

博士論文

イネにおけるミトコンドリア **DNA** 量の組織間差異

東京大学大学院農学生命科学研究科

生産・環境生物学専攻

平成 19 年度進学 高梨 秀樹

指導教員 堤 伸浩

目次

第一章. 緒言	3
第二章. 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	10
2.1 諸論	11
2.2 材料及び方法	13
2.2.1 BY-2 におけるミトコンドリアおよび mt 核様体の観察	
2.2.2 イネの根各部におけるミトコンドリア一個あたりの DNA 量測定	
2.3 結果	17
2.3.1 タバコ培養細胞 BY-2 における mt 核様体の不均一性	
2.3.2 BY-2 におけるミトコンドリア融合時の mt 核様体の動態	
2.3.3 イネ根各部における明確な mt 核様体をもつミトコンドリアの割合	
2.3.4 イネ根各部における個々のミトコンドリアのもつ DNA 量	
2.4 考察	29
2.4.1 高等植物ミトコンドリア融合の意義	
2.4.2 高等植物ミトコンドリア融合時の mt 核様体の動態	
2.4.3 ミトコンドリアあたりの DNA 量およびその組織間による差異	
第三章. イネ卵細胞のミトコンドリア形態と mtDNA 量	32
3.1 諸論	33
3.2 材料及び方法	36
3.3 結果	42
3.3.1 イネ卵細胞の単離	
3.3.2 イネ卵細胞におけるミトコンドリアおよび mt 核様体の形態	
3.3.3 イネ卵細胞ミトコンドリアの形態に関する検証	
3.3.4 イネ卵細胞一個あたりに含まれるミトコンドリア遺伝子のコピー数	
3.4 考察	58
3.4.1 イネ卵細胞ミトコンドリアの保持する mtDNA 量	
3.4.2 イネ卵細胞ミトコンドリアの形態	
3.4.3 種間における卵細胞ミトコンドリアの形態の差異およびその意義	

第四章. 総合考察	61
4.1 高等植物ミトコンドリア間の相補作用	
4.2 mtDNA 均等分配の重要性	
4.3 分化済み組織において mtDNA 量を低水準に保つ意義	
第五章. 摘要	66
参考文献	71
謝辞	80

第一章. 緒言

ミトコンドリアはほとんど全ての真核生物の細胞に含まれる直径 1 μm 以下の細胞小器官である。その形態は一般的に動物ではネットワーク状や糸状、植物では粒状と大きく異なり (Scott I. and Logan D. C. 2007), また細胞の置かれている状態によってもその形態を大きく変化させる (Kuznetsov A. V. *et al.* 2009) という意味で、形態に関しては比較的柔軟性のある細胞小器官といえる。その機能に関しては、好気呼吸によるエネルギー生産という真核生物の生存に必要な役割だけでなく、有機酸、アミノ酸合成代謝経路の一部を担い、各種疾患、老化、プログラム細胞死および細胞質雄性不稔にも関与しており (Nakada K. *et al.* 2009; Reddy P. H. *et al.* 2009; Lu G. *et al.* 2009; Satoh M. *et al.* 2004), ミトコンドリアは動物植物に関わらず非常に重要な機能を担う細胞小器官であるといえる。

1857 年、ドイツのケーリッカーにより細胞内に粒状構造が見出され、それが後にミトコンドリアと命名される細胞小器官の発見であった。1890 年にアルトマンがミトコンドリアが細胞内で分裂によって自立的に増殖することを指摘し、ミトコンドリアが共生体である可能性が示唆された。その後 1953 年にミトコンドリアに関する細胞質遺伝が発見され (Ephrussi B. 1953), このことはミトコンドリアが独自の遺伝子を持つ可能性を示唆するものであった。しかしながら当時の技術ではその証拠となるミトコンドリア DNA (以下 mtDNA と略す) の姿をとらえることは困難であり、決定的な存在証明は難航した。1963 年になりようやく、Nass らはミトコンドリア内に DNA 分解酵素で処理した時にのみ消滅する繊維状の構造を発見し、ここに至って初めて mtDNA の実在が証明された (Nass M. M. and Nass S. 1963)。これらの結果をうけ、ミトコンドリアは α プロテオバクテリアの祖先種が現在から約 10-20 億年前に原始真核細胞内に共生して現在に至ったとする細胞内共生説が提唱され (Margulis L. 1970), 現在では細胞内共生説がミトコンドリアの起源としてほぼ定説とされている。

共生を開始したミトコンドリアは、共生後に自らのゲノムを宿主の核へと転移させ、次第にそのゲノムサイズを縮小していったと考えられている。またそれと並行してミトコンドリアゲノムには動物植物間において、進化の過程で大きな差異が生まれたことが明らかになっていった。ミトコンドリアゲノムサイズについては、脊椎動物では約 17 kbp であり種間でそれほど大きな差がない一方で (Anderson S. *et al.* 1981), 高等植物ではシロガラシの 208 kbp からマスキメロンの 2,400 kbp まで、巨大かつ植物種間で著しく異なることがわかった (Ward B. L. *et al.* 1981)。またミトコンドリアゲノムの構造についても、脊椎動物では単一環状であったのに対し、高等植物では不均一なサイズの環状 DNA の存在が報告された (Syrenki R. M. *et al.* 1978; Sparks R. B. and Dale R. M. K. 1980)。高等植物 mtDNA は内部のリピート配列で相同組み換えを起こして (Fig. 1-1) 構造を変化させることも示唆され (Lonsdale D. M. *et al.* 1984; Palmer J. D. and Shields C. R. 1984), これらの結果から、動物のミトコンドリアゲノムが単一の環状

DNA から構成されるのに対して、植物のミトコンドリアゲノムは様々なサイズの DNA 分子が混在する複雑な構造をとることが次第に明らかになってきた。これを受けて、高等植物のミトコンドリアゲノムは全ての遺伝情報を含むマスターサークルと呼ばれる大型の環状 DNA と、マスターサークルから相同組み換えによって生じる様々なサイズのサブゲノムサークルと呼ばれる小型の環状 DNA の集合体からなるという、マルチパータイト構造の概念が提唱された (Fauron C. *et al.* 1995, Fig. 1-2). 1997 年にシロイヌナズナミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定され、これに続いてテンサイ、イネ、ハクサイ、タバコ (Unseld M. *et al.* 1997; Kubo T. *et al.* 2000; Notsu Y. *et al.* 2002; Handa H. 2003; Sugiyama Y. *et al.* 2005) においてもミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定され、全塩基配列をもとにそれぞれのミトコンドリアゲノムにおけるマルチパータイト構造が予測可能になっていった。

マルチパータイト構造の考え方から、植物細胞において個々のミトコンドリアは組み換えによって生じた様々なサイズの環状 DNA を様々な組み合わせで、凝集した mtDNA-タンパク質複合体であるミトコンドリア核様体 (以下 mt 核様体と略す) として保持していると予想されている (Satoh M. *et al.* 1993, Fig. 1-3). しかしながら、これらのゲノム構造はあくまでも塩基配列解析プログラムのアッセンブルによる仮想的なものであり、マスターサークルやサブゲノムサークルが実在する構造であるかどうかは不明である。また、mtDNA 分子の構造についても、環状のみならず線状、分枝状の構造が観察されており (Oldenburg D. J. and Bendich A. J. 1998), 植物ミトコンドリアゲノムは予想されているマルチパータイト構造より更に複雑な構造をとっていることが示唆された。マルチパータイト構造が提唱されてから 20 年以上が経過したにもかかわらず、これまでのどの手法も間接的な構造推測しかなし得ないという欠点を持つため、いまだ高等植物ミトコンドリアゲノムの真の構造は謎に包まれている。

さらに、高等植物ミトコンドリアゲノムはその構造の複雑さに加え、細胞の状態によってミトコンドリアゲノム中の mtDNA 分子の構成が変化すること (Kanazawa A. *et al.* 1994; Suzuki T. *et al.* 1996), 細胞の成長に従って mt 核様体に含まれる mtDNA 量が減少すること (Fujie M. *et al.* 1993, 1994), 卵細胞では巨大な mt 核様体が非常に大量の mtDNA を保持していること (Kuroiwa H. *et al.* 1996) 等が報告され、これらの結果は植物ミトコンドリアゲノムが、一ミトコンドリアが一ゲノムを維持するといった単純な制御をはるかに凌駕した、非常に複雑な制御下にあることを示唆している。

一方で、高等植物細胞内には数百個のミトコンドリアが存在するが、抽出した mtDNA の総量とミトコンドリアの数のカウント結果から、植物細胞内には全てのミトコンドリアがゲノム全体をもてるほどの mtDNA 量がないという報告があった (Bendich A. J. and Gauriloff L.

P. 1984). この結果は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ことを示唆している.

植物細胞内において、個々のミトコンドリアあたり、あるいは細胞あたりには具体的にどの程度の mtDNA が保持されているのだろうか. また個々のミトコンドリアが保持する mtDNA 量には差があるのだろうか. 前述の Fujie ら, Kuroiwa らの研究における mt 核様体あたりの DNA 量については、ミトコンドリアがどの程度の mtDNA を保持しているのかという、植物における mtDNA 量の制御に関して極めて重要な手掛かりを与えたものの、当時の技術的な制約から、明らかにされたのは mt 核様体あたりの DNA 量のみであり、真に必要なと思われる個々のミトコンドリアあたりの DNA 量および細胞あたりの mtDNA 量は解明されていなかった.

このように高等植物ミトコンドリアゲノム研究はいまだ解明すべき点が多く残されている. 本博士論文ではこれまでの研究では明らかされなかった、ミトコンドリアあたりの mtDNA 量および細胞あたりの mtDNA 量に焦点を当てた研究を行った. まず第二章でイネの根においてミトコンドリアを可視化し、個々のミトコンドリアを明確に判別した上でミトコンドリアあたりの mtDNA 量、およびその組織間差異について解析した. 続いて第三章で単離したイネ卵細胞を用いて、植物卵細胞としては初めて卵細胞あたりが保持する mtDNA 量の定量をおこない、これらをあわせることで植物 mtDNA 量の制御について総合的な議論を目指し研究を行った.

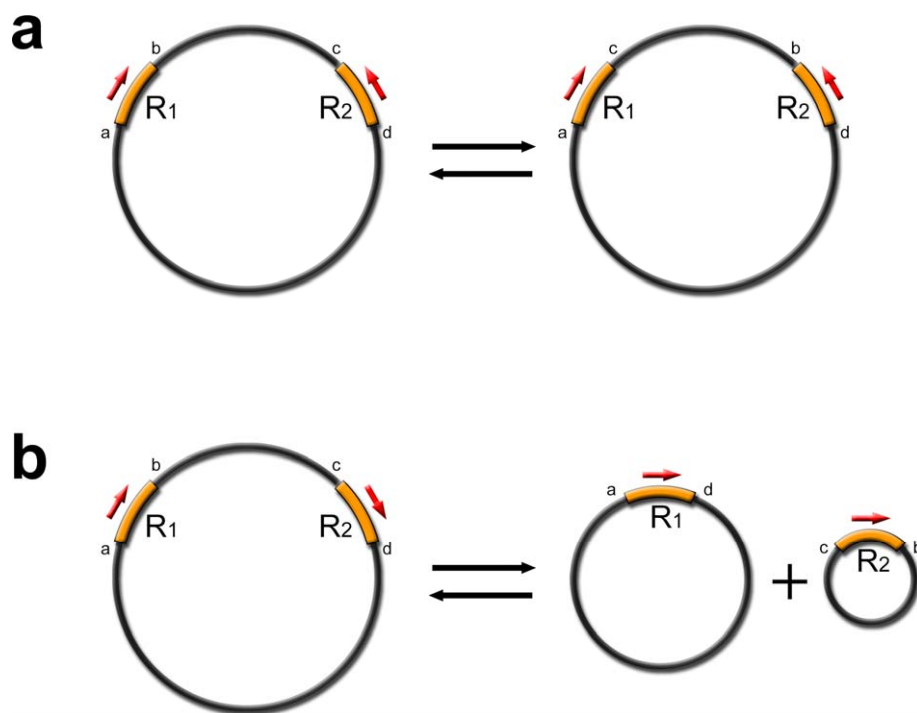


Fig.1-1 リピート配列を介した相同組み換えの様式

a : リピート配列が逆位に配置している場合では、相同組み換えによってリピート配列の間の配列 (図中における b-c) の向きが逆転する. **b** : リピート配列が順位に配置している場合では、相同組み換えによって新たな小型環状 DNA が生じる. 図中の R はリピート配列を、矢印はその向きを示す.

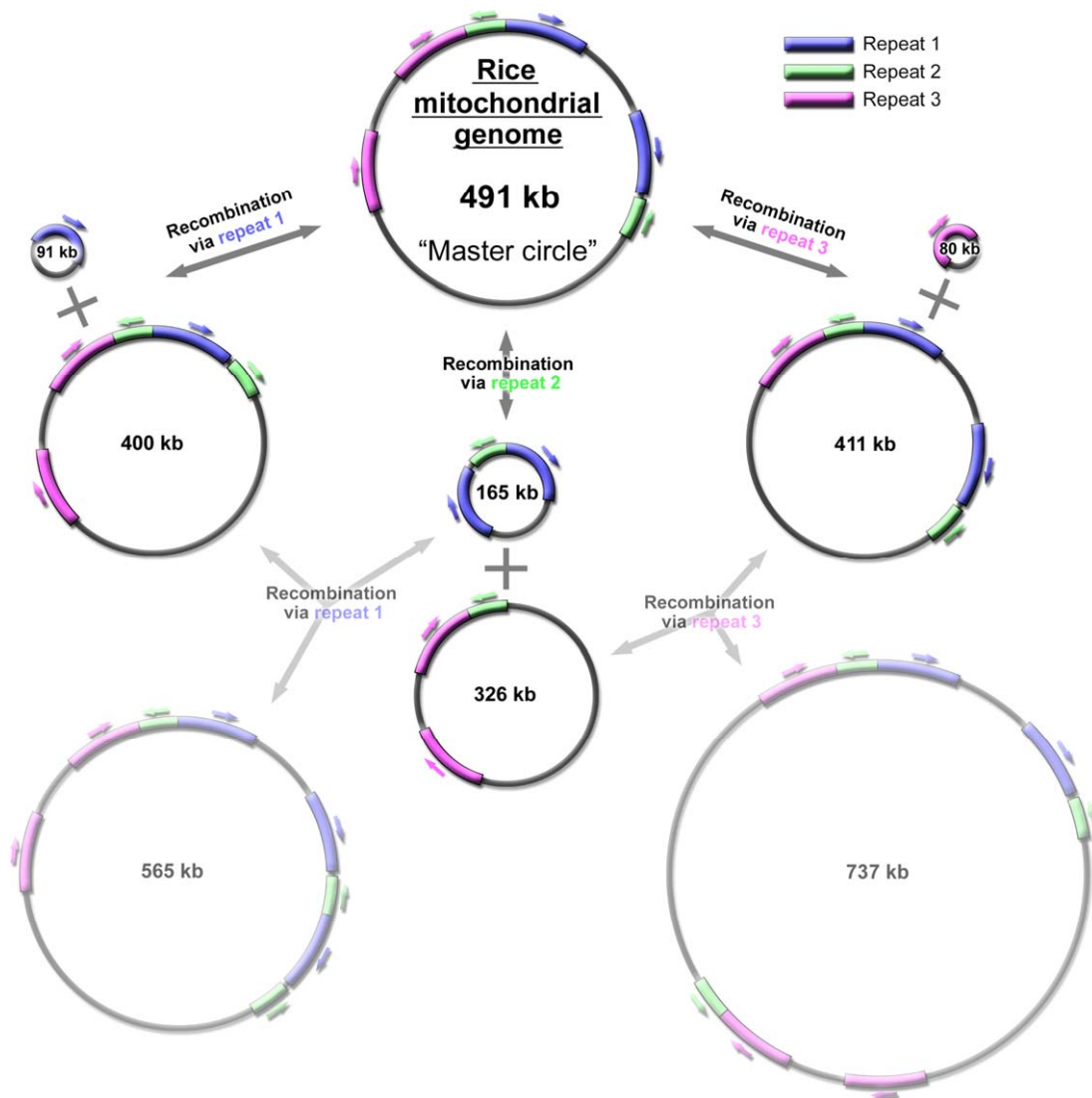


Fig.1-2 イネミトコンドリアゲノムの予想されるマルチパートイト構造の一例

公開されたイネミトコンドリアゲノム配列情報 (Notsu Y. *et al.* 2002) から、マルチパートイト構造を予想した。イネミトコンドリアゲノム中には 20 kbp 以上の大型リピート配列が 3 組存在し (図中の Repeat 1-3, 矢印はその向きを示す), それぞれのリピート配列間における相同組み換えの結果, 様々なサイズの, また時にはミトコンドリアゲノムサイズ (491 kbp) 以上の mtDNA が生じると考えられる。

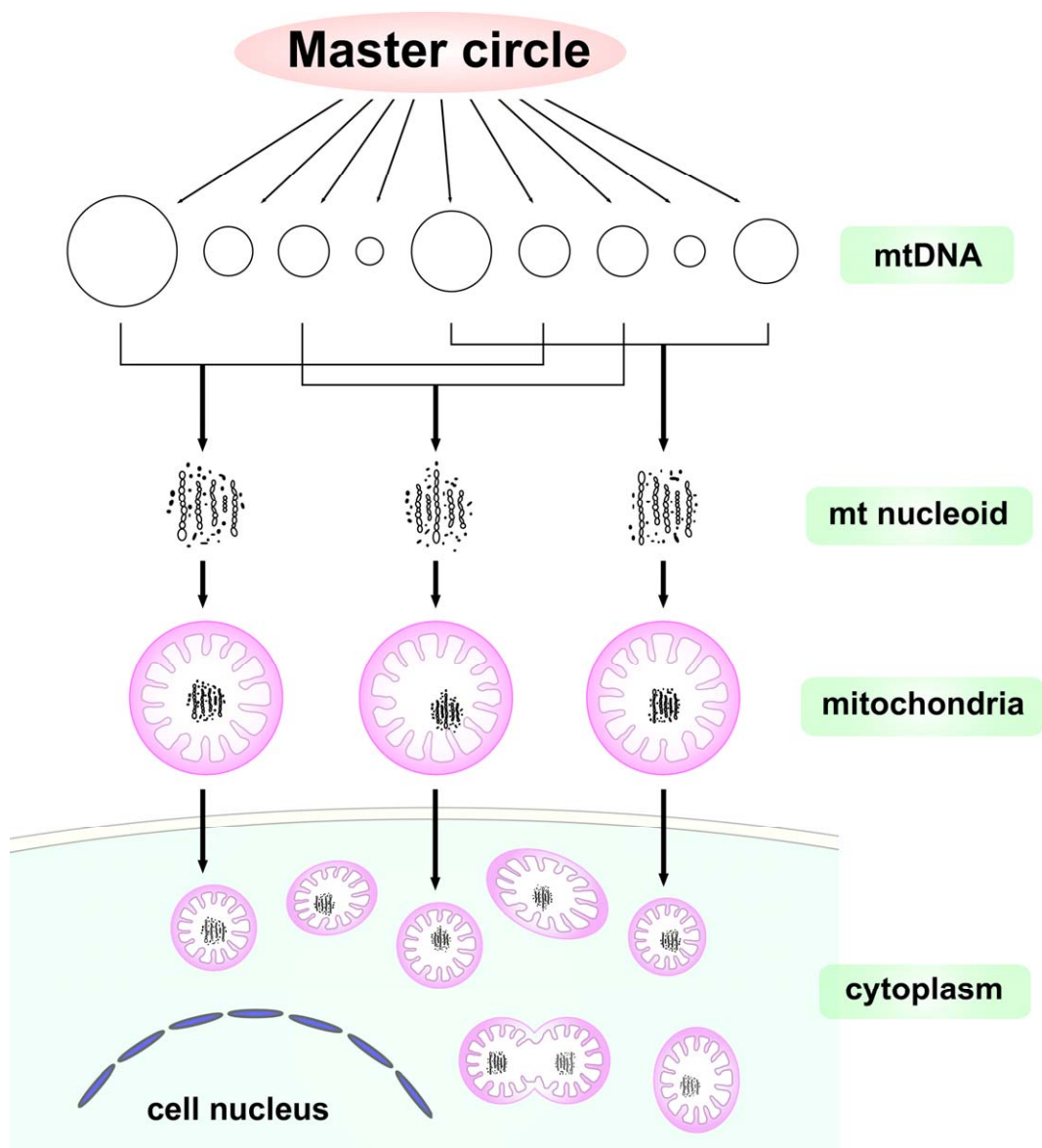


Fig.1-3 高等植物におけるミトコンドリアゲノムの予想される存在様式

それぞれのミトコンドリアは、様々なサイズの環状 DNA を様々な組み合わせで保持していると予想されている。また、mtDNA は核様体と呼ばれる凝集した DNA-タンパク質複合体としてミトコンドリア内に収納されていると考えられている。Satoh M. *et al.* 1993 から引用，一部改変。

第二章. 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

2.1 諸論

ミトコンドリアは真核生物において、好気呼吸によって ATP を生産するばかりでなく、有機酸、アミノ酸合成代謝経路の一部を担い、老化やプログラム細胞死にも関与していると考えられる重要な細胞小器官である。ミトコンドリアは原核生物が細胞内共生したものに由来しており、独自の DNA を持ち独立した遺伝子発現機構を持っている (Gray M. W. 1992)。

単一環状のミトコンドリアゲノムを持つ動物などの他の生物と比較して、高等植物のミトコンドリアゲノムはサイズが大きく複雑な構造をとっていると考えられている (Backert S. *et al.* 1997)。サザンハイブリダイゼーション解析の結果や決定されたミトコンドリアゲノム全塩基配列をもとに、高等植物のミトコンドリアゲノムは全ての遺伝情報を含むマスターサークルと呼ばれる大型の環状 DNA と、マスターサークルから相同組み換えによって生じる様々なサイズのサブゲノムサークルと呼ばれる小型の環状 DNA の集合体からなるという、マルチパート構造の概念が提唱された (Fauron C. *et al.* 1995, Fig. 1-2)。タバコミトコンドリアゲノムにおける研究から、mtDNA はわずか 9 bp のリピート配列によって組み換えを起こしうることが示され (Kanazawa A. *et al.* 1994)、このことから、植物細胞内の mtDNA には膨大な数の分子種が存在しうることが示唆される。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、mt 核様体と呼ばれる凝集した DNA-タンパク質複合体としてその内部に保持していると考えられている (Sato M. *et al.* 1993, Fig. 1-3)。

一方で、高等植物細胞内には数百個のミトコンドリアが存在するが、抽出したミトコンドリア DNA (以下 mtDNA と略す) の総量とミトコンドリアの数のカウント結果から、植物細胞内には全てのミトコンドリアがゲノム全体をもてるほどの mtDNA 量がないという報告があった (Bendich A. J. and Gauriloff L. P. 1984)。この結果は個々のミトコンドリアが全ゲノム情報を保持していない可能性が高いことを示唆している。しかしながら、実際に個々のミトコンドリアがどれだけの mtDNA を保持しているかという、ミトコンドリアあたりの DNA 量についてはこれまで調べられていなかった。

植物細胞内における mtDNA の挙動に関する研究として、固定した細胞内を DAPI のみで染色し、染色された mt 核様体に含まれる DNA 量を測定したという報告があった (Fujie M. *et al.* 1993, 1994)。これらの結果は、細胞が分裂組織から遠ざかるに従って mt 核様体に含まれる DNA 量が減少することを示す非常に興味深いものであった。しかしながら、これらの手法ではミトコンドリア自体をはっきりと識別できないため、DNA を持たないミトコンドリアが存在する場合や、一個のミトコンドリアに複数の mt 核様体がある場合が想定されていない。し

たがって、この手法を用いた研究では正確な意味でのミトコンドリアあたりの DNA 量を明らかにしたとは言えなかった。タバコ培養細胞 (BY-2) とタマネギの表皮細胞を用いた染色実験により, mtDNA の蛍光シグナルを持たないミトコンドリアや、複数の mt 核様体を持つミトコンドリアが確認されており (Arimura S. *et al.* 2004), 個々のミトコンドリアの持つ DNA 量には大きなばらつきがあることが示唆されている。

本研究では BY-2 およびイネを用いて、ミトコンドリアと mt 核様体を同時に可視化する実験系により、ミトコンドリアと mt 核様体の動態および個々のミトコンドリアが保持する DNA 量を明らかにすることを目指し実験を行った。

2.2 材料及び方法

2.2.1 BY-2 におけるミトコンドリアと mt 核様体の観察

植物材料

タバコ (*Nicotiana tabacum*) 培養細胞 (BY-2) は 0.2 mg, 2-4 D を加えた Murashige Skoog 培地で Nagata らの方法 (Nagata T. *et al.* 1992) に従い, 暗条件, 28 °C, 130 rpm で振盪培養した.

