

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380007

研究課題名 (和文) 核遺伝子によるミトコンドリア DNA の量的変動制御機構の解明

研究課題名 (英文) Analysis of mechanisms for quantitative changes of mitochondrial DNA by nuclear gene

研究代表者

今村 順 (IMAMURA JUN)

玉川大学・農学部・教授

80384717

研究成果の概要：

ナタネの細胞質雄性不稔はミトコンドリア遺伝子 *orf125* が原因遺伝子であることが知られているが、*Brassica rapa* を交配した後代で稔性が回復することが観察された。この稔性回復が核の 1 遺伝子 (Fr) により、*orf125* のコピー数が減少することで引き起こされること、Fr の遺伝子型により稔性回復の程度が決まることを見出した。さらに、核コードの稔性回復遺伝子 *orf687* が存在することで、Fr 遺伝子によるコピー数の減少が起こらないことが観察された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2008 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種

1. 研究開始当初の背景

植物のミトコンドリアゲノムにコードされている重要な農業形質である細胞質雄性不稔 (cms) について、さまざまな種で多くの報告がなされている。その中で最も研究が進んでいる cms の一つに、ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔がある。研究代表者らは、この cms を細胞融合によりダイコンからナタネ (*Brassica napus*) に導入して、不稔性が環境要因によって影響を受けない安定した cms ナタネを作出することに成功している。また、この cms の原因遺伝子である

orf125 やダイコンの核にコードされている雄性不稔回復遺伝子 *orf687* を単離し、遺伝子構造や発現等を明らかにし、核・ミトコンドリア相互作用による雄性不稔現象の全体像を解明してきた。

一方、この研究過程で、cms ナタネに稔性回復遺伝子 *orf687* を持たない *Brassica rapa* を交配した後代で、稔性回復が生じることを見いだした。これら稔性回復個体すべてで、cms 原因遺伝子 *orf125* のコピー数が減少していた。稔性回復遺伝子 *orf687* の稔性回復は、ORF687 タンパク質がミトコンドリア内の *orf125* の mRNA と結合してその翻訳を阻害

し、ORF125 タンパク質を減少させることによるものと推定されている。しかし、*B. rapa* との交配後代で見られた稔性回復は *orf687* による回復とは異なり、おそらく *B. rapa* 由来の核遺伝子により、ミトコンドリアの *orf125* 遺伝子のコピー数が減少することに起因すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的はこの核遺伝子を同定、単離し、発現や機能を解析することで、核遺伝子によるミトコンドリア遺伝子の量的変動制御機構を解明することにある。

まず稔性回復個体において *cms* 遺伝子 *orf125* のコピー数が減少する現象を手がかりとして、*orf125* を含むすべてのミトコンドリア遺伝子の量的変動を調べることと、ナタネとダイコンの *cms* 系統のミトコンドリアゲノムの物理地図を作成することで、*orf125* が座乗しているミトコンドリアゲノムの存在様態を明らかにする。すなわち、*orf125* がミトコンドリアゲノムのマスターサークルに組み込まれているのか、あるいはサブゲノムとして存在しているか、など *orf125* の存在様態を解明することで、*orf125* のコピー数の変動制御機構を推定できると考える。また、PCR 定量法を用いて *orf125* を定量し、*orf125* のコピー数の減少に関与していると想定される *B. rapa* 由来の核遺伝子の遺伝様式を明らかにする。その結果を将来における遺伝子の同定、単離に結び付けたい。

3. 研究の方法

本研究は2つの柱からなる。一つは、ナタネ *cms* 遺伝子 *orf125* の存在様態を解明するものであり、もう一つは、*orf125* の量的変動にかかわっていると想定される核遺伝子の遺伝解析である。*orf125* の存在様態は、ミトコンドリア遺伝子をプローブとしたサザン分析と、ナタネ及びダイコン *cms* 系統におけるミトコンドリアゲノムの詳細な物理地図作製と部分塩基配列決定によって解明できると考える。また、遺伝解析では植物材料の交配育成と組織別、発達段階別の *orf125* コピー数の定量を行い、*B. rapa* 由来の核遺伝子の遺伝様式を調査する。研究代表者は、*orf125* と稔性回復遺伝子に関する研究の実績が、研究分担者には、ナタネ・ミトコンドリアゲノムの構造解析に関する研究実績が、研究協力者には、ナタネをふくむ *Brassica* 属の遺伝育種に関する研究実績があり、3者の共同により所期の目的を達成できるものと考えている。以下にその詳細を記述する。

