

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	村井 裕知
学位授与の日付	2022年3月31日	
論文名	キク属植物におけるウイルス誘導性遺伝子サイレンシング系の確立に関する研究	
論文審査委員	主査	東條 元昭
	副査	小泉 望
	副査	青木 考
	副査	望月 知史

論文要旨

キクは鑑賞的価値などから経済的に最も重要な花卉のひとつである。国内における出荷量が切り花内で最大であるだけでなく、世界規模でもバラ、カーネーションとともに重要な品目の一つである。近年、広義キク属モデル植物であるキクタニギクのゲノム解読が進み、ゲノム情報の蓄積が進んでいる。しかし、キク属植物は複雑な倍数体が多く、自家不和合性を持つなどの理由から、遺伝子機能解析が進んでいない。

植物の遺伝子機能解析方法の一つに、植物ウイルスベクターを利用したウイルス誘導性遺伝子サイレンシング (VIGS) がある。VIGS はウイルスの複製能と宿主植物の RNA サイレンシング機構を利用し、塩基配列特異的な遺伝子発現抑制を可能とする。標的とする植物遺伝子の部分配列をウイルスベクターに導入し、接種することで遺伝子機能解析を行うことができるため、形質転換植物などの従来遺伝子機能解析法に比べて時間や手間を大きく抑えることができる。

本研究では、キクの遺伝子機能解析を加速させるために、キクで効率的に働く VIGS ベクターを作製することを目的とした。まず、キクにおいて VIGS ベクターとして使用するウイルスの選定から行った。その後、VIGS ベクターとして効率的に運用するための条件を模索し、最終的にキクタニギクに対して VIGS 誘導を行なった。

第一章 キクから分離された TAV の cDNA クローン作製と系統解析

キクで働く VIGS ベクターに適したウイルスの選定を行なった。キクに感染するウイルスのうち、3分節のプラス鎖一本鎖 RNA をゲノムとして持つククモウイルスは cDNA クローンの作製および接種が容易であり、VIGS ベクターとしての知見も豊富に存在する。そこで、VIGS ベクターに適したこれらの性質を持つククモウイルスを用いること

にした。

第一章では、ククモウイルスのうち、キクからよく分離されるトマトアスパーミイウイルス (TAV) の感染性 cDNA クローンを作製した。キクから分離された TAV ChJ 系統 RNA1-3 の全長 cDNA を T7 プロモーターあるいは 35S プロモーター下流に導入した cDNA クローンを作製した。クローニングした TAV の全長塩基配列を決定し、既知の TAV との系統関係を解析した。ChJ 系統は日本のキクやトマトから分離された他の TAV 系統と近縁関係にあり、日本国内における TAV は多様性に富んでいないことが示された。

作製した TAV ChJ cDNA クローンの *Nicotiana benthamiana* と日本小菊への病原性を調査した。ウイルス RNA の転写産物接種とアグロイノキュレーション接種の両方で *N. benthamiana* に元株と同じ病徴を示したが、日本小菊に対してはアグロイノキュレーション接種のみ感染が認められた。したがって、日本小菊では TAV cDNA クローンの接種方法によって感染性が異なり、アグロイノキュレーション接種が適していることが示された。

第二章 キクに感染するククモウイルスゲノム交換ウイルスの探索

ククモウイルスは異なる 2 種間で分節ゲノムの交換が可能であり、それによって宿主範囲と病原性が変化する。代表的なククモウイルスであるキュウリモザイクウイルス (CMV) は VIGS ベクター化の知見が豊富に存在することから、第一章で作製した TAV cDNA クローンと既知の CMV pepo 系統の cDNA クローンをゲノム交換し、キクへの全身感染性を担保しつつベクター化を容易に行える組み合わせを探索した。

