

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380100

研究課題名（和文） トランスクリプトームの網羅的解析法を用いたマツ材線虫病の解明と抵抗性育種への利用

研究課題名（英文） Global transcriptome analysis of the pine wilt disease and application to the resistance breeding

研究代表者

白石 進 (SHIRAIISHI SUSUMU)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70226314

研究成果の概要（和文）：

クロマツはマツノザイセンチュウを病原体とするマツ材線虫病に対し感受性樹種であり、本病に対する抵抗性育種事業が行われてきた。SAGE (serial analysis of gene expression) 分析と ODD (ordered differential display) 分析を使用して、本病の発病メカニズムと本病に対する抵抗性メカニズムの解明を試みた。その結果、SAGE を用いたトランスクリプトームの網羅的解析により、pathogenesis-related protein, osmotin, lipoxygenase, chalcone synthase 等の遺伝子発現が増大、eukaryotic translation initiation factor SUI1, translationally controlled tumor protein, xyloglucan endotransglycosylase が減少した。これらの遺伝子が発病メカニズムに深く関与していることが示された。また、抵抗性マツでは catalase, dienelactone hydrolase family protein が、非抵抗性マツでは pathogenesis-related protein, leucoanthocyanidin dioxygenase の発現が増大した。これらの遺伝子群は抵抗性メカニズムに関与していると思われる。

研究成果の概要（英文）：

The Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) is highly susceptible to pine wilt disease caused by the pine wood nematode (PWN; *Bursaphelenchus xylophilus*). To cope with this disease, researchers and tree breeders selected PWN-resistant individuals in a previous breeding program. In an attempt to understand the mechanisms of pathogenesis and resistance, the mechanisms were clarified using LongSAGE (serial analysis of gene expression) and ODD (ordered differential display) analyses. Especially, by the global transcriptome analysis using SAGE, it is indicated that pathogenesis-related proteins, osmotin, lipoxygenase, chalcone synthase were significantly up-regulated, and eukaryotic translation initiation factor SUI1, translationally controlled tumor protein, and xyloglucan endotransglycosylase were down-regulated by the PWN inoculation in both the resistant and non-resistant pines. On the other hand, catalase, dienelactone hydrolase family protein were expressed at a higher level only in the resistant pine, pathogenesis-related proteins and leucoanthocyanidin dioxygenase were expressed only in the non-resistant pine. These differentially expressed genes are presumed to reflect some of the differences between the resistant and non-resistant pines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

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： クロマツ、マツ材線虫病、トランスクリプトーム、抵抗性育種、遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ポストゲノム時代を迎え、遺伝子研究法が大きく変わろうとしている。主要モデル生物種でのゲノム(全 DNA 塩基配列の解明)計画が終了し、研究の主流は、トランスクリプトーム(発現した全 mRNA)解析(トランスクリプトミクス)、プロテオーム(発現した全蛋白質)解析(プロテオミクス)等に移行し、このための分析手法の進展が著しい。これにより、従来の研究法(諸生命現象の把握→代謝系の解明→遺伝子(DNA))から、逆遺伝学的研究法(全 DNA/全 mRNA/全蛋白質の網羅的解析→生命の諸現象の解明)へと移行してきている。

(2) マツ材線虫病の発病機作は未だ解明されていない。1970年代初め、それまで原因不明とされてきた松枯れ(松食い虫)は、マツノマダラカミキリによって伝搬されるマツノザイセンチュウが樹体内に侵入することによって引き起こされることが明らかとなった。その後、マツ枯損機作について、生理学的、組織学的等、種々の視点から研究が進められてきたが、未だ枯損機作の解明には至っていない。

(3) 九州地域では、マツ材線虫病に対する第二世代抵抗性品種が作出されている。平成16年度より、第二世代の抵抗性品種の開発を進めてきた。このプロジェクトでは、複数の(異なる)抵抗性遺伝子を集積した個体を第二世代集団から選抜して、410抵抗性クローンを育成した。この中でも、組織学的アプローチからの枯損機作の解明は試みられているが、分子生物学的アプローチは行われていない。本研究では、このプロジェクトで育成された感受性クローン群および第二世代抵抗性クローン群が供試材料として使われる。

(4) クロマツの近縁であるテーダマツ(*P. taeda*)、フランスカイガンショウ(*P. pinaster*)等において、大規模なゲノムプロジェクトが実施され、既に30万件以上の発現遺伝子の塩基配列(EST, expressed sequence tag)が報告されている。