BY-2 の二重染色

継代後 6 日目の BY-2 をマイクロチューブに 500 µl 分取し, SYBR Green I (Molecular Probes) を 0.25 µl 加え 15 分間培養シェーカーで振盪し mt 核様体を染色した後, MitoTracker Orange CMTMRos (Molecular Probes) を終濃度 500 nM になるよう加え, 更に 15 分間培養シェーカーで振盪しミトコンドリアを染色した. マイクロチューブを卓上遠心機で 10 秒遠心し, 上清を捨て BY-2 培地を 500 µl 加えよく混ぜ, 再び卓上遠心機で 10 秒遠心した. この洗浄作業を三度繰り返した後, 新たな BY-2 培地を 500 µl 加え, 軽く混ぜた BY-2 懸濁液をガラスボトムディッシュ (MATSUNAMI) にマウントし倒立型蛍光顕微鏡を用いて観察を行った.

顕微鏡観察

二重染色した BY-2 は固定せず, 生きたまま蛍光顕微鏡 (TE2000-U, Nikon) で観察し, 100 倍の対物レンズ (N.A. 1.40) と共焦点レーザー顕微鏡システム (Micro-Radiance MR / AG-2, Bio-Rad) を使用して画像を撮影した. SYBR Green I は argon ion laser (488 nm) で, MitoTracker は green HeNe laser (543 nm) で励起した. 得られた画像は, 主に出力に際して PHOTOSHOP 7.0 (Adobe Systems) を用いて画像調整した.

2.2.2 イネの根各部におけるミトコンドリア一個あたりの DNA 量測定

植物材料

植物の組織は MitoTracker 等の染色剤で染まりにくいいため、本研究ではミトコンドリアを確実に可視化するために、GFP をミトコンドリアに局在させた形質転換イネ（以下 mtGFP イネと略す）を用いた。MtGFP イネは、イネ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) に

CaMV35Spro::Mt-GFP::NOSter 配列を Fukuoka らの方法 (Fukuoka H. *et al.* 2000) に従って形質転換することで作製されたものを、岡山大学資源生物科学研究所の坂本亘博士より分譲を受けた。GFP をミトコンドリアに局在させるためのミトコンドリア移行シグナルは、シロイヌナズナの ATPase δ -subunit (Sakamoto W. and Wintz H. 1996) のプレシークエンスを用いた。実験には 28 °C 明条件下で 1 / 2,000 HYPONeX (HYPONeX Japan) を加えて 30 日間水耕栽培した mtGFP イネを用いた。

イネミトコンドリアの単離・DAPI 染色

30 日間水耕栽培した mtGFP イネの冠根の基部、中間部、根端部をそれぞれ 1 cm ずつ切り出した。MtDNA を確実にかつ均一に染色するために、切り出したサンプルをカミソリを用いて DAPI 溶液 (2 μ g / ml DAPI in 0.4 M Mannitol, 0.25 mM MES) 中でよく刻み、細胞を破碎しミトコンドリアを溶液中に浮遊させた。MtDNA 染色のために 5 分静置したのち、ミトコンドリアを含む懸濁液を直接蛍光顕微鏡で観察した。GFP 蛍光をもとにミトコンドリアを識別し、根の基部、中間部、根端部それぞれ 300 個のミトコンドリアを撮影した。

顕微鏡観察

MtGFP イネを用いた実験では、BY-2 を用いた実験と同様の蛍光顕微鏡を用いて C-LHG1 HG lamp (Nikon) を使用し、GFP 蛍光像と DAPI 蛍光像をそれぞれ GFP (R) -BP filter set と DAPI filter set (共に Nikon) を用いて観察した。最も蛍光が強い焦点面において同一視野の GFP 蛍光像、DAPI 蛍光像をそれぞれ冷却 CCD カメラ (Evolution MP, Media Cybernetics) で撮影した。GFP 蛍光は DAPI filter によって完全にブロックされ、DAPI 像に写りこまないことが確認された。根の基部、中間部、根端部それぞれ 300 個のミトコンドリアを撮影した。

MtGFP イネの GFP, DAPI 蛍光像の画像処理

撮影した GFP, DAPI 蛍光像を PHOTOSHOP 7.0 を用いてそれぞれマゼンタ, グリーンに擬似カラー表示したのち重ね合わせ, 画像のミトコンドリアの部分のみ切り出し整列させた. 個々のミトコンドリアに含まれる DAPI の蛍光強度 (Fluorescent Intensities ; FIs, 後述) を測定したのち, PHOTOSHOP 7.0 を用いてコントラストを調整した.

DAPI 蛍光強度 (DAPI FIs) の測定

ミトコンドリア一個あたりの DAPI FIs はコントラストを調整する前の画像から, 画像解析ソフト IMAGE-PRO PLUS (Media Cybernetics) を用いて測定した. ヒストグラムは, コントラスト調整前の DAPI FIs からバックグラウンド値を引いた値を用いて作製した. バックグラウンド値は, コントラスト調整後の画像でも明確な mt 核様体が観察できないミトコンドリアにおける, コントラスト調整前の DAPI FIs の平均値とした. バックグラウンド値を引いた値がマイナスになったミトコンドリアについては DAPI FIs を 0 としてヒストグラムを作製した.

DNA 量 (kbp 相当量) - DAPI FIs 間の検量線の作製

個々のミトコンドリアに含まれる DNA 量 (kbp 相当量) は DAPI FIs の値から, Miyakawa ら, Miyamura らと同様の方法で推定した (Miyakawa I. *et al.* 1984; Miyamura S. *et al.* 1986). DNA 量 (kbp 相当量) - DAPI FIs 間の検量線は, λ DNA (NIPPON GENE : 線状 48.5 kbp), BAC クローン T18C6 (Arabidopsis Biological Resource Center より分譲 : 環状 114 kbp) を同様の方法で DAPI 染色した結果を用いて作製した. またミトコンドリア内の凝集した DNA の状態 (mt 核様体) に近づけるため, それぞれの DNA 溶液 (3 ng / μ l) 10 μ l に 2.5 M CaCl_2 を 25 μ l, 0.1 M スペルミジンを 10 μ l 加え DNA を凝集させた後 DAPI で染色した.

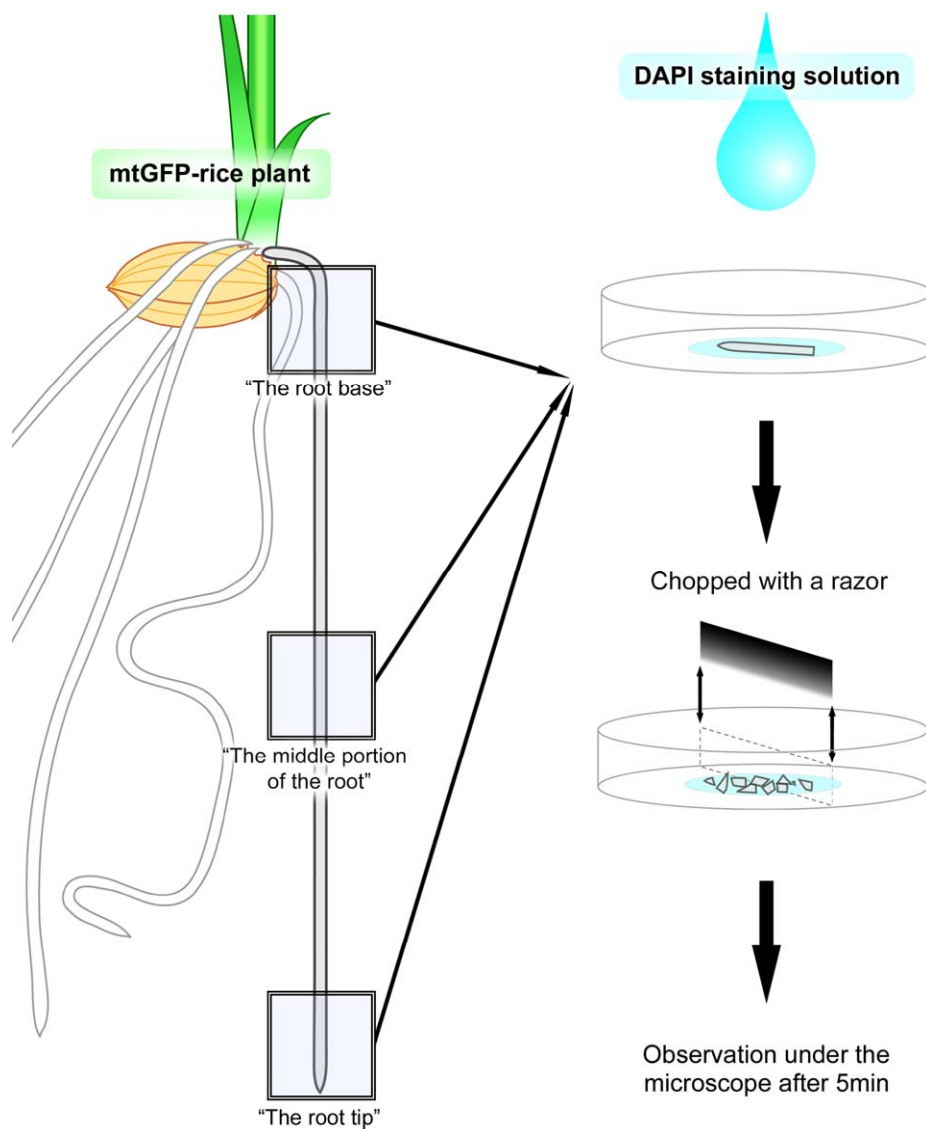


Fig. 2-1 MtGFP イネの mt 核様体の DAPI 染色方法

本研究では mt 核様体を均一に染色するため、細胞を破碎しミトコンドリアを浮遊させて染色する手法を用いた。根の基部、中間部、根端部を 1 cm ずつ切り出し、カミソリを用いて DAPI を含むマンニトール溶液中でサンプルをよく刻み細胞を破碎し、サンプル中のミトコンドリアを浮遊させた。その後 5 分静置し mt 核様体を染色し、ミトコンドリア懸濁液を直接蛍光顕微鏡で観察した。

2.3 結果

2.3.1 タバコ培養細胞 BY-2 における mt 核様体の不均一性

BY-2 のミトコンドリアと mt 核様体の関係およびミトコンドリア融合、分裂時における mt 核様体の動態を調べるために、ミトコンドリアと mt 核様体を MitoTracker と SYBR Green I で二重染色して観察した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて二重染色した BY-2 を観察したところ、個々のミトコンドリアに含まれる mt 核様体シグナル強度には大きなばらつきがあり、中には明確な mt 核様体が観察されないミトコンドリアが多数存在することが明らかになった (Fig. 2-2, 矢尻)。また、このようなミトコンドリアの一つについて Z 軸に沿って 0.3 μm 毎に、ミトコンドリアの上底から下底までの連続写真を撮影した結果、どの焦点面においても mt 核様体は観察されなかった (Fig. 2-3)。このことから、このミトコンドリアに mt 核様体が観察されないのは焦点面の選択によるものではないことがわかった。同一の細胞内に明確な mt 核様体を持つミトコンドリアと持たないミトコンドリアが混在して観察されることから、BY-2 の個々のミトコンドリアの持つ DNA 量には大きなバラつきがあるらしいことが明らかになった。

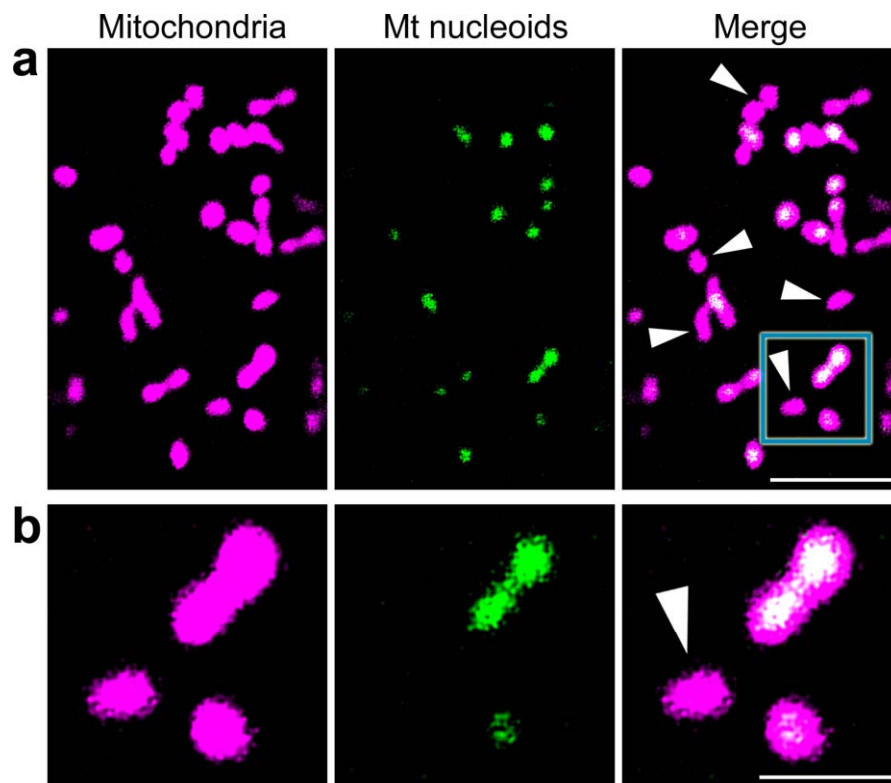


Fig. 2-2 BY-2 におけるミトコンドリアと mt 核様体の二重染色

a : ミトコンドリアを MitoTracker (マゼンタ), mt 核様体 (mtDNA) を SYBR Green I (グリーン) で染色した。ミトコンドリアをマゼンタ, mt 核様体をグリーンで表示してあるため, ミトコンドリア内の mt 核様体は二色の重ね合わせの結果ホワイトに表示される。矢尻のように mt 核様体の観察されないミトコンドリアが多数存在した。Bar = 5 μ m. **b** : a の枠内拡大図。矢尻のミトコンドリアには mt 核様体が観察されず, またこれらの 3 つのミトコンドリアが保持する mt 核様体量には大きな差があることがわかる。Bar = 2 μ m.

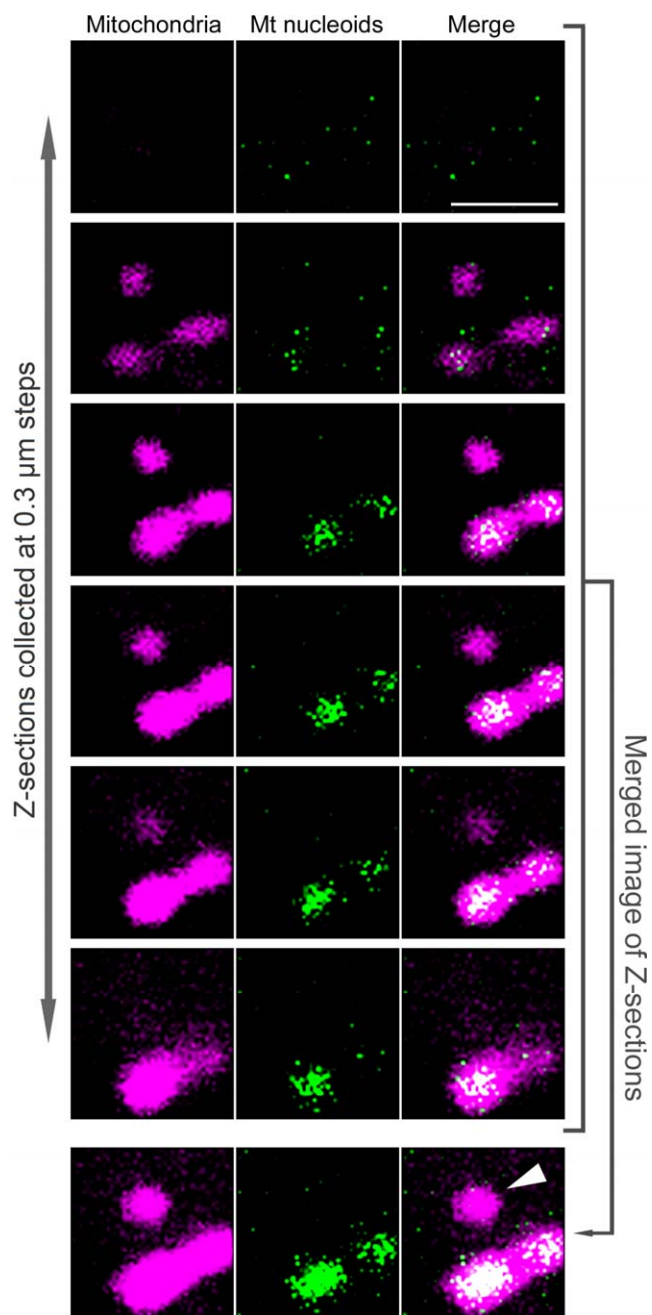


Fig. 2-3 BY-2 における明確な mt 核様体をもたないミトコンドリア

明確な mt 核様体をもたないミトコンドリアについて、Z 軸に沿って 0.3 μm 毎に連続撮影した写真。矢尻のミトコンドリアではいずれの焦点面にも mt 核様体シグナルは観察されない。
Bar = 2 μm.

