

ダイコンのオグラ型雄性不稔細胞質に対する *Rfi* 稔性回復遺伝子座のマッピング

平成 25 年 4 月 22 日受付

安本景太*
寺地徹*
山岸博*

要 旨

ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔性は、アブラナ科野菜の F₁ 育種に重要な形質である。この雄性不稔は、ミトコンドリアゲノムにコードされている *orf138* 遺伝子の働きによって引き起こされる。一方で、核ゲノムにコードされている稔性回復遺伝子 (*Rf*) は、*orf138* 遺伝子の発現を抑制することで、正常な機能をもった花粉を形成させる。著者らは、野生のハマダイコン (*Raphanus sativus*) から、*orf138* 遺伝子転写産物の 5' プロセッシングに關与する稔性回復遺伝子である *Rfi* を単離・同定することを旨として、F₂BC₁ 分離集団を用いて、Sequence Tagged Site (STS) マーカーの作製を行なった。マッピングの結果、*Rfi* はマーカー間で 0.9 cM の領域内に設定された。さらに、*Rfi* 遺伝子から 0.6 cM の位置にマップされた STSK17 マーカー、およびこのマーカー配列をもとにして作製された *Rfi* 遺伝子と完全連鎖する K17LF2R1 マーカーは、いずれも *Rf* 遺伝子様の PPR (pentatricopeptide repeat) タンパク質をコードする配列の一部を有することから、*Rfi* もこのような PPR タンパク質ファミリーに属する遺伝子である可能性が示唆された。

キーワード：細胞質雄性不稔 (CMS)、稔性回復遺伝子 (*Rf*)、Sequence Tagged Site (STS) マーカー、マッピング、PPR (pentatricopeptide repeat) タンパク質

はじめに

細胞質雄性不稔 (以降 CMS と略す) は、植物の生育は正常でありながら、葯における花粉形成が阻害される形質であり、ミトコンドリアと核の相互作用により決定される。CMS は、ミトコンドリアゲノム上の異常な CMS 遺伝子の働きによって誘発される一方で、核ゲノムに稔性回復遺伝子 (以降 *Rf* 遺伝子と略す) が存在すると、CMS 遺伝子の発現が抑えられ、正常な花粉が形成される。こうしたミトコンドリアと核の相互作用により生み出される花粉形成制御システムは、生物学的に興味深いこと、作物の F₁ 種子生産における育種の利用価値が極めて高いことなどから、様々な植物種におい

* 京都産業大学総合生命科学部

て、基礎と応用の両面から盛んに研究されてきた。

キャベツやハクサイなど、主要な野菜を多く含むアブラナ科植物では、ダイコンから発見された「オグラ型」と呼ばれる CMS (Ogura 1968) が古くから研究されている。また CMS 遺伝子として、ミトコンドリアの *orf138* (Bonhomme et al. 1992) が同定されている。

一方、核の *Rf* 遺伝子を分子的に同定する研究は、近年、急速に進められ、PPR モチーフを持つタンパク質 (PPR タンパク質) をコードする遺伝子の 1 つ、“*orf687*” が、*Rf* 遺伝子としてはじめて単離された (Koizuka et al. 2003, Desloire et al. 2003, Brown et al. 2003)。この PPR タンパク質は、高等植物で巨大遺伝子ファミリーを形成する一群の RNA 結合タンパク質であり、オルガネラ mRNA のプロセッシング、エディティング、安定化など、RNA 修飾の様々な段階に関与することが知られている (O’ Toole et al. 2008; 他)。その中で ORF687 タンパク質は、*orf138* mRNA と結合し、ORF138 タンパク質への翻訳を抑制することが報告されている (Uyttewaal et al. 2008)。しかし著者らのこれまでの研究では、*orf687* を持たない栽培・野生ダイコン (細胞質はオグラ型) の中にも、花粉稔性を回復するものがしばしば観察され、*orf687* の有無のみでは稔性回復の全てを説明できないことが示されている (Yasumoto et al. 2008)。