(1) ミトコンドリア遺伝子をプローブとしたサザン分析と発現解析

前述したように、研究分担者は、ナタネのミトコンドリアゲノム全塩基配列を決定している。その過程で得られたミトコンドリア遺伝子クローンをプローブとして、サザン分析を行う。*orf125* 減少個体と *cms* ナタネ、通常のナタネ、*cms* ダイコンの全ミトコンドリア遺伝子のコピー数とハイブリダイゼーションパターンを比較することで、*orf125* のミトコンドリアゲノムにおける存在様態を推定する。分析はそれぞれの系統の葉から抽出した全ゲノム DNA を用いて行う。また、*orf125* のコピー数が減少した個体における *orf125* の発現を mRNA 及びタンパク質レベルで調べる。これらの実験で核酸、タンパク質の定量に使用する分光光度計を購入した。

(2) ナタネとダイコン *cms* 系統のミトコンドリアゲノム詳細物理地図の作製

前述したように、研究分担者は、これまでにナタネ正常系統のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定し、そのゲノム構造を明らかにしている。この知見をもとにして、*orf125* 遺伝子を持つナタネ及びダイコン *cms* 系統のミトコンドリアゲノムの詳細な物理地図を作製し、*orf125* 遺伝子が座乗する DNA 分子が、それぞれの系統において、ミトコンドリアマスターサークルであるか、あるいはサブサークルであるかを明らかにする。具体的には、ナタネ正常系統の物理地図及び塩基配列のデータに基づいて、PCR 法を用いて *cms* 系統のゲノム断片を順次増幅し、得られた断片のサイズや塩基配列を比較して、*cms* 系統に特異的な挿入・欠失があるかどうかを確認する。また、*orf125* 遺伝子配列を利用して、その隣接領域をクローン化し、塩基配列決定を行い、*orf125* 遺伝子の置かれているゲノム環境を明らかにする。こうしたデータを集積して、*cms* 系統のミトコンドリアゲノムの詳細な物理地図を作製し、ダイコン由来の *orf125* 遺伝子がナタネマスターサークル上に挿入されているか、ダイコン由来のサブゲノムのまま維持されているかを明らかにする。物理地図作製の際には、(1)で行うサザン分析の結果も統合して、利用する。

4. 研究成果

コセナ CMS ナタネに *B. rapa* を交配し、その後ナタネで戻し交配を行ったところ、後代で稔性を回復した個体 (Fr) が観察された。Fr 個体は、稔性回復遺伝子 *orf687* をもたず、Fr 個体を父親として CMS に交配した後代では、稔性回復個体と不稔個体が分離した。また、同一個体で不稔と可稔の花が見られる部分不稔の個体も観察された。

