

氏 名(本籍)	かざ 風	ま 間	とも 智	ひこ 彦
学位の種類	博 士 ( 農 学 )			
学位記番号	農 博 第 8 5 0 号			
学位授与年月日	平 成 1 8 年 3 月 2 4 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	Boro 型細胞質雄性不稔イネに対する稔性回復遺伝子 <i>Rf1</i> の機能解析			
論文審査委員	(主 査)	教 授	鳥 山 欽 哉	
	(副 査)	教 授	西 尾 剛	
		教 授	山 谷 知 行	

# 論文内容要旨

## 緒言

細胞質雄性不稔性 (cytoplasmic male sterility:以下 CMS) は、細胞質 (ミトコンドリア) と核ゲノムの特定の組み合わせで花粉の発育不全を引き起こす現象である。CMS の一部においては、花粉稔性を回復させる核コードの遺伝子が存在する場合があります、これは稔性回復遺伝子 (fertility restorer gene:以下 *Rf*) とよばれている。

本研究に用いた Boro 型 CMS イネでは、1 個の稔性回復遺伝子 *Rf1* が第 10 染色体に座乗することが報告されていた (図 1-1)。また、ミトコンドリアには、正常型の *atp6* 遺伝子 (以下 N-*atp6*) の他に、Boro 型 CMS に特異的な *atp6-orf79* 遺伝子 (以下 B-*atp6*) が存在し、CMS 系統では *atp6-orf79* が共転写されて 2.0 kb の RNA を生じるが、回復系統では共転写を受けた RNA がプロセッシングを受けることで、1.5 kb の *atp6* RNA と 0.5 kb の *orf79* RNA を生じることが報告されていた (図 1-2)。しかし、*Rf1* はクローニングされておらず、*orf79* の翻訳についても明らかにされていなかった。

本研究は、Boro 型細胞質 CMS イネに対する稔性回復遺伝子 *Rf1* の機能解析を目的として、マップベースクローニング法によって、*Rf1* のクローニングを行い (第 1 章)、ミトコンドリアにおける *Rf1* タンパク質の機能について、分子レベルで解析を行った (第 2 章)。次に、ミトコンドリアにおける ATP6 と ORF79 の翻訳について解析し、CMS の原因について考察した (第 3 章)。さらに、*Rf1* 遺伝子座の近傍に存在する類似の遺伝子との比較より、*Rf1* 遺伝子の進化について考察した (第 4 章)。

## 第1章 マップベースクローニング法による *Rf1* のクローニング

本研究で材料として用いたイネの遺伝子型と稔性を表 1-1 に示した。マップベースクローニングを行う集団は、CMS 系統[*cms-bo*] *rflrfl* x  $F_1$  (CMS 系統[*cms-bo*] *rflrfl* x 回復系統[*cms-bo*] *Rf1Rf1*) の交配によって得られた 1121 個体の  $BC_1F_1$  を用いた (図 1-3)。この集団を用いることで効率よく組換え花粉に由来する個体を選抜することができる。

公開されている日本晴 (*rflrfl*) の塩基配列情報より、DNA マーカーを作成し連鎖解析を行った結果、SSR マーカー CT502 で 4 個体、RFLP マーカー GEND713

で6個体の組換え個体を選抜することができた。それぞれのマーカーと *Rfl* との遺伝的距離を算出したところ、CT502 は 0.36 cM であり GEND713 は 0.54 cM であった。これらのマーカーに挟まれる日本晴の領域は、4個の BAC クローンによってカバーされており、その物理的距離は約 380 kb であることを明らかにした (図 1-4)。

日本晴ゲノムにおいて、このマーカーに挟まれる領域に含まれる遺伝子を遺伝子予測ソフトで予測したところ、90 個の遺伝子が予測された (表 1-2)。Rf1 タンパク質は、ミトコンドリアで機能していることが考えられるため、予測した 90 個の遺伝子のコードするタンパク質がミトコンドリアに移行するかどうかを、タンパク質局在予測ソフトを用いて予測した。この結果、3 個の遺伝子がコードするタンパク質がミトコンドリアへ移行することが予測された。これらの遺伝子は、いずれも PPR (pentatricopeptide repeat) タンパク質をコードしていると予測されたため、それぞれ *PPR8-1*, *PPR8-2*, *PPR8-3* と名付けた。PPR タンパク質とは、35 アミノ酸からなる繰り返し配列を持つタンパク質のことで、葉緑体やミトコンドリアにおいて RNA の転写後制御に関与していると予測されている。日本晴で見つけた 3 個の PPR 遺伝子の回復系統における対立遺伝子を *Rfl* 候補遺伝子と予想した。回復系統の 1 つである密陽 23 号の BAC クローンよりそれぞれの DNA 断片をクローニングし、アグロバクテリウム法を用いて CMS イネへ導入して、相補性試験を行った (図 1-5)。遺伝子導入を行ったカルスより全 RNA を抽出し、*B-atp6* RNA の転写パターンをノーザンブロット分析で調べた結果、*PPR8-1* を導入したカルスでのみ 0.5 kb *orf79* RNA が検出され、プロセッシングが起ることが分かった (図 1-6)。プロセッシングの有無の検出に注目したスクリーニング法により、カルスの段階で迅速に候補遺伝子を *PPR8-1* に絞り込むことができた。さらに、*PPR8-1* 遺伝子導入個体は、花粉稔性・種子稔性ともに回復することも明らかとなった (図 1-7)。このことは、*PPR8-1* が *Rfl* であることを証明している。

