



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the molecular mechanism involved in the second growth of potatoes using microtubers [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	張, 霞
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16035号
Issue Date	2024-06-28
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92757
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	ZHANG_XIA_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 張 霞

学 位 論 文 題 名

Studies on the molecular mechanism involved in the second growth of
potatoes using microtubers
(マイクロチューバーを用いたジャガイモの二次生長に関わる分子機構の研究)

ジャガイモは北海道を代表する農作物であり、世界的に重要な作物である。ジャガイモの栽培中に気温が上昇すると塊茎の休眠状態が一時的に解除され、「二次成長」と呼ばれる萌芽が起こることがある。芽が再び休眠し塊茎形成が再開すると「二次肥大」が起こりこぶ状の奇形塊茎が形成される。このような二次成長が生じると塊茎デンプン含有量が減少し、見た目が悪くなるため商品価値が低下する。最近では地球温暖化により、圃場での二次成長や二次肥大、さらに保管中の塊茎の萌芽が増加する傾向がある。本研究では、塊茎の二次成長の分子機構を解明するために、組織培養を用いた *in vitro* での小塊茎、マイクロチューバー（MT）を使い、二次肥大と二次成長を再現することを試みた。さらにその系を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行い、塊茎の萌芽におけるメカニズムを研究した。

塊茎の二次成長、二次肥大の組織培養系の確立

供試材料にはジャガイモ（*Solanum tuberosum* L.）の栽培種メークイン、ダンシャクイモ、亜種のアンディゲーナを用い、塊茎の二次成長、二次肥大を引き起こす組織培養系の確立を行った。塊茎の二次成長の系は無菌化した植物体の節を含む茎切片から MT を形成し、茎を付けた状態でジベレリン（GA）を含む培地で培養することにより MT の休眠打破を行い萌芽させることにより確立した。また茎のついた MT に GA を短期間処理後、塊茎形成の培地で培養することにより萌芽塊茎の二次肥大を誘導した。メークインでは二次肥大誘導後 14 日で 60%以上の二次塊茎が形成されたが、アンディゲーナでは、二次肥大誘導後 21 日においても二次塊茎形成はほとんど起きず、28 日後 75%以上の二次塊茎が形成された。この品種による二次塊茎形成開始時期が異なる現象に関しては、さらなる多品種による研究が必要であるが、圃場における塊茎形成時期の早生・晩成に関連していると考えられた。

組織培養を用いたジャガイモの塊茎の萌芽ならびに二次成長の解析

ジャガイモの MT を用い、植物ホルモンによる塊茎の萌芽、二次成長の誘導について調べた。二次成長の系として茎がついた MT（stMT）、塊茎の萌芽の系として茎を除いた MT（deMT）、および茎側の塊茎を除去し半分にした MT（hMT）を GA 単独、CK（サイトカイニン）単独、GA と CK を合わせた（GACK）培地でそれぞれ培養し二次成長・萌芽の誘導を行った。植物ホルモンを処理しない、あるいは CK 単独の場合、塊茎の萌芽ならびに二次成長は生じなかった。また GACK 処理した場合、塊茎の萌芽と二次成長が生じた。しかしながら GA 単独では塊茎の萌芽は起こらなかったが、二次成長は起こった。このことは GA が茎組織に作用し何らかの物質とともに塊茎の休眠を打破し二次成長を誘導したと考えられた。そしてこれには CK が関与していることが示唆された。

植物ホルモン処理に対するマイクロチューバー萌芽のトランスクリプトーム解析

GA、CK、GACK を含む培地で 3 日間処理した stMT および hMT の頂端組織および stMT の茎組織から RNA を抽出し RNA-Seq を行った。得られたデータを 2 倍体のジャガイモゲノム配列に HISAT2 を使用してマッピングし、R パッケージ (DESeq2、ClusterProfiler 4.0、ggplot2、WGCNA など) を使用して、発現変動遺伝子 (DEG) 解析を行った。

各試験区をコントロールと比較し合計 6515 の DEG が検出された。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) を用いたパスウェイ解析においてこれらの DEG を解析したところ、16 の経路が抽出されたが、その中で「植物ホルモン生合成およびシグナル伝達」が最も低い p 値を示した。またこれらの DEG の重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析 (WGCNA) の結果は、GA 単独処理した stMT (二次成長が生じる) の茎組織において「植物ホルモンシグナル伝達経路」の CK に関連する遺伝子が正に制御されていることを示した。

塊茎の萌芽が生じる試験区 (GA 処理の stMT、GACK 処理の stMT、および hMT) の頂端組織の DEG を比較したところ 1064 の DEG を共有した。それらを KEGG を用いたパスウェイ解析した結果、15 の DEG が「植物ホルモン生合成およびシグナル伝達」経路に関連し、CK 応答遺伝子の *RR9* (type-A response regular) も上方制御されていた。発現変動遺伝子のみに着目した遺伝子オントロジー (GO) のエンリッチメント解析により、「CK 活性化シグナル伝達経路」および「CK 生合成プロセス」に関連する 4 つの DEG が下方制御されていた。しかし、CK 生合成遺伝子の *CYP735A* や CK 恒常性とシグナル伝達に関連する *CISZOG*、*UGT85A1* など、「ゼアチン生合成」の経路に関連する遺伝子は上方制御されていた。

MT の萌芽には CK シグナル伝達とホメオスタシスが重要であり、茎がついていることで MT が GA 単独で萌芽することは GA が茎での CK 関連遺伝子の制御にかかわっていることが示唆された。

マイクロチューバーの二次成長過程のトランスクリプトーム解析

stMT に GA 単独処理を行い処理過程中の網羅的発現解析を行った。GA で 36 時間および 72 時間処理した stMT の頂端組織を 0 時間と比較し、それぞれの頂芽、茎の組織から RNA を抽出し RNA-seq を行った。両時間の頂端組織の DEG をそれぞれ KEGG を用いたパスウェイ解析を行ったところ、8 経路が上方制御され、5 経路が下方制御されていた ($p < 0.05$)。「植物ホルモン生合成およびシグナル伝達」の経路において、36 時間および 72 時間にそれぞれ 72 および 30 の DEG が検出された。茎組織では 36 時間および 72 時間に 55 および 17 の DEG が検出された。72 時間では「ゼアチン生合成」経路に関する DEG は検出されなかったが、36 時間では 12 の DEG が検出された。それらのうち、CK 合成の鍵酵素遺伝子の *IPT5* は下方制御され、*UGT85A1* と *CISZOG* は上方制御されていた。

GA を処理した節を含む茎組織においても CK シグナル伝達とホメオスタシスが時間的に変化していることが判明した。

ジャガイモ塊茎の萌芽には GA と CK が必要であるが、節を介し茎とつながっている塊茎においては GA 単独で萌芽が誘導できることが判明した。さらに茎組織において GA による CK に関連する遺伝子の制御も示された。

本研究は、温暖化など気候変動で問題になってきているジャガイモの二次成長や貯蔵中の萌芽の生理的機構を解明するうえで一つの重要な手段となりうる二次成長のモデル系の確立を行い、その系を用いて遺伝子の網羅的発現解析を行った。これらの結果は更なる詳細なジャガイモ二次成長、塊茎萌芽の機構解明の手段として有用なものである。