

マイクロアレイ法を用いたイチゴ炭疽病応答性遺伝子の検索

1. 試験のねらい

イチゴ炭疽病耐病性品種の開発に有用な遺伝子情報を得る目的で、多数の遺伝子の働きを同時に解析できるマイクロアレイ法を用いて、イチゴ炭疽病菌接種後に特異的に発現が変化する遺伝子を検索する。

2. 試験方法

(1) イチゴ遺伝子の集積とマイクロアレイの作製

とちおとめ各組織（葉、花、果実、根）の cDNA ライブラリーを作製し、単離したクローンの塩基配列解析を行った。その後、グルーピングプログラム CAP3 により非重複クローンを決定した。各クローンは DNA を PCR で増幅後スライドガラスへ高密度にスポットし、cDNA マイクロアレイを作製した。

(2) マイクロアレイ法によるイチゴ炭疽病応答性遺伝子の検索

供試材料には、とちおとめ（炭疽病耐病性弱）、いちご中間母本農 2 号（炭疽病耐病性強）および（とちおとめ×いちご中間母本農 2 号）F₁ 系統を用いた。炭疽病菌接種 8 時間後のいちご培養苗から RNA 抽出し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。さらに、リアルタイム PCR 法により、選抜した遺伝子の詳細な発現解析を行った。

3. 試験結果および考察

(1) とちおとめ各組織から収集した cDNA クローン数は 21,866 個であり、そのうち 8,732 個が非重複クローンであった(表 - 1)。非重複クローンの塩基配列を NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) タンパク質データベース(nr)と同源性検索を行った結果、2,413 個(27.6%)のクローンで遺伝子機能が推定可能であった(図 - 1)。また、非重複クローンとコントロール DNA、計 9,200 個をスポットしたイチゴ cDNA マイクロアレイを作製した。

(2) いちご苗に炭疽病菌を接種し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、炭疽病耐病性強の F₁ 系統で共通して発現量が増加した遺伝子など、44 クローンを選抜した(図 - 2)。

(3) 選抜した cDNA クローンの遺伝子を、リアルタイム PCR 法により発現解析した。その結果、アレイ試験と同様に、いちご中間母本農 2 号や F₁ 系統において、とちおとめより顕著に強く発現する遺伝子が多数認められた。特に、炭疽病耐病性強系統（いちご中間母本農 2 号含む）のみで強く発現する 12 個の遺伝子の発現パターンにより、耐病性強系統、弱系統を判別可能と考えられた（表 - 2、矢印部）。

4. 成果の要約

とちおとめの各組織から、計 8,732 個の非重複クローンを収集した。また、それらの中から、イチゴ炭疽病耐病性強系統と弱系統を識別可能と考えられる有望な遺伝子候補をみいだした。

（担当者 生物工学部 遺伝子工学研究室 松島雄大、天谷正行、生井 潔*、森島正二**）

*現 応用生物研究室 **現 環境技術部病理昆虫研究室

表 - 1 いちごの各組織から収集したクローンの内訳と非重複クローン数

	葉由来	炭疽病接種 葉由来	花由来	成熟果実 由来	未成熟 果実由来	根由来	全クローン数	非重複 クローン数
クローン数	3,072	3,360	1,728	4,512	7,584	1,630	21,886	8,732

