

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380009

研究課題名（和文） ミトコンドリア・レトログレード・シグナリングの機構解明と育種的利用

研究課題名（英文） Molecular basis of mitochondrial retrograde signaling and its Application for breeding

研究代表者

村井 耕二（MURAI KOJI）

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：70261097

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアから発せられ、核遺伝子の発現に影響を及ぼすシグナルは、ミトコンドリア・レトログレード・シグナル（MRS）と呼ばれる。本研究では、近縁野生種ミトコンドリアゲノムを持つ細胞質置換コムギ系統における雄ずいの雌ずい化（pistillody）および花成（栄養成長から生殖成長への移行）遅延が MRS によって引き起こされることを明らかにした。本研究の成果は、ミトコンドリアゲノムを利用するミトコンドリア育種の展開につながる。

研究成果の概要（英文）：The intracellular signaling from mitochondria to the nucleus is called mitochondrial retrograde signaling (MRS). This study revealed that pistillody, homeotic transformation of stamens into pistil-like structures, and delayed flowering-time in the alloplasmic (cytoplasmic substitution) lines are caused by MRS. The knowledge about the MRS leads to develop the mitochondrial breeding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：コムギ・細胞質置換系統・ミトコンドリアレトログレードシグナリング（MRS）・pistillody・花成・稔性回復遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアから発せられ、核遺伝子の発現に影響を及ぼすシグナルは、ミトコンドリア・レトログレード・シグナル（MRS）と呼ばれ、酵母やほ乳動物では、Ca イオンやタン

パク質リン酸化酵素が関与することが明らかになってきている。植物にも MRS が存在すると考えられるが、その機構はほとんど何も分かっていない。

研究代表者は、近縁野生種 *Aegilops crassa*

細胞質を持つ細胞質置換コムギ系統において、雄ずいが雌ずいへとホメオティックに変化する現象 (pistillody) を見出した。これまでの研究により、この pistillody の原因遺伝子はミトコンドリアゲノムに存在する *orf260* であること、コムギ品種「Chinese Spring」(CS) 7B 染色体長腕 (7BL) には、pistillody 誘発を抑制する稔性回復遺伝子 (*Rfd1*) が存在し、*orf260* の発現を down-regulate することが明らかとなった。さらに、花の器官形成に関与するコムギ MADS ボックス遺伝子の解析により、pistillody の直接的原因は、細胞質置換系統において、雄ずい原基で雄ずい形成に関与するクラス B MADS ボックス遺伝子 (*WPI*, *WAP3*) の発現がなくなり、代わって雌ずい形成に関与する *YABBY* 遺伝子 (*TaDL*) が発現することであり、その結果、雄ずいが雌ずいへ転換することが明らかとなった。さらに、ミトコンドリアからこれら核遺伝子の発現を制御する MRS に関与すると思われるタンパク質リン酸化酵素遺伝子 *WPPK1* (*wheat pistillody-specific protein kinase 1*) を同定した。

一方、近縁野生種 *Ae. geniculata* 細胞質を持つ細胞質置換コムギ系統は、生育不良を引き起こすことなく、出穂が遅延することが知られている。この現象も MRS の一種と思われる。研究代表者は、コムギの出穂性 (花成) に関与する *WAPI/VRN1* 遺伝子を同定し、コムギの花成の分子機構解明に取り組んでいる。

