

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

連続戻し交雑法により育成された植物のことを、細胞質置換系統とよぶ。連続戻し交雑法は古典的な育種技術であり、この方法で育成された細胞質置換系統は、メンデルの遺伝法則の再発見者の1人として有名なコレンス (C. Correns) により、最初に植物細胞質の遺伝学的研究に用いられた。有性生殖をする高等植物では、核ゲノム (染色体) に存在する遺伝情報は両親から半分ずつ次代へ伝えられる。一方、細胞質は、多くの場合母性遺伝するので、そこに存在する遺伝情報 (細胞質ゲノム、プラズモン) も母方のみから子孫へ伝えられる。したがって何回もの連続戻し交雑を経て育成された細胞質置換系統では、花粉親からみて、細胞質が最初の交配に用いた母親 (細胞質提供親) のものに置き換えられた状態になっており、細胞質置換系統と花粉親とを比較することで、細胞質の遺伝的特性をそのまま表現型に反映させることができる。このことから細胞質置換系統は、植物の細胞質ゲノムの特性を研究するための格好の材料として利用されてきた。

コムギにおいても、コムギ (*Triticum*) 属とその近縁野生種であるエギロプス (*Aegilops*) 属植物の細胞質をパンコムギに導入した細胞質置換系統が、多数育成されており、両属植物のプラズモンが植物の表現型にどのような影響を与えるのか、体系的に調査されている¹⁾。これらプラズモンの研究は、両属植物の系統進化の解明に貴重な情報を提供してきた。また異種プラズモンによるパンコムギの表現型の変化には、雄性不稔や半数体誘発など実際の育種にも役に立ちそうな特性が多数観察されたことから、実用化を目指した研究の題材としても興味が持たれている。その中で我々は *Ae. mutica* の細胞質に注目した。*Ae. mutica* は、トルコ、シリアなど中東地域に生育する2倍性の野生種で、他の多くの *Aegilops* 種とは異なり他殖性である。この植物のプラズモンは、米国とブルガリアの研究者により、それぞれ独立にパンコムギに導入されたが、もともと同一種に由来するにもかかわらず、最初の交雑に用いた個体間でパンコムギに与える表現型に大きな違いがみとめられ、出穂遅延を生じる T 型と細胞質雄性不稔を引き起こす T² 型の2つに分類されるに至った。以前に行われたオルガネラ DNA の制限酵素分析では、T 型と T² 型の表現型の違いはミトコンドリア DNA 分子の構成の違いによることが示唆されているが、その機構の詳細は未だ解明されていない²⁾。そこで本プロジェクトでは、パ

¹ 京都産業大学工学部嘱託職員

ンコムギに表現型の変化をもたらす *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムの原因遺伝子の探索を目的に、種々の分子生物学的実験を行う。今年度はその第一歩として、網羅的サザン解析によるゲノム構造の比較、構造変異を示す遺伝子の塩基配列レベルの解析とノーザン解析による遺伝子発現の調査を行った。以下その結果を報告する。

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 (*T. aestivum*) の 1 品種 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、C14 系統と比べて出穂が遅延すること、C14 系統は雄性不稔を示すことが知られている。

2.2. 実験方法

実験方法の詳細は論文に譲るが、サザン解析は以下の方法で行った。すなわち C52, C13, C14 各系統から調製した全 DNA 約 10 µg を制限酵素 *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SalI* により完全消化し、これらをアガロースゲル電気泳動した後、ナイロンメンブレンに転写した。PCR により得たパンコムギミトコンドリアの各種遺伝子断片をプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーションを行い、Dig システムの発光系によりシグナルを検出した。またノーザン解析には、開花前の植物の葉及び穂から調製した全 RNA を使用した。これらの実験を含め、クローニング、シーケンシングなどの分子生物学的実験は、一般的な方法によった。

3. 結果及び考察

3.1. パンコムギミトコンドリア遺伝子プローブを用いた網羅的サザン解析

昨年、パンコムギ (*T. aestivum* cv. Chinese Spring) のミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定さ

表 1 実験に用いた植物材料

a) Alloplasmic and euplasmic lines of common wheat

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

¹⁾ After Tsunewaki (1996)

