

テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性における 花粉稔性回復機構の解明

学位論文内容の要旨

細胞質雄性不稔性(CMS)は雄性配偶子の特異的退化をもたらす形質で、7%を超える被子植物で記載例がある。CMS の遺伝モデルは植物種を問わず原則として同じであり、雄性不稔性を引き起こす因子を細胞質に仮定し、この細胞質因子に働く 1 ないし少数の優性の抑制因子を核に仮定して、両者の相互作用により形質発現が担われるとする。

テンサイの一代雑種育種に広く利用されている Owen 型 CMS では、細胞質側の因子(CMS 原因遺伝子)としてミトコンドリアゲノムにコードされる *preSatp6* が同定され、次いで核側の因子(稔性回復遺伝子)として *Rf1* がクローニングされた。本研究では、*preSatp6* と *Rf1* との相互作用を分子レベルで調査し、テンサイ Owen 型 CMS の稔性回復機構について解明を試みた。

preSatp6 と *Rf1* の相互作用

Rf1 は、ペプチダーゼ M48 ドメインを保持するタンパク質をコードする。遺伝学的観察に基づけば、*Rf1* と *preSatp6* の相互作用は、タンパク質レベルで行われている可能性が高い。そこで本研究では、抗 RF1 抗体を作成し、*Rf1* のタンパク質レベルでの発現を調査した。蒴、葉、根などの器官からそれぞれ抽出したタンパク質に対し、抗 RF1 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、蒴でのみ翻訳産物の蓄積が確認された。さらに、蒴を減数分裂期から成熟花粉期までの 4 つの发育ステージ別に採取し、それぞれの抽出タンパク質に対してウエスタンブロット解析を行ったところ、減数分裂期から小孢子期までの未成熟な蒴で翻訳産物の蓄積が確認された。

preSATP6 と RF1 が共に蓄積する稔性回復株の未成熟蒴タンパク質に対し、免疫沈降法を用いてタンパク質間相互作用を検証した。抗 *preSATP6* 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、*preSATP6* に結合するタンパク質は 1 種のみであり、それが RF1 であることを確認した。さらに、*Rf1* に FLAG タグを連結し、CMS 細胞に導入した形質転換培養細胞を作り、解析を試みた。形質転換培養細胞から抽出したミトコンドリアタンパク質に対し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、RF1 に結合する *preSATP6* を検出した。したがって、*preSatp6* と *Rf1* はタンパク質間で相互作用していることが明らかとなった。

Rfl による Owen 型 CMS の花粉稔性回復機構

preSatp6 と *Rfl* のタンパク質間相互作用が検出されたものの、*Rfl* はペプチダーゼ M48 ドメイン内のプロテアーゼ活性中心 Zn^{2+} 結合モチーフ (HExxH) が不活性型に変更されており、どのような機構によって *preSATP6* の機能を変更しているかは不明である。一方、*preSATP6* はミトコンドリア内膜でホモ多量体を形成していることが明らかにされている。そこで、*Rfl* の発現と *preSATP6* 多量体の関係について調査した。

CMS 株および *Rfl* を優性ホモ接合型で持つ稔性回復株の未成熟葯から複合体を壊すことなく穏和にタンパク質を抽出し、Blue native-PAGE を用いて *preSATP6* 多量体の調査を行った。その結果、稔性回復株特異的に低分子側へのサイズシフトが見出された。このような現象は、稔性回復株の成熟花粉や根ではみられず、*Rfl* が発現する未成熟葯でのみ検出される。そこで、*Rfl* を CMS 細胞に導入した形質転換培養細胞を用いて *preSATP6* 多量体の挙動を調査したところ、稔性回復株の未成熟葯と同様のサイズシフトが再現された。さらに、低分子側にサイズシフトした *preSATP6* 複合体には、RF1 が含まれることを二次元電気泳動により確認した。

これらの解析結果から、次のような仮説を立てることができる。*preSATP6* は、ミトコンドリア内膜でホモ多量体を形成し、その結果、ミトコンドリアに何らかの機能障害を与え、花粉不稔を誘発する。それに対して、*Rfl* は未成熟葯でのみ発現し、翻訳産物が *preSATP6* と結合する。RF1 それ自体は、プロテアーゼ活性に重要な Zn^{2+} 結合モチーフが不活性型であり、*preSATP6* を分解できないので、翻訳産物の蓄積量は減ずることはない。しかし、新規に RF1-*preSATP6* 複合体が形成されることによって、*preSATP6* ホモ多量体の総量が減少し、多量体の細胞毒性を軽減し、花粉稔性が回復すると考えられる。