本研究では、これら細胞質置換系統で誘発される pistillody および花成遅延現象を植物における MRS のモデルとし、その機構の解明と育種的利用を図る。

2. 研究の目的

(1) pistillody

① ミトコンドリア原因遺伝子 *orf260* と核の MADS ボックス遺伝子を結ぶ MRS に関与する遺伝子群の網羅的解析を行う。

② *orf260* の作用を抑制する核遺伝子 (*Rfd1*) の単離に向けた高密度マッピングを行う。

③ pistillody の育種的利用として、ハイブリッドコムギ品種を作出する。

(2) 出穂性改変

① 細胞質置換系統の出穂特性 (低温要求性、日長反応性、純粋早晩性) を調査する。

② ミトコンドリア原因遺伝子の作用により、花成関連遺伝子の何がどのように変化することにより、出穂性が変化するかを明らかにする。

③ この MRS を利用したコムギの出穂性の改変の実用性を検討するため、代表的な日本コムギ品種に野生種細胞質を導入し、出穂性を含む農業形質の詳細な解析を行う。

3. 研究の方法

(1) pistillody

① MRS に関する伝子群の網羅的解析
pistillody を抑制する *Rfd1* 遺伝子が存在する 7B 染色体長腕 (7BL) を両方欠失した正常細胞質「Chinese Spring」ダイテロソミック 7BS 系統 (CSdt7BS 系統; 正常雄ずい形成) および *Ae. crassa* 細胞質を持つダイテロソミック 7BS 系統 ((cr)-CSdt7BS 系統; pistillody 誘発) を用いる。両系統を圃場で栽培し、雌雄原基が分化する穎花分化期の幼穂から RNA を単離する。マイクロアレイ解析により、正常系統に比べて pistillody 系統で発現の増加するあるいは減少する遺伝子を特定する。研究代表者を含む日本コムギゲノミクス・コンソーシアムで作成した 38K のアジレント社コムギオリゴ DNA マイクロアレイを使用する。

② 核の pistillody 抑制遺伝子 (*Rfd1*) の単離に向けた高密度マッピング

Ae. crassa 細胞質を導入した「農林 26 号」細胞質置換系統 ((cr)-N26) (*Rfd1* なし) に「Chinese Spring」(CS) (*Rfd1* あり) を交雑した F₂ 集団を用いる。さらに、*Rfd1* 遺伝子近傍マーカーの開発のため、*Rfd1* の座乗する 7B 染色体欠失 CS 系統およびイオンビーム照射により作出した *Rfd1* 領域の欠失 (cr)-CS 系統 (pistillody による雄性不稔性を示す) を用いる。(cr)-N26/CS 交雑 F₂ 個体 (約 150 個体) の長日条件の温室における表現型 (pistillody の有無) を調査する。バルク法により *Rfd1* 近傍マーカーの開発を行う。マーカーには、ナショナル・バイオリソース・プロジェクト・コムギで収集開発の進められているマイクロサテライトマーカーおよび RAPD マーカー (SCAR/STS マーカー化) を用いる。

③ ハイブリッドコムギ品種の作出

研究代表者が最近育成した実用的優良 PCMS 系統 2 系統を用いる。花粉親候補として、パン用コムギ品種/系統 10 系統を用いる。PCMS 系統 2 系統および花粉親品種/系統を実験圃場で栽培し、人工交配により F₁ 種子を得る。これらの F₁ 系統は、次年度に評価を行い、組合せ能力を検定する。

(2) 出穂性改変

① 細胞質置換系統の出穂特性 (低温要求性、日長反応性、純粋早晩性) の調査 および

② 花成関連遺伝子の発現パターンの解析
細胞質置換系統として、*Ae. geniculata* 細胞質を導入した「Chinese Spring」((gen)-CS) を、コントロールとして、正常細胞質の CS を用いる。(gen)-CS および CS を 0、7、14、21、28、35 日間それぞれ低温処理 (4°C) し、その後、長日条件 (16 時間日長) 下の人工気象器で生育させ、到穂日数を調査する。35 日間低温処理区はもう 1 セット用意し、短日条件 (10 時間日長) 下で生育させる。一般的に、

低温処理の効果により到穂日数は減少し、一定の値になる。一定の値になった低温処理日数から低温要求性を、一定値になった到穂日数から純粋早晚性を、長日条件下と短日条件下における到穂日数の比から日長反応性を推定する。長日条件下および短日条件下の1、2、3葉期の植物体から葉をサンプリングし、*WAP1/VRN1*、*WFT*、*VRN2*の遺伝子発現をリアルタイムPCRによって調査する。

③ 代表的な日本コムギ品種における細胞質置換系統の作出と評価

(gen)-CS および「春よ恋」などの最近育成の優良日本コムギ品種 13 品種を用いる。実験圃場で栽培した(gen)-CS を母親に用い、日本コムギ品種の花粉を交配することにより F₁ 系統を作出する。次年度以降、連続戻し交配と戻し交配世代における花成遅延などの農業形質の調査を行う。

