

# タマネギのミトコンドリアゲノムに関する研究

塚 谷 (辻 村) 真 衣

京都産業大学 植物ゲノム科学研究センター

## 要 旨

タマネギ (*Allium cepa*) には複数の細胞質型があり、それらの中には細胞質雄性不稔を引き起こす、CMS-S 型細胞質がある。本研究では、次世代シーケンシングを用いて CMS-S 型細胞質を保有するタマネギ「もみじ3号」のミトコンドリアゲノムを決定し、そのゲノム構造は3つのサークルとして存在することを示した。我々は更に、雄性不稔を引き起こさない、Normal 型細胞質のミトコンドリアゲノムも決定し、遺伝子コード領域について CMS-S 型との比較を行った。その結果、*cox1*、*cox3*、*nad6* でフレームシフトを伴う大きな違いが見られた。上記の遺伝子について Western Blotting を行ったところ、COXI では Normal 型と CMS-S 型との間で翻訳産物にサイズの差が見られ、また NAD6 は翻訳産物の量に差が生じている可能性が示唆された。

キーワード：*Allium cepa*、細胞質雄性不稔、ミトコンドリアゲノム、次世代シーケンシング、パルスフィールド電気泳動

## 1. はじめに

タマネギ (*Allium cepa*,  $2n = 2x = 14$ ) は、世界で最も重要な作物の一つであり、5000 年以上にわたって栽培されている<sup>1)</sup>。その栽培地域は広く、147 か国で栽培されており、2017 年における世界の生産量は、野菜類ではトマトに次いで2番目に多く、およそ1億トンである<sup>2)</sup>。このようにポピュラーで歴史の古い作物ではあるが、現存するのは栽培種のみで祖先種と考えられる種はまだ発見されておらず、その成り立ちは不明な点が多い。これまでの研究から、*A. vavilovii* と *A. galantum* および *A. fistulosum* の交雑種が *A. cepa* の祖先種である可能性が示されており<sup>3)</sup>、*A. vavilovii* が自生する中央アジアの天山山脈、パミール高原とモンゴルのアルタイ山脈がタマネギの起源地として候補に挙げられている<sup>4)</sup>。

ところで、タマネギの細胞質雄性不稔 (Cytoplasmic Male Sterility (以下 CMS)) の存在は古くから知られており、CMS が最初に F<sub>1</sub> 育種に利用された作物でもある。1936 年に Jones と Emsweller によってタマネギの CMS が発見されて以来<sup>5)</sup>、ヘテロシス育種による大きな収量

改善が達成されている<sup>1)</sup>。商業用品種には CMS-S 型と CMS-T 型の 2 種類の細胞質がよく用いられている。CMS-S 型は花粉四分形成までは正常な発達を示し、その後原形質の退化が生じ、花粉が空洞になる<sup>6)</sup>。一方 CMS-T 型では花粉の減数分裂が正常に行われない<sup>4)</sup>。また CMS-S 型の雄性不稔性は、核にある単一のローカスによって回復され<sup>7,8)</sup>、CMS-T 型の雄性不稔性は、3 つの独立した遺伝子座 *aa*、*bb* および *cc* の相補的遺伝子座によって回復される<sup>9)</sup>。一方、Normal 型と呼ばれる細胞質も存在し、これは不稔性を示さない。Normal 型と CMS-T 型細胞質は近似しており、同じ M グループに区分され、CMS-S 型細胞質とは明確に区別される<sup>10,11)</sup>。CMS-S 型は *Allium x proliferum* に由来し、CMS-T 型および Normal 型は *A. vavilovii* に由来することが示唆されている<sup>12)</sup>。

前述の通り、タマネギでは CMS が F<sub>1</sub> 品種作出に利用されることから、細胞質タイプを判別することは重要である。これら 3 つのタイプが最初に区別されたのは、ミトコンドリアゲノムを用いた RFLP 分析で、CMS-S 型、CMS-T 型、Normal 型それぞれに特異的なパターンが生じることが示された<sup>10)</sup>。しかし全ゲノムの決定は、CMS-S 型で 2016 年に 1 種報告されているのみである<sup>13)</sup>。我々は、CMS-S 型を持つ品種「もみじ 3 号」と Normal 型を持つ 1 品種のミトコンドリアゲノムを決定し、両者を比較した。また雄性不稔原因遺伝子の探索を行い、転写産物および翻訳産物について調査した。

