

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高梨 秀樹

高等植物のミトコンドリアゲノムは、その内部の多数のリピート配列間での組み換えによって生じる様々なサイズの環状構造 DNA 分子の集合体であると考えられている。高等植物細胞内に多数存在するミトコンドリアは、これらの多様な環状 DNA 分子を様々な組み合わせでその内部に保持していると考えられている。本論文は、これまでの研究では明らかにされなかった、高等植物のミトコンドリア 1 個あたりの mtDNA 量および卵細胞 1 個あたりの mtDNA 量に焦点を当てて研究が行われた。

1. イネにおけるミトコンドリア一個あたりに含まれる DNA 量の組織間差異

高等植物の個々のミトコンドリアは全ゲノム情報を保持していない可能性が高いという報告があったものの、個々のミトコンドリアをはっきりと識別した上でのミトコンドリアあたりの DNA 量解析を行った研究はいまだなされていない。そこで申請者は、植物体において個々のミトコンドリアの持つ DNA 量は具体的にどの程度なのか、またその DNA 量にばらつきはあるのかを調べるために、イネの根の基部、中間部、根端部における個々のミトコンドリアに含まれる mtDNA 量を調べた。実験には、ミトコンドリアを可視化する目的で GFP をミトコンドリアに局在させた形質転換イネを用いた。それぞれの部位を DNA 染色液の DAPI 溶液中で破碎し、溶液中にミトコンドリアを浮遊させた状態で mt 核様体を染色し、個々のミトコンドリアあたりの DAPI 蛍光強度を測定した。その結果、イネの根においては明確な mt 核様体が観察されないミトコンドリアが多数存在し、その割合は根の基部で 67 %、中間部で 59 %、根端部で 9 %であることが明らかになった。次に、DAPI 蛍光強度からミトコンドリア一個あたりに含まれるおおよその DNA 量 (kbp 相当量) を推定した。その結果、根の基部、中間部では個々のミトコンドリアの持つ DNA 量の平均値には大きな差は見られないものの (それぞれ 29.5 kbp 相当, 28.4 kbp 相当), その二つと比較して根端部のミトコンドリアのもつ DNA 量の平均値は有意に大きいことがわかった (109.8 kbp 相当)。以上のことから、分裂組織を含む根端部のミトコンドリアは他の部分に比べて明確な mt 核様体を持っている割合が高く、またそれぞれが持っている DNA 量も多い傾向があるということが明らかになった。一方で個々のミトコンドリアの持つ DNA 量に注目すると、ほとんど DNA を持たないと思われるミトコンドリアから全ゲノムの数倍におよぶ大量の DNA を持つミトコンドリアまでが混在していた。以上の結果から、イネにおいて個々のミトコンドリアの持つ mtDNA 量は組織間で大きな差異があり、また同一組織内でも個々のミトコンドリアは常に均一な遺伝情報を持つわけではないことがわかった。また、イ

ネのミトコンドリアゲノムサイズが 491 kbp であることを考えると、イネの根においてほとんどのミトコンドリアはミトコンドリアゲノム全体を持たない可能性が高いことが明らかになった。

2. イネ卵細胞のミトコンドリア形態および保持する mtDNA 量

植物において、栄養細胞でのミトコンドリアの形態は通常小型・粒状であることが知られている。一方で、ゼラニウムやトウモロコシの卵細胞では樹脂包埋切片観察や電子顕微鏡観察によって巨大な多層カップ状構造のミトコンドリアが観察され、またゼラニウム卵細胞ミトコンドリアは大量の mtDNA を保持しているとの報告があった。このように卵細胞ミトコンドリアは非常にユニークな特徴をもつとされるものの、現在までイネ卵細胞ミトコンドリアのこれらの特徴についての報告はない。そこで申請者は、イネ卵細胞におけるミトコンドリアの形態および保持する mtDNA 量を明らかにすることを目標に実験を行った。まず、イネ卵細胞ミトコンドリアを観察するために生細胞の状態ではイネ卵細胞を単離したのち、単離卵細胞のミトコンドリアと mt 核様体を MitoTracker と SYBR Green I で同時に染色して観察を行った。その結果、ゼラニウムやトウモロコシとは異なり、イネ卵細胞においては小型・粒状のミトコンドリアおよび小型・粒状の mt 核様体のみが観察されることが明らかになった。また、イネ雌蕊の固定・樹脂包埋切片の DAPI 染色像からも、イネ卵細胞には小型・粒状の核様体のみが観察されたことから、イネ卵細胞ミトコンドリアおよび mt 核様体はゼラニウムやトウモロコシとは異なり、小型・粒状である可能性が高いことが強く示唆された。次に、イネ卵細胞が保持する mtDNA 量を評価するため、real-time PCR を用いて、ミトコンドリアゲノム上にコードされている *cob*, *coxII*, *nad6*, *atp9* の 4 遺伝子についてイネ卵細胞と、大量の調整が容易であるイネ緑葉由来プロトプラストを用いた定量 PCR を行い、細胞あたりに含まれる各遺伝子のコピー数を定量した。その結果 4 遺伝子全てにおいて、イネ卵細胞はイネ緑葉由来プロトプラストと比較して 11 倍以上に及ぶ多量の mtDNA を保持していることが明らかになった。

以上本論文では、個々のミトコンドリアの持つ mtDNA 量には組織間で大きな差異があり、また同一組織内でも個々のミトコンドリアは常に均一な遺伝情報を持つわけではないこと、およびイネの根においてほとんどのミトコンドリアはミトコンドリアゲノム全体を持たない可能性が高いことを明らかとした。また、根端や卵細胞といった分裂組織では、個々のミトコンドリアが保持する mtDNA 量が非常に多くなっており、この現象は、細胞分裂時に娘細胞に対して不均等・不十分な mtDNA の分配が起こることへの防止策であると考えられた。これらの知見は、高等植物のミトコンドリアのゲノム構成やその遺伝様式について基礎的な知見を与えるものであり、学術上きわめて価値あるものである。したがって、審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。