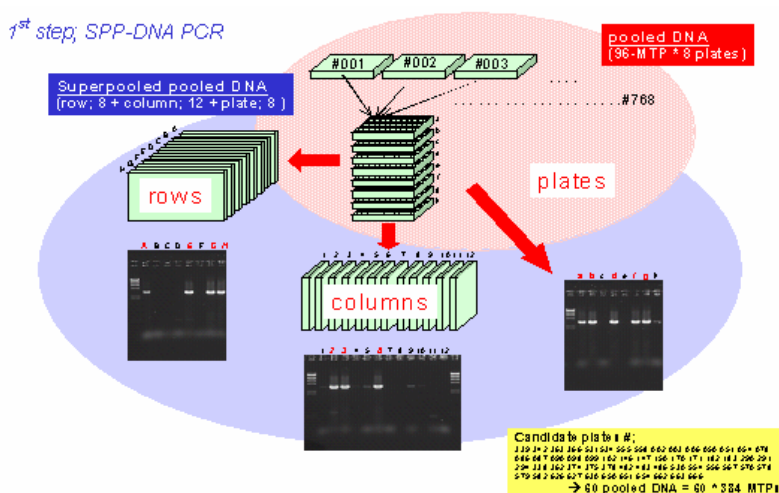
BACライブラリーを96枚の高密度メンブレンフィルターにノイズドットとの区別がしやすいように duplicateさせながらブロットするとともに、第1段階としてシングルコピーマーカーの選択用に768枚の384プレートをプレート毎にプール化したものを8列x12行x8枚の1体化した1ステップの3Dプールを作製した。更に第2段階として、ゲノム当たり複数コピーのマーカーの選択も可能なように、0.5ゲノム程度に12分割したゲノムライブラリーを作製した。(図2)

オオムギはゲノムサイズが極めて大きく(イネの10倍)、通常の3Dシステムをライブラリーから組むにはかなりの労力を要するため第1段階として、ハイブリダイゼーションとPCRの双方を用いて対応クローンを単離出来るように2ステップの選択システムを構築した。まず1セット96枚の高密度メンブレンフィルターに3072(8プレート)×2倍のクローンをduplicateさせて貼り付けて、ハイブリダイゼーションによるマーカー選択に対応した。また第1段階の3Dセレクションを行うため図2のように、各384プレートのクローンを1つつつにまとめてそれを選択するように3Dスクリーニングシステムを構築した。この方法ではPCRによっては当該クローンを含む384プレートの候補だけが同定され、その先の同定は先の高密度メンブレンによるハイブリダイゼーションによることになる。

これにより、ゲノム当たり単クローンのマーカーについては対応できるが、実際は複数のヒットをするマーカーの方が多いことが予想され、選択の手間も実際的ではない。そこで、ライブラリーを0.5ゲノム程度に分割して計12の3Dライブラリーを構成した。これにより、複数ヒットのマーカーにおいても最後のクローン選択までPCRのみで単離出来るようになる。

こうしたBACライブラリーの完成により、nud遺伝子の近傍の物理地図が作製され、現在その中の候補遺伝子の相補性検定が行われている。

図2 第1段階の3Dゲノムライブラリー：単クローンのプレート候補の予備的同定は可能だが、効率は今ひとつである。クローンの同定は、高密度メンブレンに頼る必要がある。



b) オオムギ特異的遺伝子 (小穂脱落性) の単離 (小松田)

成熟した種子が自然に脱落するか否かは野生種と栽培種の最も基本的な差異であり、非脱落化は栽培型への移行の最も初期の過程で起きたと考えられる。従って、非脱落化は栽培の起源と深い関連を持っている。オオムギ野生種は成熟に伴って穂軸が脆弱となり、穂の上部から順次穂軸の連結がはずれ、各々の穂軸節間は節上部に3小穂を連結した形で脱落する。この小穂脱落性は、密接に連鎖する2種の優性補足遺伝子 *Btr1* と *Btr2* に支配され、栽培品種はどれか一方の遺伝子に関して劣性対立遺伝子を持つが、西域には *btr1* 型品種が、東亜には *btr2* 型品種が多く見られ、両劣性遺伝子型はきわめて希である。本分担課題では小穂非脱落化遺伝子の単離に向け、分離集団の作成と、高密度連鎖地図作成、ならびに高精度連鎖地図作成を行った。

i) 分離集団の作成：小穂非脱落性が1因子に支配されるような集団を作成すれば、遺伝解析と遺伝子クローニングに非常に役立つと考えられる。そのため、野生オオムギ2系統 (OUH602 および OUH743) に栽培種5品種を交配して合計10組み合わせの分離 F_2 集団を作成し、小穂脱落性の表現型の分離を調査した。結果を表1に示した。調査の結果、9組み合わせで期待分離比3:1に適合したが、残る1組み合わせ、すなわち OUH743 x アズマムギでは見かけ上二つの補足遺伝子による期待分離比9:7に近い分離を示した。そこで確認のため各 F_2 個体に由来する F_3 系統の解析を行ったところ (表2)、脱落性に固定した系統、分離した系統、非脱落性に固定した系統の比が1:8:7に非常に良く適合した。従って、この F_2 集団において小穂脱落性に関する二つの補足遺伝子の存在が示唆された。以上の結果を担当者らの従来の知見を考慮して説明すれば (Komatsuda and Mano 2002, Komatsuda et al. 2004)、アズマムギの7H染色体に存在する阻害因子 *d* が関与し、その優性対立遺伝子は OUH743 に存在して *Btr2* と補足的に作用して小穂を脱落させると考えられた。しかしながら、実際に *d* 因子と連鎖することが分かっている ABC255 と cMWG704 をもちいて、Allard (1956) の式に従って小穂脱落性と連鎖解析をしたが、小穂脱落性の形質とマーカーとの連鎖は認められなかった。そこで OUH743 x アズマムギ F_2 集団において観察される分離は *btr2* 近傍の分離のゆがみによるものと考え、*btr2* と連鎖することが分かっている e23m23-07 と e50m21-01 を用いて分離比を調べたところ確かにマーカーに有意なゆがみが認められた。従って観察された期待分離比からの違いは分離比のゆがみに起因すると結論づけられた。当該 F_1 植物において受精にあずかった花粉の分離比は *btr2* (アズマムギ) : *Btr2* (OUH743) = 7:1 であったと考えられる。

Table 1. Segregation of brittle and tough rachis plants in F_2 populations

Population	Brittle	Tough	χ^2 (3:1)	P
Field				
OUH602 x KNG (<i>btr1</i>)	151	41	1.36	0.20 - 0.30
OUH602 x DS (<i>btr1</i>)	70	26	0.22	0.50 - 0.70
OUH602 x CH (<i>btr1</i>)	132	55	1.95	0.10 - 0.20
OUH602 x AZ (<i>btr2</i>)	135	57	2.25	0.10 - 0.20
OUH602 x SO (<i>btr2</i>)	153	39	2.25	0.10 - 0.20
OUH743 x KNG (<i>btr1</i>)	143	49	0.03	0.80 - 0.90
OUH743 x DS (<i>btr1</i>)	77	18	1.86	0.10 - 0.20
OUH743 x CH (<i>btr1</i>)	142	49	0.04	0.80 - 0.90
OUH743 x AZ (<i>btr2</i>)	122	70	13.44 ^{a)}	<0.001
OUH743 x SO (<i>btr2</i>)	66	27	0.82	0.30 - 0.50
Greenhouse				
OUH602 x KNG (<i>btr1</i>)	75	25	0.00	0.95 <
OUH602 x SO (<i>btr2</i>)	66	31	2.51	0.10 - 0.20
OUH743 x KNG (<i>btr1</i>)	74	23	0.09	0.70 - 0.80
OUH743 x SO (<i>btr2</i>)	68	29	1.24	0.20 - 0.30

^{a)} $\chi^2(9:7)=4.44$, $0.01 < p < 0.05$

Table 2. Segregation of F₃ lines for rachis brittleness

F ₂ Population	Brittle	Segregate	Tough	χ^2 (1:2:1)	P
OUH602 x KNG (<i>btr1</i>)	50	95	34	3.53	0.10 - 0.20
OUH602 x AZ (<i>btr2</i>)	40	79	44	0.35	0.80 - 0.90
OUH743 x AZ (<i>btr2</i>)	6	45	40	25.41	< 0.001

In average 26 F₃ plants were evaluated for each F₃ lines.

OUH602 x アズマムギの分離 F₂ 集団でも阻害因子 d が検出されないことから、OUH602 がもつ Btr1 と Btr2 は阻害因子 d の優性対立遺伝子 D の作用を必要としないと思われる。また、OUH743 も同様と思われる。以上の結果は以下の説明のいずれかに適合するであろう。すなわちオオムギ野生種において小穂非脱落化遺伝子の優性遺伝子 Btr2 に分化が認められる、あるいはオオムギ野生種の Btr1 と Btr2 の近傍に D 因子と同等の遺伝子が密接に連鎖する。

以上の結果を総合し、実験系を単純化するために、OUH602 x 関東中生ゴール、および OUH602 x アズマムギを解析集団とすることにした。

ii) 高密度連鎖地図作成：小穂非脱落化遺伝子に連鎖する多数の分子マーカーを作成するためには、比較的小さな集団でも構わないが、表現型を精密に調査して、正確な遺伝子型判定をおこなう必要がある。東亜の品種「アズマムギ」と西域の品種「関東中生ゴール」を交配して育成した組み換え自殖系 99 系統に対し、テスターとして夏大根麦 (*btr1*) および早木曾 2 号 (*btr2*) を検定交配し、雑種第 1 代の小穂脱落割合 (%) を調査した。一方 AFLP 解析のためのプライマーには EcoRI+3 と MseI+3 を 64 種類ずつ組合せ合計 4096 通り供試し、バルク分離型解析法等により最終的に 84 のマーカーを開発し、これらのマーカーを e14m27-4-1 と e15m19.7 に挟まれる 6.7cM の範囲内にマッピングし、平均 0.08 cM/locus の高密度を得た (Fig. 1)。*btr1* と *btr2* の組み換え型分離個体は観察されず、両座が密に連鎖する事を反映する。

上記 84 の AFLP マーカーのうち 74 マーカーを利用してオオムギ野生種及び栽培型の系統関係を解析した (Fig. 2)。栽培品種は東亜と西域に明瞭に分岐し、野生系統のいくつかがその各枝に近縁であることが示唆された。オオムギは自殖性であるが野生と栽培型の間には生殖的隔離が無い場合、少数の遺伝子を使った系統解析においては自然交雑による遺伝子浸透の可能性を考慮する必要がある。しかし小穂脱落・非脱落性遺伝子が野生種と栽培型の間で交換され定着するスピードは他の遺伝子と比較して極めて低いこと、そして本研究で使用したマーカーは小穂非脱落性遺伝子と連鎖することから、この系統樹は栽培オオムギの起源や分化を知る上で重要な情報を与えると思われる。本研究の結果は栽培オオムギが複数の地点で栽培化されたことを示唆するが、明確な結論を下すには小穂非脱落性遺伝子本体の構造解析を待たなければならない。

小穂非脱落化に関連する新規遺伝子の検出を目的に QTL 解析をおこなった。オオムギ品種アズマムギ (*btr2*) と関東中生ゴール (*btr1*) の交配で作成した組み換え自殖系統 (RILs:F11 世代) を用いた。RILs x 夏大根麦 (*btr1*) の交配では、3 H 染色体上に全表現型分散の 72% を説明する単一の QTL を検出し、この QTL は *btr1* と同一であった。RILs x 早木曾 2 号 (*btr2*) の交配では、3 H 染色体上に全表現型分散の 70% を説明する QTL を検出し、この QTL は *btr2* と同一であった。またこれ以外に 5 H 染色体と 7 H 染色体上に全表現型分散の 5% と 10% を説明する新規の QTL を検出した。以上の結果、関東中生ゴールの小穂非脱落化は *btr1* のみに支配されているが、アズマムギと早木曾 2 号の小穂非脱落化は *btr2* の他に 2 つの遺伝子によって支配されていることが明らかになった。この結果は、野生種からの変化の程度に違いのあることを示唆する。

高精度連鎖地図作成のためには、数多くの分離個体を分析して組み換え個体を見いだす必要がある。大集団の解析を能率的に行うためには AFLP 増幅断片を STS マーカーにすることが必要である。そこで小穂非脱落性遺伝子と連鎖する 26 の AFLP マーカーのクローニングとシーケンシングを行い、コムギ-オオムギ染色体添加系統や AFLP との対立性検定等を行い、合計 9 の STS マーカーをえた。これらのマーカーを用い、野生オオムギと栽培オオ

ムギの間で小穂非脱落性遺伝子領域の構造を調べるために、野生オオムギ (OUH602) x 関東中生ゴール(btr1)と野生オオムギ (OUH602) x アズマムギ(btr2)のF₂分離集団を解析した。その結果 Btr1, Btr2 各遺伝子と AFLP 由来 STS マーカーの配列が一致することが明らかになった (Fig. 3)。さらに小穂非脱落性遺伝子の分子マーカー密度を上げるため、イネゲノムとの相同性を用いてオオムギ EST をスクリーニングし、PCR マーカーを作製してオオムギ連鎖地図上へのマッピングをおこなった。また小穂非脱落性遺伝子近隣分子マーカーを起点としてオオムギ品種はるな二条のバクテリア人工染色体ライブラリーの PCR スクリーニングを行い、ラフなシーケンシングをおこなって、小穂非脱落性遺伝子に向けた染色体歩行が可能になったとおもわれる。

(2) 研究成果の今後期待される効果

現在のところオオムギにおけるゲノム配列の解析の目処はたっていない。また、公開されている BAC ライブラリーとしては、はるな二条が世界で2番目である。オオムギという産業植物において遺伝子単離に用いる品種は、権利保護の面でも研究グループにとってユニークでなければならない。はるな二条は我が国を代表する醸造用オオムギであり、品質、栽培特性の面などから我が国にとって重要な遺伝子が含まれている。また、小穂脱落性は岡山大学の研究グループが長年に渡って研究してきた生殖的隔離に関する重要な遺伝子であり、進化的にも重要な意味がある。オオムギの遺伝子がマップベースで単離された例はまだ数えるほどであるが、このような研究材料を解析するために高能率のマーカーシステム等が開発されて、遺伝子の単離が行えることは、オオムギの研究としては世界でも最高の技術水準にあるといえる。今後研究が進展して、一刻も早く遺伝子が単離されることが望まれる。

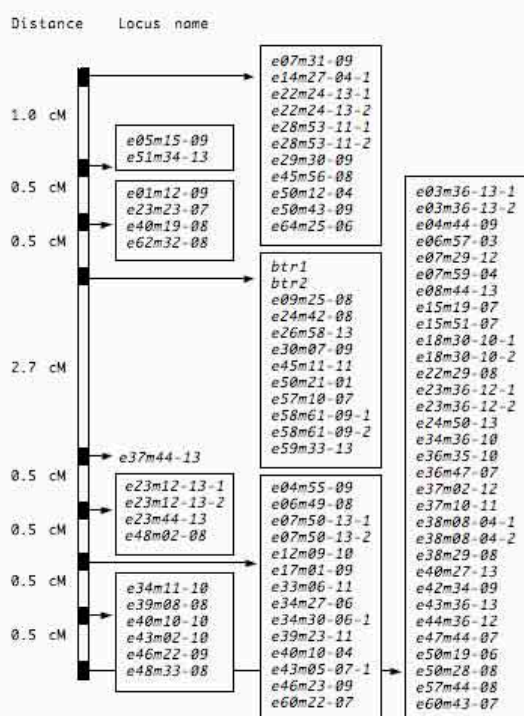


Fig. 1. High-density AFLP map of the btr1/btr2 complex loci. All 84 AFLP loci between e14m27-4-1 and e15m19-7 are included in the map. The top is toward the telomere and the bottom is toward the centromere of the short arm of chromosome 3H.

