

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640102

研究課題名(和文)植物ミトコンドリアゲノムの進化的安定性と発生学的動態の解明

研究課題名(英文)Evolutionary stability and developmental dynamics of the plant mitochondrial genome

研究代表者

森 直樹 (Mori, Naoki)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60230075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物のミトコンドリアと葉緑体は、核との複雑な相互作用を通じて細胞内の重要な機能に深く関わっている。本研究では、ミトコンドリアゲノムの進化的安定性を検証するため、異種の細胞質と核を組合せて育成され60世代以上にわたって維持されてきたパンコムギの細胞質置換系統とその細胞質提供親を用いてオルガネラDNAに変異が生じているかどうか検証した。その結果、ミトコンドリア、葉緑体ともに細胞質置換系統と細胞質提供親系統の間にちがいが見られず進化的安定性が高いと推定された。一方、ミトコンドリアゲノム内では反復配列を介して分子内組換えが生じており、その頻度は組織や成長段階によって異なることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria and chloroplast are deeply involved in the important activities in the cell through the complex interaction between nuclear genome. To examine the evolutionary stability of the plasmon, we evaluated the molecular variation in chloroplast and mitochondrial genome between the alloplasmic wheat line with an alien cytoplasm and the donor line of the cytoplasm. This alloplasmic line has been maintained for more than 60 generation by repeated backcrossing. No variation was identified between the alloplasmic line and the donor line, indicated the evolutionary stable nature of the plasmon in wheat. In addition, we found that the intramolecular recombination in mitochondrial genome occurs in almost all of the tissues, although the frequency is very low as well as variable among tissues.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：コムギ ミトコンドリアゲノム 進化的安定性 分子内組換え 細胞質置換系統 Aegilops caudata  
マイクロサテライト

1. 研究開始当初の背景

(1) 高等植物のミトコンドリアと葉緑体のゲノムは、核ゲノムとの複雑な相互作用を通じて細胞内の重要な機能に深く関わっている。この核ゲノムとオルガネラゲノムの相互作用の理解は、互いに異なる種の核と細胞質を組合せて作成された細胞質置換系統の研究によって大きく進展した。しかし、「異種核との同居」という強いストレス下に置かれたオルガネラゲノムの進化的安定性はいまだ直接検証されていない。

(2) 高等植物のミトコンドリアでは、ゲノム内に散在する大小さまざまな反復配列を介した分子内組換えにより生じる小分子種 (sublimon、以下サブリモン) が混在する。その種類と数はしばしば変動し、このようなシフト (substoichiometric shifting) は極めて迅速かつ劇的に起こることが知られている (Abdelnoor et al. 2003)。これまでに、インゲンマメとシロイヌナズナでは、このようなミトコンドリアゲノムの構造変異に核の遺伝子が関わることが報告されているが (Woloszynska 2010)、分子種シフトの発生的動態や、複雑なゲノムの遺伝機構と進化的安定性についてはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

(1) ミトコンドリアゲノムの進化的安定性の直接的検証：パンコムギ (*Triticum aestivum*) を核親、近縁野生種 (*Aegilops caudata*) を細胞質親として 1949 年に育成されて以来 (Kihara 1959)、60 年以上にわたる連続戻し交雑によって維持されてきた細胞質置換コムギ系統 (*caudata*)-Tve (図 1) と、その核ゲノムおよび細胞質ゲノムの提供親 (ともに現存) の3者のミトコンドリアゲノムの構造を比較する。これによって、60 世代以上続いた異種の核と細胞質の組合せがミトコンドリアのゲノム構造に変異を誘発したか否かを明らかにし、この間のミトコンドリアゲノムの遺伝的安定性を実験的に検証する。

(2) サブゲノミック分子種の発生的動態の把握：マスターゲノムから分子内組換えによって生じる種々のサブリモンのコピー数を、本研究代表者等が提案した方法 (Ogihara et al. 2005) によってモニタリングする。これには、幼胚期に始まる異なる発育・分化段階の組織を供試する。この結果に基づき、分子種のシフトが起きる発生段階およびシフトを起こす分子種とそのコピー数に関する発生的動態を正確に把握する。

3. 研究の方法

1) ミトコンドリアゲノムの進化的安定性の検証：近縁野生種 (*Ae. caudata*) の細胞質を持つパンコムギの細胞質置換系統、その細胞質および核ゲノムの提供親である *Ae. caudata* とパンコムギ変種 (*T. aestivum* var. Tve) (図 1) 細胞質置換系統から再構成された *Ae. caudata* および、再構成過程で育成さ

