ダイコンのオグラ型雄性不稔細胞質に対する *Rft* 稔性回復遺伝子座の構造解析

平成 26 年 3 月 28 日受付

安　本　景　太*
寺　地　　　徹*
山　岸　　　博*

要　旨

細胞質雄性不稔（CMS）は，核とミトコンドリアの相互作用により，正常な花粉の形成機能が失われてしまう母性遺伝形質である。ダイコンのオグラ型 CMS はミトコンドリアゲノムにコードされている *orf138* の発現によって引き起こされるが，核に存在する稔性回復遺伝子が ORF138 タンパク質の発現を減らすことで CMS は抑制される。著者らは，野生のハマダイコン（*Raphanus sativus*）から，*orf138* mRNA の 5' プロセシングに関わる稔性回復遺伝子 *Rft* を単離するため，マップベースド・クローニングを行なった。フォスミドクローンのシークエンスと全ゲノムシークエンスの解析データをあわせ，*Rft* に近接する DNA マーカーを作製した。このマーカーを用いて分離集団でジェノタイピングを行なった結果，*Rft* は 68kb のゲノム領域内に限定された。この領域の構造を解析したところ，*Rft* はミトコンドリアへの移行シグナル配列を持った，PPR（Pentatrico-Peptide Repeat）タンパク質をコードしていることが示唆された。

キーワード： ダイコン（*Raphanus sativus* L.），細胞質雄性不稔（CMS），稔性回復遺伝子（*Rf*），PPR（Pentatrico-Peptide Repeat）タンパク質，RNA プロセシング

はじめに

植物の細胞質雄性不稔性（以降 CMS と略す）は，ミトコンドリアゲノム上の遺伝子の働きで，花粉形成不全など，雄性の生殖機能が失われる現象であり，150 種以上の植物種でその存在が認められている（Schnable and Wise 1998）。CMS は一般に，雄性器官に特異的な形質であり，その他の器官には異常が見られない。それゆえ CMS は，雑種強勢を利用した大規模な F_1 種子の生産にたいへん有効であり，除雄の難しい作物を中心にこれまで広く用いられてきた。

現在，ナタネやキャベツなどの主要な野菜を多く含むアブラナ科作物では，ダイコン（*Raphanus sativus* L.）から発見された，「オグラ型」と呼ばれる CMS（Ogura 1968）がよく利用され，研究も最

* 京都産業大学総合生命科学部

も盛んになされている。オグラ型 CMS は，ミトコンドリアゲノム上の遺伝子である *orf138*（Bonhomme et al. 1992, Krishnasamy and Makaroff 1993）が CMS の原因遺伝子として同定されており，ORF138 タンパク質の働きによって安定な CMS を引き起こすことが明らかにされている。またこの CMS は，一部のダイコンに存在する，稔性回復遺伝子（以降 *Rf* 遺伝子と略す）という核遺伝子の存在下では抑制され，細胞質がオグラ型であってもその個体には正常な花粉が形成される。これは，*Rf* 遺伝子の翻訳産物がミトコンドリアへ移行した後，*orf138* の発現を抑制する機能を持つためであり，ミトコンドリア内における ORF138 タンパク質の蓄積量が減少する結果によるものである。これまで，育種的な利用価値の高さから，オグラ型細胞質の *Rf* 遺伝子の実態を解明しようとする分子生物学的研究が，世界で精力的に行われてきた。2003 年になって，日本，フランス，カナダの 3 つの独立した研究グループが，相次いで 1 つの *Rf* 遺伝子 “*orf687* ” のクローニングに成功した（Koizuka et al. 2003, Desloire et al. 2003, Brown et al. 2003）。これら 3 つのグループの結論は完全に一致し，ペチュニアやイネなどの *Rf* 遺伝子（Bentolila et al. 2002, Wang et al. 2006）の場合と同様，*orf687* の産物は PPR タンパク質（Pentatorico-Peptide Repeat）をコードすることが示された。PPR タンパク質は，縮重した 35 アミノ酸のタンデムリピートで特徴付けられる RNA 結合タンパク質であり，シロイヌナズナやイネなどでは少なくとも 450 遺伝子以上の巨大遺伝子ファミリーを形成している（Small and Peeters 2000, Lurin et al. 2004）。ほとんどの PPR タンパク質は，ミトコンドリアまたは葉緑体へターゲットされ（O’Toole et al. 2008），オルガネラ RNA の安定化，プロセシング，エディティング，翻訳など，ミトコンドリア遺伝子の転写・翻訳の様々な段階に関与することが知られる（Schmitz-Linneweeber and Small 2008）。ORF687 タンパク質を持つ稔性回復個体の *orf138* mRNA は，分子サイズ，蓄積量，エディティングパターンにおいて，稔性回復遺伝子を持たない CMS の個体との間で変化は認められないことから，ORF687 タンパク質はミトコンドリアへ移行した後，*orf138* mRNA と結合して *orf138* の発現を翻訳レベルで抑制すると考えられている（Krishnasamy and Makaroff 1994, Uyttewaal et al. 2008）。

