

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における体細胞分裂を
介した RNAi 効果のエピジェネティックな要因による変動

Epigenetically fluctuating RNAi effect through cell division
in unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*

修士論文

物質・環境システム工学コース 山崎 朋人

[要旨]

2本鎖 RNA が2重螺旋を形成する領域に対して相同な塩基配列を持つ mRNA は細胞質内で特異的に分解される。この機構は広い範囲の真核生物において基本的に同じであることから、進化的には真核生物の初期段階で獲得された外来 RNA ウイルス等に対する核酸レベルでの防御システムであると考えられる。塩基配列特異的な mRNA の発現抑制はヒト細胞や線虫、ショウジョウバエ、細胞性粘菌などの動物細胞では RNA interference (RNA 干渉)、アカパンカビでは quelling、シロイヌナズナやタバコなどの陸上植物では Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) と呼ばれ独自の研究がなされてきた。しかし生物種によらず同様の経路で mRNA の塩基配列特異的分解と、遺伝子の転写そのものの不活性化が共通に起こっていることがわかってきた。標的となった mRNA をコードする遺伝子の特異的な不活性化には、塩基のメチル化修飾頻度との関連性が指摘されている。シトシン、特に CpG サイト (植物では CpNpG サイトも含む) にあるシトシンのメチル化がヒストンの脱アセチル化、及びヒストン H3 タンパクにある9番目のリジン残基のメチル化を引き起こす。これに呼応して、クロマチンが凝集構造をとる事で転写抑制(Transcriptional Gene Silencing, TGS)が引き起こされる可能性が示唆されている。*C. reinhardtii* でも人為的に導入した外来遺伝子の発現が見られなかったり、得られる形質転換体の個数が遺伝子毎に大きく違うという現象が知られている。そこで我々は、単細胞緑藻の *Chlamydomonas* においても2本鎖 RNA によって特異的な mRNA を分解する機構が存在するのではないかと推測し、パンハンドル型の RNA を転写するような DNA コンストラクトを作製した (*RbcS2* プロモーター::*aadA*::イントロン::アンチセンス *aadA*::*RbcS2* ターミネーター)。このコンストラクトを *aadA* 遺伝子の導入によってスペクチノマイシン耐性を賦与されている株に2次導入した。その結果いくつかの形質転換体がスペクチノマイシン耐性の低下を示し、それらの株から2本鎖 RNA 領域が約 21 塩基長に分解された産物が検出され、薬剤耐性能の低下が RNAi の誘起に因ることが確認された。しかし、それらの形質転換体を液体培養後に寒天培地上で単離培養すると、コロニー毎に異なる薬剤耐性能を示すことがわかった。薬剤耐性能のレベルは体細胞分裂を通じて安定せず、single colony を再度液体培養すると再び様々な程度の薬剤耐性能を示すコロニーが得られた。Real Time PCR 機を用いて様々な耐性能を示す株から細胞内に蓄積されている *aadA* mRNA 量を測定した。その結果、薬剤耐性能は細胞内の *aadA* mRNA 量を反映していた。同時に導入した外来遺伝子である *ble*

mRNA 量にはほとんど変動がないことから、*aadA* mRNA 量の低下は、この mRNA に対する特異的な分解に起因すると考えられる。いったん誘発された *aadA* mRNA に対する RNAi の強度がなぜこのように不安定なのか原因は不明である。2 本鎖 RNA をコードしている DNA コンストラクトそのものは安定して維持されているにもかかわらず、*aadA* mRNA 量の変化は培養毎に生じるので、2 本鎖 RNA の転写量の変動している可能性がある。これが原因となって RNAi の強度が変化するのかもしれないと考えている。