

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：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380010

研究課題名（和文）比較ゲノム情報を駆使したリョクトウ虫害抵抗性の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular basis of insect resistance in mungbean using comparative genomics information

研究代表者

石本 政男（ISHIMOTO MASAO）

独立行政法人農業生物資源研究所・ダイズゲノム育種研究ユニット・ユニット長

研究者番号：20355134

研究成果の概要（和文）：リョクトウ野生種に由来する虫害抵抗性因子は、貯蔵害虫であるマメゾウムシ類に加えて、ホソヘリカメムシに対して生育阻害活性を示す。この抵抗性の分子機構を解明するために、分離集団を用いて原因遺伝子の座乗領域を特定し、その領域のゲノム塩基配列を解読した。さらに、抵抗性系統においてこの領域から特異的に発現する2個の遺伝子を見だし、その構造を明らかにした。この領域には環状ペプチド合成に関与する遺伝子が座乗しており、抵抗性との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the molecular basis of bruchid resistance derived from a wild accession of mungbean (*Vigna radiata*), we constructed a fine linkage map and a detailed physical map around the insect resistance locus (*Br*) using a large-scale segregating population and three mungbean BAC libraries. Recombinant lines and their progenies indicated that the two distinct regions in the same linkage group are responsible for the resistance. In addition, RNA-Seq analysis revealed one gene, which strongly expressed in developing seeds of the resistant mungbean lines, was identified from each region harboring the resistance gene(s). These two genes shared a high degree of homology, but the function of the genes as well as their homologous genes in other plant species has not been annotated yet.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ゲノム、抵抗性、貯蔵害虫、アズキゾウムシ、ホソヘリカメムシ、BAC クローン、環状ペプチド、RNA-Seq

1. 研究開始当初の背景

リョクトウ (*Vigna radiata*) は南アジアから東アジア、オーストラリアを中心に広く栽培される、比較的乾燥に強いマメ科種子作物である。日本ではモヤシや「はるさめ」の原

料としてなじみが深い。リョクトウは貯蔵中にアズキゾウムシなどの害虫に食害され、しばしば、大きな損失を被る。そこで、申請者らは、近縁野生種を含め多種多様な遺伝資源に貯蔵害虫抵抗性を探索し、マダガスカルで

収集されたリョクトウ祖先野生種の 1 系統 TC1966 に強い抵抗性を見いだした。さらに、栽培種との交配後代の検定からこの抵抗性が一つの優性遺伝子 (*Br*) によって支配されることを明らかにした。これらの成果に基づいて、タイなどでは本抵抗性の栽培品種への導入が進められている。抵抗性系統の種子は甲虫目に属するマメゾウムシ類に加え、ダイズの害虫であるホソヘリカメムシの生育を阻害する。そのため、抵抗性系統の種子には、広い殺虫スペクトラムを持つ殺虫性物質が含まれ、抵抗性遺伝子はこの物質の生合成を制御しているものと推定される。したがって、この抵抗性の分子機構を解明できれば、様々な害虫に対する抵抗性遺伝子として、さらには、原因物質を殺虫剤として広範に利用することが期待できる。

リョクトウはアズキやササゲなどと近縁なササゲ属の作物であり、さらにはダイズやインゲンマメなどとともインゲンマメ連に分類される。近年、ダイズやインゲンマメでは塩基配列や発現遺伝子を含めゲノム情報が急速に集積しつつあり、これらの情報を利用してリョクトウの抵抗性遺伝子の単離や機能解析を進めることが現実的になってきた。

2. 研究の目的

これまで多くの植物から殺虫性化合物が報告されているが、生合成を制御する遺伝子まで明らかにされた事例はほとんどない。それは、このような物質を含む多くの植物ではゲノム情報や遺伝解析材料などの研究基盤が整備されていないことも一因となっている。例えば、本研究で対象とするリョクトウ祖先野生種の抵抗性遺伝子座乗領域には環状ペプチド (*vignatic acid*) 類の生合成を制御する遺伝子が座乗し、抵抗性との関連が示唆されている。環状ペプチドは薬用植物を中心に色々な植物種から報告されているが、本研究材料を含め植物における環状ペプチド類の生合成機構 (非リボゾーム型ペプチド合成経路) はいまだに明らかになっていない。

