

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25年 5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380008

研究課題名（和文）ダイコンの雄性不稔・稔性回復システムの分子機構とその多様性形成メカニズムの解明

研究課題名（英文）Studies on molecular mechanisms for radish male sterility/fertility restoration system and its diversification

研究代表者

寺地 徹 (TERACHI TORU)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90202192

研究成果の概要（和文）：ダイコンの雄性不稔と稔性回復の分子機構、ならびにこの現象に関わる遺伝子の進化を解明するため種々の実験を行った。その結果、稔性回復遺伝子の1つ、*pprB* 遺伝子の産物がミトコンドリアの雄性不稔原因遺伝子 *orf138* の mRNA に結合し、その2次構造の変化を通じて翻訳を阻害することがわかった。またオグラ型雄性不稔細胞質と正常型細胞質のミトコンドリアゲノムの比較から、*orf138* がゲノムの進化的な構造変異に伴い偶然生じた新規遺伝子であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In order to reveal molecular mechanisms underlying male sterility/fertility restoration in radish and the evolution of mitochondrial and nuclear genes relevant to the phenomena, a series of experiments were conducted. Molecular study revealed that protein product from the gene *pprB* (one of the fertility restorer genes in radish) binds to mRNA of the mitochondrial male-sterility gene *orf138* and inhibit its translation through the structural change of mRNA. Mitochondrial genomics revealed that *orf138* was created accidentally by the structural changes of mitochondrial genomes between normal and Ogura cytoplasm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ダイコン、雄性不稔、稔性回復遺伝子、PPR、ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

植物体の生育は正常であるにもかかわらず花粉ができない現象を雄性不稔という。雄性不稔は高等植物に広く観察される現象で、一般にミトコンドリアゲノム上の遺伝子の何らかの異常により生じることが知られている。一方、異常なミトコンドリア遺伝子の

働きを抑え、花粉稔性を回復させる遺伝子（稔性回復遺伝子、以下 Rf 遺伝子）が核ゲノムに存在することも知られており、雄性不稔と稔性回復はミトコンドリアと核のゲノム上の遺伝子の相互作用により決定されるユニークな形質として知られている。

またこの形質は、様々な作物の F₁ 品種育

成に用いられる育種上重要な遺伝形質のひとつであり、イネ、トウモロコシなどいくつかの作物でミトコンドリアの雄性不稔原因遺伝子が同定されていた (e. g. Hanson & Bentolila 2004)。一方、ペチュニア (Bentolila et al. 2002)、ダイコン (e. g. Koizuka et al. 2003)、イネ (e. g. Kazama & Toriyama 2003) など Rf 遺伝子が相次いでクローニングされ、遺伝子とその産物の分子的理解が進んだ (Chase 2007)。しかし雄性不稔や稔性回復の分子機構やこの現象に関わる遺伝子の進化については、断片的な理解にとどまっていた。

2. 研究の目的

ミトコンドリアの雄性不稔原因遺伝子 (*orf138*) と、それに対する Rf 遺伝子 (*pprB*) の両方がクローニングされており、雄性不稔と稔性回復現象の分子生物学的研究が可能な数少ない作物のひとつ、ダイコンをモデルに、雄性不稔と稔性回復の分子機構を明らかにすることを目的とする。またこの現象に関わる遺伝子の多様性の全貌と進化のプロセスを明らかにすることも目的のひとつとした。

3. 研究の方法

(1) オグラ型雄性不稔に対する Rf 遺伝子の 1 つ、*pprB* 遺伝子の様々なアリルから生じる変異体タンパク質と、雄性不稔の原因遺伝子であるミトコンドリア *orf138/orf125* 遺伝子の mRNA との結合をゲルシフトアッセイで調べる。

(2) ダイコン野生種である *R. raphanistrum* から *pprB* 遺伝子ホモログを分子生物学的方法で単離し、オグラ型細胞質を持つ雄性不稔ナタネに導入して、この遺伝子の稔性回復機能を検討する。また *pprB* 遺伝子を持たないロシアのクロダイコンから Rf 遺伝子の候補となり得る新規 PPR 遺伝子ホモログを単離し、構造を明らかにする。

(3) *pprB* とは異なる新規 Rf 遺伝子 (Rft) に連鎖する STS マーカーを作製し、ハマダイコンを花粉親として育成した 190 個体の交配集団を用いて Rft のラフマッピングを行う。

(4) 日本各地に自生する野生のハマダイコンの調査を行い、現地で雄性不稔を示している個体を採集し、オグラ型細胞質、あるいはそれ以外の新規細胞質を持つかどうか、PCR 分析により検討する。

