

学 位 論 文 題 名

テンサイの細胞質雄性不稔系統における
ミトコンドリア遺伝子突然変異に関する研究

学位論文内容の要旨

細胞質雄性不稔性（CMS）は、F₁ 雑種の実用採種に不可欠な遺伝形質であるが、その分子的结构には未だ不明な点が多い。

テンサイでは、S 型の細胞質による CMS が一代雑種育種に広く用いられており、正常型と S 型 CMS 系統ではミトコンドリア DNA（mtDNA）や産生タンパク質の差異が報告されている。本研究では、テンサイ CMS の分子的结构を明らかにする目的で、正常型系統、S 型 CMS 系統および S 型とは異型の S-2、S-3、S-4 各型の CMS 系統を用いて、ミトコンドリア遺伝子の構造およびその発現に関する遺伝子解析を行った。

(1) 9 種の遺伝子プローブによる mtDNA の RFLP 分析

正常型系統および各型の CMS 系統の mtDNA を制限酵素 BamHI、EcoRI あるいは Hind III により完全分解し、9 種のミトコンドリア遺伝子（*coxI*、*coxII*、*coxIII*、*cob*、*atpA*、*atp 6*、*atp 9*、*rrn 26*、*rrn 18*）をプローブに用いてサザンブロット分析を行った。その結果、*cox I* と *rrn 18* を除く 7 種のミトコンドリア遺伝子について各系統間にそれぞれ多型が見出された。

(2) 雄性不稔性に関わるミトコンドリア遺伝子の検出

多型の検出された 7 種のミトコンドリア遺伝子のうち、*rrn 26* に関しては、ノーザンブロット分析で正常（N）型および各型の CMS 系統が同一の転写パターンを示し、雄性不稔性との関連は少ないと推定された。また、*atp 9*、*coxIII*、*cob* の 3 遺伝子については、S 型 CMS 系統のみを特徴づける RFLP 像が検出されたが、N 型系統と S 型 CMS 系統よりの多型断片をクローン化して、制限酵素切断地図を作成したところ、いずれの遺伝子においてもタンパク質のコード域からかなり離れた部位に構造変異の起きていることがわかった。したがって、雄性不稔性への影響は少ないと推察される。これに対して、*coxII*、*atpA* および *atp 6* の 3 遺伝子については、各型の CMS 系統においてコード領域に近接した部位に構造変異が見出された。

(3) *coxII* 遺伝子の解析

正常型系統の mtDNA における *cox II* (*Ncox II*) は単一コピーから成り、1463bp のイントロンによって、5' エキソン (382 bp) と 3' エキソン (398 bp) に分断される。これに対して S 型 CMS 系統の mtDNA からは、*cox II* クローンが 2 種類 (*Scox II*-1 と *Scox II*-2) 得られた。塩基配列の解析結果から、これらの *Scox II*-1 および *Scox II*-2 は *Ncox II* とでは、開始コドンの 5' 上流 50 bp からの塩基配列の相同性が全く失われていた。この領域はおそらく転写調節のために重要である。*Ncox II* の転写物が 1.3 kb であったのに対して、S 型 mtDNA からは 1.6 kb の主な転写物と 2 種の副次的な産物が得られた。一方、*Scox II*-2 においては、3' エキソン内において組換えが起こったために ORF が 3' 側に 101 コドン分伸長していた。

また、*Scox II* の 5' 上流の相同領域は S-2 型 CMS 系統にも存在し、52 bp の相同配列を有していた。したがって、*Scox II*-1 は S-2 型の祖先型において、*cox II* 遺伝子と *Scox II*-1 の 5' 上流相同域の間で 52 bp の相同配列を介して組換えの起った可能性が考えられる。また *Scox II*-2 は *Scox II*-1 に生じた再編成による産物と推定される。