(5) 抵抗性育種の推進上、遺伝子レベルでの材線虫病機作に関する情報が不可欠である。第二世代抵抗性育種計画では、個々の第一世代抵抗性クローンが保有する異なる抵抗性関連遺伝子を、交配させることで集積し、より強い抵抗性をもつクロマツを創出した。今後、第三世代以降の育種戦略を決定する上では、材線虫病機作に関与している(感染マ

ツで発現する)遺伝子群の解明と、抵抗性マツがもつ抵抗性遺伝子(抵抗性要因)群の探索が不可欠である。

## 2. 研究の目的

主として二葉松類に大きな被害をもたらすマツ材線虫病は、マツノザイセンチュウ(以下、線虫)がマツ樹体内に侵入することによって発病する。これに対する対策の一つとして抵抗性育種が行われている。マツ側の抵抗性には複数の抵抗性要因が関与していると考えられているが、未だ確証が得られていない。抵抗性要因を解明するために、まず、材線虫病の発病と病徴進展のメカニズムを分子生物学的に(遺伝子レベルで)解明する。

## 3. 研究の方法

具体的には、材線虫病の解明にトランスクリプトームの網羅的研究法を導入とクローン材料の使用による信頼性の高い実験系を使用することにより、次の課題を実施した。

(1) ODD (ordered differential display) 法を用いて、線虫接種後のトランスクリプトームの変化を時系列的に解析し、感染後によるクロマツのトランスクリプトームの変化(発現遺伝子群の消長)を調査した。

(2) SAGE (serial analysis of gene expression) 法による線虫接種後のトランスクリプトームの変化を網羅的に解析し、発病・病徴進展過程で発現する遺伝子群を明らかにした。これにより、未だ明らかにされていない材線虫病機作を分子生物学的視点からの解明を試みた。

## 4. 研究成果

(1) ODD (ordered differential display) 法を用いたマツノザイセンチュウ接種後のクロマツにおける発現遺伝子数の変化

### ① ODD法の改良

線虫感染から発病、病徴進展の過程のトランスクリプトームの変化を連続的(時系列的)に捉えるためには、多検体サンプルの解析が不可欠となる。比較的簡便なトランスクリプトームの網羅的解析法の一つに ODD (ordered differential display) 法がある。この方法にさらに dual suppression PCR 法を導入することにより、高い精度で遺伝子発現の消長を捉えることのできる分析系を確立した。また、ODD に使用する DNA polymerase および制限酵素、分析の各ステップで使用するア

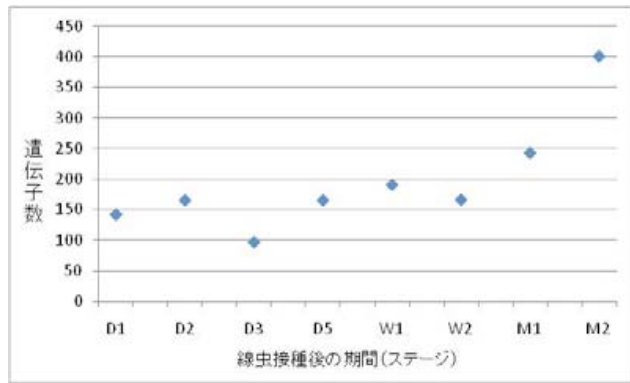


図-1 線虫接種後の遺伝子発現に違い（増減）の認められた遺伝子数の変化

アダプター、プライマー等について検討し、制限酵素 (*Mla*III) の変更、アダプター配列の変更、cDNA 合成時のポリ (T) プライマーの変更 (3' アンカーの付加) 等により PCR の再現性と得られる塩基長の精度が改善された。

#### ② 改良 ODD 法による発現遺伝数調査

改良 ODD 法を用いて、線虫接種後のマツにおける発病とその後の病徴進展に伴い発現してくる遺伝子を時系列的に解析した。クロマツ感受性クローン (4 年生) を用いて、線虫接種後 1 日から 2 ヶ月 (枯死) までの 8 ステージの当年枝を採取し、ODD 分析を行った。線虫を接種した個体では 2 週間後に明らかな病徴が見られ、1 ヶ月後に枯死し始め、2 ヶ月後に完全に枯れた。

