

機関番号：10101

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

研究成果の概要（和文）：細胞質雄性不稔性（CMS）は、140種以上の被子植物で認められる形質で、ミトコンドリアゲノム上のCMS原因遺伝子（S）がミトコンドリア機能不全を引き起こすことにより花粉不稔が発生すると説明されている。CMSでは他器官に影響を及ぼすことなく花粉形成過程が阻害されるが、これには花粉形成が高度にミトコンドリア依存であることが関係している。一方、核稔性回復遺伝子（Rf）はSの作用を打ち消すことができる。本研究では、テンサイからクローニングしたS因子である *preSatp6* と、Rfの一つである *Rf1* との相互作用を検討した。その結果、両者が翻訳産物レベルで相互作用することを明らかにした。相互作用は *Rf1* が発現する葯に限定され、その結果 *preSATP6* ホモオリゴマーの高次構造が変化する。この高次構造の変化は *Rf1* 強制発現により再現することができた。CMS発現の解明を目的として、CMS株で発現低下する遺伝子を215個収集した。また、シロイヌナズナRNAポリメラーゼの触媒サブユニット遺伝子のT-DNA挿入変異は母性遺伝できないが、一定の頻度で花粉を介して次世代に伝達される現象を見出した。ホウレンソウの雄性決定遺伝子と間性決定遺伝子は同一連鎖群に座乗しているが対立関係には無いことを明らかにした。さらに、ホウレンソウBACライブラリーを作成した。

研究成果の概要（英文）：Cytoplasmic male sterility (CMS) has been reported in more than 140 angiosperm species. Genes responsible for CMS (S gene) are encoded in mitochondrial genomes, while plants with S gene are male fertile when the plants have nuclear genes termed restorer of fertility (*Rf*). Molecular mechanism of the interaction between S and *Rf* genes was investigated in this study using sugar beet. Protein-protein interaction was detected between *preSatp6*, an S gene, and *Rf1*. This interaction was observed only in anthers in which *Rf1* was expressed. This study identified nuclear genes that were suppressed in CMS anthers. It was inferred that deleterious mutation could be inherited through pollen. This possibility was investigated using Arabidopsis mutant with defect in the genes encoding RNA polymerase. This mutation was confirmed to be transmitted through pollen. Spinach is a monoecious species with male heterogamety system. However, dioecious or hermaphroditic spinach emerges when an *M* gene exists. This study revealed that male determining gene and the *M* gene located on the same linkage group but resided in different genetic loci.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,300,000	0	15,300,000
2007年度	15,300,000	0	15,300,000
2008年度	15,300,000	0	15,300,000
2009年度	15,300,000	0	15,300,000
2010年度	9,000,000	0	9,000,000
総計	70,200,000	0	70,200,000

研究分野：植物分子育種学

科研費の分科・細目：農学・育種学（6001）

キーワード：生殖、雄性不稔性、核・細胞質相互作用、ミトコンドリア、性染色体

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物の雄性配偶子形成過程はミトコンドリア機能に高度に依存していると考えられている。それ故、ミトコンドリア機能不全が他の栄養器官に異常を与えることなく雄性器官のみを退化させる場合があると考えられている。細胞質雄性不稔性 (CMS) は、ミトコンドリアゲノム上の原因遺伝子 *S* がミトコンドリア機能不全を引き起こし、花粉不稔を引き起こす形質と考えられている。一方、核ゲノム上に稔性回復遺伝子 (*Rf*) が存在すると、花粉不稔は発現しない。テンサイは CMS に関する研究が比較的進んでいる植物種であり、*S* と考えられる *preSatp6* と、*Rf* の一つである *Rf1* がクローニングされていた。しかしながら、これらがいかなる相互作用を起こすのかは明らかではなかった。これは、花粉不稔が発生するか否かを決定する重要なイベントと考えられた。

(2) 陸上植物において、減数分裂以降配偶子形成までの過程は単相世代である。複相世代では (例えば生存に必須な遺伝子に生じた) 有害な突然変異はヘテロ接合の状態で維持されるが、単相世代では致命的となると予想される。そのため、有害な突然変異が単相世代を経て次世代に伝わることは考えにくい。しかしながら、現実にはそのような突然変異が代々受け継がれている。花粉は単相世代の雄性配偶体であるが、シロイヌナズナにおいて花粉を通じて有害な突然変異が次世代へ伝わる事例が見つかった。これがいかなるメカニズムによるものか不明であった。

(3) テンサイと同じアカザ科に属するハウレンソウは雌雄異株として知られているが、雌雄両機能を備えた間性も見出される。このような複雑な性型がどのようにして生ずるのかわかっていなかった。

2. 研究の目的

(1) テンサイ CMS 原因遺伝子 *preSatp6* と花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* の相互作用を分子レベルで検出する。

