

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25252028

研究課題名(和文) トランスクリプトームの網羅的解析情報に基づく第三世代マツ材線虫病抵抗性品種の創出

研究課題名(英文) Development of the 3rd-generation resistant cultivars against pine wood nematodes based on the exhaustive transcriptome information

研究代表者

白石 進 (Shiraishi, Susumu)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70226314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：トランスクリプトームの網羅的解析法であるSuperSAGE法に改良を加えた。mRNAから合成したcDNAからの二本鎖cDNA合成にTerminal deoxynucleotidyl transferaseによるhomopolymer伸長法を、また次世代シーケンサ解析にdual label systemを導入し、安価で効率的な分析系を確立した。  
この改良法を用いて、材線虫感染後のクロマツでトランスクリプトームの時系列変化を調査した。マツは線虫の侵入後直ぐに反応があられること、抵抗性クローン間の遺伝子発現に大きな違いがあることが認められた。

研究成果の概要(英文)：A more economic and efficient SuperSAGE was established for exhaustive transcriptome analyses of a pile of samples, that is, homopolymer extension by Terminal deoxynucleotidyl transferase was introduced for the double strand cDNA synthesis. Also a dual labeling system was used in the sequencing with a NGS. The exhaustive transcriptome analyses using the modified SuperSAGE revealed that (1) pines attached by pine wood nematode expressed associated genes immediately after the infection, and (2) there are many differences in the gene expression among the resistant clones of Japanese black pine.

研究分野：造林学

キーワード：マツ材線虫病 樹病 抵抗性遺伝子 森林保護学 林木育種学

### 1. 研究開始当初の背景

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。主要な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(発現した全遺伝子(mRNA))解析、プロテオーム(発現した全蛋白質)解析に移行している。このための分析手法(オミックス)の進展が著しい。これにより、従来の研究法(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)へとシフトしてきている。

マツ材線虫病の解明に向けトランスクリプトームの網羅的解析が既に行われている。本病によるマツの枯損メカニズムを解明するため、トランスクリプトームの網羅的解析法を用いた研究を行い、抵抗性個体と非抵抗性個体における線虫感染後の発現遺伝子を詳細に解析し、両者の代謝系の差異を明らかにした。

一方、次世代シーケンサの登場によりトランスクリプトームの解析効率が飛躍的に向上した。従来のサンガー法に基づいた DNA シーケンサでは、網羅的解析に必要なとされる十分な塩基配列情報量を得られないため、多検体のトランスクリプトーム解析は困難であった。近年の次世代シーケンサの登場により、大量の塩基配列情報を簡便に得ることが可能となり、トランスクリプトーム解析の環境は一変した。

現在、マツ材線虫病に対する第二世代抵抗性品種の作出・普及が進められている。1978年～1984年に林野庁が実施した「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」において、クロマツで16抵抗性クローン(第一世代抵抗性クローン)が選抜された。さらに、2004年～2008年、第二世代抵抗性育種プロジェクト(農水省競争的資金)が行われた。このプロジェクトでは、第一世代クローンの自然交配子供群の中からより高い抵抗性をもつ個体(1,080クローン)が創出された。さらに、さし木発根性等の選抜基準をクリアした約100クローンが第二世代抵抗性品種として選ばれ、そのクローン苗木(さし木苗)生産のための採穂園が整備され、現在、第二世代抵抗性品種(ハイパークロマツ)の普及が始まっている。

### 2. 研究の目的

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。対策の一つとして抵抗性育種が行われ、現在第二世代抵抗性品種の苗木生産が始まっている。マツ側の抵抗性には複数の遺伝子が関与していると考えられている。本研究では、トランスクリプトーム解析法を導入し、(1)トランスクリプトーム解析法の一つで

ある SuperSAGE 法に改良を加え、安価で効率的な分析系を構築する。

- (2) 第一世代抵抗性クローンが保有する抵抗性遺伝子群を明らかにする。
- (3) 第二世代抵抗性クローンが保有している抵抗性メカニズムの多様性を評価する。
- (4) 以上の結果をもとに、第二世代抵抗性クローンを育種母材料とした次世代以降の育種戦略について検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 第一世代抵抗性クローンにおける抵抗性関連遺伝子のクローン間変異の解明

マツ材線虫病抵抗性育種の育種母材料となっている第一世代抵抗性クローン(マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業で選抜された16クローン)を用いて、線虫感染後の抵抗性関連遺伝子の発現を調査し、個々の抵抗性クローン間の抵抗性メカニズムの差違を調べる。