2.3.2 BY-2 におけるミトコンドリア融合時の mt 核様体の動態

本研究の実験系では BY-2 を固定せず、細胞が生きている状態でミトコンドリアおよび mt 核様体を染色しているので、この利点を生かしてミトコンドリアの融合・分裂時における mt 核様体の挙動を観察した。それぞれのミトコンドリアに含まれる mt 核様体の量に大きなバラつきがある BY-2 細胞において、ミトコンドリアの融合・分裂時に mt 核様体がどのような動態を示すかを明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 3 秒または 5 秒毎に画像を撮影し、動画を作製した。これらの二重染色したミトコンドリアの融合・分裂を観察したところ、明確な mt 核様体を持つミトコンドリア同士の融合 (Fig. 2-4a)、明確な mt 核様体を持たないミトコンドリア同士の融合 (Fig. 2-4b)、明確な mt 核様体を持つミトコンドリアと持たないミトコンドリアの融合 (Fig. 2-4c)、mt 核様体を不均等に分配する分裂 (Fig. 2-4d)、mt 核様体をほぼ均等に分配する分裂の直後に再融合 (Fig. 2-4e)、などが観察された。これらの結果から、BY-2 ミトコンドリアの融合・分裂は、mt 核様体の有無に関して様々なパターンがあることがわかった。また、明確な mt 核様体を持つミトコンドリア同士の融合や、持たないミトコンドリア同士の融合も多く、多数の融合・分裂を観察した結果、これらのミトコンドリアの融合・分裂は mt 核様体の量や有無に関係なくランダムに起こるらしいということが示唆された。

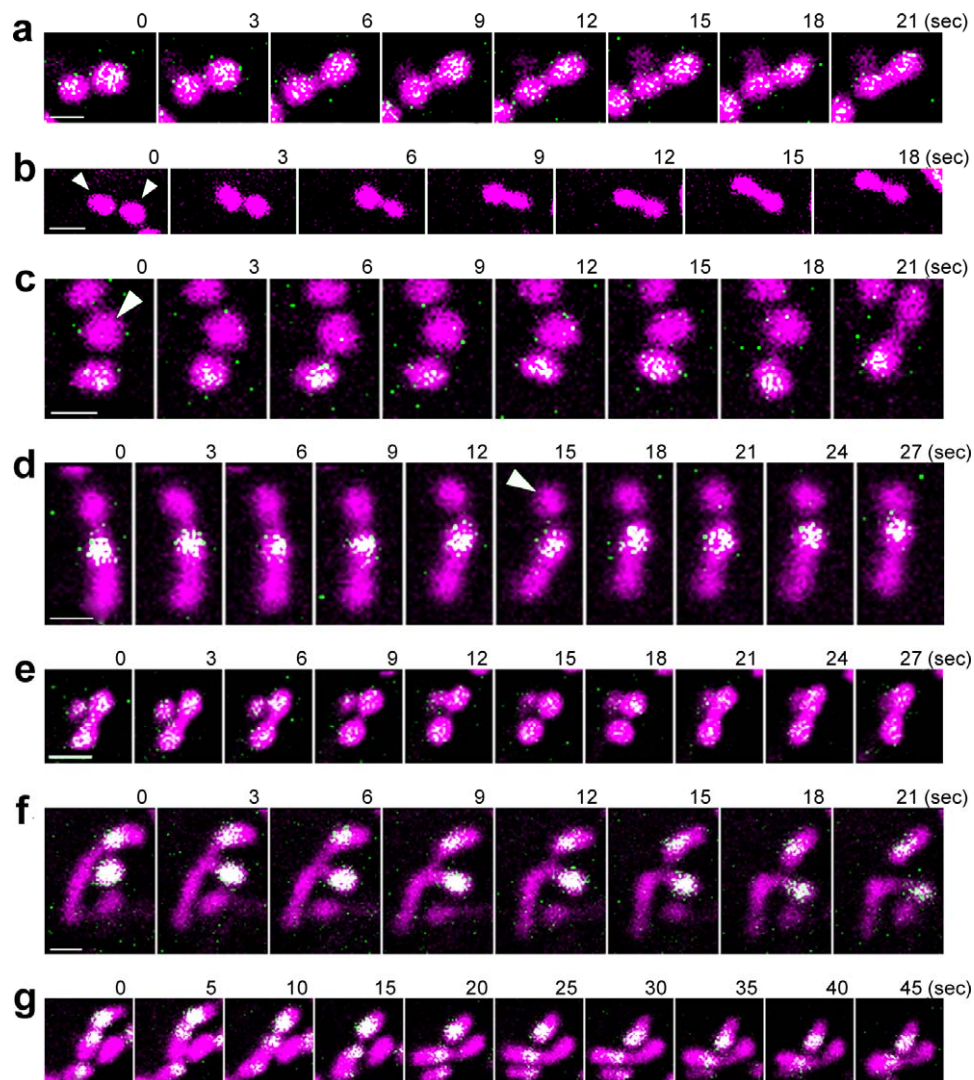


Fig. 2-4 BY-2 ミトコンドリアの融合・分裂と核様体の関係

細胞内の同一平面を 3 秒または 5 秒間隔で撮影した画像を連続的に示した。ミトコンドリアをマゼンタ, mt 核様体をグリーンで表示してあるため, ミトコンドリア内の mt 核様体は二色の重ね合わせの結果ホワイトに表示される。 **a**: 明確な mt 核様体を持つミトコンドリア同士の融合, **b**: 明確な mt 核様体を持たないミトコンドリア同士の融合, **c**: 明確な mt 核様体を持つミトコンドリアと持たないミトコンドリアの融合, **d**: mt 核様体を不均等に分配する分裂, **e**: mt 核様体をほぼ均等に分配する分裂と, その後の再融合, **f**: 融合部付近で起きた分裂, **g**: 分裂した末端部で直ちに別のミトコンドリアと融合。矢尻は明確な mt 核様体が観察されないミトコンドリアを示す。 Bars = 1 μ m.

2.3.3 イネ根各部における明確な mt 核様体をもつミトコンドリアの割合

植物体のミトコンドリアと mt 核様体においても、培養細胞である BY-2 で観察されたような個々のミトコンドリアが保持する mt 核様体量にばらつきはあるのか、また個々のミトコンドリアの持つ DNA 量はどの程度なのかを調べるために、イネを用いて実験を行った。植物体では MitoTracker 等の染色剤が浸透しにくいいため、本研究ではミトコンドリアを明確に可視化するために、GFP をミトコンドリアに局在させた形質転換イネ (mtGFP イネ) を用いた。

MtGFP イネの mt 核様体を DAPI で染色し、GFP 蛍光をもとにミトコンドリアをはっきりと識別した上でミトコンドリア内部に含まれる DAPI 蛍光像を撮影し、各ミトコンドリアがどの程度の mt 核様体をもつかを評価した。また、個々のミトコンドリアに含まれる mt 核様体の形態や存在比率に組織間による差はあるのかを調べるために、根の基部、中間部、根端部の三ヶ所について実験を行った。

MtGFP イネの冠根の基部、中間部、根端部をそれぞれ 1cm ずつ切り出し、カミソリを用いて DAPI 溶液中でよく刻み、細胞を破碎しミトコンドリアを溶液中に浮遊させ mt 核様体を染色した (Fig. 2-1)。根の基部、中間部、根端部のそれぞれ 300 個のミトコンドリアを撮影したところ、イネ根においても多くのミトコンドリアが明確な mt 核様体を持たないことがわかった (Fig. 2-5)。また、明確な mt 核様体を持たないミトコンドリアの割合は組織によって大きな差があり、根の基部、中間部、根端部においてそれぞれ 67 %、59 %、9 %であり、根端部から離れるにしたがって急激に明確な mt 核様体を持たないミトコンドリアが増加することがわかった (Fig. 2-5, Table 1)。

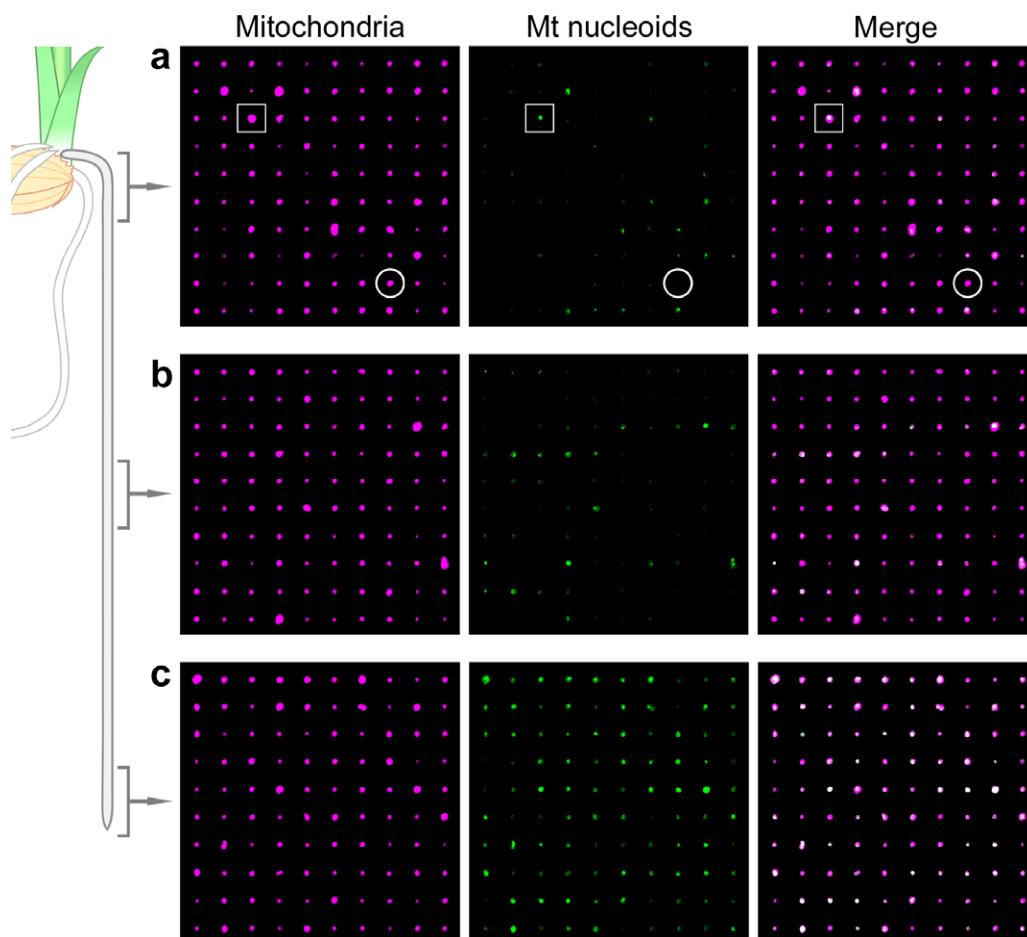


Fig. 2-5 イネ根各部におけるミトコンドリアと mt 核様体の二重染色

左列がミトコンドリア (マゼンタ), 中央が mt 核様体 (グリーン), 右列が重ね合わせ画像を示している. **a**: 根の基部のミトコンドリアと mt 核様体, **b**: 根の中間部のミトコンドリアと mt 核様体, **c**: 根端部のミトコンドリアと mt 核様体. 根の各部において撮影した 300 個のミトコンドリアのうち, ランダムに選んだ 100 個についてそれぞれ画像を表示した. 四角と丸で囲まれたミトコンドリアは, それぞれ明確な mt 核様体を持つものと持たないものの例を示す. 明確な核様体をもたないミトコンドリアの割合は根の基部, 中間部, 根端部においてそれぞれ 67%, 59%, 9%であった.

2.3.4 イネ根各部における個々のミトコンドリアのもつ DNA 量

撮影した画像の蛍光強度をもとに個々のミトコンドリアに含まれる DAPI 蛍光強度 (Fluorescent Intensities ; FIs) を測定し、その値から個々のミトコンドリアに含まれる DNA 量を推定した。根の各部のミトコンドリア一個あたりに含まれる DAPI FIs を測定したところ、根の基部、中間部と比較して根端部のミトコンドリアに含まれる DAPI FIs は、平均値が有意に大きいことがわかった ($P < 0.005$, Fig. 2-6, 矢印)。

次に、DAPI FIs の値から DNA 量 (kbp 相当量) を推定するために、 λ DNA と BAC クローン T18C6 を同様に DAPI で染色し DAPI FIs を測定し、その結果を用いて DAPI FIs と DNA 量 (kbp 相当量) 間の検量線を作製した。57 個の単分子 λ DNA, 51 個の単分子 T18C6 の DAPI FIs を測定したところ、DNA 量 (kbp 相当量) と DAPI FIs の間には “DNA 量 (kbp 相当量) = $0.316 \times \text{DAPI FIs}$ ” という比例関係があることがわかった (Fig. 2-7)。また、今回の実験系では少なくとも 4.3 kbp の DNA まではこの検量線に従う形で検出できることも確認している (結果不掲載)。本研究ではこの検量線を用いて、ミトコンドリア一個あたりに含まれる DNA 量 (kbp 相当量) を推定した。

DAPI FIs の値から、ミトコンドリア一個あたりに含まれる DNA 量の平均値を推定したところ、根の基部、中間部、根端部でそれぞれ 29.5 kbp, 28.4 kbp, 109.8 kbp 相当という結果になり (Fig. 2-8, Table 1)、いずれもイネのミトコンドリアゲノムのサイズ (491 kbp) と比較して非常に小さいことがわかった。また同一の組織内でもミトコンドリアあたりの DNA 量には非常に大きな差があり、例えば根端部においては、DNA が検出されないものから 1.2 Mbp 相当もの DNA を持つものまでが混在していた。

以上のことから、イネの根端部のミトコンドリアは根の基部や中間部のものと比較して明確な mt 核様体を持っている割合が高く、またそれぞれのミトコンドリアが持っている DNA 量も多い傾向があることがわかった。また、同一の組織内でも個々のミトコンドリアの持つ DNA 量には大きなばらつきがあり、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ることがわかった。さらに、イネのミトコンドリアゲノムは 491 kbp であることから、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情報の一部しか保持していない可能性が高いことが示唆された。

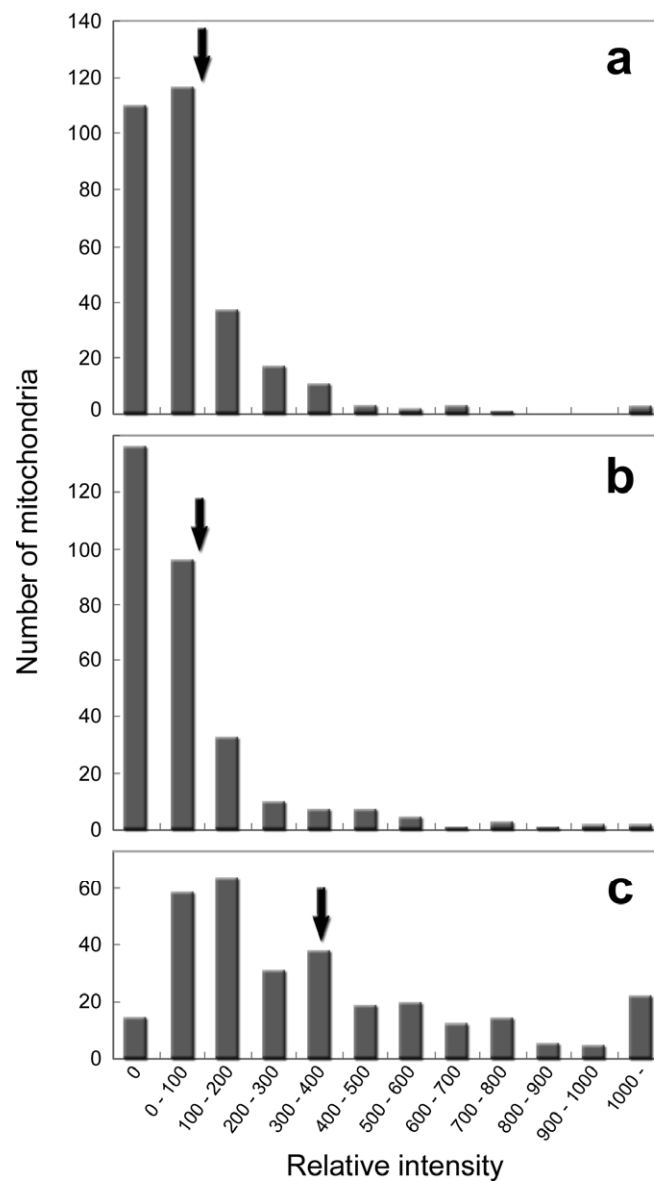


Fig. 2-6 イネの根各部におけるミトコンドリア一個あたりの DAPI FIs の頻度グラフ

a：根の基部のミトコンドリア, **b**：根の中間部のミトコンドリア, **c**：根端部のミトコンドリア.

黒矢印は平均値を表す [根の基部, 中間部, 根端部でそれぞれ 93.4 ± 233 , 90 ± 200 , 347 ± 437 (平均値 \pm 標準偏差)].

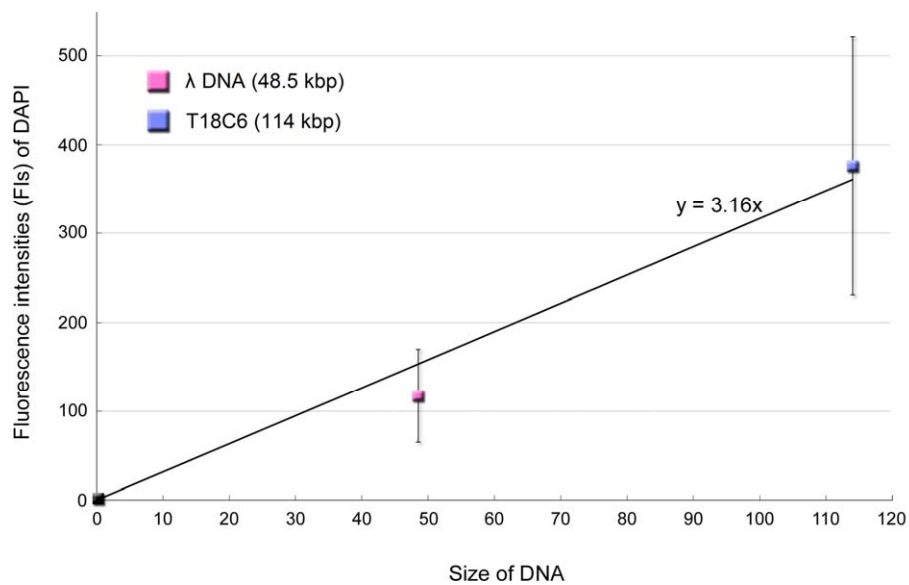


Fig. 2-7 DNA 量 (kbp 相当量) と DAPI FIs 間の検量線

57 個の単分子 λ DNA, 51 個の単分子 T18C6 の DAPI FIs を測定したところ [λ DNA : 117.6 ± 52.6, T18C6 : 376.0 ± 145.3 (平均値 ± 標準偏差)], DNA 量 (kbp 相当量) と DAPI FIs の間には “DNA 量 (kbp 相当量) = 0.316 * DAPI FIs” という比例関係があることがわかった。エラーバーは標準偏差を表す (n = 57 and 51)。

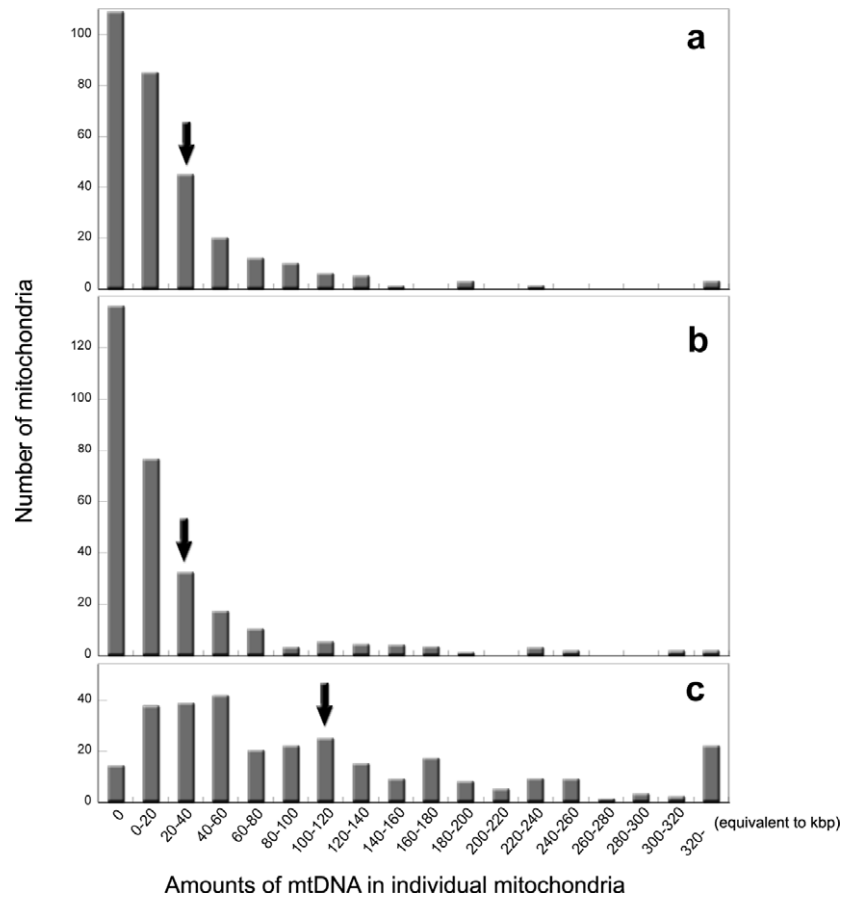


Fig. 2-8 イネの根各部におけるミトコンドリア一個あたりが保持する DNA 量の頻度グラフ

Fig. 2-7 の検量線および Fig. 2-6 の DAPI FI の値から、個々のミトコンドリアあたりの DNA 量(kbp 相当量) を推定し頻度グラフを作成した. **a** : 根の基部のミトコンドリア, **b** : 根の中間部におけるミトコンドリア, **c** : 根端部におけるミトコンドリア. 矢印は平均値を表す[根の基部, 中間部, 根端部でそれぞれ 29.5 ± 73.6 kbp 相当, 28.4 ± 63.2 kbp 相当, 109.8 ± 138.1 kbp 相当 (平均値 \pm 標準偏差)].

Table 1 Ratio of mitochondria without visible nucleoids and DNA amounts per mitochondrion and per nucleoid

	Root base	Middle portion of root	Root tip
Ratio of mitochondria without visible nucleoids ^a (%)	67	59	9
DNA amounts per mitochondrion ^b (equivalent to kbp)	29.5 ± 70.5	28.4 ± 63.2	109.8 ± 138.1
DNA amounts per nucleoid (equivalent to kbp)	46.4 ± 88.2 ^c	52.0 ± 78.1 ^d	124.2 ± 139.0 ^e

^aThe percentage is given (n =300). ^{b, c, d, e}The mean value ± standard deviation is given (n = 300, 99, 123, 273).

