

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：82105
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23780170
 研究課題名（和文） エリシター受容体遺伝子をターゲットにした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 the receptor gene to Pine Wood Nematode in *Pinus thunbergii*
 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）：本研究は、植物免疫システムの上流部に位置するエリシター受容体遺伝子（LRR 遺伝子）に着目し、クロマツの抵抗性および感受性個体から当該遺伝子を単離した。さらに実生後代における遺伝子型と表現形質の関連性を検証し、マツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子の単離を試みた。本研究で単離した遺伝子と抵抗性形質との関連を検証した結果、本研究で単離した遺伝子は抵抗性形質と有意な相関はなく、異なる遺伝子座が抵抗性形質に関係していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：To isolate receptor gene (LRR-gene) to pine wood nematode (PWN) in *Pinus thunbergii*, the comparative genomic approach was conducted using the sequence information of nematode resistance gene (NR-gene) in cultivated crop. The isolated candidate gene was evaluated by QRL (Quantitative Resistance Loci) analysis between genotype and phenotype using the resistant F1 family. As a result, the significant QTL was not detected at receptor genes isolated in this study, but one putative QTL affecting PWN resistance was detected on the linkage group 1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：エリシター受容体遺伝子，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

マツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) を原因とするマツ枯れの被害は依然として拡大しており、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。これまでにマツノザイセンチュウによって被害を受けた激害地から抵抗性候補木の選抜が行われ、クロマツ (*Pinus thunbergii*) では110個体が選抜され、育種による抵抗性品種の開発が進められつつある。しかし、依然として抵抗性遺伝子をはじめとする抵抗性個体の遺伝的バックグラウンドは明らかにさ

れていない。

栽培作物では、すでに線虫抵抗性遺伝子 (Nematode Resistance Gene; NR-gene) が単離されている。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 (例えば Gro1-4, Mi-1, Rhg4, Rhg1) が特定され、その多くが NBS (Nucleotide-Binding Site) -LRR (Leucine-Rich Repeat) 遺伝子もしくは LRR 遺伝子であると考えられている。植物は病原体の侵入に対して、大きく2つの認識経路を介して植物免疫システムを発動していると考えられている。植物免疫システ

ムの上流部には、細胞膜貫通型の LRR 遺伝子と原形質中に存在する NBS-LRR 遺伝子が発現・機能しており、病原体のエリクター・エフェクターを認識・受容することで、生体防御反応を開始する。

これまでに申請者は、栽培作物で単離されてきた NBS-LRR 遺伝子の情報をもとに、クロマツにおけるマツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子の単離を進めてきた。その成果として、単離した NBS-LRR クラスの遺伝子が抵抗性形質と有意に関連があることを明らかにした。しかしながら、依然としてそれらの遺伝子だけで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。

上述のように植物免疫システムの上流部では NBS-LRR 型遺伝子だけではなく、LRR 型の遺伝子がエリクターの認識に関与することが分かっている。最近ではイネやシロイヌナズナで LRR 型タンパク質で認識されたシグナルが NSB-LRR 型タンパク質のエリクター認識を活性化することも分かってきた。これまでに申請者が得てきた知見と先行研究の知見を合わせて推察すると、マツノザイセンチュウに対する抵抗性には NBS-LRR 型遺伝子だけでなく、LRR 型遺伝子も関与している可能性が極めて高い。

2. 研究の目的

本研究では、栽培作物で単離されている線虫抵抗性遺伝子のうち、膜貫通型の LRR 遺伝子をターゲットにして、以下二つのアプローチからマツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子を特定する。

①クロマツの抵抗性および感受性個体から LRR 遺伝子を単離し、抵抗性および感受性個体それぞれについて特異的な変異を検出する。

②検出した特異的な変異について DNA マーカー化し、抵抗性交配家系における遺伝子型と表現形質との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BLAST 解析による LRR 遺伝子の抽出

栽培作物で単離されている LRR 遺伝子のうち、保存性が高い kinase ドメインの塩基配列情報を利用して、TGI データベースに登録されているマツ (*Pinus*) およびトウヒ

(*Spruce*) の EST 配列から相同性の高い配列を抽出した。さらに、抽出したマツおよびトウヒの LRR 遺伝子をアライメントした後、保存性の高いモチーフをもとにディジェンレイトプライマーを設計した。