ODD で検出されるピーク (発現遺伝子) 数は、線虫接種 1~2 日後、すでに接種/非接種個体間で違いが認められた。これは、線虫の侵入に対する宿主 (マツ) 側の過敏感反応によって起こったと考えられた。その後 (3 日後)、一旦、接種・非接種間の違いの減少がみられたが、1 週間後以降は、接種と非接種個体間の差異は増大し、接種個体の発現遺伝子数は減少、しかも非接種と大きく異なる発現遺伝子プロフィールを示した (図-1)。

これは、接種個体での線虫ストレスに対する反応が大きくなった (病気が進展した) ためと思われる。このステージでは、多くの遺伝子発現が低下し、生理的活動が抑制されたと考えられる。

(2) SAGE 法を用いたトランスクリプトームの網羅的解析による発現遺伝子解析

#### ① 供試 RNA 単離法の改良

近縁種であるテーダマツで使用された塩化リチウム沈殿法と新た

に Plant RNA Reagent (Invitrogen) をベースにする方法について検討した。その結果、後者に High-Salt Solution (Takata) と Ethachinmate (Nippon gene) を使用した抽出系を確立した。

#### ② SAGE 法の改良

Total RNA から cDNA を合成する行程に、SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech) を導入することにより少量 RNA サンプルからの SAGE 分析を可能にした。

#### ② 改良 SAGE 法による発現遺伝数調査

マツノザイセンチュウ感染により、トランスクリプトーム中で発現が誘導される遺伝子と抑制される遺伝子の両者が認められた (図-2)。発現が増加した遺伝子として、数種の pathogenesis-related protein, osmotin, lipoxygenase, chalcone synthase 等があった。なお、機能が未解明の数種の遺伝子も発現量が大幅に増加していた。一方、発現量が減少した遺伝子としては、eukaryotic translation initiation factor SUI1, translationally controlled tumor protein, xyloglucan endotransglycosylase 等が認められた。

抵抗性マツ、非抵抗性マツで特異的に発現が誘導される遺伝子 (catalase, diene lactone hydrolase family protein (以上、抵抗性マツ)、pathogenesis-related protein, leucoanthocyanidin dioxygenase (以上、非抵抗性マツ)) が確認されたが、BLAST 検索による遺伝子機能の特定ができないものも見られた。感受性クロマツで特異的に発現する遺伝子は、すでに塩基配列 (EST: expressed sequence tag) が DNA data base に登録されていたが、その機能は不明であった。

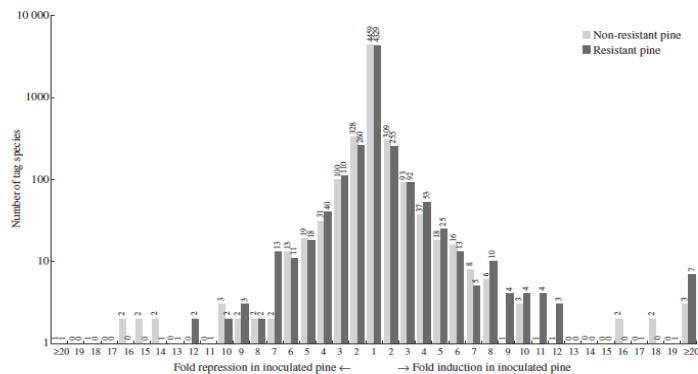


図-2 抵抗性と非抵抗性クロマツにおける線虫接種による発現量の変動

## 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3件)

① Nose M, Shiraishi S: Comparison of the gene expression profiles of resistant and non-resistant Japanese black pine inoculated with pine wood nematode using a modified LongSAGE technique. *Forest pathology* 41: 143–155, 2012

[査読有り]

② 能勢美峰, 白石 進: SAGE法を用いた網羅的な発現遺伝子解析 –マツ材線虫病抵抗性のメカニズム解明に向けて–. *林木の育種* 242: 29–32, 2012 [査読無し]

③ Guan L, Shiraishi S: Improved AFLP protocol using dual-suppression PCR and its application to species with large genomes. *Molecular Ecology Resources* 11: 854–861, 2011

[査読有り]

[学会発表] (計1件)

① 管 蘭華, 白石 進: マツノザイセンチュウを接種されたクロマツ (*Pinus thunbergii*) の遺伝子発現プロファイル. 第121回日本森林学会大会, 2010年4月, つくば(筑波大学)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石 進 (SHIRAISHI SUSUMU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 70226314