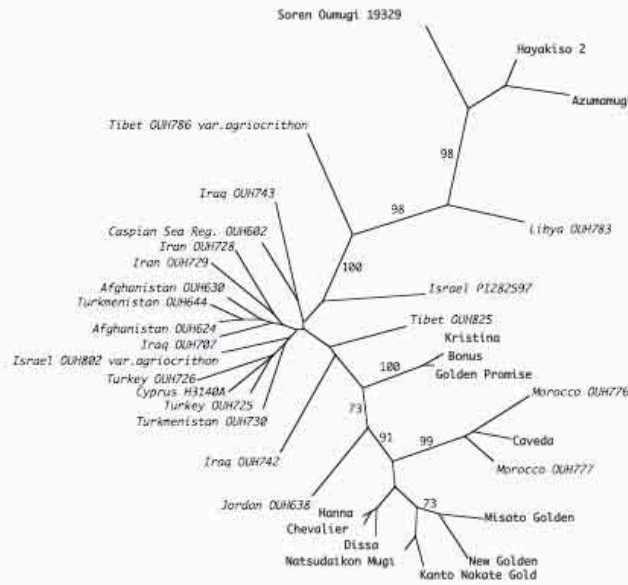


Fig. 2. Evolutionary trees for barley obtained from analyses of 74 AFLP loci linked to the *btr1* and *btr2* loci for brittle rachis. Brittle, mostly wild, barley lines are represented by country or regional names followed by accession numbers in italic. The two Moroccan lines are brittle-rachis, two-rowed barleys claimed to be wild *ssp. spontaneum*. (Molina-Cano et al. 1982, 1999). The var. *agriocrithon* lines are brittle-rachis, six-rowed barley classified in the group of *H. vulgare ssp. vulgare* (Bothmer and Jacobsen 1985). Non-brittle barley lines are represented in bold; Soren Oumugi 19329, Hayakiso 2 and Azumamugi are Western type (*btr1*), and the others are Eastern type (*btr2*). The minimum evolution method (Nei and Kumar 2000) was used. Bootstrap values > 60% are shown.

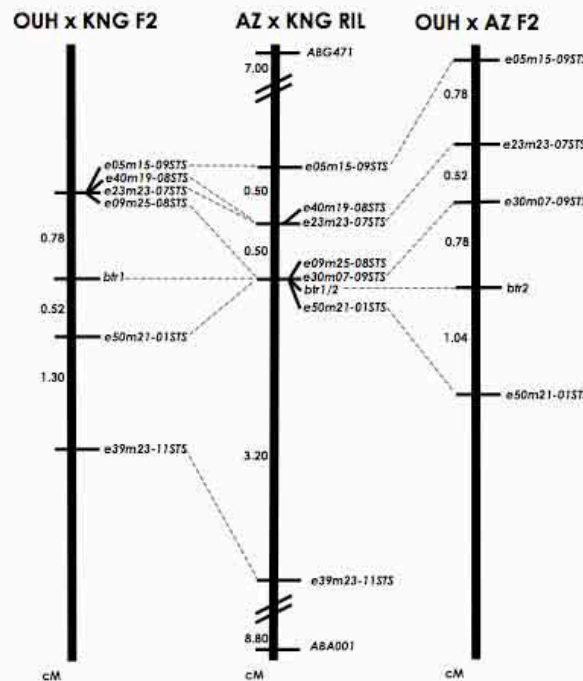


Fig 3. Mapping of the *btr1* locus in OUH x KNG F_2 population and *btr2* locus in OUH x AZ F_2 population in comparison with AZ x KNG RILs map. The maps show a part of the short arm of chromosome 3H. Map distances in centi-Morgan (cM).

3. 8 大量シーケンス解析グループ (秋田県立大学生物資源学部 高橋秀和)

大量シーケンス解析ならびにオオムギにおける有用な PCR マーカーの開発を行った。異種由来、発現遺伝子由来ならびにトランスポゾン由来の PCR マーカーを作成した成果ならびに問題点を報告する。本研究の供試材料はデータの公開などを考慮して既に配布されている品種・系統を主に用いた。

a) イネ cDNA 由来の STS マーカー

イネの細胞増殖因子 (phytosulfokine, PSK) の遺伝子が Yang ら (1999) によって単離された。この遺伝子は動植物に広く存在することが報告されているのでイネの PSK 遺伝子 (*OsPSK*) のマッピングとオオムギにおける *OsPSK* 相同領域のマッピングを行った。

イネのマッピング集団「あそみのり」と「IR24」の RI (組換え自殖) 70 系統によるマッピング EAT グの結果、*OsPSK* はイネの第 6 染色体に座乗した。一方、オオムギのマッピング集団「Steptoe」と「Morex」の DH (倍加半数体) 142 系統によるマッピングの結果、HvPSK-1 座はオオムギの 3H 染色体長腕側の動原体付近に位置した。オオムギ 3H 染色体には、未熟胚由来のカルス増殖に関係する QTL (Mano ら, 1996) が報告されているが、HvPSK-1 座と QTL のピークの位置を比較すると両者の間は約 20 cM 離れていた。なお、オオムギに *OsPSK* の相同領域が複数存在したので、遺伝子のコピー数や他種のコホモロジーを考慮してプライマーの設計を再検討する必要がある。

b) オオムギ EST 由来の SNP マーカー

岡山大学と国立遺伝学研究所の共同研究によって「はるな二条」、「赤神力」および「野生オオムギ (OUH602)」に由来する cDNA ライブラリーから約 43,000 のオオムギ EST が作成された。これらのシーケンスデータのグループ化および整列化によって 1 塩基多型 (SNP, single nucleotide polymorphism) を多数見出したので、これらの SNP の再確認を行った。

SNP を挟むプライマーを EST データから設計して「はるな二条」および「OUH602」のゲノム DNA を鋳型に再度シーケンス解析した結果、SNP は PCR 産物あたりエクソンで 1~12 個、イントロンでは 1~13 個確認でき、そのほとんどが 1 塩基置換型の多型で、僅かに欠失型が認められた。SNP 頻度は、エクソンで 147.5 塩基毎に、イントロンでは 116.4 塩基毎に検出された。また、1 塩基置換変異には transition 型の A/G (エクソン: 29.8 %, イントロン: 27.5 %) と C/T (29.3 %, 25.3 %) ならびに transversion 型の C/G (13.5 %, 14.3 %) が多く検出され、変異型の頻度はエクソンとイントロンにおいて概ね同様の傾向であった。

EST データから検出された SNP は 169/367 (46.0 %) の割合でゲノム DNA から再確認された。この割合を高めるにはスプライシング部位を予測して EST データからのプライマー設計を再検討する必要がある。

一方、SNP マーカーは従来の多型検出が困難であった近縁品種間においても利用可能な DNA マーカーとして期待されているので、オオムギの突然変異遺伝子と量的形質遺伝子座 (QTL) のマッピングを目的に、SNP マーカーの開発ならびに SNP マーカーによる遺伝子地図を作成した。

突然変異 (非背地性, OUX42) 系統と正常型系統「はるな二条」の間には、STS マーカーの塩基配列間に多型が認められた。CAPS 法により多型が確認された遺伝子座は 22/31 個 (71 %), allele specific PCR 法により多型が確認されたのは 8/17 個 (47 %) であった。非背地性遺伝子 (*Izd2*) は 3H 染色体短腕末端部に座乗した。一方、これまでに深播耐性の QTL は 5H 染色体の長腕端部の ABC309~MWG632 に座乗すると報告してきたが、再解析の結果 ABC718~HVM6 に見出された。すなわち、染色体の末端部のマーカーを追加することにより、より QTL に近いマーカーを見出した。

以上 SNP は遺伝子内外に多数存在し、ゲノム全体や局所的なマーカー作成に有用であることが示された。よって SNP は目的に応じて検出方法を検討して利用する必要がある。

c) トランスポゾン由来の MITE-AFLP マーカー

MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element) はゲノムに散在するトランスポゾン因子で、MITE 配列近傍の制限酵素認識配列の多型を検出する MITE-AFLP 法は動植物のゲノムマッピングに利用されている。

「はるな二条」と「OUH602」のDH（倍加半数体）系統を用いて、MITE-AFLP マーカーのゲノムマッピングを行った。一般にオオムギのSSR マーカーやAFLP マーカーはクラスターを形成することが知られているが、今回用いた *Stowaway*, *Barfly* および *Pangrangja* 因子由来のMITE-AFLP マーカーはゲノム全域に散在し、214 マーカーで全長 1,012 cM の遺伝子地図を構成した。しかしマーカーの分布には偏りがみられ、あるMITE 因子の近傍にはそれと同種のMITE 因子が連鎖した。すなわちゲノム内に散在するMITE は選択的に染色体へ挿入しているとみられた。現在、他種のMITE プライマーの検討やMITE-AFLP マーカーを用いた突然変異遺伝子のマッピングを行っている。

(2) 研究成果の今後期待される効果

EST マーカーの開発によってオオムギのマーカー作製は極めて効率的になった。その一方で、マイクロサテライトやMITE といった反復性の高いマーカーの使い勝手の良さも捨てきれない魅力がある。今後、このようなマーカーを自在に使いこなせる高能率のマーカータイプピングシステムの出現が望まれる。

3. 9 醸造品質解析グループ（サッポロビール(株)バイオリソース開発研究所 伊藤一敏)

(1) 研究実施内容及び成果

ポストゲノム解析の有力な手法であるプロテオミクス研究では、タンパク質を網羅的に解析することにより機能をもつタンパク質を同定することが可能となる。これまでオオムギに由来するビール中のタンパク質については一部の主要なタンパク質について品質との関連性が論じられているに過ぎなかった。本研究の目的は、プロテオミクス手法を用いて、種子、麦芽からビールに至るまでのビール醸造工程におけるオオムギタンパク質の消長と、それらのビール品質と関連を明らかにすることにある。

まずオオムギ種子、麦芽、麦汁、ビールよりサンプルを調製し二次元電気泳動を行なう方法を確立した。そしてビールの泡持ちが優れたオオムギ品種と劣ったオオムギ品種を原料に用いて実験室規模でビールを製造し、そのタンパク質組成を質量解析により同定、比較した。

a) ビール中タンパク質の網羅的解析

ビール中のタンパク質を網羅的に解析するためにpI 4-7, 6-9に分けての二次元電気泳動、並びに一次元のSDS-PAGEを行い、得られたタンパク質スポットの質量解析を実施した。合計87スポットについてTOF-MSによるPMF (Peptide Mass Finger-printing) 解析を行った。PMF 解析で同定できなかったタンパク質スポットのうち特徴的なくつかのスポットについてLC-MS/MSによる解析を実施した。この結果合計43スポットが同定された。同定されなかったタンパク質はデータベースに存在しなかったためと考えられる。現在、登熟種子、発芽種子で発現する遺伝子のエントリーがデータベースに少ない為、オオムギ遺伝子データベースが将来的に充実するようになればそれにヒットし同定される可能性がある。

有意にヒットしたタンパク質のうち、オオムギ由来のタンパク質が6種類(BDAI-1, LTP-1など)、酵母由来のタンパク質が7種類(Enolase 1, Acyl-CoA binding protein type 1など)であった。同一分子量であるが等電点が異なるいくつかのスポットは同一のタンパク質種と同定される傾向にあった。

表 1 TOF-MS, LC-MS/MS を利用したビール中タンパク質の同定結果

Spot No.	Protein Name	Identification		Spot No.	Protein Name	Identification	
		Method	Species			Method	Species
3	protein z-type serpin	PMF	H. vulgare	49	Enolase 1	PMF	Yeast
4	protein z-type serpin	PMF	H. vulgare	50	Enolase 1	PMF	Yeast
5	protein z-type serpin	PMF	H. vulgare	51	ORF YKL152c	PMF	S. cerevisiae
6	protein z-type serpin	PMF	H. vulgare	54	cyclophilin peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	LC-MS/MS	S. cerevisiae
7	NCA3	PMF	S. cerevisiae		Non-specific lipid-transfer protein 1 precursor	LC-MS/MS	H. vulgare
8	protein z-type serpin	PMF	H. vulgare		Probable non-specific lipid-transfer protein precursor	LC-MS/MS	H. vulgare
	Tp1lp	PMF	S. cerevisiae	58	Probable non-specific lipid-transfer protein precursor	LC-MS/MS	H. vulgare
9	Tp1lp	PMF	S. cerevisiae		Non-specific lipid-transfer protein 1 precursor	LC-MS/MS	H. vulgare
	protein z-type serpin	LC-MS/MS	H. vulgare	59	LTP 1	PMF	H. vulgare
	Chain A, Structure Of Yeast Triosephosphate Isomerase	LC-MS/MS	S. cerevisiae	60	LTP 1	PMF	H. vulgare
10	Tp1lp	PMF	S. cerevisiae	71	LTP 1	PMF	H. vulgare
18	CMD preprotein(AA-14 to 146)	PMF	H. vulgare	73	LTP 1	PMF	H. vulgare
19	acyl-coA-binding protein type 1	PMF	S. bayanus	74	Barley Lipid Transfer Protein	PMF	H. vulgare
21	BDAI-1	PMF	H. vulgare	75	Barley Lipid Transfer Protein	PMF	H. vulgare
22	BDAI-1	PMF	H. vulgare	76	Barley Lipid Transfer Protein	PMF	H. vulgare
23	BDAI-1	PMF	H. vulgare	77	Barley Lipid Transfer Protein	PMF	H. vulgare
24	CMB component of tetrameric alpha-amylase inhibitor	PMF	H. vulgare	78	Barley Lipid Transfer Protein	PMF	H. vulgare
	CMD preprotein(AA-14 to 146)	PMF	H. vulgare	79	Probable non-specific lipid-transfer protein precursor	LC-MS/MS	H. vulgare
25	CMD preprotein(AA-14 to 146)	PMF	H. vulgare		Non-specific lipid-transfer protein 1 precursor	LC-MS/MS	H. vulgare
	CMB component of tetrameric alpha-amylase inhibitor	PMF	H. vulgare	80	LTP 1	PMF	H. vulgare
26	BDAI-1	PMF	H. vulgare	81	LTP 1	PMF	H. vulgare
27	BDAI-1	PMF	H. vulgare	82	LTP 1	PMF	H. vulgare
29	Trypsin inhibitor CME precursor	LC-MS/MS	H. vulgare	83	Non-specific lipid-transfer protein 1 precursor	LC-MS/MS	H. vulgare
	Non-specific lipid-transfer protein 1 precursor	LC-MS/MS	H. vulgare	85	LTP 1	PMF	H. vulgare
31	BDAI-1	PMF	H. vulgare	86	LTP 1	PMF	H. vulgare
33	Non-specific lipid-transfer protein 1 precursor	LC-MS/MS	H. vulgare	87	protein z-type serpin	LC-MS/MS	H. vulgare
48	Enolase 1	PMF	Yeast				

b) ビールの泡持ちに関連するタンパク質の解析

ビールの重要な品質の一つである泡持ちに関連するタンパク質の同定を目的として、泡持ちの異なる 2 品種（品種 A および B）を用い、さらに製麦条件（浸麦度）を変えて麦芽を調製し、単用ビールを醸造し、解析を実施した。その結果、NIBEM 値で評価した‘泡持ち’は A<B であり、タンパク質解析では分子量約 30KD 以下に違いが観察され、泡持ちの良い品種に特異的に存在するスポットが観察された。また、浸麦度を変えた麦芽を用いた試験は、品種 A では浸麦度の上昇に伴い、NIBEM 値の低下が認められたが、品種 B では泡持ちは高いまま維持された（図 1）。タンパク質解析でも、泡持ちの変化と同調するスポットが確認され、泡持ちとの関連が示唆された。これらのスポットについての質量解析を実施し、岡山大学のオオムギ EST (expressed sequence tag) 配列にヒットするタンパク質を見出した。これによりオオムギゲノム解析をビール品質の改良に応用できることが示唆された。

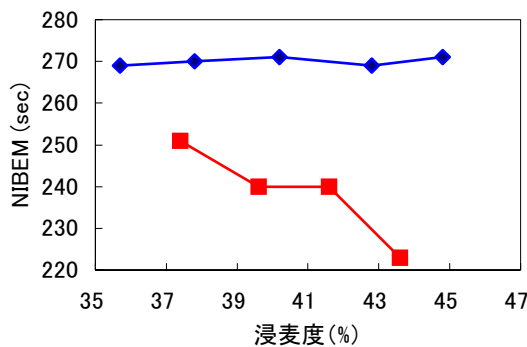
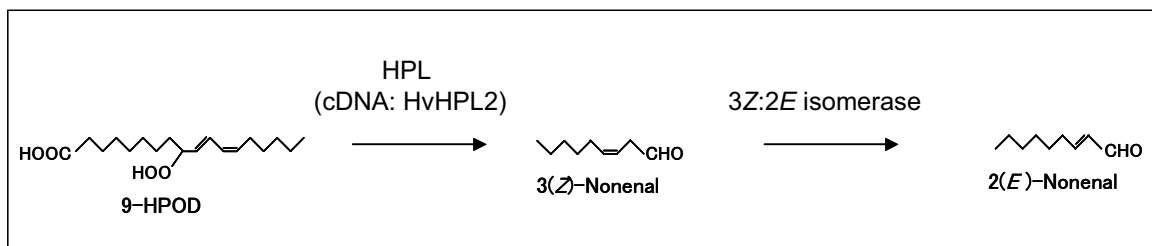


