

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
(要約)

新潟大学大学院自然科学研究科 (論文博士は氏名のみでも可)

氏名 清水 元樹

(以下要約を記入する)

萎黄病は糸状菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) によって引き起こされるアブラナ科植物 (ハクサイ, カブなど; *Brassica rapa* やキャベツ, ブロッコリーなど; *B. oleracea*) において最重要とされる病害であり, 抵抗性育種が必要とされている. 本研究では, 萎黄病に対して *B. rapa*, *B. oleracea* における抵抗性 (*R*) 遺伝子を異なった2つの手法での同定・単離した.

1). RNA-seq を用いた Differential expression analysis 法による単離 (*B. rapa*)

2). Map-based cloning 法による単離 (*B. oleracea*)

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

ハクサイは 2011 年に全ゲノム配列が公開され, 分子生物学的な研究にも適した材料である. 萎黄病に抵抗性と感受性を示す系統に対して, RNA-seq 法によって系統間で発現量が異なる NBS-LRR (*R* 遺伝子の共通配列) 型遺伝子を探索し, 萎黄病抵抗性遺伝子の同定を行った. RNA-seq の結果から, 系統間で異なる発現を示した 2 遺伝子 (Bra012688, Bra012689) に作成した遺伝子マーカー (感受性系統では増幅されない) では, F₂ 集団における遺伝子型は罹病度と強い関連性を示し, 感受性系統では, 両遺伝子あるいはどちらか一方の遺伝子の欠失により罹病化したと考えられた. この 2 遺伝子は同じ転写方向でタンデムに位置しするが, アミノ酸配列の相同性が低く最近の重複によるものではないと考えられる (Shimizu *et al.* 2014. In press Plant Mol Biol).

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 (Pu and Shimizu *et al.* 2012 Mol Breed). さらに, 1,008 F₂ 個体を用いたファインマップ法により *FocBo1* 候補領域を絞りこみ, 自らスクリーニングした BAC クローンのシーケンスと近縁種の *B. rapa* との相同解析より 2 つの NBS-LRR 型遺伝子 (Bra012688, Bra012689) のオルソログ (*FocBo1-A*, *FocBo1-B*) が *B. oleracea* に存在したため, これらを候補遺伝子とした. 抵抗性系統で *FocBo1-A* では ORF が確保できた, 一方で *FocBo1-B* は転写されているがオルソログの Bra012689 の転写領域と比較しても多くの塩基挿入・欠失により ORF が得られなかった. 感受性系統では *FocBo1-A* 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後半領域が *FocBo1-B* に置き換わり, *FocBo1A, B* 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.

本研究において, 両種において有力な候補遺伝子 (*FocBo1A*, Bra012688,

【別紙 2】

Bra012689) を選抜できた。また, *FocBo1-A* は Bra012688 のオルソログである。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 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 (*FocBo1-A*) 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 (投稿論文執筆中)。この結果は, *FocBo1-A* が真の萎黄病抵抗性遺伝子であることを更に裏付け, 確実な MAS の基盤を提供するものと考えられる。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。