

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年9月2日(02.09.2010)

PCT

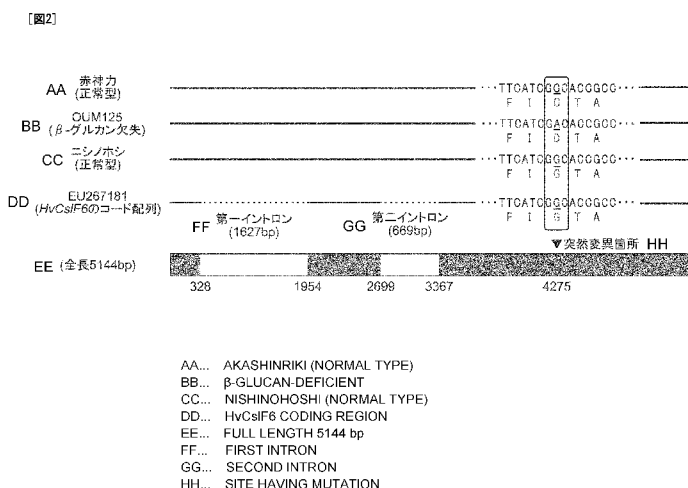
(10) 国際公開番号
WO 2010/098378 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12G 3/12* (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
A23K 1/14 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12C 11/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/052939
- (22) 国際出願日: 2010年2月25日(25.02.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-045393 2009年2月27日(27.02.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 (Incorporated Administrative Agency National Agriculture and Food Research Organization) [JP/JP]; 〒3058517 茨城県つくば市観音台3-1-1 Ibaraki (JP). 国立大学法人岡山大学 (National University Corporation Okayama University) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 塔野岡 卓司 (TONOOKA Takuji) [JP/JP]; 〒3058518 茨城県つくば市観音台2-1-18 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所内 Ibaraki (JP). 吉岡 藤治 (YOSHIOKA Toji) [JP/JP]; 〒3058518 茨城県つくば市観音台2-1-18 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所内 Ibaraki (JP). 青木 恵美子 (AOKI Emiko) [JP/JP]; 〒3058518 茨城県つくば市観音台2-1-18 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究所内 Ibaraki (JP). 武田 真 (TAKETA Shin) [JP/JP]; 〒7100046 岡山県倉敷市中央2-20-1 国立大学法人 岡山大学 資源生物科学研究所内 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外 (HASEGAWA Yoshiaki et al.); 〒1040061 東京都中央区銀座一丁目10番6号銀座ファーストビル 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

[続葉有]

(54) Title: B-GLUCAN-DEFICIENT GENE IN BARLEY, SYNTHETIC GENE, AND USE OF SAME

(54) 発明の名称: オオムギのβ-グルカン欠失遺伝子、合成遺伝子及びその利用



(57) Abstract: Disclosed are: a β-glucan-deficient gene in a barley; genomic DNA and cDNA of a β-glucan synthesis gene; a barley having genomic DNA for a β-glucan-deficient gene; a method for breeding the barley; an alcohol or fermented food production method, which utilizes grains of a β-glucan-reduced or -deficient barley; and an animal feed composition. Specifically disclosed are: genomic DNA for a β-glucan-deficient gene, which is DNA comprising a nucleotide sequence having a 90% or higher homology with the nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:1 and capable of being transcribed and translated into a protein lacking a β-glucan synthesis activity; and a breeding method comprising steps of determining a barley as having a β-glucan-deficient gene when a nucleotide corresponding to the 4275th nucleotide or the 2385th nucleotide in a gene comprising the nucleotide sequence depicted in SEQ ID NO:4 that is located adjacent to a centromere of chromosome-7H in the barley is mutated from G to A, and selecting the barley.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2010/098378 A1



GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

オオムギの β -グルカン欠失遺伝子及び β -グルカン合成遺伝子のゲノム DNA 及び cDNA、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノム DNA を有するオオムギ及びその育種方法、 β -グルカンを減少又は欠失したオオムギの穀粒を利用したアルコール又は発酵食品の製造方法並びに動物用飼料組成物を提供する。配列番号 1 に記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成される DNA である、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノム DNA、及び、オオムギの 7H 染色体の動原体付近に座乗する配列番号 4 に記載の塩基配列からなる遺伝子の第 4275 番目に対応する塩基、又は第 2385 番目に対応する塩基が、G から A に変異していた場合に、そのオオムギは β -グルカン欠失遺伝子を有すると判別して選択するステップを含む育種方法。

明 細 書

発明の名称：

オオムギの β -グルカン欠失遺伝子、合成遺伝子及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、オオムギ穀粒の(1-3, 1-4)- β -D-グルカン(以下、 β -グルカンという。)を欠失する遺伝子(以下、 β -グルカン欠失遺伝子という。)、 β -グルカン合成遺伝子及びその利用に関する。具体的には、オオムギの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA及びcDNA、オオムギの β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA及びcDNA、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギ及びその育種方法、 β -グルカン合成遺伝子の発現を抑制することによってオオムギ穀粒の β -グルカンを減少又は欠失させる方法及びこの方法によって得ることのできる、穀粒中の β -グルカンを減少又は欠失したオオムギ、 β -グルカンを減少又は欠失したオオムギの穀粒を発酵させるステップを含むアルコール又は発酵食品の製造方法、並びにこのオオムギ穀粒を含む動物用飼料組成物に関する。ここで、 β -グルカン合成遺伝子とは、 β -グルカンの合成経路に関与して、 β -グルカンの合成を促進する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。

背景技術

- [0002] コムギやイネなどの穀物と異なり、オオムギ穀粒には、多糖類の一種である β -グルカンが豊富に含まれている。 β -グルカンは胚乳細胞壁を構成する主要成分である。 β -グルカンが多いと、ビールや焼酎の醸造においてデンプンの糖化や発酵の効率を低下させ、ブタや家禽の飼料に用いる場合には消化吸収が劣り飼養効果が低い等の負の作用があることが分かっている。そのため、これらの用途に用いられるオオムギにおいては β -グルカンの低含有化が求められており、 β -グルカンを欠失する遺伝子は有用である。
- [0003] 一方で、 β -グルカンには血糖値上昇抑制や血中コレステロールの低減などの生理機能があり、生活習慣病の予防と改善に効果があることが明らかに

されている。近年では免疫機能の増進にも効果があることが報告されている（非特許文献1）。そのため、オオムギを食用として用いる場合には、 β -グルカン含量が高いほうが利用価値が高い。

先行技術文献

非特許文献

- [0004] 非特許文献1: Brennan, C. S. and L. J. Cleary (2005) J. Cereal Sci. 42: 1-13.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 育種における β -グルカン含量の遺伝的制御のためには、 β -グルカンの合成や制御に関わる遺伝子の解明が不可欠である。 β -グルカンは世界的に注目を集めている高機能性多糖であると同時に植物の細胞壁を構成する多糖として重要な成分であるにもかかわらず、 β -グルカン合成に関わる遺伝子は未だ解明されていない。この遺伝子の解明は世界的に熾烈な競争となっている。
- [0006] 本発明は、オオムギの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA及びcDNAを提供することを目的とする。本発明はまた、オオムギの β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA及びcDNAを提供することを目的とする。本発明は更に、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギ及びその育種方法、このオオムギの穀粒を発酵させるステップを含むアルコールの製造方法、並びにこのオオムギ穀粒を含む動物用飼料組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 1つの態様において、本発明は、配列番号1に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成されるDNAである、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを提供する。

- [0008] 別の態様において、本発明は、配列番号 18 に記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成される DNA である、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノム DNA を提供する。
- [0009] このような β -グルカン欠失遺伝子ゲノム DNA は、穀粒中の糊粉層及び胚乳の細胞壁において β -グルカンが完全に欠失し、胚乳細胞壁が顕著に薄い、オオムギの作出に利用可能である。 β -グルカンが欠失したオオムギ穀粒を原料に用いることによって、ビールや焼酎の製造におけるデンプンの糖化や発酵の効率を向上させることができる。また、 β -グルカンが欠失したオオムギ穀粒を含む、ブタや家禽などの動物用飼料組成物は、消化吸収が良く、飼養効果が高い。また、 β -グルカンを欠失するオオムギは、機能性多糖として重要なアラビノキシランをやや多く含むため、アラビノキシランに特化した機能性食品の開発に利用することも可能である。通常は β -グルカンとアラビノキシランを完全に分離することは困難であるが、 β -グルカンが欠失したオオムギからアラビノキシランを抽出することにより、純粋なアラビノキシランを得ることができる。
- [0010] 本発明の β -グルカン欠失遺伝子ゲノム DNA が転写・翻訳された時に生成される、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質は、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 660 番目に対応するアミノ酸がグリシン以外のアミノ酸である、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質であることが更に好ましい。また、上記の第 660 番目に対応するアミノ酸は、アスパラギン酸であることが更に好ましい。さらに、本発明の β -グルカン欠失遺伝子ゲノム DNA は、配列番号 1 に記載の塩基配列からなることが特に好ましい。
- [0011] あるいは、本発明の β -グルカン欠失遺伝子ゲノム DNA が転写・翻訳された時に生成される、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質は、配列番号 20 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、

置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号20のアミノ酸配列の第253番目に対応するアミノ酸がシステイン以外のアミノ酸である、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質であることが更に好ましい。また、上記の第253番目に対応するアミノ酸は、チロシンであることが更に好ましい。さらに、本発明の β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAは、配列番号18に記載の塩基配列からなることが特に好ましい。

[0012] 別の態様において、本発明は、配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号2のアミノ酸配列の第660番目に対応するアミノ酸がグリシン以外のアミノ酸である、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質をコードする、 β -グルカン欠失遺伝子cDNAを提供する。

[0013] 別の態様において、本発明は、配列番号20に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号20のアミノ酸配列の第253番目に対応するアミノ酸がシステイン以外のアミノ酸である、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質をコードする、 β -グルカン欠失遺伝子cDNAを提供する。

[0014] β -グルカンの欠失遺伝子cDNAは、 β -グルカン合成に関わっているため、生命科学分野で植物の β -グルカン合成に関わる遺伝子の解明に利用できる。 β -グルカン合成に関わる遺伝子が解明されれば、その結果を利用して、育種における β -グルカン含量の遺伝的制御が可能になる。

[0015] 本発明の β -グルカン欠失遺伝子cDNAがコードするアミノ酸配列において、配列番号2のアミノ酸配列の第660番目に対応するアミノ酸は、アスパラギン酸であることが更に好ましい。また、本発明の β -グルカン欠失遺伝子cDNAは、配列番号3に記載の塩基配列からなることが特に好ましい。

[0016] あるいは、本発明の β -グルカン欠失遺伝子cDNAがコードするアミノ酸配列において、配列番号20のアミノ酸配列の第253番目に対応するアミノ酸は、チロシンであることが更に好ましい。また、本発明の β -グルカ

ン欠失遺伝子 cDNA は、配列番号 19 に記載の塩基配列からなることが特に好ましい。

[0017] 別の態様において、本発明は、配列番号 4 に記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成される DNA である、 β -グルカン合成遺伝子ゲノム DNA を提供する。この β -グルカン合成遺伝子ゲノム DNA は、配列番号 4 に記載の塩基配列からなることが特に好ましい。

[0018] 別の態様において、本発明は、配列番号 15 に記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成される DNA である、 β -グルカン合成遺伝子ゲノム DNA を提供する。この β -グルカン合成遺伝子ゲノム DNA は、配列番号 15 に記載の塩基配列からなることが特に好ましい。

[0019] β -グルカンの合成に関与する遺伝子は解明されていなかったが、本発明者らは、上記の DNA が β -グルカン合成に関与していることを明らかにした。植物中の β -グルカン合成遺伝子ゲノム DNA のコピー数を増やすなどの方法によって、 β -グルカンの産生量が高い植物品種を開発することが可能である。 β -グルカンは、血糖値上昇抑制や血中コレステロールの低減などの生理機能、免疫機能の増進などの効果を持つことが報告されているため、利用価値が高い。

