

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大沢 勇久

レトロエレメントは、その転写産物が逆転写されたのち転移する因子の総称であるが、その一種 SINE は他の因子とは異なり RNA ポリメラーゼ III (Pol III) によって転写される。p-SINE1 は、イネ (*Oryza sativa*) のゲノムに存在する約 122 bp の大きさの SINE であり、内部に Pol III のプロモーター様配列を持ち、3' 末端にポリ T が存在する。本論文は、p-SINE1 の転写とその産物を解析することにより、p-SINE1 が実際 Pol III で転写されること、その発現が DNA メチル化などで制御されていること、特定のサブグループの p-SINE1 メンバーが主に転写されていることを明らかにすると共に、p-SINE1 の転写産物の高次構造を解析しその転移に必要な構造を推定したものであり、6つの章からなる。

第1章で研究の背景を述べた後、第2章ではイネ懸濁培養細胞 Oc における p-SINE1 の転写について述べている。まず、培養細胞より抽出した RNA 標品を用いて p-SINE1 配列をプローブとしたノーザン解析、5' RACE-PCR、C-RACE、及びプライマー伸長反応を行い、p-SINE1 が発現していること、生じた転写産物が p-SINE1 配列の 5' 端付近から始まり 3' 端にあるポリ U で終わるものであることを示した。また、p-SINE1 配列を運ぶプラスミド DNA を鋳型としてタバコの核抽出物中に生ずる転写産物を解析することによって、p-SINE1 が Pol III によって転写されていることを示した。

さらに、Oc 細胞から得られた p-SINE1 の転写産物は、p-SINE1 のコンセンサス配列とは異なり、イネで比較的最近に転移している p-SINE1 のサブファミリー中のサブグループ (RA α) のメンバーが持つ6個の塩基置換を高い割合 (63 %) で持つことを見出した。

第3章ではストレス下での p-SINE1 の転写について述べている。まず、DNA メチル化阻害剤 (5-アザシチジン) で処理した Oc 細胞から抽出した RNA 標品を用い、p-SINE1 転写産物の量が顕著に増大すること、生じた転写産物の大部分が RA α のメンバーに由来するものであることを示した。これらとその他の結果から、RA α の p-SINE1 メンバーの発現が DNA メチル化によって抑制されていることを指摘した。

次に、熱ショック処理した Oc 細胞から抽出した全 RNA を用いた場合、p-SINE1 の転写産物の量が減少することを示した。残った転写産物の大部分が RA α のメンバーに由来することから、熱ストレスにより RA α の転写産物の量のみならず、他の p-SINE1 メンバーの転写産物の量も減少すると推測した。

第4章では植物体 (日本晴) での p-SINE1 の転写について述べている。根と穂より抽出した全 RNA 中には p-SINE1 の転写産物が検出されるが、穂の細胞における p-SINE1 転写産物の大部分が RA α のメンバーに由来することから、植物体でも培養細胞と同様、RA α の p-SINE1 メンバーが主に転写されていることを示唆した。

さらに RA α のメンバーが *O. sativa* の近縁種の系統の穂でも転写されていること、

その転写産物の大部分が RA α のメンバーに由来することから、これらの祖先種において既に RA α のメンバーが転写されるようになっていたと推測した。

第5章では *p-SINE1* 転写産物の二次構造について述べている。RA α の配列を持つ *p-SINE1* の転写産物を合成し、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動することによって、それが単一の高次構造を取ることを見出した。また、一本鎖 RNA の特異的塩基または二本鎖 RNA を認識する各種 RNase による切断によって決定した転写産物の二次構造が、コンピュータプログラム mfold によって予測された構造と一致することを示し、この構造が転移に必要な逆転写酵素などの認識に関与している可能性を指摘した。

第6章では以上の結果を踏まえて *p-SINE1* の転写制御とその転写産物の転移経路を考察している。

以上、本論文はイネの SINE が Pol III によって転写されること、特定のサブグループのメンバーが発現していることを明らかにすると共に、その発現が DNA のメチル化によって抑制されていること、熱ストレスによって転写産物量が減少するような制御を受けていること、さらに転写産物の二次構造を明らかにしたものであり、学術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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。