

# 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

寺 地 徹

## 1. はじめに

我国の、主として海岸線に自生するハマダイコンには、オグラ型と呼ばれる細胞質を持つ個体が約4割前後の頻度で存在する。これらの細胞質を日本の栽培ダイコンに導入すると、ミトコンドリアゲノムにコードされる *orf138* 遺伝子の働きで花粉の形成に異常をきたし、雄性不稔となる。一方、ハマダイコンやハツカダイコンなど一部の栽培ダイコンには、核ゲノムに稔性回復遺伝子（以下 *Rf* 遺伝子と略す）を持つものがある。これらのダイコンでは *Rf* 遺伝子の働きにより *orf138* 遺伝子の翻訳が抑えられ、細胞質がオグラ型であっても正常な花粉をつけることができる。これまで、このダイコンの *Rf* 遺伝子の分子実体は全く不明であったが、昨年、植物工学研究所が中国ダイコン「園紅」に由来する *Rf* 遺伝子を世界に先駆けてクローニングし、この遺伝子産物が PPR モチーフを持つタンパク質であることが示された。また、その後少し遅れて、カナダ、フランスのグループもそれぞれダイコンの *Rf* 遺伝子のクローニングに成功し、いずれも全く同じ結論に達している。ここでい

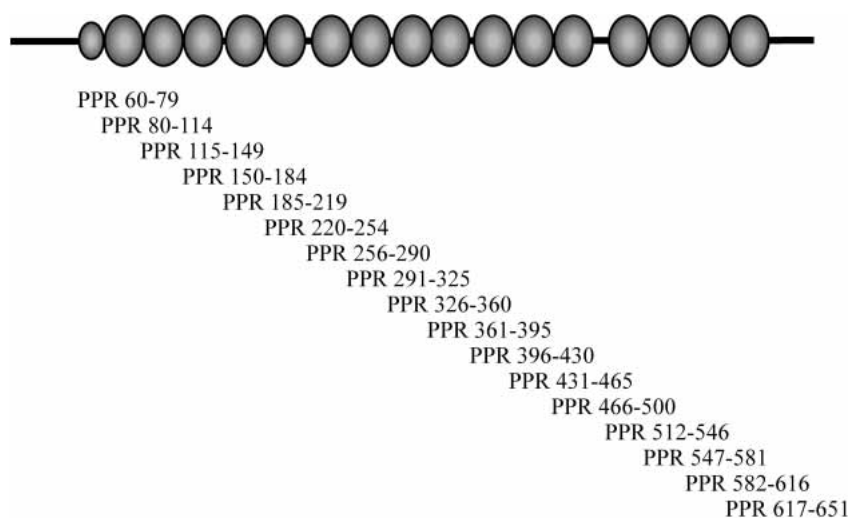


図1. *orf687* 遺伝子の推定翻訳産物にみられる PPR ドメイン  
 模式図下の数字は個々の PPR ドメインを構成するアミノ酸の範囲を示している。

う PPR モチーフとは、ゆるいコンセンサス配列を持つ35個のアミノ酸がタンデムに並んだりリピートを構成するもので、「園紅」の *Rf* 遺伝子 (*orf687* と呼ぶ) には16個の PPR モチーフが存在する (図1)。一般に PPR モチーフを持つタンパク質は、葉緑体やミトコンドリアなど細胞内のオルガネラへ移行し、そこでなんらかの RNA と結合すると考えられている。ダイコンの場合、*Rf* 遺伝子の働きから、*orf687* の遺伝子産物がミトコンドリアへ移行し、*orf138* の mRNA と結合することで、その翻訳を妨げているのではないかと考えられている。

本共同プロジェクトでは、オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子の構造と機能を、ハマダイコン、ハツカダイコンなどの材料を用いて研究しているが、すでにクローニングされた中国ダイコン「園紅」の *orf687* 遺伝子と、我々が用いている材料の *Rf* 遺伝子との関係は未だ明らかになっていない。そこで今回、ハマダイコンの *Rf* 遺伝子の全容を明らかにし、「園紅」の *orf687* と比較することを目的に一連の実験を行ったので以下に報告する。

