

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06039

研究課題名(和文) マルバカイドウにおけるリンゴ高接病発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Unraveling mechanisms underlying top working disease susceptibility in Malus prunifolia

研究代表者

森谷 茂樹 (Moriya, Shigeki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・上級研究員

研究者番号：90391474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ高接病の発症メカニズムを解明するため、「マルバカイドウ」由来の感受性原因遺伝子Cv2の遺伝子本体を明らかにしようとした。F1集団約1000個体を用いたファインマッピングの結果、Cv2はDNAマーカーMdo.chr14.12とMdo.chr14.14との間に座乗することを明らかにした。BACライブラリーを用いた塩基配列解析の結果、本領域の大きさはリンゴゲノム情報の94kbに対して「マルバカイドウ」では294kbと非常に大きかった。この違いは、周辺領域が重複を伴いながら挿入されていることが原因であった。挿入領域内に存在する候補遺伝子が葉において発現していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにあまり解明されていなかったリンゴ高接病の発症メカニズムについて、リンゴの持つ罹病性遺伝子の面から知見を得ることができた。先行研究と合わせて、より詳細な発症メカニズムの仮説を立てることが可能となった。今後の研究を進めることで、リンゴとウイルスの相互作用について明らかにすることができる。近年、シードル生産が注目されるに伴い、古品種を栽培することへの関心が高まっているが、古品種は高頻度で高接病のウイルスを保有しているリスクがある。本研究によって高接病への関心が高まり、無理解な接ぎ木増殖によるウイルスの蔓延が抑止されることを期待している。

研究成果の概要(英文)：To understand mechanisms of virus induced top working disease in apple, we aimed to identify the Cv2 gene conferring a disease susceptibility on 'Marubakaido'. Fine mapping approach resulted in identification of candidate region of Cv2 between markers Mdo.chr14.12 and Mdo.chr14.14. Sequence analysis using the BAC library showed that the size of this region was very large, 294 kb in 'Marubakaido' compared to 94 kb in the apple genome GDDH13. This difference was due to a large insertion sequence with several duplication events within the region. We confirmed that the candidate genes present in the candidate region were expressed in leaves.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：リンゴ ウイルス 高接病 相互作用 病害抵抗性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リンゴ高接病は現れた症状が激しい場合、樹が枯死にいたる重要病害である。リンゴ高接病には3種類の病原ウイルスが知られており、その内、リンゴクロロティックリーフスポットウイルス (ACLSV) は最も主要な原因として知られている。

リンゴ属植物が ACLSV によって高接病を発症するかどうか、また、現れる病徴については品種間差が存在する。例えば、台木として用いられるリンゴ属野生種であるマルバカイドウ (*Malus prunifolia* Borkh.) やミツバカイドウ (*M. sieboldii* Rehd.) は高接病を発症する感受性であるが、それぞれ特徴が異なる病徴を示す。一方、セイヨウリンゴ (*M. × domestica* Borkh.) やわい性台木 (*M. pumila*) では、ウイルスの感染が成立するものの発症しない免疫性を示す。

高接病の発症メカニズムは未だ多くのことが不明であるが、感受性の遺伝についてはいくつかの知見が得られている。マルバカイドウおよびミツバカイドウの ACLSV 感受性は、感受性が免疫性に対して顕性を示す1対の遺伝子 *cv* によって後代に遺伝することが知られている (羽生田ら、1983)。研究代表者らは連鎖解析により、マルバカイドウおよびミツバカイドウの有する *cv* がそれぞれ第4番、および第10番染色体に座乗している異なる遺伝子であることを明らかにし、それぞれを *cv2* と *cv1* と呼称して区別することを提唱した (北本、森谷ら、2018)。さらに、*cv1* は *cv2* に対して上位性を示すことを明らかにした (北本、森谷ら、2019)。