2.4 考察

2.4.1 高等植物ミトコンドリア融合の意義

高等植物と同様に動物ミトコンドリアも融合することが知られている (Hayashi J. et al. 1994). その意義として近年ではミトコンドリアの相補作用という概念が有力である. これは例えば, 変異の入った mtDNA を持つミトコンドリアが正常な mtDNA を持つミトコンドリアと融合することで, 正常 mtDNA の作る正常な転写産物等を獲得し, 変異型の表現型が出るのを抑えているという考えである. この説はヒト培養細胞を用いて, 異なる変異を持つ二種類の呼吸不全系統を細胞融合させることによりお互いの変異を相補し, 融合後の細胞の呼吸能が回復したという実験結果からも支持されている (Ono T. et al. 2001).

高等植物細胞内には全てのミトコンドリアが全ゲノムを持てるだけの mtDNA 量がないという結果 (Bendich A. J. and Gauriloff L. P. 1984) から, mtDNA 上には正常な生存に必須の遺伝子がコードされている (Unsold M. et al. 1997) にも関わらず, 個々のミトコンドリアは遺伝子が不足した状態にあると考えられる. 本研究で観察された明確な mt 核様体を持たない BY-2 ミトコンドリアは, mt 核様体が染まりきっていない可能性を加味しても DNA がかなり不足している状態であると考えられ, イネの根各部のミトコンドリア一個当たりに含まれる DNA 量もその一ゲノム分のゲノムサイズには到底及ばないものであった. このゲノム全体を持たないミトコンドリアがそのまま mtDNA が不足した状態を続ければ, 近い将来そのミトコンドリアが機能不全を起こすことは明らかである. 今回ミトコンドリア染色剤として用いた MitoTracker は膜電位依存的にミトコンドリアを染色する試薬であり, 仮にミトコンドリアの呼吸能の指標となる膜電位が消失していれば, そのミトコンドリアは MitoTracker で非常に染まりが悪くなる. 今回観察された明確な mt 核様体を持たないミトコンドリアの MitoTracker での染まり具合は, mt 核様体を持つミトコンドリアの染まり具合と大きな差がないことがわかる (Fig. 2-2). このことから, たとえ明確な mt 核様体を持たないようなミトコンドリアであっても, 膜電位は下がり呼吸能は落ちていないという可能性が示唆された.

本研究でも示したように, 明確な mt 核様体を持たないミトコンドリアにも十分に膜電位があり, 機能不全を起こしていると思われるようなミトコンドリアが観察されなかったことから, 高等植物ミトコンドリア間にも相補作用があり, ミトコンドリアの融合によってなんらかの物質をやり取りし, 遺伝情報の不足しているミトコンドリアも正常に機能していることが示唆される.

2.4.2 高等植物ミトコンドリア融合時の mt 核様体の動態

BY-2を用いてミトコンドリアとmt核様体を二重染色し観察したところ、明確なmt核様体を持たないミトコンドリアと持つミトコンドリアの融合時に、mt核様体が融合したミトコンドリア間を移動し、mt核様体を持っていなかったミトコンドリアがmt核様体を獲得するという現象は見られなかった。これは少なくとも、融合後ただちに分裂するといった一過的な融合・分裂時にはmt核様体の移動、交換などは行われないことを示している。この原因として、mt核様体がDNA-タンパク質の複合体という比較的巨大な構造であり、短時間でミトコンドリア間を移動することが困難であるということが考えられる。Arimura らの蛍光タンパク質 *Kaede* を用いた研究 (Arimura S. *et al.* 2004) において、緑色ミトコンドリアと赤色ミトコンドリアが融合すると直ちに黄色ミトコンドリアになることから、ミトコンドリア融合時には、20 kDa 程度のマトリクスタンパク質は瞬時に混ざり合うということが証明されている。従って、マトリクス内に存在している転写産物、翻訳産物等の可溶性の物質については融合時に瞬間的に交換が行われている可能性は高い。

ミトコンドリア内で mtDNA の移動は起こり得ないのだろうか。Belliard らは、異なる二種のタバコプロトプラストの融合により、二種の mtDNA の組み換え体 (非両親型 mtDNA) が生じることを示した (Belliard G. *et al.* 1979)。これは融合したミトコンドリア内で両親由来の mtDNA が組み換えを起こしたことを意味しており、このことはミトコンドリア内での mtDNA 分子の移行が起こりうることを示唆している。

これらを合わせると、高等植物ミトコンドリアは、一過的なミトコンドリアの融合では DNA の直接的な移動、交換ではなく、マトリクスに存在する転写産物や翻訳産物を移動、交換することでミトコンドリア間の相補作用を成立させていると考えられる。一方でスイカやシロイヌナズナの茎頂分裂組織で観察されるネットワーク状ミトコンドリアや (Bendich A. J. and Gauriloff L. P. 1984; Segui-Simarro J. M. *et al.* 2008)、細胞の脱分化後の分裂時に見られる massive mitochondrial fusion のような (Shahan M. B. *et al.* 2005)、長期的で mt 核様体が移動するのに十分な余裕がある融合の場合は DNA 間の移動、交換も行われうると考えられる。

2.4.3 高等植物ミトコンドリアあたりの DNA 量およびその組織間による差異

イネの根各部を用いた実験結果より、根端部では他の部分と比較してミトコンドリア一個あたりの DNA 量が有意に多いことがわかった。根端部は分裂組織を含んでおり、この結

果は分裂組織ではオルガネラ DNA 量が多いという過去の報告にも一致する (Fujie M. *et al.* 1993, 1994). このことは、新たに生じる娘細胞に対し、確実に不足なくオルガネラ DNA を分配しなければならない分裂組織では、オルガネラ DNA を盛んに複製して不十分な分配、伝達が起こることを防いでいるからではないかと考えられる (Kuroiwa T. *et al.* 1992; Suzuki T. *et al.* 1992).

では分裂組織以外、本研究での根の基部、中間部でミトコンドリアあたりの DNA 量が激減するのはどういった理由によるものなのだろうか. 考えられる仮説としては、細胞内の mtDNA の総量が少なくても、盛んな融合・分裂によるミトコンドリア間の相補作用によってミトコンドリアの機能を保つことが可能であり、結果的にその方が大量のゲノムを維持、メンテナンスするより総コストが削減できるため、現在のように細胞内 mtDNA 量が少なくなったというものである. 正確な DNA の複製・維持というものはかなりのエネルギーや材料を要する作業であると考えられる. 融合・分裂にも当然コストはかかるものの、大量の DNA を維持し続けるコストよりは少ないと仮定すると、少量の mtDNA を維持し融合・分裂による相補作用で生き抜く戦略は有利である.

本研究ではミトコンドリアあたりの DNA 量が多い根端部のミトコンドリアですら、そのほとんどが全ゲノムを保持していないという結果を得た. 本研究ではミトコンドリアの膜の浸透性を上昇させるような処理を行っていないため、DAPI がミトコンドリア内に浸透しにくく、内部の DNA が染まりきっていないという可能性は否定できない. 検量線は裸の DNA を染色した結果を用いており、二重膜に包まれた mtDNA の DAPI FIs に対してこの検量線を適用することで、実際に個々のミトコンドリアが保持している DNA 量よりも少なめの DNA 量が算出された可能性はある. しかしながら、同一細胞内でも一個のミトコンドリアが保持する DNA 量には大きな差があり、その DNA 量は組織間で大きく異なるという結論に変わりはない.

第三章. イネ卵細胞のミトコンドリア形態と mtDNA 量

3.1 諸論

植物において、ミトコンドリアは融合・分裂を繰り返し、そのバランスをとることで通常小型粒状の形態を保っている (Arimura S. *et al.* 2004; Arimura S. *et al.* 2008). しかしながら、正常な野生型植物体においても、組織間でその形態は一樣ではなく、これまでにスイカやシロイヌナズナの茎頂分裂組織において長大化したネットワーク状のミトコンドリアが観察されている (Bendich A. J. and Gauriloff L. P. 1984; Seguí-Simarro J. M. *et al.* 2008). また、特に卵細胞においては、非常に複雑な巨大多層カップ状構造をもつミトコンドリアがゼラニウム (Kuroiwa H. and Kuroiwa T. 1992; Kuroiwa H. *et al.* 1996), トウモロコシ (Diboll A. G. and Larson D. A. 1966; Faure J. E. *et al.* 1992; Mól R. *et al.* 2000), マルバアサガオ (Hu Z. M. *et al.* 1996) やワラビ (Tourte Y. 1975) において見出されている (Fig. 3-1).

一方で、ワタ (Jansen W. A. 1965; Jansen W. A. *et al.* 1977), イヌホウズキ (Briggs C. L. 1992), ハクサイ (Sumner M. J. and Vancaeseele L. 1989), シロイヌナズナ (Mansfield S. G. *et al.* 1991) やイネ (Dong J. and Yang H. Y. 1989) などの種では電子顕微鏡観察によって卵細胞ミトコンドリアは通常的小型粒状の形態であるとの報告があった。しかしながら、これらの結果はいずれも少数の切片の電子顕微鏡観察のみから得られたものである。電子顕微鏡観察のような極薄切片の観察では、連続切片を用いた立体構築を行わなかった場合、仮に細胞内にネットワーク状の構造体が存在したとしてもこれらの断面図では粒状に見えてしまう。したがってこれらの植物種の卵細胞ミトコンドリアが細胞全域において小型粒状であるのか、本当にそれらの植物種の卵細胞には巨大ミトコンドリアが存在しないのかについては疑問が残っていた。

これまでの先行研究および本博士論文第二章から、根端部などの分裂組織では mtDNA 量が多いことが明らかになっているが (Fujie M. *et al.* 1993, 1994), それではいわば始原分裂細胞とも言える卵細胞においても同様の傾向がみられるのだろうか。卵細胞における mtDNA 研究についてはゼラニウムでのみ進展があり、DAPI 染色法を用いた研究により、巨大ミトコンドリアの mt 核様体には 300 Mbp を超える非常に大量の DNA が含まれていることが判明した (Kuroiwa H. *et al.* 1996). この結果から、巨大ミトコンドリアをもつ卵細胞は大量のミトコンドリア DNA を保持していることが示唆された。しかしながら、ゼラニウム卵細胞におけるミトコンドリア DNA 量の研究結果は、あくまでも mt 核様体あたりに含まれる DNA 量の定量であり、卵細胞全体に含まれる mtDNA 量は不明であった。卵細胞あたりに含まれる mtDNA 量の

測定結果はこれまで巨大ミトコンドリアをもつ植物種、もたないとされる植物種のいずれにおいても報告されていない。

本研究では卵細胞が巨大ミトコンドリアをもたないとされる植物種において、卵細胞におけるミトコンドリア形態の詳細および卵細胞が保持する mtDNA 量を明らかにすることを目指した。本研究では、卵細胞が巨大ミトコンドリアをもたないとされる植物種として、ミトコンドリアゲノム配列が読解されている点 (Notsu Y. *et al.* 2002), 固定せずに卵細胞が比較的容易に単離できる点 (Han H. M. *et al.* 1998; Zhang J. *et al.* 1999; Zhao J. *et al.* 2000; Khalequzzaman M. and Haq N. 2005; Uchiumi T. *et al.* 2006) からイネを材料として選択し、イネ卵細胞におけるミトコンドリア形態と mt 核様体を観察し, real-time PCR 法を用いて卵細胞に含まれる mtDNA 量を定量した。

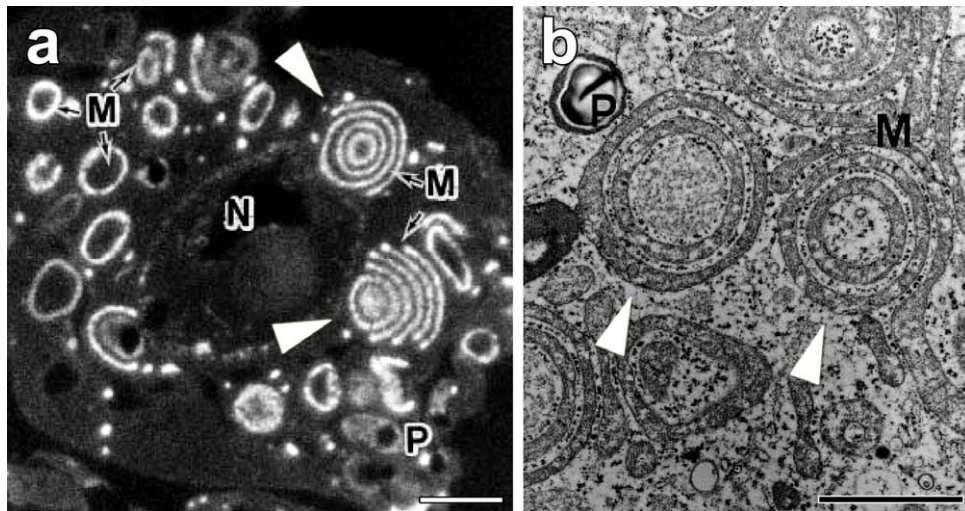


Fig. 3-1 ゼラニウムおよびトウモロコシ卵細胞において観察された巨大ミトコンドリア

a: ゼラニウム卵細胞 Technovit 樹脂包埋切片の DAPI 染色像. ゼラニウム卵細胞においては複雑な巨大多層カップ状 mt 核様体 (矢尻) が観察された. Bar = 5 μ m. Kuroiwa H. *et al.* 2002 より引用.

b: トウモロコシ卵細胞の電子顕微鏡観察像. トウモロコシ卵細胞においても巨大多層カップ状ミトコンドリア (矢尻) が観察された. Bar = 5 μ m. Mól R. *et al.* 2000 より引用. 一部改変としてそれぞれパネル番号と矢尻を挿入した.

3.2 材料及び方法

植物材料

イネ (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) は播種後 30 °C (day) / 25 °C (night) 条件の人工気象室内, 自然光で生育させたものを用いた. トウモロコシ (*Zea mays*, line A188) はインキュベーター (K30-7248, Koito Industries Ltd) 内で 22 °C, light (13h) / dark (11h), 光度 150 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で生育させたものを用いた.

イネ卵細胞およびトウモロコシ卵細胞の単離

イネ卵細胞は, 単離操作によって細胞に与える影響が少ないと考えられる Zhang ら, Uchiumi らの手法に従い (Zhang J. *et al.* 1999; Uchiumi T. *et al.* 2006), さらにこれに改良を加えた手法により単離, 収集した. 出穂後開花前の穎花から雌蕊を単離し, 柱頭を取り除いた後に 370 mM マンニトール溶液中に回収した. 実体顕微鏡下でカミソリを用いて雌蕊中央部 (Fig. 3-3b, c 破線部) を切断し, 倒立顕微鏡下 (TE2000-U, Nikon) でマニピュレーター (CellTram Oil, Eppendorf) を用いて切断面から現れる卵細胞 (Fig. 3-3f) を単離した.

ガバーガラス (Fisherfinest, Fisher Scientific) 上にシリコンラバー (Bathcaulk N, Cemedine) の枠を作り, その内部にミネラルオイル (SIGMA) を張り, ミネラルオイル中のカバーガラス上に 370 mM マンニトール溶液のドロップを複数作製した. これらのドロップを細胞回収用と洗浄用にわけ, 雌蕊から単離した卵細胞を回収用のドロップに収集した. 回収ドロップ中の卵細胞をマニピュレーターを用いて洗浄用ドロップに移すことで細胞の洗浄を行った. 新たな洗浄用ドロップに移す操作を三度繰り返すことで組織片などの不要物を取り除いた卵細胞を (Fig. 3-2), 以降の染色実験および real-time PCR に用いた. トウモロコシ卵細胞は Kranz らの手法に従って単離した (Kranz E. *et al.* 1991).

イネ根およびイネ緑葉由来プロトプラストの単離

イネ根由来プロトプラストおよびイネ緑葉由来プロトプラストは Kyozuka らの手法に従い (Kyozuka J. *et al.* 1987), さらにこれに改良を加えた手法により単離, 回収した. プロトプラストは出芽後 10 日目のイネの冠根 (基部側約 2 cm), 第三葉の葉身 (約 4.7 cm) から調整した. 切り出したイネの根と葉身に酵素液 [4 % Cellulase Onozuka RS, 1 % Macerozyme R-10 (共に Yakult), 0.06 % Pectolyase Y-23 (Kyowa Chemical), 2.5 mM MES and 0.4 M mannitol] を 6 ml 加え, それぞれシャーレ内でカミソリを用いてよく刻んだ. シャーレを密閉し 28 °C で

4.5 時間酵素処理を行った。処理後の酵素液を径 50 μm のナイロンメッシュ (SUBARU)でろ過し組織片などの不要物を除いた。ろ液を 110 g で 3 分間遠心しプロトプラストを沈殿させ、上清を捨て新たに 2.5 mM MES, 0.4 M マンニトールを加え軽く混ぜ、同様の遠心操作によって細胞を洗浄した。遠心による洗浄を三度繰り返したのち倒立顕微鏡下でマニピュレーターを用いてプロトプラストを回収し、上記 370 mM マンニトールドロップに収集した。

Technovit 樹脂包埋切片作製

出穂後開花前のイネ穎花から雌蕊を単離し、4 %パラホルムアルデヒドを用いて 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩固定した。固定後の雌蕊をエタノールの希釈系列 (50%, 70%, 90%, 95%, 99.5%, 100%, それぞれ 15 分を二回) で脱水し、メーカーのプロトコルに従い Technovit 7100 (Kulzer) に包埋した。ミクローム (PR-50, Yamato Kohki) を用いて 4 μm 厚の切片を作製し、切片をカバーガラス上に接着させた。

生細胞および Technovit 樹脂包埋切片の蛍光染色

細胞を 1 / 5000 SYBR Green I (Invitrogen) を含む 370 mM マンニトールドロップに移し 15 分静置したのち、1 / 5000 SYBR Green I および 500 nM MitoTracker Orange CMTMRos (Invitrogen) を含む 370 mM マンニトールドロップに移し 20 分静置することで、卵細胞およびプロトプラストのミトコンドリアと mt 核様体を染色した。染色後、細胞を新たな 370 mM マンニトールドロップに移す操作を三度繰り返し、細胞を洗浄したのち観察を行った。

Technovit 樹脂包埋切片に 2 μg / ml DAPI を滴下し、暗黒条件で 5 分静置したのち切片を蒸留水で二度洗浄し観察を行った。

顕微鏡観察

染色した卵細胞およびプロトプラストは蛍光顕微鏡 (TE2000-U, Nikon) で観察し、10 倍, 100 倍の対物レンズ (N.A. 0.30, 1.40) と共焦点レーザー顕微鏡システム (C1Si, Nikon) を使用して画像を撮影した。SYBR Green I は argon ion laser (488 nm) で、MitoTracker は green HeNe laser (543 nm) で励起した。Z 軸方向に 0.5 μm 毎に画像を取得し、重ね合わせの画像を得た。得られた画像は、主に出力に際して PHOTOSHOP 7.0 (Adobe Systems) を用いて画像調整した。

Technovit 樹脂包埋切片は 60 倍の対物レンズ (N.A. 1.42) と共焦点レーザー顕微鏡システム (DeltaVision, Applied Precision) を用いて観察し、冷却 CCD カメラ (CoolSnap HQ2, Roper Scientific) により画像を取得した。Z 軸方向に 0.5 μm 毎に画像を取得し、重ね合

わせの画像を得たのち、デコンボリューション技術 (softWoRx software, Applied Precision) を用いてノイズの除去を行った。

細胞破壊試験

Real-time PCR に用いる細胞およびそのミトコンドリアが PCR 前に想定通りバーストしているかを確かめるため、イネ卵細胞およびイネ緑葉由来プロトプラストを 500 nM MitoTracker Green FM (Invitrogen) で 20 分染色したのち、マニピュレーターを用いて蒸留水のドロップに移した。蒸留水ドロップに投入後、100 倍の対物レンズ (N.A. 1.40) と共焦点レーザー顕微鏡システム (C1Si, Nikon) を使用して経時的に画像を撮影した。

Real-time PCR に用いるスタンダードプラスミドの作製

本研究では *cob*, *coxII*, *nad6*, および *atp9* の 4 遺伝子について一細胞あたりに含まれるコピー数の定量を試みた。4 遺伝子断片をそれぞれ単独でスタンダードとして用いた場合、濃度測定時の誤差等で算出したコピー数に人為的な誤差が生じかねない。それらの人為的な誤差を極力排除するため、本研究ではスタンダードとして *cob* :: *coxII* :: *nad6* :: *atp9* 断片をひとつなぎとして含むプラスミドの構築を計画した (Fig. 3-11a)。スタンダードプラスミドは TaKaRa LA Taq (Takara) および pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いて構築した。作製したスタンダードプラスミド原液の濃度は PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Invitrogen) を用いて蛍光分光光度計 (F-2000, HITACHI) により測定した。測定した濃度とプラスミドの分子量からスタンダードプラスミド原液 1 μ l あたりに含まれるプラスミドのコピー数を算出した。上記スタンダードプラスミドの希釈系列を作製し、real-time PCR のスタンダードとして用いた。

スタンダードプラスミドの構築および real-time PCR に用いたプライマーは Table 2 に記載した。プライマーの配列はイネ品種日本晴の *cob*, *coxII*, *nad6*, および *atp9* の配列情報 (GenBank Accession Number DQ167400) をもとに決定した。PCR 産物は 105 - 145 bp の範囲でシングルバンドになることを電気泳動により確認した。

