

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17380007
 研究課題名（和文） 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
 研究課題名（英文） Studies on the interaction between nuclear and mitochondrial genomes using alloplasmic lines of common wheat as a model.

研究代表者
 寺地 徹（TERACHI TORU）
 京都産業大学・工学部・教授
 研究者番号：90202192

研究成果の概要：コムギの近縁野生種である *Aegilops mutica* に、パンコムギの花粉を連続戻し交配して育成した「細胞質置換コムギ」には、正常な花粉が形成されないものや、穂の出る時期が遅くなるものがある。本研究は細胞質置換コムギの表現型に変化をもたらす原因を探ることを目的に、各種分子生物学的手法を用いて、ミトコンドリアの DNA、RNA 及びタンパク質の分析を行った。研究期間内に原因を特定するには至らなかったが、候補となる3つの遺伝子領域が見出された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,500,000	0	6,500,000
2006年度	3,800,000	0	3,800,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	15,600,000	1,590,000	17,190,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：パンコムギ、ミトコンドリア、雄性不稔、*Aegilops*、細胞質置換、マイクロアレイ、二次元電気泳動、Blue Native

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、過去に *Ae. mutica* も含めた細胞質置換コムギを材料に、ミトコンドリアゲノムの分子進化学的研究を行っていた。しかし当時の分子生物学的技術では、細胞質置換コムギのユニークな表現型がミトコンドリア遺伝子のどのような発現変化によりもたらされているか、深く追求することはできなかった。その後、植物のミトコンドリアゲノムの構造変異と雄性不稔とを関連づける研究は、

分子生物学的技術の発展とともに進展し、例えばトウモロコシの *T-urf13*、ペチュニアの *pcf*、ヒマワリの *orf522* など一部の植物ではミトコンドリアの原因遺伝子が特定された。また、ミトコンドリア遺伝子と核遺伝子の相互作用に関する研究は、主に雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子についてなされていて、2002年に、ペチュニア、ナタネ、イネで、相次いで稔性回復遺伝子が同定された。しかしパンコムギでは、雄性不稔の原因遺伝子、稔

性回復遺伝子ともに分子の実体は全くわかっていなかった。出穂性に関しては、パンコムギでは古典的なものから QTL 解析にいたるまで、多数の研究がなされていた。また、モデル植物のシロイヌナズナやイネを用いた、栄養・生殖成長の切り替えのタイミングに関する研究も多数行われていた。しかし、これらの研究はいずれもミトコンドリア遺伝子との関連を探ったものではなかった。

ミトコンドリアのゲノム解析の観点からは、当時、ゲノムの全構造が決められていた植物は、パンコムギ、イネ、シロイヌナズナなど数種にすぎず、マイクロアレイが利用できる植物も限定されていた。これらの点を総合的に勘案し、細胞質置換による表現型変化の分子機構を研究するには、細胞質置換コムギが材料として最適であると考え、本研究を実施した。

2. 研究の目的

コムギの近縁野生種である *Aegilops* 属植物の細胞質を、連続戻し交雑法によりパンコムギの核に導入した「細胞質置換コムギ」では、雄性不稔、半数体誘発、出穂の遅延などに代表される様々な表現型が観察される。この現象は、*Ae. caudata* 細胞質をパンコムギへ導入した最初の研究以来、半世紀も前から知られており、その後の体系的な研究により、細胞質型と表現型の関係が明らかにされている。またパンコムギでは、細胞質の遺伝情報を担う葉緑体とミトコンドリアのゲノムの全構造が解明されている。しかし *Aegilops* 属植物のオルガネラゲノムの構造変異とそれに起因する遺伝子発現の変化が、細胞質置換コムギにおける上記表現型とどのように結びつくのかは大きなブラックボックスであった。加えてオルガネラゲノムが *Aegilops* 属のものに置換されることにより、パンコムギの核の遺伝子発現がどのように変化するかについてはほとんど調べられていなかった。そこで本研究では、*Ae. mutica* の細胞質置換コムギを中心に、パンコムギにおける最新の分子生物学的リソースを活用することで、オルガネラ（特にミトコンドリア）の遺伝子と核遺伝子の相互作用について網羅的解析を行ない、細胞質置換コムギでみられる表現型の原因遺伝子を特定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

実験には *Ae. mutica* の細胞質を持つ細胞質置換コムギの 2 系統を用いた。

(2) 実験方法

ミトコンドリアゲノムの解析 (PCR、クローニング、シーケンシング、サザン・ノーザン解析)、ミトコンドリアタンパク質の各種電気泳動による解析、マイクロアレイによる核遺伝子の発現解析などの分子生物学的実験は、すべて定法によった。