[0020] 別の態様において、本発明は、配列番号 6 に記載の塩基配列と 90% 以上の相同性を有する塩基配列からなり、 β -グルカン合成活性を有するタンパク質をコードする DNA である、 β -グルカン合成遺伝子 cDNA を提供する。この β -グルカン合成遺伝子 cDNA は、配列番号 6 に記載の塩基配列からなることが特に好ましい。

[0021] β -グルカンの合成に関与する遺伝子は解明されていなかったが、本発明により、上記の cDNA が β -グルカン合成に関与していることが明らかとなった。この cDNA を適切なプロモーターの下流に連結して細菌や酵母、植物などに導入することにより、 β -グルカンを大量生産することが可能で

ある。 β -グルカンは、血糖値上昇抑制や血中コレステロールの低減などの生理機能、免疫機能の増進などの効果を持つことが報告されているため、利用価値が高い。

[0022] 別の態様において、本発明は、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギの育種方法であって、オオムギの7H染色体の動原体付近に座乗する配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基が、G（グアニン）からA（アデニン）に変異していた場合に、上記オオムギは β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップを含む、育種方法を提供する。

[0023] 別の態様において、本発明は、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギの育種方法であって、オオムギの7H染色体の動原体付近に座乗する配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基が、GからAに変異していた場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップを含む、育種方法を提供する。

[0024] この育種方法により、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを育種することができる。従来の β -グルカン有無の判別法は、穀粒を試料として、 β -グルカンに特異的に吸着する蛍光色素や酵素処理により生ずる産物を検出する方法であった。したがって、その判別を行うためには種子を形成する段階にまで植物を生育させることが必要であった。これに対し、本発明を利用すれば、種子を形成する前の幼植物においても判定でき、かつ遺伝子型のホモ・ヘテロの判定も可能である。このため、育種に要する期間を格段に短縮することができる。

[0025] 上記の育種方法の1つの態様において、本発明は、オオムギから抽出したゲノムDNAを鋳型として、配列番号4に記載の塩基配列の第4275番目に対応する塩基を含むDNA断片を増幅する増幅ステップと、増幅ステップで増幅されたDNA断片を、Taq I、Ban I及びNla IVからなる群から選択される制限酵素で切断し、切断したDNA断片を検出する検出ステ

ップと、検出ステップにおいて、DNA断片が制限酵素TaqIで切断された場合、又は制限酵素BanI若しくはNlaIVで切断されなかった場合に、上記オオムギはβ-グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップとを含む、育種方法を提供する。

[0026] この育種方法により、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基が変異していた場合に迅速に判別することができる。制限酵素BanI又はNlaIVを用いる場合には、上記の第4275番目に対応する塩基が、GからA、C（シトシン）又はT（チミン）に変異していた場合に判別することができる。制限酵素TaqIを用いる場合には、上記の第4275番目に対応する塩基が、GからAに変異していた場合に判別することができる。

[0027] 上記の育種方法の1つの態様において、本発明は、オオムギから抽出したゲノムDNAを鋳型として、配列番号4に記載の塩基配列の第2385番目に対応する塩基を含むDNA断片を増幅する増幅ステップと、増幅ステップで増幅されたDNA断片を、制限酵素Fnu4HIで切断し、切断したDNA断片を検出する検出ステップと、検出ステップにおいて、DNA断片が、配列番号4に記載の塩基配列の第2386番目に対応する塩基と第2387番目に対応する塩基の間で切断されなかった場合に、上記オオムギはβ-グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップとを含む、育種方法を提供する。

[0028] この育種方法により、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基が変異していた場合に迅速に判別することができる。すなわち、当該塩基がGである場合には、上記の増幅されたDNA断片が、配列番号4に記載の塩基配列の第2386番目に対応する塩基と第2387番目に対応する塩基の間でFnu4HIにより切断され、そのオオムギは野生型であることを示す。また、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基がGからA、C又はTに変異していた場合には、上記の増幅されたDNA断片が、配列番号4に記載

の塩基配列の第2386番目に対応する塩基と第2387番目に対応する塩基の間でFnu4HIにより切断されず、そのオオムギが β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有することを示す。

[0029] 別の態様において、本発明は、上記の育種方法によって育種されたオオムギであって、次のDNA：

(a) 配列番号1に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAであって、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成されるDNAである、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

(b) 上記(a)に記載の β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAにおいて、転写・翻訳された時に生成されるタンパク質が、配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号2のアミノ酸配列の第660番目に対応するアミノ酸がグリシン以外のアミノ酸である、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

(c) 上記(b)に記載の β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAにおいて、グリシン以外のアミノ酸がアスパラギン酸である、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

(d) 配列番号1に記載の塩基配列からなる、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

(e) 配列番号18に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAであって、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成されるDNAである、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

(f) 上記(e)に記載の β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAにおいて、転写・翻訳された時に生成されるタンパク質が、配列番号20に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号20のアミノ酸配列の第253番目に

対応するアミノ酸がシステイン以外のアミノ酸である、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

(g) 上記(f)に記載の β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAにおいて、システイン以外のアミノ酸がチロシンである、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

(h) 配列番号18に記載の塩基配列からなる、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA、

のいずれかを有するオオムギを提供する。また、本発明のオオムギは、上記の(a)～(h)のいずれかの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAをホモで有している事が更に好ましい。

[0030] 上記の(a)～(h)のいずれかの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAをヘテロで有するオオムギは、野生型のオオムギに比べて穀粒中の β -グルカンが減少しており、上記の(a)～(h)のいずれかの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAをホモで有しているオオムギは、穀粒の β -グルカンを完全に欠失している。

[0031] 別の態様において、本発明は、配列番号4に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNAである β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、又は配列番号4に記載の塩基配列からなる β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制するステップを含む、オオムギ穀粒の β -グルカンを減少又は欠失させる方法及びこの方法によって得ることのできる、 β -グルカンを減少又は欠失したオオムギを提供する。このオオムギは、穀粒の β -グルカンを減少又は完全に欠失している。

[0032] 別の態様において、本発明は、配列番号15に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNAである β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、又は配列番号15に記載の塩基配列からなる β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制するステップを含む、オオムギ穀粒

の β -グルカンを減少又は欠失させる方法及びこの方法によって得ることのできる、 β -グルカンを減少又は欠失したオオムギを提供する。このオオムギは、穀粒の β -グルカンを減少又は完全に欠失している。

[0033] 別の態様において、本発明は、上記の育種方法によって育種されたオオムギであって、上記の(a)～(h)のいずれかの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有しているオオムギ、又は上記の β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制することによって得ることのできる、穀粒中の β -グルカンを減少又は欠失したオオムギ由来の穀粒を発酵させるステップを含む、アルコールの製造方法を提供する。 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAをヘテロで有しているオオムギは、野生型のオオムギに比べて穀粒中の β -グルカンが減少しており、ホモで有しているオオムギは、穀粒中の β -グルカンを完全に欠失している。 β -グルカンが減少又は欠失したオオムギ穀粒を原料に用いることによって、ビールや焼酎の製造において、デンプンの糖化時間の短縮、麦汁の濾過時間の短縮、アルコール生成量の増加、発酵残渣の減少などの効果が得られる。

[0034] 別の態様において、本発明は、上記の育種方法によって育種されたオオムギであって、上記の(a)～(h)のいずれかの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有しているオオムギ、又は上記の β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制することによって得ることのできる、穀粒中の β -グルカンを減少又は欠失したオオムギ由来の穀粒を発酵させるステップを含む、発酵食品の製造方法を提供する。発酵食品はオオムギの穀粒を発酵させたものを含む食品であり、例えば味噌や醤油である。 β -グルカンが減少又は欠失したオオムギ穀粒を原料に用いることによって、発酵の効率を上げることができるため、発酵に要する時間を短縮できるなどの効果が得られる。

[0035] 別の態様において、本発明は、上記の育種方法によって育種されたオオムギであって、上記の(a)～(h)のいずれかの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有しているオオムギ、又は上記の β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制することによって得ることのできる、穀粒中の β -グ

ルカンを減少又は欠失したオオムギ由来の穀粒を含む、動物用飼料組成物を提供する。 β -グルカンが減少又は完全に欠失したオオムギ穀粒を含む動物用飼料組成物は、消化吸収が良く飼養効果が高い。また、消化性が改善される結果、糞の量が減少するなどの効果が得られる。また、胚乳細胞壁が薄く穀粒が軟質であるため、飼料組成物の製造時に、より容易に穀粒を粉砕することができる。

[0036] 別の態様において、本発明は、次のDNA：

(a) 配列番号4に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNAである、 β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、

(b) 配列番号4に記載の塩基配列からなる β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、

(c) 配列番号6に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、 β -グルカン合成活性を有するタンパク質をコードするDNAである、 β -グルカン合成遺伝子cDNA

(d) 配列番号6に記載の塩基配列からなる β -グルカン合成遺伝子cDNA、

(e) 配列番号15に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNAである、 β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、

(f) 配列番号15に記載の塩基配列からなる β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、

のいずれかを含むベクターを発現可能に保持する形質転換体を提供する。形質転換体は、オオムギであってもよいし、本来は β -グルカンを含まないか、微量にしか含まない植物であってもよい。あるいは、形質転換体は、大腸菌などの原核生物や、酵母などの真核生物に例示される微生物であってもよい。

[0037] このような形質転換植物体は、 β -グルカンをより大量に含むため、付加

価値が高い。あるいは、このような形質転換微生物を利用して、 β -グルカンを大量に工業生産することも可能である。

[0038] 形質転換体は、 β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA又は β -グルカン合成遺伝子cDNAを過剰発現することがより好ましい。過剰発現とは、形質転換前の宿主と比較して、mRNAレベル又はタンパクレベルで、より大量の β -グルカン合成遺伝子を発現することを意味する。

発明の効果

[0039] 本発明により、オオムギの β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA及びcDNAが提供される。また、オオムギの β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA及びcDNAが提供される。さらに、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギ及びその育種方法、 β -グルカン合成遺伝子の発現を抑制することによってオオムギ穀粒の β -グルカンを減少又は欠失させる方法及びこの方法によって得ることのできる、穀粒中の β -グルカンを減少又は欠失したオオムギ、これらの β -グルカンを減少又は欠失したオオムギ穀粒を発酵させるステップを含むアルコール又は発酵食品の製造方法、並びにこのオオムギ穀粒を含む動物用飼料組成物が提供される。

[0040] β -グルカン合成に関与する遺伝子の改変は、生命科学分野で植物の β -グルカン合成に関わる遺伝子の解明、並びに農業分野で β -グルカンを含まないオオムギの品種育成において有用である。 β -グルカン欠失遺伝子と β -グルカン欠失性機構の解明は、 β -グルカン合成に関わる遺伝子の特定に寄与するものである。また、 β -グルカンを欠失するオオムギは、 β -グルカンとともに機能性多糖として重要なアラビノキシランをやや多く含むため、アラビノキシランに特化した機能性食品の開発において重要な資源である。従来の β -グルカン有無の判別法は、穀粒を試料として、 β -グルカンに特異的に吸着する蛍光色素や酵素処理により生ずる産物を検出する方法であった。したがって、その判別を行うためには種子を形成する段階にまで植物を生育させることが必要であった。これに対し、本発明を利用すれば、種子を形成する前の幼植物においても判定でき、かつ遺伝子型のホモ・ヘテロの

判定も可能である。本発明による β -グルカン欠失遺伝子を利用すると、糊粉層及び胚乳の細胞壁において β -グルカンが完全に欠失し、胚乳細胞壁が顕著に薄いオオムギを作出することが可能である。

