

修士論文要旨 コムギミトコンドリアにおける光及び組織依存的な遺伝子発現

(応用生物学研究室) 若松裕徳

1. 序論

ミトコンドリアは酸化的リン酸化と呼吸鎖電子伝達系により ATP を合成し、細胞のエネルギー生産をつかさどる細胞小器官であり、真核生物に普遍的に存在する。一方、植物細胞にはもう一つのエネルギー生産オルガネラである葉緑体が存在し、光合成を始めとする重要な代謝反応の場となっている。また、ミトコンドリアと葉緑体は、ともに独自のゲノムと遺伝子発現系を有する半自律的なオルガネラでもある。葉緑体が発達している光合成組織と未発達の非光合成組織では、細胞のエネルギー生産におけるミトコンドリアと葉緑体の役割分担が大きく異なる。そしてそれに伴い、オルガネラ遺伝子の発現パターンも大きく変化すると想像される。実際、非光合成組織では葉緑体遺伝子の発現は強く抑制されている。しかし、細胞分化に伴ったミトコンドリア遺伝子の系統的な発現解析はこれまで報告されていない。

動物細胞のミトコンドリアゲノム(約 16 kbp)に比較し、植物のミトコンドリアゲノムはそのサイズが 200-2,500bp と巨大で、100 近い遺伝子をコードしている。ミトコンドリアには、ファージ型の RNA ポリメラーゼが存在する。植物のミトコンドリアゲノム遺伝子は複数のプロモーターから転写されることが知られており、単純な転写を行う 2 つのプロモーターから全遺伝子を転写する動物細胞に比べ、はるかに複雑な発現制御を受けていると考えられる。

コムギをはじめとする穀類の実生では、その下部から上端部に向けて細胞の分化ステージの勾配が存在する。実生下部の非光合成細胞はミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP 生産に依存するが、光合成能力を持つ上端細胞では、その役割は低くなっていると考えられる。この系は、細胞代謝機能とミトコンドリア遺伝子発現の関係を解析する上で理想的なモデル系となる。本研究では、コムギ実生をモデル系として細胞分化および光環境とミトコンドリア遺伝子発現との関係について系統的な解析を行った。

2. 材料と方法

コムギ(*Triticum aestivum* cv. *Chinese spring*)をパーミキュライトに播種し、定常光条件で 5 日間育成した。その後 24 時間の暗処理を行い、続いて 2 時間の照射を行った植物(LDL)と、そのまま暗においた植物(LDD)の 2 系統を準備した。各植物体は、子葉鞘を含む下部(B)、

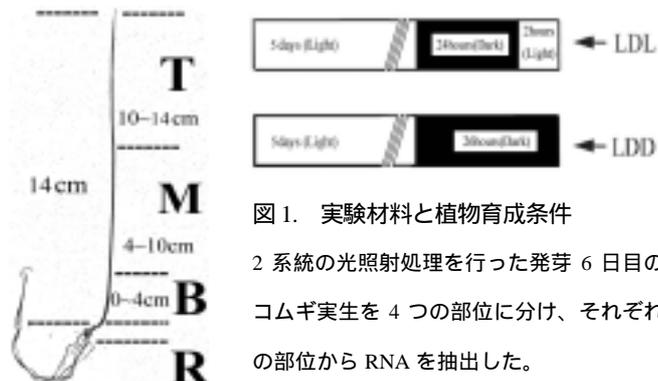


図 1. 実験材料と植物育成条件

2 系統の照射処理を行った発芽 6 日目のコムギ実生を 4 つの部位に分け、それぞれの部位から RNA を抽出した。

中間部(M)、上端部(T)および根にわけ、それぞれの組織からトータル RNA を抽出した(図1)。明暗周期実験では、12 時間明、12 時間暗の光周期条件で播種後 4 日間生育させたコムギ実生の根から、その後 3 日間にわたって 3 時間おきにトータル RNA を調製した。遺伝子発現は、ノーザンブロット法で検出した。また、各組織からトータル DNA を抽出し、制限酵素 BamH1 で消化後サザン解析を行った。

3. 結果と考察

葉緑体遺伝子発現

播種後 6 日目のコムギ実生下部では、葉緑体の発達は不十分でクロロフィルの蓄積も少なく、薄緑色を示す(図1)。一方、実生中間部、上端部では葉緑体も十分に発達しており、濃い緑色の組織となっている。葉緑体の 16S rRNA および *psbA* 遺伝子の発現は、実生中間部、上端部で高く、実生下部、根では低かった。葉緑体の発達に伴って葉緑体の光合成遺伝子の発現が活性化されることがわかる。