高接病の発症メカニズムに関する研究は、ゲノム解読などが進行しているウイルスからの取り組みに比べて、宿主であるリンゴからの取り組みは後れを取っている。そこで、本研究では、日本のリンゴ栽培で利用されている台木の約7割を占めているマルバカイドウに着目し、マルバカイドウ由来の *cv2* の遺伝子本体を明らかにして、高接病の発症メカニズムを解明しようとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、高接病発症メカニズムを解明するために、マルバカイドウが有する *cv2* の遺伝子本体を明らかにすることを目的とする。具体的には、*cv2* について、ファインマッピングおよび BAC ライブラリーの構築と塩基配列の解読、さらに、候補遺伝子の探索を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1) *cv2* のファインマッピング

材料として、感受性のマルバカイドウ (*cv2/cv2*) と免疫性の‘ふじ’ (*cv2/cv2*) とを交雑して得られた  $F_1$  約 1000 個体から、*cv2* 近傍に染色体の組換えを検出した 26 個体の“組換え型個体”を用いた。組換え型個体の表現型を検定するために、各個体 3 本の接ぎ木苗を養成し、そのうちの 2 本に ACLSV の P-203 株の保毒穂木を腹接ぎしてウイルスを接種した。接ぎ木翌年の春、および翌々年の春に葉における病徴を観察し、感受性が免疫性を予備判定した。その後、初夏に樹体を解体して接ぎ木部における病徴の有無を観察することで、表現型の確定診断とした。

並行して、リンゴのゲノム情報 GDDH13 を利用し、研究開始時点の候補領域 556kb の塩基配列から単純反復配列 (SSR) マーカーを開発した。これらのマーカーを用いて、前述の組換え型個体において染色体の組換えが起きた位置を推定した。上記の表現型の診断と、組換え位置の関係を示すグラフィカルジェノタイプを作成した。

#### 2) *cv2* 候補領域の塩基配列の決定

BAC ライブラリーを作成するため、マルバカイドウの後代個体である No. 609 (*cv2* を保有する個体) の葉から抽出したゲノム DNA を制限酵素 HindIII の処理によって断片化し、ベクタープラスミドに組み込んだ。ベクターを大腸菌に導入したのち、LB 培地を分注した 384 ウェルプレート上に整理して、BAC ライブラリーとした。

次に、*cv2* 候補領域の染色体がクローン化されたプラスミドを有する菌株を BAC ライブラリーから選抜して、プラスミド DNA を抽出した。ロングリード型の次世代シーケンサー PacBio RSII を用いてプラスミドの全塩基配列を解読した。

#### 3) *cv2* 候補遺伝子の同定

遺伝子発現と表現型の関係について調べるため、ACLSV を接種した感受性および免疫性個体の葉および樹皮など、高接病の症状が現れる組織から遺伝子発現解析用のサンプルを採取し、2) で明らかにした塩基配列から予想された *cv2* 候補遺伝子についての発現解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) *cv2* のファインマッピング

*cv2* 周辺領域の組換え型個体 26 個体について、2020 年と 2021 年の展葉期に葉の病徴を観察し、さらに 2021 年に樹体の解体調査により抵抗性/免疫性の確定診断を行ったところ、11 個体が免疫性 (*cv2/cv2*)、15 個体が感受性 (*cv2/cv2*) と判定された。

リンゴゲノム情報 GDDH13 を利用して、候補領域内から新規 SSR マーカーを 25 種類設計した。これらについて、供試集団での多型を調査したところ、14 種類をマッピングに利用可能であった。これらのマーカーを利用して *cv2* のファインマッピングを行ったところ、*cv2* の候補領域は

SSR マーカー Mdo.chr14.12 と Mdo.chr14.14 との間、GDDH13 上の物理距離では約 94kb であった (図 1)

