

博士（農 学）山 本 将 之

学 位 論 文 題 名

テンサイにおける細胞質雄性不稔性
原因遺伝子の発現に関する研究

学位論文内容の要旨

細胞質雄性不稔性は花粉形成が妨げられる変異形質であり、ハイブリッド作物の種子生産に欠くことができない。この形質はミトコンドリアゲノムに生じた遺伝子突然変異に起因すると考えられるが、不稔性発現の分子機構は不明のままである。

テンサイにおいては由来の異なる複数の細胞質雄性不稔変異が知られており、それぞれの細胞質ゲノムはミトコンドリア DNA の構造差に基づいて S 型、S-2 型および S-3 型の 3 タイプに分類されている。これら 3 種の雄性不稔細胞質ゲノムの下では、花粉稔性の回復に働く核遺伝子（稔性回復核遺伝子）の種類や作用性が互いに異なることが分かっており、花粉不稔の発現に至る分子機構も相違すると考えられる。従って、各々の細胞質ゲノムについて分子的な特徴付けを行い、共通点と相違点を網羅的に究明することによって、細胞質雄性不稔性の機構の全容が明らかになるものと期待される。これまでに各雄性不稔型ミトコンドリアゲノムにおいて、正常稔性(N)株とは異なる転写パターンを生ずる変異遺伝子が数種同定された。本研究ではこれらの変異遺伝子の翻訳産物を調査し、雄性不稔の原因遺伝子の同定を試みた。結果は以下のように要約される。

1 S 型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の解析

育種的利用に供されている S 型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の内、雄性不稔性関与の可能性が考えられる 3 遺伝子 (*orf324*, *coxl*, *atp6*) について翻訳産物を解析した。先ず、普遍的なミトコンドリア遺伝子 *atp8* と 5'コード域の一部および 5' 非翻訳領域を共有するキメラ遺伝子 *orf324* に関して抗体を作製し、花蕾および葉から抽出したミトコンドリアタンパク質に対してウエスタン解析を行った。しかし *orf324* の翻訳産物は全く検出されなかった。*atp8* に関しては、N、S 両株間で翻訳産物の蓄積量に差が見られず、*orf324mRNA* と *atp8mRNA* が翻訳装置を競合することも考え難い。従って *orf324* が直接的、間接的に雄性不稔に関与している可能性は低いと結論づけた。

coxl に関しても同様の解析を試みたが、N 型株と S 型細胞質雄性不稔株との間で COXI タンパク質のサイズと蓄積量に差異は見出されなかった。また、S 型 *atp6* は N

型 *atp6* に比べ著しく伸長したアミノ末端を持つ。両遺伝子に共通のアミノ酸配列を認識する抗体を用いたところ、両者間で翻訳産物の差は認められなかった。一方興味深いことに、S 型 *atp6* の伸長したアミノ末端(*Satp6(Nex)*)を認識する抗体を用いた場合には、S 型不稔株において N 型株には見られない翻訳産物が検出された。ただし、SATP6N(ex)ポリペプチドの蓄積量は稔性回復核遺伝子の有無には左右されないようである。

2 S-2 型および S-3 型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の解析

野生ビートに由来する S-2、S-3 両細胞質雄性不稔株においては、ミトコンドリアゲノムの分子構造が互いに酷似し、花粉稔性回復の遺伝様式も比較的似通っている。両ゲノムより 3 種の変異遺伝子 *orf187*, *atp6*, *orf129* が見付かり、さらに S-3 型ゲノムについてはこれらに加えて *orf145*, *orf170* の 2 変異遺伝子が見出された。ウエスタンプロット解析の結果、*orf187*, *orf145* および *orf170* に関しては翻訳産物が認められず、また *atp6* についても雄性不稔性への関与を示唆するデータは得られなかった。

orf129 は S-2 型株と S-3 型株に固有の遺伝子であり、その相同配列は N 型株や S 型株には含まれていない。*orf129* は S-2、S-3 両雄性不稔株の花薺ミトコンドリアで翻訳されている。しかも ORF129 ポリペプチドの蓄積量は S-2 型株の方が S-3 型株よりも 4 倍程度多いことが分かった。検定交配実験によれば、S-3 型細胞質雄性不稔に作用し完全な稔性回復をもたらす核遺伝子は、S-2 型細胞質雄性不稔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の差は S-2、S-3 両株に共通の雄性不稔ミトコンドリア遺伝子 *orf129* の発現量の差異に起因すると考えるとデータは矛盾なく説明できる。

