

論文内容の要旨

博士論文題目

スプライシングによるイネ *waxy* 遺伝子の発現制御

氏名 一色 正之

(1) イネ *waxy* 遺伝子はアミロース生合成に必要な澱粉顆粒結合性澱粉合成酵素をコードしており、二つの対立遺伝子座が知られている。 W_{xa} は発現量が多く、ばさばさした米の原因となるが、 W_{xb} は発現量が低く、もちもちした米になる。しかし、この原因は米の食味といった育種上重要な問題にもかかわらず、全く解明されていなかった。本論文では W_{xa} と W_{xb} の発現量の違いを解析するため、両者のシークエンスを比較し、 W_{xb} の第1イントロン5'スプライス部位の+1GがTに1塩基変異していることを発見した。この変異により W_{xb} は変異を持つオリジナルの部位の他に2ヶ所の新しい部位でのスプライシングが行われていた。さらに第1イントロンスプライス部位に変異を導入したコンストラクトの解析から、 W_{xb} の低発現の原因は第1イントロン5'スプライス部位の1塩基の変異であることが明らかになった。(2) *dull*突然変異体は*waxy*遺伝子の発現制御に関わるトランス因子であろうと予測されていた。そこで、胚乳の*waxy* mRNAへの影響を調べると、*du-1, du-2*ともに W_{xb} でのスプライスされたmRNAの量が減少していた。このことから、*du-1, du-2*の影響は W_{xb} のスプライシングの阻害、またはmRNAの安定性の低下と推測された。そこで、*dull*と W_{xa} をもつインディカ品種を交配し、自殖後代を調べた結果、*dull*は W_{xb} には影響するが、 W_{xa} には影響しなかった。 W_{xa} と W_{xb} はそのコーディング領域にほとんど違いがないことから、*dull*は安定性ではなく、 W_{xb} のスプライシングに影響のある因子の変異であることが明らかになった。さらに、花粉で*dull*の影響を見ると*Waxy*タンパク質は*du-1*ではその変異の影響が顕著になり、*du-2*では変異の影響がほとんどなく、*du-1*と*du-2*では W_{xb} のスプライス部位の選択性が異なっていた。これらのことから、*du-1, du-2*は組織特異性をもつスプライシング因子の突然変異体であると考えられる。(3) セリン-アルギニンリッチ (SR) タンパク質はスプライソソームの構築やスプライス部位の選択など様々なスプライシング制御を行っている。植物においても複数のSRタンパク質が単離されているが、機能解析は進んでいない。本論文ではイネからSRタンパク質をコードする3つのcDNAを単離し、イネのプロトプラストにおいて*Wx* pre-mRNAのスプライシングへの影響を調べた。その結果、osSR3は W_{xb} の第1イントロンのスプライシングを促進し、スプライス部位の選択を変えた。また、*Wx* 第1エキソンのプリンリッチ配列を変異させたコンストラクトを用いるとosSR3によるスプライシングの促進が低下したことから、osSR3はプリンリッチエンハンサーを介して選択的スプライシングを行っていることが示唆された。

審査結果の要旨

博士論文題目

スプライシングによるイネ *waxy* 遺伝子の発現制御

氏名 一色 正之

waxy 遺伝子の発現量の制御は米に含まれるアミロース量を変化させ、食味を左右する実用的に重要な研究テーマである。これまでもアンチセンス遺伝子などの導入によりその発現量を調節する試みがなされてきたが、作用機構の明らかな方法での発現調節は行われていなかった。また、選択的スプライシングが遺伝子の発現制御に重要であることが明らかになっているが、動物に比較すると植物における制御機構の解析は著しく遅れている。その原因は植物におけるスプライシング解析を行うための *in vitro* の系および基質として使用可能な pre-mRNA が存在しなかったことによる。本論文は *waxy* 遺伝子の発現に影響するスプライシング突然変異体の解析と Wx pre-mRNA を利用した植物におけるスプライシング解析系の開発について述べたものである。本論文の成果を要約すると次のようになる

(1) これまで全く不明であった発現量の異なる対立遺伝子座 *Wxa* と *Wxb* の遺伝子レベルの解析が行われ、*Wxb* の低発現の原因が第 1 イントロンの 5' スプライス部位共通保存配列の変異に起因していることを明らかにした。(2) *waxy* 遺伝子に影響を及ぼし、低アミロースの表現型を示す突然変異体、*du-1, du-2* がスプライス部位に変異を持つ *Wxb* の選択的スプライシングに影響するトランス因子の変異であることを遺伝学および分子生物学的解析により明らかにした。現在までに選択的スプライシングに関わる因子の変異は一連の *Drosophila* 体細胞性決定因子として知られているものがあるが、先例は少なく、植物では最初の発見である。(3) イネからスプライシング因子として知られる SR タンパク質をコードする cDNA を単離し、イネプロトプラストおよび Wx pre-mRNA を用いることによりその機能解析を行い、植物の遺伝子の選択的スプライシングがスプライシング因子により制御されていることを植物において初めて示した。また、動物でスプライシングエンハンサーとして知られるプリンリッチ配列が植物においても選択的スプライシングに重要な役割をはたしていることを明らかにした。以上のように本論文はこれまで全く解明されていなかった植物における選択的スプライシング機構の解析を大きく進歩させたことにより、植物分子生物学上の意義は大きいと考えられる。また、スプライシング因子を用いた *waxy* 遺伝子の発現制御による米の食味の改善といった育種学上の成果も期待できる。よって、本論文は博士 (バイオサイエンス) の学位論文として十分に価値のあるものと認める。