

## 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3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580008

研究課題名（和文）ダイコンにおける花粉稔性回復遺伝子の単離

研究課題名（英文）Isolation of pollen fertility restoration genes in radishes.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：世界の栽培、野生ダイコンには、数種類の稔性回復遺伝子（Rf 遺伝子）が存在する。本研究ではこれらの Rf 遺伝子の特性を明らかにしようとした。まず我国のハマダイコンで *Rft* 遺伝子が発見された。*Rft* はオグラ型雄性不稔の遺伝子（*orf138*）の mRNA のプロセシングに関与する遺伝子であることが明らかになった。それに加えて、栽培・野生ダイコンの4品種・系統に特有の Rf 遺伝子が分布していることが明らかになった。そこでそれらの遺伝子の塩基配列を決定して、その結果に基づき、各遺伝子の成立過程を推定した。本研究全体として Rf 遺伝子が栽培・野生ダイコンにおいて多様に進化していることが示された。

研究成果の概要（英文）：We conducted the experiments to isolate Rf genes for the Ogura male-sterility and identify their characteristics. We found in Japanese wild radishes new *Rft* gene that is involved in the processing of mRNA of *orf138*, and exploited DNA markers tightly linked to the *Rft*. Furthermore, it was demonstrated that unique Rf genes are distributed in wild species, *Raphanus raphanistrum*, Japanese wild radish, and Chinese cultivated radishes, respectively. The DNA sequences of them were determined. Based on the results, the genetic and evolutionary processes of establishment of each Rf gene were estimated. This research project shows, as a whole, the diverse differentiations of Rf genes in wild and cultivated radishes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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

植物の育種において、雑種強勢育種（F<sub>1</sub> 育種）は歴史的に極めて重要な位置を占めてい

る。とりわけアブラナ科植物では顕著な雑種強勢が現れるため、F<sub>1</sub> 育種が多大な効果を発揮してきた。アブラナ科植物の F<sub>1</sub> 育種には自

家不和合性と細胞質雄性不稔性が利用されているが、後者のうちダイコンで発見されたオグラ型雄性不稔性は安定した発現を示すため、異なる属の作物にも導入され、最も広く利用されている。最近では、従自家不和合性を利用してきた多くの野菜においても、この細胞質が盛んに用いられている。

オグラ型雄性不稔性は、ミトコンドリアの *orf138* によって誘起される (Bonhomme ら, 1991)。我々はダイコン属植物におけるこの遺伝子の分布と塩基配列変異を明らかにするとともに (Yamagishi & Terachi 1996, 1997, 2001)、これに対する稔性回復遺伝子 (Rf 遺伝子) の野生、栽培ダイコンにおける分布を明らかにした (Yamagishi, 1998)。このうち、中国の栽培品種が持つ Rf 遺伝子 (*orf687*) が単離された (Koizuka ら, 2003)。ところが、その後の我々の大規模な調査により、*orf687* はごく一部の栽培品種が持つ Rf 遺伝子であり、多くの野生、栽培ダイコンには、これとは異なる Rf 遺伝子があることが明らかになった (Yasumoto ら, 2008a; 2008b)。またその後核内の稔性回復遺伝子の作用とは異なる機構で稔性回復が起ることが観察された (Giancola ら, 2007)。このようにオグラ型雄性不稔性に対する Rf 遺伝子の探索および作用機構の解明は、現実には緒についたばかりで、その全容解明にはほど遠い状態にあった。

## 2. 研究の目的

本研究では、アブラナ科作物の F<sub>1</sub> 育種において世界的に重要なオグラ型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子を単離して機能を明らかにすることを全体の目的とする。そのために、ダイコンにおいて大規模な交雑後代集団を作成し、個々の Rf 遺伝子の遺伝様式と Rf 遺伝子間の遺伝学的相互作用を明らかにするとともに、マップベースクロニングにより、Rf 遺伝子を単離・同定しようとした。それと平行して、個々の Rf 遺伝子が雄性不稔の原因である *orf138* の発現に与える影響を分子生物学的に明らかにしようとした。さらに単離された Rf 候補遺伝子を、ダイコンおよび *B. napus* の雄性不稔個体に形質転換し、実際の稔性回復機能を確認することを目的とした。

これらの結果にもとづき、野生、栽培ダイコンにおける Rf 遺伝子の分布と分化を明らかにしつつ、花粉稔性回復機構の全体的なメカニズムを把握すること。また、アブラナ科植物の広範な育種材料について、オグラ型雄性不稔に対する維持系統となり得るかまたはいかなる Rf 遺伝子を持つかを識別すること。さらに、それらの成果を応用することによって、特に *B. napus* などの油料作物の実用品種に Rf 遺伝子を導入し、利用すること

