



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 [全文の要約]
Author(s)	本間, 雄二郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/58935
Type	doctoral thesis
File Information	Yujiro_Homma_summary.pdf



学位論文の要約

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

北海道大学 大学院農学院

生物資源科学専攻 博士後期課程

本間 雄二郎

第1章 緒論

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(*rfrf*)の場合にのみ表現型が表れる。CMSは核ゲノムと細胞質ゲノムの相互作用を研究する上で重要な形質であるため、多くの植物種でCMS原因細胞質因子と核ゲノムにコードされる*Rf*の同定が進められてきた。これまで報告されたCMS原因細胞質因子はすべてミトコンドリアゲノムにコードされており、既知のミトコンドリア遺伝子の部分配列や由来不明な配列が組み合わさったキメラORFである事が分かっている。一方で、*Rf*としてCMS原因細胞質因子の翻訳産物の蓄積を減ずる機能を持つ遺伝子が数多くクローニングされている。

CMSは一代雑種育種に用いられる重要な育種形質でもある。CMSは両性花株を機能的雌花株へと変えるので、理想的な種子親を提供する。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)が必要となるが、維持系統選抜(*rfrf*選抜)がこの育種法の鍵となる作物種も少なくない。

テンサイは主要な砂糖の原料作物の一つであり、Owen 型 CMS を用いた一代雑種育種が行われている。Owen 型 CMS を引き起こす細胞質因子は *preSatp6* と呼ばれる ORF と考えられている。一方で、花粉稔性回復の遺伝モデルは多くの育種家により研究されてきた。これは、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の同定が望まれていたためである。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、*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 *RA(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。

第2章 新規稔性回復遺伝子 *Rf2* の同定

E60 と命名された個体は遺伝子型が *rflrf1* にも関わらず CMS 系統 TA-33BB-CMS との

F₁では不完全であるが花粉稔性を回復する。この F₁を戻し交配して得られた BC₁F₁集団(115 個体)、およびその 1 個体から自殖を繰り返して得られた BC₁F₂、BC₁F₃集団(24 個体、184 個体)はいずれも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 を組み合わせた BSA(bulked segregant analysis)により *Rf2* と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、BC₁F₁ と BC₁F₃ 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、BC₁F₁ および BC₁F₃ 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。

第 3 章 *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には、*Rf2* を保持するゲノムライブラリーを用いた物理地図解析が不可欠である。そこで、*Rf2* をホモ接合で持つ個体のゲノム 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。そのため、染色体歩行により *Rf2* 保持領域全体をカバーするおよそ 750 kbp のコンティグを構築し、塩基配列情報をもとに f87C1_1 と 33N17_1 を含む 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 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 を明らかにするため、*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発現量もしくは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 は複数の機能ドメインを保持する既知のタンパク質をコードしていた。ORF8 は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、さらに、TA-33BB-CMS アレルのアミノ酸配列と比べて、複数の機能ドメインにおいてアミノ酸残基の置換が見つかった。よって、ORF8 は回復アレルと TA-33BB-CMS アレルで機能が異なるようなミトコンドリアタンパク質であることから、*Rf2* の候補遺伝子と考えられた。

第 4 章 *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。既報の *Rf* の多くは CMS 原因細胞質因子の転写パターンの変化や翻訳産物蓄積

量の減少が知られる。例外的な分子機構をもつテンサイ *Rf1* 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* 稔性回復薬における *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。続いて、E60BC₁F₃ の 1 個体を自殖して得られた E60-F₄-*Rf2*(*Rf2* 稔性回復個体)の薬における 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(正常系統)、TA-33BB-CMS(CMS 系統)ならびに 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との違いがあるかどうか調査した。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、*Rf1* と *Rf2* の稔性回復機構を考察する上で、興味深い結果が得られた。

第 5 章 総合論議

公表できない内容が大部分のため、省略する。