

機関番号：82105

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780157

研究課題名 (和文) マツノザイセンチュウ抵抗性候補遺伝子のマッピングと eQTL 解析

研究課題名 (英文) Linkage mapping and eQTL analysis of candidate resistant gene for pine wilt disease caused by wood nematode

研究代表者

磯田 圭哉 (Isoda Keiya)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター関西育種場・育種研究室長

研究者番号：60391702

研究成果の概要 (和文)：

既報のマツノザイセンチュウ抵抗性候補遺伝子の EST 情報から 3'-RACE を行い、3'-end 付近にプライマーを設計し、半数体の雌性配偶体 DNA を利用してシングルジーンを増幅可能なものを選んだ。このうちの 2 領域で SNP が検出され、遺伝子のマッピングが可能となった。次に、キチナーゼ、PR4、TLP の 3 遺伝子について eQTL 解析を試みた。キチナーゼおよび PR4 の eQTL がマツノザイセンチュウ接種後の生存日数を指標とした抵抗性形質の QTL と同一連鎖群に検出された。このことは、これら遺伝子が抵抗性反応に関与していることを示唆するものと考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

3'-RACE was conducted using previously reported EST information of candidate resistant gene for pine wood nematode in order to determine 3'-end sequence of the ESTs. PCR primers were designed and single-genes were screened by sequencing haploid genome extracted from megagametophyte. Two primers were developed to amplify single-genes containing SNPs. Expression QTL analysis of pathogen related genes were conducted. EQTL of chitinase and PR-4 were detected in the same linkage group of phenotypic resistant trait, suggesting similar regulation factor was related to these genes and resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010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：森林学・森林科学

キーワード：森林生産・育種・遺伝学・林木育種

1. 研究開始当初の背景

マツ材線虫病は我が国のアカマツ・クロマツ林に甚大な被害を与え、多くのマツの美林を消失させる原因となった。そのため、昭和53年よりマツノザイセンチュウ抵抗性育種事業が行われ、抵抗性品種が開発された。今後は、より多様性に富んだ品種や、より抵抗性の高い品種の開発が抵抗性育種における課題となっている。そのためには、抵抗性メカニズムを明らかにしたうえで育種対象形質を再考することにより、抵抗性因子の選抜や集積を行っていくことも必要である。

我々は、これまでに、アカマツおよびクロマツの連鎖地図を作製し、QTL解析を試みた。しかし、発病するとほとんどが枯死にいたる本病は、抵抗性のレベルを評価するのが困難であり、QTL解析によって、どの程度の抵抗性要因が明らかにできるかについては疑問があった。そこで、生体防御遺伝子の発現量を定量的に調べ、それを形質とすることによって、抵抗性因子を含む QTL が解析可能であろうと考えた。

生体防御関連遺伝子については、渡邊ら(2007)により、cDNA サブトラクションライブラリから単離されており、それらを用いた。これまでに、いくつかの PR 遺伝子(病傷害関連遺伝子)がマツノザイセンチュウの侵入後に高い発現を示すことが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、マツ材線虫病に対する抵抗性因子として、接種後に発現する遺伝子を用いて、eQTL解析を行うことにより、抵抗性を発揮する遺伝子の連鎖地図上の位置を明らかにすることを目的としている。さらに、抵抗性候補遺伝子群を DNA マーカー化し、連鎖地図上に座乗させる方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 抵抗性候補遺伝子群の SNP 解析によるマッピング

渡邊ら(2007)がサブトラクションライブラリから単離した候補遺伝子群の EST 配列情報から 3'-RACE 用のプライマーを設計した。線虫接種後 10 日目のクロマツから主軸の皮層組織を採取、液体窒素で凍結し、RNeasy Plant Mini Kit を用いて Total RNA を抽出した。抽出した RNA と合成した 3'-RACE プライマーを用いて、3'-RACE core