(2) クロマツにおける NBS-LRR 遺伝子の単離 マツノザイセンチュウを接種した抵抗性

および感受性個体の cDNA を用いて、作成したディジェンレイトプライマーで PCR を行った。増幅した PCR 産物については、クローニングを行い、抵抗性および感受性個体それぞれ 96 クローンシーケンスした。

(3) RACE 法による多型検出

決定した塩基配列情報をもとに 3' RACE プライマーを作成し、抵抗性および感受性個体の cDNA を用いて、3' 末端側の塩基配列を決定した。RACE で決定した抵抗性および感受性個体の塩基配列から抵抗性個体に特異的な変異 (SNP) を検出し、SNP マーカーの作成を行った。

(4) 抵抗性形質との関連解析

抵抗性家系 96 個体に対し、マツノザイセンチュウを接種し、抵抗性形質を 5 段階で評価した。さらに作成した SNP マーカーおよびクロマツの連鎖地図情報を利用して、クロマツにおける LRR 遺伝子のゲノム上での位置を特定した。さらに抵抗性個体の連鎖地図と形質情報を利用して、QTL 解析から抵抗性形質との関連性について検証した。

4. 研究成果

(1) クロマツにおける LRR 遺伝子

ディジェネレイトプライマーを利用して抵抗性および感受性個体から LRR 遺伝子を単離した。単離した遺伝子はファミリーを構成しており、大きく 2 つのクラスターに分かれた (図-1)。

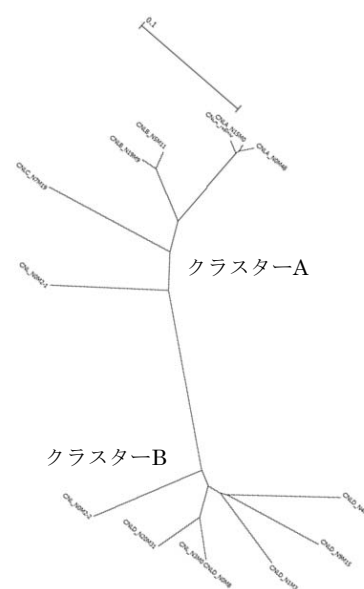


図-1. クロマツから単離した LRR 遺伝子のクラスターリング

(2) LRR 遺伝子の染色体上での位置

抵抗性および感受性個体の cDNA を用いて、3' 末端側の塩基配列を決定した。RACE で決定した抵抗性および感受性個体の塩基配列から抵抗性個体に特異的変異 (SNP) を検出し、DNA マーカーの作成を行った。さらに作成した DNA マーカーをクロマツのベースマップ上にマッピングした。大きく分岐した 2 つのクラスターに該当する遺伝子群は、異なる染色体上に座乗することが分かり、各クラスターに属する遺伝子群はそれぞれ近傍に位置することが分かった (図-2)。

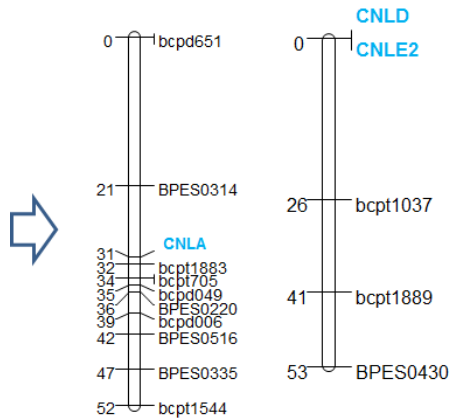


図-2. クロマツにおける LRR 遺伝子の連鎖地図上の位置

CNLA はクラスター-A に相当する遺伝子、CNLD および CNLE2 はクラスター-B に相当する遺伝子群の位置を示す。

(3) 抵抗性形質との関連解析

抵抗性家系 96 個体に対し、マツノザイセンチュウを接種し、接種後 1 週間目の抵抗性形質の評価を 5 段階で行った。抵抗性家系の形質は正規分布を示した (図-3)。

