

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02159

研究課題名（和文）細胞質雄性不稔性を温度感受性化する稔性回復遺伝子の育種学的研究

研究課題名（英文）Study on the genotype associated with thermosensitive fertility restoration in cytoplasmic male sterility

研究代表者

久保 友彦（Kubo, Tomohiko）

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：40261333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：テンサイOwen型細胞質雄性不稔（CMS）を温度感受性化させる機構と利用について遺伝育種学的な研究を行った。温度感受性の表現型が野外栽培でも発現することを明らかにした。温度感受性化させる核遺伝子型について各々の遺伝子を検討し、対立遺伝子の新たな作用の発見や、新規の遺伝子については染色体上の座乗領域を絞り込むことに成功した。温度感受性の機構にはこれらに加えてミトコンドリアの生理学的な反応などの複数の要因が関与していると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

テンサイOwen型CMSはテンサイハイブリッド育種に用いられている。育種の現場においては雄性不稔発現により純度の高い雑種を得ている。そのため、安定したCMS発現を促すような選抜が加えられてきた。著者らは本研究開始以前にテンサイCMS発現を不安定化させる核遺伝子型の存在を明らかにしていたが、本研究によりその核遺伝子型の解明を進めることができた。さらにテンサイCMS発現を栽培環境によって制御できる可能性を確かめることができた。これは温度感受性CMSを利用した新しい採種システム実用化に向けた前進である。

研究成果の概要（英文）：Cytoplasmic male sterility (CMS) is prerequisite for the hybrid breeding of sugar beet. It has been believed that sugar beet CMS expresses constitutively, but its stable expression depends on the specific nuclear genotype. Other genotypes restore male fertility or confer conditional male sterility that expresses only when the plant suffers heat. This project aims to clarify the genetic mechanism of this conditional male sterility and to see its potential use for the application of practical breeding. Sugar beet plants showed very different phenotypes in northern and southern parts of Japan when they have male sterility-inducing mitochondria and certain genotypes. These genotypes were further dissected into individual genes. One of the constituents is an allele of known gene but its novel function was revealed in this project. The chromosomal location of another gene was identified. Altogether, the mechanism of the conditional male sterility involves several nuclear genes.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：テンサイ 細胞質雄性不稔性 稔性回復遺伝子 温度感受性

### 1. 研究開始当初の背景

細胞質雄性不稔性 (CMS) はミトコンドリアが引き起こす花粉不稔である。CMS 個体に着生する種子は必ず雑種となることから、様々な作物で一代雑種種子生産を目的とした CMS 導入が図られている。一方で、CMS 系統は自殖できないので、その増殖には特別な系統 (維持系統) が必要である (図 1)。結果として採種体系は複雑にならざるをえない。

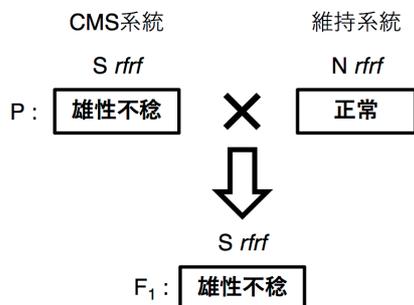


図 1. CMS 系統と、CMS 系統の増殖のために必要な維持系統の遺伝子型と表現型. N と S は、それぞれ正常ミトコンドリアと雄性不稔誘発ミトコンドリアである. *rf* は花粉稔性回復遺伝子 (抑制遺伝子) の劣性対立遺伝子である. ミトコンドリアは母性遺伝なので種子親 (母親) から伝わるが、核遺伝子は両親から伝わるので、維持系統と CMS 系統の核遺伝子型を揃えると、次世代も同一の遺伝子型となる. 維持系統は N ミトコンドリアの作用により花粉稔性は正常となる。