## 2. タマネギ 2 系統のミトコンドリアゲノムの決定

植物のミトコンドリアゲノムは、葉緑体のそれと比べて格段に複雑である。そのサイズは種によって大きく異なり、*Brassica hirta* では 208kbp、巨大なミトコンドリアゲノムを持つ *Silene conica* では 11.3Mbp と幅広い。ほとんどの植物ミトコンドリアゲノムはマスターサークルとよばれる 1 つのサークルとして表されることが多いが、複数のサークルとして存在するものや、リニア構造を取るものも報告されている<sup>14)</sup>。また、リピートを多く含み、それを介して組換え分子が多数存在することも、特徴として挙げられる。

図 1 は、我々が決定した CMS-S 型の「もみじ 3 号」および Normal 型のミトコンドリア DNA を制限酵素で処理したバンドパターンである。バンドパターンの違いから、「もみじ 3 号」と Normal 型では明らかにミトコンドリアゲノムの構造が異なることがわかる。この 2 つのミトコンドリア DNA を精製し、Roche454 による次世代シーケンスを行って全ゲノムの配列を決定した (図 2)。

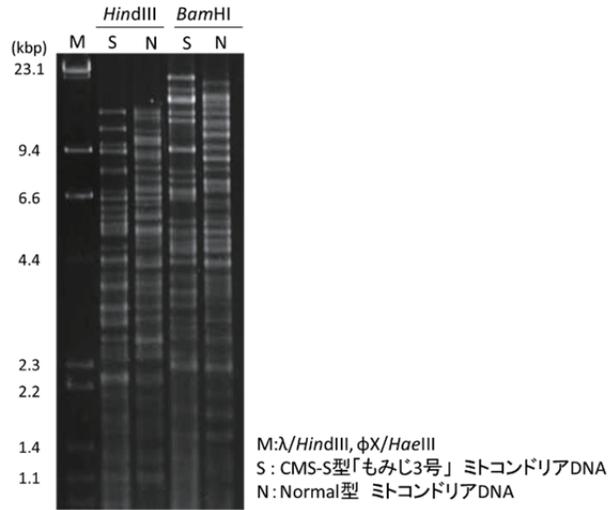


図1 ミトコンドリア DNA の制限酵素切断パターン

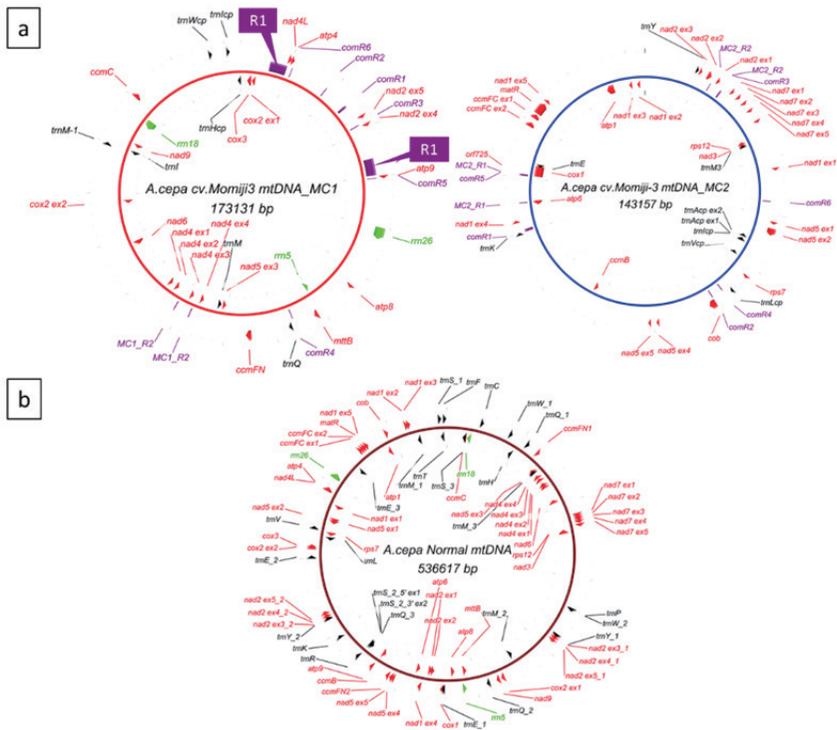


図2 「もみじ3号」(a) および Normal 型 (b) のミトコンドリアゲノム

