

	ツマダ <sup>ダ</sup> 侍
<b>氏 名</b>	<b>対馬 大希</b>
本籍（国籍）	青森県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第連研 685 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
<b>学位論文題目</b>	<b>ジャガイモやせいもウイルスの病原性に関する研究 –病原性を制御する塩基変異とウイルス及び宿主スモール RNA の変動解析– (Studies on potato spindle tuber viroid pathogenesis -analysis of nucleotide sequences regulating pathogenesis and changes in viroid and host small RNAs )</b>
学位審査委員	主査 弘前大学教授 佐野 輝男 副査 田中 和明(弘前 准教授),磯貝 雅道(岩手 准教授),長谷 修 (山形 准教授)

### 論文の内容の要旨

近年、農産物の国際化に伴い種苗類が流通・拡大する中で、検疫病害指定ウイルスが世界的に蔓延しつつあり、植物保護の観点から大きな懸念材料となっている。ウイルスは、現在知られている最小の植物病原体であり、広い宿主範囲を有し、感染後は様々な程度の病気を引き起こす。全長約 250-400 ヌクレオチドの環状一本鎖ノンコーディング RNA であり、細胞中で自己複製する。このタンパク質情報をコードしないウイルスが何故、どのように病原性を発揮するのかといった課題の解決が急務である。課題解決のために、これまでも様々なウイルス種、分離株間の組合せで研究が進められており PSTVd 分子構造中の P 領域が病原性を決定する上で重要であることが示唆されてきたが、詳細な病原性発現の分子機構は未だ明らかになっていない。

植物の病原体に対する防御反応である RNA サイレncing機構が解明され、ウイルスが強力な RNA サイレncing誘導体となり、多量のウイルス由来のスモール RNA (Viroid-sRNA) がウイルス感染植物に蓄積することが明らかになった。しかしながら、Viroid-sRNA が病原性に関与することを決定づけるには至っておらず、Viroid-sRNA だけではなく、ウイルス感染によって発現量が変動するタンパク質をはじめとする宿主側因子との関連を調査する必要が求められている。

本研究では、病原性の異なる PSTVd 株間に見られる塩基配列変異と分子構造の変化に着目し、PSTVd の病原性を制御する分子機構に関して、病原性の強弱と塩基変異及びスモール RNA 蓄積量の 3 者の関連性に焦点を当てて分析を行っている。また、宿主側因子に関し

て、RNAi を用いた遺伝子組換え作物を用いたり、マイクロ RNA 発現量の変動と病原性の強弱を関連付けて総合的に考察することで PSTVd の病原性発現分子機構に関する新たな知見を提供する。

#### 1. PSTVd 分子中の構造領域と病原性の相互作用

本研究ではまず、強毒系統 PSTVd 基準株 (PSTVd-I) と弱毒系統ダリア株 (PSTVd-D) の右側分子中の塩基配列の違いに着目し、計 14 種の PSTVd キメラ変異体を構築し、Rutgers トマトへの生物検定を実施したところ、PSTVd 右側分子中の塩基置換は病原性にはさほど影響しないが蓄積レベルに影響を与えることを明らかにした。一方の病原性の決定に関与するとされる P 領域に焦点を当て、同様に PSTVd キメラ変異体を構築、分析したところ PSTVd 左側分子への塩基変異導入は、高確率で共変異を誘導するが、共変異した場合も病原性への影響はほとんど見られないことが明らかになった。興味深いことに、PSTVd-I への単一な PSTVd-D 型塩基変異導入 (C42U 及び 64U) により、PSTVd-I は弱毒化した。すなわち、単一 (或は数塩基) の塩基変異導入により PSTVd の病原性が制御できる可能性を実証した。さらには、PSTVd の病原性発現に関わる新たな決定因子として PSTVd 分子中の第 7 ステム構造の安定性が示唆された。

#### 2. SlVirP1 の PSTVd 感染に与える影響

PSTVd がタバコ (*Nicotiana benthamiana* 及び *N. tabacum*) に感染するために必須であると報告された VirP1 タンパク質がトマト (*Solanum lycopersicum*) でも同様の役割を果たすのかを調査するために、RNAi で作出された Sl:VirP1proIR 導入トマトに PSTVd-I 及び -D を接種した。その結果、T3, T4 いずれの場合も、接種後 3 週目の段階でほとんど全ての PSTVd 接種個体で感染が確認された。すなわち、SlVirP1 は単独では PSTVd 感染に影響しないという結論に至った。

#### 3. 病原性の異なる PSTVd 感染トマトにおける PSTVd 特異的スモール RNA 蓄積量の比較分析

PSTVd 感染後に宿主中に生じる Viroid-sRNA と PSTVd 病原性発現の関係を調査するために、接種後 4 週目でのマルチプレックスディープシーケンシング解析を行った。その結果、PSTVd-I, -D 間に生じる塩基変異と PSTVd-sRNA の蓄積レベルに相関を見出し、さらに特定の領域から生成する PSTVd-sRNA が病原性に影響を与える可能性を示した。

