

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580015

研究課題名(和文)ハクサイ根こぶ病抵抗性modifier遺伝子の単離と機能解析

研究課題名(英文) Isolation and characterization of modifier locus for clubroot resistance in Brassica rapa.

研究代表者

畠山 勝徳 (HATAKEYAMA, Katsunori)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所 野菜育種・ゲノム研究領域・主任研究員

研究者番号：60355625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：根こぶ病抵抗性系統と罹病性系統の交雑F2から、Crr1座を有し、modifier座Crr2の候補領域約18kb内で組換えを起こした個体を選抜し、そのF3個体のマーカー遺伝子型と根こぶ病抵抗性の関係から、遺伝子が存在する領域を約5.9kbにまで絞り込んだ。この領域には2つのORFが存在し、罹病性ゲノムでは、ORF3の3'非翻訳領域に約1.6kbの挿入、ORF4の5'非翻訳領域から第2エクソンの一部にわたって約591bpの欠失が認められた。ORF4は罹病性系統で発現が低かった。機能証明のために、ORF3とORF4についてコマツナへの形質転換を開始し、ORF4の形質転換体を得た。

研究成果の概要(英文)：We tested for clubroot resistance using F3 plants derived from the selected F2 plants with recombination in the 18-kb Crr2 candidate region. Crr2 was estimated to lie within 5.9-kb region based on the relationship between the genotype of markers within the candidate region and clubroot resistance. Two ORFs, ORF3 and ORF4, were speculated in this region. In the susceptible genome, a 1.6-kb insertion was found in 3' UTR of ORF3 and a 591-bp deletion in the region including 5' UTR, exon1 and a part of exon2 of ORF4. RT-PCR analysis revealed that ORF3 expressed in leaves of both resistant and susceptible lines whereas ORF4 did not expressed in leaves of the susceptible line. Transformation of ORF3 and ORF4 constructs into Brassica rapa is in progress.

研究分野：植物育種学

キーワード：ハクサイ 根こぶ病 抵抗性遺伝子 DNAマーカー

1. 研究開始当初の背景

根こぶ病は絶対寄生性の病原体 *Plasmodiophora brassicae* によって引き起こされるアブラナ科野菜の栽培において難防除の土壤病害である。植物が感染すると根がコブ状に肥大し、水分や養分の吸収が著しく阻害され、最終的には枯死する。罹病した組織が腐敗することで放出される休眠胞子は、土中で 10 年以上生存するため、耕種的防除は困難であることから、抵抗性品種の利用が効率的な防除手段の一つとなっている。

ハクサイでは、ヨーロッパに由来する飼料用カブ品種の中に抵抗性の素材が見出され、根こぶ病抵抗性 (以下、CR) 品種が育成されているが、病原体の病原性分化により CR 品種が発病し問題となっている。我々は、CR ハクサイ 2 品種を判別品種として利用することにより、日本には少なくとも 4 つの病原型 (G1, G2, G3, G4) が見出されることを明らかにしている。一方、根こぶ病抵抗性の選抜には労力と時間を要することから、抵抗性に連鎖する DNA マーカーの研究が開始され、これまでに 8 つの CR 遺伝子座が見出されている。しかし、これらの遺伝子座の病原型特異性は一部でしか明らかになっておらず、抵抗性のメカニズムについては全く未解明である。

我々は病原型の異なる根こぶ病菌を用いた QTL 解析によって *Crr1* と *Crr2* の 2 つの抵抗性遺伝子座を同定した。ハクサイの染色体 A08 に見出された *Crr1* は単独で Ano-01 菌に抵抗性を示すが、より宿主範囲の広い Wakayama-01 菌に対しては抵抗性を示さない。一方、A01 に見出された *Crr2* は単独で根こぶ病抵抗性を発揮しないが、*Crr1* と共存することで Wakayama-01 菌に対しても抵抗性を発揮する。このことから、*Crr2* は *Crr1* のレース特異的な抵抗性を強める modifier 遺伝子であると考えられる。これまでの解析から、ファインマッピングにより *Crr2* の座乗領域を約 20kb にまで絞り込むことに成功している。本遺伝子を単離することによって、抵抗性メカニズムに関する重要な知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

Crr2 は、別の染色体に存在するもう一つの遺伝子座と協調することで、より宿主範囲の広い菌系に対する抵抗性を付与できるユニークな遺伝子である。本研究では、抵抗性メカニズムの解明と高精度選抜 DNA マーカーの開発に向けて、マップベースクローニングによる *Crr2* 遺伝子の単離を目的とする。