orf687 がクローニングされたことで，近年，ダイコンの F_1 育種へのオグラ型 CMS の導入が加速的に広がりつつある。しかし，F_1 育種の現場では，CMS 系統を育成するための維持系統（オグラ型細胞質も，*Rf* 遺伝子も持たない系統）の選抜が，*orf687* の遺伝子型の判別のみでは困難な場合があることが問題となっている（私信）。つまり *orf687* を持たない個体を交配しても，次世代で稔性を回復してしまう場合がある。その理由の 1 つとして，ダイコンでは，*orf687* とは別の，不安定な *Rf* 遺伝子の存在が関与していることがあげられる。こうした *Rf* 遺伝子の稔性回復効果は，内的あるいは外的要因により変化するため，遺伝解析は非常に困難で，複数の研究報告はあるものの，統一的な理解は未だになされていない（Nieuwhof 1990, Bett and Lydiate 2004）。

著者らはこれまでに，*orf687* を持たないダイコンのなかから，第 2 の *Rf* 遺伝子，“*Rft*” の存在を見出した（Yasumoto et al. 2009）。*Rft* による稔性回復効果は，開花期には，より不安定であり，高温長日条件下において減退することが示唆されている（堤ら，2010，データ未発表）。また，*Rft* は

orf687 とは異なり，*orf138* の mRNA をプロセシングにより短く切断することで，RNA レベルで *orf138* の発現を抑えて稔性を回復させる（Yasumoto et al. 2009）。昨年度の本研究所報においては，この *Rft* をマップベースド･クローニング法によって単離･同定するため，DNA マーカーの作製とマッピングを行い，*Rft* をマーカー間で 0.9 cM の領域内に設定したことを報告した。さらに，*Rft* が *orf687* と同様に PPR タンパク質ファミリーに属する *Rf* 遺伝子である可能性を考察した（安本ら，2013）。今年度の報告では，昨年度に引き続き，*Rft* 遺伝子領域の絞り込みを行ない，その構造を決定し，候補遺伝子を単離した結果を報告する。

材料と方法

1. 植物材料

熊本県の富岡町から採種された 1 個体のハマダイコン ‘T-14’（*Rft* を持つ）と，オグラ型細胞質を持つ雄性不稔のダイコン ‘MS 源助 ’（*Rft* を持たない）との交雑後代（F_2BC_1）（安本ら，2013）である 1 個体を自殖させた。この個体の自殖で得られた分離集団（以降，F_2BC_1 self と略す）を構成する 403 個体を京都産業大学内の温室で育成して実験に用いた。

2. 実験方法

実験条件などの詳細は論文に譲るが，F_2BC_1 self のそれぞれ個体の本葉から total DNA を抽出し，これまでに作製した *Rft* に近接する連鎖マーカー（Yasumoto et al. 2009, 安本ら，2013）によるジェノタイピングを行なうことで，*Rft* との間で組換えを生じた個体を検出した。また，ジェノタイピングによって *Rft* をホモ型（*Rft*/*Rft*）に持つと推定された 1 個体の核ゲノム DNA からフォスミドライブラリーを調製した。*Rft* に最も近接した STS マーカーである K17LF2R1（安本ら，2013）を含むクローンを選抜し，ロッシュ GS FLX 次世代シークエンサーによって塩基配列を決定した。これと同時に，イルミナ Genome Analyzer 次世代シークエンサーによって，*Rft* ホモ型（*Rft*/*Rft*）34 個体の total DNA を混合してシークエンシングを行ない，取得した全ゲノム配列の情報から同領域の延長をはかった。また，*Rft* 候補遺伝子の細胞内局在の解析は，遺伝子の N 末端側のシグナル配列を GFP に連結したプラスミドコンストラクトを作製し，このプラスミド DNA をパーティクルガンでタバコ BY-2 細胞（Nagata et al. 1992）に導入した後，一過的に発現した GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察することで行なった。なお，フォスミドライブラリー調製作業はタカラバイオ社に，選抜されたクローンの塩基配列を決定する作業は北海道システムサイエンス社に，全ゲノム配列の解析は公益財団法人岩手生物工学研究センターにそれぞれ委託して行ない，その他の分子生物学的な実験，解析は定法に従って行なった。

