

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年2月20日(20.02.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/027502 A1

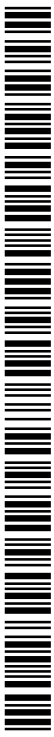
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
A01H 1/02 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/066528
- (22) 国際出願日: 2013年6月10日(10.06.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-180824 2012年8月17日(17.08.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP). 国立大学法人琉球大学(UNIVERSITY OF THE RYUKYUS) [JP/JP]; 〒9030213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 Okinawa (JP).
- (72) 発明者: 鳥山 欽哉(TORIYAMA, Kinya); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 風間智彦(KAZAMA, Tomohiko); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 本村 恵二(MOTOMURA, Keiji); 〒9030213 沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 国立大学法人琉球大学農学部内 Okinawa (JP). 五十嵐 圭介(IGARASHI, Keisuke); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: RICE RT-TYPE CYTOPLASMIC MALE STERILITY CAUSAL GENE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: イネ RT 型細胞質雄性不稔性原因遺伝子およびその利用

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to identify the causal gene of rice RT-type cytoplasmic male sterility and to provide a means for determining a rice sterile line that possesses RT-type male-sterile cytoplasm by using said causal gene as a DNA marker, in order to employ rice RT-type cytoplasmic male sterility in a three-line method. The present invention provides: a causal gene of rice RT-type cytoplasmic male sterility that includes a DNA comprising a base sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 3; and a method for determining a rice sterile line that possesses RT-type male-sterile cytoplasm by detecting the presence of said gene in a rice to be tested.

(57) 要約: 本発明は、三系法でイネ RT 型細胞質雄性不稔性を利用するために、イネ RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子を同定し、これを DNA マーカーとして RT 型雄性不稔細胞質を保有するイネ不稔系統を判別する手段を提供することを課題とする。本発明は、配列番号 1 または 3 に示す塩基配列からなる DNA を含むイネ RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子、ならびに被検イネにおける該遺伝子の存在を検出することによって RT 型雄性不稔細胞質を保有するイネ不稔系統を判別方法を提供する。



WO 2014/027502 A1

明 細 書

発明の名称

イネ RT 型細胞質雄性不稔性原因遺伝子およびその利用

技術分野

本発明は、イネ RT 型細胞質雄性不稔性原因遺伝子および当該遺伝子を用いて RT 型細胞質雄性不稔イネ系統を判別する方法に関する。

背景技術

一代雑種育種法はハイブリッド品種育種法とも呼ばれ、両親の優れた形質を合わせ持ち、かつ、雑種強勢を示す品種が育成できるため、種々の植物において利用されている。イネにおいてはハイブリッドライス（一代雑種品種）を育種するために、細胞質雄性不稔性（CMS: Cytoplasmic Male Sterility）を利用した三系法が利用されている。細胞質雄性不稔は、異常なミトコンドリア遺伝子の働きにより、花粉形成が阻害される現象である。雄性不稔細胞質のミトコンドリアには雄性不稔の原因となる遺伝子が存在し、一方、核コードの稔性回復遺伝子はキメラ遺伝子産物の修飾を行なって上記阻害を回避していると考えられている。三系法は、雄性不稔細胞質を保有する系統である「不稔系統」、稔性回復遺伝子(Rf)を保有する系統である「稔性回復系統」、および、核遺伝子は不稔系統と同一であって不稔細胞質を保有しない系統である「維持系統」を利用する育種方法をいう。これらの3系統を用いて、(i) 不稔系統に回復系統の花粉を交配させることによりハイブリッド種子を獲得することができ、(ii) 不稔系統に維持系統の花粉を交配することにより不稔系統を維持・増殖することができる。

三系法で細胞質雄性不稔性を利用するにあたっては、雄性不稔細胞質を確実に保有するイネ不稔系統かどうかの検定が必要である。従来、植物体中での雄性不稔細胞質の遺伝子型を判定するためには、まず、自家受粉および正逆の検定交雑を行い、種子形成率が 0%である個体の出現頻度を調査する必要がある。しかしながら、この方法は年単位の膨大な時間と多大な労力を要し、また、種子稔性

