

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380001

研究課題名（和文） 作物における生殖様式の多様性をもたらす機構の解析

研究課題名（英文） Studies for different reproductive strategies in Chenopodiaceae crops

研究代表者

三上 哲夫（MIKAMI TETSUO）

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50133715

研究成果の概要(和文)：

アカザ科作物のテンサイおよびハウレンソウはそれぞれ遺伝的均一化をもたらす自家受精を妨げる仕組みとして細胞質雄性不稔(CMS)および雌雄異株性を発達させた。本研究では、それぞれの仕組みに注目して、植物における生殖様式の多様性をもたらす機構の解明を試みた。

テンサイのOwen型CMSをもたらすタンパク質preSATP6はミトコンドリア内膜でホモ多量体を形成する。本研究では、稔性回復核遺伝子として同定された*Rf1*の翻訳産物はRF1-preSATP6複合体の形成を通じてpreSATP6ホモ多量体の総量を減少させることによって、花粉稔性回復をもたらしている可能性を示した。さらに、ハマフダンソウを含むテンサイ近縁野生種において、*Rf1*座は少なくとも16種のアレルが分化していることを明らかにした。Owen CMSとは由来を異にするCMS系統における雄性不稔発現メカニズムの解析と併せて、*Rf1*座の多様なアレルの進化機構を解析するのが次の課題となる。

ハウレンソウと同じSpinacia属の植物種 *S. turkestanica*および*S. tetrandra*における性型を調査した結果、いずれもハウレンソウと同様に雌雄異株の植物であることを見出した。しかしながら、*S. tetrandra*の一部のアクセシオンはハウレンソウおよび*S. turkestanica*の雄株が共通して持っているDNA配列(雄特異的DNA)を欠くことが判明した。さらに、この*S. turkestanica*アクセシオンはハウレンソウとは異なる葉緑体ゲノム配列を有することも明らかにした。すなわち、Spinacia属は少なくとも2つのグループによって構成されており、性決定遺伝子座あるいは性染色体の構造が分化している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

Sugar beet and spinach, members of Chenopodiaceae, have evolved different strategies to prevent self-fertilization and promote outcrossing. The former has developed cytoplasmic male sterility (CMS) and the latter has evolved dioecism. Molecular mechanisms of the CMS and the dioecism in the crops were analyzed to understand the diversity of reproductive strategies in plants.

In sugar beet, Owen CMS-associated pre-SATP6 is a mitochondrial membrane protein that assembles into a homogeneous 200-KDa protein complex. Here we found that the product of a nuclear restorer gene (*Rf1*) for Owen CMS interacts with preSATP6, resulting in the significant reduction of the 200-KDa protein complex and restoration of pollen fertility. We also identified at least 16 distinct

alleles in the Rf1 locus from sugar beet and its close relatives, using a variety of DNA markers. The molecular mechanisms of other sources of CMS and evolution of Rf1 locus are worthy of further investigation.

Spinach (*Spinacia oleracea*) is a dioecious plant. Our study revealed that its wild relatives, *S. turkestanica* and *S.tetrandra*, are also dioecious plants with unisexual flowers morphologically quite similar to those of spinach. We identified male specific DNA sequences in spinach, which were also found to be male-specific for all accessions of *S. turkestanica* and some accessions of *S.tetrandra* examined. The accessions from the wild species were shown to possess chloroplast intergenic sequences (*trnL-rpl32*) identical to that of spinach (*S. oleracea*). However, most accessions of *S.tetrandra* lack the DNA sequences specific for male spinaches, whose *trnL-rpl32* sequences are distinctive from that of spinach. The results suggested that the sex determining locus and sex chromosomes are differentiated among members of genus *Spinacia*.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野:農学

科研費の分科・細目:農学・育種学

キーワード:植物育種・遺伝

1. 研究開始当初の背景

生殖は、遺伝子を混ぜ合わせて多様な子孫を産み出すシステムである。動物は、性染色体を使って生殖のパートナーとなる雌雄を厳密に区別している。

一方、ほとんどの植物は、1個の花に雌ずいと雄ずいを含む両性花をつける。動物と違って、動くことが出来ない植物は、生殖のパートナーをみつけられないというリスクを常に背負っているので、両性花をつけることは種の存続上とても重要である。この特性を利用し自家受精を達成させた植物も少なくない。