図 1 品種 A と B 単用醸造ビールの浸麦度と泡持ち (NIBEM 値) の関係 (■ : 品種 A, ◆ : 品種 B)。

c) ビール老化に関与するオオムギ脂質酸化系酵素の研究

ビール中のトリヒドロキシオクタデセン酸や2(*E*)-ノネナールなどの脂質酸化物は、ビールの品質を低下させることが知られている。これらの脂質酸化物は、麦芽由来の脂質酸化酵素によって生成すると考えられているが、その生成経路は不明な点が多い。本研究では、ビールの老化臭として知られる2(*E*)-ノネナールに関して、その生成経路と生成に関与するオオムギの酵素と遺伝子を明らかにした。生成経路の生化学的解析により、麦芽由来のリノール酸は、 $\Delta\text{OE-1}$ によりリノール酸9-ヒドロペルオキシド(9-HPOD)に変換され、9-HPODは脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ(HPL)により3(*Z*)-ノネナールに分解後、3*Z*:2*E*イソメラーゼによって2(*E*)-ノネナールに異性化されることが明らかになった。オオムギでは、リノール酸13-ヒドロペルオキシド(13-HPOD)を分解する13-HPLがクローニングされているが、今回キャラクタライズしたHPLは9-HPOD分解活性を有し、13-HPLとは異なる新規のHPLであると考えられた。そこで、この新規HPLの候補遺伝子をオオムギESTから探索した。次に、完全長cDNAを単離し、これをHvHPL2と命名した。予測ORF領域を大腸菌で発現させたところ、組換え蛋白質は9-HPOD及び13-HPODを分解し、HvHPL2は新規の9-/13-HPLであることが明らかとなった。



(2) 研究成果の今後期待される効果

これまでのアプローチでは見出されなかったビール醸造上有用なタンパク質を突き止め、ゲノム・ポストゲノム手法による測定・管理、育種手法、醸造技術による改良・制御を施すことによりオオムギの産業利用性をいっそう高めることが出来る

HvHPL2 がクローニングされたことにより、遺伝子多型の解析、SNPs の解析や HvHPL2 蛋白質を定量する ELISA 系の構築が可能となった。従って、オオムギ遺伝資源の遺伝子多型や SNPs の解析を行い、HvHPL2 活性変異体の候補を探索したり、ELISA 系を利用して HvHPL2 欠質変異体のスクリーニングを行い、最終的には、ビール老化を抑制できるオオムギ原料の開発が期待できる。

4 研究参加者

①センター形成グループ(ゲノム解析システムの研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田和義	岡山大学資源 生物科学研究 所	教授	研究総括	平成12年11月～平成 18年3月
佐藤和広	同上	助教授	ゲノム解析全般	平成12年11月～平成 18年3月
最相大輔	同上	助手	BAC ライブラリー開発, 形質転換	平成12年11月～平成 18年3月
石井 誠	同上	技官	実験材料管理	平成12年11月～平成 18年3月
堀 清純	農業生物資源 研究所	研究補助 員(時給 制)	形質マッピング	平成13年7月～平成 13年12月
堀 清純	岡山大学資源 生物科学研究 所	研究補助 員(時給 制)	形質マッピング	平成15年1月～平成 16年3月
酒井(田辺) 千賀	同上	チーム事 務員	事務処理, 実験室管理	平成13年3月～平成 18年3月
伊藤裕之	同上	研究補助 員	形質調査, マッピング	平成13年4月～平成 14年3月
南角奈美	同上	CREST 技 術員	シーケンス解析, マッピ ング, タンパク解析	平成13年4月～平成 18年3月
矢野健太郎	同上	CREST 研 究員	情報解析	平成13年11月～平成 15年7月
明楽映里子	同上	研究補助 員	BAC 解析	平成14年4月～平成 17年3月
元井由加	同上	研究補助 員	シーケンス解析, マッピ ング	平成14年4月～平成 18年3月
江口美穂	同上	研究補助 員	アレイシステム	平成15年6月～平成 15年11月
植木英雄	同上	研究補助 員	マッピング, BAC 解析	平成16年4月～平成 18年3月
鈴木 一	同上	CREST 研 究員	アレイ解析	平成15年1月～平成 17年3月
張 文勝	同上	研究補助 員(時給 制)	材料管理	平成13年10月～平成 16年3月

②機能開発解析グループ(遺伝子・蛋白解析システム, 形質転換系, ミネラル反応の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
馬建鋒	岡山大学資源生物科学研究所	教授	ミネラル応答機構の解明	平成12年11月～平成18年3月
且原眞木	同上	助教授	遺伝子機能解析, 形質転換系	平成12年11月～平成18年3月
杉本 学	同上	助教授	遺伝子・タンパク解析システム	平成12年11月～平成18年3月
劉 形	同上	研究補助員(時給制)	遺伝子機能解析, 形質転換系	平成14年8月～平成15年3月
山口峰生	同上	研究補助員(時給制)	遺伝子機能解析, 形質転換系	平成13年11月～平成14年3月

③物理地図グループ(物理地図作製, 生理機能の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
武田真	香川大学農学部	教授	物理地図作製, 生理機能の研究	平成12年11月～平成18年3月

④タンパク解析グループ(有用特性のタンパク解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
掛田克行	三重大学生物資源学部	助教授	有用特性のタンパク解析	平成13年4月～平成18年3月

⑤情報システムグループ(オオムギ遺伝子データベースの研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
山崎由紀子	国立遺伝学研究所	助教授	オオムギ遺伝子データベースの開発	平成12年11月～平成18年3月

⑥ライブラリ開発グループ(完全長 cDNA ライブラリ開発の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
斉藤彰	九州沖縄農業研究センター	室長	完全長 cDNA ライブラリ の開発	平成12年11月～平成 18年3月

⑦BAC 遺伝子単離グループ(高能率 BAC ライブラリ開発, 精密連鎖地図作製と遺伝子単離の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
川崎信二	農業生物資源研究所	上席研究 官	高能率BACライブラリ開 発, 精密連鎖地図作製	平成12年11月～平成 18年3月
小松田隆夫	同上	主任研究 官	精密連鎖地図作製と遺 伝子単離	平成12年11月～平成 18年3月
プーヘイラン ディッシュ・ モハマド	同上	研究補助 員(時給 制)	精密連鎖地図作製	平成16年4月～平成 17年3月

⑧大量シーケンス解析グループ(大量シーケンス解析技術の開発と遺伝子マッピングの研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
高橋秀和	秋田県立大学 生物資源学部	助手	大量シーケンス解析技 術の開発と遺伝子マッ ピング	平成13年11月～平成 18年3月

⑧醸造品質解析グループ(醸造品質の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
伊藤一敏	サッポロビール株式会社	バイオリソース研究所長	醸造品質の研究	平成14年2月～平成18年3月
金子隆史	同上	同上グループリーダー	醸造品質の研究	平成14年2月～平成18年3月
岡田吉弘	同上	同上研究員	醸造品質の研究	平成14年2月～平成16年3月
飯牟礼隆	同上	同上	醸造品質の研究	平成16年4月～平成18年3月
高塩仁愛	同上	価値創造フロンティア研究所長	醸造品質の研究	平成14年2月～平成18年3月
蛸井 潔	同上		醸造品質の研究	平成14年2月～平成14年9月
金田弘拳	同上	同上グループリーダー	醸造品質の研究	平成14年10月～平成18年3月
黒田久夫	同上	同上上級研究員	醸造品質の研究	平成14年10月～平成18年3月

5 成果発表等

(1)論文発表 (国内7件, 海外(国際)89件)

- Sato, K., Inukai, T. and Hayes, P. M. QTL analysis for resistance to the rice blast pathogen in barley. *Theor. Appl. Genet.* 102:916-920. (2001)
- Takahashi, H., Sato, K. and Takeda, K. Mapping genes for deep-seeding tolerance in barley. *Euphytica* 122: 37-43. (2001)
- Miyazaki, C., Osanai, E., Saeki, K., Ito, K., Konishi, T., Sato, K. and Saito, A. Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to barley yellow mosaic virus in a Chinese barley landrace, Mokusekko 3. *Breeding Sci.* 51:171-178. (2001)
- Kaneko, T., Zhang, W. S., Ito, K. and Takeda, K. Worldwide distribution of beta amylase thermostability in barley. *Euphytica* 121:223-228. (2001)
- Kaneko, T., W. S. Zhang, Takahashi, H. Ito, K. and Takeda, K. QTL mapping for enzyme activity and thermostability of beta amylase in barley. *Breeding Sci.* 51:99-105. (2001)
- Matsuo, H., Taniguchi, K., Hiramoto, T., Yamada, T., Ichinose, Y., Toyoda, K., Takeda, K. and Shiraishi, T. Gramine increase associated with rapid and transient systemic resistance in barley seedlings induced by mechanical and biological stresses. *Plant Cell Physiol.* 42:1103-1111. (2001)
- Kohyama, N., Fujita, M. and Takeda, K. Correlation between barley constituents and the browning reaction in heat-treated barley pastes. *Food Sci. Technol. Res.* 7:297-299. (2001)
- Marquez-Cedillo, L. A., Hayes, P. M., Kleinhofs, A., Legge, W. G., Rossnagel, B. G., Sato, K.,

- Ullrich, S. E., Wesenberg, D. M. QTL analysis of agronomic traits in barley based on the doubled haploid progeny of two elite North American varieties representing different germplasm groups. *Theor Appl Genet* 103: 625-637. (2001)
- Costa, J. M., Corey, A., Hayes, P. M., Jobet, C., Kleinhofs, A., Kopisch-Obusch, A., Kramer, S. F., Kudrna, D., Li, M., Riera-Lizarazu, O., Sato, K., Szucs, P., Toojinda, T., Vales, M. I., and Wolfe, R. I. Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theor Appl Genet* 103: 415-424. (2001)
- Kato, H., Taketa, S., Ban, T., Iriki, N. and Murai, K. The influence of a spring habit gene, *Vrn-D1*, on heading time in wheat. *Plant Breeding* 120, 115-120. (2001)
- Taketa, S., Ando, H., Takeda, K. and Bothmer, R. von. : Physical locations of 5S and 18S-25S rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. *Heredity* 86, 522-530. (2001)
- Taketa, S. and Takeda, K. Production and characterization of a complete set of wheat-wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) chromosome addition lines. *Breeding Science* 51, 199-206. (2001)
- Matsui, K., Mano, Y., Taketa, S., Kawada, N. and Komatsuda, T. Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102, 477-482. (2001)
- Komatsuda, T., Salomon, B., Bryngelsson, T., and Bothmer, R. von. Phylogenetic analysis of *Hordeum marinum* Huds. based on nucleotide sequences linked to the *vrs1* locus. *Pl. Syst. Evol* 227:137-144. (2001)
- Mano, Y., Kawasaki, S., Takaiwa, F. and Komatsuda, T. Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) cross 'Azumamugi' x 'Kanto Nakate Gold' using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system. *Genome* 44:284-292. (2001)
- Matsui, K., Mano, Y., Taketa, S., Kawada, N. and Komatsuda, T. Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 102:477-482. (2001)
- Ma, J. F., Ryan, P. R. and Delhaize, M.: Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Sci.* 6, 273-278. (2001)
- Raman, H., Moroni, J. S., Sato, K., Read, B. J. and Scott, B. J. Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105:458-464. (2002)
- Noda, K., Matsuura, T., Maekawa, M. and Taketa, S. Chromosomes responsible for sensitivity of embryo to abscisic acid and dormancy in wheat. *Euphytica* 123 : 203-209. (2002)
- Taketa, S., Choda, M., Ohashi, R., Ichii, M. and Takeda, K. Molecular and physical mapping of a barley gene on chromosome arm 1HL that causes sterility in hybrids with wheat. *Genome* 45: 617-625. (2002)
- Murai, K. and Taketa, S.: Introgression of barley chromatin into wheat genome through chromosome engineering. *Current Topics in Plant Biology* 3, 155-165 (2002)
- Taketa, S., Choda, M., Ohashi, R., Ichii, M. and Takeda, K. Molecular and physical mapping of a barley gene on chromosome arm 1HL that causes sterility in hybrids with wheat. *Genome* 45: 617-625. (2002)
- Masaoka, Y., Saito, A., Arakawa, Y., Matsuzaki, H., Miyazaki, C. and Kobayashi, K. 26Al microanalysis in the leaf cell organelles of Ruzigrass and barley by Accelerator Mass Spectrometry. *J. Plant Nutrition* 25(2), 343-354. (2002)
- Tanno, K., Taketa, S., Takeda, K. and Komatsuda, T. A DNA marker closely linked to the *vrs1* locus (row type gene) indicates multiple origins of six-rowed cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 104:54-60. (2002)
- Komatsuda, T. and Mano, Y. Molecular mapping of the intermedium spike-c (*int-c*) and non-brittle rachis 1 (*brt1*) loci in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet* 105: 85-90. (2002)
- Fujita, M., Takeda, K., Kohyama, N., Doi, Y. and Matsunaka, H. Genotypic variation in polyphenol content of barley grain. *Euphytica* 124:55-58. (2002)
- Domon, E., Saito, A. and Takeda, K. Comparison of the waxy locus sequence from a non-waxy strain and two waxy mutants of spontaneous and artificial origins in barley. *Genes and genetic systems* 77:351-359. (2002)

- Katsuhara, M., Akiyama, Y., Koshio, K., Shibasaka, M. and Kasamo, K. Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiology* 43:885-893. (2002)
- Ma, J. F. Beneficial Elements: Si and Na. In *Encyclopedia of Soil Science*, Marcel Dekker, Inc. 1201-1205. (2002)
- Ma, J. F. and Takahashi, E. *Soil, Fertilizer, and Plant Silicon Research in Japan*. Elsevier Science (2002)
- Kawahara, T., Taketa, S. and Murai, K. Differential effects of cultivated and wild barley chromosome 5H on heading characters in wheat-barley chromosome addition lines. *Hereditas* 136: 195-200. (2002)
- Matsui, K., Yoshida, M., Ban, T., Komatsuda, T. and Kawada, N. Role of male-sterile cytoplasm in resistance to barley yellow mosaic virus and *Fusarium* head blight in barley. *Plant Breeding* 121:237-240. (2002)
- Matsui, K., Oda, S., Furusho, M., Komatsuda T. and Kawada, N. Evaluation of barley male-sterile cytoplasm based on fertility restoration and the effect of the cytoplasm on malting quality in Japan. *Plant Prod Sci* 5 (3):194-197. (2002)
- Mano, Y. and Komatsuda, T. Identification of QTLs controlling tissue-culture traits in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 105:708-715. (2002)
- Nishikawa, T., Salomon, B., Komatsuda, T., Bothmer, R. von and Kadowaki, K. Molecular phylogeny of the genus *Hordeum* using three chloroplast DNA sequences. *Genome* 45:1157-1166. (2002)
- Ma, F. F., Higashitani, A., Sato, K. and Takeda, K. Genotypic variation in Si concentration of barley grain. *Plant and Soil* 249(2): 383-387. (2003)
- Rikiishi, K., Matsuura, T., Maekawa, M., Noda, K. and Takeda, K. Genetic analysis of tissue culture traits in barley cultivar 'Lenins'. *Plant Breeding* 122:99-104. (2003)
- Domon, E., Yanagisawa, Y., Saito, A. and Takeda, K. Single nucleotide polymorphisms genotyping by polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for barley waxy gene. *Plant Breeding* 123:225-228. (2003)
- Chono, M., Honda, I., Zeniya, H., Yoneyama, K., Saisho, D., Takeda, K., Takatsuto, S., Hoshino, T. and Watanabe, Y. A Semidwarf Phenotype of Barley uzu Results from a Nucleotide Substitution in the Gene Encoding a Putative Brassinosteroid Receptor. *Plant Physiology* 133: 1209-1219. (2003)
- Hori, K., Kobayashi, T., Shimizu, A., Sato, K., Takeda, K. and Kawasaki, S. Efficient construction of high-density linkage map and its application to QTL analysis in barley. *Theor. Appl. Genet.* 107: 806-813. (2003)
- Zhao, Z., Ma, J., Sato, K. and Takeda, K. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 217: 794-800. (2003)
- Sugimoto, M., Okada, Y., Sato, K., Ito, K. and Takeda, K. A root-specific O-methyltransferase gene expressed in salt-tolerant barley. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 966-972. (2003)
- Matus, A., Corey, A., Filichkin, T., Hayes, P. M., Vales, I., Kling, J., Riera, O., Sato, K., Powell, W. and Waugh, R. Development and characterization of recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donot alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background. *Genome* 46:1010-1023. (2003)
- Sugimoto, M. and Takeda, K. Structure and function of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-like protein from barley. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 23: 397-403. (2003)
- Katsuhara, M., Koshio, K., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T. and Kasamo, K. Over-expression of a barely aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 44:1378-1383. (2003)
- Katsuhara, M., Koshio, K., Shibasaka, M. and Kasamo, K. 2003. Expression of an aquaporin at night in relation to the growth and root water permeability in barley seedlings. *Soil Science and Plant Nutrition* 49:883-888. (2003)
- Kikuchi, S., Taketa, S., Ichii, M. and Kawasaki, S. Efficient fine mapping of the naked caryopsis gene (*nud*) by HEGS (High efficiency genome scanning)/AFLP in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 73-78. (2003)
- Ma, J. F. and Furukawa, J.: Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97: 46-51. (2003)

