

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292007

研究課題名(和文)ゲノム解読を基盤とする高等植物ミトコンドリアゲノムの包括的研究

研究課題名(英文)Comprehensive studies on higher plant mitochondrial genomes based on genome analysis

研究代表者

寺地 徹 (TERACHI, Toru)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90202192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は植物ミトコンドリアゲノムの構造と機能、ならびに変異と進化に関する包括的な研究を行ない、このゲノムについての新しい概念を創出することを目的とした。そのため次世代シーケンシングにより、コムギやダイコンの近縁種など、合計25種類のミトコンドリアゲノムの解読を完了し、いくつかの組み合わせについて、全塩基配列ベースでゲノム構造の比較解析を行なった。分子コーミングやパルスフィールド電気泳動によりゲノムの物理的状態を調査した結果、少なくともタマネギでは、3分割されたマスターサークルの存在が証明された。なお大腸菌とタバコ葉緑体を用いた発現解析によりダイコンの雄性不稔関連orfの機能を推定した。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to understand plant mitochondrial (mt) genome comprehensively. The NGSs were used to determine nucleotide sequences of the mt genomes from several species in Poaceae and Brassicaceae. Two types of onions were also used as materials. A total of 25 mt genomes were sequenced and a predicted master circle(s) was constructed for each genome. Comparative genomics revealed unexpected conservatism of plant mt genome; only three and one SNPs were identified between a wild and a cultivated barley and between two Brassica rapa, respectively. In contrast, extensive structural variations were observed among mt genomes of radish. The molecular combing failed to show the physical structure of mt genome. PFGE, however, revealed existence of three large circular molecules as master circles of mt genome of the onion. Expression analyses of orf118 from *B. maurorum* were performed in *E. coli* and tobacco chloroplast, though more detailed analyses remained to be done.

研究分野：植物分子遺伝学

 キーワード：ミトコンドリアゲノム コムギ ダイコン 次世代シーケンシング 雄性不稔 ORF 分子コーミング
葉緑体形質転換

1. 研究開始当初の背景

(1) Unselcら(1997)により、シロイヌナズナで高等植物のミトコンドリアゲノムの全塩基配列(366,924bp)が初めて報告されて以来、サトウダイコン(Kubo et al. 2000)、イネ(Notsu et al. 2002)、ナタネ(Handa 2003)、トウモロコシ(Clifton et al. 2004)など複数の高等植物でミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定されていた。しかしこれらの研究は、ゲノムライブラリーから単離された整列クローンの配列を、一つ一つサンガー法で決定してアッセンブルするなど、相当な手間とコストをかけて行われたものであった。

(2) 本研究を開始した当初は、次世代シーケンサー(以降 NGS)が普及し始めた時期である。NGS では一回の実験で得られる塩基配列の情報量が飛躍的に増加するので、ミトコンドリアのゲノム解読に必要な費用も個人研究レベルで手の届く範囲に下がりつつあった。その結果、ミトコンドリアのゲノム解読が終了した植物の種数は加速度的に増加することが予想されていた。なお今日では、200 種近くの高等植物のミトコンドリアゲノムの配列が NCBI に登録されている。

(3) 様々な植物でミトコンドリアゲノムの解読が実施されたものの、このゲノムに関して、以前から謎とされていた以下の事項については明確な解答が得られていなかった。

一般的に高等植物のミトコンドリアゲノムは、マスターサークルとサブサークルから構成される、マルチパート構造をとるとされるが、そもそもマスターサークルは本当に存在するのか。

サブサークルはマスターサークル上のリピート配列を介する分子内組換えにより生じるとされるが、リピート配列には組換えに関与するものと関与しないものがあるように思えるのはなぜか。

複雑な構造を取るにもかかわらず、ミトコンドリアゲノムは次世代に正確に伝達される。その機構は何か。

植物のミトコンドリアゲノムを比較すると、種間、場合によっては種内でも、著しい構造変異が観察される。この構造変異は遺伝子間領域に多く、その結果、オープンリーディングフレーム(*orf*)が新たに形成されることがある。このような *orf* は遺伝子として機能するのか。

2. 研究の目的

(1) 上記の疑問に答えるため、イネ科のコムギとアブラナ科のダイコン、さらにはそれらの近縁種を材料に、ミトコンドリアゲノムの包括的な研究を行なうことを目的とした。

