

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 4日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658002

研究課題名（和文）ミトコンドリアプラスミドの父性遺伝性を制御する核因子の探索

研究課題名（英文）Search of nuclear factors that control the paternal inheritance of mitochondrial plasmid

研究代表者

半田 裕一（HANDA HIROKAZU）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：20343957

研究成果の概要（和文）：ナタネミトコンドリアプラスミドの持つ父性遺伝性の機構解明を目指して、QTL解析を行った。プラスミド伝達率の異なるナタネ品種「農林16号」と「Westar」の交雑に由来するF2集団102個体を供試し、連鎖地図作成とプラスミドの父性伝達に関するQTL解析を行い、1374.7 cMをカバーする遺伝地図を作成し、A5、C2、C9染色体に1つずつQTLを検出した。この結果、父性遺伝性は比較的少数の核遺伝子により制御されていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of paternal inheritance of rapeseed mitochondrial plasmid, I conducted the QTL analysis. Using the the F2 population (102 individuals) derived from the cross rapeseed varieties with different plasmid transfer rate, "Norin 16" and "Westar", genetic map covering 1374.7 cM was constructed and then three QTLs were detected on the chromosomes, C2, C9 and A5. These results indicated that the paternally inheritance of mitochondrial plasmid is controlled by relatively a few nuclear genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：植物遺伝学

科研費の分科・細目：農学、育種学

キーワード：ミトコンドリア、ナタネ、プラスミド、父性遺伝性

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等植物の細胞質ゲノム（ミトコンドリア及び葉緑体ゲノム）は、一般的には種子親からのみ次代に伝達される母性遺伝性を示すことが知られている。ナタネを含む *Brassica* 属植物においても、ミトコンドリア及び葉緑体ゲノムは母性遺伝することが示されている。しかし、ナタネのミトコンドリアには、ミトコンドリアはもちろん他のゲノ

ムとは異なる DNA 分子である線状プラスミドが存在している（Palmer et al., *Nature*, 301, 725-728）。このプラスミドは、ミトコンドリアゲノムが完全な母性遺伝を示す場合であっても、花粉親から次代へ伝達される。この遺伝性は基礎生物学的にきわめてユニークな現象であるにもかかわらず、その分子的構造や機能に関する研究は長い間、十分に行われてこなかった。

(2) 研究代表者は、このプラスミドの存在とその特異な遺伝性に着目した研究を推進し、これまでにプラスミドの全塩基配列を決定し、遺伝子構造や発現を明らかにしたほか (Handa et al., Mol. Gen. Genomics, 267:797-805, 2002)、花粉成熟過程におけるミトコンドリアゲノムとプラスミド動態の解明に取り組んだ (Sato et al., Protoplasma, 224:179-185, 2004)。さらに、プラスミドの起源が *Brassica rapa* であること、また、プラスミドの遺伝性が核ゲノムの背景により変化することを明らかにしてきた (Handa, Genome, 50:234-240, 2007)。

2. 研究の目的

本研究課題では、プラスミドの遺伝性を制御する遺伝子群の単離に向けて、プラスミドの遺伝性に関する QTL 解析を行い、関与する QTL 遺伝子座を明らかにする。プラスミドの遺伝性は、これまでの研究代表者の研究成果により、少なくとも二つの因子、プラスミドの次代への伝達性及び次代における維持安定性により制御されていると考えられることから、まず遺伝性全体を量的形質としてとらえてゲノムワイドな解析を実施し関与する遺伝子座を明らかにすることを目的としている。

こうした研究成果は実際の制御遺伝子単離に大いに寄与するものと予想され、ミトコンドリアプラスミド遺伝性制御機構の全体像解明の第一段階をなすものである。また、今後、ミトコンドリア形質転換等を目指したミトコンドリアプラスミドの生物工学的利用や革新的育種技術への応用を考える際の基盤を提供するものである。

