

細胞質置換コムギをモデルとした核と ミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究

堀 川 明 彦¹
寺 地 徹

1. はじめに

高等植物が正常に生育するためには、核及びオルガネラ遺伝子の調和のとれた発現が必要である。オルガネラで機能するタンパク質のほとんどが核の遺伝子産物であることに加え、例えば、葉緑体の遺伝子の転写制御が核ゲノムにコードされているシグマ因子によって行われるなど、核ゲノムにコードされた遺伝子によるオルガネラの制御、換言すれば、核からオルガネラへの情報伝達をよく研究されており、すでに様々な事実が明らかになっている。一方、細胞内のオルガネラを取り巻く環境に何らかの変化が生じた場合、ある特定の核遺伝子の発現が変動することが知られている。これはオルガネラから核へ向かう情報伝達の経路が存在することを示すものであり、このような遺伝子発現制御をレトログレード制御と呼ぶ。ミトコンドリアのレトログレード制御については動物や酵母を用いた研究が先行しているが、近年、高等植物でもストレス条件下や生育段階に応じた、ミトコンドリアから核への情報伝達の事例が報告されてきている。

さて、コムギ属に近縁な野生植物であるエギロプス属植物の細胞質ゲノムを、連続戻し交雑によりパンコムギの核に導入すると、雄性不稔をはじめとする様々な表現型の変化が観察される。その中で、*Ae. mutica* の細胞質ゲノムはパンコムギに与える表現型の変化に基づき、出穂遅延を引き起こす T 型と、細胞質雄性不稔を引き起こす T² 型の 2 種に分類される。これまでの研究結果から、T 型と T² 型におけるオルガネラゲノムの違いはミトコンドリアゲノムの分子構成の違いによることが示されており、本プロジェクトは、両細胞質の表現型の原因となるミトコンドリア遺伝子の特定を目的としている。昨年度の報告では、網羅的サザン解析によるミトコンドリアのゲノム構造比較の結果を示した。その中で我々は、*atp1-9*、*cox1*、*rrn18+5* の 3 つの遺伝子領域に系統特異的な変異遺伝子が存在することを明らかにし、これらを原因遺伝子の有力な候補と考え詳細な解析を進めていることを示した。一方、コムギの細胞質置換系統におけるミトコンドリアのレトログレード制御、すなわちパンコムギのミトコンドリアゲノムが *Ae. mutica* のものに置き換わることにより、核遺伝子の発現がどのように変化するかについては、全く調査されていなかった。そこで今年度は、コムギ 22K マイクロアレイを用いて、*Ae. mutica* 細胞質置換系統にみられる核遺伝子の発現変動を網羅的に調査した。以下その

¹ 京都産業大学工学部嘱託職員

結果を報告する。

2. 材料及び方法

2.1. 植物材料

本研究に用いた植物材料を表 1 に示す。普通系パンコムギ Chinese Spring (以下 C52 系統) と、Chinese Spring の核に *Ae. mutica* の T 型細胞質を導入した系統 (以下 C13 系統)、同じく Chinese Spring の核に T² 型細胞質を導入した系統 (以下 C14 系統) を実験材料として用いた。なお C13 系統は、C52 系統並びに C14 系統と比べて出穂遅延を示し、C14 系統は雄性不稔を示すことがわかって

表 1 実験に用いた植物材料

Alloplasmic and euplasmic lines of common wheat

Code	Plasma type ¹⁾	Nuclear genome ²⁾	Cytoplasm donor		
			Group or Section	Species	Ploidy
C13	T	CS	Amblyopyrum	<i>Ae. mutica</i>	2 x
C14	T ²	〃	〃	〃	2 x
C52	B	〃	Dinkel	<i>T. aestivum</i>	6 x

¹⁾ After Tsunewaki (1996)

²⁾ *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring

2.2. 実験方法

穂孕み期から出穂期にあたる各系統の穂から全 RNA を単離し、コントロールとして用いる C52 系統の RNA を Cy3 で、また比較する C13 及び C14 系統の RNA を Cy5 で、それぞれ標識して cRNA を合成した。今回の実験にはコムギ EST データベースを基に作成された、スポット数 21939 のマイクロアレイを用いた。C52 と C13、C52 と C14 系統の標識 cRNA をそれぞれ競合的にハイブリダイズさせ、シグナル強度を測定後、厳しい基準で変動した遺伝子リストを作成した。なお、マイクロアレイの操作は北海道システムサイエンスに委託して行い、その他の分子生物学的実験は定法により行った。

