

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450011

研究課題名(和文) 日本産ダイコンの多様性に果たす野生ダイコンの遺伝的役割の解明

研究課題名(英文) Genetic roles of wild radishes on diversification of Japanese cultivated 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我国の栽培ダイコンの遺伝的多様性に対する野生ダイコン、とりわけハマダイコンの役割を明らかにすることを目的とした。特にミトコンドリアの細胞質雄性不稔(CMS)遺伝子と、それに対する核の稔性回復遺伝子(Rf遺伝子)の対応を明らかにしようとした。我国のダイコン品種にはCMS遺伝子であるorf138があり、かつこれに対するRf遺伝子のorf687とRftを持つ品種も多く存在することが明らかとなった。このため、ハマダイコンからのこれらの遺伝子の導入が盛んに行われていることが示された。またRf遺伝子を持ちながら雄性不稔を示す品種が観察され、ミトコンドリアと核の間の複雑な相互関係が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In Japan, cultivated radishes show huge diversity that can not be observed in other countries. In order to know genetic roles of the wild radishes to the development of diversity in Japanese cultivars, differentiations of a mitochondrial cytoplasmic male sterile gene (orf138) and fertility restoration genes (Rf genes) in nucleus were observed. Also, the relationships between the presence of Rf genes and the actual pollen fertility were investigated. It was found by PCR of orf138 gene that most of the modern radish varieties possess orf138, the fact indicating that male sterile gene has been rapidly introduced into cultivars. A half of the investigated varieties possessed Rf genes. By the observation of phenotypic pollen fertility, it was found that several varieties demonstrated male sterility despite the fact that they have the Rf gene. Complex relationship between orf138 and Rf genes were estimated.

研究分野：植物育種学

キーワード：栽培ダイコン ハマダイコン 細胞質雄性不稔 稔性回復遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我国では古くからダイコンが食生活上極めて重要な位置を占めている。また長いダイコンの栽培の歴史の中で、多様な形態の特徴を持つ品種が各地で育成されてきた。このダイコン品種の多様性は世界に例を見ない。しかしながら我国における栽培ダイコンの多様性については、その起源が十分に明らかになっていない。その一方で、我国には広く野生ダイコンのハマダイコンが分布している。このハマダイコンと栽培ダイコンの遺伝的関係については、古くから論争があるものの、現在まで両者の関係についての明確な論拠が示されていない。これらの背景から、本研究では、我国の栽培ダイコンの多様性に対するハマダイコンの遺伝的役割を実験的に明らかにしようとした。

2. 研究の目的

(1) 我国の栽培ダイコンの多様性に与える野生ダイコン、とりわけ我国に自生するハマダイコンの遺伝的影響を明らかにするために、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子 (*orf138*) と、これに対する核の稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) を指標として、これらの遺伝子が近年の栽培ダイコンにどのように分布しているかを明らかにしようとした。従来 *orf138* は、我国の栽培ダイコンにはほとんど見出されず、大部分の品種が正常型細胞質を有していた。また我国の栽培品種には *orf138* に対する *Rf* 遺伝子も存在しなかった。これに対して、ハマダイコンにおいては約半数の個体が *orf138* を持つと共に、大部分の個体に *Rf* 遺伝子 (*orf687* または *Rft*) が存在することが明らかになっている。このように *orf138* と *Rf* 遺伝子の分布は、ハマダイコンと栽培ダイコンの間で著しく対照的であった (Yamagishi and Terachi 1996; Yamagishi 1997)。近年ダイコンをはじめとするアブラナ科作物では、*orf138* を利用した細胞質雄性不稔による F<sub>1</sub> 育種が急速に発展している。このため、本研究では我国の栽培ダイコンにおける *orf138* ならびに *orf687*、*Rft* の分布を調査することによって、本来ハマダイコンが持っていたこれらの遺伝子が栽培ダイコンの品種にどのような影響を与えているかを明らかにすることを目的とした。

