

テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く 花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* のクローン化と機能解析

学位論文内容の要旨

高等植物に広く見出される細胞質雄性不稔性 (CMS) は核ゲノムとミトコンドリアゲノムの不調和に起因する花粉不稔形質である。CMS システムにおいては、CMS 型ミトコンドリアゲノムにコードされる固有 ORF (Open Reading Frame) の翻訳産物がミトコンドリア機能障害を引き起こす結果、花粉不稔が生じると考えられている。これに対して核ゲノムにコードされる稔性回復遺伝子 (*Rf*) は、花粉不稔の発現を抑制する。よって、*Rf* のクローン化は CMS 発現制御の分子機構や、核とミトコンドリア間のクロストークについて新たな知見をもたらすと期待される。

テンサイの一代雑種育種に広く利用されている Owen 型 CMS の花粉稔性回復には、*Rf1* が主要な役割を果たす。これまでに *Rf1* のポジショナルクローニングが進められた結果、*Rf1* は 2 個の分子マーカーに挟まれるおよそ 250 kb のゲノム領域に座乗することが判明し、対応する BAC contig が完成した。そこで本研究では、*Rf1* を含むゲノムクローンの塩基配列を決定し、当該領域に予想される遺伝子の特徴付けを行って *Rf1* のクローン化を試みた。

塩基配列解析より見出した *Rf1* 候補遺伝子

Rf1 座乗領域をカバーする 2 個の BAC クローンおよび 1 個のコスミドクローンのショットガンシーケンスを行った。得られた約 250 kb の塩基配列をもとに予想遺伝子を検索したところ、28 個の ORF および 2 個の転位因子を見出した。

Rf1 は胞子体的に働き、ミトコンドリア変異を抑制することで花粉稔性を回復する。よって、*Rf1* は葯組織で発現するミトコンドリアタンパク質をコードするはずである。そこで、*Rf1* 座に見出された ORF の発現パターンと細胞内局在性に注目して *Rf1* 候補遺伝子を探索した。その結果、ORF15 (機能不明タンパク質) および ORF19, ORF21, ORF23 ならびに ORF25 (いずれも Metallopeptidase 類似タンパク質をコードするので MPL と名付けた) の 5 個の ORF について、葯組織における発現 (RT-PCR) ならびに産物のミトコンドリア局在 (GFP 融合タンパク質の一過的発現系) を確認した。このうち ORF15 は *Rf1* ホモ接合系統と *rf1* ホモ接合系統の間でコード領域に変異が存在せず、発現パターンの差異も見いだせないことから *Rf1* 候補から除外した。以上の結果から、MPL が唯一の *Rf1* 候補と判断した。

Rfl 候補遺伝子 MPL の系統間多型

Rfl 系統における 4 個の MPL は互いに配列が酷似し、直列 4 反復の遺伝子クラスターを成す。この構造が *rfl* 系統でも保存されているか否かをサザン解析で調査した。*Rfl* 系統ではゲノム配列から予想される通りの 4 本のシグナルバンドを得たのに対して、*rfl* 系統では 1 本のシグナルバンドを得た。また、遺伝背景の異なる様々なテンサイ系統および近縁野生種を供試してサザン解析を行ったところ、MPL のコピー数は遺伝子型間で極めて多様性に富むことが判明した。この構造多型の成因を明らかにするため、*rfl* 系統のファージゲノムライブラリーから MPL 周辺領域を完全に含むクローンを単離して塩基配列を決定し、*Rfl* 系統の MPL 遺伝子座と比較した。その結果、*rfl* 系統では繰返し配列を介した不等交差に起因すると思われる複雑なゲノム再編成が生じていることがわかり、*rfl* 系統の MPL は *Rfl* 系統の 3 個の MPL のモザイク構造と見なすことができる。こうしたゲノム再編成は最近でも頻繁に生じていると思われる、これが MPL 遺伝子座の構造変異の原因の一つと考えられる。

次に、*Rfl* 系統と *rfl* 系統の間で MPL コード領域を比較した。その結果、*rfl* の MPL は *Rfl* 系統の 4 個の MPL と比べて変異が多く見られ、全長約 430 アミノ酸残基中 23 残基で *rfl* 系統の MPL に固有のアミノ酸置換が見出された。しかしながら、ナンセンス変異やフレームシフトなどの機能を著しく損なうような変異は見出されなかった。

MPL の発現パターンならびに予想アミノ酸配列の特徴付け

MPL の発現をノーザン解析により調べたところ、MPL は *Rfl* 系統の花芽で強く発現することがわかった。さらに、発現の時期・組織特異性を明らかにするために *Rfl* 系統の花芽組織切片に対する *in situ* hybridization を行った。その結果、MPL は花粉発育過程における四分子期の葯タペート組織で強く発現することが明らかになった。CMS 系統において最初にミトコンドリア形態異常が見られるのは四分子期タペートであり、MPL の発現パターンと花粉稔性の回復には密接な関連性が存在するものと思われる。

