



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Roles of RNA silencing-related genes in tomato tolerance to viral infection [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	権, 峻
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14655号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83169
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	kwon_joon_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	Joon Kwon
審査担当者	主査	教授	増田 税
	副査	教授	松浦英幸
	副査	講師	中原健二

学位論文題名

Roles of RNA silencing-related genes in tomato tolerance to viral infection

（トマトのウイルス感染耐性における RNA サイレンシング関連遺伝子の役割）

本論文は英文 90 頁，図 14，表 2, 3 章からなり，参考論文 1 編が付されている。

植物の RNA サイレンシングは，ウイルスに対する主要な防御機構であり，その分子メカニズムは，主にモデル植物であるシロイヌナズナや *Nicotiana benthamiana* で調べられてきた。しかしながら，作物のウイルス病防除やウイルス抵抗性育種を行う上で，作物でのウイルス防御における RNA サイレンシングの役割を明らかにすることは重要である。そこで本研究は，トマトの RNA サイレンシングのウイルス防御における役割を以下の 3 つの RNA サイレンシングに必須の遺伝子，Dicer 様タンパク質（DCL），Argonaute タンパク質（AGO），RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RDR）のゲノム編集またはノックダウン形質転換トマトのウイルスに対する反応を基に解析した結果をまとめたものである。

1. トマトの PVX および PVY 感染耐性に DCL2, 4 および AGO2, 3 が寄与する

DCL2 および DCL4（hpDCL2.4），RDR6，および AGO2, 3（hpAGO2.3）をノックダウンしたトランスジェニックトマトに，ジャガイモ X ウイルス（PVX）UK3 株とジャガイモ Y ウイルス（PVY）O 株および N 株を接種し，その反応とウイルス外被タンパク質（CP）およびゲノム RNA の蓄積を調べた。逆転写ポリメラーゼ法により，PVY を接種したすべての植物の全身感染が確認されたが，病徴は接種した hpDCL2.4 植物でのみ上葉で観察された。また，ウェスタンブロッティングにより症状が出た上葉でのみ，PVY CP の蓄積が確認された。これらの結果から DCL2, 4 はウイルスゲノム RNA に対する RNA サイレンシングを介したウイルスの増殖抑制に関わることで，PVY 感染に対するトマト耐性に貢献していると考察されている。また，PVX を接種した hpDCL2.4 株では，より深刻な症状が見られたことから，DCL2, 4 が PVX 感染に対する耐性にも関与していることが示された。一方，PVX を接種した hpAGO2.3 株では全身でえそ病徴が観察されたことから，AGO2, 3 は細胞死を伴う症状の発現を制御することで PVX 感染への耐性に関与していると考察されている。

2. AGO2,3 によるトマトの PVX 感染による全身壊死の制御の分子機構

AGO2,3 による PVX 感染による全身えそ制御メカニズムについてさらに解析を進めた. PVX を接種した hpAGO2.3 株におけるウイルスゲノム RNA の蓄積量を経時的に調べたところ, 野生型トマトと比較して常にウイルス RNA レベルが高いことが示された. さらに, マイクロ RNA398 (miR398)によって制御されている活性酸素種 (ROS) を無毒化する活性酸素ディスムターゼの銅関連シャペロン (CCS1) の mRNA レベルが, PVX を接種した hpAGO2.3 植物がえそ病徴を呈した際に減少していることを見出している. これと相関して DAB 染色により, hpAGO2.3 のえそを示した葉では活性酸素が増加していた. 人為的に組換え PVX から CCS1 を異所的に発現させることで, えそ症状が抑制された. 以上の結果から, AGO2,3 は, miR398 とそのターゲットである CCS1 を介して過剰な活性酸素の産生を制御するとともに, RNA サイレンシング機構を介してウイルスの増殖を抑制することで, トマトの PVX 感染によるえそ病徴発現を制御していると結論されている.

3. ゲノム編集による DCL3 のインフレーム欠失変異による CMV 抵抗性

CRISPR/Cas9 を用いてトマトの DCL3 遺伝子に変異を導入し, DCL3 タンパク質をコードする領域にそれぞれ 2 塩基と 6 塩基の欠失 (2DEL と 6DEL) を持つ新たな DCL3 対立遺伝子を得た. これらの対立遺伝子のホモ接合体を持つトマトにいくつかのウイルスを接種したところ, 2DEL は接種したすべてのウイルスの反応は変わらなかった. しかし 6DEL は意外にもキュウリモザイクウイルス (CMV) に対して部分的な抵抗性を示した. DCL3 タンパク質の翻訳時に-1 フレームシフトを伴う 2DEL はノックアウト変異であると考えられる. 一方, 6DEL は, 2つのアミノ酸残基を欠失した変異 DCL3 タンパク質を発現することから, この変異が, CMV 感染阻害に働くよう DCL3 の機能を変化させた可能性があると考えられている.

以上, 本研究でトマトの RNA サイレンシング機構がウイルスのゲノム RNA に対するサイレンシングによる防御や, 宿主植物の活性酸素関連遺伝子の発現制御により, えそ病徴を含むウイルスの毒性制御に貢献していることを示し, さらにゲノム編集による DCL3 遺伝子の変異で, 特定のウイルスに対する抵抗性を付与できることが示された. 以上の成果は, 作物の RNA サイレンシングを介したウイルス防御機構やそれを利用した抵抗性育種の研究に大きく寄与するものである.

よって審査員一同は, Joon Kwon 君が博士 (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.