

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05564

研究課題名(和文)花粉稔性回復遺伝子の不完全優性アレルを利用した細胞質雄性不稔性発現機構の研究

研究課題名(英文) Study on the cytoplasmic male sterility expression using incomplete dominance alleles of restorer of fertility gene

研究代表者

久保 友彦 (Kubo, Tomohiko)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：40261333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質雄性不稔性(CMS)の発現を変化させる遺伝子を稔性回復遺伝子(Rf)という。Rf遺伝子座から作用力が異なる様々な対立遺伝子が見つかることがわかった。これらはCMS原因遺伝子産物の特定のフォームを作用力に応じて減ずる。このことを利用して、CMS発現機構の解析を行った。その結果、葯形態やミトコンドリアの異常が段階的に異なることがわかった。こうした異常は葯発達のある時期に突然現れることもわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のCMS研究では、Rfの優性と劣性の2つの対立遺伝子しか利用されていなかった。一方で、ゲノムDNA塩基配列の多様性からはRfに様々な対立遺伝子がある可能性が暗示されていたものの、これを検証した例はなかった。今回、テンサイのRfが複対立遺伝子であり、そのことを利用してCMSのメカニズムを研究することが可能であることを実証した。すなわち、CMS原因遺伝子の作用が段階的に減少するような状況を作り出し、ミトコンドリアや葯発達プログラムにいかなる影響があるのかを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic male sterility (CMS) is encoded by mitochondrial genome. Its expression is controlled by nuclear restorer-of-fertility gene (Rf). Analyses of plant genome sequences suggested multiple allelism of Rf locus. This possibility was investigated in sugar beet, and alleles with various strength were found. Plants with CMS mitochondria and Rf alleles with different strength were compared. Anther morphology differed in accordance with the level of MS expression. Mitochondria exhibited morphological abnormality. Difference in gene expression profile was also detected.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：テンサイ 細胞質雄性不稔 稔性回復遺伝子 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一代雑種種子生産に好んで用いられる細胞質雄性不稔性 (CMS) の原因遺伝子はミトコンドリアにコードされる。CMS 原因遺伝子として、いくつかの植物種から様々なモザイク遺伝子が見つかっている。これらの多くは全身で発現するにもかかわらず雄性不稔のみを誘発するが、その発現機構はよくわかっていない。CMS は原因遺伝子があれば必ず発現するものではなく、稔性回復遺伝子 (*Rf*) があれば抑制される。*Rf* の研究はミトコンドリア遺伝子発現制御機構解明へ進む一方、雄性不稔性発現機構解明に大いに利用されているとは言い難い。これまでに *Rf* を利用して (すなわち、正常、CMS、および *Rf* 回復個体という三者間の比較により)、形態あるいは RNA プロファイルの網羅的解析が行われてきた。しかしながら、*Rf* 回復個体はモザイク遺伝子翻訳産物がほぼ完全に消失して稔性回復する事が多い。そのため、こうした実験において、*Rf* 回復個体と CMS 個体との差異は非常に多岐にわたり、データの解釈が困難になる。この原因は、回復個体と CMS 個体の極端な葯形態の差異を含めたあらゆる違いが RNA に反映されて検出されるため、いずれがモザイク遺伝子の直接の作用なのかがわかっていなかった。

ゲノム DNA 構造多型に基づけば、*Rf* が複対立遺伝子系であることは暗示されていた。実際、テンサイにおいては、*Rf1* と命名された *Rf* について、そのことが明らかになりつつあった。すなわち、稔性回復力の異なる *Rf* 対立遺伝子の存在が示唆されていた。

2. 研究の目的

テンサイ *Rf1* は、タンパク質間相互作用を通じて CMS 原因遺伝子 *preSarp6* 翻訳産物のオリゴマーフォームを減ずる。作用力の異なる *Rf1* 対立遺伝子は、それぞれ減少量が異なるので、結果として、様々な量のオリゴマーフォームが残存する。すなわち、オリゴマーフォーム量の異なる状態を作り出すことができる。本研究の目的は、オリゴマーフォーム量を段階的に減じた場合に現れる形態的、あるいは分子生物学的な特徴を明らかにし、得られたデータを考慮した CMS 発現モデルを構築することである。

3. 研究の方法

テンサイ *Rf1* からは表 1 に示す対立遺伝子 (アレル、allele) が見つかっている。

表 1. 現在までに見つかっているテンサイ *Rf1* 対立遺伝子と、その作用力

対立遺伝子名称	作用力
NK-198- <i>Rf1</i>	強い。ホモ接合でもヘテロ接合でも完全回復する。
NK-305- <i>Rf1</i>	やや弱い。ヘテロ接合では、半不稔となる。
Fukkoku- <i>Rf1</i>	非常に弱く、他の <i>Rf</i> の効果を強化するが、単独では回復しない。
TK-81mm-O <i>rf1</i>	回復できない。いわゆる劣性アレル。