3. 研究の方法

(1) F2 集団におけるプラスミド伝達の解析

本課題で対象としているナタネの二品種、「農林 16 号」と「Westar」には、花粉親からのミトコンドリアプラスミド伝達率について明確な品種間差が認められている。この品種間差は、数回の独立した交雑実験においても認められることから、核遺伝子による遺伝的制御を受けていると考えられる。そこで、まず、「農林 16 号」と「Westar」(いずれもプラスミドを保持しておらず、I 型ミトコンドリアゲノムを持っている) の交雑に由来する F2 集団を作成した。さらに、得られた F2 個体それぞれに対して、プラスミド伝達に関する検定親であるナタネ品種「イズズナタネ (プラスミドを持ち、II 型ミトコンドリアゲノムを持っている)」を交雑した後代系統を作成して、それぞれについてプラスミドの有無とミトコンドリアゲノム型を決定した。

(2) F2 集団を利用した基本遺伝地図の作成

前述した F2 集団を用いて、QTL 解析を行うための基盤となる遺伝地図を作成した。遺伝地図作成にあたっては、ナタネのゲノム供与親である A ゲノムを持つ *Brassica rapa* の SSR マーカー「BRMS シリーズ」のほか、これまでに報告されているナタネ (*Brassica napus*) の遺伝地図の RAPD、AFLP、SSR 等のマーカーについても、本課題に適合可能かどうかを評価した。さらに、相互に非常に近縁で、マーカー情報も 90% を越える確率で相互に利用することが可能とされているナタネのゲノム供与親である A ゲノムを持つ *Brassica rapa*、また C ゲノムをもつ *Brassica oleracea*、そして近縁種のシロイヌナズナについても、マーカー情報を収集して活用することにより、本課題での基本遺伝地図作成を効率的に進めることとした。マーカー開発にあたっては、効率的な地図作成及び QTL 解析を行うため、PCR ベースの DNA マーカー (主として SSR マーカー) の開発を主体に研究を進めた。

4. 研究成果

(1) 花粉を介したプラスミドの後代への伝達率を調査したところ、ナタネ品種「農林 16 号」と「Westar」は、それぞれ 78.8% と 27.5% を示した。この 2 品種の交配に由来する F1 個体の伝達率は、「農林 16 号×Westar」と「Westar×農林 16 号」で、それぞれ 65.0% と 60.0% であり、正逆交雑間で差がないこと、また、親品種の中間値を示すことから、細胞質の影響はほとんどなく、プラスミドの父性伝達率は主に核遺伝子により支配されているものと考えられた。

87 の F2 個体について伝達率を調査したところ、0%~100% の範囲に広く分布したが、農林 16 号に近い高い伝達率を持つ個体が、Westar に近い低い伝達率を持つものより多く見られた。平均値は 68.2% であり、F1 個体とほぼ同等であった (図 1)。

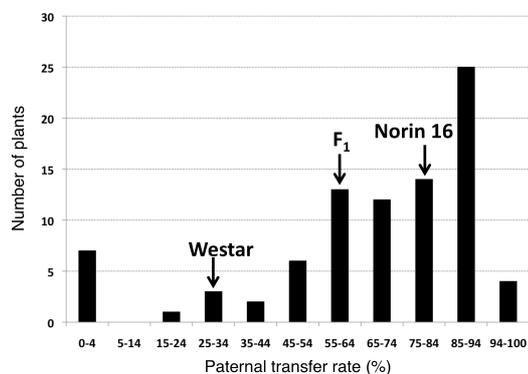


図1. F2集団におけるプラスミドの伝達率の分布

図 1 に見られる伝達率の分布は連続的であり、超越分離も見られることから、父性遺伝

性が複数の核遺伝子により制御されていることを示唆しており、このため、QTL解析を行うこととした。

(2) ナタネ及びその近縁種で報告されている1915 マーカーに加えて、*Brassica rapa* 等のBAC塩基配列から232の新規SSRマーカーを作成し、全部で2147のSSRマーカーについて、「農林16号」と「Westar」の両親間でのサイズ多型を検索した。最終的に209マーカー(9.7%)について多型を検出した。そのうち、173マーカーを使用して、F₂集団102個体の遺伝子型を調査した。最終的に、22の連鎖群が得られ、連鎖地図は全体で1374.7 cMをカバーした。3つの染色体(C3, C5, C8)にはギャップが見られたが、それぞれの連鎖群はナタネの19本の染色体に関連づけられた(図2)。