結果および考察

1. *Rft* 遺伝子座の絞り込み

作製したフォスミドライブラリーのクローンの平均インサート長は＞ 30kb であり，ダイコンのゲノムサイズを 573 Mbp（Johnston et al. 2005）とした場合，ゲノム冗長度は 2.3 と推定された。このライブラリーのスクリーニングによって，*Rft* に最も近接した STS マーカーである K17LF2R1 を含むクローンを 3 種類獲得した。それぞれのクローンにおけるインサートの末端配列を TAIL-PCR 法（Liu et al. 1998）を用いて決定することで，クローンコンティグを得た（図 1-A）。その後，3 種類のクローンのインサートの塩基配列を決定したところ，コンティグの全長は約 68 kb であることがわかった。これに全ゲノム解読によって得られたショートリードの *de novo* アッセンブル解析データをあわせたところ, 2 つのスキャッホールド（Scaffold_4086; 19 kb, および scaffold_5605; 16 kb）によって，コンティグの全長は約 84 kb まで延長された（図 1-A）。この領域の末端付近の配列をもとに，2 つの PCR マーカー（Marker A および Marker B）を作製し，分離集団で組換え体の選抜を行なったところ，それぞれのマーカーで組換え体が 1 個体ずつ（個体 No.2-75 と個体 No.3-65）検出され，*Rft* 遺伝子座は約 68 kb の領域内に絞り込まれた（図 1-B）。

2. *Rft* 遺伝子座の構造と *Rft* 候補遺伝子の細胞内局在の解析

約 68 kb の領域内に絞り込まれた *Rft* 遺伝子座の構造を解析したところ，この遺伝子座からは，少なくとも 6 つのオープンリーディングフレーム（*orf*）が見出された（図 1-A）。このうち，3 つの *orf* については，*Rf* 様の PPR タンパク質（RFL）に相同性があることがわかった（Fujii et al. 2011, Hölzle et al. 2011，Jonietz et al. 2010）。これら 3 つの遺伝子はタンデムに並んで存在し，それぞれ 629 個，628 個，628 個のアミノ酸をコードしていた（*ppr629*，*ppr628a*，*ppr628b* と呼ぶ）（図 1-A）。これらの推定アミノ酸配列をコンピューターのタンパク質モチーフの予測プログラム TIGR-PFAM HMM Search（http://blast.jcvi.org/web-hmm/）を用いて解析したところ，いずれも 15 個の PPR モチーフを持ち，P クラス（Lurin et al. 2004）と呼ばれる一群の PPR タンパク質であることが予測された。また，細胞内局在を予測するプログラムである Predotar（https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html）からは，N 末端側にミトコンドリアへの移行シグナル配列を持つことが予測された。さらに，N 末端側の配列と GFP との融合タンパク質の一過性発現検定の結果からも，ミトコンドリアへ局在していることが確認された（図 2）。以上の結果から，今回見出された *ppr629*, *ppr628a*，*ppr628b* の 3 つの *ppr* 遺伝子のいずれか，またはその組み合わせが *Rft* 遺伝子である可能性が高いと考えられた。

3. *rft* 遺伝子座の構造解析

図 3 に，3 つの *Rft* 候補遺伝子含む領域の DNA を Long-PCR で増幅した結果を示す。*Rft* のホモ型（*Rft/Rft*）の可稔個体では, 予想される約 21 kb の増幅断片が得られたのに対して, *rft* のホモ型（*rft/*

