ミニ総説

高等植物のミトコンドリア内におけるDNA分子の増幅と分配

黒岩常祥 (東京大学・理学部・植物学教室)

Endoduplication and Separation of DNA Molecules in Mitochondria of Higher Plants

Tsuneyoshi Kuroiwa, Department of Biology, Faculty of Science, University of Tokyo, Hongo
Tokyo 113, Japan

Abstract

Two models with a master circle and without the master circle for endoduplication and separation of mitochondrial (mt) DNA in higher plants are discussed. In these models, mitochondrial DNAs are actively synthesized in mitochondria in meristematic cells while during cell differentiation, mitochondria divide in absence of DNA synthesis. Finally, in cells of differentiated tissues such as a root cap and an elongation zone, mitochondria contain a smaller amount of DNA than the genome size and their molecules in each mitochondrion are heterogeneous.

1981年にAnderson(1)によってヒトのミトコンドリアゲノム(mt)の全塩基配列が決定されて以来、ショウジョウバエその他多くの生物種のmtゲノムの全塩基配列が決定されている。しかしながら、こうした塩基配列が決定されているどの生物でもミトコンドリアがどのようにして細胞内で分裂増殖し、分化するのか、また分裂の際にmtゲノムがどのように分配されるのかといった基本的な問題に関してはほとんど明らかでない。ほ乳動物では、電子顕微鏡で観察される環状mtDNA分子は、均一でほとんど5-6 μ mであり、この値は制限酵素を使って解析される分子サイズ(15-17kb)と矛盾しない。また、1個のミトコンドリアに含まれるDNA量はほぼ70Mdであり、これは1個のミトコンドリアに3-4のmtDNA分子があると考えればよい。しかしながら、高等植物のmtゲノムの構造に関しては、多くの報告があるにもかかわらず矛盾に満ちている。例えば、佐藤ら(2)によると、タバコの場合、電子顕微鏡で観察される環状DNA分子の長さは最大のピークが8 μ mであるがやや広がりがあり、制限酵素による同じDNA分子のゲノムサイズの測定は200kbを越えている。更に興味深いことには、分化した細胞のミトコンドリア1個に含まれるDNA量が100kbより少なくなっている。このような現象は多くの高等植物に見られる。表1は、これまでコット分析や制限酵素によって調べられたmtゲノムのサイズを佐藤がまとめたものである(3-5, 12)。一目で分かることは植物のmtゲノムが動物のそれに比べて著しく大きいことである。このように大きなゲノムを含むことのできるミトコンドリアが存在するかどうか個々の植物での検討が必要である。特にマスクメロン(*Cucumis melo*)のmtゲノムのサイズは2400kbとなっており、非常に大きいことが分かる。しかしこれは大腸菌のゲノムサイズ3800kbよりは少ない。

いったいこのような巨大なゲノムを含むミトコンドリアがマスクメロンに実在するであろうか。この問題を調べるために、マスクメロンの実生を用い、その根端部を既に述べた方法(6)によりテクノビット包埋し

厚さ1 μ mに切った切片をDAPI(4'-6-diamidino-2-phenyleindole)染色して観察した。またミトコンドリアあたりのDNA量はVIMシステムによりその蛍光強度を測定することにより決定した。輝度の基準マーカーとしてT4ファージを選びその輝度を1Tとした。その結果、根冠、伸長領域において、ミトコンドリアの蛍光強度は比較的均一で約0.7-1Tであった。ところが分裂組織では5Tほどのものが観察された。分裂組織では、表皮、皮層よりも中心柱において、上部よりも下部(静止中心のすぐ上)において、mtDNAを多く含むミトコンドリアが観察された。しかしながらいずれの部分においても2400kbに相当するような量のDNAを含んだミトコンドリアを見いだすことができなかった。従ってこれは2400kbを算出したコット分析に問題があるように思われる。コット分析は、変性させた2重鎖DNAのアニーリング速度を表わすものであり、直接的にDNA量を測定する方法ではない。従ってmtゲノム内における塩基のヘテロな度合からおおまかなDNA量を調べるのには適当であろう。