Real-time PCR に用いるサンプルの調整

卵細胞および緑葉由来プロトプラストに含まれる 4 遺伝子のコピー数を定量するにあたり、それぞれ独立した 3 セットの卵細胞、緑葉由来プロトプラストの溶解液を作製した。倒立顕微鏡下でカウントした洗浄後の卵細胞 100 個および緑葉由来プロトプラスト 500 個をそれぞれ PCR チューブに投入し、蒸留水で 20 μ l に希釈した (Fig. 3-9 における “Egg” および “Pp”)。バックグラウンドコントロールとして、細胞を回収したドロップから細胞を回収するのに要

した液量と同量のマンニトールを分取し、蒸留水で 20 μ l に希釈したものを用意した [(卵細胞 100 個を回収するのに 1.5 μ l を要した場合、同一のドロップから卵細胞を除いたマンニトール 1.5 μ l を蒸留水で 20 μ l に希釈し、これを卵細胞のバックグラウンドコントロールとした (Fig. 3-9 における “Egg_BG”)]. 作製した各細胞溶解液はよくボルテックスしたのち、細胞およびミトコンドリアを完全にバーストさせるため 98 $^{\circ}$ C で 10 分加熱した。

Real-time PCR による各遺伝子のコピー数定量

Real-time PCR は QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) を用いて 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) により検出した。反応は 20 μ l の系で行い、細胞溶解液 1 μ l (卵細胞溶解液 1 μ l には卵細胞 5 個分相当量の DNA が、緑葉由来プロトプラストの溶解液 1 μ l には緑葉由来プロトプラスト 25 個分相当量の DNA が含まれている) をテンプレートとして用い、独立した溶解液を用いて三反復の実験を行った。卵細胞および緑葉由来プロトプラスト細胞あたりに含まれる 4 遺伝子のコピー数は、[(卵細胞溶解液 1 μ l に含まれるコピー数) - (卵細胞バックグラウンド溶液 1 μ l に含まれるコピー数)] / 5, [(緑葉由来プロトプラスト溶解液 1 μ l に含まれるコピー数) - (緑葉由来プロトプラストバックグラウンド溶液 1 μ l に含まれるコピー数)] / 25 として算出した。

細胞溶解液に PCR の増幅効率に影響を与える物質が含まれているかを調査するため、イネゲノム配列上には存在しない λ DNA (NIPPON GENE) を用いた対照実験を行った。約 3 pg の λ DNA および λ DNA 増幅用プライマーセットを含むプレミックスを作製し、それを 19 μ l ずつ分注した。19 μ l のプレミックスに各溶解液、各バックグラウンド用液、ネガティブコントロールとして新鮮なマンニトールおよび蒸留水 1 μ l を加え、20 μ l の系で反応を行った (Fig. 3-10a)。 λ DNA の希釈系列をスタンダードとして用い、独立した溶解液を用いて三反復の実験を行った。

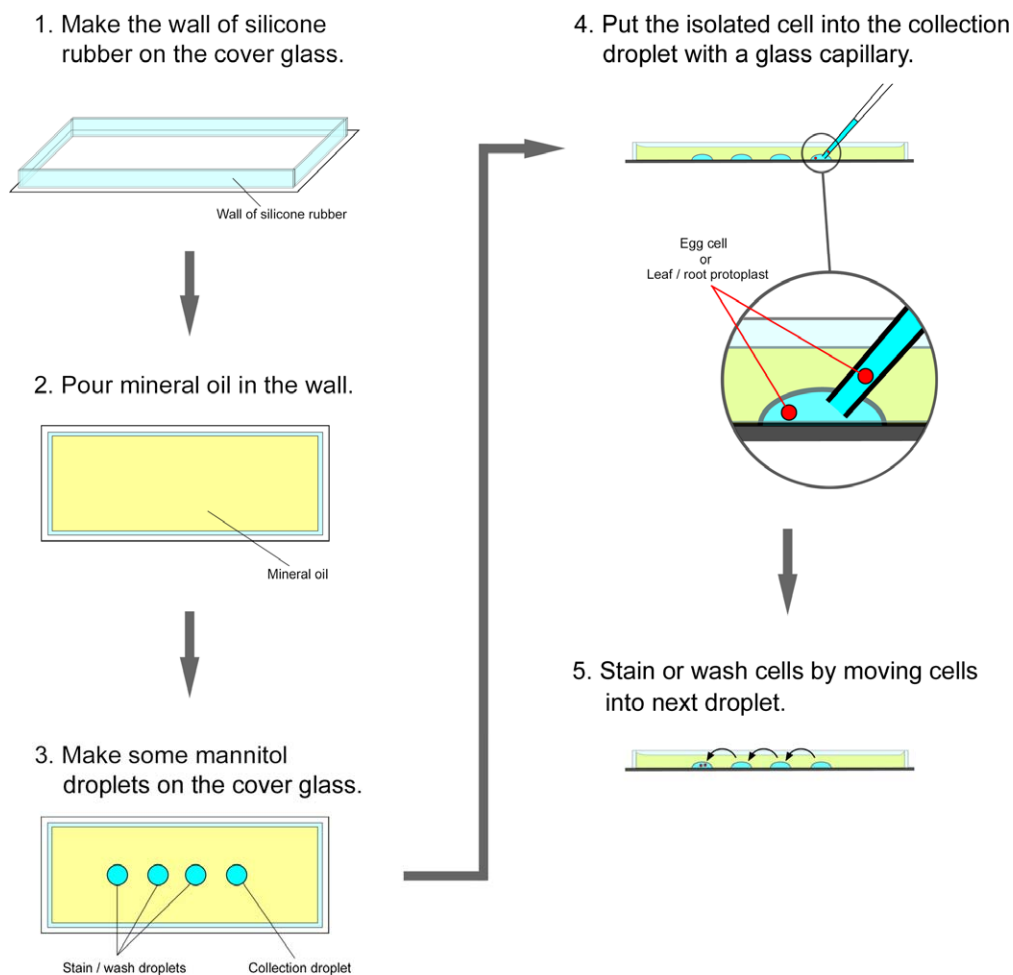


Fig. 3-2 単離した細胞の回収法および洗浄法

まずカバーガラス上にシリコンの壁を作製し (1), 内部をミネラルオイルで満たしたのち (2), ミネラルオイル中, カバーガラス上にマンニトール溶液のドロップを複数作製した (3). 単離した細胞をマニピュレーターで回収用マンニトールドロップに投入し (4), 細胞を新たなマンニトールドロップに移すことで細胞を洗浄した (5). この洗浄操作を三度繰り返し, 組織片などの不要物を取り除いた.

Table 2 Sequences of primers for standard plasmid constructing and real-time PCR analysis

Target		Primers for standard plasmid constructing	Primers for q-PCR analysis
<i>cob</i>	Forward	5'-TCCTAATGTTTTGGGGCATC-3'	5'-TCCTAATGTTTTGGGGCATC-3'
	Reverse	5'-TTTCTGGCCCAGAATGGCATGG-3'	5'-AGAATGGCATGGATCGGTAG-3'
<i>coxII</i>	Forward	5'-GCCATTCTGGGCCAGAAACGGA-3'	5'-GCCAGAAACGGAGAGTTGAG-3'
	Reverse	5'-GAAATGCCCTCGTATATCGCT-3'	5'-TCGTATATCGCTCCACCACA-3'
<i>nad6</i>	Forward	5'-ATATACGAGGGGCATTTCTGTCG-3'	5'-GGCATTTCTGTCGGAATACAT-3'
	Reverse	5'-AATACCGACCTCCGTCTGGTTT-3'	5'-TCCGTCTGGTTTTTGGTTTC-3'
<i>atp9</i>	Forward	5'-CAGACGGAGGTCGGTATTGGAA-3'	5'-TCGGTATTGGAAACGTCCTC-3'
	Reverse	5'-ATCAGAAAGGCCATCATTGG-3'	5'-ATCAGAAAGGCCATCATTGG-3'
λ DNA	Forward	-	5'-CATCAAACGCACGGGTAATG-3'
	Reverse	-	5'-CAGAACTGGCAGACGACATG-3'

3.3 結果

3.3.1 イネ卵細胞の単離

イネ雌性配偶体は典型的な 7 細胞型であり (Kuwada Y. 1909, 1910), 卵細胞と助細胞からなる卵装置は胚嚢下部, 珠孔付近に存在している (Fig. 3-3c および 3d). マンニトール溶液中で雌蕊の中央部 (Fig. 3-3b および 3c の破線部) を横切開することで胚嚢をマンニトール溶液中に解放し, 雌蕊の下部側, 切断部付近をガラス針などで優しく押すことで切断面に卵細胞を露出させた (Fig. 3-3f). 露出した卵細胞をマニピュレーターを用いて回収し, カバーガラス上に作製したマンニトールドロップ (Fig. 3-2) に収集した (Fig. 3-3g).

単離したイネ卵細胞は直径がおよそ 40 μm であり, これまでに単離の報告があったトウモロコシ (60–77 μm ; Kranz E. *et al.* 1991), コムギ (50–70 μm ; Kovacs M. *et al.* 1994), ホソムギ (50–60 μm ; Van der Maas H. *et al.* 1993) の卵細胞と比較して小型であることがわかった. 単離したイネ卵細胞の細胞質中央部には, トウモロコシ, コムギ, ホソムギにおいて卵細胞の典型的な特徴とされる核周辺部の粒状構造 (Faure J. E. *et al.* 1992; You R. and Jensen W. 1985; van der Maas H. *et al.* 1993) が見出された (Fig. 3-3g および 3h).

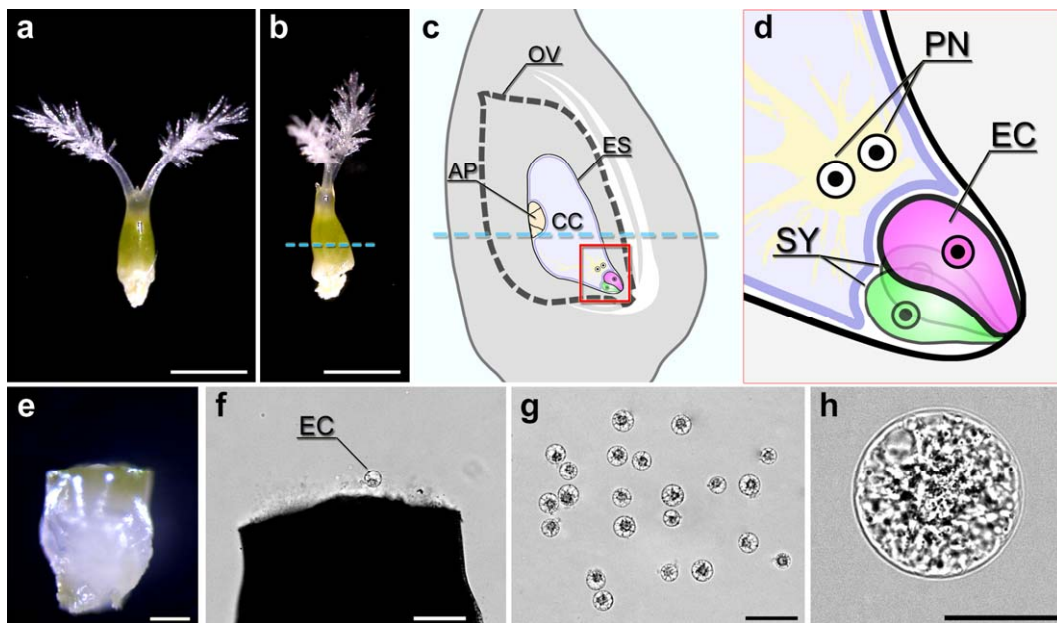


Fig. 3-3 イネ卵細胞の単離法

a: 出穂後、開花前のイネ穎花から単離したイネ雌蕊. **b**: 取り出した雌蕊を側面から観察した図.
c: イネ雌蕊の内部構造. **d**: **c** の赤枠内拡大図. 卵細胞は珠孔付近、上側に位置する. **e**: 卵細胞単離のため雌蕊の中ほど (**b** および **c** の破線部) をマンニトール溶液中で切断した. **f**: 切断面から現れた卵細胞. **g**: 回収用マンニトールドロップに収集した卵細胞. **h**: 卵細胞の拡大図. AP 反足細胞; OV 胚珠; ES 胚嚢; CC 中央細胞; PN 極核; EC 卵細胞; SY 助細胞. Bars in **a** and **b** = 1 mm, in **e**, **f** and **g** = 100 μ m, in **h** = 30 μ m.

3.3.2 イネ卵細胞におけるミトコンドリアおよび mt 核様体の形態

イネ卵細胞および対照としてイネ根由来プロトプラストのミトコンドリアと mt 核様体を、それぞれ MitoTracker Orange と SYBR Green I を用いて可視化し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、根由来プロトプラストのミトコンドリアが細胞全体に広く拡散して存在しているのに対し、イネ卵細胞においてミトコンドリアは核の周囲に密集して存在することが明らかになった (Fig. 3-4 および 3-5)。また、イネ卵細胞ミトコンドリアを高倍率で観察したところ、イネ卵細胞ミトコンドリアおよび mt 核様体の形態は、イネ根由来プロトプラストと同様に通常の小型粒状であることが明らかになった (Fig. 3-4b)。

核周辺に密集しているイネ卵細胞ミトコンドリアの形態をより明らかにするため、Z 軸方向に厚さ約 8 μm の、核を含む領域を 0.5 μm 毎に撮影しそれぞれの断面におけるミトコンドリアの形態を詳細に観察した (Fig. 3-5)。その結果、いずれの断面においてもイネ卵細胞にはゼラニウムやトウモロコシにおいて報告のあった巨大ミトコンドリアは存在しないことがわかった。

直径約 40 μm もの卵細胞全体を共焦点レーザー顕微鏡でスキャンするのは技術的に不可能であるが、本研究では 100 個以上の卵細胞を、ガラス針で回転させながら様々な断面で観察し、そのいずれの断面にも巨大ミトコンドリアが存在しないことを確かめた。

以上の結果から、ゼラニウムやトウモロコシとは異なり、イネ卵細胞ミトコンドリアは小型粒状の形態であることが示唆された。

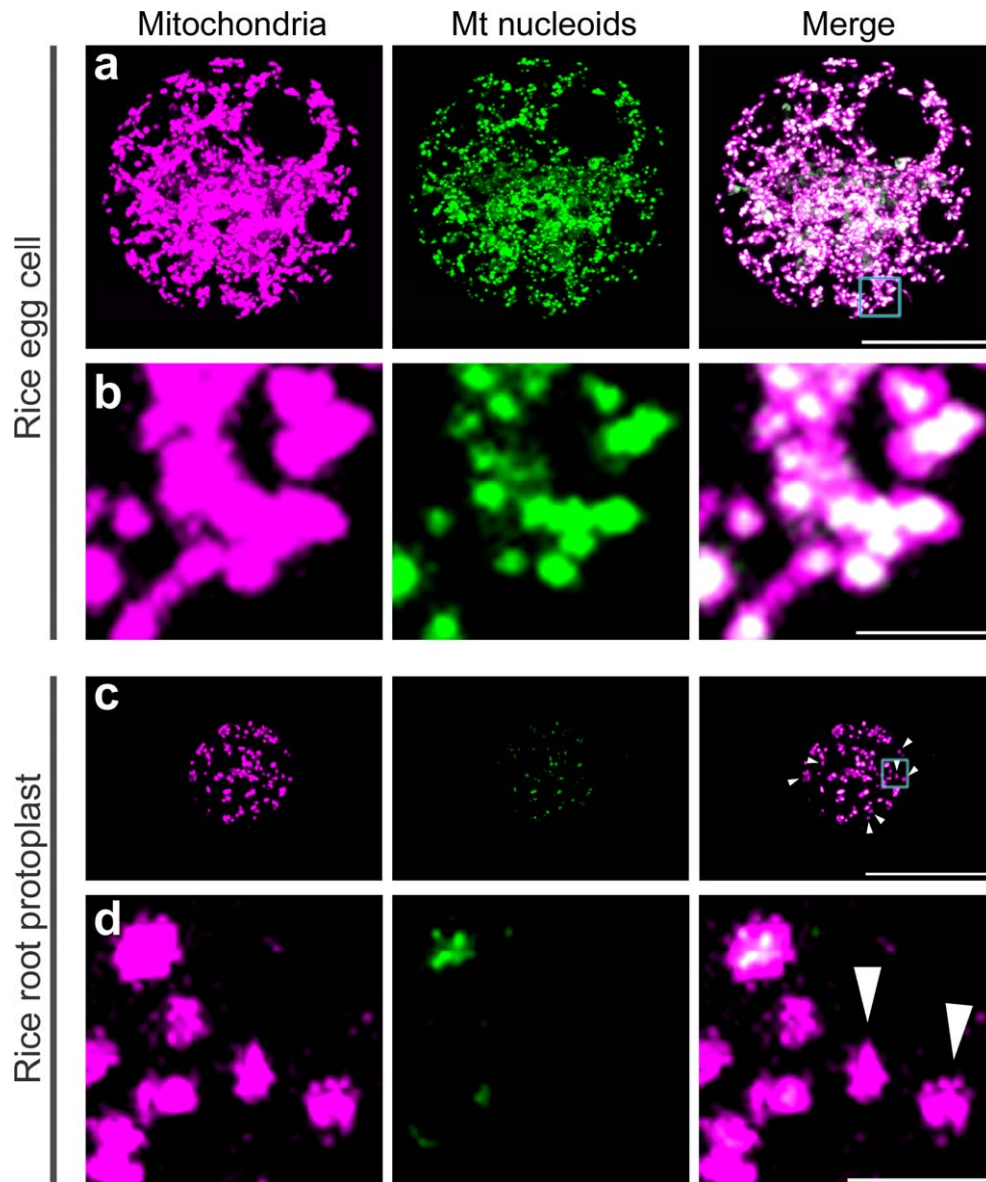


Fig. 3-4 イネ卵細胞およびイネ根由来プロトプラストのミトコンドリアおよび mt 核様体形態

イネ卵細胞 (a, b) およびイネ根由来プロトプラスト (c, d) のミトコンドリアおよび mt 核様体を、それぞれ MitoTrackerOrange (マゼンタに疑似カラー表示) および SYBR Green I (グリーンに疑似カラー表示) で可視化した。b, c はそれぞれ a, d の枠内拡大図。矢尻は明確な mt 核様体が観察されないミトコンドリアを示す。Bars in **a** and **c** = 20 μm , in **b** and **d** = 2 μm .

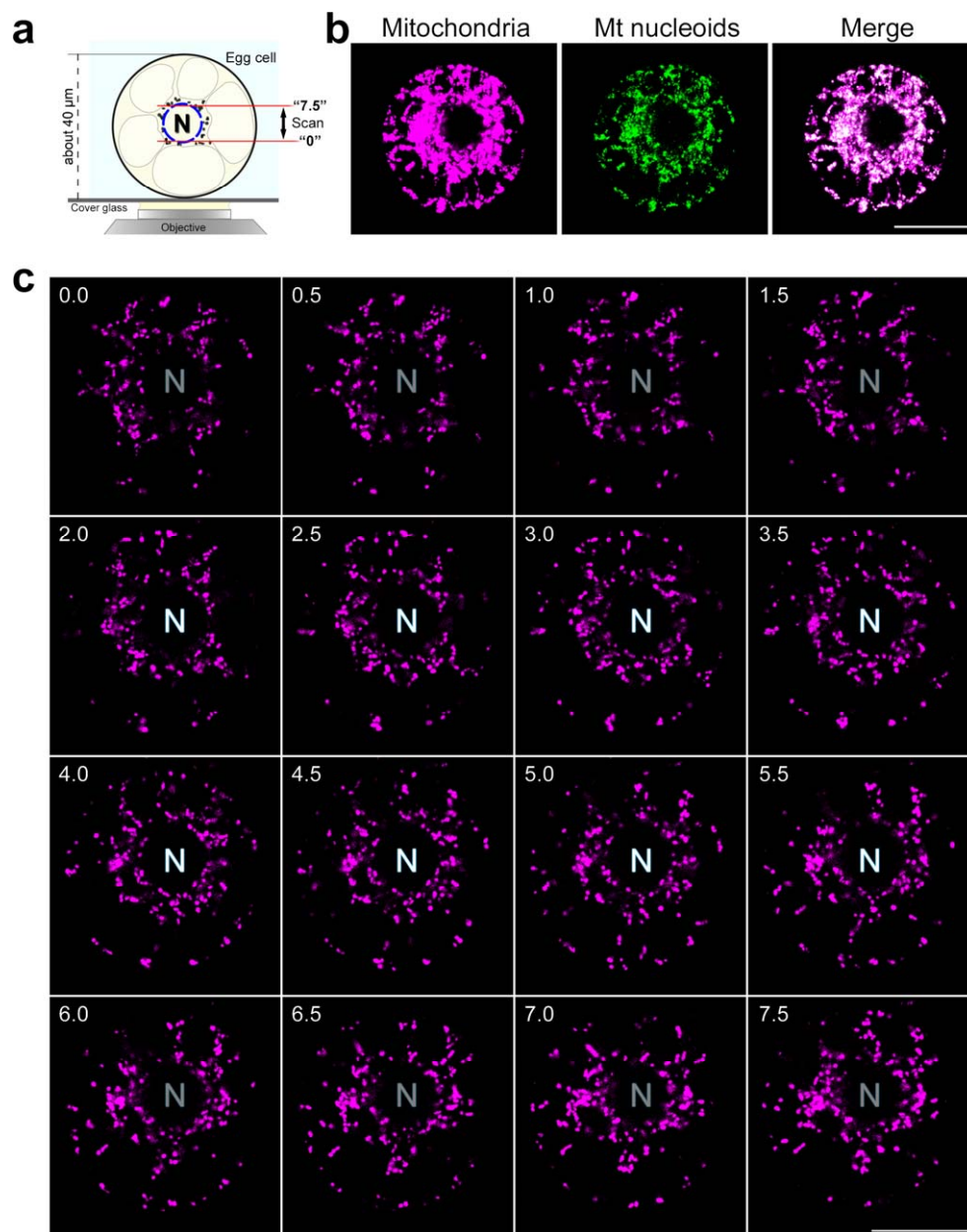


Fig. 3-5 イネ卵細胞核周辺におけるミトコンドリアおよび mt 核様体形態

a : 撮影範囲の模式図. 直径約 40 μm の卵細胞の, 核周辺約 8 μm 厚の領域を Z 軸に沿って 0.5 μm 毎に撮影した. **b** : 取得した画像の重ね合わせ. **c** : 各焦点面における画像. ここではミトコンドリアのシグナルのみ表示した. 各画像左上の数値は Z 軸方向の高さを表す. 図中の N は卵細胞核を示す. Bars in **a** and **c** = 20 μm .

