

TAC ベクターとプロテオーム解析を用いた ダイコンの稔性回復遺伝子のクローニング

——オグラ型雄性不稔に対するハツカダイコンの稔性回復遺伝子座の構造解析——

寺 地 徹

1. はじめに

ダイコンにはオグラ型と呼ばれる雄性不稔細胞質が存在し、この細胞質のミトコンドリアゲノムにコードされている *orf138* 遺伝子の働きにより雄性不稔が生じる。一方、ハマダイコン、ハツカダイコンなど一部のダイコンの核ゲノムには、*orf138* 遺伝子の発現を翻訳レベルで抑え、稔性を回復させる機能を持つ稔性回復遺伝子（以下 *Rf* 遺伝子）が存在している。この *Rf* 遺伝子は、一昨年、中国ダイコン「園紅」に由来するものがクローニングされ（コードするアミノ酸の数から *orf687* と呼ばれる）、その産物はペチュニアやイネの *Rf* 遺伝子産物同様、PPR モチーフを持つタンパク質であることが示されている¹⁻³⁾。我々は本共同研究プロジェクトにおいて、この *Rf* 遺伝子の構造と機能、さらにはその多型と進化を明らかにすることを目的に、様々な実験を進めてきた。そのなかで過去2年の研究経過報告書では、我国の熊本県「富岡」の集団から採取されたハマダイコン1個体に由来する *Rf* 遺伝子のクローニングの結果を示し、我々が見つけたハマダイコンの *Rf* 遺伝子は、日本の栽培ダイコンの *rf* 遺伝子と3ヵ所のアミノ酸置換で区別されること、またアミノ酸置換の場所は、中国ダイコンの *Rf* 遺伝子とは明確に異なっていることを報告した。今年度の報告書では、ハツカダイコンの *Rf* 遺伝子のクローニングとその構造解析の結果について述べたい。周知のようにハツカダイコンは、古来西洋において栽培されてきたもので（例えば、紀元前2200年のエジプト）、同じ種 (*Raphanus sativus*) に分類されるとはいえ、歴史的にも、またその形態や用途においても、日本や中国の栽培ダイコン及びハマダイコンと大きく異なっている。我々が以前に行った研究では、ハツカダイコンには、オグラ型雄性不稔細胞質を持つものは存在しないことが明らかとなっている。一方、ハツカダイコンの多くは（例えばコメット）、オグラ型細胞質による雄性不稔を回復することから、これらは *Rf* 遺伝子を有しているものと考えられる⁴⁾。このことは、正常型細胞質しか持たないハツカダイコンが、なぜ *Rf* 遺伝子を持つのかという大きな疑問をなげかける。またハツカダイコンの *Rf* 遺伝子は、そもそも中国ダイコンやハマダイコンのものと本当に同じものかという疑問も呈する。これらの間に答えるため、以下の実験を実施したので、その概要を報告する。

表 1. MS源助 X コメットのF₂集団における表現型の分離

| 表現型 | | $\chi^2(3:1)$ | P |
|-----|----|---------------|------|
| 可稔 | 不稔 | | |
| 26 | 6 | 0.67 | 0.41 |

2. 材料及び方法

2.1. 植物材料

表 1 に、本実験に用いた F₂ 分離集団を示す。オグラ型細胞質を持つ雄性不稔系統のダイコン MS 源助と、稔性回復遺伝子を持つコメットを交配させて得た F₁ を自殖させ、32 個体からなる F₂ 集団を育成した。この F₂ 集団では、コメット由来の *Rf* 遺伝子のホモ、この遺伝子と MS 源助由来の *rf* 遺伝子のヘテロ、さらに MS 源助由来の *rf* 遺伝子のホモが 1 対 2 対 1 に分離することが期待される。また、稔性回復が 1 つの優性遺伝子によって決定されるとすると、表現型では可稔と不稔が 3 対 1 に分離することが予測される。これら F₂ の各個体から全 DNA を調製し、以後の実験に用いた。また全 RNA の調製は、交配に用いた親とは別のコメット 1 個体から行った。

