

氏 名	はん だ ひろ かず 半 田 裕 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 1783 号
学位授与の日付	平 成 4 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Molecular genetic studies of mitochondrial genome in rapeseed ( <i>Brassica napus</i> L.) in relation to cytoplasmic male-sterility (細胞質雄性不稔性に関するナタネミトコンドリアゲノムの分子遺伝学的研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 常 脇 恒 一 郎 教 授 大 山 莞 爾 教 授 矢 澤 進

### 論 文 内 容 の 要 旨

ミトコンドリアは呼吸をつかさどる細胞小器官(オルガネラ)であり,固有の遺伝物質としてミトコンドリアDNA(mtDNA)をもつ。このオルガネラに含まれる遺伝子を総称してミトコンドリアゲノムとよぶが,これは多くの植物で母性遺伝を行い,呼吸のほか,雄性不稔性の発現などに関与する遺伝子をもつとされている。本論文は,ナタネ(*Brassica napus*)のミトコンドリアゲノムを取り扱ったものであり,2つの部分からなっている。第1部はナタネとその近縁種におけるmtDNAの変異と,それに基づくミトコンドリアゲノムの分類と系統関係を扱い,第2部は雄性不稔性の発現に関与すると考えられる2つのミトコンドリア遺伝子の分子遺伝学的研究の成果を述べたものである。その主要内容は以下のとおりである。

(1) ナタネにおけるミトコンドリアゲノムの遺伝的多様性:まず,ナタネの27品種についてmtDNAの制限酵素分析を行い,その泳動パターンから,これらのミトコンドリアゲノムが2型,6重型(Ia, Ib, Ic; IIa, IIb, IIc)に分類できることを示した。次に,このミトコンドリアゲノムの分類と,すでに報告されているナタネ細胞質の正常(N)型・雄性不稔(S)型の分類とを比較し, Ia型にのみN型とS型が混在することに疑問をもち, N型とされてきた7品種に稔性回復遺伝子をもたない,いわゆる維持系統の花粉を2回反復交配した戻し交雑第1世代において,正常個体と不稔個体の分離を調査し,これら品種がすべてS型細胞質をもつことを確認した。ここに,ミトコンドリアのゲノム型と稔性に関する2型の分類が初めて合致した。最後に,ナタネを含む*Brassica*属と*Raphanus*(ダイコン)属の5種10品種のmtDNAの6種酵素を用いた制限酵素分析と,5個のミトコンドリア遺伝子をプローブとするサザンハイブリダイゼーションを行い,制限断片及びハイブリッドバンドの一致率を求め,これに基づいてミトコンドリアゲノムの系統樹を作成した。そして,ナタネには*B. campestris*と*B. oleracea*由来の細胞質をもつ2つの品種群が存在することを明らかにした。

(2) 細胞質雄性不稔性の発現機構の分子遺伝学的研究:ナタネに対する雄性不稔細胞質の1つである'Polima'細胞質(pol型)を日本品種'いすずなたね'に導入した系統と,その正常系統(N型細胞質をもつ)を材料に用い,まず,10個のミトコンドリア遺伝子をプローブとして両細胞質のmtDNAのサザン

ハイブリダイゼーションを行ったところ、*atpA* と *atp 6* 遺伝子を含む領域についてのみ差異を認めた。そこでまず、*atpA* 遺伝子を含む領域の構造を決定したところ、507アミノ酸残基に相当する翻訳領域とその5'末端上流の約0.5kbの領域のいずれにも両細胞質間に差異を認めなかった。また、ノザンハイブリダイゼーションによって調べた転写産物にも差異を認めなかったため、この遺伝子は細胞質雄性不稔性の発現に関与していないものと判断した。一方、*atp 6* については、261アミノ酸残基に相当する翻訳領域の構造は両細胞質間で完全に一致したが、*pol* 型細胞質ではその5'末端約0.5kb上流に105アミノ酸残基に相当する特異なオープンリーディングフレーム(ORF)がみられ、これを *pol-urf* と命名した。*atp 6* をプローブとするN型細胞質のノザンハイブリダイゼーションでは1.1kbの単一転写産物のみ認められたのに対し、*pol* 型細胞質では1.1kbと2.1kbの2種の転写産物が見いだされた。*pol-urf* をプローブに用いて選抜したN型細胞質のmtDNAクローンの構造解析により、この遺伝子の5'末端の175bpはN型ミトコンドリアゲノムのORF474の一部であり、それに続く41bpは別のミトコンドリア遺伝子、*rps 3*の一部であることが分かったが、残りの143bpの起原については特定できなかった。これらの結果は *pol-urf* がキメラ遺伝子であることを強く示唆した。また、ホモロジー検索により、この遺伝子がダイコンの雄性不稔細胞質の *atp 6* 遺伝子に近接して存在するORF105と部分相同であることも判明した。以上の結果より、*pol* 型細胞質による雄性不稔性の発現は、ミトコンドリア遺伝子 *atp 6* の5'末端上流域に存在するキメラ遺伝子、*pol-urf* によるものと推定した。

#### 論文審査の結果の要旨

ナタネ (*Brassica napus*) は、*B. campestris* と *B. oleracea* を両親とする複2倍性の油料作物であり、雄性不稔細胞質を利用して一代雑種の育成が試みられている。一方、ミトコンドリアのゲノムには、呼吸のほか、雄性不稔性の発現などに関与する遺伝子が存在するとされている。本論文は、ナタネとその近縁種におけるミトコンドリアゲノムの変異を調べてナタネの起原を推定するとともに、雄性不稔性発現の分子遺伝学的機構の解明を試みたものであり、得られた成果のうち特に評価すべきものは次のとおりである。

- (1) ナタネの27品種についてミトコンドリア(mt)DNAの制限酵素分析を行い、2型、6亜型(Ia, Ib, Ic; IIa, IIb, IIc)のミトコンドリアゲノムの存在を認めた。
- (2) 稔性回復遺伝子をもたない維持系統を反復花粉親とする戻し交雑を行い、I型ミトコンドリアゲノムをもつ細胞質はすべて雄性不稔性を誘発することを証明した。
- (3) ナタネとその近縁種のmtDNAの制限酵素分析とサザンハイブリダイゼーションを行い、I型のミトコンドリアゲノムは *B. campestris* に、II型は *B. oleracea* に起原したことを示した。
- (4) ナタネの正常細胞質(N型)と品種'Polima'の雄性不稔細胞質(*pol*型)のmtDNAについて、10個のミトコンドリア遺伝子をプローブとするサザンハイブリダイゼーションを行い、*atp 6* 遺伝子が雄性不稔性の発現に関与していることを示す結果を得た。
- (5) N型と *pol* 型細胞質の *atp 6* 遺伝子とその近傍の塩基配列を決定し、両者は同一翻訳領域をもつが、*pol* 型の *atp 6* の5'末端上流域に特異なORFが存在することを発見し、*pol-urf* と命名した。また、このORFと *atp 6* が共転写されることを示した。

(6) *pol-urf* は ORF474, *rps 3* 遺伝子の一部, 及び未同定の DNA 断片からなるキメラ遺伝子であることを証明し, これが *pol* 型細胞質による雄性不稔性発現の原因であると推論した。

以上のように, 本論文はナタネのミトコンドリアゲノムの変異を解析してその起原を明らかにするとともに, 細胞質雄性不稔性の発現機構を解明したもので, 植物遺伝学と栽培植物起原学の発展に寄与するところが大きい。

よって, 本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 平成 4 年 7 月 24 日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。