4. 研究成果

(1) pistillody

① MRS に関与する伝子群の網羅的解析

ミトコンドリア原因遺伝子 *orf260* と核の MADS ボックス遺伝子を結ぶ MRS に関与する遺伝子群を網羅的に同定するため、コムギ 38K マイクロアレイを用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、新規のカルモジュリン結合タンパク質遺伝子が pistillody 系統の幼穂で特異的に発現上昇することが明らかとなった。これは、MRS による pistillody 誘発にカルシウムイオンが関与することを示唆し、植物における MRS が動物における MRS と同様にカルシウムイオンが関与する可能性を初めて示した実験である。

一方、当初計画にはなかったが、ORF260 タンパク質の機能を解析するため、大腸菌系での発現プラスミドを構築し、ORF260 タンパク質の機能解析を行った。ORF260 タンパク質は、N 末端領域に 2 箇所膜貫通ドメイン(TM-domain)を有している、比較的小さなタンパク質である。また、その他の近縁野生種 *Ae. cylindrica* にも、*orf260* ホモログ遺伝子が存在するが、*Ae. crassa* 由来 *orf260* 遺伝子産物 (ORF260^{cr}) の TM-domain には、特異的アミノ酸配列が含まれていることから、この領域が pistillody に関連していると考えられる。ORF260 を大腸菌内で発現させたところ、*Ae. crassa* 由来 *orf260* 遺伝子産物が大腸菌は分裂阻害作用が大きかった (図1)。これらの特徴は、過去に細胞質雄性不稔 (CMS) 原因遺伝子として同定されてきた遺伝子産物とも類似している。CMS 原因遺伝子産物は、ミトコンドリア内膜に局在し、何らかの形で膜機能を阻害していると考えられており、pistillody 原因遺伝子産物 ORF260 もまた、膜機能を破壊し、ミトコンドリア内の環境を変化させることで MRS を生み出すと考えられ

る。この結果は、従来から知られていた CMS も本研究の pistillody も共通の MRS 機構が関与することを示唆し、今後のミトコンドリアゲノムによる植物の雄ずい形成機構の統一的な理解への道を開いた。

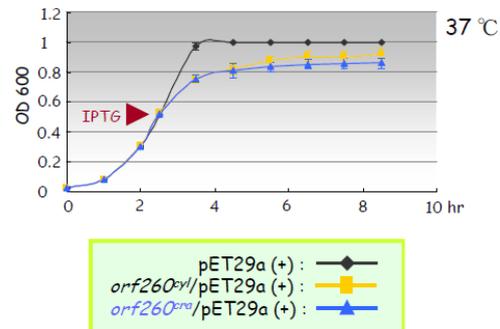


図1. ORF260 タンパク質は発現させた大腸菌の生育曲線

② 核遺伝子 (*Rfd1*) の単離に向けた高密度マッピング

orf260 の作用を抑制する核遺伝子 (*Rfd1*) の単離に向けた高密度マッピングのために、これまで作成した分離集団を基にしたバルク法を用いて、約 30 個の RAPD マーカーを開発した。さらに、両親系統で多型を示す約 20 個のマイクロサテライトマーカーを見出した。分離集団の長日条件下での表現型解析が困難であったため、高密度マッピングまでには至っていない。

③ ハイブリッドコムギ品種の作出

pistillody の育種的利用として、ハイブリッドコムギ品種を作出するため、これまで育成した優良 PCMS (日長感受性細胞質雄性不稔) 系統に花粉親を人工交配し、F₁ 植物を作出した。次年度以降、これらの F₁ 系統の農業形質の評価を行った。農業形質の評価は、2010 年、2011 年、2012 年の 3 か年間行った。3 か年の評価の結果、最優良花粉親を 1 品種にしぼることができ、優良な F₁ コムギ品種が育成できた。

北海道の長日条件下における F₁ 種子の採種方法の確立などの課題は残っているが、本研究で育成されたハイブリッドコムギは、本邦初のハイブリッドコムギ品種となり、コムギの国内生産量の増大、自給率のアップに寄与できると考える。