は温度や日照時間などの環境条件により影響を受けやすく正確な検定ができない。よって、迅速かつ簡便に効率よくイネ雄性不稔細胞質を検定する方法が望まれていた。

従来より三系法を用いたイネのハイブリッド品種に育成にはインド型イネ Chinsurah Boro II 品種の BT 型細胞質雄性不稔性や海南島野生イネ品種の WA 型細胞質雄性不稔性が用いられたが、主流は WA 型細胞質雄性不稔性である（非特許文献 1）。世界のイネ全栽培面積からみれば、1 割が単一の WA 型雄性不稔細胞質に依存していることになる。これまで WA 型細胞質雄性不稔性イネにおいて細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の候補として orf126 が報告されている（非特許文献 2）。しかし、細胞質雄性不稔性に直接関与するかは実験的に証明されていない。よって、WA 型細胞質雄性不稔性は、細胞質の原因遺伝子、稔性回復系統のもつ稔性回復遺伝子の正体も明らかにされておらず、分子基盤が解明されないまま使われている。

また、上記以外にも細胞質雄性不稔性を提供するイネ系統について幾つか報告がある。たとえば、RT98 型細胞質雄性不稔系統 (RT98A) は琉球大学の本村らにより、野生イネ *Oryza rufipogon* K98 系統 (国立遺伝学研究所 系統番号 W1109) を 1 回母本にし、台中 65 号を 8 回の連続戻し交配を行って育成された系統で、花粉は見かけ上正常であるが、受精機能を持たない。また、その育成過程において、RT98A と同じ細胞質をもつが、K98 に由来する稔性回復遺伝子をもつために稔性が回復する稔性回復系統 RT98C が育成されている (非特許文献 3)。また、RT102 型細胞質雄性不稔系統 (RT102A) は、同様に *Oryza rufipogon* の K102 系統 (国立遺伝学研究所 系統番号 W1125) を 1 回母本にし、台中 65 号を 8 回の連続戻し交配を行って育成された系統で、花粉はデンプンの蓄積するものと蓄積しないものが混在して見られたが、いずれも受精能力がない。また、その育成過程において、RT102A と同じ細胞質をもつが、K102 に由来する稔性回復遺伝子をもつために稔性が回復する稔性回復系統 RT102C が育成されている (非特許文献 4)。しかしながら、RT98 型細胞質雄性不稔性および RT102 型細胞質雄性不稔性の原因となるミトコンドリア遺伝子は報告されていない。ハイブリッド品種育成に利用するために、これらの RT 型細胞質雄性不稔性の原因となるミトコンドリア遺伝子を同定し、クローニ

ングすることが望まれている。

先行技術文献

非特許文献

非特許文献 1 Li S, Yang D, Zhu Y (2007) Characterization and use of male sterility in hybrid rice breeding. *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 791-804

非特許文献 2 Bentolila S, Stefanov S. (2012) A reevaluation of rice mitochondrial evolution based on the complete sequence of male-fertile and male-sterile mitochondrial genomes. *Plant Physiol.* 158:996-1017.

非特許文献 3 本村恵二・石嶺行男・村山盛一・比嘉照夫・呉屋 昭・友寄哲夫 (2001) イネ台中 65 号の核置換系統 RT98C における雄性不稔および稔性回復の遺伝. *熱帯農業* 45:202-208

非特許文献 4 Motomura K, Moromizato Z, Adaniya S (2003) Inheritance of cytoplasmic male sterility and restoration of fertility in rice line, RT102C, derived from *Oryza rufipogon*. *Japanese Journal of Tropical Agriculture* 47: 70-76

発明の概要

従って、本発明の課題は、三系法でイネ RT 型細胞質雄性不稔性を利用するために、イネ RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子を同定し、これを DNA マーカーとして RT 型雄性不稔細胞質を保有するイネ不稔系統を判別する手段を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく、RT 型細胞質雄性不稔イネ系統から抽出したミトコンドリアゲノムの全塩基配列を決定し、それを既に報告されている正常型細胞質である「日本晴」のミトコンドリアゲノムと比較調査して該 RT 型細胞質雄性不稔イネ系統に固有のオープンリーディングフレーム (ORF) を同定するとともに、その中から、既報のミトコンドリア遺伝子とキメラ構造をなすこと及び/又は翻訳産物が膜貫通領域を持つことを指標として RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の候補遺伝子を選抜した。さらに、この候補遺伝子の塩基配列をもとに

設計したプライマーを用いて、正常可稔イネ系統および細胞雄性不稔イネ系統(RT型、WA型)より抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCR法により増幅した結果、RT型細胞質雄性不稔イネ系統のミトコンドリアDNAでのみ増幅断片が検出されることを確認し、RT型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子を同定することに成功した。本発明はかかる知見により完成されたものである。

