

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻
平成 14 年度博士課程 進学
氏 名 馮曉歌
指 導 教 官 平野博之

高等植物のミトコンドリア形態に関する研究

ミトコンドリアは真核細胞にほぼ普遍的に存在している。生物は細胞呼吸によって、外界から取り入れた糖やタンパク質、脂肪などの栄養物質を酸化することにより生産したエネルギーを ATP の形で細胞のさまざまな活動へと供給する。この過程は細胞内のオルガネラ-ミトコンドリア内で進行する。ミトコンドリア内では、クエン酸回路、電子伝達系、その他多様な代謝過程が行われる。またミトコンドリアは細胞へのエネルギー供給のほか、アポトーシス、細胞のストレス反応、老化、さまざまな遺伝病について鍵となる役割をしていることが徐々に明らかにされつつあり、注目されている。

ミトコンドリアの構造は、内膜外膜の 2 種類の膜で取り囲まれており、これら代謝物質の透過障壁になるのは、ミトコンドリア内膜である。ここには各代謝産物のトランスロケーターがあり、必要に応じて輸送を行っていると考えられている。ミトコンドリア外膜は多くの代謝産物を自由に透過することができるため、低分子物質に限って言えば内膜と外膜の膜間空間は膜外空間と同一と見なされる。そしてミトコンドリアの“原形質”に相当する内膜に囲まれた区画は、ミトコンドリア・マトリックスと呼ばれる。ミトコンドリア内膜には、呼吸鎖電子伝達系の酵素群が存在し、またその内膜表面積を拡大するため、管状あるいは折りたたまれた膜になって、マトリックスに陥入している。ミトコンドリアのこのような構造の中で、百種類以上の酵素、DNA (ミトコンドリアゲノム)、 およびタンパク質合成に必要な各種 RNA が存在している。ミトコンドリアの多様な機能は、ミトコンドリア自身の構造とよく関連していることが明らかにありつつある。そのため、ミトコンドリアの構造や形態に関する研究が近年盛んに行われている。

これまで、ミトコンドリア形態についての研究は主に出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)およ

び哺乳類細胞を用いたものが中心となっていた。高等植物においてもミトコンドリアの形態はその機能とよく関連していることが予想される。しかしながら、出芽酵母あるいは哺乳類細胞のミトコンドリアの形態、動態、分配などに関する知見に比べて、高等植物に関する情報は極めて不足している。そこで、実験植物シロイヌナズナを用いて、ミトコンドリア形態に関する新規遺伝子を単離することを目標として、突然変異体のスクリーニングを試みた。

1. 変異体のスクリーニング

ミトコンドリアを可視化する目的で、ミトコンドリア移行シグナルを付加した緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを材料として用いた。この形質転換体は、GFP の蛍光により生きたまま容易にミトコンドリアを観察することができる。この系統に EMS 処理を行い、この後代約 19,000 ラインの M2 植物を用いて、スクリーニングを行った。播種後 2-3 週間の本葉を用いて、蛍光顕微鏡下で観察することによりミトコンドリアの形態異常株を探索した。その結果、17 個体のミトコンドリア形態異常を示す変異体が得られ、それぞれ突然変異系統 (ライン 1-17) とした。

2. 各変異系統のミトコンドリア形態以外の特徴

ライン 3、6、9、11 において、草丈が野生型より若干小さかった。また、ライン 6 は、植物体地上部の色が薄緑であった。ライン 4、10、14 は、茎が赤みを帯びていた。M3 世代での稔性は、ライン 16 は不稔になり、ライン 17 は非常に稔性が低かったが、それら以外は、野生型植物とほぼ同様であった。変異体の莢のサイズは、ライン 1、3、4、5、6、10、11 は、野生型とほぼ同様であり、ライン 2、9、12、13、14、15、17 は、野生型より小さくなり、ライン 7、8 は、野生型よりすこし大きくなった。

発芽率は、ライン 16、17 は、野生型と比較して非常に低かった。ライン 2、9、15 は、ほぼ野生型の半分ぐらいであり、それ以外のものは、野生型とほぼ同様であった。

変異体それぞれ 16 株ずつにおける開花までに要する平均時間を調査したところ、ライン 6、11 は野生型より非常に早かったが、ライン 3、8、9、14、17 は、遅くなった。それ以外のものは、野生型とほぼ同様であった。

3. 各変異系統のミトコンドリアの形態

蛍光顕微鏡下で観察したミトコンドリアの形、サイズおよび細胞内での分布などは、系統ごとにそれぞれ異なっていた。共通の変化としては、以下二つの変化がみられた。野生型のミトコンドリアが直径 0.5-2 μ m ほどの粒状もしくは桿状で、数も非常に多いのに対して、突然変異系統では非常に長いもの (4-50 μ m) が多かった。また直径 8 μ m 程度の球状のミトコンドリアも同時に観察された。変異系統では、野生型と比較して細胞あたりのミトコンドリアの数が減少することが多かった。ミトコンドリアの形態は野生型植物体においても低酸素などの環境にตอบสนองして、また、組織や器官によってもその形態が著しく異なることが知られ