rft）の不稔個体では，約 6 kb の増幅断片が得られた。そこでこの約 6 kb の塩基配列を決定したところ，領域内には 1,887 bp，628 個のアミノ酸をコードする 1 つの *ppr* 遺伝子が含まれていることがわかった（以降この *ppr* 遺伝子を *rft* と呼ぶ）。図 4 に，これまでにダイコンで同定されている *Rf* 遺伝子の *orf687*（別名：*ppr-B*），同一遺伝子座に *orf687* とタンデムに並んで存在する *Rf* 様の *ppr* 遺伝子の *ppr-A*，*ppr-C* の塩基配列，そして今回見出された *ppr629*，*ppr628a*，*ppr628b*，*rft* の塩基配列と，昨年度の本所報で報告した *Rft* に連鎖する *ppr* 遺伝子である *ppr603*（安本ら，2013）の塩基配列，さらにシロイヌナズナで報告されている *Rf* 様の *ppr* 遺伝子（Fujii et al. 2011）の塩基配列を比較して描いた系統樹を示す。*rft* の配列は，3 つの *Rft* 候補遺伝子（*ppr629*，*ppr628a*，*ppr628b*）と互いによく似ており，*orf687* 遺伝子座の *ppr* 遺伝子の配列とは大きく異なることがわかった。*ppr* 遺伝子は，病原菌への耐性遺伝子の獲得機構でよく知られているような，遺伝子重複を繰り返すことによって，高等植物でその数を増大させたと考えられている（Geddy and Brown 2007, Fujii et al. 2011）。*Rft* についても，この遺伝子座で生じた *ppr* 遺伝子の非相同組換えや，遺伝子変換によって稔性回復機能が獲得された可能性が考えられる。*Rft* と *orf687* の進化の関係や，オグラ型細胞質の起源と分化との関係を含め，たいへん興味深いところである。

おわりに

今回著者らは，*orf138* mRNA のプロセシングという，これまで明らかにされている *orf687* とは異なる機能を持った稔性回復遺伝子 *Rft* の候補遺伝子領域を 68kb の領域内に絞り込み，そのなかからタンデムに並んだ 3 つの *ppr* 遺伝子を見出した（*ppr629*，*ppr628a*，*ppr628b*）。しかしながら，これら 3 つのうちのどの遺伝子が稔性回復遺伝子なのか，今のところ不明のままである。また，*Rft* は単独の遺伝子ではなく，3 つの遺伝子のどれかの組み合わせである可能性も捨てきれない。さらに，なぜ *Rft* による稔性回復が，環境条件により不安定化してしまうのかについても答えが得られていない。これらのことを明らかにするために，現在，オグラ型細胞質を持った CMS 植物体への遺伝子導入実験を行なっている。今後，形質転換体の *orf138* mRNA の解析や，花粉稔性の調査を進めることで，答えが提示できると考えている。

参考文献

Bentolila, S., Alfonso, A.A., and Hanson, M.R. 2002. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 10887–10892.

Bett, K.E., and Lydiate, D.J. 2004. Mapping and genetic characterization of loci controlling the restoration of male fertility in Ogura CMS radish. Mol. Breed. 13: 125-133.

Bonhomme, S., Budar, F., Lancelin, D., Small, I., Defrance, M.-C., and Pelletier, G. 1992. Sequence and transcript analysis of the *Nco2.5* Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. Mol. Gen. Genet. 235: 340–348.

Brown, G.G., Formanová, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., et al. 2003. The radish *Rfo* restorer

gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. Plant J. 35: 262–272.

Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., et al. 2003. Identification of the fertility restoration locus, *Rfo*, in radish, as a member of the pentatricopeptiderepeat protein family. EMBO Rep. 4: 588–594.

Fujii, S., Bond, C.S., and Small, I.D. 2011. Selection patterns on restorer-like genes reveal a conflict between nuclear and mitochondrial genomes throughout angiosperm evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 1723-1728.

Geddy, R., and Brown, G.G. 2007. Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection. BMC Genomics 8: 130.

Hölzle, A., Jonietz, C., Törjek, O., Altmann, T., Binder, S., and Forner, J. 2011. A RESTORER OF FERTILITY-like PPR gene is required for 5'-end processing of the nad4 mRNA in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 65: 737-744.

Jonietz, C., Forner, J., Hölzle, A., Thuss, S., Binder, S. 2010. RNA PROCESSING FACTOR2 is required for 5' end processing of *nad9* and *cox3* mRNAs in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 22: 443-453.

Johnston, J.S., Pepper, A.E., Hall, A.E. Chen, Z.J. Hodnett, G., Drabek, J., et al. 2005. Evolution of genome size in Brassicaceae. Ann. Bot. 95: 229-235.

Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, H., Hayakawa, T., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., et al. 2003. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. Plant J. 34: 407–415.

