



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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11824号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58657
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Liu_Jinyan_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（農学） 氏名 劉 錦 妍

審査担当者	主 査	教 授	増田 税
	副 査	教 授	近藤 則夫
	副 査	講 師	犬飼 剛

学 位 論 文 題 名

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

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宿主植物に様々な病徴を誘導する。アブラナ科作物のモデル植物アラビドプシスの生態型 *Ler* は TuMV-TuR1 系統に感染すると、全身すじえそ症状を生じる。宿主植物の遺伝子 *TuNI* がこのすじえその誘導に関与している。この *TuNI* は *Ler* の染色体 1 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ている。*TuNI* の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* は 3 個の *R-like gene* のいずれかである可能性が高いと考え、本研究では 3 個の *R-like gene* 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 個の候補遺伝子の作るタンパク質の構造は CC-NBS-LRR 型であり、互いに配列の相同性は高い。3 遺伝子の cDNA クローンを Col-0 に導入した形質転換体に 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 3 遺伝子の 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。また、アグロインフィльтраクション法による *Ler* への一過的発現系でも、P3 と RGX を共発現させるとインフィльтраクション部位で壊死斑が確認された。以上の結果から RGX 遺伝子は *Ler* のえそを決定する遺伝子 *TuNI* である可能性が高い。

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。3 遺伝子の cDNA をクローニングしシーケンスした結果、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 や 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 *Ler* の RGX 遺伝子の発現解析を行った。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 *Ler* 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 *Ler* の約 0.7 倍まで減少した。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解析するために、RGX のプロモーター領域の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。検出されたモチーフを分断しないように、1362bp 長の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、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。TuMV-TuR1 に感染すると、全長プロモーター領域と 901bp のプロモーター領域をもつ植物では GFP の発現量は増加した。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 発現量が僅かに低下したのに対して、472bp のプロモーター領域をもつ植物では著しい低下が認められた。これらの結果から、ウイルス感染に応答する配列は-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。

本研究の成果は、ウイルス病に対する植物の抵抗性に関する研究に寄与するところが大きく、学術面で高く評価できる。

よって審査員一同は劉錦妍氏が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。