orf125 をプローブとしたサザンハイブリダ

イゼーションを行ったところ、Fr 個体において *orf125* のコピー数の著しい減少が観察された。その Fr 個体を父親として CMS に交配した F₁ 個体でも、*orf125* のコピー数の減少が観察された。この *orf125* のコピー数の減少は稔性とは関連せず、雄性不稔を示す個体においても *orf125* のコピー数の減少が観察された。次に、CMS ナタネではミトコンドリアに *orf125* が座乗しているミトコンドリア DNA のサークル (*orf125* サークル) とマスターサークルが存在しており、*orf125* サークルのコピー数のみが核遺伝子 *Fr* の働きにより減少しているとの仮説をたて、ナタネの全ミトコンドリアゲノムをプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、*orf125* のコピー数が著しく減少している、あるいは半分程度に減少しているが個体と CMS ナタネの間で、検出された主要な 68 本の DNA 断片は同一であった。すなわち、*orf125* のコピー数の変動にかかわらず、ミトコンドリア DNA のハイブリダイゼーションパターンに違いがなかった。このことから、*orf125* サークルが CMS ナタネのマスターサークルとは独立に存在しており、*orf125* サークルは *orf125* を除いてマスターサークルの DNA 配列と同一であるか、あるいは少なくともマスターサークルの DNA 配列の一部と *orf125* から構成されていると考えられる。上述したようにミトコンドリアゲノムにコードされている cms 遺伝子 *orf125* のコピー数は、核遺伝子 *Fr* により制御されていることが明らかになった。次に、*Fr* 遺伝子の遺伝様式を調べ *orf125* のコピー数の変動は核支配の一因子優性遺伝子であることを証明することができた。また、*orf125* 量が減少したヘテロ接合体 (*Frfr*) に品種 Westar (*frfr*) を交配して得られた F₁ 個体 (*frfr*) とその自殖後代 (F₂) の *orf125* 量を比較したところ、その量は CMS 個体のおよそ半分以下に減少し、*Fr* 遺伝子が存在しないにもかかわらず一度減少した *orf125* 量は 2 世代にわたり CMS 個体のレベルに復帰しなかった (図 1)。すなわち劣性ホモ個体においては、*orf125* のコピー数を CMS 個体のレベルまで増加させる働きが弱い、あるいはないと思われる。また、ヘテロ接合体では *orf125* 量は半減しているが 3 世代にわたりほぼ同量を維持し、消失しないことが分かった。これに比べ優性ホモ個体では一世代で *orf125* が完全に消失する。すなわち、*Fr* の 1 遺伝子量では *orf125* は不完全な消失にとどまり完全に消失させるためには 2 遺伝子量が必要であることが明らかになった。

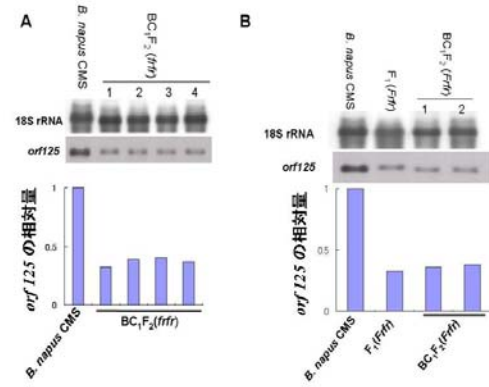


図 1. *Fr* 遺伝子の遺伝子型における *orf125* のコピー数のサザン分析による半定量. CMS ナタネの *orf125* のコピー数を 1 とした. A) 劣性ホモ (*frfr*), B) ヘテロ (*Frfr*). 18SrRNA 遺伝子は内部コントロール

次に、*orf125* 遺伝子のミトコンドリアゲノム中における存在様式を明らかにするために、CMS ナタネの *orf125* を含む 7200bp の領域の塩基配列を決定した結果、*orf125* の終止コード上流 32bp から下流はミトコンドリア遺伝子 *ccmFN1* 領域のゲノム配列と完全に一致し、一方、上流側はコセナの *orf125* 領域とほぼ一致しており、組換え点近傍にある 87bp の反復配列を介した組換えにより生じたことが明らかとなった (図 2)。さらに、詳細な塩基配列比較から、CMS ナタネの *orf125* 領域で見られた組換えは、コセナのミトコンドリア中では同様な反復配列があるにもかかわらず抑制されており、サイブリッド化によって始めてその抑制が解除されて生じたことが明らかとなった。

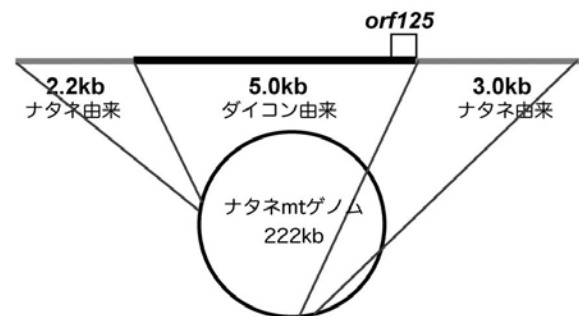


図 2. CMSサイブリッドの *orf125* 領域
約 5kb のダイコン *orf125* 領域がナタネ配列中に挿入されているが、両端のナタネ配列はゲノム中では異なる領域に由来する。
→ *orf125* 領域は再配置されたサブサークル上にある。