## 2. 材料及び方法

### 2. 1. 植物材料

本研究には、昨年と同様、オグラ型細胞質を持つ「富岡」のハマダイコン1個体と日本の栽培ダイコン「打木源助」の交配で得た F<sub>2</sub> 集団のなかの複数個体を用いた。この F<sub>2</sub> 集団は全ての個体がオグラ型細胞質を持ち、核の稔性回復遺伝子の遺伝子型は *Rf* のホモと *Rf/rf* のヘテロと *rf* のホモが1対2対1に分離する。また、その表現型は、可稔と不稔が3対1に分離することが期待される。F<sub>2</sub> 集団の各個体の表現型 (花粉稔性) を顕微鏡観察により調査し、葯が発達し正常な丸い花粉が観察されるものを可稔個体、葯が未発達で花粉が全く観察されないものを不稔個体として区分した。前述の交配スキームに従うと、ここで観察される不稔個体は「打木源助」由来の *rf* をホモに持つことが期待される。これらの不稔個体からクローニングされた *rf* 遺伝子を「打木源助」の *rf*、可稔個体に見いだされた不稔個体とは異なる配列を「富岡」のハマダイコン由来の *Rf* として、以後の解析に用いた。

### 2. 2. 実験方法

今回の実験では、これら F<sub>2</sub> 集団のいくつかの個体から、*orf687* ホモログを RT-PCR によりクローニングし、その塩基配列を決定した。詳しい条件などは論文にゆずるが、実験の概要を以下に簡単にまとめる。まず不稔性を示した1個体 (#10) の cDNA を鋳型に、*orf687* の N 末端近傍と 3' 非翻訳領域に相補性を持つプライマーペアで PCR を行い、cDNA のほぼ全長を増幅し、これをプラスミドベクター (pGEM-T Easy) へクローニングした。得られた複数のクローンのうち2クローン (#10-2, #10-6) の全塩基配列と1クローン (#10-3) の部分塩基配列を決定し、全長 2288bp の

cDNA 配列を得て、これを「打木源助」の *rf* の塩基配列とした。また、昨年の報告で述べたダイレクトシーケンシングによる Genotyping で、*Rf* ホモと判定した 2 個体 (#5, #6) の cDNA 各 1 クローン (#5-2, #6-3) の全塩基配列と個体 #5 の 1 クローン (#5-7) の部分塩基配列から、同じく全長 2288bp の cDNA 配列を得て、これをハマダイコンの *Rf* の塩基配列とした。

### 3. 結果及び考察

各 cDNA クローンの塩基配列を解析した結果、いずれのクローンも「園紅」の *orf687* 遺伝子の C 末端に存在する唯一のイントロンに相当する配列がスプライスされておらず、推定アミノ酸が 20 個多い *orf707* へと変化していることが示唆された（ただしこの結果については、別途行った 3'RACE 等の結果と一致せず、*orf707* が cDNA 由来の増幅産物ではなく、試料にわずかに混入したゲノム

Consensus	HEIKGLEDAI DLFSDMLRSR PLPSVDFCK LMGVVVRMER PDLVISLYQK	104
Enk	.....	
Ksn	.....	
Hmdk	.....	
Ucg	.....	
Consensus	MERKQIRCDI YSFTLLIKCF CSCSKLPFAL STFGKITKLG LHPDVVTFNT	154
Enk	..... N .....	
Ksn	.....	
Hmdk	.....	
Ucg	..... L .....	
Consensus	LLHGLCVEDR VSEALNLFHQ MFETTCRPNV VTFTTLMNGL CREGRIVEAV	204
Enk	..... DF .....	
Ksn	.....	
Hmdk	.....	
Ucg	.....	
Consensus	ALLDRMMEDG LQPTQITYGT IVDGMCKKGD TVSALNLLRK MEEVSHIPN	254
Enk	.....	
Ksn	.....	
Hmdk	..... I .....	
Ucg	..... D .....	
Consensus	VVIYSAIDS LCKDGRHSDA QNLFTEMQEK GIFPDLFTYN SMIVGFCSSG	304
Enk	.....	
Ksn	.....	
Hmdk	.....	
Ucg	.....	

図 2. *Rf/rf* 遺伝子の推定翻訳産物におけるアミノ酸配列の比較（部分）

各アミノ酸は 1 文字コードで表記されており、コンセンサス配列と同じアミノ酸はドットで示されている。変異ヶ所は四角で囲まれている。Enk: 園紅、Ksn: コセナダイコン、Hmdk: ハマダイコン、Ucg: 打木源助。

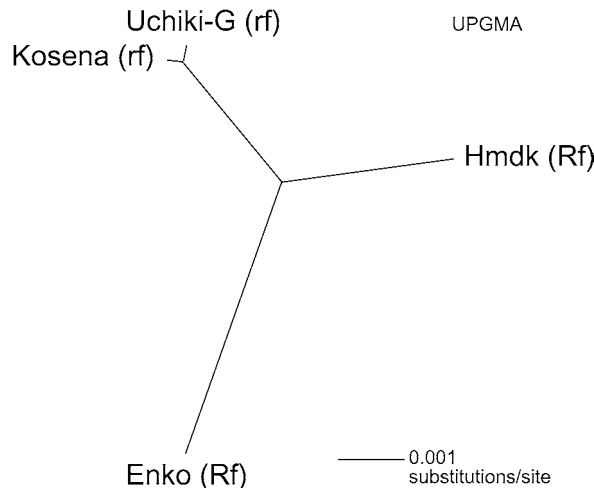


図3. 塩基配列による *Rf/rf* 遺伝子の系統関係 (UPGMA 法)