(2) 代表者は、過去に他の研究者とともにパンコムギのミトコンドリアゲノムを初め

て解読しており(Ogihara et al. 2005)、また代表者と分担者は、いち早く NGS を利用して、2 種類のダイコンのゲノム解読を終えている(Tanaka et al. 2012)。パンコムギでは、近縁な *Aegilops* 属植物の細胞質を持つ様々な細胞質置換系統が育成されており(Tsunewaki 2009)、ミトコンドリアゲノムの違いが置換系統の表現型にどのような影響を及ぼすか、詳細に調べられている。またダイコンのミトコンドリアゲノムには、複数のタイプが存在することがすでに調査されており、ミトコンドリアに存在する細胞質雄性不稔(CMS)の原因遺伝子と、核の稔性回復遺伝子の相互作用に関する研究も我々により行なわれてきた。そこで本研究では、コムギとダイコンの近縁種を中心に以下の実験を行なうことを目的とした。

NGS を活用して、多数の植物種のミトコンドリアゲノムを解読する。ゲノム全域を種間や種内で比較して、構造変異の特徴を明らかにするとともに、植物の系統関係を考察する。

分子コーミングの技法を用いて、ゲノム構造を明らかにする。

ミトコンドリアゲノムに多数見出される *orf* のうち、興味あるものについて、大腸菌および葉緑体で発現させ、大腸菌の生育や組換え体の表現型を観察することで、当該 ORF タンパク質の機能を推定する。

3. 研究の方法

(1) 研究の当初、コムギおよびその近縁種 15 種、ダイコン 3 系統をミトコンドリアゲノム解読の材料に供した。また、研究の進展にとともに、新たな知見が期待できる材料として、*Brassica* 属 5 種、タマネギ 2 系統もゲノム解読の材料に加えた。

(2) 当初 NGS によるシーケンシングは、北海道システムサイエンス社に委託し、Roche454 を用いて 400bp ~ 700bp のリードが得られるプロトコルで実施した。各サンプル当たりの情報量は、約 45Mb であった。得られたリードは Roche454 付属の Newbler でアッセンブルされ、我々は組み上がった contig 間の接続を PCR ならびにサンガー法によるシーケンシングで精査した。また、後半の年度には、Roche 社が NGS のサポートから撤退し、Roche454 によるシーケンシングが不可能となる事態に遭遇した。そこで一部のサンプルは、illumina 社あるいは Pacific Bioscience 社の 2 種類の異なる NGS でデータを得て、それぞれゲノムの構築に用いた。

(3) 分子コーミングによるゲノムの構造の推定は、研究分担者(山本)の指導のもと、高純度のミトコンドリア DNA を大量に調製することが可能なタマネギを用いて行なった。また分子コーミングおよび NGS のデータを補完するため、タマネギおよびコムギのミトコンドリアを単離して、Pulse Field Gel

Electrophoresis (PFGE) によるゲノム構造の推定も試みた。

(4) ミトコンドリアゲノム上に存在する新規 *orf* の解析では、主に CMS 原因遺伝子をターゲットとした。具体的には、ダイコンに雄性不稔を引起こすことが知られている *Brassica maurorum* の細胞質の原因遺伝子とされる *orf118* の発現実験を大腸菌で行なうとともに、*orf118* を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコを初めて作出した。またダイコンの *orf138* を大腸菌のプラスミドベクターにクローニングし、後述する進化実験を行なった。

4. 研究成果

本研究で得られた具体的な成果を、以下の4つに分けて報告する。

(1) ミトコンドリアゲノムの解読

研究期間を通じて、コムギ属と *Aegilops* 属植物 9 種 11 系統、他のイネ科植物 4 種 4 系統、ダイコン 3 系統、他の *Brassica* 属 4 種 5 系統、タマネギ 2 系統の合計 25 種類の植物のミトコンドリアゲノムの解読を完了した。その結果、サイズはタマネギのものが最大 (536,617bp) で、*B. rapa* のものが最小 (219,775bp) であることがわかった。