²⁾ *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring

れ、このゲノムは全長 452,528 bp の環状 DNA 分子であること、その中に 35 個のタンパク質をコードする遺伝子、3 種の rRNA 遺伝子、17 個の tRNA 遺伝子が含まれていることが明らかとなった³⁾。この情報をもとに、今ではパンコムギと、C13、C14 系統のミトコンドリアゲノムの間にどのような構造の違いが存在するのか、より詳細に調べることが可能となっている。そこで本研究ではまず、パンコムギのミトコンドリアゲノムに存在するタンパク質をコードする遺伝子の、ほぼすべてを網羅したプローブによるサザン解析を行い、系統間のミトコンドリアゲノムの構造をより広範囲に比較した。図 1 に、28 種類の遺伝子プローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。また表 2 に、各遺伝子プローブを用いて得られたシグナルから求めた、系統間で同じサイズを示す制限断片のパーセンテージを掲げる。得られた結果をまとめると、C13、C14 系統のミトコンドリアゲノムには、リファレンスとした C52 系統も含めて 3 系統すべてに共通な遺伝子領域、C13、C14 系統間で共通であるが C52 系統とは異なる領域、C13 と C14 系統間で構造の異なる領域が存在することが示された。例えば *nad1* 遺伝子などでは、C13 と C14 系統間、また C52 と C13、C14 系統間のいずれにおいても表中で 100% と表記されている。したがってこの遺伝子を含むゲノム領域は、3 系統すべてにわたって共通であると推測される。一方で、*atp1*、*cox1*、*rrn18+5* 遺伝子領域では、C52 と C13、C14 系統間だけではなく、C13 と C14 の系統間にも遺伝子コピー数の違いを示唆する顕著なハイブリダイゼーションシグナルの違いが認められた（データ未掲載）。そこで、本研究ではこの 3 遺伝子領域に注目し、その全体的な構造と塩基配列を各系統間で比較した。

3.2. *atp1*、*cox1*、*rrn18+5* 遺伝子領域のシークエンシング

図 2 に、各遺伝子領域の構造の模式図を示す。*atp1*、*cox1*、*rrn18+5* 遺伝子領域の塩基配列の決定により、次のような事実が明らかになった。1) C14 系統の *atp1* 遺伝子下流の *atp9* 遺伝子、C13 系統の *cox1* 遺伝子内にはそれぞれ配列の分岐点があり、分岐点を持つ系統では、それぞれ他系統には無い組換え型のオープンリーディングフレーム (*orf*) を組むことができる。2) *Ae. mutica* の *cox1* 遺伝子の上流には、パンコムギには無い *orf260* 遺伝子が存在する（なお、これは C13、C14 系統に共通して認められる）。3) C14 系統の *rrn18+5* 遺伝子領域には、3' 部分が他の配列と置き換わった異常な *rrn18* 遺伝子が存在する。

一般に、細胞質雄性不稔を示す植物のミトコンドリアゲノム上には、既知のミトコンドリア遺伝子配列を部分的に含む、特異的なキメラ遺伝子が存在する。さらに、トウモロコシの NCS 突然変異体の生育異常は、ミトコンドリア遺伝子の欠損、またはキメラ遺伝子による正常型遺伝子の転写阻害が原因と考えられており、ミトコンドリア遺伝子の構造変異と雄性不稔以外の異常な表現型との関連が示唆されている。したがってこの 3 遺伝子領域の構造変異により生じた新たな *orf* は、雄性不稔及び出穂遅延を引き起こす原因遺伝子の有力な候補と考えられた。