3 *in organello* 翻訳産物の比較

上述の *Satp6(Nex)* と *orf129* 以外に、雄性不稔株のミトコンドリアゲノム中で翻訳される変異遺伝子が存在するか否かを調べるために、N 型株および 3 種の細胞質雄性不稔株の肥大根よりミトコンドリアを単離し *in organello* 翻訳実験を試みた。ミトコンドリアゲノムコードのタンパク質組成を比較した結果、明確な差異は S 型株においては約 40kDa の固有ポリペプチド、また、S-2 型および S-3 型株では約 10kDa の固有ポリペプチドに限定された。10kDa ポリペプチドは抗 ORF129 抗体を用いた免疫沈降実験を通じて、*orf129* 翻訳産物であることを確認した。また S 型ミトコンドリアに特異的な翻訳産物は、そのサイズからも SATP6(Nex)ポリペプチドである可能性が高い。以上の結果より、S 型細胞質雄性不稔に関しては *Satp6(Nex)* 配列が、また S-2、S-3 両細胞質雄性不稔については *orf129* がそれぞれ花粉不稔の原因遺伝子として働いていると結論された。

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

テンサイにおける細胞質雄性不稔性 原因遺伝子の発現に関する研究

本論文は 89 頁からなる和文論文であり、図 35 と表 7 を含む。別に参考論文 4 編が添えられている。

細胞質雄性不稔性は花粉形成が妨げられる変異形質であり、ハイブリッド作物の種子生産に欠くことができない。この形質はミトコンドリア遺伝子突然変異に起因するが、不稔性発現の分子機構は不明のままである。

テンサイでは由来の異なる複数の細胞質雄性不稔変異 (S, S-2 および S-3 型) が知られており、それらの不稔細胞質 (ミトコンドリア) ゲノムの下では、花粉稔性の回復に働く核遺伝子の種類や作用性も互いに相違する。これまでに各雄性不稔型ミトコンドリアゲノムにおいて、正常稔性(N)株とは異なる転写パターンを生ずる変異遺伝子が数種同定された。本研究ではこれらの変異遺伝子の翻訳産物を調査し、雄性不稔の原因遺伝子の同定を試みた。得られた結果は以下のように要約される。

1 S型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の解析

育種的利用に供されている S 型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の内、雄性不稔性関与の可能性が考えられる 3 遺伝子 (*orf324*, *coxI*, *atp6*) について翻訳産物を解析した。先ず、*orf324* に関して抗体を作製し、花蕾や葉から抽出したミトコンドリアタンパク質に対してウエスタン解析を行った。しかし翻訳産物は全く検出されなかった。*coxI* に関しても同様の解析を試みたが、N 型株と S 型雄性不稔株との間で COXI タンパク質のサイズと蓄積量に差異は見出されなかった。従って *orf324* や *coxI* が雄性不稔に関与している可能性は低いと結論した。

S型 *atp6* は N型 *atp6* に比べ著しく伸長したアミノ末端を持つ。両遺伝子に共通のアミノ酸配列を認識する抗体を用いたところ、両者間で翻訳産物の差は認められなかつた。一方興味深いことに、S型 *atp6* の伸長したアミノ末端(*Satp6(Nex)*)を認識する抗体を用いた場合には、S型不稔株において N型株には見られない翻訳産物が検出された。

2 S-2型およびS-3型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の解析

野生ピートに由来する S-2、S-3 両細胞質雄性不稔株においては、ミトコンドリアゲノムの分子構造が互いに酷似し、花粉稔性回復の遺伝様式も比較的似通つてゐる。先に見出された 5 種の変異遺伝子 (*orf129*, *orf145*, *orf170*, *orf187*, *atp6*) の内、*orf145*, *orf170* および *orf187* に関しては翻訳産物が認められず、また *atp6* についても雄性不稔性への関与を示唆するデータは得られなかつた。

orf129 は S-2 型株と S-3 型株に固有の遺伝子であり、その相同配列は N 型株や S 型株には含まれていない。しかも ORF129 ポリペプチドの蓄積量（花薺）は S-2 型株の方が S-3 型株よりも 4 倍程度多いことが分かつた。検定交配実験によれば、S-3 型細胞質雄性不稔に作用し完全な稔性回復をもたらす核遺伝子は、S-2 型細胞質雄性不稔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の差は S-2、S-3 両株に共通の雄性不稔ミトコンドリア遺伝子 *orf129* の発現量の差異に起因すると考えるとデータは矛盾なく説明できる。

3 *in organello* 翻訳産物の比較

in organello 翻訳産物の解析を通じて、S 型株固有のタンパク質は *Satp6(Nex)* の産物であり、また S-2 型および S-3 型株を特徴づけるタンパク質は ORF129 であることを確認した。以上の結果より、S 型細胞質雄性不稔に関しては *Satp6(Nex)* 配列が、また S-2、S-3 両細胞質雄性不稔については *orf129* がそれぞれ花粉不稔の原因遺伝子として働いていると結論された。

本研究の成果はテンサイの細胞質雄性不稔性の機構解明に寄与するところが大きく、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、山本将之が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。