#### (1) 供試材料と線虫接種処理

第一世代抵抗性16クローンを供試し、線虫の人工接種区と非接種区を設定した。なお、非接種区には滅菌水を接種した。線虫接種2日後のトランスクリプトームを解析した。

#### (2) トータル RNA の抽出と二本鎖 cDNA 合成、PCR によるラベル化

各サンプルの当年枝を採取し、液体窒素中で凍結保存した。サンプルからの RNA 抽出は、改良チオシアン酸グアニジン法を用いて行った。Terminal deoxynucleotidyl transferase による homopolymer 伸長法を用いて、トータル RNA に含まれる mRNA から二本鎖 cDNA を合成した。処理区ごとに固有の5'テール(タグ)をもつプライマーで PCR を行い、次のシーケンス解析の鋳型 DNA を調製した。

#### (3) シークエンス解析

得られる複数サンプルのタグ付き二本鎖 cDNA を混合した。混合 PCR 産物から各サンプルのライブラリーを作成した後、次世代シーケンスシステム(本学共同利用機器, MiSeq (Illumina))を用いて、塩基配列を決定した。

#### (4) トランスクリプトーム(発現遺伝子)解析

得られた塩基配列情報を整理し、塩基配列別の出現頻度を求め、線虫接種後の遺伝子発現の変化を明らかにした。

#### (5) 抵抗性関連遺伝子のクローン特異性の解明

各クローンの接種-非接種間での発現遺伝子の差異、およびクローン間における差異を明らかにし、各クローンが保有する抵抗性遺伝子の差違を明らかにした。

#### 2) 第二世代抵抗性クローンの保有遺伝子の解明

第一世代抵抗性クローン間の交配子供群(1,080個体)から選抜された第二世代抵抗性クローンについて、前述の通りトランスク

リプトーム解析を行い、各クローンが保有する抵抗性遺伝子群を明らかにした。具体的な手順は以下のとおりである。

(1) 供試材料と線虫接種処理

第二世代抵抗性 29 クローンを使って、線虫を人工接種し、線虫接種 2 日後のトランスクリプトームを解析した。

(2) トータル RNA の抽出と二本鎖 cDNA 合成、PCR によるラベル化

各サンプルの当年枝を採取し、トータル RNA を抽出、二本鎖 cDNA を合成した後、各クローンのサンプルにタグを付加し、ライブラリーを作成した。

(3) シークエンス解析

ライブラリーを混合し、次世代シーケンスシステムで、タグの塩基配列を決定した。

(4) トランスクリプトーム（発現遺伝子）解析

得られた塩基配列情報を整理し、タグ塩基配列別に求めた出現頻度から各クローンで特異的に発現する抵抗性遺伝子（タグ）を特定した。

3) 抵抗性遺伝子の集積化による第三世代抵抗性品種の創出のための検討

第二世代抵抗性品種の子供群から第三世代抵抗性品種創出のための育種戦略について検討した。

4. 研究成果

1) トランスクリプトームの網羅的解析のための改良 SAGE 分析法の構築

網羅的トランスクリプトーム解析法の一つである SAGE 分析 (Serial Analysis of Gene Expression, Velculesc 1995) を用いた。Matsumura ら (2010) によって改良された High-throughput SuperSAGE にさらに改良を加え、次世代ゲノムシーケンサ (Illumina MiSeq) を用いた安価で、効率的な SuperSAGE 法を構築した。大きな改良点は、次の 2 点である。

mRNA から逆転写酵素で合成した一本鎖 cDNA を用いて二本鎖 cDNA を合成する過程に、Terminal deoxynucleotidyl transferase による homopolymer 伸長活性を利用した。これにより、安価に二本鎖 cDNA を得ることが可能となった。

次世代シーケンサのライブラリー作成法について検討し、dual index 法と PCR プライマーの集約化を行った。これにより少数のアダプター (28 種類) で 384 ライブラリーの作成が可能となり、分析効率が大きく向上した。

なお、最終的に確立した SAGE ライブラリー作成系で使用するプライマー、アダプター等は図 1 に示す通りである。

2) マツ材線虫病感染後の宿主におけるトランスクリプトームの変化

マツ材線虫病感受性クローンをういて、線虫接種直後、3 時間後、6 時間後、1 日後、3 日後、1 週間後、2 週間後の 7 ステージにお

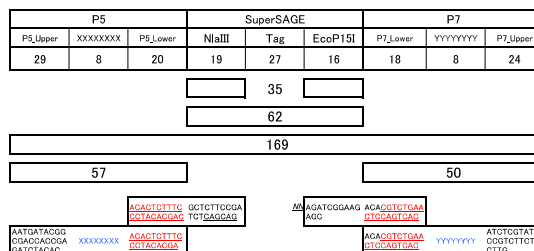


図1 次世代シーケンサ (MiSeq) によるシーケンス戦略 (改良 SuperSAGE)