TAV と CMV 間で RNA3 をゲノム交換したウイルス、T1T2C3 および C1C2T3 は *N. benthamiana* に全身感染したが C1C2T3 でのみ矮化症状が現れた。過去の報告も鑑みると、この矮化症状は CMV 2b に起因していることが示唆された。なお、ゲノム交換ウイルスの全身感染率と蓄積量は親ウイルスと同程度であった。次に、T1T2C3 および C1C2T3 を日本小菊へ汁液接種したが、全身感染は認められなかった。この結果より、キクでククモウイルスを利用した VIGS を行うためには TAV-CMV 間のゲノム交換は適しておらず、TAV RNA1-3 で行う必要があることが明らかとなった。

第三章 TAV 2b タンパク質サイレンシングサプレッサーの機能解析および VIGS に与える影響の調査

TAV がコードする 2b タンパク質(以下 2b)は RNA サイレンシングサプレッサー (VSR) である。強力な VSR 活性は効率的・効果的な VIGS を阻害する報告があるため、VIGS 誘導と VSR 活性には深い関わりがある。第三章では TAV ChJ 系統の 2b とその変異体の VSR 活性の解析と、2b の変異が TAV の病原性と VIGS 誘導に与える影響を調査した。

アグロインフィルトレーションを用いた GFP 一過性発現による VSR 活性解析により、TAV ChJ 系統の 2b が VSR として機能することを確認した。次に、様々な 2b 変異体を作製し、VSR 活性を調べた。C 末端を部分的に欠失させる変異 ($\Delta C61$ と $\Delta C23$) や、ククモウイルスで保存されているアミノ酸のうち CMV で報告のある弱毒アミノ酸変異 (R46C と S4042A) を TAV 2b に導入すると、VSR 活性が低下した。さらに、これら

の変異 2b を導入した TAV は、2b の VSR 活性の低下度合いに応じて病原性とウイルス RNA 蓄積量が低下した。これらの結果より、ククモウイルス属の 2b N 末端やククモウイルス 2b 間で保存されているアミノ酸は、VSR 活性と病原性に共通して重要であることが示された。

野生型 TAV および 2b 変異体に VIGS マーカー遺伝子としてタバコ Mg-キラターゼサブユニット H 遺伝子 (*NtChlH*) の部分配列を導入し、*N. benthamiana* に VIGS 誘導を試みた。興味深いことに、VSR 活性が維持されていた 2b 野生型と $\Delta C23$ 変異体を持ったベクターは表現型の変化を誘導しなかった。一方で、VSR 活性が中程度もしくはほとんど失われた R46C、S4042A および $\Delta C61$ 変異体を持ったベクターでは退緑が誘導され、VSR 活性が弱い程、強い退緑が現れた。これらの結果は、TAV ベクターを用いた VIGS 誘導では TAV 2b の VSR 活性が低下している必要があることを示す。なお、効果的な VIGS 誘導に 2b の VSR 活性の低下が必要ではない CMV ベクターとゲノム交換しても、2b が野生型の TAV 由来の場合は表現型の変化は生じなかった。

第四章 TAV ベクターによるキクタニギクへの VIGS 誘導

キクタニギクに VIGS 誘導を試みた。初めに、作製した TAV cDNA クロンのキクタニギクへの効率的な接種方法を模索した。植物 RNA ウイルスの接種法としてよく用いられる、ウイルス RNA 転写産物の機械的接種と葉へのアグロイノキュレーション接種ではいずれもキクタニギクに TAV を感染させることができなかった。そこで、キクタニギク実生を TAV cDNA クロンを保持したアグロバクテリウム溶液に浸漬しバキュームインフィルトレーションする接種 (SVI 法) を試みた。SVI 法では接種個体の約 5 割で TAV 感染が認められ、SVI 法はキクタニギクへの TAV ベクターの接種方法として適していることが示された。

第三章にて、*N. benthamiana* における TAV ベクターの VIGS 誘導には、2b の VSR 活性が低下している必要があることが示された。そこで、キクタニギクへの TAV 感染における 2b VSR 活性の重要性を調査するために、TAV 2b 変異体をキクタニギクに SVI 法で接種した。その結果、野生型の TAV と比較して、TAV 2b 変異体はキクタニギクへ感染しないあるいは感染率が著しく低下し、TAV のキクタニギクへの効率的な感染には野生型 2b が必要であることが分かった。*N. benthamiana* とキクタニギクは科レベルの差があるため、TAV 2b の VSR 活性がこれら二つの科で異なることが考えられた。