「もみじ3号」のミトコンドリアゲノムは、NGSの結果からは、MC1、MC2の2つのサークルとして存在することが示された（図2a）。MC1には3.5kbのダイレクトリピートR1が存在する。このリピートを介して、2つのサークルに分かれた状態で存在することが予想された。実際の構造を確かめるため、「もみじ3号」のミトコンドリアゲノム配列中に切断箇所が少ない制限酵素、*AsiSI*と*SfiI*で切断し、パルスフィールド電気泳動（PFGE）を行った（図3b, c）。その結果MC2においてはNGSの配列から予測される切断パターン（図3a）と同一のバンドパターンが得られた。一方MC1は予測断片（図3a）より約30kb小さいバンドが得られた。これはR1を介して2つのサークルに分かれた片側、MC1\_Lのサイズと一致する。もう一方のサークル、MC1\_Sは上記酵素で切断されない（図3d）。PFGEでは実験の性質上、直鎖DNAしか泳動されないため、バンドが検出されなかったと考えられる。また泳動結果では約150kbpのバンドが検出された。これは材料に用いた単離ミトコンドリアに混在した葉緑体のゲノム（153kbp）と考えられる（図3d）。

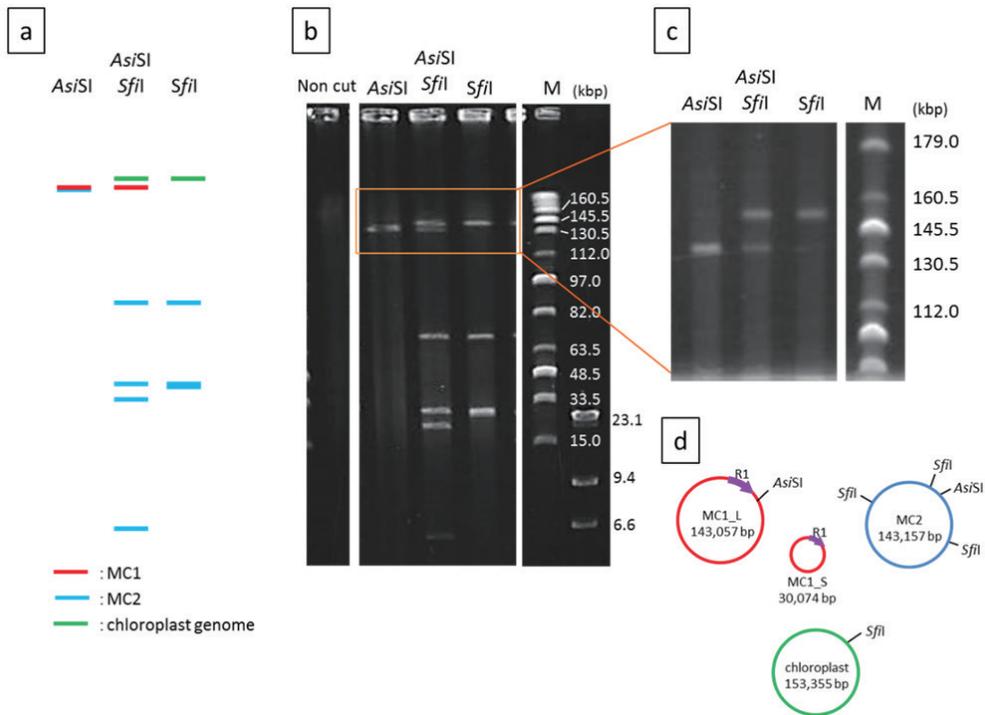


図3 「もみじ3号」のミトコンドリアゲノム構造の決定

a : 全ゲノム配列から予測される制限酵素切断パターン、b : PFGE 結果 (wide range)、  
c : PFGE 結果 (narrow range)、d : ミトコンドリアゲノムおよび葉緑体ゲノムの制限酵素切断位置

