HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Turnip mosaic virusに感染したArabidopsis 生態型Lerの全身えそ症状を決定するTuNI遺伝子の同定及び発現解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	刘, 锦妍
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第11824号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/58657
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Liu_Jinyan_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　劉　錦　妍

学 位 論 文 題 名

Turnip mosaic virus に感染した *Arabidopsis* 生態型 L*er* の全身えそ症状を決定する *TuNI* 遺伝子の同定及び発現解析

１．アラビドプシスのカブモザイクウイルスに対するえそ誘導遺伝子 *TuNI* の同定

カブモザイクウイルス（*Turnip mosaic virus*, TuMV）は、多くのアブラナ科作物に感染して TuMV 系統と宿主植物の組み合わせによって様々な病徴を示し、全身えそが最も重篤な病徴の 1 つである。アブラナ科作物のモデル植物アラビドプシスの生態型 L*er* は TuMV-TuR1 系統に感染した後すじえそを生じる。宿主植物の遺伝子 *TuNI*（TuMV Necrosis Inducer）がこのすじえその誘導に関与している。この *TuNI* は L*er* の染色体 1 上の *R* gene クラスターを含む約 105kb の領域内に座乗している。TuNI と TuR1 系統の P3 との相互作用によって誘導されるすじえそは過敏感反応（HR）様の細胞死であることが明らかとなった。*TuNI* マッピング領域には 3 個の *R*-like gene（RG3，RGX 及び RG2）が座乗している。*TuNI* が誘導するすじえそは HR であるため、*TuNI* は 3 個の *R*-like gene のいずれかである可能性が高い。本研究では 3 個の *R*-like gene（RG3，RGX 及び RG2）の中から *TuNI* を特定し、*TuNI* の発現パターンと機能を解析した。

TuNI の 3 個の候補遺伝子 RG3、RGX 及び RG2 の構造は CC-NBS-LRR 型であり、互いに配列の相同性は高い。RG3、RGX 及び RG2 の cDNA クローンを Col-0 に導入した形質転換体に TuMV-TuR1 系統を感染させて病徴を観察した。RGX を導入した形質転換体のみで弱いえそ斑点及び葉の黄化が観察された。Col-0 のプロトプラストに RG3、RGX 及び RG2 の cDNA コンストラクトと TuMV-TuR1 系統の cDNA 全長クローンを同時に一過的に発現させた結果、RGX と TuMV-TuR1 を共発現させたプロトプラストの細胞死亡率が大幅に増加した。TuMV-TuR1 の P3 と RGX をプロトプラストで共発現させた場合でも細胞死亡率は TuMV-TuR1 を RGX と共発現させたプロトプラストとほぼ同様であった。アグロインフィルトレーション法による一過的発現系でも、P3 と RGX を共発現させると L*er* の壊死のパッチが確認された。以上の結果から RGX 遺伝子は L*er* のえそを決定する遺伝子 *TuNI* である可能性が高くなった。

２．えそ誘導遺伝子 *TuNI* の発現及び機能解析

5’RACE により *TuNI* mRNA の転写開始点を決定したところ、長さの異なる 2 種類の転写産物が検出された。*TuNI* 及び RG2, RG3 の 5’側の配列の相同性が高いため、*TuNI* 及び RG2, RG3 の転写産物の cDNA をクローニングし、開始コドンより下流 90bp のところにある 1 塩基の多型を用いて（*TuNI* は T ; RG2、RG3 はともに A)、*TuNI* と RG2、RG3 を区別した。cDNA をクローニングしシークエンスした結果、開始コドンから 371bp 上流に転写開始点があることがわかった。これら R 遺伝子の 5' UTR 領域の上流に座乗している 250bp のイントロンが選択的スプライシングによって mRNA に残る場合があること、そして RGX では、このスプライシング効率が RG2 及び RG3 よりも低いことが示された。

RGX の発現パターンを調べるために、TuMV-TuR1 に感染した L*er* の RGX の遺伝子発現解析を行った。ウイルス感染により RGX の発現量は Mock と比較して約 1.5 倍程度有意に増加していた。RGX が誘導するえそ病徴は弱光下で抑制されるため、遮光処理した L*er* における *TuNI* の発現量を調べた。その結果、遮光処理によって RGX の発現量が無処理 L*er* の約 0.7 倍まで有意に減少した。以上の結果から RGX の発現はウイルス感染や光によって制御されていることが明らかとなった。

RGX の特徴的な発現制御についてさらに解析するために、RGX のプロモーター及び 5’ UTR 領域 1362bp をプロモーター領域として、モチーフ検索を行った。光依存的な発現制御に関するモチーフが推定プロモーター領域上に 12 箇所、5’ UTR 上に 4 箇所見いだされた。木部で発現する遺伝子に固有のシスエレメントも転写開始点のすぐ上流に検出された。検出されたモチーフを分断しないように、この 1362bp プロモーター領域を 3 つの異なる長さ（472bp、901bp 及び 1362bp）に分け、それぞれ GFP 遺伝子と連結して Col-0 を形質転換した。全長 1362bp 及び 901bp のプロモーター領域をもつ形質転換植物では、TuMV-TuR1 を接種すると上位葉及び葉脈で GFP の蛍光が観察された。472bp のプロモーター領域をもつ形質転換植物では GFP 蛍光は観察されなかった。全長及び 901bp のプロモーター領域をもつ植物の GFP の発現量は同程度あり、472bp のプロモーター領域をもつ植物の約 4 倍であった。TuMV-TuR1 に感染すると、全長プロモーター領域をもつ植物では GFP は最大 1.5 倍程度に発現量が増加した。901bp のプロモーター領域をもつ植物における GFP 発現量の増加は 20%程度であったが、472bp のプロモーター領域をもつ植物では発現量がほとんど変化しなかった。遮光処理によって、全長及び 901bp のプロモーター領域をもつ植物では GFP 発現量が 20%程度の低下であったが、472bp のプロモーター領域をもつ植物では 85%程度に著しく低下した。これらの結果から、ウイルス感染に応答する配列は開始コドンを 0 起点とした場合、-472bp から-1362bp の領域内に存在し、光応答には 0 から-472bp の領域が重要であり、-472bp から-1362bp の領域内には光によって *TuNI* の発現を負に制御する因子も存在することが示唆された。