

学位論文審査の結果の要旨

| 氏名 | Shaikhul Islam |
|------|----------------|
| 審査委員 | 主査 小林 括平 |
| | 副査 曳地 康史 |
| | 副査 賀屋 秀隆 |
| | 副査 五味 剣二 |
| | 副査 八丈野 孝 |

論文名

Comparative analysis of mechanisms underlying the chlorosis development in transgenic tobacco expressing different chlorosis triggers

(異なる退緑黄化発症因子を発現する遺伝子組換えタバコにおける退緑黄化発症機構の比較解析)

審査結果の要旨

植物のウイルス病害で多く見られる葉の退緑黄化は、葉緑体の障害によって生じるため、植物の生産性低下に直結している。そのため、これを軽減することは農業生産における減収回避の一戦略となり得る。このことから、退緑黄化症状の発症機構に関する理解は、新たな耐病性作物を開発するための基盤として重要である。これまでに、モモ潜在モザイクウイルス (PLMVd)、およびキュウリモザイクウイルス (CMV) の Y サテライト RNA (Y-satRNA) によって誘導される退緑黄化症状の発症には、PLMVd RNA および Y-satRNA に由来する小分子干渉 RNA (siRNA) を介した宿主葉緑体タンパク質の RNA サイレンシングによる発現抑制が重要な役割を果たしていること、さらにそれぞれの標的遺伝子 [葉緑体局在性熱ショックタンパク質 90 (HSP90C)、およびマグネシウムプロトポルフィリンキラーゼの I サブユニット (CHLI)] の遺伝子発現を抑制する RNA を、人為的に発現制御可能なプロモーターを用いて発現させることによって、形質転換タバコにおいて誘導的に退緑黄化症状を再現できることが示された。本研究ではそれら二種類の形質転換タバコを、異なる標的遺伝子の発現抑制によって誘導される退緑黄化の発症機構を解析するモデル系として用い、網羅的な遺伝子発現解析、および発現変動遺伝子の比較解析を行った。

1. HSP90C 発現を人為的に抑制可能な形質転換タバコにおける退緑黄化に関連する遺伝子発現変動の解析

当研究室で作出された、HSP90 に特異的なトランジットペプチド領域に対するヘアピン RNA 遺伝子をデキサメサゾン (Dex) 誘導性の GVG プロモーターの制御下に発現する形質転換タバコ (i-hpHSP90C タバコ; Bhor, 2017) は、Dex 処理 2 日後に有意な HSP90C の発現抑制を示し、Dex 処理 7 日後に肉眼で確認可能な退緑症状を示す。退緑黄化の発症のプロセスを解明する目的で、特に Dex 処理後早期の遺伝子発現変動を明らかにするために、Dex 処理後 1 日の i-hpHSP90C タバコから RNA を抽出し、

RNA-seq 解析を行った。Dex 処理および無処理の非形質転換タバコ、および、Dex 処理および無処理の i-hpHSP90C タバコ、それぞれ 3 反復において、発現 mRNA の包括的な比較を主成分分析で行った。その結果、Dex 処理した i-hpHSP90C タバコのうち 1 個体において、対照区と比較してほとんど遺伝子発現変動が認められなかったが、これは HSP90C の発現抑制が他の 2 個体と比べて緩徐であったためであることが、独立した 8 個体の定量的 RT-PCR 解析によって確認された。

得られた RNA-seq データを解析し、公開されているレファレンストランスクリプトーム上で対応するシロイヌナズナ相同遺伝子の AGI コードを与えられていた RNA に限定してジーンオントロジー (GO) エンリッチメント解析を行った。その結果、サリチル酸、ジャスモン酸、およびアブシジン酸などの植物ホルモン経路や、細胞死、防御応答、活性酸素種や小胞体ストレスに対する応答などに関与する遺伝子群の発現が亢進し、光合成や葉緑体の発生、細胞周期制御、一次および二次代謝に関与する遺伝子の発現が抑制されていることが分かった。網羅的遺伝子発現解析の結果から、活性酸素種の生産や細胞死が退緑黄化の発症に関与することが示唆されたため、これらの現象が生じているかどうか検討した。その結果、葉緑体における過酸化水素の生産が誘導処理後 24 時間で認められ、視認可能な退緑黄化を示す葉では、散発的な細胞死が起こっていることが分かった。これらの結果は、HSP90C の発現抑制が葉緑体機能の維持に必要な遺伝子の発現を著しく抑制するとともに、防御応答を活性化させ、その結果、著しい退緑黄化症状を引き起こすことを示唆する。

2. CHLI の発現を人為的に抑制可能な形質転換タバコにおける退緑黄化に関連する遺伝子発現変動の解析

CHLI においても i-hpHSP90C タバコと同様な誘導型発現抑制系を持つ i-amiCHLI タバコが作出されている (Bhor 2017)。i-amiCHLI タバコについても、Dex 処理後 1 日の個体から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。その結果、i-amiCHLI タバコでは、誘導処理をしない条件でも非形質転換タバコとは明確に異なる遺伝子発現を示すこと、Dex 処理した場合にはさらに多くの遺伝子が発現変動を示すことが分かった。そこで、通常は遺伝子発現の継時的変動を解析する際に用いられるソフトウェアを用いて発現変動遺伝子を再検討し、退緑黄化の発症に関与しうる遺伝子を抽出した。それらのうち、シロイヌナズナ相同遺伝子の AGI コードを与えられていた RNA について GO エンリッチメント解析を行い、i-hpHSP90C タバコと同様に細胞死を含む防御応答関連遺伝子の発現亢進と、葉緑体関連遺伝子等の発現抑制を認めた。さらに、葉緑体における過酸化水素の生産と、視認可能な退緑黄化を示す葉における細胞死も確認された。以上の結果から、i-amiCHLI タバコにおける退緑黄化は、単にクロロフィル合成系酵素成分である CHLI の発現抑制によるクロロフィル合成量の減少によるものではなく、葉緑体関連遺伝子の発現抑制と防御応答の活性化を導く植物の応答機構が関与するものであることが示唆された。i-hpHSP90C タバコおよび i-amiCHLI タバコにおける退緑黄化に先立つ遺伝子発現変動を比較したところ、異なる GO に分類される遺伝子の発現が変動したことが示唆されたが、個体ごとのクラスター解析から、それらの多くが 2 つの実験系における退緑黄化発症の進行速度の違いを反映しているにすぎないことが示された。

以上のように得られた成果は、ウイルス病における退緑黄化の発症に共通の防御応答機構が関与することを示しており、今後の退緑黄化発症機構の解明に向けた方向性を示すものである。今後、本研究で退緑黄化への関与が示された個々の遺伝子に関する機能解析が、ウイルス病発現機構の解明に寄与するとともに、ウイルス病耐病性植物開発における新規標的遺伝子を与えるものと期待される。

本論文の公開審査会は令和 3 年 2 月 3 日にリモートシステムを利用して開催された。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全員一致して判定した。