一方、Normal 型のミトコンドリアゲノムは次世代シーケンスの結果から 1 つのサークルとして描かれた (図 2b)。CMS-S 型ゲノムが全長約 310kbp であるのに対し、Normal 型は、ゲノムの全長がおよそ 537kbp で、「もみじ 3 号」のおよそ 1.7 倍になった。CMS-S 型ではゲノムに占めるリピート領域の割合は 1.5% であるのに対し、Normal 型では 30.7% がリピート領域となっており、両者のサイズ差はリピート領域の多さに起因する。Normal 型でも CMS-S 型と同様、これらのリピート領域が組換えを起こしている可能性がある。

### 3. CMS-S 型「もみじ 3 号」と Normal 型のミトコンドリア遺伝子の比較

「もみじ 3 号」と Normal 型のミトコンドリアゲノムのタンパク質をコードする遺伝子領域の違いを表 1 にまとめた。

表 1 CMS-S 型「もみじ 3 号」と Normal 型の間で変異のあったミトコンドリア遺伝子

Gene	Position ( Momiji-3)	Momiji-3	Normal	Description of differences
<i>atp1</i>	81	A	C	Synonymous substitution
<i>atp6</i>	92	A	C	Non-synonymous substitution
<i>ccmFC</i>	1,168-1,170	GGA	TCC	Non-synonymous substitution
<i>ccmFN1</i>	13-14	GA	TC	Non-synonymous substitution
	519-524	TGGAAG	----	InDels without causing frame shift
<i>cox1</i>	1,595	C	T	Non-synonymous substitution
( <i>orf725</i> )	1,604-2,151			Low homology within this region
<i>cox3</i>	52-58	GTATC	----	InDels causing frame shift
<i>nad1</i>	819-820	GA	TC	Non-synonymous substitution
<i>nad4</i>	297	T	G	Non-synonymous substitution
<i>nad5</i>	1,314	A	C	Synonymous substitution
<i>nad6</i>	720-729	GACCT	----	InDels causing frame shift
<i>rps7</i>	268-269	GA	TC	Non-synonymous substitution
	360	A	C	Non-synonymous substitution

合計 14 ヶ所の塩基置換または InDel のうち、アミノ酸置換も伴うものは 12 ヶ所あり、特に *cox1*、*cox3*、*nad6* でフレームシフトを伴う大きな違いが見られた。また、それぞれの系統で RNAseq による転写産物の情報も取得し、*cox1*、*cox3*、*nad6* のコード領域に対する転写領域を推定した (図 4)。