Kit (TAKARA)により、3'-RACE 反応を行った。得られた産物をクローニングし、ABI 3130 により塩基配列を決定した。各 EST から得られた塩基配列を Sequenchar4.1.4 (Gene Code)でアッセンブルし、きわめて相同性の高い配列だけでコンティグを作成した。各コンティグの塩基配列から、新たなプライマーを設計した。設計したプライマーがシングルジーンを増幅可能かどうか調べるため、クロマツの雌性配偶体から抽出した半数体 DNA を用いて PCR 増幅をおこなった。アガロースゲル電気泳動でシングルバンドを示したプライマー対について、ドラゴンジェノミクスセンター (TAKARA) のプレミックスシーケンス受託解析を利用して、塩基配列を決定した。得られた塩基配列から、ダブルピークが見られないプライマー対がシングルジーンを増幅するものとした。複数個体の雌性配偶体 DNA の塩基配列から、SNP サイトを検出した。

(2) 抵抗性候補遺伝子群の eQTL 解析によるマッピング

抵抗性候補遺伝子として単離された EST のうち、先行研究 (Isoda et al. 2008) で発現量が特徴的であった EST について、eQTL 解析を試みた。

材料に用いたのは、強抵抗性クロマツ (志摩 64) と弱抵抗性クロマツ (穎娃 429) の交配家系で、既に連鎖地図の作成と接種後の生存日数を形質とした QTL 解析を行っている。この家系に、2008 年 7 月マツノザイセンチュウ (Ka4) を 1 万頭接種し、3 日後に主軸の皮層細胞を回収、液体窒素で凍結した。サンプルは、その後、 -80°C のフリーザーで凍結保存した。このサンプルから、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) を用いて Total RNA を抽出し、PrimeScript 1st strand cDNA 合成キット (TAKARA) で cDNA 合成後、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (ABI) により発現量の解析を行った。得られた各個体の発現量情報を形質データとして QTLcartographer で QTL 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 抵抗性候補遺伝子群の SNP 解析によるマッピング

表-1に3'-RACEを行うために設計したプライマーを示した。6種類のESTにそれぞれ2種類のプライマーを設計し、3'-RACE反応を行い、アガロースゲル電気泳動で確認したところ、07_RI-SI_437 (PR-1)、07_RI-SI_291 (β -1-3 glucanase)、07_SI-RI_130 (embrio avandant protein) の3つのESTにおいてシングルバンドが検出されたため、産物をTAクローニングし、3'-end付近の塩基配列を決定した。その結果、各ESTにおいて、複数のコンティグが作成された。各コンティグはきわめて相同性が高いものや、5'側は相同性が高いが3'側は相同性が低いものなどがあった。これらのうち、10クローン以上の配列がコンティグを作ったものについて、ゲノムDNAからPCR増幅するためのプライマーを設計した(表-2)。07_RI-SI_291については3種類、07_RI-SI_437については5種類、07_SI-RI_130については3種類のプライマー対を設計した。複数設計したのは、プライマー設計部位によって、増幅コピーが変わると思われるからである。

3'-RACEの結果から設計した、3'-end付近を増幅するプライマーによるPCR産物がシングルジーンかどうかを検証するため、半数体(n)ゲノムを保有する雌性配偶体を利用した。シングルジーンであれば、半数体ゲノムでは、シークエンスを行った際ダブルピークは観察されないが、ジーンファミリーなどの重複遺伝子を増幅している場合は、半数体ゲノムでもダブルピークが出現する。よって、複数の個体の半数体ゲノムを解析することにより、シングルジーンか否かが判定できる。8個体のクロマツ(全て抵抗性クロマツ)の種子から雌性配偶体を取り出し、CTAB法により半数体ゲノムを持つDNAを抽出した。これを鋳型として、合成したプライマーを用いて

