

イネ培養細胞を用いた遺伝子の相同性に依存する 遺伝子の不活性化機構の研究

学位論文内容の要旨

近年、トランスジェニック植物を用いた実験系において、導入遺伝子のみが、あるいは導入遺伝子およびこれと高い相同性を持つ内在性の遺伝子が、共に不活性化を受ける現象が数多く報告されている。これはgene silencingと呼ばれ、後者は遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象と捉えることができる。この現象は転写段階での調節もしくは転写後の調節により生じており、DNAの塩基配列の変化を伴わないと考えられている。この、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象は、基礎研究から分子育種まで広く用いられるトランスジェニック植物に生じた問題点であるのみならず、植物の遺伝子発現調節機構と深く関わっているものと考えられる。

転写後調節型の遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化においては、導入遺伝子および内在性の遺伝子から転写されるRNA間の相互作用を介してRNAの分解が起こるために遺伝子の不活性化が引き起こされるという仮説や、導入遺伝子および内在性の遺伝子から転写されるRNAの量に依存してRNAの分解が起こるために不活性化が引き起こされるという仮説等が提唱されている。すなわち、転写後調節による遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化には、導入遺伝子および内在性の遺伝子からの転写産物が何らかの形で関与することにより生じると考えられている。しかしながら、分子レベルでの発生機構の解明には未だ至っていない。

この現象の分子機構の解明のためには、この現象の鍵を握ると考えられているRNAの挙動を直接的に解析できる実験系の確立が必要である。そこで、本研究では実験材料として培養細胞に着目した。培養細胞はプロトプラスト化およびDNAやRNAの導入が容易に行える。そこで、まず、レポーター遺伝子をゲノム上に挿入し、安定に発現しているトランスジェニック細胞株を確立する。次いで、そのレポーター遺伝子を内在性遺伝子と見立てて、相同配列を持つDNAやRNA分子を導入すれば、転写後調節型の遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化を解析できる系が開発できると期待される。

本研究では、イネの培養細胞を実験材料として用い、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象を支配する分子機構の解析を行った。得られた結果は以下のようにまとめられる。

- (1) 遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象の解析のための実験系の確立

カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーターにレポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ (GUS) の構造遺伝子をつないだキメラ遺伝子を構築し、イネの培養細胞であるOc細胞に電気穿孔法によって導入し、25株の形質転換細胞株を得た。得られた細胞株についてGUS活性を測定したところ、活性の高いGUSタンパク質高発現細胞株と、導入遺伝子に不活性化が起こったと考えられるGUSタンパク質低発現株に分類することができた。GUSの活性染色を行ったところ、低発現細胞株において、完全な導入遺伝子を持つにも関わらず、染色の見られない細胞株が存在した。ノーザン解析ならびにrun-on assayによって、この細胞株においてはGUS mRNAの蓄積が低下しており、これが転写後調節により引き起こされていることを明らかにした。

(2) 相同配列を持つプラスミドDNAの導入による不活性化現象の誘導

GUSタンパク質高発現細胞株およびOc細胞株を再度プロトプラスト化し、GUSプラスミドDNAを再導入して一過的に発現させた。この時、親株であるOc細胞株では導入後48時間目までGUS活性は上昇するのに対して、高発現細胞株では24時間目以降にGUS活性は減少した。一方、GUS遺伝子と相同性を持たない、ルシフェラーゼ (LUC) 遺伝子を導入したときのLUC活性の経時変化には、親株と高発現細胞株の間で顕著な差は観察されなかった。このことは、酵素活性レベルではあるが、GUSプラスミドDNAの一過的発現により、高発現細胞株において24時間目以降、遺伝子の不活性化が誘導されたことを示唆している。

(3) 相同配列を持つRNAの導入による不活性化現象の誘導

GUSタンパク質高発現細胞株に、試験管内で合成したGUS RNAあるいはLUC-GUSキメラRNAを導入した。その結果、細胞株間においてばらつきはあるものの、導入後数時間の内にGUS活性の減少が観察された。一方、GUS遺伝子と相同性を持たない、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子に由来するGFP RNAあるいはLUC-GFPキメラRNAを導入したときには、そのようなGUS活性の減少は観察されなかった。

さらに、RNAを導入したプロトプラストから抽出した全RNAを用いたRNase protection assayにより、GUS遺伝子と相同性を持つRNAをGUSタンパク質高発現細胞系統に導入したときにのみ、導入RNAの特異的な分解が誘導されることを明らかにした。