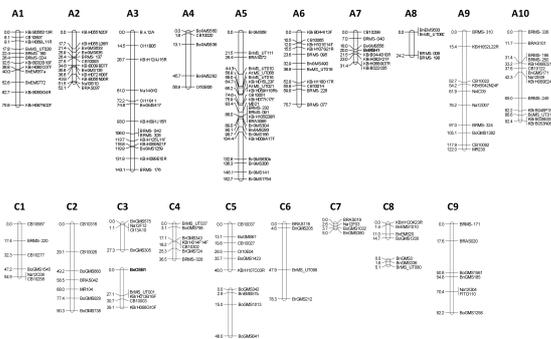


図2. ナタネ連鎖地図

最も長い連鎖群は、A5染色体で24マーカーで157.2 cMをカバーし、最も短いC7染色体は4マーカーで5.0 cMであった。マーカー間距離は0 cMから43.3 cMまで分布しており、平均距離は7.9 cMを示した。

ミトコンドリアゲノムの構造に影響を及ぼす既知の核遺伝子、*Msh1*、*RecA3*、*OSB1* についてマッピングを試みた。*Msh1* と *OSB1* については両親間で多型が検出でき、それぞれ、遺伝地図作成のために、A7染色体とC3染色体にマップされた。

(3) それぞれのF₂個体からのプラスミド伝達率とF₂集団を対象としたQTL解析を行った。その結果、2.5以上のLOD値を示すQTLが、A5、C2、C9染色体に1つずつ存在することが明らかとなり、それぞれ*qPpt1*、*qPpt2*、*qPpt3*と名付けた。それぞれのLOD値は4.97、3.45、3.35であり、寄与率は25.0%、22.2%、37.1%を示した(図3)。*qPpt1*と*qPpt2*については、「農林16号」のアリールが、*qPpt3*については「Westar」のアリールがプラスミドの高伝達率に寄与していた。また、3つのQTL間に有意なエピスタシスはみられなかったが、「農林16号」型の*qPpt1*と*qPpt2*を

持つ個体は、「Westar」型の*qPpt1*と「農林16号」型の*qPpt2*を持つ個体より高いプラスミド伝達率を示した。一方、「Westar」型の*qPpt1*と*qPpt2*を持つ個体のプラスミドは完全に抑えられており、何らかの遺伝子乾燥後作用があることが示唆された(図4)。

