

氏 名 浦 和 博 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第494号

学位授与の日付 平成12年9月29日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 シロイヌナズナのリボゾームRNA遺伝子非転写領域

を用いた相同組み換え活性化に関する研究

論文審査委員	主査教授	西村 幹夫
	教授	飯田 滋
	教授	堀内 嵩
	教授	山森 哲雄
	教授	岡田 清孝 (京都大学)

論文要旨の内容

彼女らは、大腸菌と出芽酵母を用い、DNA複製阻害に依存し、近傍での体細胞相同組み換えが活性化されることを見出している。本研究では、同様の現象がシロイヌナズナにおいても見られるかどうかを検討することを目的とした。出芽酵母の複製阻害領域（RFB=Replication fork barrier）は、真核生物において高度に保存された構造をしているリボゾーム RNA 遺伝子（rDNA）の非転写領域（Non-transcribed spacer; NTS）に見出されている。更に、エンドウ豆を含む数種の生物の NTS 内には既に RFB が同定されている。

これらのことより、生物共通に RFB の存在が考えられる rDNA NTS を用いて、シロイヌナズナにおける体細胞相同組み換えの活性化を試みた。相同組み換え検出遺伝子構造の上流にシロイヌナズナ rDNA NTS 領域を含む 5.1kb 断片を持たせたシロイヌナズナ形質転換体 20 ライン（Fork block Group= Group F）と、相同組み換え検出遺伝子構造のみを持たせたシロイヌナズナ形質転換体 18 ライン（Control Group）を分離し、その相同組み換え活性を比較した。相同組み換え検出には、相同組み換えが起これば uidA 遺伝子が発現する構造を用いた。ロゼット葉が全て展開した頃の植物体を、細胞組織染色による GUS アッセイにより、相同組み換えを青色のスポットとして視覚化した。その結果、何れのグループにおいても、根や子葉で多くの青色スポットが観察された。また観察した全ての器官において、青色スポットはコントロールグループに比べグループ F に多く見られた。本葉におけるスポット数を比較定量したところ、グループ F はコントロールグループの 9 倍以上となった。これは、出芽酵母での NTS 導入による相同組み換え活性化頻度と同程度である。更に、コントロールグループにおいて、他より遙かに多くのスポットが観察された 2 ラインを除外し比較した場合は、グループ F はコントロールグループの 63 倍となった。

グループ内の他のラインに比べ遙かに多くのスポットが観察されたラインとして、上記の 2 ラインの他に、グループ F の 100 倍以上（これは、コントロールグループの 1000 倍以上になる。）の頻度でスポットが観察された F43 ラインが見出された（このラインは統計処理等からは除いた）。このラインでは、分子レベルで組み換え後分子の存在が確認できる程、高頻度で組み換えが起こっていた。高頻度組み換えラインの出現は、T-DNA の挿入場所による影響が原因として考えられ、その挿入場所に興味を持たれる。

今回の結果から、rDNA NTS による高頻度な相同組み換え活性が、大腸菌や出芽酵母に限らず、生物に広く一般に見られる現象である可能性が示唆された。この相同組み換え活性化の引き金としては、DNA複製阻害が考えられる。彼らは大腸菌や出芽酵母の遺伝学的解析から、DNA複製阻害が起こると、近傍で DNA 二重鎖切断が生じ、体細胞相同組み換えが活性化されるというモデルを提出しているが、今回の植物の系においても同様なモデルで説明が可能である。彼らは NTS のもつこの活性の生物学的意義として、rDNA コピー数の調節や、rDNA 配列の均一性（ユニット間の配列の同一性）を考えている。更に植物では、rDNA 以外の disease resistance gene family 等の多重遺伝子族においても、その多様性と均一性の確立や維持にこの様な活性が関与している可能性も考えている。

現在までに植物体細胞相同組み換えの研究には、変異株の単離解析等の遺伝学的解析の他に、DNA 二重鎖切断等の導入により活性化させた組み換え反応を解析することが行われ

