

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380002

研究課題名(和文) イネ細胞質雄性不稔性発現機構と稔性回復機構の分子基盤解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular basic mechanism of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice

研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA, KINYA)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20183882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：イネの一代雑種品種の育種基盤として用いられる細胞質雄性不稔性と稔性回復機構について解析した。特に、LD型細胞質雄性不稔性の原因としてミトコンドリアにORF79タンパク質が蓄積することを明らかにした。また、稔性回復遺伝子RF2はGRP162と名付けられたRNA結合型グリシンリッチタンパク質、および、ミトコンドリア局在型のRNA分解酵素と複合体を形成してatp6-orf79 RNAを分解することにより稔性を回復させるというモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：We studied a mechanism of cytoplasmic male sterility (CMS) /fertility restoration (RF) system, that is useful for hybrid rice breeding. We demonstrated accumulation of ORF79 peptide is a cause of LD-type CMS. We identified several possible components of RF complex of RF2, which is a RF factor for LD-type CMS. We proposed a model in which a RNA-binding glycine-rich protein, GRP162, and a mitochondrial ribonuclease are candidate factors of RF2 complex to degrade atp6-orf79 RNA.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：育種学 遺伝学 遺伝子 植物 バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

ハイブリッドライスは 15%から 20%の収量増が期待され、中国では 1,600 万ヘクタールで栽培され、イネ栽培面積の半分を占めている(Barclay 2007, *Rice Today* 6: 22-25)。さらに、東南アジア各国や米国でも栽培され、世界全体でのハイブリッド作付け率は 13%となっている(IRRI 2009 報告に基づく推定値)。2008 年には IRRI を中心としてハイブリッドライス開発コンソーシアム (Hybrid Rice Development Consortium; HRDC) が設立され、ハイブリッドライスの開発支援や種子生産研究への協力を行っている。このコンソーシアムでは、IRRI 育成システムを用いた事業化の場合、1.3%から 2.0%のライセンス料を課している。しかし、ハイブリッドライス開発コンソーシアムに日本からの参加は無い。

ハイブリッドライスの育種には雄性不稔システムが使われるが、全体の 95%が WA 型雄性不稔細胞質 (WA-CMS) を利用している(Barclay 2007, *Rice Today* 6: 22-25)。世界のイネ全栽培面積の 1 割が単一の細胞質に依存していることになる。トウモロコシのハイブリッド育種では、1960 年代に、T 型細胞質雄性不稔を用いた F1 採種が行われていたが、T 型特異的な「ごま葉枯病菌」の新しい T 型レースが出現したことにより 1970 年代に大被害を受けて壊滅している。このような病害虫に対する遺伝的脆弱性の克服には CMS 細胞質の多様化が必要である。また、F1 を利用することで、育成者の権利も保証されるメリットもある。

我々は、3 種類の細胞質雄性不稔システムと稔性回復システム(BT-CMS/*RF1*, LD-CMS/*RF2*, CW-CMS/*RF17*) を材料とし、雄性不稔発現機構および稔性回復機構の解明に関する研究を行ってきた。これまでに 次のことを明らかにした。

(1) BT-CMS の稔性回復遺伝子 *RF1*、LD-CMS の稔性回復遺伝子 *RF2*、CW-CMS の稔性回復遺伝子 *RF17* をクローニングした(Fujii et al. 2009, *Proc Natl Acad Sci USA*)。さらに、JST の支援を受けて、*RF17* の国際特許出願 (PCT 出願)を行ってきた。

(2) LD-CMS と CW-CMS のミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定した (Fujii et al. 2010, *BMC Genomics*)。

しかし、LD-CMS と CW-CMS のミトコンドリアの CMS 原因遺伝子の特定には至らなかった。また、クローニングした稔性回復遺伝子産物の作用機構は不明であった。

## 2. 研究の目的

これまで用いてきた LD-CMS, CW-CMS に加え *O. rufipogon* 由来の RT61, RT98, RT102 (琉球大学育成システム) の合計 5 種類の雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子を材料として、ミトコンドリアの雄性不稔原因遺伝子の特定、および、稔性回復機構の解明を行い、

ミトコンドリアゲノムの異常から花粉稔性の消失までの全容を明らかにする。

(1)ミトコンドリアの CMS 原因遺伝子解析：稔性回復遺伝子の有無で転写 / 翻訳状態が変化する遺伝子が CMS 原因候補遺伝子となる。CMS 原因遺伝子を明らかにする。