図 1 *Cv2* 周辺のグラフィカル遺伝子型

Markers	Position of Left Primers on Chr04	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	マーカー間距離 (Kbp)	
Mdo.chr4.5	31,081,527	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	0.0
Mdo.chr4.6	31,093,346	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	11.8
Mdo.chr4.7	31,110,673	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	17.3
Mdo.chr4.11	31,185,385	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	74.7
Mdo.chr4.12	31,185,420	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	0.0
<b><i>Cv2</i></b>		S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	
Mdo.chr4.14	31,279,777	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	23.7
Mdo.chr4.15	31,322,899	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	43.1
Mdo.chr4.17	31,342,107	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	19.2
Mdo.chr4.19	31,490,420	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	148.3
Mdo.chr4.20	31,509,822	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	19.4
Mdo.chr4.21	31,517,122	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	7.3
Mdo.chr4.23	31,542,139	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	25.0
Mdo.chr4.24	31,548,901	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	6.9
Mdo.chr4.25	31,561,191	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	12.3

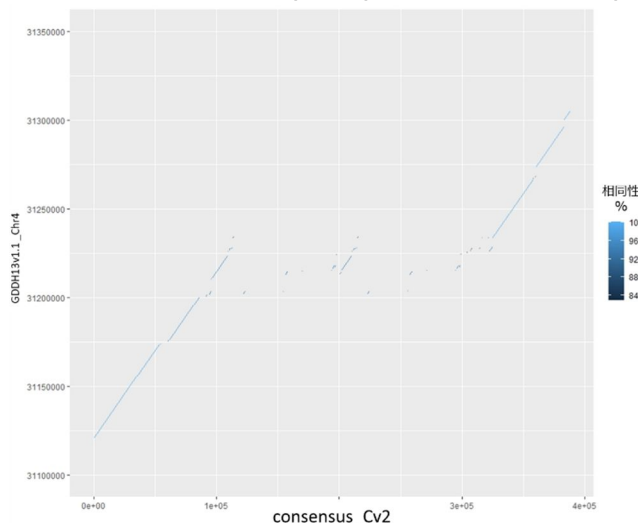
S 感受性  
R 免疫性

## 2) *Cv2* 候補領域の塩基配列の決定

*Cv2* を有するマルバカイドウの後代である「No. 609」のゲノム DNA を HindIII によって部分消化した断片が組み込まれた大腸菌 55,295 クローンを得た。組み込まれた断片の平均長は 168kb であった。このことから、構築した BAC ライブラリーはリンゴゲノム (約 750Mb) の 12 倍のカパレッジを持つと推定された。

BAC ライブラリーから *Cv2* 候補領域を含むクロンのスクリーニングを行ったところ、免疫性 (*cv2*) 側染色体では候補領域を全て含む単一のクロンが得られたが、感受性 (*Cv2*) 側ではそのようなクロンを得ることはできなかった。そこで、新たに設計した in/del マーカーやクロン末端配列を利用してスクリーニングを継続した結果、9 個のクロンからなる、感受性 (*Cv2*) 側の全候補領域を包含する BAC コンティグが構築された。これらのクロンについて、ロングリード型次世代シーケンサーによって塩基配列の解読を試みた。すると、候補領域の両端に位置するクロンから、互いに相同性の高い塩基配列が 20kb 以上に渡って認められた。また、候補領域の中心部分を含むと考えられるクロンの塩基配列のアセンブルについては失敗した。この原因として、100kb を越える大きな重複配列が挿入されていることが考えられた。解読に成功したクロンの塩基配列と、失敗したクロンの末端配列を比較したところ、重複が疑われる領域内の約 12kb について塩基配列の解読がなされていないことがアセンブル失敗の原因であると推測された。そこで、ロング PCR によって未解読領域を増幅した後、ダイレクトシーケンスによるプライマーウォーキングを実施して、この増幅産物の塩基配列を明らかにした。以上の結果、*Cv2* 座乗候補領域の全塩基配列が 296kb であることが明らかになった。Mdo.chr14.12 と Mdo.chr14.14 間の距離を比較すると、GDDH13 の約 94kb、本研究で得た免疫性の *cv2* の 81kb に対して、*Cv2* は約 3~3.5 倍の長さであった。この違いは挿入配列に起因しており、挿入配列内には周辺の塩基配列が 2~4 回重複して挿入されていた (図 2)。

