

学位論文題名

テンサイ雄性不稔細胞質における
ミトコンドリアゲノム再編成に関する研究

学位論文内容の要旨

テンサイの一代雑種採種に広く用いられている雄性不稔株は、すべて自然発見によるS型細胞質を有する。しかし細胞質雄性不稔性（CMS）と深い関係を有するミトコンドリアゲノムの分子構造に関する知見はなお不十分である。そこで本研究では、正常（N）型とS型雄性不稔系統からミトコンドリア（mt）DNAを抽出してそれらの構造解析を行い、変異域の特定や遺伝子発現を調べた。

1. 正常（N）型ミトコンドリアゲノムの構造解析

N型mt DNAの物理地図ならびにクローンバンクを作成し、ゲノムマッピングを行った。ゲノムウォーキングによって明らかになったN型ゲノムのマスター染色体は358 kbであった。ゲノム全領域をクローン化して、物理地図上に21種のミトコンドリア遺伝子をマッピングした。そのうちnad 9は高等植物で初めて見いだされた遺伝子である。cDNAの解析によればテンサイnad 9のmRNAは5箇所のエディティング部位を有する。このほかにN型ゲノムについて以下のような特徴が明らかになった。

i) N型ゲノム中には多様な反復配列が含まれていることがハイブリダイゼーション実験により判った。最長の反復配列は4.7 kbでrrn 26を含み、マスター染色体当たりで3コピー存在した。この反復配列により分子内組換えを生じることがコスミドクローンの解析から示された。また遺伝子コード域の一部や転写調節域の配列から成る、0.5 kbに満たない短い配列のファミリーも見いだされた。

ii) mt DNA中には葉緑体（cp）DNAとの相同配列が含まれていた。ハイブリダイゼーション実験から、6領域におけるcp DNA配列の存在が明らかになった。このようなcp DNAとの相同配列の中で、trn P, trn W, 及びpet Gについて構造解析を行った。cp DNAとの塩基配列比較からtrn P, trn W, pet Gは697 bpの転移配列中に含まれることが判った。これら3種の遺伝子はcp DNAと同様にクラスターを形成し、コード域のcp DNAとの相

同性は93%以上で、非コード域では68~78%であった。遺伝子の発現を調べたところ、*trnW*のみが転写されていた。

テンサイの近縁種である*Beta trigyna*と*B. webbiana*のmtDNAにも相同配列が存在し、*petG*配列において重複や欠失変異がみられた。塩基配列の相同性は96%以上で、塩基置換率はcpDNAの1/5~1/4であった。また塩基配列の比較解析により、植物種を越えて共通する60bpの配列が*trnP/trnW*遺伝子間領域に見い出された。このことは高等植物のmtDNAにおける*trnP*、*trnW*の相同配列がcpDNAより転移したのはかなり古い時代であった可能性を示唆する。

2. S型雄性不稔ミトコンドリアゲノムの構造変異

S型mtDNAの物理地図を作成してN型の場合と比較した。N型クローンを用いたRFLP分析によりS型を、N型と同じ構造を有する15領域(リンケージ群)とS型固有の変異域とに分けた。続いて変異域をクローン化してS型の物理地図(376kb)を作成した。マッピングによればS型はN型と異なる反復配列を含んでいた。

2種の物理地図を比較すると、15種のリンケージ群の順序や方向の異なることが明らかになった。さらに詳細なRFLP分析によれば両ゲノムに共通な配列は約250kbで、全体の25~28%はN型とS型のそれぞれに固有の配列であった。

変異域におけるミトコンドリア遺伝子の発現について調査した。N型ゲノムの転写地図を作成したところ23種の転写領域が明らかになり、そのうち15領域はS型ゲノムの構造変異域と一致した。しかもこの15領域のうち5領域に含まれる遺伝子は未同定であった。このことは既知の遺伝子プローブに頼った解析では全変異域の調査であったとは言えないことを意味する。そこで変異域を全て網羅するN型及びS型ゲノミッククローンを選び出し、それらをプローブに用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、17種の変異域のうち、5領域で転写産物の違いを検出した。転写産物に差異を生じた遺伝子としては*coxII*、*atpA*、*atp6*、及び*rps13*であったが、残る1領域の遺伝子は不明であった。