本研究ではリョクトウ種内の多様性 (抵抗性の有無) を利用して原因遺伝子の単離を図る。しかし、リョクトウにおいてもゲノム研究を展開するための研究基盤は整備されていない。そこで、BAC ライブラリーやゲノム配列情報など、抵抗性遺伝子単離のために必要な研究基盤の整備に重点的に取り組むとともに、進展著しい近縁作物のゲノム情報を援用して、虫害抵抗性の分子機構の解明を図る。

3. 研究の方法

(1) 大規模分離集団を用いた抵抗性遺伝子の高精度マッピング

感受性品種と抵抗性準同質遺伝子系統 (抵抗性 NIL) の交配に由来する F₂ 分離集団の各個体の葉から DNA を調製し、DNA マーカーを用いて抵抗性遺伝子 (*Br*) 座近傍の連鎖地図を作成する。DNA マーカーは Kaga and Ishimoto (Mol. Gen. Genet. 258:378-384 1997) の報告にあるものに加え、BAC クローンの塩基配列やダイズゲノム情報から新たに DNA マーカーを開発し、精密連鎖地図の作成に使用する。さらに、抵抗性遺伝子に近接した領域内で組換えを起こした個体について、DNA マーカーを用いて組換え位置を詳細に解析する。また、組換え型系統についてアズキゾウムシ抵抗性を調査し、抵抗性遺伝子の座乗領域の絞り込みを行う。

(2) 抵抗性遺伝子の座乗領域の物理地図と塩基配列解読

これまでに作出した *Hind*III 部分消化の BAC ライブラリー (MBH) に加え、新たに *Eco*RI あるいは *Mbo*I で部分消化した抵抗性 NIL の核 DNA から BAC ライブラリー (MBE, MBM) を構築し、3 次元プールを作成する。既知のゲノム配列を起点として、BAC クローンを単離し、末端配列を利用して整列化を進める。さらに、抵抗性遺伝子の座乗領域の BAC クローンについてはショットガンシーケンス法により塩基配列を解読する。得られた配列をつなぎ合わせてもギャップを生じた場合は、BAC クローン上をウォーキング法によって塩基配列を決定する。

(3) 抵抗性遺伝子が座乗するゲノム領域の発現遺伝子の解析

抵抗性 NIL および感受性品種の登熟中の種子から調製した mRNA を断片化し、これを鋳型として二本鎖 cDNA を合成する。この cDNA からライブラリーを作製し、HiSeq 2000 によりペアエンドシーケンス解析を行う。抵抗性必要領域の塩基配列を参照配列として、高速シーケンサーより得られる発現遺伝子のショートリード配列をマッピングする。

(4) 抵抗性関連物質の解析

抵抗性遺伝子座乗領域の近傍で組換えを生じた系統の種子成分を、LC-MS (質量分析装置) によって比較、解析する。

4. 研究成果

(1) 抵抗性の発現には複数の遺伝子が必要である

感受性品種×抵抗性 NIL の F₂ 分離集団を栽培し、葉から DNA を調製するとともに、個体毎に種子を収穫した。DNA と種子が揃った 2645 個体について、*Br* 座近傍の DNA マーカーを解析し、連鎖地図を作成した (図 1 A)。

図1 A に示した領域内で組換えを起こした130 個体について世代を進め、組換え領域が固定した系統の種子を得てアズキゾウムシ抵抗性を調査した。図1 C に示したグラフ遺伝子型のように、DNA マーカー Bng143 側あるいは Bng110 側が感受性品種の染色体（青色の部分）に組換わった系統を得た。これらの系統の一部は抵抗性を示したものの、大きく感受性品種の領域に置き換わると感受性になり、抵抗性の発現には広い染色体領域が必要であることがわかった。すなわち、抵抗性の発現には隣接した領域に存在する複数の遺伝子が関与していることが明らかになった。