図面の簡単な説明

- [0041] [図1] β -グルカン欠失遺伝子の染色体上の座乗位置を示す図である。
- [図2] β -グルカン欠失オオムギ品種及び野生型品種における、HvCs1F6遺伝子の塩基配列と推定アミノ酸配列を示す図である。
- [図3] CAPSマーカーによるHvCs1F6遺伝子型の判別例を示す写真である。
- [図4] ニシノホシ (bg1) 準同質遺伝子系統及びニシノホシの穀粒断片の光学顕微鏡による観察結果を示す写真である。
- [図5] ニシノホシ (bg1) 準同質遺伝子系統及びニシノホシの穀粒断片の光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡による観察結果を示す写真である。
- [図6] TR251及びCDC-Bo1dのHvCs1F6遺伝子のプロモーター配列を示す図である。
- [図7] TR251及びCDC-Bo1dのHvCs1F6遺伝子のプロモーター配列を示す図である。
- [図8] サチホゴールデン (TN5) 及びKM27のHvCs1F6遺伝子の塩基配列を示す図である。 TN5-DNA : サチホゴールデンのHvCs1F6遺伝子のゲノムDNAの塩基配列 (配列番号15) の一部を示す。 TN5-cDNA : サチホゴールデンのHvCs1F6遺伝子のcDNAの塩基配列 (配列番号16) の一部を示す。 TN5-a. a. : サチホゴールデンのHvCs1F6のアミノ酸配列 (配列番号17) の一部を示す。 KM27-DNA : KM27のHvCs1F6遺伝子 (bg1遺伝子) のゲノムDNAの塩基配列 (配列番号18) の一部を示す。 KM27-cDNA : KM27のbg1遺伝子のcDNAの塩基配列 (配列番号19) の一部を示す。 KM27-a. a. : KM27のbg1遺伝子がコードするアミノ酸配列 (配列番号20) の一部を示す。

[図9] H v C s l F 6 の予測される立体構造を示す図である。(i) : KM 2 7 において、システインがチロシンに変異した部位を示す。(ii) : O U M 1 2 5 において、グリシンがアスパラギン酸に変異した部位を示す。

[図10] CAP S マーカーによる H v C s l F 6 遺伝子型の判別例を示す写真である。

発明を実施するための形態

- [0042] 本明細書において、「90%以上の相同性を有する塩基配列」とは、2つの塩基配列を、可能な限り多数の塩基が相互に一致するように並列させて比較した場合に、90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、更に好ましくは99%以上の塩基が同一である塩基配列を意味する。ここで、塩基配列を並列させる際には、最大の相同性を与えるようにギャップを含んでもよい。
- [0043] 本明細書において、「1個又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」とは、基準となるアミノ酸配列と比較して、1~10個、より好ましくは1~5個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味する。
- [0044] 本明細書において、「ゲノムDNA」とは、イントロンを含むDNAを意味し、「cDNA」は、イントロンを含まないDNAを意味する。例えば、配列番号1に記載の塩基配列は、 β -グルカン欠失遺伝子のゲノムDNAの塩基配列を示しており、この塩基配列において、第328~1954番目及び第2699~3367番目はイントロンである。イントロンは、宿主中でゲノムDNAがmRNAに転写され、タンパクに翻訳される過程で、スプライシングにより除去される。ここにおいて、宿主は植物であることが好ましく、オオムギであることが更に好ましい。例えば、配列番号3は、配列番号1に記載の塩基配列からイントロン部分を除去した、 β -グルカン欠失遺伝子cDNAの塩基配列を示す。本明細書において、「 β -グルカン欠失遺伝子」とは、ゲノムDNA及びcDNAの両者を意味する場合がある。
- [0045] 本明細書において、「 β -グルカン合成活性」とは、 β -グルカンの合成

経路に関与して、 β -グルカンの合成を促進する活性を意味する。また、「 β -グルカン合成遺伝子」とは、 β -グルカンの合成経路に関与して、 β -グルカンの合成を促進する機能を有するタンパクをコードする遺伝子を意味する。

[0046] 1つの態様において、本発明は、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギの育種方法であって、オオムギの7H染色体の動原体付近に座乗する配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基が、GからAに変異していた場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップを含む、育種方法を提供する。この育種方法における選択ステップにおいて、ゲノムDNAの変異を検出する方法は特に制限されない。例えば、検出したいゲノムDNA上の領域をPCR増幅し、PCR断片のダイレクトシーケンスにより、又はPCR断片をシーケンス用ベクターに挿入後、シーケンスすることにより、塩基配列決定を行い、目的の変異を持つか否かを判別しても良い。しかしながら、判別操作がより簡便であることから、制限酵素で切断されるか否かを指標として目的の変異の存在を検出することが好ましい。

[0047] 具体的には、オオムギから抽出したゲノムDNAを鋳型として、例えば、配列番号4に記載の塩基配列の第3893～4361番目に対応する塩基配列からなるDNA断片をPCR増幅し、増幅された469bpのDNA断片を制限酵素BanIで切断し、切断したDNA断片をアガロース電気泳動などにより検出し、DNA断片が制限酵素BanIで切断されなかった場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別することができる。この方法の場合、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基がAに変異していた場合に迅速に判別することができる。さらに、上記の4275番目に対応する塩基がC又はTに変異していた場合においても同様に判別することができる。

[0048] 制限酵素としては、BanIと同様に、TaqIや、NlaIVなども利

用可能である。TaqIの認識配列は5' -TCGA-3'であり、TaqI消化によって5' -T/CGA-3'の形に切断される。このため、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基が、GからAに変異していた場合に切断される。NlaIVの認識配列は5' -GGNCC-3'であり、NlaIV消化によって5' -GGN/ NCC-3'の形に切断される。ここで、NはA、T、G又はCを意味する。このため、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基が、GからA、C又はTに変異していた場合に切断される。

[0049] 配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基の周辺には、BanI、TaqI又はNlaIVなどの制限酵素によって切断される認識配列が複数存在する。当業者は、これらの制限酵素による切断によって上記の第4275番目に対応する塩基の変異を判別する場合に、配列番号4に記載の塩基配列のうちの、どの領域を増幅してDNA断片を調製すれば判別可能であるかを容易に選択することができる。また、これらの制限酵素以外の使用可能な制限酵素は、当業者にとって明らかである。

[0050] オオムギからのゲノムDNAの抽出方法は特に制限されないが、例えば0.1g程度の若い葉を採取し、液体窒素を加えてすり鉢上で磨砕し、DNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社）を用いて取扱説明書にしたがって抽出することができる。

[0051] 本実施形態の育種方法は例えば次のようにして実施することができる。まず、野生型のオオムギを、メタンサルホン酸エチル（EMS）などの変異誘発剤で処理して変異体を得る。続いて、得られた各変異体からゲノムDNAを抽出し、上記の方法によって、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基の変異を検出し、β-グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギ個体を判別し、選択する。このようにして、β-グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを育種する

ことができる。あるいは、野生型のオオムギ品種と、すでに β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有することが明らかとなっているオオムギ品種を交配し、その子孫の中から上記と同様の方法によって β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを判別し、選択することで、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを育種することができる。または、野生型のオオムギにおける、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基を、相同組換えによる遺伝子ターゲティング法などの分子生物学的手法によって、人工的にGからA、C又はTに変異させることにより、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを育種することができる。上記の人工的に導入する変異は、GからAへの変異であることがより好ましい。

[0052] 別の態様において、本発明は、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギの育種方法であって、オオムギの7H染色体の動原体付近に座乗する配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基が、GからAに変異していた場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップを含む、育種方法を提供する。この育種方法における選択ステップにおいて、ゲノムDNAの変異を検出する方法は特に制限されない。例えば、検出したいゲノムDNA上の領域をPCR増幅し、PCR断片のダイレクトシーケンスにより、又はPCR断片をシーケンス用ベクターに挿入後、シーケンスすることにより、塩基配列決定を行い、目的の変異を持つか否かを判別しても良い。しかしながら、判別操作がより簡便であることから、制限酵素で切断されるか否かを指標として目的の変異の存在を検出することが好ましい。

[0053] 具体的には、オオムギから抽出したゲノムDNAを鋳型として、例えば、配列番号4に記載の塩基配列の第2219～2529番目に対応する塩基配列からなるDNA断片をPCR増幅し、増幅された311bpのDNA断片を制限酵素Fnu4HIで切断し、切断したDNA断片をアガロース電気泳

動などにより検出する。野生型の品種では、制限酵素 *Fnu4HI* による消化により、この増幅断片が、3、41、50、56、62及び99bpの6個の断片に切断される。これに対し、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基が、GからAに変異していた場合、あるいはGからC又はTに変異していた場合には、1塩基置換により *Fnu4HI* 認識部位が1箇所なくなるため、*Fnu4HI* で消化した場合に、上記の増幅断片が、3、41、50、56及び161bpの5個の断片に切断される。*Fnu4HI* 消化により生じるこれらの断片の差は、図10に示すように電気泳動等により容易に識別可能である。この方法により、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基における変異の有無を迅速に判別することができる。

[0054] なお、*Fnu4HI* の認識配列は5' -GCNGC-3' であり、*Fnu4HI* 消化によって、5' -GC/NGC-3' の形に切断される。ここで、NはA、T、G又はCを意味する。*Fnu4HI* と同一の塩基配列を認識し、*Fnu4HI* と同じ形に切断する制限酵素として、*BisI*、*BsoFI*、*Fsp4HI*、*ItaI*、*SatI*などが知られている。これらの制限酵素も *Fnu4HI* と同様に使用可能である。

[0055] 配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基の周辺には、*Fnu4HI* によって切断される認識配列が複数存在する。当業者は、*Fnu4HI* による切断によって上記の第2385番目に対応する塩基の変異を判別する場合に、配列番号4に記載の塩基配列のうちの、どの領域を増幅してDNA断片を調製すれば判別可能であるかを容易に選択することができる。また、*Fnu4HI* 以外の使用可能な制限酵素は、当業者にとって明らかである。

[0056] 本実施形態の育種方法は例えば次のようにして実施することができる。まず、野生型のオオムギを、メタンスルホン酸エチル (EMS) などの変異誘発剤で処理して変異体を得る。続いて、得られた各変異体からゲノムDNAを抽出し、上記の方法によって、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノ

ムDNAの第2385番目に対応する塩基の変異を検出し、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギ個体を判別し、選択する。このようにして、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを育種することができる。あるいは、野生型のオオムギ品種と、すでに β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有することが明らかとなっているオオムギ品種を交配し、その子孫の中から上記と同様の方法によって β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを判別し、選択することで、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを育種することができる。または、野生型のオオムギにおける、配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基を、相同組換えによる遺伝子ターゲティング法などの分子生物学的手法によって、人工的にGからA、C又はTに変異させることにより、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギを育種することができる。上記の人工的に導入する変異は、GからAへの変異であることがより好ましい。

[0057] 1つの態様において、本発明は、オオムギの β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA及びcDNAを提供する。本発明の β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA又はcDNAをオオムギなどの植物のゲノム中に導入し、コピー数を増やすなどの方法によって、 β -グルカンの産生量が高い植物品種を開発することが可能である。あるいは、本発明の β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA又はcDNAを、大腸菌などの原核生物や、酵母などの真核生物などの微生物に導入して、 β -グルカンを工業的に大量生産することも可能である。 β -グルカンは、血糖値上昇抑制や血中コレステロールの低減などの生理機能、免疫機能の増進などの効果を持つことが報告されているため、利用価値が高い。

[0058] β -グルカン合成遺伝子を植物体に導入する場合には、まず、 β -グルカン合成遺伝子の発現ベクターを構築する。発現ベクターは、植物体内で発現可能なプロモーター、 β -グルカン合成遺伝子、翻訳終結配列を含む。 β -グルカン合成遺伝子はゲノムDNAであってもcDNAであってもよい。こ

