

テンサイOwen型細胞質雄性不稔性に働く稔性回復遺伝子 *Rf1* の同定と作用力に関する研究

学位論文内容の要旨

細胞質雄性不稔性（CMS）は、140種を超える植物種で知られている形質である。雌性器官や栄養器官に影響を及ぼすことなく、雄性器官に特異的退化をもたらすため、多くの作物種において一代雑種種子生産に不可欠の重要な育種形質となっている。

CMSの発現機構は、遺伝学的には不稔性を引き起こす細胞質（[S]）とその働きを特異的に抑制する稔性回復遺伝子（*Rf*）との相互作用に基づいて説明できる。つまり、[S] *rfrf*（雄性不稔維持アレルホモ接合）であれば不稔となるが、*Rf*（稔性回復アレル）があれば[S]の効果打ち消され正常（可稔）となる。

テンサイ育種で広く用いられているOwen型細胞質に対する稔性回復遺伝子 *Rf1* については、分子遺伝学的解析から、酵母 *Oma1* 遺伝子と相同性の高い新規の遺伝子（*Oma-L*）が候補遺伝子とされてきた。実験に使用した稔性回復系統NK-198では、*Oma-L* 遺伝子は4コピー（*orf18*, *orf19*, *orf20* 及び *orf21*）存在し、クラスターを形成する。ところが、4コピーの全てが花粉稔性回復遺伝子として機能するのか、あるいはいずれか一つなのか不明であった。

そこで、本研究では、コピー別の発現様式から調査を始めることとした。特に、花粉形成に重要な組織であり、かつテンサイOwen型CMSで最も初期に異常が認められる組織であるタペート組織においていずれのコピーが発現しているのかに注目した。

テンサイ *Rf1* として機能するコピーの同定

まず、定量的リアルタイムPCRを用いて *Oma-L* の発現量（RNA蓄積量）を調査した。その結果、*Rf1* 系統において栄養器官における発現量は極めて少ない一方、花芽と葯において発現量が多く、特に、減数分裂期及び四分子期葯における発現量が極めて多いことがわかった。次に、*Rf1* 系統であるNK-198が保持する4つの *Oma-L* について、cDNAダイレクトシーケンスを用いて器官ごとの発現コピーを推定したところ、器官ごとに異なる波形パターンが得られ、これより4つのコピーの発現パターンが異なることが示唆された。特に、*Oma-L* の発現量が多い未熟な花芽および未熟な葯においては、*orf20* を示す波形が相対的に大きく見られる傾向にあった。そこで、コピー間で発現パターンが異なる要因を調査するため、遺伝子上流域について、いかなる発現調節能を保持するか調査することとした。各コピー別に遺伝子上流配列を得、GUS遺伝子と連結させてテンサイに導入し、形質転換テンサイにおける発現パターンを観察したところ、*orf20* 由来の上流域断片のみが四分子期タペート組織での発現能を有していた。以上のデータは、*orf20* のみが稔性回復遺伝子として機能する可能性を強く示唆した。

そこで、CMS系統を宿主に、*orf18*, *orf19*, *orf20* 及び *orf21* ゲノム断片を形質転換により導入

した個体を観察し、コピー別の稔性回復能を調査した。結果、*orf20* 導入個体のみが稔性回復していた。よって、*orf20* のみが稔性回復遺伝子として機能することが明らかとなった。

タペート組織での発現能の有無が稔性回復能に及ぼす影響の調査

NK-198 が保持する 4 つの *Oma-L* について、*orf20* とその他のコピーの間で稔性回復能に差が生ずる原因が、タペート組織での発現能の有無にあることを実験的に示すこととした。強い稔性回復能を示さなかった *orf19* のコード域について、*orf20* の上流域と下流域を連結させたキメラ遺伝子を作り、形質転換テンサイを作出した。その結果、花粉稔性が改善された。よって、タペート組織での発現の有無は、稔性回復遺伝子として機能する上で必要不可欠な要因の一つであることが明らかになった。

タペート組織での発現能を決定している *cis* 因子の候補として、*orf20* コード域の上流 600bp に存在する *anther-box* と呼ばれる約 20 塩基の配列が注目された。*anther-box* は、ペチュニアにおいてタペート組織での発現に関与することが報告されている。タペート組織で発現しない *orf18*, *orf19* 及び *orf21* において *anther-box* は見つからなかった。

rfl 系統より得られたタペート組織での発現能を保持しないコピー (*orf20L*) に、*anther-box* 相同配列が存在することがわかった。そこで、*orf20* の上流配列と *orf20L* の上流配列の間で部分的に塩基配列を入れ替えたキメラ上流配列を作出し、GUS 遺伝子と連結させた上でテンサイに形質転換し、いかなる配列が *orf20* と *orf20L* のタペート組織での発現能の有無を決定しているかを調査した。作出した全てのキメラ上流域配列 (合計 16 種類) において、タペート組織での発現が完全に抑制されているものはなかった。おそらく *orf20L* においては、複数の因子の組み合わせによりタペート組織での発現が抑えられていると考えられた。

