

論文内容の要旨

申請者氏名 森野 和子

コサプレッションを代表とする HDGS (Homology-Dependent Gene Silencing) は、外来遺伝子を植物に導入した時に、その外来遺伝子に相同性を持つ遺伝子が認識され、転写が抑制される、もしくは、転写後に、RNA が分解される現象のことである。この現象は、1989 年に Matzke M.A. らによって抗生物質耐性遺伝子を導入した形質転換タバコではじめて報告されて以来、現在までに様々な植物種、導入遺伝子について報告されている。同様の現象は、アカパンカビ、ショウジョウバエなどでも報告されており、広く生物の持つ機能が、外来遺伝子の導入によって活性化されることによって起きると考えられる。

転写後に起こるサイレンシングに共通する特徴は、1) コーディング領域の配列の相同性に依存して起こる、2) 相互作用する遺伝子の分離によってサイレンシングから回復する、3) RNA の分解が細胞質で起こる、4) 導入遺伝子がヘテロの場合起こらず、ホモの場合起こる、5) 不完全な RNA (アベラント RNA) が検出される、6) 環境因子や発生段階での遺伝子制御の影響を受ける、7) サイレncingの起きた導入遺伝子はメチル化されている、8) 細胞間を移動し、サイレンシングの起きていない細胞にサイレンシングを誘導する因子の存在が示唆されている、という 8 つがあげられる。

本研究では、形質転換植物における HDGS の分子機能解明を最終的な目的とし、形質転換イネで起きた導入遺伝子のサイレンシングについて包括的解析を行った。

オオムギから単離された糊粉層特異的遺伝子 *Ltp2* (Lipid transfer protein 2) のプロモーターにレポーター遺伝子 *gus* を融合した遺伝子を導入したイネを解析の材料として用いた。この形質転換イネを用いること利点は、サイレンシングの程度を糊粉層で組織学的に量的に視覚化出来ることである。

この材料を用いて、次の 6 つについて解析を行った。1) 形質転換第 5 世代までの植物を用いて *gus* 発現解析を行い、サイレンシングがどのように遺伝するかを解析した。2) サザン解析とゲノミッククローンの塩基配列より導入遺伝子のイネゲノム上での構造を決定した。3) DNA レベルの解析からサイレンシングの引き金と予想される RNA 分子の発現を確認した。4) 導入遺伝子のメチル化とサイレンシングの関係について解析した。5) 環境因子がサイレンシングに与える影響について考察した。6) 液体培養、植物体再分化の過程がサイレンシングに与える影響について解析を行った。以上の解析の結果、次の 7 つの結果を得た。1) レポーター遺伝子 *gus* のサイレンシングは、遺伝子導入時から、植物体再分化にいたる過程で起きた導入遺伝子の組み換えによって作られた複雑な構造を持つ導入遺伝子から転写されるアンチセンス領域を持つ RNA が原因であると考えられる。2) しかし、同じ遺伝子を持っている植物でも、各個体によってサイレンシングの程度は異なる。3) サイレncingは環境因子の影響を受ける。4) サイレncingは組織分化と相関関係がある。5) 不活性化の起きた導入遺伝子は、強くメチル化を受けている。6) DNA レベルの変化によってサイレンシングから回復が見られる。7) サイレncingから回復した植物では、アンチセンス RNA の一部が消失していた。

以上の結果、サイレンシングの引き金として予想されるアベラント RNA として機能できる RNA は、アンチセンス 領域を含む RNA であると結論できる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 森野 和子

本論文では、単子葉植物であるイネにおける相同生依存型ジーンサイレンシングの解析を行い、次の7つの結果を得た。1) レポーター遺伝子 *gus* のサイレンシングは、遺伝子導入時から、植物体再分化にいたる過程で起きた導入遺伝子の組み換えによって作られた複雑な構造を持つ導入遺伝子から転写されるアンチセンス領域を持つ RNA が原因であると考えられる。2) しかし、同じ遺伝子を持っている植物でも、各個体によってサイレンシングの程度は異なる。3) サイレncingは環境因子の影響を受ける。4) サイレncingは組織分化と相関関係がある。5) 不活性化の起きた導入遺伝子は、強くメチル化を受けている。6) DNA レベルの変化によってサイレンシングから回復が見られる。7) サイレncingから回復した植物では、アンチセンス RNA の一部が消失していた。これらの解析結果から、ジーンサイレンシングのサイレンシングの引き金として予想されるアベラント RNA として機能できる RNA は、アンチセンス 領域を含む RNA であると結論できる。これは、相同生依存型ジーンサイレンシングの機構研究を進める上で重要な結果である。

組織特異的遺伝子を用いたジーンサイレンシングの解析は、ほとんど行われていないが、本論文で解析を行った *Ltp2 / gus* 遺伝子は、組織特異性が強く、発生過程における細胞の系譜がすでにわかっている糊粉層特異的に発現する遺伝子である。この点を利用してジーンサイレンシングが組織分化と相関関係が見られること、温度条件の影響を受けることが明らかとなった。

また、本論文では、単子葉植物であるイネを解析に用いている。単子葉植物におけるジーンサイレンシングの解析は本論文を含めて6つ報告されているにすぎない。イネは、モデル植物であるとともに有用植物であり、分子育種学上の本論文の意味は大きい。

以上のように、本論文は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。