ている。突然変異系統においても、観察する時期によってその形態に違いが観察され、同じ葉の中でも程度や様子に違いが観察されることがあったが、いずれも野生型のミトコンドリアとは明らかに異なる形態であった。

ライン 1、12、13 は、植物生育の初期においては、ミトコンドリアが野生型より少し長い程度であるが、植物の生長にしたがってさらに長くなった。ライン 6、10 は逆に植物発育の初期におけるミトコンドリアのサイズが野生型より大変長かったが、植物の生長にしたがってミトコンドリアは短くなった。特にライン 10 は、生育後期にはほぼ野生型の形態と同様にまで戻った。

ミトコンドリアが野生型よりも大変長く、そして植物発育の全過程においてのサイズ、分布などに変化のないものは、ライン 2、3、4、7、8、9、11、14、15、16、17 であった。ただ植物の生長にしたがって、ライン 2、4、7、8、14 は、大きな球状のミトコンドリアが混ざり、ライン 15 では、網状につながったものが観察された。ライン 5 は、野生型よりも長いですが、他の変異体のミトコンドリアよりも短かった。すべての変異系統は、野生型と交配した F2 世代で変異型ミトコンドリアを持つ植物を分離した。

正常なミトコンドリアの形態は、分裂と融合のバランスによって維持されているといわれている。酵母でも植物でも、ミトコンドリア分裂が阻害されて融合のみが起ることによって、ミトコンドリアが長大化する。酵母においては、ミトコンドリア融合に関わる遺伝子が破壊された場合は、融合はできないが分裂が起こり、小さな粒状の多数のミトコンドリアになると同時に、ミトコンドリア DNA も失うことが知られている。本研究で得られた突然変異体は、いずれも野生型よりも伸長したミトコンドリアを持つものであった。酵母において、ミトコンドリアの分裂と融合のバランスによってミトコンドリアの形態が維持されていることから推測すると、本研究でスクリーニングした変異体の原因遺伝子は、すべて分裂に関する遺伝子であり、その遺伝子の機能が阻害されたため、ミトコンドリアが伸長したと考えられる。

高等植物のミトコンドリアは、酵母や哺乳動物と比較すると大変小さいのが特徴である。もしも融合に関する遺伝子が阻害された場合、さらに小さなものが得られる可能性はあると思われるが、野生型ミトコンドリアの形との区別は困難であると考えられ、今回は融合に関する変異体が見つかっていない。酵母の場合には、融合遺伝子が破壊されるとミトコンドリアゲノムの欠失が起こり、発酵によってのみ生育する。高等植物の場合、このようなミトコンドリアゲノムの欠失が起こると、好気呼吸がおこなわれなくなるため、生長できなくなる可能性もある。このように、ミトコンドリア融合遺伝子に関する突然変異体は致死となったため、本研究で用いた方法では変異体を獲得できなかった可能性も考えられる。

4. 突然変異体原因遺伝子のマッピング

得られた 17 系統の変異系統から 7 系統を用いて、遺伝子のマッピングを行った。その結果、4 系統（ライン 1、2、3、4）の原因遺伝子が 4 番染色体、3 系統（ライン 5、6、7）の原因遺伝子が 5 番染色体に座乗することがわかった。4 番染色体に原因遺伝子を持つ 4 系統のうち 3

系統（ライン 2、3、4）については、4 番染色体の 16,280~16,500 Kb の領域にマップされた。この領域は、既にミトコンドリア分裂に関与することが報告されているダイナミン様タンパク質 DRP3A（ADL2a）をコードする遺伝子が存在している 16,200 Kb に極めて近い位置である。他の 1 系統（ライン 1）は、4 番染色体の 9,600~11,800 Kb 領域に座乗していることがわかった。

5 番染色体にマップされた 3 系統のうち、1 系統（ライン 7）は 5,940~7,500Kb の領域、また 2 系統（ライン 5、6）は 7,500~ 8,800Kb の領域に原因遺伝子が座乗することがわかった。この領域の近傍には、シロイヌナズナを用いて同様の方法で単離されたミトコンドリア形態異常の遺伝子が既に報告されている。

以上のように、本研究では 7 系統の突然変異遺伝子についてラフマッピングをおこなった。その結果、6 系統についてはその原因遺伝子が既に報告されているシロイヌナズナのミトコンドリア形態に関する遺伝子と同一である可能性を否定できなかった。残りの 1 系統（ライン 1）については、他の生物種で知られているミトコンドリア形態に関する遺伝子のホモログが、シロイヌナズナゲノム上のこの領域には存在しないので、全生物種においてはじめて見出した遺伝子である可能性が高い。