

学 位 論 文 題 名

MOLECULAR STUDIES ON
CYTOPLASMIC MALE STERILITY OF RICE

(イネの細胞質雄性不稔の分子機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

核遺伝子は、さまざまなレベルでミトコンドリア遺伝子の発現を調節している。植物ではミトコンドリアと核の不和合が原因である母性遺伝形質がいくつかあり、中でも細胞質雄性不稔 (CMS) は多くの植物でみられる現象である。CMS 植物では母性生殖器官を含めて他の組織は正常であるにもかかわらず、機能的な花粉を生産できない。いくつかの CMS 型ミトコンドリアゲノムには、正常なミトコンドリアには存在しないタンパク質をコードする CMS 遺伝子の候補もみつかり、機能が推測されている例もある。一方、特定の CMS に対して稔性を回復する遺伝子 (Rf) が核に存在する。Rf により CMS 遺伝子産物は転写産物のレベルやタンパク質レベルで変化するという報告がなされているが、Rf の機能はこれまでの研究では明らかにされていない。また多くの CMS は遠縁の植物間の核と細胞質を組み合わせた場合に出現するが、ミトコンドリアゲノム構造や転写様式の複雑さから、CMS の原因を特定することは困難である。本研究は、細胞融合により得た CMS 細胞質雑種 (サイブリッド) のミトコンドリアゲノムを解析することにより、イネの CMS 遺伝子を同定するとともに、転写産物の解析を通じて Rf 遺伝子による CMS の発現と稔性回復の分子機構についてモデルを提唱したものである。

1. 雄性不稔細胞質 [cms-bo] に特異的に存在する遺伝子

CMS 細胞質 [cms-bo] をもつ Chinsurah boro II (CBII) と正常細胞質をもつ日本晴との非対称細胞融合により得た CMS サイブリッドを材料にして、[cms-bo] の原因遺伝子を調査した。ミトコンドリア遺伝子 13 個を含む 10 個の DNA 断片をプローブ

に用いて、ミトコンドリアゲノムのサザン解析を行った。atp6 をプローブにしたときのみ CBII と CMS サイブリッドのハイブリダイゼーションパターンは同じであり、[cms-bo] 型ミトコンドリアに特異的に存在する B-atp6 が CMS 遺伝子の候補として有力となった。

正常型の N-atp6 と B-atp6 の塩基配列を比較したところ、5' 上流域およびコード領域は全く同じであったが、ストップコドン以下 49 番目の塩基から下流は全く異なっていた。B-atp6 の 3' 配列中には、イネのミトコンドリア coxII, tRNA^{'M'} 下流域、および coxI 等と相同性のある配列が存在していることから、B-atp6 はミトコンドリアゲノム組換えによって生じたと考えられた。また、coxII および tRNA^{'M'} との相同塩基配列が重なる領域には、2つの逆向き反復配列が並んでいることがわかった。

2. Rf-1 遺伝子の機能

N-atp6 と B-atp6 のコード領域は全く同じであったが、B-atp6 は 3' 領域の違いにより転写産物のレベルで発現調節される可能性が考えられた。ノザン解析を行ったところ、N-atp6 は核の Rf-1 の有無にかかわらず約 1.5 kb の RNA を生産するが、B-atp6 は Rf-1 が存在するとき、N-atp6 と同じサイズの 1.5 kb と、0.45 kb の 2つの RNA を生産する。一方、Rf-1 が存在しないと 2.0 kb RNA が検出された。そこで次に正確な転写領域の解析を行った。5' 末端の同定をプライマー伸長法により行ったところ、B-atp6 由来の 1.5 kb および 2.0 kb RNA の 5' 末端は 1.5 kb N-atp6 RNA と同じであることがわかった。RNA の 3' 末端は、各 RNA の 3' 末端を含む cDNA を polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した後クローニングし、得られたクローンの塩基配列を調べることにより決定した。その結果、2.0 kb および 0.45 kb RNA の 3' 末端は同じであったが、1.5 kb B-atp6 RNA の 3' 末端は B-atp6 特異的 3' 領域にマッピングされた。またノザン解析では検出されなかったが、PCR 法により Rf-1 をもつイネにもプロセッシングされる前の 2.0 kb RNA が検出された。以上の実験により、2.0 kb B-atp6 RNA は Rf-1 の働きにより B-atp6 特異的 3' 配列中の逆向き反復配列でプロセッシングされ、その結果 1.5 kb と 0.45 kb RNA が生ずると結論した。

3. Rf-1 による転写後の制御と CMS 発現機構

以上の結果から、RNA プロセッシングによる RNA の構造変化は、転写後の RNA エディティングに影響を与える可能性があるかと推測された。そこで atp6 cDNA を合成し、コード領域中に存在する 9 箇所のエディティング部位について調査した。プロセッシングされた B-atp6 RNA は N-atp6 RNA と同様にエディティングされていたが、プロセッシングされていない RNA の中には全くエディティングされていないものや不完全にエディティングされたものが見つかった。この現象は、Rf-1 の有無に関係なく観察された。以上の結果は、Rf-1 が直接 RNA エディティングに関与するのではなく、プロセッシングを通して間接的にエディティングの効率を上げていることを示している。また、プロセッシングされた RNA もされない RNA も 5' 末端は同じなので、いずれも翻訳されると考えられる。