(4) *atpA* 遺伝子の解析

正常型系統の *atpA* 遺伝子 (*NatpA*) は 1518 bp から成り、コード域内に 3 箇所の C→U エディティングを含んでいた。それらのいずれもがプロリンからロイシンへのアミノ酸変換をもたらす修飾であった。次に、S 型および S-2 型 CMS 系統より *atpA* 遺伝子をクローン化して構造解析を行った。いずれの *atpA* もコード域の塩基配列は *NatpA* と同一であったが、*NatpA* と S 型 *atpA* (*SatpA*) 間では開始コドンから数えて、わずか 47 bp 上流より構造変異を生じていた。他方、S-2 型 *atpA* (*S-2 atpA*) については、5' 上流域の構造は、*NatpA* と変わらなかったが、3' 隣接域 (終止コドンの下流 393 bp) に組換えを生じていた。ノーザンブロット分析によれば *S-2 atpA* における 3' 隣接域の構造変異は転写パターンに影響を及ぼしていないが、*SatpA* では *NatpA* とは異なる転写物が得られ、さらに RNase プロテクション分析とプライマー伸長法によって mRNA の 5' 隣接域の構造変異が転写に影響していることがわかった。

また、*S-2 atpA* を特徴づける 3' 隣接域は正常型系統および S 型 CMS 系統の mtDNA 中にも存在し、その上、S-2 型 CMS 系統の mtDNA 中では反復がみられた。なお、これらの配列は *NatpA* と 406 bp の配列を共有していた。したがって、正常型系統の祖先型において、この 406 bp 配列を介して相同組換えにより、*S-2 atpA* を生じたと考えられる。

(5) *atp 6* 遺伝子の解析

正常型系統の mtDNA よりクローン化した *atp 6* 遺伝子 (*Natp 6*) は 750 bp から成り、0.95 kb の mRNA が転写されていた。これに対して、S 型および S-2 型 CMS 系統では、それぞれ

2.3 kb ならびに 2.2 kb の *atp 6* 転写物が検出された。これは、S 型の *atp 6* (*Satp 6*) と S-2 型の *atp 6* (*S-2 atp 6*) においてそれぞれ開始コドンの上流 41 bp から構造変異を生じ、*Satp 6* の上流に 525 bp の *Sorf 1* が、また *S-2 atp 6* の上流に 702 bp の *orf 234* が配置され、これらの ORF が下流の *atp 6* と共転写されているためと考えられた。*Sorf 1* と *orf 234* の塩基配列の相同性は 86% 程度であったが、アミノ酸配列から推定して、共にミトコンドリアの内膜を貫通できるタンパク質と考えられる。

(6) *Beta* 属における mtDNA の多型

Beta 属に属する栽培品種および野生種について、4 種のミトコンドリア遺伝子 *cox I*, *cox II*, *atpA*, *atp 6* をプローブに用いて PFLP 分析を行った。多型のみられた断片をクローン化し、それらの構造を解析したところ、フダンソウ (*B. vulgaris* ssp. *cicla*) に属する 8 系統は、S-3 型および S-4 型 CMS 系統と同一の構造を有していた。また野生種では、*cox I*, *cox II*, *atpA*, *atp 6* の各遺伝子の隣接域に多様な構造変異が見出された。その中で、*Patellares* 節の系統は *cox I*, *cox II*, *atpA*, *atp 6* 各遺伝子のいずれにおいても他節の系統と構造的差異があり、テンサイから最も遠縁であることが示唆された。

以上の各知見は細胞質雄性不稔性の育種的利用や野生種からの有用遺伝子の導入のための基礎として重要と考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 俊 郎

副 査 教 授 島 本 義 也

副 査 教 授 三 上 哲 夫

テンサイの細胞質雄性不稔性 (CMS) は、F₁ 雑種の実用採種に不可欠な遺伝形質であり、いわゆる S 型細胞質を有する CMS 系統が一代雑種品種の採種に広く用いられている。CMS の発現にはミトコンドリア DNA (mtDNA) が関係し、細胞質ゲノムには S 型のほかに異型の S-2, S-3, S-4 の各型が見出されている。本研究ではこれら各型の CMS 系統中におけるミトコンドリア遺伝子の構造および発現に関する遺伝子解析を行った。