- Bothmer, R. von, Knüpfper, H., Hintum, Th. Van. and Sato, K. Diversity in barley (*Hordeum vulgare*). Elsevier Science, The Netherlands. (2003)
- Bothmer, R. von, Sato, K., Komatsuda, T., Yasuda, S. and Fischbeck, G. Domestication of barley. In Diversity in barley (*Hordeum vulgare*) (eds. Bothmer, R. von, et al.). Elsevier Science, The Netherlands. (2003)
- Knüpfper, H., Terentyeva, I., Hammer, K., Kovalyova, O. and Sato, K. Ecogeographical diversity – a Vavilovian approach. In Diversity in barley (*Hordeum vulgare*) (eds. Bothmer, R. von, et al.). Elsevier Science, The Netherlands. (2003)
- Weibull, J., Walther, U. and Sato, K. Diversity in response to biotic stresses. In Diversity in barley (*Hordeum vulgare*) (eds. Bothmer, R. von, et al.). Elsevier Science, The Netherlands. (2003)
- Sato, K., Bothmer, R. von, Hintum, T. van and Knüpfper, H. Barley diversity, an outlook. In Diversity in barley (*Hordeum vulgare*) (eds. Bothmer, R. von, et al.). Elsevier Science, The Netherlands. (2003)
- Hayes, P. M., Castro, A., Marquez-Cedillo, L., Corey, A., Henson, C., Jones, B. L., Kling, J., Mather, D., Matus, I., Rossi, C. and Sato, K. Genetic Diversity for Quantitatively Inherited Agronomic and Malting Quality Traits. In Diversity in barley (*Hordeum vulgare*) (eds. Bothmer, R. von, et al.). Elsevier Science, The Netherlands. (2003)
- Taketa, S., Linde-Laursen, I. and Künzel, G. Cytogenetic diversity. In: Bothmer, R. von., Hintum, Th. Van., Knüpfper, H. and Sato, K. (eds), Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*), pp. 97-119. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. (2003)
- Stanca, A.M., Romagosa, I., Takeda, K., Lundborg, T., Terzi, V. and Cattivelli, L. Diversity in abiotic stress tolerances. In: Bothmer, R. von., Hintum, Th. Van., Knüpfper, H. and Sato, K. (eds), Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*), pp. 179-199. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. (2003)
- 佐藤和広. オオムギの育種. 植物育種学 (日向康吉, 西尾剛編). 文英堂, 東京, pp. 95-101. (2003)
- 且原真木. 「水の吸収と移行」植物の膜輸送システムーポンプ・トランスポーター・チャンネル研究の新展開 (加藤潔, 島崎研一郎, 前島正義, 三村徹郎監修) 秀潤社 159-166. (2003)
- Ma, J. F. Aluminum tolerance in Plants. In Physiological Plant Ecology (Walter Larcher), Springer, pp. 218-221. (2003)
- Ma, J. F. Functions of silicon in higher plants. In Silicon Biomineralization (Muller W. E. G. ed), Springer, pp. 127-147. (2003)
- Kuroda, H., Furusho, S., Maeba, H. and Takashio, M. Characterization of factors involved in the production of 2(E)-nonenal during mashing. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 691-697. (2003)
- Ma, J. F., Nagao, S., Sato, K., Ito, H., Furukawa, J. and Takeda, K. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. J. Exp. Bot.: 1335-1341. (2004)
- Karsai, I., Hayes, P. M., Kling, J., Matus, I. A. Mészáros, K., Láng, L., Bedo, Z. and Sato, K. Genetic Variation in Component Traits of heading date in *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* Accessions Characterized in Controlled Environments. Crop Sci. 44: 1622-1632. (2004)
- Ma, J. F., Higashitani, A., Sato, K. and Takeda, K. Genotypic variation in Fe concentration of barley grain. Soil Sci. Plant Nutr. 50: 1115-1117. (2004)
- Domon, E., Yanagisawa, Y., Saito, A. and Takeda, K. Single nucleotide polymorphism genotyping of the barley waxy gene by polymerase chain reaction with confronting two-pair primers. Plant Breed. 123: 225-228. (2004)
- Zhang, W., Kaneko, T. and Takeda, K. β -amylase variation in wild barley accessions. Breed. Sci. 5: 41-49. (2004)
- Zhang, W., Kaneko, T., Ishii, M. and Takeda, K. Differentiation of β -amylase phenotypes in cultivated barley. Crop Sci. 44: 1608-1614. (2004)
- Saisho, D., Tanno, K., Chono, M., Honda, I., Kitano, H. and Takeda, K. Spontaneous brassinolide-insensitive barley mutant 'uzu' adapted to East Asia. Breed. Sci. 54: 409-416. (2004)
- 且原真木. 植物の根に関する諸問題-水透過性の分子機構: 根における水チャンネル-アクアポリンの機能- 農業および園芸 79:600-605. (2004)

- Hanba, Y. T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I. and Katsuhara, M. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 45: 521-529. (2004)
- 且原真木. 水の吸収と輸送の分子機構 : 水チャネル研究の新展開 根の研究 13:15-20 (2004)
- Liu, T., Nakashima, S., Hirose, K., Shibasaka, M., Katsuhara, M., Ezaki, B., Giedroc, D. P. and Kasamo, K. A novel cyanobacterial SmtB/ArsR family repressor regulates the expression of a CPx-ATPase and a metallothionein in response to both Cu(I)/Ag(I) and Zn(II)/Cd(II). *Journal of Biological Chemistry* 279:17810-17818. (2004)
- Taketa, S., Kikuchi, S., Awayama, T., Yamamoto, S., Ichii, M. and Kawasaki, S. Monophyletic origin of naked barley inferred from molecular analyses of a marker closely linked to the naked caryopsis gene (*nud*). *Theoretical and Applied Genetics* 108, 1236-1242. (2004)
- Ma, J. F.: Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50: 11-18. (2004)
- Komatsuda, T., Maxim, P., Senthil, N. and Mano, Y. High-density AFLP map of non-brittle rachis 1 (*btr1*) and 2 (*btr2*) genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) *Theor Appl Genet* 109: 986-995. (2004)
- Turuspekov, Y., Mano, Y., Honda, I., Kawada, N., Watanabe, Y. and Komatsuda, T. Identification and mapping of cleistogamy genes in barley. *Theor Appl Genet* 109: 480-487. (2004)
- Komatsuda, T. and Tanno, K. Comparative high resolution map of the six-rowed spike locus 1 (*vrsl*) in several populations of barley, *Hordeum vulgare* L. *Hereditas* 141: 68-73. (2004)
- Matsui, K., Kiryu, Y., Komatsuda, T., Kurauchi, N., Ohtani, T. and Tetsuka, T. Identification of AFLP markers linked to non-seed shattering locus (*sht1*) in buckwheat and conversion yo STS markers for marker-assisted selection. *Genome* 47: 469-474. (2004)
- Sameri, M. and Komatsuda, T. Identification of quantitative trait loci (QTLs) controlling flowering time in the population generated from a cross between oriental and occidental barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) *Breed Sci* 54:327-332. (2004)
- He, C., Sayed-Tabatabaei B. E. and Komatsuda, T. AFLP targeting of the 1-cM region conferring the *vrsl* gene for six-rowed spike in barley, *Hordeum vulgare* L. *Genome* 47:1122-1129. (2004)
- He, C. and Komatsuda, T. PCR-based screening BAC library and direct end sequencing of BAC clones. *Acta Genetica Sinica* 31:1262-1267. (2004)
- 佐藤和広. 作物の伝播 (オオムギ) 農学大辞典第3版. 養賢堂. 東京.pp.446-447. (2004)
- 馬 建鋒: 有用元素. 農学大辞典第3版. 養賢堂. pp.794-796. (2004)
- Hagras, A. A., Kishii, M., Sato, K., Tanaka, H. and Tsujimoto, H. Extended application of barley EST markers for the genomic analysis of wheat and barley-related species. *Breed. Sci.* 55:335-342. (2005)
- Hagras, A. A., Kishii, M., Tanaka, H., Sato, K. and Tsujimoto, H. 2005. Genomic differentiation of *Hordeum chilense* from *H. vulgare* as revealed by repetitive and EST sequences. *Genes and Genetic Systems* 80: 147-159. (2005)
- Hori, K., Sato, K., Nankaku, N. and Takeda, K. 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.* DOI: 10.1007/s11032-005-0998-z (2005)
- Hori, K., Kobayashi, T., Sato, K., Takeda, K. QTL analysis of *Fusarium* head blight resistance using a high-density linkage map in barley. *Theor. Appl. Genet.* DOI: 10.1007/s00122-005-0102-4 (2005)
- 且原真木. 植物のアクアポリンの働き 「みずみずしい体のしくみ : 水の通り道「アクアポリン」の働きと病気」第19回「大学と科学」公開シンポジウム講演収録集. クバプロ. 33-41. (2005)
- Taketa, S., Awayama, T., Ichii, M., Sunakawa, M., Kawahara, T. and Murai, K. Molecular cytogenetic identification of nullisomy-5B induced homoeologous recombination between wheat chromosome 5D and barley chromosome 5H. *Genome* 48: 115-124. (2005)
- Taketa, S., Ando, H., Takeda, K., Ichii, M. and Bothmer, R. von. : Ancestry of American polyploid *Hordeum* species with the I genome inferred from 5S and 18S-25S rDNA. *Annals of Botany*

- 96, 23-33. (2005)
- Kubo, N., Salomon, B., Komatsuda, T., Bothmer, R. von, and Kadowaki, K. Structural and distributional variation of mitochondrial rps2 genes in the tribe Triticeae (Poaceae). *Theor. Appl. Genet.* 110: 995-1002. (2005)
- Murakami, S., Matsui, K., Komatsuda, T. and Furuta, Y. AFLP-based STS markers closely linked to a fertility restoration locus (Rfm1) for cytoplasmic male sterility in barley. *Plant Breed.* 124: 133-136. (2005)
- Honda, I., Turuspekov, Y., Komatsuda, T. and Watanabe, Y. Morphological and physiological analysis of cleistogamy in barley (*Hordeum vulgare*) *Physiologia Plantarum* 124:524-531. (2005)
- Senthil, N., Komatsuda, T. Inter-subspecific maps of non-brittle rachis genes btr1/btr2 using occidental, oriental and wild barley lines. *Euphytica* 145: 215-220. (2005)
- Turuspekov, Y., Kawada, N., Honda, I., Watanabe, Y. and Komatsuda, T. Identification and mapping of QTL for rachis internode length associated with cleistogamy in barley. *Plant Breed* 124:542-545. (2005)
- Kuroda, H., Kojima, H., Kaneda, H. and Takashio, M. Characterization of 9-Fatty Acid Hydroperoxide Lyase-like Activity in Germinating Barley Seeds that Transforms 9(S)-Hydroperoxy-10(E),12(Z)-octadecadienoic acid into 2(E)-Nonenal. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:1661-1668. (2005)

(2)口頭発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)

□発表者 (所属), タイトル, 学会名, 場所, 月日等□

□招待, 口頭講演 (国内 132 件, 海外 (国際) 14 件)

□ポスター発表 (国内 7 件, 海外 (国際) 45 件)

Sato, K.¹, Saisho, D.¹, Takahashi, H.² and Takeda, K.¹ (1.岡大資生研, 2.秋田県立大) A large scale barley cDNA sequencing program in Okayama University. *Plant and Animal Genome IX.* 米国, サンディエゴ, 2001 年 1 月 15 日 (ポスター)

Sugimoto, M., Katsuhara, M., Sakamoto, W., Sato, K., Takeda, K. and Kawai, F. (岡大資生研) Identification of specific genes expressed in salt tolerant barley. *Plant and Animal Genome IX.* 米国, サンディエゴ, 2001 年 1 月 15 日 (ポスター)

且原真木・笠毛邦弘 (岡大資生研) 「オオムギ根から単離した水チャンネル遺伝子の機能発現」日本植物生理学会 2001 年年会, 九州大学, 2001 年 3 月 23-36 日

小塩和輝・且原真木・笠毛邦弘 (岡大資生研) 「オオムギの水チャンネル遺伝子 *bpw1* の局在性と発現の日周変化」日本植物生理学会 2001 年年会, 九州大学, 2001 年 3 月 23-26 日

佐藤和広¹・最相大輔¹・高橋秀和²・武田和義¹・小原雄治³(1.岡大資生研, 2.秋田県立大, 3.遺伝研), オオムギ cDNA クロームの大量シーケンシング, 日本育種学会、神奈川県藤沢市日本大学生物資源科学部, 2001 年 4 月 2 日

伊藤裕之^{1,3}・佐藤和広¹・川崎信二²・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.生物研, 3.CREST), バルクセグレガント分析を用いたオオムギアルミニウム耐性のマッピング, 日本育種学会、神奈川県藤沢市日本大学生物資源科学部, 2001 年 4 月 2 日

南角奈美^{1,2}・佐藤和広¹・石井誠¹・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST), 日本育種学会、中国中南部から収集したオオムギ遺伝資源のマイクロサテライトマーカーによる評価, 神奈川県藤沢市日本大学生物資源科学部, 2001 年 4 月 2 日

元井由加・佐藤和広・石井誠・武田和義 (岡大資生研), 中国辺境および周辺国に分布するオオムギ遺伝資源の導入と特性評価, 日本育種学会、神奈川県藤沢市日本大学生物資源科学部, 2001 年 4 月 2 日

武田 真¹・安藤裕崇²・武田和義²・Bothmer, R. von³ (1.香川大農, 2.岡大資生研, 3.スエーデン農科大) 5S および 18S-25S rRNA 遺伝子座の分布パターンから推定したオオムギ属倍数種の系統進化. 育種学研究 3 巻 (別 1) 181. 日本育種学会 日本大学 2001

- 年 4 月 2 日.
- Knüpffer, H.¹, Bothmer, R., von.², Hintum, T. van.³ and Sato, K.⁴,(1:IPK, Germany, 2:Swedish Univ. Agr., 3:CGR, The Netherlands, 4:Okayama Univ.), The International barley core collection, 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, September 10-12 ,2001. (ポスター)
- Bothmer, R. von.¹, Hintum, Th. Van.², Knüpffer, H.³ and Sato, K.⁴(1:Swedish Univ. Agr., 2:CGR, The Netherlands, 3:IPK, Germany, 4:Okayama Univ.), Genetic diversity in barley (*Hordeum vulgare*), 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, September 10-12 ,2001.
- Nishikawa, T., Komatsuda, T., Bothmer, R. von. and Kadowaki, K. Molecular phylogeny in the genus *hordeum* using three sequences of chloroplast DNA. In (ed) Proceeding 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, September 10-12,2001 pp. 119 (ポスター)
- Kubo, N., Komatsuda, T., Salomon, B. and Kadowaki, K. Mitochondrial rps2 of barley has a c-terminal extension differing from that of other cereals but is highly conserved in *hordeum* species. In (ed) Proceeding 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, September 10-12, 2001 pp. 92 (ポスター)
- Kadowaki, K., Nishikawa, T., Kubo, N., Salomon, B., Komatsuda, T. and Bothmer, R. von., Analysis of chloroplast and mitochondrial sequences for taxonomic analysis of tribe triticeae. In (ed) Proceeding 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, September 10-12, 2001 pp. 30 (ポスター)
- Komatsuda, T., Salomon, B. and Bothmer, R. von., A new molecular tool for studying the nuclear genome in the Triticeae. In (ed) Proceeding 4th International Triticeae Symposium, Cordoba, Spain, September 10-12, 2001 pp. 88 (ポスター)
- 佐藤和広¹・武田和義¹・山崎由紀子²・小原雄治²(1.岡大資生研, 2.遺伝研), オオムギ EST に見いだされた一塩基置換多型, 日本育種学会, 福岡県福岡市九州大学箱崎キャンパス,2001年10月7日
- 伊藤裕之^{1,3}・佐藤和広¹・川崎信二²・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.生物研, 3.CREST), オオムギアルミニウム耐性の精密マッピングに向けたマップ集団の再構成, 日本育種学会, 福岡県福岡市九州大学箱崎キャンパス, 2001年10月7日
- 南角奈美^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST), マイクロサテライトマーカーを用いたオオムギ遺伝資源の多様性評価, 日本育種学会, 福岡県福岡市九州大学箱崎キャンパス, 2001年10月7日
- 元井由加¹・佐藤和広¹・南角奈美^{1,2}・石井誠¹・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST), 中国および周辺国に分布するオオムギ遺伝資源のマイクロサテライトマーカーによる評価, 日本育種学会, 福岡県福岡市九州大学箱崎キャンパス, 2001年10月7日
- 小林哲朗・佐藤和広・武田和義 (岡大資生研), RI 集団を用いたオオムギ赤かび病抵抗性の連鎖分析日本育種学会, 福岡県福岡市九州大学箱崎キャンパス, 2001年10月7日
- 武田 真・大橋良子(香川大農) オオムギ転座染色体添加コムギ系統を利用したオオムギ 1H染色体長腕に関する細胞遺伝学地図の作成. 育種学研究 3 卷(別 2)33. 日本育種学会 九州大学 2001年10月8日.
- 川崎信二, 清水顕史, 三上一保 (生物研), 高能率ゲノム走査法 (HEGS : High Efficiency Genome Scanning) とその応用, 第 4 3 回日本育種学会シンポジウム報告, 2001年10月8日
- Katsuhara, M. Water channels in barley. The 6th International Society of Root Research Symposium, 名古屋国際会議場, 2001年11月11-15日 (ポスター)
- 東谷, 馬, 佐藤, 武田 大麦穀粒におけるミネラル含量について 日本土壤肥料学会関西支部会 山口 2001年12月7日
- Kubo, N., Komatsuda, T., Salomon, B., Kadowaki, K., Diversity of mitochondrial rps2 gene in the tribe Triticeae. *Breed Res* 3 (suppl 2):292 (2001)
- Nishikawa, T., Komatsuda, T., Kadowaki, K., Phylogenetic analysis of genus *Hordeum* using three chloroplast DNA regions. *Breed Res* 3 (suppl 2):290 (2001)

