

学 位 論 文 題 名

野生ビートより見出された細胞質雄性不稔性の機構解明

学位論文内容の要旨

本論文は155頁からなる和文論文であり、図54と表8を含む。別に、参考論文3編が添えられている。

細胞質雄性不稔性（CMS）は雌性配偶子や栄養器官には何の障害も現れず、雄性配偶子（花粉）のみが退化する現象である。多くの作物は両性花をつけるので、掛け合わせを行う時には母株の雄ずいを予め除去しなければならない。母株に細胞質雄性不稔性を導入しておけば、煩雑な雄ずいの除去操作が省けるので、産業規模でハイブリッド種子を生産する際にこの形質は好んで利用される。

テンサイ（シュガービート）栽培品種の大多数も、CMS株を母本に配して育成されたハイブリッドで占められる。しかし、現在利用されているCMSは、米国のテンサイ品種より発見されたOwen-CMS一種のみなので、普及品種のもつ遺伝子型の単純化をまねき、そのため病虫害や環境ストレスに対する遺伝的脆弱性が強く懸念される。こうした危険性を未然に回避するには、遺伝的に多様なCMSを発見し、その発現機構を解明した上で、育種素材として整備することが急務である。本研究では、野生ビートに由来する2種のCMS

（S-2型CMSおよびS-3型CMS）について、その発現機構を遺伝学と分子生物学の両面から解析し、育種利用に供されているOwen-CMSと比較した。得られた結果は以下のように要約される。

1. 花粉稔性回復の遺伝機構

検定交配実験を通じて、S-2型CMSおよびS-3型CMSの発現が花粉不稔をもたらす細胞質遺伝子とその働きを抑える2対の優性核遺伝子（Rf）との相互作用によって支配され、しかもRf遺伝子の種類と作用様式がOwen-CMSの場合とは異なることを立証した。

2. S-3型細胞質雄性不稔性の分子機構

S-3型CMS株（パキスタン原産野生ビート由来）を供試し、雄性不稔性の発現にかかわる細胞質遺伝子を含むミトコンドリアゲノムのクローンライブラリーを構築した。次いで、このライブラリーを用いたゲノムウォーキングを行い、S-3型ミトコンドリアゲノム物理・遺伝子地図を完成した。

S-3型ミトコンドリアゲノムは234kbpと274kbpの2種の環状マスター染色体より構成される。S-3型CMS株と正常株（1種類の358kbp環状マスター染色体よりなる）との間で、ミトコンドリアゲノム地図を比較した結果、S-3型ゲノムにおける構造変異域が11箇所にはぼることが明かとなった。これらの変異域の構造と発現の解析を進め、S-3型ゲノムに固有の転写パターンを示す5種の遺伝子（orf129, orf145, orf170, orf187, atp6）を特定した。

orf187は、ミトコンドリア内でmRNAに転写されるものの、タンパク質には翻訳されていないようである。また正常株とS-3型CMS株間にみられるatp6の転写パターンの差異は、転写調節に関わる5'上流域の塩基配列の相違に起因する。しかし、atp6の翻訳産物のサイズと蓄積量に関しては、正常株とS-3型CMS株との間で差異が認められなかった。したがって、orf187とatp6の両遺伝子がS-3型CMSに関与している可能性は極めて低い。

以上の結果に基づき、S-3型CMSの発現に関わる候補ミトコンドリア遺伝子をorf129, orf145, orf170の3種に絞った。因みに、抗ORF129抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、期待通りの14.2kDaタンパク質がS-3型CMS株の雄ずいミトコンドリア画分から特異的に検出された。

3. 細胞質雄性不稔性の発現機序の多様性

Owen-CMSの関与ミトコンドリア遺伝子として、先にcox1とatp6の2種の候補遺伝子が見出された。これら2遺伝子と、本研究で解析したS-3型CMS関連遺伝子との間には、塩基配列の共通性が全く認められない。換言すれば、ともにテンサイの細胞質雄性不稔形質を発現する変異体であるにも拘わらず、Owen-CMSとS-3型CMSでは花粉不稔をもたらすミトコンドリア遺伝子と核遺伝子との相互作用系が明かに相違している。したがって、交配実験を通じて示唆された雄性不稔性の発現機序の多様性が分子レベルでも明確に示されたことになる。

一方、トルコ産野生ビートに由来するS-2型CMSのミトコンドリアゲノムの構造はS-3型ゲノムの構造に酷似する。両ゲノム間に生じた構造差は1箇所に限られ、S-3型ゲノムに固有のorf145/orf170連鎖域がS-2型ゲノムから失われているに過ぎない。

S-3型CMSの候補ミトコンドリア遺伝子として同定されたorf129は、S

－2型ゲノムにも含まれている。しかも、orf129の翻訳産物の蓄積量はS－2型株の方がS－3型株より多い（3～6倍）ことが判明した。興味深いことに、検定交配実験によればS－3型不稔細胞質に作用して完全な稔性回復をもたらすRf遺伝子は、S－2型細胞質に対しても共通に働くものの、その稔性回復作用は不完全である。この稔性回復パターンに見出された差異は、S－2、S－3両CMSに共通の雄性不稔関連遺伝子orf129の発現量の差を反映している可能性が高い。