れた中間系統 (常脇, 2014) (図 2) を用いて、それぞれの系統間でミトコンドリアゲノムの構造を互いに比較し、ミトコンドリアゲノムの遺伝的安定性を検証する。

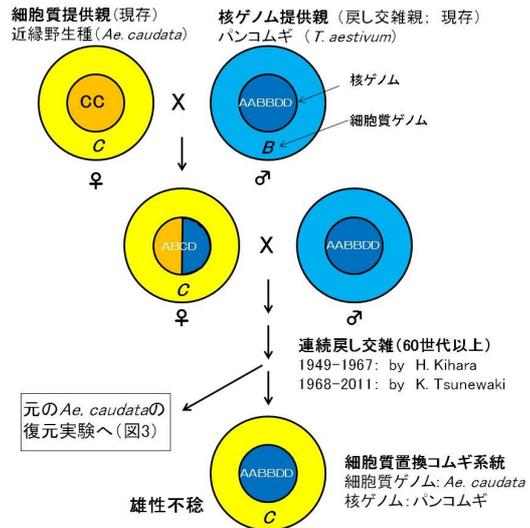


図1. 本研究で用いたパンコムギの細胞質置換系統の育成過程

2) サブゲノミック分子種の発生的動態の把握：パンコムギのミトコンドリアゲノムの全塩基配列 (Ogihara et al. 2005) に基づき、分子内組換えに関与していると推定される反復配列のそれぞれに特異的なプライマーを作成し、サブリモンの頻度を正確に推定する手法を確立する。この手法により、コムギの異なる発生段階におけるサブリモンの種類とその数の発生的動態を正確にモニタリングする。

4. 研究成果

(1) コムギのオルガネラゲノムの進化的安定性

本研究では、半世紀以上にわたり細胞質置換系統 { (*caudata*)-Tve } としてパンコムギの核ゲノム (AABBDD) と共存した *Ae. caudata* の細胞質ゲノム (以下プラズモンとよぶ) とその核ゲノム提供親であるパンコムギ変種 Tve、細胞質提供親である *Ae. caudata* var. *polythera* (KU6-1) の間でプラズモンを比較した。さらに、(*caudata*)-Tve の保有する *Ae. caudata* 由来のプラズモンをもとの *Ae. caudata* に戻すことによって再構成された (*caudata*)-*Ae. caudata* (常脇 2014) とこの系統を育成する段階で得られた 10 の中間系統 (図 2) も加えてオルガネラ DNA の比較解析を行った。

葉緑体ゲノムとミトコンドリアゲノムの進化的安定性を直接検証するため、葉緑体ゲノムおよびミトコンドリアゲノムについて多様性を組織的に調査した。

まず、葉緑体ゲノムに存在する 24 のマイクロサテライト座について筆者らが開発したプライマーセット (Ishii et al. 2001) を用いて PCR を行い、シークエンスゲルによる電気泳動によってマイクロサテライトの反

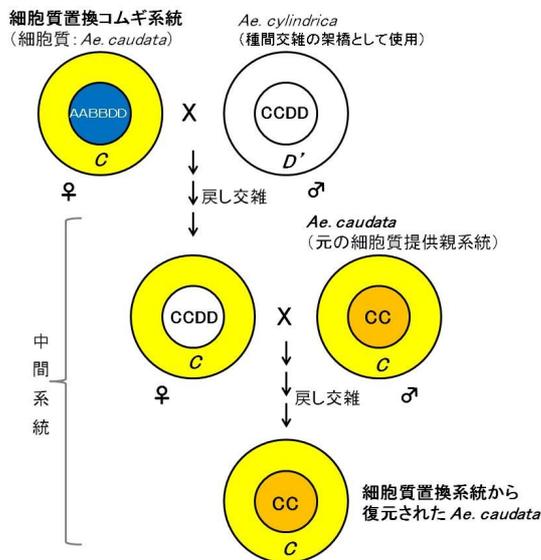


図2. *Ae. caudata*細胞質を持つ細胞質置換系統からの元の *Ae. caudata*の復元過程とこの過程でつくられた中間系統

復配列数を解析した。その結果、24のマイクロサテライト座のうち *Wct14*、*Wct17* の2座を除き残りすべての座で良好なPCR産物が得られた。*Wct14*、*Wct17*では良好なPCR産物が得られなかったため、本研究から除外した。解析できた22の座では、細胞質置換系統 (*caudata*)-Tve、細胞質提供親系統 *Ae. caudata* (KU6-1)、再構成系統 (*caudata*)-*Ae. caudata*、及びすべての中間系統が同一のアリルを保有することが判明した。この結果から、マイクロサテライトの変異から見る限り葉緑体ゲノムは進化的に高い安定性をもつことが推定された。

