



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモYウイルス抵抗性遺伝子Rychcの同定および機能発現メカニズムの解析とRychc遺伝子座が農業形質に与える影響 [全文の要約]
Author(s)	赤井, 浩太郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15291号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89428
Type	doctoral thesis
File Information	Akai_Kotaro_summary.pdf



博士論文の要約

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 赤井 浩太郎

学位論文題名

ジャガイモ Y ウイルス抵抗性遺伝子 R_{ychc} の同定及び機能発現メカニズムの解析と
 R_{ychc} 遺伝子座が農業形質に与える影響

1. 緒言

ジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) は栄養繁殖性の作物であり、塊茎を植え付けることで増殖する。このとき、塊茎を通じて植物ウイルス、植物病原細菌、植物病原糸状菌、センチュウ類などの各種病虫害が次世代に伝播しやすい。種ばれいしょ生産においては、健全な種いもを生産するため、これらの病虫害に感染した株の抜き取り作業が行われているが、病害株の発見に熟練した技能が必要であること、すべての株を目視で確認する必要があることなど、作業コストが高いことが問題視されている (平石 2017)。特にジャガイモ Y ウイルス (PVY) はジャガイモに感染する植物ウイルスの中で最も多く見られるものであり、ウイルスフリーの培養苗を起点とした種ばれいしょ増殖体系の中でも頻繁に発生し被害をもたらすことから、種ばれいしょ生産の軽労化のため PVY 抵抗性を有するジャガイモ品種の育成と普及が求められている。

日本国内のジャガイモ育種事業においては、PVY に対する抵抗性遺伝子として近縁二倍体野生種 *Solanum chacoense* B. に由来する R_{ychc} 遺伝子が用いられている (Asano & Tamiya 2016, Mori *et al.* 2011)。 R_{ychc} は PVY の感染に対して Extreme Resistance (ER) と呼ばれる無病徴あるいは微小なえそ斑を伴う抵抗性を示す強力な抵抗性遺伝子である。 R_{ychc} の育種的利用は 1960 年代から行われているが (浅間ら 1982)、 R_{ychc} について明らかにすべき課題が複数残されている。1 点目は、 R_{ychc} の遺伝子本体の同定である。これは R_{ychc} の機能を理解するのに必要であるだけでなく、DNA マーカー選抜等を高精度で行う上で重要である。2 点目は抵抗性メカニズムの解明である。 R_{ychc} は高温下で抵抗性が低下すること (Ohki *et al.* 2018) が報告されており、この抵抗性喪失メカニズ

ムの解明は Ry_{chc} を利用するためのリスク評価に重要である。そして 3 点目は、 Ry_{chc} のような野生種由来遺伝子座が栽培形質に与える影響を明らかにすることである。もし Ry_{chc} に連鎖する形質が収量や品質に悪影響を与える場合は、 Ry_{chc} の利用が制限される原因となる。

これらの課題を解明するため、本研究では第 3 世代シーケンサーによる全ゲノムアセンブリによる Ry_{chc} の同定、RNA-seq 解析による高温環境での Ry_{chc} 抵抗性喪失メカニズムの解明、 Ry_{chc} 遺伝子座の有無が主要農業形質に与える影響の評価を行った。

2. 第 3 世代シーケンサーを利用した *de novo* assembly による Ry_{chc} 遺伝子の探索

目的遺伝子を同定するためには、ファインマッピング等で遺伝子の座乗位置を明らかにするだけでなく、目的遺伝子が座乗するゲノム領域の塩基配列を取得する必要がある。ジャガイモは同質四倍体であり、かつ栄養繁殖性作物であるため、そのゲノムは極めてヘテロ接合性が高い (Hardigan *et al.* 2015)。このようなゲノムは、次世代シーケンシング(NGS)によって得られる 50 ~ 250 bp 程度の長さのリードを用いた *de novo* genome assembly が困難であることが知られる。また、Nucleobinding site(NBS)-Leucine rich repeat (LRR) 型抵抗性遺伝子クラスターに存在する反復配列も、同様にアセンブルの難易度を高める (Alkan *et al.* 2011, Schatz *et al.* 2012)。そこで本研究では、 Ry_{chc} の同定のため、 Ry_{chc} 座乗領域がホモ接合の 2 倍体系統‘184202-2’を作出し、さらに反復配列を含んだ領域のアセンブルに有効な第 3 世代シーケンシング(TGS)を用いて全ゲノムシーケンスを行い、得られたロングリードを用いて *de novo* assembly を行った。Oxford Nanopore Technology の MinION(FLO-MIN106D/R9.4)による全ゲノムシーケンスで得られた合計 12.9 Gb、平均リード長 17.8 kb のロングリードを用いて Flye ver2.7 によるアセンブルを行い、さらに、Illumin HiSeq X によって得られた高精度ショートリードを用いてエラー修正を行った結果、9,622 本(計 1.09 Gb)のコンティグが得られた。このうち、先行研究において実施されたファインマッピング解析で構築された Ry_{chc} 連鎖 DNA マーカーが座乗する 3.3 Mb の長さを持つ Contig5278 を見出した。ジャガイモのリファレンスゲノムである *S. phureja* DM1-3 516 R44 ver4.03 との比較により、Contig5278 は 9 番染色体遠腕末端に相当することが明らかになり、既報の Ry_{chc} 座乗領域と一致した (Hosaka *et al.* 2001, Sato *et al.* 2006)。Contig5278 上に見出された