(2) テンサイ CMS 株の葯において、どのようなイベントが生じているのか明らかにする。

(3) シロイヌナズナ RNA ポリメラーゼ遺伝子に T-DNA が挿入された変異体を用いて、

花粉経路で有害な突然変異が次世代へ伝わる機構を明らかにする。

(4) ハウレンソウの性決定遺伝子の同定を進め、遺伝子クローニングを進める。

3. 研究の方法

(1) テンサイ正常株 (遺伝子型は [N]*rf1rf1*)、CMS 株 ([S]*rf1rf1*) および花粉稔性回復株 ([S]*Rf1Rf1*) の葯ミトコンドリアタンパク質を分析する。特に、*preSatp6* 翻訳産物の挙動を、タンパク質高次構造の視点から調べる。

(2) テンサイ CMS 原因遺伝子 *preSatp6* と花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* の相互作用を、タンパク質レベルで解析する。

(3) テンサイ葯における遺伝子発現を、正常株、CMS 株および花粉稔性回復株で比較する。

(4) シロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体を利用し、有害変異の遺伝の機構を調べる。

(5) ハウレンソウの性決定について、雄株および間性株の出現に関わる遺伝機構を調べる。

4. 研究成果

(1) 抗 *RF1* 抗体を作成し、葯における発現時期を特定した。その結果、減数分裂期から小孢子後期までの未成熟葯でのみ発現していた。一方、*RF1* が発現しても、*preSATP6* の翻訳産物蓄積量は変化していなかった。

(2) DDM やジギトニンを用いて可溶化した未成熟葯タンパク質に対して抗 *preSATP6* 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、CMS 株では相互作用するタンパク質が検出されなかったのに対し、ジギトニンを用いて可溶化した稔性回復株から 41kDa タンパク質が検出された。これが *RF1* であることを確認した。

(3) テンサイ CMS 株培養細胞では、*preSatp6* は発現しているが *Rf1* はほとんど発現していない。そこで、*Rf1*-FLAG をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターにつなぎ、培養細胞で発現させた。抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行ったところ、

preSATP6 と結合していることが明らかになった。

(4) CMS 株の肥大根ミトコンドリアタンパク質をジギトニンで可溶化した。その結果、preSATP6 が 250kDa のホモ多量体を形成している事がわかった。同様な複合体が葯からも検出された。このホモ多量体は、高濃度のジギトニンに対しても安定であることを確認した。

(5) ジギトニンで可溶化した稔性回復株の葯タンパク質においては、減数分裂期から小孢子後期まで 250kDa の preSATP6 ホモ多量体が著しく減少しており、その代わりに 200kDa と 150kDa の複合体が検出された。200kDa と 150kDa の複合体は CMS 株の葯では見つからない。稔性回復株であっても、成熟葯や肥大根からは見つからない。

(6) 35S:Rf1 を導入したテンサイ CMS 株培養細胞のミトコンドリアをジギトニンで可溶化した。これより、200kDa と 150kDa の複合体が検出された。

(7) 35S:Rf1 を導入したテンサイ CMS 株培養細胞のミトコンドリアにおいて、200kDa 複合体に preSATP6 と RF1 が含まれることを 2 次元電気泳動によって確かめた。

(8) 由来の異なる稔性回復株においても 200kDa 複合体が検出できることが分かった。以上より、テンサイ CMS においては preSATP6 が 250kDa ホモ多量体を形成することが雄性不稔性発現に不可欠であり、RF1 の機能は preSATP6 と結合して 250kDa ホモ多量体形成を阻害することだと結論した。このことは、preSATP6 そのものはミトコンドリアに害をもたらさないことを示唆する。

(9) テンサイ正常株、CMS 株および稔性回復株の花芽 total RNA を用いて cDNA サブトラクションを行った。このうち、CMS 株で発現が低下するものに注目し、350 クローンの塩基配列を決定した。重複を除き、215 個の塩基配列を得た。遺伝子産物を精査したところ、CMS 株で発現低下する遺伝子には、既知の雄性不稔変異体（核遺伝子の変異による）との共通点が認められた。ただし、完全には一致していない。

(10) 215 個の cDNA のうち、211 個についてマクロアレイ解析を行った。正常テンサイ葯を、減数分裂期、四分子期、小孢子期（前期）、小孢子期（後期）および花粉期に分別し、cDNA を合成した。これらをプロットし、215 個の遺伝子プローブをハイブリダイズさ

せた。その結果、各遺伝子の発現のピークに基づいて分類することができた。特に、減数分裂期、小孢子期（前期）および小孢子期（後期）は、遺伝子の種類やカテゴリーがバラエティに富んでいた。CMS テンサイにおけるこれらの遺伝子の発現低下と、雄性不稔性の発現が示唆される。

