

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 清水 元樹
 学位 博士 (農学)
 学位記番号 新大院博 (農) 第 135 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 アブラナ科植物における萎黄病抵抗性候補遺伝子の同定と多型に関する研究

論文審査委員 主査 教授・岡崎 桂一
 副査 教授・西村 実
 副査 准教授・中野 優
 副査 准教授・佐野 義孝

博士論文の要旨

萎黄病は、糸状菌 *Fusarium oxysporum* によって引き起こされるアブラナ科作物の重要病害であり、ハクサイ、カブ (*Brassica rapa*) やキャベツ、ブロッコリー (*B. oleracea*) などの産地で問題となっている。このため本病害の抵抗性育種が必要とされている。本研究では、萎黄病に対する抵抗性遺伝子候補を *B. rapa*, *B. oleracea* において、2つの異なる手法、1) RNA-seq を用いた Differential expression analysis 法 (*B. rapa*)、2) Map-based cloning 法 (*B. oleracea*) によって同定した。

1) *B. rapa* における萎黄病抵抗性遺伝子の同定 (Differential expression analysis)

萎黄病抵抗性 T23 と罹病性系統 T24 を用いて、RNA-seq 法によって両系統間で発現量が異なる遺伝子を網羅的に探索すると同時に、発現量に差のある遺伝子の中から病害抵抗性遺伝子特有の NBS-LRR モチーフ配列を持つ遺伝子を探索した。次に、絞り込んだ NBS-LRR モチーフ配列遺伝子の中から、ゲノム PCR で抵抗性系統では増幅できるが、罹病性系統で増幅できない7つの遺伝子を選抜した。T23 を含む抵抗性 6 系統と、T24 系統を含む罹病性 3 系統について、前記の 7 つの遺伝子の遺伝子型を決定したところ、タンデムでリポートする Bra012688 遺伝子と Bra012689 遺伝子の遺伝子型判定が、9 系統の抵抗性/罹病性表現型と一致した。次に、T24 (S) × T23 (R) および T22 (S) × T21 (R) の交雑から育成した F2 分離集団 (それぞれ約 100 個体) について、Bra012688 遺伝子と Bra012689 遺伝子の遺伝子型と表現型判定を実施したところ、各個体の遺伝子型判定と表現型判定が 1 個体を除き完全に一致した。ゲノムの PCR 解析から、罹病性系統では、両遺伝子が欠失していた。これにより罹病化したと考えられた。

2) *B. oleracea* における萎黄病抵抗性遺伝子の同定 (Map-based cloning)

抵抗性キャベツと感受性ブロッコリーの自殖後代により QTL 解析を行い、単因子優性遺伝子、*FocBo1* を同定した。さらに、F2 集団 1,008 個体を用いたファインマップ法により *FocBo1* 候補領域を絞り込んだ。次に、BAC ライブラリーのスクリーニングから得られた *FocBo1* 近傍マーカーを含む BAC クローンのシークエンスと近縁種の *B. rapa* との相同解析から、単離した BAC 領域内に 2 つの NBS-LRR 型遺伝子 (Bra012688, Bra012689)

のオルソログを同定した。これらのオルソログを *FocBo1A*, *FocBo1B* と命名し、これらを候補遺伝子とした。抵抗性系統で *FocBo1A* では ORF が確保できたが、*FocBo1B* は転写されているものの、そのコーディング領域には Bra012689 塩基配列と比較し、多くの塩基挿入・欠失があり ORF が得られなかった。また、感受性系統では *FocBo1A* の前半領域では一塩基の挿入が見られフレームシフトを起こしていたほか、*FocBo1A* の後半と *FocBo1B* の前半領域が融合した構造を示しており、両方の遺伝子が機能を喪失していると考えられた。これらの結果から、*FocBo1A* が萎黄病抵抗性遺伝子の候補遺伝子と考えられた。

本研究において、2つの異なる方法によって、*B. rapa*, *B. oleracea* の両種において萎黄病抵抗性遺伝子の有力な候補遺伝子 (Bra012688, Bra012689, *FocBo1A*) を同定できた。また、*FocBo1A* は Bra012688 のオルソログであり、異なる種で同定された遺伝子が互いにオルソログであることは、これらの 2 遺伝子が真の抵抗性遺伝子であることを強く示唆している。また、*B. oleracea* 抵抗性遺伝子 (*FocBo1A*) を特異的に増幅する遺伝子マーカーによってキャベツ、ブロッコリー F1 品種を用いた MAS を行ったところ抵抗性品種と感受性品種を完全に判別することができた。この結果は、*FocBo1A* が真の萎黄病抵抗性遺伝子であることを更に裏付けた。同時に、本研究で同定した遺伝子の遺伝子型判定を利用したマーカー利用選抜 (MAS) の有効性を示すものである。現在、3 遺伝子 (*FocBo1A*, Bra012688, Bra012689) の感受性系統への形質転換実験により候補遺伝子が真の抵抗性遺伝子であるかを実証試験中である。

審査結果の要旨

本研究では、萎黄病に対する抵抗性遺伝子候補を *B. rapa*, *B. oleracea* において、2つの異なる手法、1) RNA-seq を用いた Differential expression analysis 法 (*B. rapa*)、2) Map-based cloning 法 (*B. oleracea*) を用いて同定した。これまで、Brassica 属の萎黄病抵抗性遺伝子は同定されておらず、本研究で明らかにした *FocBo1A*, Bra012688, Bra012689 が当該遺伝子の有力な候補と考えられた。既存の *B. rapa*, *B. oleracea* の品種を用いた、本候補遺伝子の遺伝子型判定と接種試験による表現型解析の判定(抵抗性/罹病性)は完全に一致しており、本病害の抵抗性育種を行う上で、本研究で同定した候補遺伝子のジェノタイピングが極めて有効であることが示された。

本論文の結果の一部は、Plant Molecular Biology に受理され、掲載予定であるほか、国内外の学会で発表されている。

以上のことから、本論文は博士 (農学) の博士論文として十分な内容を持つものと判定した。