CMS 発現は S ミトコンドリアおよび花粉稔性回復遺伝子 (抑制遺伝子、*Rf*) で説明されるが、その際に優性 *Rf* と劣性 *rf* の 2 つの対立遺伝子しか用いないので、多くの研究論文ではこれら以外の対立遺伝子を考慮していない。一方で、応募者はテンサイ (サトウダイコン) *Rf* の一つ *Rf1* が複対立遺伝子であることを明らかにしてきた。すなわち、S ミトコンドリアと組み合わせることが可能な *Rf* 対立遺伝子は複数種類存在する。これらの対立遺伝子が機能的にどのように分化しているのかは詳しくわかっていない。

テンサイにおいては一代雑種育種が盛んに行われており、CMS はその採種に不可欠な形質である。テンサイ育種に用いられる CMS 系統は気温に関係なく安定して雄性不稔を発現するが、これは選抜の結果に過ぎない。著者らは核遺伝子型を変更することで CMS 発現が温度感受性を示すことを発見した。これは新しい採種技術に発展する可能性がある現象である。

### 2. 研究の目的

著者らは温度感受性の核遺伝子型を利用すれば環境応答性 CMS 系統の作出が可能になり、維持系統が不要になると考えている。これを実現するため、育種学的には温度感受性の機構について基礎的な知見を得て、何らかの本質的な障害があるかどうかを検討すべきである。加えて、実用化を見据えた検討も必要である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 野外における温度感受性の発現とその影響

CMS の温度感受性が野外圃場でも発現するかどうかを福岡県・久留米市と北海道・礼文町で栽培して明らかにした。CMS の温度感受性発現が維持系統選抜に影響していることを検定交配集団における表現型から明らかにした。

#### (2) 温度感受性の発現モデルの構築

CMS を温度感受性化する核遺伝子型についてその構成要素を明らかにし、各々の特徴付けを行った。テンサイ *Rf1* は分子シャペロン様タンパク質をコードしており、その結合パートナーはミトコンドリア CMS 原因遺伝子の翻訳産物である。これ以外にパートナーが存在する可能性を検討した。さらに、高温がミトコンドリア CMS 原因遺伝子に及ぼす影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) CMS の温度感受性は野外圃場でも発現する

CMS ミトコンドリアといくつかの核遺伝子型を組み合わせた材料を複数用意し、それぞれを福岡県・久留米市と北海道・礼文町で栽培し花粉稔性を調べた。核遺伝子型は *Rf1* 対立遺伝子を識別するマーカーを指標に分類した。そうした *Rf1* 遺伝子型グループにおける花粉稔性指数 (0 が不稔、4 が正常) を 2 つの試験地ごとに平均化した。コントロールである正常系統と CMS 系統は試験地による花粉稔性の差が小さかったのに対し、供試した材料には栽培地による表現型が大きく異なるものが含まれていた (図 2)。以上より、核遺伝子型の最適化と栽培環境の組み合わせにより CMS の表現型の制御が可能であることが示された。

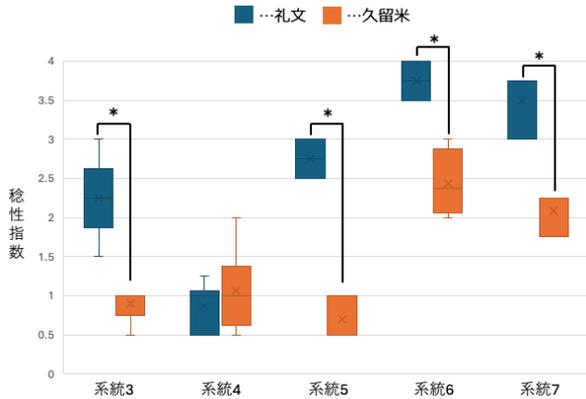


図2. 野外圃場試験に用いた供試材料の表現型。縦軸は花粉稔性指数を、横軸は系統を示す。エラーバーは標準偏差を示し、\*はWilcoxon検定により有意差が検出されたことを表す（有意水準は0.05）。