#### 4. 病原性の異なる PSTVd 感染トマトにおけるマイクロ RNA の変動分析

加えて、上記のディープシーケンシング解析で得られたデータを基に、植物のライフサイクルにおいて欠かせないマイクロ RNA (miRNA) 発現レベルが PSTVd-I, -D 感染でどのように変動するのかを調査した。その結果、多数の miRNA 種の蓄積レベルが PSTVd 感染後に変動する中で、特に miR159 及び miR319 が PSTVd の病原性に相関を示した。

## 論文審査の結果の要旨

近年、農産物の国際化に伴い種苗類の流通が拡大する中で、検疫病害指定のウイロイドが世界的に蔓延しつつあり、植物保護の観点から大きな懸念材料となっている。ウイロイドは現在知られている最小の植物病原体で、広い宿主範囲を有し、感染後は様々な程度の病気を引き起こす。ウイロイドは全長約 250-400 ヌクレオチドの環状一本鎖ノンコーディング RNA で、細胞中で自己複製するが、タンパク質情報をコードしない RNA がなぜ、そしてどのように病原性を発揮するのか、詳細な病原性発現の分子機構には未解明の部分が多い。

本論文は、病原性の異なるジャガイモやせいもウイロイド (PSTVd) 株間に見られる塩基配列変異と分子構造の変化に着目し、PSTVd の病原性を制御する分子機構に関して、病原性の強弱と塩基変異及びウイロイド感染で誘導されるウイロイド特異的スモール RNA 蓄積量の関連性に焦点を当てて分析を行ない、また、宿主側因子に関してマイクロ RNA 発現量の変動と病原性の強弱に注目して総合的に分析を試みたもので、4 章から構成されている。

第 1 章では PSTVd の強毒株と弱毒株間に見られる 8 か所の塩基配列の違いに着目して各塩基を相互に置換して、合計 26 種類の人工変異体を構築し、検定トマト品種に感染させて複製能と病原力の違いを分析した。その結果、PSTVd の病原性は分子の左側半分に生じた塩基により制御されており、特に 42 番目の塩基、及び 64-65 番塩基間の挿入塩基により、強毒型が弱毒型に変化することを突き止めた。さらにこの観察結果に基づいて、PSTVd の病原性発現に関わる新たな決定因子として PSTVd 分子中の第 7 ステム構造の不安定性が病原性の強さに関与するモデルを提案した。

第 2 章では、ウイロイドの細胞・組織間移行に関与することが報告されているトマトのタンパク質 VirP1 に関して、VirP1 遺伝子発現をノックダウンした形質転換トマトシステムを使用して PSTVd 感染に及ぼす影響を分析し、少なくともトマトでは VirP1 遺伝子のノックダウンは PSTVd の感染性に影響しないことを明らかにした。

第 3 章では、強毒株と弱毒株に感染した植物体中のウイロイド特異的スモール RNA の蓄積量とパターンの比較解析を行い、弱毒株では強毒株より蓄積レベルが低く、特に弱毒性の変異が見られる領域の蓄積量が激減していることを明らかにした。このことから、特定の領域から生成するウイロイド特異的スモール RNA が病原性に影響を与える可能性を示唆した。

さらに第 4 章では、強毒株と弱毒株に感染した植物体中のマイクロ RNA の発現量を比較し、多数のマイクロ RNA 種の発現レベルがウイロイド感染後に変動する中で、特に miR159 及び miR319 が PSTVd の病原性の強さに比例して減少していることを明らかにし、ウイロイド感染で誘導される RNA サイレンシングにより、宿主の正常なマイクロ RNA 代謝機能

が阻害され、ウイロイド特有の病徴発現に至る可能性を示唆した。

以上、本研究は、ウイロイドの病原性、特に PSTVd の弱毒性を制御する塩基を特定し、ウイロイド感染で誘導される RNA サイレンシングによって生成するウイロイド特異的スモール RNA が宿主のマイクロ RNA の発現制御に影響を及ぼし、病徴発現に至る可能性を指摘したもので、関連分野の発展に寄与しうる新知見を含むものである。

以上、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

- 1 . Tsushima, D., Adkar-Purushothama, C.R., Taneda, A., Sano, T. (2015) Changes in relative expression levels of viroid-specific small RNAs and microRNAs in tomato plants infected with severe and mild symptom-inducing isolates of Potato spindle tuber viroid. *Journal of General Plant Pathology*, 81: 49–62.
- 2 . Tsushima, D., Tsushima, T., Sano, T. (2016) Molecular dissection of a dahlia isolate of potato spindle tuber viroid inciting a mild symptoms in tomato. *Virus Research*, 214: 11–18.