

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580182
 研究課題名（和文）
 マツノザイセンチュウに対するマツの生体防御関連遺伝子の探索と発現定量解析
 研究課題名（英文）
 Isolation and expression profiles of pathogen related genes from Pinus thunbergii
 研究代表者
 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育種第二課育種研究室・研究室長
 研究者番号：10360471

研究成果の概要： マツノザイセンチュウ侵入後のクロマツ樹体内の生体防御を明らかにするため、抵抗性と感受性それぞれから経時的に組織片を採取し、抽出したRNAに基づいて構築した6ライブラリーから単離した1,900 ESTが既存のデータベースに登録されている遺伝子と一致した。これらESTにはPRタンパク等が共通して含まれていたが、時間経過に応じて各ライブラリーから単離されるESTには特徴が認められた。本研究の結果、生体防御関連遺伝子発現プロファイルの基礎的データが収集できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林学・森林工学

キーワード：生体防御関連遺伝子・サブトラクション・経時的発現・リアルタイム PCR

1. 研究開始当初の背景

マツノザイセンチュウによって引き起こされるマツ材線虫病は、アカマツおよびクロマツ林に多大な被害を与えてきた。これら被害に対処するため、枯損木の焼却や薬剤散布等の自治体の努力に加え、マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業が展開され、アカマツ、クロマツとも抵抗性を保有する個体の選抜が行われてきた。しかし、抵抗

性個体の選抜効率は極めて低く、従来の事業だけで抵抗性個体数の増加を図ることは労力、時間、費用面で限界がある。そこで、林木育種センターでは、AFLP や SSR マーカーによる連鎖地図作成とマツノザイセンチュウ抵抗性の QTL 解析を進めている。しかし、マツのゲノムサイズは巨大であり、座乗するマーカーに基づいて MAS (marker assisted selection) やマップベ

一スクローニングを実行することは現段階で困難であること、マツノザイセンチュウ侵入後の個体内の病徴進展に関する生理学的知見が集積されている一方で（福田、1999）、病徴進展と表現型の関係は明確でなく、QTL解析を実施する場合の判定基準の設定に試行錯誤が必要であることなど、遺伝学的手法だけで抵抗性に関する遺伝的特性もしくは抵抗性遺伝子の解明といった研究へ発展させるためには多くの問題点を解決する必要性がある。一方、病徴進展に応じて発現する防御関連遺伝子群の単離といった分子生物学的アプローチは、上記問題点を直接的に解決する上で最も有効な方法の一つであり、さらにこれまでの成果と関連づけることによって抵抗性遺伝子の解明へ直結できると考えられる。

イネを中心とする作物において、種々の病害虫抵抗性遺伝子が単離されており、同様の手法は巨大ゲノムを有するマツにおいても適用可能である。すでに、東北地方で選抜されたクロマツ抵抗性個体と非抵抗性個体の接ぎ木クローン個体を作成し、これらにマツノザイセンチュウを接種あるいは非接種に区分し、時期別に差別的に発現する遺伝子群を明らかに出来るcDNAサブトラクションライブラリーを構築した。接種から同一日数経過した非抵抗性の接種個体と非接種個体間の形成層部位から構築したライブラリーに基づいて差別的に発現する遺伝子を約500単離した結果、接種した個体では、感染特異的蛋白質（PRタンパク質）であり、PR-5に分類されるThaumatin-like proteinを含む3つの遺伝子が有意に発現していることが明らかとなった。このThaumatin-like proteinはヨーロッパアカマツ（Asiegbu et al., 2005）やモンチコラゴヨウ（Piggott et al., 2004）においても病害虫侵入後に発現する遺伝子の一つとして既に報告されており、マツノザイセンチュウに対する生体防御関連遺伝子群の一つである可能性が高い。残る2つの遺伝子についても抗細菌等に反応することが既知の遺伝子データ

