

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 真 野 弘 範

多細胞生物が一つの個体として生きていくためには、離れた器官の間で的確に物質や情報のやり取りをしなくてはならない。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が、最近 Thioredoxin h, actin, oryzacystatin- I, SUT1, CmPP16, CmNACPなどのmRNAが篩管液から検出された (Kuhn et al. 1997; Xoconostle-Cares et al. 1999; Ruiz-Medrano et al. 1999)。

本論文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行われたものであり、第1章で本研究の背景と意義を述べている。第2章では、篩管以外の細胞からの汚染が少ないインセクトレーザ法をもちいてイネ篩管液を採取し、その核酸の濃度を測定している。イネ篩管液の核酸濃度は20~40ng/ μ l程度であり、RNase A またはDNase I 処理実験の結果から、RNAとDNAはほぼ同程度の量が存在していると推定している。第3章では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、銀染色により検出している。100~200ベース付近にスメアなシグナルが検出され、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であると考えられた。第4章ではイネ篩管液中には本研究において問題となるようなRNase活性はなく、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) はなかった。第5章では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53 μ l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の構築を行っている。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、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。相同性検索によって、17ベース以上のクローン (115個) についてイネの遺伝子やEST、ゲノム配列と比較した。68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などと一致したのは8つ、イネの核ゲノム由来のribosomal RNA (rRNA) と一致するクローンが8つあった。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48個あった。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たので、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を行った。第6章では¹⁴C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¹⁴Cの移行を観察し、50~200cm/hの速度で移行する結果を得ている。

本研究から篩管液中のRNAは、隣接する細胞より継続的に供給されており、篩管液中の大部分のRNAは短い断片として存在していると推定している。またcDNA libraryから単離したクローンには、ほとんど重複するものが含まれていなかったことから、篩管液中のRNA分子は最低でも60種類以上あること、tRNAやrRNAの断片も含まれていることを示している。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を予測している。

以上本論文は高等植物の物質や情報の移送を担っている篩管液に含まれるRNAについて、イネ篩管液の詳細な解析から、大部分のRNAが短い断片であることを初めて明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところがすくなくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。