これらの対立遺伝子を戻し交配によりテンサイ CMS 系統に持たせた材料を育成した。対立遺伝子の識別は DNA マーカーによって行った。育成した材料を開花誘導し、遺伝子発現量や葯の微細構造を検討した。

4. 研究成果

(1) タペート発達遺伝子の発現

まず、小胞子のアレキサンダー染色像に基づき、発達ステージを識別できることを確認した。続いて、7つのタペート発達制御遺伝子 (*tdf1*, *ams*, *myb103*, *ms1*, *undead*, *myb33* および *ms2*) に着目した。これらの遺伝子はシロイヌナズナやイネの突然変異体から発見されたものである。それらの相同遺伝子をテンサイゲノムより見出した。アミノ酸配列の相同性から複数の遺伝子が見つかったが、系統樹を用いてオルソログと思われるコピーを同定した。同定した遺伝子コピーについてリアルタイム PCR による発現解析を行った。

四分子期においては、いずれの供試材料も正常系統との発現量の違いは見られなかった。差異が生ずるのはその直後であった。

NK-198-*Rf1* と正常系統は、いずれも花粉稔性が正常で、葯内部構造に違いは見られないにも関わらず、小胞子期の *ams* および *ms1* の発現量は異なっていた。

NK-305-*Rf1* において、各遺伝子の発現量は正常系統や NK-198-*Rf1* によく似ている。一方、*ams* や *ms1* では発現量がピークに達する時期は、遅れる傾向が認められた。*undead* については、正常系統で見られるほど発現量は急落しない。

Fukkoku-*Rf1* については、全体に発現量が少ない。*myb103*, *ms1*, および *undead* については、発現の低下が緩やかであった。

(2) 葯の微細構造

葯発達ステージの四分子期から小孢子期について、電子顕微鏡による微細構造の調査を行った。花粉壁の形態から発達ステージを定義したが、前項(1)の実験との対応を以下の表2に示す。

表2. 葯発達ステージの対応関係と花粉壁の形態

小孢子のアレキサンダー染色像に基づく発達ステージ	花粉壁の形態に基づく発達ステージ	花粉壁の形態
四分子期前期から四分子期後期	I	カロースに包まれている。プロバキュラが見えるが、インティンやネキシンは見えない。
四分子期後期から小孢子期前期	II	カロースに包まれている。バキュラとテクタムができ始め、花粉壁内側にはネキシンが観察される。また、プラズマメンブレンとネキシンの間に電子密度の低い層が見られる(図1)。
小孢子期前期から小孢子期中期	III	テクタムが厚くなり、バキュラの電子密度が高くなる。

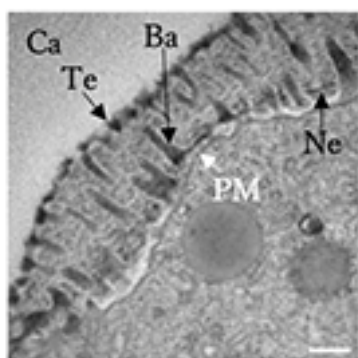


図1. ステージIIの花粉壁。Ca、カロース；Ba、バキュラ；Te、テクタム；Ne、ネキシン；PM、プラズマメンブレン。スケールバーは200 nm。

①タペート細胞のミトコンドリア

NK-305-*Rfl* と Fukkoku-*Rfl* を持つ個体においては、葯ミトコンドリア内の電子密度がステージIとIIで低い傾向が認められた。ステージIIIになると比較的高くなる。CMS系統ではステージIとIIでは電子密度の高いミトコンドリアと低いミトコンドリアが混在し、ステージIIIになるとほとんどが電子密度の低いミトコンドリアであった。ミトコンドリア内部

構造は、CMS系統や正常系統と若干異なっていた。すなわち、球状やタマネギ状クリステが見つかった。CMS系統では、電子密度の低いミトコンドリア内に短いクリステと球状のクリステが確認されたが、クリステの数は非常に少なかった。

②タペート細胞の小胞体

ステージIにおいて、NK-305-*Rfl*、Fukkoku-*Rfl* および CMS 系統で大きく発達していた。ステージII以降の Fukkoku-*Rfl* および CMS 系統においては正常系統やNK-305-*Rfl* に比べて拡張した小胞体が数多く観察され、ステージIIIの CMS 系統では同心円状の小胞体も観察された。