(5) ダイコンのミトコンドリアゲノムの多型解析の基礎となる、正常型、オグラ型のゲノム配列を完全解読する。

(6) ダイコンの *pprB* 遺伝子の多型を広く調査し、この遺伝子座における多型形成の機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) Rf として働く中国ダイコン ‘園紅’ 由来の PPRB タンパク質が *orf138* の mRNA と直接結合することがわかった ($KD=10^{-9}$ 程度)。様々な部分長 RNA を用いた実験より、PPRB タンパク質はこの RNA 中の最低 2 カ所と結合することが示唆された。特に *orf138* の mRNA 中の翻訳開始コドン直下の 3' 領域との結合が Rf 機能に重要だと考えられた。

一方、予想に反して、Rf の機能がない (rf として働く) 日本の品種 ‘コセナ’ の PPRB タンパク質も *orf138* の RNA と強く結合することがわかった ($KD=10^{-9}$ 程度; 園紅の PPRB と同程度)。

以上の知見から、*pprB* 様遺伝子の稔性回復機能は RNA との結合親和性と完全に一致しないことが示唆された。そこで、タンパク質結合後の *orf138* の mRNA における高次構造の変化を検証したところ、Rf 存在下で RNA 高次構造形成の促進が示唆された。以上の研究から、PPRB タンパク質は *orf138* の mRNA と結合し、その 2 次構造を変化させることがわかり、このことによる翻訳阻害が最終的な稔性回復につながる、というモデルが考えられた。

(2) *R. raphanistrum* の *pprB* 遺伝子ホモログを雄性不稔ナタネに導入した結果、花粉稔性が回復した。この実験により、この遺伝子が Rf として機能していることが証明された。またクロダイコンの PPRB 遺伝子ホモログの構造を決定し、この遺伝子座の成立過程を考察した。

(3) 我が国のハマダイコンの集団で、主要な Rf として働いているのは、*pprB* 遺伝子ではなく、Rft であることがわかった。ハマダイコンと ‘MS 源助’ との交配集団を用いた連鎖分析をすすめた結果、Rft と完全に連鎖する DNA マーカーが得られた。

(4) 研究期間の3月中旬~7月初旬の開花シーズンに、宮崎、鹿児島、福岡、熊本、和歌山、沖縄、島根、鳥取、福井、神奈川、東京、三重、愛知、石川、高知、徳島、香川、青森、秋田、および北海道など、ほぼ全国のハマダイコンを調査し、現地で実際に雄性不稔を示している個体を多数(約 200 個体)採取した。これらの個体から DNA を単離し、PCR 法によりミトコンドリアゲノムのタイプを調査したところ、すべてオグラ型あるいはその変種のコセナ型と判定され、新規雄性不稔細胞質は発見できなかった。

また、雄性不稔個体とともに現地で採取した、ハマダイコンの可稔個体のミトコンドリアゲノムも合わせて調査したところ、日本のハマダイコンには、オグラ型/コセナ型雄性不稔細胞質が高頻度に存在する一方、核には雄性不稔の発現を抑制する Rf 遺伝子が広く分布していることがわかった。

コセナ型雄性不稔の原因遺伝子であるミトコンドリアの *orf125* 遺伝子の多型をシーケンシングにより調べたところ、三重県の1個体に、東北地方を中心に日本で広く観察される既知 *orf125* 配列と比べて1つの SNP を持つものが観察された。三重県のハマダイコンの集団には、同じ SNP を有するオグラ型の個体も存在したことから、*orf138* から *orf125* が生じる欠失変異、すなわちオグラ型からコセナ型への進化は、日本各地のハマダイコンで多元的に生じていることが示唆された。

(5) 正常型とオグラ型のミトコンドリアゲノムの違いを明らかにするため、‘打木源助’ (正常型) 及び ‘MS 源助’ (オグラ型) の mtDNA の全塩基配列を次世代シーケンサーにより解読した。その結果、正常型 mtDNA は全長 244, 037bp、オグラ型 mtDNA は全長 258, 426bp の環状 DNA 分子と考えられること、*orf138* は、両型の分化にともなう mtDNA の大規模な再構成の過程で偶然生じた、新規遺伝子であることがわかった。

(6) ハマダイコン及びアザキダイコンの採集調査を行い、7 地域約 30 個体から *pprB* 遺伝子のコード領域を含む全長約 3. 2kb の DNA 断片をクローニングし、得られた DNA 配列データから種内変異の量やパターンを解析した。さらに *pprB* 遺伝子と連鎖するパラログ遺伝子群との比較解析を行った。

その結果、各地域集団間の遺伝的な分化は認められず、中立性からの大きな逸脱も検出されなかった。領域全体の塩基多様度 (~ 0. 1%) は平均的な植物集団と比べて多少低いものの、コード領域の一部に変異量の増大が認められ、染色体の不等交叉に伴う非相同配列間の遺伝子変換が、*pprB* 遺伝子領域の変異パターンに局所的な影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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 8 件)

① Elucidation of the RNA recognition code for pentatricopeptide repeat proteins involved in organelle RNA editing in

plants.

