

クロマツにおける EST (Expressed Sequence Tag) 多型の利用

林 英司⁽¹⁾・近藤禎二⁽¹⁾・寺田貴美雄⁽²⁾・倉本哲嗣⁽¹⁾・シブ シャンカール カンダン⁽³⁾

Eiji Hayashi⁽¹⁾, Teiji Kondo⁽¹⁾, Kimio Terada⁽²⁾, Noritsugu Kuramoto⁽¹⁾
and Shiv Shankhar Kaundun⁽³⁾

Transferability of EST (Expressed Sequence Tag) Developed in Loblolly Pine to Japanese Black Pine

要旨：テーダマツで報告された EST (Expressed Sequence Tag) マーカーが、クロマツで利用可能なかを明らかにするとともに、ESTの多型を用いて互いの連鎖地図の一部を連結する目的で、遺伝子増幅を行った。117プライマー対のうち72対(62%)で単一の断片が増幅された。その他のプライマー対では全く増幅がみられないか、検出強度が著しく低かった。これら72プライマー対のうち16対で得られた増幅断片の制限断片長多型を10酵素種で調べたところ、3プライマー対の増幅断片が多型が見られた。これらの3多型は人工交配家系で遺伝的分離を示した。このうちマーカー PtFG8898 は、耐虫東奥育17号の自然交雑種子由来の大配偶体で、1:1の期待比に適合する54:41の分離を示し、既存のクロマツ連鎖地図中の第10連鎖群に位置づけられた。このマーカーは、テーダマツの第4連鎖群に位置することがすでに明らかにされているため、これらの連鎖群は互いに相同であると推定された。マツ類の中でテーダマツは、EST開発のもとになる発現遺伝子の塩基配列が最も明らかにされている樹種の1つである。今後、この情報をうまく活用し、クロマツの連鎖地図の充実に役立てることができると考えられる。

1 緒 言

われわれは、既報において AFLP および RAPD マーカーによるクロマツの連鎖地図を作成した³⁾。この連鎖地図は、ゲノムの約80%をカバーするとともに第1連鎖群にマツバノタマバエ抵抗性遺伝子が位置することが明らかになっているが、その他に有用形質の育種に利用可能な情報を現時点では含んでいない³⁾。したがって、より多くの DNA マーカーや遺伝子を地図上に位置づけて実用性の高いものにする必要があり、そうして得られる連鎖地図は育種を

(1) 林木育種センター

〒319-1301 茨城県多賀郡十王町大字伊師 3809-1

Forest Tree Breeding Center

3809-1 Ishi, Juo, Taga, Ibaraki 319-1301 Japan

(2) 林木育種センター東北育種場

〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字大崎 95

Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center

95 Osaki, Takisawa, Iwate 020-0173 Japan

(3) 生物系特定産業技術研究推進機構

〒331-8537 埼玉県さいたま市日進町1丁目40番地2

Bio-oriented Technology Research Advancement Institution

1-40-2 Nisshin, Omiya, Saitama, Saitama 331-8537 Japan

効率的に進めるために役立つことができると期待されている。

一方、テーダマツでは、多くの発現遺伝子の塩基配列が明らかになり、この情報にもとづき多数のEST (Expressed Sequence Tag) マーカーを含む連鎖地図が報告されている¹⁰⁾。遺伝子の塩基配列は近縁の種間では保存性が高いと考えられているため、テーダマツのESTをクロマツに利用することにより、新たにマーカーを開発する手間を省くとともに、機能が明らかな遺伝子を比較的容易に連鎖地図に位置づけられると期待される。さらに、テーダマツでは、成長、容積密度等さまざまな形質のQTLが明らかにされているため^{2) 4) 5) 9)}、EST等の「橋渡し」マーカーにより種間で連鎖地図を連結することにより、既知の有用形質に関する情報を共有できる可能性がある。

そこで本報告では、テーダマツで開発されたESTプライマー対がクロマツでどの程度増幅可能なのか検討し、その制限断片長多型を利用して連鎖地図に位置づけ、テーダマツの連鎖地図と連結することができたので、これについて述べる。