ここで、宿主となる植物体は、特に制限されないが、オオムギであることが好ましい。発現ベクターはまた、必要に応じて、大腸菌における複製起点、大腸菌における選択マーカー（アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子など）、植物体における選択マーカー（カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ビアラホス（b a r）耐性遺伝子など）、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列などを更に含んでもよい。

[0059] 植物体内で発現可能なプロモーターとしては、種子特異的な発現を誘導するものであってもよく、組織に関係なく構成的に発現するものであってもよい。例えばユビキチンプロモーター、アクチンプロモーター、Emプロモーター、カリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどが例示できる。

[0060] オオムギへの遺伝子導入は、一般的なパーティクルボンバードメント法やアグロバクテリウム法を用いて行うことができる。例えば、金粒子にまぶした β -グルカン合成遺伝子の発現ベクターDNAを、パーティクルボンバードメント法を用いて、オオムギ未熟種子から取り出した未熟胚に打ち込むことにより遺伝子導入する。続いて、遺伝子導入した未熟胚を、植物ホルモンであるオーキシンなどを含む培地で培養後、オーキシンの濃度を下げることにより、個体を再分化させて形質転換植物体を得ることができる。例えば、ビアホラス耐性遺伝子を含む β -グルカン合成遺伝子の発現ベクターをオオムギに導入した場合、導入遺伝子を取り込んだ形質転換植物体は、ビアホラス耐性となるので、ビアホラスを添加した培地を用いることにより選抜することができる。あるいは、オオムギ由来のカルスを β -グルカン合成遺伝子の発現ベクターを導入したアグロバクテリウムの溶液に浸してアグロバクテリウムに感染させることにより、 β -グルカン合成遺伝子をオオムギに導入することができる。例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子を含む β -グルカン合成遺伝子の発現ベクターをオオムギに導入した場合、遺伝子を取り込んだ形質転換体は、ハイグロマイシン及びアグロバクテリウムを除菌するためのカルベニシリンなどの除菌剤を添加した培地で選抜することができる。そ

の後、オーキシンを除いた再分化培地で培養して再分化させ、続いて、発根培地へと移し変えることにより、 β -グルカン合成遺伝子を発現可能に保持する形質転換植物体を得ることができる。

[0061] 大腸菌などの原核生物や、酵母などの真核生物に例示される微生物も、 β -グルカン合成遺伝子の発現ベクターを導入する宿主に用いることができる。大腸菌としては、例えばK12株などが好ましく用いられ、ベクターとしては、一般にpBR322やpUC系のプラスミドが用いられるが、これらに限定されない。大腸菌用のプロモーターとしては、トリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーターなどが使用可能である。酵母としては、例えばサッカロミセス属酵母、例えばパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* や石油酵母 *Pichia pastoris* を利用できる。酵母用のプロモーターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーターや酸性フォスファターゼ遺伝子のプロモーターなどが使用可能である。

[0062] 1つの態様において、本発明は、配列番号4に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNAである β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、又は配列番号4に記載の塩基配列からなる β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制するステップを含む、オオムギ穀粒の β -グルカンを減少又は欠失させる方法を提供する。

[0063] 1つの態様において、本発明は、配列番号15に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNAである β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA、又は配列番号15に記載の塩基配列からなる β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制するステップを含む、オオムギ穀粒の β -グルカンを減少又は欠失させる方法を提供する。

[0064] DNAの発現を抑制する方法としては、siRNAやアンチセンス核酸を細胞内に導入する公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、

β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAを標的としたsiRNAを発現するベクターや、 β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAを標的としたアンチセンスRNAを発現するベクターを、上記と同様にパーティクルボンバードメント法やアグロバクテリウム法を用いてオオムギに導入するとよい。この方法によれば、 β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制することにより、穀粒中の β -グルカンを減少又は完全に欠失したオオムギを得ることができる。

実施例

[0065] 以下、本発明の実施例を示して、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲での種々の変更が可能である。

[0066] (オオムギ品種ニシノホシの準同質遺伝子系統の作出)

発明者らは、オオムギ品種(系統)OUM125が β -グルカンを欠失していることを見出し、これに基づいて β -グルカンを欠失する遺伝子を同定し、本発明を完成させるに至った。OUM125は、岡山大学において、裸性の六条オオムギ品種である赤神力を、メタンスルホン酸エチル(EMS)処理することにより作出された、半矮性突然変異体である。本実施例で使用したOUM125の種子は、岡山大学資源生物科学研究所 大麦・野生植物資源研究センターの佐藤和広博士により提供された。

[0067] ニシノホシは、優良形質を持つ二条オオムギ品種である。泉系A41は、西海皮55号とOUM125の子孫と、西海皮54号(ニシノホシの開発名)との交配によって、1997年に九州農業試験場において作出された系統であり、 β -グルカン欠失性及び裸性の表現型を持つ。発明者らは、泉系A41を1回親に、ニシノホシを反復親に用いて交配を行い、 β -グルカン欠失性及び皮性であるニシノホシの準同質遺伝子系統を作出した。

[0068] (β -グルカン欠失性の解析)

個々の穀粒を横方向に切断し、胚から遠い部分をペンチを用いて破碎した。 β -グルカン欠失性は、破碎した穀粒をリケナーゼ及び β -グルコシダー

ぜで処理し、グルコースアッセイキット（グルコースC-I Iテスト、和光純薬工業株式会社）でグルコースを発色させることにより判定した。 β -グルカン欠失性の穀粒においては、反応液が無色又は薄いピンク色となるのに対し、野性型の穀粒においては、反応液が深赤色となった。

[0069] (β -グルカン欠失性と皮裸性の連鎖解析)

ニシノホシとその準同質遺伝子系統の交配によって得られた228個体において、 β -グルカン欠失性及び皮裸性についての連鎖解析を行った。連鎖解析の結果を表1に示す。 β -グルカン欠失型及び野生型の分離比は1:3であった。したがって、 β -グルカン欠失性は単因子劣勢の遺伝子によるものであると考えられた。この遺伝子を β -グルカン欠失遺伝子（(1-3, 1-4) - β -D-グルカンレス、bg1）と命名した。 β -グルカン欠失遺伝子と皮裸性遺伝子（nud）の間には、有意な連鎖が検出された。これらの遺伝子間の組換え価は、Allard（Hilgardia 24: 235-278、1956年）の最尤法により、14.4%±2.5%と計算された。nud遺伝子は7H染色体の長腕に存在することが知られているため、 β -グルカン欠失遺伝子も7H染色体上に座乗していると考えられた。

[0070] [表1]

表1 ニシノホシ(β -グルカン欠失+裸性)準同質遺伝子系統×ニシノホシのF₂における β -グルカン欠失性と皮裸性の共分離

	β -グルカンの有無		計
	正常	欠失	
皮性	153	15	168
裸性	16	44	60
計	169	59	228

β -グルカンの正常型と欠失型の分離比の検定

$$\chi^2(3:1)=0.0936, 0.90>p>0.75$$

β -グルカン欠失性と皮裸性の独立性の検定

$$\chi^2L=101.3, p<0.01$$

β -グルカン欠失性と皮裸性の組換え価=14.4±2.5%

[0071] (マッピング)

ニシノホシ、その準同質遺伝子系統及びこれらの交配によって得られた228個体それぞれからCTAB法によりゲノムDNAを抽出した。Ramsayら (Genetics 156:1997-2005、2000年) に報告されたSSRマーカーを用いて、これらのゲノムDNAを解析し、 β -グルカン欠失遺伝子をマッピングした。両親の間で多型を示した7H染色体のSSRマーカーを選択し、PCR解析した。各マーカーの染色体上の位置は、コムギのオオムギ染色体添加系統 (Islam, Sakamoto, S. 編 Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp. Maruzen Kyoto. pp. 233-238、1983年) を用いた解析によって決定した。組換え価はMAPMAKER version 2.0 (Landerら、Genomics 1:174-181、1987年) を用いて計算した。遺伝的距離はKosambi関数 (Kosambi、Ann. Eugen. 12:172-175、1944) を用いて計算した。

[0072] 図1にマッピングの結果を示す。 β -グルカン欠失遺伝子は、Bmac0162から3.4cMの位置にマッピングされ、Bmag0321、Bmag0359、Bmac0167及びHvCsIF6遺伝子と共局在していることが明らかとなった。HvCsIF6遺伝子は、セルロース合成酵素様遺伝子のサブファミリーの一つである。 β -グルカン欠失遺伝子は7H染色体動原体付近に座乗することが明らかとなった。

[0073] さらに、HvCsIF6遺伝子上に、制限酵素BanIによって検出することができる1塩基多型 (SNP) が存在し、 β -グルカン欠失性の表現型とHvCsIF6遺伝子座の遺伝子型が完全に一致することが明らかとなった。すなわち、図2に示すように、HvCsIF6遺伝子の塩基配列の4275番目の塩基がGからAに置換したものが β -グルカン欠失遺伝子であり、 β -グルカン欠失遺伝子をホモで保有すると、穀粒の β -グルカンが完全に欠失する。図2に示すように、推定されるアミノ酸は、野生型の品種ではグリシンであるのに対し、 β -グルカン欠失遺伝子を有する品種ではアスパ

ラギン酸となる。

[0074] (CAPS解析)

β -グルカン欠失遺伝子の有無は、共優性のCAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーによって明瞭に判別可能である。ここで、共優性マーカーとは、ヘテロ型のパターンが両親のいずれのホモ型とも区別可能なマーカーを意味する。 β -グルカン欠失遺伝子のCAPS解析を行うために、以下のプライマー (CAPSマーカー) 5' -GCCAAGACCAAGTACGAGAAGC-3' (Forward、配列番号11) 及び5' -TGTTCTTGGAG AAGAAGATCTCG-3' (Reverse、配列番号12) を作成した。

[0075] これらのプライマーを用いてオオムギのゲノムDNAをPCRすることにより、469bpの増幅断片が得られる。野生型の品種では、制限酵素Ban Iによる消化により、この増幅断片が382bpと87bpに切断される。これに対し、 β -グルカン欠失遺伝子を有する品種では、1塩基置換によりBan I認識部位が存在しないため、制限酵素Ban Iで消化しても切断されない。なお、Ban Iの認識配列は5' -GGYRCC-3' であり、Ban I消化によって、5' -G/GYRCC-3' の形に切断される。ここで、YはC又はTを意味し、RはA又はGを意味する。

[0076] 図3に、CAPS解析によって β -グルカン欠失遺伝子の有無を判別した結果を示す。ゲノムDNAを上記のプライマーでPCR増幅後、増幅断片を制限酵素Ban Iで切断し、アガロースゲル電気泳動した。レーンA~Fは、それぞれOUM125 (β -グルカン欠失性)、赤神力 (野生型)、OUM125と赤神力のF1 (ヘテロ型)、ニシノホシの準同質遺伝子系統 (β -グルカン欠失性及び裸性)、ニシノホシ (野生型)、ニシノホシの準同質遺伝子系統 (β -グルカン欠失性及び裸性) とニシノホシのF1 (ヘテロ型) のゲノムDNAを解析した結果である。

[0077] (デンプン、 β -グルカン及びアラビノキシラン含有量の測定)

ニシノホシ (b g 1) 及びニシノホシを育てて収穫した。ここで、ニシノホシ (b g 1) とは、 β -グルカン欠失性及び皮性である、ニシノホシの準同質遺伝子系統を意味する。収穫後、粉碎し、0.5mmのふるいを透過させた、成熟全粒サンプル中の β -グルカン及びアラビノキシラン含有量を測定した。 β -グルカン含有量は、Mixed linkage β -グルカン アッセイキット (Megazyme International、アイルランド) を用いて酵素学的方法 (McCleary 及び Codd、1991年) により測定した。アラビノキシラン含有量は、Sekiwara (2003年) の方法にしたがって、サンプルを硫酸で加水分解した後に、アラビノース及びキシロース含有量を別々に測定することにより決定した。アラビノース含有量は「Arabinan assay procedure (Megazyme International Ireland 2002)」に記載された酵素学的方法によって測定した。キシロース含有量は、D-キシロース アッセイキット (Megazyme International、アイルランド) を用いて測定した。 β -グルカン及びアラビノキシラン含有量の測定前に、80%エタノール処理によって、粉碎したサンプル中の遊離低分子糖を除去した。結果を表2に示す。