(2) 出穂性改変

① 細胞質置換系統の出穂特性 (低温要求性、日長反応性、純粋早晚性) の調査

人工気象器を用いた栽培試験の結果、細胞質置換系統は細胞質 (ミトコンドリア) ゲノム

の影響により低温要求性が増大し、かつ純粋早晩性が遅延することが明らかとなった（図2）。

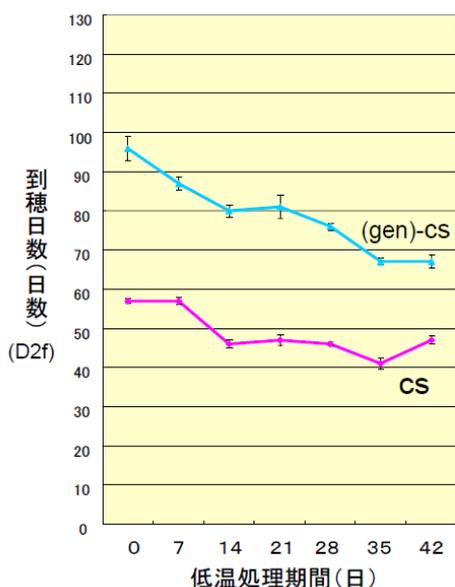


図2. 細胞質置換系統 ((gen)-CS) および正常系統 (CS) における低温処理期間と到穂日数 (第2葉展開から止葉展開までの日数) の関係

② 花成関連遺伝子の発現パターンの解析
遺伝子発現解析から、細胞質置換系統の花成遅延には、*VRN1* 遺伝子および *WFT* 遺伝子の発現上昇遅延が関与することが示唆された。人工気象器を用いた栽培試験結果と遺伝子発現解析結果を総合して、細胞質置換系統は細胞質（ミトコンドリア）ゲノムの影響による低温要求性の増大は、*VRN1* 遺伝子発現の抑制によることが、また、純粋早晩性の遅延は、*WFT* 遺伝子発現の抑制によると考えられる。この結果は、ミトコンドリアゲノム（の何らかの遺伝子）が、核の花成関連遺伝子の発現に影響を及ぼすことを世界で最初に発見したものである。

③ 代表的な日本コムギ品種における細胞質置換系統の作出と評価

MRS を利用したコムギの出穂性の改変の実用性を検討するため、代表的な日本コムギ品種 13 品種と細胞質置換系統とを人工交配し、F₁ 植物を作出した。次年度以降、戻し交配を繰り返し、各戻し交配世代における花成遅延や稔性などの農業形質を調査した。その結果、全ての品種で、*Ae. geniculata* 細胞質の効果が現れ、花成遅延が起こることが明らかになった。また、細胞質の影響で CMS が併発されることも判明した。その中で、北海道春播き品種「春よ恋」は強力な稔性回復遺伝子を持ち、晩生化した品種として、細胞質置換系統の利用価値が高いことが示唆された。

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 14 件）

- ① Yamamoto, M., N. Shitsukawa, M. Yamada, K. Kato, S. Takumi, K. Kawaura, Y. Ogihara and K. Murai (2013) Identification of a novel homolog for a calmodulin-binding protein that is upregulated in alloplasmic wheat showing pistillody. *Planta* 237: 1001-1013、査読有
DOI:10.1007/s00425-012-1812-x
- ② Kitagawa, S., S. Shimada and K. Murai (2012) Effect of *Ppd-1* on the expression of flowering-time genes in vegetative and reproductive growth stages of wheat. *Genes Genet. Syst.* 87: 161-168、査読有
<http://dx.doi.org/10.1266/ggs.87.161>
- ③ Kinjo, H., N. Shitsukawa, S. Takumi and K. Murai (2012) Diversification of three *APETALA1/FRUITFULL*-like genes in wheat. *Mol. Genet. Genomics* 287: 283-294、査読有
DOI:10.1007/s00438-012-0679-7
- ④ Kajimura, T., K. Murai and S. Takumi (2011) Distinct genetic regulation of flowering time and grain-filling period base on empirical study of D-genome diversity in synthetic hexaploid wheat lines. *Breed. Sci.* 61: 130-141、査読有 doi: 10.1270/jsbbs.61.130
- ⑤ Fujiwara, Y., S. Shimada, S. Takumi and K. Murai (2010) Differential effects of *Aegilops tauschii* genotypes on maturing-time in synthetic hexaploid wheats. *Breed. Sci.* 60(3): 286-292、査読有
<http://dx.doi.org/10.1270/jsbbs.60.286>
- ⑥ Yamada, K., T. Saraike, N. Shitsukawa, C. Hirabayashi, S. Takumi and K. Murai (2009) Class D and B_{sister} MADS-box genes are associated with ectopic ovule formation in the pistil-like stamens of alloplasmic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* 71: 1-14、査読有
DOI:10.1007/s11103-009-9504-z
- ⑦ Ishikawa, M., Y. Ohmori, W. Tanaka, C. Hirabayashi, K. Murai, Y. Ogihara, T. Yamaguchi and H.-Y. Hirano (2009) The spatial expression patterns of *DROOPING LEAF* orthologs suggest a conserved function in grasses. *Genes Genet. Syst.* 84: 137-146、査読有
<http://dx.doi.org/10.1266/ggs.84.137>
- ⑧ Shimada, S., T. Ogawa, S. Kitagawa, T. Suzuki, C. Ikari, N. Shitsukawa, T. Abe, H. Kawahigashi, R. Kikuchi, H. Handa and K. Murai (2009) A genetic network of flowering