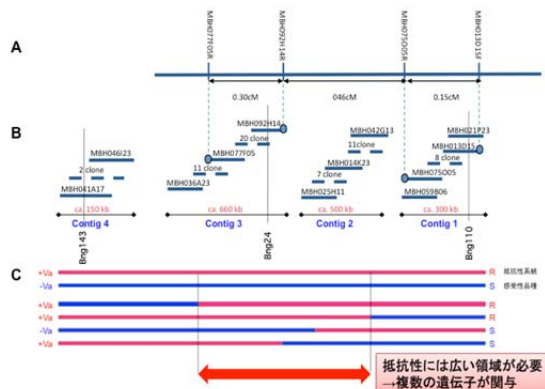


図1. 分離集団を用いた抵抗性遺伝子座乗領域の絞り込み

(2) 抵抗性に必要なゲノム領域の塩基配列を解読する

新たに構築した BAC ライブラリー、MBE と MBM はそれぞれリョクトウゲノムの約 2.5 倍量に相当した。すでに構築していた MBH と合わせて重複度が約 10 倍のゲノムライブラリーを作出した(表 1)。これらの BAC ライブラリーの 3 次元スクリーニングプールから、連鎖地図上の DNA マーカーの配列に基づいて BAC クローンを単離し(図 1 B)、末端配列の解読結果から隣接の BAC クローンを選抜した。これを繰り返すことにより、抵抗性領域全体をカバーする BAC コンティグの構築を進めた。その結果、総計 69 個の BAC クローンは 4 つの contig にまとめ、これらの contig 間をつなぐ、新たな BAC クローンを得ることはできなくなった(図 1 B)。そこで、末端配列に基づいてプライマーを設計し、組換え系統における多型性を調査することにより、物理地図と連鎖地図との整合性を確認した。抵抗性遺伝子は contig 2 の一部と contig 3 の一部を含む領域に座乗していることがわかった。

抵抗性が優性であることから、抵抗性領域の一部を持つ系統間で交配を行うことにより抵抗性遺伝子の座乗領域のさらなる絞り込みを進めた(図 2)。例えば、contig 3 の一

部を持つ系統 205-10 と contig 2 の一部を持つ系統 405-54 を交配し、その F₁ や F₂ 種子の抵抗性を検定することで、抵抗性に必要な染色体領域を絞り込んだ。その結果、BAC クローンが得られていない、contig 2 と contig 3 の間の領域は、抵抗性の発現には必要ではないことが明らかになった。そこで、contig 2 と contig 3 をカバーするよう 18 個の BAC クローンを選び、ショットガンシーケンシング法ならびに一部のクローンについてはロッシュ社の次世代シーケンサー(GS Junior ベンチトップシステム)により塩基配列を解読した。得られた配列をアセンブリし、いくつかのギャップがあるものの、contig 2 については 496 kb、contig 3 については 661 kb の塩基配列を得た。塩基配列の比較からこの領域はサイズの第 4 染色体ならびに第 6 染色体と高い相同性を示した。さらに、感受性を示す組換え型系統間の交配後代の解析から、BAC クローンの contig のうち contig 2 の 279 kb と contig 3 の 413 kb 内に抵抗性遺伝子が座乗することが明らかになった。

表 1. リョクトウ BAC ライブラリーの詳細

ライブラリー名とプレート番号	制限酵素	ベクター	平均インサート長 (kb)	インサート挿入率 (%)	384穴プレート数	総インサート長 (Mb)	×Genomes
MBH001-099	HindIII	pBAC-LAC	97.5	79%	99	2939.3	5.07
MBE101-117	EcoRI	pCC1BAC	101	88%	17	580.2	1
MBE131-160	EcoRI	pCC1BAC	84	88%	30	951.6	1.47
MBM001-015	Mbol	pCC1BAC	115	81%	15	536.5	0.92
MBM031-060	Mbol	pCC1BAC	84	100%	30	967.7	1.67
Total					191	5975.3	10.13