2 材料と方法

2.1 供試材料

クロマツのマツバナタマバエ抵抗性個体である耐虫東奥育8号 (R8)、11号 (R11)、14号 (R14)、16号 (R16)、17号 (R17)、27号 (R27)、感受性個体の被害木6号 (S6)、交配家系No.14 (R17xR14)、No.16 (R17xS6)、アカマツとしてマツノザイセンチュウ抵抗性個体の岡山132号の針葉およびR17の自然交雑種子の大配偶体を分析に用いた。

2.2 DNA抽出

針葉および大配偶体からのDNA抽出の手順は既報⁶⁾と同様である。

2.3 ESTの多型検出

本研究ではアメリカ農務省 (USDA) を中心に進められているESTプロジェクトで開発された117プライマー対を用いた。25 μ lの反応液を、鋳型DNA 25 ng、20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、各dNTP 0.2 mM、各プライマー 5 pM、TaqDNAポリメラーゼ 1Uの組成に調整した。サーマルサイクラー PTC-200 (MJ Research) を使用して、Temesgenらの反応温度条件¹⁰⁾により遺伝子増幅 (Polymerase Chain Reaction, PCR) を行った。得られたPCR産物2 μ lを下記の制限酵素で処理し、2%アガロースゲル上で電気泳動を行い、多型を示す制限酵素を選抜した。制限酵素処理の反応液組成、温度条件はその製造元が推奨する方法で行った。

使用した制限酵素は、AluI、HaeIII、HhaI、HinfI、MboI、MseI、MspI、NciI、RsaI、ScrFIの10種である。

2.4 連鎖分析

耐虫東奥育17号の大配偶体で遺伝的分離を示したESTと、既報³⁾の AFLPおよびRAPDマーカーの分離データを合せ、コンピュータ・プログラムMAPMAKER/EXP 3.0^{7) 8)}を使用して連鎖分析を行った。ESTが座乗する連鎖群を知るために「Group」コマンドを、連鎖群中の最良なマーカーの位置を明らかにするために「Try」コマンドを実行した。また、「Ripple」コマンドでマーカーの順序を再確認した。マーカー間の地図距離の算出には、Haldane地図関数を用いた。

3 結 果

3.1 増幅断片の制限断片長多型

検討した 117 対の EST プライマー (芽ばえの針葉由来 60 対, 辺材部由来 57 対) のうち, 72 対でテーダマツと分子量の同じ増幅断片が得られた。その他については, 全く増幅されないか, 検出強度が著しく低かった。この 72 プライマー対中半数の 36 対はテーダマツの連鎖地図上に位置づけられている。そこで, 36 プライマー対中 11 対を含む 16 対について, 交配親間で制限断片長多型の有無を検討したところ, プライマー対, PtIFG2290, PtIFG2358 (針葉由来), PtIFG8898 (辺材由来) において, クロマツの個体間で多型が検出された。

PtIFG2290 では, 制限酵素 *Hinf*I による切断後, 全個体で約 350 bp および約 500 bp の断片が, さらに R8, 14, 16 およびアカマツ岡山 132 号ではもう 1 個の断片 (約 840 bp) が検出された (図 1 上段)。約 840 bps の断片は PCR 産物そのものであるため, これが検出された R8, 14, 16 およびアカマツ岡山 132 号はヘテロ接合型 (AB), 検出されない R11, 17, 27, S6 はホモ接合型 (BB) と想定し, このことを確認するために F_1 家系 R17xR14 での遺伝子型の分離を調査した。 F_1 では, 分離比が AB:BB = 8:7 となり, 期待分離比 1:1 に適合した (図 1 下段, 表 1)。