テンサイ *Rfl* の作用力に関する調査

NK-198 由来の *Rfl* の及ぼす花粉稔性回復の程度は、CMS 系統の核遺伝子型背景が異なると変化するが詳細は不明であった。その理由を形態学的観点から調査するため、葯の横断切片を発達ステージ別に観察した。花粉稔性回復が正常系統と遜色のない個体では、葯形態の異常は認められなかった。花粉稔性回復が十分ではない葯試料を観察した結果、正常系統と比較し、小孢子期以降のタペート細胞の崩壊が充分でなかった。一方、CMS 系統で観察されるタペート細胞の肥大や空胞は見られなかった。よって、半不稔となる原因はタペート細胞の不十分な崩壊にあると思われた。

観察の過程で、*Rfl* (*orf20*) を 1 コピー保持するが核遺伝子型背景の異なる個体において、内被の発達程度に違いが認められた。そこで、核遺伝子型背景を変更し、その効果を観察した。内被の発達程度が劣る個体に TA-33BB-O ([N]*rflrfl*) を花粉親として交配し、*Rfl* を保持する後代の葯を観察したところ、内被の発達程度が改善されていた。これは、核背景を変更することで *Rfl* の作用力が強まったと解せよう。従って、*Rfl* の作用力は *Rfl* 以外の核遺伝子型背景により影響を受けるものであることが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 久 保 友 彦
副 査 特任教授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 貴 島 祐 治

学位論文題名

テンサイOwen型細胞質雄性不稔性に働く稔性回復遺伝子 *Rf1* の同定と作用力に関する研究

本論文は120頁からなる和文論文であり、図38と表34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(CMS)は、多くの作物種において一代雑種種子生産に不可欠の重要な育種形質である。テンサイにおいては、稔性回復遺伝子の同定が試みられてきたが、候補遺伝子群の中でいずれのコピーが稔性回復遺伝子として機能するか不明であった。

本研究では、テンサイ稔性回復遺伝子 *Rf1* の同定を試み、併せて *Rf1* の作用力について検討した。また、研究基盤整備として、形質転換素材の作出を行った。得られた結果は以下のように要約される。

1. テンサイ *Rf1* 候補遺伝子群におけるコピーごとの特徴付け

テンサイ *Rf1* 候補遺伝子群として、極めて相同性の高い4つの遺伝子が挙げられていた。それぞれ、*orf18*, *orf19*, *orf20* 及び *orf21* である。発現解析の結果より、コピー間で発現パターンが異なることを明らかにした。また、若い蒴タペート組織での発現能を保持している点において、*orf20* を他のコピーと明確に区別できることを明らかにした。タペート組織は花粉形成に重要な役割を果たすため、*orf20* が稔性回復遺伝子として機能する可能性が高いと結論づけた。また、*orf20* のタペート組織での発現を司る塩基配列が、遺伝子上流域配列であることを示した。

2, テンサイ *Rf1* 遺伝子の同定

前項において、稔性回復遺伝子として機能する可能性が高いことを指摘した *orf20* について、形質転換実験の結果を踏まえ、実際に稔性回復遺伝子として機能するコピーであることを明らかにした。さらに、*orf20* 上流域を組み合わせた *orf19* のコード領域を発現させると、*orf19* 上流域制御下で発現させた形質転換体よりも高い稔性回復を示すことを実験的に示し、*orf20* 上流域の持つタペート発現領域が、稔性回復遺伝子としての必要な因子の一つであることを明らかにした。

3, *Rf1* の作用力に関する調査

前項までの解析の中で、*Rf1* の作用が十分に発揮されない実験材料が見られた。そこで、形態学的調査を通して、*Rf1* の作用力が低下する理由について検討した。その結果、*Rf1* により完全に稔性回復が起こらない系統では、おしなべて、タペート細胞の崩壊が十分に進行していなかった。よって、十分な完全な稔性回復が起こらない理由は、タペート細胞の異常形態に起因すると結論づけた。また、異なる核背景を持つ宿主に *Rf1* を導入したものを観察し、核背景により *Rf1* の作用力が異なることを明らかにした。

4, 新たな形質転換素材の作出

テンサイは、組織培養と形質転換の両方が非常に難しい作物であり、前項までの研究の足かせとなっていた。そこで、組織培養に関わる因子について遺伝様式を明らかにすると共に、得られた知見を基に形質転換体作出年限の短縮を図ることができる新たな形質転換素材の作出を行った。この新たな素材を用いることで、より迅速な研究の進展が期待できる。

本研究の成果は、テンサイ Owen 型 CMS に働く稔性回復遺伝子 *Rf1* の研究と植物 CMS 研究に寄与するところが大きく、学術面で高く評価できる。

よって審査員一同は鏡豊代が博士（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。