他方、他家受精植物においては、パートナーが見つからないときの保険として両性花株を残すと同時に、遺伝的均一化をもたらす自

家受精の回避のために、雄ずいの退化した雌花株(雄性不稔株)を集団に混在させる例がしばしばみられる。また、動物のように性染色体を使って雌雄性を区別する植物や受精を伴わない無融合生殖(アポミクシス)で子孫を増やす植物もあり、生育環境に適応して発達した植物の生殖戦略は多様性に富む。

動物では、ヒトのSRYをはじめ性決定遺伝子が同定され、生殖メカニズムの研究の進展は目覚ましいが、植物の研究はようやく緒についたばかりである。

アカザ科作物のテンサイとホウレンソウは進化的に近縁である。遺伝的均一化をもたらす自家受精を妨げる主要な仕組みとして前者

が細胞質雄性不稔を採用したのに対して、後者は雌雄異株性を発達させた。

本研究の目的は、アカザ科の両作物を研究対材料に用いて、植物における生殖様式の多様性をもたらす機構の本質に迫ることである。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでに正常型テンサイとハイブリッド育種に利用されているOwen型細胞質雄性不稔テンサイのミトコンドリアゲノムについて、全塩基配列を決めた。両ゲノムの配列を比べるとともに遺伝子発現を比較分析することによって、雄性不稔の原因ミトコンドリア遺伝子 (preSATP6と命名) の発見に成功した。

さらに、Owen型細胞質雄性不稔に働く稔性回復核遺伝子Rf1のポジショナルクローニングを試みた。その結果、Rf1は葯壁組織でのみ発現する金属プロテアーゼ遺伝子 (MPLと命名) であることが判明した。

植物細胞には損傷を受けた異常タンパク質を取り除く目的で、様々なプロテアーゼが用意されている。雄性不稔原因遺伝子atp6プレ配列はミトコンドリアの働きを邪魔する異常タンパク質を作るようである。テンサイ祖先種において、atp6プレ配列が産まれると同時に既存のプロテアーゼ遺伝子の一つがゲノム内で重複し、雄性不稔原因タンパク質排除を専門任務とするMPL (すなわちRf1) が出来上がったというのが、Rf1誕生に関する作業仮説である。本研究ではテンサイ (アカザ科フダンソウ属) とその近縁種を用いて、雄性 (花粉) 不稔性成立のメカニズム解明を企てる。

一方、テンサイと同じアカザ科ホウレンソウは雌雄異株植物である。雌株と雄株の遺伝子型はそれぞれXX、XY、またしばしばみつかるとの間性株 (1個体内に雌花と雄花をつける) の遺伝子型は X^mX^m または X^mX で、X、 X^m 、Yは同一座のアレルと仮定されている。ホウレンソウにおける雌雄異

株化に関しては、祖先型の間性を出発点として“gain of function”型のYアレルの誕生により雄株が、他方“loss of function”型のXアレルの誕生により雌株が出現したというのが申請者らの作業仮説である。事実、YアレルはXアレルに対し完全優性を示し、また既知の X^m (間性アレル) はYに対しては完全劣性、Xに対しては優性に働く。本研究では、ホウレンソウ性決定遺伝子座の構造解析とホウレンソウと同じSpinacia属植物種を用いて、Spinacia属における雌雄異株の成立メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

テンサイにおける細胞質雄性不稔性 (CMS) 成立のメカニズム解析

- (1) Owen CMS の原因遺伝子および稔性回復核遺伝子として同定された preSATP6 および MPL の翻訳産物間の生化学的な相互作用関係を調査する。
- (2) ハマフダンソウを含むテンサイ近縁野生種を供試し、MPL とその祖先配列の有無やコピー数を調べ、一部については構造を解析する。

ホウレンソウにおける雌雄性成立のメカニズム解析

- (1) ホウレンソウ (*Spinacia oleracea*) の雄性決定遺伝子 Y と共分離する AFLP マーカーの開発およびそれらの STS 化を通じて Y 共分離 STS マーカーを作成する。
- (2) Spinacia 属にはホウレンソウの他に、野生種の *S. tetrandra* および *S. turkestanica* がある。ホウレンソウ在来種に加えて、この野生種を複数個体数育成し、これらの性表現型を調査する。
- (3) 葉緑体 DNA 配列およびホウレンソウ Y 共分離 DNA 配列の有無に基づいて、Spinacia 属における遺伝的類縁関係およ