2.2. 実験方法

実験条件などの詳細は論文に譲るが、F₂ 分離集団の各個体より全 DNA を調製し、その約 5 μ g を制限酵素 *Bam*HI で完全消化後、アガロースゲル電気泳動を行った。この DNA をナイロン膜に転写した後、ディゴキシゲニン (Dig) 標識したコメットの *orf687* 全長 cDNA プローブでハイブリダイゼーションを行った。またコメットの *orf687* は、以下の方法で単離した。まずコメットのつぼみより全 RNA を調製し、園紅の *orf687* の塩基配列を基に設計したプライマーペア (1F / 2R) で RT-PCR を行い、cDNA ほぼ全長を含む断片を得た。この増幅断片をプラスミドベクターへクローニングした後、得られた 3 つのクローンについて全塩基配列を決定し、それらのコンセンサス配列をもとめた。また、RACE 法により *orf687* の 5' および 3' UTR の塩基配列を決定し、上記配列と合わせてコメットの *Rf* 遺伝子の塩基配列とした。

3. 結果及び考察

3.1. 表現型の分離とサザンハイブリダイゼーション

MS 源助とコメットを交配して得た F₂ 集団 32 個体の表現型の分離は、可稔が 26 個体、不稔が 6 個体であった。この分離の値を χ^2 検定したところ、3 対 1 の分離比に適合した。このことからコメットの *Rf* 遺伝子は 1 つの優性遺伝子であることが強く示唆された。続いて各個体の遺伝子型を決定するため、サザン解析を行った。図 1 に、F₂ 集団に由来する 8 個体のサザンハイブリダイゼーションパターンを例示する。*orf687* の全長 cDNA をプローブとするハイブリダイゼーションでは、おおよそ 9kb, 7kb, 6kb, 5kb の DNA 断片の泳動位置にそれぞれシグナルが観察され、6kb のものは似た大

長さの2本のバンドが重なっていた。個体別では、後述する1個体の例外を除き、これらすべてのバンドを持つもの（例えば図1，個体#2），そこから9kbのバンドだけを欠くもの（同，個体#1），逆に9kbのバンドだけを持つもの（同，個体#4）のいずれかに分類された。ここで不稔個体は9kbのバンドだけを持っていたことから、このバンドはMS源助に由来し、そこにはMS源助の*rf*遺伝子が含まれることがわかった。また残りのバンドは、すべてコメントに由来することも示された。一方、9kbのバンドと、6kbの2本のバンドのうちの1本を持つ個体が、データを得ることができた全30個体中1個体だけ観察された（図2，個体#8）。このことより、この6kbのバンドは、他のコメント由来の7kb、6kb、5kbの3本のバンドと同じ染色体上に座乗するが、それらとは別のローカスに位置していることが示された。ここで興味深いのは、この個体も稔性が回復していたことで、この実験により、実際に稔性回復に寄与する*Rf*遺伝子は、この6kbのバンドに含まれていることがわかった。