次に、ミトコンドリアゲノムに存在する21のマイクロサテライト座について、筆者らが開発したプライマーセット (Ishii *et al.* 2006)を用いて葉緑体と同様の方法で解析を行った。その結果、調査した21座のうち *Wmt2*、*Wmt11*、*Wmt19*の3座で複数のPCR増幅産物がみられた。そのため、これら3座についてそれぞれプライマーを新しくデザインして再度解析を行ったところ、*Wmt19*を除く2座では良好なPCRが確認された。一方、*Wmt19*では、*Ae. cylindrica*のCCDDゲノムをもつ中間系統において複数のバンドパターンが観察され、良好なPCR産物が得られなかったため、この *Wmt19*座を以降の解析から除外した。良好なPCR産物が確認された20座について解析を行ったところ、細胞質置換系統 (*caudata*)-Tve、細胞質提供親系統 *Ae. caudata* (KU6-1)、再構成系統 (*caudata*)-*Ae. caudata*、及びすべての中間系統が同一のアリルを保有することが確認された。この結果、マイクロサテライトの変異から見る限りミトコンドリアゲノムも進化的に高い安定性をもつと推定された。これまでに、コムギのミトコンドリアゲノムの進化的安定性を直接的に検証した研究はなく、本研究の成果は世界で初めての直接検証といえる。一方で、*Wmt19*座のように、複数のPCR産物がみられる場合があったことから、ミトコンドリアゲ

ノムの分子内組み換えなどによって部分的に複数の分子種が生成されている可能性もめぐり去れなかった。

ミトコンドリアゲノムの安定性をより詳細に検証するためには、細胞質置換系統とその細胞質提供系統のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定する必要がある。本研究ではそのための第一歩として、(*caudata*)-Tveのミトコンドリアゲノムの全塩基配列の解明に着手した。ミトコンドリアの単離精製には多数の種子が必要であるが強度の雄性不稔を示す(*caudata*)-Tveから大量の種子を得るのは容易ではない。本研究では、(*caudata*)-Tveを母親とし、Tveの花粉を用いて戻し交雑することにより、約2000粒の種子を増殖することに成功した。最終年度にこれらを用いてミトコンドリアDNAを単離精製し、次世代シーケンサーによって全塩基配列を解析した。現在、得られた配列情報を解析中である。今後は、この塩基配列を、既に解析されている(*caudata*)-Chinese Spring (この系統は雄性不稔を示さない)のミトコンドリアゲノムの配列と比較する。さらに、細胞質提供系統である *Ae. caudata* var. *polyathera*のミトコンドリアゲノムの配列を解析するため、種子を増殖中である。もしもこれら3者の間に何らかの変異が見出されれば、その変異は核ゲノムとミトコンドリアゲノムの不調和によって生じた可能性がある。

(2)ミトコンドリアゲノムの分子内組み換えによって生じるサブゲノミック分子の解析

コムギのミトコンドリアの全ゲノム配列が解明されたことに伴い、分子内組み換えによって生じるサブゲノミック分子が存在することが明らかにされた (Ogihara *et al.* 2005)。しかし、このような分子内組み換えのメカニズムや植物における発生学的動態はいまだ解明されていない。本研究では、ミトコンドリアゲノムにみられるサブゲノミック分子のコピー数を正確に定量する手法の開発を試みた。さまざまな条件を検証した結果、qPCR法を応用することにより、分子内組み換えの結果生じた分子の相対量を定量することに成功した (牧田 2015)。

これまでにパンコムギ品種 Chinese Spring を用いて播種後3日、7日、14日、30日、45日、60日、75日、90日ごとの根、茎、幼穂、雌ずいについて組み換え分子の相対量を測定した。その結果、根、茎、葉の増幅産物量を経時的にみると、いずれの組織でも分子内組み換えによるサブゲノミックな分子が生成していること。また、これらの分子の量は非組み換え型分子の量に比べて非常に小さく、組織ごとにその存在量が異なっていることが判明した。また、核ゲノムを含む全ゲノムDNAにしめるミトコンドリアゲノムの割合は組織ごとに、また生育段階ごとに大きく変