前述のように、高等植物のミトコンドリアゲノムは、マスターサークル上のリピータ配列を介した分子内組換えにより、マルチパート構造をとっているものと推定される。このことは、リピータ配列を持たない *B. maurorum* の場合を除き、NGS のデータ解析からも支持された。すなわち、contig を scaffold へと組み上げる際、ある contig の末端に 2 つの異なる contig が接続する可能性があり、あたかもゲノム配列がこの地点で分岐するように思えるケースがあった。本研究では、メイズ社に、マスターサークルの構築作業を支援するソフトウェアを発注し、このソフトウェアを活用して contig の接続を整理した。なおリピータ配列を含むマスターサークルでは、接続可能な 2 つの contig のうち、どちらを選択して隣接させるかは任意となるため、本研究で構築した *B. maurorum* を除く各植物のマスターサークルは、各植物の配列データから考えうるいくつかの構造のうちの一つを描写したものと言える。また本研究で明らかになった *Ae. searsii* やライムギ、タマネギのもみじ 3 号のマスターサークルは、いずれも 2 つのサークルに分かれて存在するが、2 つのサークル間で共有されるリピータ配列を介せば、これを大きな 1 つのサークルで描くことも可能であった。このように、今回得られた NGS のデータは、マスターサークルの存在を否定するものではなかったが、この結果からミトコンドリアゲノムの物理的な存在形態を一義的に明らかにすることはできなかった。

(2) ミトコンドリアゲノムの比較

本研究では、いくつかの植物の組み合わせについて、比較をミトコンドリアゲノムの全域にわたって行なったところ、このゲノムの保存性と変異性に関連する興味深い知見が得られた。例えば、栽培オオムギ (Haruna Nijo) と野生オオムギ (H602) の比較では、全長 525,999bp のうち、わずか 3 つの SNP しか見つからなかった (Hisano et al. 2016)。また、*B. rapa* の異なる 2 品種 (中生白茎千筋京水菜と王将白菜) の間には、全長 219,775bp のうち 1 つの SNP が存在するのみであった。さらに *Ae. caudata* の細胞質を持つ 2 つの細胞質置換コムギの比較では、パンコムギを 50 世代連続戻し交雑を繰り返したもの ((caudata)-Tve) と、パンコムギを 10 世代以上戻し交雑した後、自殖を繰り返したもの (J02) との間に SNP は存在しなかった。このように、ミトコンドリアゲノムの種内変異が極めて低い分類群があることや、母性遺伝の正確さからこのゲノムの保存性が示された一方、ダイコンの 3 タイプやタマネギの 2 系統のように、種内においても著しい構造変異が認められる分類群があるなど、このゲノムの高い変異性が示唆される場合もあった。この違いが何に起因するのか不明であり、今後の研究課題としたい。

(3) 分子コーミングの技法を用いた、ゲノム構造の推定

当初の計画では、リピータ領域にハイブリダイズする蛍光プローブを用いて、ミトコンドリア DNA に含まれるであろう、複数の組換え分子の存在を検出することを目指した。実験には、NGS の結果から 2 つのサークルが存在することが示されたタマネギのもみじ 3 号を用いた。最初の実験では、塩化セシウム法によって精製したミトコンドリア DNA をスライドガラスに貼り付け、顕微鏡で観察したところ、断片化した分子のみが認められた。そこで、Lilly et al. (2001) の方法に従い、単離ミトコンドリアをスライドガラス上で破碎し、DNA に物理的ダメージを与えることなくプレパレーションする方法に変更した。ミトコンドリア DNA 全域にハイブリダイズするプローブで検出を行ったところ、長鎖の DNA 分子は検出されたものの、サークル状の分子を検出するには至らず、組換え分子の同定もできなかった。

タマネギのゲノム解読から予想される 2 つのマスターサークルの存在を物理的に証明するため、PFGE とレアカッターによるミトコンドリア DNA の制限酵素地図の作成を試みた。その結果、タマネギのミトコンドリアゲノムはマスターサークルとして存在すること、ただしそれは NGS から予想される 2 つのサークルではなく、2 つのうちの 1 つが分子内組換えでさらに分割された、3 つのサークルであることが初めて証明された。