3. 研究の方法

植物材料

Crr1 と *Crr2* を有する根こぶ病抵抗性系統 G004、罹病性系統 A9709、および両者の交雑 F₁ に由来する F₂、F₃ を用いた。また、F₂ から *Crr1* のみを有する個体を選抜し、世代を F₆ まで進めた AGF6_55_GA を養成し、*Crr2* 候補

遺伝子を導入したコマツナ形質転換体との交雑に用いた。

座乗領域の塩基配列解析

G004 の DNA を用いて構築した BAC ライブラリー (Suwabe et al. 2012) から座乗領域をカバーする BAC クローンを単離し、ショットガンシーケンスにより塩基配列を決定した。罹病性ゲノムについては、推定座乗領域に推定された ORF および ORF 間の領域を増幅するプライマーを設計し、罹病性系統 A9709 から調整した DNA を用いて PCR によって当該領域を増幅し塩基配列を決定した。

座乗領域の絞り込み

Crr2 推定座乗領域の抵抗性ゲノムの塩基配列から SSR や indel を検索しマーカー化した。*Crr2* は *Crr1* と共存しないと抵抗性を発揮しないことから、*Crr1* 連鎖マーカー BSA1 と *Crr2* の座乗領域の外側に位置するマーカー BRMS-096 と 314B6F を用いて、F₂ の遺伝子型を決定し、*Crr1* の遺伝子型が抵抗性ホモ型あるいはヘテロ型で、*Crr2* 領域の 2 つのマーカー間で組換えを起こしている個体を選抜した。選抜した F₂ から F₃ を採種し、Wakayama-01 菌を用いて病土挿入法により接種検定を行った。検定個体から DNA を抽出し、BSA1、*Crr2* 領域の推定 ORF 間に設計したマーカーを用いてジェノタイピングを行い、マーカー遺伝子型を決定した。マーカー遺伝子型と根こぶ病抵抗性の関係から座乗領域の絞り込みを行った。

ジェノタイピングは、Shimizu et al. (2011) の bar-coded split tag 配列を利用して蛍光ラベルした PCR 産物を DNA シーケンサー ABI3730xl で泳動し、GeneMapper ソフトウェアを用いて多型を検出した。

発現解析、RACE 解析

G004 および A9709 の葉と根から RNA を抽出し、DNase I 処理を行った。1 本鎖 cDNA を合成し、RT-PCR の鋳型として用いた。V-ATPase を内部標準として用いた。

G004 および A9709 から RNA を調整し、SMARTer RACE cDNA 増幅キットを用いて RACE 解析を行った。

プロモーター解析

Crr1 に存在する根こぶ病抵抗性遺伝子 *Crr1a* のプロモーターの下流に、*Crr2* 候補 ORF を連結したコンストラクトを作成するために、*Crr1a* プロモーター約 2.5kb を PCR によってクローニングし、その下流に *GUS* 遺伝子を連結したコンストラクトを作製した。

形質転換体の作出

シロイヌナズナへの形質転換は Flower Dip 法によって行った。コマツナへの形質転換は、Takasaki et al. (1997) の方法に従って行った。

4. 研究成果

*Crr2*座乗領域に推定されたORFの構造解析と発現解析

根こぶ病抵抗性遺伝子座 *Crr2* が座乗すると考えられる 444F2_19 と 314B6F マーカー間の約 18kb のゲノム領域には 4 つの ORF (ORF1, 2, 3, 4) が推定された (図 1)。ORF1 は、5' 側が絞り込んだ候補領域の外側に位置することから候補から外した。ORF2, ORF3, ORF4 が存在する領域について、罹病性系統 A9709 のゲノム配列を決定し、抵抗性系統 G004 のゲノムと比較した。また、RACE 法によって各 ORF の非翻訳領域を決定した。ORF2 は、G004 と A9709 のアレル間で 1 アミノ酸のみ異なっていた。ORF3 についてみると、コード領域では抵抗性と罹病性で 10 アミノ酸の置換が認められた。また、A9709 において 3' 非翻訳領域に 1.6kb の挿入があった。ORF4 についてみると、A9709 において 5' 非翻訳領域から第 2 エクソンの一部にわたって 590bp の欠失が認められた。そのため、推定された開始コドンよりも下流から翻訳されたタンパク質が生成されると推定された。

RT-PCR により ORF2, ORF3, ORF4 の発現を解析した。ORF2 と ORF3 については、抵抗性と罹病性で発現に差異は認められなかったが、ORF4 は罹病性の根で発現が抵抗性に比べて低く、葉では検出されなかった。