ミトコンドリア遺伝子発現の全体パターン

コムギミトコンドリアゲノムについて現在ほぼ 90%のシーケンス解析が終了し、これまでに 80 種の遺伝子領域が同定されている。このうち 33 種はタンパク質遺伝子である。その内訳は、複合体 I を構成する *nad* 遺伝子が 8 種、複合体 IV を構成する *cox* 遺伝子が 3 種、複合体 V を構成する *atp* 遺伝子が 3 種、*ccb* タンパク質が 5 種、リボソームタンパク質が 5 種、*matR* 遺伝子が 1 種、ORF (機能未同定の遺伝子領域) が 8 種である。他にリボソーム RNA 遺伝子が 3 種、tRNA 遺伝子が 7 種同定されている。本研究ではこのうち 19 種のタンパク質遺伝子と 2 種の rRNA 遺伝子、5 種の ORF について発現解析を行った。その結果を表 1 にまとめた。

		光特異的発現	
		+	-
組織特異的発現	+	<i>atp1, cox1, cox2, cox3, cob</i>	<i>nad1, nad2, nad3, nad4, nad5, nad7, rps1A, rps7, rps12, orf240</i>
	-	<i>atp6, orf156</i>	<i>(nad5), nad6, nad9, atp9, matR, rrn18, rrn26, orfB, orf25, orf589</i>

表 1. 遺伝子発現解析のまとめ

解析した合計 26 種類のコムギミトコンドリア遺伝子について、光と組織に依存した発現の有無で各遺伝子を分類した。+は組織特異的あるいは光による発現制御が見られたことを示す。

26 種の遺伝子中、15 遺伝子は組織特異的な発現制御を受け、7 遺伝子は光による制御(抑制)を受けていた。この結果は、葉緑体遺伝子同様に、ミトコンドリア遺伝子も複雑な発現制御を受けていることを物語っている。以下、各遺伝子の発現パターンを、遺伝子の機能別に紹介する。

複合体 I 遺伝子

複合体 I (NADH 脱水素酵素複合体) を構成する 8 遺伝子について発現解析を行った。暗条件での組織ごとの発現パターンを比較すると、*nad1, nad2, nad3, nad4, nad7* の場合は、実生下部、根での発現が強い傾向が見られた。一方、*nad6, nad9* は全ての組織で構成的に発現していた。また、全ての *nad* 遺伝子の発現は、光による発現制御をほとんど受けず、24 時間暗処理後に行った 2 時間の光照射

で mRNA の発現レベルはほとんど変化しなかった。

nad 遺伝子の多くは、トランススプライシングを受ける。トランススプライシングとは、ゲノム中で別々に転写された mRNA 断片をつないで全長の mRNA を構成する現象である。*nad5* 遺伝子の場合スプライシング前・中間体と考えられる、2.9、4.2kb の転写産物が実生下部、根で組織特異的に発現する（図2）。一方、実生上部、中部では 1.9、1.8kb の短い転写産物が認められた。同様に根や実生下部でスプライシング前駆体が組織特異的に蓄積する傾向は、他のトランススプライシングを受ける *nad* 遺伝子 (*nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad7*) でも見られた。この結果は、*nad* 遺伝子群の発現が、組織特異的なトランススプライシング反応によって転写後制御を受けている可能性を示唆している。

複合体 VI 遺伝子

複合体（シトクロム酸化酵素複合体）を構成する 3 つの *cox* 遺伝子 (*cox1*, *2*, *3*) の発現は、全て明確な組織特異性を示した。*cox1* と *cox2* は、多くの複合体 I 遺伝子と同様に、実生下部、根特異的な発現を示した。一方、*cox3* の組織特異的な発現パターンはミトコンドリア遺伝子の中で最も特徴的なもので、多くの遺伝子と逆に実生の上端、中間、下部での発現が強く、根での発現は低かった。このようなパターンを示したのは、*cox3* のみであった。また、全ての *cox* 遺伝子の発現レベルは、全ての組織で光によって抑制された。

cox3 は、単独転写される遺伝子で、転写レベルで特異的な制御を受けている可能性がある。*cox3* プロモーターはすでにコムギでマッピングされており、植物ミトコンドリアプロモータの共通配列を持つ典型的な構造を持つ。今後、*cox3* 転写の組織特異的な制御、光抑制機構を解析していく必要がある。

