

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05624

研究課題名(和文) ピワがんしゅ病抵抗性遺伝子候補の探索、およびその活用

研究課題名(英文) Identification of loquat canker resistance gene in loquat

研究代表者

福田 伸二 (Fukuda, Shinji)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：70503770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ピワ栽培において最も重大な病害であるピワがんしゅ病に対するピワの抵抗性遺伝子を同定することを目的とした。がんしゅ病Aグループ菌に対するピワの抵抗性は、ピワの第10連鎖群に座乗し、SCY1-like protein 2、disease resistance protein RPM1およびpentatricopeptide repeat-containing protein At5g40410の3種に絞ることができた。また、Cグループ菌に対する抵抗性遺伝子は、omega-3 fatty acidとacyl-lipid omega-3 desaturaseの2つに絞ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ピワ栽培において最も重大な病害を引き起こすピワがんしゅ病に対するピワの抵抗性遺伝子を同定するために行った。その結果、ピワがんしゅ病には複数のレースが存在し、各レースに対するピワの反応も異なることから、複数の抵抗性遺伝子を見つける必要があった。研究の結果、Aグループ菌に対するピワの抵抗性遺伝子を3つに絞ることができた。また、Cグループ菌に対するピワの抵抗性は、2つの遺伝子に絞ることができた。これらの候補遺伝子中のCAPsマーカーにより、抵抗性個体と罹病性個体を効率よく選抜することができるようになり、ピワ育種が大きく前進した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to identify resistance genes in loquat against loquat canker, the most serious disease in loquat cultivation. The resistance of loquat canker Group A disease was narrowed down to three genes, SCY1-like protein 2, a disease resistance protein RPM1, and a pentatricopeptide repeat-containing protein At5g40410. The resistance genes against group-C bacteria were narrowed down to two, omega-3 fatty acid and acyl-lipid omega-3 desaturase.

The CAPs markers obtained from SNP polymorphisms in these genes can be used to efficiently and accurately detect the genes in each individual.

研究分野：園芸学

キーワード：ピワ 抵抗性 育種 DNA 遺伝子 早期選抜

1. 研究開始当初の背景

今回の研究課題であるピワがんしゅ病は、ピワ栽培における最大の病害である。銅剤による薬剤散布も試みられているが、最終的な解決には至らず、現場では感染部を物理的に切除して対応している。この様いがんしゅ病は難防除病害であることから生産地は慢性的な感染・拡大による樹勢の低下ならびに収量性の悪化に見舞われている。また、本病害は台風や春季の晩霜害の発生後に生じた傷口から感染しやすいため、これらの気象災害の増加により近年被害は拡大傾向にある。そのため、生産現場からは本病害に抵抗性を有する品種の育成が強く望まれている。しかしながら、がんしゅ病菌には複数のグループが存在し、それに対するピワの反応も様々であるので、抵抗性評価に複数年を要する。そこで、育種の効率化を図るために抵抗性遺伝子そのものを同定する必要がある。

育種年限が長い果樹を対象にした研究において原因遺伝子の単離やアプローチの研究報告は非常に少ない。それは、果樹の幼若期が長いことにより遺伝様式の解明が遅れていることにある。っていないと言われるバイオインフォマティクス解析手法も得意としている。

この研究に着手するために2組合せの集団、約1,000個体の育成と一年分の抵抗性検定を終了させている。既報で報告した抵抗性選抜マーカーの配列情報、新たにRAD-Seqで得たマーカー配列情報、ピワドラフトゲノム情報、リンゴやナシとのゲノムの類似性情報を統合した結果は、両遺伝子が共に約1Mbの領域に座乗していることを示しており、研究の方向性が間違いない。以上のことから本計画は実行可能であると考えられる。

データ取得後のバイオインフォマティクス解析に関する準備状況・実行可能性が問題となる。データを取得したけれども、その後のバイオインフォマティクス解析ができないということが世界中で多発しているのは事実である。しかし、我々の研究グループは多数の経験があり、確実に実行できると考える。

2. 研究の目的

ピワ〔*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.〕は、農林水産省政令指定品目の中で、高値で取引されているにも関わらず生産量が少ない品目の1つである。その要因として、国内最大生産地である長崎県の栽培面積の60%がピワがんしゅ病(*Pseudomonas syringae* pv. *erobotryae*)病に感染しており(長崎県防除所調べ)感染による樹勢の低下により10a当たりの収量が1トン未満と少ないことにある。現在の経済栽培品種(‘茂木’、‘田中’および‘長崎早生’)は、罹病性であり(森田、1980)、生産量を増やすには、食味優良かつ抵抗性の品種育成が喫緊の課題である。ピワがんしゅ病菌はA、BおよびCの3グル