び性決定機構の多様性について評価を試みる。

4. 研究成果

テンサイにおける細胞質雄性不稔性(CMS)成立のメカニズム解析

- (1) Owen CMS の原因ミトコンドリアタンパク質 preS ATP6 と稔性回復核遺伝子の翻訳産物 RF1 との相互作用を調べた。その結果、preS ATP6 に結合するタンパク質は RF1 のみであり、ミトコンドリア内膜で RF1-preS ATP6 複合体が形成されることにより、preS ATP6 ホモ多量体の総量が減り、花粉稔性回復がもたらされる可能性が示された。
- (2) Owen CMS に働く Rf1 の遺伝子型判別マーカーを開発し、これを用いて Rf1 座に少なくとも 16 種のアレルが分化していることを明らかにした。家畜ビートやフダンソウの在来品種には多様なアレルが含まれているようである。
- (3) Owen CMS とは由来を異にする CMS 系統について雄性不稔発現メカニズムの解明を図る。併せて Rf1 座の多様なアレルの進化機構を解析するのが次の課題である。

ハウレンソウにおける雌雄性成立のメカニズム解析

- (1) 120 個体からなる Y 分離集団において、Y と共分離が確認された優性の DNA マーカーを新規に 5 個開発した。Y 共分離 DNA マーカーは既知のもの(2 個)と合わせて、合計 7 個になった。
- (2) 前述の 7 個の Y 共分離 DNA 断片(マーカー)の有無と性発現に関して、西南アジア、東アジアおよびヨーロッパの各地から収集されたハウレンソウ在来品種を調査した。その結果、6 個の DNA 断片について

は、供試したハウレンソウ在来品種のいずれにおいても雄性(もしくは、雄性決定遺伝子)との間に強固な連関性(アソシエーション)を見出すことができた。以降、この 6 個の DNA 断片を雄特異的 DNA 断片と称する。

- (3) Spinacia 属の野生種 *S.tetrandra* および *S. turkestanica* それぞれについて複数のアクセシオンを育成し各個体の性型を調査した。その結果、いずれの野生種もハウレンソウと同様に雌雄異株であることが判明した。さらに、どちらの野生種も花器形態に関して、ハウレンソウと顕著な差異は見出されなかった。
- (4) さらに、これらの野生種における雄株および雌株に対して、ハウレンソウの雄特異的 DNA 配列の有無を調査した。その結果、*S. turkestanica* の全アクセシオンおよび *S. tetrandra* の XX アクセシオンについては、当該 DNA 配列と雄性(もしくは、雄性決定遺伝子)との間に強固な連関性(アソシエーション)を見出すことができた。しかしながら、*S. tetrandra* の XX アクセシオンの雄株および雌株のいずれも、ハウレンソウ雄特異的 DNA 配列を持っていないことが判明した。
- (5) 上述の *S. tetrandra* および *S. turkestanica* の葉緑体配列(*trnL-rpl32* 領域)を解析し、クラスター分析を行った。その結果、ハウレンソウの雄特異的 DNA 配列が雄株から見出されたアクセシオンはいずれも *S. oleracea* とは区別されなかった。一方、当該 DNA 配列が雌・雄いずれからも検出されない *S. tetrandra* のアクセシオンは *S. oleracea* とは独立のグループを形成した。
- (6) 今後は、本研究を通じて見出された Spinacia 属の二つのグループ間で性染色体およびゲノム構造の比較解析を通じて

性決定機構の進化解明に向けた研究を
展開する。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 三上 哲夫、Molecular basis of cytoplasmic male sterility in beets: an overview、Plant Genetic Resources. Characterization and Utilization、査読有、9 巻、2011、284-287.
DOI: 10.10171/S1479262111000177
- ② 小野寺 康之、Mapping of the genes for dioecism and monoecism in Spinaciaoleracea L.: evidence that both genes are closely linked、Plant Cell Reports、査読有、30 巻、2011、965-971.
DOI: 10.1007/s00299-010-0998-2

[学会発表] (計 2 件)

- ① 三上 哲夫、Mitochondrial genome diversity and male sterility in leaf and garden beets.、VII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding、2011.9.20、Belgium, Ghent
- ② 小野寺 康之、Genetic analysis of the genes for dioecism and monoecism in Spinaciaoleracea L.、VII EUCARPIA Leafy Vegetables Working Group Meeting、2011.8.24、France, Lille

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 哲夫(MIKAMI TETSUO)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号:501333715

(2)研究分担者

小野寺 康之(ONODERA YASUYUKI)
北海道大学・大学院農学研究院・講師
研究者番号:80374619