上記の実験を基に、野生型 2b を持つ TAV ベクターに VIGS マーカー遺伝子としてキクタニギクフィトエン不飽和化酵素 (*CsPDS*) 遺伝子の部分配列を導入し、キクタニギクに SVI 法で接種した。接種後約 1 ヶ月程度で、*PDS* 遺伝子サイレンシングの典型的な表現型である白化症状が上位葉の一部に現れた。白化部位から total RNA を抽出して RT-PCR を行い、導入した *CsPDS* 配列を保持した TAV ベクターを確認した。RT-qPCR を用いて *CsPDS* 発現量を定量すると、*CsPDS* 配列を持つ TAV ベクターに感染した個体の白化症状部位では、配列を持たない TAV ベクター接種区と比較して *CsPDS* 発現量が減少していた。以上の結果より、作製した TAV ベクターはキクタニギクに対して *CsPDS* 遺伝子のサイレンシングを誘導し、キク属での VIGS 誘導を初めて可能とした。

VIGS 誘導では標的配列をアンチセンス鎖方向に導入した方が、センス鎖方向に導入

するより効果的であったという報告がある。しかしながら本研究では、アンチセンス鎖方向に *CsPDS* 配列を導入した TAV ベクターによる VIGS 誘導がセンス鎖方向に導入した方 TAV ベクターよりも効果的であるという結果は得られなかった。

結論

本研究では、TAV VIGS ベクターシステムを構築、最適化して、キク属植物での VIGS 誘導系を世界で初めて確立した。確立した TAV VIGS ベクターシステムはキクタニギクに対して *CsPDS* の VIGS 誘導が可能であり、キク属植物の遺伝子機能解析を効率的に行うことができるツールとなりうることが示唆された。

審査結果の要旨

キクは鑑賞的価値などから経済的に最も重要な花卉のひとつである。近年、広義キク属モデル植物であるキクタニギクのゲノム解読が進み、ゲノム情報の蓄積が進んでいるが、キク属植物は複雑な倍数体が多く、自家不和合性を持つなどの理由から、遺伝子機能解析が進んでいない。植物の遺伝子機能解析方法の一つに、植物ウイルスベクターを利用したウイルス誘導性遺伝子サイレンシング (VIGS) がある。VIGSはウイルスの複製能と宿主植物のRNAサイレンシング機構を利用し、塩基配列特異的な遺伝子発現抑制を可能とする。標的とする植物遺伝子の部分配列をウイルスベクターに導入し、接種することで遺伝子機能解析を行うことができるため、形質転換植物などの従来遺伝子機能解析法に比べて時間や手間を大きく抑えることができる。そこで本研究は、キクの遺伝子機能解析を加速させるために、キクで効率的に働くVIGSベクターを作製することを目的とした。

第一章ではキクから分離されたトマトアスパーマイウイルス (TAV) のcDNAクローン作製と系統解析を行った。cDNAクローンの作製および接種が容易で、VIGSベクターとしての知見も豊富なククモウイルスに属するTAVに着目し、キクから分離されたTAV ChJ系統を用いた。全長cDNAをT7プロモーターあるいは35Sプロモーター下流に導入したcDNAクローンを作製し、*Nicotiana benthamiana*と日本小菊への病原性を調べた。その結果、ウイルスRNAの転写産物接種とアグロイノキュレーション接種の両方で*N. benthamiana*に元株と同じ病徴を示したが、日本小菊に対してはアグロイノキュレーション接種のみ感染が認められた。したがって、日本小菊ではTAV cDNAクローンの接種方法によって感染性が異なり、アグロイノキュレーション接種が適していることが示された。

