

機関番号：82105

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780156

研究課題名 (和文) 比較ゲノムを利用したマツ属植物からのマツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子の単離

研究課題名 (英文) Isolation of pine wood nematode resistance gene in pines by comparative genomics

研究代表者

平尾 知士 (HIRAO TOMONORI)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・研究員

研究者番号：90457763

研究成果の概要 (和文)：栽培作物における線虫抵抗性遺伝子の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報を利用して、比較ゲノムによってマツ属植物における抵抗性候補遺伝子を単離した。単離した候補遺伝子は、クロマツの抵抗性個体および感受性個体、さらに抵抗性と感受性個体の人工交配家系を利用して遺伝子型と表現形質 (抵抗性形質) の関連解析を行い、マツノザイセンチュウ抵抗性形質と関係する遺伝子座の特定を行った。

研究成果の概要 (英文)：To isolate resistance genes in *Pinus thunbergii* against the pine wood nematode (PWN), the comparative genomic approaches was conducted using the sequence information of nematode resistance gene (NR-gene) in cultivated crop. The isolated candidate gene was evaluated by an association analysis between genotype and phenotype using the resistant variety, the susceptible variety, and the artificial mating population. As a result, the isolated alleles in resistant variety showed an effective association with resistance against the PWN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：比較ゲノム, クロマツ, マツノザイセンチュウ, 抵抗性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マツノザイセンチュウを原因とするマツ枯れの被害は依然として継続しており、日本全国の激害地では抵抗性マツの導入が求められている。マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業では、これまでに激害地からの抵抗性候補木選抜と接種検定から抵抗性クロマツとアカマツの品種開発を進めてきた。しかし、現在の選抜方法は選抜効率が低く、抵抗

性品種の開発までに8年間という長い年月を必要としている。そこで、より効率的にかつ早期に抵抗性個体が選抜できる MAS (Marker Assisted Selection) や GAS (Gene Assisted Selection) の導入を目指し、マツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子の単離を試みている。現在では、分子生物学的手法から生体防御関連遺伝子が数多く単離され、分子遺伝学的手法からは抵抗性形質との関連解析が進められている。しかしながら、未だマツノザイセ

ンチュウ抵抗性遺伝子は単離されていない。

(2) 被子植物を中心とした栽培作物では、すでに線虫抵抗性遺伝子の単離が行われている。例えば、ジャガイモ、トマト、ダイズではQTL解析やマップベースクローニングから抵抗性形質と関連する遺伝子が特定され、交雑や遺伝子組換えによって抵抗性遺伝子の導入が行われている。最近では、線虫抵抗性遺伝子が他の病害虫抵抗性にも関連していることや抵抗性遺伝子の発現が下流の生体防御関連遺伝子群の発現トリガーとなっていること、さらに抵抗性遺伝子のほとんどがNBS (Nucleotide-Binding Site)-LRR (Leucine-Rich Repeat)といった共通のドメイン構造を持ち、同じようなドメイン構造を持つ遺伝子がテーダマツといった異なる種にも存在していることが分かっている。これらの特徴から、抵抗性遺伝子として認識されている構造遺伝子は植物種において生体防御反応の中核を担い、さらにそれらの遺伝子は種を超えて高度に保存されていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、比較ゲノムを利用して栽培作物で単離されている線虫抵抗性遺伝子 (Nematode Resistance gene; NR-gene) をマツ属植物で単離し、マツノザイセンチュウ抵抗性との関連を検証することで、クロマツにおけるマツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子を特定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 比較ゲノムによる候補遺伝子の抽出

本研究では、まずDDBJ/EMBL/GenBankに登録されている栽培作物の線虫抵抗性遺伝子をもとにアミノ酸配列を利用して、マツ属植物の遺伝子発現データベース (DFCI Pine Gene Index) から相同性の高いNBS-LRR遺伝子を単離した。

### (2) 塩基配列情報の取得

単離したNBS-LRR遺伝子については、NBSドメインの中でも保存性の高いモチーフをターゲットにして、degenerateプライマーを設計した。さらに、マツのザイセンチュウを接種した抵抗性および感受性クロマツのcDNAを利用してPCR増幅を行い、得られたフラグメントについてクローニングを行った後、任意に200クロンのシーケンスを行った。

### (3) 単離した発現遺伝子の全長決定

得られたシーケンス情報にもとづいてク

ラスター解析を行い、抵抗性および感受性クロマツで特異的に観察されたクローンが属するクラスターについては、クラスター単位で3´RACEおよび5´RACEを行い、遺伝子の全長を決定し、アミノ酸構造を明らかにした。

### (4) 遺伝子型と表現形質の関連解析

全長を決定した抵抗性および感受性の遺伝子についてはspecificプライマーを作成し、抵抗性および感受性個体の人工交配によって得られた1家系113個体について遺伝子型と表現形質 (抵抗性形質) の関連解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 比較ゲノムによる候補遺伝子の抽出