3. 結果及び考察

3.1. *Ae. mutica* 細胞質置換コムギの遺伝子発現プロファイリング

マイクロアレイを用いたハイブリダイゼーション実験において、C13、C14 系統で発現量が 2 倍以上変化した遺伝子数を表 2 に示す。C52 系統と比較して、2 倍以上発現が変動した遺伝子は C13 系統ではアレイにスポットされている遺伝子全体の 1.5%、C14 系統では 5.4% となり、C13 系統と比較して C14 系統で、より多くの遺伝子の発現が変動していることが明らかとなった。C52 系統と比較して、C13 及び C14 系統で発現量に差が見られた上位 10 遺伝子を表 3 に示す。発現変動を示した遺

表 2 細胞質置換系統で発現量に差が見られた遺伝子数

	Up-regulated genes				Down-regulated genes				Differentially expressed genes (%)
	2-3	3-5	>5	Total	2-3	3-5	>5	Total	
C52 vs. C13	114	46	38	198	68	21	38	127	1.5
C52 vs. C14	347	190	148	685	291	132	73	496	5.4

表 3 細胞質置換系統で発現量に差が見られた上位 10 遺伝子

Fold change	Probe name	Description (BLASTx search result)	Fold change	Probe name	Description (BLASTx search result)
C13 up-regulated			C14 up-regulated		
44	w2525	matR	79	w9393	17 kDa class I small heat shock protein
32	rwhf5p10	No hits found	77	w2656	putative 22.0 kDa class IV heat shock protein
25	w13328_2	Serine/threonine-protein kinase	54	w2525	matR
24	w2825	No hits found	50	w446	Helix-turn-helix family protein, expressed
23	whf10o05	No hits found	45	w9951	putative heat shock protein, hsp40
21	rwh31n06	expressed protein	42	w2200	Hsp70 protein
19	w1783	Glycosyl hydrolase family 1 protein	41	w7940	putative 16.9 kDa class I heat shock protein
19	w12692	expansin EXPB4 cell wall protein	37	w2559	expressed protein
17	w1947	No hits found	34	w571	putative heat shock protein, hsp40
17	w12955	Pectinesterase family protein	34	w2515	No hits found
C13 down-regulated			C14 down-regulated		
72	w11073	heat shock protein HSP26	19	w14735	putative RAFTIN1 protein
54	w2656	putative 22.0 kDa class IV heat shock protein precursor	15	rwhh2j05	putative cytochrome P450
33	w12683	putative 16.9 kDa class I heat shock protein	12	w4563	S-locus receptor-like kinase RLK14
29	w13	small heat shock protein HSP17.8	11	whf1370	putative protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
28	w3609	Chain D, Crystal Structure And Assembly Of An Eukaryotic Small Heat Shock Protein	10	w10075	No hits found
28	w5660	putative 16.9 kDa class I heat shock protein	10	w10133	expressed protein
25	w8442	heat shock protein 16.9.	10	rwhh26i19	cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylase-like protein
24	w2625	putative 16.9 kDa class I heat shock protein	9	w5495	subtilase family protein
21	w2404	dnaK protein, expressed	9	w14068	putative serine protease
20	w1872	dnaK protein, expressed	9	w4643	NAD dependent epimerase/

伝子の中から対応する EST クローンをランダムに選抜し、リアルタイム RT-PCR により mRNA の定量を行ったところ、マイクロアレイと同様の発現変動が認められ、データの信頼性を確認することができた。C13 系統では、ミトコンドリアゲノムにコードされている *matR* 遺伝子が最も高い発現上昇を示し、発現低下を示した上位遺伝子のほとんどがストレスタンパク質をコードするものであった。一方 C14 系統では、多くのストレスタンパク質遺伝子の発現が上昇し、さらに C13 系統同様、ミト

コンドリア *matR* 遺伝子の発現も著しく上昇していた。また C14 系統では、BURP ドメインをコードする *RAFTIN* 様遺伝子の発現が最も低下していた (19 倍の発現変動を示した)。