③タペート細胞の脂質

ステージIでは脂質はNK-305-*Rfl*、Fukkoku-*Rfl* および CMS 系統において特定の細胞に偏って局在していた。ステージII以降、NK-305-*Rfl* では、異常は見つからなかった。一方、Fukkoku-*Rfl* および CMS 系統では、ステージIIにおいて塊となった脂質が見られ、他の供試材料とは著しく異なっていた。ステージIIIでは、Fukkoku-*Rfl* はタペート組織に脂質が大量に蓄積していたが、これはCMS系統ではほとんど見当たらず、正常に近い形態を示した。

④タペート細胞のユービッシュ体

NK-305-*Rfl* はステージIおよびIIIでは正常系統と同様なユービッシュ体前駆体およびユービッシュ体が見られるものの、ステージIIではユービッシュ体が観察されなかった。Fukkoku-*Rfl* および CMS 系統ではいずれのステージにおいてもユービッシュ体は観察されなかったが、Fukkoku-*Rfl* ではステージIIIにユービッシュ体に類似した電子密度の高い物質が確認された。

⑤小孢子

ステージIでは小孢子的形態に差異はなかったが、ステージIIでは、Fukkoku-*Rfl* および CMS 系統において発芽孔の拡大が見られた。ステージIIIにおいては、NK-305-*Rfl* および CMS 系統の発芽孔に異常が観察された。花粉壁について、CMS系統ではすべてのステージにおいて異常が確認されたが、他の供試材料はいずれも正常であった。

(3) 考察

タペート発達遺伝子発現解析によれば、タペート発達プログラムの遅延(NK-305-*Rfl*)、あるいは進行異常(Fukkoku-*Rfl*)が示唆された。微細構造のレベルではNK-305-*Rfl* と fukkoku-*Rfl* においてミトコンドリア電子密度低下が認められた。これより、遺伝子発現の異常をもた

