

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Md. Emran Ali
審査委員	主査 西口 正道 副査 小林 括平 副査 山岡 直人 副査 曳地 康史 副査 秋光 和也

論文名

Studies on RNA silencing-mediated resistance to tobamovirus in melon and tobacco plants
(メロン及びタバコにおける RNA サイレncing が関与するタバモウイルス抵抗性に関する研究)

審査結果の要旨

二本鎖 RNA が引き金となり、塩基配列特異的に遺伝子の発現が抑制される RNA サイレncing は、植物のみならず動物や菌類など真核生物に広く保存されている。この現象は、トランスポゾン、ウイルス、導入遺伝子等の侵入してくる核酸に対する防御機構として考えられている。これらによる遺伝子発現の抑制が、発育、分化、形態形成、ストレス耐性等の生物もつ重要な機能に影響を及ぼすとされる。本研究では、ウイルス防御としての RNA サイレncing の役割について、ウイルスに由来する遺伝子をメロンに導入し、得られた導入遺伝子のサイレncing 系統についてのウイルス抵抗性、ならびに RNA サイレncing の接ぎ木移行を利用して非形質転換体の穂木にサイレncing を誘導させ、そのウイルス抵抗性について解析を行った。

1. ウイルス由来導入遺伝子の RNA サイレncing とウイルス抵抗性

タバコモザイクウイルスと同じグループに属するスイカ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) ゲノムにコードされる移行タンパク質遺伝子 (MP) を順方向に 2 分子配置した配列 (DR) を植物発現ベクターに組み込み、アグロバクテリアによりメロンを形質転換した。T1~T3 世代について、PCR およびサザンブロット解析により、導入遺伝子の存在していることを確認した。また、ノーザンブロット解析により、導入遺伝子に由来する、RNA サイレncing の目印となる siRNA を検出することができた。得られた形質転換体について、さらにウイルス抵抗性を検討した。その結果、非形質転換体あるいは MP 遺伝子の過剰発現株にくらべ、ウイルス蓄積量は極端に低く、高度の抵抗性を示した。さらに、メチル化感受性酵素を用い、導入遺伝子 DNA のメチル化レベルについて検討した結果、対照の過剰発現株にくらべ、メチル化レベルの高くなっていることが判明した。以上の結果は、導入遺伝子のメチル化レベルが高くなり、RNA サイレncing が誘導され、ウイルス抵抗性が付与されたことを示す。

2. RNA サイレncing の接ぎ木移行を利用したウイルス抵抗性

タバコモザイクウイルスに代表されるタバモウイルスの増殖に必要な植物側の遺伝子としてタバコでは *NtTOM1* および *NtTOM3* 遺伝子が単離され、各遺伝子をそれぞれサイレncing した株を互いに交配し

て得られた両遺伝子のサイレンシング株 (Sd1) は高度のタバモウイルス抵抗性が示されている。RNA サイレンシングの特徴の一つは接ぎ木により、相手側の株にサイレンシングを誘導できることである。しかし、これまで、非形質転換体の普通の植物にサイレンシングを接ぎ木により明白に誘導させた例はほとんどない。ここでは、内在遺伝子のサイレンシング株 Sd1 を台木に、同種ならびに異種の非形質転換タバコを穂木として供試し、穂木に RNA サイレンシングが誘導され、ウイルス抵抗性を示すかについて検討した。その結果、いずれの穂木においても、それぞれの遺伝子に由来する siRNA が検出された。このことは両遺伝子の RNA サイレンシングが穂木に誘導されたことを示す。また、穂木の切離葉について数種タバモウイルスを接種した結果、いずれもウイルス RNA の蓄積量は極端に低下し、高度のウイルス抵抗性を示した。以上の結果は、内在遺伝子のサイレンシングについて接ぎ木により非形質転換体にサイレンシングが誘導され、ウイルス抵抗性が付与されたことを示す。

以上、RNA サイレンシングを介したウイルス抵抗性についてウイルス由来遺伝子ならびに接ぎ木による研究を示した。ここで得られた成果は、それぞれ他の作物についても応用が可能な技術であり、特にメロンはウリ科作物であり、これらの栽培される熱帯・亜熱帯・温帯地域で重要なウイルス病の制御に役立つと考えられる。また、接ぎ木による有用形質の付与は、ウイルス抵抗性に限定されるものではなく、他の有用形質にも発展する可能性があり、今後、農業分野のみならず食品産業等へ影響を与えるものと考えられ、評価される。

本論文の公開審査会は平成 25 年 8 月 3 日に高知大学農学部において開催された。申請者が論文内容について発表した後、質疑応答が行われた。同日引き続いて論文審査委員会をあらためて開催し、審査を行った。これらの結果から本論文は博士（農学）の学位を授与するに値すると審査委員会全員一致して判定した。