*Ry_{chc}*候補領域には、RNA-seq 解析により複数の NBS-LRR 型抵抗性遺伝子が検出されたが、その多くは早期の終止コドンによって不完全なタンパク質をコードしていると推定された。また、*Ry_{chc}* に最も近傍であると推定されたふたつの DNA マーカーの間には、Toll/Interleukin-1 receptor(TIR)-NBS-LRR 型抵抗性遺伝子をコードする *STRG1648* が単独で検出された。*STRG1648* は二種類のスプライシングバリエーションを持ち、そのうち一方が完全な TIR-NBS-LRR 型タンパク質をコードしていると推定された。以上のことから、*STRG1648* が *Ry_{chc}* であると推定された。加えて、本研究と並行して Li ら (2022) が異なる *S. chacoense* 系統に由来する *Ry_{chc}* の配列を報告し、この塩基配列は *STRG1648* と 98%(4108 nt/4176 nt) の相同性を有したことから、*STRG1648* が *Ry_{chc}* であると同定した。*STRG1648* が座乗する領域は、約 200 kb にわたる反復配列が多数含まれる領域であり、*Ry_{chc}* が染色体末端の遺伝子重複によって生じた遺伝子であることが示唆された。また、*STRG1648* の LRR 領域に設計した PCR プライマーセット (1648F24/1648R22) による増幅の有無は PVY 抵抗性の有無と完全に一致したことから、本プライマーセットを用いた PCR は *Ry_{chc}* の遺伝子型判定に用いることができる。さらに、ジャガイモの品種改良において利用される 5 種の病害抵抗性遺伝子を検出するマルチプレックス PCR (Mori *et al.* 2011) において、*Ry_{chc}* を検出する RY186 マーカーを本プライマーセットで置き換えることが可能であり、一部系統で見られる偽陽性を低減できることを確認した。

3. 高温環境での PVY 感染に対する *Ry_{chc}* の機能解析

Ohki ら (2018) によって、*Ry_{chc}* の Extreme Resistance (ER) は 28°C の高温環境で失われ、PVY の接種によって PVY の全身感染と過敏感反応 (HR) によるえそ斑が生じることが報告された。近年の北海道では夏季に最高気温が 30°C を超える真夏日や 35°C を超える猛暑日が増加する傾向にあり (札幌管区気象台 2017)、*Ry_{chc}* の抵抗性が高温で失われるならば *Ry_{chc}* の育種利用に懸念が生じる。また、ER と HR という 2 つの抵抗性反応の違いや発現メカニズムは世界中で広く研究されており、温度条件によって ER と HR が変化する *Ry_{chc}* の抵抗性発現メカニズムは興味深い。本研究では、*Ry_{chc}* を有するサクラフブキに PVY を接種し、その後 28°C の高温環境に置くことで病害抵抗性関連遺伝子の発現がどのように変化するかを RNA-seq 解析により調査した。

供試材料はウイルスフリー培養苗由来の‘サクラフブキ’株を鉢上げ後 20-28°Cの温度制御のない温室で3週間育苗したものをを用いた。PVY接種1週間前より22°C、16時間日長の人工気象器内で栽培し、PVY接種後は22°C、16時間日長または28°C、16時間日長の人工気象器で24時間静置した。接種24時間後にサンプリングした接種葉から全RNAを抽出し、RNA-seq解析に供した。試験区は22°C×Mock区、22°C×接種区、28°C×Mock区、28°C×接種区を設け、それぞれについて3株ずつ実験を行った。

リファレンスゲノム *S. phureja* DM1-3 ver4.03 の遺伝子モデルを用いた遺伝子発現解析を行い、2倍以上または1/2倍以下に発現量に変動し、偽陽性確率(FDR)が0.05以下となった遺伝子を発現変動遺伝子として抽出し、Gene Ontology (GO) 解析に供した。

