



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	テンサイOwen型細胞質雄性不稔性に働く新規花粉稔性回復遺伝子Rf2の研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	本間, 雄二郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11822号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58655
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yujiro_Homma_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 本間 雄二朗

学 位 論 文 題 名

テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く新規花粉稔性回復遺伝子 *Rf2* の研究

細胞質雄性不稔性(Cytoplasmic male sterility, CMS)は母性遺伝性の雄性不稔であり、140 以上の植物種で記録されている。CMS は細胞質 (CMS 細胞質) により発現が促されるが、核ゲノムにコードされる稔性回復遺伝子(*Rf*)の作用により抑制される。すなわち、CMS は CMS 細胞質をもち、かつ *Rf* が劣性ホモ接合(*rf rf*)の場合にのみ表現型が表れる。CMS は核と細胞質の相互作用を研究する上で重要な現象であると同時に、一代雑種育種の種子親に用いられる重要な育種形質でもある。種子親系統の維持・増殖には正常細胞質を持つ同質遺伝子系統(維持系統)が必要となり、維持系統選抜がこの育種法の鍵となる。

テンサイは世界の主要な製糖作物の一つであり、Owen 型 CMS を用いた一代雑種育種が行われている。Owen 型 CMS における維持系統出現率は 5%程度であるとされ、維持系統選抜阻害要因を知るため花粉稔性回復の遺伝モデルが研究されてきた。現在までに *X* と *Z* なる 2 因子を想定した Owen(1945)のモデルが広く受け入れられている。近年、*X* の対立遺伝子と思われる *Rf1* がクローニングされ、*rf1rf1* のマーカー補助選抜が試みられたが、その選抜効率は実用レベルではなかった。おそらく、選抜効率を下げる未知の遺伝因子が存在するものと考えられた。

本研究では、*rf1rf1* でありながら花粉稔性が回復する個体名 E60 の後代集団を用いて、この集団が保持する新規の *Rf*(*Rf2* と命名した)を遺伝学的に同定し、ポジショナルクローニングにより *Rf2* の実体を明らかにするとともに、*Rf2* の花粉稔性回復における分子機構の調査を行った。

新規稔性回復遺伝子 *Rf2* の同定

E60 と CMS 系統 TA-33BB-CMS との F_1 を戻し交配して得られた BC_1F_1 集団、およびその 1 個体から自殖を繰り返して得られた BC_1F_2 と BC_1F_3 集団はいずれも不完全な花粉稔性回復個体が分離する。この集団の花粉稔性分離を χ^2 検定すると、いずれも 1 因子のモデルに適合した。これを *Rf2* と命名した。*Rf2* マップポジション同定のため、AFLP による BSA(bulked segregant analysis)で *Rf2* に連鎖するマーカーを作出し、17 個の STS マーカーへと変換した。これらのマーカーを用いて、 BC_1F_1 と BC_1F_3 の連鎖解析を行うと、テンサイ第 4 染色体に帰属する全長 46.1cM および 34.5 cM の連鎖地図が作成できた。続いて、QTL 解析により *Rf2* 座乗位置の同定を行うと、 BC_1F_1 および BC_1F_3 で共通した 1 つのピークが得られた。これを *Rf2* 座とし、この *Rf2* 座に近接しているマーカーを *Rf2* 最近接マーカーとした。帰属染色体から、*Rf2* は Owen の想定した *Z* の対立遺伝子と思われる。

***Rf2* 遺伝子座の構造と発現**

Rf2 のポジショナルクローニングのため、*Rf2* をホモ接合で持つ個体の DNA を用いて BAC ライブラリーと Fosmid ライブラリーを作製した。それぞれ、ゲノム被覆率は 5.2 倍と 2 倍であった。連鎖解析で用いた *Rf2* 最近接マーカーでライブラリーのクローンを選抜すると、それらだけでは *Rf2* 保持領域全体をカバーすることは出来なかったため、染色体歩行により *Rf2* 保持領域全体をカバーするコンティグを構築し、塩基配列情報をもとに 8 個のマーカーを新たに設置した。同時に、詳細なマッピング解析を行うため 1,178 個体からなる分離集団を作出し、表現型解析により *Rf2* 保持領域を絞り込んだ。*Rf2* は f87C1_1 と 33N17_1 なる 2 つのマーカー間に座乗する事が明らかとなり、この領域の塩基配列を決定すると 392,718 bp であった。この領域に座乗する ORF を明らかとするため、*Rf2* 稔性回復個体の未成熟葯の RNA-seq を行い、リードデータのマッピングにより発現領域を決定した。続いて、TA-33BB-CMS 未成熟葯の RNA-seq リードデータに基づいて回復アレルとアミノ酸配列の差異をもつ ORF を選抜すると、7 個同定できた。さらに、CMS の原因はミトコンドリアにあるため、翻訳産物がミトコンドリアに移行する遺伝子が *Rf2* 候補遺伝子となる。これら 7 個の ORF に対して局在予測解析すると、ORF3 と ORF8 のみがミトコンドリア局在を示した。この中で、ORF8 は他の CMS の *Rf* としてクローニングされた塩基配列特異的 RNA 結合タンパク質である PPR タンパク質をコードしていた。さらに、細胞内局在実験により実際にミトコンドリアへの局在が確認され、TA-33BB-CMS アレルのアミノ酸配列と比べて、塩基配列認識能に関わるアミノ酸残基の置換が見つかった。よって、ORF8 が *Rf2* の候補遺伝子と考えられた。

***Rf2* による花粉稔性回復葯における *preSatp6* ならびに葯転写産物の発現解析**

Rf2 の分子の実体は ORF8 であると考えられたが、*Rf2* による花粉稔性回復の分子機構は不明である。*Rf1* については preSATP6 タンパク質と RF1 タンパク質がヘテロオリゴマーを形成する事が分かっている。そこで、*Rf2* 稔性回復葯における *preSatp6* の分子的な挙動を調査した。ノーザンブロット解析および cDNA の塩基配列決定により、*preSatp6* 転写産物の転写パターンおよび RNA 編集の状態を確認した。さらに、SDS-PAGE および BN-PAGE によるイムノブロット解析により、preSATP6 タンパク質の蓄積量や複合体の性状を確認した。いずれの解析においても、CMS 系統との違いは検出されなかった。そこで、E60BC₁F₃ の 1 個体を自殖して得られた E60-F₄-*Rf2*(*Rf2* 稔性回復個体)の葯における RNA-seq による全転写物の網羅的発現解析により、*Rf2* の作用機序を調査した。比較対象として TA-33BB-O(維持系統)、TA-33BB-CMS(CMS 系統)および 14-0034(*Rf1* 稔性回復個体)を用いることで、*Rf1* による花粉稔性回復機構との違いも調査した。TA-33BB-O と TA-33BB-CMS で発現パターンが異なる遺伝子群の中から、*Rf1* 稔性回復個体や *Rf2* 稔性回復個体で TA-33BB-O と同じような発現量を示す稔性回復関与遺伝子を調査した。すると、14-0034 と E60-F₄-*Rf2* で共通して発現している稔性回復関与遺伝子は 10 個ほどであった。また、14-0034 でのみ発現している稔性回復関与遺伝子は 226 個であり、E60-F₄-*Rf2* でのみ発現している稔性回復関与遺伝子は 5 個であった。これらの結果から、*Rf1* と *Rf2* の稔性回復機構は異なる事が示唆された。