(11) 生命維持に必須なシングルコピー遺伝子であるシロイヌナズナの RNA ポリメラーゼ (polI, polII および polIII) の触媒サブユニット遺伝子の T-DNA 挿入変異に注目して有害変異の遺伝解析を行った。その結果、これらの T-DNA 挿入変異は母性遺伝できないが、一定の頻度で花粉を介して次世代に伝達される現象を見出した。次いで、形態観察によって当該機能喪失は雌性配偶体の発達停止を引き起こすことが判明した。一方、機能型 RNA ポリメラーゼ遺伝子を喪失しても、花粉発達および花粉管の初期伸長過程において RNA ポリメラーゼの活性が維持されることを組織化学的解析によって明らかにした。これにより、RNA ポリメラーゼ遺伝子の変異が単相世代を経て次世代へ伝達される。

(12) ホウレンソウの雄性決定遺伝子 (Y) 近傍領域の AFLP マーカーマッピングを行った結果、Y を含む 13.4cM の領域に 12 個のマーカーがマップされた。さらに、Y と間性決定遺伝子 (M) は同一連鎖群に座乗しているが対立関係には無いことを明らかにした。さらに、ホウレンソウ BAC ライブラリーを作成した。これにより、性決定遺伝子単離に向けた基盤整備ができた。

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 22 件)

① Kubo T, Kitazaki K, Matsunaga M, Kagami, H, Mikami T, Male sterility-inducing mitochondrial genomes: how do they differ?, Critical Reviews in Plant Sciences, 査読有, vol. 30, 2011, p. 378-400.

② Cheng D, Yoshida Y, Kitazaki K, Negoro S, Takahashi H, Xu D, Mikami T, Kubo T, Mitochondrial genome diversity in *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* (Leaf and Garden Beet Groups) and its implications concerning the dissemination of the crop, Genetic Resources and Crop Evolution, 査読有, vol. 58, 2011, p. 553-560.

③ Onodera Y, Yonaha I, Masumo. H, Tanaka A, Niikura S, Yamazaki S, Mikami

T, Mapping of the genes for dioecism and monoecism in *Spinacia oleracea* L.: evidence that both genes are closely linked, *Plant Cell Reports*, 査読有、vol. 30, 2011, 965-971.

④Kawanishi Y, Shinada H., Matsunaga M, Masaki Y, Mikami T, Kubo T, A new source of CMS found in wild beet and its relationship to other CMS types, *Genome*, 査読有、vol. 53, 2010, 251-256.

⑤Kitazaki K, Nomoto Y, Aoshima A, Mikami T, Kubo T, A mitochondrial gene involved in cytochrome *c* maturation (*ccmC*) is expressed as a precursor with a long NH₂-terminal extension in sugar beet, *Journal of Plant Physiology*, 査読有、vol. 166, 2009, p. 775-780.

⑥Yamamoto 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、vol. 54, 2008, p. 1027-1036.

⑦ Kubo T, Newton KJ, Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion*, 査読有、vol. 8, 2008, p. 5-14.

⑧ Nishizawa S, Mikami T, Kubo T, Mitochondrial DNA phylogeny of cultivated and wild beets: relationships among cytoplasmic male-sterility-inducing and nonsterilizing cytoplasms, *Genetics*, 査読有、vol. 177, 2007, p. 1703-1712.

⑨Matsuhira H, Shinada H, Yui-Kurino R, Hamato N, Umeda M, Mikami T, Kubo T, An anther specific lipid transfer protein gene in sugar beet: its expression is strongly reduced in male-sterile plants with Owen cytoplasm, *Physiologia Plantarum*, 査読有、vol. 129, 2007, p. 407-414.

「他、査読付き学術雑誌に 13 報」

〔学会発表〕(計 64 件)

①北崎一義・松平洋明・山本将之・久保友彦・三上哲夫、「テンサイ S 型細胞質雄性不稔株固有タンパク質 PRESATP6 の稔性回復株における挙動」、日本育種学会第 110 回講演会(愛媛大学)、2006 年 9 月

②松平洋明・久保友彦・三上哲夫、「テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔に伴って発現が上昇する核遺伝子のスクリーニング」、日本育種学会第 112 回講演会(山形大学)、2007 年 9 月

③久保友彦・松平洋明・北崎一義・亀井陽子・三上哲夫、「ユニークな遺伝子を採用したテンサイ稔性回復システム」、日本育種学会第

114 回講演会(シンポジウム)(滋賀県立大学)、2008 年 10 月

④鏡豊代・松平洋明・北崎一義・久保友彦・三上哲夫、「テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く花粉稔性回復遺伝子 Rf1 の発現解析」、第 32 回日本分子生物学会年会(パシフィコ横浜)、2009 年 12 月

⑤松永宗幸・北崎一義・久保友彦・三上哲夫、「テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔に作用する稔性回復遺伝子 Rf1 の機能ドメイン探索」、第 33 回日本分子生物学会年会(神戸国際会議場)、2010 年 12 月
「他、59 件」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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

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