22°CではPVY接種により117の遺伝子が有意に発現変動した一方で、28°Cでは16遺伝子のみが有意に発現変動した。このことから、28°CではPVY感染によって生じる遺伝子発現変動が抑制されていることが明らかになった。また、PVY接種の有無にかかわらず、28°C処理はより大きな遺伝子発現変動を誘導し(Mock: 832 遺伝子、接種区 534 遺伝子)、生物学的ストレス応答や病害抵抗性に関連するGO経路の発現が低下していることを明らかにした。また、‘184202-2’の遺伝子モデルから R_{ych} の発現量を算出したところ、28°Cでは R_{ych} の発現量が低下する傾向が見られた。

これらのことから、高温において R_{ych} がPVYに対するERを失うのは、上記の抵抗性反応に関わる遺伝子や R_{ych} 発現量の低下により、PVYの封じ込めに失敗することが原因であると考えられた。ただし、本研究ではPVYの封じ込め失敗が最終的にHRを引き起こすメカニズムは明らかにできなかった。TIR-NBS-LRRタンパク質が形成するオリゴマー(Resistome)がHR誘導に関与している可能性があるが(Ma *et al.* 2020, Martin *et al.* 2020, Wan *et al.* 2019, Yu *et al.* 2022)、 R_{ych} がどのようにHRを誘導するのかを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

4. R_{ych} 遺伝子座がジャガイモの主要農業形質に与える影響の解析

R_{ych} は野生種 *S. chacoense* から導入されたが、 R_{ych} を有する商用品種にいたるまで5~7回の交配しか経ていない。このとき、Hanson (1959)の式にならうと、 R_{ych} 近傍に平均で12.0 cMもの野生種由来染色体領域が存在することが予想される。もし、このような目的遺伝子近傍の領域

が収量や品質に強い悪影響を与える場合には、その遺伝子の育種的利用場面は限定されうる。本研究ではこの領域が収量や塊茎の大きさ、でん粉含有量、栽培特性等に影響を与えるかどうかについて、分離集団の栽培試験によって解析した。解析に用いた分離集団は Ry_{chc} を有するでん粉原料用品種‘パールスターチ’(*S. chacoense* から 6 世代後)と PVY 抵抗性を持たない‘Eden’の交配後代から得られた 101 系統を用いた。栽培試験は 2019 年、2020 年および 2021 年の三ヶ年にわたり、北海道農業研究センター芽室研究拠点(北海道河西郡芽室町新生南 9 線 4)の圃場で行った。各系統 8 株を株間 30 cm、畦間 75 cm で栽培し、主要な農業形質について評価した。

Ry_{chc} の有無を識別するジェノタイプは Ry_{chc} の両側に座乗する連鎖マーカーである RY364 と RY186 を用いて行だったが、分離集団では RY364 と RY186 が独立に遺伝していることが明らかとなった。これは‘パールスターチ’が RY364 と RY186 をともに有していながら、RY186 と Ry_{chc} の間ですでに連鎖が切れていたことが原因であった。そこで、RY364(セントロメア側)と RY186(テロメア側)の両方について、各種農業形質との関連を調べた。

2020 年及び 2021 年の栽培試験においては、調査した「株あたり上いも数」「上いも平均重」「10 a あたり上いも収量」「上いもの比重」「終花期茎長」「生育期間(萌芽から枯凋までの日数)」に対して、RY364 と RY186 のどちらも有意な影響を与えなかった。2019 年においては、RY186 が「株あたり上いも数」と「10 a あたり上いも収量」に有意な影響を与えたが、平均値の差は僅かであった。これらのことから、 Ry_{chc} 遺伝子座はセントロメア側、テロメア側ともに主要栽培形質に顕著な影響を与えないことが明らかとなった。2019 年に一部形質に有意な差が生じたのは、前年である 2018 年に未成熟な塊茎を収穫したことが影響している可能性が考えられた。また、*S. chacoense* との交配から 7 回の交配しか経ていないにも関わらず、顕著な劣悪形質が検出されなかったのは、 Ry_{chc} 座乗領域が染色体末端であり組換え頻度が高い領域であることと、各世代において育種家によって強い選抜圧がかけられたことが要因であると考えられた。ただし、本研究では塊茎の外観や食味、剥皮後褐変などの品質に関連する形質について調査を行っておらず、これらの形質については今後検証を行う必要がある。