本論文は 7 章より成り、138 頁で、表 13 と図 44 を含む。主な内容は下記の如く要約される。

(1) ミトコンドリア遺伝子の多型分析

正常(N)型および4型のCMS系統のmtDNAを制限酵素で完全分解し、9種のミトコンドリア遺伝子をプローブに用いてサザンブロット分析を行った。その結果、7種のミトコンドリア遺伝子については多型が検出され、その7種のうちの*rrn 26*に関しては、ノーザンブロット分析ですべての系統が同一の転写パターンを示したので雄性不稔性との関連は少ないと推定された。また、*atp 9*, *coxIII*, *cob*の3遺伝子については、いずれの遺伝子においてもタンパク質のコード域からかなり離れた部位にそれぞれ構造変異が起きているために雄性不稔性との関連は少ないと考えられた。これに対して*coxII*, *atpA*および*atp 6*の3遺伝子については、N型と各型のCMS系統においてタンパク質のコード領域に近接したところに構造変異が検出された。

(2) *coxII*遺伝子の解析

N型系統のmtDNAにおける*coxII* (*NcoxII*)は単一コピーから成り、1463 bpのイントロンによって、5'エキソン(382 bp)と3'エキソン(398 bp)に分断される。これに対してS型CMS系統のmtDNAからは、*coxII*クローンが2種類(*ScoxII-1*と*ScoxII-2*)得られ、塩基配列を調べたところ、*NcoxII*の開始コドンの5'上流50 bpからの転写調節に係わる領域において塩基配列に相違を生じていた。因みに*NcoxII*の転写物が1.3 kbであったのに対して、S型mtDNAからは1.6 kbの主な転写物と2種の副次的な産物が得られた。*ScoxII-2*においては、さらに3'エキソン内において組換えが起こったためORFが3'側に101コドン分伸長していた。

(3) *atpA*遺伝子の解析

N型系統の*atpA*遺伝子(*NatpA*)は1518 bpから成り、コード域内に3箇所のC→U editingを含んでいた。それらのいずれもがプロリンからロイシンへのアミノ酸変換をもたらす修飾であった。S型およびS-2型CMS系統の*atpA*はコード域の塩基配列が*NatpA*と同一であったが、*NatpA*とS型*atpA* (*SatpA*)間では開始コドンから数えて、47 bp上流より構造変異を生じていた。他方、S-2型*atpA* (*S-2 atpA*)については、3'隣接域(終止コドンの下流393 bp)に組換えを生じていた。ノーザンブロット分析によれば*S-2 atpA*における3'隣接域の構造変異は転写パターンに影響を及ぼしていないが、*SatpA*では*NatpA*とは異なる転写物が得られ、さらにRNaseプロテクション分析とプライマー伸長法によって転写開始点に相違のあることがわかった。

(4) *atp 6*遺伝子の解析

N型系統のmtDNAよりクローン化した*atp 6*遺伝子(*Natp 6*)は750 bpから成り、0.95

kb の mRNA が転写されていた。これに対して、S 型 *atp 6* (*Satp 6*) と S-2 型 *atp 6* (S-2 *atp 6*) ではそれぞれ開始コドンの上流41 bp から構造変異を生じ、*Satp 6* の上流には525 bp の *Sorf 1* が、また S-2 *atp 6* の上流に702 bp の *orf 234* がそれぞれ配置されていて、これらの ORF は下流の *atp 6* と共転写されていた。

(5) *Beta* 属における mtDNA の多型

Beta 属の栽培品種および野生種について、4 種のミトコンドリア遺伝子をプローブに用いて RFLP 分析を行い、それらの構造を分析した。フダンソウ (*B. vulgaris* ssp. *cicla*) の 8 系統は、S-3 型および S-4 型 CMS 系統と同一の構造を有していた。また野生種では、*cox I*, *coxII*, *atpA*, *atp 6* の各遺伝子の隣接域に多様な構造変異がみられ、*Patellares* 節の系統はすべて他節の系統と構造的差異があり、テンサイから最も遠縁であることに符号した。

以上の各知見は細胞質雄性不稔性の育種の利用や野生種からの有用遺伝子の導入のための基礎として重要と考えられる。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合せて、本論文の提出者千田峰生は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。