

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075001

研究課題名（和文） テンサイ雄性不稔性原因遺伝子と花粉稔性回復遺伝子の相互作用解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of interaction between male-sterility inducing gene and fertility restorer in sugar beet

研究代表者

久保 友彦 (KUBO TOMOHIKO)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：40261333

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：細胞質雄性不稔性、ミトコンドリア、核・細胞質相互作用、タンパク質品質管理、ミトコンドリア複合体、BN-PAGE

1. 研究計画の概要

細胞質雄性不稔性 (CMS) は原因遺伝子がミトコンドリアゲノムに存在する一方、核ゲノムに稔性回復遺伝子 (*Rf*) があると発現しない雄性不稔形質である。テンサイの CMS は他の植物とは全く異なる独自の遺伝子が CMS 原因遺伝子となっている上、*Rf* との相互作用も RNA を介することなく行われていることが申請者らの研究により明らかにされつつあった。本研究では、CMS をゲノム障壁の一つと位置づけ、*Rf* との相互作用の分子的基盤や、形質発現のメカニズムを明らかにするべく研究を行った。

CMS 原因遺伝子と *Rf1* との相互作用については、薬タンパク質や CMS 株培養細胞を用いた実験系を活用して行う。CMS 発現機構の解明については、CMS 株で発現低下する遺伝子クローンを収集して解析する。CMS ミトコンドリアの生理機能については、酸素電極による活性測定を行う。

2. 研究の進捗状況

(1) テンサイ *Rf1* と *preSntp6* の相互作用

①BN-PAGE により、CMS 原因遺伝子産物である *preSATP6* が形成するホモオリゴマーの分子量を調べた。その結果、花粉稔性回復薬において特異的に複合体の分子量が変化していた。稔性回復の過程で、CMS 株固有タンパク質複合体に構造変換が起こることを初めて明らかにできた。

②薬において減数分裂期から小孢子期にかけてのみ *RF1* タンパク質が検出された。並行して *preSATP6* 複合体を調べたところ、*RF1* タンパク質が検出される時期においてのみ電気泳動の移動度が増していた。

③ テンサイ CMS 株培養細胞に *Rf1* を形質転換して異所的に発現させた結果、*Rf1* が発現している細胞株においてのみ *preSATP6* 複合体の分子量が変化していることがわかった。これより、*Rf1* が CMS 株固有タンパク質複合体に構造変換を起こす因子であることが明らかになった。

④BN-PAGE と SDS-PAGE を組み合わせた解析により、*RF1* と *preSATP6* は同一の複合体に含まれることがわかった。これより、CMS 株固有タンパク質複合体の構造変換は、*preSATP6* ホモオリゴマーから *RF1-preSATP6* ヘテロオリゴマーへの組み替えであることが明らかになった。

(2) テンサイ *preSntp6* のミトコンドリアに対する作用

①ミトコンドリア内膜のタンパク質複合体を BN-PAGE で分画し、特異的な基質を用いて活性を測定する *in gel* アッセイを行った結果、各複合体の活性は CMS 株と正常株で変わらなかった。

②単離ミトコンドリアにおける酸素消費を酸素電極により測定した。その結果、CMS 株の State3 は正常株より有意に高かった。以上を総合すると、*preSATP6* は特定のミトコンドリア呼吸鎖複合体に影響を与

えることなく、単独でミトコンドリア機能を変えていると思われる。

(3) テンサイ CMS 株の葯形成過程における遺伝子発現の変更

テンサイ CMS 株の葯において発現が低下する遺伝子をサブプレッション・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション法により 215 個得ることができた。マクロアレーにより発現時期や組織を調べたところ、そのうちのいくつかは葯の形態異常が認められる以前から発現に異常があることがわかった。こうした遺伝子の解析を通じて、CMS 発現の機構に迫れるものと期待される。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

当初の目的に見合うデータが得られているため。研究遂行上の障害は、新たな実験系を開発することで克服できた。

4. 今後の研究の推進方策

今後も、以下の3点を中心に研究を進める。

(1) *Rf1* と *preSatp6* の相互作用

生化学的に詳細に検討する。特に *Rf1* と *rf1* という違いをもたらす要因の解明を試みる。

(2) *preSatp6* のミトコンドリアに対する作用

CMS 株において *State3* が亢進する機構を検討し、CMS の発現原理を考察する。

(3) CMS 株の葯形成過程における遺伝子発現の変更

CMS 発現との関連を検討する。

5. 代表的な研究成果

(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 15 件)

1. Yamamoto MP, Shinada H, Onodera Y, Komaki C, Mikami T, Kubo T, A male sterility-associated mitochondrial protein in wild beets causes pollen disruption in transgenic plants. **The Plant Journal**, 査読有り, vol. 54, pp. 1027-1036, 2008
2. Onodera Y, Nakagawa K, Haag JR, Pikaard D, Mikami T, Ream T, Ito Y, Pikaard CS, Sex-Biased lethality or transmission of defective transcription machinery in Arabidopsis. **Genetics**, 査読有り, vol. 180, pp. 207-218, 2008
3. Kubo T, Newton KJ, Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. **Mitochondrion**, 査読有り, vol. 8, pp. 5-14,

2008

4. Nishizawa S, Mikami T, Kubo T, Mitochondrial DNA phylogeny of cultivated and wild beets: relationships among cytoplasmic male-sterility-inducing and nonsterilizing cytoplasm. **Genetics**, 査読有り, vol. 177, pp. 1703-1712, 2007
5. Satoh M, Kubo T, Mikami T, The Owen mitochondrial genome in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): possible mechanisms of extensive rearrangements and the origin of the mitotype-unique regions. **Theoretical and Applied Genetics**, 査読有り, vol. 113, pp. 477-484, 2006

[学会発表] (計 33 件)

[図書] (計 1 件)