

テンサイ細胞質雄性不稔性発現と花粉稔性回復における翻訳後制御過程の研究

生物資源科学専攻 育種工学講座 遺伝子制御学 荒河 匠

1. 緒言

細胞質雄性不稔性 (CMS) は、ミトコンドリアによって花粉不稔を引き起こされる形質である。一方、核ゲノムには CMS を抑制する稔性回復遺伝子 (*Rf*) が存在するため、核-ミトコンドリア間の相互作用によって CMS の発現が決定される。北海道の主要作物であるテンサイの育種体系には CMS 系統が必要不可欠であることから、その分子機構が調べられてきた。花粉不稔の原因と考えられているミトコンドリア遺伝子 *preSatp6* の翻訳産物は、ミトコンドリアの内膜上で 250kDa 複合体を形成するが、花粉不稔にどのように関わるか明らかではない。一方で、*Rf1* として *Oma1* 様遺伝子である *bvORF20* がクローニングされた。酵母 OMA1 はシャペロン様活性をもつことから、*bvORF20* は *preSATP6* とタンパク質レベルで相互作用する可能性が考えられた。さらに、*Rf1* 保持個体の葯では *preSATP6* の複合体構造が変化していた。したがって、*bvORF20* は *preSatp6* に対して翻訳後制御を行っていること、および、*preSATP6* の 250kDa 複合体が CMS 発現に重要であることが示唆されたが、十分な証拠が得られていない。そこで、*bvORF20* 強制発現カルスを作製し、翻訳後制御過程を生化学的に特徴づけた。また、*preSATP6* 複合体がミトコンドリア機能に与える影響を単離ミトコンドリアの膜電位を指標に調査した。

2. 結果および考察

bvORF20 に FLAG タグを付加し、カルスにおいて強制発現させた。劣性対立遺伝子である *bvORF20L* を対照とした。強制発現カルスを供試して抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行うと、*bvORF20* 導入カルスから *preSATP6* のシグナルが検出されたが、*bvORF20L* 導入カルスからはシグナルが検出されなかった。Blue-native/SDS ポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動を行うと、*bvORF20* 導入カルスでは 250kDa, 200kDa および 150kDa の *preSATP6* 複合体が検出され、200kDa の *preSATP6* 複合体に *bvORF20* が含まれることが示された。一方で、*bvORF20L* 導入カルスでは 250kDa の *preSATP6* 複合体のみが検出され、この複合体に *bvORF20L* は含まれていなかった。これらのことから、*bvORF20* は、おそらくはタンパク質間相互作用によって *preSATP6* 複合体の構造を変化させることが考えられる。*bvORF20L* にはそのような能力はみられない。したがって、*bvORF20* は *preSATP6* 複合体の構造を変化させることによって稔性回復させることが示唆された。

CMS の発現には、*preSATP6* の 250kDa 複合体が重要であると考え、*preSATP6* 複合体がミトコンドリア機能に与える影響を調べた。まず、CMS ミトコンドリアの機能に変化がみられるか調べるため、CMS 系統および正常系統のカルスよりミトコンドリアを単離し、膜電位を測定した。CMS ミトコンドリアは、正常ミトコンドリアよりも膜電位が低かった。この膜電位の低下に *preSATP6* 複合体が関わるかどうか調べるべく、*bvORF20* 導入カルスおよび *bvORF20L* 導入カルスを用いて同様の解析を行った。*bvORF20* 導入カルス由来のミトコンドリアは、*bvORF20L* 導入カルス由来のミトコンドリアよりも膜電位が高い傾向にあったが、有意な差がみられなかった。解析に用いたミトコンドリアを供試し、*preSATP6* 複合体の挙動を調べたところ、*bvORF20* 導入カルスにおいて *preSATP6* の 250kDa 複合体が強く検出された。このことから、形質転換カルスにおいて有意な差がみられない原因の一つとして、*preSATP6* の 250kDa 複合体が残存していることが考えられた。今後、詳細な条件検討が必要である。