

そこで我々は、転写制御による影響を同じにするために、プロモーター、ターミネーターを全く同じものとした。また、組みこまれた染色体内での位置特異的な影響をほぼ同じにするために、それぞれのプロモーターを逆向きに近傍に位置するよう設計した。二つの遺伝子発現におけるリンクの状態を定量的に調べるために、*GUS* 遺伝子と *GFP* 遺伝子がリンクした上記の構造を持つプラスミドを、BY-2 細胞にアグロバクテリウムを用いて導入したところ、*GUS* 活性と *GFP* 量間の相関係数 r 値は 0.87 であり、既往の文献と比較しても、非常に良好な相関関係が見られた。

そこで、*GUS* 遺伝子と Hm 耐性遺伝子 (*hph*) をリンクさせたプラスミドを設計構築し、様々な濃度の Hm で選抜することにより、その *GUS* 活性を 1 年半にわたり、図 1 にプロットした。選択圧が強い場合は表現形が分離しにくいことが明らかになった (図 1, Hm500)。500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高レベルの Hm による選択圧下で培養されている Hm500 のラインは、細胞で発現しうる限度に近いレベルの耐性遺伝子を発現している細胞であると考えられる。そのため、何らかの遺伝子組換えが発現遺伝子やその周辺に起これば、耐性能力が上がるというよりは下がる確率が高く、そのような細胞は増殖速度が落ち、あるいは死滅し、集団の中で占める割合が下がっていく。その結果、初期において二つの遺伝子のリンクを保った高発現株だけが淘汰されずに生き残っていくのではないかと考えられる。

本研究から、表現形の分離を防ぐためには、目的遺伝子と薬剤耐性遺伝子がリンクを保ち続けること、そのためには常に強い抗生物質による選択圧をかけることが必要であることが示唆され、形質転換植物の遺伝子安定制御に関して重要な知見が加えられた。

一方、遺伝子発現の抑制制御に関して、ノックアウト植物をつくる簡便な方法は、現在においてもまだ確立しているとは言えない。これまで、アグロバクテリウムの T-DNA を植物のゲノムに挿入することにより、ランダムにゲノムの遺伝子を破壊し、そこから表現形を示す植物体をスクリーニングすることによって、多くの遺伝子機能が同定されてきた。しかし、この方法ではマルチコピーの遺伝子や、機能を相互に補完しあうような遺伝子の解析はほとんど不可能である。マルチコピーの遺伝子や、似た機能を持つものは、相同な mRNA の配列を持つと考えられ、その配列を標的として mRNA レベルで遺伝子発現を制御することは非常に有用であり、簡便で信頼性のある遺伝子発現抑制システムの開発が望まれる。mRNA レベルでの遺伝子発現抑制の手法として、RNA 干渉 (RNAi) 法、リボザイム法があげられる。

RNAi は、二重鎖 RNA (dsRNA) によってその配列特異的に mRNA が分解され、その結果、遺伝子の発現が抑制される現象である。1998 年、最初に線虫で報告された後、RNAi は、ゼブラフィッシュ、ショジョウバエ、プラナリア、ヒドラ、トリパノソーマ、菌類、

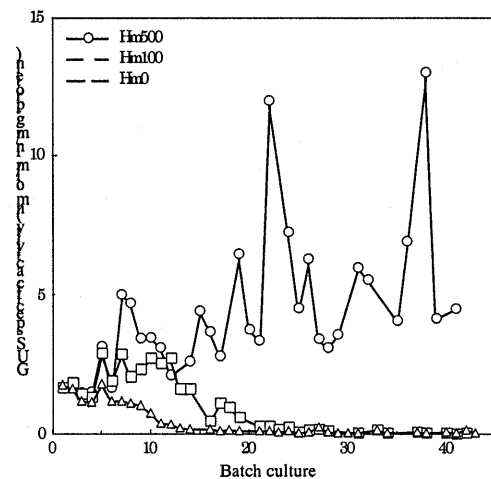


Figure 1. Time courses of the *GUS* specific activity during a long-term culture. The BY-2 cell suspensions transformed with pBI121hph were cultured with various amounts of hygromycin concentration. Each cell line was initiated from the same culture and adapted to stepwisely increased hygromycin over the first six subcultures. After the sixth batch culture, the concentration of Hm0, Hm100, and Hm500 was maintained at 0, 100, and 500 mg/ml, respectively. Triplicate *GUS* assay experiments were carried out for each data point and the average of the *GUS* activity was plotted.

