

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03007

研究課題名(和文) eQTL解析によるマツ材線虫病に対するクロマツの抵抗性機構の解明

研究課題名(英文) The resistance mechanism of Japanese black pine to pine wilt disease by eQTL analysis

研究代表者

平尾 知士 (Hirao, Tomonori)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等

研究者番号：90457763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：マツ材線虫病に対する抵抗性家系を対象としたRNAシーケンスデータから一塩基多型(SNP)を中心とする遺伝的変異を検出し、その情報を利用することでより高密度なクロマツの連鎖地図を構築した。さらにその連鎖地図情報と抵抗性家系における表現型情報との連鎖解析を行うことで、抵抗性形質に関わるより詳細な遺伝領域(QTL)の絞り込みが可能となった。また構築した連鎖地図情報と遺伝子発現情報を利用した関連解析(eQTL解析)を実施することで、遺伝子発現レベルで抵抗性形質に関わる遺伝子座を検出することができ、抵抗性形質とQTLとの関連性を遺伝子レベルで包括的に示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抵抗性の遺伝的要因と発現遺伝子の関連解析から抵抗性関連遺伝子群を特定するとともにゲノム上での制御関係を明らかにする遺伝子レベルでの包括的な研究の試みであり、マツ材線虫病における抵抗性及び発病機構解明に向けた新たな取り組みである。本研究において特定する抵抗性関連遺伝子群の情報は、その塩基配列情報、遺伝子発現情報、さらに推定上の遺伝子機能情報をもとに抵抗性反応に関わる生理及び生化学的防御反応といった表現形質レベルにおける抵抗性メカニズムの解明に繋がり、さらに抵抗性反応と対極に位置する感受性側の発病機構にも迫ることができる。

研究成果の概要(英文)：We detected genetic variants, mainly single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the RNA sequences of F1 family for resistance to pine wilt disease (PWD), and constructed a high-density linkage map of Japanese black pine. Linkage analysis between the constructed linkage map and phenotypic information obtained by the inoculation test enabled us to narrow down more detailed genetic regions (QTL) related to PWD resistance. Furthermore, it was possible to detect loci involved in PWD resistance for the gene expression level by performing association analysis (eQTL analysis) using the constructed linkage map information and gene expression information. The relationship between gene location on the genome and its regulation in genetic characteristics related to PWD resistance was comprehensively demonstrated.

研究分野：森林遺伝育種

キーワード：クロマツ マツ材線虫病 遺伝子発現 抵抗性 eQTL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) によるマツ材線虫病は今なお国内最大の森林病虫害であり、1978 年から現在までに約 4,000 万 m³ のマツ林が消失している。このマツ材線虫病に対応するため、マツノザイセンチュウ抵抗性育種が実施され、平成 30 年の時点で、クロマツ (*Pinus thunbergii*) で 183 個体、アカマツ (*Pinus densiflora*) で 246 個体の抵抗性個体が選抜されている。

これまでに多くの抵抗性個体が選抜されているが、その抵抗性形質に關与する遺伝的要因 (抵抗性遺伝子) は明らかにされていなかった。最近になり、EST (Expressed Sequence Tag) を中心とする DNA マーカーの拡充により遺伝学的なアプローチ (QTL 解析) が可能となり、抵抗性形質に対して寄与の大きい遺伝子 (座) の一つが第 3 連鎖群上にあることが分かってきた。(Hirao *et al.* 2019)。

遺伝学的なアプローチから抵抗性遺伝子座の特定を進める一方で、感受性クロマツ (一般的なクロマツ) と抵抗性クロマツを対象にしてマツ材線虫病の感染に伴う生体防御反応の違いを遺伝子発現レベルで明らかにする試みも進めてきた (Hirao *et al.* 2012)。しかし、これまでの研究から得られた結果は、あくまで抵抗性と感受性間の相対的な遺伝子発現パターンの比較から抵抗性反応を推察したにすぎず、抵抗性遺伝子がどのような遺伝子群を、どのように発現制御することで抵抗性反応を誘導しているのか、その直接的な関係性は解明できていなかった。

2. 研究の目的

Expression-QTL (eQTL) 解析は、遺伝子発現レベルを表現型とみなした QTL 解析によって対象形質に關連する遺伝子を検出するためのアプローチであり、DNA 配列上の変異に直結した遺伝子発現データを表現型として利用する点で、従来の遺伝子発現解析では十分に行えない遺伝子間制御関係の解明に適している方法である (松田ら 2013)。本アプローチを利用することで、マツ材線虫病抵抗性遺伝子がどのような遺伝子群を、どのように発現制御することで抵抗性反応を誘導しているのか、その直接的な制御関係を解明できる。

