

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292001

研究課題名(和文)ミトコンドリア過剰活性化説に基づく細胞質雄性不稔性の発現機構の解析

研究課題名(英文)Is cytoplasmic male sterility explained by mitochondrial overactivation?

## 研究代表者

久保 友彦(Kubo, Tomohiko)

北海道大学・(連合)農学研究科(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) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質雄性不稔性(CMS)は重要な育種形質である。CMSの原因はミトコンドリアにあるが、その機構は明らかではない。そこで、テンサイを材料にミトコンドリア機能を調査した。その結果、CMSにおける膜電位の低下を見出した。ATP サブユニット遺伝子を用いてミトコンドリア機能の改変を試み、形質転換植物を作出した。その結果、半不稔の状態を作り出すことに成功した。テンサイCMSミトコンドリアの機能変換は主としてpreSatp6が担っていると考えられる。これに対する新規の花粉稔性回復遺伝子(Rf)の作用を検討した。その結果、既知のRfとは異なり、直接的な作用を及ぼしていない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cytoplasmic male sterility (CMS) is a breeding character that makes hybrid seed production feasible. In the genetic model of CMS, male sterility expresses when the cytoplasm has male-sterility inducing factor while the nucleus has two recessive alleles of restorer-of-fertility gene (rf). The cytoplasmic factor is a mitochondrial gene that is specific to CMS mitochondrial genome. Such genes have been found from many plant species but the mechanism how CMS expresses is still obscure. The objective of this study is to clarify the mitochondrial function of CMS sugar beet. We found the followings: biochemical difference between male-fertile and CMS mitochondria; male-sterility induction by FOF1-ATPase alteration; and effect of novel Rf on the male-sterility inducing mitochondrial gene.

研究分野：分子育種学

キーワード：ミトコンドリア 細胞質雄性不稔性

## 1. 研究開始当初の背景

いくつかの植物では、花粉形成を阻害する遺伝子がミトコンドリアにコードされており、その形質は細胞質雄性不稔性 (CMS) と呼ばれている。CMS は作物のハイブリッド育種に使われる重要な形質であるので、そのメカニズム解明には大きな意義がある。巷間、十分な検証も無いまま CMS 遺伝子はミトコンドリア機能を低下させることで雄性不稔をもたらすと信じられてきた。これに対し、申請者はテンサイ (サトウダイコン) の CMS 系統から単離したミトコンドリアが正常よりも活性化しているという、意外な事実を発見した。

CMS 発現は、ミトコンドリアと核遺伝子の相互作用により発現する。テンサイ CMS に関わるミトコンドリア遺伝子は *preSatp6* であり、ミトコンドリアと相互作用する核遺伝子として、*Rf1* の特徴付けが進んでいる。一方、最近同定された *Rf2* については、情報が少ない。テンサイにおいてハイブリッド育種が進められていることから、系統選抜を進める上で *Rf2* の情報は不可欠である。

## 2. 研究の目的

CMS とミトコンドリア機能の関係について明らかにする。そのため、以下を明らかにする。

- (1) ミトコンドリア機能解析による CMS の特徴付け
- (2) ミトコンドリア  $F_0F_1$ -ATPase と花粉形成の関係
- (3) テンサイ新規稔性回復遺伝子の作用

## 3. 研究の方法

### (1) 供試材料

NK-219mm-CMS と TA-33BB-CMS は北海道農業研究センター育成の CMS 系統である。NK-219mm-0 と TA-33BB-0 は、それぞれに対する維持系統である。E60-F4-Rf2 は、*Rf2* により稔性回復した個体である。TA-33BB-CMS::Rf1 は、*Rf1* により稔性回復した個体である。

### (2) 組織培養と形質転換

葉片の脱分化、カルスからの再分化、および形質転換は、Kagami et al. (2015) (図書①) に従って行った。

### (3) ミトコンドリア単離と膜電位測定

Lind et al. (1991) の方法を改変してミトコンドリアを単離した。膜電位測定は Panda et al. (2008) の方法を改変して行った。

### (4) PCR および遺伝子クローニング

慣行法に従った。

### (5) タンパク質電気泳動と検出

12% SDS-PAGE もしくは、NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gel System (Invitrogen) を用い