複合体 V 遺伝子

複合体 V (ATP 合成酵素複合体) を構成する 3 種の遺伝子の発現解析を行なったが、*atp1* が最も強く、続いて *atp6*, *atp9* の順で mRNA の蓄積レベルが高かった。この順番は F1-F0-ATP 合成酵素の各サブユニットの化学量論比の順位に相当し、タンパク質の発現量が mRNA レベルで制御されている可能性を示す。*atp1* は実生下部や根で強く発現しているが、*atp6* と *atp9* は全ての組織で構成的に発現していた。*atp1* は、光による発現抑制を受けるが、それは実生下部と根に特異的で、実生上端部や中間部の mRNA レベルは、光による制御を受けなかった。一方、*atp6* は全ての組織で光による発現抑制が見られた。*atp9* は、光による制御を受けなかった。

光で発現制御される遺伝子の中には、内在性の概日リズムによる制御を受けるものが多い。そこで、光による発現抑制を受ける *atp1* 発現が概日リズムで制御されている可能性を検討したが、12 時間の光周期条件で生育させた実生の根において *atp1* 遺伝子発現の周期性変化は見られなかった。

シトクロム酸化酵素生合成遺伝子、*matR* 遺伝子

シトクロム酸化酵素生合成酵素をコードする *cob* 遺伝子は、暗条件では実生下部での発現が最も高いが、光照射を行うことで下部での発現が特異的に抑制され、全組織で構成的に発現するようになっ

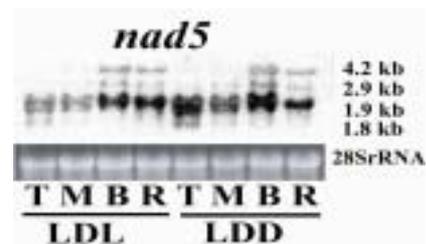


図2、*nad5* 遺伝子の発現パターン

トランススプライシングの前・中間体と考えられる 4.2kb、2.9kb の転写産物が実生基部および根で特異的に蓄積している。

た。mRNA 成熟酵素をコードする *matR* は、構成的に発現し、光抑制も受けなかった。

リボソームタンパク質遺伝子

rps7 と *rps1A* 遺伝子は、実生下部、根特異的に発現していた。特に、*rps7* は組織特異的なプロセシング制御を受けている可能性が示唆された。一方、*rps12* は根特異的に発現していた。リボソームタンパク質遺伝子では、光による発現抑制が見られなかった。

リボソーム RNA 遺伝子

暗条件では、*rrn18* も *rrn26* も全ての組織で構成的に発現していた。また、両遺伝子とも基本的に光による発現制御を受けなかった。

ORF 遺伝子

5 種の *orf* 遺伝子の発現を調べたが、その全てで発現を確認できた。*orf25*、*orf156*、*orf589* は、全組織で構成的に発現していた。*orf240* は根特異的なプロセシングを受けている可能性がある。*orf156* の発現レベルは、光によって抑制されたが、他の *orf* 遺伝子の発現は光で制御されなかった。

定量的サザン解析

植物のミトコンドリア DNA は、物理的構造が複雑で、不均質な小ゲノムに分割されたマルチパーティット構造をとる。従って、特定遺伝子のコピー数の変動が一部のミトコンドリア遺伝子にみられた光や組織に依存した発現制御の原因である可能性がある。そこで、明瞭な組織特異的な発現が見られた *nad1*、*atp1*、*cox1*、*cox2*、*cox3* 遺伝子について、サザン解析を行いその可能性について検討した。しかし、いずれの遺伝子についても組織による遺伝子コピー数の変化は認められず、遺伝子特異的にコピー数が制御されている可能性は否定された。

4 . 結論

本研究で、植物のミトコンドリア遺伝子の発現が、組織分化や光条件に応答して予想以上に複雑な発現制御を受けていることがわかった。今回解析した 26 遺伝子中 14 遺伝子は実生下部および根で強い発現を示した。このパターンは、複合体 I および IV、リボソームタンパク質の遺伝子に多く見られた。多くのミトコンドリア遺伝子が葉緑体遺伝子の発現と相補的な発現制御を受けることが分かった。非光合成組織では、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化による ATP 生成を支えるために、ミトコンドリア遺伝子の発現レベルが高くなっていると考えられる。一方、それ以外のリボソーム RNA 遺伝子や *orf* 遺伝子など 11 遺伝子は全ての組織で構成的に発現していた。また、ATP 合成酵素やシトクローム酸化酵素をコードする 7 遺伝子で光による明らかな発現抑制が確認されたが、現時点でその生理的意義は分からない。さらに、多くの複合体 I 遺伝子や一部のリボソームタンパク質遺伝子では、トランスプライシングまたはプロセシング過程が組織特異的に制御されていることが分かった。この結果は、植物のミトコンドリア遺伝子発現制御における転写後制御の重要性を示している。