



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（農学） 氏名 本間 雄二郎

審査担当者 主査 准教授 久保友彦
副査 教授 阿部純
副査 教授 貴島祐治

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

本論文は 160 頁からなる和文論文であり、図 27 と表 23 を含む。別に、参考論文 3 編が添えられている。

細胞質雄性不稔性(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 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。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、一代雑種育種に用いられる重要な育種形質である。

テンサイでは Owen 型 CMS を用いた一代雑種育種が行われている。Owen 型 CMS の維持系統（正常細胞質で *Rf* が劣性ホモ接合の遺伝子型）選抜のため、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 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、*rflrf1* 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、*rflrf1* でありながら花粉稔性が回復する E60 個体の後代集団を用いて、新規の *Rf* 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。

1. 新規稔性回復遺伝子 *Rf2* の同定

E60 と CMS 系統 TA-33BB-CMS の戻し交配集団 (BC_1F_1 、 BC_1F_2 および BC_1F_3) ではいずれも不完全に花粉稔性が回復した個体が分離する。これら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 で連鎖マーカーを作出し、そのうち 17 個を STS マーカーへ変換した。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 の連鎖地図が得られた。続いて、花粉稔性回復に関する QTL 解析により共通して 1 つのピークを得た。これを *Rf2* 座とした。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。

2. *Rf2* 遺伝子座の構造と発現

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。*Rf2* に最も近接するマーカーで選抜したゲノム DNA クローンを起点とした染色体歩行により *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、1178 個体からなる分離集団を作出し、詳細なマッピング解析により *Rf2* 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 392718 bp であった。*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この領域に座乗する ORF を明らかとした。このうち、TA-33BB-CMS (*rf2*) アレルと回復 (*Rf2*) アレルでアミノ酸配列の差異をもつ ORF は 7 個であった。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 ORF を *in silico* で予測すると、ORF3 と ORF8 のみがミトコンドリア局在を示した。このうち、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 アレルとの間に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。

3. *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 による花粉稔性回復の分子機構を調べるため、CMS 原因ミトコンドリア遺伝子 *preSatp6* の *Rf2* 稔性回復葯における分子的挙動を調査した。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や RNA 編集を調査した。さらに、SDS-PAGE および BN-PAGE により、preSATP6 タンパク質の蓄積量や複合体の性状を調べた。いずれにおいても、CMS 系統との違いは検出されなかった。そこで、E60-F₄-*Rf2*(*Rf2* 稔性回復個体)の葯における RNA-seq を行った。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)を用いた。まず TA-33BB-O と TA-33BB-CMS で発現量が異なる遺伝子群を同定し、この中から 14-0034 や E60-F₄-*Rf2* において TA-33BB-O と同様な発現量を示す遺伝子を選び出して比較した。すると、14-0034 と E60-F₄-*Rf2* で共通して該当する遺伝子は 10 個であった。また、14-0034 でのみ該当する遺伝子は 226 個であり、E60-F₄-*Rf2* でのみ該当する遺伝子は 5 個であった。これより、*Rf1* と *Rf2* の稔性回復機構は異なる事が示唆された。

本研究の成果は、テンサイ Owen 型 CMS の稔性回復機構解明と遺伝育種学的基礎研究に寄与するところが大きく、学術面で高く評価できる。

よって審査員一同は本間雄二郎が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。