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

[1] 以下の(a)～(c)のいずれかに示すDNAを含むイネRT型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子。

(a) 配列番号1または3に示す塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1または3に示す塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイネRT型細胞質雄性不稔性に関与するDNA

(c) 配列番号1または3に示す塩基配列に対して80%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつイネRT型細胞質雄性不稔性に関与するDNA

[2] 以下の(d)～(f)のいずれかに示すタンパク質をコードするイネRT型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子。

(d) 配列番号2または4に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号2または4に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイネRT型細胞質雄性不稔性に関与するタンパク質

(f) 配列番号2または4に示すアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつイネRT型細胞質雄性不稔性に関与するタンパク質

[3] 被検イネにおける[1]または[2]に記載の遺伝子の存在を検出することを特徴とする、RT型雄性不稔細胞質を有するイネ系統の判別方法。

[4] [1]または[2]に記載の遺伝子の存在の検出が、配列番号1もしくは配列番号3に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列を含むDNA領域を検出することにより行われる、[3]に記載の方法。

[5] 検出が、PCR法またはハイブリダイゼーション法により行われる、[3]また

は[4]に記載の方法。

[6] [3]～[5]のいずれかに記載の方法により判別された RT 型雄性不稔細胞質を有するイネ系統を受粉系統とし、該細胞質雄性不稔に対して花粉稔性を回復する稔性回復遺伝子を保有または導入したイネ系統を授粉系統として交配することを特徴とするイネハイブリッド種子の生産方法。

[7] 配列番号 1 もしくは配列番号 3 に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列を増幅するための、少なくとも 15 塩基以上の長さのオリゴヌクレオチドから構成される、RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子増幅用プライマーセット。

[8] 以下の (A) または (B) のプライマーセットである、[7]に記載のプライマーセット。

(A) 配列番号 5 に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドと配列番号 6 に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとから構成される、RT98 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子増幅用プライマーセット

(B) 配列番号 7 に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドと配列番号 8 に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとから構成される、RT102 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子増幅用プライマーセット

[9] 配列番号 1 もしくは配列番号 3 に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列にハイブリダイズし、[1]に記載の遺伝子を検出するための少なくとも 15 塩基以上の長さのオリゴヌクレオチドからなるプローブ。

[10] [7]または[8]に記載のプライマーセット、および/または、[9]に記載のプローブを含む、RT 型雄性不稔細胞質を有するイネ系統の判別用キット。

本発明によれば、イネ RT 型 (RT98 型および RT102 型) 細胞質雄性不稔性の原因となるミトコンドリア遺伝子が同定された。このイネ RT 型細胞質雄性不稔性原因遺伝子を DNA マーカーとすることにより RT 型雄性不稔細胞質を保有するイネ系統を迅速かつ効率的に判別できる。よって、本発明は、RT 型細胞質雄性不稔性を利用する三系法によるイネハイブリッド品種育成の基盤となる雄性不稔系統の確立と高純度の雄性不稔系統種子の生産に有用である。

824の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1(A)は、RT98型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子(orf113_RT98)の構造、ならびにプローブとPCRプライマーの位置を示す。図1(B)は、TMHMM解析によるORF113_RT98から予測されるタンパク質の膜貫通領域を示す。

図2(A)は、RT102型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子(orf352_RT102)のキメラ構造、ならびにプローブとPCRプライマーの位置を示す。図2(B)は、TMHMM解析によるORF352_RT102から予測されるタンパク質の膜貫通領域を示す。

図3は、RT98型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の候補として選抜したorfのRT98型細胞質雄性不稔系統(RT98A)およびRT98型細胞質雄性不稔回復系統(RT98C)における発現のノーザンブロット解析結果を示す(A: RT98A(稔性回復遺伝子なし)、C: RT98C(稔性回復遺伝子あり)、T: 台中65号)。

図4は、各イネ系統のゲノムDNAに対するRT98型細胞質雄性不稔検出用プライマーセットによるPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動写真を示す(RT98A: RT98型細胞質雄性不稔系統、T65: 台中65号、BTA: BT型細胞質雄性不稔系統、CWA: CW型細胞質雄性不稔系統、LDA: Lead Rice細胞質雄性不稔系統、WAA: WA型細胞質雄性不稔系統)。