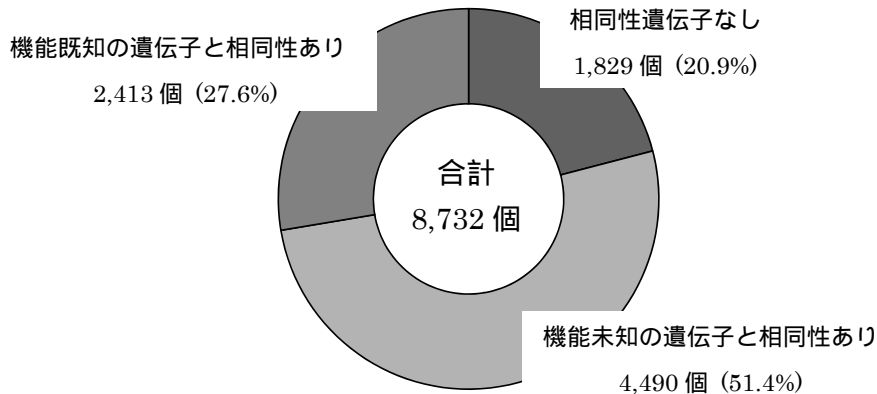


図 - 1 イチゴ cDNA 非重複クローンの同一性検索結果

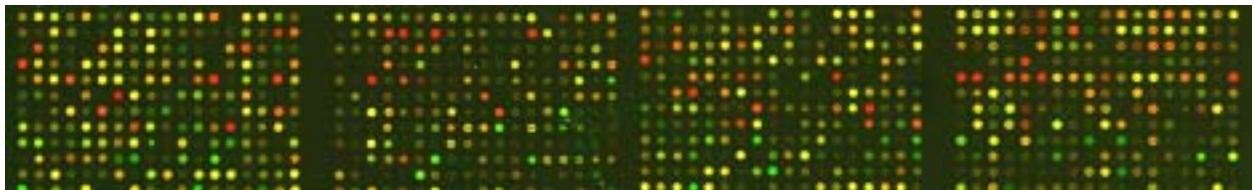


図 - 2 マイクロアレイ法によるイチゴ炭疽病応答性遺伝子の発現解析例

赤：耐病性強系統で発現する遺伝子 黄：強弱で発現に差のない遺伝子 緑：耐病性弱系統で発現する遺伝子

表 - 2 リアルタイム PCR 法によるイチゴ炭疽病応答性遺伝子の詳細な発現解

遺伝子名	炭疽病耐病性 強系統				弱系統		
	農2 a) 13 b)	F1-45 13	F1-68 31	F1-87 22	F1-36 100	F1-57 100	F1-91 100
d) 09-31	1.92 c)	2.06	1.21	1.78	0.74	0.08	-0.31
09-32	1.72	1.03	1.11	1.08	-0.09	-0.99	-0.89
09-33	0.69	-0.03	0.09	0.61	0.16	-0.46	-0.38
09-34	2.05	1.79	1.84	2.01	-0.34	0.42	0.30
09-35	2.19	1.92	1.67	2.07	0.16	0.03	-0.13
09-36	1.42	1.11	1.27	1.40	-0.12	0.15	-0.13
09-37	0.86	-1.52	0.23	0.11	-0.64	-1.48	-1.55
09-38	1.70	1.08	1.52	1.69	0.00	0.02	0.00
09-39	1.21	1.08	1.25	1.27	-0.25	0.02	0.10
09-40	1.47	0.91	1.42	1.38	-0.18	0.15	-0.10
09-41	2.77	2.19	2.30	1.95	0.53	0.79	0.95
09-43	0.83	1.32	1.60	1.12	0.12	0.43	0.36
09-44	0.78	0.58	0.74	0.74	-0.11	-0.71	-0.40
09-45	0.90	0.57	0.67	0.80	0.11	-0.35	-0.03
09-46	2.34	1.42	2.41	1.65	1.14	0.35	0.48
09-47	2.28	2.23	2.21	2.85	0.06	-0.29	-0.70
09-48	3.61	3.76	4.14	3.92	0.18	-0.15	-0.98

a) 農 2 はいちご中間母本農 2 号を示す。

b) 数値は発病度を示す。発病度= $\{\sum(\text{発病指数} \times \text{当該株数}) / 4 \times \text{調査株数}\} \times 100$ により算出した。発病指数は 0:無病徴、0.5:斑点型病斑形成、1:黒褐色の陥没病斑形成、1.5:葉柄褐変、2:葉柄折損、3:萎凋、4:枯死とした。

c) 太字は、炭疽病接種後のとちおとめの発現量を 1 とした時の相対発現量を対数化(log₂)した値を示す。

d) 矢印は炭疽病耐病性強・弱 F₁ 系統間で異なる発現パターンを示した遺伝子。