5. 総合考察

PVY は植物防疫法に基づく国内検疫の指定病害虫に指定されており、種ばれいしょ生産者は PVY 感染株を抜去する作業を行わなければならない。他方、PVY に対する育種的対応もこれまでに行われてきており、日本では *S. chacoense* に由来する PVY 抵抗性遺伝子 R_{ychc} が用いられてきた。本研究では、これまで報告されていなかった R_{ychc} 遺伝子本体の探索、同定に加え、 R_{ychc} による抵抗性の高温環境での振る舞い、 R_{ychc} 遺伝子座によってもたらされる農業形質への副次的効果について分析、検証した。これらの知見を踏まえて PVY 抵抗性育種の展望を考察する。

本研究において、 R_{ychc} 領域がホモ接合の二倍体系統のゲノムを *de novo* assembly するアプローチにより、 R_{ychc} が 9 番染色体長腕末端に座乗する TIR-NBS-LRR 型抵抗性遺伝子であることを明らかにした。Li ら (2022) も異なる *S. chacoense* 系統に由来する R_{ychc} を BAC クローニングにより単離・報告し、 R_{ychc} の分子生物学的な解析を行う基盤が整ったと言える。また、本研究で作成した R_{ychc} の LRR 領域に設計したプライマーセットは、 R_{ychc} を有する育成系統の選抜に有用であると考えられる。さらに、本研究では R_{ychc} 遺伝子座とその近傍領域の有無が主要な農業形質に影響を与えないことを明らかにした。これらの知見は、今後の PVY 抵抗性育種を加速する上で重要な知見である。特に、同じくジャガイモ野生種 *S. stoloniferum* に由来する R_{ysto} (Grech-Baran *et al.* 2020) を有する品種が細胞質雄性不稔を有する (Hosaka & Sanetomo 2012, Sanetomo *et al.* 2022, Sanetomo & Nashiki 2021) ことから、 R_{ychc} は育種利用しやすい PVY 抵抗性遺伝子だと言える。

これまでに R_{ychc} を打破する PVY 系統の存在は報告されていないが、夏季の高温は R_{ychc} を有する品種が PVY に感染するリスクを高め、突然変異の蓄積を誘発する可能性がある。本研究では、高温下で R_{ychc} の抵抗性が失われる原因として、病害抵抗性関連遺伝子の発現が抑制されること、 R_{ychc} の発現が低下すること等を見出した。これらの結果として R_{ychc} を有する品種に PVY が感染・増殖する機会が増えれば、 R_{ychc} の認識を回避する PVY が出現するリスクも増えると考えられる。また、 R_{ychc} を回避する PVY 出現リスクには R_{ychc} が認識する *Avr* の機能が PVY の病原性に重要であるかどうかにも影響しうる (Vera Cruz *et al.* 2000) ことから、今後の研究で R_{ychc} が認識する *Avr* を明らかにする必要がある。

持続可能なジャガイモ生産を続けていくためには、PVY は克服しなければならない課題である。本研究で明らかにした知見が今後の PVY 抵抗性ジャガイモ育種において有効に活用されること