クローニングした *Rfl* の塩基配列を決定したところ、2376 bp で 791 アミノ酸からなるタンパク質をコードしており、18 繰り返しの PPR モチーフを含むことが明らかとなった (図 1-8)。この配列と日本晴の *rfl* を比較したところ、*rfl* では 1 bp の欠失によりフレームシフトを起こし、終止コドンが生じていた (図 1-9)。さらに、Rf1 の N 末端領域が、推定ミトコンドリア移行シグナルをコードしているかどうかを、GFP との融合コンストラクトを用いてパーティクルガン法で調査

した. この結果, GFPはミトコンドリアに局在しており, Rf1はミトコンドリアに移行することが示された (図 1-10) .

## 第2章 ミトコンドリアにおける Rf1 の機能

CMS 系統, 回復系統, *Rf1* 遺伝子導入系統より, ミトコンドリア RNA を抽出し, ノーザンブロット分析を行った結果, *Rf1* の存在特異的に *B-atp6* RNA のプロセッシングが起きていることが確認された (図 2-1) . プライマー伸長法により, *B-atp6* RNA のプロセッシング部位を決定した. この結果, *orf79* の開始コドンより 52 bp 上流にプロセッシング部位が存在することが分かった (図 2-2) . プロセッシングサイトを含む 400nt RNA の 2 次構造を構造予測ソフト Mfold によって予測した結果, プロセッシングサイトは, 2 つのステムループに挟まれる一本鎖領域に位置することが分かった (図 2-2) . さらに, 大腸菌で生成させた Rf1 リコンビナントタンパク質と, この領域をプローブにゲルシフトアッセイを行った結果, この領域とリコンビナント Rf1 との結合が確認された (図 2-3) .

次に, Rf1 と RNA 編集 (以下エディティング) の関係について調査した. ミトコンドリアの *atp6* 遺伝子では, 17 カ所において C→U へのエディティングが起ることが知られている. さらに, これらのエディティングは, *Rf1* を持たない日本晴などにおいても効率よく起っていることが報告されている. CMS 系統では, 2.0 kb の *B-atp6* RNA と, 1.5 kb の *N-atp6* RNA が存在している. cDNA15 クローンの塩基配列を調べたところ, 2.0 kb の *B-atp6* RNA では 2 クローンしかエディティングが起きていなかった (図 2-4) . 1.5 kb の *N-atp6* RNA では, 13 クローンでエディティングが起っていた. このことは, Rf1 は *atp6* RNA のエディティングに必須な因子ではないことを示している. さらに, 回復系統において, プロセッシングを受けて生じた 1.5 kb の *atp6* RNA と *N-atp6* のエディティング効率を調べたところ, 全てのクローンでエディティングが観察され, CMS 系統の *N-atp6* RNA でのエディティング効率を上回ることが分かった. Rf1 は *atp6* のエディティングに必須ではないが, 促進する機能を持っていると考えられる.

### 第3章 CMSの原因タンパク質

ペチュニアやコセナダイコンなどの CMS 植物においては、原因遺伝子のタンパク質が蓄積しているが、回復系統では翻訳が抑制されていることが報告されている。Boro 型 CMS の原因は *B-atp6* と言われているが、*orf79* が翻訳されているか不明であったため、Boro 型 CMS イネにおいても同様のことが観察されるかどうか調査した。

*orf79* 遺伝子がタンパク質として発現可能な遺伝子であるかどうかを調べるために、真核生物型および原核細胞型の *in vitro* 翻訳系において、タンパク質の翻訳について調べた (図 3-1)。この結果、原核生物型の *in vitro* 翻訳系においてのみ翻訳産物が検出できたので、*orf79* 遺伝子はミトコンドリアにおいて翻訳可能な遺伝子構造を持っていると考えられた。また、原核生物型の *in vitro* 翻訳系では、プロセッシングを受けた *orf79* の方が、プロセッシングを受ける前よりも翻訳産物が少ないことも分かった。*orf79* の 5'側 85 bp は *coxI* (シトクロムオキシダーゼ・サブユニット I) と相同性が高く、後半部は既知の配列と相同性が見られない。*coxI* 相同領域を除いた *orf79* の後半部 (ORF79 $\Delta$ N) を大腸菌で発現させてリコンビナントタンパク質を得た (図 3-2)。これを抗原として抗体を作成し、ウエスタンブロット分析を行った。この結果、*Rf1* ホモの回復系統においては、ORF79 の蓄積が観察されなかった (図 3-3)。さらに、*Rf1* 遺伝子導入個体では、CMS 系統の半分まで ORF79 の量が減少していることが明らかになった。一方、ATP6 の蓄積量はどちらの系統においても変化がなかった (図 3-3)。このことは、ORF79 の蓄積が CMS を引き起こし、*Rf1* による *B-atp6* RNA のプロセッシングにより ORF79 の翻訳が減少するために、稔性が回復することを示唆している。