このような背景のもと、著者らは、*orf687* を持たないダイコンの中から、第 2 の *Rf* 遺伝子、“*Rfi*” の存在を見出した (Yasumoto et al. 2009)。この *Rfi* は *orf138* の mRNA をプロセッシングにより短く切断し、RNA レベルで ORF138 タンパク質の発現を抑えて花粉稔性を回復させる。またこれまでに、マップベース・クローニング法によって *Rfi* を単離・同定するため、ハマダイコン由来の *Rfi* が分離する F₂ 集団 (100 個体) から、2 つの RAPD マーカー (Yasumoto et al. 2009)、および 1 つの AFLP マーカー (データ未発表) を作製し、それぞれの Sequence Tagged Site (STS) 化を行なった。本稿ではさらに、F₂ 集団の後代 (F₂BC₁ 集団) を用いて、新たな連鎖マーカーの作製とマッピング行なった結果を報告する。

材料と方法

1. 植物材料

熊本県の福岡町から採種された 1 個体のハマダイコン ‘T-14’ (*Rfi* を持つ) と、オグラ型細胞質を持ち雄性不稔のダイコン ‘MS 源助’ (*Rfi* を持たない) の交雑 F₂ 集団 (Yasumoto et al. 2009) の中から、以前に作製した共優性マーカー (STSA14) による選抜で、*Rfi* をヘテロ (*Rfi/rfi*) に持つと推定される 1 個体 (#43) を選抜した。この個体を花粉親として、‘MS 源助’ に戻し交雑することで得られた F₂BC₁ 集団 329 個体を *Rfi* のマッピングに用いた (図 1)。これらの個体は京都産業大学内の温室で育成し、3~4 月期、または 10~11 月期に開花させ、蒴の形態を観察することで花粉稔性を調査した。

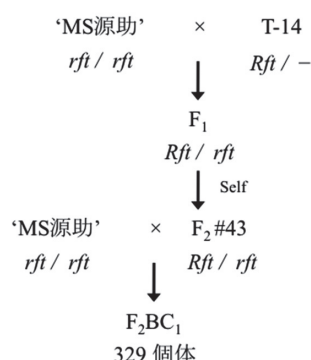


図1 *Rft* のマッピングに使用した F₂BC₁ 集団の交配スキーム

'MS 源助': オグラ型雄性不稔ダイコン, T-14: 富岡町(熊本県)から採種されたオグラ型細胞質を持ち可稔のハマダイコン (*orf687* の遺伝子型は劣性ホモ型)。

2. 実験方法

実験条件などの詳細は論文に譲るが, F₂BC₁ 個体におけるノーザン解析は, 本葉もしくはツボミから抽出した total RNA を用いた。方法は, Roche 社のマニュアルに従い, *orf138* 全長の配列を DIG 標識した DNA プローブによってハイブリダイゼーションを行なった。*Rft* に連鎖した STS マーカーの作製は, RAPD 法によって行なった。F₂BC₁ 集団の可稔 9 個体と不稔 9 個体の total DNA をそれぞれ等量ずつバルク化し, このバルク DNA を鋳型として, 10 塩基または 12 塩基のランダムプライマーを用いた RAPD-PCR を行なった。合計 2,350 反応の RAPD-PCR を行ない, 可稔バルクに特異的に増幅したマーカー断片を, それぞれプラスミドベクターにクローニングした。マーカー断片の塩基配列を決定後, BLAST 検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) などによって解析するとともに, PCR プライマーを設計し, マーカーの STS 化を行なった。一方, 以前に作製した PPR タンパク質をコードする STSK17 マーカー (Yasumoto et al. 2009) の塩基配列をもとにプライマーを設計し, 任意の組み合わせによる PCR 増幅を行ない, 新たな PCR マーカーを得た。なお, F₂BC₁ 集団における *Rft* の連鎖地図作成には MapMaker/exp (v3.0) を使用した。