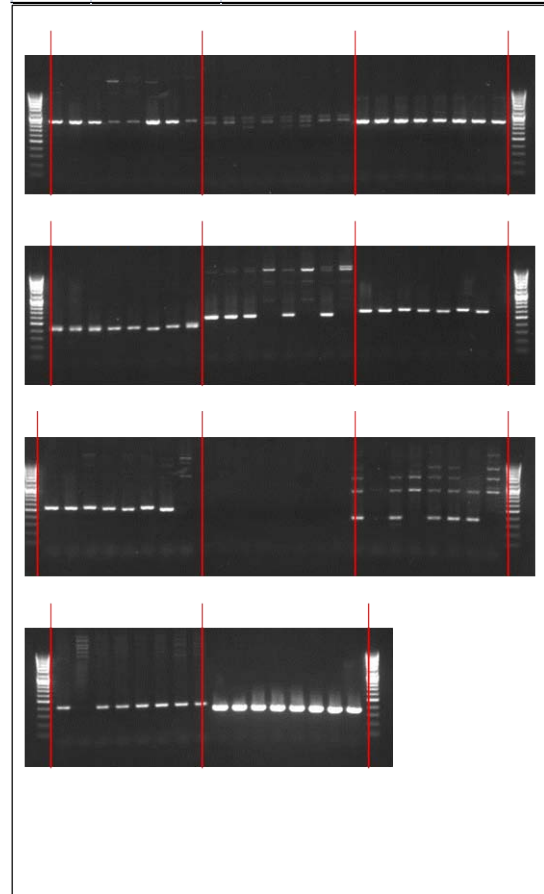
表-1 3'-RACEに用いたプライマー

| gene | Primer | sequence |
|-------------------------|-------------------|--------------------------|
| TLP | 03_RI-R_389race1 | agacgacacgaccagcacttcac |
| | 03_RI-R_389race2 | actggcacctccatgaagctcag |
| unknown | 07_RI-SI_040race1 | ccattgatgaaccactaagccaa |
| | 07_RI-SI_040race2 | tgccctgataaggaatggaagca |
| PR-1 | 07_RI-SI_437race1 | gacgtcctgggtaatagagaagca |
| | 07_RI-SI_437race2 | atacctgcgctgaaggacctgc |
| unknown | 07_RI-SI_114race1 | tagtaagcctcaacaacatcca |
| | 07_RI-SI_114race2 | gcoccttagtatcgtatgccagta |
| β -1-3 glucanase | 07_RI-SI_291race1 | gttgggtcaacgacaacattcg |
| | 07_RI-SI_291race2 | gcaacgaggtttgacaggcac |
| embrio avandant protein | 07_SI-RI_130race1 | ttgggaatcgaccaggccttactg |
| | 07_SI-RI_130race2 | tggcacaaaggatcggacgctg |

PCR増幅し、アガロースゲル電気泳動でシングルバンドを保有するかどうかを確認した(図-1)。その結果、07RISI291c, 07RISI437a, c, d, 07SIRI130b, cの6プラ

表-2 3'-end付近を増幅するためのプライマー

| gene | primer name | sequence |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| β -1-3 glucanase | 07RISI291a-f | GACAACATTGCCCCCTTCTA |
| | 07RISI291a-r | TGACTCAACGGCTACGACAC |
| | 07RISI291b-f | AAACATTCAAACCGCAGTCC |
| | 07RISI291b-r | CTACGCATGGCGTTACATTG |
| | 07RISI291c-f | AGAAACATTCAAGCCGCGAGT |
| | 07RISI291c-r | GGCGTTACAAGCGCAAATAA |
| PR-1 | 07RISI437a-f | GCTCAAGCTCAATGCAACAA |
| | 07RISI437a-r | TATTGGCAAGCCCTAATCCA |
| | 07RISI437b-f | TCCTGGGTTAATGAGAAGCAA |
| | 07RISI437b-r | GAAATCTAATTGCTGCCACT |
| | 07RISI437c-f | TCCTGGGTTAATGAGAAGCA |
| | 07RISI437c-r | CCGTATACCGTACCTAAGAACCA |
| | 07RISI437d-f | TACCTGCGCTGAAGGTAAG |
| | 07RISI437d-r | TGCTGTCAACTCTTGCCACT |
| | 07RISI437e-f | GTCCTGGGTTAATGAGAAGCA |
| 07RISI437e-r | TCATTGCATTAAGAATATGTTTGC | |
| embrio avandant protein | 07SIRI130a-f | TACATACTGGGCAGGGAAGC |
| | 07SIRI130a-r | TTGGGAAATGACACACCTTG |
| | 07SIRI130b-f | TACATACTGGGCAGGGAAGC |
| | 07SIRI130b-r | CCAAAAAGAAATCAAAATTAACCA |
| | 07SIRI130c-f | CTGGCGGCATGCTTAACACA |
| | 07SIRI130c-r | TCATGACCCGTGGGCCTTCT |



