

氏名(本籍)	まつ 松	もと 本	けん 健	いち 一	(奈良県)
学位の種類	農学博士				
学位記番号	博甲第521号				
学位授与年月日	昭和63年3月25日				
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当				
審査研究科	農学研究科				
学位論文題目	STUDIES ON EVOLUTION OF HIGHLY REPETITIVE AND TRANSCRIBABLE SEQUENCE IN THE SALMON GENOME				
主査	筑波大学教授	農学博士	村上	和雄	
副査	筑波大学教授	農学博士	田淵	武士	
副査	筑波大学教授	農学博士	今川	弘	
副査	筑波大学助教授	農学博士	田仲	可昌	

論文の要旨

高等生物のゲノムの約1/3は、反復配列により構成されている。反復配列は大きく分けて、タンデムに反復しているものとゲノム内に分散しているものに分けられる。分散しているタイプのものには二種類あり、一つはSINEs (short interspersed repeated segments) と呼ばれ、もう一つはLINEs (long interspersed repeated segments) と呼ばれている。一般にSINEsは約500bp以下の長さを持ち、ハプロイドあたり $10^4 \sim 10^5$ コピー存在している。一方LINEsは約5 kbp以上の長さを持ち、ハプロイドあたり 10^5 コピー存在している。さらにSINEsのあるものは、RNAポリメラーゼⅢにより転写されて低分子RNAが合成されることが知られている。

本研究では、HeLa細胞粗抽出液を用い、全DNA鋳型として、*in vitro* 転写反応を行うことにより転写可能な高頻度反復配列を検出するというユニークな実験系を用いることにより、シロサケのゲノム中に存在する転写可能な反復配列の解析を行った。シロサケの反復配列からの転写産物である6S RNAの分析を行ってみると微量塩基成分のプソイドウリジン(Ψ)が6S RNA中に存在することがわかった。このように全DNAから転写された転写産物が修飾を受けるという例は、現在までのところこれ以外には報告されていない。このシロサケの転写可能な高頻度反復配列を解析することは、この反復配列の生成と進化、さらには生体内での機能を知るうえで非常に重要であると考えられる。

〔I〕シロサケの反復配列から転写された6S RNA 中に見出されるプソイドウリジン。

シロサケの精巢から全DNAを抽出し、それを鋳型とし、HeLa細胞粗抽出液を酵素標品として、

in vitro 転写反応を行うと 6S RNA が得られる。この 6S RNA はシロサケのゲノム中に少なくとも $10^4 \sim 10^5$ コピー散在する転写可能な高頻度反復配列から転写された産物を反映している。また α -アミニチンの阻害実験からこの 6S RNA は RNA ポリメラーゼ III により転写されることが確かめられた。さらに 6S RNA を RNase T₁ で完全分解し、二次元 PEI-セルロースクロマトグラフィーを行ったところ、非常に明瞭なフィンガープリントを得ることができた。この 6S RNA は、半数体あたり少なくとも数万コピー存在する遺伝子からの転写産物の混合物であり、その混合物のフィンガープリントがきわめて明瞭であるということは、その数万コピー存在する各々の遺伝子の配列が非常によく保存されていることを示している。

次に、この反復配列から転写された 6S RNA のオリゴヌクレオチド分析を行ったところ、二ヶ所に微量塩基成分のプソイドウリジン (Ψ) が存在していることがわかった。

これらのことより、シロサケの反復配列から転写された 6S RNA は、たとえば tRNA や snRNA などのプソイドウリジンを含んでいる RNA と構造が似ている可能性が高いと思われる。

〔II〕シロサケの転写可能な高頻度反復配列の起源はリジン tRNA₁ 遺伝子である可能性が高い。

シロサケの全 DNA を鋳型とし、HeLa 細胞粗抽出液を酵素標品とした時得られる 6S RNA をプローブとして、シロサケの遺伝子ライブラリーからこの反復配列を含んだいくつかのファージクローンの単離を行い、シロサケの転写可能な反復配列の構造を調べた。単離した 6 個のファージクローンの DNA を鋳型として *in vitro* 転写反応を行うと、そのうち 4 個のクローン化 DNA を鋳型とした時、全 DNA を鋳型とした時と同じ長さの 6S RNA が生じた。この 4 個のファージクローンのうち、Sm 3 と Sm 2 を主に解析に用いた。この Sm 3 DNA を鋳型として、*in vitro* 転写反応で得られる 6S RNA のフィンガープリント分析を行ったところ、このフィンガープリントはシロサケの全 DNA からの転写で得られる 6S RNA のフィンガープリントのパターンとほぼ一致することがわかった。このことは、Sm 3 内の 6S RNA 遺伝子は、シロサケの転写可能な反復配列を代表できる遺伝子であることを意味する。

