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［全文の要約］
Author(s)	刘, 锦妍
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/58936
Type	doctoral thesis
File Information	Liu_Jinyan_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文の要約

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様々な病徴を示す。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* 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(過敏感反応)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。

TuNI の 3 個の候補遺伝子産物の構造は 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 を感染させたところ、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。また、Col-0 のプロトプラストに各 *TuNI* 候補を TuMV と同時に一過的に発現させた結果、RGX と TuMV 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。さらにプロトプラストで共発現させた場合でも、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、TuMV の P3 と RGX を共発現させると L*er* の壊死（細胞死）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。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判明した。すなわちこれら 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を明らかにした。

次に、RGX の発現パターンを調べるために、TuMV 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。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 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。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%程度に低下し、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判明した。