図5は、日本晴ミトコンドリアゲノム配列における機能既知の遺伝子(atp1、atp6、cox3、orfB)および既報の機能未知のorf(orf165、orf284、orf288)のRT102型細胞質雄性不稔系統(RT102A)およびRT102型細胞質雄性不稔回復系統(RT102C)における発現のノーザンブロット解析結果を示す(1: RT102C、2: RT102A)。

図6は、orf352_RT102の特異的領域に設定したプローブのRT102型細胞質雄性不稔系統(RT102A)およびRT102型細胞質雄性不稔回復系統(RT102C)における発現のノーザンブロット解析結果を示す。

図7は、各イネ系統のゲノムDNAに対するRT102型細胞質雄性不稔検出用プライマーセットによるPCR増幅産物のアガロースゲル電気泳動写真を示す(Nippobare: 日本晴、T65: Taichung 65、BTA: BT型細胞質雄性不稔系統、RT98C:

RT98 型雄性不稔細胞質を有する雄性不稔回復系統、RT102C: RT102 型雄性不稔細胞質を有する雄性不稔回復系統、WAA: WA 型細胞質雄性不稔系統)。

発明を実施するための形態

以下、本発明を詳細に説明する。

1. イネ RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子

本発明において同定されたイネ RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子は、イネ RT98 型細胞質雄性不稔性に関与する遺伝子およびイネ RT102 型細胞質雄性不稔性に関与する遺伝子を包含する。本発明の上記遺伝子は、稔性回復遺伝子の存在下で、雄性不稔細胞質ミトコンドリアに固有のオープンリーディングフレーム(orf)の転写産物が修飾を受け、転写または翻訳パターンが、稔性回復遺伝子の非存在下と比べて変化することにより特定されたオープンリーディング領域(orf)を含む遺伝子である。

イネ RT98 型細胞質雄性不稔性に関与する遺伝子(以下、「RT98 型 CMS 遺伝子」ともいう)は、RT98 型細胞質雄性不稔性を示すイネの細胞質に固有な配列番号 1 に示す塩基配列を有し、配列番号 1 に示す塩基配列のうち、第 202 番目から第 543 番目の塩基配列(配列番号 2 のアミノ酸配列をコードする部分)をオープンリーディングフレーム(orf113)として含み、-151 から+11 までの塩基配列が nad9 と完全に一致し、nad9 とキメラ構造になっていた(図 1)。また、イネ RT102 型細胞質雄性不稔性に関与する遺伝子(以下、「RT102 型 CMS 遺伝子」ともいう)は、イネ RT102 型細胞質雄性不稔性を示すイネの細胞質に固有な配列番号 3 に示す塩基配列を有し、配列番号 3 に示す塩基配列のうち、第 301 番目から第 1359 番目の塩基配列(配列番号 4 のアミノ酸配列をコードする部分)をオープンリーディングフレーム(orf352)として含み、既報の orf とはキメラ構造になっている(図 2)。

本発明の RT98 型 CMS 遺伝子または RT102 型 CMS 遺伝子は、イネ RT 型細胞質雄性不稔性に関与する機能を有する限り、配列番号 2 または 4 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であってもよい。

ここで、欠失、置換若しくは付加されてもよいアミノ酸の数としては、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異タンパク質作製法により欠失、置換、若しくは付加できる程度の数をいい、好ましくは、1個から数個である。例えば、配列番号2または4に示すアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号2または4に示すアミノ酸配列に1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号2または4に示すアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。また、ここにいう「変異」は、主には公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を意味するが、天然に存在する同様の変異であってもよい。

また、本発明の上記遺伝子には、配列番号2または4に示すアミノ酸配列に対して80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつイネ RT 型細胞質雄性不稔性に関与するタンパク質をコードする遺伝子も含まれる。上記80%以上の相同性は、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性をいう。配列の同一性は、FASTA 検索や BLAST 検索により決定することができる。

本発明に係る RT98 型 CMS 遺伝子または RT102 型 CMS 遺伝子は、配列番号1または3に示す塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつイネ RT 型細胞質雄性不稔性に関与するタンパク質をコードする DNA を含む遺伝子であってもよい。

ここで、ストリンジエントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。例えば、相同性が高い核酸、すなわち配列番号1または3に示す塩基配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列からなる DNA の相補鎖がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸の相補鎖がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム塩濃度が15～750mM、好ましくは50～750mM、より好ましくは300～750mM、温度が25～70℃、好ましくは50～70℃、より好ましくは55～65℃、ホルムアミド濃度が0～50%、好ましくは20～50%、より好ましくは35～45%での条件をいう。