では、植物細胞のmtDNAの分子サイズと1個のミトコンドリアに含まれるDNA量、及びゲノムサイズの間に矛盾がないように説明ができるであろうか。先に述べたようにタバコのミトコンドリアの場合を考慮すると、DNAの長さが8 μ m(24kb)、制限酵素によるゲノムサイズが200kb、ミトコンドリアあたりのDNA量が分裂

表1 種々の生物におけるミトコンドリアのゲノムサイズ

俗名	学名	ゲノムサイズ (kbp)
ヒト	<i>Homo sapiens</i>	16.5 ¹⁾
ハツカネズミ	<i>Mus musculus</i>	17 ¹⁾
ショウジョウバエ	<i>Drosophila melanogaster</i>	18.3 ¹⁾
コウボ	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75 ¹⁾
モジホコリカビ	<i>Physarum polycephalum</i>	60 ²⁾
テトラヒメナ	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	50 ¹⁾
クラミドモナス	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16 ¹⁾
カブ	<i>Brassica campestris</i>	218 ³⁾
シロガラシ	<i>Brassica hirta</i>	208 ³⁾
ホウレンソウ	<i>Spinacia oleracea</i>	327 ³⁾
コムギ	<i>Triticum aestivum</i>	430 ³⁾
トウモロコシ	<i>Zea mays</i>	570 ³⁾
マスクメロン	<i>Cucumis melo</i>	2400 ³⁾
キュウリ	<i>Cucumis sativus</i>	1515 ³⁾
スイカ	<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	333 ³⁾
ジャガイモ	<i>Solanum tuberosum</i>	150 ³⁾
タバコ	<i>Nicotiana glauca</i>	91 ³⁾

1)はWallace (1982) の総説から、2)はKavano *et al.* (1982) から、3)はLonsdale (1989) の総説からそれぞれ引用した。

組織で300kb、分裂を停止したいわゆる分化した細胞では100kbとなる。これを使って図1に示すような2つのモデルを提出する。

Lonsdale (5)が分子生物学的方法によって提出したmtDNAゲノムが全部連鎖したいわゆるマスターサークルが存在するか否かによってミトコンドリア核内におけるDNA分子の存在様式は異なる。説明をし易くするためにマスターサークルはa-fの断片が連鎖したものとし、aとd、bとe、cとfはそれぞれ分子量がほぼ同じ環状分子から形成されているものとする。マスターサークルがある場合には、分裂期の細胞内に数100あるミトコンドリアには、ミトコンドリア核が1個含まれ、その核1個にはa-fがつながった1-2分子が含まれる。ミトコンドリアは、細胞周

期の回転の再開とともにDNA合成を行いながら増殖するが、まもなく DNA合成を伴う分裂にかわる。この時マスターサークルはaからfの数本の環状DNA分子に分断され娘ミトコンドリアに分配される。従って、娘ミトコンドリアにはabc, def, aef, bdf-- 等のようにヘテロな分子が含まれるようになる。マスターサークルをつくらない場合のモデル I I では、増殖期にあるミトコンドリアが既にabc, def, aef, bdf -- 等のようなヘテロなミトコンドリアDNA分子を含んでいるので、分裂周期が回転しはじめる初期にはそれぞれがコピー数を増大させる。この増大量は植物の組織によって異なるようだ。この場合において、やがてミトコンドリアはDNA合成を伴わない分裂をするようになる。分裂に際しては小環状の分子は質的にはヘテロだが量的には均等に分配される。最終的に分化した細胞に含まれるミトコンドリアあたりのDNA量はほぼ等しくなり、個々のミトコンドリアに含まれるmtDNA分子の種類は異なってしまう。従って 一度分化した細胞が再び分裂を開始するような場合、例えば葉から分離したプロトプラストが再分化し植物体を形成するような際には、I のモデルではミトコンドリアの融合とそれに伴うmtDNA分子の再結合が必要である。