(4) 新規 *orf* の機能解析

ミトコンドリアのゲノム解読により同定された新規 *orf* のうち、*B. maurorum* の CMS 原因遺伝子と推定される *orf118* の機能解析を主に行なった。大腸菌を用いた *orf118* の発現実験では、大腸菌の生育に負の影響が認められた。パーティクルガン法を用いて、タバコの葉緑体ゲノムへ *orf118* を導入したところ、PCR により遺伝子の導入が確認された個体が 3 個体得られた。いずれの個体も、 T_0 世代では、特異な表現型は見られなかったものの、野生型と比べて花粉が少ないものがあった。これらのうちの 2 個体については、自殖により T_1 世代を得ている。今後、より詳細な表現型の観察や、*orf118* の転写・翻訳産物の解析を行う予定である。

ダイコンのミトコンドリアの CMS 原因遺伝子として、オグラ型細胞質が持つ *orf138* とコセナ型細胞質が持つ *orf125* が知られている。これらはいずれも野生のハマダイコンに起源するものであり、両 *orf* の違いはタンパク質の C 末側をコードする塩基配列中の 39bp のリピート配列の数の違い (*orf138*=3 個、*orf125*=2 個) によっている。*orf125* は *orf138* のリピート配列が 1 つ欠失することで生じたと考えられる。今回、自然界でこの *orf* に生じた変異を、大腸菌内で再現できないか、またこの *orf* の変異を拡大できないかと考え、以下の実験を行なった。*orf138* を大腸菌のプラスミドベクターにクローニングし、トランスフォーメーションとプラスミドレスキューを繰り返したところ、*orf138* から *orf125* への欠失変異が生じること、また *orf125* から *orf138* への復帰変異もありえることが示され、コセナ型細胞質の起源について実験的な考察を加えることができた。なお *orf125* 以外にも、*orf138* の 3 個を基準にリピート配列を増減させた新規 *orf* を作成した。今後、大腸菌内での発現実験を行ない、*orf* の構造と機能の関係を探る予定である。

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 4 件)

Hisano H, Tsujimura M, Yoshida H, Terachi T, Sato K (2016) Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). BMC Genomics 17 (1): 824. doi: 10.1186/s12864-016-3159-3 (査読有り)

Yamagishi H, Tanaka Y, Terachi T (2014) Complete mitochondrial genome sequence of black mustard (*Brassica nigra*; BB) and comparison with *Brassica oleracea* (CC) and *Brassica carinata* (BBCC). Genome 57 (11-12): 577-582. doi: 10.1139/gen-2014-0165 (査読有り)

Tanaka Y, Tsuda M, Yasumoto K, Terachi T, Yamagishi H (2014) The complete mitochondrial genome sequence of *Brassica oleracea* and analysis of coexisting mitotypes. Current Genetics 60 (4): 277-284. doi: 10.1007/s00294-014-0433-2 (査読有り)

Yamagishi H, Bhat SR (2014) Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. Breeding Science 64 (1): 38-47. doi:10.1270/jsbbs.64.38 (査読有り)

[学会発表](計 21 件)

軸屋恵, 寺地徹, 山岸博 「*Sinapis* 属植物におけるミトコンドリアの *orf108* の分布」日本育種学会第 131 回講演会 平成 29 年 3 月 30 日 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

太田星史, 牧田真之, 辻村真衣, 寺地徹, 森直樹 「qPCR 法を用いたコムギのミトコンドリアゲノムにおける分子内組換えの定量的解析」日本育種学会第 131 回講演会 平成 29 年 3 月 30 日 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

辻村真衣, 執行正義, 寺地徹 「雄性不稔タマネギのミトコンドリアゲノムの解析」京都産業大学総合生命科学部シンポジウム 平成 29 年 3 月 3 日 京都産業大学 (京都府・京都市)

岩橋直人, 辻村真衣, 村田稔, 寺地徹 「ライムギ細胞質を持つ細胞質置換コムギのミトコンドリアゲノムの塩基配列の決定」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市)

鳩野紗希, 辻村真衣, 山岸博 「ハクサイとミズナのミトコンドリアゲノムの全塩基配列」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 25 日 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市)

辻村真衣, 出雲谷遥, 執行正義, 上ノ山華織, 坂本智昭, 木村成介, 寺地徹 「雄性不稔タマネギのミトコンドリア転写産物の解析」日本育種学会第 130 回講演会 平成 28 年 9 月 24 日 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市)

