

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成10年度博士課程進学
氏名 真野弘範
指導教官名 米山忠克

論文題目

イネ篩管液中のRNAに関する研究

多細胞生物が一つの個体として生きていくためには、離れた器官の間での確に物質や情報のやり取りをしなければならない。高等植物においては維管束がその役割を担っている。維管束の構成要素である篩管はその分化の過程で核やリボソーム、液胞、ゴルジ体などは失うものの、原形質膜やミトコンドリア、プラスチドなどは篩管が成熟した後も維持されており、「生きた細胞」としての代謝活性をある程度持っていると考えられる。

核が消失した成熟篩管内にもRNAが存在することが1960年代から報告されてきた。イネについては大嶋ら(1990)は、ノーザンハイブリダイゼーションによって篩管液中にはtRNAが含まれることを示した。佐々木ら(1998)は、Thioredoxin h, actin, oryzacystatin-IなどのmRNAをRT-PCRによって検出した。イネ以外の植物の篩部要素においてもSUT1, CmPP16, CmNACPなどいくつかのタンパク質をコードするmRNAが*in situ* hybridizationや*in situ* RT-PCRなどによって検出されている(Kühn et al. 1997; Xoconostle-Cázares et al. 1999; Ruiz-Medrano et al. 1999)。また、RNAウイルスに対する植物の反応としてのRNA-mediated virus resistance (RMVR)や外部から導入した遺伝子に対するpost-transcriptional gene silencing (PTGS)のシグナル物質としてもRNAが有力視されており、そのシ

グナル物質は篩管を移動することが示唆されている。また RNA ウィルスも篩管を移動する RNA の一つとしてあげることができる。本研究はイネ篩管液中に存在する RNA 種の全体像を知ること为目标として実験を行った。

インセクトレーザ法はイネの篩管液を吸汁する昆虫であるトビイロウンカがイネを吸汁している最中にその口針を YAG レーザーで切断し、切り口より滲出してくる液をキャピラリーで集める方法である。通常用いられる切り込み法に比べると、作業がやや困難であり、得られる篩管液の量がかなり少なく（一回に数 μ l 程度）、またウンカからの汚染も予想されるという欠点があるものの、篩管以外の細胞からの汚染や植物に対するダメージが少ないという点で優れている。RNA は篩管液中には微量にしか存在しないことが予想される一方で、周辺の細胞には多量に存在する分子であり、他の細胞からの汚染が最も問題となる。このため、本研究においては篩管液をインセクトレーザ法によって採取した。

1, イネ篩管液中の核酸の濃度の測定

イネ篩管液より核酸をフェノール抽出し高効率でエタノール沈殿したのち DNA DipStick kit (invitrogen) によって核酸の濃度を測定すると、出始めの篩管液を集めたものでは 18 ng/ μ l 程度、続いて出た篩管液を集めたものでは 44 ng/ μ l 程度であった。したがってイネ篩管液中の核酸濃度は 20~40 ng/ μ l 程度であり、出始めのものより続いて出た篩管液の核酸の濃度の方がやや濃いという傾向があることが分かった。

RNase A 処理した篩管液、DNase I 処理した篩管液から核酸の抽出を行った後に濃度を測定すると、それぞれ 20 ng/ μ l と 16 ng/ μ l となった。同時に抽出を行った無処理の篩管液の場合は 38 ng/ μ l となった。このことから RNA と DNA はイネ篩管液中にほぼ同程度の量が存在していると思われる。

切り込み法により採取されたニセアカシア (*Robinia*) の篩管液中の核酸の濃度は 6.35 ng/ μ l (DNA 4.7 ng/ μ l, RNA 1.65 ng/ μ l) (Ziegler and Kluge 1962), カボチャ (*Cucurbita maxima*) 篩管液中の RNA の濃度は 10 ng/ μ l, DNA の濃度は 20 ng/ μ l (Kollmann et al. 1970) と報告されており、これと大きな違いは見られなかった。

2, イネ篩管液の電気泳動

イネ篩管液より抽出した核酸をアクリルアミドゲルで電気泳動し、銀染色を行うと、100~200 ベース付近にスミアなシグナルが検出された。このシグナルは DNase I 処理では変化が見られず、RNase A 処理によって消失したこと

から RNA であると考えられる。

3, イネ篩管液の RNA 分解活性の検出

RNA マーカー 3 μg に 3 μl の篩管液を混ぜ (全液量 7 μl) , 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートしても RNA の量は減少せず, RNA の電気泳動パターンも変化しなかった。このことからインセクトレーザ法で採取したイネ篩管液中には本研究の実験作業において問題となるような RNase 活性はないことが示された。