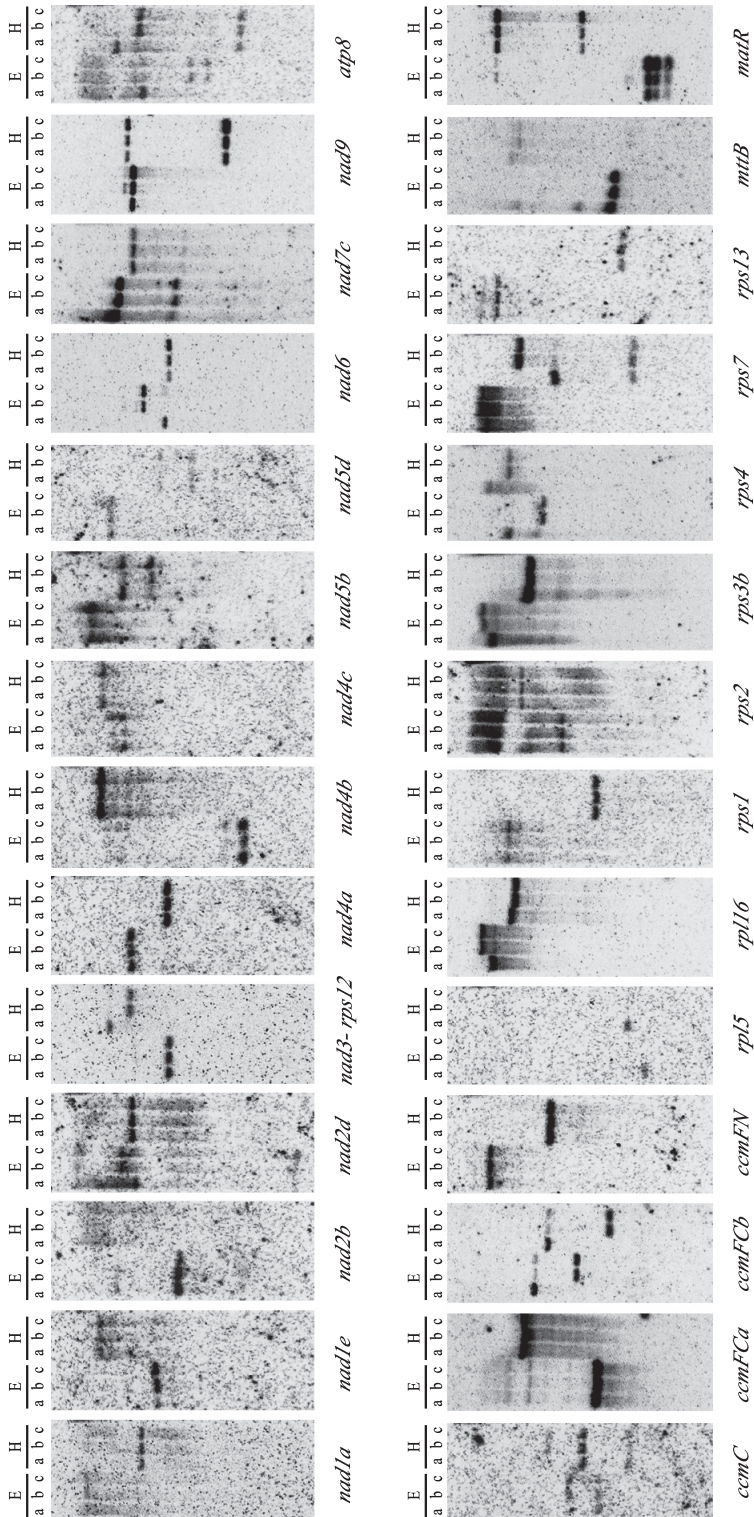


図1 ミトコンドリア遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション
EはEcoRI, HはHindIIIサイトを, aはC52, bはC13, cはC14系統を示す。

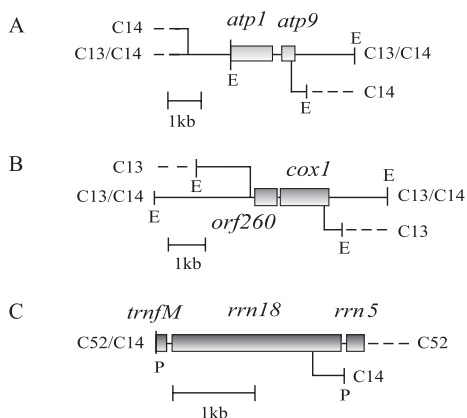


図2 *atp1*, *cox1*, *rrn18+5* 遺伝子領域の構造
Aは*atp1*, Bは*cox1*, Cは*rrn18+5* 遺伝子領域を, EとPはそれぞれ *EcoRI*, *PstII* サイトを示す。