time genes in wheat leaves, in which an *APETALA1/FRUITFULL*-like gene, *VRN1*, is upstream of *FLOWERING LOCUS T*. *Plant* 58: 668-681、査読有

doi: 10.1111/j.1365-313X.2009J.03806.x

- ⑨ Mizumoto, K., H. Hatano, C. Hirabayashi, K. Murai and S. Takumi (2009) Altered expression of wheat *AINTEGUMENTA* homolog, *WANT-1*, in pistil and pistil-like transformed stamen of an alloplasmic line with *Aegilops crassa* cytoplasm. *Dev. Genes Evol.* 219: 175-187、査読有
DOI:10.1007/s00427-009-0275-y

〔学会発表〕(計 19 件)

- ① ミトコンドリアゲノムによる花成関連遺伝子のエピジェネティック制御. 村井耕二. 第 35 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「有性生殖におけるゲノム・遺伝子相関」, 2012 年 12 月 11 日, 福岡市.
- ② pistillody: ミトコンドリア・レトログレード・シグナルによる雄ずいの雌ずい化. 村井耕二. 日本遺伝学会第 84 回大会 ワークショップ「ミトコンドリアゲノムが制御する多様な生命現象 ～動植物に見るその共通性と相違性～」, 2012 年 9 月 24 日, 福岡市.
- ③ 日長感応性細胞質雄性不稔による新規ハイブリッドコムギ育種基盤の開発. 村井耕二. 日本育種学会第 122 回講演会 ワークショップ「細胞質雄性不稔/稔性回復に関わるイノベーション創出基礎的研究」, 2012 年 9 月 14 日, 京都市.
- ④ ミトコンドリア・レトログレード・シグナルによる花成関連遺伝子の発現制御. 加藤啓介ら. 第 53 回日本植物生理学会年会, 2012 年 3 月 17 日, 京都市.
- ⑤ 花成遅延を誘発する細胞質置換コムギ系統における *VRN1* および *WFT* 同祖遺伝子の発現パターン. 村井耕二ら. 日本育種学会第 121 回講演会, 2012 年 3 月 30 日, 宇都宮市.
- ⑥ 細胞質置換コムギ系統にみられる花成遅延は花成関連遺伝子の発現パターンの変化による. 加藤啓介ら. 日本育種学会第 119 回講演会, 2011 年 3 月 30 日, 横浜市.
- ⑦ コムギ花成関連遺伝子の発現を制御するミトコンドリア・レトログレード・シグナル. 村井耕二ら. 第 52 回日本植物生理学会年会, 2011 年 3 月 17 日, 仙台市.
- ⑧ Homeotic transformation of stamens induced by mitochondrial retrograde signaling. K. Muraiら. 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸市.
- ⑨ ミトコンドリア・レトログレード・シグナルによるコムギ花成関連遺伝子の発現

制御と花成の改変. 村井耕二, 嶋田早苗, 藤原佑紀, 加藤啓介. 日本遺伝学会第 82 回大会, 2010 年 9 月 21 日, 札幌市.

- ⑩ ミトコンドリア・レトログレード・シグナルによる pistillody (雄ずいの雌ずい化) に関する遺伝子のマイクロアレイ解析. 山本充香, 川浦香奈子, 荻原保成, 村井耕二. 日本育種学会第 118 回講演会, 2010 年 9 月 25 日, 秋田市.
- ⑪ Adaptation of flowering-time in tetraploid wheat by selection of flowering-time genes under domestication. K. Murai, 6th International Triticeae Symposium, 2009 年 6 月 2 日, 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井 耕二 (MURAI KOJI)
福井県立大学・生物資源学部・教授
研究者番号：70261097

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：