

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19102

研究課題名(和文) ジャガイモ塊茎における分裂組織の成長制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of the molecular mechanisms involved in regulation of meristem tissue in potato tuber

研究代表者

志村 華子 (Shimura, Hanako)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：20507230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジャガイモ塊茎の奇形は塊茎発達中の二次成長によって起こるが、塊茎発達過程における芽の伸長や休眠に関わる分子メカニズムはまだ不明な点が多い。本研究では、塊茎の萌芽や休眠に関わる分子メカニズムを解明することを目的とし、マイクロチューバーを用いて塊茎の萌芽に関わる植物ホルモンの影響を解析した。RNA-seq解析では、マイクロチューバーの萌芽にはサイトカイニンとしてあまり機能が知られていないcis-zeatinの関与が示唆された。塊茎の休眠不良を引き起こすキクわい化ウイルスをジャガイモへ接種し、得られた感染シュートの無菌処理によりin vitroでウイルス感染ジャガイモを維持する系を作出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食用部位である塊茎の発達や休眠を制御するメカニズムはジャガイモの生理学的研究で最も重要である。ジャガイモは栄養繁殖性であり、倍数性遺伝子構造をもつために表現型への影響が大きい遺伝子変異体を得るのは容易でない。本研究ではウイルス感染が塊茎形成時に特異的に形態異常を引き起こすことに着目し、この病原体の病徴メカニズムを解析するための実験系を確立した。ウイルスによる病徴誘導メカニズムの詳細を明らかにすることは塊茎発達や萌芽に関わる分子機構を解明することにもなり、ジャガイモ有用品種の分子育種や困難とされているウイルス病防除へも役立つ知見となるものである。

研究成果の概要(英文)：The irregular shape of potato tubers is caused by secondary growth during tuber development, and the molecular mechanisms involved in bud elongation and dormancy during tuber development are still unclear. In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms involved in sprouting and dormancy of tubers, and analyzed the effects of plant hormones on sprouting of tubers using microtubers. RNA-seq analysis suggested that cis-zeatin, whose function is not well known as cytokinin in various plants, is involved in microtuber sprouting. Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) is known to disturb dormancy state of potato tubers. We inoculated CSVd to potato plants and then the obtained shoots were cultured in vitro to establish potato cultures retaining CSVd infection. By culturing the CSVd-infected potato cultures at different conditions with plant hormone, we will further investigate in detail the effects of CSVd infection on the development and germination of microtubers.

研究分野：植物生理学、植物病理学

キーワード：ジャガイモ 塊茎 二次成長 ウィロイド

## 1. 研究開始当初の背景

ジャガイモの食用部位である塊茎は、地下茎先端にある次頂部（茎頂下部組織）が肥大化して形成される。塊茎発達時、塊茎に含まれる芽は休眠しているが、高温などの環境要因で休眠が打破され、二次成長と呼ばれる萌芽が起こることがある。二次成長した芽が再び休眠すると二次肥大が起こり、こぶ状の奇形イモが形成されるが、このような二次成長の発生はジャガイモの商品価値を著しく低下させる。塊茎の形成や萌芽・休眠を制御するメカニズムはジャガイモの生理学的研究で最も重要である。しかし、茎分裂組織で起こる劇的な形態変化の制御がどのように起こるのか、分子レベルのメカニズムの多くはまだ分かっていない。ジャガイモは同質倍数体で遺伝子構造がヘテロであり、また、栄養繁殖性であることから、表現型への影響が大きい遺伝子変異体を作成して遺伝子解析を進めることが難しかった。そこで我々は、ジャガイモ塊茎生理の分子メカニズムを解明するための新しい切り口として、ウイロイドに着目した。キクわい化ウイロイド (CSVd) は主にキク科にわい化病徴を起こすが、ジャガイモにも感染することが報告されている (Matsushita et al. 2019 JGPP)。CSVd 感染ジャガイモは地上部器官は無病徴であるが、塊茎発達中に二次成長や二次肥大が生じて奇形塊茎が生じることが予備実験で示されている。ウイロイドが感染したジャガイモでは、塊茎の休眠・萌芽の制御メカニズムが攪乱されていると考えられるが、ウイロイド感染によってどのような遺伝子発現が影響を受けるのか調べた研究例はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ジャガイモ塊茎の二次成長に関わる遺伝子制御を明らかにすること、また、塊茎発達に関わる遺伝子発現制御にウイロイドがどのように影響を及ぼして塊茎を奇形にするのかそのメカニズムを明らかにすることを目的とし、奇形症状に関わる分子メカニズムを通じて地下茎分裂組織における複雑な成長制御メカニズムの解明につなげることを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 植物ホルモンを用いたマイクロチューバーの二次成長誘導系の確立および萌芽関連遺伝子のトランスクリプトーム解析