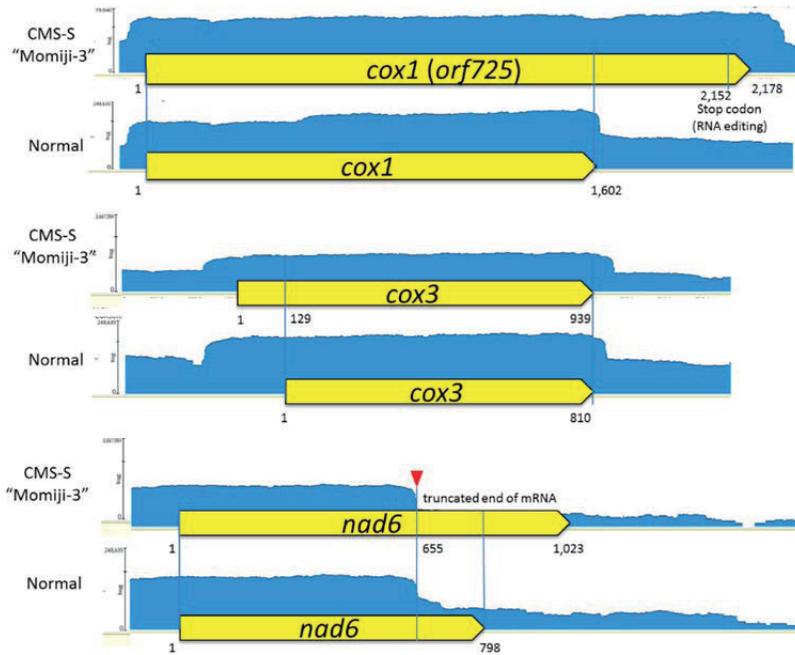


図4 *cox1*、*cox3*、*nad6* のコード領域および転写の比較

2009年にKimらが報告したように<sup>15)</sup>、*coxI*ではCMS-S型はNormal型における終止コドンにあたる位置以降の配列が、Normal型と異なっており、C末端側が184aa長く、全長725aaとなっている(*orf725*)。転写産物はそれぞれのコード領域をカバーしているため、タンパク質もサイズが異なることが考えられた。*cox3*では、5'側に5bpのInDelがある。これによって引き起こされるフレームシフトによって、CMS-S型のN末端がNormal型より43aa長くなっている。一方、転写領域はどちらも同じ位置から開始していた。*nad6*ではInDelによりCMS-S型のC末端が75aa長くなる。しかし、転写領域はどちらもコード領域内で終結しており、その位置は開始コドンから655bpの位置で共通だった。*nad6*はシロイヌナズナでもストップコドンの上流で転写終結が起きており、ユニークな転写終結システムが存在することが示唆されている<sup>16,17)</sup>。転写終結位置がCMS-S型とNormal型どちらもほぼ同じ位置であることから、タマネギにおいても同様の転写システムが機能していると考えられる。次に、Normal型と、CMS-S型で回復遺伝子*Rf*を持つ回復系統と持たない不稔系統の3系統に対し、CMSの原因遺伝子の可能性が考えられる上記の3つの遺伝子について、Western Blottingを行った(図5)。

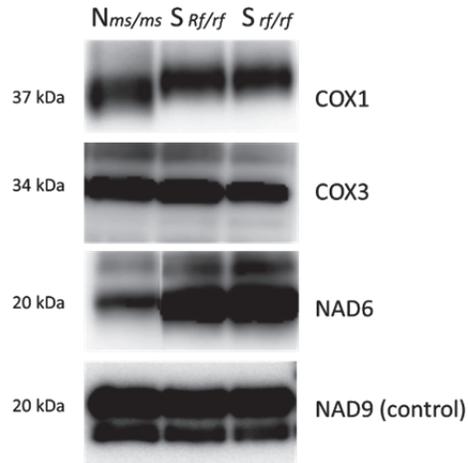


図5 *cox1*、*cox3*、*nad6* の翻訳産物の比較

Normal型とCMS-S型の間では、COX1は検出されたバンドの位置に差があることから、CMS-S型の方がタンパク質の分子量が大きいことが示された。これは図4で示した転写産物の差から予測される内容と一致する。一方、COX3、NAD6ではバンドの位置に差は見られなかった。COX3の翻訳フレームは、CMS-S型の方が大きいものの、最初の開始コドンを使用されずNormal型の開始コドンと同じ位置から翻訳されていると考えられる。NAD6も同様に、両者とも同じ位置で転写終結しているため、タンパク質の大きさには差がないと考えられる。しかし、controlに用いたNAD9のバンドで示されるように、この実験ではほぼ等量のサンプルをロードしたにもかかわらず、Normal型とCMS-S型間で発現量に差が見られることは興味深い。

一方、CMS-S型における回復系統と不稔系統の間では、3つのタンパク質で大きさや量に差は見られなかった。つまり、雄性不稔性にこれら3つの遺伝子は関係がないことが示唆された。ただし今回の実験では、鱗葉球（タマネギ可食部）から単離したミトコンドリアのタンパク質を使用している。*Rf*遺伝子が器官特異的に発現している可能性を考え、花やつぼみといった花器官を用いた実験を行う予定をしている。また、今回は既知遺伝子に集中して解析を行ったが、CMSの原因遺伝子を同定するためには、新規ORFやコード領域外の転写状況、さらにBN-PAGEによりミトコンドリアの呼吸鎖複合体を形成するタンパク質を網羅的に調べるなど、焦点を広げ解析する必要がある。