を可能にすることを目的として実験を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 野生、栽培ダイコンにおいては 4 個以上の Rf 遺伝子が存在するとされる (Bett & Lyddiate, 2004)。由来を異にするこれらの Rf 遺伝子を持つ個体とオグラ型雄性不稔の個体間の交雑にもとづき、個々の Rf 遺伝子に関する大規模な分離集団を作成した。また異なる個体を持つ Rf 遺伝子 (たとえば野生種とハマダイコンの Rf 遺伝子) を組み合わせた分離集団も作成した。これらの集団における花粉稔性の分離を観察することにより、各個体に由来する Rf 遺伝子の遺伝子数、遺伝様式、稔性回復の環境変動に対する安定性を明らかにした。さらに、Rf 遺伝子間の遺伝的相互関係 (連鎖、補足性、同義性等) を明確にしようとした。これにもとづき *Raphanus* 属に分布する Rf 遺伝子の数とそれらの相互関係を推定した。

(2) ハツカダイコンの Rf 遺伝子について、これと連鎖する RAPD マーカーおよび AFLP マーカーが得られ、それらの SCAR 化 (Murayama ら, 1999)、STS 化 (Murayama ら, 2003) にも成功している。また Koizuka ら (2003) が単離した Rf 遺伝子 (*orf687*) が、実際には栽培・野生ダイコンのごく一部にしか存在せず、ハマダイコンにはこれとは異なるメカニズムの Rf 遺伝子があることを見出した (Yasumoto ら, 2008a; 2008b)。この新規 Rf 遺伝子についても、DNA マーカーを開発済みである。そこで、*orf687* 以外の Rf 遺伝子を単離しようとした。まず、すでに Rf 遺伝子の DNA マーカー (RAPD、AFLP) とゲノミックライブラリーが得られているハツカダイコンについては、DNA マーカーの精密化を進めながら Rf 遺伝子の単離を目指した。一方、この手法を援用することにより、*R. raphanistrum*, ハマダイコン、中国ダイコン等の栽培ダイコンを用いた稔性分離集団について、それぞれの Rf 遺伝子と連鎖した DNA マーカーを開発しようとした。

(3) 上記 (1)、(2) で単離された Rf 候補遺伝子を、実際に雄性不稔を示すダイコンおよびナタネに導入して、稔性回復効果を確認すること、および稔性回復の分子生物学的機構を明らかにすることを目指した。ナタネを含めた *Brassica* 属植物においては胚軸への *Agrobacterium* の感染による形質転換技術が開発されている。そこでこの技術を利用することによって、ナタネなどの油料作物で必要とされる高い稔性回復力を持った稔性回復系統を作出する基礎技術を得ようとした。

## 4. 研究成果

(1) 既に明らかにされている Rf 遺伝子であ

る *orf687* 以外の Rf 遺伝子を持つ栽培、野生ダイコンとして、野生種 *R. raphanistrum*、熊本県、大分県で収集されたハマダイコン、中国より導入したハツカダイコンおよび黒ダイコンが存在することが明らかになった。これらの品種・系統を用いた交雑後代における花粉稔性の分離を調査したところ、ハツカダイコンにおいては2つの Rf 遺伝子が存在する一方で、他の品種・系統では1つの Rf 遺伝子によって花粉稔性の有無が決定されていることが明らかになった。

(2) 存在が明らかになった Rf 遺伝子のうち、*R. raphanistrum*、ハマダイコンおよび黒ダイコンの遺伝子は、*orf687* と同様に ppr モチーフを持つタンパク質をコードする遺伝子であることが示された。このうち、*R. raphanistrum* の Rf 遺伝子は *orf687* と比較して3アミノ酸分長い塩基配列を持つ *orf690* であることが判明した。さらに、ハマダイコンと黒ダイコンの塩基配列を決定したところ、これらの遺伝子は *orf687* 遺伝子と、稔性回復機能を持たない rf 遺伝子の一部領域との間の組換えの結果生じたキメラ遺伝子であることが強く示唆された。またハマダイコンの多くの個体には、雄性不稔の原因遺伝子であるミトコンドリアの *orf138* の発現を転写レベルで制御する *Rft* 遺伝子が分布していることが明らかになった。その上で、*Rft* に強く連鎖する DNA マーカーが開発された。

(3) これに対して、ハツカダイコンの交雑後代においては、可稔個体と不稔個体の分離が15:1の分離比に適合し、独立に働く2つの Rf 遺伝子の存在が示された。一方、この分離集団では *Rft* に強く連鎖する DNA マーカーの分離は3:1であった。このことから、ハツカダイコンにおいては、ハマダイコンに広く分布する *Rft* と、未知の Rf 遺伝子が共存し、かつ独立に稔性を回復していることが明らかになった。現在未知の Rf 遺伝子の単離を進めている。

(4) 現在までに存在が確認された多くの Rf 遺伝子のうち *Rft* について、これと強く連鎖する DNA マーカーを用いて、*Rft* 遺伝子の候補と考えられる DNA 配列を単離し、*B. napus* への遺伝子導入を図っている。候補遺伝子の形質転換体を得られれば、それらの稔性回復力の調査ならびに分子生物学的特性の解析によって、*Rft* 遺伝子の作用メカニズムが明らかになる。

#### 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6件)

1. Zhang L, Yasumoto K and Yamagishi H 2011 Identification of cytoplasmic male

sterility in Chinese radish following PCR analysis of mitochondrial DNA. Plant Molecular Biology Reporter  
DOI:10.1007/s11105-011-0391-5 (査読論文)