ジャガイモから単離されている寄生性線虫抵抗性遺伝子 (Gro1-4) のアミノ酸配列をもとに、Blast解析からマツ属植物 (*Pinus monticola*, *P. taeda*, *P. radiata*) のNBS (Nucleotide-Binding Site)-LRR (Leucine-Rich Repeat) 遺伝子を抽出した (図-1)。抽出したNBS-LRR遺伝子の構造比較を行った結果、NBSドメインには、Kinase 1a, P-loop motif や Kinase 2, Kinase 3a など保存性の高いモチーフが存在した。

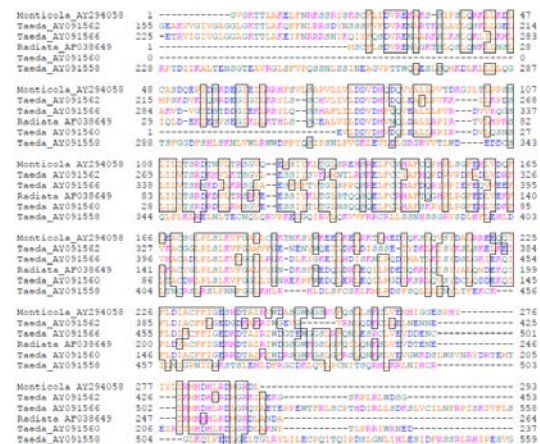


図-1 マツ属植物から抽出したNBS-LRR遺伝子の比較解析

### (2) 塩基配列情報の取得

比較解析によって、NBSドメインの中でも特に保存性が高かったGKTTLAKモチーフおよびLPLSLKVモチーフをもとにdegenerateプライマーを設計し、さらにそれを利用して、クロマツの抵抗性および感受性個体のコントロールサンプル (非接種サンプル) および接種後3日目、7日目のcDNAを利用してPCR増幅を行った。その結果、500bp付近に顕著

なフラグメントが認められた (図-2)。

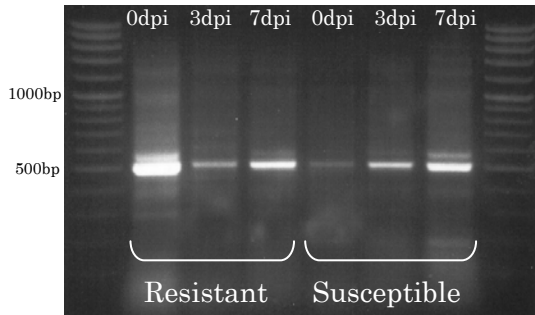


図-2 Degenerate プライマーによって得られた PCR フラグメント

各時系列で得られた抵抗性および感受性のフラグメントについては、クローニングを行い、任意に選抜した 200 クローンについてシーケンスを決定した。その結果、151 個の独立したクローンが得られ、シロイヌナズナで報告されているように、クロマツで単離した NBS-LRR 遺伝子はスーパーファミリーを構成していることが分かった (図-3)。

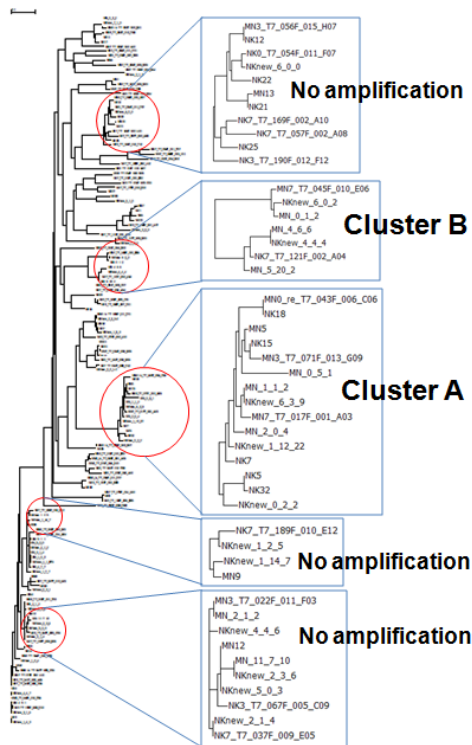


図-3 Degenerate プライマーによって得られたシーケンスのクラスター解析

### (3) 単離した発現遺伝子の全長決定

151 個の独立したクローンについてクラスター解析を行い、2 つのクラスターに属する NBS-LRR 遺伝子について 3' RACE および 5' RACE を行い、抵抗性および感受性個体のそれぞれで遺伝子の全長を決定し、アミノ酸構造を明らかにした (図-4)。