図 2 リンゴゲノム情報 GDDH13 (縦軸) と *Cv2* 座乗染色体 (横軸) の配列の相同性解析

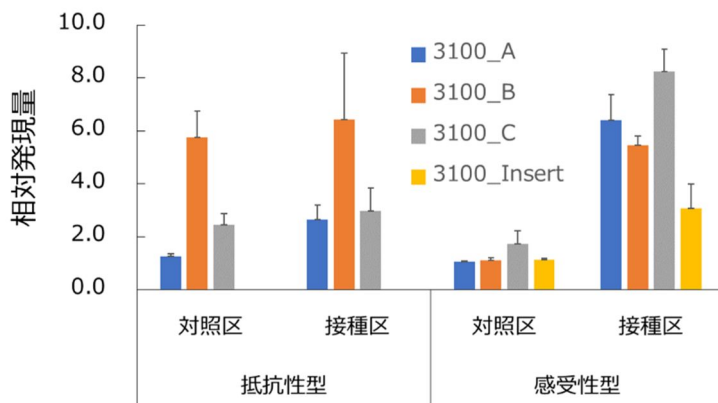


### 3) Cv2 候補遺伝子の同定

ACLSV に対する感受性および免疫性個体から葉組織をサンプリングし、cDNA を合成した。

上記で明らかにした 296kb の塩基配列からは、病害抵抗性遺伝子の特徴を備えた遺伝子が複数予測された。そこで、重複領域内でこれらの遺伝子がどのように存在しているか調べたところ、完全な配列が残っている遺伝子（パラログ）が 1~3 コピー存在していることが判明した。これらのパラログを特異的に検出できるプライマーを設計して cDNA からの増幅を試みたところ、いずれの遺伝子も葉での発現が認められた（図 3）。

図 3 Cv2 候補遺伝子「3100」のパラログごとに調べた葉における相対発現量



#### 相対発現量の平均値と標準誤差

内部コントロール：MdActin, 反復数：2

感受性型の対照区における発現量を 1 として相対発現量を $\Delta\Delta\text{CT}$ 法で求めた

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Moriya Shigeki, Iwanami Hiroshi, Haji Takashi, Okada Kazuma, Shimizu Taku, Suzaki Koichi, Kitamoto Naoko, Katayose Yuichi, Wu Jianzhong, Yamamoto Toshiya, Abe Kazuyuki	4. 巻 17
2. 論文標題 QTL analysis of crown gall disease resistance in apple: first plant R gene candidates effective against <i>Rhizobium rhizogenes</i> (Ti)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tree Genetics & Genomes	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11295-021-01508-9	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森谷茂樹・岩波宏・土師岳・岡田和馬・清水拓・須崎浩一・北本尚子・片寄裕一・呉健忠・山本俊哉・阿部和幸
2. 発表標題 リンゴの根頭がんしゅ病抵抗性に関する3種類のQTL
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北本尚子・馬場隆士・岡田和馬・榊原均・竹林裕美子・小嶋美紀子・吉田康徳・神田啓臣・今西弘幸
2. 発表標題 カラムナータイプリンゴ‘ウィジック’の成り年におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Moriya Shigeki, Okada Kazuma, Shimizu Taku, Wada Masato, Abe Kazuyuki
2. 発表標題 Marker-assisted breeding of apple rootstock at NARO, Japan
3. 学会等名 10th Rosaceae Genomics Conference（国際学会）
4. 発表年 2020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	北本 尚子  (Kitamoto Naoko)  (70447241)	秋田県立大学・生物資源科学部・准教授   (21401)	

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