

テンサイOwen型細胞質雄性不稔ミトコンドリア機能の解明

学位論文内容の要旨

雌性両生花異株(gynodioecy)は、雌花個体と両生花個体が集団の中に混在するものを指す。雌性両生異株は被子植物の140種以上に見られるといい、雌性花株において雄機能が失われているメカニズムが注目されてきた。細胞質雄性不稔性(CMS)は、雌性両生花異株を引き起こすメジャーなメカニズムの一つであり、遺伝学的にはミトコンドリアゲノム上の雄性不稔誘発遺伝子 *S* と、核の稔性回復遺伝子 *Rf* の相互作用により説明される。すなわち *S* の存在下では雄性不稔となるが、これは *Rf* があると発現しない。

CMS は、一代雑種種子生産に用いられる農業上重要な形質であり、これまでにさまざまな植物種でCMSの発現メカニズムの解析がなされてきた。*S* は植物種毎に異なり、由来不明な配列で形成されるが、機能が明らかになった例は少ない。*Rf* もまた多くの植物でクローン化されている。大部分は、*S* 翻訳産物の蓄積を阻害することが示されている。

テンサイ Owen 型 CMS では、CMS 原因遺伝子 *S* と稔性回復遺伝子 *Rf1* がクローン化され特徴付けがなされてきた。CMS 原因遺伝子 *S* として、*atp6* の 5'末端伸長領域である *preSatp6* がクローン化された。*preSatp6* 翻訳産物はミトコンドリア内膜でホモオリゴマーを形成する。さらに、薬で強く発現する *Rf1* の作用により、*preSATP6* ホモオリゴマーは、より分子量の小さなタンパク質複合体に組み替えられることが観察された。この組み替えは、*preSATP6* が *RF1* タンパク質と結合する結果である。

以上のように、テンサイ CMS 原因遺伝子翻訳産物はホモオリゴマー形成という点で他植物種の CMS と類似するが、*Rf* との関係がユニークである。すなわち、CMS 原因遺伝子産物の高次構造と雄性不稔性発現の関係が強く示唆されるシステムである。そのため、CMS 原因遺伝子産物のホモオリゴマー形成の意義を調査することが可能であると考えた。第2章では、*preSatp6* が CMS に関わる新たな証拠を得るべく、未解析であった N ミトコンドリア固有転写産物を生ずる *rps3* 遺伝子座の発現解析を行った。第3章では、単離ミトコンドリアを用いた生化学的解析を行い、CMS ミトコンドリアの特徴付けを試みた。第4章では、*Rf1* と *preSatp6* との相互作用を意義づけるべく、稔性回復と呼吸の関連を調査した。

ミトコンドリア固有転写産物を生ずる *rps3* 遺伝子座の発現解析

本研究では、CMS ミトコンドリアで失われている *rps3* の 3'UTR について調査を行った。研究の過程で発見した偽 *atp9* が RNA 編集に与える影響についても調査した。*rps3* ならびに *atp9* の編集部位ならびに頻度ともに影響を受けていないことが示された。RPS3 翻訳産物の蓄積量も変わらない。

テンサイ CMS ミトコンドリアゲノムには、正常と異なる転写パターンを示す 6 つの領域が見つかった。それぞれ、*cox2*、*cox1*、*atp1*、*atp6*、*orf324-rps13*、および *rps3* である。今回の結果により、これら全ての遺伝子座の解析が終了した。総合的に、*preSatp6* が CMS 原因遺伝子であるという結論に変更はない。

肥大根における Owen 型細胞質雄性不稔性ミトコンドリアの機能解析

CMS テンサイと正常テンサイのミトコンドリア機能を比較した。肥大根からの単離ミトコンドリアをもちいたミトコンドリア機能解析を行った。BN-PAGE と in gel アッセイを組み合わせた活性染色では、各ミトコンドリア呼吸鎖複合体に違いは認められなかったが、酸素電極による解析によれば TK81-MS ミトコンドリアでは、ADP/O 比に TK81-O と違いがないまま State3 での呼吸速度が亢進していることが示された。State3 における呼吸速度の上昇が核遺伝子型背景ではなく、細胞質の効果であることは、Owen 型細胞質をもつ別なテンサイのデータから明らかであった。またいずれの CMS ミトコンドリアも RCR の数値が上昇していた。加えて CMS 株でミトコンドリア膜電位が低下していることも示された。これらの結果は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化経路が活性化していることを示唆する。