本研究では、マツ材線虫病に対するクロマツの抵抗性機構を遺伝子レベルで包括的に解明することを目的として、eQTL 解析を試みることで遺伝子発現レベルにおける抵抗性關連遺伝子群の特定と抵抗性遺伝子との制御関係をゲノム上で明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 材料

抵抗性家系

抵抗性家系については、抵抗性品種間の人工交配家系 F₁ 96 個体を対象とした。これらの材料については、森林総合研究所林木育種センター (茨城県) で線虫の接種検定とサンプリングを実施した。サンプリングについては線虫接種前の針葉サンプルを採取するとともに、サンプル収集後に各個体にマツノザイセンチュウ (アイソレイト Ka4) を個体あたり 5,000 頭ずつ接種した。表現形質は 1 週間おきに接種後 10 週目まで 5 段階評価で病徴を評価するとともに、接種後 1 週目については RNA シーケンスに供試する針葉サンプルを採取した。

② 抵抗性クローン

抵抗性クローンについては、遺伝的関係性のない抵抗性クローン 48 クローン (コントロールを含めて 1 クローンあたり各 4 クローン合計 192 クローン) を対象とした。これらの材料については、森林総合研究所林木育種センター九州育種場 (熊本県) で接ぎ木によるクローン増殖を行い、線虫の接種検定とサンプリングを実施した。サンプリングについては線虫接種前の針葉サンプルを採取するとともに、サンプル収集後に各クローンにマツノザイセンチュウ (アイソレイト Ka4) を個体あたり 10,000 頭ずつ接種した。表現形質は 1 週間おきに接種後 10 週目まで 5 段階評価で病徴を評価するとともに、接種後 1 週目および 2 週目については RNA シーケンスに供試する針葉サンプルを採取した。

(2) RNA シーケンス

収集した針葉サンプルについて、抵抗性 F₁ 家系 96 個体は線虫接種前および線虫接種後 7 日目の計 192 サンプルから Total RNA を抽出し、ライブラリー作成後、イルミナ社製次世代シーケンサーを利用して 100-150bp のペアエンドで RNA シーケンスを行った。各サンプルにおいて、約 30M-40M リード相当のシーケンス情報を収集した。抵抗性クローン 48 クローンは線虫接種前及び接種後 14 日目の 96 サンプルについて Total RNA を抽出し、イルミナ社製次世代シーケンサーを利用して 150bp のペアエンドで RNA シーケンスを行った。各サンプルは、約 30M リード相当のシーケンス情報を収集した。

(3) 高密度連鎖地図の構築及び QTL 解析

抵抗性 F₁ 家系 96 個体における線虫接種前の RNA シーケンスのデータを利用し、クロマツの EST リファレンス配列にマッピングし、一塩基多型 (SNP) を含む遺伝的変異を検出した。検出した変異情報をもとに、遺伝連鎖地図作成ソフト (JoinMap 4.0) を利用して連鎖地

図の構築を行った。さらに、接種検定により得られた表現形質の情報（生存もしくは枯死のバイナリデータ）とともに QTL 解析を行うことで、抵抗性形質に寄与する遺伝子座を検出した。

(4) eQTL 解析

抵抗性 F_1 家系を対象とした eQTL 解析では、表現形質の情報をもとにグルーピングした抵抗性グループと感受性グループ間で遺伝子発現量が 2 倍以上の発現比を示す遺伝子を抽出し、クラスタリング解析を行うことで、グループ間で特徴的な発現パターンを示すクラスターの絞り込みを行った。抵抗性クローンについては、抵抗性家系と同様に遺伝子発現量の違いによる絞り込みとクラスタリングを行うことで、抵抗性クローンに特徴的な候補遺伝子の絞り込みを行った。各サンプル群において、絞り込みを行った遺伝子群は、遺伝子構成の比較を行い、さらにその遺伝子発現量の情報をもとに抵抗性家系において eQTL 解析を行った。

