

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* における
RNAi 関連遺伝子の同定

Identification of genes that related to RNAi in *Chlamydomonas*
reinhartii

[要旨]

細胞質内で2本鎖RNA(double strand RNA : dsRNA)のハイブリッド部分と相同な塩基配列を持つ1本鎖RNAを特異的に分解する機構は、ほぼ全ての真核生物が共通して持っている核酸レベルでの免疫システムである。この機構は、ヒト細胞や線虫、ショウジョウバエ、細胞性粘菌、アカパンカビ、シロイヌナズナなどでRNAiとして知られている。また、多細胞真核生物は200以上のmicroRNAと呼ばれる内在性遺伝子に相同な配列を持つ2本鎖RNAをゲノムにコードしており、発生、分化のある時期のみに転写することによって、同じような経路を経て、内在遺伝子の発現を調節していることも分かってきた。

1998年に発見されたRNAiは哺乳類でも応用できることが分かってから、すさまじい早さで研究がなされている。そうした中でのRNAiの中核となる反応である、2本鎖RNAのプロセス、mRNAの破壊を直接担うような遺伝子としては、Dicer、RNA依存RNAポリメラーゼ、argonaute family、RNAヘリカーゼなどが様々な生物種で共通して同定されてきている。しかしRNAiに関する様々なアクセサリタンパクや、RNAiを使った寄生因子に対するシステムなどには、生物間でかなりのバリエーションが存在することも分かってきている。

そこで本研究では外来遺伝子に人為的にRNAiを誘発させた単細胞緑藻クラミドモナスの株を用いて、他の生物種でも共通してRNAiに関与している遺伝子と共にクラミドモナス特有に働く遺伝子も同定することを目的とした。

今回、スペクチノマイシン耐性賦与遺伝子*aadA*が導入され、安定的なスペクチノマイシン耐性となった株に*aadA*の配列を持った2本鎖RNAを転写するよう設計したRNAi誘起コンストラクト(*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)を2次的に導入することにより、*aadA*に対するRNAiが誘起されてスペクチノマイシン耐性の低下した株を使用した。

関連する遺伝子を同定するため、RNAiのかかった株のゲノムに無作為にTagとなるDNA断片を導入し、スペクチノマイシン耐性能の回復した株を作出した。次に薬剤耐性能の回復した株はTagの挿入により関連遺伝子が破壊された、RNAiが解除されたものとし、Tag前後のゲノム配列をTAIL-RCRによって調べ、データベースと比較することによって破壊されたRNAi関連遺伝子と考えられるものを決定する手法をとった。実際にはTagとなるDNA断片の導入効率は非常に低いため、パラモマイシン耐性賦与遺伝子*aphVIII*を持つプラスミドをTagとして導入し、パラモマイシン耐性になったものをTagの導入されたもの

とした。

パラモマイシン耐性となった形質転換体 3000 株のうちスペクチノマイシン耐性能が RNAi を誘起する前のレベルまでほぼ復活した株は 24 株であった。しかしまた決定したものが本当に RNAi に関連するものかどうか、破壊される前のものを再び導入することによって、*aadA* に対する RNAi をレスキューすることが最終的に必要となってくる。よって、導入した Tag はゲノム中に 1 つであることが望ましい。この条件を満たしたのは最終的に 6 株であった。RNAi 誘起コンストラクトが抜け落ち、2 本鎖 RNA が転写されなくなったために RNAi が誘起されず、スペクチノマイシン耐性を示したものは 4 株あった。