ープに分類することが可能であり(森田、1978)、各グループ菌に対するピワの抵抗性も異なる。Aグループ菌抵抗性は主働遺伝子 *Pse-a* 遺伝子により支配されている(稗圃ら、2002)、Bグループ菌へのピワ品種の反応はAグループ菌に対する反応と同じである。Cグループ菌に対する抵抗性は、劣性形質であり特に‘白茂木’の保有する抵抗性は *pse-c* によって支配されていることが明らかとなっている(Hiehata et al. 2012)。

我々は、果実形質の一つである果肉色の遺伝(福田ら、2009)や上記の抵抗性の遺伝様式、抵抗性個体を選抜するDNAマーカー(Fukuda et al., 2005; 2009; 2014; 2016)を開発してきた。これらの技術は、現在、長崎県農林技術開発センターのピワ育種事業に実用化され、年間2,000本ほどの選抜に活かされ、新品種の育成(稗圃ら、2008; 2010; 2016)にも貢献してきた。しかしながら、近年、消費者および生産者の嗜好やニーズは多様化しており、特色ある果樹新品種の早期育成が求められている。そのためには新しい育種素材として世界各国から導入した遺伝資源を積極的に活用し、特色ある新品種を早急に育成する必要があるが、上記のDNAマーカーは精度の問題から使用できない品種も増えてきており、性能的限界も見え始めている。そのため遺伝子そのものを同定する必要がある。

我々は、基盤研究(C)(一般)(平成27~29年度)「次世代シーケンサーによるピワ連鎖地図の構築と果実形質等を選抜できるマーカーの獲得」の支援の下、部分ゲノム解読法RAD-Seqを活用して、約1,000個のマーカーからなる連鎖地図を作成した。その結果、Aグループ菌抵抗性遺伝子ピワ第10連鎖群上部に座乗し、Cグループ菌抵抗性遺伝子はピワ第3連鎖群に座乗することがはっきりとわかった。また、新学術領域研究「先進ゲノム支援」(平成28年度)の支援の下、ピワの *de novo* 全ゲノム配列解読を実施し、計725Mb (N50=2.2Mb)のドラフトゲノム情報を得た。さらに、*de novo* 全ゲノム配列解読で得たスキップフォルド(一続きのDNA配列)を、リンゴやナシのゲノムとの類似性やメイトペア情報(15kb離れたDNA配列の情報)を利用して連結する、独自開発の計算法「スーパーキャップフォルド構築法」を用いて、2抵抗性遺伝子(*Pse-a* および *pse-c*)が座乗する領域を、共に約1MbのDNA配列に狭めることに成功した。

このような準備状況の下、いよいよ、交雑集団を用いて、次世代シーケンサー活用したSNPs比較により、がんしゅ病抵抗性遺伝子候補を同定することにした。候補遺伝子を見つけたとしても、ピワへの形質転換が難しいことから、他の方法で抵抗性遺伝子の重要性を確認する必要がある。そこで、保有する100品種・系統以上の遺伝資源を供試し、候補遺伝子領域の多型と抵抗性の相関を確認する。本研究の結果、育種選抜を行う上での最重要

な情報を提供できることになる。

3. 研究の方法

1. A グループ菌抵抗性の供試材料には、2016年に‘なつたより’ (*Pse-a pse-a*) を自殖した約 500 個体の集団を活用する。また、C グループ菌抵抗性の供試材料には 2017 年に‘長崎早生’ (*Pse-c pse-c*) を自殖した約 500 個体の集団を活用する。A グループ菌抵抗性の分離集団‘なつたより’の自殖集団については、2017 年度に第一回目の抵抗性検定を終了させており遺伝解析に適した集団となっている。研究期間内で 2 集団において 2 回の接種検定を行い、正確な検定結果を得る。その後、2 集団から抵抗性および罹病性を示すことが確実なもの約 100 個体を選抜し、そのゲノム DNA を均等に混合し、次世代シーケンサーにより全ゲノムシーケンスする (バルクシーケンス)。(類似の方法である MutMap 法では、約 20 - 40 個体で解析して原因遺伝子の同定に成功しているが、より多くの個体を解析することとした。抵抗性・罹病性の両集団を用いてより確実性を高めるところも MutMap 法と異なる。) 先行研究から、2 抵抗性遺伝子 (*Pse-a* および *pse-c*) は、数個のスキヤフォールドからなる約 1Mb の DNA 配列に座乗することはわかっている。そこで、その近傍を中心にバルクシーケンスで得られた大量の 150 塩基の塩基配列 (リード) 間で比較することにより原因 SNP を同定する予定である。これはリシーケンスと言われる、全ゲノムを断片化して読んだ配列を決定済みゲノム配列と比較する方法である。