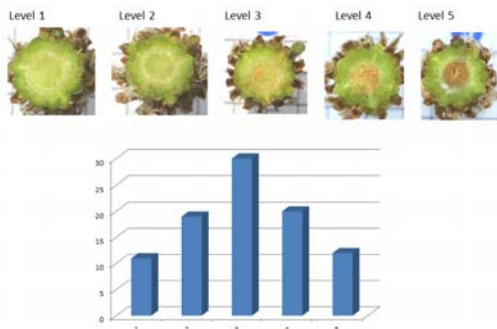


図-3. クロマツ抵抗性家系の形質評価

得られた形質情報と LRR 遺伝子をマッピングした連鎖地図を用いて、QTL 解析を行った。解析を行った結果、第一番染色体上に抵抗性形質と関連する遺伝子座が検出できたが、本研究で単離した LRR 遺伝子座は抵抗性形質と

有意な相関が検出されなかった。

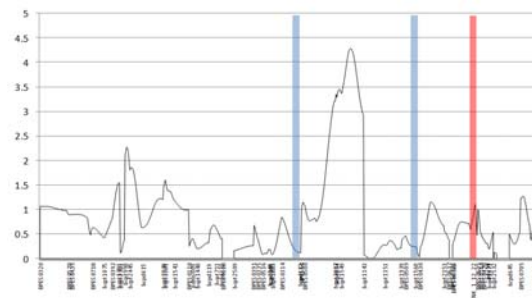


図-4. クロマツ抵抗性家系における QTL 解析

x 軸は連鎖群を直列的に並べたもの、y 軸は LOD スコアを示す。青色の領域は、本研究で単離した LRR 遺伝子が座乗している領域を示し、赤色の領域は NBS-LRR 遺伝子が座乗する領域を示す。

(4) まとめ

トマト、ダイズ、ジャガイモでは、根こぶ線虫、シスト線虫に対する線虫抵抗性遺伝子が特定されている。それらのほとんどが NBS-LRR もしくは LRR モチーフを持つと考えられている。本研究では、それらの線虫抵抗性遺伝子の中でも LRR 遺伝子に注目し、クロマツ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 LRR 遺伝子は抵抗性形質と有意な関連性が検出できなかった。NBS-LRR 遺伝子および LRR 遺伝子は遺伝子ファミリーを構成しており、本研究で単離した LRR 遺伝子はその一部にすぎず、今後、さらに遺伝子ファミリーをカバーするようにディジェネレートプライマーの設計を行い、網羅的に LRR 遺伝子を単離する必要がある。

最近、ダイズシストセンチュウに対する抵抗性遺伝子が新たに特定された。これまでダイズにおける線虫抵抗性遺伝子は、膜貫通型の LRR モチーフを持つ遺伝子であると考えられていたが、順遺伝学を用いた詳細な研究の結果から、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼや傷害誘導に関連する遺伝子の CNV (Copy Number Variation) であることが分かってきた。これまでマツノザイセンチュウ抵抗性遺伝子の単離については、エリクターやエフェクターを受容・感知する細胞質中の NBS-LRR 遺伝子や LRR 遺伝子をターゲットにしてきたが、今後は代謝制御に関わる遺伝子にも着目し、抵抗性遺伝子を単離する必要がある。

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 Hirao T., Fukatsu E., Watanabe A
(2012) Characterization of resistance
to pine wood nematode infection in
Pinus thunbergii using suppression
subtractive hybridization. *BMC Plant
biology* 12:13 査読有
doi:10.1186/1471-2229-12-13

〔学会発表〕(計4件)

- ① Hirao T., Watanabe A. Comparison of
gene expression profiles between
resistance and susceptibility in *Pinus
thunbergii* to pine wood nematode
infection. IUFRO Working Unit
7.03.12 “Alien invasive species and
international trade”, 2012年6月
10-16日, 東京大学(東京都)
- ② 平尾知士, 渡辺敦史, マツノザイセンテ
ユウ抵抗性解明に向けたクロマツ生体防
御に関連する遺伝子発現応答プロファイ
ルの構築, 第123回日本森林学会大
会, 2012年3月26-29日, 宇都宮大学(栃
木県)
- ③ Hirao T., Fukatsu E., Watanabe A.
Defense response of resistance and
susceptibility to pine wood nematode
infection in *Pinus thunbergii*. 第53
回日本植物生理学会年会, 2012年3月
16-18日, 京都産業大学(京都府)
- ④ Hirao T., Shirasawa K., Tabata S.,
Watanabe A., Detection of inter-
specific introgressive hybridization
in *Pinus* using EST-SSR markers. *Plant
and animal genome XX*, 2012年1月14-18
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) 連携研究者

渡辺 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