

(第5号様式)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	WAGH SOPAN GANPATRAO
審査委員	主査 小林 括平 副査 山岡 直人 副査 木場 章範 副査 秋光 和也 副査 西口 正通

論文名

Studies on rice genes involved in RNA silencing: defence against pathogens including viruses

(RNAサイレンシングに関与するイネ遺伝子の研究：ウイルスを含む病原体に対する防御)

審査結果の要旨

RNAサイレンシングは、真核生物における遺伝子発現制御機構の一つで、発育、形態形成やウイルス・トランスポゾンなど侵入核酸に対する防御反応等に関わっており、*RNA依存RNAポリメラーゼ (RDR)* や *suppressor of gene silencing3 (SGS3)* などの遺伝子の関与することが知られている。ウイルスは宿主のサイレンシングに打ち勝つため、サイレンシング抑制タンパク質をコードしているが、最近では菌類においてもサイレンシング抑制タンパク質をコードする報告がなされた。このことはRNAサイレンシングがウイルスのみならず、菌類に対する防御機構としての役割をも暗示する。本研究では、RNAサイレンシングに関与するイネの *RDR (OsRDR1 及び OsRDR6)* 及び *SGS3 (OsSGS3b)* 遺伝子が、ウイルス、細菌及び菌類に対する防御反応への関与について検討するとともに、イネに感染するイネえそモザイクウイルス (RNMV) のゲノム構造の解析を行った。

1. *OsRDR1* 及び *OsSGS3b* の防御応答解析

OsRDR1 及び *OsSGS3b* の変異株あるいはそれらの重複変異株、また、それぞれの過剰発現株を使用することにより、ウイルス、細菌及び菌類の病原体に対する防御反応を解析した。まず、野生株を用い、上記2遺伝子の発現誘導について検討したところ、RNMV、キュウリモザイクウイルス (CMV)、イネ白葉枯病細菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 及びイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) のいずれの接種葉においても、*OsRDR1* 及び *OsSGS3b* の両者とも発現が誘導された。次に、上記イネにこれらの病原体を接種し、ウイルス増殖や病徴を検討した。その結果、*OsRDR1* 及び *OsSGS3b* の変異株では、野生株に比べCMV/RNMVのRNA蓄積量が多く、重複変異株で最も多くなった。*X. oryzae* pv. *oryzae* 及び *M. oryzae* の感染による病徴も同様に変異株で強く、重複変異株で最も強くなった。一方、過剰発現株においては、野生株と比べ、ウイルスRNAの蓄積量は低下し、病斑も小さく、抵抗性を示した。上記遺伝子の各変異株からのRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行った結果、防御応答に関わる遺伝子やシグナル応答に関わる遺伝子に発現量が低下していること判明した。以上の結果は、これらの遺伝子が、ウイルスのみならず、細菌や菌類に対する防御に積極的に関与していることを示す。

2. *OsRDR6* の防御応答解析

OsRDR6 の変異株は通常致死であるが、*sh12-rol* 変異は *OsRDR6* の弱い変異株であり、感染実験に供試できる。野生株を用い、本遺伝子の発現誘導について検討したところ、RNMV、CMV、*X. oryzae* pv. *oryzae* 及び *M. oryzae* のいずれの接種葉においても、*OsRDR6* の発現が誘導された。さらに上記変異株を用い、上記 4 種類の病原体に対する防御応答を解析した。その結果、野生株に比べ、本変異株においてウイルス RNA の蓄積量は高く、ヘテロ株においては中間の蓄積量を示した。また、*X. oryzae* pv. *oryzae* 及び *M. oryzae* の感染による病斑は野生株に比べ、変異株ではより強い病徴を、ヘテロ株では中間の病徴を示した。以上の結果から、*OsRDR6* は、ウイルスのみならず、細菌や菌類に対する防御にも積極的な役割を果たしていることを明らかにした。

3. イネエソモザイクのゲノム構造解析

RNMV は菌類により媒介されるウイルスで *Bymovirus* に分類され、2 つの RNA から成り立っている。本ウイルス感染イネ葉より、ウイルス粒子を調製後、ウイルス RNA を抽出し、cDNA クローニングを行った。各 cDNA クローンの塩基配列を決定し、RNA 1 及び RNA 2 の全塩基配列を明らかにした。その結果、RNA1 は 7,178 塩基長であり、258 kDa のポリタンパク質をコードし、これらは P3, 7K₁, CI, 7K₂, NIa-VPg, NIa-Pro, NI b 及び CP のタンパク質に分断されると考えられた。また、RNA 2 は 3,579 塩基長であり、110 kDa のポリタンパク質をコードし、分断され P1 及び P タンパク質が生ずると推定された。塩基及びアミノ酸配列情報から RNA 1 及び RNA2 ともオオムギマイルドモザイクウイルス (BMMV) との相溶性が最も高く、他の 4 種類の *bymovirus* とは区別された。このことから、*Bymovirus* は RNMV と BMMV が一つにサブグループに、他の 4 種のウイルスが別のサブグループに分かれることを提唱した。

以上、本研究で得られた成果は、従来、ウイルスに対する防御機構として考えられていた RNA サイレンシングが、ウイルスのみならず細菌や菌類の病原体に対する防御にも関与していることを示すものであり、このような概念が定着していくことに寄与するものと考えられ、評価される。RNMV のゲノム構造解析の結果は、我が国で単離されたウイルスで、未解明であったゲノム構造が明らかになったことで、今後、モデル植物であるイネにおいて、ウイルスとの相互作用の解明するツールとして重要な貢献をするものと評価される。

本論文の公開審査会は平成 27 年 8 月 1 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 (学術) 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。