て電気泳動を行った。分離したタンパク質は Hybond-P (GE healthcare) PVDF メンブレンにエレクトロ・ブロッティングした。シグナルバンドの検出は慣行法によった。

## 4. 研究成果

### (1) 培養細胞の膜電位

以前に行った実験では、測定条件等に不備があるという指摘があったので、条件検討を含めて実験を進めた。材料には、実験条件が制御しやすく、試料の回収が容易であることから、培養細胞を用いることとした。まず、解析に供試する培養細胞の生理的状态を考慮する必要があることから、Settled cell volume を指標に細胞増殖を調べた。NK-219mm-0 由来のカルスは、500 ml のサスペンション培地にて振盪培養を開始してから 15 日後まで一定の速度で増殖していたが、それ以降は増殖速度が低下した。従って、15 日目を境に増殖期から定常期に移行するものと思われる。以前の実験から、NK-219mm-0 と NK-219mm-CMS では増殖速度に違いがないことを確認している。ミトコンドリア単離は増殖期にある培養細胞を用いて行った。NK-219mm-0 および NK-219mm-CMS 由来の培養細胞から単離したミトコンドリアの膜電位を測定したところ、State3 および State4 で CMS ミトコンドリアの膜電位が正常ミトコンドリアよりも低かった。この差は、t 検定によって統計的に有意であった。膜電位の低下の原因を探るために、膜電位形成に関わる ATP 合成酵素および ANT それぞれの阻害剤である oligomycin および carboxyatractyloside (ANT-inhibitor) を State3 条件の反応液に加えて膜電位を測定した。その結果、阻害剤存在下でも CMS ミトコンドリアの膜電位は正常よりも有意に低下していた。本実験は、ロテノン存在下で行われており、複合体 II から複合体 I への電子の逆流はない。膜電位の低下により、電子伝達系が活性化され、酸素呼吸速度が上昇している可能性がある (このことはすでに肥大根ミトコンドリアの呼吸解析から示唆されている)。また、このことにより、活性酸素種の発生に影響があるかもしれない。今後、活性酸素種と花粉不稔について調べる必要がある。

### (2) ミトコンドリア $F_0F_1$ -ATPase を改変した形質転換テンサイ作出の試み

ミトコンドリア  $F_0F_1$ -ATPase は膜電位の大きな消費者であり、これを操作することで花粉形成に影響を与えられるならば、ミトコンドリア活性と雄性不稔を関連づけられるかもしれない。そこで、まず、ミトコンドリア *atp9* を利用した実験系を試みた。Hernould et al. (1993) は、コムギ *atp9* ゲノム断片をタバコの核ゲノムに遺伝子導入し、細胞質中で未編集 mRNA から翻訳された ATP9 タンパク質をミトコンドリア輸送シグナルによって

ミトコンドリアへ輸送させ、栄養成長に影響を与える事無く花粉不稔を誘導することに成功している。テンサイ *atp9* には 4 か所の RNA 編集部位が存在し、いずれも mRNA 上で指定するアミノ酸残基を変更する。そのため、未編集 *atp9* の導入は ATP 合成に何らかの影響を与えることが期待された。テンサイミトコンドリアゲノムより得られた *atp9* の塩基配列の 3' 末端側に in-frame で FLAG および HA タグ配列を付加し、5' 末端側にはミトコンドリア移行シグナルである PDHE1 $\alpha$  を配置した。プロモーターは、花芽特異的な発現を促すシロイヌナズナ *APETALA3* 遺伝子 (*AtAp3*) のプロモーターを用いた。このコンストラクトを NK-219mm-0 および NK-219mm-CMS へ導入した。

得られた形質転換体から抽出した DNA を鋳型に、薬剤耐性遺伝子特異的なプライマーを用いた PCR 反応を行い、導入遺伝子を持つ個体を選抜し、NK-219mm-0 および NK-219mm-CMS を宿主とする形質転換体をそれぞれ 10 個体および 11 個体得た。導入したタンパク質が蓄積しているかどうか確認すべく、NK-219mm-0 および NK-219mm-CMS を宿主とする形質転換体より 5 個体ずつ選び、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、予想されるサイズである 10kDa 付近に特異的なシグナルは検出されなかった。