3.3. 変異遺伝子領域のノーザン解析

前述のサザン解析とシーケンシングの結果, *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムにはパンコムギには無い4種類のキメラ遺伝子が存在することが初めて明らかになった。これらの変異領域に存在する各遺伝子の発現を調査するため, 各系統から調製した全RNAを用いノーザン解析を行った(図3)。その結果, *atp1* および *rrn18* 遺伝子では, ハイブリダイゼーションシグナルに違いは見出されず, 両遺伝子領域に存在するキメラ遺伝子は発現していないこと, キメラ遺伝子の存在が正常型遺伝子の発現パターンに影響を与えていないことが示された。一方, *cox1* 遺伝子に関しては, 細胞質置換系統で, パンコムギと比べmRNAの蓄積量が著しく低下していることがわかった。*orf260* 遺伝子の発現パターンとの比較より, 細

表2 各種ミトコンドリア遺伝子プローブを用いたサザン解析の結果

Probe	Common fragments (%)		Probe	Common fragments (%)	
	C13 vs. C14	C52 vs. (C13, C14)		C13 vs. C14	C52 vs. (C13, C14)
<i>nad1a</i>	100	100	<i>atp6</i>	100	31
<i>nad1e</i>	100	100	<i>atp8</i>	100	25
<i>nad2b</i>	100	100	<i>ccmC</i>	100	80
<i>nad2d</i>	100	50	<i>ccmFCa</i>	100	100
<i>nad3-rps12</i>	100	50	<i>ccmFCb</i>	100	0
<i>nad4a</i>	100	100	<i>ccmFN</i>	100	100
<i>nad4b</i>	100	100	<i>rpl5*</i>	-	-
<i>nad4c</i>	100	100	<i>rpl16</i>	100	0
<i>nad5b</i>	100	100	<i>rps1</i>	100	100
<i>nad5d</i>	100	100	<i>rps2</i>	100	100
<i>nad6</i>	100	50	<i>rps3b</i>	100	0
<i>nad7c</i>	100	100	<i>rps4</i>	100	0
<i>nad9</i>	100	100	<i>rps7</i>	100	25
<i>cob</i>	100	25	<i>rps13</i>	100	100
<i>cox1</i>	55	0	<i>matR</i>	100	100
<i>cox2</i>	80	90	<i>mttB</i>	100	0
<i>cox3</i>	100	0	<i>rrn18-rrn5</i>	46	25
<i>atp1-atp9</i>	67	0	<i>rrn26</i>	100	70
<i>atp4</i>	100	0			

* C13, C14系統ではシグナルが検出されず, *Ae. mutica* では*rpl5* 遺伝子は核ゲノムへ移行していると推測される。

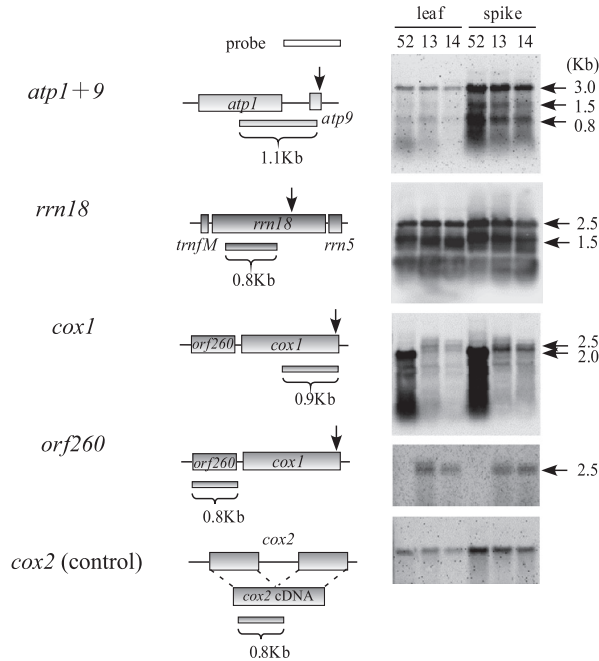


図3 変異遺伝子領域のノーザンハイブリダイゼーション

矢印は遺伝子内の分岐点を、52はC52、13はC13、14はC14系統を示す。

胞質置換系統では *cox1* 遺伝子上流に存在する *orf260* 遺伝子のプロモーターが、すぐ下流に存在する *cox1* 遺伝子の発現を抑制している可能性が考えられる。ただしこの現象は、C13、C14の両系統ともに生じていたので、それぞれの系統の表現型とどのように結びつくのか、現段階ではわからない。今後は、*cox1* 遺伝子のタンパク質レベルでの比較、また複合体IV (*cox1* 遺伝子の翻訳産物がサブユニットの一部を構成する)の活性の検討などを行い、*cox1* 遺伝子と表現型との関連を考えていく予定である。

