



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモYウイルス抵抗性遺伝子Rychcの同定および機能発現メカニズムの解析とRychc遺伝子座が農業形質に与える影響 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	赤井, 浩太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15291号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89424
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akai_Kotaro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学）

氏名 赤井 浩太郎

学位論文題名

ジャガイモ Y ウイルス抵抗性遺伝子 Ry_{chc} の同定および機能発現メカニズムの解析と
 Ry_{chc} 遺伝子座が農業形質に与える影響

ジャガイモ Y ウイルス (potato virus Y, PVY) は、ジャガイモに黄化、モザイク、萎縮、塊茎えそなどの病徴を引き起こす植物ウイルスである。また、塊茎を通じて次世代へと伝播するため、種ばれいしょ生産においては PVY 感染株の検査や抜き取り作業が求められている。日本国内においては、PVY への育種的対応として、ジャガイモ野生種 *Solanum chacoense* 'w84' に由来し、PVY 感染に対して Extreme Resistance (ER) を誘導する抵抗性遺伝子 Ry_{chc} が利用されている。しかしこれまで、 Ry_{chc} の遺伝子本体は同定されておらず、その抵抗性メカニズムや農業形質に与える影響は十分に明らかにされていなかった。そこで本研究では、*de novo* assembly による Ry_{chc} 遺伝子の特定、高温下で生じる Ry_{chc} の機能低下メカニズムの解明、 Ry_{chc} 遺伝子座が与える農業形質への影響調査を行った。

Ry_{chc} の特定には、染色体上の座乗位置を明らかにし、 Ry_{chc} を含むゲノム配列を取得する必要があった。そこで、過去に行われた Ry_{chc} ファインマッピング解析の再評価と、第三世代シーケンサーを用いた全ゲノム *de novo* assembly を組み合わせることで、 Ry_{chc} の特定を試みた。本研究では Ry_{chc} 遺伝子座がホモ接合の二倍性半数体を作成し、ロングリードを用いた *de novo* genome assembly を行うことで、合計 9,622 本のコンティグ(1.09 Gb)を得、このうち Ry_{chc} 連鎖マーカー配列が座乗する 3.3 Mb のコンティグを検出した。また、成熟葉の RNA-seq 解析により、ファインマッピング解析で推定された Ry_{chc} 座乗領域には、Toll/Interleukin-1 receptor(TIR)-nucleotide binding site(NBS)-leucine-rich repeat(LRR)型抵抗性遺伝子をコードする *STRG1648* が単独で検出された。本研究と並行して、Li ら(2022)が異なる *S. chacoense* 系統に由来する Ry_{chc} 遺伝子の配列を公開したが、*STRG1648* はこの塩基配列と 98% の相同性を有していたことから、*STRG1648* が Ry_{chc} であると特定した。また、本研究では、 Ry_{chc} が約 200 kb にわたる反復配列の中に存在すること、 Ry_{chc} が 2 種のサブライシングバリエーションを持つこと、 Ry_{chc} の LRR 領域に新たに設計した PCR プライマーセット(1648F24/1648R22)が既存の各種病害抵抗性遺伝子の DNA マーカーを識別するマルチプレックス PCR に組み込んで使用できることを示した。

Ry_{chc} は22°Cの環境ではPVYに対しERを誘導するが、高温の28°Cにおいては過敏反応(Hypersensitive Reaction, HR)を生じ、PVYの増殖・拡散を抑制できなくなることが知られていた。そこで、高温環境で Ry_{chc} が抵抗性を喪失するメカニズムを明らかにするため、PVYもしくはMock接種した Ry_{chc} を有する品種を22°Cと28°Cで栽培し、高温環境が Ry_{chc} を含む遺伝子発現にどのような影響を与えるかをRNA-seqにより網羅的に調査した。22°Cでは、PVY接種24時間後に117遺伝子が有意に発現変動したが、28°Cでは16遺伝子のみが発現変動し、高温環境ではPVY感染による遺伝子発現変動が抑制されていた。一方で、接種の有無にかかわらず、28°Cでは22°Cに対して多数の遺伝子発現変動が認められた(Mock:832遺伝子、接種区:534遺伝子)。発現変動遺伝子のGO解析により、28°Cでは生物学的ストレス応答や病害抵抗性に関わる代謝経路が低下していることが明らかとなり、PVY感染に対する初期の病害抵抗性応答が低下していることが示唆された。また、高温環境では Ry_{chc} の発現量も低下しており、初期の抵抗性応答を低下させる要因になりうると考えられた。さらに、高温環境でPVYを接種した場合、Mock接種に比べ、アブシジン酸経路のマーカー遺伝子であるPR-2の発現が強く誘導されていた。PR-2は β -1,3-グルカナーゼであり、PR-2の活性化は原形質連絡に蓄積したカロースを分解し、ウイルスの細胞間移行を容易にすると考えられる。これらの結果から、 Ry_{chc} が高温で抵抗性を喪失するメカニズムは、 Ry_{chc} の発現量低下、病害抵抗性の機能低下に加え、カロース沈着の解除による封じ込め失敗が関わっていると考えられた。

Ry_{chc} のような野生種由来遺伝子を用いる際には、目的遺伝子に連鎖する領域などが劣悪形質を発現するおそれがある。本研究では、 Ry_{chc} の分離集団を用いて Ry_{chc} 遺伝子座のセントロメア側領域(RY364)とテロメア側領域(RY186)が各種農業形質に影響を与えるかを調査した。3カ年の栽培試験のうち、2020年および2021年においては、 Ry_{chc} 遺伝子座は株あたり上いも数、10aあたり上いも収量、上いも一個重、塊茎の比重、生育期間の農業形質に有意な影響を与えなかった。2019年においては、RY186領域が上いも収量と上いも数に有意な影響を与えたが、その平均値の差はわずかであった。これらの結果から、 Ry_{chc} 遺伝子座は主要な農業形質に影響を与えないか、その影響は僅かであると結論付けた。 Ry_{chc} 遺伝子座が塊茎の外観や内部品質については影響を与える可能性については、今後さらなる検証を行う必要がある。

本研究では、*S. chacoense*に由来するPVY抵抗性遺伝子 Ry_{chc} を同定し、高温下での Ry_{chc} 抵抗性メカニズムの一端を明らかにした。また、 Ry_{chc} 分離集団の栽培試験により、 Ry_{chc} 遺伝子座が主要な農業形質に顕著な影響を与えないことを明らかにした。PVY抵抗性ジャガイモ品種の重要度が高まる中で、本研究が明らかにした知見は、DNAマーカー選抜の精度向上や抵抗性遺伝資源の選定などにおいて有用であり、 Ry_{chc} を利用したPVY抵抗性品種育成に貢献できる。