次に異植物種由来のミトコンドリア  $F_0F_1$ -ATPase の  $\gamma$  サブユニットをテンサイ葯で発現させることとした。本実験では、不和合性発現を期待しシロイヌナズナの  $\gamma$  サブユニット (*AtATP3*) を導入することとした。コントロールとなるテンサイ  $\gamma$  サブユニットは未同定である。そのため、*AtATP3* のアミノ酸配列を用いて、テンサイゲノムデータベースにおいて相同性検索した。その結果、三つの候補遺伝子 (*Bv5\_123510\_tzod*、*Bv4\_088420\_ixmo* および *Bv8\_186220\_smue*) が見出され、中でも最も相同性の高い *Bv5\_123510\_tzod* が最有力候補と考えられた。

*Bv5\_123510\_tzod* がミトコンドリア  $\gamma$  サブユニットであるかどうか確かめるべく、アミノ酸配列比較解析を行った。他植物種のミトコンドリアおよび葉緑体  $\gamma$  サブユニット (*AtATPC1* および *AtATPC2*)、*Bv5\_123510\_tzod*、*Bv4\_088420\_ixmo* および *Bv8\_186220\_smue* のアミノ酸配列に基づき、最尤法による系統樹を描くと、*Bv5\_123510\_tzod* は *AtATP3* と同じクレードに含まれ、他の二つの候補遺伝子 *Bv4\_088420\_ixmo* および *Bv8\_186220\_smue* は *AtATPC1* および *AtATPC2* と同じクレードに含まれていた。さらに Target P による局在予測においても、*Bv5\_123510\_tzod* の翻訳産物はミトコンドリアに局在し、*Bv4\_088420\_ixmo* および *Bv8\_186220\_smue* は葉緑体に局在すると予測された。

*Bv5\_123510\_tzod* の翻訳産物を調べるため、コード域 C 末端に FLAG および HA タグ配列を

in-frame で付加し pMDC32- $\Omega$  にクローン化して、テンサイ培養細胞において強制発現させた。形質転換カルス由来の粗ミトコンドリアタンパク質を SDS-PAGE により泳動し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行うと約 43kDa のシグナルが得られ、予想される翻訳産物の分子量と一致した。これらの結果から、*Bv5\_123510\_tzod* がテンサイ  $\gamma$  サブユニットをコードすることが強く示唆された。以後、*Bv5\_123510\_tzod* を *BvATP3* と示す。

テンサイで発現させた *AtATP3* が内在性  $F_0F_1$ -ATPase に組み込まれるかどうか確認することにした。テンサイ培養細胞においてタグ配列を付加した *AtATP3* と *BvATP3* を強制発現させた。*AtATP3* のコード配列の下流に FLAG および HA タグ配列を in-frame で付加した上で、テンサイ培養細胞において強制発現させた。形質転換した培養細胞から抽出した粗ミトコンドリアタンパク質を用いてウェスタンブロット解析を行うと、抗 HA 抗体によって約 40kDa の特異的なシグナルが得られ、予想されるサイズと一致した。次に、導入タンパク質が内在性の ATP 合成酵素に組み込まれるか確認した。形質転換カルス由来の粗ミトコンドリアタンパク質を Blue-Native PAGE に供試し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行うと、*BvATP3* 導入カルスにおいて約 720kDa のシグナルが得られた。抗 ATP6 抗体を用いて同一メンブレンに反応させたところ、同じサイズに特異的なシグナルが得られたことから、導入した *BvATP3* タンパク質は内在性 ATP 合成酵素に組み込まれていることが示された。一方で、*AtATP3* 導入形質転換カルス由来の粗ミトコンドリアタンパク質から抗 HA 抗体の特異的なシグナルは検出されなかった。*AtATP3* 特異的なシグナルが得られないのは、サンプルの精製度が低いためであると考え、密度勾配遠心によって精製ミトコンドリアを得て解析を行ったところ、抗 HA 抗体によって 720kDa に特異的なシグナルが得られ、抗 ATP6 抗体によるシグナルとサイズが一致した。このことから、導入した *AtATP3* タンパク質も内在性 ATP 合成酵素に組み込まれていることが示された。