さて、上記のモデルはタバコの培養細胞やマスクメロンを考慮し組み立てられたものであるが、このモデルは、通常の根端組織においても応用は可能である。例えば、テンジクアオイ(*Pelargonium zonale*)の場合、根端分裂組織の静止中心のすぐ上部においてはミトコンドリアあたりのDNA量は20Tにもなるが上部にゆくに従って減少し、伸長領域ではミトコンドリアあたりのDNA量は1Tもしくは1Tより少なくなることが観察される。上の2つのモデルを当てはめて考えると、テンジクアオイの根端の場合には培養細胞やマスクメロンに比べて分裂組織におけるミトコンドリアのDNA量が著しく、マスターサークルに換算して20分子となっている。静止中心の上部ではmtDNA合成を活発におこないながらミトコンドリアは増殖している。しかしこれらの細胞が分化するにつれて、ミトコンドリアはmtDNA合成を伴わない分裂を続けておこない、やがてマスターサークル1分子を含むようになる。分化しつつある組織細胞においてはこのマスターサークルが断片化するので、ミトコンドリアは幾つかの小環状のmtDNA分子を含むようになる。

我々は、既に 粘菌(*Physarum polycephalum*)とイデユコゴメ (*Cyanidium caldarium* RK-1, *Cyanidium caldarium* M8)を用いてミトコンドリアと色素体の分裂周期に関する研究を行ってきた(8, 9)。その結果、細胞核は1細胞周期毎にDNAを倍加させるが、ミトコンドリアと色素体は増殖のはじめに一度にDNA量を数倍増加させ、その後はDNA合成を伴わない分裂を繰り返すことが明らかとなった。粘菌では分化した組織細胞においてmtDNA量が生活環の最小になった時でさえmtゲノムが分断されヘテロな分子として存在していることはなかった。高等植物のミトコンドリアとの違いはここにある。

高等植物のミトコンドリアの増殖モデルを提出したが、モデルI, I I のどちらか、あるいは両方が混在するものなのか、現在のところ決定的な証拠は無い。今後が楽しみである。

図1 高等植物のミトコンドリアゲノムの増殖と分配に関するモデル。

Iはマスターサークル(master circle)が存在すると仮定した場合である。分裂組織の細胞内において多数あるミトコンドリアは1個のミトコンドリア核を含んでいる。1個のミトコンドリア核内には数本のマスターサークル分子があり、DNA合成(+ DNA synthesis)を伴いながらミトコンドリアは増殖する。細胞の分化とともにミトコンドリアはDNA合成(- DNA synthesis)を伴わない分裂にかわる。この分裂の最後に、マスターサークルが分断(fragmentation of master circle)するので、分化した細胞内のミトコンドリア核はa-fのようなヘテロな環状DNA分子を含むようになる。IIはミトコンドリアがマスターサークルを含まないと仮定した場合。分裂組織細胞内におけるミトコンドリア内では多数のヘテロな分子がコピーを増大させる。細胞の分化とともに、これらは均等に分配されてゆく。この点に関してはモデルIと似ている。

参考文献

- 1) Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrel, M. H. L. deBruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden and I. G. Young. 1981. *Nature* 290:457-465.
- 2) Satoh, M., Y. Nemoto, S. Kawano, T. Nagata, and T. Kuroiwa. 1991. *Planta* in press.
- 3) Wallace, D. C. 1982. *Microbiol. Rev.* 46:208-240.

- 4) Kawano, S., T. Suzuki, and T. Kuroiwa. 1982. *Biochim. Biophys. Acta* 696:290-298.
- 5) Lonsdale, D. M. 1989. in "The Biochemistry of Plants" 15:229-295.
- 6) Kuroiwa, T., H. Kuroiwa, T. Mita and M. Fujie. 1990. *Protoplasma* 158:191-194.
- 7) Kuroiwa, T., S. Nakamura, S. Kawano, M. Hizume and A. Toh-e, I. Miyakawa and N. Sando. 1986 199-206.
- 8) Kuroiwa, T. 1982. *Int. Rev. Cytol.* 75:1-59.
- 9) Kuroiwa, T. 1991. *Int. Rev. Cytol.* in press.
- 10) Kawano, S., S. Nishibayashi, N. Shiraishi, , M. Miyahara and T. Kuroiwa. 1986. *Exp.Cell Res* 149:359-373.
- 11) Kawano, S. 1990. *Bot. Mag. Tokyo* 104:97-113.
- 12) 佐藤征弥 1990. 博士論文(東北大学) .

(Received 4 June 1991)