これまでに、ミトコンドリアゲノムにコードされている *cms* 遺伝子 *orf125* のコピー数は、一因子の核遺伝子 *Fr* により減少すること、その減少量は、*Fr* 遺伝子の遺伝子型によることを明らかとしたが、①通常の PCR では検出できないまでに *orf125* が減少した系統 (*FrFr*) と CMS 系統のミトコンドリアゲノムをミトコンドリア遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行うことで比較したところ、*cox1* 遺伝子をプローブとした場合のみ多型が観察された。CMS 系統では 2 本のバンドが観察されたが、*FrFr* 系統ではそのうちの 1 本のバンドが消失していた。他のミトコンドリア遺伝子をプローブとした場合、多型は観察されなかった。現在 *orf125* と *cox1* がマスターゲノムとは独立した分子上に存在しており、その分子のみが、*Fr* 遺伝子の影響でコピー数を変動させていると仮定して、*orf125* と *cox1* が座乗している分子の配列を調査中。② *orf125* の翻訳を阻害して ORF125 タンパク質の蓄積を減少させることで、稔性を回復することが知られている稔性回復遺伝子 *Rf* を交配により導入した CMS 個体では、*Fr* 遺伝子が存在するにもかかわらず、*orf125* のコピー数の減少が見られなかった。このことは、*Fr* 遺伝子による *orf125* のコピー数の減少は、*orf125* 遺伝子の発現、すなわち、ORF125 タンパク質の蓄積が必要である可能性がある。現在、*Rf* 遺伝子が存在することで *orf125* が減少しないことを F2 世代を作成して確認中である。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 大嶋雅夫, ナタネにおける稔性回復遺伝子 *Fr* によるミトコンドリアに対する影響, 日本育種学会第 115 回講演会、2009 年 3 月 28 日、つくば国際会議場
- ② Ohima M, Brassica 2008, Copy Number of the CMS Gene, *orf125*, of Kosena CMS Rapeseed is Down-Regulated by a Nuclear Gene, *Fr*, 2008 年 9 月 10 日、リレハンメル(ノルウエー)
- ③ 半田裕一, コセナ CMS ナタネのミトコンドリア CMS 遺伝子 *orf125* 領域は分子間組換えに由来する、日本育種学会 113 回講演会、2008 年 3 月 28 日、明治大学
- ④ 大嶋雅夫, ナタネ *cms* 遺伝子 *orf125* のコピー数の減少と稔性回復遺伝子 *Fr* の遺伝子型との関係、日本育種学会第 113 回講演会、2008 年 3 月 28 日、明治大学
- ⑤ 大嶋雅夫, ナタネにおける *cms* 原因遺伝

子 *orf125* のコピー数の変動と稔性回復遺伝子 *Fr* の遺伝様式, 日本育種学会第 112 回 講演会, 2007 年 9 月 22 日、山形大学

- ⑥ Imamura J, Fertility restoration of Kosena *cms* caused by copy-number reduction of the *cms* gene, *orf125* in *Brassica napus*, International Congress on Plant Mitochondrial Biology, 2007 年 6 月 15 日、奈良女子大学
- ⑦ 今村順, 核遺伝子 *Fr* によるナタネ CMS 遺伝子 *orf125* のコピー数の制御, 日本育種学会第 111 回講演会, 2007 年 3 月 30 日、茨城大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今村 順 (IMAMURA JUN)
玉川大学・農学部・教授
研究者番号: 80384717

(2) 研究分担者

半田 裕一 (HANDA HIROKAZU)
独立行政法人農業生物資源研究所・植物ゲノム研究ユニット・上級研究員
研究者番号: 20343957
肥塚 信也 (KOIZUKA NOBUYA)
玉川大学・農学部・准教授
研究者番号 30433866