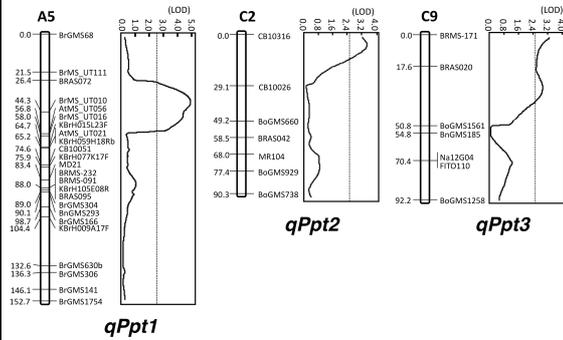


図3. 検出された3つのQTL領域

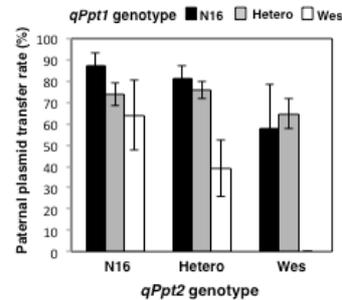


図4. *qPpt1*と*qPpt2*のアリールの組み合わせによるプラスミド伝達率の差

これらの結果は、ミトコンドリアプラスミドの父性遺伝は独立した比較的少数の核遺伝子により制御されていることを示していた。

(4) 花粉を通じてプラスミドが伝達されるには、少なくとも以下の3つのステップが必要となる：①花粉形成時のDNA消去から逃れること、②後代ミトコンドリアへのプラスミドの挿入、③後代植物での安定的保持。本研究で見出されたプラスミド伝達を制御する3つのQTLの明確な機能については、今後の研究を待たなければいけないが、少なくとも、交雑以前に起こる①(花粉形成時のDNA消去から逃れること)には関係がない。従って、②(後代ミトコンドリアへのプラスミドの挿入)または③(後代植物での安定的保持)に関与している可能性が高い。

ミトコンドリアゲノム構造の安定性に関わる核遺伝子として、*Msh1*、*RecA3*、*OSB1*が知られているが、今回の実験により*Msh1*と*OSB1*はA7染色体とC3染色体にマップされ、QTL領域とは一致しなかった。従って、今回見出されたプラスミド伝達に関わるQTLを担う遺伝子は新規のものである可能性が高い。

(5) *qPpt1* が座乗する A5 染色体の連鎖地図を、2011 年に公開された *Brassica rapa* の配列情報及びマーカー情報 (Wang et al. 2011) と比較したところ、*B. rapa* の A05 染色体上の SSR マーカー BRAS072 から A81300 の領域 (800kb~24Mb) とナタネ A05 染色体上との間にこれまでに報告されていない大きな逆位が確認された (図 5)。

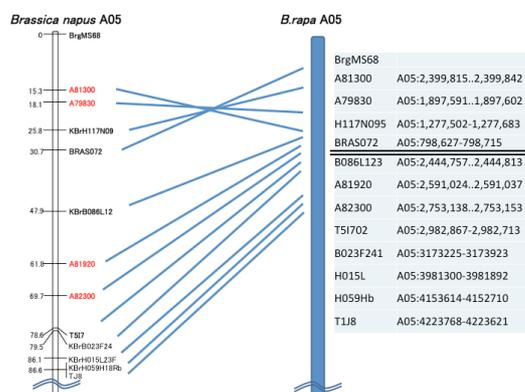


図 5. ナタネ A05 染色体に見られた逆位

この逆位は、*qPpt1* の座乗位置よりも、短腕待った側に位置しているものと推測され、現在のところ、*qPpt1* との関係は明らかではない。

(6) 本研究で得られた結果は、プラスミドの父性遺伝という極めてユニークな特性を明らかにするために有用な情報を与えた。ミトコンドリアは重要な細胞機能を担う細胞内小器官であり、独自のゲノムをもつため、その機能改良には遺伝子導入が有効であると考えられている。本研究の対象であるナタネミトコンドリアプラスミドは植物ミトコンドリア形質転換のツールとして有望であり、その制御法の開発のために、今後は、QTL 遺伝子の単離等が必要である。

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 1 件)

- ① Oshima M, Handa H, The identification of quantitative trait loci that control the paternal inheritance of a mitochondrial plasmid in rapeseed (*Brassica napus* L.), *Genes & Genetic Systems*, 査読有, vol.87, No.1, 2012, 19-28. doi.org/10.1266/ggs.87.19

[学会発表] (計 3 件)

- ① 大嶋雅夫、半田裕一、ナタネ A05 染色体に存在するミトコンドリアプラスミドに関する QTL 領域の精密化と周辺領域の

構造、日本育種学会第 123 回講演会 (東京農業大学)、2013.3.28

- ② 大嶋雅夫、半田裕一、ナタネにおけるミトコンドリアプラスミドの父性遺伝制御 QTL 領域の詳細化、日本育種学会第 120 回講演会 (福井県立大学)、2011.9.23
- ③ 大嶋雅夫、半田裕一、ナタネ連鎖地図の精密化とそれに基づくミトコンドリアプラスミドの父性遺伝に関する QTL 解析、日本育種学会第 119 回講演会 (横浜市立大学)、2011.3.30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

半田 裕一 (HANDA HIROKAZU)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：20343957