[0078] ニシノホシ (b g 1) の穀粒中には β -グルカンが検出されなかったのに対し、ニシノホシの穀粒中には3.2質量%の β -グルカンが含まれていた。アラビノキシラン含有量はニシノホシの穀粒中で6.3質量%であったのに対し、ニシノホシ (b g 1) の穀粒中では7.2質量%であった。

[0079] [表2]

表2 ニシノホシ(bg1)準同質遺伝子系統における穀粒中の β -グルカン及びアラビノキシラン含量

品種・系統	β -グルカン (%)	アラビノキシラン (%)
ニシノホシ(bg1)準同質遺伝子系統	0.0a	7.2b
ニシノホシ	3.2b	6.3a

異なるアルファベットを付した数値間には5%水準で有意な差があることを示す (Fisher's PLSD test)

[0080] (光学顕微鏡観察)

ニシノホシ (b g l) 及びニシノホシの穀粒をスライスし、グルタルアルデヒド中で固定し、一連のエタノール処理によって脱水し、低温重合樹脂 Technovit 7100 (Heraeus Kulzer、ドイツ) 中に包埋した。7 μ m厚の切片を0.5%のFast Green FCF (シグマアルドリッチ社、米国) 及び0.01%Calcofluor (和光純薬工業株式会社) で2重染色した。切片を、UVフィルターを装着した光学顕微鏡 (Axiophot、カールツァイス、ドイツ) により、倍率200倍で観察した。Fast Green FCFによって細胞壁、細胞質及び核が染色され、Calcofluorによって β -グルカンが染色される。図4に結果を示す。観察倍率は200倍であった。図4において、Aは、明視野観察画像を示し、Bは、紫外光照射画像を示す。図4中、aは穀皮、bは種皮及び果皮、cは糊粉層、dは胚乳を指す。ニシノホシのサンプルにおいては、糊粉及び胚乳細胞壁に蛍光が観察されたのに対し、ニシノホシ (b g l) においてはこれらの蛍光は観察されなかった。この結果は、 β -グルカン欠失遺伝子を有する系統が、糊粉層と胚乳の両方において、 β -グルカンを完全に欠失していることを示す。

[0081] (電子顕微鏡観察)

ニシノホシ (b g l) 及びニシノホシの穀粒の水平方向の切片を、走査型電子顕微鏡 (N-3400、日立) により、観察倍率5000倍で観察した。結果を図5に示す。図5において、Aは光学顕微鏡による明視野観察画像 (観察倍率200倍) を示し、Bは電子顕微鏡観察画像 (観察倍率5000倍) を示す。ニシノホシの胚乳細胞壁が厚いのに対し、ニシノホシ (b g l) は顕著に薄い胚乳細胞壁を有していることが明らかとなった。糊粉細胞の細胞壁の厚さには、両者に違いは見られなかった。

[0082] (幼苗の葉の β -グルカン含有量の測定)

ニシノホシ (b g l) 及びニシノホシの茎が伸長する前のロゼット状態の幼植物を圃場より採取し、凍結乾燥した。続いて葉身及び葉鞘の β -グルカ

ン含有量を、Mixed linkage β -グルカン アッセイキット (Megazyme International、アイルランド) を用いて測定した。 β -グルカン含有量の測定前に、80%熱エタノール処理によって、遊離低分子糖を除去した。結果を表3に示す。

[0083] ニシノホシ (bg1) の葉には β -グルカンがほとんど検出されなかったのに対し、ニシノホシの葉には13.5mg/gの β -グルカンが含まれていた。以上の結果は、ニシノホシ (bg1) が、穀粒だけでなく栄養器官においても β -グルカンを欠失していることを示す。

[0084] [表3]

表3 ニシノホシ (bg1) 準同質遺伝子系統における幼苗の葉の β -グルカン含量

品種・系統	β -グルカン (mg/g)
ニシノホシ (bg1) 準同質遺伝子系統	0.1a
ニシノホシ	13.5b

異なるアルファベットを付した数値間には5%水準で有意な差があることを示す (Fisher's PLSD test) .

[0085] (穀粒硬度の測定)

ニシノホシ (bg1) 及びニシノホシの穀粒の穀粒硬度を測定した。穀粒硬度は単粒硬度計 (SKCS-4100、Perten Inc.、スウェーデン) を用いて、それぞれ300粒の穀粒について測定した。搗精時間は、試験用搗精機 (TM-05、サタケ、東広島市) を用いて、穀粒 (原麦) 180gを55%歩留まで搗精するのに要する時間とし、碎粒率は搗精麦10g中の碎粒及び欠損粒の質量比で求めた。結果を表4に示す。

[0086] ニシノホシ (bg1) の穀粒はニシノホシの穀粒と比較して顕著に柔らかくかつ脆くなっていることが示された。この結果は、 β -グルカン欠失により胚乳細胞壁が薄くなったことに由来すると考えられる。穀粒が柔らかく脆いという特性は、動物用飼料の製造において破碎しやすく、グリッツに加工しやすいという有用性を示す。

[0087]

[表4]

表4 ニシノホシ(bg1)準同質遺伝子系統における穀粒の特性

品種・系統	穀粒硬度 (Hardness Index)	搗精時間 (秒)	砕粒率 (%)
ニシノホシ(bg1)準同質遺伝子系統	30.8a	265a	35.9b
ニシノホシ	74.9b	497b	3.8a

異なるアルファベットを付した数値間には5%水準で有意な差があることを示す (Fisher's PLSD test)

[0088] (HvCs1F6遺伝子のプロモーター領域における多型)

オオムギ系統TR251及びCDC-Boldは、 β -グルカンの産生量に差があることが知られている (Journal of Cereal Science 48:647-655、2008)。TR251は β -グルカン高産生系統であり、CDC-Boldは β -グルカン低産生系統である。発明者らは、これらの系統間の β -グルカンの産生量の差は、HvCs1F6遺伝子の塩基配列の変異によるのではないかと考え、これらのオオムギ系統のHvCs1F6遺伝子領域のゲノムの塩基配列を決定した。TR251は、Dr. W. G. Legge (Brandon Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Canada) より分与された。CDC-Boldは、Dr. B. G. Rossnagel (Crop Development Centre, University of Saskatchewan, Canada) より分与された。

[0089] これらのオオムギ系統からCTAB法によりゲノムDNAを抽出し、HvCs1F6遺伝子のプロモーター領域を含む、HvCs1F6遺伝子の開始コドンの上流約2kbのゲノムの塩基配列 (以下、「プロモーター配列」という。) を決定した。TR251及びCDC-BoldのHvCs1F6遺伝子のプロモーター配列を、それぞれ配列番号13及び14に示す。

[0090] 図6及び7に示すように、これらの塩基配列を比較した結果、TR251のプロモーター配列 (配列番号13) において、配列番号14 (CDC-B

o l dのプロモーター配列)の塩基配列の第10番目、第45番目、第614番目及び第2002番目に対応する塩基が、それぞれAからT、AからG、GからA及びCからAに変異していることが明らかとなった。さらに、配列番号14の塩基配列の第678番目と第679番目に対応する塩基の間に5'-TCTCTCAA-3'の8塩基対の挿入が見られた。図中、各変異箇所を白抜き文字で示す。これらの塩基配列の相違により、TR251がβ-グルカンを高生産するという表現型を示すことが示された。

[0091] これらのプロモーター領域における多型を指標として、β-グルカンを高生産又は低生産するオオムギ品種の育種を効率よく行うことができる。

[0092] また、配列番号14(CDC-Bo l dのプロモーター配列)の塩基配列の第1755~第1758番目(HvCs l F6遺伝子の開始コドンの約350bp上流)、及びTR251のプロモーター配列(配列番号13)における、これに対応する位置に、典型的なTATAボックスが見出された。図7中、TATAボックスを白抜き文字で示す。また、HvCs l F6遺伝子の開始コドンを四角で囲み、コード領域を下線で示す。

[0093] (HvCs l F6遺伝子のコード領域における多型)

TR251のHvCs l F6遺伝子のコード領域のゲノムDNAの塩基配列を配列番号23に、cDNAの塩基配列を配列番号24に、推定アミノ酸配列を配列番号25に示す。また、CDC-Bo l dのHvCs l F6遺伝子のコード領域のゲノムDNAの塩基配列を配列番号26に、cDNAの塩基配列を配列番号27に、推定アミノ酸配列を配列番号28に示す。TR251のHvCs l F6遺伝子のcDNAの塩基配列(配列番号24)において、赤神力(野生型)のHvCs l F6遺伝子のcDNAの塩基配列(配列番号6)の第174番目、第1768番目及び第2505番目に対応する塩基がそれぞれ、GからA、GからA及びTからGに変異していることが明らかとなった。また、これらの変異のうち、第1768番目の塩基における変異によって、TR251のHvCs l F6タンパクのアミノ酸配列(配列番号25)において、赤神力(野生型)のHvCs l F6タンパクのアミノ酸

配列（配列番号5）の第590番目に対応するアミノ酸がアラニンからトレオニンに変異していることが明らかとなった。これらの変異も、TR251が β -グルカン高産生系統であることと関係がある可能性が考えられる。

[0094] （新たな β -グルカン欠失変異体の取得）

発明者らは、オオムギ品種サチホゴールデン（TN5）（野生型）の新たな β -グルカン欠失変異体を発見し、この変異体をKM27と命名した。そこで、サチホゴールデン及びKM27のHvCs1F6遺伝子の塩基配列を決定した。以下、KM27のHvCs1F6遺伝子を β -グルカン欠失遺伝子と呼ぶ。サチホゴールデンのHvCs1F6遺伝子のゲノムの塩基配列を配列番号15に、cDNAの塩基配列を配列番号16に、推定アミノ酸配列を配列番号17に示す。また、KM27の β -グルカン欠失遺伝子のゲノムの塩基配列を配列番号18に、cDNAの塩基配列を配列番号19に、推定アミノ酸配列を配列番号20に示す。

[0095] 図8に示すように、配列番号18に示すKM27の β -グルカン欠失遺伝子のゲノムの塩基配列の第2385番目の塩基が、この塩基に対応するサチホゴールデンのHvCs1F6遺伝子の塩基であるGからAに変異していることが明らかとなった。配列番号18の第2385番目の塩基は、配列番号19（KM27の β -グルカン欠失遺伝子のcDNAの塩基配列）においては、第758番目に対応する。また、この変異によって、配列番号20に示すKM27の β -グルカン欠失遺伝子がコードするアミノ酸配列の第253番目のアミノ酸が、このアミノ酸に対応する、サチホゴールデンのHvCs1F6タンパク上のアミノ酸残基であるシステインからチロシンに変異していることが明らかとなった。この変異は、OUM125及びニシノホシ（bg1）の β -グルカン欠失遺伝子において同定された変異とは異なるものである。

[0096] β -グルカン欠失性を示す、HvCs1F6遺伝子に変異を有する異なる2つの変異体が取得されたことは、HvCs1F6遺伝子が β -グルカン合成遺伝子であることのより強固な証拠である。

[0097] (HvCSLF6の立体構造の予測)

タンパク質立体構造予測ソフトのSOSUI (フリーウェア、<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)を用いて、HvCSLF6タンパク質の立体構造を予測した。図9に結果を示す。図9中、KM27において、システインがチロシンに変異した部位を(i)で示し、OUM125において、グリシンがアスパラギン酸に変異した部位を(ii)で示す。また、Dモチーフ及びQxxRWモチーフの位置をそれぞれD及びQxxRWとして示す。

[0098] (CAPS解析)