- Tanno, K., Bothmer, R. von., Takeda, K., Komatsuda, T. Allopolyploidy of *Hordeum murinum* indicated from sequencing analysis. *Breed Res* 3 (suppl 2):287. (2001)
- Nishikawa, T., Kubo, N., Komatsuda, T., Kadowaki, K. Differences of substitution rate among three kinds of *Hordeum* genome. *Breed Res* 3 (suppl 1):183 (2001)
- 元井由加¹・佐藤和広¹・南角奈美^{1,2}・武田和義¹ (1.岡大資生研、2.CREST) , 中国およびその周辺国から導入したオオムギ遺伝資源の多様性評価とコアサンプルの選抜, 日本育種学会, 東京都町田市玉川大学, 2002年3月30日
- 矢野健太郎^{1,3}・山川武廣²・山崎由紀子²・佐藤和広³・武田和義³・小原雄治² (1. CREST, 2. 国立遺伝研, 3. 岡大資生研), オオムギESTからのUnigene構築法の比較, 日本育種学会, 東京都町田市玉川大学, 2002年3月30日
- 小林哲朗・佐藤和広・武田和義(岡大資生研), オオムギ赤かび病抵抗性のQTL解析, 日本育種学会, 東京都町田市玉川大学, 2002年3月30日
- 瀬名波忍¹・伊藤裕之^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1.岡大資生研、2.CREST) オオムギにおけるアルミニウム耐性遺伝資源の選抜, 日本育種学会, 東京都町田市玉川大学, 2002年3月30日
- 高橋秀和¹・佐藤和広²・山崎由紀子³・武田和義²・小原雄治³ (1. 秋田県大生物資源, 2. 岡大資生研, 3. 遺伝研) , ダイレクトシーケンシングによるオオムギESTに由来するSNPの再確認, 日本育種学会, 東京都町田市玉川大学, 2002年3月30日
- 堀清純^{1,2}・小林哲朗¹・清水顕史^{2,3}・佐藤和広¹・武田和義¹・川崎信二² (1. 岡大資生研、2. 生物研、3. 京大農学研究科) , 高能率ゲノム走査法(HEGS)によるオオムギ高密度連鎖地図の短期作成,, 日本育種学会, 東京都町田市玉川大学, 2002年3月30日
- 杉本 学, 且原真木, 岡田吉弘, 佐藤和広, 伊藤一敏, 武田和義. (2002) 塩ストレス抵抗性オオムギに関する研究. 1. 塩ストレスで特異的に発現する遺伝子の解析. 日本育種学会第101回講演会. 東京. 2002年3月30-31日
- 武田 真・大橋良子(香川大農) 配偶子致死染色体を利用したコムギの背景におけるオオムギ1H染色体の構造変異の誘発. 育種学研究4巻(別1)188. 日本育種学会, 玉川大学. 2002年3月31日
- 濱絵里子¹・砂川誠¹・清水智章¹・河原友子¹・武田 真²・村井耕二¹ (1.福井県立大, 2.香川大農) オオムギ5H染色体特異的 amplicon マーカーによるオオムギ5H染色体転座型コムギ染色体の同定. 育種学研究4巻(別1)189. 日本育種学会, 玉川大学. 2002年3月31日
- 小塩和輝, 且原真木, 笠毛邦弘(岡山大学資源生物科学研究所), オオムギの水チャンネル遺伝子 HvPIP2;1 の塩ストレスおよび乾燥ストレス下における機能的発現と日周変化, 日本植物生理学会2002年度年会, 岡山大学, 2002年3月28-30日
- 且原真木(岡山大学資源生物科学研究所), 植物水チャンネルの遺伝子と機能, 第6回植物生体膜シンポジウム, 倉敷市公民館, 2002年3月26日
- Komatsuda, T., Mano, Y. Molecular mapping of the non-brittle rachis 1 (btr1) locus in barley (*Hordeum vulgare* L.). In Backmann Kea (ed) Proceeding 6th Gatersleben Research Conference "Plant Genetic Resources in the Genomic Era: Genetic Diversity, Genome Evolution and New Applications., Gatersleben, March 7-11, (2002) (ポスター)
- 馬建鋒(香川大農) 細胞壁に作用するアルミニウム毒性 2002年度日本土壌肥料学会講演要旨集(シンポジウム講演) , 名古屋, 2002年4月3日
- 馬建鋒(香川大農) 酸性土壌における植物の生育戦略 2002年度日本土壌肥料学会講演要旨集(シンポジウム講演) , 名古屋, 2002年4月3日
- 馬, 東谷, 佐藤, 武田 大麦穀粒におけるケイ酸含量の変異とケイ酸集積機構の解析 日本土壌肥料学会年会 名古屋 2002年4月2日
- Zhao, 佐藤, 武田, 馬 Differential Al tolerance in barley and citrate secretion 日本土壌肥料学会年会 名古屋 2002年4月2日
- 高橋秀和^{1,2}・赤木宏守¹, 森宏一^{1,2}, 花井秀俊¹, 佐藤和広³, 武田和義³ (1.秋田県大生物資源, 2.CREST, 3.岡大資生研) イネおよびオオムギにおける細胞増殖因子(PSK)

- 遺伝子のマッピング. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 佐藤和広 (岡大資生研). オオムギの cDNA 解析. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 土門英司¹・丹野研一^{2,3}・斎藤彰¹・武田和義³ (1.九沖農研, 2.日本学術振興会 3.岡大資生研)野生オオムギの waxy 遺伝子における構造変異の地理的分布. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 廣田直彦¹・金子隆史¹・伊藤一敏¹・武田和義² (1.サッポロビール植工研, 2.岡山大学資生研). オオムギ種子リポキシゲナーゼの研究.II. オオムギ種子リポキシゲナーゼ耐熱性遺伝子の連鎖分析. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 武田和義¹・最相大輔¹・力石和英¹・北野英巳² (1. 岡大資生研, 2. 名大生命農学) オオムギにおける半矮性「渦」の特性解析. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 丹野研一・南角奈美・最相大輔・武田和義 (岡大資生研). オオムギ半矮性遺伝子 uzu 座に連鎖するマイクロサテライトマーカーの遺伝的多様性. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 南角奈美^{1,2}・矢野健太郎^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST) オオムギの EST に由来する STS 配列の多型性. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 堀清純¹・小林哲朗¹・佐藤和広¹・武田和義¹・川崎信二² (1. 岡大資生研, 2. 生物研) 高密度連鎖地図を用いたオオムギ赤カビ病抵抗性の QTL 解析. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 矢野健太郎^{1,3}・山崎由紀子²・小原雄治²・佐藤和広³・武田和義³ (1. CREST, 2. 国立遺伝研, 3. 岡大資生研) オオムギ EST の phred/phrap 大規模解析ならびにライブラリ特異的配列の探索. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 廣田直彦¹・黒田久夫²・金子隆史¹・伊藤一敏¹・武田和義³ (1.サッポロビール植工研, 2.サッポロビール (株) 醸技研, 3.岡山大学資生研) オオムギ種子リポキシゲナーゼの研究.I. オオムギ種子リポキシゲナーゼの品種変異. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 最相大輔¹・川崎信二²・佐藤和広¹・武田和義¹ (1. 岡大資生研, 2. 生物研) 醸造用オオムギ”はるな二条”の BAC ライブラリー構築. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 石井 誠¹, 児玉なつ美², 加藤鎌司², 武田和義¹, 安田昭三¹ (1.岡大資生研, 2.岡大農) 完全春化条件でもオオムギの春播性遺伝子は早晩性に影響する. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- Zhang, W.S.^{1,2}, Kaneko, T.³, Ishii M.¹, Takeda, K.¹ (1. Res. Inst. Biores., Okayama U., 2. Shijiazhuang Inst. Agric. Mod., CAS, 3. Plant Bioeng. Res. Lab. Sapporo Brew. Ltd.) Classification of β -amylase in cultivated barley. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 杉本 学¹, 岡田吉弘², 佐藤和広¹, 伊藤一敏², 武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.サッポロビール植工研) 塩ストレス抵抗性オオムギに関する研究. 2. 塩ストレスで誘導される O-methyltransferase 遺伝子のクローニングと構造. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- 長田雅之, 武田 真, 一井眞比古 (香川大農) 縦列型反復配列 Afa ファミリーの塩基配列に基づく *Hordeum* 属の系統解析. 育種学研究 4 卷(別 2) 397. 日本育種学会, 帯広畜産大学. 2002 年 8 月 27 日
- 菊池慎一¹・武田 真¹・川崎信二²・一井眞比古¹ (1.香川大農, 2.生物研) オオムギ裸性遺伝子に密接に連鎖した分子マーカーの開発. 育種学研究 4 卷(別 2) 271. 日本育種学会, 帯広畜産大学. 2002 年 8 月 27 日
- 掛田克行・唯野秀崇・伊吹敏郎・鈴木淳子・神山康夫 (三重大・生物資源) *Hordeum bulbosum*

- における S 遺伝子座周辺 DNA マーカーのマッピング. 日本育種学会第 102 回講演会. 帯広. 2002 年 8 月 27 日
- Shimizu, A., Kawasaki, S. (農業生物資源研究所) RGA-Scanning: trial to map and characterize all the Resistance-Gene Analogues (RGAs) in a plant genome. 3rd International Rice Blast Conference, つくば市, 2002 年 9 月 11-14 日
- 掛田克行¹・武田真² (1.三重大生物資源, 2.香川大農) チオレドキシソ様遺伝子の塩基配列を用いた *Hordeum* 属の系統分化の解析. 日本育種学会, 福岡県福岡市九州大学農学部, 2002 年 10 月 8 日
- 伊吹敏郎・神山康夫・掛田克行 (三重大生物資源)*Hordeum bulbosum* における AMF 法を用いた自家不和合性遺伝子座転写産物の解析. 日本育種学会, 福岡県福岡市九州大学農学部, 2002 年 10 月 8 日
- 佐藤和広¹, 山崎由紀子², 小原雄治², 武田和義¹ (1 岡大資生研, 2 遺伝研). オオムギ ESTs に存在する SNPs の特性. 日本分子生物学会年会. 横浜市. 2002 年 12 月 11 日 (ポスター)
- 矢野健太郎^{1,3}・山崎由紀子²・佐藤和広¹・小原雄治²・武田和義¹. (1 岡大資生研, 2 遺伝研, 3CREST) オオムギ cDNA ライブラリを用いた遺伝子発現プロファイルの大規模解析のためのデータベース構築. 日本分子生物学会年会. 横浜市. 2002 年 12 月 11 日 (ポスター)
- 掛田克行 (三重大・生物資源) 野生オオムギの自家不和合性. ムギ類分子生物学研究会, 埼玉県入間郡日清製粉基礎研究所, 2002 年 12 月 7 日
- Sato, K., Takeda, K., Yamazaki, Y. and Kohara, Y. SNP detection from barley EST resources in Okayama Univertisy. Plant and Animal Genome X abstracts:177. (2002) (ポスター)
- Saisho, D., Kawasaki, S., Sato, K. and Takeda, K. 2002. Construction of a BAC library from Japanese malting barley Haruna Nijo. Plant and Animal Genome X abstracts:176. (2002) (ポスター)
- Senthil N, and Komatsuda T. Development of mapping population for tagging brittleness genes in barley. Abstract Book of the 1st Plant Genomics European Meetings Berlin 2002, p.101. (2002) (ポスター)
- Sugimoto, M.¹, Yano, K.^{1,2}, Nankaku, N.^{1,2}, Saisho, D.¹, Sato, K.,¹ Takeda, K.¹ (1 岡大資生研, 2CREST) Expressed sequence tag (EST) analysis of the root cDNA library from salt-tolerant barley under salt stress. Plant & Animal Genome XI, San Diego, CA, U.S.A. 2003 年 1 月 13 日 (ポスター)
- Yano, K.^{1,2}, Yamazaki, Y.³, Kohara, Y.³, Sato, K.¹ and Takeda, K.¹ (1 岡大資生研, 2CREST, 3 遺伝研) Gene expression profile in barley cDNA libraries. Plant & Animal Genome XI, San Diego, CA, U.S.A. 2003 年 1 月 13 日 (ポスター)
- Sato, K.¹, Yano, K.^{1,2}, Yamazaki, Y.³, Takeda, K.¹ (1 岡大資生研, 2CREST, 3 遺伝研) Construction of full length-enriched cDNA library in barley. Plant & Animal Genome XI, San Diego, CA, U.S.A. 2003 年 1 月 13 日 (ポスター)
- Hori, K.¹, Shimizu, A.², Sato, K.¹, Takeda, K.¹ and Kawasaki, S.² (1 岡大資生研, 2 生物研) Rapid construction of a high-density barley linkage map by high efficiency genome scanning (HEGS). Plant & Animal Genome XI, San Diego, CA, U.S.A. 2003 年 1 月 13 日 (ポスター)
- Saisho, D.¹, Kawasaki, S.², Sato, K.¹ and Takeda, K.¹ (1 岡大資生研, 2 生物研) Construction and evaluation of a BAC library from Japanese malting barley 'Haruna Nijo'. Plant & Animal Genome XI, San Diego, CA, U.S.A. 2003 年 1 月 13 日 (ポスター)
- Honda Ichiro¹, Yerlan Turuspekov¹, Mano Yoshiro², Mohammad Sameli², Komatsuda Takao², Watanabe Yoshiaki¹. (1. 農研機構・作物研, 2. 農業生物資源研究所) Genetic analysis of opened and closed types of flowering in barley. Plant & Animal Genomes XI Conference, San Diego, January 11-15, 2003 (ポスター)
- D. Vidya Saraswathi, Congfen He, P. Azhaguvel, T. Komatsuda (農業生物資源研究所) Conversion

