

学位論文審査の結果の要旨

氏名	Sumyya Waliullah
審査委員	主査 小林 括平 副査 西口 正通 副査 曳地 康史 副査 秋光 和也 副査 八 野

論文名

Analysis of the pathogenic function of *Cauliflower mosaic virus* multifunctional protein Tav (Transactivator/viroplasmin) in transgenic tobacco. (形質転換タバコを用いたカリフラワーモザイクウイルス Tav タンパク質の病原性機能の解析)

審査結果の要旨

植物病害で多く見られる葉の退緑・黄化は光合成を行う葉緑体の障害によって生じたため、植物の生産性低下に直結しており、これを軽減することは作物保護の一戦略となり得る。それゆえ、それら病徴発現の分子機構を明らかにすることは、新たな耐病性作物の開発の基盤として重要である。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) がコードする多機能性タンパク質、Transactivator/viroplasmin (Tav) については、これを発現する形質転換タバコが病徴様の表現型を示すことが明らかにされていた。本研究は、人為的に発現制御可能な Tav 遺伝子を用い、形質転換タバコにおける病原性機能を解析することによって、植物ウイルス病における退緑・黄化病徴の発現機構の詳細を解明する端緒を得ることを目的として行われたものである。

1. 人為的に発現誘導可能な Tav 遺伝子を持つ形質転換タバコの作出

CaMV Tav を発現する形質転換タバコが病徴様の表現型を示すことが報告され、この植物を用いることによって退緑・黄化病徴の発現機構の詳細な研究が可能になると期待された。しかし、Tav の発現を構成的なプロモーターの制御下で行った場合、病徴様の表現型は植物の生育につれて発現され、病徴発現に至る分子生物学的な変化を継時的に解析することは困難である。また、病徴様の表現型は子葉においても認められ、その発現に至るシグナル伝達を解析することも困難である。そこで、人為的に発現誘導の可能なプロモーターの制御下で Tav を発現させることを着想し、デキサメサゾン (Dex) 誘導性の GVG プロモーターの支配下に Tav のコード領域を挿入した形質転換タバコ (iTav タバコ) を作出した。iTav タバコでは、Dex 処理7日後に肉眼で確認可能な退緑・黄化が観察され、クロロフィル量を継時的に計測したところ、Dex 処理2日後以降に統計的に有意なクロロフィル量の減少を検出することができた。また、光合成関連遺伝子の発現が種々のウイルス感染植物において低下することが知られていることから、iTav タバコにおいて Dex 処理後の光合成関連遺伝子の発現を継時的に検討した。その結果、異なる iTav タバコ系統において、Dex 処理2～5日後に明確な発現レベルの低下を観察した。これらの結果は、iTav タバコにおける退緑・黄化病徴様の表現型が種々のウイルス感染植物と共通した分子生物学

的变化に基いて起こっていることを示唆する。

Tav を構成的に発現する形質転換タバコにおいて病原性関連タンパク質 PR1a の発現が誘導されることが報告されている。一方、Tav を一過性に発現させた場合には、病原体関連分子パターン、およびサリチル酸 (SA) によって誘導される PR1a 遺伝子の発現を抑制することが報告されている。これらのことから、形質転換タバコにおける Tav による PR1a 遺伝子の発現誘導は、病徴様表現型の発現による、二次的な反応である可能性が考えられた。しかし、iTav タバコにおいて PR1a 遺伝子の発現は Dex 処理の 1 日後に認められた。この結果は、Tav に対する反応がその発現様式および宿主によって異なることを示唆する。

2. iTav タバコにおける退緑・黄化病徴様表現型と Tav の病原性機能の関連性についての解析

上述のように iTav タバコにおいて PR1a 遺伝子の発現が Dex 処理後、速やかに誘導されたことから、病徴様表現型の発現が宿主の防御応答関連遺伝子の活性化を伴うことが示唆された。そこで、他の病原性関連タンパク質遺伝子の発現を解析したところ、iTav タバコにおいて Dex 処理後、SA 誘導性およびエチレン誘導性防御関連遺伝子が誘導されることが分かった。これらの応答と Tav の病原性因子機能との関連を明らかにする目的で、Tav の欠失変異体を用いて iTav タバコと同様な形質転換タバコを作出し、退緑・黄化病徴様表現型の発現と PR1a 遺伝子の発現を検討した。その結果、病徴様表現型の発現、および PR1a 遺伝子の活性化が、Tav の病原性因子機能 (RNA サイレncing を抑制する機能、およびトマト矮化病ウイルス P19 タンパク質によって誘導される細胞死を抑制する機能) と同じドメインによって担われていることが明らかとなった。一方、SA 分解酵素遺伝子の一過性発現によって、病徴様表現型の発現、および PR1a 遺伝子の活性化が、SA 非依存的に起こることが示唆された。SA 非依存的な PR1a 遺伝子の活性化はエフェクター誘導性免疫 (ETI) においても起こることが報告されていることから、iTav タバコにおける退緑・黄化病徴様の表現型発現は、Tav の病原性因子機能に対する宿主応答の結果であり、その応答は SA 非依存的な ETI に類似のメカニズムによるものであることが示唆された。

以上のように得られた成果は、ウイルス病徴の発現機構の理解に向けて非常に有用な実験系を提供するとともに、病徴発現機構の解明に端緒を与える新規性の高いものである。今後、本研究で確立された実験系を用いたさらなる研究を通してウイルス病徴発現機構の解明に大きく寄与するとともに、糸状菌病、細菌病、線虫病および虫害に対する耐性植物を開発しようとする分子育種の分野にも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 27 年 2 月 7 日に愛媛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。