

# 低温環境におけるコムギとイネの ミトコンドリア遺伝子発現制御機構の解析

## 学位論文内容の要旨

低温はしばしば冷害をもたらし、作物の栽培地域の拡大を阻む要因となっている。そのため低温に対する作物の応答機構を明らかにすることは、北方圏農業の発展を図る上で重要な意義をもつ。低温下での植物体の反応は複雑を極めるが、本研究では特にミトコンドリアに関連する異常を指摘する研究事例が多いことに注目した。

低温に対する植物ミトコンドリアの反応に関しては、これまでに細胞学的あるいは生理・生化学的研究が行われ、また呼吸代謝にかかわる核ゲノムコードの遺伝子の発現解析も進められている。しかし、ミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子の低温応答に関する研究例は殆んど無い。本研究では、コムギとイネのミトコンドリア遺伝子の発現が低温環境により変化することをはじめて見出し、その機構の解明を試みた。

### 1) 低温環境下での *cox2* 遺伝子の発現

コムギとイネのミトコンドリア遺伝子 *cox2* (シトクローム酸化酵素サブユニット II) は共に 1 個のグループ II イントロンを含む分断遺伝子である。コムギにおいては、0.5–2°C の低温に遭遇すると、イントロンのスプライシングを経ていない *cox2* 前駆体転写産物の蓄積量が、低温処理日数に応じて増加する現象が認められた。一方、スプライシングを終了した成熟転写産物量には変化はみられなかった。同様の傾向は 12°C の低温に遭遇したイネの *cox2* についても認められ、前駆体転写産物の蓄積量が増加し、スプライシングを終了した転写産物量はやや減少した。ただ、COX II ポリペプチドの蓄積量は低温によって影響を受けなかった。低温と関連の深いストレスに対する応答を調べるため、乾燥、NaCl および ABA 処理を試みたが、いずれも前駆体転写産物の増加を引き起こさなかった。

次に低温環境下での *cox2* の RNA エディティングを解析した。その結果、スプライシングを終了した転写産物ではほぼ全ての部位でエディティングが生じていることが分かった。一方、前駆体転写産物については低温により影響を受けるエディティング部位がみつかった。特にグループ II イントロンのスプライシング反応に重要と考えられる IBS1 (Intron Binding Site 1) のエディティングは、コムギにおいては 0.5–2°C の低温により著しく頻度が低下し、また、イネにおいては 12°C の低温により完全に阻害されていた。

## 2) グループIIイントロンを持つミトコンドリア遺伝子の発現

イネおよびコムギのミトコンドリアゲノムには、それぞれ合計して23個、22個のグループIIイントロンがある。イネについては全イントロンを含む9遺伝子、コムギでは計10個のイントロンを含む5遺伝子に関して、ノーザン分析と個々のイントロンのスプライシングに着目した定量的RT-PCRにもとづく転写解析を行った。その結果、低温処理（コムギで0.5–2°C、イネで12°C）によりイントロンを含む転写産物の蓄積量が減少した事例は一つもなく、増加する場合（コムギ10イントロンとイネ16イントロン）および変化しない場合（イネ7イントロン）が認められた。従って、低温処理によりイントロンを含む転写産物の蓄積量が増えるのはかなり普遍的な現象と考えられる。また、イントロンを含む転写産物の蓄積量が低温により増えるか否かに関して、イントロンの一次構造や二次構造との関連は見出せなかった。イントロンを含む転写産物の蓄積が増加した遺伝子について、スプライシングを経た転写産物の蓄積量を調べたところ、増加するタイプ、変化しないタイプ、および減少するタイプの3種に分けられた。

## 3) スプライシング補助因子の探索

高等植物ミトコンドリアのグループIIイントロンには自己触媒能がないので、スプライシングには補助因子を要し、しかもこの因子は核ゲノムコードと予想される。酵母などでは核ゲノムにコードされるスプライシング因子が同定されているものの、高等植物では詳細な解析例は殆んど無い。

シロイヌナズナにおいては、酵母ミトコンドリアのスプライシング補助因子*MRS2*のホモログ*atmrs2-1*が単離されている。イネのデータベースより*atmrs2-1*相同配列を検索した結果、高い類似性を示す完全長cDNAクローンを発見し、*osmrs2-1*と命名した。推定アミノ酸配列から、*osmrs2-1*翻訳産物はミトコンドリアあるいは葉緑体の膜に存在する可能性が示された。低温処理（12°C14日）により、*osmrs2-1*の発現量はやや減少した。低温に伴ってスプライシング効率が低下するならば、前駆体転写産物の蓄積増と成熟転写産物の減少がもたらされるはずである。このような蓄積の増減パターンを示す遺伝子として、本研究では*cox2*、*rps3*（リボソームタンパク質S3）をはじめ7種のイネ遺伝子がみつかった。これらの遺伝子のイントロスプライシングには*osmrs2-1*の翻訳産物が関わっている可能性が考えられる。

