

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	河井 崇
論文題目	Virus-induced gene silencing in <i>Prunus</i> fruit and nut tree species by <i>Apple latent spherical virus</i> vector (リンゴ小球形潜在ウイルスベクターによるサクラ属果樹のウイルス誘導性ジーンサイレンシングに関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>主要果樹種を多く含むバラ科サクラ属の遺伝学的・生理学的な研究は古くより進められ、有用形質との関連が示唆される候補遺伝子が単離されてきた。しかしながら、木本永年作物である果樹類の遺伝子機能の評価には長期間を要することに加え、サクラ属果樹ではアグロバクテリウム法による効率的な形質転換系が確立されておらず、基礎研究で得た知見の実証と応用が進んでいない。ウイルス誘導性ジーンサイレンシング (virus-induced gene silencing; VIGS) は、組換えウイルスを直接植物体に接種して内生遺伝子の発現を抑制するため、これらの問題点を解決し得る遺伝子機能評価法として注目されている。本論文は、遺伝子機能評価への利用を見据え、幅広いサクラ属果樹を対象にリンゴ小球形潜在ウイルス (<i>Apple latent spherical virus</i>; ALSV) ベクターを用いたVIGS法を開発し、その有効性を検証したものである。本論文は以下のように要約される。</p> <p>第1章では、アンズおよびウメの2種のバラ科サクラ属果樹を対象にALSVベクターを用いたVIGS法の開発を試みた。ALSVベクターは、リンゴやセイヨウナシなどのバラ科果樹を含む幅広い植物種で安定してVIGSを誘導できることが報告されているが、サクラ属果樹での有効性は検証されていない。VIGSの標的遺伝子として、カロテノイド合成に関与するフィトエン不飽和化酵素 (<i>PHYTOENE DESATURASE</i>; <i>PDS</i>) 遺伝子を用いた。アンズ‘平和’から<i>PDS</i>の部分配列 (<i>ParPDS</i>; 108 bp) を単離し、ALSV RNA2をがT-DNA上に配置されたコードするバイナリーベクターpBICAL2のクローニングサイトにライゲーションした (pBICAL2-<i>ParPDS</i>)。このコンストラクトバイナリーベクターおよびALSV RNA1をコードするT-DNA上に配置したバイナリーベクターpBICAL1をアグロバクテリウム (EHA105系統) に導入した。pBICAL1/EHA105とpBICAL2-<i>ParPDS</i>/EHA105を同時に<i>Nicotiana benthamiana</i>に接種し、た。RT-PCRにより組換えALSV (<i>ParPDS</i>-ALSV) の感染が確認された個体の上位葉をRNA抽出に用いた。抽出した全RNAを金粒子にコーティングし、遺伝子銃でアンズ‘平和’およびウメ‘南高’種子の発根直後の種子の未展開子葉に接種した。RT-PCRによりALSVの感染を確認したところ、アンズにおいて組換えALSVの感染が確認された。さらに、アンズでは感染個体の上位葉で白化が観察され、ティッシュプロット分析により葉全面からALSVが検出された。白化葉では内生<i>PDS</i> mRNA量が減少しており、<i>ParPDS</i>-ALSVの感染によるVIGSの誘導が示唆された。以上より、アンズにおいてALSVベクターを用いたVIGS法の開発に成功した。一方、ウメではALSVの感染が確認できなかったことから、サクラ属果樹の中でも種によってALSVベクターの利用が制限される可能性を示した。</p> <p>第2章では、対象とするサクラ属果樹の種や品種をさらに拡大してALSVベクターを用いたVIGSの有効性を調査した。また、VIGSの成否に関する基礎的な知見を得ることを目的として、VIGSにより生じるsmall RNAの分布を調査した。アンズ、ウメ、カンカオウトウ、モモ、ヨーロッパスモモ、ニホンスモモ、アーモンドのサクラ属果樹7種、計16品種を対象に、第1章で開発したものと同様の手順で<i>ParPDS</i>-ALSVを接種し</p>			

た。ALSVの感染率は種間および品種間で異なり、ウメ、ヨーロッパスモモ、ニホンスモモでは供試した全品種で、アンズ、アーモンドでは供試した一部の品種で感染が確認されなかった。感染が確認されたアンズ、カンカオウトウ、アーモンドの品種において、いずれも上位葉の白化および内生*PDS* mRNA量の減少が確認された。モモは生育初期にALSVによる激しい病徴がみられ、主枝の生長が停止した。その後正常な葉を持つ側枝が形成されたが、展葉した上位葉ではウイルスが検出されなかった。以上より、アンズ、カンカオウトウ、アーモンドにおいてALSVベクターを用いたVIGS法の開発に成功した。一方で、サクラ属果樹の種や品種によってALSVの感染性およびVIGSの有効性に差異があることを示した。さらに、アンズ、カンカオウトウ、アーモンドの白化葉およびモモの病徴葉から精製したsmall RNAを*ParPDS* mRNA配列にマッピングしたところ、全ての種でインサート*PDS*配列内に21 ntのsmall RNAの蓄積がみられ、この領域がmRNAの分解に関わるsiRNAとして機能したと考えられた。一方、インサート外の*PDS*配列にマッピングされたsmall RNAはほとんどなかったことから、内生*PDS* mRNAを介したsiRNAの二次的な増幅は生じていないと考えられた。これらの結果から、インサートとして用いる領域がsiRNA形成およびVIGSの効率に影響を及ぼす可能性を示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し

審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ウイルス誘導性ジーンサイレンシング (virus-induced gene silencing; VIGS) は、組換えウイルスを直接植物体に接種して内生遺伝子の発現を抑制し、その機能欠損形質から逆遺伝学的に対象遺伝子の機能を評価する手法である。安定した形質転換系が確立されていないサクラ属果樹において、VIGS法を用いることで遺伝子機能評価を加速化できる可能性があるが、これまでその有効性は十分に検証されていない。本論文は、遺伝子機能評価への利用を見据え、様々なサクラ属果樹を対象にリンゴ小球形潜在ウイルス (*Apple latent spherical virus*; ALSV) ベクターを用いたVIGS法を開発し、その有効性を検証したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. フィトエン不飽和化酵素 (*PHYTOENE DESATURASE*; *PDS*) 遺伝子をVIGSの標的として、*Nicotiana benthamiana*へのアグロバクテリウムの接種により効率的に組換えALSVを増幅し、遺伝子銃でサクラ属果樹へ接種する系を開発した。その結果、アンズ、カンカオウトウ、アーモンドにおいてサクラ属果樹で初となるALSVベクターの接種および個体レベルでのVIGS誘導に成功し、これらのサクラ属果樹の遺伝子機能評価にALSVベクターによるVIGSを有効活用できる可能性を示した。
2. サクラ属果樹の7種18品種を対象にVIGSの有効性を検証した結果、サクラ属果樹の種や品種によってALSVの感染性やVIGSの有効性が異なり、ALSVベクターの利用が制限されることを明らかにした。また、VIGSにより生じるsmall RNAの分布を調査することで、標的遺伝子の発現抑制に直接的に関わるsiRNAの蓄積を確認し、インサートとして用いる領域がsiRNA形成およびVIGSの効率に影響を及ぼす可能性を示した。

以上のように、本論文は、サクラ属果樹で初めてALSVベクターによるVIGS法の開発に成功するとともに、開発した系による遺伝子機能評価をサクラ属果樹全般に適用する際の重要な知見を提示するものであり、果樹園芸学、果樹生理学並びに果樹育種学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年11月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)