### 第4章 PPR 遺伝子である *Rf1* の進化

PPR タンパク質は、高等植物でスーパーファミリーを形成していることが知られており、イネではゲノム中に約 650 個の PPR 遺伝子の存在が予測されている。*Rf1* 近傍に存在した 2 つの PPR 遺伝子 *PPR8-2*, *PPR8-3* および *Rf1* の特徴を表 4-1 に示した。これら 3 個の遺伝子について、RT-PCR によって発現を調査したところ、*Rf1* と *PPR8-3* はどの組織においても発現していた。一方、*PPR8-2* は根と葉

においては発現していないが、その他の組織では発現していることが分かった (図 4-1) . RT-PCR の結果より, *PPR8-2* と *PPR8-3* はともに発現しており, ミトコンドリアにおいて何らかの機能を担っている可能性が示唆された. それぞれの遺伝子について回復遺伝子を持たない日本晴ゲノム情報と比較したところ, *PPR8-2* においては, 日本晴では欠失によるフレームシフトによって終止コドンができていた (図 4-2) . 一方 *PPR8-3* では, 日本晴との間に 2 アミノ酸の置換のみが存在した. それぞれの PPR 遺伝子について, 相同性を調べたところ, それぞれの相同性が非常に高いことが明らかとなった (表 4-2) . 特に, *Rfl* の 5' 領域と 3' 領域は *PPR8-2* と相同性が高く, その領域に挟まれる領域は *PPR8-3* と相同性が高いことが明らかとなった (図 4-3) . このことは, *Rfl* が *PPR8-2* と *PPR8-3* の重複によって生じた可能性を示唆している.

## 結語

CMS は  $F_1$  雑種品種の育成に利用できるため, 世界中で研究されている. 本研究と同時期にペチュニアとコセナダイコンの CMS において稔性回復遺伝子がクローニングされ, いずれも PPR 遺伝子であることが報告された. 本研究では, 世界に先駆けて Boro 型 CMS イネに対する稔性回復遺伝子 *Rfl* をクローニングし, PPR タンパク質をコードしていることを明らかにした. また, *Rfl* の翻訳産物である PPR タンパク質が *atp6-orf79* RNA に結合し, プロセッシングを起こすことを明らかにした. さらに, ORF79 の蓄積が CMS を引き起こすが, 重複によって生じた稔性回復遺伝子 *Rfl* の存在により, *atp6-orf79* RNA のプロセッシングが起きると ORF79 の翻訳が抑制されるために, ORF79 の悪影響を回避して, 稔性が回復するというメカニズムのモデルを新たに提唱した (図 5) . また, *Rfl* の進化を考えることで, PPR 遺伝子などの核遺伝子によるオルガネラ遺伝子の発現制御の解明にもつながると期待される.

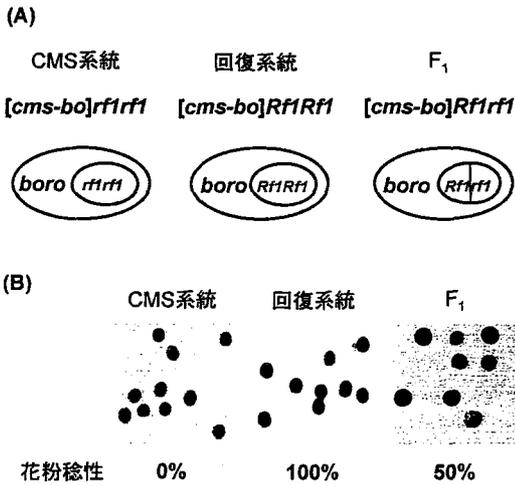


図1-1 材料の遺伝子型と稔性

Boro型CMSは、インド型品種Chinsurah Boro IIIに日本型品種台中65号を連続戻し交配することで作出された(Shinjo 1969)。(A) それぞれの系統の遺伝子型表記と、モデル図 (B) ヨウ素ヨードカリウム染色による花粉稔性 CMS系統では、花粉のデンプンが蓄積せず不稔となる。配偶体型に働く*Rf1*により稔性が回復する。

表1-1 本研究で使ったイネの遺伝子型と稔性

系統名	遺伝子型	稔性
CMS系統	[ <i>cms-bo</i> ] <i>rf1rf1</i>	不稔
回復系統	[ <i>cms-bo</i> ] <i>Rf1Rf1</i>	可稔
台中65号	[N] <i>rf1rf1</i>	可稔
日本晴	[N] <i>rf1rf1</i>	可稔
密陽23号	[N] <i>Rf1Rf1</i>	可稔