## 謝 辞

本研究は京都産業大学先端科学技術研究所 植物ゲノム科学研究センターの研究活動によるものである。

## 参考文献

- 1) Khosa J. S., McCallum J., Dhatt A. S. and Macknight R. C. (2016) Enhancing onion breeding using molecular tools. *Plant Breeding* 135(1):9-20.
- 2) Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistics Database. 2019 <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- 3) Gurushidze M., Mashayekhi S., Blattner F. R., Friesen N. and Fritsch R. M. (2007) Phylogenetic relationships of wild and cultivated species of *Allium* section *Cepa* inferred by nuclear rDNA ITS sequence analysis. *Plant Syst. and Evol.* 269(3):259-269.
- 4) Kik C. (2002) Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species. CABI Publishing:81-100.
- 5) Jones H. A. and Emsweller S. L. (1936) A male-sterile onion. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 34:582-585.
- 6) Holford P., Croft J. and Newbury H. J. (1991) Structural studies of microsporogenesis in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.) containing the cms-S cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 82(6):745-755.
- 7) Holford P., Croft J. H. and Newbury H. J. (1991) Differences between, and possible origins of, the cytoplasm found in fertile and male-sterile onions (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 82(6):737-744.
- 8) Jones H. A. and Clarke A. E. (1943) Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 43:189-194.
- 9) Jones H. A. and Davis G. (1944) Inbreeding and heterosis and their relation to the development of new varieties of onions. *USDA Tech.Bull.* 874:1-28.
- 10) Schweisguth B. (1973) Étude d' un nouveau type de stérilité male chez l' oignon, *Allium cepa* L. *Ann. Amélior Plant* 23:221-233.
- 11) de Courcel A. G. L., Vedel F. and Boussac J. M. (1989) DNA polymorphism in *Allium cepa* cytoplasm and its implications concerning the origin of onions. *Theor. Appl. Genet.* 77(6):793-798.
- 12) Havey M. J. (2000) Diversity among male-sterility-inducing and male-fertile cytoplasm of onion. *Theor. Appl. Genet.* 101(5):778-782.
- 13) Kim B., Kim K., Yang T. J. and Kim S. (2016) Completion of the mitochondrial genome sequence of onion (*Allium cepa* L.) containing the CMS-S male-sterile cytoplasm and identification of an independent event of the *ccmFN* gene split. *Curr. Genet.* 62(4):873-885.
- 14) Chen Z., Zhao N., Li S., Grover C. E., Nie H., Wendel J. F. and Hua J. (2017) Plant mitochondrial genome evolution and cytoplasmic male sterility. *Critical reviews in plant sciences* 36(1):55-69.
- 15) Kim S., Lee E. T., Cho D. Y., Han T., Bang H., Patil B. S., Ahn Y.K. and Yoon M.K. (2009) Identification of a novel chimeric gene, *orf725*, and its use in development of a molecular marker for distinguishing among three cytoplasm types in onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118(3):433-441.
- 16) Raczynska K. D., Le Ret M., Rurek M., Bonnard G., Augustzniak H. and Gualberto J. M. (2006) Plant mitochondrial genes can be expressed from mRNAs lacking stop codons. *FEBS Lett* 580(24):5641-5646.
- 17) Forner J., Weber B., Thuss S., Wildum S., and Binder S. (2007) Mapping of mitochondrial mRNA termini in *Arabidopsis thaliana*: t-elements contribute to 5' and 3' end formation. *Nucleic Acids Res.* 35(11):3676-3692.

# Research of onion mitochondrial genome

Mai TSUKATANI (TSUJIMURA)

## Abstract

There are some cytoplasm types in onion (*Allium cepa*), and one of them causes cytoplasmic male sterility; CMS-S type. In this research, we determined mitochondrial genome of CMS-S type onion “Momiji-3” using next generation sequencing, and then we showed that the structure was divided into three circles with component size of 143kbp, 143kbp, and 30kbp, respectively. In addition, we also determined the mitochondrial genome of Normal type which doesn’t exhibit sterility and compared two mitochondrial genomes. Differences appeared in the gene coding regions of *cox1*, *cox3* and *nad6* between the CMS-S and Normal types. Results from transcripts data analysis and Western Blotting suggested that there were differences in size of COXI and amount of NAD6 between CMS-S type and Normal type.

**Keywords:** *Allium cepa*, Cytoplasmic male sterility, Mitochondrial genome, Next generation sequencing, Pulsed field gel electrophoresis