次に、それらを導入した形質転換植物を作成した。プロモーターには *AtAp3* プロモーターを用いた。NK-219mm-0 および NK-219mm-CMS に遺伝子導入し、薬剤耐性遺伝子および導入遺伝子にそれぞれ特異的なプライマーを用いた PCR 反応によって、導入遺伝子を持つ個体を選抜した。NK-219mm-0 および NK-219mm-CMS に対し、*AtATP3* を導入した個体はそれぞれ 7 個体および 3 個体、*BvATP3* を導入した個体はそれぞれ 1 個体および 5 個体得られた。

得られた形質転換体の葯を肉眼で観察し、葯内容物を Alexander 染色すると、NK-219mm-CMS に *AtATP3* を導入した 3 個体および *BvATP3* を導入した 5 個体は不稔を示した。この表現型は、非形質転換 NK-219mm-CMS

と区別できない。さらに、NK-219mm-0 に AtATP3 を導入した形質転換体 7 個体では、正常な稔性を示した。一方、1 個体のみ得られた BvATP3 を導入した形質転換体では、葯は黄色を呈するが裂開が認められなかった。そこで、葯内容物の観察を行ったところ、花粉内部が赤く染色されない花粉のみが検出された。導入タンパク質が蓄積しているかどうか確かめるべく、SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析を行った。いずれの植物体の葯からも、抗 HA 抗体によって特異的なシグナルが検出された。

テンサイ *atp9* を発現させる実験では、導入遺伝子翻訳産物が検出されない。導入タンパク質が蓄積しない理由として、まず細胞質で発現させた ATP9 が毒性を発揮している可能性がある。ATP9 タンパク質の約半分が膜貫通ドメインから成るため、疎水性が高い。疎水性タンパク質はミトコンドリアへ輸送されにくく、かつしばしば有害である。これを克服せねばならない。もう一つの  $\gamma$  サブユニットを利用する実験では、導入遺伝子は発現している。さらに少なくともテンサイ培養細胞で翻訳産物はミトコンドリア  $F_0F_1$ -ATPase に組み込まれることがわかった。ただし、BvATP3 に比べて、 $F_0F_1$ -ATPase に組み込まれた AtATP3 を検出するのは困難であった。これは、AtATP3 の組み込み効率が低いからかもしれない。BvATP3 と AtATP3 の相同性はアミノ酸配列レベルで約 80% であり、この数字は効率的な組み込みに不十分なのかもしれない。今後、より近縁な植物種由来の  $\gamma$  サブユニット遺伝子を試験する必要がある。BvATP3 あるいは AtATP3 を導入した形質転換テンサイを得ることができた。花粉稔性については AtATP3 を導入しても稔性は変化しないが、BvATP3 を正常系統へ導入すると稔性が低下し、半不稔を示した。さらに調べた全ての個体で花芽あるいは葯に導入タンパク質が蓄積していたことから、稔性の低下は導入遺伝子の作用による可能性が示唆された。BvATP3 が花粉稔性に影響するとしたら、その原因はタグ配列かもしれない。一方、AtATP3 でそのような作用が見られないのは、 $F_0F_1$ -ATPase に組み込まれる翻訳産物が少ないからと説明できる。また、BvATP3 を遺伝子導入した際に、内在性 BvATP3 の発現に影響を与え、不稔性が誘導されたのかもしれない。今後、これらの可能性について検証を行う必要がある。

### (3) テンサイ新規稔性回復遺伝子の作用

ミトコンドリア遺伝子 *preSatp6* と *Rf1* の関係は少しずつ解明されつつあるが、比較的新しく発見された *Rf2* については情報が少ない。そこで、*Rf2* と *preSatp6* の関係を調査した。

TA-33BB-0、TA-33BB-CMS および E60-F4-Rf2 の開花前の葯から total RNA を抽出し、*preSatp6* の 5' 側配列、3' 側配列、および全長配列をプローブとするノーザンブロット

解析を行った。その結果、TA-33BB-0 と TA-33BB-CMS ではシグナルパターンが大きく異なっていた。E60-F4-Rf2 のシグナルパターンは TA-33BB-CMS と同一であり、両者を区別することはできなかった。