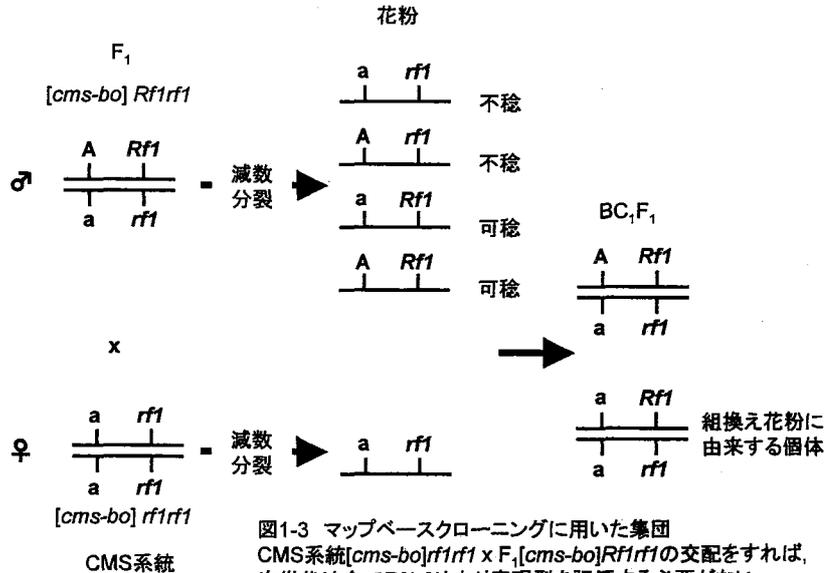


図1-3 マップベースクローニングに用いた集団 CMS系統[*cms-bo*]*rf1rf1* x F<sub>1</sub>[*cms-bo*]*Rf1rf1*の交配をすれば、次世代は全て*Rf1rf1*となり表現型を評価する必要がない。マーカーAについて、CMS系統ホモ型の個体が、組換え個体である。

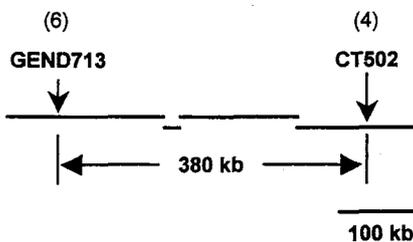


図1-4 *Rf1*候補領域をカバーする日本晴BACクローン マーカー上の括弧中の数字は、組換え花粉由来の個体数を示す。日本晴BACクローンのアクセッション番号は、左のクローンから、AC068950, AC092489, AC068923, AC079888である。

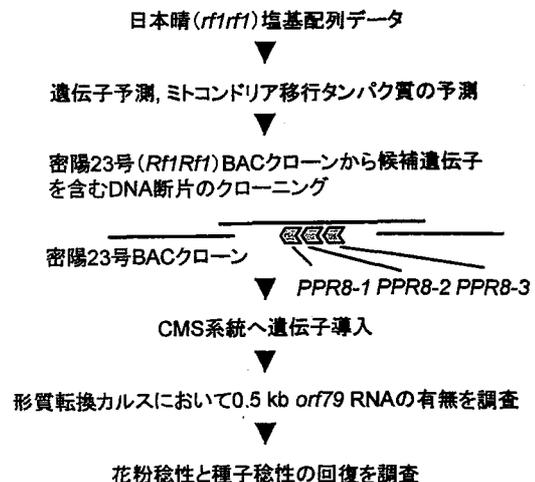


図1-5 *Rf1*クローニングのフローチャート

表1-2 BACクローン上に予測された遺伝子の数

AC068950 予測された遺伝子と遺伝子数	AC092489 予測された遺伝子と遺伝子数	AC068923 予測された遺伝子と遺伝子数	AC079888 予測された遺伝子と遺伝子数
ABC transporter 1	Unknown 5	Acyltransferase 1	Acyltransferase 1
KH domain 1		Epoxide hydrolase 2	Myb-like DNA binding domain 1
PPR 3		Lanthionine synthetase 1	PPR 4
RNA polymerase 1		MuDR family transposase 1	Unknown 24
WD domain 1		PGAP1-like protein 1	
Unknown 15		Phytochelatin synthetase 1	
		Protein kinase 1	
		PPR 3	
		RNase H 1	
		TPR 1	
		Unknown 20	

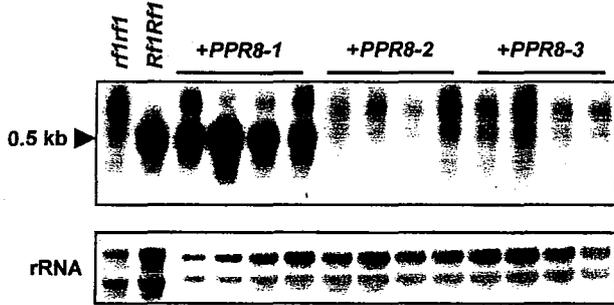


図1-6 候補領域を導入した形質転換カルスにおけるノーザンブロット解析プローブとしてorf79を用いた。PPR8-1を導入したカルスでのみ、B-atp6 RNAのプロセッシングが観察された。下段は、rRNA。