(2) CMSの温度感受性に関わる核遺伝子型を構成する *Rf1* 対立遺伝子

温度感受性を示す核遺伝子型には特定の *Rf1* 対立遺伝子が頻出する。そこで、この *Rf1* 対立遺伝子を保持する系統を見出し、CMS系統およびその維持系統との交配を行って分離集団を育成した。その結果、この集団内において花粉稔性はわずかしか回復しなかった。続いて、DNAマーカーによりこの *Rf1* 対立遺伝子を保持する個体を選抜し、蒴切片を作成して内部構造を調査した。これらの蒴は正常とは異なり小胞子期でタペート細胞の空胞化や肥大が認められた。一方、その発達過程はCMS系統とも異なっており、小胞子期の最終期に蒴内部に未発達の花粉粒やその残渣が認められた。CMS系統ではそのような構造物が認められず完全な空隙となる。蒴RNAを用いたRNA-seq解析によっても、この *Rf1* 対立遺伝子を保持する系統とCMS系統の間に差があることが確認された。したがって、この *Rf1* 対立遺伝子は劣性対立遺伝子ではなく、作用の弱い対立遺伝子である可能性が高い。

(3) CMSの温度感受性は維持系統選抜に影響をおよぼす

テンサイ育種において維持系統は検定交配（CMS系統と交配しそのF1の表現型から花粉親の遺伝子型を推測する）によって行われる。そのため、F1の表現型が環境条件で変化すると花粉親の遺伝子型を見誤り、維持系統ではない遺伝子型も維持系統と判断される可能性がある。そこで、9系統10個体を花粉親としたF1について花粉稔性表現型を調べた。これらのF1は過去に野外圃場において維持系統もしくは維持系統となる遺伝子型を分離すると考えられていた。しかしながら、より温和な栽培条件下では稔性回復する個体がいくつか出現し、7つの遺伝子型については評価が変わり維持系統遺伝子型ではないとされた。育種を進める過程で育種機関の間で系統の交換が行われ外部機関で育成された系統がしばしば期待通りの表現型を示さない場合が経験的に知られているが、本研究で見出した環境条件による表現型の変化はこれに酷似する。CMSの温度感受性は維持系統の品質に影響を与えるため、何らかの対策が必要である。

(4) CMSの温度感受性に関わる核遺伝子型を構成する新規の *Rf*

上記(3)において、劣性 *rf1* ホモ接合であるが温和な条件下で稔性回復する個体が得られた。そこで、この個体の後代の花粉稔性とDNAマーカー型の分離を調査したところ、稔性回復を説明する遺伝子が第4染色体上にあることがわかった。この遺伝子は以前より遺伝子単離を進めていた *Rf2* である可能性が高い。*Rf2* の単離が困難である理由として、この遺伝子の作用が温度感受性を示すことが考えられた。ただし、稔性回復の程度は単独では低いことから、(2)で述べた弱い *Rf1* 対立遺伝子と組み合わせることにより稔性回復の程度が上がると思われる。

(5) 新規 *Rf* のゲノム領域解析

第4染色体上にある新規 *Rf* は *Rf2* であると考え、その遺伝解析を進めた。この新規 *Rf* を保持する個体についてPacBio Sequel II system (PacBio) によりHiFiモードで塩基配列決定し、テンサイリファレンスゲノムやCMS系統との比較解析を行った。その結果、当該領域には系統間で著しい構造変異のあることがわかり、リファレンスに依存することなく系統間多型を考慮しながら遺伝子同定を進める必要があることがわかった。得られたゲノム塩基配列を直接比較してSNPsを検出し、新たなDNAマーカーを作製した。このマーカー遺伝子型について遺伝分離集団の表現型との対応を調べた。新たに作成した10個のマーカーのうち、2つのマーカーが、表現型と比較的よく一致することがわかり、新規 *Rf* はこれらの近くに座乗することが考えられた（本項目は「先進ゲノム支援（第2期）」の支援を受けて行った）。