Krishnasamy, S., and Makaroff, C.A. 1993. Characterization of the radish mitochondrial *orfB* locus: possible relationship with male sterility in Ogura radish. Curr Genet. 24: 156-163.

Krishnasamy, S., and Makaroff, C.A. 1994. Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. Plant Mol. Biol. 26: 935-946.

Lurin, C., Andrés, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyère, C., et al. 2004. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. Plant Cell 16: 2089-2103.

Liu, Y.-G., and Huang, N. 1998. Efficient amplification of insert end sequences from bacterial artificial chromosome clones by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant Mol. Biol. Rep. 16: 175-181.

Nieuwhof, M. 1990. Cytoplasmic-genetic male sterility in radish (*Raphanus sativus* L.). Identification of maintainers, inheritance of male sterility and effect of environmental factors. Euphytica 47: 171-177.

Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. 1992. Tobacco BY-2 cell line as "Hela" cell in the cell biology of higher plants. Int. Rev. Cytol. 132: 1-30.

Ogura, H. 1968. Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ. 6: 39–78.

O'Toole, N., Hattori, M., Andres, C., Iida, K., Lurin, C., Schmitz-Linneweber, C., et al. 2008. On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. Mol. Biol. Evol. 25: 1120-1128.

Schenable, P.S., and Wise, R.P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci. 3: 175-180.

Small, I., and Peeters, N. 2000. The PPR motif – a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. Trends Biochem. Sci. 25: 46-47.

Schmiz-Linneweber, C., and Small, I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. Trends Plant Sci. 13: 663-670.

Uyttewaal, M., Arnal, N., Quadrado, M., Martin-Canadell, A., Vrielynck, N., Hiard, S., et al. 2008. Characterization of *Raphanus sativus* pentatricopeptide repeat proteins encoded by the fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility. Plant Cell, 20: 3331-3345.

Wang, Z., Zou, Y., Li, X., Zhang, Q., Chen, L., Wu, H., et al. 2006. Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. Plant Cell, 18: 676–687.

Yasumoto, K., Terachi, T., Yamagishi, H. 2009. A novel *Rf* gene controlling fertility restoration of Ogura male sterility by RNA processing of *orf138* found in Japanese wild radish and its STS markers. Genome, 52: 495-504.

安本景太，寺地 徹，山岸 博。2013 “ダイコンのオグラ型雄性不稔細胞質に対する *Rft* 稔性回復遺伝子座のマッピング”京都産業大学 総合学術研究所所報 第 8 号：123-130。