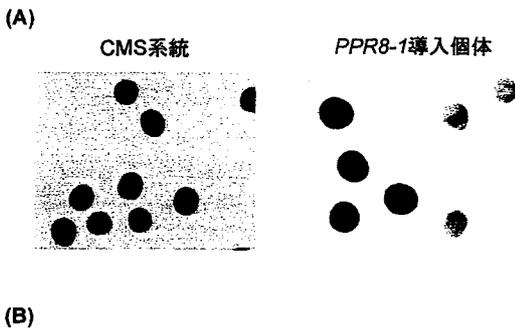


図1-7 PPR8-1の遺伝子導入個体の花粉稔性と種子稔性  
(A) CMS系統と、CMS系統にPPR8-1を導入した系統の花粉をI<sub>2</sub>KIで染色した。導入遺伝子が分離するため、50%の花粉で稔性を回復する。  
(B) PPR8-1を導入した系統は、種子稔性を回復した。

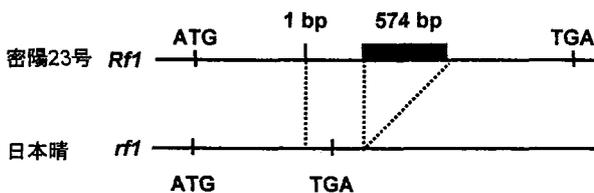


図1-9 Rf1(2376 bp)とrf1(801 bp)の比較  
日本晴ゲノムと比較したところ、rf1では1塩基の欠失で終止コドンが生じていた。また、574塩基の欠失も存在した。

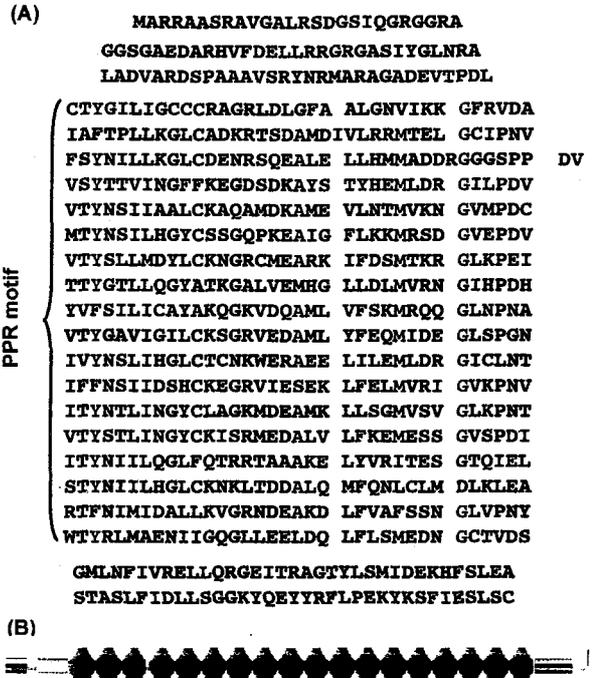


図1-8 Rf1タンパク質のPPRモチーフ  
(A) 1行目は、推定ミトコンドリア移行シグナル。18繰り返し  
PPRモチーフ中の赤字は、保存されているアミノ酸を示す。  
(B) PfamによるRf1タンパク質の模式図。

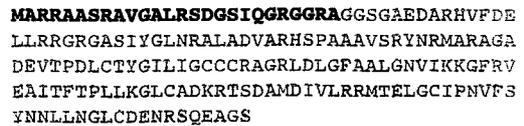
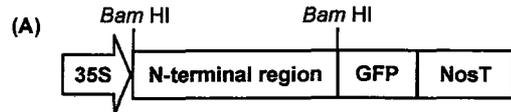


図1-10 GFPを用いた細胞内局在  
(A) コンストラクトの模式図  
(B) GFPと融合したRf1のN末端領域。最初の26アミノ酸が推定ミトコンドリア移行シグナル。  
(C) ツククサの孔辺細胞で一過性の発現を調査した。左がミトコンドリア移行を示すF<sub>1</sub>-ATPase  $\gamma$ -subunitのシグナルペプチドと、GFPを融合させた遺伝子の発現。右がRf1のシグナル領域とGFPを融合させたもの。GFPがミトコンドリアに局在していることが分かった。