4. 研究成果

前述のように本研究は、パンコムギに雄性不稔などの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を探索することを目的とする。そのため異なる 2 系統の *Ae. mutica* に由来する、2 種類のプラズモン (T 型と T² 型) のミトコンドリアゲノムを、DNA、RNA 及びタンパク質の各レベルで比較した。研究年度ごとの研究成果は以下の通りである。

(1) 初年度はまず、パンコムギと *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムの構成を、ほぼすべてのミトコンドリア遺伝子プローブを用いたサザン解析により調べた。その結果、T 型と T² 型間でコピー数の変化を伴う構造変異は、*atp1*、*cox1* 及び *rrn18+5* の 3 つの遺伝子領域に限られることがわかった。また、*rrn18+5* 遺伝子の構造解析を行なった結果、T² 型特異的なキメラ *rrn18* 遺伝子が見出された。さらに野生の *Ae. mutica* を用いた実験により、この *rrn18* 遺伝子領域の構造変異は、種内変異として既に野生植物に存在していることがわかった。なお、これら 3 つの変異領域に存在する遺伝子のノーザン解析を行ったところ、T 型と T² 型間に違いは認められなかった。しかし細胞質置換コムギの *cox1* 遺伝子の mRNA 蓄積量がパンコムギと比較して著しく低下していることがわかった。

(2) 次年度はまず、交配により、雄性不稔系統の種子を大量増殖し、後の分析に用いる植物材料を確保した。次に、細胞質置換によるレトログレード制御の可能性を探るため、各系統の穂ばらみ期〜出穂期の穂から調製した全 RNA と、パンコムギの EST 情報から作製されたマイクロアレイ (22K) とのハイブリダイゼーション実験を行った。その結果、雄性不稔系統では、発現量が 5 倍以上上昇した遺伝子が 148 個、低下した遺伝子が 73 個、出穂遅延系統では、5 倍以上上昇した遺伝子が 38 個、低下した遺伝子が 38 個同定された。この実験では、*Ae. mutica* の細胞質置換の影響で、RAFTIN などに代表される薬の発達に必要な核遺伝子の発現量が著しく低下するという、興味深い知見を得た。

またこの年度は、ミトコンドリアの単離方法、タンパク質の可溶化方法、及び電気泳動

の条件など、ミトコンドリアタンパク質を調製して二次元電気泳動で展開するための種々の実験条件を、得られた植物材料を用いて検討した。その結果、プラズモン特異的なスポットを再現性よく分離する実験条件が見いだされた。

(3) 2007年度は、雄性不稔を引き起こすT²型細胞質に見いだされた伸長型 *atp9* (以下 *e-atp9*)、*orf260* 両遺伝子について詳細な解析を行い、表現型との関連を探った。*e-atp9* はパンコムギの正常型 *atp9* と比べ *orf* の3'末が伸長しており、ゲノムの塩基配列からは翻訳産物のC末に6つの余分なアミノ酸を持つと予測される。しかし植物ミトコンドリアではRNA editingという現象が生じているので、転写産物そのものの配列を知る必要がある。そこで、出穂期の穂、実生の葉、根の各器官から *e-atp9* のcDNAクローンを多数単離し、RNA editingの頻度を調査した。その結果、ほとんどの転写産物が効率よくeditingを受けており、タンパク質レベルでは両者の違いがキャンセルされていることがわかった。興味深いことに、editingを受けていない *e-atp9* 転写産物が一部観察されたが、これらにはミトコンドリア転写産物の分解タグとして知られる poly-(A) が付加されていた。したがって poly-(A) タグを介した分解機構が E-ATP9 への翻訳を阻止するために機能している可能性が考えられた。

またこの年度は、*orf260* の詳細な機能を探るため、この遺伝子を大腸菌で発現させ、その特性について調査を行った。ORF260 全長を大腸菌で発現させたところ、このタンパク質は大腸菌に強い毒性を示した。*orf260* の発現部位やタグの位置を変更したコンストラクトを用いた実験から、N末端に存在する疎水性領域が大腸菌に致死性をもたらすことがわかった。

(4) 最終年度の2008年度は、これまでの各種実験を総括するとともに、今後の実験に備え、戻し交配による雄性不稔系統の維持・増殖を行った。具体的にこの年度は、パンコムギと細胞質置換コムギの黄化実生より単離したミトコンドリアタンパク質をIEF/SDS-PAGEにより展開し、その泳動プロフィールを詳細に比較した。その結果、細胞質置換により消失するタンパク質スポットが見出され、これがCOX2であることもわかった。次にこの結果をRNAレベルの解析と関連付けるため、黄化実生由来のRNAを用いてミトコンドリア *cox* 遺伝子群のノーザン解析を行った。その結果、*cox2* の mRNA 蓄積量に違いは見られなかったものの、*cox1* の mRNA の蓄積量が置換コムギ