ベースから明らかとなっている。一方で、ファイトアレキシンに関連する遺伝子群やペルオキシダーゼ等のこれまでマツノザイセンチュウ抵抗性と何らかの関係があると考えられてきた遺伝子はほとんど単離されなかった。従って、抵抗性個体における接種および非接種個体間や抵抗性と非抵抗性個体間といったさらに多くの試験区間におけるサブトラクションライブラリーを構築すること、ライブラリーあたりの単離遺伝子数を増やすことでこれまで明らかにされていなかったマツノザイセンチュウに対する生体防御関連遺伝子群が解明できると考えられる。さらに、単離した遺伝子の情報に基づいて遺伝子マーカーを設計し、接種からの経過日数に応じた発現定量解析を行うことによって、これら生体防御関連遺伝子群の樹体内応答に関する詳細を明らかにすることが出来る。

2. 研究の目的

本研究では、接種・非接種ともに接種後同日経過したクロマツつぎ木クローンから形成層を採取し、経時的なクロマツサブトラクションライブラリーを構築し、それぞれから遺伝子を単離する。さらに、同一日数経過した抵抗性と非抵抗性クロマツ間でも同様にサブトラクションライブラリーを構築する。単離した遺伝子群は機能別や出現頻度別に整理し、試験区間における相違を明らかにする。さらに、高い出現頻度の遺伝子群や既知の遺伝子から生体防御に関連すると推定される遺伝子群、試験区間で特徴的に発現する遺伝子群については、特異的増幅可能なプライマーを設計し、マーカー化を図る。マツノザイセンチュウ抵抗性個体を母樹とする採種園から得た種子による実生苗を家系別に生育し、マツノザイセンチュウを接種後、枯損に至るまで定期的に形成層部位から組織を採取し、これら遺伝子マーカーをリアルタイムPCRすることによって枯損に至る経過と遺伝子群の発現定量解析を行うことで、各遺伝子が枯死に関与するか明らかにする。これら一連の研究によ

り、マツノザイセンチュウ抵抗性と関連する遺伝子群候補の解明を行う。

3. 研究の方法

マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ接木クローンをマツノザイセンチュウを接種する個体と非接種個体に分けた。非接種個体については接種個体同様に個体の上端部を切除し、マツノザイセンチュウが混入していない溶液のみを注入し、できるだけ個体が受けるストレスを同一条件にした。非抵抗性個体についても抵抗性個体同様に処理した。抵抗性および非抵抗性クローンは共に、接種後、1日、3日、7日、14日、21日経過した接種1個体および非接種1個体の上端部から10cm下部の形成層部位を採取し、直ちに液体窒素に浸し、RNAの単離まで-80℃で保存した。

遺伝子単離はサブトラクションライブラリーに基づいた。サブトラクションライブラリーはClontech社製のkitを用いて、推奨するプロトコールに改変を加えて上で構築した。単離した遺伝子群はDDBJやGENBANKといったデータベースを利用し、アノテーションを行い、各遺伝子群の機能や出現頻度に基づいて整理した。

4. 研究成果

a. 構築したサブトラクションライブラリーから単離した遺伝子群

本研究では、全部で6ライブラリーを構築した。ライブラリーのうち一つは、抵抗性接ぎ木クローンに人工接種した後、9日経過した個体をテスター、同日経過した非接種個体をドライバーとしたライブラリーであり、ライブラリーの表記は09RI-Rとなっている。RIとは、抵抗性（resistance）に接種（inoculation）したことを表しており、単にRと表記したものは抵抗性ではあるが非接種であることを示している。従って、残るライブラリーは、09R-RI（接種後、9日経過した非接種抵抗性個体をテスター、接種抵抗性個体がドライバー）、03RI-R（接種後3日経過した接種抵抗性個体と非接種抵抗性個

間のライブラリー）、同様に14RI-R、07RI-SI（抵抗性・非抵抗性共に接種した後、7日もしくは14日経過したライブラリー）、07SI-RIである。これに、すでに構築し遺伝子単離を行った09SI-Sを加えて、計7ライブラリーを構築したことになる。各ライブラリーに対し、実際のシーケンス数、BLASTサーチをした数、BLASTサーチでヒットした数については表1にまとめた。