第二章ではキクに感染するククモウイルスゲノム交換ウイルスの探索を行った。代表的なククモウイルスであるキュウリモザイクウイルス (CMV) はVIGSベクター化の知見が豊富に存在することから、第一章で作製したTAV cDNAクローンと既知のCMV pepo系統のcDNA クローンをゲノム交換し、キクへの全身感染性を担保しつつベクター化を容易に行える組み合わせを探索した。その結果、キクでククモウイルスを利用したVIGSを行うためにはTAV-CMV間のゲノム交換は適しておらず、TAV RNA1-3で行う必要がある

ことが明らかとなった。

第三章ではTAV 2bタンパク質サイレンシングサプレッサーの機能解析およびVIGSに与える影響を調べた。ククモウイルスがコードする2bタンパク質はRNAサイレンシングサプレッサー（VSR）であり、強力なVSR活性は効率的・効果的なVIGSを阻害する報告があるため、VIGS誘導とVSR活性には深い関わりがある。そこでTAV ChJ系統の2bとその変異体のVSR活性の解析および、2bの変異がTAVの病原性とVIGS誘導に与える影響を、アグロインフィルトレーションを用いたGFP一過性発現によるVSR活性解析等により比較した。その結果、TAV 2b N末端やその中でもククモウイルス2b間で保存されているアミノ酸は、VSR活性と病原性に共通して重要であることが示された。そこで、野生型TAVおよび2b変異体にVIGSマーカー遺伝子としてタバコMg-キラーゼサブユニットH遺伝子（NtCh1H）の部分配列を導入し、*N. benthamiana*にVIGS誘導を試みたところ、VSR活性が維持されていた2b野生型とΔC23変異体を持ったベクターは表現型の変化を誘導しなかった。一方で、VSR活性が中程度もしくはほとんど失われたR46C、S4042AおよびΔC61変異体を持ったベクターでは退緑が誘導され、VSR活性が弱い程、強い退緑が現れた。これらの結果は、TAVベクターを用いた*N. benthamiana*でのVIGS誘導では、TAV 2bのVSR活性が低下している必要があることを示す。なお、効果的なVIGS誘導に2bのVSR活性の低下が必要ではないCMVベクターとゲノム交換しても、2bが野生型のTAV由来の場合は表現型の変化は生じなかった。

第四章ではTAVベクターによるキクタニギクへのVIGS誘導を行った。第一章で作製したTAV cDNAクローンのキクタニギクへの効率的な接種方法を模索した。植物RNAウイルスの接種法としてよく用いられる、ウイルスRNA転写産物の機械的接種と葉へのアグロイノキュレーション接種では、いずれの方法でもキクタニギクにTAVを感染させることができなかった。そこで、キクタニギク実生をTAV cDNAクローンを保持したアグロバクテリウム溶液に浸漬しバキュームインフィルトレーションする接種法（SVI法）を試みたところ、接種個体の約5割でTAV感染が認められ、SVI法がキクタニギクへのTAVベクターの接種方法として適していることが示された。また第三章で*N. benthamiana*におけるTAVベクターのVIGS誘導に2bのVSR活性が低下している必要があることが示されたため、キクタニギクへのTAV感染における2b VSR活性の重要性を調査した。その結果、野生型のTAVと比較して、TAV 2b変異体はキクタニギクへ感染しないあるいは感染率が著しく低下し、TAVのキクタニギクへの効率的な感染には野生型2bが必要であることが分かった。さらに、作製したTAVベクターはキクタニギクに対して*CsPDS*遺伝子のサイレンシングを誘導し、キク属でのVIGS誘導を初めて可能とした。この結果は、*N. benthamiana*とキクタニギクは科レベルの差があるため、TAV 2bのVSR活性がこれら二つの科で異なることに起因すると考えられた。

本研究では、TAV VIGS ベクターシステムを構築、最適化して、キク属植物での VIGS 誘導系を世界で初めて確立した。確立した TAV VIGS ベクターシステムはキクタニギクに対して *CsPDS* 遺伝子の VIGS 誘導が可能であり、キク属植物の遺伝子機能解析を効率的に行うことができるツールとなりうることを示唆された。これらの新知見は応用生命科学分野とくに植物病理学、植物ウイルス学および園芸学の発展に大きく寄与する。よって、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。