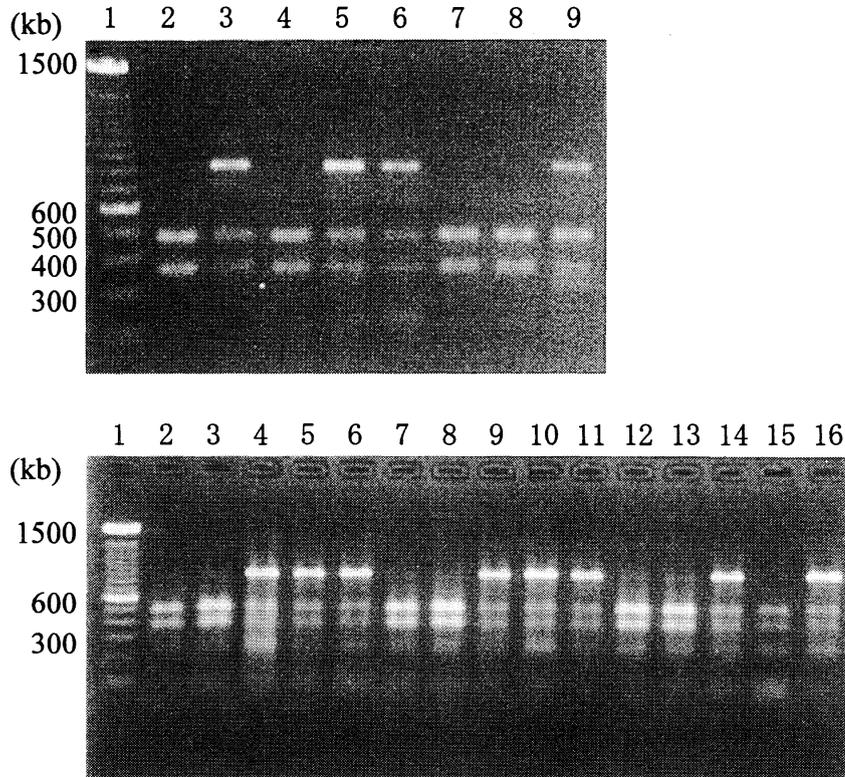


図 1. EST 多型 (PtIFG2290/*Hinf*I)

レーン 1, DNA サイズマーカー (100bp ラダー)

上段: レーン 2, 耐虫東奥育 17 号; レーン 3, 同 14 号; レーン 4, 被害木 6 号;

レーン 5, 耐虫東奥育 16 号; レーン 6, 同 8 号; レーン 7, 同 27 号; レーン 8, 同 11 号;

レーン 9, アカマツ岡山 132 号

下段: レーン 2-16, F_1 (耐虫東奥育 17 号 x 同 14 号) 15 個体

表1 クロマツで得られた EST 多型

マーカー名	プライマーの塩基配列 (5'→3')		PCR産物の断片長 (kb)	予想される機能	制限酵素	分離集団	分離比
	フォワード側	リバース側					
PtIFG2290	AGCTTGCAGCATCAACCG	GAACCAACAGCTTCAGGACC	840	Light harvesting complex chlorophyll a/b binding protein	<i>Hinf</i> I	R17 (BB) × R14 (AB)	AB: BB=8: 7
PtIFG2358	GTTAACCCCTCGAGGAGACATG	GCTTCCACAGTCCACAATCTG	330	-	<i>Mse</i> I	R17 (BB) × R14 (AB) R14 (AB) × R17 (BB)	AB: BB= 13: 9 AB: BB=12: 8
PtIFG8898	ATGGGGGTGCAGCATAAAC	GGGATGGCAACAACAAAAAG	1150	Transmembrane protein WD40-repeat type I	<i>Hha</i> I	R17 (AB) × R11(AB) R17 (AB)種子大配偶体	AA: AB: BB= 1: 8: 5 A: B= 54: 41

PtIFG2358 では、制限酵素 *Mse* I による切断後、R8 で約 330 bp の PCR 産物のみが検出され、R8, 14 以外では約 280 bp の断片のみが検出され元の断片は検出されなかった (図 2 上段)。R14 では、これら 2 個の断片がともに検出された。したがって R8 がホモ接合型 (AA), R14 がヘテロ接合型 (AB), R11, 16, 17, 27, S6 およびアカマツ岡山 132 号がホモ接合型 (BB) と想定し、R17 および R14 の相互交配家系で遺伝子型の分離を調査した。F₁ 家系 R17xR14 では AB: BB = 13: 9 となり 1: 1 の期待分離比に適合し (図 2 下段)、これは正逆 F₁ 家系の R14xR17 でも同様だった (表 1)。