3.3.3 イネ卵細胞ミトコンドリアの形態に関する検証

イネ卵細胞ミトコンドリアが小型粒状であるという結果は真実であろうか。本研究における単離したイネ卵細胞のミトコンドリアを染色して観察する手法は、卵細胞の単離による物理的な衝撃や染色剤による化学的な変化が避けられず、これらがミトコンドリア形態に影響を与え、本来の卵細胞ミトコンドリアの形態を保持していないという可能性が否定できない。そこで本研究では二通りの検証実験を計画し、イネ卵細胞ミトコンドリアが小型粒状であるかを検証した。

まず第一の検証として、これまでに電子顕微鏡観察により巨大ミトコンドリアが存在することが明らかにされているトウモロコシ卵細胞 (Fig. 3-1b) を生きた状態で単離し、イネ卵細胞と同様にミトコンドリアと mt 核様体を染色した場合、どのようなミトコンドリアが観察されるかを調査した。その結果、トウモロコシ卵細胞ミトコンドリアはイネと同様に核周辺に密集しており (Fig. 3-6a), その形態を詳細に観察したところ、巨大な多層カップ構造のミトコンドリアが多数見出された (Fig. 3-6c および 6d)。この結果は生細胞染色の手法でも巨大ミトコンドリアの形態は保たれ、この手法がミトコンドリア形態に重大な影響を与えないことを示している。

第二の検証として、ゼラニウム卵細胞において巨大 mt 核様体が観察された固定樹脂包埋切片の DAPI 染色法 (Fig. 3-1a) と同様の手法で固定したイネ卵細胞において、どのような形態の mt 核様体が観察されるかを調査した。イネ雌蕊を固定後 Technovit 7100 に包埋し、ミクロームで切片を作製したのち DAPI で核様体を染色して観察した。Fig. 3-7b は切片中のイネ胚嚢下部、珠孔付近の様子を、Fig. 3-7a は 7b の模式図を示している (Fig. 3-3d を参照)。Mt 核様体および色素体核様体 (pt 核様体) は卵細胞核の周辺に密集して存在し、個々の核様体は小型粒状であり、ゼラニウムにおいて観察されたような巨大 mt 核様体は存在しないことがわかった (Fig. 3-7c)。

以上二点の検証実験の結果および結果 3.3.2 から、イネ卵細胞ミトコンドリア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ことが強く示唆された。

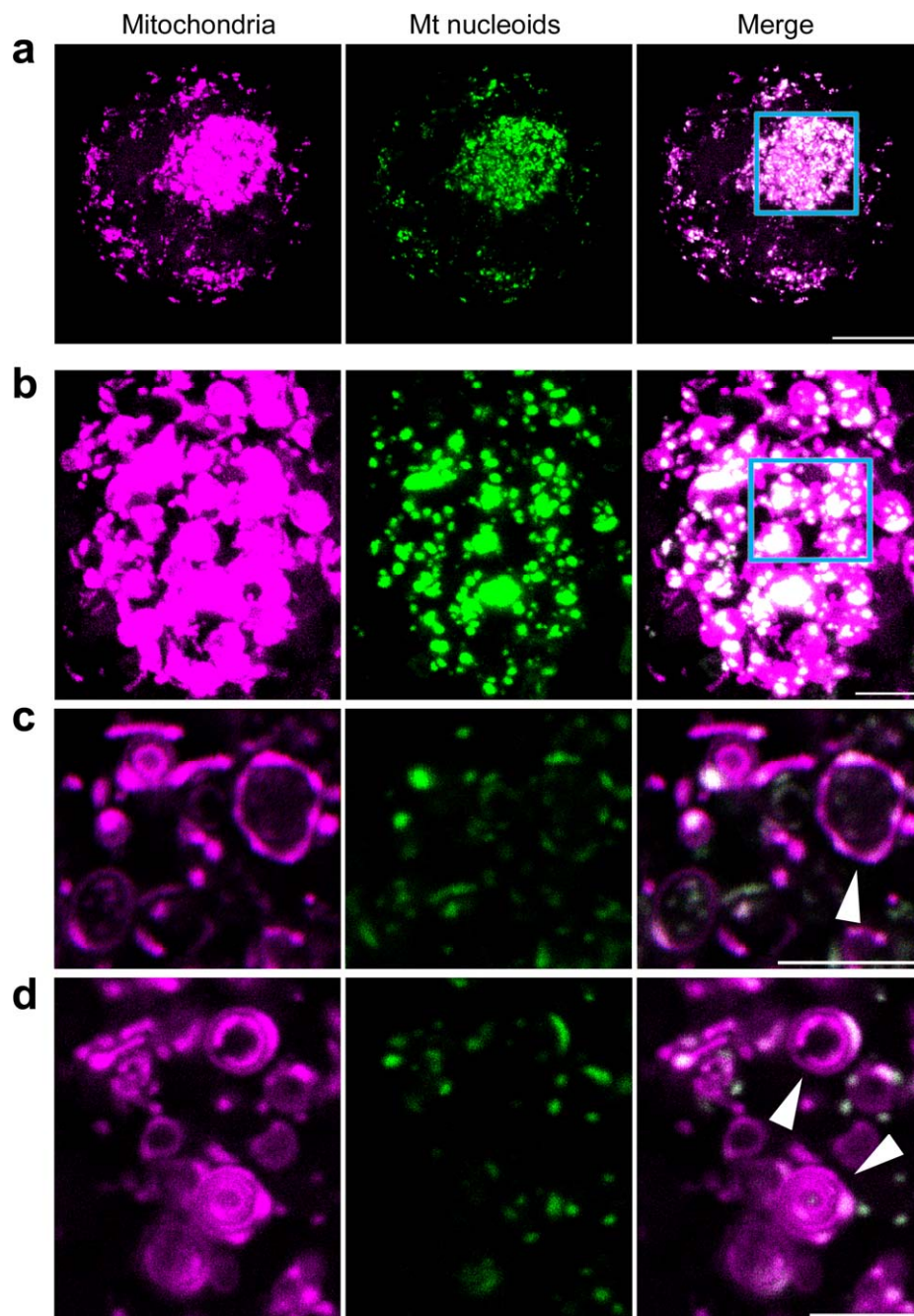


Fig. 3-6 トウモロコシ卵細胞におけるミトコンドリアおよび mt 核様体形態

a : イネ卵細胞と同様の手法でミトコンドリアと mt 核様体を可視化したトウモロコシ卵細胞. 核周辺にミトコンドリアが密集している領域が存在している (枠内). **b** : **a** 枠内の拡大図. **c**, **d** : **b** 枠内拡大図の単一焦点画像. 矢尻は巨大な環状および複雑な多層カップ状ミトコンドリアを示す. Bars in **a** = 20 μ m, in **b**, **c** and **d** = 5 μ m.

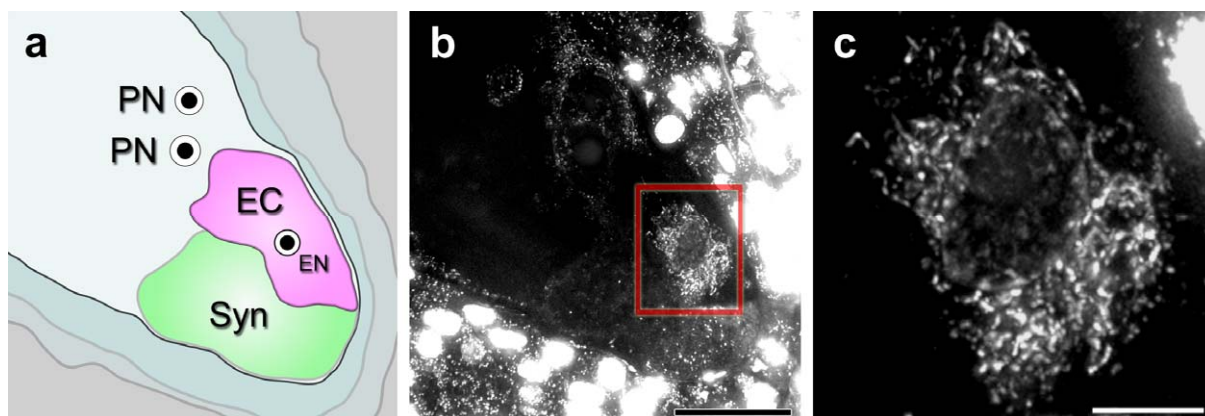


Fig. 3-7 イネ雌蕊 Technovit 樹脂包埋切片の DAPI 染色像

a: **b** の模式図を示す. **b**: イネ雌蕊 Technovit 樹脂包埋切片の珠孔付近における DAPI 染色像. 赤枠は卵細胞核付近を示す. **c**: **b** の赤枠内拡大図. イネ卵細胞においては小型粒状の核様体のみが観察された. Bars in **b** = 20 μm , in **c** = 5 μm .

3.3.3 イネ卵細胞一個あたりに含まれるミトコンドリア遺伝子のコピー数

Fig. 3-4 の染色結果から、イネ卵細胞はイネ根由来プロトプラストと比較して細胞のサイズが大きく、ミトコンドリアの数も多いことは明らかであり、mt 核様体のシグナル強度も卵細胞で非常に強いことがわかった (Fig. 3-4a および 4c)。また、根由来プロトプラストには明確な mt 核様体をもたないミトコンドリアが多数観察されるのに対し (Fig. 3-4c および 4d の矢尻)、卵細胞ではほとんど全てのミトコンドリアが非常に強い mt 核様体シグナルをもつことが見出された。これらの結果は、イネ卵細胞はイネ根由来プロトプラストと比較して非常に大量の mtDNA を保持していることを示唆している。

ではイネ卵細胞には実際どの程度の mtDNA 量が保持されているのだろうか。卵細胞あたりの mtDNA 量を詳細に解析するため、本研究ではミトコンドリアゲノム上にコードされる、*cob*, *coxII*, *nad6*, および *atp9* の 4 遺伝子 (いずれの遺伝子もイネミトコンドリアゲノム中に 1 コピーのみ存在; Notsu Y. *et al.* 2002) について、real-time PCR を用いて卵細胞あたりに含まれるコピー数の定量を試みた。対照として大量調整が可能であるイネ緑葉由来プロトプラストを用いた。

Real-time PCR を用いるにあたり必要となる対照実験

本研究では real-time PCR のテンプレートとして、卵細胞 100 個、緑葉由来プロトプラスト 500 個を蒸留水に投入した細胞溶解液を用いた (Fig. 3-9)。各細胞の溶解液が PCR のテンプレートとして相応しいか、すなわち蒸留水に投入した細胞およびそのミトコンドリアが想定通りバーストしているかを確かめるため、まず顕微鏡下で細胞破壊試験を行った。膜電位非依存性である MitoTracker Green FM でミトコンドリアを可視化したイネ卵細胞および緑葉由来プロトプラストを蒸留水のドロップに投入し、投入直後から 3 分後まで経時的に観察を行った。その結果、卵細胞、緑葉由来プロトプラストともに蒸留水に投入後 30 秒以内に細胞膜がバーストし (Fig. 3-8b および 8e)、次いでミトコンドリアが膨張している様子が観察され、投入後 3 分でミトコンドリアシグナルがほぼ確認できなくなった (Fig. 3-8c および 8f)。この結果は蒸留水に投入後 3 分以内にミトコンドリアがバーストし MitoTracker が拡散したことを示唆している。以上の結果と、各細胞溶解液はボルテックスおよび熱処理を行っていることから (Fig. 3-9)、実際の各細胞溶解液中では確実にミトコンドリアまでバーストしているものと考えられ、以上より本研究で用意した細胞溶解液は PCR のテンプレートとしての使用に耐えうると判断した。

次に、各細胞溶解液に PCR の増幅効率に影響を与える物質が含まれているか否かを調査するため λ DNA を用いた検証実験を行った。等量の λ DNA を含むプレミックス (Fig. 3-10a) に各細胞の溶解液を加えたのちに λ DNA コピー数の定量を行い、ネガティブコントロールとして蒸留水のみを加えたものと比較してコピー数の定量値が変化するかを検査した。その結果、いずれの細胞溶解液および細胞バックグラウンド溶液を加えたサンプルにおいても、蒸留水のみを加えたサンプルにおける λ DNA コピー数の定量値との間には有意な差がないことがわかった (Fig. 3-10b)。以上の結果から、本研究で用いた各細胞溶解液には PCR の阻害剤、促進剤のいずれも含まれておらず、各細胞溶解液から算出されたコピー数を直接比較しても問題がないことが明らかになった。

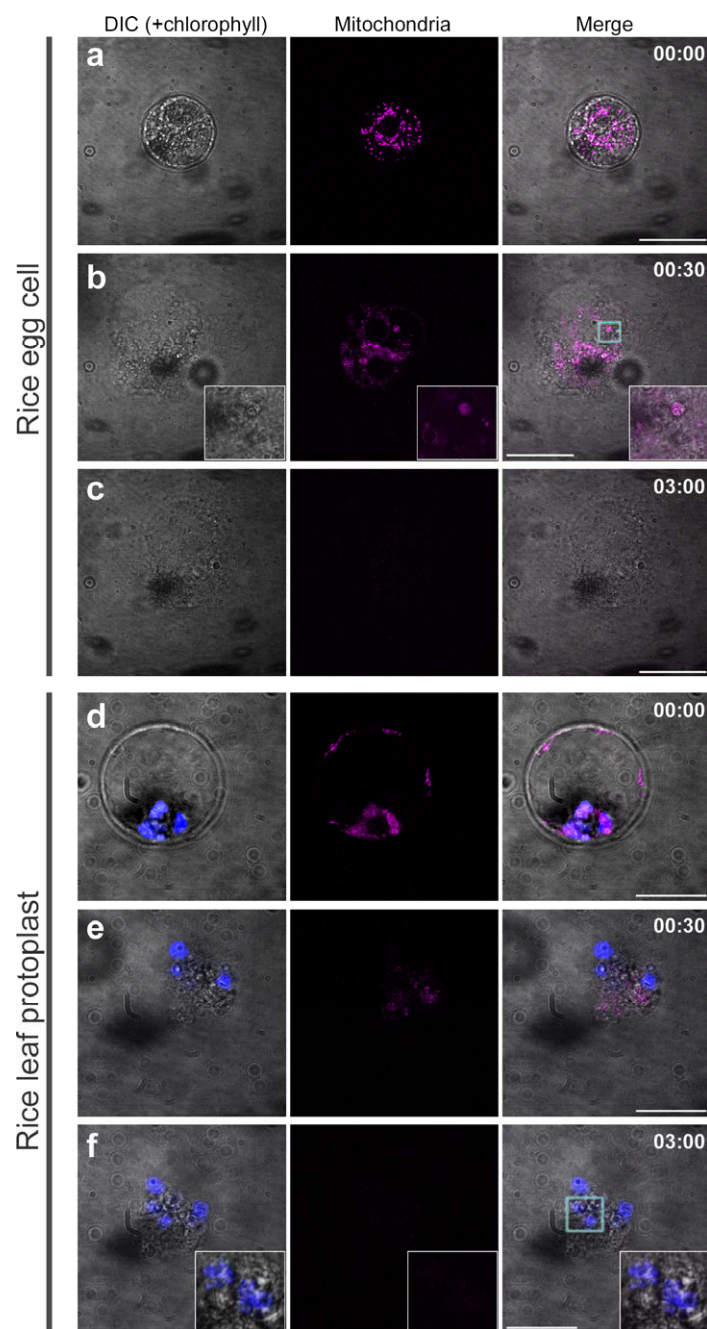


Fig. 3-8 イネ卵細胞およびイネ緑葉由来プロトプラストの細胞破壊試験

マンニトールドロップから蒸留水ドロップへ移した、ミトコンドリア染色後の卵細胞 (**a-c**) および緑葉由来プロトプラスト (**d-f**) を経時的に撮影した。ミトコンドリアをマゼンタで、葉緑体自家蛍光をブルーで疑似カラー表示した。右上の数字は蒸留水に投入後の時間を表す (min:sec). **b** および **f** における挿入図はそれぞれ重ね合わせにおける枠内拡大図を表す。イネ卵細胞およびイネ緑葉由来プロトプラストの細胞膜は共に 30 秒以内にバーストし、同様にミトコンドリアのシグナルも共に 3 分以内にほぼ消失した。 **b** における挿入図では膨張したミトコンドリアが観察された。 Bars in **a-c** = 40 μm and in **d-f** = 20 μm .

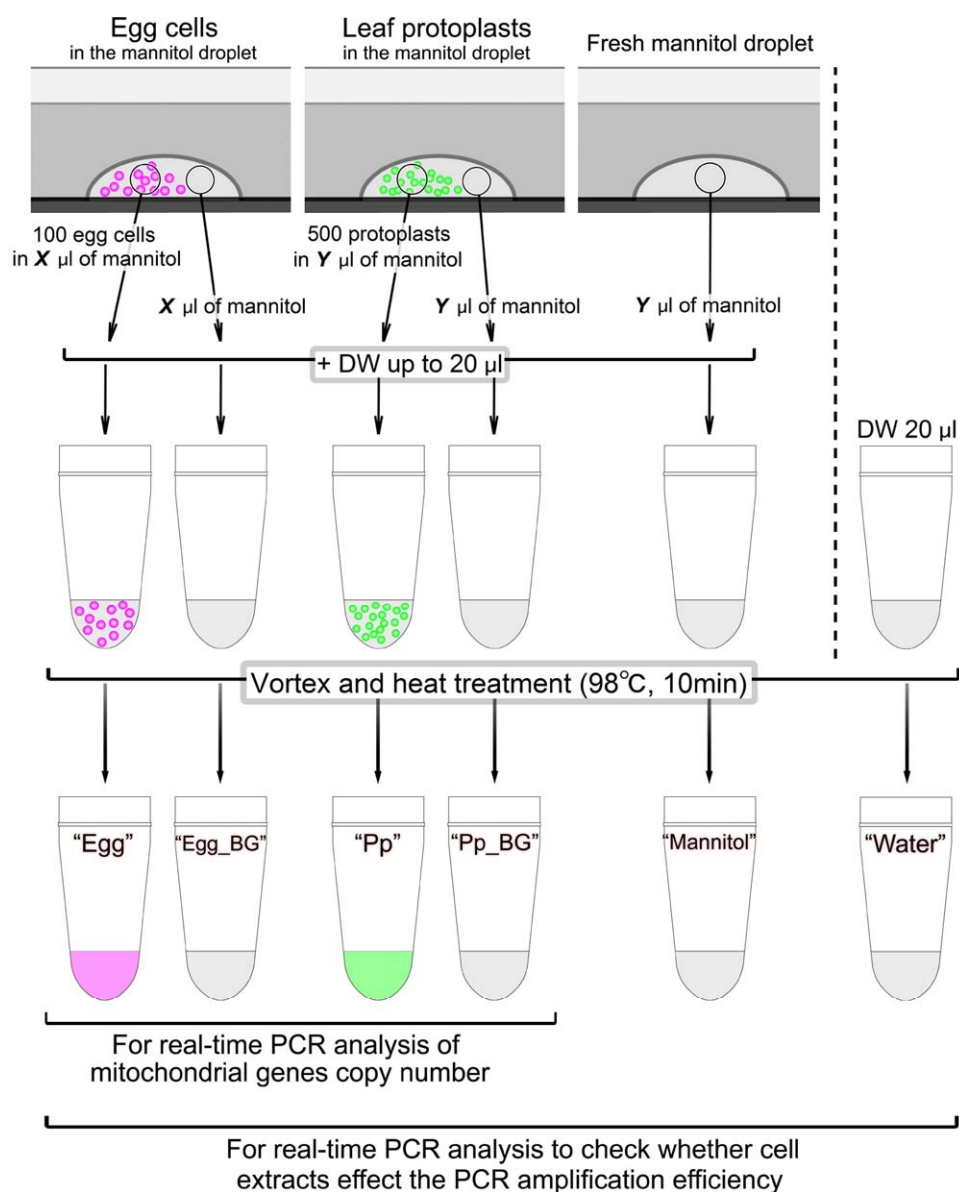


Fig. 3-9 Real-time PCR およびコントロール実験に用いるサンプルの調整法

倒立顕微鏡下でカウントした洗浄後のイネ卵細胞 100 個およびイネ緑葉由来プロトプラスト 500 個をそれぞれ PCR チューブに投入し、蒸留水で $20 \mu\text{l}$ に希釈した。バックグラウンドコントロールとして、細胞を回収したドロップから細胞を回収するのに要した液量と同量のマンニトールを分取し、蒸留水で $20 \mu\text{l}$ に希釈したものを用意した。サンプルをよくボルテックスしたのち 98°C 10 分の熱処理を行った。コントロール実験用に未使用のマンニトールドロップを蒸留水で希釈したものおよび蒸留水のみというサンプルを用意した。それぞれ独立の 3 反復分のサンプルを用意した。

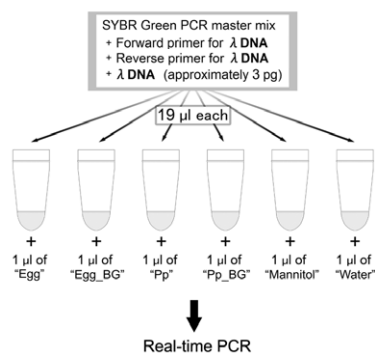
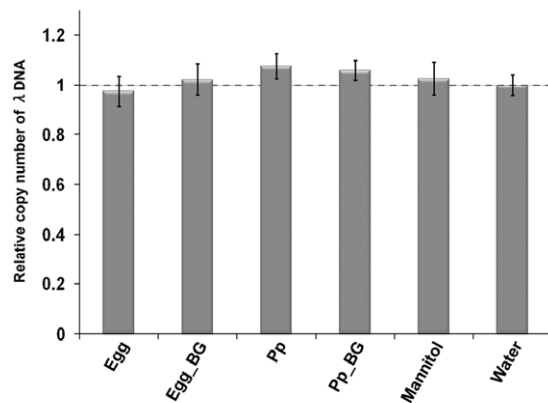
a**b**

Fig. 3-10 各細胞溶解液が PCR 増幅効率に与える影響の検証

細胞溶解液に PCR 増幅効率に影響を与える物質が含まれているかを調査するため、 λ DNA を用いた対照実験を行った。a：実験手順の模式図。等量の λ DNA を含むプレミックスに各細胞の溶解液を加えたのち、 λ DNA コピー数の定量を行い、ネガティブコントロールとして蒸留水のみを加えたものと比較してコピー数の定量値が変化するかを検証した。b： λ DNA コピー数の定量結果。蒸留水を加えたサンプルの定量値を 1 として標準化した。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

卵細胞あたりに含まれるミトコンドリア遺伝子のコピー数

卵細胞 5 個分, 緑葉由来プロトプラスト 25 個分相当量の DNA を含むと考えられる細胞溶解液をテンプレートとして, *cob*, *coxII*, *nad6*, および *atp9* の 4 遺伝子について real-time PCR を用いてコピー数を定量した. その定量値から卵細胞, 緑葉由来プロトプラスト一細胞あたりに含まれる各遺伝子のコピー数を算出した. その結果, 細胞あたりのコピー数は 4 遺伝子全てにおいて緑葉由来プロトプラストと比較して卵細胞で著しく多いことが明らかになった (Fig. 3-11b). 細胞あたりに含まれる *cob*, *coxII*, *nad6*, および *atp9* のコピー数の平均値は, 卵細胞において 2209, 1848, 1754, および 1523, 緑葉由来プロトプラストにおいて 122, 102, 140, および 132 であり, 細胞あたりの *cob*, *coxII*, *nad6*, および *atp9* のコピー数比 (卵細胞 / 緑葉由来プロトプラスト) は 18.1, 18.1, 12.6, および 11.5 であった (Table 3).