テンサイで未だ解析されていない*rps13*についてN型とS型間での比較を行った。その結果、遺伝子コード域の上流56bpより両者の塩基配列が大きく異なっており、S型に固有のオープンリーディングフレーム(*orf300*)が発見された。*orf300*は他の植物種のCMS関連配列と同様にキメラ構造を有しており、S型ゲノム中で転写されていた。

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

学 位 論 文 題 名

テンサイ雄性不稔細胞質における ミトコンドリアゲノム再編成に関する研究

テンサイの細胞質・核遺伝子型雄性不稔はミトコンドリアゲノム (mtDNA) の分子構造と深い関係を有することが明らかになっている。そこで本研究では、正常 (N) 型と S 型雄性不稔系統からミトコンドリア (mt) DNA を抽出してそれらの構造解析を行い、変異域の特定や遺伝子発現を調べた。

本論文は 5 章より成り、130 頁で表 3 と図 43 を含む。

1. 正常 (N) 型ミトコンドリアゲノムの構造解析

ゲノムウォーキングによって明らかにされた N 型ゲノムのマスター染色体は 358 kb で、物理地図上に 21 種のミトコンドリア遺伝子をマッピングした。そのうちの *nad9* は高等植物で初めて見いだされた遺伝子であり、*nad9* の mRNA は 5 箇所のエディティング部位を有していた。N 型ゲノム中には多様な反復配列が含まれ、最長の反復配列は 4.7 kb で *rrn26* を含み、マスター染色体当たりで 3 コピー存在していた。この反復配列により分子内組換えを生じることがコスミドクロンの解析からも示された。

2. S 型雄性不稔ミトコンドリアゲノムの構造変異

N 型クローンを用いて RFLP 分析により S 型 mtDNA の物理地図 (376 kb) を作成した。S 型ゲノムは N 型と同じ構造を有する 15 領域 (リンケージ群) と S 型固有の変異域とに分けられた。

2 種の物理地図を比較すると S 型は N 型と異なる反復配列を含み、15 種のリンケージ群の順序や方向の異なることが明らかになった。さらに両ゲノムに共通な配列は約 250 kb で、全体の 25~28% は N 型と S 型のそれぞれに固有の配列であった。

変異域におけるミトコンドリア遺伝子の発現をみるため、N 型ゲノムの転写地図を作成

したところ23種の転写領域が明らかになり、そのうち15領域はS型ゲノムの構造変異域と一致した。しかもこの15領域のうち5領域に含まれる遺伝子は未同定であった。そこで変異域を全て網羅するN型及びS型ゲノミッククローンを選び出し、それらをプローブに用いてノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、17種の変異域のうち、5領域で転写産物の違いを検出した。転写産物に差異を生じた遺伝子としては *cox I I*、*atp A*、*atp 6*、及び *rps 13* であったが、残る1領域の遺伝子は不明であった。*rps 13* についてN型とS型間での比較を行った結果、遺伝子コード域の上流56bpより両者の塩基配列が大きく異なっており、S型固有のオープンリーディングフレームが発見され、S型ゲノム中で転写されていた。

3. ミトコンドリアゲノム中に見い出された葉緑体由来の遺伝子クラスター

mtDNA中には葉緑体(cp)DNAとの相同配列が含まれていた。ハイブリダイゼーション実験から、6領域におけるcpDNA配列の存在が明らかになった。

cpDNAとの塩基配列比較から *trn P*、*trn W*、*pet G* は697bpの転移配列中に含まれ、cpDNAの場合と同様にクラスターを形成し、コード域のcpDNAとの相同性は93%以上で、非コード域では68~78%であった。3遺伝子の内、*trn W*のみが転写されていた。

テンサイの近縁種である *Beta trigyna* と *B. webbiana* のmtDNAにも相同配列が存在し、*pet G* 配列において重複や欠失変異がみられた。塩基配列の相同性は96%以上で、塩基置換率はcpDNAの1/5~1/4であった。また塩基配列の比較解析により、植物種を越えて共通する60bpの配列が *trn P*/*trn W* 遺伝子間領域に見い出された。このことは高等植物のmtDNAにおいて *trn P*、*trn W* の相同配列がcpDNAより転移したのはかなり古い時代であったことを示唆する。

本研究は雄性不稔性と関連の深いミトコンドリアゲノムの分子構造を明らかにしたことによりテンサイの分子遺伝学への貢献が大きい。よって審査員一同は最終試験の結果と合わせて本論文の提出者久保友彦は博士(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。