PtIFG8898 では、制限酵素 *Hha* I による切断後、R14, 27 およびアカマツ岡山 132 号で約 1150 bp の PCR 産物のみが検出され、S6, R8 では約 1000 bp の断片のみが検出された。また、R11, 16, 17 では、これら 2 個の断片がともに検出された (図 3 上段)。したがって、R14, 27 およびアカマツ岡山 132 号がホモ接合型 (AA), R11, 16, 17 が

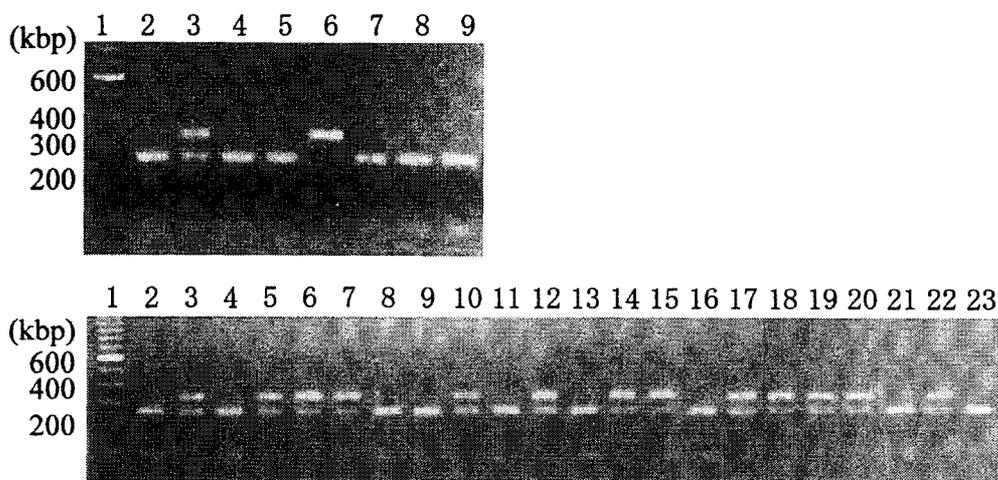


図2. EST 多型 (PtIFG2358/*Mse* I)

レーン 1, DNA サイズマーカー (100bp ラダー)

上段: レーン 2, 耐虫東奥育 17 号; レーン 3, 同 14 号; レーン 4, 被害木 6 号;

レーン 5, 耐虫東奥育 16 号; レーン 6, 同 8 号; レーン 7, 同 27 号; レーン 8, 同 11 号;