3.2. コメントの *orf687* の RT-PCR 及びシークエンシング

図3に、コメントのつぼみから調製した全RNAを用いたRT-PCRの結果を示す。ハマダイコンの5' RACEの結果に基づき合成した00Fプライマー（データ未掲載）と2Rのプライマーのペアで、約2.2kbのシングルバンドが増幅した。1F/2RプライマーによるRT-PCR産物のクローニングとRACEのデータにより、コメント *orf687* の全長cDNAの塩基配列を決定したところ、予測通りcDNA中に687個のアミノ酸をコードする2064bpの*orf*を見いだすことができた。この*orf*、すなわちコメントの*Rf*遺伝子の推定翻訳産物のアミノ酸配列を、ハマダイコンの*Rf*遺伝子、園紅の*Rf*遺伝子、コセナダイコンの*rf*遺伝子、ならびに今回我々がコメントと同様の方法で初めて決定した、MS源助の*rf*遺伝子の推定翻訳産物のアミノ酸配列と相互に比較した。図4に、いずれかの品種・系統でアミノ酸配列に違いがみられた場所をまとめた。コメントではN末端付近のアミノ酸配列が、他のダイコン4品種・系統と特に異なっていることが見てとれる。なお、*orf687*の翻訳産物は縮重した35個のアミノ酸がタンデムに並ぶPPRモチーフを持つ。コメントの*orf687*も他のダイコン4品種・系統のものと同様に16個のPPRモチーフを持つと予測されたが、コメントで見られたN末端付近のアミノ酸の違いは、前から1番目のPPRモチーフに集中していることも、この比較で明らかとなった。図5に、*orf687*の塩基配列を比較し、それらの系統関係を示したものを掲げる。MS源助とコセナダイコンの*rf*遺伝子の塩基配列は極めてよく似ていること、コメントの*Rf*遺伝子の配列は、ハマダイコン、園紅の*Rf*遺伝子と比べて、大きく異なることが分かった。

4. おわりに

今回の報告では、ハツカダイコンの1品種、コメントの*orf687*、すなわち*Rf*遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定することができた。また、その構造を中国ダイコンの園紅やハマダイコンの既知の*Rf*遺伝子のもものと比較したところ、特に最初のPPRモチーフに大きな違いが認められ

た。コメントの *Rf* 遺伝子座では、コード領域内ばかりではなく、遺伝子間領域にも大きな構造変異（欠失）が存在することが示されている（安本，データ未掲載）。また，他のハツカダイコンの品種でも，この遺伝子座に，大きな変異が存在することが明らかになりつつある（吉見，データ未掲載）。このことは，ハツカダイコンにおけるこの遺伝子座が，中国ダイコンやハマダイコンとは異なる進化の道筋をたどってきたことを示唆している。最初に述べたように，ミトコンドリアの *orf138* 遺伝子は，ハツカダイコンには見つからない。一方，*orf138* 遺伝子は，特に我国のハマダイコンに高い頻度で見いだされる。ダイコンにおけるオグラ型と正常型の細胞質の分化が *Rf/rf* 遺伝子の多型や進化とどのように関係しているのか，大いに興味を持たれる。今後，さらに研究を進めたい。

5. 謝辞

本報告書に使用したデータは，主として安本景太氏（京都産業大学工学研究科修士2年），吉見麻衣子氏（同修士1年）により得られたものである。ここに記して深謝の意を表す。

参考文献

- 1) Koizuka N., Imai R., Fujimoto H., Hayakawa T., Kimura Y., Kohno-Murase J., Sakai T., Kawasaki S. and Imamura J. (2003) *Plant J.* 34, 407-415
- 2) Desloire S., Gherbi H., Laloui W., Marhadour S., Clouet V., Cattolico L., Falentin C., Giancola S., Renard M., Budar F., Small I., Caboche M., Delourme R. and Bendahmane A. (2003) *EMBO Rep.* 4, 588-594
- 3) Brown G. G., Formanova N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W. Y. and Landry B. S. (2003) *Plant J.* 35, 262-272
- 4) Yamagishi H. (1998) *Genes Genet. Sys.* 73, 79-83

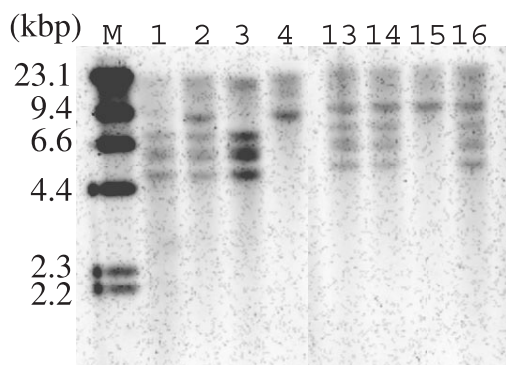


図1. *orf687* の cDNA 全長をプローブとする F_2 集団各個体のサザン解析
 レーン上の数字は F_2 集団を構成する各個体の番号を示す。M：分子サイズマーカーに用いたラムダ
 ファージ DNA の *Hind*III 消化物