(2) ハマダイコンにおいては、雄性不稔遺伝子 *orf138* に関して塩基配列変異が観察されており、8 タイプの *orf138* が存在することが知られている。その一方で、*Rf* 遺伝子にも *orf687* と *Rft* が存在することが明らかになっている。これらのことは *orf138* と *Rf* 遺伝子との間に多様な対応関係があることを示唆している。このため、栽培ダイコンについて、*orf138* および *Rf* 遺伝子の対応について、実際に花粉稔性の表現型を調査することによって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我国で流通しているダイコンの品種 31 品種を供試した。これらの品種について 1 品種あたり 4~10 個体を用いて *orf138* および *Rf* 遺伝子の有無を調査した。各個体の葉から DNA を単離し、PCR によって *orf138* をミトコンドリアに持つか否かを識別した。同様に *Rf* 遺伝子に関して、PCR によって *orf687* および *Rft* の有無を調査した。その上で *orf687* については PCR 産物の制限酵素処理によって、稔性回復機能を有する *orf687* かどうかを判定した。さらに上記の調査個体のうち *orf138* を持つ個体については、PCR 産物の塩基配列を決定することによって、現在までに明らかにされている *orf138* の 9 タイプのうち、どのタイプに当たるかを決定した。

(2) *orf138* を持つことと、そのタイプが明らかになった個体について、実際に開花させて *Rf* 遺伝子の有無と花粉稔性との対応を調査した。その結果から、*Rf* 遺伝子を持つと考えられるものの、雄性不稔性を示した個体について、*orf138* の発現とそれに対する *Rf* 遺伝子の影響を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 供試品種について雄性不稔遺伝子の *orf138* の有無を調査したところ、半数以上の品種が *orf138* を持っていることが判明した (表 1)。このことは、近年のダイコンの育種において、オグラ型の細胞質雄性不稔による雑種強勢育種が急速に普及していることを示す。*orf138* を持つ品種は、A 型と H 型の 2 つのタイプに分類されたが、このうち A 型は、我国のハマダイコンにおける頻度は必ずしも高くなく、ハマダイコンに存在する *orf138* の 8 タイプのうち、特定の *orf138* が栽培ダイコンに導入され利用されていることが明らかになった。一方、H 型の *orf138* は、我国のハマダイコンおよび栽培ダイコンにおいては分布が知られていなかったタイプである。また供試品種の中に、A 型と H 型の個体が混在する品種が観察された。この H 型は台湾のダイコンで認められた *orf138* であり、このタイプの遺伝子を持つ我国の栽培ダイコンの育種経過については、さらに詳しく調査する必要がある。

表 1 我国のダイコン品種における雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の対応

細胞質	稔性回復遺伝子			計
	<i>orf687</i>	<i>Rft</i>	<i>Rf</i> なし	
<i>orf138</i> (A 型)	1	7	7	14 <sup>a</sup>
<i>orf138</i> (H 型)	1	2	2	5
正常型	3	3	8	13 <sup>a</sup>

a *orf687* と *Rft* を共に有する品種がそれぞれ 1 品種存在した

(2) *orf138* に対する *Rf* 遺伝子は、調査したうちの半数の品種に存在した(表1)。ダイコンは主として根部を利用する作物であり、細胞質雄性不稔を利用した雑種強勢育種においては、必要とされない形質である。それにも関わらず、半数の品種が *Rf* 遺伝子を持つことは、我国のダイコンの育種上興味深い現象である。*Rf* 遺伝子の有無に関しては、個々の品種が *orf138* を持つか、正常型細胞質を持つかという細胞質の分化との対応関係は観察されなかった。さらに *Rf* 遺伝子のうちでは、遺伝子の同定が終了した *orf687* よりも *Rft* を持つ品種が多く認められた。このことは、ハマダイコンにおける *orf687* と *Rft* の分布頻度と共通しており、栽培ダイコンにおける *Rf* 遺伝子の由来に興味を持たれる。さらに品種内に *orf687* と *Rft* を共に持つ個体が含まれる品種が複数存在し、これらの品種の育種素材についても詳しく調査する必要があると考えられた。

(3) 以上のように、従来正常型細胞質の品種が大部分であった我国の栽培ダイコンにおいては、ハマダイコンに分布する *orf138* を持つ品種の普及が急速に進んでいることが見出された。その一方で、この *orf138* の分布と *Rf* 遺伝子の分布との間には明確な対応関係は観察されなかった。このため、本来ハマダイコンに由来するこれらの遺伝子が、ダイコンの育種過程においてどのように導入されたかについては、今後詳細に調査する必要がある。