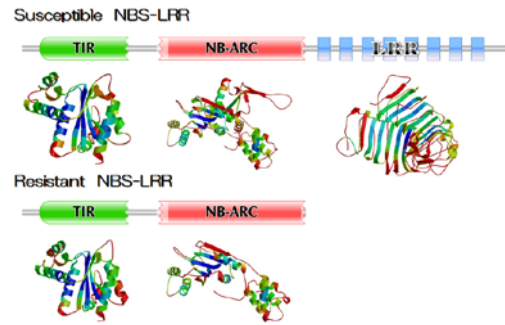


図-4 clusterA に属する抵抗性および感受性個体の NBS-LRR 遺伝子の構造

clusterA に属する抵抗性個体の NBS-LRR 遺伝子は、N 末端側に TIR (Toll/interleukin 1 Receptor) のドメインを保有し、さらに NBS ドメインも認められた。しかし、LRR ドメインは保有しなかった。一方で、感受性個体で得られた NBS-LRR は、抵抗性個体と同様に C 末端側に TIR ドメインを保有し、さらに NBS-LRR のドメインも保有することが分かった。

### (4) 遺伝子型と表現形質の関連解析

発現している遺伝子の全長を決定した抵抗性および感受性個体の TIR-NBS および TIR-NBS-LRR 遺伝子について specific プライマーを作成し、抵抗性個体および感受性個体の人工交配家系 113 個体について表現型 (抵抗性形質) と遺伝子型の関連解析を行った。

人工交配家系 113 個体における表現形質の評価は、マツノザイセンチュウ (アイソレート: Ka-4) を 2 年生実生個体に 5,000 頭を接種し、接種後 10 週後の生存/枯死で抵抗性と感受性個体を分類した。その結果、抵抗性個体は 55 個体、感受性個体については 58 個体であることが分かり、表現形質では抵抗性個体と感受性個体が約 1:1 に分離することが分かった。

抵抗性個体で単離した TIR-NBS 遺伝子 (座) は 1:1 に分離し、さらに分離したアレルの一方は、抵抗性形質と有意に相関が認められた。一方で、感受性個体で単離した TIR-NBS-LRR 遺伝子 (座) についても 1:1 に分離するものの、抵抗性形質とは有意な相関は認められなかった (図-5)。

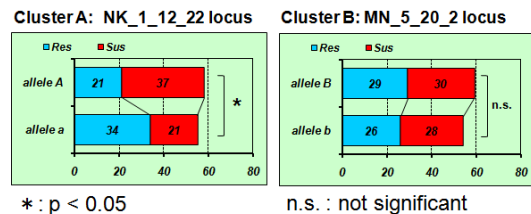


図-5 抵抗性および感受性で得られた遺伝子座の家系内の分離と表現形質との関連 Res (青): 抵抗性個体の数、Sus (赤): 感受性個体の数を示す。

## (5) まとめ

本研究では、比較ゲノムを利用してマツ属植物からマツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子の単離を試みた。本研究で単離したクロマツ抵抗性個体の TIR-NBS 遺伝子は、LRR 部分を大きく欠失し、さらに抵抗性形質と関連することが分かったが、以前として単離した遺伝子だけでは抵抗性形質との関連を完全に説明できるまでには至っていない。また、発現している遺伝子の全長を明らかにした一方で、ゲノム上での構造は明らかにしていない。NBS-LRR 遺伝子では選択的スプライシングによって発現している遺伝子に構造的な変異が生じることが報告されているため、今後はゲノム上での構造解析、さらに他のクラスターで検出される遺伝子（座）についても解析を進め、抵抗性形質との関連性について明らかにしていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 楠本大、米道学、村田政穂、渡辺敦史、磯田圭哉、平尾知士、山田利博、材線虫病抵抗性マツ類における組織の反応と線虫の分布・増殖、樹木医学研究、査読有、14 巻、3 号、2010、pp. 98-100

[学会発表] (計 5 件)

- ① 平尾知士、マツノザイセンチュウ抵抗性防御メカニズム解明に向けたトランスクリプトーム解析、第122回日本森林学会、2011年3月26日、静岡大学（静岡県）
- ② 平尾知士、マツノザイセンチュウ感染に伴う抵抗性および感受性クロマツのトランスクリプトーム解析、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日、東北大学（宮城県）
- ③ 平尾知士、Differential Gene Expression Of Pine Wood Nematode-Resistant And -Susceptible Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii*) In Response To PW N Infection, Plant & Animal Genomes XIX Conference, 2011年1月15-19日、サンディエゴ（アメリカ合衆国）
- ④ 平尾知士、クロマツにおけるマツノザイセンチュウ生体防御関連遺伝子の発現プロファイリング、2010年度日本植物生理学会、2010年3月19日、熊本大学（熊本県）
- ⑤ 平尾知士、Gene Expression Profiling in *Pinus thunbergii* Defence Response

s To Nematode Infection, Plant and Animal Genome XVIII, 2010年1月9-13日、サンディエゴ（アメリカ合衆国）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平尾 知士 (HIRAO TOMONORI)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・研究員

研究者番号：90457763

### (2) 研究協力者

渡邊 敦史 (WATANABE ATSUSHI)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター育種部・研究室長

研究者番号：10360471