さらに、Sm 3 と Sm 2 内に存在する 6S RNA 遺伝子の塩基配列を決定し比較した。Sm 3, Sm 2 とも全長約 180 ヌクレオチドで、両端に direct repeat をもつトランスポゾン様の構造をとっていることがわかった。また特徴ある 4 つの塩基配列領域から構成されており、5' リーダー領域、リジン tRNA 相同領域、tRNA 非相同領域、A+Trich 領域より構成されていることがわかった。さらに、リジン tRNA 相同領域は、リジン tRNA₁ と 84% の相同性があり、この相同性は二次構造にもおよび、ステムとループのヌクレオチド数は、リジン tRNA₁ のそれと全く一致していた。また、プソイドウリジンの修飾が起きている場所はリジン tRNA₁ のプソイドウリジンの修飾の場所と完全に一致し、一つはアンチコドンステムの CA Ψ G (U27 が Ψ 27 に変換)、もう一つは、T Ψ C ループの U Ψ CG (U55 が Ψ 55 に変換)、であることがわかった。

これらのことから、シロサケの転写可能な高頻度反復配列は、リジン tRNA 遺伝子を起源として tRNA 非相同領域との組み換えにより一つのユニットを形成し、それが増幅し、ゲノム中にひろがったと考えられる。

〔Ⅲ〕RNAポリメラーゼⅢの新しい転写終結機構がシロサケの全DNAの転写反応後得られる6S RNAの生成には必要である。

RNAポリメラーゼⅢによる転写終結信号は、真核生物においてはすべて共通で、GCに富んだ配列に囲まれた連続した4個以上のT配列であるといわれてきた。ところが、シロサケの反復配列を代表するクローンSm2を鋳型として*in vitro*転写反応を行うと、転写終結点付近に連続した4つ以上のT配列がないにもかかわらず転写終結が起こり、6S RNA (140ヌクレオチド)が生じることがわかった。

次に、正確な転写終結点を調べたところ転写終結点は、tRNA非相同領域とA+Trich領域の境界領域に一致することがわかった。さらに、転写終結点に必要な信号領域を決定したところ、転写終結には9ヌクレオチド以上のAT配列が必要であり、6ヌクレオチド以下のAT配列では転写が終結しないことが明らかとなった。さらに転写終結点のすぐ5'側に存在するヘアピン構造は、転写終結には影響を及ぼさないことも示された。シロサケのゲノム中に数万コピー存在するこの反復配列の転写終結点付近は、塩基配列が非常に保存されていることから、数万コピー存在する反復配列の転写終結には、いま述べた新しい転写終結機構が関与しているものと考えられる。

〔Ⅳ〕まとめ

以上のことを考慮し、シロサケの転写可能な反復配列の成立過程を推定すると、反復配列はリジン tRNA₁遺伝子を起源としてtRNA非相同領域との組み換えにより一つのユニットを形成し、それが原形となり、遺伝子内に存在するプロモーターを用いて、RNAポリメラーゼⅢにより転写され、逆転写酵素の働きによりcDNAが合成され、遺伝子増幅が起き、ゲノム中に散在するようになったと考えられる。

審 査 の 要 旨

本論文では、シロサケゲノム中に存在する転写可能な高頻度反復配列が、リジン tRNA 遺伝子を起源としていることを見出し、その反復配列の遺伝子増幅機構を明らかにしている。

現在までに起源が明らかにされた反復配列はいくつか知られているが、シロサケの反復配列のように、起源となっているRNAを一つに限定できた例はまれである。

また、反復配列のRNAポリメラーゼⅢによる転写の転写終結機構は今までのものとは異なり、ATATATATTというATに富む9bpの配列で、転写が終結することを見つけた。

本研究は、非常に独創的で高く評価できる。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。