では減少していること、置換コムギとパンコムギとの間で *cox3* の発現様式に差が認められることがわかった。また新しい電気泳動法 (Blue Native PAGE) を用いて、ミトコンドリアタンパク質複合体の比較解析を行った。その結果、COX2ポリペプチドを構成成分とする complex IV の存在比と活性の違いは見られず、ミトコンドリアの酸化的リン酸化 (OXPHOS) 経路を構成する他の酵素の活性にも違いは認められなかった。一方、Blue Native/SDS-PAGE 二次元電気泳動では、各系統間のミトコンドリアタンパク質の構成に新たな違いが見出され、将来の解析に展望を持たせる結果となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

- ① 堀川明彦、寺地徹 「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 2」、査読無し、京都産業大学総合学術研究所所報 5: 23-28. 2007
- ② 堀川明彦、寺地徹 「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 1」、査読無し、京都産業大学総合学術研究所所報 4: 23-29. 2006
- ③ Ogihara, Y., Yamazaki, Y. 他 12名 (5番目) 「Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome.」 査読有り、Nucleic Acids Res. 33(19): 6235-6250. 2005
- ④ 寺地徹 「細胞質置換コムギの育成-究極のオルガネラゲノム工学」、査読無し、蛋白質 核酸 酵素 50: 1808-1812. 2005

[学会発表] (計 11件)

- ① 小嶽佑太 ミトコンドリアゲノムの substoichiometric shifting に関わる可能性のあるダイコン *recA* 遺伝子のホモログの解析 日本育種学会第 115 回講演会 2009年3月28日 つくば国際会議場

- ② 谷口和也 *Ae. mutica* 細胞質置換コムギにおけるミトコンドリアレトログレート制御の解析 日本育種学会第114回講演会 2008年10月11日 滋賀県立大学
- ③ 中西健太 コムギ及びエギロプス属植物のミトコンドリア *orf260* 遺伝子の変異 日本育種学会第114回講演会 2008年10月11日 滋賀県立大学
- ④ 小嶽佑太 ミトコンドリアゲノムの substoichiometric shifting にかかわる可能性を持つダイコン *MutS* 遺伝子ホモログの解析 日本育種学会第114回講演会 2008年10月12日 滋賀県立大学
- ⑤ 谷口和也 細胞質置換コムギにみられるミトコンドリア *cox* 遺伝子群の構造変異とそれに伴う遺伝子発現変動の解析 日本育種学会第113回講演会 2008年3月29日 明治大学
- ⑥ Horikawa, A. Molecular analyses of alloplasmic lines of common wheat having *Aegilops mutica* cytoplasm. Int. Cong. Plant Mitochondrial Biol. 25-29, June, 2007, Nara
- ⑦ 堀川明彦 コムギ及びエギロプス植物のミトコンドリア *orf260* 遺伝子の分子的解析 日本育種学会第112回講演会 2007年9月23日 山形大学
- ⑧ 谷口和也 雄性不稔を示す *Aegilops mutica* 細胞質置換コムギに存在する伸長型ミトコンドリア ATP9 の発現解析 日本育種学会第111回講演会 2007年3月31日 茨城大学
- ⑨ 堀川明彦 コムギ 22K マイクロアレイを用いた *Aegilops mutica* 細胞質置換コムギにおけるミトコンドリアレトログレート制御の解析 日本育種学会第110回講演会 2006年9月23日 愛媛大学

- ⑩ 堀川明彦 パンコムギ mtDNA の全塩基配列情報に基づく *Aegilops mutica* ミトコンドリアゲノムの構造解析 日本育種学会第109回講演会 2006年3月30日 東京農工大学
- ⑪ 堀川明彦 コムギ・エギロプス属内で生じたミトコンドリア *rp15* 遺伝子の核ゲノムへの移行 日本育種学会第107・108回講演会 2005年8月21日 筑波大学

〔図書〕(計 1 件)

- ① 中村千春編著 化学同人 基礎生物学テキストシリーズ1「遺伝学」 2007年 pp. 145-158、pp. 175-186

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺地 徹 (TERACHI TORU)
京都産業大学・工学部・教授
研究者番号：90202192

(2) 研究分担者

山岸 博 (YAMAGISHI HIROSHI)
京都産業大学・工学部・教授
研究者番号：10210345
黒坂 光 (KUROSAKA AKIRA)
京都産業大学・工学部・教授
研究者番号：90186536

(3) 連携研究者

なし