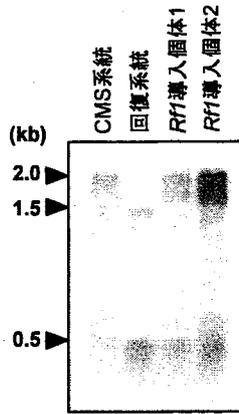
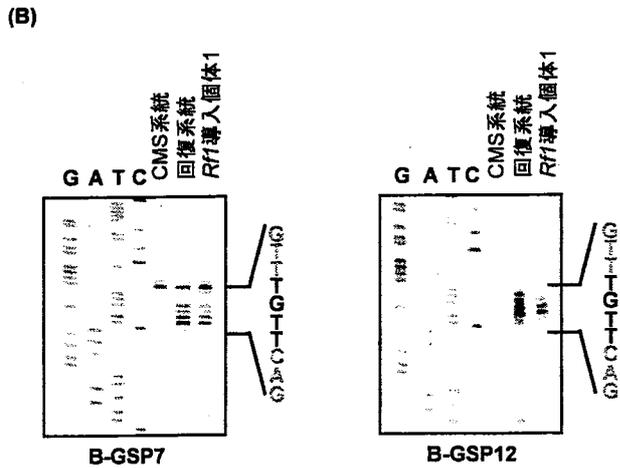
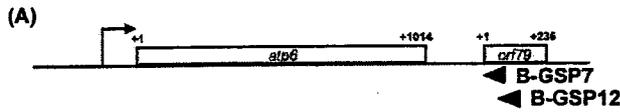


図2-1 単離ミトコンドリアRNAのノーザンプロット分析  
 プロープには、B-*atp6*遺伝子1.6kbを用いた。  
*Rf1*導入個体1, 2は、ともに稔性回復が確認されている。



(C)

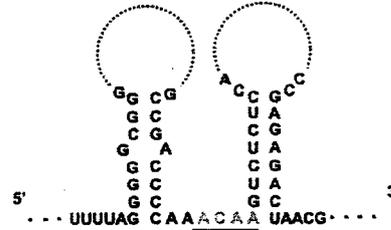


図2-2 プライマー伸長法によるプロセッシングサイトの決定  
 (A) プライマー伸長法に用いたプライマーの位置を矢印で示した。  
 (B) プライマー伸長法で、決定したプロセッシングサイト。  
 (C) プロセッシングサイト近辺のRNAの2次構造を示した。  
 プロセッシングサイトは、下線で示した領域。

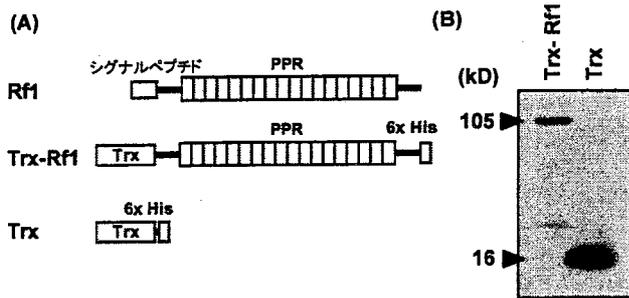
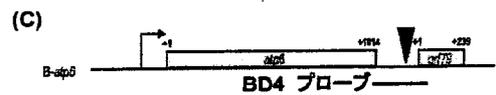
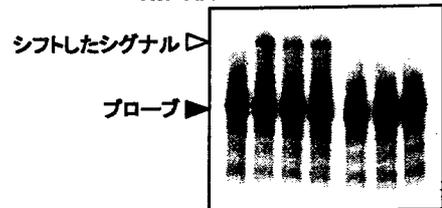


図2-3 ゲルシフトアッセイ  
 (A) Rf1タンパク質の構造と、リコンビナントタンパク質の構造。  
 Rf1のN末はミトコンドリア移行シグナル。Trx-Rf1は、  
 シグナル領域を除いたRf1をチオレドキシン(Trx)と連結  
 した。Trxはコントロールとして用いた。  
 (B) ゲルシフトアッセイに用いたリコンビナントタンパク質を  
 抗His抗体を用いウエスタンブロット分析で検出した。  
 それぞれのレーンに 240 ngのタンパク質を泳動した。  
 (C) ゲルシフトアッセイに用いたプローブ領域を下線で示した。  
 矢印はプロセッシングサイトを示す。  
 (D) ゲルシフトアッセイの結果を示した。  
 白矢印は、シフトしたシグナルを示す。  
 競合的阻害剤として、酵母のtRNAを用いた。  
 タンパク質は、Trx: 12.5 fmol, Trx- Rf1: 10 fmolを用いた。



(D)

競合的阻害剤	tRNA	tRNA
モル倍/プローブ	- 0.3 1 3	0.3 1 3
Trx	- - - + + +	- - - + + +
Trx- Rf1	- + + + - - -	- + + + - - -