さらに、ストリンジェントな条件では、ハイブリダイゼーション後のフィルターの洗浄条件が、通常はナトリウム塩濃度が 15~600mM、好ましくは 50~600mM、より好ましくは 300~600mM、温度が 50~70°C、好ましくは 55~70°C、より好ましくは 60~65°C である。例えば、本発明の上記 RT98 型 CMS 遺伝子の相同遺伝子としては、配列番号 4 6 に示す塩基配列を有し、配列番号 4 6 に示す塩基配列のうち、第 101 番目から第 544 番目の塩基配列（配列番号 4 8 の塩基配列；配列番号 4 7 に記載のアミノ酸配列をコードする部分）をオープンリーディングフレーム（orf147）とする遺伝子が挙げられる。

当業者であれば、Molecular Cloning (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning : a Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 10 Skyline Drive Plainview, NY (1989)) 等を参照することにより、こうしたホモログ遺伝子を容易に取得することができる。また、上記の配列の相同性は、同様に、FASTA 検索や BLAST 検索により決定することができる。

本発明の RT98 型 CMS 遺伝子または RT102 型 CMS 遺伝子は、それぞれの塩基配列の情報に基づいて設計したプライマーを用いて、RT98 型細胞質雄性不稔性のミトコンドリアを保有する RT98A または RT98C 系統、または RT102 型細胞質雄性不稔性のミトコンドリアを保有する RT102A または RT102C 系統の任意の細胞若しくは組織から調製したゲノム DNA ライブラリー等由来の核酸を鋳型とした PCR 増幅を行うことにより、核酸断片として得ることができる。また RT98 型 CMS 遺伝子または RT102 型 CMS 遺伝子は、上記ライブラリー等由来の核酸を鋳型とし、当該 RT98 型 CMS 遺伝子または RT102 型 CMS 遺伝子の一部である DNA 断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸断片として得ることができる。あるいは RT98 型 CMS 遺伝子または RT102 型 CMS 遺伝子は、化学合成法等の当技術分野で公知の各種の核酸配列合成法によって、核酸断片として合成してもよい。

2. RT 型細胞質雄性不稔イネ系統の判別方法

本発明の RT 型細胞質雄性不稔イネ系統の判別は、被検イネにおける前記 RT98 型 CMS 遺伝子（配列番号 1）または RT102 型 CMS 遺伝子（配列番号 3）の存在を検出することにより行なう。上記遺伝子は、具体的には、それぞれの塩基配列である配列番号 1 もしくは配列番号 3 に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分

配列を含む DNA 領域を検出することにより行われる。

RT98 型 CMS 遺伝子および RT102 型 CMS 遺伝子（以下、これらを総称して「RT 型 CMS 遺伝子」ともいう）の検出は、PCR 法またはハイブリダイゼーション法のいずれによっても行なうことができるが、被検イネより抽出したゲノム DNA を鋳型とし、上記 DNA 領域を増幅できるプライマーを用いた PCR 法により行なうことが好ましい。PCR 法により増幅された増幅ゲノム DNA を電気泳動にて分離後、増幅ゲノム DNA の視覚的な検出を行うことにより、RT 型雄性不稔細胞質を有するイネ系統を判別することができる。

本発明の判別方法で用いられる被検イネのゲノム DNA は、たとえば、最新農学実験の基礎、東北大学農学部農学科編、1990 東京・（株）ソフトサイエンス社発行および植物細胞工学別冊 植物の PCR 実験プロトコール、島本功、佐々木卓治監修、1995 東京・（株）秀潤社発行等に記載される通常の植物のゲノム DNA 抽出方法によって調製することができる。具体的には、被検イネの任意の一部（例えば、種子、葉、茎等）を材料とし、必要に応じて液体窒素中で磨砕し、該磨砕物に臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)溶液を添加してインキュベート後、クロロホルム-イソアミルアルコールを加えてよく混和し、遠心分離により水層を分離・回収し、これにイソプロピルアルコールを加えて混和する。次に、遠心分離により沈殿を回収後、たとえば EDTA 等含有の緩衝液を加えて溶解し、RNase 処理する。処理後、フェノール、フェノールとクロロホルム-イソアミルアルコール、クロロホルム-イソアミルアルコールの順序で溶媒を置換する。置換処理後、エタノールを加えてよく混和し、遠心分離によりゲノム DNA を得る。また、イネのゲノム DNA としてミトコンドリアゲノム DNA を利用する場合には、たとえば、次の方法でミトコンドリア DNA を調製することができる。まず、被検イネの培養細胞由来のプロトプラストを緩衝液中で細胞膜破壊を行ない、該破壊物を遠心分離によりミトコンドリア画分を回収し、これに DNase を処理することにより混在ゲノム DNA を除去する。次に、精製ミトコンドリア画分をプロテイナーゼ処理してミトコンドリア膜を消化した後、フェノールとクロロホルムで抽出を行い、得られたミトコンドリア DNA と RNA の混和物に RNase を処理し、処理後、再びフェノールとクロロホルムで抽出を行うことによりミトコンドリア DNA を得る。