組換え F₃ を利用した候補 ORF の絞り込み

抵抗性ゲノムと罹病性ゲノム上に推定された 4 つの ORF の塩基配列の違いを利用して indel マーカー (indel_01~indel_05) を作成した。抵抗性 G004 と罹病性 A9709 の F₁ に由来する F₂ 約 4,000 個体から DNA を抽出し、*Crr1* 連鎖マーカー BSA1 と *Crr2* 推定座乗領域の両側に位置するマーカー BRMS-096 と 314B6F のジェノタイピングを行った。その結果、*Crr1* を抵抗性ホモ型あるいはヘテロ型でもち、*Crr2* の 2 つのマーカー間で組換えを起こしている F₂ を 4 個体得ることができた。この 4 個体の F₃ について、ORF 間の indel マーカーのジェノタイピングと Wakayama-01 菌を用いた接種検定を行った結果、*Crr2* は ORF2 と ORF3 の間に位置する indel_03 と ORF4 の C 末に位置する indel_01 間に存在すると推定された (図 1)。以上の遺伝子構造解析、発現解析、組換え個体の接種検定結果から、ORF3 と ORF4 が候補遺伝子の最有力と考えられた。

候補 ORF の形質転換体の作出

Crr2 候補遺伝子の形質転換実験と平行して行っていた *Crr1* の詳細マッピングの結果、研究開始当初 1 つの遺伝子座と考えられていた *Crr1* には、Ano-01 菌に対する抵抗性の主動的役割を担う遺伝子座 *Crr1a* とこの座から約 0.7cM 離れた領域にマイナー効果を有する遺伝子座 *Crr1b* が存在することが示唆され

た (Suwabe et al. 2012)。マップベースクローニングにより *Crr1a* を単離した結果、この遺伝子は NB-LRR クラスの病害抵抗性タンパク質をコードしており、単独で病原型 G2 と G4 に抵抗性を発揮することが明らかになった (Hatakeyama et al. 2013)。そこで、*Crr1a* を形質転換したシロイヌナズナを利用した *Crr2* 候補 ORF の機能証明を試みた。まず、ORF3 と ORF4 の cDNA 配列をレタス・ユビキチンプロモーターの下流に連結したコンストラクトを作成した。シロイヌナズナ Col-0 に形質転換し、T₂ 世代において導入遺伝子をホモに有する複数の系統を選抜した。*Crr2* 候補 ORF 導入個体と *Crr1a* 導入個体を交配した F₁ を作出し、Wakayama-01 菌による接種検定を行ったが、抵抗性を示す系統は見出されなかった。

以上の結果から、*Crr2* と共に機能する遺伝子座が *Crr1a* ではなく *Crr1b* である可能性が考えられた。G004 と A9709 の交雑後代に由来する組換え F₃ 個体を用いた詳細な遺伝解析を行ったところ、*Crr1a* と *Crr2* を有する個体は Wakayama-01 菌に罹病し、*Crr1b* と *Crr2* を有する個体は抵抗性を示すことが明らかになった。このことから、*Crr2* と共に抵抗性に寄与する遺伝子は *Crr1a* ではなく、*Crr1b* であることが示唆された (松元ら 2012)。以上のことから、研究開始当初は *Crr1a* を導入したシロイヌナズナを利用した機能証明を予定していたが、*Crr1b* がクローニングされていない現状では、シロイヌナズナを利用した

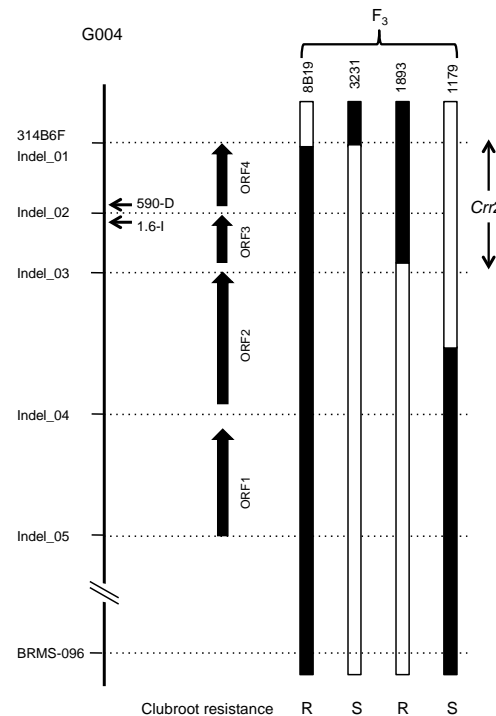


図 1 *Crr2*座乗領域の推定ORFの位置、組換えF₃のグラフ遺伝子型と根こぶ病抵抗性
罹病性A9709ゲノムに存在する1.6kbの挿入(1.6-I)と590bpの欠失(590-D)の位置を矢印で示す。グラフ遺伝子型の白バーは罹病性ゲノム、黒バーは抵抗性ゲノムを示す。
R: 抵抗性、S: 罹病性