(4) 次に *orf138* を持つ品種について、実際の花粉稔性を調査した。その結果、*Rf* 遺伝子を持たないと判定された品種はすべて雄性不稔性を示したものの、*Rf* 遺伝子を持つと考えられた品種においても、正常な花粉稔性を有する品種は少数で、雄性不稔の表現型を示す品種が大半を占めた(表2)。このことは、*orf138* と *Rf* 遺伝子の間の複雑な対応関係を示唆した。*Rf* 遺伝子のうち *Rft* は *orf138* の mRNA をプロセシングすることによって、この遺伝子の発現を抑制し、花粉稔性を回復することが知られている。そこで、*Rft* を持ちながら雄性不稔性を示した品種について、*orf138* の mRNA を調査したところ、いずれもプロセシングを受けているにもかかわらず、ORF138 タンパクが存在していた。このため、栽培ダイコンの中には、*Rft* による *orf138* mRNA のプロセシングの有無によって表現型が決定されるという、今までに解明された両遺伝子の対応関係では説明できない対応を持つ品種が存在することが新たに明らかになった。

(5) さらに、稔性回復機能を有する *orf687* を持つにもかかわらず雄性不稔を示す品種が発見された。この品種では *orf138* の mRNA はプロセシングを受けておらず、また ORF138

タンパク質の蓄積も確認されて *Rf* 遺伝子が機能していないことが明らかになった。そこで、この遺伝子の機能を決定するとされる塩基置換以外の領域についても塩基配列を決定した。その結果、この品種の *orf687* は稔性回復機能を持つとして同定された *orf687* の塩基配列と同一であった。このため *orf138* と *orf687* を共に持ちながら、雄性不稔の表現型を示した品種における雄性不稔性の原因については、さらに別の視点から調査する必要がある。

表2 *orf138* を持つダイコンにおける *Rf* 遺伝子の有無と花粉稔性との関係

<i>Rf</i> 遺伝子	花粉稔性		
	可稔	不稔	可稔/不稔 <sup>a</sup>
あり	2	6	2
なし	0	8	0
計	2	14	2

a 品種内に可稔の個体と不稔の個体が存在した

(6) 以上のように、本研究によって、*Rft* または *orf687* を有しながら、雄性不稔の表現型を示す品種が存在することが新しく発見された。このため、現在までに明らかにされている *orf138* とこれに対する *Rf* 遺伝子の働きだけでは説明できない未知の対応が、我国の栽培ダイコンに存在することが示唆された。今後さらに詳細に *orf138* と *Rf* 遺伝子の機能について、調査する必要がある。

#### < 引用文献 >

Yamagishi, H. and T. Terachi (1996) Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. . Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. Theor. Appl. Genet. 93:325-332

Yamagishi, H. (1997) Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes. Genes Genet. Syst. 73:79-83

#### 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 1件)

Hatono, S., Nishimura, K., Murakami, Y., Tsujimura, M. and Yamagishi, H. Complete mitochondrial genome sequences of *Brassica rapa* (Chinese cabbage and mizuna), and intraspecific differentiation of cytoplasm in *B. rapa* and *Brassica juncea*. Breeding Science 67

(In press). 2017

〔学会発表〕(計 5 件)

軸屋 恵、寺地 徹、山岸 博 : *Sinapis* 属植物におけるミトコンドリアの *orf108* の分布。日本育種学会第 131 回講演会、名古屋大学(愛知県名古屋市) 2017.3.29-30  
山岸 博、崎山 史歩、金山 純子、軸屋 恵 : タカナと CMS キャベツの体細胞雑種作出。日本育種学会第 130 回講演会、鳥取大学(鳥取県鳥取市) 2016.9.24-25  
鳩野 紗希、辻村 真衣、山岸 博 : ハクサイとミズナのミトコンドリアゲノムの全塩基配列。日本育種学会第 130 回講演会、鳥取大学(鳥取県鳥取市) 2016.9.24-25  
軸屋 恵、寺地 徹、山岸 博 : ダイコンの稔性回復遺伝子の変異がオグラ型雄性不稔の発現に与える影響。日本育種学会第 130 回講演会、鳥取大学(鳥取県鳥取市) 2016.9.24-25  
前田 貴文、田中 花歩、柴田 菜々恵、山岸 博 : *Brassica rapa* における種皮型関連遺伝子の同定に向けた連鎖解析。日本育種学会第 130 回講演会、鳥取大学(鳥取県鳥取市) 2016.9.24-25

〔図書〕(計 2 件)

Yamagishi, H. In:Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) The Radish Genome. Springer(In press)、Speciation and diversification of radish. 2017

Yamagishi, H. and Terachi, T. In:Nishio, T. and Kitashiba, H. (eds) The Radish Genome. Springer(In press)、Cytoplasmic male sterility and mitochondrial genome variations in radish. 2017

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

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :

(4)研究協力者

( )