

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510236

研究課題名(和文)ミトコンドリア遺伝子転移を利用した重複遺伝子のゲノム内再編成に関する研究

研究課題名(英文) Genomic rearrangements of duplicated genes after intracellular gene transfer events in plant mitochondria

研究代表者

久保 中央 (Kubo, Nakao)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：60347440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：核へ転移した植物ミトコンドリア遺伝子の知見を得るためにデータベース検索を行った。ハクサイでは、シロイヌナズナと比べて遺伝子重複が生じていた。ダイコンでは、ハクサイと同様なゲノム領域が分散していることを確認した。

解析過程で、遺伝子上流側がリボソームタンパク質遺伝子、下流側がアミノ酸生合成酵素と相同な遺伝子を同定した。ゲノムには類似配列が5コピー存在した(うち3つは偽遺伝子)。本遺伝子は、2つの遺伝子がイントロンで組換わって生じたと推測された。GFPの解析から、遺伝子産物のミトコンドリア及び葉緑体への局在が示唆された。この他、リボソームタンパク質遺伝子が糖代謝酵素遺伝子と融合している例を見出した。

研究成果の概要(英文)：Plant mitochondrial genes that had been transferred to the nuclei were searched in the database. Numerous duplications were identified in Chinese cabbage. In radish, syntenic regions were dispersed throughout the genome.

During the course of the analysis, the gene, showing homology to a ribosomal protein gene in the upstream region and to an amino acid biosynthetic gene in the downstream region, has been found in the database. There are five paralogs in the genome, three of which are pseudogenes. It is suggested that the gene was created by a recombination via an intron. The gene products seem to be localized to mitochondria and chloroplasts by using GFP. In addition, a case of gene fusion between a ribosomal protein gene and a sugar metabolic enzyme gene has been identified.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：植物ミトコンドリア 遺伝子転移

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、約 20 億年前、好気性細菌が細胞内に共生したものであると考えられている。現在、ミトコンドリアのゲノムには少数の遺伝子しか残存せず、ミトコンドリアに必要な多くの遺伝子は核へ転移したと推定されている。これまでの研究から、哺乳動物等と比べて、植物ではミトコンドリアゲノムの進化が遅く、核への遺伝子転移が現在でも進行中であることが分かっているが、遺伝子転移の詳細なプロセスは多くの謎に包まれている。特に、細菌由来のミトコンドリア遺伝子が核へ転移後に活性化するには、真核生物型のプロモータやシグナルペプチド等の機能配列が必要であるが、それらの由来や獲得機構は動植物を含めて長い間ほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、核へ転移した植物ミトコンドリアリボソームタンパク質遺伝子について、集積しているゲノム情報を用いて、特に以下の点に焦点を当てて研究を行った。

遺伝子コピーの重複およびゲノム上での遺伝子群の分布、コピーの重複機構と転移後の再転移の有無、重複コピーの機能分化の可能性。

3. 研究の方法

遺伝子コピーの重複：ゲノム情報が得られている植物種について、リボソームタンパク質遺伝子の配列をデータベース検索し、コピー数、および、各コピーの類縁関係とゲノム内の分布を明らかにした。

コピーの重複機構と転移後の再転移：ゲノムデータを基にして、転移遺伝子周辺の遺伝子配置の保存性(シンテニー)を検出し、遺伝子の転移時期、コピー数の増加とゲノム重複との関係、再転移の可能性等を検証した。

重複コピーの機能分化の可能性：重複遺伝子のコピー間での発現変化を RT-PCR と緑色蛍光タンパク質(GFP)等を用いて解析した。

4. 研究成果

核へ転移した植物ミトコンドリア遺伝子についてデータベース検索を行った。例えばアブラナ科植物では、ハクサイ(*Brassica rapa*)のゲノム配列から相同遺伝子を検出し、シロイヌナズナと比較してハクサイで遺伝子重複が多数存在し、ゲノムサイズに比例して遺伝子重複のケースが大になる傾向が認められた。ダイコンでは、ハクサイと同祖なゲノム領域が分散していることを確認した。

解析過程で、遺伝子の 5'-上流側がリボソームタンパク質遺伝子、3'-下流側が芳香族アミノ酸の生合成酵素遺伝子と相同な配列で構成される新奇遺伝子をポプラで同定した。ポプラでは、類似の配列がゲノム内に計 5 コピー存在し、第 8, 10, 12, 14 染色体に