表1. 各ライブラリーの概要

Libraries	S	B	H	B/S	H/B
03RI-R	1344	267	110	0.20	0.41
09RI-R	448	173	102	0.39	0.59
14RI-R	864	251	95	0.29	0.38
07RI-SI	960	404	294	0.42	0.73
07SI-RI	672	307	261	0.46	0.85
09SI-S	576	444	307	0.77	0.69

S : シーケンスした数

B : BLAST サーチした EST 数

H : BLAST の結果、データベースに保存されている何らかの遺伝子としてヒットした数

b. 各ライブラリーから単離した遺伝子の特徴

本研究以前に構築した 09SI-S ライブラリーから、マツノザイセンチュウ接種後にクロマツ非抵抗性個体内で PR タンパク質を始めとする数多くの遺伝子が防御反応の結果発現することは示唆されていた。本研究では、さらに抵抗性個体について、経時的発現を追跡した結果、03RI-R では、マツノザイセンチュウ接種後、PR-5 に分類される Thaumatin-like Protein がライブラリー内で有意に発現していることが明らかとなった。09SI-S の発現遺伝子では、その他、PR-1 や β -1,3 グルカナーゼの発現も認められていたが、抵抗性ではほとんど認められないことから、Thaumatin-like protein がクロマツ個体内の初期の防御反応の主要な遺伝子に位置づけられる可能性は高い。

一方、14RI-R のライブラリーでは、Thaumatin-like protein の発現よりもむしろ

P450 に関連する遺伝子が有意に発現していた。接種したクロマツは 21 日目の段階で抵抗性・非抵抗性にかかわらず枯死の兆候が認められており、14 日目の個体から単離した遺伝子は、クロマツ防御反応の後期に位置づけられる。従って、初期の反応と比較したとき、生体防御反応は病兆によって経時的に変化することが明らかとなった。

さらに、抵抗性と非抵抗性間の発現の相違を明確にするため、抵抗性と非抵抗性間でライブラリーを構築しており、これはクロマツの生体防御が最も作用していると考えられる接種後 7 日目の組織を利用した。このライブラリーを利用した結果、Thaumatolike protein、キチナーゼ、PR-1、 β , 1, 3 グルカナーゼといったこれまで病害虫と関連すると考えられる遺伝子群が抵抗性でも発現しており、病兆が進展した結果、多種類の病害虫関連遺伝子の発現がこの時期に生じていることが明らかとなった。特に、この時期には、初期の Thaumatolike protein の発現に代わり、PR-1 が発現量を増加させていることが示唆されている。これに加え、抵抗性では、RNase H family protein と Picea (トウヒ属植物) で単離され、機能未知のプロテインが多数発現していることが明らかとなった。この二種類のタンパク質は非抵抗性を利用したライブラリーからはほとんど単離されていないため、抵抗性で特異的な反応である可能性がある。このうち、RNase H family protein は RNA/DNA ハイブリッド鎖の RNA 鎖を特異的に加水分解する酵素で、DNA 複製に必要な RNA プライマーを合成・除去したり、DNA に間違っ取りこまれた RNA を除去したりすると考えられており、DNA 修復に必要なプロテインであることから、マツノザイセンチュウによる侵入の結果、何らかのダメージをクロマツが受け、それに対する修復系の遺伝子が作用していると考えられる。もう一つの unknown gene についての検討は今後の課

題である。

一方、07SI-RI のライブラリーに利用した cDNA は 07RI-SI と同一であるにもかかわらず、全く異なる様相を示した。Thaumatolike protein やキチナーゼに関する遺伝子が同様に単離される一方で、10 kDa putative secreted protein といったどのライブラリーからも確認されていなかった遺伝子が BLAST サーチでヒットした遺伝子のうち多くを占めた。さらにこの遺伝子についてデータベースに基づいて検索を進めた結果、本遺伝子は森林総合研究所の Forestgen データベースに保存されているマツノザイセンチュウ由来の遺伝子と一致することが明らかとなった。サブトラクションは、比較する二つの cDNA 間で共通の遺伝子を除去し、その特異性を検出する方法である。従って、本遺伝子は生体防御関連遺伝子と共に、クロマツ個体内で発現しているが、抵抗性をテスターとした場合、あまりにも他と比較して相対的に発現が少なかったために、これまで単離出来なかったと考えられる。本遺伝子の単離は、これまで寄生側のマツノザイセンチュウからの宿主に対する反応について、ほとんど知られてこなかったために極めて重要であり、寄生側と宿主側の相互作用がマツ材線虫病に存在することを示す初めての証拠となる。今後は、本遺伝子を寄生側からも追跡することが寛容と考える。