無菌培養で継代しているジャガイモ培養物（メークインおよび *subsp. andigena*）のシュートから節切片を切り出し、ジベレリン阻害剤としてアンシミドールを含む塊茎誘導培地で 2 週間培養して節切片の側芽にマイクロチューバーを形成させた。マイクロチューバーをさらにジベレリンやサイトカイニンを添加した培地へ移植して培養することで二次成長が起こるかを観察した。二次肥大の誘導では、マイクロチューバーの芽の休眠打破後に塊茎誘導培地へ移植し、再び塊茎肥大が起こるかを観察した。

二次成長に関わる遺伝子を同定するために、萌芽程度が異なった各試験区のマイクロチューバーから芽および茎（マイクロチューバーとの付着部分）をサンプリングして RNA を抽出し、RNA-seq を行った。トリミング後のショートリードは HISAT2 を用いてリファレンスゲノム (Group Phureja clone DM1-3, PGSC\_DM\_v4.03) にマッピングして各遺伝子のリードカウントを算出し、DESeq2 による DEG 分析へと進めた。検出された DEG は KEGG および GO 解析により機能推定を行った。

(2) ウイロイド感染を用いたマイクロチューバーの二次成長誘導系の確立

ウイロイド感染による奇形塊茎をマイクロチューバーで再現するために、ジャガイモ培養シュートへ無菌的にウイロイドを接種した。また、挿木で維持しているウイロイド感染ジャガイモのうち、地下部や地上茎で塊茎形成がみられたことから、これらのウイロイド感染塊茎を無菌処理してフラスコ内で培養しシュートを形成させる方法も検討した。

## 4. 研究成果

(1) シュートの側芽に形成させたマイクロチューバーは、ジベレリンを添加した培地へ移植するとただちに萌芽して二次成長を示した (図 1)。また、休眠打破後に再度塊茎誘導培地へ移植することで塊茎がこぶ状に形成され、マイクロチューバーでも二次肥大を誘導することができた (図 1)。二次肥大の発生はメークインで起こりやすい一方、*andigena* では起こりにくく、マイクロチューバーの二次成長の起こりやすさに品種間差があることが分かった。

マイクロチューバーの二次成長における植物ホルモンの影響をさらにみるために、ジベレリンとサイトカイニンを用いて萌芽を観察した。マイクロチューバーはジベレリン単独処理で萌芽したが、サイトカイニンとの併用処理は萌芽をさらに促進した。しかし、サイトカイニン単独処理ではマイクロチューバーの萌芽は起こらなかった。マイクロチューバーから茎を外し、頂芽を含む半切り状態で培養すると、ジベレリン単独処理では萌芽が起こらなかった (図 2)。このことから、ジベレリンが誘導するマイクロチューバーの萌芽には茎組織が何らかの役割を持つことが示唆された。半切りマイクロチューバーは、茎つきマイクロチューバーと同様にサイト