(2) 稔性回復機構の解析：これまでクローニングした *RF2* は他の因子と結合して働くと予想された。結合相手を同定して稔性回復機構を考察する。

(3)レトログレードシグナル伝達経路の解明：*RF17* 遺伝子プロモーターはミトコンドリアから核へのレトログレードシグナルを受けて発現が制御されていると考えられる。このプロモーターに結合する転写因子を解析することで、ミトコンドリアから核へのレトログレードシグナル伝達経路の上流を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)ミトコンドリアの CMS 原因遺伝子解析：CMS 原因候補遺伝子は稔性回復遺伝子の有無で転写 / 翻訳状態が変化する予想されるので、RNA とタンパク質の解析を行うことで同定する。

(2)稔性回復機構の解析：*RF2* と相互作用する因子を Yeast Two Hybrid 法で探索し、*in vivo* で証明する。*RF2* に対する抗体を作成し、*RF2* 複合体を単離して、その構成要素を質量分析で同定する。

(3)レトログレードシグナル伝達経路の解明：*RF17* 遺伝子プロモーターに結合する転写因子を Yeast One Hybrid 法により同定する。

## 4. 研究成果

(1)ミトコンドリアの CMS 原因遺伝子解析：LD 型 CMS の原因遺伝子について詳細に解析した。LD 型 CMS のミトコンドリアには BT 型 CMS と類似した *orf79* が存在し、*atp6* と共転写されることがわかっていたが、ORF79 タンパク質の蓄積が検出されなかった (Itabashi et al. 2009 *Plant Cell Rep*)。本研究において、抗 ORF79 抗体を作り直したところ、ORF79 ペプチドが蓄積していることが明らかとなった。ORF79 ペプチドの蓄積量は BT-CMS に比較して少なく、蓄積量が多いほど花粉発育に悪影響を与えられた。*Rf2* が存在すると *atp6-orf79 RNA* が減少し、ORF79 ペプチド蓄積が減少することを明らかにした。これより、LD 型 CMS の原因遺伝子は *orf79* であると結論した。

また、RT61-CMS の CMS 原因遺伝子として *orf79* が存在することを明らかにした。RT98 の CMS 原因遺伝子候補として未報告の *orf113* を見出した。RT102 の CMS 原因遺伝子候補として *orf352* を見出した。この *orf352* は WA-CMS の CMS 原因遺伝子として報告された #A352 (Luo et al. 2013 *Nat Genetics*) のシークエンスバリエーションと考えられた。

(2) 稔性回復機構の解析：

これまでクローニングした RF2 はグリシンリッチプロテインをコードし、RF2 タンパク質は他の因子と結合して複合体として働くと予想された。結合相手を Yeast-Two-Hybrid 法で探索したところ、4 種類の cDNA を含むクローンが選抜された(表 1)。これらのタンパク質を RF2 interacting factors (R2IF1~R2IF4) と名付けた。細胞内局在解析を行ったところ、R2IF2 (ubiquitin domain containing protein) がミトコンドリアに局在することが判明した。なお、RF2 もミトコンドリアに局在することが報告されている (Itabashi et al. 2011)。R2IF2 と RF2 について、GST プルダウンアッセイにより *in vitro* における結合能を評価したところ、R2IF2 と RF2 の結合が確認された。以上のことから、RF2 と R2IF2 タンパク質が相互作用することで RF2 複合体を形成し、稔性回復効果を示していることが考えられた。しかし、RF2 と R2IF2 は RNA 結合モチーフを持っていなかったため、その他の RNA 結合タンパク質も関与すると予測した。

表1 Y2Hにより検出されたタンパク質をコードする遺伝子

名前	RAP-DB Locus ID	機能
R2IF1	Os04g0404900	Conserved hypothetical protein
R2IF2	Os10g0542200	Ubiquitin domain containing protein
R2IF3	Os04g0229100	Similar to Sinapyl alcohol dehydrogenase
R2IF4	Os12g0507600	Conserved hypothetical protein

さらに、RF2 複合体を明らかにする目的で、RF2 に対する抗体を用いて RF 複合体を分画して質量分析した結果、189 種類のタンパク質が同定された。この中には、RNA 認識に關与するタンパク質が7種類含まれていた(表 2)。その中の1つである GRP162 は RNA 結合モチーフをもつグリシンリッチタンパク質であり、Honglian 型 CMS において *atp6 - orfH79* RNA に結合することが報告されている (Hu et al 2012 Plant Cell)。また、RNA を分解する機能を持つリボヌクレアーゼも含まれていた。このリボヌクレアーゼはミトコンドリアに局在すると予測された。以上のことから、これら2つの因子が RF2 と相互作用することで *atp6 - orf79* RNA の分解を行うという稔性回復モデル(図 1)が考えられた。