このような機構を通じて花粉稔性の回復が起こる例はこれまでに報告されていない。CMS 原因遺伝子は、ゲノム中に散在する反復配列を介した DNA 組み換えを盛んに繰り返す被子植物ミトコンドリアゲノム進化の副産物として出現したと考えられ、植物種ごとにあるいは同一種内でも不稔細胞質型ごとに遺伝子構造は異なる。これに対し、稔性回復遺伝子も植物種もしくは不稔細胞質型ごとに異なるが、これまでにクローニングされた稔性回復遺伝子を見てみると、代謝補正を担うと考えられるトウモロコシの *Rf2* を除き、いずれも pentatricopeptide repeat (PPR) モチーフを保持するミトコンドリア RNA 結合タンパク質 (PPR タンパク質) をコードしている。PPR モチーフを持つこれらの *Rf* 遺伝子は、作用機構に若干の違いはあるものの、すべて CMS 原因遺伝子の転写産物に直接作用し、最終的に翻訳産物の蓄積を阻害することで花粉稔性回復に寄与しているものと考えられている。したがって、本研究で、これらとは一線を画す新規の稔性回復システムを示せたことは、核ゲノムによるミトコンドリアゲノム変異の制御機構について新たな知見をもたらすものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 佐 野 芳 雄
副 査 教 授 喜 多 村 啓 介
副 査 准教授 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おける 花粉稔性回復機構の解明

本論文は 98 頁からなる和文論文であり、図 28 と 表 8 および 付図 4 を含む。
別に、参考論文 3 編が添えられている。

細胞質雄性不稔性は花粉の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。テンサイのハイブリッド育種に広く利用されている Owen 型細胞質雄性不稔性に関しては、ミトコンドリアゲノムより原因遺伝子 *preSatp6* が同定され、次いで原因遺伝子の作用を抑制して花粉稔性回復をもたらす核遺伝子 *Rf1* がクローン化された。しかし、両遺伝子の機能は明らかでない。

本研究では、*preSatp6* と *Rf1* との相互作用を分子レベルで調査し、Owen 型細胞質雄性不稔における稔性回復機構の解明を試みた。得られた結果は以下のように要約される。

1. *preSatp6* と *Rf1* の相互作用

抗 RF1 抗体を用いた解析を通じて、RF1 タンパク質が減数分裂期から小孢子期までの未成熟な葯でのみ蓄積することを明らかにした。

遺伝学的観察に基づけば、*preSatp6* に対する *Rf1* の抑制作用は、両遺伝子がコードするタンパク質間の相互作用の結果生じている可能性が高い。これを立証するため、*preSATP6* と RF1 が共に蓄積する稔性回復株 (Owen 型不稔細胞質をもち、核遺伝子型が *Rf1 Rf1* の植物) の未成熟葯よりタンパク質を抽出し、免疫沈降法を用いてタンパク質間相互作用を調べた。その結果、*preSATP6* に結合するタンパク質は RF1

のみであることを見出した。両タンパク質の結合は、CaMV35S プロモーターに付いた *Rf1* を細胞質雄性不稔植物由来の細胞へ導入して作った形質転換培養細胞系においても確認された。

2. *Rf1* による花粉稔性回復機構

Rf1 はペプチダーゼドメインを含むタンパク質をコードする。しかし、そのアミノ酸配列から判断して、*RF1* タンパク質にプロテアーゼ活性があるとは考え難く、どのような機構を介して *preSATP6* の働きを阻害しているのかは容易に予想できない。

そこで *Rf1* の発現と、ミトコンドリア内膜でホモ多量体を作ることが判明した *preSATP6* との関係を調べた。その結果、① *Rf1* の発現に伴って *preSATP6* 多量体のサイズが変化し、②サイズが変わった *preSATP6* 複合体には *RF1* が含まれていることを明らかにした。

得られた結果をもとに、次のような仮説を立てた。すなわち、*preSATP6* 多量体はミトコンドリアの機能に何らかの障害をもたらし、花粉不稔を誘発する。一方、未成熟蒴で蓄積する *RF1* タンパク質それ自体はプロテアーゼ活性が無く *preSATP6* を分解しないので、*preSatp6* 翻訳産物の蓄積量が減ることはない。しかし、*RF1-preSATP6* 複合体が形成されることによって、*preSATP6* ホモ多量体の総量が減少し、多量体のもつ細胞毒性が軽減される結果、花粉稔性が回復すると考えた。

このような機構を介した花粉稔性回復のシステムはこれまで全く報告例が無い。

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ともに、核ゲノムによるミトコンドリアゲノム変異の制御機構に新知見をもたらすものと期待され、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北崎一義が博士（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。