4. 研究成果

(1) クロマツにおける高密度連鎖地図の構築及び抵抗性領域の特定

抵抗性 F_1 家系 96 個体における線虫接種前の RNA シーケンスのデータを利用し、クロマツの EST リファレンス配列にマッピングした結果、3,556,993 サイトにおいて多型が検出でき、そのうちメンデル遺伝を示す 10,679 サイトの遺伝的変異をもとにクロマツにおける高密度連鎖地図の構築を試みた。10,679 サイトの変異のうち、3,286 サイト（遺伝子座）はクロマツの基本染色体数にあたる 12 本の連鎖群に収束し、全長 1531.2 cM、マーカー間密度は 0.47 cM の高密度な連鎖地図を構築することができた（図 1）。この連鎖地図情報をもとに、QTL 解析を行った結果、第 3 連鎖群に抵抗性形質に関連する遺伝子座をより明確に検出することができた。先行研究において、抵抗性形質に関連する QTL が第 3 連鎖群に座乗していることを明らかにしていたが、本研究で構築した高密度な連鎖地図の情報によって、抵抗性遺伝子座の領域をより詳細に絞り込むことができた。

(2) eQTL 領域の特定

抵抗性 F_1 家系を対象とした eQTL 解析では、抵抗性グループと感受性グループ間での遺伝子発現量の比較から 2 倍以上の発現比を示す 2,223 遺伝子を抽出し、さらにクラスタリング解析から特徴的な発現パターンを示した 3 つのクラスターから 296 遺伝子を絞り込んだ。この 296 遺伝子について、その遺伝子発現量の情報をもとに eQTL 解析を行った結果、40 遺伝子座で eQTL 領域を検出した（図 2）。検出した eQTL 領域はほぼすべての連鎖群上に検出されたが、第 3 連鎖群や第 7 連鎖群では他の連鎖群と比較して、多くの eQTL 領域を検出した。本研究において対象とした抵抗性 F_1 家系では、抵抗性形質に関する QTL は第 3 連鎖群上に座乗しており、遺伝子発現量やその発現パターンにおいても第 3 連鎖群上の遺伝子が抵抗性に寄与している可能性が示唆された。

本研究を開始する以前は、クロマツの連鎖地図は約 400 個の遺伝子上の SNP マーカーをもとに構築されたラフマップの状態にあり、クロマツのゲノム骨格を反映した精度の高い連鎖地図とは言い難かった。巨大かつ複雑なゲノム構造を持つ針葉樹種において、発現している遺伝子をターゲットにした RNA シーケンスのデータは、ゲノム中のジャンクな配列が除去され、生物学的な機能に直結する配列のみをターゲットにできる効率的かつ効果的なデータである。RNA シーケンスデータから遺伝子発現情報と遺伝的多型情報（SNP 情報等）の収集、さらにそれらの情報を利用した遺伝解析までのストラテジーを確立したことで、これまで非常に粗であったクロマツの連鎖地図の高密度化を図ることができ、当初の計画以上にマツ材線虫病抵抗性に関連する遺伝子群とその領域を特定することができた。本研究により、ゲノムサイズが巨大かつヘテロ性の高い針葉樹種（例えば、海外で同じマツ材線虫病で被害が発生しているマツ属樹木や日本の固有種であるヒノキやアカマツなど）やゲノム情報が不足している生物種に適用可能な新たな遺伝学的アプローチを提示することができた。

< 引用文献 >

Hirao, T., Fukatsu, E., and Watanabe, A. (2012). Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biol.* 12:13.

Hirao, T., Matsunaga, K., Hirakawa, H., Shirasawa, K., Isoda, K., Mishima, K., et al. (2019). Construction of genetic linkage map and identification of a novel major locus for resistance to pine wood nematode in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *BMC Plant Biol.* 19:424.

松田洋和・谷口幸雄・祝前博明 (2013) 代表的なゲノム育種価予測法と生物学的知識を用いたアプローチの現状. *The Journal of Animal Genetics* 41: 93-99