植物などの様々な種間で保存されている現象であることが分かってきた。RNAi の生物学的な役割は、核酸レベルの防御システムであることが示唆されており、またその詳細な機構もここ 1, 2 年で次第に明らかになりつつある。

RNAi を利用した遺伝子発現の抑制は、簡便であり、しかも非常に高い効果が期待できることがわかってきた。RNAi の発見により、基礎から応用まで、様々な有用な副産物が生み出されてきている。その波及効果は、新たな遺伝子発現制御機構の解明、医療分野への応用、ウイルス耐性作物にむけた品種改良、ポストゲノム時代における遺伝子機能解析などに及び、あらゆる局面で無視できないものとなってきている。

RNAi 法は、ごく最近開発された手法であり、実際の効果についての十分な知見が蓄積されていない。そこで、RNAi 法が、植物において遺伝子発現抑制法として従来、また現在でも最もよく用いられているセンス、アンチセンス法に比べてどの程度の効果があるのかを、一過的発現の系で調べた。

RNAi 効果の定量には、mRNA 量の多少を鋭敏に検出する系が必要である。そこで、それぞれホタルルシフェラーゼ (*luc*)、ウミシイタケルシフェラーゼ (*Rluc*) 遺伝子を発現するプラスミドを構築し、エレクトロポレーションにより、BY-2 細胞に両方のプラスミドを一過的に導入した。*Rluc* を形質転換効率のコントロールとして、*luc* の活性を測定すると、*luc* 発現プラスミドの量を鋭敏に反映する *luc* 活性が検出できた。

そこでこの系を用い、*luc* 遺伝子に対する dsRNA、センス RNA、アンチセンス RNA を発現するプラスミドを計 5 種類構築し、それぞれ、*luc*、*Rluc* 発現プラスミドと共にエレクトロポレーションで BY-2 細胞に導入した。センス RNA、アンチセンス RNA 発現プラスミドは、わずかに抑制効果が見られ、コントロールと比較して *luc* 活性を 20-40% 程度抑制したのに対し、dsRNA 発現プラスミドを共発現させた場合、ほぼ 90% 程度の割合で *luc* 活性を抑制した (図 2)。dsRNA 領域は、300 bp でも十分な効果が見られ、500 bp のものとあまり効果に差はなかった。おそらく、この系における RNAi 効果は 300 bp で飽和していると考えられる。また、その抑制効果は *luc* 特異的であり、*Rluc* の活性にはほぼ影響が見られなかった。この効果は常に再現性があり、我々の知る限り、RNAi 効果を最初に定量的に測定したものである。植物培養細胞の一過的発現系において、dsRNA 発現プラスミドによる RNAi は、非常に強力なツールであることが示された。

しかし、RNAi は、植物の防御機構に関連する様々な遺伝子をも誘導するので、ある特定の遺伝子の発現のみを抑制できない可能性がある。もう一つの mRNA レベルの遺伝子発現抑制法として用いられているリボザイムは、mRNA と相補的に相互作用するアームを持

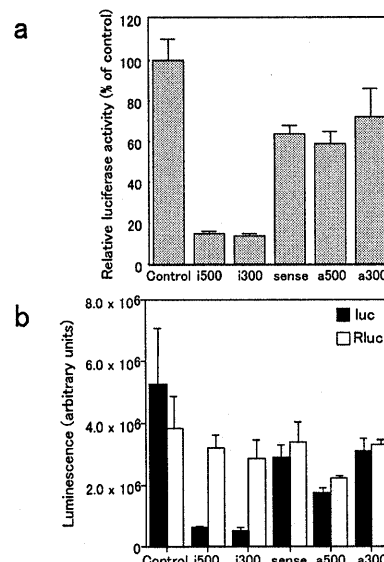


Figure 2. Comparison of the RNAi effect of dsRNA on firefly luciferase activity with the effects on this activity of sense and antisense sequences in BY-2 cells. (a) Tobacco BY-2 cells were converted to protoplasts and cotransformed by electroporation with three plasmids, namely, 0.3 μ g of p35Sluc, 0.3 μ g of p35SRluc and 3 μ g of a sense, antisense or dsRNA expression plasmid or 3 μ g of a control plasmid (p35SDsRed). The amount of each expression plasmid used for electroporation was ten times that of the reporter genes. The firefly luciferase activity was normalized by reference to the activity of Renilla luciferase. (b) The activities of firefly and Renilla luciferases used to calculate the results in Fig. 2a. Triplicate electroporation experiments were performed in every case. Columns and bars show mean results and standard deviations, respectively.