- of AFLP markers around non-brittle rachis (btr1) to STS in barley. Plant & Animal Genomes XI Conference, San Diego, January 11-15, 2003 (ポスター)
- Ma, J. F. (Faculty of Agriculture, Kagawa University), Different Strategies for the Detoxification of Aluminum in Higher Plants, Fifth Keele University Meeting on Al, Keele University, UK. 2003年2月22-25日
- Zhao, Z.¹, Ma, J. F.¹, Sato, K.², Takeda, K.² (1Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2Research Institute for Bioresources, Okayama University) A new secretion pattern of citrate is triggered by Al in barley (*Hordeum vulgare* L.) 日本植物生理学会年会 東大阪 2003年3月26-29日
- 且原真木¹, 半場祐子¹, 柴坂三根夫¹, 林泰行², 早川孝彦², 笠毛邦弘¹ (1 岡山大学資源生物科学研究所, 2(株)植物工学研究所) オオムギ水チャンネル遺伝子を過剰発現させた形質転換イネ緑葉での二酸化炭素透過性(拡散コンダクタンス)の上昇. 日本植物生理学会 2003年度年会. 奈良. 2003年3月29日
- 南角奈美^{1,2}・佐藤和広¹・矢野健太郎^{1,2}・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST) PCR産物サイズによるオオムギESTのマッピング. 日本育種学会第103回講演会. 千葉市千葉大学西千葉キャンパス. 2003年4月2日
- 矢野健太郎^{1,3}・三ツ井和²・山川武廣²・山崎由紀子²・佐藤和広³・武田和義³ (1. CREST, 2. 国立遺伝研, 3. 岡大資生研) オオムギESTのイネゲノム上の相同性解析. 日本育種学会第103回講演会. 千葉大学西千葉キャンパス. 2003年4月2日
- 堀清純・小林哲朗・佐藤和広・武田和義(岡大資生研) 二条オオムギ間の交雑に由来するRI集団におけるオオムギ赤カビ病抵抗性のQTL解析. 日本育種学会第103回講演会. 千葉大学西千葉キャンパス. 2003年4月2日
- Zhang, W.S.^{1,2}, Kaneko, T.³ and Takeda, K.¹ (1. Res. Inst. Biores., Okayama U., 2. Shijiazhuang Inst. Agric. Mod., CAS, 3. Plant Bioeng. Res. Lab. Sapporo Brew. Ltd.) Comparison of β -amylase alleles between *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* and ssp. *spontaneum*. 日本育種学会第103回講演会. 千葉大学西千葉キャンパス. 2003年4月2日
- 佐藤和広¹・南角奈美^{1,2}・矢野健太郎^{1,2}・武田和義¹ (1.岡山大学資生研 2.CREST) オオムギESTマーカーの大規模開発. 日本育種学会第103回講演会. 千葉大学西千葉キャンパス. 2003年4月2日
- 最相大輔¹・丹野研一¹・蝶野真喜子²・本多一郎³・北野英巳⁴・武田和義¹ (1. 岡大資生研, 2. 農研機構作物研, 3. 農研機構野菜茶研, 4. 名大生命農学) オオムギ半矮性遺伝子‘渦’の同定. 日本育種学会第103回講演会. 千葉大学西千葉キャンパス. 2003年4月2日
- 武田 真 (香川大学農学部) コムギとオオムギの属間交雑およびオオムギ属の系統分化に関する細胞遺伝学的研究(日本育種学会奨励賞受賞講演)日本育種学会, 千葉市, 2003年4月2日
- 佐藤和広¹・南角奈美^{1,2}・矢野健太郎^{1,2}・武田和義¹ (1.岡山大学資生研 2.CREST) オオムギESTマーカーの大規模開発. 日本育種学会, 千葉大学, 2003年4月2日.
- 堀清純・小林哲朗・佐藤和広・武田和義(岡大資生研) 二条オオムギ間の交雑に由来するRI集団におけるオオムギ赤カビ病抵抗性のQTL解析. 日本育種学会, 千葉大学, 2003年4月2日.
- 南角奈美^{1,2}・佐藤和広¹・矢野健太郎^{1,2}・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST) PCR産物サイズによるオオムギESTのマッピング. 日本育種学会, 千葉大学, 2003年4月2日.
- 矢野健太郎^{1,3}・三ツ井和²・山川武廣²・山崎由紀子²・佐藤和広³・武田和義³ (1. CREST, 2. 国立遺伝研, 3. 岡大資生研) オオムギESTのイネゲノム上の相同性解析. 日本育種学会, 千葉大学, 2003年4月2日.
- 武田 真(香川大農) コムギとオオムギの属間交雑およびオオムギ属の系統分化に関する細胞遺伝学的研究. 日本育種学会, 千葉大学, 2003年4月2日.
- 山下晃弘¹・高橋秀和¹・赤木宏守¹・森宏一¹・佐藤和広² (1. 秋田県大生物資源, 2. 岡大

- 資生研) オオムギにおける SNP マーカーの開発と非背地性遺伝子のマッピング. 日本育種学会. 千葉大学. 2003 年 4 月 3 日
- 高橋秀和¹・橋本知栄¹・赤木宏守¹・森宏一¹・武田和義² (1. 秋田県大生物資源, 2. 岡大資生研) オオムギ 5H 染色体長腕末端部における PCR マーカーの作成. 日本育種学会. 千葉大学. 2003 年 4 月 2 日
- Katsuhara, M., Hanba, Y., Koshio, K., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Increase in leaf CO₂ conductance and decrease in salt tolerance in transgenic rice plant over-expressing barley aquaporin. *Plant Biology* 2003, Honolulu, U.S.A. 2003 年 7 月 26 日 (ポスター)
- Kakeda, K., Ibuki, T., Suzuki, J., Tadano, H., Kurita, Y., Kowayama, Y. (三重大生物資源) Molecular genetics of self-incompatibility in wild barley, *Hordeum bulbosum*. *Plant Biology* 2003, Honolulu, U.S.A. 2003 年 7 月 26 日 (ポスター)
- 南角奈美^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST) CAPS マーカーによるオオムギ EST のマッピング. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- 堀清純・佐藤和広・武田和義 (岡大資生研) オオムギ赤かび病抵抗性の発現と選抜. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- 鈴木一^{1,2}・笹沼恒男^{1,3}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1.岡山大資生研 2.CREST 3.横浜市大木原生研) オオムギ cDNA マイクロアレイの試作. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- 佐藤和広¹・南角奈美^{1,2}・元井由加^{1,2}・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST) オオムギ EST に由来する PCR 産物のマップ親における多型. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- 武田 真・粟山貴也・一井眞比古・砂川 誠・河原友子・村井耕二(香川大農) ナリソミック 5B によって誘発したコムギ-オオムギ 5H 組換え染色体の細胞学的同定. 育種学研究 5 巻(別 2)273. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- Yerlan Turuspekov, 間野吉郎, 本多一郎, 渡邊好昭, 小松田隆夫 (作物研, 畜草研, 野菜茶戟 A, 生物研) オオムギ閉花性の遺伝に関する仮説. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- 菊池慎一・粟山貴也・山本 傑・一井眞比古・川崎信二・武田 真 (香川大農) 皮裸性遺伝子に密接に連鎖した分子マーカーによる裸ムギの起源の推定. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 20 日.
- 小松田隆夫, 間野吉郎, Petre Maxim, Natesan Senthil (生物研, CREST, 畜草研) 密接に連鎖するオオムギ小穂非脱落性遺伝子 *btr1* および *btr2* の高密度連鎖地図作製. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- Perumal Azhaguvel, Dhanasekaran Vidya Saraswathi, Natesan Senthil, Congfen He, 小松田隆夫 (生物研, CREST) オオムギ小穂非脱落性遺伝子の高精度比較マップ. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- 高橋秀和¹・八重樫真澄¹・赤木宏守¹・森宏一¹・武田真²・佐藤和広³・武田和義³ (1. 秋田県大生物資源, 2. 香川大農, 3. 岡大資生研) オオムギ EST データベース(HarvEST) を利用した PCR マーカーの作成. 日本育種学会, 神戸大学, 2003 年 9 月 19 日.
- 大塚岳、且原真木 (岡大資生研) オオムギの水輸送と塩ストレス応答. 第 19 回根研究集会. つくば大学. 2003 年 11 月
- 且原真木・小塩和輝・柴坂三根夫・笠毛邦弘 (岡大資生研) オオムギ幼根の水透過性に関連する水チャネルの夜間における発現. 第 19 回根研究集会. つくば大学. 2003 年 11 月
- 半場祐子・柴坂三根夫・林泰行*・早川孝彦*・笠毛邦宏・寺島一郎**・且原真木 (岡山大資生研, *植物工学研究所, **大阪大学理学部) オオムギ水チャンネルは二酸化炭素を透過する-形質転換イネ葉での二酸化炭素拡散コンダクタンスの上昇 関西光合成研究会 京都市 (京都府立大学) 2003 年 11 月

- 馬 建鋒 (香川大農) : 植物におけるケイ酸輸送機構. 日本植物生理学会シンポジウム講演要旨集, p.84. 奈良 (2003)
- 長尾咲子, 馬 建鋒, 佐藤和広, 武田和義 : オオムギにおけるアルミニウム耐性機構の遺伝学的解析 2003 年度日本土壌肥料学会講演要旨集 p.68 神奈川 (2003)
- Zhuqing, Z., 馬 建鋒, 佐藤和広, 武田和義 : A new secretion pattern of citrate is triggered by Al in barley. 日本植物生理学会 2003 年度年会講演要旨集 p. 236 奈良 (2003)
- Sato, K. Yamazaki, Y. and Takeda, K. Comparative sequence analysis of barley ESTs and rice genome. Plant & Animal Genome XII abstracts. (barley workshop lecture). San Diego, USA. 2004 年 1 月 9 日.
- 堀清純¹・南角奈美^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1. 岡大資生研, 2. CREST) オオムギ倍加半数体および染色体組換置換系統群における農業形質遺伝子座の比較. 日本育種学会, 東京大学, 2004 年 3 月 30 日.
- 石井 誠・堀 清純・佐藤和広・武田和義 (岡大資生研) オオムギの異なる交配集団における休眠性 QTL の比較. 日本育種学会, 東京大学, 2004 年 3 月 30 日.
- 最相大輔¹・明楽映里子^{1,2}・川崎信二³・佐藤和広¹・武田和義¹ (1. 岡大資生研, 2. CREST, 3. 生物研) 醸造用オオムギ「はるな二条」 BAC ライブラリーの構築と利用. 日本育種学会, 東京大学, 2004 年 3 月 30 日.
- 南角奈美^{1,2}・元井由加^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1. 岡大資生研, 2. CREST) オオムギ EST マップ作製における SNP タイピングシステム. 日本育種学会, 東京大学, 2004 年 3 月 30 日.
- 竹原小百合¹・南角奈美^{1,2}・元井由加^{1,2}・堀清純¹・佐藤和広¹・笹隈哲夫³・武田和義¹ (1. 岡大資生研, 2. CREST, 3. 横浜市大木原生研) 二倍体コムギマップ集団へのオオムギ EST マーカーの導入. 日本育種学会, 東京大学, 2004 年 3 月 30 日.
- 鈴木一^{1,2}・笹沼恒男^{1,3}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1. 岡山大資生研 2. CREST 3. 横浜市大木原生研) オオムギ cDNA マイクロアレイシステムにおけるシグナル強度の統計解析. 日本育種学会, 東京大学, 2004 年 3 月 30 日.
- 且原真木 (岡山大資生研) オオムギ水チャンネルとその塩ストレス応答についての解析. 第 1 回植物アクアポリン研究討論会. 名古屋大学. 2004 年 3 月
- 半場祐子, 柴坂三根夫, 林泰行*, 早川孝彦*, 笠毛邦宏, 寺島一郎**, 且原真木 (岡山大資生研, *植物工学研究所, **大阪大学理学部) オオムギアクアポリン HvPIP2;1 を過剰発現させた形質転換イネ葉での二酸化炭素拡散コンダクタンスと光合成速度の上昇. 第 1 回植物アクアポリン研究討論会. 名古屋大学. 2004 年 3 月
- 宮本直子*, 且原真木, 大川泰一郎**, 笠毛邦弘, 平沢正** (岡山大資生研, *東京大学アジア生物資源環境研究センター, **東京農工大農学部) 屈性を示している根の細胞の水吸収 第 1 回植物アクアポリン研究討論会. 名古屋大学. 2004 年 3 月
- 掛田克行¹・武田真² (1 三重大生物資源, 2 香川大農) オオムギ野生種の自家不和合性遺伝子座周辺における組換え抑制. 日本育種学会第 105 回講演会. 東京大学. 2004 年 3 月 31 日
- 黒田久夫^{1,2}・古庄重樹¹・小島英敏¹・金田弘挙^{1,2}・高塩仁愛^{1,2} (1. サッポロビール (株) 価値創造フロンティア研究所, 2. CREST) オオムギ 9-ヒドロペルオキシドリアーゼ ~ 酵素活性のキャラクタライズとビール老化との関係について日本農芸化学会. 2004 年 3 月 28 日.
- 且原真木¹, 小塩和輝¹, 柴坂三根夫¹, 林泰行², 早川孝彦², 笠毛邦弘¹ (1 岡山大資生研, 2 植物工学研究所) 水チャンネル過剰発現イネにおける根の形質と塩ストレス応答性の変化 日本植物生理学会 2004 年度年会 (東京) 2004 年 3 月 27 日-29 日
- Sasaki, T., Oosawa, H., Yamamoto, Y., Katsuhara, M., Ahn, S. J., Ryan, P. R., Delhaize, E., Matsumoto, H. Regulation of malate efflux in wheat root apex under aluminum stress: role of protein phosphorylation and ALMT1 gene. The 1st International Symposium "Life and Environmental Science in Future" (Chonnam University, Korea) 2004 年 4 月

- 且原真木 (岡山大資生研) 植物細胞におけるイオンと水：その生理と輸送機構の動物細胞との共通点と相違点 第47回日本腎臓学会学術総会(栃木) 2004年5月27日-29日
- Hori, K., Kobayashi, T., Sato, K., Takeda, K. : QTL Analysis of resistance to fusarium head blight in barley RI populations. 9th International Barley Genetics Symposium, Proceedings II: 792-798, 20-26 June 2004, Brno, Czech Republic (ポスター)
- Saisho, D., Tanno, K., Chono, M., Honda, I., Kitano, H. and Takeda, K. : Identification of barley semi-dwarf gene 'uzu'. 9th International Barley Genetics Symposium, Proceedings II: 220-225, 20-26 June 2004, Brno, Czech Republic (ポスター)
- Takeda, K.: Inheritance of fusarium head bright resistance in barley. 9th International Barley Genetics Symposium, Proceedings I: 302-307, 20-26 June 2004, Brno, Czech Republic
- Sato, K., Nankaku, N., Motoi, Y. and Takeda, K. : A large scale mapping of ESTs on barley genome. 9th International Barley Genetics Symposium, Proceedings I: 79-85, 20-26 June 2004, Brno, Czech Republic
- Sugimoto, M., Okada, Y., Sato, K., Ito, K. and Takeda, K. : Root-specific O-methyltransferase gene expressed in salt-tolerant barley. 9th International Barley Genetics Symposium, Proceedings II: 998-1002, 20-26 June 2004, Brno, Czech Republic (ポスター)
- Komatsuda, T., Maxim, P., Senthil, N. and Mano, Y. (生物研) (2004) High-density map of non-brittle rachis genes and domestication pattern of barley. Spunar I, Janicoba J (eds) Proceedings of 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic, 20-26 June 2004, pp 82-87 (ポスター)
- Sameri, M. and Komatsuda, T. (生物研) (2004) Identification of Quantitative Trait Loci Controlling Morphological and Physiological Traits, which are Characteristic between Oriental and Occidental Barley Cultivars (*Hordeum vulgare* L.). Spunar I, Janicoba J (eds) Proceedings of 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic, 20-26 June 2004, pp 231-236 (ポスター)
- Vidya Saraswathi, D., Azhaguvel, P. and Komatsuda, T. (生物研) (2004) High-resolution mapping of non-brittle rachis1 (btr1) in Barley. 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic, 20-26 June 2004, p 54 (ポスター)
- Azhaguvel, P., He, C., Sayed-Tabatabaei, BE., Tanno, K. and Komatsuda, T. (生物研) (2004) Construction of BAC contig for row type gene (vrs1) in barley. 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic, 20-26 June 2004, p 61 (ポスター)
- Turuspekov, Y., Mano, Y., Honda, I., Watanabe, Y. and Komatsuda, T. (生物研) (2004) Genetic analysis of cleistogamy in barley. 9th International Barley Genetics Symposium, Brno, Czech Republic, 20-26 June 2004, p 56 (ポスター)
- Katsuhara, M. (Research Inst. Biores. Okayama Univ.). Aquaporins under salt stress. Gordon Research Conference "Salt and Water Stress in Plants" (Hong Kong) 2004年6月13日-18日
- Kakeda, K.¹, Hanai, Y.¹, Sato, K.² (1.Fac. Biores., Mie U., 2.RIB, Okayama U.) Differential expression proteomics in barley and its wild relatives. 9th Int. Barley Genet. Symp. Brno, Czech Republic.Proc.II: 354-359. 2004年6月21日 (ポスター)
- Kuroda, H.¹, Hirota, N.², Kaneda, H.¹, Kobayashi, N.¹, Takeda, K.³, Ito, K.² and Takashio, M.³ (1. サッポロビール株式会社、価値創造フロンティア研究所、2. サッポロビール株式会社、バイオリソース開発研究所、3. 岡山大学資源生物科学研究所) Lipid oxidation during mashing and its impact on beer quality – recent progress. World Brewing Congress. 米国、サンディエゴ、2004年7月24-28日
- Saito, A. (九州沖縄農業研究センター), Y. Masaoka (広島大) Effect of low pH and Ca on root elongation at the early seedling of barley, *Hordeum vulgare*. The 6th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, Sendai, 2004, Aug.3 (ポスター)
- 竹原小百合¹・南角奈美^{1,2}・元井由加^{1,2}・堀 清純¹・佐藤和広¹・笹隈哲夫³・武田和義¹ (1. 岡大資生研, 2.CREST, 3.横浜市大木原生研) オオムギ EST マーカーを利用したオオムギおよび二倍性コムギにおける第4, 第5同祖群の構造推定. 日本育種学会第