1) ビワがんしゅ病抵抗性検定

A グループ菌抵抗性分離集団‘なつたより’ (*Pse-a pse-a*) 自殖集団 500 個体の 2 回目のがんしゅ病 (AM001 系統菌) 抵抗性検定および C グループ菌抵抗性分離集団‘茂木’ (*Pse-c pse-c*) 自殖集団 500 個体の 1 回目のがんしゅ病 (CG001 系統菌) 抵抗性検定を行う。

2) リシーケンスとそのデータ解析

A グループ菌抵抗性個体および罹病性個体の各々の集団に由来するバルク DNA を、シーケンス受託会社に送り、DNA 配列を解読する。条件は、150bp ずつのペアエンドとする。少なくともゲノムサイズの 50 倍のデータ (約 40Gb) を得る。(約 20 個体を用いた同様の解析の場合、ゲノムサイズの 10 倍のデータを用いるので、約 100 個体を用いる本解析では 50 倍のデータとした。) 得られた配列データをコンピューターで解析し、候補遺伝子を同定する。

3) ビワがんしゅ病抵抗性検定

グループ菌抵抗性分離集団‘長崎早生’ (*Pse-c pse-c*) 自殖集団 500 個体の 2 回目のがんしゅ病 (CG001 系統菌) 抵抗性検定を行う。

4) リシーケンスとそのデータ解析

C グループ菌抵抗性個体および罹病性個体の各々の集団に由来するバルク DNA を、同様に解析する。

4. 研究成果

接種検定により‘なつたより’自殖の抵抗性分離集団 435 個体を評価した結果、抵抗性は 328 個体、罹病性は 107 個体であり、それらの分離比は期待値 (抵抗性:罹病性=3:1) に適合していた ($\chi^2=0.038$ 、P 値=0.847)。作製した 2 つのバルク DNA のリシーケンスングにより、ピワ第 10 連鎖群に座乗する合計 33 個のスキヤフォールドのうち、scaffold1267_cov61 (586,949kbp) 内のみ、SNP のホモ接合性頻度が 100% を示す遺伝子領域が複数確認された。そのため、抵抗性遺伝子 *Pse-a* は scaffold1267_cov61 内にあると特定した。さらに、候補領域内の遺伝子配列から作成した CAPs マーカーを用いて、各個体の遺伝子型を分析した結果、scaffold1267_cov61 に存在する 3 つの遺伝子 (*SCY1-like protein 2*, *disease resistance protein RPM1-like* および *pentatricopeptide repeat-containing protein At5g40410*, *mitochondrial*) において、全個体の CAPs マーカーによる遺伝子型が接種検定の結果と完全に一致していることが確認された。以上の結果から、*Pse-a* はこれらの遺伝子の一つである可能性が高いと考えられた。

‘長崎早生’自殖集団における接種検定の結果、抵抗性 104 個体、罹病性 340 個体となり、期待値である 1:3 に適合した ($\chi^2=0.589$ 、p 値 = 0.443)。作成した連鎖地図は、長さ 1.1cM 内に 5 種のマーカーが存在する高密度連鎖地図となり、*pse-c* は CAPS (*omega-3*) と CAPS (*acyl-lipid*) の間にマッピングされ、それらとの距離は、それぞれ 0.1cM であった。さらに、前述した 2 つの CAPS の遺伝子型は、抵抗性評価と完全に一致した。*pse-c* 遺伝子候補である *omega-3 fatty acid desaturase*, *endoplasmic reticulum* と *acyl-lipid omega-3 desaturase*, *endoplasmic reticulum* の塩基配列から想定されるアミノ酸配列は、両者間において相同性が高く、系統樹解析では、リンゴやナシにおいて同名で登録されているアミノ酸配列と同一のクラスターを形成した。scaffold555_cov85 と ‘Seventh Star’ における *pse-c* 遺伝子候補間の領域を比較した結果、両者間において合計 18,468bp のギャップを発見したが、その領域にて注釈付けされた遺伝子は検出されなかった。