Yagi, Y., Hayashi, S., Kobayashi, K., Hirayama, T. and Nakamura, T.
PLoS ONE 8: e5728 査読有 2013

② A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.).

Tanaka, Y., Tsuda, M., Yasumoto, K., Yamagishi, H. and Terachi, T.
BMC Genomics 13: 352 査読有 2012
doi:10.1186/1471-2164-13-352

③ Mechanistic insight into pentatricopeptide repeat proteins as sequence-specific RNA-binding proteins for organellar RNAs in plants.

Nakamura, T., Yagi, Y. and Kobayashi, K.
Plant Cell Physiol. 53: 1171-1179 査読有 2012

④ Identification and characterization of the RNA binding surface of the pentatricopeptide repeat protein.

Kobayashi, K., Kawabata, M., Hisano, K., Kazama, T., Matsuoka, K., Sugita, M. and Nakamura, T.
Nucleic Acids Res. 40: 2712-2723 査読有 2012

⑤ Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*.

Honma, Y., Yoshida, Y., Terachi, T., Toriyama, K., Mikami, T. and Kubo, T.
Current Genetics 57: 261-270 査読有 2011
doi: 10.1007/s00294-011-0345-3

[学会発表] (計 19 件)

① 安本景太、高木宏樹、寺内良平、寺地 徹、山岸 博
オグラ型雄性不稔ダイコンの稔性回復に関わる Rft 遺伝子座の構造解析
日本育種学会第 123 回講演会 (2013. 3. 27)
東京農業大学

② 鳥塚悠太、今村 順、肥塚信也
ダイコンミトコンドリアゲノムのプロモーター構造とゲノム組換えの関連性
日本育種学会第 123 回講演会 (2013. 3. 27)
東京農業大学

③ 山岸 博
オルガネラゲノム工学による細胞質雄性不稔の開発

日本育種学会第 122 回講演会 (2012.9.14)
京都産業大学

④寺地 徹

ダイコンのミトコンドリアゲノムの多様性とミトコンドリアと相互作用する核遺伝子の進化

日本育種学会第 122 回講演会 (2012.9.14)
京都産業大学

⑤鳥塚悠太、今村 順、肥塚信也

ダイコンミトコンドリアゲノムにコードされる *atp8* 遺伝子座の転写開始点と転写後過程の解析

日本育種学会第 122 回講演会 (2012.9.15)
京都産業大学

⑥富岡関子、安本景太、平出美穂子、高橋 亮、山岸 博、寺地 徹

ハマダイコンにおけるオグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 (*ppr-B*) の分子集団遺伝学的解析

日本育種学会第 121 回講演会 (2012.3.30)
宇都宮大学

⑦田中義行、富岡関子、山岸 博、寺地 徹

ダイコンの OS40 型ミトコンドリアゲノムの構造解析-正常型およびオグラ型との比較-

日本育種学会第 121 回講演会 (2012.3.30)
宇都宮大学

⑧鳥塚悠太、今村 順、肥塚信也

ダイコン細胞質雄性不稔遺伝子 *orf125* を含む一次転写物の転写後過程の解析

日本育種学会第 121 回講演会 (2012.3.30)
宇都宮大学

⑨Tanaka, Y., Tsuda, M., Yasumoto, K., Yamagishi, H. and Terachi, T.

Mitochondrial genome analysis of radish (*Raphanus sativus*) by next-generation sequencing.

International Conference for Plant Mitochondrial Biology, (2011.5.15), Hohenroda, Germany

⑩Yasumoto, K., Imamura, J., Koizuka, C., Yamagishi, H. and Terachi, T.

A new fertility restorer gene for Ogura male-sterility found in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.).

International Conference for Plant Mitochondrial Biology, (2011.5.15), Hohenroda, Germany

京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：90202192

(2)研究分担者

山岸 博 (YAMAGISHI HIROSHI)

京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：10210345

黒坂 光 (KUROSAKA AKIRA)

京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：90186536

高橋 亮 (TAKAHASHI RYO)

京都産業大学・総合生命科学部・助教
研究者番号：50342811

(H23→H24：研究分担者)

中村 崇裕 (NAKAMURA TAKAHIRO)

九州大学・農学研究科・准教授
研究者番号：10464398

三宅 恵子 (MIYAKE KEIKO)

岐阜大学・男女共同参画推進室・准教授
研究者番号：40404058

肥塚 信也 (KOIZUKA NOBUYA)

玉川大学・農学部・教授
研究者番号：30433866

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺地 徹 (TERACHI TORU)