

# 二国間交流事業 共同研究報告書

平成23年 3月 31日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 (独) 農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域

職・氏名 <sup>(ふりがな)</sup> 上級研究員 <sup>かどの</sup> 門野 <sup>けいこ</sup> 敬子  
(奥田)

1. 事業名 相手国 ( インド ) との共同研究 振興会対応機関 ( DST )

2. 研究課題名 カイコ核多角体病抵抗性遺伝子の探索と同定

3. 全採用期間

平成 21年 6月 1日 ~ 平成 22年 3月 31日 ( 1年 10ヶ月)

4. 研究経費総額

(1) 本事業により交付された研究経費総額 2,000 千円

初年度経費 1,000 千円、 2年度経費 1,000 千円、 3年度経費          千円

(2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額          千円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
かどの けいこ 門野 敬子	(独) 農業生物資源研究所 昆虫 科学研究領域・上級研究員	カイコ核多核体病抵抗性と感受性系統を用いた抵抗性遺伝子候補探索のための分子遺伝学的連鎖解析
みた かずえい 三田 和英	(独) 農業生物資源研究所 昆虫 科学研究領域・特任上級研究員	カイコ核多角体病抵抗性と感受性系統を用いた抵抗性遺伝子候補探索のための塩基配列解析

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名 Central Sericultural Research and Training Institute・Scientist C・  
Sreekumar Sivaramakurup

(3) 相手国参加者（代表者の氏名の前に○印を付すこと）

氏名	所属・職名（国名）	研究協力テーマ
Ashwath S.K.	Central Sericultural Research and Training Institute (CSRTI)・Scientist D (India)	BmNPV 抵抗性と感受性系統の探索、純化と遺伝学的解析
○Sreekumar Sivaramakurup	CSRTI・Scientist C (India)	BmNPV 抵抗性と感受性系統の分子遺伝学的解析

## 6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

【目的】現在、養蚕業における主要な被害は核多角体病ウイルス（バキュロウイルス、BmNPV）感染によるものである。主要な養蚕国であるインドではこの BmNPV による被害はカイコ絹生産量の 20-50%に及んでおり、時期によっては壊滅的な打撃を受ける。したがって、国内外で BmNPV に対する様々な角度からの研究が取り組まれているが、未だにその感染メカニズムが明らかにされていない。その主な原因は、BmNPV に明確な抵抗性を示すミュータントが得られていなかったことと、カイコの遺伝子/ゲノム情報や機能解析に必要なツールが充分整備されていなかったために BmNPV 感染に関わるカイコ遺伝子の同定・単離が進んでいなかった点にある。日本側の研究室では、カイコ EST データベースをもとに構築した cDNA マイクロアレイ、カイコゲノムデータベースなどが整備され、効率的に変異形質の原因遺伝子のポジショナルクローニングを実施できる体制が整った。一方、インド側の研究グループは、マイソールにあるインド Central Sericultural Research and Training Institute (CSRTI) に保存されている多数のカイコ系統の中から、絹生産能は低いながらも BmNPV 抵抗性系統を確立することに成功している。また、このような抵抗性系統に実用品種を繰り返し交配することにより、BmNPV 抵抗性と実用形質を併せ持つ（準同質）系統の育成にも成功した。そこで、このような遺伝資源を持つインドと、ゲノム情報と遺伝子解析ツールを持つ日本が協力して BmNPV 抵抗性原因遺伝子のポジショナルクローニングを効率的に進め、抵抗性遺伝子を単離同定して、これらの遺伝子を利用して BmNPV 抵抗性実用系統の作出に貢献することを目的に、インドの BmNPV 抵抗性系統における抵抗性に関わる遺伝子の解析を行うことを計画した。

【内容】抵抗性系統や準同質系統の抵抗性を支配している主働遺伝子が優性であることを明らかにしたので、感受性親系統を F1 に戻し交配した個体群（backcrossed 1st generation; BC1）をウイルス接種により抵抗性と感受性に選別した。1年目には、同蛾区内交配によるある程度の系統の純化から開始し、2年間で計4回のウイルス選別 BC1 個体群を作製した。2つの抵抗性系統と1つの感受性系統を用い、それぞれの交配による親、F1、BC1 について、ゲノム DNA 抽出を行った。親、F1 のゲノム DNA を用いて、カイコ統合ゲノム地図上にマップされている全 28 連鎖群マーカーの中から、各系統間で PCR 産物のサイズに差を示すマーカーを探索し、連鎖解析用のマーカーとした。これらのマーカーを用いて、ウイルス選別 BC1 個体群の連鎖解析を行った。さらに、2つの抵抗性系統の1つである準同質系統では、それぞれの染色体について、実用感受性系統への染色体の置換が起きているか、あるいは抵抗性系統の染色体を保存しているかが、その由来親である抵抗性と感受性系統の多型と比較することで予想できるため、これについても実験を行った。また、RAPD マーカーによる連鎖解析も試みた。

【成果】性染色体を除く全 27 連鎖群について、BC1 個体群の並び順を統一して、個体毎の抵抗性/感受性ヘテロ型あるいは感受性ホモ型の群毎のパターンが 28 群全てで異なっており、また同一郡内のマーカーでは同じパターンを示したので、各連鎖群のマーカーはインドの系統にも利用でき、染色体の融合や切断は起きていないことが明らかとなった。1つの抵抗性と感受性系統間での連鎖解析では、4回のすべての実験区において、完全に連鎖している群は見られず、1つの群にある程度の連鎖傾向が認められた。RAPD マーカーによる連鎖解析で有力な候補マーカーが見つかったので、その PCR 産物を日本に持参し、ゲル上でバンドを切り出し、クローニング、シーケンスを行い、染色体の同定と位置を決定した。この連鎖群は、準同質系統の交配系や日本での BC1 解析結果では連鎖していなかったが、さらに検討を要する。準同質系統は、感受性系統との間で多型を示すマーカーが少なく、連鎖解析はまだ行っていないが、マーカー探索において、抵抗性系統由来の染色体が残存していると思われる領域が何カ所か見つかると、それらは抵抗性の原因遺伝子が乗る領域である可能性が高い。共同研究期間は終了したが、この準同質系統の解析は今後継続する予定である。