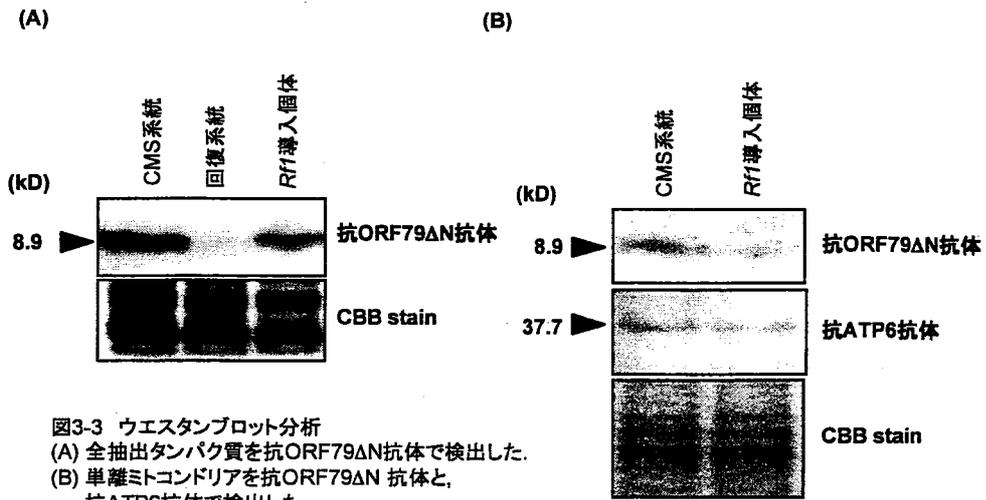


図3-3 ウェスタンブロット分析  
 (A) 全抽出タンパク質を抗ORF79ΔN抗体で検出した。  
 (B) 単離ミトコンドリアを抗ORF79ΔN抗体と、  
 抗ATP6抗体で検出した。

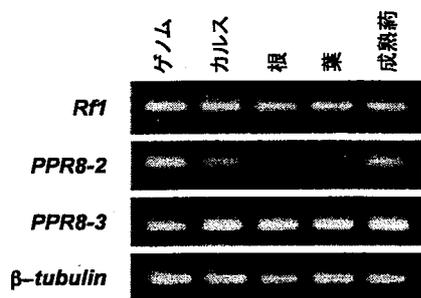


図4-1 RT-PCRによる発現の調査  
 コントロールとして恒常的に発現している  
 $\beta$ -tubulinを用いた。

表4-2 *Rf1*, *PPR8-2*, *PPR8-3*遺伝子, 推定アミノ酸の比較  
 影付きの数字は, DNAレベルでの相同性を示した。  
 それ以外は, アミノ酸レベルでの相同性を示した。

	<i>Rf1</i>	<i>PPR8-2</i>	<i>PPR8-3</i>
<i>Rf1</i>	-	93.2%	93.7%
<i>PPR8-2</i>	92.5%	-	91.6%
<i>PPR8-3</i>	89.0%	89.2%	-

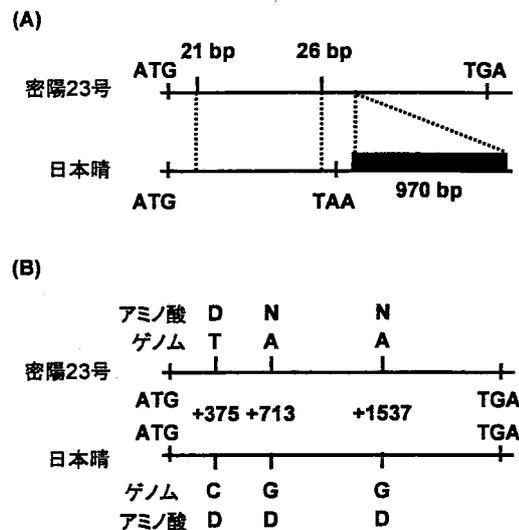


図4-2 *PPR8-2*, *PPR8-3*の日本晴ゲノムとの比較  
 (A) 日本晴の*PPR8-2*では, 21 bp, 26 bpの欠失で  
 終止コドンが生じていた。  
 (B) *PPR8-3*では, 375番目と713番目および1537番目  
 の塩基置換以外の変異は存在しなかった。

表4-1 *Rf1*, *PPR8-2*, *PPR8-3*遺伝子の特徴

	コード領域 (bp)	推定 アミノ酸数	PPR モチーフ数	その他の モチーフ
<i>Rf1</i>	2376	791	18	-
<i>PPR8-2</i>	2052	683	16	-
<i>PPR8-3</i>	2385	794	18	-

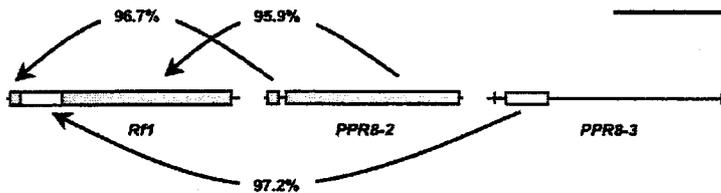


図4-3 *Rf1*を3つのパートに区切って, *PPR8-2*, *PPR8-3*と比較した。  
 5'側領域の*Rf1* (1~91)は, *PPR8-2* (1~91)と96.7%の相同性を示し,  
 3'側領域の*Rf1* (562~1376)は*PPR8-2* (241~2052)と95.9%の相同性を  
 示した。また, その領域に挟まれる, *Rf1* (92~561)は*PPR8-3*  
 (104~573)と, 97.2%の相同性を示した。このように, *Rf1*は*PPR8-2*と  
*PPR8-3*の融合によって生じた可能性が示唆された。