らす要因はこの時期に出現していると思われる。得られたデータは、わずかでもオリゴマーフォームが減少すれば微細構造レベルの形態異常の発現が変わると解釈することもできる。このことは、薬発達プログラム進行のキーとなる量的なシグナルがミトコンドリアを経由しており、オリゴマーフォームはそれを調節できることを示唆している。また、ミトコンドリア形態異常がオリゴマーフォームの量と相関する可能性も考えられる。今後この視点からの研究が必要であろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Arakawa Takumi, Kagami Hiroyo, Katsuyama Takaya, Kitazaki Kazuyoshi, Kubo Tomohiko	4. 巻 12
2. 論文標題 A Lineage-Specific Paralog of Oma1 Evolved into a Gene Family from Which a Suppressor of Male Sterility-Inducing Mitochondria Emerged in Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 2314 ~ 2327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gbe/evaa186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Arakawa Takumi, Matsunaga Muneyuki, Matsui Katsunori, Itoh Kanna, Kuroda Yosuke, Matsuhira Hiroaki, Kitazaki Kazuyoshi, Kubo Tomohiko	4. 巻 20
2. 論文標題 The molecular basis for allelic differences suggests Restorer-of-fertility 1 is a complex locus in sugar beet (<i>Beta vulgaris</i> L.)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Plant Biology	6. 最初と最後の頁 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12870-020-02721-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Arakawa Takumi, Sugaya Hajime, Katsuyama Takaya, Honma Yujiro, Matsui Katsunori, Matsuhira Hiroaki, Kuroda Yosuke, Kitazaki Kazuyoshi, Kubo Tomohiko	4. 巻 6
2. 論文標題 How did a duplicated gene copy evolve into a restorer-of-fertility gene in a plant? The case of Oma1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 190853 ~ 190853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsos.190853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kubo Tomohiko, Arakawa Takumi, Honma Yujiro, Kitazaki Kazuyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 What Does the Molecular Genetics of Different Types of Restorer-of-Fertility Genes Imply?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 361 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants9030361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa Takumi, Uchiyama Daisuke, Ohgami Takashi, Ohgami Ryo, Murata Tomoki, Honma Yujiro, Hamada Hiroyuki, Kuroda Yosuke, Taguchi Kazunori, Kitazaki Kazuyoshi, Kubo Tomohiko	4. 巻 13
2. 論文標題 A fertility-restoring genotype of beet (<i>Beta vulgaris</i> L.) is composed of a weak restorer-of-fertility gene and a modifier gene tightly linked to the Rf1 locus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0198409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0198409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa Takumi, Ue Sachiyo, Sano Chihiro, Matsunaga Muneyuki, Kagami Hiroyo, Yoshida Yu, Kuroda Yosuke, Taguchi Kazunori, Kitazaki Kazuyoshi, Kubo Tomohiko	4. 巻 132
2. 論文標題 Identification and characterization of a semi-dominant restorer-of-fertility 1 allele in sugar beet (<i>Beta vulgaris</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 227 ~ 240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-018-3211-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 荒河 匠、鏡豊代、勝山高也、菅谷元、黒田洋輔、松平洋明、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 花粉不稔ミトコンドリアを抑制する核遺伝子の分子進化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒河 匠、菅谷 元、松井 克憲、北崎 一義、久保 友彦
2. 発表標題 ビート花粉稔性回復遺伝子誕生には遺伝子重複が関与した
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 菜奈 , 北崎 一義 , 桂 直幸 , 松平 洋明 , 黒田 洋輔 , 久保 友彦
2. 発表標題 テンサイ細胞質雄性不稔性における不完全な花粉稔性回復の微細構造解析
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒河匠、鏡豊代、勝山高也、菅谷元、黒田洋輔、松平洋明、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイ花粉稔性回復遺伝子Rf1の分子進化について
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒河匠、松永宗幸、上幸代、松井克憲、伊藤菜奈、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイ花粉稔性回復遺伝子Rf1における対立遺伝子の強さについて
3. 学会等名 日本育種学会、第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿俣陽平、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 ガーデンビート遺伝資源における維持系統遺伝子型同定の試み
3. 学会等名 NPO法人グリーンテクノバンクてん菜研究会第17回技術発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保友彦、荒川匠、北崎一義
2. 発表標題 育種形質として現れる核と細胞質の相互作用
3. 学会等名 日本育種学会、第136回講演会・第61回シンポジウム（シンポジウム・ワークショップ）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 栞奈 , 荒河 匠 , 松平 洋明 , 黒田 洋輔 , 北崎 一義 , 久保 友彦
2. 発表標題 テンサイ細胞質雄性不稔における不完全な花粉稔性回復の遺伝子発現解析
3. 学会等名 日本育種学会、第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井 克憲, 荒川 匠, 松平 洋明, 黒田 洋輔, 北崎 一義, 久保 友彦
2. 発表標題 由来の異なるテンサイrf1対立遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本育種学会、第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿俣陽平、柏倉淳、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 ガーデンビートにおける稔性回復遺伝子の多様性に関する予備的調査
3. 学会等名 日本育種学会、第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鹿俣陽平、柏倉淳、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 ガーデンビートにおけるミトコンドリアDNAと花粉稔性回復遺伝子の多様性
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Arakawa, Kazuyoshi Kitazaki, Muneyuki Matsunaga, Rika Yui-Kurino, Hiroaki Matsuhira, Tetsuo Mikami, Tomohiko Kubo
2. 発表標題 Molecular interaction of cytoplasmic male sterility in sugar beet
3. 学会等名 76th The International Institute of Sugar Beet Research (IIRB) Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takumi Arakawa, Kazuyoshi Kitazaki, Muneyuki Matsunaga, Rika Yui-Kurino, Hiroaki Matsuhira, Tetsuo Mikami, Tomohiko Kubo
2. 発表標題 Molecular basis of nuclear-mitochondrial interaction in cytoplasmic male sterility in sugar beet
3. 学会等名 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒河 匠, 上 幸代, 佐野 千紘, 鏡 豊代, 吉田 有宇, 北崎 一義, 久保 友彦
2. 発表標題 テンサイCMSの花粉稔性にはpreSATP6複合体の蓄積量が相関する
3. 学会等名 第134回日本育種学会講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒河 匠, 勝山 嵩也, 菅谷 元, 本間 雄二郎, 佐野 千紘, 久保 友彦
2. 発表標題 花粉稔性回復遺伝子の分子進化過程は核 - ミトコンドリアコンフリクト仮説に符合するか
3. 学会等名 第2回 日本共生生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒河 匠, 松永 宗幸, 上 幸代, 松井 克憲, 伊藤 菜奈, 北崎 一義, 久保 友彦
2. 発表標題 テンサイ花粉稔性回復遺伝子 Rf1における対立遺伝子の強さについて
3. 学会等名 日本育種学会 第135回講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本間 雄二郎 (Honma Yujiro) (30800495)	北見工業大学・工学部・助教 (10106)	
研究分担者	北崎 一義 (Kitazaki Kazuyoshi) (60532463)	北海道大学・農学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	田口 和憲 (Taguchi Kazunori) (80414754)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・グループ長 (82111)	削除：2018年10月19日

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松平 洋明 (Matsuhira Hiroaki) (90549247)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道 農業研究センター・主任研究員 (82111)	追加：2018年10月19日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関