- 106 回講演会. 三重大学農学部. 2004 年 9 月 21 日
 南角奈美^{1,2}・元井由加^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST) オオムギの異なるマップ両親における EST マーカー多型の比較. 日本育種学会第 106 回講演会. 三重大学農学部. 2004 年 9 月 21 日
- 堀 清純・南角奈美・畑 徹・佐藤和広・武田和義 (岡大資生研) 異なる系統に由来するオオムギ赤かび病抵抗性 QTL. 日本育種学会第 106 回講演会. 三重大学農学部. 2004 年 9 月 21 日
- 栗山貴也¹・山本 傑¹・天野里子¹・櫻井幸恵¹・水元若菜¹・一井眞比古¹・最相大輔^{2,3}・佐藤和広^{2,3}・武田和義^{2,3}・川崎信二^{3,4}・武田 真^{1,3} (1.香川大農, 2.岡大資生研, 3.CREST, 4.生物研) オオムギ 7H 染色体裸性遺伝子座領域のイネとのシンテニー. 日本育種学会第 106 回講演会. 三重大学農学部. 2004 年 9 月 21 日
- 杉本 学, 佐藤和広, 武田和義. オオムギの網羅的タンパク質マップ構築の試み. 日本育種学会第 106 回講演会. 三重大学生物資源学部, 9 月 22 日, 2004.
- Suzuki, H., Sasanuma, T., Sato, K. and Takeda, K. : Expression analysis using cDNA microarray in seedling shoots of malting barley and its dwarf mutants. IPGSA Meeting 2004, Canberra, Australia, 20-24 September 2004. (ポスター)
- Sato, K., Suzuki, H. and Takeda, K. : Comparison of expression profiles between GeneChip® and cDNA microarray in seedling shoots of malting barley and its dwarf mutants. IPGSA Meeting 2004, Canberra, Australia, 20-24 September 2004. (ポスター)
- 柴坂三根夫, 藤井俊行, 笠毛邦弘, 且原真木 (岡山大資生研) グルタチオン包含体の液胞膜透過機構に関する ABC トランスポーター遺伝子 第 68 回日本植物学会 (神奈川県) 2004 年 9 月 10 日-12 日
- 且原真木, 西村秀希, 柴坂三根夫 (岡山大資生研) オオムギ根のアクアポリンと水輸送, および塩ストレスとの関係 第 68 回日本植物学会 (神奈川県) 2004 年 9 月 10 日-12 日
- 小松田隆夫・Senthil Natesan (生物研) オオムギにおける新しい小穂非脱落性遺伝子について 第 106 回日本育種学会講演会要旨集: *Breeding Research*, 2004 年 9 月 21-22 日 (育種学研究 6 巻別 2 p.344)
- 半田裕一, Mohammad Sameri, 張 孟基, 柴田未知恵, 並木信和, 金森裕之, 小松田隆夫 (1. 生物研, 2. 国立台湾大学, 3. STAFF 研) 比較ゲノム手法を用いたオオムギ稔性回復遺伝子 *Rfm1* のマッピング 日本育種学会第 106 回講演会要旨集 2004 年 9 月 21-22 日 (育種学研究 6 巻別 2 p.89)
- 且原真木, 西村秀希, 柴坂三根夫 (岡山大資生研) オオムギ根の水輸送とアクアポリンファミリー 第 21 回根研究集会 (東京) 2004 年 10 月 16 日
- 紙本宣久, 柴坂三根夫, 且原真木 (岡山大資生研) オオムギにおけるストレス応答性遺伝子 MAPK および CAX の単離と機能解析 第 21 回根研究集会 (東京) 2004 年 10 月 16 日
- 且原真木 (岡山大資生研) 植物のアクアポリンの働き, 第 19 回「大学と科学」公開シンポジウム みずみずしい体のしくみ: 水の通り道“アクアポリン”の働きと病気 (東京) 2004 年 10 月 20 日-21 日
- Kakeda, K., Kowyama, Y. (Fac. Biores., Mie U.) Diversity of the self-incompatibility systems in plants. 4 th Int. Symp. on the Molecular and Cell Biology of Egg- and Embryo-Coats. Shima, Japan. 2004 年 11 月 11 日
- 武田 真・菊池慎一・栗山貴也・山本 傑・一井眞比古・川崎信二 栽培オオムギにおける裸性の起源. 育種学研究 6 巻(別 1)191. (2004)
- 栗山貴也・山本傑・天野里子・櫻井幸恵・水元若菜・一井眞比古・最相大輔・佐藤和広・武田和義・川崎信二・武田 真 オオムギ 7H 染色体裸性遺伝子座領域のイネとのシンテニー. 育種学研究 6 巻(別 2) 53. (2004)
- 武田 真・櫻井幸恵・天野里子・Asif Javaid・一井眞比古 オオムギ 7H 染色体に座乗する密穂および短芒遺伝子のマッピング. 育種学研究 6(別 2) 54. (2004)

- Taketa, S., Kikuchi, S., Awayama, T., Yamamoto, S., Ichii, M. and Kawasaki, S. High-resolution mapping of the naked-caryopsis gene (*nud*) and the origin of naked barley. Proceedings of the 9th International Genetics Symposium. Edited by Ing. J. Spunar and J. Janokova. pp. 589-594 (2004) (ポスター)
- Ma, J. F. : Molecular mechanism of Al resistance in higher plants. Proceedings of the 6th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, p. 44. 仙台 (2004)
- Nagao, S., Ma, J. F., Sato, K., Takada, K. : Mapping of genes for Al resistance and citrate secretion in barley. Proceedings of the 6th International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH, p. 206. 仙台 (2004) (ポスター)
- Sugimoto, M., Sugimoto, M., Sato, K. and Takeda, K. Primary approach for establishing a global proteome map of germinating shoot in malting barley. Plant, Animal & Microbe Genomes XIII, San Diego, CA, U.S.A. 2005年1月15日 (ポスター)
- Nanakaku, N., Motoi, Y., Ueki, H., Sato, K. and Takeda, K. High density SNP based EST map in barley. Plant, Animal & Microbe Genomes XIII, San Diego, CA, U.S.A. 2005年1月15日 (ポスター)
- Sato, K., Takehara, S., Nankaku, N., Hori, K., Sasakuma, T. and Takeda, K. Mapping barley ESTs onto a diploid wheat mapping population. Plant, Animal & Microbe Genomes XIII, San Diego, CA, U.S.A. 2005年1月15日 (ポスター)
- 藤谷典志, 岡田吉弘, 伊藤一敏, 武田和義, 今野晴義, 杉本 学. 塩ストレス抵抗性オオムギで発現するACC酸化酵素遺伝子のクローニング. 日本農芸化学会中四国支部第11回講演会. 岡山, 1月22日, 2005.
- 杉本 恵・佐藤和広・武田和義・斎藤彰・白子幸男. オオムギ組換え自殖集団におけるムギ類萎縮ウイルス抵抗性の評価とQTL解析. 日本植物病理学会講演会. 静岡, 2005年3月29日
- 且原真木・柴坂三根夫(岡大資生研)・半場祐子(京都工芸繊維大)、アクアポリンの多様性と多面性:耐塩性や光合成との関係、(シンポジウム:アクアポリンの多様性:構造、機能、局在)、日本植物生理学会2005年度年会、新潟大学、2005年3月24日-26日
- Kuroda, H., Kojima, H., Kaneda, H. and Takashio, M. (サッポロビール株式会社、価値創造フロンティア研究所) Fatty acid hydroperoxide lyase as a key enzyme for the production of trans-2-nonenal during mashing. European Brewing Congress 2005, チェコ、プラハ、2005年5月14-19日 (ポスター)
- Sato, K., Tsujimoto, H. and Bothmer, R. von. Introduction of genetic diversity into cereals from their wild relatives. Proc. 5th Int. Triticeae Symp. Prague. Czech republic. 2005. 6.5
- Komatsuda, T., Turuspekov, Y., Honda, I., Makino, T., Watanabe, Y., Kawada, N., Mano, Y. (2005) Cleistogamy of barley - gene identification, mapping and diversity. In Proceeding of the 8th Gatersleben Research Conference "Genetic Diversity & Genome Dynamics in Plants", 3-6 June, 2005, Chateau Meisdorf/IPK Gatersleben, Germany, p. 110 (ポスター)
- Perumal, A., Dhanasekaran, V. S., Komatsuda, T. Conversion of AFLP markers linked to the non-brittle rachis locus *btr1/btr2* into STS markers for high-resolution linkage mapping and phylogenetic study using *btr1*-linked markers in barley. In Proceeding of the 8th Gatersleben Research Conference "Genetic Diversity & Genome Dynamics in Plants", 3-6 June, 2005, Chateau Meisdorf/IPK Gatersleben, Germany, p. 93. (ポスター)
- Komatsuda, T., Mano, Y., Turuspekov, Y., Honda, I., Kawada, N., Watanabe, Y. Inheritance and genetic diversity of flowering types in barley. In Proceeding of the 5th International Triticeae Symposium, June 6-10, 2005, Prague, Czech Republic, p. 50 (ポスター)
- Komatsuda, T., Perumal, P., Dhanasekaran, V. S. (2005) Are North African barleys of type Eastern or Western? In Proceeding of the 5th International Triticeae Symposium, June 6-10, 2005, Prague, Czech Republic, p. 22 (ポスター)
- Kamimoto, Y., Shibasaka, M., Katsuhara, M. Functional and molecular analysis of the barley Ca^{2+}/H^{+} antiporter. Plant Biology 2005 Seattle, U.S.A. 2005年7月16日-20日 (ポスター)
- Panda, S. K., Katsuhara, M. Transcriptional regulation of plasma membrane intrinsic protein (PIP)

- aquaporins in barley (*Hordeum vulgare*, Haruna-nijo) by heavy metals. 10th International Congress SABRAO, Tsukuba, Japan 2005 年 8 月 22 日-23 日 (ポスター)
- 佐藤和広¹・南角奈美^{1,2}・元井由加^{1,2}・植木英雄^{1,2}・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST)
オオムギ高密度転写産物地図の開発とイネゲノム配列との比較. 日本育種学会、筑波大学、2005.8.21
- 佐藤和広 (岡山大学資源生物科学研究所) 南・東アジアにおけるムギ類多様性へのアプローチ. 日本育種学会、筑波大学、2005.8.21
- 最相大輔・張文勝・石井誠・佐藤和広・武田和義 (岡大資生研) オオムギ遺伝資源からのβ-アミラーゼ新規アレルの探索. 日本育種学会、筑波大学、2005.8.21
- 南角奈美^{1,2}・植木英雄^{1,2}・元井由加^{1,2}・佐藤和広¹・武田和義¹ (1.岡大資生研, 2.CREST)
オオムギ高密度転写産物地図の構築. 日本育種学会、筑波大学、2005.8.21
- 畑 徹・堀清純・佐藤和広・武田和義 (岡大資生研) オオムギ組換え置換系統群の高解像度ジェノタイピング. 日本育種学会、筑波大学、2005.8.21
- 堀清純・佐藤和広・武田和義 (岡大資生研) オオムギ休眠性 QTL の単離に向けた強連鎖マーカーの検出. 日本育種学会、筑波大学、2005.8.21
- 掛田克行・木浦正和 (三重大生物資源) オオムギ野生種の S 遺伝子座に密接連鎖した F-Box 遺伝子の解析. 日本育種学会、筑波大学、2005 年 8 月 21 日.
- 高橋秀和 (秋田県大生物資源)・赤木宏守 (秋田県大生物資源)・森宏一 (秋田県大生物資源)・武田和義 (岡大資生研)・佐藤和広 (岡大資生研)、MITE-AFLP 法によるオオムギのゲノムマッピング、日本育種学会、筑波大学、2005.8.21
- 武田 真・安藤裕崇・一井眞比古・武田和義・Bothmer, R. von. (2004) アメリカ産オオムギ属野生種の倍数性進化に関する分子細胞遺伝学的解析. 育種学研究 7 (別 1・2) 310. 日本育種学会、筑波大学、2005 年 8 月 21 日.
- 藤谷典志・寺田理枝・前川雅彦・岡田吉弘・伊藤一敏・飯田 滋・武田和義・今野晴義・杉本 学. 塩ストレス抵抗性オオムギに関する研究 3. 恒常的に高発現する ACC 酸化酵素遺伝子の機能. 日本育種学会第 107・108 回講演会、2005 年 8 月 20-21 日、筑波 (ポスター)
- 杉本 学・杉本 恵・佐藤和広・武田和義. 塩抵抗性オオムギ根で特異的に発現しているタンパク質のプロテオーム解析. 日本育種学会第 107・108 回講演会、2005 年 8 月 20-21 日、筑波 (ポスター)
- 佐藤和広、武田和義 (岡山大資生研) オオムギのゲノム研究と種子関連形質の遺伝解析. 日本植物学会. 富山、2005 年 9 月 22 日
- Panda, S. K., Katsuhara, M. Osmotic stress regulates differentially aquaporin genes expression in salt tolerant and salt sensitive barley (*Hordeum vulgare*). 4th Plant Genomic European Meetings, Amsterdam, Hooland, 2005 年 9 月 20 日-23 日 (ポスター)
- 且原真木・紙本宣久 (岡大資生研)、オオムギの液胞膜型 Cation/H⁺ exchanger (CAX)、第 8 回植物生体膜シンポジウム、富山大学、2005 年 9 月 23 日
- 紙本 宣久・且原 真木 (岡大資生研)、オオムギの CDPK 遺伝子および液胞膜型 CAX 遺伝子の同定と機能解析、第 69 回日本植物学会、富山大学、2005 年 9 月 21 日-23 日
- Ma, J. F. Diversity of Al toxicity and resistance mechanisms. XV International Plant Nutrition Colloquium, Beijing, China, Sept. 14-19, 2005.
- 且原真木 水チャンネル・MIP 遺伝子ファミリーの多様な機能 第 1 回ムギ類研究会 (京都府立農業試験場)、2005 年 11 月 12 日
- 武田真 コムギーオオムギ雑種の細胞遺伝学的解析. 第 1 回ムギ類研究会. 京都府農業資源研究センターおよび京都府立大学附属農場. 2005 年 11 月 12 日.
- Kuroda, H., Kaneda, H. and Watari, J. (サッポロビール株式会社、価値創造フロンティア研究所) Oxylinin cascade enzymes and beer quality – impact of cereal LOX and cytochrome P450 enzymes on food quality., The First Asian Symposium on Plant Lipids., 東京、駒場、2005 年 11 月 25-27 日

- 杉本 学. ストレス応答遺伝子の解析 -塩ストレス抵抗性植物作出に向けて-. 2005 年度岡山大学重点プロジェクト「植物医科学」第2回シンポジウム, 岡山, 2005 年 11 月 3 日
- 杉本 学・杉本 恵・佐藤和広・武田和義. オオムギの網羅的タンパク質マップ構築のためのプロテオーム解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, 2005 年 12 月 7-10 日, 博多 (ポスター)
- Hori, K., Takehara, S., Nankaku, N., Sato, K., Sasakuma, T., Takeda, K. Comparison of linkage maps based on barley ESTs between diploid wheat and barley. Proc. SABRAO, August, 2005 (ポスター)

(3)特許出願

①国内出願 (58 件)