結果および考察

1. F₂BC₁ 集団における *Rft* の分離

F₂ 集団 100 個体における, 以前の花粉稔性の観察の結果 (Yasumoto et al. 2009) では, 可稔と不稔の分離比が, 期待される 3 対 1 とは異なり, *Rft* を持ちながらも不稔の個体や, 同一個体内で花により花粉稔性の異なる部分可稔性を示す個体が観察された (表 1)。一方で, F₂BC₁ 集団については, 期待される 1 対 1 の分離比に適合した ($\chi^2=1.34$, $p>0.05$) (表 1)。また, このうち一部の個体 (190 個体) についてノーザンハイブリダイゼーションを行ない, *orf138* mRNA を検出したところ, *Rft* を有する個体 (遺伝子型は *Rft/rft*) の花粉稔性は全て可稔であった (表 2)。*Rft* による稔性回復効果は, 開花期

表1 F₂ および F₂BC₁ 集団におけるの花粉稔性の分離

集団	個体数		合計
	可稔*	不稔	
F ₂	59 (27)	41	100 (27)
F ₂ BC ₁	175 (4)	154	329 (4)

* ; 括弧内は部分可稔の個体数

表2 F₂BC₁ 集団における *Rft* の遺伝子型と花粉稔性との関係

遺伝子型	個体数		合計
	可稔*	不稔	
<i>Rft/rft</i>	109 (4)	0	109
<i>rft/rft</i>	0	81	81
合計	109 (4)	81	190 (4)

* ; 括弧内は部分可稔の個体数

により不安定であり、高温長日条件下において減退するとされている(堤ら, 2010, データ未発表)が、F₂BC₁ 集団における今回の調査では、夏期を避けて開花を促したために、*Rft* の作用が比較的安定していたものと推察された。

2. 新規 STS マーカーの作製と *Rft* 遺伝子座のマッピング

RAPD 法によってマーカーの検出を行なった結果、5つのマーカーが新たに得られ、それぞれを STS 化した(STSAF02, STSAD06, STSA1141, STSA0258, STSA0158)。これら5つのマーカーと花粉稔性の分離との相関を調べたところ、合計28個体の組換え体が検出された。このうち *Rft* に最も近接していたのは、3つの STS マーカー(STSA1141, STSA0258, STSA0158)であり、それぞれ同一の可稔1個体において組換えが生じていた(図2-A)。また、これら3つのマーカー(RAPD 増幅断片)の塩基配列について、BLAST 検索を行なった。その結果、3つの塩基配列は共通してシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の1つの BAC クローン(85.4 kb)配列内に相同性が認められ、これらはシロイヌナズナゲノム中では約30 kb 以内の領域に存在していることがわかった(図2-B)。

3. K17LF2R1 マーカーの作製とジェノタイピング

以前に作製した STSK17 マーカー(Yasumoto et al. 2009)は、603個のアミノ酸をコードすると推定される *ppr* 遺伝子(*ppr603* 遺伝子と呼ぶ)の配列を含んでいることが明らかになっている(データ未発表)。*ppr603* は、最近、シロイヌナズナから同定されたミトコンドリア *nad4* 遺伝子転写産物の5' プロセッシングに関与する *rpfl* (Hölzle et al. 2011)や、*nad9* および *cox3* 遺伝子転写産物の5' プロセッシングに関与する *rpf2* (Jonietz et al. 2010)などの属する *Rf* 遺伝子様の *ppr* 遺伝子である。*Rft* も *orf138* 遺伝子転写産物の5' プロセッシングに関与していることから、このような *ppr* 遺伝子である可能性が