化していることが明らかになった。

現在さらに測定精度を向上させるべく改良を続けている。

#### 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 7件)

Shizuka, Takako, Naoki Mori, Hakan Ozkan and Shoji Ohta, Chloroplast DNA haplotype variation within two natural populations of wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) in southern Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 査読あり, Vol.29, No.3, 2015, 423-430, DOI: 10.1080/13102818.2015.1012648

Tsunewaki, Koichiro, Naoki Mori and Shigeo Takumi (2014) Genetic effect of the *Aegilops caudata* plasmon on the manifestation of the *Ae. cylindrica* genome. *Genes Genet. Syst.*, 査読あり, 89, 2014, 195-202

Aloka Lanka Ranawake, Oliver Escano Manangkil, Shinya Yoshida, Takashige Ishii, Naoki Mori & Chiharu Nakamura (2014) Mapping QTLs for cold tolerance at germination and the early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.), *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 査読あり, Vol. 28, No.6, 2014, 989-998, DOI: 10.1080/13102818.2014.978539

Tsujimura, Mai, Naoki Mori, Hiroshi Yamagishi and Toru Terachi (2013) A possible breakage of linkage disequilibrium between mitochondrial and chloroplast genomes during Emmer and Dinkel wheat evolution, *Genome*, 査読あり, Vol.56, No.4, 2013, 187-193  
Mori, Naoki, Shoji Ohta, Hajime Chiba, Toshiya Takagi, Yukiko Niimi, Vasant Shinde, Mukund Kajale and Toshiki Osada, Rediscovery of Indian dwarf wheat (*Triticum aestivum* L. ssp. *sphaerococcum* (Perc.)MK. an ancient crop of the Indian subcontinent, *Genet Resour. Crop Evol.*, 査読あり, Vol.60, No.6, 2013, 1771-1775

Thanh, Phan Thi, Cristian I. Vladutu, Shahryar F. Kianian, Pham Thien Thanh, Takashige Ishii, Miyuki Nitta, Shyuhei Nasuda, and Naoki Mori, Molecular genetic analysis of domestication traits in emmer wheat. I: Map construction and QTL analysis using a F2 population. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 査読あり, Vol.27, 2013, 3627-3637

Manangkil, Oliver Escano, Vu, Hien.Thi Tu, NaokiMori, Shinya Yoshida, and Chiharu Nakamura, Mapping of quantitative trait loci controlling seedling vigor in rice (*Oryza sativa* L.) under submergence, *Euphytica*, 査読あり, Vol.192, No.1, 63-75, 2013, DOI 10.1007/s10681-012-0857-z)

[学会発表](計 16件)

大田 正次、森 直樹、Ozkan Hakan、非休眠性個体を高頻度で含む野生四倍性コムギ集団の探索 - 栽培コムギ集団の成立をめぐって、日本育種学会第129回講演会、2016.3.21~2016.3.22、横浜市立大学(神奈川県)

太田 星史、牧田 真之、辻村 真衣、寺地 徹、森 直樹、コムギのミトコンドリアゲノムの分子内組換えの定量的解析、第10回 ムギ類研究会、2015.12.11~2015.12.12、伊勢市観光文化会館(三重県)

島田 沙織、牛 恒一、Vladutu Christian、石井 尊生、Kianian Shahryar、森 直樹、野生エンマーコムギの遺伝的背景に栽培種の染色体断片を導入した戻し交雑自殖系統を用いた栽培化関連形質の解析、第10回 ムギ類研究会、2015.12.11~2015.12.12、伊勢市観光文化会館(三重県)

宮崎 裕貴、Pham-Minh Ngoc、Vladutu Christian、石井 尊生、Kianian Shahryar、森 直樹、栽培エンマーコムギの遺伝的背景に野生種の染色体断片を導入した戻し交雑自殖系統を用いた栽培化関連 QTL の解析、第10回 ムギ類研究会、2015.12.11~2015.12.12、伊勢市観光文化会館(三重県)

森 直樹、牛 恒一、Vladutu Cristian、石井 尊生、Kianian Shahryar、野生二粒系コムギの遺伝的背景に栽培種の染色体断片を導入した戻し交雑自殖系統群の作出：栽培化関連形質の遺伝学的解析に向けて、日本育種学会第128回講演会、2015.9.11~2015.9.12、新潟大学(新潟県)

