



| | |
|------------------------|---|
| Title | Study of small RNA-mediated control of gene expression and viruses in plants : Roll of a viral suppressor of RNA silencing in viral survival [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review] |
| Author(s) | Hangil, Kim |
| Citation | 北海道大学. 博士(農学) 甲第13925号 |
| Issue Date | 2020-03-25 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/77916 |
| Rights(URL) | https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ |
| 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 | Hangil_kim_review.pdf (審査の要旨) |



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

生物資源科学専攻 博士（農学）

Hangil Kim

審査担当者 主査 教授 増田 税

副査 客員教授 松村 健

副査 講師 志村 華子

学論文題名

英語題目 : Study of small RNA-mediated control of gene expression and viruses in plants: Roll of a viral suppressor of RNA silencing in viral survival

日本語題目 : Small RNA によって調節される植物体内の遺伝子発現と植物ウイルスに関する研究: ウイルス生存のために機能する RNA サイレンシングサプレッサーの役割)

本論文は英文 106 ページ, 22 図, 3 表, 2 章からなり, 参考論文 3 編が付されている。

RNA サイレンシング (RS) は 2 本鎖 RNA (dsRNA) によって誘導される現象で, 植物の生長や分化さらにはストレス応答などに重要な機能を果たしている。植物では特にウイルスに対する抵抗性機構だと考えられている。この RS 経路ではまず Dicer-like (DCL) が dsRNA やヘアピン構造をもつ 1 本鎖 RNA (ssRNA) を分解し, 21~24 ヌクレオチド(nt) からなる short interfering RNA (siRNA) を生産する。これを宿主の AGO タンパク質がとりこみ, その後 siRNA をチャージした AGO は RISC 複合体に組み込まれて, siRNA と同じ配列をもつ RNA を切断する。ウイルスは RS のターゲットになるため, 高率よく siRNA を生産することから, ウイルスベクターにターゲット配列をいれた組換えウイルスを植物に感染させることによって, ターゲット特異的に RS を誘導できる。この技術は virus-induced gene silencing (VIGS) と呼ばれ, これを利用して植物遺伝子の機能解析が行われている。ウイルスは RS によって分解されることに抵抗するため, RNA silencing suppressor (RSS) を生産し, 宿主の RS を阻害する。本研究では, この RS に関わる研究を以下の 3 つのテーマにそって実施している。(1) siRNA を利用して, 植物に抗ウイルス性を付与する最近の技術の実用性について検討した。(2) ホウレンソウの遺伝子の機能解明を目的に, cucumber mosaic virus (CMV) を VIGS ベクターとして改変し,

その有用性についてデモすることに成功した。(3) ニンニクに感染する onion yellow dwarf virus (OYDV)の RSS である HC-Pro を解析し、現在北海道で分離される OYDV の生き残り戦略を考察した。

1. ホウレンソウの遺伝子機能解析のための VIGS ベクターの作出

これまで、ホウレンソウの遺伝子の機能解析には beet curly top virus (BCTV)や tobacco rattle virus (TRV)が使用されているが、両方ともホウレンソウにおいて全身感染が長期間維持されないという問題があったため、CMV を VIGS ベクターとして開発できるか検討した。CMV の2つの系統間でシュードリコンビナントを作出し、ホウレンソウに厳しい病徴を誘導しないように工夫し、phytoene desaturase (PDS)と dihydroflavonol 4-reductase (DFR)遺伝子をターゲットに VIGS を誘導した。その結果、期待された表現型の変化 (PDS ではフォトブリーチング、DFR ではアントシアニンの蓄積抑制) が観察され、CMV が優れた VIGS ベクターであることが証明できた。

2. N 末端を欠失した OYDV HC-Pro の RSS 活性

北海道産ニンニクから分離した OYDV 株のもつ HC-Pro タンパク質は供試したすべてのサンプルで、N 末端が100アミノ酸残基ほど欠失していることがわかった。この N 末端の欠失が HC-Pro の RSS 活性に及ぼす影響について *Nicotiana benthamiana* を用いたアグロインフィльтраーション法によってアッセイしたところ、完全長の HC-Pro と N 末端欠失 HC-Pro とともに RSS 活性がないことが判明した。次に、*N. benthamiana* は OYDV の自然宿主ではないことから、タマネギを用いて同様の実験を行ったところ、完全長の HC-Pro のみ強い RSS 活性が確認でき、HC-Pro の N 末端は RSS 活性に重要であることがわかった。またこの欠失領域は OYDV のアブラムシ伝搬にも関与していることから、現在、短い HC-Pro をもつ OYDV に単独感染したニンニクを作出中である。この OYDV 感染ニンニクの作出に際して、混合感染する他のウイルスに対して茎頂培養時に siRNA を処理し、RS によってそのウイルスを除去する技術を開発することにも成功した。

これらの研究成果は、植物ウイルスと宿主植物の RS を介した分子レベルでの攻防戦の理解に大きく寄与するものである。よって、審査員一同は、Hangil Kim 君が博士(農学)を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。