1. アルミニウム耐性因子に連鎖する DNA マーカー, 及びその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2001.3.29, 特願 2001-97221
2. 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法, 佐藤和広・武田和義・小原雄治, 岡山大学, 2001.12.20, 特願 2001-387059
3. 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法, 佐藤和広・武田和義・小原雄治, 岡山大学, 2001.12.20, 特願 2001-387131
4. 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法, 佐藤和広・武田和義・小原雄治, 岡山大学, 2001.12.20, 特願 2001-403299
5. 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法, 佐藤和広・武田和義・小原雄治, 岡山大学, 2001.12.20, 特願 2001-403300
6. オオムギ染色体由来の核酸マーカーを, コムギの背景で検出するための新規なプライマーセット, およびその利用, 武田 真・武田和義, 科学技術振興事業団, 2001 年 10 月 4 日, 特願 2001-309184
7. 水チャンネル遺伝子, 及びその利用, 且原真木, 武田和義, 科学技術振興事業団, 2001 年 11 月 16 日. 特願 2001-352367
8. 水チャンネル遺伝子, 及びその利用, 且原真木, 武田和義, 科学技術振興事業団, 2001 年 11 月 16 日. 特願 2001-352372
9. 塩ストレスによって誘導される核酸およびタンパク質, 杉本 学, 武田和義, 伊藤一敏, サッポロビール株式会社, 2002 年 1 月 29 日, 特願 2002-020367
10. 植物の遺伝子に生じた特徴的な塩基配列及びそれを利用する方法, 佐藤和広・武田和義・小原雄治, 岡山大学, 2002.9.27, 特願 2002-327515
11. 深播耐性等に関与する遺伝子等についての新規遺伝マーカーおよびその利用法, 佐藤和広・武田和義・高橋秀和, 科学技術振興機構, 2003.3.31, 特願 2003-95547
12. 新規遺伝マーカーおよびその利用法, 佐藤和広・武田和義・高橋秀和, 科学技術振興機構, 2003.3.31, 特願 2003-95696
13. 麦類植物の受粉性の識別方法とその利用による麦類植物の改良方法, 小松田隆夫, 間野吉郎, 本多一郎, ヤーラン トゥルスペコフ, 渡邊好昭, 農業生物資源研究所, 2002 年 12 月 3 日出願, 特願 2002-350839
14. 支持体上に固定化した物質を染色体の順あるいは配列位置情報を付加して配列するアレイおよびその製造方法, 並びにその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2003.5.1, 特願 2003-126667
15. A1 耐性オオムギの判別方法, A1 耐性に関与する遺伝子, およびその利用, 馬建鋒・佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2003.5.20, 特願 2003-142514
16. アルミニウム耐性オオムギの判別方法, 馬建鋒・佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2003.8.18, 特願 2003-207726
17. 新規網羅的発現プロファイル解析方法およびシステム, 矢野健太郎・佐藤和広・武田

- 和義, 科学技術振興機構, 2003.8.29, 特願 2003-307587
18. 赤カビ病抵抗性品種因子に連鎖する DNA マーカーおよびその利用, 武田和義・佐藤和広, 科学技術振興機構, 2004.1.22, 特願 2004-014839
 19. 稈長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040639
 20. 小穂段数に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040642
 21. 護穎長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040644
 22. 出穂期に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-038915
 23. 穂長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040653
 24. 穂軸節間長に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040654
 25. 休眠性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040655
 26. 千粒重に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040658
 27. 穂のロウ質を支配する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040660
 28. 穎色に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-038955
 29. 糊粉層色に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040661
 30. 小穂脱落性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040662
 31. 開閉花性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-040663
 32. 縞萎縮病抵抗性に関与する遺伝子座に連鎖する遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.2.17, 特願 2004-090644
 33. ビール大麦の育種に利用可能な遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義・岡田吉弘・蛸井潔・伊藤一敏, 科学技術振興機構, 2004.3.29, 特願 2004-097179
 34. オオムギ 1 H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.31, 特願 2004-101618
 35. オオムギ 2 H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.31, 特願 2004-101626
 36. オオムギ 3 H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.31, 特願 2004-101641
 37. オオムギ 4 H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.31, 特願 2004-101646
 38. オオムギ 5 H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.31, 特願 2004-101662
 39. オオムギ 6 H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.31, 特願 2004-101675
 40. オオムギ 7 H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.31, 特願 2004-101682
 41. 遺伝子型解析表示システムおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.26, 特願 2004-093824

42. 遺伝子相互作用解析システムおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.26, 特願 2004-093826
43. 量的遺伝子座解析システムおよびその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.3.26, 特願 2004-093825
44. 皮裸性遺伝子に連鎖する遺伝マーカー, 及びその利用. 武田和義・武田 真・川崎信二, 科学技術振興機構・農業生物資源研究所. 2003年7月10日, 特願 2003-195069
45. 皮裸性遺伝子に連鎖する遺伝マーカー, 及びその利用. 武田和義・武田 真・川崎信, 科学技術振興機構・農業生物資源研究所. 2003年12月17日(国内優先権出願主張), 特願 2003-419643
46. 小穂非脱落性遺伝子等についての新規遺伝子マーカーおよびその利用法. 武田 和義, 小松田 隆夫, ナテサン センシル, ペーター マキシム, 間野 吉郎, ダナセカラン ビデア サラスワテ, ペルマル アザグエル, 科学技術振興機構・農業生物資源研究所. 2003年4月23日, 特願 2003-119023
47. 赤カビ病抵抗性品種因子に連鎖する DNA マーカーおよびその利用 (国内優先権主張), 武田和義・佐藤和広, 科学技術振興機構, 2004.9.16, 特願 2004-270268
48. 縞萎縮病抵抗性品種因子に連鎖する DNA マーカーおよびその利用 (国内優先権主張), 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-342737
49. オオムギ 1H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-341944
50. オオムギ 2H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-342018
51. オオムギ 3H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-342097
52. オオムギ 4H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-342261
53. オオムギ 5H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-342406
54. オオムギ 6H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-342458
55. オオムギ 7H 染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.11.26, 特願 2004-342598
56. オオムギ EST 配列を利用して作製された二倍体コムギ遺伝地図を用いるコムギ育種方法, 佐藤和広・武田和義, 2005.8.18, 特願 2005-238021
57. 麦芽飲料老化臭原因遺伝子及びその利用, 黒田久夫・武田和義・佐藤和広 2005.8.31. 特願 2005-252329
58. コムギに導入されたコムギ近縁野生種由来の外来染色体を検出する方法, 佐藤和広・武田和義, 2005.9.20, 特願 2005-238021

②海外出願 (7 件)

1. 支持体上に固定化した物質を染色体の順あるいは配列位置情報を付加して配列するアレイおよびその製造方法, 並びにその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2004.4.30, PCT/JP2004/006284
2. 遺伝子に生じた一塩基多型(SNP), およびその利用, 佐藤和広・武田和義・小原雄治, 岡山大学, 2004.6.20, PCT/IB02/05403 (各国出願, 米国, 英国, ドイツ, フランス)
3. オオムギ染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2005.3.31, PCT/JP2005/006825
4. 赤カビ病抵抗性品種因子に連鎖する DNA マーカーおよびその利用, 武田和義・佐藤和広, 科学技術振興機構, 2005.3.31, PCT/JP2005/000790 (WO 2005/071076)
5. 縞萎縮病抵抗性品種因子に連鎖する DNA マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和

義, 科学技術振興機構, 2005.3.31, PCT/JP2005/005285

6. ビール大麦の育種に利用可能な遺伝マーカーおよびその利用, 佐藤和広・武田和義・岡田吉弘・蛸井潔・伊藤一敏, 科学技術振興機構, 2005.3.31, PCT 全指定
7. 支持体上に固定化した物質を染色体の順あるいは配列位置情報を付加して配列するアレイおよびその製造方法, 並びにその利用, 佐藤和広・武田和義, 科学技術振興機構, 2005.5.2, PCT/JP2004/006284 (WO2004/097015) 指定国移行 (米国, カナダ, EP (英, 独, 仏, 蘭, スイス, スウェーデン), オーストラリア, ロシア, 中国, ブラジル, インド, 南アフリカ, 自己指定)

その他0件

(4)受賞等

①受賞

- 武田真. コムギとオオムギの属間交雑およびオオムギ属の系統分化に関する細胞遺伝学的研究. 平成14年度日本育種学会奨励賞, 2003年4月
- 武田和義. 「作物遺伝資源の開発・評価・利用の研究, 特に不良環境耐性麦類の画期的育種の実践」日本農学賞および読売農学賞, 2004年4月
- Saisho, D., K. Tanno, M. Chono, I. Honda, H. Kitano and Takeda K., Spontaneous brassinolide-insensitive barley mutant 'uzu' adapted to East Asia. *Breed. Sci.* 54: 409-416. (2004) 平成16年度日本育種学会論文賞
- Tomita, R. N., Suzuki, G., Yoshida, K., Yano, Y., Tsuchiya, T., Kakeda, K., Mukai, Y. and Kowyama., Y. Molecular characterization of a 313-kb genomic region containing the self-incompatibility locus of *Ipomoea trifida*, a diploid relative of sweet potato. *Breed. Sci.* 54: 165-175 (2004) 平成16年度日本育種学会論文賞
- Hanba, Y.T., Shibasaka, M., Hayashi, Y., Hayakawa, T., Kasamo, K., Terashima, I. and Katsuhara, M. Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiology* 45: 521-529 (2004) 2006年度日本植物生理学会論文賞
- 杉本 学. 資源生物で発現する機能性物質の探索と機能開発. 2004年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞. 2004年9月

②新聞報道

- オオムギ3品種間に遺伝子の違い1000カ所 毎日新聞 2001年1月30日
- 一塩基多型オオムギで1000種発見 日経産業新聞 2001年1月30日
- オオムギのSNPを大量発見 日本工業新聞 2001年1月30日
- オオムギ遺伝子塩基の違い発見 日本農業新聞 2001年1月30日
- オオムギのスニップ野生種などで約1千個 日刊工業新聞 2001年1月30日
- オオムギ遺伝子のSNPを大量検出 化学工業日報 2001年1月30日
- ビールの味が落ちないオオムギ 朝日新聞 2003年4月2日
- ビールの鮮度長持ち 日刊工業新聞 2003年8月20日
- 特許取得の動き加速 山陽新聞 2004年1月12日

③その他

(雑誌)

- 佐藤和広. 岡山大学がオオムギのSNP分析を加速 日経バイオビジネス 2001年3月
- 佐藤和広. オオムギ遺伝子に存在する一塩基多型を約4,000個発見. *ブレインテクノニユース No.92*, 生物系特定産業技術研究推進機構. 2002年7月
- サッポロビール株式会社. サッポロ, オオムギ・ゲノムの共同研究プロジェクトに参画, 品質改良などへ. *日経バイオオンライン* 2002年5月22日
- 佐藤和広. ゲノム時代で変わる穀物育種 *日経バイオビジネス* 2004年11月

黒田久夫 オオムギの脂質酸化酵素がビールの品質を下げる！？ 生物工学会誌 2005 年 1 月

(データベース)

佐藤和広. International barley EST database HarvEST. <http://harvest.ucr.edu/> (2002)

山崎由紀子・佐藤和広. Barley EST clone search database. <http://shigen.lab.nig.ac.jp/barley/> (2002)

山崎由紀子・佐藤和広. Barley EST homology search database. <http://shigen.lab.nig.ac.jp/barley/> (2002)

山崎由紀子・佐藤和広. Barley gene database on the public DNA database. <http://shigen.lab.nig.ac.jp/barley> (2002)

山崎由紀子・佐藤和広. オオムギ EST — イネゲノムマップ <http://shigen.lab.nig.ac.jp/barley/> (2004)

(5) その他特記事項

a) ベンチャー起業

岡山大麦ゲノムテクノロジー株式会社

<https://service.dynacom.jp/bgorder/about.html>

2005 年 4 月 1 日付け

会長： 武田和義（岡山大学資源生物科学研究所教授）

代表取締役： 佐藤和広（岡山大学資源生物科学研究所助教授）

取締役： 原 謙三（原謙三国際特許事務所所長，弁理士）

監査役： 安田昭三（岡山大学名誉教授）

b) 特許実施許諾（手続き中）

（製品名）

オオムギ EST シンプルマーカーセット ver. 1.3 (96 マーカー分)

オオムギ EST コアマーカーセット ver. 1.3 (384 マーカー分)

（使用特許）

PCT/IB02/05403（各国出願，米国，英国，ドイツ，フランス），佐藤和広・武田和義・小原雄治，遺伝子に生じた一塩基多型(SNP)，およびその利用，岡山大学，2004.6.20

PCT/JP2005/006825，佐藤和広・武田和義 オオムギ染色体にマップされるポリヌクレオチドを利用した検出器具，科学技術振興機構，2005.3.31

（発売元）

岡山大麦ゲノムテクノロジー株式会社

6 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 12 年 12 月 12-13 日	チーム内打ち合わせ	岡山大学資源生物科学研究所	1 1 名	研究計画打ち合わせおよび研究分担者事務打ち合わせ
2001 年 5 月 9-10 日	チーム内打ち合わせ	岡山大学資源生物科学研究所	1 3 名	平成 1 3 年度研究計画打ち合わせ

平成14年 5月13-14日	チーム内打ち合わせ	岡山大学資源生物科学研究所	15名	研究計画経過報告および平成14年度研究計画打ち合わせ
平成15年 5月15-16日	チーム内打ち合わせ	岡山大学資源生物科学研究所	18名	研究計画経過報告および平成15年度研究計画打ち合わせ
平成15年10月22日	CRESTシンポジウム「オオムギゲノム機能の解析と制御」	日本科学未来館	121名	研究チームの研究内容の講演(武田和義, 佐藤和広, 山崎由紀子, 馬建鋒)およびポスター(その他メンバー), さらに世界のオオムギゲノム研究の中心グループの研究代表者(Andreas Graner: ドイツ, Pat Hayes: 米国, Alan Shulman: ノルディック諸国)の講演によって, CRESTによるオオムギゲノム研究の国際的な水準を評価すると共に, 他の生物種のゲノム研究との比較を交えて, 世界のオオムギゲノム研究の現状と将来展望を概括した。
平成16年 10月26日	東京・コクヨホール	東京・コクヨホール	10名	領域シンポジウム参加・チーム内打合せ
平成17年 10月18-19日	チーム内打ち合わせ	岡山大学資源生物科学研究所	12名	研究経過報告

(2)招聘した研究者等

氏名(所属, 役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Patrick M. Hayes オレゴン州立大学 教授	研究課題シンポジウム打ち合わせ, 出席および講演のため(東京) オオムギゲノム研究国際協力に関する研究打ち合わせのため(倉敷)	日本科学未来館(青海)岡山大学資源生物科学研究所(倉敷)	平成15年10月19日～平成15年10月25日
Alan H. Schulman フィンランドヘルシンキ大学 教授	同上	同上	同上
Andreas Graner ドイツハレ大学 教授	同上	同上	同上

7 結び

本研究課題を CREST に提案した時点で公開されていたオオムギの EST は世界で 80 にすぎず、オオムギのゲノム研究はスターラインに着いたところであった。今や公開された EST は約 42 万、そのうち約 4 分の 1 は本プロジェクトによって解析されたものであり、正にタイムリーな出発であったと言える。オオムギは我国ではマイナークロップであるが、先行するイネやシロイヌナズナの情報を活用しつつ、ムギ類全体にフィードバックするうえでもモデル作物として重要な地位を占めている。前述の多数の EST の他に BAC ライブラリー 30 万クローン、3,000 個の EST (想定されるオオムギの遺伝子の約 10%) による高密度マップ、GeneChip システムなどゲノム解析のリソース開発には十分な成果が得られたと考えている。また、論文や学会発表だけでなく、多数の特許を出願したことも本プロジェクトの特徴であり、関連してベンチャービジネス「岡山大麦ゲノムテクノロジー(株)」が設立されたことも特筆されよう。

我国におけるオオムギの研究ソサエティーは小さいが、本プロジェクトにはそのほとんど全員が参加して、オールジャパンの研究体制を組織し、特に、知的所有権などに関連して微妙な立場にある民間(サッポロビール)の研究所がプロジェクトに参加したことは大きな意義があると考えている。

このようにプロジェクトの開始時には予想しなかったような大きな進展を見ることができ、「オオムギゲノム育種」が実現味を帯びて来たと言えよう。

今後の研究の展開については岡山大学を中心として一応のビジョンは持っているが、相当額の研究費を必要とするプロジェクトなのでその確保が当面の大きな課題である。

前述のように、我国のオオムギ研究ソサエティーは小さく、今回のプロジェクトはオールジャパンの体制でスムーズに進めることができた。イネやコムギの研究者とのコミュニケーションも十分に取ることができ、今後の研究の展開も期待できるが、研究を遂行する中で、バイオインフォマティクス分野の人材が不足であることを痛感した。

今回の CREST による研究費はかなり高額でまた、ある程度弾力的に運用することもでき、大型研究をサポートするシステムとして有効と考えるが、敢えて要望を述べさせていただければ、中間評価を厳しく、そのかわりに発展の期待される課題の延長を増やしていただければ、本プロジェクトのように、論文を書いて終わりではなく、育種の新システムの提案、さらには中間母本や研究用のリソース(遺伝資源)の作出にまで及ぶような場合には有難いと思います。



岡山大学資源生物科学研究所のオオムギ研究グループ(平成16年3月)