次に, この卵細胞においてミトコンドリア遺伝子のコピー数が多いという現象が細胞のサイズのみによるものなのかを確かめるため, 定量に用いた卵細胞および緑葉由来プロトプラストの直径を測定し, その値から細胞の体積を算出した. 卵細胞および緑葉由来プロトプラストの直径の平均値はそれぞれ約 39 μm および 23 μm であり, そこから算出した細胞体積はそれぞれ 30780 μm^3 および 5957 μm^3 であった. 細胞の体積比 (卵細胞 / 緑葉由来プロトプラスト) は 5.2 であり, この値は 4 遺伝子のコピー数比よりも小さいことがわかった. これらの結果から, イネ卵細胞において細胞あたりの各遺伝子のコピー数が多いのは単に細胞が大きいからではなく, イネ卵細胞は緑葉由来プロトプラストと比較して体積当たりの各遺伝子コピー数も多いことによるということが明らかになった.

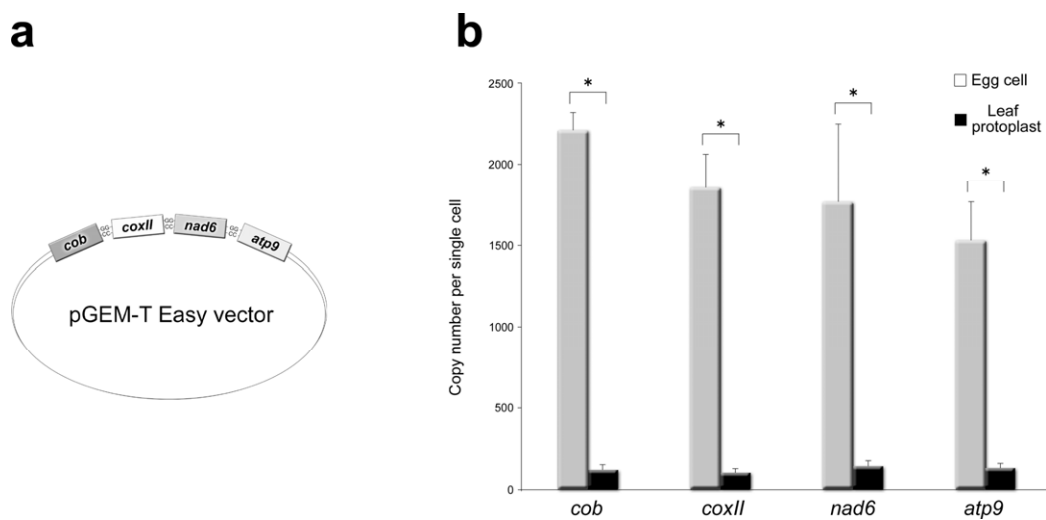


Fig. 3-11 卵細胞および緑葉由来プロトプラストあたりに含まれる 4 遺伝子のコピー数

a : Real-time PCR に用いたスタンダードプラスミドの構造. b : Real-time PCR を用いて算出された卵細胞および緑葉由来プロトプラスト細胞あたりに含まれる *cob*, *coxII*, *nad6*, および *atp9* のコピー数. 4 遺伝子全てにおいてそのコピー数は卵細胞において有意に多いことが明らかになった (* $P < 0.05$, エラーバーは標準誤差を示す; $n = 3$).

Table 3 Copy number of four mitochondrial genes per single cell and cell size

	Copy number per single cell ^a				Cell size	
	<i>cob</i>	<i>coxII</i>	<i>nad6</i>	<i>atp9</i>	Diameter (μm)	Volume (μm ³)
Egg cell	2208 ± 110	1848 ± 215	1753 ± 496	1523 ± 246	38.88 ± 0.17 ^b	30780
Leaf protoplast	121 ± 33	102 ± 27	140 ± 39	132 ± 29	22.49 ± 0.05 ^c	5957
Ratio (Egg / Protoplast)	18.13	18.09	12.55	11.51	1.73	5.17

^a The mean copy number ± standard error is given (n = 3). ^{b, c} The measured diameter of egg cells and leaf protoplasts. The mean diameter ± standard error is given (n = 368, 2037).

3.4 考察

3.4.1 イネ卵細胞ミトコンドリアの保持する mtDNA 量

本研究の real-time PCR 解析によって、ミトコンドリアゲノム上にコードされる 4 遺伝子全てについて、イネ卵細胞はイネ緑葉プロトプラストと比較して 10 倍以上のコピー数を保持していることが見出された。この結果と、今回解析を行った 4 遺伝子はミトコンドリアゲノム上にほぼ均一に分散している (Notsu Y. *et al.* 2002) ことから、イネ卵細胞ではミトコンドリアゲノムの特定の領域ではなく、ゲノム全域におよぶ増幅が起きていることが明らかになった。

ミトコンドリアおよび mt 核様体の二重染色実験から、イネ卵細胞ではほとんどのミトコンドリアが非常に強い mt 核様体シグナルを持つのにに対し、イネ根プロトプラストでは明確な mt 核様体を持たないミトコンドリアが多数観察された (Fig. 3-4)。イネ根プロトプラストのように mtDNA が不足していると考えられる細胞では、ミトコンドリア融合による相補作用によって mtDNA 不足によって引き起こされる不具合を乗り越えていると考えられる (Lonsdale D. M. *et al.* 1988; Arimura S. *et al.* 2004)。前章の考察でも述べたように、正確な DNA の複製・維持というものはかなりのエネルギーや材料を要する作業であると考えられる。融合、分裂にも当然コストはかかるものの、大量の DNA を維持し続けるコストよりは少ないと仮定すると、少量の mtDNA を維持し融合、分裂による相補作用で生き抜く戦略は有利である。

これまでの観察から、植物細胞はごく少量の mtDNA で生存可能であるように思われるが、ではイネ卵細胞は何故ここまで大量の mtDNA を保持しているのだろうか。これまでに分裂組織ではオルガネラ DNA 量が多いという報告が複数あり (Fujie M. *et al.* 1993, 1994; Suzuki T. *et al.* 1995)、これは、分裂組織ではオルガネラ DNA を盛んに複製して、新たに生じる娘細胞に不十分な分配が起こることを防いでいるからではないかと考えられる。卵細胞は次世代の植物体を構成する全ての細胞のもととなるいわば始原分裂細胞とも言える細胞であり、娘細胞へのオルガネラ DNA の分配が不十分であると発生のごく初期に致命的な不具合が起きかねない。このことを考えると、卵細胞が他の分裂組織と同様に、またはそれ以上にオルガネラ DNA を盛んに複製し、娘細胞への分配に備えることはごく自然な結果だと考えられる。

3.4.2 イネ卵細胞ミトコンドリアの形態

これまでに、ゼラニウムおよびトウモロコシ卵細胞の観察により、卵細胞ミトコンドリアが卵細胞の成熟に従ってその形態を変化させることが報告されている (Kuroiwa H. *et al.* 1996; Mól R. *et al.* 2000). この点を考慮すると、イネ卵細胞では過去に電子顕微鏡によって小型粒状のミトコンドリアが観察されものの (Dong J. and Yang H. Y. 1989), これらの小型粒状のミトコンドリアが卵細胞の成熟過程を通して常に小型粒状であるのかは不明であった. 本研究で単離した卵細胞は、出穂後から開花直前までの範囲の雌蕊から調整しているため、その範囲における様々な成熟段階の卵細胞が含まれていると考えられる. このことは単離した卵細胞のサイズが一様ではないことからもうかがえる (Fig. 3-3g). 本研究ではこのような卵細胞を100個以上観察し、その全てが小型粒状のミトコンドリアのみを保持していることを確認した. この結果は、少なくとも本研究で用いた卵細胞の成熟範囲においては、イネ卵細胞ミトコンドリアは恒常的に小型粒状の形態を保つことを示唆している.

3.4.3 種間における卵細胞ミトコンドリアの形態の差異およびその意義

ゼラニウムにおいて、受精前までは多層カップ構造をもつ卵細胞巨大ミトコンドリアは、受精直後から次第に細分化が起こり、やがて通常の小型粒状の形態に変化することが報告されている (Kuroiwa H. *et al.* 2002). このようなミトコンドリア形態の変化は、偏りのないミトコンドリア分配を求められる細胞分裂時には、小型粒状の形態がより適しているために起こると考えられる.

植物ミトコンドリアは融合、分裂のバランスを保つことで通常の小型粒状の形態を維持しているが、分裂因子が欠損した変異体ではそのバランスが崩れ、細胞内のミトコンドリア数が減少し、単純に長大化したネットワーク構造をもつミトコンドリアが出現する (Arimura S. and Tsutsumi N. 2002; Logan D. C. *et al.* 2004; Arimura S. *et al.* 2008). これらの観点から考えると、多層カップ構造という複雑な形態の巨大ミトコンドリアは、ミトコンドリア融合の活性化のみでは形成し得ないことは明らかであり、このことから、巨大ミトコンドリアの形成にはミトコンドリア融合の活性化に加え、何らかの他の制御因子が必須であることが強く示唆される.

受精後に細分化する必要があるにもかかわらず、ゼラニウム卵細胞は何故巨大ミトコンドリアを形成するのか. 卵細胞巨大ミトコンドリアにはどのような意義があるのだろうか. シロイヌナズナ茎頂分裂組織やゼラニウム卵細胞に現れる巨大ミトコンドリアの存在意義として、巨

大ミトコンドリアは大量の ATP を核へ供給するのに適している可能性 (Seguí-Simarro J. M. *et al.* 2008), および巨大ミトコンドリア内の巨大 mt 核様体では mtDNA 間の相同組み換えがより効率よく行える可能性 (Kuroiwa H. and Kuroiwa T. 1992) が考察されている。しかしながら、仮にこれらの利点が真実であったとしても、高等植物中に卵細胞巨大ミトコンドリアをもつ種およびもたない種が広く存在しており、さらには同一科内のトウモロコシとイネでさえ卵細胞ミトコンドリアの形態が異なるという事実は、巨大ミトコンドリアを形成し再び細分化するという複雑な制御に要するコストと、巨大ミトコンドリアが存在することで得られるメリットとがほぼ釣り合っていることを意味しているように思われる。

イネは、巨大ミトコンドリアによる利点を捨てるかわりに巨大ミトコンドリアを形成して再び細分化するという複雑な制御を回避し、細胞分裂時の分配に適した個々の小型ミトコンドリア内で mtDNA を盛んに増幅するという道を選んだのかもしれない。

第四章. 総合考察

4.1 高等植物ミトコンドリア間の相補作用

本研究からも、卵細胞や根端等の分裂組織ではミトコンドリアの保持する mtDNA 量が多く、分化済みの組織では保持する mtDNA 量が極端に少ないという現象が観察された。この分化済みの組織でのわずかな mtDNA 量は、ミトコンドリアの融合、分裂時における相補作用なしでは生存が不可能なレベルであると考えられる。しかしながら、本研究で観察した BY-2 ミトコンドリアの融合、分裂時には、不足していると思われる mtDNA を直接やり取りする様子は観察されなかった。現在のところミトコンドリア融合時に実際どのような物質をやり取りしているかを検出する実験系がないこともあり、植物におけるミトコンドリア間相補作用についてはその存在に関する直接的な証明はなされていない。動物細胞におけるミトコンドリア間相補作用の有無についても大論争が繰り広げられたものの、近年 Ono らの実験からようやくその実在が証明された。Ono らは独立の二種類の呼吸不全変異型（それぞれ tRNA 上の点変異）の mtDNA をそれぞれホモプラズミーで保持する二種のヒト培養細胞を用いて、それらを細胞融合させることで細胞融合後の細胞では全てのミトコンドリアで呼吸能が回復するという結果から、少なくともミトコンドリア融合によってミトコンドリア内で tRNA がやり取りされていること、すなわちミトコンドリアにおける機能的相補作用が実在することを鮮やかに示した (Ono T. *et al.* 2001)。

タマネギ表皮細胞において全てのミトコンドリアが数時間で少なくとも一度は融合しているというミトコンドリア融合の頻度 (Arimura S. *et al.* 2004) および、本研究における、明確な mt 核様体シグナルを持たない、mtDNA が不足していると考えられるミトコンドリアにおいても呼吸能の重篤な低下が起きていないことから、植物ミトコンドリア間での相補作用はまず間違いなく存在すると思われ、今後の直接的な証明が待たれる。

4.2 ミトコンドリア DNA 均等分配の重要性

根端や卵細胞といった分裂組織で mtDNA 量が多いことについて、その意義は新たに生じる娘細胞に mtDNA の不十分な分配が起こることを防いでいるということを考察した。このことを裏付ける実例、すなわち mtDNA の不十分な分配が細胞の生育にとって重篤な欠陥として現れた例はあるのだろうか。ミトコンドリアおよび mtDNA の均等分配の重要性を如実に示す一例として、シロイヌナズナ Miro GTPase の一つでありミトコンドリアに局在する MIRO1 の機能解析の結果が挙げられる (Yamaoka S. and Leaver C. J. 2008)。MIRO1 欠損型花粉では

花粉管の伸長が抑制され、また MIRO1 欠損型の配偶子同士が受精してできた胚は、胚発生のごく初期（接合子から四細胞期）において発生が止まり胚性致死となる。MIRO1 欠損型花粉の花粉管におけるミトコンドリアの動態を観察したところ、肥大化したミトコンドリアが存在し、それらの巨大ミトコンドリアが本来のミトコンドリアの動きを阻害することで、細胞内のミトコンドリア分布が不均一になっている状態が観察された。MIRO1 欠損型花粉において花粉管が伸長阻害をうけるのは、ミトコンドリアの不均一な分布によるエネルギーおよび代謝の不足によるものと考えられた。さらに、胚性致死となる MIRO1 欠損型の胚においてミトコンドリアを可視化したところ、ミトコンドリアの肥大化およびミトコンドリアの細胞間分配の異常が観察された。酷いものではほとんどミトコンドリアが観察されない細胞まで存在し、これは巨大化したミトコンドリアにより本来のミトコンドリアの動きが阻害されたために細胞分裂時に均等なミトコンドリア分配がなしえなかったとことによると考えられる (Yamaoka S. *et al.* 未発表)。この結果から、MIRO1 欠損型の胚が胚性致死になる原因は、ミトコンドリアが分配されないような細胞が生じる、ミトコンドリアの不均等分配によるものだと考えられる。

MIRO1 欠損型の胚のようにミトコンドリアが巨大化していない場合でも、個々のミトコンドリアに含まれる mtDNA 量が非常に少ない場合には、細胞分裂時に mtDNA が大きな偏りをもって分配される可能性は高く、極端な偏りの場合は mtDNA の観点からみると本質的に MIRO1 欠損型の胚と同様であり細胞は生育できないと考えられる。このようなミスを起こさないために分裂組織で mtDNA 量を増加させる戦略は非常に理にかなっているといえる。

4.3 分化済み組織において mtDNA 量を低水準に保つ意義

ミトコンドリアゲノムは核ゲノムに比べてはるかに障害を受けやすいと言われており (Kang D. and Hamasaki N. 2005), その原因として主に次の二点が考えられる。第一に、ミトコンドリアは生理的に活性酸素を産生する主要なオルガネラであるということが挙げられる。好氣的 ATP 産生のため、ミトコンドリアの電子伝達系による酸素消費量は、細胞内酸素消費量のうち 90%以上を占め、このうち 1-5%は活性酸素に転換されていると考えられている。mtDNA はその活性酸素生産部位のごく近傍に存在するため、核 DNA よりはるかに強い酸化障害を受ける状況にある。第二に、ミトコンドリアは ATP 合成のためにマトリックス側が陰性の膜ポテンシャルを維持しており、そのため脂溶性陽イオンがミトコンドリアに蓄積する傾向があることが挙げられる。抗がん剤などの多くの合成化学物質もまた脂溶性陽イオンであり、そのため mtDNA は核 DNA より外来物質による化学修飾を数十倍強く受けることが報告されている。こ

の脆弱性を反映して、mtDNA の変異率は核 DNA に比べて 100 倍以上高いということが知られている (Khrapko K. *et al.* 1997; Taylor R. W. *et al.* 2003).