LOC_Os ID	機能	
LOC_Os12g43600.1	Similar to Glycine-rich RNA-binding protein 1	RNA 認識
LOC_Os04g54440.1	RNA-binding region domain containing protein	
LOC_Os10g34720.1	Pentatricopeptide repeat domain containing protein	
LOC_Os03g46770.1	Similar to Glycine-rich RNA-binding, abscisic acid-inducible protein	
LOC_Os07g36490.1	RNA recognition motif containing protein	
LOC_Os01g68790.2	RNA recognition motif, glycine rich protein domain containing protein	
LOC_Os08g04440.1	RNA recognition motif containing protein	RNA 切断
LOC_Os07g33240.1	Similar to Endoribonuclease	

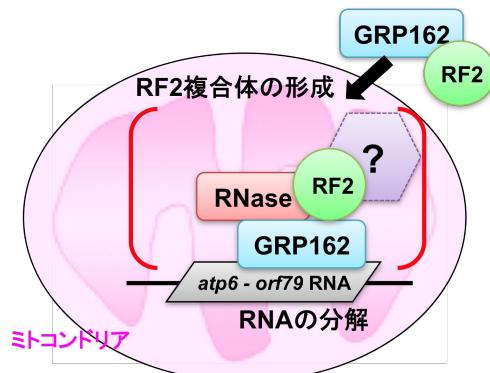


図1 RF2複合体による *atp6 - orf79* RNA の分解モデル  
RF2によりGRP162がミトコンドリアにリクルートされ、複合体を形成し、RNase (LOC\_Os07g33240.1)により *atp6 - orf79* RNA が分解される。

(3) レトログレードシグナル伝達経路の解明:

CW-CMS の稔性回復遺伝子である RF17 遺伝子プロモーターはミトコンドリアから核へのレトログレードシグナルを受けて発現が制御されていると考えられる。このプロモーターのシス配列と予想される領域(500 bp)に結合する因子を Yeast One Hybrid 法により探索した。1次スクリーニングの結果、Rf17 の配列を bait に用いた場合 28 陽性クローン、rf17の配列を bait 用いた場合 25 の陽性クローンが得られたが、この中に転写因子と考えられるクローンは含まれておらず、さらなる解析が必要と考えられた。

また、CW-CMS の初期育成系統の中から、Rf17 アリルを持たずにアリルを持つが稔性が回復するという新規稔性回復系統 (CWR25)

を見出した。CW-CMS のレトログレードシグナル伝達解明に役立つ系統として期待される。新規稔性回復の原因遺伝子のマップベースクローニングを進めるための系統育成を行った。

#### 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 7 件)

(1) Kazama T, Yagi Y, Toriyama K, Nakamura T (2013) Heterogeneity of the 5'-end in plant mRNA may be involved in mitochondrial translation. *Front Plant Sci* 4-517: 1-4 (査読有)  
doi: 10.3389/fpls.2013.00517

(2) Okazaki M, Kazama T, Murata H, Motomura K, Toriyama K (2013) Whole mitochondrial genome sequencing and transcriptional analysis to uncover an RT102-type cytoplasmic male sterility-associated candidate gene derived from *Oryza rufipogon*. *Plant Cell Physiol* 54: 1560-1568 (査読有)  
doi: 10.1093/pcp/pct102

(3) Toda T, Toriyama K (2013) Re-sequencing of mitochondrial genes in a standard rice cultivar Nipponbare. *RICE* 6-2: 1-3 (査読有)  
doi:10.1186/1939-8433-6-2

(4) Itabashi, E., Iwata, N., Fujii, S., Kazama, T., Toriyama, K. (2011) The fertility restorer gene, Rf2, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. *Plant J.* 65: 359-367 (査読有)  
DOI: 10.1111/j.1365-3113.2010.04427.x

〔学会発表〕(計 43 件)

(1) 鳥山欽哉・風間智彦 : イネ細胞質雄性不稔性/稔性回復に見られるミトコンドリア RNA のプロセッシング  
第 55 回日本植物生理学会シンポジウム  
富山市、2014 年 3 月 19 日 (招待)