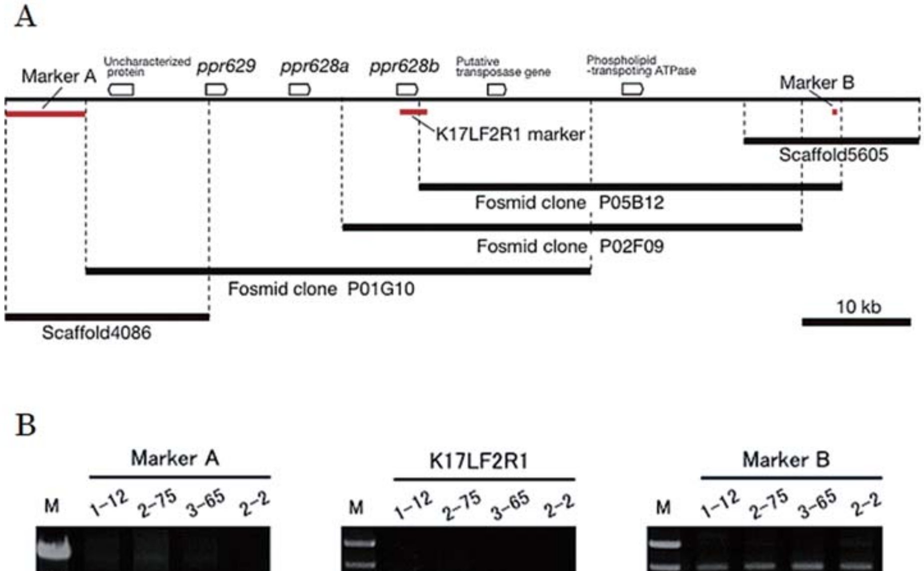

図 1. (A) *Rft* 遺伝子座の物理地図。*Rft* に近接する 3 つの連鎖マーカー（K17LF2R1，Marker A，Marker B）の位置を赤色の太線で示し，3 つのフォスミドクローンと 2 つのスキャッフォールドの位置関係は黒色の太線で示す。白色のボックスは，予測されたオープンリーディングフレームを示す。(B) 3 つの連鎖マーカーによる PCR と組換え体の検出。マーカー増幅断片の位置を矢印で示す。F; 可稔，S; 不稔，M; 分子サイズマーカー，1-12; *Rft* ホモの可稔個体，2-75; Marker B の組換え体（可稔），3-65; Marker A の組換え体（不稔），2-2; *rft* ホモの不稔個体。*Rft* は Marker A と Marker B の間の約 68 kb の領域内に存在する。

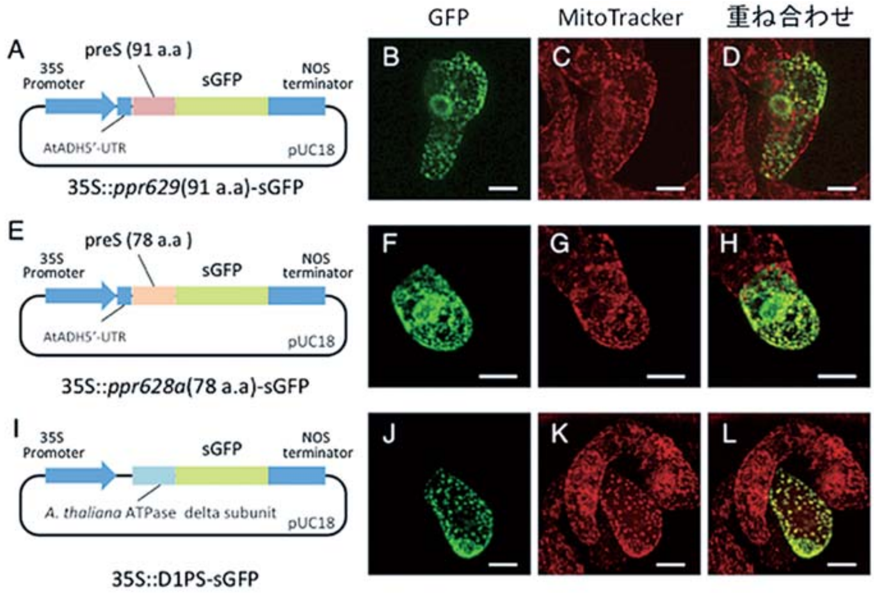

図 2.　一過性発現検定による細胞内局在の蛍光イメージ。（A）*ppr629* のミトコンドリア移行シグナルを含むと予測される N 末端（91 アミノ酸残基）と GFP の融合タンパク質を発現するプラスミドコンストラクト。（E）*ppr628a* および *ppr628b* のミトコンドリア移行シグナルを含むと予測される N 末端（78 アミノ酸残基；*ppr628a* と *ppr629b* では同一の配列）と GFP の融合タンパク質を発現するプラスミドコンストラクト。（I）ミトコンドリア局在のポジティブコントロールとして使用したシロイヌナズナ ATPase δ サブユニットのミトコンドリア移行シグナル（D1PS）と GFP の融合タンパク質を発現するプラスミドコンストラクト。（B-D, F-H, J-L）A，E，I のプラスミド DNA を導入した BY-2 細胞の GFP 蛍光画像，MitoTracer Orange 染色によるミトコンドリアの蛍光画像，および GFP と MitoTracer の蛍光を重ねあわせた画像。スケールバーの長さはいずれも 20 μm。