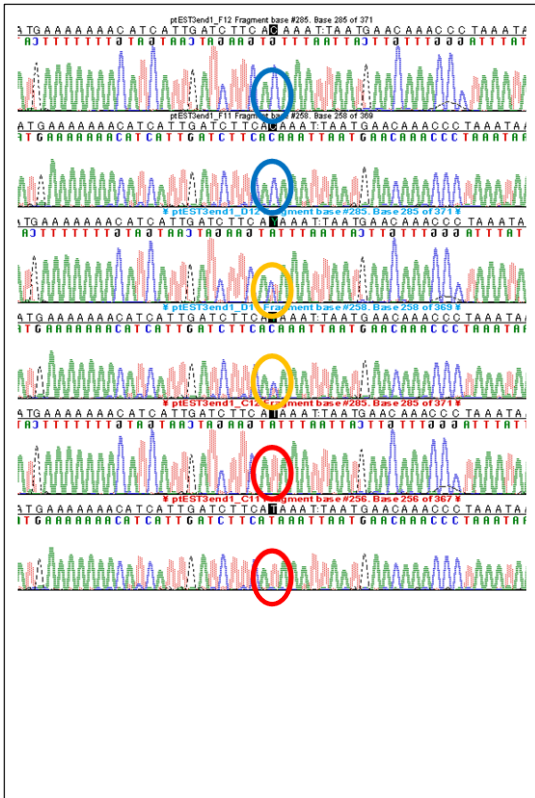


表-3 新たに作成したプライマーによるシングルジーンのスクリーニングとSNP検出結果

| プライマー | S/M *1 | 重複 *2 | SNP *2 | Indel *2 |
|------------|--------|-------|--------|----------|
| 07RISI291c | M | 6 | 11 | 0 |
| 07RISI437a | M | 9-20 | 26 | 1 |
| 07RISI437c | S | 0 | 4 | 4 |
| 07RISI437d | S | 0 | 4 | 3 |
| 07SIRI130b | M | 1 | 5 | 1 |
| 07SIRI130c | S | 0 | 0 | 0 |

*1 Sはシングルジーン、Mはマルチジーン
 *2 ダブルピークが見られたサイト数
 *3 全SNPサイト数(ダブルピーク含む)
 *4 Indelサイト数

プライマー対でシングルバンドが検出された。次に、これら PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンシングにより決定した。プライマーは PCR 反応に用いたものと同じのものを用い、ダイターミネーター法で両鎖を決定した。その結果、3 プライマー対ではダブルピークが検出され、2 領域以上の重複領域を増幅していることが明らかとなった(図-2)。残りの3プライマー対では、シングルピークのみが検出されシングルジーンを増幅に成功したと思われた。しかし、そのうちの1プラ