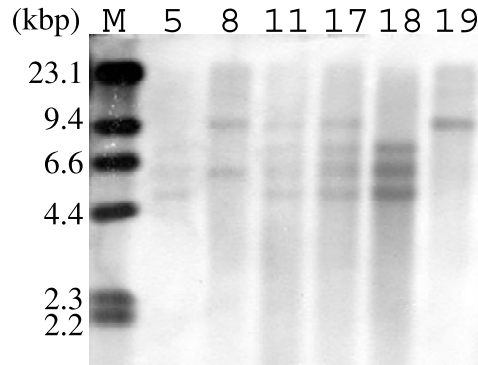


図2. *orf687* の cDNA 全長をプローブとする F₂ 集団各個体のサザン解析 (続き)
注釈は図1 参照

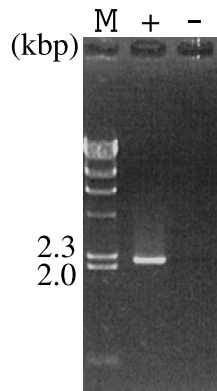


図3. コメットのつぼみから調製した全 RNA を用いた RT-PCR
+は逆転写反応液中に酵素を含むが, -は酵素を含まない。M: 分子サイズマーカーに用いたラムダファージ DNA の *Hind*III 消化物

| 品種・系統名 | 遺伝子型 | アミノ酸の位置 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|------|---------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 93 | 97 | 102 | 103 | 105 | 107 | 108 | 109 | 111 | 114 | 118 | 140 | 153 | 170 | 171 | 232 | 240 | 248 | 381 | 441 |
| Cmt | Rf | K | V | H | K | V | M | R | R | P | A | N | I | T | N | L | K | N | V | N | C |
| Hmd | Rf | E | L | Y | Q | M | R | K | Q | R | I | T | I | N | N | L | I | D | I | H | Y |
| Enk | Rf | E | L | Y | Q | M | R | K | Q | R | I | N | I | T | D | F | K | N | V | H | Y |
| Ksn | rf | E | L | Y | Q | M | R | K | Q | R | I | T | I | N | N | L | K | N | V | H | Y |
| Msg | rf | E | L | Y | Q | M | R | K | Q | R | I | T | L | N | N | L | K | N | V | H | Y |

PPR motif



図4. *Rf/rf* 遺伝子の推定翻訳産物のアミノ酸変異と PPR モチーフの関係

Cmt: コメット, Hmd: ハマダイコン, Enk: 園紅, Ksn: コセナダイコン, Msg: MS 源助

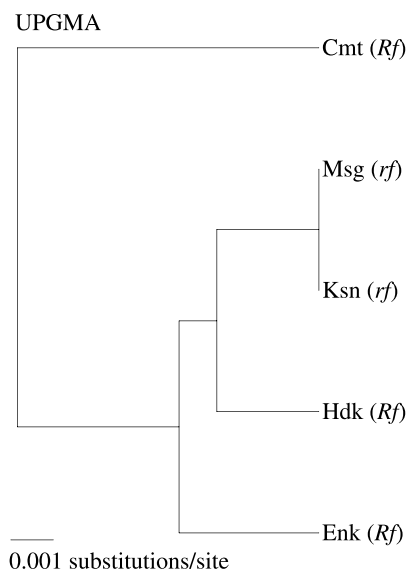


図5. 塩基配列からみた *Rf/rf* 遺伝子の系統関係 (UPGMA 法)

Cmt: コメット, Hmd: ハマダイコン, Enk: 園紅, Ksn: コセナダイコン, Msg: MS 源助