KM27と同じβ-グルカン欠失遺伝子のCAPS解析を行うために、以下のプライマー (CAPSマーカー) 5'-ATCAAGGAGCCCATCCTCTC-3' (HvCSLF6_MPP2-1F、配列番号21) 及び5'-TTGATCCTGGCCTTGA ACTC-3' (HvCSLF6_MPP2-1R、配列番号22) を作成した。

[0099] これらのプライマーを用いてオオムギのゲノムDNAをPCRすることにより、311bpの増幅断片が得られる。野生型の品種では、制限酵素Fnu4HIによる消化により、この増幅断片が、3、41、50、56、62及び99bpの6個の断片に切断される。これに対し、KM27と同じβ-グルカン欠失遺伝子を有する品種では、1塩基置換によりFnu4HI認識部位が1箇所なくなるため、Fnu4HIで消化した場合に、上記の増幅断片が、3、41、50、56及び161bpの5個の断片に切断される。Fnu4HI消化により生じるこれらの断片の差は電気泳動等により容易に識別可能である。なお、Fnu4HIの認識配列は5'-GCNGC-3'であり、Fnu4HI消化によって、5'-GC/NGC-3'の形に切断される。ここで、NはA、T、G又はCを意味する。Fnu4HIと同一の塩基配列を認識し、Fnu4HIと同じ形に切断する制限酵素として、BisI、BsoFI、Fsp4HI、ItaI、SatIなどが知られている。これらの制限酵素もFnu4HIと同様に使用可能である。

[0100] 図10に、CAPS解析によってKM27と同じ β -グルカン欠失遺伝子の有無を判別した結果を示す。ゲノムDNAを上記のプライマーでPCR増幅後、増幅断片を制限酵素Fnu4HIで切断し、アガロースゲル電気泳動した。レーンA～Fは、それぞれ、サチホゴールドン（野生型）、KM27（ β -グルカン欠失性）、サチホゴールドンとKM27のF1（ヘテロ型）、KM27（ β -グルカン欠失性）、ニシノホシ（bg1）（ β -グルカン欠失性）、サチホゴールドンとKM27のF1（ヘテロ型）のゲノムDNAを解析した結果である。

産業上の利用可能性

[0101] 本発明の利用により、生命科学分野における植物の β -グルカン合成に関わる遺伝子の解明が可能となる。 β -グルカン合成に関わる遺伝子が解明されれば、その結果を利用して、育種における β -グルカン含量の遺伝的制御が可能になると期待される。また、農業分野における β -グルカンを含まない醸造用・飼料用オオムギの品種育成が可能となる。またアラビノキシランの機能性を利用する食品への応用が可能となる。

請求の範囲

[請求項1]

以下の (a) ~ (h) の DNA :

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成される DNA ;

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成される DNA であって、当該タンパク質が、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 660 番目に対応するアミノ酸がグリシン以外のアミノ酸である DNA ;

(c) 配列番号 1 に記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成される DNA であって、当該タンパク質が、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号 2 のアミノ酸配列の第 660 番目に対応するアミノ酸がアスパラギン酸である DNA ; 及び

(d) 配列番号 1 に記載の塩基配列からなる DNA ;

(e) 配列番号 18 に記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成される DNA ;

(f) 配列番号 18 に記載の塩基配列と 90% 以上の同一性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成される DNA であって、当該タンパク質が、配列番号 20 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番

号20のアミノ酸配列の第253番目に対応するアミノ酸がシステイン以外のアミノ酸であるDNA；

(g) 配列番号18に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質が生成されるDNAであって、当該タンパク質が、配列番号20に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号20のアミノ酸配列の第253番目に対応するアミノ酸がチロシンであるDNA；及び

(h) 配列番号18に記載の塩基配列からなるDNA；

からなる群から選択される、 β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNA。

[請求項2]

以下の(a)～(f)のDNA；

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号2のアミノ酸配列の第660番目に対応するアミノ酸がグリシン以外のアミノ酸である、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質をコードするDNA；

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号2のアミノ酸配列の第660番目に対応するアミノ酸がアスパラギン酸である、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質をコードするDNA；及び

(c) 配列番号3に記載の塩基配列からなるDNA；

(d) 配列番号20に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号20のアミノ酸配列の第253番目に対応するアミノ酸がシステイン以外のアミノ酸である、 β -グルカン合成活性を欠失したタ

ンパク質をコードするDNA；

(e) 配列番号20に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号2のアミノ酸配列の第253番目に対応するアミノ酸がチロシンである、 β -グルカン合成活性を欠失したタンパク質をコードするDNA；及び

(f) 配列番号19に記載の塩基配列からなるDNA；

からなる群から選択される、 β -グルカン欠失遺伝子cDNA。

[請求項3]

以下の(a)～(d)のDNA；

(a) 配列番号4に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNA；

(b) 配列番号4に記載の塩基配列からなるDNA；

(c) 配列番号15に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、転写・翻訳された時に β -グルカン合成活性を有するタンパク質が生成されるDNA；及び

(d) 配列番号15に記載の塩基配列からなるDNA；

からなる群から選択される、 β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNA。

[請求項4]

(a) 配列番号6に記載の塩基配列と90%以上の相同性を有する塩基配列からなり、 β -グルカン合成活性を有するタンパク質をコードするDNA、又は(b)配列番号6に記載の塩基配列からなるDNA、からなる β -グルカン合成遺伝子cDNA。

[請求項5]

β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギの育種方法であって、

オオムギの7H染色体の動原体付近に座乗する配列番号4に記載の塩基配列からなるゲノムDNAの第4275番目に対応する塩基が、GからAに変異していた場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺

伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップ、又は
オオムギの7H染色体の動原体付近に座乗する配列番号4に記載の
塩基配列からなるゲノムDNAの第2385番目に対応する塩基が、
GからAに変異していた場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺
伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップ
を含む、育種方法。

[請求項6]

β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギの育種方法
であって、

オオムギから抽出したゲノムDNAを鋳型として、配列番号4に記
載の塩基配列の第4275番目に対応する塩基を含むDNA断片を増
幅する増幅ステップと、

増幅ステップで増幅されたDNA断片を、TaqI、BanI及び
NlaIVからなる群から選択される制限酵素で切断し、切断したD
NA断片を検出する検出ステップと、

検出ステップにおいて、DNA断片が制限酵素TaqIで切断され
た場合、又は制限酵素BanI若しくはNlaIVで切断されなかつ
た場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有
すると判別して選択する選択ステップと

を含む、育種方法。

[請求項7]

β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギの育種方法
であって、

オオムギから抽出したゲノムDNAを鋳型として、配列番号4に記
載の塩基配列の第2385番目に対応する塩基を含むDNA断片を増
幅する増幅ステップと、

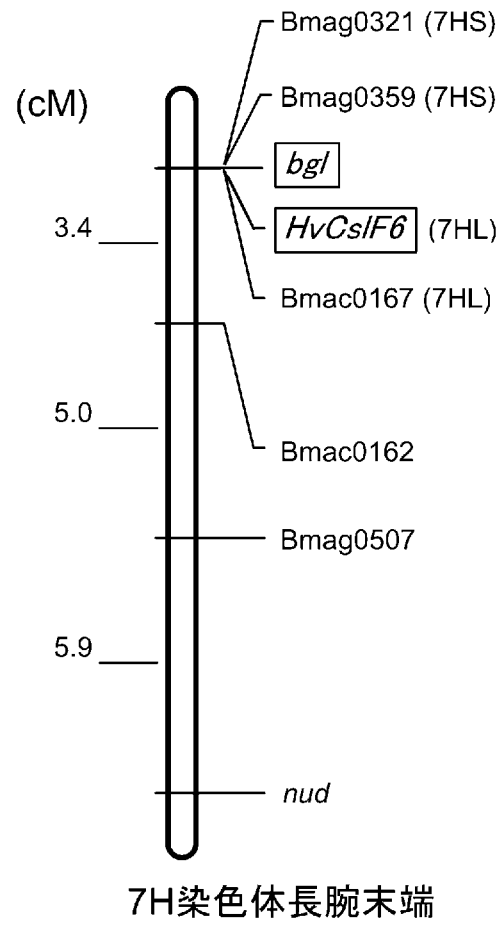
増幅ステップで増幅されたDNA断片を、制限酵素Fnu4HIで
切断し、切断したDNA断片を検出する検出ステップと、

検出ステップにおいて、DNA断片が、配列番号4に記載の塩基配
列の第2386番目に対応する塩基と第2387番目に対応する塩基

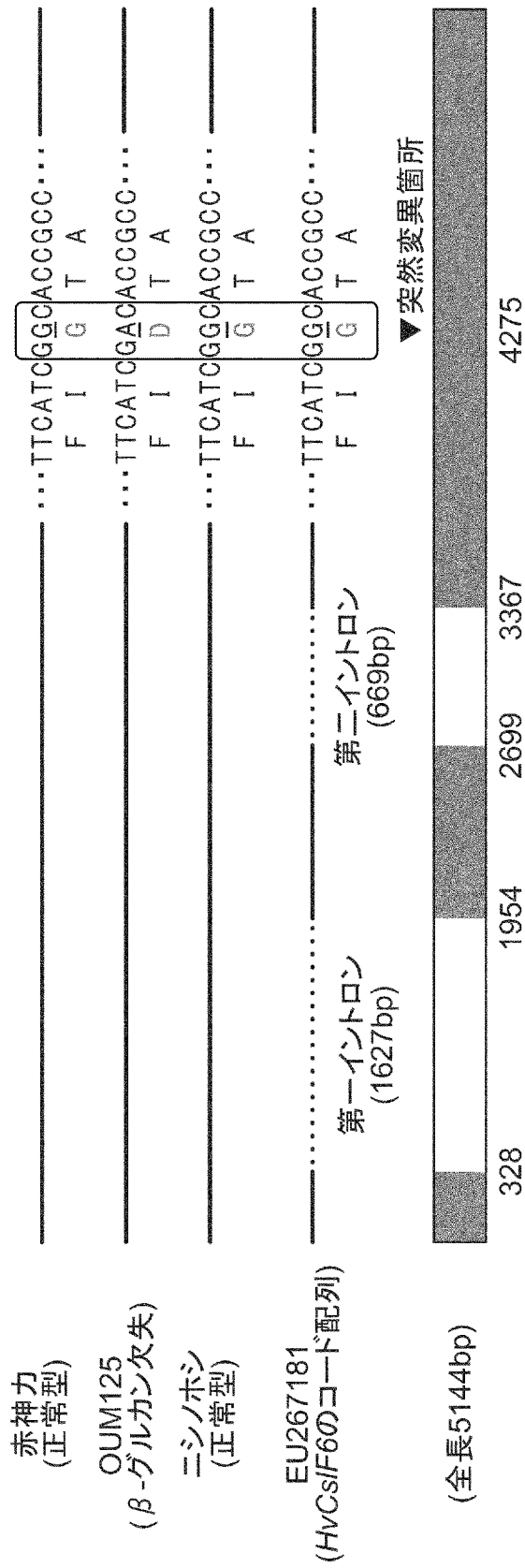
の間で切断されなかった場合に、前記オオムギは β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有すると判別して選択する選択ステップとを含む、育種方法。

- [請求項8] 請求項3に記載の β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAの発現を抑制するステップを含む、オオムギ穀粒の β -グルカンを減少又は欠失させる方法。
- [請求項9] 請求項8の方法によって得ることのできる、穀粒中の β -グルカンを減少又は欠失したオオムギ。
- [請求項10] 請求項5～7のいずれか一項に記載の育種方法によって育種された、請求項1に記載の β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAを有するオオムギ。
- [請求項11] 請求項5～7のいずれか一項に記載の育種方法によって育種された、請求項1に記載の β -グルカン欠失遺伝子ゲノムDNAをホモで有するオオムギ。
- [請求項12] 請求項3に記載の β -グルカン合成遺伝子ゲノムDNAを含むベクターを発現可能に保持する、形質転換体。
- [請求項13] 請求項4に記載の β -グルカン合成遺伝子cDNAを含むベクターを発現可能に保持する、形質転換体。
- [請求項14] 請求項9～11のいずれか一項に記載のオオムギ由来の穀粒を発酵させるステップを含む、アルコールの製造方法。
- [請求項15] 請求項9～11のいずれか一項に記載のオオムギ由来の穀粒を発酵させるステップを含む、発酵食品の製造方法。
- [請求項16] 請求項9～11のいずれか一項に記載のオオムギ由来の穀粒を含む、動物用飼料組成物。