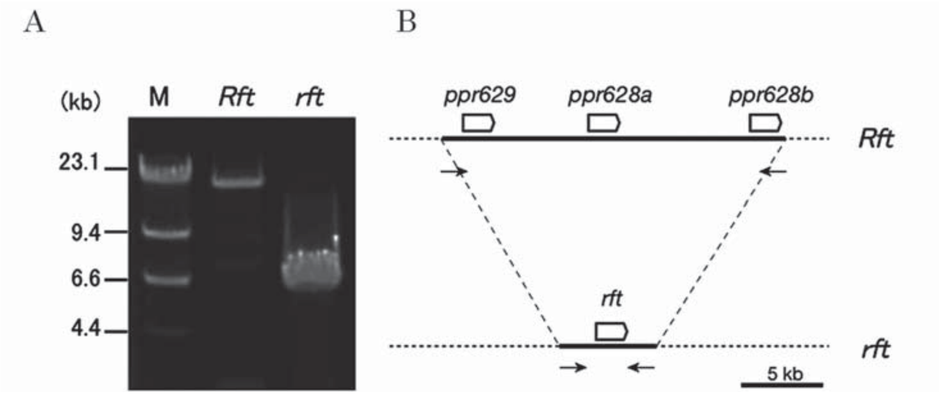

図 3.　*Rft* 候補遺伝子座の Long-PCR 増幅。　レーン M: 分子サイズマーカー，左図（A）の Long-PCR に用いたプライマーの位置を右図（B）の矢印で示す。*Rft* を持つ可稔個体（レーン *Rft*）で，3 つの *ppr* 遺伝子（*ppr629*，*ppr628a*，*ppr628b*）を含む 21 kb の領域が増幅したのに対して，*Rft* を持たない不稔個体（レーン *rft*）では 6 kb の断片が増幅した。この 6 kb の断片には 1 つの *ppr* 遺伝子が含まれていた。

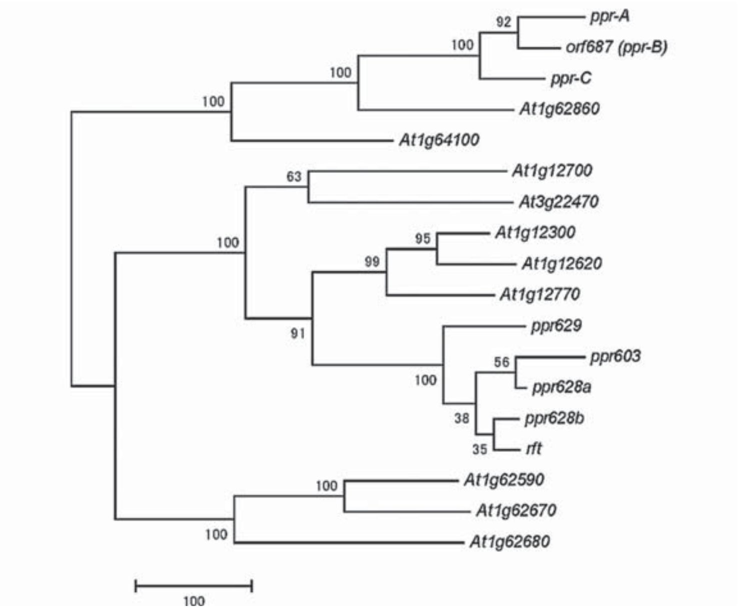

図 4.　塩基配列からみた *Rft* 候補遺伝子（*ppr629*，*ppr628a*，*ppr628b*）の系統関係。シロイヌナズナの *Rf* 様の *ppr* 遺伝子を AGI コードで示す。

Structural analysis of the *Rft* gene locus associated with fertility restoration in Ogura male-sterile radish (*Raphanus sativus* L.)

Keita YASUMOTO
Toru TERACHI
Hiroshi YAMAGISHI

Abstract

Cytoplasmic male-sterility (CMS) is a maternally inherited trait that prevents plants from producing functional pollen. CMS is caused by nuclear-mitochondrial interactions, and Ogura CMS found in Japanese radish is associated with ORF138 protein encoded by the mitochondrial gene *orf138*. The male sterile phenotype is controlled by nuclear fertility restorer (*Rf*) genes that reduce the amount of ORF138 protein. One of the *Rf* genes, termed *Rft*, was previously identified in the Japanese wild radish. *Rft* was shown to reduce the amount of ORF138 protein by the processing of 5' end of *orf138* mRNA. In order to clone *Rft*, a map-based cloning was conducted. Combining the data from fosmid clone sequencing and whole genome shotgun sequencing, we have developed DNA markers that were closely located to the *Rft* locus. As a result of genotyping of the 403 segregating plants, we physically delimited *Rft* locus to a 68 kb region. Analysis of this region suggested that the *Rft* gene encoded the Pentatrico-Peptide Repeat (PPR) protein with a predicted mitochondrial targeting pre-sequence.

Keywords : Radish (*Raphanus sativus* L.), Cytoplasmic male sterility (CMS), Restorer of fertility gene (*Rf*), PPR (Pentatrico-Peptide Repeat) protein, RNA processing