レーン 9, アカマツ岡山 132 号

下段: レーン 2-23, F₁ (耐虫東奥育 17 号 x 同 14 号) 22 個体

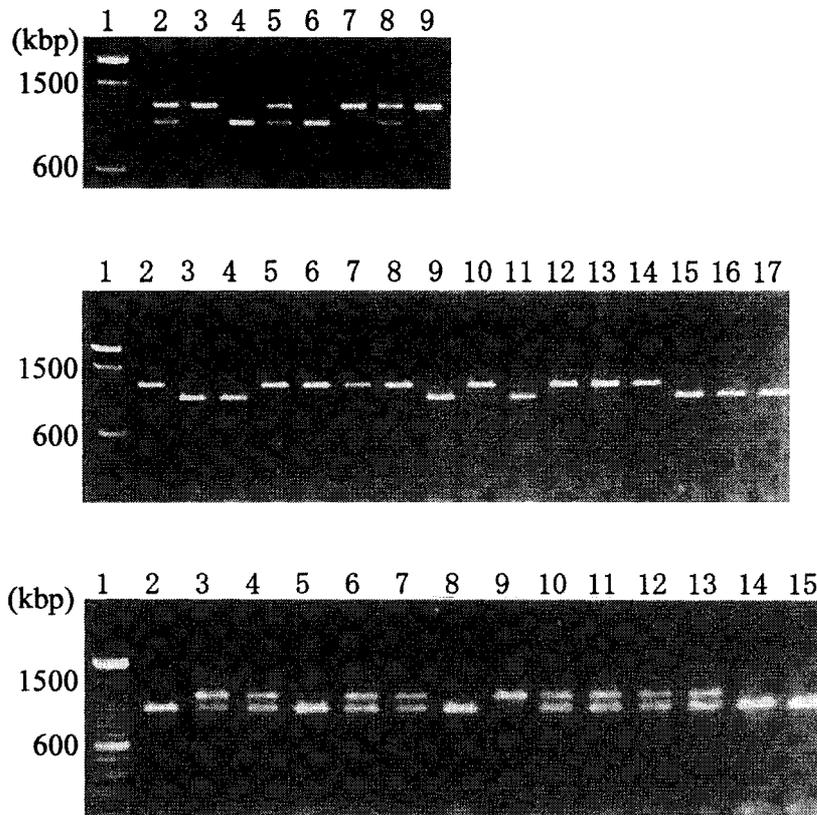


図3. EST 多型 (PtIFG8898/Hha I)

レーン1, DNA サイズマーカー (100bp ラダー)

上段: レーン2, 耐虫東奥育17号; レーン3, 同14号; レーン4, 被害木6号;

レーン5, 耐虫東奥育16号; レーン6, 同8号; レーン7, 同27号; レーン8, 同11号;

レーン9, アカマツ岡山132号

中段: レーン2-17, 耐虫東奥育17号種子の大配偶体16個体

下段: レーン2-16, F₁ (同17号x被害木6号) 14個体

ヘテロ接合型 (AB), S6, R8 がホモ接合型 (BB) と想定し, R17 の種子大配偶体および F₁ 家系 R17xR11 における遺伝子型の分離を調査した。大配偶体では分離比が A : B = 54 : 41 となり, 1 : 1 の期待分離比に適合した (図3中段, 表1)。F₁ では AA : AB : BB = 1 : 8 : 5 となり, 1 : 2 : 1 の期待分離比に適合しなかった (図3下段, 表1)。

3.2 PtIFG8898 のマッピング

PtIFG8898 と既知の AFLP および RAPD マーカーの分離データを合せ, MAPMAKER の「Group」コマンドで検討した結果, PtIFG8898 はクロマツ連鎖地図中の第10連鎖群に帰属することが確認された。第10連鎖群中での PtIFG8898 の位置を「Try」コマンドで検討した結果, AFLP マーカーである ACA/CCAA₁₃₂ および ACT/CCTA₁₂₇ の間に座乗し, 前者から 6.4 cM, 後者から 4.4 cM の位置にあることが明らかになった (図4)。

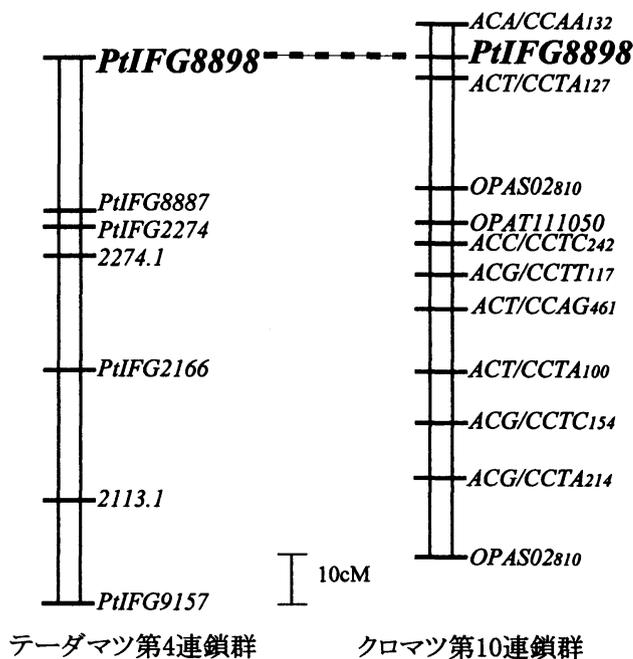


図4. クロマツとテーダマツの連鎖地図の連結

4 考 察

テーダマツのcDNAクローンの塩基配列から開発されたESTプライマー117対のうち、60プライマー対は芽ばえの針葉由来、残りの57プライマー対は辺材由来である。クロマツでは、針葉由来の60プライマー対のうち26プライマー対(43%)、辺材由来の57プライマー対のうち46プライマー対(80%)、全体では62%にあたる72プライマー対で単一の増幅断片が得られた。Brownら⁹⁾は、分類学上クロマツと同じ *Sylvestres* 亜節に属するヨーロッパアカマツではテーダマツのESTのうち約75%が利用可能であることを報告している。本報告では、若干これよりも低い値であり特に針葉由来のESTで顕著であった。