*preSatp6* mRNA における RNA 編集を調査した。*preSatp6* の RNA 編集部位は、すでに決定されているので、編集頻度を cDNA ダイレクトシーケンスにより見積もった。その結果、*preSatp6* は 2 カ所の C-U 編集部位を持つが、TA-33BB-CMS と E60-F4-Rf2 のいずれにおいても同部位が低頻度に編集されていた。

続いて、preSATP6 タンパク質をウェスタンブロット法により解析した。TA-33BB-0、TA-33BB-CMS および E60-F4-Rf2 の開花前の葯タンパク質を SDS-PAGE により分画し、抗 preSATP6 抗体と反応させた。その結果、TA-33BB-CMS および E60-F4-Rf2 から同一サイズで同強度のシグナルバンドが検出された。コントロールとして COXI 抗体による解析を行ったが、3 つのサンプルからほぼ同一のシグナルバンドが現れた。

*preSatp6* は、その翻訳産物が複合体を形成する。そこで、この複合体に対する *Rf2* の効果を調べた。ここでは、TA-33BB-CMS、E60-F5-Rf2、および E60-F5-rf2 (E60-F4-Rf2 を自殖して得た、それぞれ *Rf2* および *rf2* を保持する個体) の未成熟葯タンパク質を Blue Native-PAGE で分画し、抗 preSATP6 抗体と反応させた。その結果、3 つのサンプルから同一のシグナルバンドが検出された。コントロールである TA-33BB-CMS::Rf1 からは、より低分子のバンドが検出されたので、試料の調製は正しく行われた。

以上より、*Rf2* の作用は *preSatp6* の転写や翻訳に直接影響するとは考えにくい。これは、翻訳産物同士が相互作用する *Rf1* とは対照的である。多くの植物種では CMS 発現におけるミトコンドリアと核の相互作用は、転写後または翻訳時に見つかっている。一方、テンサイでは *Rf1* は翻訳後に作用するし、*Rf2* についてもその可能性が高いが、その詳細は今後の研究を俟たねばならない。テンサイで翻訳後相互作用が独自に進化してきたのであれば、これは大変興味深いケースである。ミトコンドリア機能解析と合わせ、今後 CMS 機構解明に向けた研究を進めていく予定である。

## 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 5 件)

- ① Ohgami T, Uchiyama D, Ue S, Yui-Kurino R, Yoshida Y, Kamei Y, Kuroda Y, Taguchi K, Kubo T, Identification of molecular variants of the nonrestoring restorer-of-fertility 1 allele in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Theoretical and Applied Genetics*, 査読あり, Vol.

129, pp. 675-688, 2016. doi: 101007/s00122-015-2656-0

- ② Onodera Y, Arakawa T, Yui-Kurino R, Yamamoto MP, Kitazaki K, Ebe S, Matsunaga M, **Taguchi K**, **Kuroda Y**, Yamashita S, Sakai T, Kinoshita T, Mikami T, **Kubo T**, Two male sterility-inducing cytoplasms of beet (*Beta vulgaris*) are genetically distinct but have closely related mitochondrial genomes: implication of a substoichiometric mitochondrial DNA molecule in their evolution, *Euphytica*, 査読あり, Vol. 206, pp. 365-379, 2015. doi: 10. 1007/ s10681-015-1484-2
- ③ Kitazaki K, Arakawa T, Matsunaga M, Yui-Kurino R, Matsuhira H, Mikami T, **Kubo T**, Post-translational mechanisms are associated with fertility restoration of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris*), *The Plant Journal*, 査読あり, Vol. 83, pp. 290-299, 2015. doi: 10. 1111/tpj. 12888
- ④ Honma Y, **Taguchi K**, Hiyama H, Yui-Kurino R, Mikami T, **Kubo T**, Molecular mapping of restorer-of-fertility 2 gene identified from a sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) homozygous for the non-restoring restorer-of-fertility 1 allele, *Theoretical and Applied Genetics*, 査読あり, Vol. 127, pp. 2567-2574, 2014. doi: 10. 1007/ s00122-014-2398-4 (<http://hdl.handle.net/2115/60418>)
- ⑤ **Taguchi K**, Hiyama H, Yui-Kurino R, Muramatsu A, Mikami T, **Kubo T**, Hybrid breeding skewed the allelic frequencies of molecular variants derived from the restorer of fertility 1 locus for cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Crop Science*, 査読あり, Vol. 54, pp. 1407-1412, 2014. doi: 10. 2135/cropsci2013. 11. 0731 (<http://hdl.handle.net/2115/56484>)