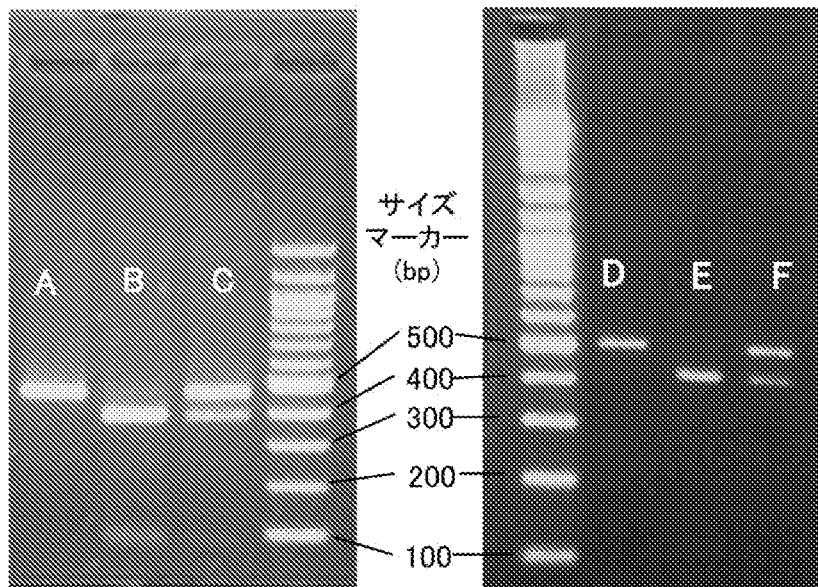
[図1]



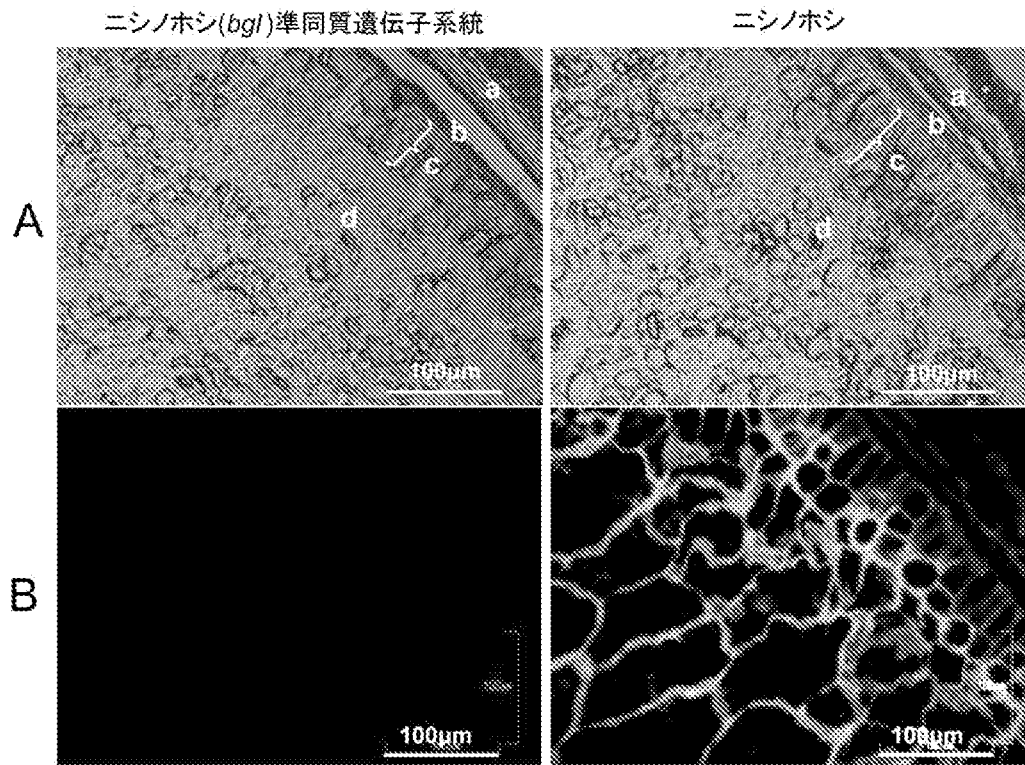
[図2]



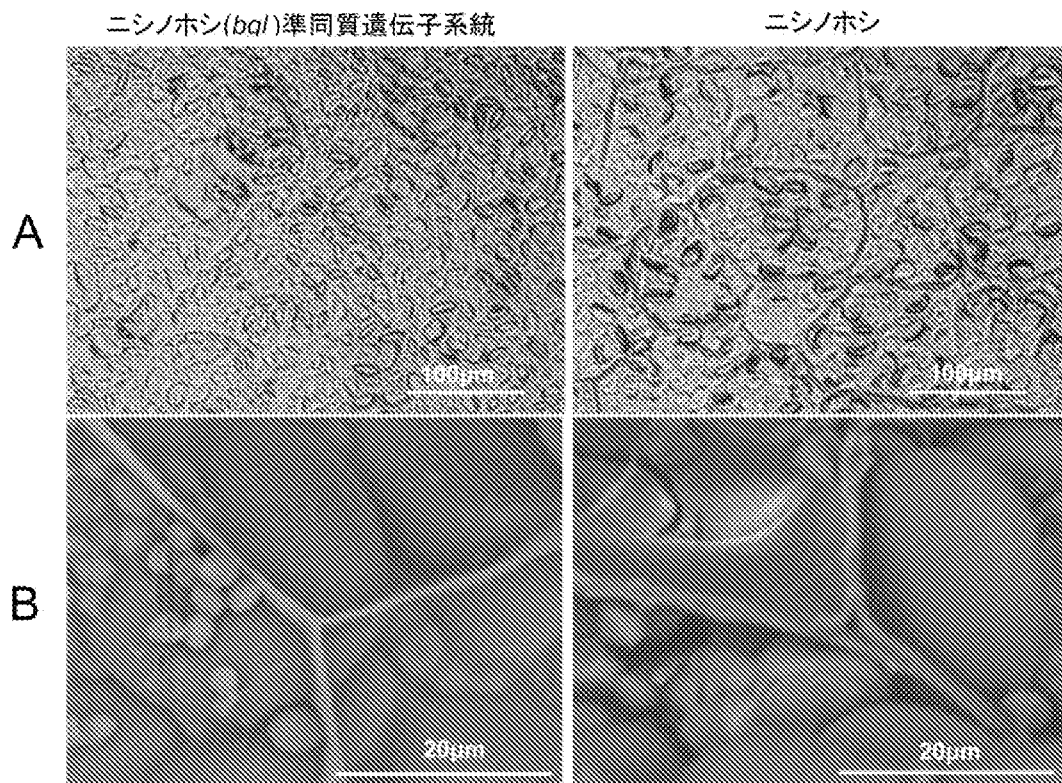
[図3]



[図4]



[図5]





TR251 (配列番号13) 1101: GCGATTGGCCGGTGGCTGCAGGGCCACAGCGGAGCAAGAGGCTTGTACGGTACTCAAACCGCTCAGTGCATGGCGATGCTACAGGGACTCAGGG 1200
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1093: GGCATTTGCCGGTGGGCTGCAGGGCCACAGCGGAGCAAGAGGCTTGTACGGTACTCAAACCGCTCAGTGCATGGCGATGCTACAGGGACTCAGGG 1192

TR251 (配列番号13) 1201: GCCACGCTGGCTGGGAGAGCAGCAGAAAAGGGCGAAGAAAAGAACTTTCTCTCAATCAAGGGCAACAACAGCACAAGCTCACAAGCCGCCACCA 1300
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1193: GCCACGCTGGCTGGGAGAGCAGCAGAAAAGGGCGAAGAAAAGAACTTTCTCTCAATCAAGGGCAACAACAGCACAAGCTCACAAGCCGCCACCA 1292

TR251 (配列番号13) 1301: AGTTAAGAAAAGAAAAAATACAGGCACTTCCGATAACAACAATAATCATCATCAGCACTCATGCCCGCGGCACTTTATTCTAGCGCCAGCT 1400
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1293: AGTTAAGAAAAGAAAAAATACAGGCACTTCCGATAACAACAATAATCATCATCAGCACTCATGCCCGCGGCACTTTATTCTAGCGCCAGCT 1392

TR251 (配列番号13) 1401: CCTCTCTACATTACACTTCTAACATATAAACAAATCAATCGGTGGAGGAGGAGGACCAATTAATTAATGGATTAGTAATAACAATTTCTATGCGAGCAAA 1500
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1393: CCTCTCTACATTACACTTCTAACATATAAACAAATCAATCGGTGGAGGAGGAGGACCAATTAATTAATGGATTAGTAATAACAATTTCTATGCGAGCAAA 1492

TR251 (配列番号13) 1501: AATAATCGTACTCCTGTACTAATAAGAAATCGGAAATGCAAGCTAATCAGAGCTACTGCGTAGCTACTAGTTTTCTTGGCGGGGAGGGGCATCACAAATCA 1600
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1493: AATAATCGTACTCCTGTACTAATAAGAAATCGGAAATGCAAGCTAATCAGAGCTACTGCGTAGCTACTAGTTTTCTTGGCGGGGAGGGGCATCACAAATCA 1592

TR251 (配列番号13) 1601: CATGGGACACGCGGGGCAAGAAATAGGTGGAAGCAACCTGGTAGGTAGGTGGGCTGCGGTTGCGGGGCAATATGATAAGCAATATGGGCTGGGCGGA 1700
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1593: CATGGGACACGCGGGGCAAGAAATAGGTGGAAGCAACCTGGTAGGTAGGTGGGCTGCGGTTGCGGGGCAATATGATAAGCAATATGGGCTGGGCGGA 1692

TR251 (配列番号13) 1701: GCATACACGGGTACATGCAATTTGCATACACCGAAGAGTGGTTGGCACCACCTACAATAAAGCGCACCAGCAGCGCTCAAAACAATTTACA 1800
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1693: GCATACACGGGTACATGCAATTTGCATACACCGAAGAGTGGTTGGCACCACCTACAATAAAGCGCACCAGCAGCGCTCAAAACAATTTACA 1792

TR251 (配列番号13) 1801: ACCCGCACACAGCTCAAACCGTTGGTGGATAGCTCAGCAAGCAGCTGGTGGTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCT 1900
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1793: ACCCGCACACAGCTCAAACCGTTGGTGGATAGCTCAGCAAGCAGCTGGTGGTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCTTGGCT 1892