クロマツで増幅が見られたESTのうち、16プライマー対(針葉由来10対、辺材由来6対)について制限断片長多型の有無を調べた結果、3プライマー対(針葉由来2対、辺材由来1対)で交配親間に多型が見られ、F₁では共優性遺伝していた。このうち、PtIFG8898は大配偶体において1:1の期待比に適合する遺伝的分離を示した。さらに、アカマツにおいてもクロマツと全く同様に遺伝子の増幅がみられたことから、テーダマツのESTがクロマツのみならずアカマツにおいても遺伝マーカーとして十分利用可能であることが示唆された。

テーダマツの連鎖地図上には現時点で56個のEST多型が座乗しており、このうち11個が本報告と同じく制限断片長多型を用いたものである。本報告では、16プライマー対による増幅断片の制限断片長多型の有無を検討し、1個のEST多型を連鎖地図に位置づけることができたが、これは必ずしも効率的な結果とはいえない。Temesgenらはこの他に、DNAの二重構造の違いをゲル上で分離することによって塩基配列の変異を検出するDGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) を用いている¹⁰⁾。この方法は、遺伝子増幅後すぐに分離できるため今回用いた方法よりも効率的に多型を検出できるといわれている。今後DGGE等の変異の検出が容易な方法を検討する必要がある。

これまでに作成されたクロマツの AFLP および RAPD マーカーによる連鎖地図は、ゲノムの約 80% をカバーし第 1 連鎖群にマツバナタマバエ抵抗性遺伝子が位置することが明らかになっているが、その他に有用形質の育種に利用可能な情報を現時点では含んでおらず、連鎖群の数もクロマツの単相染色体数 ($n=12$) に収束していない³⁾。したがって、今後さらに多くのマーカーや遺伝子を連鎖地図に組み込むことにより、12 の連鎖群でゲノム全域をカバーする実用性の高いものにする必要がある。RAPD や AFLP などの優性マーカーは、多くの多型マーカーを得られる利点があるものの、不特定多数の DNA 断片を増幅するため、マーカー自体の機能が明らかではない。また、多型検出の適否を明らかにするために、多数のプライマーを用いて分析を行う必要がある。マツ類の中でテーダマツは、発現遺伝子の塩基配列が最も明らかにされている樹種の 1 つであり、この塩基配列をもとに多くの EST が開発されている。さらに、遺伝子の塩基配列は、近縁の種間では保存性が高いため、多くの EST マーカーをクロマツに利用することが可能だと考えられる。EST は機能が明らかであることに加え、塩基配列中に塩基置換等の変異が多く存在するため、これを安価で容易な方法で検出できれば DNA マーカーとして非常に有用である。したがって EST マーカーを用い、マーカー開発に必要なコストや時間を削減するとともに、連鎖地図に遺伝子を効率的に位置づけることができると考える。

PtIFG8898 は、テーダマツおよびスラッシュマツのそれぞれの連鎖地図で第 4 連鎖群に位置しており、これらの連鎖群は相同であることがすでに明らかになっていることから^{1) 10)}、これらとクロマツの第 10 連鎖群とは相同であると考えられる (図 4)。テーダマツの連鎖地図では、成長、容積密度等の有用形質に関わる QTL の位置が明らかにされているため^{2) 4) 5) 9)}、クロマツの連鎖地図との統合を進め相同な連鎖群を明らかにすれば、QTL の存在位置に関して重要な知見が得られると期待される。また、染色体上での遺伝子の位置関係を種間で比較することにより、ゲノムの構造変異や進化に関する情報が得られると考えられる。