RNA マーカー 3 μg に 1 ng の RNase A を混ぜて (全液量 7 μl) 同条件でインキュベートすると RNA は約半分に減少し, 電気泳動パターンもスミアなものに変化したが, ここに篩管液 3 μl を混ぜた場合 (全液量 7 μl) にもこれとほぼ同様な RNA の分解が起きた。このためイネ篩管液中には, 切り込み法によるキュウリ篩管液について報告された RNA を安定化するような作用 (Ruiz-Medrano et al. 1999) はないと考えられる。

4, イネ篩管液の cDNA library の作製

Poly A tail のついていない RNA も含めてクローニングすることを目的として, イネ篩管液約 65 μl 相当からフェノール抽出した RNA に poly A tail を付加し, RT-PCR で増幅した後 cDNA library の構築を行った。Blue/white selection によってランダムに単離した 895 個の白色クローンについて PCR を行い, そのバンドの位置によりインサートが入っていると判断した 225 クローンについてシーケンスを決定した。

イネのゲノムサイズは 430 Mb と推定されており, 配列が全くランダムであると仮定すると, 17 ベース以上の長さのクローンが偶然一致してしまう確率は 2.5% 以下となる。このため相同性検索によって, 17 ベース以上のクローンについてイネの遺伝子や EST, ゲノム配列と一致したものはイネ由来のクローンであると推定できると考えた。17 ベース以上の長さのクローンは 115 個得られており, そのうち 65 個のクローンがイネ由来の配列と一致した。この中で, イネの EST と一致したのは 7 つ, イネの核ゲノム由来の ribosomal RNA (rRNA) としては 5.8S rRNA と一致するクローンは 1 つ, 17S rRNA と一致するのは 2 つ, 25S rRNA に対して一致したクローンは 5 つであった。transfer RNA (tRNA) に関してはプロリン, グリシン, システイン, リジンの tRNA に一致するクローンがそれぞれ 1 つずつ得られた。イネのゲノム配列にのみ一致するものは 46 個あった。現在はまだイネゲノムの全配列は決定されていないため, 一致しなかったものの中にもイネ由来のクローンが含まれて

いると考えられる。これについては、得られたクローンの配列からプライマーを設計し PCR を行うことにより判別が可能である。

5. イネ篩管液の転流速度の測定

^{11}C でラベルした二酸化炭素を、イネの葉の上部より吸収させ、PETIS (Positron emitting tracer imaging system) によってリアルタイムで ^{11}C の移行を観察したところ、50~200cm/h 程度の速度で移行するのが観察された。

まとめ

篩管液中の RNA の由来としては、篩部分化過程における分解物が残存している可能性、および隣接細胞からの輸送ということが考えられる。本研究では 1 の実験において、続いて出てくる数 μl の篩管液における核酸の濃度は減少していないことを示した。このことは篩管液中の核酸は隣接する細胞より継続的に供給されている可能性を支持している。

篩管液の電気泳動においては低分子側およそ 100~200 ベース付近に RNA のシグナルが検出され、篩管液より構築した cDNA library から単離したクローンでは 20 ベース程度の短いものが数多く得られた。3 の実験によって、これらが篩管液の採取時に分解した産物ではないことが示されたため、篩管液中の RNA は短い断片を主なものとして存在していることが予測される。

cDNA library から単離したクローンには、今のところほとんど重複するものが含まれていないことから、篩管液中の RNA 分子は最低でも 60 種類以上あることが示された。また、tRNA や rRNA の断片も含まれていることが分かった。

篩管を介した RNA の移行がマスフローで起こっているならば、その速度は光合成産物と同等であると予想される。5 の実験からその速度は 1 時間で 50~200cm であることが示されたため、篩管液中の RNA は特にシャペロンなどの存在を想定しなくても、植物体内の離れた器官間を分解を受けずに移行が可能であると予想される。

一般に RNA の役割は一つの細胞内でタンパク質の合成を行うことにあるといえるが、本研究において検出されたクローンは断片であったためタンパク質合成の鋳型とはなりえない。篩管に入った RNA は器官間の移行が可能であることから、RNA は器官間のシグナル物質として働いていることが予測できる。篩管液中の RNA の役割を明らかなものとするためには今後さらなる検証を重ねることが必要であるが、本研究はその基礎となると考える。