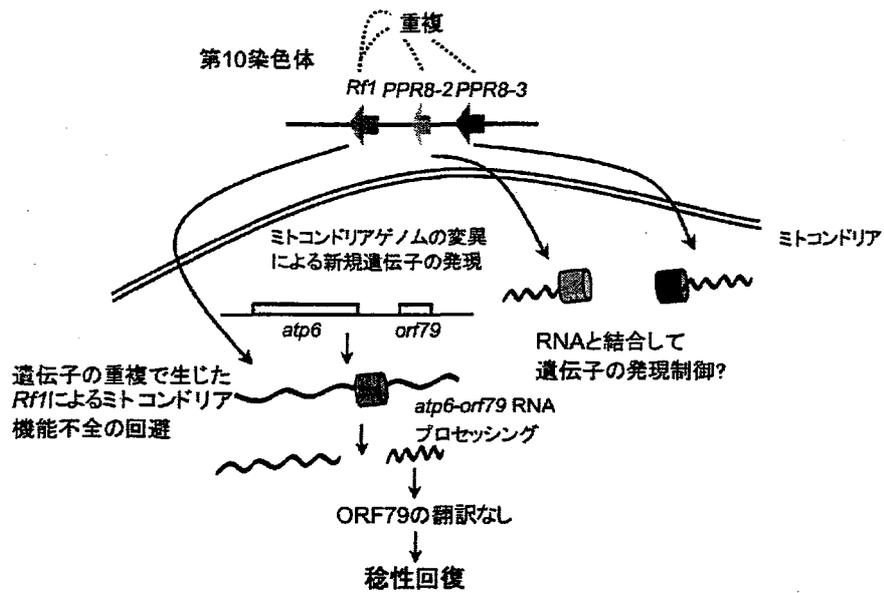


図5 Rf1遺伝子の進化と機能のモデル  
 核では遺伝子重複によって、様々な種類のPPR遺伝子が生じている。  
 一方、ミトコンドリアでのゲノム変異によって引き起こされるミトコンドリアの機能不全を回避するために、都合の良いPPRが対処している。  
 今回の場合は、重複によって生じたRf1が、ORF79の蓄積による不稔性を回避するためにリクルートされたと考えられる。

## 論文審査結果要旨

細胞質雄性不稔性 (CMS) は F1 ハイブリッド育種に利用できるため、農業上有用な形質である。Boro 型 CMS の稔性回復遺伝子は *Rf1* と名付けられ、第 10 染色体に存在することが報告されていたがクローニングされていなかった。本研究では、Boro 型 CMS イネに対する稔性回復遺伝子 *Rf1* のクローニングを行うとともに、*Rf1* の機能解析を行ったものである。

本論文では、*Rf1* のマップベースクローニングを行い、世界に先駆けて *Rf1* をクローニングした。候補遺伝子を用いて相補性試験を行う際、ミトコンドリアに存在するキメラ遺伝子 *atp6-orf79* の RNA プロセッシングの有無に注目したユニークなスクリーニングを行った。*Rf1* の塩基配列を決定し、PPR タンパク質をコードしていること、および、ミトコンドリア移行シグナルを持つことを明らかにした。PPR タンパク質は 35 アミノ酸からなる繰り返し配列を持つタンパク質で、葉緑体やミトコンドリアにおいて RNA の転写後制御に関与していると予測されている。*Rf1* の翻訳産物である PPR タンパク質が *atp6-orf79* RNA に結合することをゲルシフトアッセイを用いて解析して結合部位を決定した。また、*Rf1* タンパク質が、*atp6* のエディティングを促進することを明らかにした。次に ORF79 に対する抗体を作製し、これを用いて CMS 系統では ORF79 が蓄積するが、*atp6-orf79* RNA がプロセッシングを受けると ORF79 が減少することを明らかにし、CMS の原因について考察した。さらに、*Rf1* 遺伝子座の近傍に *Rf1* と類似する PPR 遺伝子が存在することを示し、それらの配列比較から、*Rf1* 遺伝子が近傍の PPR 遺伝子の重複によって生じた可能性を示唆した。

本研究により、CMS の原因遺伝子がミトコンドリアの *atp6-orf79* であり、ORF79 の蓄積が CMS を引き起こすこと、さらに、稔性回復遺伝子 *Rf1* の存在により、*atp6-orf79* RNA のプロセッシングが起きますと ORF79 の翻訳が抑制されるために、ORF79 の悪影響を回避して稔性が回復するというメカニズムのモデルを新たに提唱した。

以上のように本研究は、イネの Boro 型細胞質雄性不稔と稔性回復のメカニズムに新たな知見を与えると同時に、イネにおける F1 ハイブリッド品種の育成にも貢献するものである。また、PPR 遺伝子などの核遺伝子によるオルガネラ遺伝子の発現制御の解明にも貢献するものである。よって審査員一同は、本論文は博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判断した。