以上のように、本研究ではS－3型CMS株と正常株におけるミトコンドリアゲノムの構造および発現の詳細な比較解析を行って、S－3型CMSの発現にかかわる候補遺伝子としてorf129を同定した。さらに、orf129がS－2、S－3両CMSに共通の関与ミトコンドリア遺伝子であり、その発現量の差を反映して、これに応答するRf遺伝子の相互作用パターンが両CMS間で異なる可能性を示した。また、テンサイ育種に供されているOwen－CMSと野生ビート由来のS－2、S－3両CMS間では、雄性不稔性の発現機序が異なることを明かにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 上 哲 夫

副 査 教 授 島 本 義 也

副 査 教 授 佐 野 芳 雄

学 位 論 文 題 名

野生ビートより見出された細胞質雄性不稔性の機構解明

本論文は155頁からなる和文論文であり、図54と表8を含む。別に、参考論文3編が添えられている。

花粉退化をもたらす突然変異の中で、細胞質遺伝に従う変異を特に細胞質雄性不稔性(CMS)と呼ぶ。テンサイ栽培品種の大多数は、CMS株を母株に配して育成されたハイブリッドで占められるが、一種類のCMS(Owen-CMSと称する)のみに依存しているので、遺伝子型の単純化をまねき、病虫害や環境ストレスに対する脆弱性が強く懸念される。こうした危険性を回避するには、遺伝的に多様なCMSを発見し育種素材として整備することが急務である。本研究では、野生ビートに由来する2種のCMS(S-2型CMSおよびS-3型CMS)について、その発現機構を調査し、育種利用に供されているOwen-CMSと比較した。得られた結果は以下のように要約される。

1. 花粉稔性回復の遺伝機構

交配実験を通じて、S-2型およびS-3型CMSの発現が花粉不稔をもたらす細胞質遺伝子とその働きを抑える2対の核遺伝子(Rf)との相互作用に支配され、しかもRf遺伝子の種類と作用様式がOwen-CMSの場合とは異なることを立証した。

2. S-3型細胞質雄性不稔性の分子機構

S-3型CMS株(パキスタン原産野生ビート由来)を供試し、雄性不稔の発現にかかわる細胞質遺伝子を含むミトコンドリアゲノムのクローンライブラリーと物理・遺伝子地図を完成した。S-3型ミトコンドリアゲノムは234kbpと274kbpの2種の環状マスター染色体より構成される。S-3型CMS株と正常株との間で、ミトコンドリアゲノム地図を比較した結果、S-3型ゲノムに

おける構造変異域が11箇所にのぼることが明かとなった。これらの変異域の構造と発現の解析を進め、S-3型ゲノムに固有の転写パターンを示す5種の遺伝子 (orf129, orf145, orf170, orf187, atp6) を特定した。

5遺伝子の中で、orf187はmRNAに転写されるものの、翻訳されていないようである。またatp6の翻訳産物のサイズと蓄積量に関しては、正常株とS-3型CMS株との間で差異が認められなかった。以上の結果に基づき、S-3型CMSの発現に関わる候補遺伝子をorf129, orf145, orf170の3種に絞った。抗ORF129抗体を用いたウェスタンブロット分析によれば、S-3型CMS株においてのみORF129タンパク質のシグナルが得られた。

3. 細胞質雄性不稔性の発現機序の多様性

トルコ産野生ビートに由来するS-2型CMSのミトコンドリアゲノムの構造はS-3型ゲノムに酷似する。構造差は1箇所に限られ、S-3型ゲノムに固有のorf145/orf170連鎖域がS-2型ゲノムから失われているに過ぎない。S-3型CMSの候補遺伝子orf129はS-2型ゲノムにも含まれており、しかもorf129の翻訳産物の蓄積量はS-2型株の方がS-3型株より多い(3~6倍)ことが判明した。興味深いことに、S-3型細胞質に作用して完全な稔性回復をもたらすRf遺伝子はS-2型細胞質に対しても共通に働くものの、その作用は不完全である。この稔性回復パターンの差はS-2、S-3両CMSに共通の不稔関連遺伝子orf129の発現量の差を反映している可能性が高い。

一方、Owen-CMSの関与ミトコンドリア遺伝子として、先にcox1とatp6の2種の候補遺伝子が見出された。これら2遺伝子には、S-3型CMS関連遺伝子との共通性が全くない。換言すれば、Owen-CMSとS-3型CMSでは雄性不稔発現にかかわるミトコンドリアと核遺伝子の相互作用系が明かに相違しており、CMS発現機序の多様性が分子的にも示されたことになる。

本研究は野生ビートより見出された細胞質雄性不稔性の機構を分子遺伝学的に明かにしたものであり、その成果は学術および応用の両面で高く評価できる。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者小野寺康之は博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。