ち、mRNA に結合・切断する。動物細胞においては詳細に検討されており、その設計の簡便さおよびポストゲノム時代における Gene Discovery にも用いることができるため、大きな成功を収めてきている。しかし、その応用性の広さにも関わらず、植物においてはリボザイムが発現していても、その効果がしばしば見られてこなかった。そこで、植物内在のタンパク質を利用して、リボザイム効果を向上させることが考えられる。

RNAi に必須な構成要素として、RNA ヘリカーゼが知られている。RNA ヘリカーゼは、核酸鎖を交換することにより、mRNA の高次構造を解く酵素である。RNAi において RNA ヘリカーゼの変異株は遺伝子発現の抑制効果を持たない。また、当研究室において、mRNA を解く酵素である RNA ヘリカーゼと相互作用するモチーフをつけたリボザイムは、ステムを組み、通常のリボザイムでは切れないような構造を持つ mRNA でも *in vivo* で切断することが明らかにされた。つまり、RNA レベルで遺伝子発現を抑制するためには、おそらく mRNA の高次構造を解くことが必須であると考えられる。

そこで、この効果を詳細に検討するために、*in vitro* でリボザイムによる切断効果を解析した。ビオチンタグをつけたヘリカーゼ結合モチーフを付加したリボザイムを細胞抽出液と混ぜ、ストレプトアビジンで吸着させた。この RNA ヘリカーゼ・リボザイム複合体は、通常のリボザイムでは切断できない、堅いステムを持った基質を切断することを示した。このアッセイ系は、様々なモチーフをつけたリボザイムと相互作用するタンパク質の、切断効果を検出するのに応用できるだろう。

近年、カチオン性ポリマーに親水性の側鎖をグラフト共重合させることによって開発された楕型カチオン性ポリマーが、RNA ヘリカーゼと同様に核酸同士の鎖交換を行なう活性を有していることが分かってきた。ポリマーを用いることにより、通常のリボザイムでは効果が見られにくい基質に対して、切断効果が促進されたことを示した(図 3)。このポリマーの応用面としては、一つはリボザイムとポリマーを融合させ、そのリボザイム効果を向上させることが考えられる。

動物細胞においても、最初は細胞内でリボザイムの効果が見られず、発現系の構築、細胞質輸送の最適化など様々な工夫を重ねて今の成功がある。リボザイムを植物細胞で用いるために、いつもの試行錯誤が必要となるだろう。

終わりに、本研究において、遺伝子の発現制御に応用できるツールの開発を、主に BY-2 培養細胞を用いて行ってきた。BY-2 培養細胞は、冒頭述べた様に、ゲノム配列がわかっていないこと以外は、モデル植物としての機能を十分備えている。また BY-2 培養細胞は、植物培養細胞の中で唯一、高度に同調培養できる細胞であり、細胞周期の研究において欠かせないものとなっている。BY-2 細胞そのもののツールとしての重要性もここに強調しておきたい。

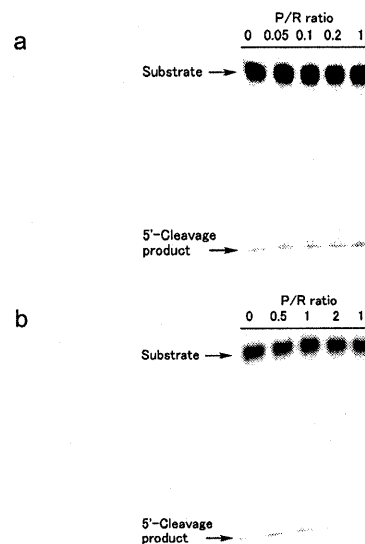


Figure 3. Dependence of the cleavage activity of ribozymes targeted for the RNA duplex on the amount of the α PLL-g-Dex #2. After the substrate of the RNA duplex was incubated with 200 nM ribozyme in the presence of the α PLL-g-Dex #2 with indicated P/R ratio for 30 min, 4 μ l of the reaction mixture was sampled and was mixed with equal volume of the stop solution I. Samples were heat-denatured and loaded onto the 20% polyacrylamide gel containing 7 M urea. (a) Enhancement on the cleavage activity of ribozymes in the presence of the α PLL-g-Dex #2. (b) Inhibitory effects on the cleavage activity of ribozymes in the presence of α PLL-g-Dex #2 with a high P/R ratio.