(6) CMS原因遺伝子発現と温度

温度感受性のメカニズムを調べるため、CMS原因遺伝子の発現が加温によって変化するかどうか調べた。テンサイCMS系統由来のカルスよりミトコンドリアを単離し、35°C、1時間など、いくつかの条件で処理したタンパク質蓄積量を調査した。その結果、予備的ではあるが、高温処理に

よりタンパク質蓄積量が増加することがわかった。したがって、温度感受性のメカニズムには核とミトコンドリアの双方の視点が必要と思われる。

#### (7) *Rf1* 翻訳産物と結合する新規パートナータンパク質の探索

温度の変化はタンパク質間相互作用に影響する可能性がある。これに関する基本的な情報を得るため、*Rf1* 翻訳産物が未知の遺伝子産物とタンパク質レベルで相互作用する可能性を検討した。テンサイ形質転換実験系を利用し、テンサイカルスでいくつかの *Rf1* 対立遺伝子を発現させた。導入遺伝子には FLAG 配列を付加してある。得られたカルスから粗ミトコンドリアを単離し、タンパク質を抽出した後、免疫沈降を行った。次に、共沈降したタンパク質を網羅的に検出するため銀染色を行った。その結果、比較的バンドが明瞭な 33 のバンドが検出できた (図 3)。

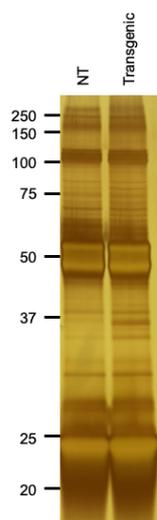


図 3. ミトコンドリアタンパク質を抽出し免疫沈降を行った。NT は形質転換を行っていないカルスを、Transgenic は形質転換カルスである。左側の数字は分子量(kDa)を示す。