(2) 藤井慎也・風間智彦・伊藤幸博・小島創一・鳥山欽哉 : イネ LD 型 CMS 系統における稔性回復因子 RF2 と相互作用する ubiquitin domain containing protein の解析、日本育種学会第 124 回講演会、鹿児島市、2013 年 10 月 12-13 日

(3) 藤井慎也・風間智彦・伊藤幸博・小島創一・鳥山欽哉 : 酵母ツーハイブリッド法とブ

ルダウンアッセイによるイネ LD 型細胞質雄性不稔系統の稔性回復因子 RF2 と相互作用する因子の探索、第 54 回日本植物生理学会年会、岡山市、2013 年 3 月 21-23 日

(4) Toriyama, K.: Genome barriers between mitochondria and nuclei exemplified by cytoplasmic male sterility/fertility restoration in rice. 10th International Congress on Plant Molecular Biology, Jeju, Korea, October 21-26, 2012 (招待)

(5) 鳥山欽哉・風間智彦 : イネにおけるミトコンドリア遺伝性の花粉発育不全とそれをレスキューする核遺伝子、日本遺伝学会第 84 回大会、福岡、2012 年 9 月 24-26 日 (招待)

(6) 鳥山欽哉・風間智彦 : コメ産業の国際化を狙った新規ハイブリッドライス育種基盤の開発、日本育種学会第 122 回講演会、京都、2012 年 9 月 14-15 日 (招待)

(7) Kazama, T., Itabashi, E., Fujii, S., Toriyama, K.: Regulatory mechanisms of ORF79 translation by RF2 in cytoplasmic male sterile rice、第 53 回日本植物生理学会年会、京都、2012 年 3 月 16-18 日

(8) Toriyama, K., Kazama, T.: Fertility restoration in three types of cytoplasmic male sterility in rice. *Plant Reproduction for Food*, Melbourne, Australia, February 13-17, 2012 (招待)

(9) Toriyama, K. New resources for hybrid rice breeding. XVIII International Botanical Congress, Melbourne, Australia, July 24-30, 2011 (招待)

(10) Toriyama, K., Kazama, T.: Molecular analysis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice. 1st Congress of Cereal Biotechnology and Breeding, Szeged, Hungary, May 24-27, 2011 (招待, 基調講演)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 鳥山欽哉 (2012) DNA の組換え・遺伝子組み換えから、21 世紀に喜ばれる植物が誕生するか、食と農コミュニケーションづくりの集い「未来ある農業のために-少なくとも今-」 pp60-66 羽柴輝良/鳥山欽哉編 研究会

(2) 鳥山欽哉 (2011) 農学生命科学を学ぶための入門生物学 p88-95、p97-99 山口高弘/鳥山欽哉編 東北大学出版会

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 1 件)

名称 : Fertility restorer gene and fertility restoration method for CW-type male sterile cytoplasm of rice  
発明者 : Toriyama, K., Fujii, S  
権利者 : Tohoku University  
種類 : 米国特許  
番号 : US 8344122  
取得年月日 : 2013 年 1 月 1 日  
国内外の別 : 国外

[その他]

アウトリーチ活動(5件)

(1) 鳥山欽哉: エンジョイ DNA ~ 遺伝子組換え植物と植物の環境適応、科学技術振興機構 未来の科学者養成講座委託事業 科学者の卵養成講座、仙台、2011 年 9 月 3 日

新聞報道(7件)

(1) 鳥山欽哉: 花粉の不思議(4) コピー作れぬハイブリッド、河北新報、科学の泉、2013 年 8 月 30 日

ホームページ等(2件)

(1) 伊藤幸博・鳥山欽哉  
インターネット上での研究成果の継続的な発信「環境適応生物工学研究室 お知らせと更新情報」  
<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioadp/PukiWiki/index.php?FrontPage>

(2) 鳥山欽哉  
エンジョイ DNA ~ よくわかる遺伝子組み換え植物 ~ ,  
東北大学サイエンスカフェ動画チャンネル  
<http://www.youtube.com/watch?v=u6gU81x0VAQ&feature=youtu.be>  
公開日 2012 年 10 月 4 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥山 欽哉 (TORIYAMA KINYA)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号 : 2 0 1 8 3 8 8 2

(2) 連携研究者

風間 智彦 (KAZAMA TOMOHIKO)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号 : 3 0 4 3 1 4 6 4