図 1 は、C52 系統と比較して、C13 系統で 4 倍以上、また C14 系統で 5 倍以上の発現変動を示した遺伝子を機能に基づき分類したものである。C13 系統で発現が上昇した遺伝子には、代謝、生合成に関わる遺伝子や組織、器官の発達、シグナル伝達に関わる遺伝子などが含まれており、発現が低下した遺伝子には、ストレスタンパク質が多く認められた。中でも興味深いのは、コムギの花成調節遺伝子である *FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子の発現が大きく低下していたことで (4.7 倍の発現変動)、これが C13 系統の出穂遅延の直接的な原因である可能性が考えられる。今後、*FT* 遺伝子を取り巻く他の花成調節遺伝子の発現について調査を行いたい。

一方、C14 系統で発現が上昇した遺伝子の多くは、ストレスタンパク質をコードするものであ

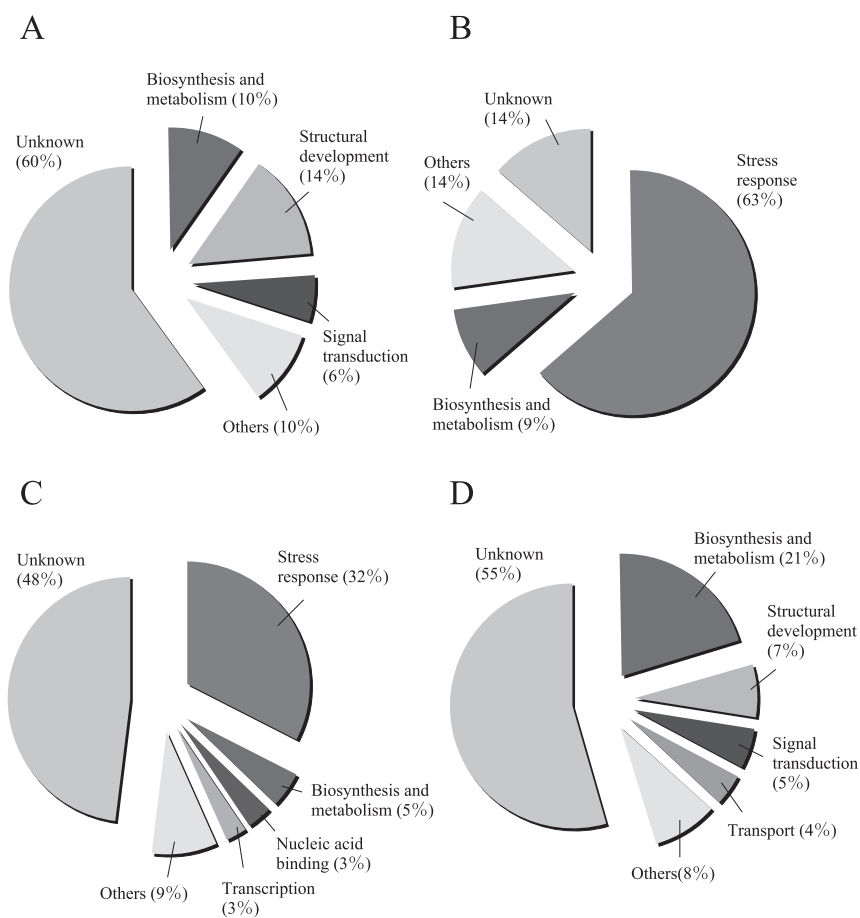


図 1 発現変動を示した遺伝子の機能に基づく分類

A : C13 up-regulated ; B : C13 down-regulated

C : C14 up-regulated ; D : C14 down-regulated

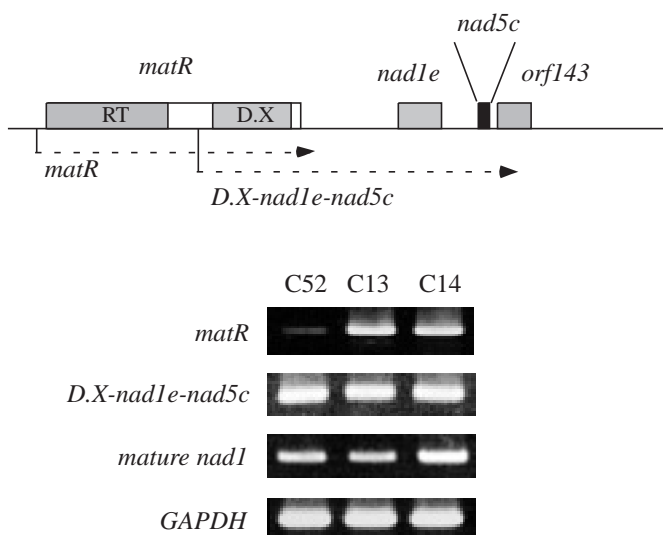


図2 細胞質置換系統における *matR* 遺伝子の発現

た。また発現が低下した遺伝子には、代謝、生合成関連、器官の発達やシグナル伝達、物質輸送などに関連するものがあり、C13系統と比較して様々な遺伝子の発現量低下が認められた。これら代謝、生合成関連の遺伝子の中には、脂質代謝やアントシアニン生合成に関わる遺伝子が含まれており、葯特異的な遺伝子である *RAFTIN* 遺伝子や、*RAFTIN* と同様に BURP ドメインをコードする遺伝子の発現が著しく低下していたことも特徴的であった。なおこの *RAFTIN* は、イネやコムギの花粉発達初期段階で、タベート細胞から脂質などの物質を花粉小細胞へ運搬するために必須な遺伝子と考えられている。したがって C14 系統では花粉壁を構成するために必要な物質が十分に供給されないまま、未成熟な花粉が発達している可能性が考えられる。BURP ドメインをコードする遺伝子はいくつかの植物から単離されているが、発現パターンは様々であり、本質的な機能は同定されていない。今回、*RAFTIN* 以外にも、BURP ドメインを持ち C14 系統で著しい発現低下を示した遺伝子が同定された。これらの遺伝子の機能についても今後解析を進めていく予定である。