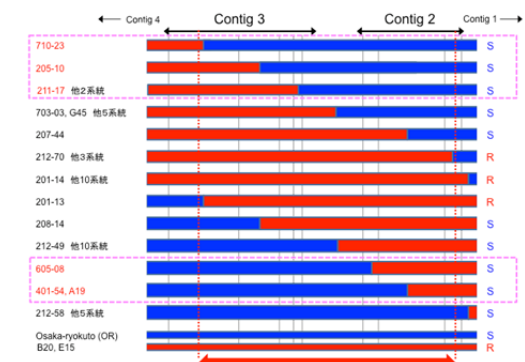


図2. 領域を相補することによって抵抗性遺伝子の座乗領域を絞り込む

(3) 抵抗性遺伝子座乗領域から発現する遺伝子の解析

この領域には、contig 2 では 2 カ所、contig 3 では 7 カ所の欠落部が存在する。それらを N100 で接続し、参照配列とした。抵抗性 NIL および感受性品種の生長段階の異なる登熟種子から mRNA を精製、cDNA を合成し、イルミナ社の次世代シーケンサー (HiSeq 2000) によるペアエンド法により 1 億 6 千万以上のリード数を得た。これらのペアエンド配列を Bowtie プログラムにより参照配列上へマッピングした。抵抗性 NIL では約 15 万リードがマッピングされたのに対し、感受性

品種では約 3000 リードがマッピングされた。抵抗性 NIL と感受性品種ともに共通した領域にマッピングされる発現遺伝子配列も存在したが、contig 2 と contig 3 の抵抗性必要領域において抵抗性 NIL でのみ強く発現していると推定される配列を検出した (図 3)。さらに、抵抗性 NIL の登熟中の種子におけるこれら 2 つの遺伝子の発現を RT-PCR およびノーザン分析により確認した。一方、感受性品種では発現を確認できなかった。これらの遺伝子は高い相同性を有しており、複数の類似配列が contig 2 と contig 3 に存在することがわかった。しかし、これらの遺伝子に構造が類似した遺伝子は他の植物にも存在するものの機能は未知であり、抵抗性との直接の関連を明らかにすることはできなかった。

(4) 環状ペプチドと抵抗性の関係



図3. 抵抗性に必要なゲノム領域の発現遺伝子の検出

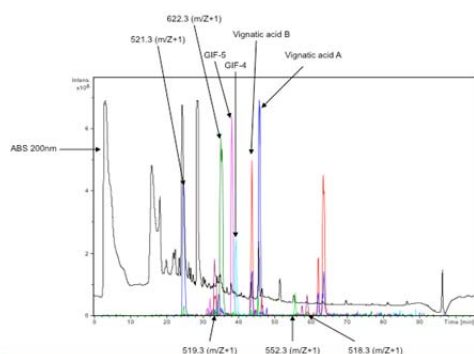


図4. LC-MS/MS分析による抵抗性NILに含まれる環状ペプチド類の検出

LC-MS/MS により、網羅的に vignatic acid 類 (vignatic acid A, vignatic acid B, GIF-4, GIF-5) を検出する条件を決定した (図 4)。この方法により contig 3 の抵抗性必要領域に vignatic acid 類の生合成に関与する遺伝子が座乗していることがわかった。また、contig 2 と contig 3 の抵抗性必要領域を合わせ持つ系統から特徴的な物質のシグナルを得たが、その構造を決定するには至らなかった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

①石本政男, 高木恭子, 佐山貴司, 横田侑子, Liu S, 廣瀬亜矢, 中本有美, 寺石政義, 加賀秋人: RNA-Seq によるリョクトウ貯蔵害虫抵抗性関連遺伝子の解析, 日本育種学会第 120 回講演会, 2011 年 9 月 24 日, 福井市 (福井

県立大学)

②石本政男, 寺石政義, Liu S, 佐山貴司, 廣瀬亜矢, 中本有美, 横田侑子, 佐藤修正, 平川英樹, 加賀秋人: リョクトウの貯蔵害虫抵抗性に必要なゲノム領域の解析, 日本育種学会第 121 回講演会, 2012 年 3 月 30 日, 宇都宮市 (宇都宮大学)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 政男 (ISHIMOTO MASAO)

農業生物資源研究所・ダイズゲノム育種研究ユニット・ユニット長

研究者番号: 20355134

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

菅原 二三男 (SUGAWARA FUMIO)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号: 30192123