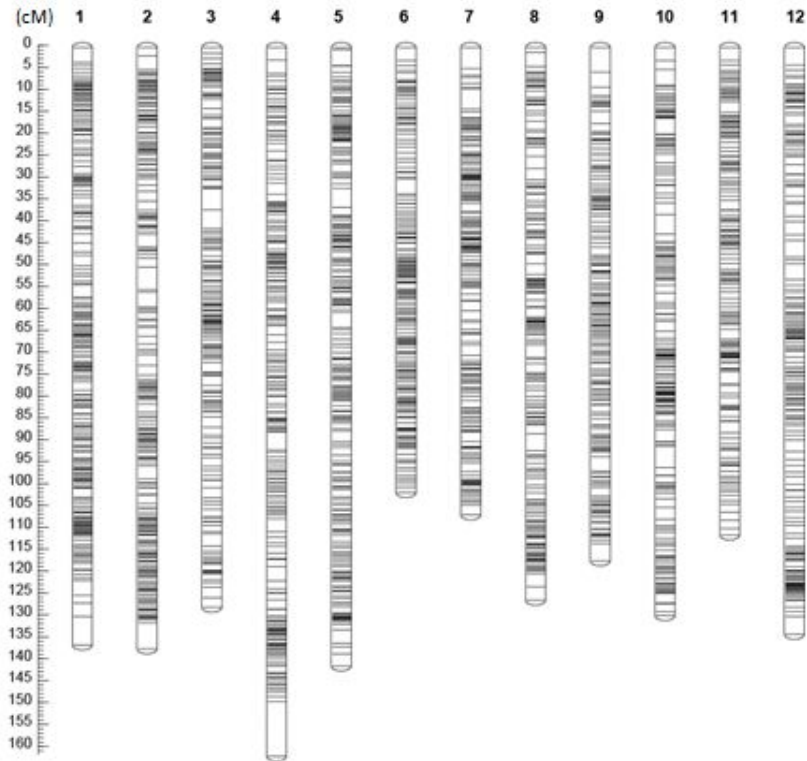


図1 遺伝子領域のSNPを主体としたクロマツの高密度連鎖地図

発現遺伝子上の遺伝的変異を検出し、それをもとにクロマツの高密度連鎖地図を構築した。

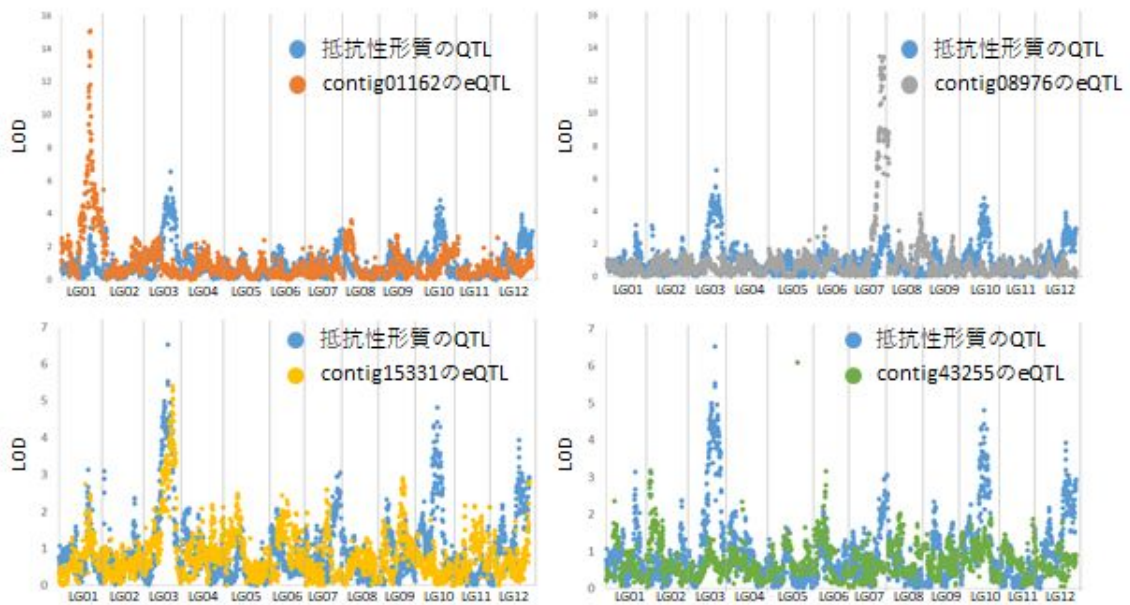


図2 抵抗性家系において検出したeQTL領域の一部

遺伝子を主体とした高密度連鎖地図の情報をもとに検出した抵抗性のQTL（抵抗性形質に寄与する遺伝子座）とeQTL（遺伝子発現量に寄与する遺伝子座）を検出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平尾知士、平川英樹、松永孝治、三嶋賢太郎、能勢美峰
2. 発表標題 クロマツにおけるRNA-Seqデータからの高密度連鎖地図の作製
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松永 孝治 (Matsunaga Koji) (40415039)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等 (82105)	
研究分担者	岩泉 正和 (Iwaizumi Masakazu) (50391701)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------