ミトコンドリア呼吸に対する稔性回復遺伝子 *Rf1* の効果

Rf1 を強く発現する細胞は、薬に限られており、*Rf1* の効果を薬を用いて調べることは難しい。そこで、*Rf1* を発現する形質転換培養細胞を作出し、機能解析を行った。*orf23* を発現する培養細胞の呼吸活性は非形質転換 CMS 培養細胞、もしくはコントロールと比較して低下する傾向にあった。薬においては、CMS テンサイの呼吸速度は正常テンサイよりも明らかに高いことが分かった。これは、単離ミトコンドリアの State3 において観察した CMS テンサイと正常テンサイの違いに極めてよく似ている。さらに稔性回復した薬では呼吸は低下する。一方で芽生えにおいてはそのような差異は観察されなかった。これらの結果から、呼吸速度の亢進は *preSATP6* ホモオリゴマーにより引き起こされていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	久 保 友 彦
副 査	教 授	三 上 哲 夫
副 査	教 授	貴 島 祐 治
副 査	准教授	阿 部 純

学 位 論 文 題 名

テンサイOwen型細胞質雄性不稔ミトコンドリア機能の解明

本論文は 83 頁からなる和文論文であり、図 21 と 表 6 を含む。別に、参考論文 5 編が添えられている。

細胞質雄性不稔 (CMS) は、一代雑種種子生産に用いられる重要な農業形質である。テンサイにおいては CMS 原因遺伝子が単離され、翻訳産物の生化学的な特徴付けがなされていたが、CMS を引き起こす機構については不明であった。

本研究では、テンサイ CMS ミトコンドリア機能の解明を試み、テンサイ CMS の発現機構について検討した。得られた結果は以下のように要約される。

1, ミトコンドリア固有転写産物を生ずる *rps3* 遺伝子座の発現解析

CMS ミトコンドリアゲノムには、正常と異なる転写パターンを示す 6 つの領域が見つかった。それぞれ、*cox2*, *cox1*, *atp1*, *atp6*, *orf324-rps13*, および *rps3* である。CMS ミトコンドリアで失われている *rps3* の 3'UTR について調査を行った。研究の過程で発見した偽 *atp9* が RNA 編集に与える影響についても調査した。*rps3* ならびに *atp9* の編集部位ならびに頻度ともに影響を受けていないことが示された。RPS3 翻訳産物の蓄積量も変わらないことが示された。今回、CMS 遺伝子の候補として残っていた *rps3* 遺伝子座の解析を終了し、最終的に *preSatp6* が CMS 原因遺伝子であると結論付けた。

2, 肥大根における Owen 型細胞質雄性不稔性ミトコンドリアの機能解析

CMS テンサイと正常テンサイのミトコンドリア機能を比較した。肥大根からの単離ミトコンドリアをもちいたミトコンドリア機能解析を行った。BN-PAGE と in gel アッセイを組み合わせた活性染色では、各ミトコンドリア呼吸鎖複合体に違いは認められなかったが、酸素電極による解析によれば TK81-MS ミトコンドリアでは、ADP/O 比に TK81-O と違いがないまま State3 での呼吸速度が亢進していることが示された。State3 における呼吸速度の上昇が核遺伝子型背景ではなく、細胞質の効果であることは、Owen 型細胞質をもつ別なテンサイのデータから明らかであった。またいずれの CMS ミトコンドリアも RCR の数値が上昇していた。加えて CMS 株でミトコンドリア膜電位が低下していることも示された。これらの結果は、ミトコンドリアの酸化リン酸化経路が活性化していることを示唆する。この成果は、これまでに考えられていた CMS の発現メカニズムに一石を投ずるものである。

3, ミトコンドリア呼吸に対する稔性回復遺伝子 *Rf1* の効果

Rf1 を強く発現する細胞は、薬に限られているが *Rf1* の効果を薬を用いて調べることは難しい。そこで、*Rf1* を発現する形質転換培養細胞を作出し、機能解析を行った。*orf23* を発現する培養細胞の呼吸活性は非形質転換 CMS 培養細胞、もしくはコントロールと比較して低下する傾向にあった。薬においては、CMS テンサイの呼吸速度は正常テンサイよりも明らかに高いことが分かった。これは、単離ミトコンドリアの State3 において観察した CMS テンサイと正常テンサイの違いに極めてよく似ている。さらに稔性回復した薬では呼吸は低下する。一方で芽生えにおいてはそのような差異は観察されなかった。これらの結果から、呼吸速度の亢進は preSATP6 ホモオリゴマーにより引き起こされていることが示唆された。この成果は、機能不明であった preSATP6 ホモオリゴマーの機能に新たな知見を与えるものである。

本研究の成果は、テンサイ Owen 型 CMS ミトコンドリアの機能解明と植物 CMS 研究に寄与するところが大きく、学術面で高く評価できる。

よって審査員一同は松永宗幸が博士（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。