

植物ウイルスをベクターとして用いる試みは、植物 RNA ウイルスの遺伝子操作系が確立した 1980 年代から検討が行われ、現在も様々なウイルスベクターの検討が続けられている。その技術は RNA interference (RNAi) と呼ばれる生物防御応答を利用した遺伝子機能破壊の技術と結びつき、植物ウイルスを用いた RNAi 誘導の概念が登場した。植物ウイルスを用いた RNAi 誘導は短時間にベクターを構築でき、導入が容易である。よって、新たな機能解析ツールとして期待されているが、その応用例は少なく一般的なツールとしては用いられるにいたっていない。

そのような背景の中、堀氏はトマトモザイクウイルス (ToMV) を母体とするウイルスベクターを用いて、RNAi の誘導による遺伝子機能破壊の系を構築し、応用を試みた。

本論文では 1 章において植物ウイルスベクター TocJ を弱毒型ベクター LcJ に改良することで、RNAi 誘導後、表現型を観察する際の問題点であった病原性を軽減させることに成功した。

そして構築した LcJ ベクターを γ -チューブリンの解析に利用した。その結果 γ -チューブリン配列の一部を組み込んだウイルスベクターを感染した植物体は、 γ -チューブリンの蓄積量の減少によると思われる萎縮やトライコームの形態異常などの表現型を示し、 γ -チューブリンが細胞伸張に関わる可能性が示唆された。

この結果より、従来の手法では機能破壊株を作製できなかった遺伝子においても、ウイルスベクターにより発現抑制をおこない機能解析を試みることができる可能性が示された。

本論文 2 章においては重要なモデル植物シロイヌナズナに RNAi を誘導することができるベクターの構築と応用を試みた。シロイヌナズナは全ゲノム配列が決定され、豊富な EST 情報を有し、多くの変異体も単離されている。ウイルスベクターによる RNAi 誘導と組み合わせることでより幅の広い遺伝子機能解析を行える可能性を期待した。構築したウイルスベクター YogW はシロイヌナズナに全身感染し、RNAi を誘導することを確認した。

このベクターを用いて RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RDR) がウイルス抵抗性や RNAi に関与しているかどうか解析を試みた。複数の RDR のノックダウン変異体とウイルスベクターを組み合わせることで解析することによりを試みた。その結果、単一の RDR のみでは植物体全身でのウイルス増殖に大きな影響は及ぼしていないが、RDR6 は成

長点近辺においてウイルスを防いでいる可能性を示唆した。

この結果よりウイルスベクターと既存の変異体を組み合わせて利用することで新たな解析を行うことができる可能性を示した。

3章においては、ここまでに作製したウイルスベクターを用い NMD (nonsense-mediated mRNA decay)の解析を試みた。

NMDはナンセンス変異(premature termination codon :PTC)が存在する mRNA が生体内で分解される現象である。多くの研究は酵母、動物で行われ、植物においては、植物における NMD の機構や役割はまだ未解明であった。しかし NMD の中で重要な因子である UPF1、UPF2、UPF3 に非常に高い相同性を持つタンパク質の存在がシロイヌナズナのゲノム情報上推定されている。

そこでウイルスベクターを利用して、植物の NMD 現象とそれと関連が予測される因子の存在を実証し、その機能を解析することを試みた。ウイルスベクターTogJを利用して UPF3 の局在を解析し、他の真核生物と同様、核内で mRNA の複合体に結合する可能性を示唆した。さらに NMD の標的となる mRNA を発現する遺伝子を初めて明らかにし、ウイルスベクターによる *AtUPF1*, *AtUPF2*, *AtUPF3* に対する RNAi 誘導によってそれぞれの遺伝子が NMD に関与していることを示唆した。

以上の結果は、植物における NMD 機構の存在と発生過程への関与を世界にさきがけて明らかとした。またウイルスベクターの解析による迅速性を示すものともなった。

以上の結果はポストゲノミクス解析における遺伝子機能解析の重要性が高い現状において、本論文はウイルスベクターの広範囲な利用法を検討したものであり、植物分野における遺伝子機能解析の進展に貢献することが期待されるものである。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。