c. 各遺伝子の発現と枯死メカニズムとの関連解明

サブトラクション法は発現量の差異を大まかに捉えるには有効な方法である一方、単離した遺伝子がどの程度本当に発現しているか明らかにするまでの定量性にはかける。そこで、単離した一部の遺伝子についてリアルタイム PCR を利用して、実際に発現量を経時的に追跡した。

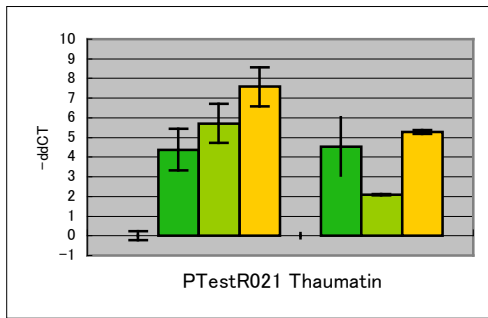


図1 Thaumatin-like proteinの経時的発現

図1は Thaumatin-like protein の2クローンにおける経時的発現を示している。結果から明らかなように時系列的には、本遺伝子は病兆進展に伴って、発現量が增大していることが明らかである。14RI-R ライブラリーからは見かけ上発現が減少したように認められたが、主要な PR タンパクとして生体防御に寄与することが改めて確認できた。いくつかの遺伝子について、さらに発現量の経時的追跡を行った結果、Thaumatin-like protein 同様に UP Regulate する遺伝子群と Down Regulate する遺伝子群の大きく二つに分かれた。その中に、クローン間で UP Regulate と Down Regulate に違いが認められた遺伝子が存在し(図3)、このような遺伝子は抵抗性に関与する候補遺伝子となる。本遺伝子は、重金属ストレスに応答する遺伝子として知られており、マツ材線虫病も水分ストレスが枯死の直接の引き金となることから、本遺伝子の応答がクローン間で異なる場合には生体防御そのものが異なることを示しており、これら遺伝子発現パターンの分類または収集が重要である。

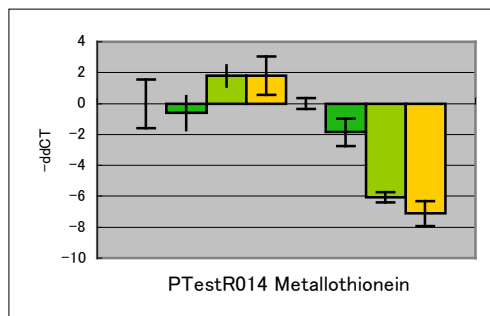


図3 クローン間で発現パターンが異なる遺伝子

d. まとめ

本研究の結果、マツノザイセンチュウ侵入後のクロマツ個体内の遺伝子発現プロファイルの外枠を埋めることが出来たと考える。一方で、サブトラクションライブラリーは発現量が極端に異なる場合に有効であり、希な発現をする遺伝子については見逃している可能性が高い。今後は、マイクロアレイへと発展させた上でより詳細な発現プロファイルの構築が必要である。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

①渡辺敦史・平尾知士・磯田圭哉(2009) マツノザイセンチュウ抵抗性品種開発へ向けた事業的取り組みと分子育種への指向 日本森林学会病虫害研究会

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・室長
研究者番号：10360471

(2) 研究分担者

磯田 圭哉 (ISODA KEIYA)
独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・第一研究室・研究員
研究者番号：60391702

(3) 連携研究者

()

研究者番号：