正常なエディティングの場合は、9 箇所のエディティング部位のうち 6 箇所でアミノ酸の置換が起こるが、置換後のアミノ酸配列は生物種間で非常によく保存されていた。また 6 箇所のうち 3 箇所では親水性のセリンから疎水性のロイシンへの置換がみられる。そのため CMS ミトコンドリアでは、構造や機能が異常な ATP6 が、正常な ATP6 と生産過程で競合するか、もしくは ATPase のアセンブリー形成を阻害するために、ATPase 活性の低下をもたらし、正常な花粉形成が行われないと考えられる。

ミトコンドリア遺伝子は、転写レベルおよび転写後のレベルで核遺伝子により発現が調節されている。本研究の結果から、イネの CMS においてはプロセッシング酵素をコードすると考えられる核の Rf-1 遺伝子が、CMS ミトコンドリア特異的な atp6 RNA のエディティングを間接的に正常化していることが明らかとなった。このようなミトコンドリア遺伝子の発現調節機構はおそらく他の遺伝子にも存在し、CMS の中には、イネの例の他にも、核とミトコンドリアの不和合によるエディティングの異常が原因となっているものがあると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 藤 茂 行

副 査 教 授 堀 浩

副 査 教 授 三 上 哲 夫 (農学研究科)

副 査 助 教 授 加 藤 敦 之

学 位 論 文 題 名

MOLECULAR STUDIES ON CYTOPLASMIC MALE STERILITY OF RICE

(イネの細胞質雄性不稔の分子機構に関する研究)

花粉が不稔となる雄性不稔に、ミトコンドリアDNAの組み換えが関連するという研究報告が以前からトウモロコシ、ペチュニア、テンサイ等でなされていた。更に、細胞質雄性不稔を回復させる核遺伝子も知られていたが、その作用機構の詳細は不明であった。申請者は、イネの細胞質雄性不稔を研究し、その分子機構の解明に大きく貢献する優れた成果を挙げた。

植物のミトコンドリアのゲノムはサイズが大きくて変異度も高く、雄性不稔とゲノムの編成替えとの関連性を見るには不適當である。そこで申請者は、稔性植物体のミトコンドリアのゲノム内に雄性不稔に関連するミトコンドリアDNA領域のみを組み込んでいる不稔性株(雄性不稔サイブリッド株)を実験材料として用いた。稔性株、雄性不稔株、雄性不稔サイブリッド株のそれぞれからDNAを抽出し、13種類のミトコンドリア遺伝子をプローブとして Southern 法で検索した結果、ATPaseサブユニット6の遺伝子、atp6 に相補性を示す DNA断片が、稔性株と雄性不稔株の間で異なることを発見した。即ち、不稔性株と不稔性サイブリッド株では、稔性株に見られる 1.3 kb の HindIII断片(N-atp6)のほかに 0.9 kb HindIII断片(B-atp6)が存在し、これが雄性不稔と関連のあることが示唆された。

N-atp6 と B-atp6 のコード領域と、3'領域をプローブとした Northern法によって、1.3 kbの N-atp6 からは 1.5 kbのRNAが転写されるが、0.9 kbの B-atp6 からは 2.0

kb RNAの生ずる事がわかった。

この雄性不稔サイブリッドの不稔性が、核遺伝子のRf-1により回復することは既に示されていたが、Rf-1があると 2.0 kb RNAは無く、代わりに 1.5 kb と 0.45 kb の RNAが存在した。5'末端の解析から、それら2分子のRNAは 2.0 kb RNAがプロセスされて生じたものである事が知られた。従って、この稔性回復遺伝子は異常に長い転写物を切断して正常の 1.5 kb RNAとするプロセッシング酵素の遺伝子であることが明確となった。このような研究報告は世界で初めてのものである。

植物のミトコンドリアRNAに就いてはエディティングという現象が知られている。申請者はイネの atp6 遺伝子のcDNAを調べ、この遺伝子の転写物についても相当な頻度でエディティングが起こる事を示した。ところで稔性個体で見られる 1.5 kb RNAと、雄性不稔個体で作られる 2.0 kb RNA、又、回復遺伝子でプロセスされた 1.5 kb RNAの各々に就いてエディティングの程度を比較すると、1.5kb RNAでは大部分のエディティングサイトで C→U の修正が起こっているが、2.0 kb RNAでは、その程度に可成の変異があった。上記の結果から、雄性不稔は atp6遺伝子の3'下流領域で何らかの編成替えが起こった結果、通常よりも長いRNAが作られ、それについてはエディティングが不十分で、従って活性のある ATPaseサブユニット6 が合成されず雄性不稔になる。又、回復遺伝子 Rf-1 があると、長過ぎる異常転写物がプロセスされて、正常な mRNAとなり、それは有効にエディティングされ、正常な ATPaseが産生されて花粉の稔性が回復する、といった経過が描けるようになった。そこで少なくともイネのATPaseが関与する雄性不稔に就いては、その分子機構の実態が明らかになった。この研究成果は植物分子生物学、植物遺伝学の関係者に強いインパクトを与え、国内外より高い評価を得たものである。最終試験の結果も満足すべきものであり、7編の参考論文の質も高く、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。