[学会発表] (計22件)

- ① 荒河匠、勝山豊代、門脇卓哉、三上哲夫、**久保友彦**、「テンサイ花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* 領域に座乗する4コピーの *Oma1* 様遺伝子の機能解析」、日本育種学会第129回講演会、平成28年3月22日、横浜市立大学(神奈川県横浜市)
- ② 上幸代、本間雄二郎、吉田有宇、亀井陽子、**久保友彦**、「テンサイ花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* の多様な遺伝子構造から探る *Rf1* の進化機構」、日本育種学会第129回講演会、平成28年3月22日、横浜市立大学(神奈川県横浜市)
- ③ 荒河匠、北崎一義、栗野里香、三上哲夫、

**久保友彦**、「テンサイ細胞質雄性不稔性の稔性回復には翻訳後制御が関わる」、第38回日本分子生物学会年会、平成27年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

- ④ 上幸代、吉田有宇、亀井陽子、**久保友彦**、「テンサイ花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* の多様な進化機構について」、日本遺伝学会第87回大会、平成27年9月24日、東北大学(宮城県仙台市)
- ⑤ **久保友彦**、荒河匠、栗野里香、「低化学量比ミトコンドリア DNA 分子からみた野生ビート由来雄性不稔細胞質の進化」、日本育種学会第128回講演会、平成27年9月12日、新潟大学(新潟県新潟市)
- ⑥ 荒河匠、勝山豊代、門脇卓哉、三上哲夫、**久保友彦**、「テンサイ *Rf1* 領域の *Oma1* 様遺伝子のコピー数が稔性回復に与える影響」、日本育種学会第128回講演会、平成27年9月12日、新潟大学(新潟県新潟市)
- ⑦ 本間雄二郎、田口和憲、内山大輔、**久保友彦**、「テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性における *Rf2* がもたらす花粉稔性回復過程の分子的解析」、日本育種学会第127回講演会、平成27年3月22日、玉川大学(東京都町田市)
- ⑧ 荒河匠、北崎一義、栗野里香、三上哲夫、**久保友彦**、「テンサイ *Rf1* 領域の *Oma1* 様遺伝子と CMS 関連遺伝子 *preSatp6* のタンパク質間相互作用」、日本育種学会第127回講演会、平成27年3月22日、玉川大学(東京都町田市)
- ⑨ **久保友彦**、田口和憲、森谷麻里、松平洋明、樋山肇、栗野(由井)里香、村松亜季、三上哲夫、「ミトコンドリアによる雄性不稔性発現を許容する核遺伝子：テンサイにおける細胞質雄性不稔維持アレルの事例」、第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ⑩ **久保友彦**、「細胞質雄性不稔を引き起こすミトコンドリアは何をしているのか」、国立遺伝学研究所研究集会「オルガネラゲノムに支配される生命現象」、平成26年11月7日、国立遺伝学研究所(静岡県三島市)
- ⑪ 本間雄二郎、田口和憲、**久保友彦**、「RNA-seq によるテンサイ Owen 型細胞質雄性不稔系統と可稔系統の葯遺伝子発現比較解析」、日本育種学会第126回講演会、平成26年9月27日、南九州大学(宮崎県都城市)
- ⑫ 本間雄二郎、田口和憲、樋山肇、栗野里香、浜田宏之、**久保友彦**、「テンサイ細胞質雄性不稔に作用する稔性回復遺伝子 *Rf2* 座から見出された候補遺伝子の特徴付け」、日本遺伝学会第86回大会、平成26年9月17日、長浜バイオ大学(滋賀県長浜市)
- ⑬ 勝山嵩也、鏡豊代、**久保友彦**、「テンサイおよび *Beta vulgaris* 遺伝資源における稔性回復遺伝子 *Rf1* の塩基配列多型」、日本育種学会第125回講演会、平成26年3月22日