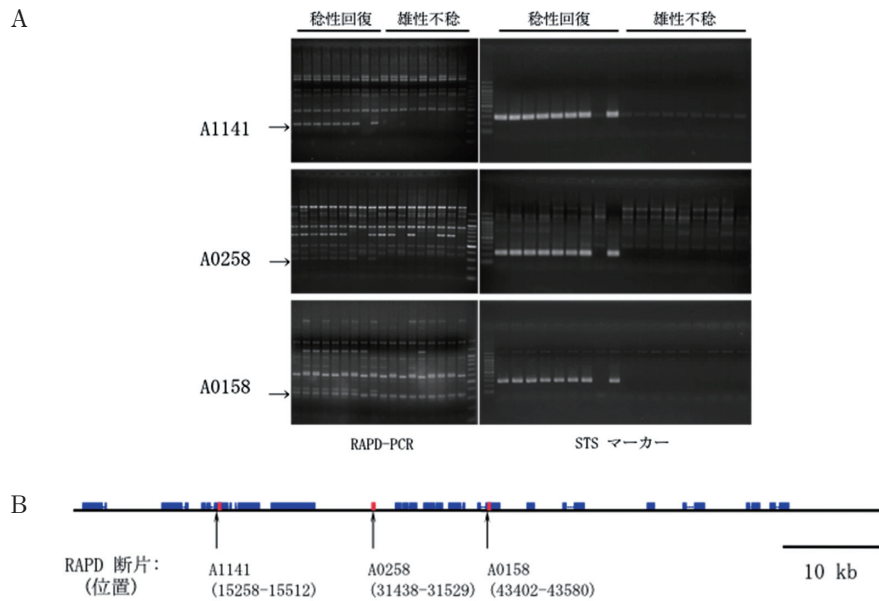


図 2

A: RAPD-PCR 増幅(左)と STS 化後の PCR 増幅(右). 稔性回復個体で特異的に増幅したバンドを矢印で示す。

B: シロイヌナズナ (*A. thaliana*) の BAC クローン領域内における 3 つの RAPD-PCR 断片の位置関係. RAPD-PCR 断片と相同な領域を赤色のボックスと矢印で示し, 推定の遺伝子領域を青色のボックスで示す。

考えられた。また, これまでペチュニア (Bentolila et al. 2003), ダイコン (Koizuka et al. 2003, Desloire et al. 2003, Brown et al. 2003), イネ (Kazama and Toriyama 2003, Akagi et al. 2004, Komori et al. 2004, Wang et al. 2006) などから単離されている *ppr* 遺伝子をコードする *Rf* 遺伝子の周辺ゲノム領域には, *Rf* 遺伝子様の *ppr* 遺伝子が重複して存在するという特徴があることが知られている。そこで, *ppr603* の塩基配列をもとにプライマーを設計し, *ppr603* のゲノム周辺領域に, 複数の *ppr* 遺伝子が並んで存在すると仮定した PCR 実験を試みた。その結果, 1 組のプライマーペア (K17LongF2/K17LongR1) を用いた PCR において, *ppr603* の配列を含まず, *Rft* に連鎖した PCR 増幅断片を得ることができ, このマーカーを K17LF2R1 マーカーとした。STSK17 マーカーと K17LF2R1 マーカーによる F₂BC₁ 集団の PCR の結果の一部を図 3 に示す。K17LF2R1 マーカーでは, STSK17 マーカーと *Rft* の間で組換えを生じている可稔 2 個体からも増幅が認められ, K17LF2R1 マーカーは, STSK17 マーカーよりもさらに *Rft* 近傍に存在していることがわかった。

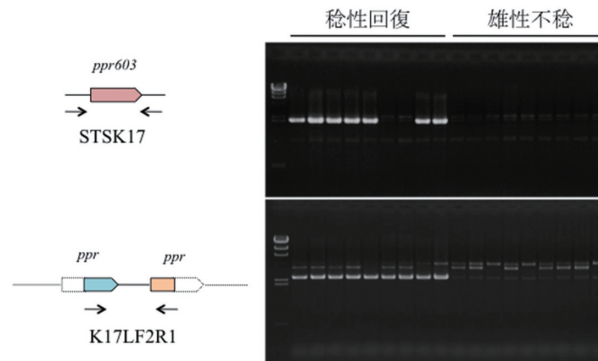


図3 *ppr* 遺伝子の配列を含む2種類のSTSマーカーによるPCR増幅
 上段: STSK17マーカー, 下段: K17LF2R1マーカー, STSK17マーカーを増幅
 せず稔性回復した2個体においても, K17LF2R1の増幅が認められる。