カイニン単独処理では萌芽しなかったが、ジベレリンとサイトカイニンの両方を添加した培地で培養することで二次成長を示した(図2)。マイクロチューバーの萌芽にともなって発現変動する遺伝子やマイクロチューバーに付着する茎の有無がどのように萌芽に関わるのかに注目してトランスクリプトーム解析を行った。マイクロチューバーに茎がついている場合には、ジベレリン処理によってマイクロチューバーの芽でサイトカイニンやオーキシン情報伝達経路が活性化していた。ジベレリンとサイトカイニンの両方添加区の半切りマイクロチューバーでは、茎つきマイクロチューバーの試験区で検出されたものとは異なるオーキシンおよびサイトカイニン経路の遺伝子が DEG として検出されていた。また、ジベレリン単独処理でも、マイクロチューバーの茎ではサイトカイニン情報伝達に関わる遺伝子が複数検出され、ジベレリンによるサイトカイニン経路への関わりが示唆された。

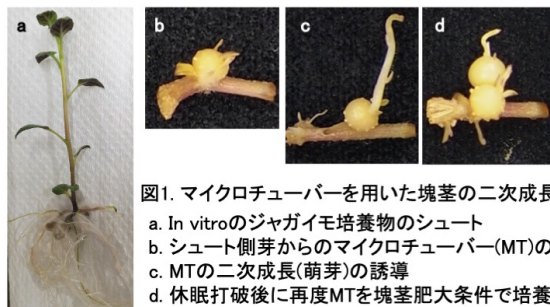


図1. マイクロチューバーを用いた塊茎の二次成長誘導

- a. In vitroのジャガイモ培養物のシュート
- b. シュート側芽からのマイクロチューバー(MT)の誘導(品種メークイン)
- c. MTの二次成長(萌芽)の誘導
- d. 休眠打破後に再度MTを塊茎肥大条件で培養すると二次肥大が起こった



図2. マイクロチューバー(MT)の萌芽に及ぼす茎の影響

- a. ジベレリン添加培地で培養した茎をつけたMT
- b. ジベレリンとサイトカイニン添加培地で培養した茎をつけたMT
- c. ジベレリン添加培地で培養した茎を外したMT
- d. ジベレリンとサイトカイニン添加培地で培養した茎を外したMT

(2) 二次肥大による奇形塊茎は高温などで生じやすいため、無菌培養で継代しているジャガイモ培養物にウイロイドを感染させられれば、環境要因を均一にした条件で塊茎形成への影響をみれると考えた。ジャガイモ培養物のシュートを針で傷つけ、無菌処理した CSVd RNA を塗布して接種を行った。2ヶ月後に RT-PCR により感染を確認したが、ウイロイドが感染した個体は得られなかった。培養条件を変えて茎を太くしたり、接種のタイミングを変えることで再度検討する予定である。一方、CSVd 感染塊茎の無菌化によりシュート得る方法では、塊茎に内在していた雑菌でコンタミが多く発生したが、いくつかの塊茎で無菌培養を継続できるものがあり、数ヶ月後にシュートの伸長がみられた(図3)。RT-PCR により、ウイロイド感染塊茎から得られたシュートはすべてウイロイドの感染を維持していることが確認された。現在は、節培養によってウイロイド感染シュートを増殖培養させており、十分な量を確保できたあとに側芽への塊茎形成を誘導し、塊茎の奇形や休眠不良が生じるかを観察する予定である。また、これまで CSVd の感染は男爵でのみ確認されており、他のジャガイモ品種への感染性は確認されてなかった。男爵も含め9品種のジャガイモからシュート穂を用意して CSVd を機械接種した。感染確認まで2ヶ月の育成中であるが、今のところ、ノーザンルビー、シャドークイーン、キタカムイでの感染が検出され、CSVd は複数のジャガイモ品種に感染することが分かった。



図3. ジャガイモ無菌培養物へのウイロイド感染

- 左: 健全ジャガイモシュート(品種 男爵)
- 右: CSVd感染ジャガイモシュート

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 張霞・志村華子・藤野介延
2. 発表標題 ジャガイモマイクロチューバーを用いた二次成長の遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本育種学会第142回秋季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤野 介延  (Fujino Kaien)  (80229020)	北海道大学・農学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	松下 陽介  (Matsushita Yosuke)  (00414665)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・植物防疫研究部門・上級研究員    (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------