てきた。また、出芽酵母の組み換え関連遺伝子の相同遺伝子の単離も行われている。しかしながら、植物における相同組み換え機構はよくわかっていない。ゲノム DNA の組み換え反応は種に遺伝的多様性を持たせるために重要である反面、多くの繰り返し配列を含む植物ゲノムにおいては、ゲノム構造の危機的変化をもたらす可能性も持ち合わせている。加えて、植物細胞は全能性を持ち、体細胞でのゲノム構造変化も、次世代へと引き継がれる可能性がある。これらのことから考えると、危機的なゲノム構造変化を回避するために、植物においては相同組み換え活性が低く抑えられている可能性が考えられる。そしてこのことが、植物における組み換え機構の解析が進まないだけでなく、植物における遺伝子破壊技術開発を遅らせていると考えられる。今回の彼らの研究は、これまでに報告されている植物を用いた DNA 二重鎖切断の導入等による相同組み換えの活性化頻度上昇（3～10倍）と比較しても、同程度、あるいはそれ以上であり、なおかつ、それらの報告とは違い、組み換えの活性化を誘導するための外部因子（例えば DNA 二重鎖切断を起こさせるための酵素）の影響を考慮することなく、*in vivo* での相同組み換え反応機構を解析できる。また、出芽酵母においては、用いる NTS 領域を全域から相同組み換え活性化に必須の領域に限定すると、相同組み換え頻度が更に 10 倍上昇することが報告されているが、同様のアプローチを取ることにより、シロイヌナズナにおいても、更なる相同組み換えの活性化が期待できる。更には、既にコントロールの 1000 倍以上で組み換えを起こす F43 ラインを得ている。これらの点から、彼らの研究は、植物における相同組み換えの研究にも貢献すると考えられる。

論文の審査結果の要旨

生物のゲノム構造の変化と維持の機構の解明は、生物の進化、特に生物のゲノム構造の進化を知る上で、また生物のある種の適応や病気の原因を理解する上で大変重要である。しかしながら体細胞の相同組換えは、特に繰り返し配列がゲノム上に多数存在する高等生物では、一般に抑えられていると考えられ、その機構の解明が重要であるにも関わらず、充分進んでいないのが実状である。特に高等植物では、これまで遺伝子ターゲティングが困難なことから、その傾向は著しかった。その中で、ゲノムに傷害を与えたり、人為的に2本鎖切断を誘導することで相同組み換えの頻度を上げることで、相同組み換えの現象を解析することがこれまで行われて来た。

本論文のテーマは、これまで申請者の研究室において明らかにされてきた微生物（大腸菌や酵母）の組換えのホットスポットを、植物（アラビドプシス）に応用した時、同様のホットスポット活性が発現するか否かを検討したものである。酵母のリボゾーム RNA 遺伝子（rDNA）の非転写領域（NTS）は、相同組換えのホットスポット活性を有している。アラビドプシス NTS 領域が同様に、組み換えのホットスポット活性を有するか否かを、NTS を GUS 遺伝子を利用した組み換えモニターに連結し、植物体に導入、組み換えによって生じる活性型 GUS 遺伝子の青色発色によるスポットの数の測定により検討した。その結果、（1）明らかに NTS による組換えの活性化が約10倍起こること、（2）特に根や子葉でその活性化が著しい傾向にあること、を見いだした。さらに、そのトランスジェニック植物の中の1株に、コントロール株の約1000倍活性が上昇したのを見だし、その子葉から取り出した DNA の解析から、組み換え後の DNA 分子を捉えることに成功した。

現在ターゲティングができないことから、導入した DNA はランダムに挿入されるため、その挿入場所の組み換えの影響が大きいことが予想される。それをできるだけ排除するため、多数のトランスジェニック株を分離し、生育させ、交配し、定量的に組み換え頻度を求めている。また、それらの株の中に、極めて高い組み換え頻度を示す株を見出し、恐らく少なくとも植物では最初の組み換え後の分子の検出に成功した。これらの結果から、高等生物の NTS は、普遍的に組換え上昇活性を有する可能性を示したこと、その活性に組織依存的傾向が見られたことは興味深い。さらに青色スポットばかりでなくセクターも認められたことから、細胞系譜の解析への応用の可能性を示したこと、又高い組み換え株が分離されたことから、この株の利用や解析から組み換え機構解明に向けた展開も今後可能になったことなど、単細胞での現象を多細胞においても確認したばかりでなく、今後の研究の芽となる幾つかの興味深い結果も得ている。以上の点を評価し、本研究が充分博士論文に値するものと判定した。

本論文の内容の口頭発表を聞き、その後論文の研究内容、またこの研究の背景となる分野を中心とした一般的知識に関する質疑応答を行った。いずれの質問に対しても、適切な答えがなされ、申請者がこの研究について自らが考え、自らが実験を行ってきたこと、またその過程やまとめに際し、その背景となる知識を充分獲得、理解していると判定した。また、この研究を博士論文にまとめただけでなく、資料として提出された英語の論文にまとめ、その投稿論文が適切な英文で書かれていることから英語を書く能力も備わっている

と判定した。