本論文は、培養細胞の実験系において、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象が生じることを明らかにした。また、DNAおよびRNAの再導入による一過的な遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象の解析から、この不活性化現象は、RNAによって生じることを直接的に示した。これらのことは、培養細胞を材料として用いることにより、従来の植物体を用いた実験系では困難と考えられる、不活性化現象の初期過程を解析できることを示している。本実験系は今後、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象の研究のためのモデル手法になると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 藤 哲

副 査 教 授 富 田 房 男

副 査 助 教 授 石 川 雅 之

学 位 論 文 題 名

イネ培養細胞を用いた遺伝子の相同性に依存する 遺伝子の不活性化機構の研究

本論文は23図、引用文献55を含む和文79ページからなり、別に参考論文1編が添付されている。

形質転換植物において、導入遺伝子のみが、あるいは、導入遺伝子およびこれと高い相同性を持つ内在性の遺伝子が、共に不活性化を受ける現象が知られている。後者は、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象と捉えることができる。この現象は、DNAの構造変化を伴うものではなく、転写段階での調節あるいは転写後の調節により起こると考えられている。遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象は、植物の遺伝子発現調節機構と深く関わっていると考えられ、その分子機構の解明は興味深い研究課題である。

本論文は、イネの培養細胞を実験材料として、遺伝子の相同性に依存した不活性化現象の分子機構の研究を行ったものである。

本論文の内容は以下のように要約される。

1) 遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象の解析のための実験系の確立

カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーターにレポーター遺伝子として β -グルクロニダーゼ (GUS) の構造遺伝子をつないだキメラ遺伝子を構築して、イネの培養細胞であるOc細胞に電気穿孔法によって導入し、25株の形質転換細胞株を得た。これらの株についてGUS活性を測定したところ、GUSタンパク質高発現細胞株と、導入遺伝子に不活性化が起こったと考えられるGUSタンパク質低発現株に分類することができた。低発現細胞株においては、完全な導入遺伝子を持つにも関わらず、GUS活性の見られない細胞株が存在した。低発現細胞株を用いたノーザン解析によりGUS mRNAの蓄積量が低下していること、およびrun-on assayによりmRNAの蓄積低下が転写後調節により引き起こされていることを明らかにした。

2) 相同配列をもつDNAの導入による遺伝子の不活性化の誘導

GUSタンパク質高発現細胞株およびOc細胞株を再度プロトプラスト化し、GUSプラスミドDNAを再導入して一過的にGUS mRNA量を増加させた。この時、親株であるOc細胞株では導入後48時間目までGUS活性が上昇するのに対して、高発現細胞株では24時間目以降GUS活性の低下が観察された。一方、GUS遺伝子と相同性を持たない、ルシフェラーゼ（LUC）遺伝子を導入したときのLUC活性の経時変化には、親株と高発現細胞株の間で顕著な差違は観察されなかった。このことから、相同配列を持つ遺伝子を導入して一過的に発現させることにより、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化が誘導されたと判断された。

3) 相同配列をもつRNAの導入による遺伝子の不活性化の誘導

GUSタンパク質高発現細胞株に対し、試験管内で合成したGUS RNAあるいはLUC-GUSキメラRNAを導入して、GUS活性の経時変化を調べた。その結果、導入後数時間のうちにGUS活性の減少が観察された。一方、GUS遺伝子と相同性を持たない、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子のRNAあるいはLUC-GFPキメラRNAを導入した時には、そのようなGUS活性の低下は観察されなかった。

さらに、RNAを導入したプロトプラストから抽出した全RNAを用いたRNase protection assayにより、GUS遺伝子と相同性を持つRNAをGUSタンパク質高発現細胞系統に導入したときにのみ、導入RNAの特異的な分解が誘導されることを明らかにした。

本論文により、培養細胞を用いた実験系において、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象が起こることを明らかにし、DNAおよびRNAの再導入による一過的な不活性化現象の解析から、遺伝子の相同性に依存した遺伝子の不活性化現象は、相同配列を持つRNAによって引き起こされると考えられた。導入遺伝子の不活性化の現象は、従来、植物体を用いた実験系によって研究されてきたが、本論文で報告した培養細胞を用いた実験系は、この現象の研究に新たな研究手法を導入するものである。

近年、有用遺伝子の導入により作物の品質等を改善する分子育種が盛んに行われるようになったが、導入遺伝子の不活性化は大きな問題となっている。本研究はこうした分子育種を行う上での基礎研究としても重要なものである。よって審査員一同は、菅野達夫が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。