4. *Rfi* 遺伝子座のマッピング

今回得られた各種STSマーカーを用いて, F₂BC₁集団329個体における*Rfi*の連鎖地図を作製した(図4)。その結果, *Rfi*はマーカー間で0.9cMの領域内に設定され, K17LF2R1マーカーは*Rfi*と完全連鎖(0.0cM)していることが明らかとなった。今後は, このマーカーを含む領域における*ppr*遺伝子と*Rfi*との関係を詳細に解析するとともに, シロイヌナズナや*Brassica rapa*などの, 全ゲノム配列が決定されているアブラナ科植物とのマイクロシンテニーを利用するなどして, *Rfi*遺伝子を単離する予定である。

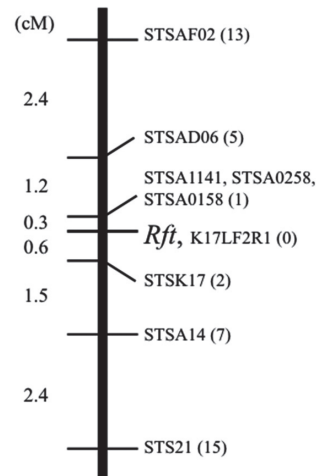


図4 *Rfi* 遺伝子座の連鎖地図
 括弧内の数字はF₂BC₁集団329個体における組換え個体の数を示す。

参考文献

- Akagi, H., Nakamura, A., Yokozeki-Misono, Y., Inagaki, A., Takahashi, H., Mori, K., and Fujimura, T. 2004. Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor. Appl. Genet.* **108** : 1449-1457.
- 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.
- 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., Formanova, 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 pentatricopeptide-repeat protein family. *EMBO Rep.* **4** : 588-594.
- 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.
- Kazama, T., and Toriyama, K. 2003. A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant *atp6* RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Lett.* **544** : 99-102.
- 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.
- Komori, T., Ohta, S., Murai, N., Takakura, Y., Kuraya, Y., Suzuki, S., et al. 2004. Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J.* **37** : 315-325.
- 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.
- 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., Matsumoto, Y., Terachi, T., and Yamagishi, H. 2008. Restricted distribution of *orf687* as the pollen fertility restorer gene for Ogura male sterility in Japanese wild radish. *Breed. Sci.* **58** : 177-182.
- 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.

Molecular mapping of an *Rft* fertility restorer locus for Ogura cytoplasmic male sterility in radish

Keita YASUMOTO
Toru TERACHI
Hiroshi YAMAGISHI

Abstract

Ogura male-sterile cytoplasm is widely distributed in Japanese wild radish. The cytoplasm has been used in the F₁ hybrid seed production in Cruciferous crops. The male-sterility is associated with the mitochondrial protein encoded by the gene *orf138*, whereas nuclear fertility restorer (*Rf*) genes prevent accumulation of ORF138 protein. One of the *Rf* genes, *Rft*, was previously identified in the Japanese wild radish. *Rft* was shown to reduce the amount of ORF138 protein by processing 5' end of *orf138* mRNA. In order to isolate *Rft*, we have developed the Sequence Tagged Site (STS) markers surrounding the *Rft* locus using an F₂BC₁ segregating population. As a result of molecular mapping, *Rft* was located between two markers the distance of which was estimated to be 0.9 cM. Since nucleotide sequences of STSK17 marker (0.6 cM) and K17LF2R1 marker (0.0 cM) contain the sequence characteristic to the *Rf*-like PPR (pentatricopeptide repeat) protein genes, it is likely that the gene *Rft* also encodes a member of the PPR protein family.

Keywords : Cytoplasmic male sterility (CMS), Restorer of fertility gene (*Rf*), Sequence Tagged Site (STS) marker, Molecular mapping, PPR (pentatricopeptide repeat) protein