細胞内共生成立後のミトコンドリアから核へのゲノム転移は、このような過酷な環境からミトコンドリアゲノムを避難させるために起きたと推測される。脊椎動物ミトコンドリアゲノムがほぼ 17 kbp という非常に小型化されていることと比べて、植物ミトコンドリアゲノムはサイズが大きく、種間でもその差が大きい。またサイズの *coxII* のように (ミトコンドリアゲノム上に ORF は保存されているが、核に機能遺伝子がある) 転移の途にあると思われる遺伝子も存在することから、植物においてははまだミトコンドリア遺伝子を核ゲノムへと転移している進化の途上にあると考えられる。

さて、本研究の結果にあるように、植物において分裂組織で mtDNA 量が多いことはのちの細胞分裂時の mtDNA 均等分配の必要性を考えれば必然的なことであると考えられるが、それでは分化済み組織で mtDNA 量を激減させるのは何故なのだろうか。二章、三章の考察で述べたように、相補作用の恩恵およびコスト面でのメリットのためという考え方がまず挙げられるが、それが全てであろうか。

近年、ミトコンドリアの品質管理について、動物のミトコンドリア研究から興味深い結果が報告されている。オートファジーによる選択的なミトコンドリア分解をマイトファジーと呼ぶが、2008 年にパーキンソン病とマイトファジーの関連を示唆する重要な論文が報告された。これまでパーキンソン病の原因遺伝子産物である Parkin は、ミトコンドリアの機能維持に働くと考えられていたものの、その細胞内局在に関して矛盾があり (通常はほとんどミトコンドリアに局在しない) 多くの研究者を悩ませていた。Narendra らは、脱共役剤を用いてミトコンドリアの膜電位を失わせると、Parkin タンパク質が選択的に膜電位を失ったミトコンドリアに移動してこのミトコンドリアをオートファジー経路で分解することを報告した (Narendra D. *et al.* 2008)。この結果は、Parkin が膜電位を失ったミトコンドリアを選択的にマイトファジーに誘導する因子であり、パーキンソン病が膜電位を失ったミトコンドリアに対する品質管理の不全病であることを強く示唆している。

高等植物においても同様のミトコンドリア品質管理機構があると仮定した場合、分化済みの組織において個々のミトコンドリア内で少量の mtDNA を保持することはどういう意味を持つか。ミトコンドリアの機能に阻害的な、例えば膜電位を低下させるような異常なタンパク質を生み出す変異が mtDNA に生じた場合、そのようなダメージを蓄積した mtDNA が細胞内に長く留まるのは好ましくない。もし個々のミトコンドリアに多コピーの mtDNA が存在した場合、例えそのうち一つの mtDNA にそのような変異が起きたとしても、そのミトコンドリアには直ちに表現型が現れずにしばらくは膜電位を維持し、他のミトコンドリアと融合することでミトコンドリ

アネットワーク上にその変異型 mtDNA が広がりかねない。ミトコンドリア内にごく少量の mtDNA のみを保持する場合は、変異型 mtDNA が生じた場合直ちに膜電位が低下し、膜電位の低下によりミトコンドリア融合が抑制され、そのようなミトコンドリアを標的としたマイトファジーにより速やかに排除されと考えられる。以上のように、高等植物においてもミトコンドリア品質管理機構があると仮定した場合、分化済みの組織で個々のミトコンドリアが少量の mtDNA をもつことは、変異型 mtDNA および損傷を受けたミトコンドリアがミトコンドリアネットワーク上に広まることを防ぐという意義がある可能性がある。

第五章. 摘要

高等植物のミトコンドリアゲノムは動物など他の生物種と比較してサイズが大きく、また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、様々なサイズの環状構造 DNA 分子が生じ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。しかしながら、高等植物細胞内には数百個のミトコンドリアが存在するが、抽出したミトコンドリア DNA (以下 mtDNA と略す) の総量とミトコンドリアの数のカウント結果から、植物細胞内には全てのミトコンドリアがゲノム全体を持てるほどの mtDNA 量がないという報告があり、植物細胞内の mtDNA の構成には不明な点が多く残されていた。さらに、細胞の状態によってミトコンドリアゲノム中の mtDNA 分子の構成が変化すること、細胞の成長に従ってミトコンドリア核様体 (凝集した DNA-タンパク質の複合体、以下 mt 核様体と略す) に含まれる mtDNA 量が減少すること、および卵細胞では巨大な mt 核様体が非常に大量の mtDNA を保持していること等が報告され、これらの結果は植物ミトコンドリアゲノムが、一個のミトコンドリアが一セットのゲノムを維持するといった単純な制御ではなく、非常に複雑な制御下にあることを示唆している。

しかしながら、これまでの研究では、植物細胞内において個々のミトコンドリア、あるいは一個の卵細胞には具体的にどの程度の mtDNA が保持されているのか、また個々のミトコンドリアが保持する mtDNA 量には差があるのかといった疑問には答えられていなかった。本論文で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一個あたりの mtDNA 量および卵細胞一個あたりの mtDNA 量に焦点を当て研究を行った。

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、本研究ではまずタバコ培養細胞 (BY-2) を用いて、ミトコンドリアと mt 核様体をそれぞれ MitoTracker と SYBR Green I で染色し、ミトコンドリアをはっきりと識別した上でミトコンドリアと mt 核様体を同時に観察した。その結果、mt 核様体が観察されないミトコンドリアが多数存在することがわかった。また、観察された mt 核様体のシグナル強度が同一細胞内においても個々のミトコンドリア間で大きく異なることから、BY-2 において個々のミトコンドリアの持つ DNA 量には大きなばらつきがあることが示唆された。

次に、培養細胞ではなく植物体において、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 の量を調べた。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、蛍光顕微鏡下でGFP蛍光画像とDAPI蛍光画像を記録し、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、培養細胞と同様にイネの根においても明確なmt核様体がみられないミトコンドリアが多数存在していることがわかった。明確なmt核様体を持たないミトコンドリアの割合は根の基部で67%、中間部で59%、根端部で9%であり、根端部では有意に少ないことが明らかになった。次に、サイズ既知の λ DNA、BACクローンを同様にDAPIで染色し、DAPI蛍光強度とDNA量(kbp相当量)間の検量線を作成し、これを用いてミトコンドリア一個あたりに含まれるおよその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。そこで本研究で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。

本研究ではこれまでに複数報告されているイネ卵細胞単離法の中から、単離操作によって卵細胞に与える影響が小さいと考えられる、固定・酵素処理を行わずに生細胞の状態で卵細胞を単離する手法を採用した。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。しかしながら、今回の手法で観察した場合、単離・染色の際のアーティファクトで本来巨大であったミトコンドリアおよび mt 核様体が小型・粒状になってしまったという可能性が否定できない。そこでまず、電子顕微鏡観察によって巨大なミトコンドリアが観察されるトウモロコシ卵細胞を生細胞染色の手法で観察することで、生細胞染色によるミトコンドリア形態への影響を検討した。その結果、生細胞染色による観察でもトウモロコシ卵細胞には巨大な多層カップ状構造のミトコンドリアが多数観察されることが明らかになった。この結果は、生細胞染色はミトコンドリア形態に対して大きな影響を与えないことを示唆している。次にイネ雌蕊をゼラニウムと同様の手法で固定し、樹脂包埋切片を作製後、DAPI 染色によりイネ卵細胞に含まれる核様体の形態を観察した。その結果、イネ卵細胞では生細胞染色の手法と同様に小型・粒状の核様体のみが観察されることが明らかになった。これらの結果から、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、ゼラニウムと同様にイネ卵細胞は大量の mtDNA を保持しているかを検証するため、イネ根由来プロトプラストのミトコンドリアと mt 核様体をイネ卵細胞と同様に染色し、イネ卵細胞における染色像と比較した。その結果、前章での結果と同様にイネ根由来プロトプラストには mt 核様体が観察されないミトコンドリアが多数存在するのに対し、イネ卵細胞ではほとんど全てのミトコンドリアが非常に明確な mt 核様体を持つことから、イネ卵細胞はイネ根由来プロトプラストと比較して大量の mtDNA を保持していることが示唆された。細胞あたりの mtDNA 量に関してさらに詳しい解析を行うため、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 倍以上に及ぶコピー数を保持していることが明らかになった。この値は、定量に用いた卵細胞と緑葉由来プロトプラストの細胞体積比 (5.2 倍) よりも大きいことから、イネ卵細胞において細胞あたりの各遺伝子のコピー数が多いのは単に細胞が大きいからではなく、イネ卵細胞は緑葉由来プロトプラストと比較して体積当たりの各遺伝子コピー数も多いことによるということが明らかになった。

本研究から、イネにおいて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が明らかになった。このようにゲノムが不足していると考えられるミトコンドリアでも、特に目立った呼吸活性の低下等の不具合が起きていないように見えることから、高等植物においてははまだ直接的には実在の証明がなされていないミトコンドリア間の相補作用の存在が強く示唆された。また、根端や卵細胞といった分裂組織では、細胞あたりおよび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る。

参考文献

- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., Debruijn M. H. L., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J. H., Staden R. and Young, I. G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.
- Arimura S., Fujimoto M., Doniwa Y., Kadoya N., Nakazono M., Sakamoto W. and Tsutsumi N. (2008) Arabidopsis ELONGATED MITOCHONDRIA1 is required for localization of DYNAMIN-RELATED PROTEIN3A to mitochondrial fission sites. *Plant Cell* 20: 1555–1566.
- Arimura S. and Tsutsumi N. (2002) A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in Arabidopsis mitochondrial division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99: 5727–5731.
- Arimura S., Yamamoto J., Aida G. P., Nakazono M. and Tsutsumi N. (2004) Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101: 7805–7808.
- Backert S., Nielsen B. L. and Borner T. (1997) The mystery of the rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science* 2: 477–483.
- Belliard G., Vedel F. and Pelletier G. (1979) Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. *Nature* 281: 401–403.
- Bendich A. J. and Gauriloff L. P. (1984) Morphometric analysis of cucurbit mitochondria: The relationship between chondriome volume and DNA content. *Protoplasma* 119: 1–7.
- Briggs C. L. (1992) A light and electron-microscope study of the mature central cell and egg apparatus of *Solanum nigrum* L. (Solanaceae). *Int. J. Plant Sci.* 153: 40–48.

- Diboll A. G. and Larson D. A. (1966) An electron microscopic study of the mature megagametophyte in *Zea mays*. Am. J. Bot. 53: 391–402.
- Dong J. and Yang H. Y. (1989) An ultrastructural study of embryo sac in *Oryza sativa* L. Acta. Bot. Sin. 31: 81–88
- Ephrussi B. (1953) Nucleo-cytoplasmic relations in microorganisms, Clarendon Press, New York.
- Faure J. E., Mogensen H. L., Kranz E., Digonnet C. and Dumas C. (1992) Ultrastructural characterization and three-dimensional reconstruction of isolated maize (*Zea mays* L.) egg cell protoplasts. Protoplasma 171: 97–103.
- Fauron C., Casper M., Gao Y. and Moore B. (1995) The maize mitochondrial genome – Dynamic, yet functional. Trends in Genet. 11: 228–235.
- Fujie M., Kuroiwa H., Kawano S. and Kuroiwa T. (1993) Studies on the behavior of organelles and their nucleoids in the root apical meristem of *Arabidopsis thaliana* (L.) Col. Planta 189: 443–452.
- Fujie M., Kuroiwa H., Kawano S., Mutoh S. and Kuroiwa T. (1994) Behavior of organelles and their nucleoids in the shoot apical meristem during leaf development in *Arabidopsis thaliana* L. Planta 194: 395–405.
- Fukuoka H., Ogawa T., Mitsuhashi I., Iwai T., Isuzugawa K., Nishizawa Y., Gotoh Yo., Nishizawa Ya., Tagiri A., Ugaki M., Oshima M., Yano H., Murai N., Niwa Y., Hibi T. and Ohashi Y. (2000) Agrobacterium-mediated transformation of monocot and dicot plants using the NCR promoter derived from soybean chlorotic mottle virus. Plant Cell Rep. 19: 815–820.
- Gray M. W. (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. Int. Rev. Cytol. 141: 233–357.

- Han H. M., Zhao J., Shi H. Z., Yang H. Y. and Zhou C. (1998) Isolation of egg cells and zygotes in *Oryza sativa*. Acta. Bot. Sin. 40: 186–188.
- Handa H. (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.); comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. Nucl. Acids Res. 31: 5907–5916.
- Hayashi J., Takemitsu M., Goto Y. and Nonaka I (1994) Human mitochondria and mitochondrial genome function as a single dynamic cellular unit. J. Cell Biol. 125: 43–50.
- Hu Z. M. and Hu S. Y. (1996) Studies on plastids and mitochondria and their DNAs before and after fertilization in Pharbitis. Acta. Bot. Sin. 38: 257–261.
- Jensen W. A. (1965) Ultrastructure and composition of egg and central cell of cotton. Am. J. Bot. 52: 781–797.
- Jensen W. A., Schulz P. and Ashton M. E. (1977) An ultrastructural study of early endosperm development and synergid changes in unfertilized cotton ovules. Planta 133: 179–189.
- Kanazawa A., Tsutsumi N. and Hirai A. (1994) Reversible changes in the composition of population of mtDNAs during dedifferentiation and regeneration in tobacco. Genetics 138: 865–870.
- Kang D. and Hamasaki N. (2005) Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes and cancer. Curr. Med. Chem. 12: 429–441.
- Khalequzzaman M. and Haq N. (2005) Isolation and in vitro fusion of egg and sperm cells in *Oryza sativa*. Plant Physiol. Biochem. 43: 69–75.

- Khrapko K., Collier H. A., Andre P. C., Li X. C., Hanekamp J. S. and Thilly W. G. (1997) Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94: 13798–13803.
- Kovacs M., Barnabas B. and Kranz E. (1994) The isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex. Plant Reprod.* 7: 311–312.
- Kranz E., Bautor J. and Lorz H. (1991) In vitro fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex. Plant Reprod.* 4: 12–16.
- Kubo T., Nishizawa S., Sugawara A., Itchoda N., Estiati A. and Mikami T. (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA Cys (GCA). *Nucl. Acids Res.* 28: 2571–2576.
- Kuroiwa H. and Kuroiwa T. (1992) Giant mitochondria in the mature egg cell of *Pelargonium zonale*. *Protoplasma* 168: 184–188.
- Kuroiwa H., Nishimura Y., Higashiyama T. and Kuroiwa T. (2002) *Pelargonium* embryogenesis; Cytological investigations of organelles in early embryogenesis from the egg to the two-celled embryo. *Sex. Plant Reprod.* 15: 1–12.
- Kuroiwa H., Ohta T. and Kuroiwa T. (1996) Studies on the development and three-dimensional reconstruction of giant mitochondria and their nuclei in egg cells of *Pelargonium zonale* Ait. *Protoplasma* 192: 235–244.
- Kuroiwa T., Fujie M. and Kuroiwa H. (1992) Studies on the behavior of mitochondrial DNA. Synthesis of mitochondrial DNA occurs actively in a specific region just above the quiescent center in the root-meristem of *Pelargonium zonale*. *J. Cell Sci.* 101: 483–493.
- Kuwada Y. (1909) On the development of the pollens and the embryo sac, and the formation of the endosperm, etc. of *Oryza sativa* L. *Bot. Mag. (Tokyo)* 24: 333–343.

- Kuwada Y. (1910) A cytological study of *Oryza sativa* L. Bot. Mag. (Tokyo) 24: 266–281.
- Kuznetsov A. V., Hermann M., Saks V., Hengster P. and Margreiter R. (2009) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. Int. J. Biochem. Cell Biol. 41: 1928–1939.
- Kyozuka J., Hayashi Y. and Shimamoto K. (1987) High-frequency plant-regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. Mol. Gen. Genet. 206: 408–413.
- Logan D. C., Scott I. and Tobin A. K. (2004) ADL2a, like ADL2b, is involved in the control of higher plant mitochondrial morphology. J. Exp. Bot. 55: 783–785.
- Lonsdale D. M., Brears T., Hodge T. P., Melville S. E. and Rottmann W. H. (1988) The plant mitochondrial genome – Homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity. Philos. Trans. R. Soc. London B. 319: 149–163.
- Lonsdale D. M., Hodge T. P. and Fauron C. M. R. (1984) The physical map and organization of the mitochondrial genome from the fertile cytoplasm of maize. Nucl. Acids Res. 12: 9249–9261.
- Lu G., Sun H., Korge P., Koehler C. M., Weiss J. N. and Wang Y. (2009) Functional characterization of a mitochondrial SER / THR protein phosphatase in cell death regulation. Methods Enzymol. 457: 255–273.
- Mansfield S. G., Briarty L. G. and Erni S. (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* .I. The mature embryo sac. Can. J. Bot. 69: 447–460.
- Margulis L. (1970) Origin of eukaryotic cells. Yale Univ. Press, New Haven, CT. van Wijk., 2001.
- Miyakawa I., Aoi H., Sando N. and Kuroiwa T. (1984) Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Sci. 66: 21–38.

- Miyamura S., Nagata T. and Kuroiwa T. (1986) Quantitative fluorescence microscopy on dynamic changes of plastid nucleoids during wheat development. *Protoplasma* 133: 66–72.
- MÓl R., Idzikowska K., Dumas C., Matthys–Rochon E. (2000) Late steps of egg cell differentiation are accelerated by pollination in *Zea mays* L. *Planta* 210: 749–757.
- Nass M. M. and Nass S. (1963) Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J. Cell Biol.* 19: 593–611.
- Nagata T., Nemoto Y. and Hasezawa S. (1992) Tobacco BY–2 cell line as the “Hela” cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* 132: 1–30.
- Nakada K., Sato A. and Hayashi J. (2009) Mitochondrial functional complementation in mitochondrial DNA-based diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 1907–1913.
- Narendra D., Tanaka A., Suen D. F. and Youle R. J. (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183: 795–803.
- Notsu Y., Masood S., Nishikawa T., Kubo N., Akiduki G., Nakazono M., Hirai A. and Kadowaki K. (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome; frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genomics* 268: 434–445.
- Oldenburg D. J. and Bendich A. J. (1998) Fluorescence microscopy of DNA–protein structures from osmotically lysed mitochondria of yeast and tobacco. *Protoplasma* 201: 53–63.
- Ono T., Isobe K., Nakada K. and Hayashi J. (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nature Genet.* 28: 272–275.

- Palmer J. D. and Shields C. R. (1984) Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* 307: 437–440.
- Reddy P. H., Maoa P. and Manczak M. (2009) Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease. *Brain Res. Rev.* 61: 33–48.
- Sakamoto W. and Wintz H. (1996) Nucleotide sequence of cDNAs encoding γ , δ , δ' , and ϵ subunit of mitochondrial F1–ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 112: 1736.
- Satoh M., Kubo T., Nishizawa S., Estiati A., Itchoda N. and Mikami T. (2004) The cytoplasmic male–sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. *Mol. Genet. Genomics* 272: 247–256.
- Satoh M., Nemoto Y., Kawano S., Nagata T., Hirokawa H. and Kuroiwa T. (1993) Organization of heterogeneous mitochondrial DNA molecules in mitochondrial nuclei of cultured tobacco cells. *Protoplasma* 175: 112–120.
- Scott I. and Logan D. C. (2007) Mitochondrial dynamics: the control of mitochondrial shape, size, number, motility, and cellular inheritance. In *Plant Mitochondria*, editor: David C Logan, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 1–35.
- Seguí-Simarro J. M., Coronado M. J. and Staehelin L. A. (2008) The mitochondrial cycle of *Arabidopsis* shoot apical meristem and leaf primordium meristematic cells is defined by a perinuclear tentaculate/cage–like mitochondrion. *Plant Physiol.* 148: 1380–1393.
- Sheahan M. B., McCurdy D. W. and Rose R. J. (2005) Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *Plant J.* 44: 744–755.
- Sparks R. B. and Dale R. M. K. (1980) Characterization of H–3 labeled supercoiled mitochondrial DNA from tobacco suspension culture cells. *Mol. Gen. Genet.* 180:

351–355.

Sugiyama Y., Watase Y., Nagase M., Makita N., Yagura S., Hirai A. and Sugiura M. (2005) The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol. Genet. Genomics* 272: 603–615.

Sumner M. J. and Vancaeseele L. (1989) The ultrastructure and cytochemistry of the egg apparatus of *Brassica campestris*. *Can. J. Bot.* 67: 177–190.

Suzuki T., Kawano S., Sakai A., Fujie M., Kuroiwa H., Nakamura H. and Kuroiwa T. (1992) Preferential mitochondrial and plastid DNA synthesis before multiple cell divisions in *Nicotiana tabacum*. *J. Cell. Sci.* 103: 831–837.

Suzuki T., Sasaki N., Sakai A., Kasano S. and Kuroiwa T. (1995) Localization of organelle DNA synthesis within the root apical meristem of rice. *J. Exp. Bot.* 46: 19–25.

Suzuki T., Kawano S., Sakai A., Hirai A. and Kuroiwa T. (1996) Variability of mitochondrial subgenomic molecules in the meristematic cells of higher plants. *Genes Genet. Syst.* 71: 329–333.

Sytenki R. M., Levings C. S. III. and Shah D. M. (1978) Physicochemical characterization of mitochondrial DNA from Soybean. *Plant Physiol.* 61: 460–464.

Taylor R. W., Barron M. J., Borthwick G. M., Gospel A., Chinnery P. F., Samuels D. C., Taylor G. A., Plusa S. M., Neddham S. J., Greaves L. C., Kirkwood T. B. and Turnbull D. M. (2003) Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J. Clin. Invest.* 112: 1351–1360.

Tourte Y. (1975) Ultrastructural study of oogenesis of a fern — *Pteridium-aquilinum* (L.) kuhn. *J. Microsc. Biol. Cell* 23: 301–316.

- Uchiumi T., Komatsu S., Koshiba T. and Okamoto T. (2006) Isolation of gametes and central cells from *Oryza sativa* L. Sex. Plant Reprod. 19: 37–45.
- Unseld M., Marienfeld J. R., Brandt P. and Brennicke A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. Nature Genet. 15: 57–61.
- van der Maas H., Zall M., De Jong E., Krens F. and van Went J. (1993) Isolation of viable egg cells of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Protoplasma 173: 86–89.
- Ward B. L., Anderson R. S. and Bendich A. J. (1981) The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (Cucurbitaceae). Cell 25: 793–803.
- Yamaoka S. and Leaver C. J. (2008) EMB2473 / MIRO1, an Arabidopsis Miro GTPase, is required for embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen. Plant Cell 20: 589–601.
- You R. and Jensen W. A. (1985) Ultrastructural observations of mature megagametophyte and fertilization in wheat (*Triticum aestivum* L.). Can. J. Bot. 63: 163–178.
- Zhang J., Dong W. H., Galli A. and Potrykus I. (1999) Regeneration of fertile plants from isolated zygotes of rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Rep. 19: 128–132.
- Zhao J., Zhou C. and Yang H. Y. (2000) Isolation and in vitro culture of zygotes and central cells of *Oryza sativa* L. Plant Cell Rep. 19: 321–326.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教官である堤伸浩教授には研究の計画段階から実験技術、論文作製に至るまで温かいご指導、ご鞭撻を賜りましたこと、また素晴らしい実験環境とその機会を与えていただいたことを深く感謝致します。中園幹生准教授には、その時々で適切にご指導、ご助言を頂き深く感謝致します。また、助教の有村慎一博士からは、本研究の全般に渡って温かいご指導を頂いたこと、またその研究者としての姿勢に強く影響を受けたことに深く感謝致します。実験材料を分譲して頂いた岡山大学資源生物科学研究所の坂本亘先生に心よりお礼申し上げます。実験材料の分譲及びイネ卵細胞単離技術のご指導で研究をサポートして下さいました首都大学東京理工学研究科の岡本龍史先生に深く感謝致します。

植物分子遺伝学研究室の先輩、同僚、後輩およびスタッフの皆様には、素晴らしい雰囲気の中で研究が出来、また様々な点で支えていただいたことに心よりお礼申し上げます。この研究の過程で特に私を精神的に支えてくれた高橋宏和氏に深く感謝致します。また、博士課程に所属する三年間、特別研究員奨励費および科学研究費を提供していただいた日本学術振興会に感謝致します。

最後に、私をこれまで育ててくれた両親と家族に深く感謝致します。