

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	PU Zijing
学位記番号	博士 (農学)
学位授与の日付	新大院博 (農) 第 154 号
学位授与の要件	平成 27 年 9 月 24 日
博士論文名	学位規則第 4 条第 1 項該当
	A study on the plant-pathogen interaction between <i>Brassica oleracea</i> and <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i> (<i>Brassica oleracea</i> と萎黄病菌における植物-病原菌相互作用に関する研究)
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 副査 准教授・伊藤 紀美子

博士論文の要旨

アブラナ科野菜に感染する土壌伝染性の *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (萎黄病菌) は、根から侵入して植物体の萎凋・枯死を引き起こし、高温で発病が助長される。本病害の防除は、最近の気候温暖化により生産上早急に対応すべき課題となっている。*Brassica oleracea* (キャベツ等) には本病害に抵抗性を示す品種がいくつか育成され、抵抗性品種による防除が行われているが、キャベツの抵抗性機構の遺伝様式は不明であるうえ、抵抗性品種の選抜は煩雑な接種試験によっている。このように本病害の防除および抵抗性の遺伝解析は喫緊の課題であるほか、*B. oleracea*-萎黄病菌相互作用における反応や萎黄病菌の病原性発現機構は、生理学的にも興味深い現象である。これらのことから、本研究論文は、*B. oleracea*-萎黄病菌相互作用を生理・遺伝的に解析することを目的に研究を行った。その成果は、以下のとおりである

(1) *B. oleracea*(キャベツ)における萎黄病抵抗性遺伝子の同定

萎黄病菌(Cong:1-1)に対して罹病性のブロッコリー-double haploid(DH)ライン(GCP04)と抵抗性キャベツ DH ライン(AnjuP01)との間の交雑後代を用い、抵抗性の分離分析による遺伝解析および Quantitative Trait Locus (QTL)分析を行ったところ、効果の大きい抵抗性 QTL が連鎖群 7 (C7) にマッピングされた。C7 上の QTL は LOD が 19.5 であった。マイナーな QTL は、2.06 の LOD スコアで C4 上に検出された。この結果は、キャベツの萎黄病抵抗性が、効果の大きい単一の優性遺伝子によって制御されることを示しており、この抵抗性遺伝子を *FocBo1*-AnjuP01 と名付けた。高温条件での接種試験では、*FocBo1*-AnjuP01 ホモ型の方が、ヘテロ型より強い抵抗性を示した。F3 分離集団の個体を用いた *FocBo1* に連鎖した SSR マーカー (KBrS003O1N10) のジェノタイピング(DNA 判定)と各個体の接種試験の結果の相関関係が高く、この SSR マーカーは *B. oleracea* に属する作物に萎黄病抵抗性の育種に有効であると思われた。

(2) コスミドライブラリーの作成

FocBo1 を分子的に単離するため、抵抗性キャベツ DH ライン(AnjuP01)のゲノムライブラリーをコスミドベクターを用いて構築した。コスミドクローン 10 個を 1 プールとしてグリセロールストックを作成し、全部で 79,000 クローンからなるライブラリーを作成した。

コスミドの平均インサート長は約 30 kb であったので、*B. oleracea* ゲノムの 4 倍をカバーすることが期待された。共同研究者(Shimizu et al. 2015)がマップベースクロニング法により絞り込んだ *FocBo1* の候補遺伝子を含むコスミドを単離したほか、*FocBo1* 座近傍のマーカを含むコスミドクローンを単離できた。本実験で単離したコスミドクローン中の候補遺伝子の塩基配列はプライマーウォーキングシーケンス法で決定され、*FocBo1* 候補遺伝子の構造決定に寄与した。

(3) 導管液タンパク質のプロテオーム解析

萎黄病菌が分泌し植物体の抵抗性機構を攪乱する物質であるエフェクターを同定することと、萎黄病菌感染時の植物の応答をタンパク質レベルで明らかにするため、非感染と感染植物(キャベツ)の導管液タンパク質のプロテオーム解析を実施した。抵抗性型 *FocBo1* を含む cv. YCR-Rinen と *FocBo1* の突然変異型を含む罹病性 cv. Delicious を用いた。導管液中のタンパク質は濃縮後トリプシン消化し、液体クロマトグラフィーとタンデム質量分析(LC-MS / MS) 分析を組み合わせて分析した。その後、導管タンパク質は、UNIPROT データベースから得た *Brassica* 属植物のタンパク質データと萎黄病菌(Cong:1-1)の全ゲノム配列情報から予測した菌タンパク質配列を含むデータベースに対するブラスト検索により同定した。1) 導管液中に同定された植物タンパク質のほとんどは分泌を示すシグナルペプチドを有する低分子のタンパク質であった。2) 非感染植物(Rinen と Delicious の両方)と Delicious の感染植物の導管液からは、200 以上の植物タンパク質が同定できたが、萎黄病菌に感染した YCR-Rinen からは、比較的少ない 158 個の植物タンパク質が同定された。3) 非感染と感染サンプル間の比較で、検出量に 2 倍以上の差のあるタンパク質に注目すると、感染によって発現が抑制されるタンパク質の数が誘導されるものの数より多いことが分かった。4) 導管タンパク質を機能で分類すると、炭水化物分解酵素(31%)、酸化還元酵素(27%)、タンパク質分解酵素(8%)、脂質代謝関連(8%)、情報伝達関連タンパク質(4%)、レクチンなど結合タンパク質(7%)、その他の機能(11%)、機能不明(4%)であった。5) 萎黄病菌に由来する分泌タンパク質が感受性品種の導管液中に検出され、その数は 25 個であったが、抵抗性品種の導管液中からは検出できなかった。検出された菌由来タンパク質うち 11 個は、病原菌のエフェクター分子の特徴とされるアミノ酸数 300 未満で、シグナルペプチドを有し、システイン(菌由来タンパク質 11 個のうち 10 個のみ)を含むという特徴を持っていた。これらの萎黄病菌由来タンパク質はエフェクタータンパク質の候補として挙げられた。

審査結果の要旨

本研究では、萎黄病菌(Cong:1-1)に対して罹病性および抵抗性を示すキャベツ系統の交雑後代を用い、抵抗性の分離分析による遺伝解析および QTL 分析を行い、これまで明らかになっていなかった萎黄病抵抗性遺伝子の染色体上の位置を明らかにしたほか、候補遺伝子の構造決定に必要な候補遺伝子を含むコスミドクローンを単離した。さらに、萎黄病菌感染時の植物の応答タンパク質を明らかにしたほか、萎黄病菌が導管に分泌するタンパク質を新規に同定した。これらの成果は、*Brassica* 属作物に萎黄病抵抗性を付与する DNA マーカー育種に有効であるほか、作物(*B. oleracea*)-萎黄病菌間の相互作用解明に大きく寄与した。本論文の結果の一部は、*Molecular Breeding* (2012) 30:809–818 で発表されている。よって、本論文は博士(農学)の博士論文として十分であると認定した。