このうち、いくつかのバンドは形質転換カルスに固有であると思われ、導入遺伝子の翻訳産物と異なるサイズのバンドについては、相互作用するタンパク質に由来する可能性が考えられた。この結果は *Rf1* 翻訳産物には CMS 原因遺伝子翻訳産物以外にも結合する可能性のあるタンパク質があることを示唆している。今後、この可能性についてさらに検討する必要がある。このことと温度の変化との関係についても調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Katsura Naoyuki, Itoh Kanna, Matsuhira Hiroaki, Kuroda Yosuke, Kubo Tomohiko, Kitazaki Kazuyoshi	4. 巻 219
2. 論文標題 Two cytoplasmic male sterility phenotypes in beet ( <i>Beta vulgaris</i> L.): implications of their simultaneous onset and divergent paths	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10681-023-03244-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Taniguchi Eigo, Satoh Kosuke, Ohkubo Megumi, Ue Sachiyo, Matsuhira Hiroaki, Kuroda Yosuke, Kubo Tomohiko, Kitazaki Kazuyoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Nuclear DNA segments homologous to mitochondrial DNA are obstacles for detecting heteroplasmy in sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0285430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0285430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanomata Yohei, Hayakawa Ryo, Kashikura Jun, Satoh Kosuke, Matsuhira Hiroaki, Kuroda Yosuke, Kitazaki Kazuyoshi, Kubo Tomohiko	4. 巻 69
2. 論文標題 Nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms suggest introgression contributed to garden beet ( <i>Beta vulgaris</i> L.) domestication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetic Resources and Crop Evolution	6. 最初と最後の頁 271 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10722-021-01227-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuhira Hiroaki, Kitazaki Kazuyoshi, Matsui Katsunori, Kubota Keisi, Kuroda Yosuke, Kubo Tomohiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Selection of nuclear genotypes associated with the thermo-sensitivity of Owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> L.)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-022-04046-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 織田琴子、柏倉淳、松井克憲、黒田洋輔、松平洋明、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイOwen型CMSにおける花粉稔性回復は温度感受性である
3. 学会等名 令和5年度日本育種学会・日本作物学会北海道談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 足達春樹、伊藤栞奈、桂直之、荒河匠、久保友彦、北崎一義
2. 発表標題 テンサイOwen型細胞質雄性不稔の発現はいつスタートするのか？
3. 学会等名 令和5年度日本育種学会・日本作物学会北海道談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口英吾、早川諒、鹿俣陽平、田中瑶人、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 ガーデンピートにおける劣性rf1対立遺伝子の出現頻度
3. 学会等名 日本育種学会第144回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷口英吾、佐藤宏亮、大久保めぐみ、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイミトコンドリア次世代解析で出現する個体内多型の起源
3. 学会等名 日本育種学会第143回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 窪田恵之、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 次世代シーケンスデータを用いる新規ミトコンドリアゲノムバリエーションの開発
3. 学会等名 令和5年度日本育種学会・日本作物学会北海道談話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 桂 直幸、伊藤菜奈、松平洋明、黒田洋輔、久保友彦、北崎一義
2. 発表標題 2つのテンサイ細胞質雄性不稔における相違と類似性
3. 学会等名 日本育種学会第145回講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋玲奈、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイ稔性回復遺伝子 Rf1 翻訳産物と結合する新規タンパク質の探索
3. 学会等名 グリーンテクノバンクてん菜研究会第20回技術研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早川 諒、鹿俣 陽平、谷口 英吾、松平 洋明、黒田 洋輔、北崎 一義、久保 友彦
2. 発表標題 ガーデンビート栽培化過程における浸透交雑の可能性について
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口英吾、佐藤宏亮、大久保めぐみ、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイミトコンドリア次世代解析におけるバリエーションの起源
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 令和4年度年次講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桂直幸、伊藤菜奈、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイG型細胞質雄性不稔における葯の内部構造解析
3. 学会等名 日本育種学会第142回講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yohei Kanomata, Ryo Hayakawa, Jun Kashikura, Kosuke Satoh, Hiroaki Matsuhira, Yosuke Kuroda, Kazuyoshi Kitazaki, Tomohiko Kubo
2. 発表標題 Nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms of garden beet genetic resources
3. 学会等名 2nd Conference on Beet Resources
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柏倉淳、本間雄二郎、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイOwen型不稔細胞質に対する新規環境応答性稔性回復遺伝子の染色体マッピング
3. 学会等名 日本育種学会秋季大会（第140回講演会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柏倉淳、本間雄二郎、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイOwen型CMSに対する新規稔性回復遺伝子の環境応答性及び候補領域選定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井克憲・北崎一義・久保友彦
2. 発表標題 環境応答性を示すテンサイCMS個体が保持するRf1対立遺伝子の特徴づけ
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早川諒、鹿俣陽平、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 ガーデンビート栽培化過程に浸透交雑は関与したか
3. 学会等名 日本育種学会秋期大会（第140回講演会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北崎一義
2. 発表標題 細胞質雄性不稔性とゲノム
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桂直幸、松平洋明、黒田洋輔、北崎一義、久保友彦
2. 発表標題 テンサイG型細胞質雄性不稔における葯の微細構造解析
3. 学会等名 第19回てん菜研究会技術発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ガーデンビートはオリゴ糖原料作物になりうるか：てん菜との関係から考える  
[https://www.alic.go.jp/joho-s/joho07\\_000588.html](https://www.alic.go.jp/joho-s/joho07_000588.html)  
 模擬講義・京都洛南高校  
<https://www.alumni-sapporo.or.jp/news/京都洛南高修学旅行生たちが模擬講義を受ける/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	北崎 一義  (Kitazaki Kazuyoshi)  (60532463)	北海道大学・農学研究院・助教   (10101)	
研究分担者	松平 洋明  (Matsuhira Hiroaki)  (90549247)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・主任研究員   (82111)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	渡辺 慎一  (Watanabe Shin-ichi)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・主席研究員   (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	村山 誠治  (Murayama Seiji)	礼文町高山植物培養センター・主査	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	University of Lille			