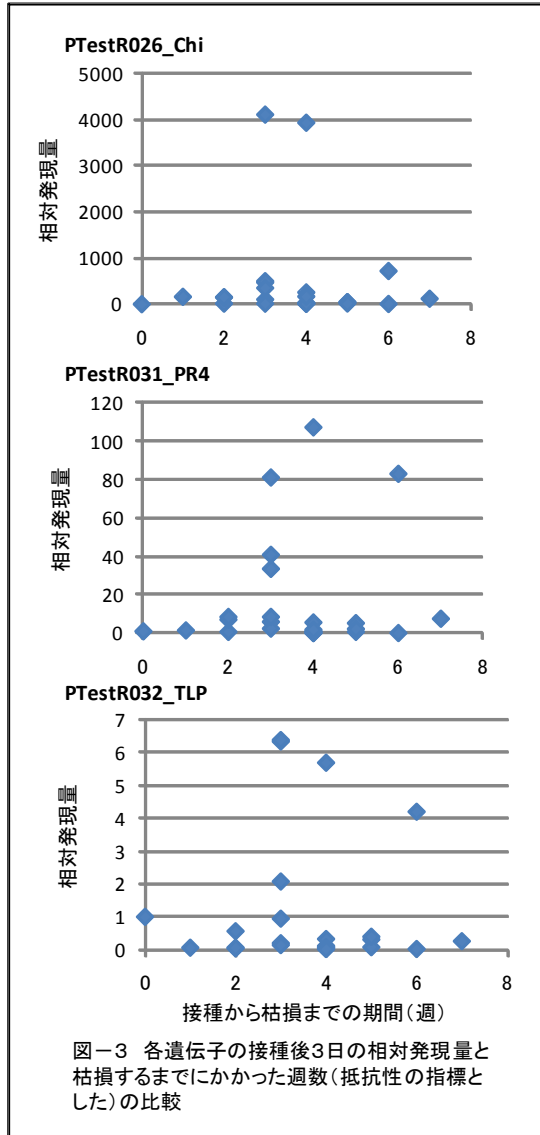


図-3 各遺伝子の接種後3日の相対発現量と枯損するまでにかかった週数(抵抗性の指標とした)の比較

(2) 抵抗性候補遺伝子群の eQTL 解析によるマッピング

eQTL 解析には、先行研究で線虫接種前後に発現量に特徴のあった病傷害関連遺伝子の EST である、PTestR026 (キチナーゼ)、PTestR031 (PR-4)、PTestR032 (TLP) の3つを使用した。なお、内在性コントロールには EF1 遺伝子を用いた。連鎖地図作成および表現形質データによる QTL 解析に用いた志摩 64 × 穎娃 429 の交配家系 92 個体のうち、23 個体について RNA の抽出に成功したため、これらの相対発現量を ddCT 法で調べた。コントロールには線虫を接種していないクロマツ組織から抽出した RNA を用いた。

各サンプルの相対発現量と表現形質を直接比較したところ、いずれの遺伝子とも相関

関係は見られなかった (図-3)。このことから、表現形質を直接的に表すような遺伝子はこの中にはないことが示された。

次に、相対発現量を量的形質として、eQTL解析を行った。表現形質のQTL解析では、第6連鎖群にもっとも高いピークが検出されている (図-4A)。PTest026 (キチナーゼ) では、表現形質と同様に、第6連鎖群に高いピークが検出された (図-4B)。このことから、キチナーゼの発現を制御する因子と抵抗性因子が同一連鎖群にあることが示唆された。PTestR031 (PR-4) においても、同じく第6連鎖群に高いピークが検出された (図-4C)。この遺伝子では、他にも、第1および第4連鎖群で高いピークが検出されている。複数の遺伝子座がこの遺伝子の発現に関与していると思われる、そのうちのいくつかは、抵抗性因子と関連がある可能性が示唆された。一方、PTestR032 (TLP) は、第1連鎖群に高いピークが検出され、第6連鎖群にはそれほど高いピークは検出されず、今回の表現形質とは関連が低いことが示唆された (図-4D)。これら病傷害関連遺伝子の発現QTLの多くが第6連鎖群に検出されたことから、抵抗性因子が第6連鎖群にある可能性が示唆されたと考えられる。

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0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯田 圭哉 (ISODA KEIYA)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター関西育種場・育種研究室長

研究者番号：60391702

(2) 連携研究者

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・育種第一課・基盤技術研究室長

研究者番号：10360471

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