なお、C13、C14両系統の *cox1* 遺伝子上流に発見された *orf260* 遺伝子は、パンコムギに雄性不稔性を付与することで知られる *T. timopheevi* 細胞質のミトコンドリアの原因遺伝子、*orf256* のホモログである。*orf260* 遺伝子の転写産物は雄性可稔のC13、雄性不稔のC14両系統の両方に観察されたが、翻訳産物の有無はまだ調べられていない。また *orf256* のホモログは、*Ae. mutica* だけではなく、他のいくつかのコムギ・エギロプス属植物にも存在するが、*T. timopheevi* もしくは *Ae. speltoides* 細胞質を持つ雄性不稔コムギの *orf256* を除けば、いずれも転写されない、もしくは転写はされるが翻訳されないことが知られており、コムギにおける *orf256/260* 遺伝子と雄性不稔形質との密接な関係が示唆される⁴⁾。したがって、何らかの理由で雄性不稔を示すC14系統にのみ *orf260* 遺伝子の翻訳産物が存在する可能性がある。今後、ウエスタン解析などタンパク質レベルの研究が必要と考えている。

4. おわりに

以上, *Ae. mutica* 細胞質を持つ細胞質置換系統 (コムギ) を材料に用いた, *Ae. mutica* とパンコムギのミトコンドリアの比較ゲノム解析の一端を報告した。*Ae. mutica* は希少な野生植物であり, この植物自体から大量のミトコンドリアや mtDNA を調製することは, 事実上不可能である。細胞質置換系統が育成されて初めて, この植物のミトコンドリアゲノムのユニークな特性が顕在化したことはもとより, もしこれらの細胞質置換系統が無ければ, *Ae. mutica* のミトコンドリアの研究を効率よく進めることは困難であろう。植物オルガネラ研究における細胞質置換系統の有効性を改めて提唱したい。現在, ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の助けを借りて, 雄性不稔を示す C14 系統の増殖を図っている。この系統の種子増殖を終える次年度には, プロテオミクス的なアプローチも可能になるものと期待している。

5. 謝辞

本報告の結果は, 堀川明彦氏 (本学嘱託職員, 工学研究科生物工学専攻平成 18 年修了), 松崎準氏 (和研薬, 工学研究科生物工学専攻平成 16 年修了) の修士論文の結果を含む。本研究で用いた細胞質置換系統を最初に提供していただいた常脇恒一郎博士, その後, 植物育成の場を提供していただいている NBRP に感謝の意を表す。

参考文献

- 1) Tsunewaki K, Wang GZ, Matsuoka Y (1996) Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*. 1. Production of alloplasmic common wheats and their fertilities. *Genes Genet Syst.* 71: 293–311
- 2) Terachi T, Tsunewaki, K. (1986) The molecular basis of genetic diversity among cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops*. 5. Mitochondrial genome diversity among *Aegilops* species having identical chloroplast genomes. *Theor. Appl. Genet.* 73: 175–181
- 3) Ogihara Y, Yamazaki Y, Murai K, Kanno A, Terachi T, Shiina T, Miyashita N, Nasuda S, Nakamura C, Mori N, Takumi S, Murata M, Futo S, Tsunewaki K (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 33: 6235–6250
- 4) Hedgcoth C, el-Shehawi AM, Wei P, Clarkson M, Tamalis D (2002) A chimeric open reading frame associated with cytoplasmic male sterility in alloplasmic wheat with *Triticum timopheevi* mitochondria is present in several *Triticum* and *Aegilops* species, barley, and rye. *Curr Genet* 41: 357–365