一方、イネの核ゲノム中には、スプライシング補助因子と推定される逆転写/成熟化酵素のORFsがコードされている。それらのうち*osnMat-1b*の完全長cDNAクローンはイネデータベースから見つかった。ただ、低温処理を施しても、*osnMat-1b*の発現量に変化は観察されなかった。

今後、ミトコンドリアスプライシング制御因子の全容を明らかにし、各々の低温処理に対する応答を調査する必要がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 上 哲 夫  
副 査 教 授 佐 野 芳 雄  
副 査 准教授 久 保 友 彦  
副 査 副研究主幹 半 田 裕 一

(独立行政法人農業生物資源研究所)

学 位 論 文 題 名

## 低温環境におけるコムギとイネの ミトコンドリア遺伝子発現制御機構の解析

本論文は 141 頁からなる和文論文であり、図 51 と表 16 および付表 4 を含む。別に、参考論文 4 編が添えられている。

今日の農業技術は低温に対して必ずしも万全ではなく、寒冷地域では年により著しい低温障害を被る。それ故、低温にさらされた作物の応答を理解することは、北方圏農業の発展を図る上で不可欠といえる。

植物の低温応答の仕方は複雑であるが、本研究ではミトコンドリアに関連する異常を指摘する研究事例が多いことに着目した。これまでに、呼吸代謝にかかわる核遺伝子の低温下での発現については知見が集積しているが、ミトコンドリアゲノムにコードされる遺伝子の低温応答に関する研究例は殆んど無い。本研究では、コムギとイネのミトコンドリア遺伝子の発現が低温環境下で変わることをはじめて見出し、その機構の解明を試みた。得られた結果は以下のように要約される。

### 1. 低温環境下での *cox2* 遺伝子の発現

コムギとイネのミトコンドリア遺伝子 *cox2* (シトクローム酸化酵素サブユニット II) は共に 1 個のグループ II イントロンを含む分断遺伝子である。コムギ *cox2* の転写においては、低温に遭遇するとイントロンのスプライシングを經ていない前駆体転写産物の蓄積量が増加することが判明した。一方、スプライシングを終了した成熟転写産物量には変化はみられなかった。同様の傾向はイネの *cox2* についても認められた。ただ、COX II ポリペプチドの蓄積量は低温によって影響を受けなかった。

また、成熟転写産物ではほぼ全ての部位でエディティングが生じていたのに対し、前駆体転写産物については低温により影響を受けるエディティング部位がみつかった。特にグループIIイントロンのスプライシングに重要と考えられる Intron Binding Site 1 のエディティング頻度が、低温により著しく低下した。

## 2. グループIIイントロンを持つミトコンドリア遺伝子の発現

イネにおいては計23個のイントロンを含む9遺伝子、コムギでは計10個のイントロンを含む5遺伝子の転写を調べた。その結果、低温処理によりイントロンを含む転写産物の蓄積量が増える事例が多数を占め、減少した例は全く見出されなかった。従って、低温下で前駆体転写産物の蓄積量が増えるのはかなり普遍的な現象とみてよい。

## 3. スプライシング補助因子の探索

高等植物ミトコンドリアのグループIIイントロンには自己触媒能がないので、スプライシングには補助因子を要し、しかもこの因子は核ゲノムコードと予想される。

イネのデータベースより酵母ミトコンドリアのスプライシング補助因子 *MRS2* の相同配列を検索した結果、類似性を示す完全長 cDNA クローンを発見し、*osmrs2-1* と命名した。*osmrs2-1* 翻訳産物はミトコンドリアあるいは葉緑体の膜に存在する可能性が高く、しかも低温処理により、*osmrs2-1* の発現量は減少した。低温に伴ってスプライシング効率が低下するならば、前駆体転写産物の蓄積増と成熟転写産物の減少がもたらされるはずである。このような蓄積の増減パターンを示す遺伝子として、本研究では *rps3* (リボソームタンパク質 S3) 遺伝子をはじめ7種のイネ遺伝子がみつかった。これらの発現には *osmrs2-1* の翻訳産物が関わっている可能性が考えられる。

本研究の成果は低温に対する植物ミトコンドリアの反応機構の全容を解明する上で寄与するところが大きく、学術および応用の両面で高く評価できる。

よって審査員一同は栗原志保が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。