引用文献

- 1) Brown, G. R., Kadel, E. E., 3rd, Bassoni, D. L., Kiehne, K. L., Temesgen, B., van Buijtenen, J. P., Sewell, M. M., Marshall, K. A. and Neale, D. B.: Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics, *Genetics* 159, 799-809 (2001)
- 2) Groover, A., Devey, M., Fiddler, T., Lee, J., Megraw, R., Mitchel-Olds, T., Sherman, B., Vujcic, S., Williams, C. and Neale, D.: Identification of quantitative trait loci influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine, *Genetics* 138, 1293-1300 (1994)
- 3) Hayashi, E., Kondo, T., Terada, K., Kuramoto, N., Goto, Y., Okamura, M. and Kawasaki, H.: Linkage map of Japanese black pine based on AFLP and RAPD markers including markers linked to resistance against the pine needle gall midge, *Theor. Appl. Genet.* 102, 871-875 (2001)
- 4) Kaya, Z., Sewell, M. M. and Neale, D. B.: Identification of quantitative trait loci influencing annual height- and diameter-increment growth in loblolly pine (*Pinus taeda* L.), *Theor. Appl. Genet.* 98, 586-592 (1999)
- 5) Knott, S. A., Neale, D. B., Sewell, M. M. and Haley, C. S.: Multiple marker mapping of quantitative trait loci in an outbred pedigree of loblolly pine, *Theor. Appl. Genet.* 94, 810-820 (1997)
- 6) Kondo, T., Terada, K., Hayashi, E., Kuramoto, N., Okamura, M. and Kawasaki, H.: RAPD markers linked to a gene

- for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*), *Theor. Appl. Genet.* 100, 391-395 (2000)
- 7) Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M., Lincoln, S. and Newberg, L.: MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations, *Genomics* 1, 174-181 (1987)
- 8) Lincoln, S., Daly, M. and Lander, E.: Construction genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0, Whitehead Institute Technical Report 3, Whitehead Institute, Cambridge, Mass. (1992)
- 9) Sewell, M. M., Bassoni, D. L., Megraw, R. A., Weeler, N. C. and Neale, D. B.: Identification of QTLs influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). I. Physical wood properties, *Theor. Appl. Genet.* 101, 1273-1281 (2000)
- 10) Temesgen, B., Brown, G. R., Harry, D. E., Kinlaw, C. S., Sewell, M. M. and Neale, D. B.: Genetic mapping of expressed sequence tag polymorphism (ESTP) markers in loblolly pine (*Pinus taeda* L.), *Theor. Appl. Genet.* 102, 664-675 (2001)

Transferability of EST (Expressed Sequence Tag) developed in loblolly pine to Japanese black pine

Eiji Hayashi ⁽¹⁾ , Teiji Kondo ⁽¹⁾ , Kimio Terada ⁽²⁾ , Noritsugu Kuramoto ⁽¹⁾
and Shiv Shankhar Kaundun ⁽³⁾

Summary : Transferability of EST (Expressed Sequence Tag) primer pairs reported in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) was assayed in Japanese black pine (*P. thunbergii* Parl.). Out of one hundred seventeen EST primer pairs, 72 pairs (62%) amplified a single fragment respectively. Restriction analyses of the fragments obtained from 16 out of the 72 pairs were performed to develop CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences) markers. Three fragments were detected polymorphisms among progeny of controlled crosses. One of the polymorphisms, PtIFG8898, showed 1:1 segregation among macrogametophytes derived from a resistant tree against pine needle gall midge, R17. The PtIFG8898 was located on the linkage group 10 on a map of Japanese black pine. Since the marker has been reported to be on the linkage group 4 in maps of loblolly pine and slash pine (*P. elliottii* Englm.), these linkage groups may be homologous to each other. Utilization of the information of marker rich species into Japanese black pine is important to progress a study of genetics in this pine. The results obtained here showed that it is possible to place the reported EST markers on the linkage map of Japanese black pine, and that these markers can be useful to integrate the linkage map of different pine species.

-
- (1) Forest Tree Breeding Center
3809-1 Ishi, Juo, Taga, Ibaraki 319-1301 Japan
 - (2) Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0173 Japan
 - (3) Bio-oriented Technology Research Advancement Institution
1-40-2 Nissin, Omiya, Saitama, 331- 3587 Japan