- 日、東北大学(宮城県仙台市)
- ⑭ 本間雄二郎、田口和憲、樋山肇、栗野里香、浜田宏之、久保友彦、「テンサイOwen型細胞質雄性不稔性に対する稔性回復遺伝子 *Rf2* がもたらす稔性回復現象にPPR 遺伝子は関与するか?」、日本育種学会第125回講演会、平成26年3月22日、東北大学(宮城県仙台市)
- ⑮ 松永宗幸、高橋愛也、栗野里香、三上哲夫、久保友彦、「被子植物進化の過程で核へ移行したミトコンドリアリボソームタンパク質遺伝子S19:翻訳産物の輸送能獲得に関連するアミノ酸残基の同定」、第36回分子生物学会年会、平成25年12月5日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ⑯ 本間雄二郎、田口和憲、樋山肇、栗野里香、浜田宏之、久保友彦、三上哲夫、「テンサイOwen型細胞質雄性不稔性における新規の花粉稔性回復現象とPPR 遺伝子に関連はあるか?」、第36回分子生物学会年会、平成25年12月4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ⑰ 石橋裕也、栗野里香、鏡豊代、小野克、久保友彦、「ミトコンドリア異常に起因する花粉不稔性におけるプログラム細胞死に関与する遺伝子の発現」、第36回分子生物学会年会、平成25年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ⑱ 鏡豊代、倉田昌幸、村松亜季、荒河匠、三上哲夫、久保友彦、「テンサイ細胞質雄性不稔の花粉稔性回復は核遺伝子型背景の影響を受ける」、日本育種学会第124回講演会、平成25年10月13日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
- ⑲ 本間雄二郎、田口和憲、樋山肇、栗野里香、浜田宏之、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*Rf2*座の遺伝子予測解析と特徴づけ」、日本育種学会第124回講演会、平成25年10月13日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)
- ⑳ 久保友彦、「花粉形成をめぐるミトコンドリアとのコンフリクトを、核はどうやって解消するか:テンサイ(サトウダイコン)の事例」、日本遺伝学会第85回大会、平成25年9月21日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)
- ㉑ 本間雄二郎、田口和憲、樋山肇、栗野里香、浜田宏之、久保友彦、三上哲夫、「テンサイOwen型細胞質雄性不稔性に作用する稔性回復遺伝子 *Rf2* 座の塩基配列解析と遺伝子予測解析」、日本遺伝学会第85回大会、平成25年9月19日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市)
- ㉒ Tomohiko Kubo, Hiroaki Matsuhira, Hiroyo Kagami, Masayuki Kurata, Mari Moritani, Kazuyoshi Kitazaki, Kazunori Taguchi, Testuo Mikami, 'Oma1-like protease genes are clustered in *restorer-of-fertility 1* locus of sugar beet', Plant Genome Evolution: A

Current Opinion Conference, September 9, 2013, Amsterdam (The Netherland)

[図書] (計2件)

- ① Kagami H, Kurata M, Matsuhira H, Taguchi K, Mikami T, Tamagake H, Kubo T, Chapter 27 Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.), (Kan Wang ed.) *Agrobacterium Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1223, pp. 335-347, DOI 10.1007/978-1-4939-1695-5\_27, Springer Science+Business Media, New York, 2015. (<http://hdl.handle.net/2115/59861>)
- ② Kubo, T, 3.3.3 Sugar beet, *Frontiers of Agricultural Science* (Yoshitaka Uchida, Junichi Kashiwagi, Tetsuya Yamada, Hanako Shimura, Satoshi Koike, Tohru Hira, Shigenobu Koseki, Tomoaki Nakatani, and Yasuyuki Hashidoko eds.), pp. 87-88, Shoukadoh Book Sellers (ISBN 978-4-87974-685-6 C3061), 2015.

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/ikushu/gelab/index.html>

## 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・教授  
研究者番号: 40261333

### (2) 研究分担者

田口 和憲 (TAGUCHI, Kazunori)  
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  
研究者番号: 80414754

黒田 洋輔 (KURODA, Yosuke)  
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・研究員  
研究者番号: 40595071