を期待する。

引用文献

- Alkan, C., S. Sajjadian, & E. E. Eichler (2011) Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nat. Methods* 8 :61–65. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1527>
- Asano, K., & S. Tamiya (2016) Breeding of pest and disease resistant potato cultivars in Japan by using classical and molecular approaches. *Japan Agric. Res. Q. JARQ* 50 :1–6. <https://doi.org/10.6090/jarq.50.1>
- Grech-Baran, M., K. Witek, K. Szajko, A. I. Witek, K. Morgiewicz, I. Wasilewicz-Flis, H. Jakuczun, W. Marczewski, J. D. G. Jones, & J. Hennig (2020) Extreme resistance to Potato virus Y in potato carrying the *Ry_{sto}* gene is mediated by a TIR-NLR immune receptor. *Plant Biotechnol. J.* 18 :655–667. <https://doi.org/10.1111/pbi.13230>
- Hanson, W. D. (1959) THE BREAKUP OF INITIAL LINKAGE BLOCKS UNDER SELECTED MATING SYSTEMS. *Genetics* 44 :857–868. <https://doi.org/10.1093/genetics/44.5.857>
- Hardigan, M. A., E. Crisovan, J. P. Hamilton, J. Kim, P. Laimbeer, C. P. Leisner, N. C. Manrique-Carpintero, L. Newton, G. M. Pham, B. Vaillancourt, X. Yang, Z. Zeng, D. S. Douches, J. Jiang, R. E. Veilleux, & C. R. Buella (2015) Genome reduction uncovers a large dispensable genome and adaptive role for copy number variation in asexually propagated *Solanum tuberosum*. *Plant Cell* 28 :388–405. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00538>
- Hosaka, K., Y. Hosaka, M. Mori, T. Maida, & H. Matsunaga (2001) Detection of a simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in a tetraploid potato. *Am. J. Potato Res.* 78 :191–196. <https://doi.org/10.1007/BF02883544>
- Hosaka, K., & R. Sanetomo (2012) Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. *Theor. Appl. Genet.* 125 :1237–1251. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4>
- Li, G., J. Shao, Y. Wang, T. Liu, Y. Tong, S. Jansky, C. Xie, B. Song, & X. Cai (2022) *Ry_{chc}* confers extreme resistance to potato virus Y in potato. *Cells* 11 :2577. <https://doi.org/10.3390/cells11162577>
- Ma, S., D. Lapin, L. Liu, Y. Sun, W. Song, X. Zhang, E. Logemann, D. Yu, J. Wang, J. Jirschitzka, Z. Han, P. Schulze-Lefert, J. E. Parker, & J. Chai (2020) Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science* 370 :eabe3069. <https://doi.org/10.1126/science.abe3069>
- Martin, R., T. Qi, H. Zhang, F. Liu, M. King, C. Toth, E. Nogales, & B. J. Staskawicz (2020) Structure of the activated *ROQ1* resistosome directly recognizing the pathogen effector *XopQ*. *Science* 370 :abd9993. <https://doi.org/10.1126/science.abd9993>
- Mori, K., Y. Sakamoto, N. Mukojima, S. Tamiya, T. Nakao, T. Ishii, & K. Hosaka (2011) Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica* 180 :347–355.

- <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0381-6>
- Ohki, T., M. Sano, K. Asano, T. Nakayama, & T. Maoka (2018) Effect of temperature on resistance to Potato virus Y in potato cultivars carrying the resistance gene *Ry_{chc}*. Plant Pathol. 67 :1629–1635. <https://doi.org/10.1111/ppa.12862>
- Sanetomo, R., K. Akai, & A. Nashiki (2022) Discovery of a novel mitochondrial DNA molecule associated with tetrad pollen sterility in potato. BMC Plant Biol. 22 :1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03669-8>
- Sanetomo, R., & A. Nashiki (2021) Identification of the tetrad-sterility-causing *Solanum stoloniferum* Schltdl. & Bouché cytoplasm in interspecific hybrids with *S. tuberosum* L. Genet. Resour. Crop Evol. 2. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01197-2>
- Sato, M., K. Nishikawa, K. Komura, & K. Hosaka (2006) Potato virus Y resistance gene, *Ry_{chc}*, mapped to the distal end of potato Chromosome 9. Euphytica 149 :367–372. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9090-y>
- Schatz, M. C., J. Witkowski, & W. R. McCombie (2012) Current challenges in *de novo* plant genome sequencing and assembly. Genome Biol. 13 :243. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-4-243>
- Vera Cruz, C. M., J. Bai, I. Oña, H. Leung, R. J. Nelson, T.-W. Mew, & J. E. Leach (2000) Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. Proc. Natl. Acad. Sci. 97 :13500–13505. <https://doi.org/10.1073/pnas.250271997>
- Wan, L., K. Essuman, R. G. Anderson, Y. Sasaki, F. Monteiro, E. H. Chung, E. O. Nishimura, A. DiAntonio, J. Milbrandt, J. L. Dangl, & M. T. Nishimura (2019) TIR domains of plant immune receptors are NAD⁺-cleaving enzymes that promote cell death. Science 365 :799–803. <https://doi.org/10.1126/science.aax1771>
- Yu, D., W. Song, E. Y. J. Tan, L. Liu, Y. Cao, J. Jirschitzka, E. Li, E. Logemann, C. Xu, S. Huang, A. Jia, X. Chang, Z. Han, B. Wu, P. Schulze-Lefert, & J. Chai (2022) TIR domains of plant immune receptors are 2' ,3' -cAMP/cGMP synthetases mediating cell death. Cell 185 :2370- 2386.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.04.032>
- 浅間和夫, 伊藤平一, 村上紀夫, & 伊藤武 (1982) ばれいしょ新品種「コナフブキ」の育成について :75–84.
- 札幌管区気象台 (2017) 北海道の気候変化(第2版). <https://www.data.jma.go.jp/sapporo/bosai/publication/kiko/kikohenka/kikohenka.html>
- 平石康久 (2017) 北海道における種ばれいしょの安定供給に向けた取り組み. 農畜産業振興機構調査報告. <https://www.alic.go.jp/content/000128583.pdf>