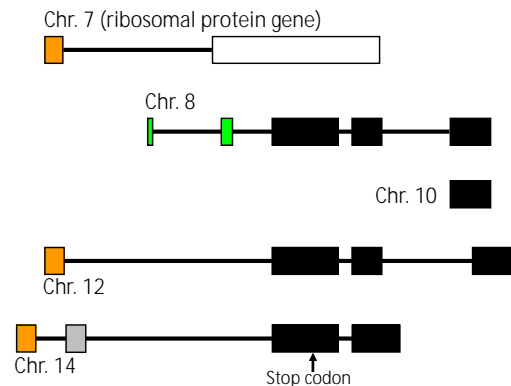


図1 遺伝子構造の模式図

黒色、橙色、緑色のBoxは、相同なエキソンを示す。

分布していた(図1)。これらの遺伝子の cDNA 全長を 5'-RACE および 3'-RACE 法で獲得した。その結果、5 コピーの遺伝子のうち 3 コピーは偽遺伝子化していることが明らかになった。残りの 2 コピーのうち、一方は他の高等植物で同定されている葉緑体局在型の遺伝子であると推定され、もう一方は上記の新奇遺伝子だった。遺伝子のエキソン・イントロン構造の比較から、新奇遺伝子は、リボソームタンパク質遺伝子の 5'-側配列と葉緑体局在型の芳香族アミノ酸生合成系酵素遺伝子の 3'-側配列とがイントロンを介して組み換わったという可能性が示唆された。また、第 14 染色体には 2 個の偽遺伝子が約 5 Mb 離れて存在しており、その高い塩基配列相同性から、これらは進化的に比較的最近重複したと推定された。それらの構造上の特徴から、第 12 染色体上にある新奇遺伝子が重複して再転移し、その後、第 14 染色体上で再重複した可能性が示唆された。

これらの遺伝子のうち機能的と推定されるコピーの配列を GFP 遺伝子と連結して植物細胞へ導入したところ、ミトコンドリアと葉緑体に GFP の局在が認められた。また、芳香族アミノ酸生合成系酵素の特異抗体を作製し精製したミトコンドリアおよび葉緑体画分に対してウェスタン解析を行い、翻訳産物の蓄積を確認した。

この他、cDNA データベースの解析から、別のリボソームタンパク質がその下流に位置する糖代謝酵素遺伝子と共転写されていることが推定された。全ゲノムが決定されている植物についてデータベース検索を行ったところ、このような構造は、進化的に離れた複数の被子植物種に広く分布していた。一方、アブラナ科植物にはこのような構造は存在せず、リボソームタンパク質が単独で存在していた。このことから、アブラナ科植物が他植物から分岐した後に本構造が二次的に消失したと推定された。RT-PCR で転写産物を解析したところ、リボソームタンパク質と遺伝子糖代謝酵素遺伝子の融合が実験的に確認

された。糖代謝酵素に対する抗体を用いてミトコンドリア画分に対してウェスタン解析を行ったところ、推定アミノ酸配列から予想される分子量よりも約 10 kDa サイズの小さいシグナルが検出された。このことから、細胞質で翻訳された遺伝子産物がミトコンドリアへ輸送された後にプロセッシングを受ける可能性が示唆された。

以上の結果から、核へ転移したミトコンドリア遺伝子の重複が、これまで知られていなかった合成や代謝経路に関わる可能性を示した。

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)

Ryoichi Nakatsuji, Tomoko Hashida, Naoko Matsumoto, Masato Tsuru, Nakao Kubo, Masashi Hirai, Development of genomic and EST-SSR markers in radish (*Raphanus sativus* L.). *Breeding Science*, 査読有, Vol. 61, No. 4, 2012, pp. 413-419. doi:10.1270/jsbbs.61.413

Yutaka Mimura, Takahiro Inoue, Yasuhiro Minamiyama, Nakao Kubo, An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breeding Science*, 査読有, Vol. 62, No. 1, 2012, pp. 93-98. doi:10.1270/jsbbs.62.93

Nobuko Fukino, Mitsuhiro Sugiyama, Takayoshi Ohara, Nakao Kubo, Masashi Hirai, Yoshiteru Sakata, Satoru Matsumoto, Mapping of a gene that confers short lateral branching (*slb*) in melon (*Cucumis melo* L.). *Euphytica*, 査読有, Vol. 187, No. 1, 2012, pp. 133-143. doi:10.1007/s10681-012-0667-3

Tomoko Hashida, Ryoichi Nakatsuji, Holger Budahn, Otto Schrader, Herbert Peterka, Tatsuhito Fujimura, Nakao Kubo, Masashi Hirai, Construction of a chromosome-assigned, sequence-tagged linkage map for the radish, *Raphanus sativus* L., and QTL analysis of morphological traits. *Breeding Science*, 査読有, Vol. 63, No. 2, 2013, pp. 218-226. doi:10.1270/jsbbs.63.218

[学会発表](計4件)

井上敬弘, 平井正志, 近藤友宏, 松元哲, 久保中央, 結球性の異なるハクサイ系統を利用した形態形質の遺伝解析. 園芸学会平成23年度秋季大会, 平成23年9月

四方香織, 中辻諒一, 武田征士, 平井正志, 久保中央, ダイコンにおける開花制御

遺伝子座(*Frs*)のファインマッピング. 園芸学会平成24年度秋季大会, 平成24年9月

松井仁美, 橋田友子, 武田征士, 平井正志, 久保中央, ダイコンの春化に関わる遺伝子の単離とマッピング. 園芸学会平成24年度秋季大会, 平成24年9月

Tomoko Hashida, Ryoichi Nakatsuji, Holger Budahn, Otto Schrader, Herbert Peterka, Tatsuhito Fujimura, Nakao Kubo, Masashi Hirai, Chromosomal assignment of radish linkage groups using a complete set of disomic radish-rapeseed chromosome addition lines. 6th International Symposium on Brassica and 18th Crucifer Genetic Workshop, November, 2012

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/cell_genome_bio/nakaokubo_jp.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 中央 (KUBO, Nakao)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 60347440

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

有村 慎一 (ARIMURA, Shin-ichi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00396938