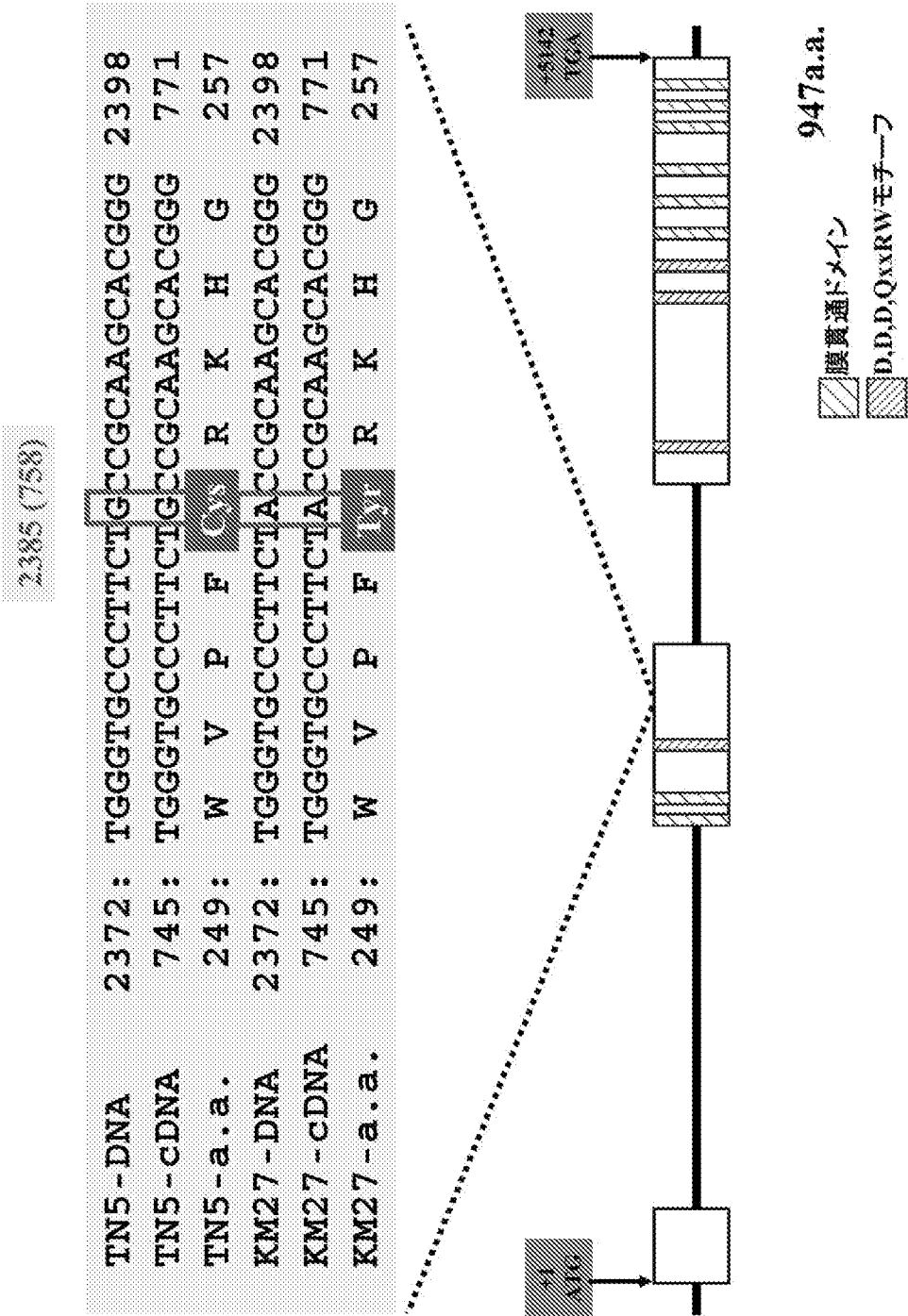
TR251 (配列番号13) 1901: CATCCAGCCATAAATCCCGCAGTACTTTACTCGTCAATTTCTCGCACCTCCTCCGCCCTCCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCT 2000
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1893: CATCCAGCCATAAATCCCGCAGTACTTTACTCGTCAATTTCTCGCACCTCCTCCGCCCTCCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCTCGCCCT 1992

TR251 (配列番号13) 2001: TCTCCCTGCATGCTAAAGGCTGCCCTCGGCCAATGGCTGAGCCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCT 2100
 CDC-Bo1d (配列番号14) 1993: TCTCCCTGCATGCTAAAGGCTGCCCTCGGCCAATGGCTGAGCCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCTTGGACCT 2092

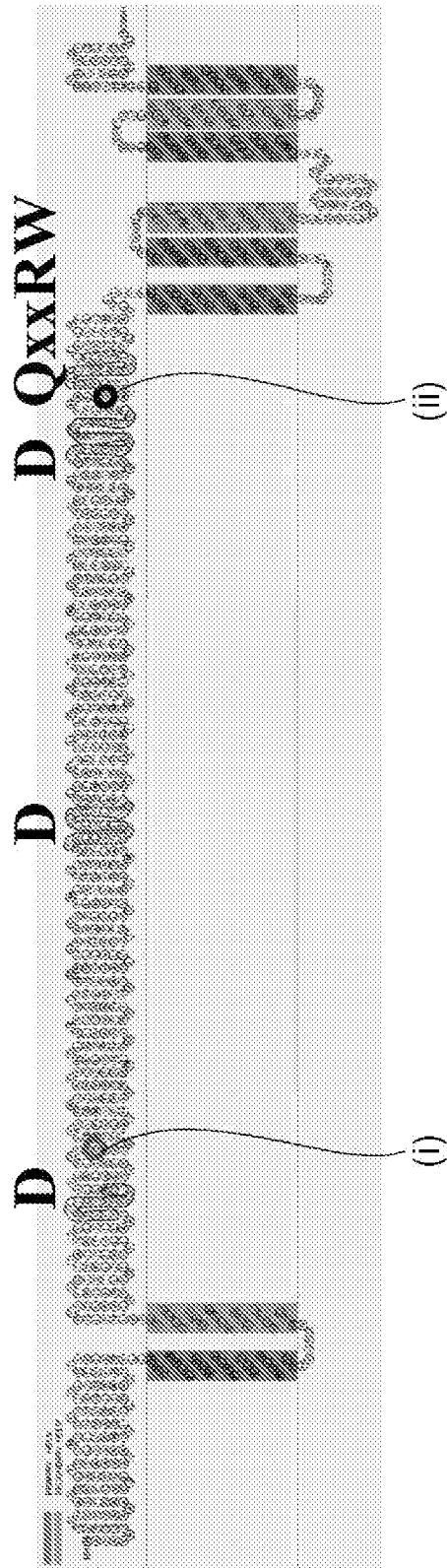
TR251 (配列番号13) 2101: TGCATTGAGGACGAGGCGCATGGCGCCAGCGGTGGCGGAGGGGCGCGGTGGCGGAGCAATGAGCGCGGTTGGCTGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 2200
 CDC-Bo1d (配列番号14) 2093: TGCATTGAGGACGAGGCGCATGGCGCCAGCGGTGGCGGAGGGGCGCGGTGGCGGAGCAATGAGCGCGGTTGGCTGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 2192

TR251 (配列番号13) 2201: GGCAGGCGCTGGCTGGGGCTTCCAGGTTTGGCGCTGCACGGGCTGGCGCGCGCGGTGGGCTCCGCCGCTCGGCTGGG----- 2279
 CDC-Bo1d (配列番号14) 2193: GGCAGGCGCTGGCTGGGGCTTCCAGGTTTGGCGCTGCACGGGCTGGCGCGCGCGGTGGGCTCCGCCGCTCGGCTGGG----- 2271

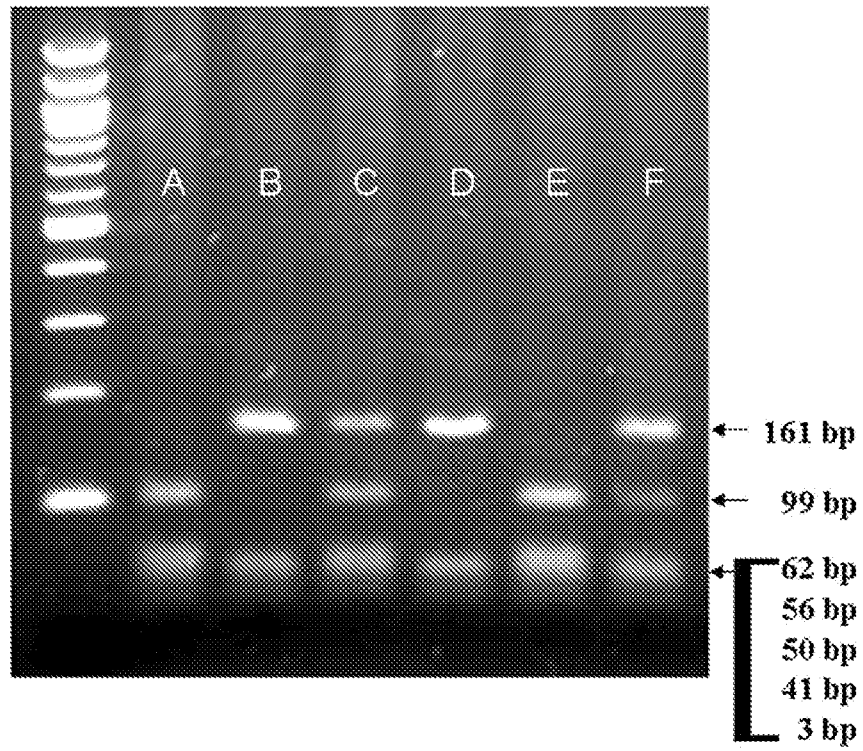
[図8]



[図9]



[10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052939

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A23K1/14(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, C12C11/00(2006.01)i, C12G3/12(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A01H1/00, A23K1/14, A23L1/30, C12C11/00, C12G3/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, CiNii		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y - A	WO 2007/014433 A1 (GRAINS RESEARCH & DEVELOPMENT CORP.), 08 February 2007 (08.02.2007), SUMMARY OF THE INVENTION; table 1; claims & JP 2009-502180 A & US 2008/0307549 A1 & EP 1920057 A	3, 4, 8, 9, 12, <u>13</u> 1, 2, <u>10</u> , 11, <u>14-16</u> 5-7
X Y - A	Takuji TONOOKA et al., "Omugi no β -glucan Kesshitsu Hen'i no Iden Yoshiki to Hainyu Saiboheki Kozo", [online] Heisei 19 Nendo 'Kanto Tokai Hokuriku Nogyo' Kenkyu Seika Joho, 28 August 2008 (28.08.2008), <URL> http://ss.inada.affrc.go.jp/chousei/shiryoku/kankou/seika/kanto19/10/19_10_40.html , [retrieval date 20 April 2010 (20.04.2010)], entire text	<u>10, 11, 14-16</u> <u>1, 2, 10, 11,</u> <u>14-16</u> 3-9, 12, 13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 April, 2010 (21.04.10)		Date of mailing of the international search report 11 May, 2010 (11.05.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/052939

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TONOOKA, T., et al., A novel mutant gene for (1-3,1-4)- β -D-glucanless grain on barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) chromosome 7H, <i>Breeding Science</i> , 2009.03, Vol. 59, No. 1, pp.47-54	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A23K1/14(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, C12C11/00(2006.01)i, C12G3/12(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A01H1/00, A23K1/14, A23L1/30, C12C11/00, C12G3/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, PubMed, CiNii

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	WO 2007/014433 A1 (GRAINS RESEARCH & DEVELOPMENT CORPORATION) 2007.02.08, SUMMARY OF THE INVENTION, TABLE 1, CLAIMS & JP 2009-502180 A & US 2008/0307549 A1 & EP 1920057 A	3, 4, 8, 9, 12, 13 1, 2, 10, 11, 14-16 5-7

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.04.2010

国際調査報告の発送日

11.05.2010

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	3959
太田 雄三		
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	塔野岡卓司ら, 大麦の β -グルカン欠失変異の遺伝様式と胚乳細胞壁構造, [online] 平成 19 年度「関東東海北陸農業」研究成果情報, 2008.08.28, 〈URL〉 http://ss.inada.affrc.go.jp/chousei/shiryuu/kankou/seika/kanto19/10/19_10_40.html , [検索日 2010.04.20]、全文	10, 11, 14-16 1, 2, 10, 11, 14-16 3-9, 12, 13
P, X	TONOOKA, T., et al., A novel mutant gene for (1-3, 1-4)- β -D-glucanless grain on barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.) chromosome 7H, <i>Breeding Science</i> , 2009.03, Vol. 59, No. 1, pp. 47-54	1-16