相補性実験は困難であると考えられた。そこで、G004 と A9709 の交雑後代に由来し、*Crr1* (*Crr1a*, *Crr1b* の両方を含む) のみを有する F₆ 系統 (AGF6_55_GA) を用いて機能証明を行うことにした。すなわち、候補 ORF3 と ORF4 を導入した形質転換コマツナを作出し、形質転換体と *Crr1* を有する F₆ 系統と交雑した後代を接種検定に利用する方法に計画変更した。

候補 ORF3 および ORF4 の遺伝子カセットを作成する目的で、*Crr1a* プロモーターをクローニングし、その発現解析を行った。*Crr1a* は全身で発現しており、根においては根毛では発現しておらず、中心柱と皮層周辺で発現していると推定された (Hatakeyama et al. 2013)。根こぶ病菌の感染は、根毛感染 (一次感染) と皮層感染 (二次感染) の大きく 2 つのステージに分けられている。根毛感染は抵抗性系統と罹病性系統のいずれにおいても観察される。一方、皮層で起こる皮層感染では、抵抗性系統において休眠胞子の発達が罹病性系統に比べて遅れることが報告されており、抵抗性系統では何らかにメカニズムによって休眠胞子の発達が阻害されていると考えられている。*Crr1a* の発現パターンは、根こぶ病を接種した抵抗性系統と罹病性系統を用いたクラシカルな観察実験によって示唆されている知見と一致する。G004 のゲノム DNA から ORF3 と ORF4 のゲノム断片をクローニングし、*Crr1a* プロモーターの下流に連結したコンストラクトを作成し、コマツナへの形質転換を行った。ORF4 については 6 個体の形質転換体を得られており、そのうち 3 個体については、*Crr1* を有する F₆ 系統との交雑 F₁ 種子の採種まで完了しており、*Crr2* 遺伝子を特定するための機能証明実験を行う準備が整った。

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)

Hatakeyama, K., Suwabe, K., Kato, T., Tomita, R.N., Nunome, T., Fukuoka, H., Matsumoto, S. (2013) Identification and characterization of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. PLoS ONE, 査読あり, 8(1): e54745.
DOI:10.1371/journal.pone.0054745

[学会発表](計 8 件)

畠山勝徳 (2015) ハクサイ育種における DNA マーカーの開発と利用、園芸学会(招待講演) 2015 年 3 月 27 日~3 月 29 日、千葉大学(千葉県千葉市)
松元 哲、畠山勝徳、高下新二、宮崎俊夫、近藤友宏 (2015) 根こぶ病抵抗性遺

伝子 *Crr1*, *Crr2* を有する晩生ハクサイ F₁ 系統「ハクサイ安日交 2 号」の育成。日本育種学会、2015 年 3 月 21 日~3 月 22 日、玉川大学(東京都町田市)

Hatakeyama, K. (2013) Recent advance on clubroot resistance in *Brassica* crops. Golden Seeds Project Symposium(招待講演), 2013 年 11 月 5 日、順天大学(韓国・順天市)

畠山勝徳、松元 哲 (2012) DNA マーカーを利用したハクサイの根こぶ病抵抗性育種 第 3 回根こぶ病研究会(招待講演)、2012 年 11 月 27 日、キャンパスプラザ京都

Matsumoto, S., Kato, T., Hatakeyama, K. (2012) Development of highly clubroot-resistant Chinese cabbage F₁ cultivar, 'Akimeki', accumulating three resistance genes, *Crr1*, *Crr2* and *CRb*. 5th ISHS International Symposium on Brassicas and the 18th Crucifer Genetics Workshop (ISHS Brassica2012), 2012 年 11 月 12 日~11 月 16 日, カターニャ大学(イタリア・カターニャ市)

Hatakeyama, K., Suwabe, K., Kato, T., Tomita, R.N., Nunome T., Fukuoka, H., and Matsumoto, S. (2012) Molecular cloning of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. 5th ISHS International Symposium on Brassicas and the 18th Crucifer Genetics Workshop (ISHS Brassica2012), 2012 年 11 月 12 日~11 月 16 日, カターニャ大学(イタリア・カターニャ市)

畠山勝徳、加藤丈幸、松元 哲 (2012) *Crr1a* を形質転換したコマツナの根こぶ病抵抗性。日本育種学会、2012 年 9 月 14 日~9 月 15 日、京都産業大学(京都府京都市)

松元 哲、加藤丈幸、畠山勝徳 (2012) ハクサイ類の根こぶ病抵抗性における *Crr1b* と *Crr2* の集積効果。日本育種学会、2012 年 9 月 14 日~9 月 15 日、京都産業大学(京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畠山 勝徳 (HATAKEYAMA Katsunori)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所 野菜育種・ゲノム研究領域・主任研究員
研究者番号: 60355625