相同性検索によれば、MPL は Peptidase M48 ファミリーに含まれ、最もよく機能解析の行われたホモログは酵母 Omal である。Omal はミトコンドリア内膜タンパク質の品質管理を行う金属プロテアーゼと考えられている。MPL の予想アミノ酸配列中にはミトコンドリア移行シグナルペプチドおよび 3 個の膜貫通領域が予想されるため、MPL もミトコンドリア内膜に局在すると予想される。一方、プロテアーゼ活性に必要と言われる亜鉛結合モチーフは Peptidase M48 ファミリーで保存的であるにもかかわらず、テンサイ MPL では保存されていないことが判明した。よって、テンサイ MPL はプロテアーゼ活性を持たず、かわりに何らかの未知の機能を持つ可能性が高い。

本研究で得られた様々な状況証拠から、テンサイ *Rfl* が MPL であることはほぼ間違いない。Owen 型 CMS を引き起こす変異ミトコンドリア遺伝子 *preSatp6* の翻訳産物は、CMS 株固有のミトコンドリア内膜複合体を形成する。興味深いことに、*Rfl* を有する花粉稔性回復株においては PreSATP6 複合体の蓄積量は変化せず、かわりに未成熟の葯組織で特異的に同複合体のサイズが小さくなることが最近判明した。

以上より, MPL は四分子期タペートのミトコンドリア内膜において PreSATP6 複合体との間で何らかの相互作用を生じ, PreSATP6 複合体を小さくすることで花粉稔性回復に与るという仮説を樹てることができる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 喜 多 村 啓 介
副 査 教 授 佐 野 芳 雄
副 査 講 師 久 保 友 彦

学 位 論 文 題 名

テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く 花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* のクローン化と機能解析

本論文は136頁からなる和文論文であり、図44と表17を含む。別に、参考論文2編が添えられている。

テンサイのハイブリッド品種を育種する際には、多数の種子親の雄しべを取り除かなければならない。しかし、テンサイの花は小さいので、機械的な除雄は事実上、困難である。そのため、細胞質雄性不稔性を利用し花粉を作れない種子親を準備した上で、ハイブリッド採種が行われてきた。

テンサイの Owen 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子はミトコンドリアゲノムに含まれる。一方、この原因遺伝子の作用を抑制して、花粉稔性回復に働く核遺伝子(*Rf1*)の存在が仮定されているが、その実体は明らかでない。*Rf1* 遺伝子の研究は雄性不稔性の機構解明に重要であるのみならず、効率的な雄性不稔維持花粉親(*rf1*を劣性ホモ接合型でもつ個体)選抜法の開発につながり、育種的貢献も大きい。これまでに、*Rf1* が2個の分子マーカーに挟まれた250kb領域内に位置することが判明した。本研究では、*Rf1* のクローン化と機能解析を試みた。得られた結果は以下のように要約される。

1. 塩基配列解析により見出した *Rf1* 候補遺伝子

Rf1 座を含む250kb領域の塩基配列を決め、28個のORFと2個の転位因子をみつけた。*Rf1* は孢子体的に働き、ミトコンドリア変異の抑制を通じて花粉稔性の回復をもたらす。従って、*Rf1* はタペート層などの葯壁組織(孢子体組織)で発現するミトコンドリアタンパク質をコードすると考えられる。この条件に合致する

のは4個のORF(ORF19、ORF21、ORF23ならびにORF25)のみであった。いずれも金属プロテアーゼ様タンパク質をコードするので、MPLと名付けた。

2. *Rfl* 候補遺伝子 MPL の系統間多型

Rfl をホモ接合型でもつ系統では、4個のMPL遺伝子が直列4反復のクラスターを成す。これに対して、稔性回復能を欠く *rflrfl* 系統(雄性不稔維持花粉親)ではMPL遺伝子座に多様な構造変異が生じており、ほとんど転写されていないことを明らかにした。

3. MPL の発現解析と機能の推定

MPL は花粉四分子期の葯タペート組織で特に強く発現することを見出した。Owen 型細胞質雄性不稔株において最初にミトコンドリアの形態異常が観察されるのは四分子期のタペート細胞であり、MPL の発現が花粉稔性の回復と密接に関連することを示している。このように、本研究で得られたデータはいずれも、*Rfl* の翻訳産物がMPLであることを強く示唆する。

テンサイ MPL はミトコンドリア移行シグナルペプチドと膜貫通領域を含むので、ミトコンドリア内膜に局在すると予想される。MPL は四分子期を迎えたタペート細胞のミトコンドリア内膜において、雄性不稔原因タンパク質との間で相互作用を生じ、原因タンパク質の機能を妨げることによって花粉稔性の回復をもたらすという仮説をたてた。

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と育種技術の開発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松平洋明が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。