2. Honma Y, Yoshida Y, Terachi T, Toriyama K, Mikami T & Kubo T 2011 Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*. Current Genetics 57:261-270 (査読論文)
3. Yasumoto K, Terachi T & Yamagishi H 2009 A novel Rf gene controlling fertility restoration of Ogura male sterility by RNA processing of *orf138* found in Japanese wild radish and its STS markers. Genome 52:495-504 (査読論文)
4. Sigeno A, Hayashi S, Terachi T & Yamagishi H 2009 Introduction of transformed chloroplasts from tobacco into petunia by asymmetric cell fusion. Plant Cell Rep 28:1633-1640 (査読論文)
5. Yamagishi H, Terachi T, Ozaki A & Ishibashi A 2009 Inter- and intraspecific sequence variations of the chloroplast genome in wild and cultivated *Raphanus*. Plant Breed 128:172-177 (査読論文)
6. Miyake K, Miyake T, Terachi T & Yahara T 2009 Relative fitness of females and hermaphrodites in a natural gynodioecious population of wild radish, *Raphanus sativus* L. (Brassicaceae): comparison based on molecular genotyping. Journal of Evolutionary Biology 22:2012-2019 (査読論文)

[学会発表] (計30件)

1. 富岡関子：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、宇都宮大学、2012. 3. 29-30
2. 田中義行：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、宇都宮大学、2012. 3. 29-30
3. 安本景太：ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 *Rft* のマッピング。日本育種学会第120回講演会、福井県立大学、2011. 9. 23-24
4. 森悠太：黒ダイコンで発見された稔性回復遺伝子の *orf138* に対する作用。日本育種学会第120回講演会、福井県立大学、2011. 9. 23-24
5. 田中義行：次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 2：正常型とオグラ型ゲノムの比較。日本育種学会第120回講演会、福井県立大学、

2011. 9. 23-24

6. 森悠太：オグラ型雄性不稔に対する黒ダイコンの稔性回復遺伝子の解析。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市立大学、2010. 3. 29-30

7. 田中義行：次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 I. ナタネミトコンドリアゲノムとの比較。日本育種学会第 119 回講演会、横浜市立大学、2011. 3. 29-30

8. 安本景太：異質細胞質ダイコン系統にみられる雄性不稔性とミトコンドリア mRNA の発現パターンとの関係について。日本育種学会第 118 回講演会、秋田県立大学、2010. 9. 24-25

9. 堤厚善：ハマダイコンが有する稔性回復遺伝子の発現の安定性。日本育種学会第 118 回講演会、秋田県立大学、2010. 9. 24-25

10. 田中義行：ダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子 *orf138* を発現する葉緑体形質転換ベクターの作製とそれを用いた稔性回復遺伝子作用アッセイ系の構築。日本育種学会第 118 回講演会、秋田県立大学、2010. 9. 24-25

11. 安本景太：*Brassica maurorum* の細胞質を持つ雄性不稔ダイコンにおけるミトコンドリア遺伝子転写産物の解析。日本育種学会第 117 回講演会、京都大学、2010. 3. 26-27

12. 山岸博：ハマダイコンにおける第 3 の稔性回復遺伝子について。日本育種学会第 117 回講演会、京都大学、2010. 3. 26-27

13. 小嶽佑太：ダイコンのミトコンドリアゲノムにみられるサブストイキオメトリックシフト (SSS) の遺伝解析。日本育種学会第 117 回講演会、京都大学、2010. 3. 26-27

14. 小嶽佑太：環境ストレスがダイコンのミトコンドリアゲノム構造ならびに SSS 関連核遺伝子の発現に及ぼす影響。日本育種学会第 116 回講演会、北海道大学、2009. 9. 25-26

15. 山岸博：野生ダイコンにおける花粉稔性回復遺伝子の多様性。日本育種学会第 116 回講演会、北海道大学、2009. 9. 25-26

16. 安本景太：ハマダイコンの新しい稔性回復遺伝子に連鎖する PPR 遺伝子の単離および構造解析。日本育種学会第 116 回講演会、北海道大学、2009. 9. 25-26

17. 富岡関子：オグラ型雄性不稔に対するハツカダイコンの稔性回復遺伝子座のゲノム構造と変異。日本育種学会第 116 回講演会、北海道大学、2009. 9. 25-26

〔図書〕 (計 2 件)

1. 山岸 博 栽培ダイコンの起源と日本産ダイコンのルーツを探る、宇都宮大学農学部だいこんサミット実行委員会編『だいこんの魅力にせまる「だいこんサミット六年間をふりかえって」』、2010 3-11 頁 (著書)

2. 山岸 博 臨川書店、日本列島における

カブとダイコンのなりたち、木村栄美編『ユーラシア農耕史 4. さまざまな栽培植物と農耕文化』、2009 229-239 頁 (著書)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kyoto-su.ac.jp/graduate/g\\_eng/g\\_bio/kyoin/yamagishi.html](http://www.kyoto-su.ac.jp/graduate/g_eng/g_bio/kyoin/yamagishi.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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