Enko: 園紅、Kosena: コセナダイコン、Hmdk: ハマダイコン、Uchiki-G: 打木源助。

DNA に由来するものであった可能性も捨てきれない。詳細は現在検討中である)。

図2に「園紅」の *Rf*、植物工学研究所が発表している日本のコセナダイコンの *rf*、ハマダイコンの *Rf* 及び「打木源助」の *rf* の翻訳産物の推定アミノ酸配列を、違いが認められた領域のみ示す。前述の *orf687* と *orf707* の違いに起因する C 末のアミノ酸配列の不一致を除くと、ハマダイコンの *Rf* は「園紅」の *Rf* とは 7ヶ所、コセナダイコンの *rf* とは 3ヶ所、「打木源助」の *rf* とは 4ヶ所で違いがみられた。また、「打木源助」の *rf* は、「園紅」の *Rf* と 5ヶ所で違いがみられるものの、コセナダイコンの *rf* とはわずか 1ヶ所で違いがみられるのみであった。図3は、決定した塩基配列のうち 3' 近傍を除く 2034bp について 4種類の *Rf/rf* を比較し、その相互関係を系統樹で示したものである。この図から、「打木源助」の *rf* 遺伝子の配列はコセナダイコンの *rf* 遺伝子の配列と極めてよく似ていること、ハマダイコンの *Rf* は「園紅」の *Rf* とは塩基配列が多少違い、両者の起源が異なることが示唆される。図4は、ハマダイコンの *Rf* と「打木源助」及びコセナダイコンの *rf* との間で推定アミノ酸が共通に変化している部分を、PPR モチーフのコンセンサス配列との関係で示したものである。両者でアミノ酸置換がみられた位置は *orf687* (*orf707*) が持つ 16の PPR タンデムリピートのうち、前から 6番目のドメインに相当する。この図からハマダイコンの *Rf* と *rf* の間には、この部分で 3つのアミノ酸置換があり、そのうち 2つ (K から I、N から D) はアミノ酸のチャージの変化を伴う置換であることがわかる。また、これら 2つの置換は、いずれも *Rf* の +チャージが増えるような変化であることが興味深い。一方、「園紅」の *Rf* と「打木源助」及びコセナダイコンの *rf* との比較では、前から 3番目と 4番目のドメインに違いが見られ、これもやはり *Rf* のアミノ酸の

A

*Rf*: ITYGTIVDGMCK**I**GDTVSA**L**D**L**LRKMEE**I**SHIIPN  
*rf*: ITYGTIVDGMCK**K**GDTVSA**N**LLRKMEE**V**SHIIPN

**vtYntlIsgycknGkleeAlelfeeMkekGikPdv**

PPR consensus

B

*Rf*: YSF**N**ILIKCFCSCKLPFALSTFGKITKLGLHPDV  
*rf*: YSF**T**ILIKCFCSCKLPFALSTFGKITKLGLHPDV

*Rf*: VTF**T**TLLHGLCVEDRVSEAL**D**FFHQMFETTCRPNV  
*rf*: VTF**N**TLLHGLCVEDRVSEAL**N**LFFHQMFETTCRPNV

図4. PPR コンセンサス配列からみた *Rf/rf* 遺伝子の推定翻訳産物間の変異位置

- A. 上段：ハマダイコンの *Rf* と打木源助、コセナダイコンの *rf* の比較（220-254番目のアミノ酸）。  
 B. 下段枠内：園紅の *Rf* と打木源助、コセナダイコンの *rf* の比較（115-184番目のアミノ酸）。  
 変異アミノ酸は太字で記されており、チャージの変化を伴う変化は楕円で囲まれている。

チャージが+側に変化するものであった。換言すれば、ハマダイコンと「園紅」の *Rf* では、位置は異なるものの、いずれも *rf* と比べて PPR ドメインのアミノ酸のチャージが+側へ変化している。このことから、PPR ドメインにおけるアミノ酸のチャージの違いが *Rf* と *rf* の機能的違いをもたらしているものと推測される。今後、組換え体の利用などを通じ、この仮説を検証したい。

#### 4. 謝辞

本研究を遂行するに当たり（株）植物工学研究所には未公開データの提供も含め様々な便宜を受けた。また、本稿の実験は主として京都産業大学工学部生物工学科4回生長島隆晴氏により行われた。ここに記して深謝の意を表す。