以上の結果に加え、2 つの *pse-c* 遺伝子候補は、どちらもジャスモン酸の前駆体である α -リノレン酸の生合成に関与していることが報告されており (Ohlrogge ら、1995 ; M. Venegas-Calcerón ら、2006) 罹病性個体ではジャスモン酸 / エチレンを介して誘導される抵抗性 (塩基性 PR タンパク質) が正常に誘導されていない可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Construction of a High-Density Linkage Map for Bronze loquat Using RAD-Seq. S. Fukuda, Y. Nagano, K. Matsuguma, K. Ishimoto, N. Hiehata, A. J. Nagano, A. Tezuka, T. Yamamoto **Scientia Horticulturae**, 251, 59-64. (2019)
2. Draft Genome Sequences of Three Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*, a Pathogen Causing Canker Disease in Loquat, Isolated in Japan. H. Tashiro, Y. Nagano, A. Jiromaru, R. Sakaguchi, N. Hiehata, S. Fukuda, *Microbiology Resource Announcements*, 10, 1049-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.01049-20>

〔学会発表〕(計3件)

1. ピワがんしゅ病抵抗性遺伝子(Pse-a)の同定の試み(2021) 田代裕誠、次郎丸絢香、永野幸生、稗圃直史、伊藤武彦、奥野未来、豊田敦、永野惇、福田伸二
2. ピワがんしゅ病抵抗性遺伝子pse-cの同定(2021) 福田伸二、田代裕誠、田中弥有、森彩花、稗圃直史、永野幸生、伊藤武彦、奥野未来、豊田敦、永野惇
3. ピワがんしゅ病抵抗性遺伝子(pse-c)のファインマッピング(2020) 福田伸二・文園千佳子・川口揚豊・松隈公孝・永野幸生・坂口龍之介・伊藤武彦・奥野未来・豊田敦

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 伸二 (FUKUDA, Shinji)
佐賀大学農学部准教授
研究者番号：70503770

(2)研究分担者

永野 幸生 (NAGANO, Yukio)
佐賀大学総合分析実験センター准教授
研究者番号：00263038

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroaki Tashiro, Yukio Nagano, Ayaka Jiromaru, Ryunosuke Sakaguchi, Naofumi Hiehata, Shinji Fukuda	4. 巻 10
2. 論文標題 Draft Genome Sequences of Three Strains of <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>eriobotryae</i> , a Pathogen Causing Canker Disease in Loquat, Isolated in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e1049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.01049-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinji Fukuda, Yukio Nagano, Kimitaka Matsuguma, Keiichiro Ishimoto, Naofumi Hiehata, Atsushi J. Nagano, Ayumi Tezuka and Toshiya Yamamoto	4. 巻 251
2. 論文標題 Construction of a High-Density Linkage Map for Bronze Loquat Using RAD-Seq	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 59-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scienta.2019.02.065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田伸二・文園千佳子・川口揚豊・松隈公孝・永野幸生・坂口龍之介・伊藤武彦・奥野未来・豊田敦
2. 発表標題 ピワがんしゅ病抵抗性遺伝子 (pse-c) のファインマッピング
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松隈公孝・石本慶一郎・稗圃直史・永野幸生・伊藤武彦・奥野未来・豊田敦・永野惇・山本俊哉・福田伸二
2. 発表標題 バルクシーケンスによるピワがんしゅ病抵抗性遺伝子 (Pse-a) 領域の推定
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田伸二・西紗葉子・松隈公孝・坂口龍之介・谷本恵美子・永野幸生・永野惇
2. 発表標題 RAD-Seq法によるピワ遺伝資源の構造解析
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田代裕誠・次郎丸絢香・永野幸生・稗圃直史・伊藤武彦・奥野未来・豊田敦・永野惇・福田伸二
2. 発表標題 ピワがんしゅ病抵抗性遺伝子 (Pse-a) の同定の試み
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 福田伸二・田代裕誠・田中弥有・森彩花・稗圃直史・永野幸生・伊藤武彦・奥野未来・豊田敦・永野惇
2. 発表標題 ピワがんしゅ病抵抗性遺伝子pse-cの同定
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021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	永野 幸生 (Nagano Yukio) (00263038)	佐賀大学・総合分析実験センター・准教授 (17201)	

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
---------	---------