Toru Terachi "Extensive structural variation among radish mitochondrial genomes revealed by complete sequencing of mitochondrial DNA" K. S. U. International symposium "Frontiers in plant mitochondrial genome research" July 7, 2016, Library hall, Kyoto Sangyo University (Kyoto, Japan)

寺地徹, 岸本岳之, 木下滉平, 児島和志, 中山侑加, 軸屋恵, 山岸博 「大腸菌を用い

たダイコンのミトコンドリア CMS 遺伝子の進化実験」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学 (神奈川県・横浜市)

辻村真衣、森直樹、寺地徹 「スペルタコムギが持つ VIIb 型ミトコンドリアゲノムの解析」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学 (神奈川県・横浜市)

出雲谷遥、辻村真衣、執行正義、寺地徹 「タマネギ (*Allium cepa*) のミトコンドリアゲノムの解析-N 型ゲノム」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学 (神奈川県・横浜市)

植村香織、辻村真衣、永島伊都子、寺地徹 「*Brachypodium distachyon* のミトコンドリアゲノムの解読」日本育種学会第 129 回講演会 平成 28 年 3 月 22 日 横浜市立大学 (神奈川県・横浜市)

軸屋恵、寺地徹、山岸博 「栽培ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔遺伝子 (*orf138*) と稔性回復遺伝子の変異」日本育種学会第 128 回講演会 平成 27 年 9 月 11 日 新潟大学 (新潟県・新潟市)

向井章人、山岸博、田中義行、寺地徹 「*Brassica oxyrrhina* のミトコンドリアゲノム全塩基配列の決定」日本育種学会第 128 回講演会 平成 27 年 9 月 11 日 新潟大学 (新潟県・新潟市)

辻村真衣、金子貴一、執行正義、出雲谷遥、寺地徹 「雄性不稔タマネギのミトコンドリアゲノムの解読」日本育種学会第 128 回講演会 平成 27 年 9 月 11 日 新潟大学 (新潟県・新潟市)

Mai Tsujimura (Tsukatani), Masayoshi Shigyo, Toru Terachi "A new configuration of mitochondrial genome found in CMS onion" The 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology, 17th May to the 22nd May, 2015, Mercure Wroclaw Centre Hotel (Wroclaw, Poland)

Kaori Uemura, Toru Terachi "Multipartite chloroplast genome in the transplastomic tobacco plant as a model to study homologous recombination in organelle genomes" The 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology, 17th May to the 22nd May, 2015, Mercure Wroclaw Centre Hotel (Wroclaw, Poland)

成田華乃、尾関美穂、加藤啓介、北川哲、

Gyawali Yadav, 寺地徹、村井耕二 「細胞質置換コムギ系統における花成遅延に關与するミトコンドリア遺伝子の探索」日本育種学会第 127 回講演会 平成 27 年 3 月 21 日 玉川大学 (東京都・町田市)

寺地徹 「植物のゲノムにみられる共生と競争」朝日地球環境フォーラム 2014 (招待講演) 平成 26 年 10 月 2 日 帝国ホテル (東京都・千代田区)

山岸博、田中義行、寺地徹 「クロガラシ (*Brassica nigra*) におけるミトコンドリアゲノムの全塩基配列」日本育種学会第 126 回講演会 平成 26 年 9 月 26 日 南九州大学 (宮崎県・都城市)

岡部真弥、房相佑、山岸博、寺地徹 「*Brassica maurorum* の細胞質を持つ雄性不稔ダイコンのミトコンドリアゲノムの解読」日本育種学会第 126 回講演会 平成 26 年 9 月 26 日 南九州大学 (宮崎県・都城市)

② 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 平成 26 年 9 月 26 日 南九州大学 (宮崎県・都城市)

〔図書〕(計 2 件)

Yamagishi, H. and Terachi, T. "Cytoplasmic male sterility and mitochondrial genome variations in radish" in Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) The radish genome, 2017, Springer, in press.

Yamagishi, H. "Speciation and diversification of radish" in Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) The radish genome, 2017, Springer, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺地 徹 (TERACHI, Toru)

京都産業大学・総合生命科学部・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・総合生命科学部・教授
研究者番号: 10210345

山本 真紀 (YAMAMOTO, Maki)

関西福祉科学大学・教育学部・教授
研究者番号: 60240123