けるトランスクリプトームの変化を時系列で解析した。その結果、接種直後から遺伝子発現に変化 (発現増加: 7 タグ, 発現減少: 10 タグ) が見られた。このことから、線虫の侵入により宿主 (マツ) で過敏反応が起るとする既往の報告が支持された。

3) 第一世代抵抗性クローンのトランスクリプトーム解析

1978~1984 年に行われた「マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業」により、クロマツでは本病に対し抵抗性をもつ 16 クローンが選抜され、今日、これらの第一世代クローンをういて造成された採種園産種子から実生苗を育苗し、抵抗性検定 (材線虫を人工接種) に合格した苗木が実際の造林に使われている。この第一世代抵抗性クローンの材線虫接種後の遺伝子発現を改良 SuperSAGE 法を用いて調査した。

接種 2 日後、60 遺伝子の遺伝子 (タグ) 発現に顕著な変化が認められた。これらの遺伝子の発現のクローン間での差を表 1 に示した。

表 1 第一世代抵抗性クローンにおける発現遺伝子の共通性

クローン数	増加	減少
10	1	1
6	1	1
4		1
3	5	2
2	6	6
1	19	17
計	32	28

第一世代の 16 クローンすべてで変化した遺伝子はなく、2 遺伝子 (増加: 1, 減少: 1) が 10 クローンで観察された。また、2 遺伝子 (増加: 1, 減少: 1) が 6 クローンで観察された。残る 56 遺伝子は、4~1 クローンのみで変化が見られたことから、クローン特異的に発現することが示唆された。

また、クローン間の発現遺伝子群 (トランスクリプトーム) の類似性をみるために主成分分析を行った。前述の結果と同様、トランスクリプトームの発現遺伝子組成を大きく異にするクローンが多数認められた。第 1 成

分・第2成分の累積寄与率はわずか37.7%と小さく、多数の遺伝子が関与していることが裏付けられた。このことから、第一世代の抵抗性メカニズムにはクローン間で違いのあることが明らかとなった。

#### 4) 第二世代抵抗性クローンのトランスクリプトーム解析

現在、第一世代子供群から育成された第二世代抵抗性品種の普及が始まった。第二世代抵抗性品種がその抵抗性メカニズムに多様性を保有していることは、次世代以降の育種戦略を立案する上で重要な知見となる。そこで福岡県が育成した第二世代抵抗性品種（筑前ハイパークロマツ）を構成するクローン群から29クローンを選び、線虫接種後のトランスクリプトームの変化を調査した。

接種2日後における遺伝子発現のクローン間での差を表2に示した。

表2 第二世代抵抗性クローンにおける発現遺伝子の共通性

クローン数	増加	減少
17	1	
12	1	
4	4	4
3	8	5
2	14	16
1	63	67
計	91	92

遺伝子発現に顕著な違いが認められた遺伝子（タグ）は183個（増加：91，減少：92）であった。このうちの1遺伝子が17クローン共通で発現（増加）した。同様に、1遺伝子（増加）が12クローン共通であった。残る181遺伝子は、ごく少数のクローンもしくはクローン特異的な発現を示した。

以上の結果から、第二世代抵抗性クローン群においても、抵抗性メカニズムの多様性が維持されていることが示唆された。

#### 5) 次世代以降の育種戦略

第一世代、第二世代抵抗性クローンの両方でトランスクリプトームの多様性が認められたことから、抵抗性メカニズムにおいても高い多様性が維持されていることが示唆された。

第三世代以降の育種母材となる第二世代抵抗性クローン群に、抵抗性メカニズムの多様性が維持されていたことから、将来世代の抵抗性育種でも高い改良ポテンシャルが期待できるものと思われる。林木では、集団の遺伝的多様性をできる限り維持するために、「集団選抜育種法」が採用されてきた。このことから、できるだけ多くの第二世代抵抗性クローンを親とし、交雑（自然交雑が良い）による子供群から第三世代抵抗性クローン

を選抜し、新品種育成を行うのが望ましいと考える。なお、次世代で近交弱勢を起こさないためには、DNAによる親子鑑定によって近縁家系の重複を排除することは必須である。

また、25塩基のタグ情報から抵抗性遺伝子群を解明し、その代謝系での機能解析を行うことにより、計画された育種戦略の妥当性をより高い信頼性を持って評価することができる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕 なし

#### 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

##### (2) 研究分担者

森 康浩 (Mori, Yasuhiro)

福岡県農林業総合試験場資源活用研究センター・専門研究員

研究者番号：20558613

##### (3) 研究分担者

後藤栄治 (Gotoh, Eiji)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90614256