3.2. 細胞質置換系統におけるミトコンドリア *matR* 遺伝子の発現上昇

今回のマイクロアレイ実験で、ミトコンドリアゲノムにコードされている *matR* 遺伝子の発現が、C13、C14 両系統で著しく上昇していることが明らかになった。この *matR* 遺伝子は、高等植物のミトコンドリアゲノムのグループ 2 インtron 内に高度に保存されており、RNA スプライシングに関与する遺伝子と考えられている。ではなぜこの遺伝子の発現が細胞質置換系統で上昇したのか、非常に興味を持たれた。そこでまず、リアルタイム PCR による *matR* 遺伝子コピー数の定量を行った。その結果、アンプリコンの増幅パターンに大きな差は認められず、発現量の差は *matR* 遺伝子コピー数の差に起因するものではないとの結論を得た(データ未掲載)。

ところで、この *matR* 遺伝子のコード領域は、RT ドメインと D.X ドメインにより構成される。また遺伝子コード領域内にもプロモーターが存在し、この領域から 2 種類の転写産物 (*matR*, *D.X-nadI* *e-nad5c*) が生じるとされる。そこで 2 種の転写産物それぞれをターゲットとした RT-PCR を行ったところ、*matR* 転写産物でのみパンコムギと細胞質置換系統間で発現量に違いが認められた (図 2)。パンコムギと細胞質置換系統で、*matR* 遺伝子 5' 側プロモーター領域の塩基配列に違いは見出されないので (データ未掲載)、今回の結果から、なぜ RT 及び D. X 両ドメインを持つ *matR* 転写産物のみ、細胞質置換系統で発現が上昇しているのかはわからなかった。これも今後の研究課題である。

4. おわりに

今回初めて、マイクロアレイ解析を細胞質置換系統に適用することで、C13 及び C14 系統の表現型変化に関わると思われる核遺伝子をいくつかスクリーニングすることができた。今後は器官や生育ステージ別に発現パターンを調査する必要がある。また二次元電気泳動によるプロテオーム解析の手法を用いながら、RNA 及びタンパク質レベルで表現型変化に関わる遺伝子を同定していきたい。

5. 謝辞

本実験の遂行には、谷口和也氏 (本学工学研究科生物工学専攻修士 1 年)、中西健太氏 (同上) の協力を得た。ここに深謝の意を表す。また本研究で用いたコムギ EST マイクロアレイは一部 NBRP の資金により作製された。NBRP、及びマイクロアレイの分譲を受けた荻原保成教授、川浦香奈子博士 (横浜市立大学木原生物学研究所) に感謝する。