宮崎 裕貴、Pham-Minh Ngoc、Vladutu Cristian、石井 尊生、Kianian Shahryar、森 直樹、栽培エンマーコムギの遺伝的背景に野生種の染色体断片を導入した戻し交雑自殖系統を用いた栽培化関連形質の遺伝学的解析、日本育種学会第128回講演会、2015.9.11~2015.9.12、新潟大学(新潟県)

森 直樹、静 貴子、Hakan Ozkan、大田 正次、トルコ南部に位置する二つの自然集団における野生二粒系コムギ (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) の葉緑体ゲノムの多様性、日本育種学会第127回講演会、2015.3.21~2015.3.22、

玉川大学(東京都)  
常脇 恒一郎、森 直樹、四元 達也、  
宅見 薫雄、*Aegilops cylindrica* ゲノム  
の発現に対する *Ae. caudata* プラズモンの  
遺伝的影響、日本遺伝学会 第 86 回大  
会、2014.9.17~2014.9.19、長浜バイオ  
大学(滋賀県)  
辻村 真衣、森 直樹、山岸 博、寺地  
徹、4 倍性コムギのミトコンドリアゲノム  
のタイプを変更する核ゲノム領域の特定、  
日本育種学会 第 126 回講演会、2014.9.  
26、南九州大学(宮崎県)  
森 直樹、Ngoc Pham Minh、Vladutu  
Cristian、Thanh Pham Thien、Thanh Phan  
Thi、石井 尊生、Kianian Shahryar、戻  
し交雑自殖系統を用いたエンマーコムギ  
の栽培化関連形質の遺伝学的解析、日本  
育種学会 第 126 回講演会、2014.9.26、  
南九州大学(宮崎県)  
静 貴子、森 直樹、オズカン ハカン、  
大田 正次、野生二粒系コムギの自然集  
団における葉緑体ゲノムの遺伝的多様性  
と分化、近畿作物育種研究会 第 177 回  
例会、2014.7.19、神戸大学(兵庫県)  
大田 正次、森 直樹、オズカン ハカ  
ン、野生コムギの種子休眠性-栽培化過  
程における種子サイズの増加に伴う休眠  
性の消失、日本育種学会 第 125 回大会、  
2014.3.21~2014.3.22、東北大学  
辻村 真衣、森 直樹、山岸 博、寺地 徹、  
核ゲノム構成により違いを示す Emmer-  
Dinkel コムギのミトコンドリアの多型、  
日本育種学会 第 124 回大会、2013 年 10  
月 12 日~2013 年 10 月 13 日、鹿児島大学  
(鹿児島県)  
静 貴子、森 直樹、大田 正次、オズカン ハ  
カン、Genetic diversity and  
differentiation of chloroplast genome  
in wild emmer wheat within and among its  
natural populations、日本育種学会 第  
124 回大会、2013 年 10 月 12 日~2013 年  
10 月 13 日、鹿児島大学(鹿児島県)  
大井 紗貴、大田 正次、森 直樹、オズ  
カン ハカン、自然集団における野生二倍  
性コムギ及び四倍性コムギの小穂と穎果  
の形態的変異、日本育種学会 第 124 回  
大会、2013 年 10 月 12 日~2013 年 10 月  
13 日、鹿児島大学(鹿児島県)  
Naoki Mori、Phan Thi Thanh、Cristian  
Vladutu、Pham Thien Thanh、Takashige  
Ishii、Miyuki Nitta、Shuhei Nasuda、  
Shahryar Kianian、Genetic analysis of  
domestication traits in emmer wheat  
using an F2 population、12th  
International Wheat Genet. Symp.、  
2013.9.8 日~2013.9.14.、横浜国際平和  
会議場(神奈川県)

〔図書〕(計 2 件)

大田 正次、森 直樹、京都大学出版会、「イ

ンダス-南アジア基層世界をさぐる」長田俊  
樹(編)、「インド冬作物の起源と変遷」、2013、  
(319 - 339)

森 直樹、京都大学出版会、「インダス-南  
アジア基層世界をさぐる」長田俊樹(編)、  
「それなら知っているよ gundu- godi だよ -  
インド矮性コムギ再発見の日」、2013、(340  
- 342)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 直樹(MORI, Naoki)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 60230075