RT 型 CMS 遺伝子の検出を PCR 法で行う場合、用いるプライマーは、配列番号 1 もしくは配列番号 3 に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列を増幅するようなオリゴヌクレオチドであれば特に限定されない。プライマーの設計手法は当技術分野で周知であり、本発明において使用可能なプライマーは、特異的なアニーリングが可能な条件を満たす、例えば特異的なアニーリングが可能な長さ及び塩基組成（融解温度）を有するように設計される。例えば、プライマーとしての機能を有する長さとしては、少なくとも 15 塩基以上が好ましく、より好ましくは 20～30 塩基である。また設計の際には、プライマーの融解温度（ T_m ）を確認することが好ましい。 T_m とは、任意の核酸鎖の 50%がその相補鎖とハイブリッドを形成する温度を意味し、鑄型となる DNA とプライマーとが二本鎖を形成してアニーリングするためには、アニーリングの温度を最適化する必要がある。一方、この温度を下げすぎると非特異的な反応が起こるため、温度は可能な限り高いことが望ましい。 T_m の確認には、公知のプライマー設計用ソフトウェアを利用することができる。

具体的には、RT98 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子を増幅する場合のプライマーの例としては、限定するものでないが、配列番号 1 に示す塩基配列の翻訳開始コドンより 176 塩基上流に存在する配列番号 5 に示す塩基配列からなるプライマー、および配列番号 1 に示す塩基配列の翻訳停止コドンより 77 塩基下流に存在する配列番号 6 に示す塩基配列からなるプライマーが挙げられる。

orf113 プライマー F1:5' -GATGGGACGCTCCAGTGTAT-3' (配列番号 5)

orf113 プライマー R1:5' -TTTTCCAACGAAAAACGAA-3' (配列番号 6)

また、RT102 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子を増幅する場合のプライマーの例としてとしては、限定するものでないが、配列番号 3 に示す塩基配列の翻訳開始コドンより 228 塩基上流に存在する配列番号 7 に示す塩基配列からなるプライマー、および配列番号 3 に示す塩基配列の翻訳停止コドンより 241 塩基下流に存在する配列番号 8 に示す塩基配列からなるプライマーが挙げられる。

orf352 プライマー F2:5' - GATTCCTATTGGTGCGGAAA-3' (配列番号 7)

orf352 プライマー R2:5' - CATGCACCTTTGTTGGATG-3' (配列番号 8)

上記プライマーの各オリゴヌクレオチドは、配列番号5～8に示す塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと実質的に同一の機能を有する限り、配列番号5～8に示す塩基配列において1～数個（例えば、5個、好ましくは3個、より好ましくは1個）の塩基が欠失、付加、置換した塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであってもよい。

上記プライマーの各オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの合成法として当技術分野で公知の方法、例えば、ホスホトリエチル法、ホスホジエステル法等により、通常用いられる市販のDNA自動合成装置を利用して合成することが可能である。

また、上記オリゴヌクレオチドは、これらをプライマーとするPCR増幅産物の検出を容易にするために、標識物質をつけたオリゴヌクレオチドであってもよい。標識物質としては、当該技術分野においてよく知られる蛍光物質(FITC、ROC等)、放射性同位体、化学発光物質（例えば、DNP）、ビオチン、DIG（ジゴキシゲニン）等を用いることができる。

PCR法によるDNA増幅は上記のプライマーを用いる以外は特に制限はなく、常法に従って行えばよい。具体的には、鋳型DNAの変性、プライマーへの鋳型へのアニーリング、および耐熱性酵素（Taqポリメラーゼ）を用いたプライマーの伸長反応を含むサイクルを20から40回、好ましくは25～30回繰り返すことにより、目的とする遺伝子の特定の領域（配列番号1もしくは配列番号3に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列を含むDNA領域）を増幅させる。PCR反応液の組成、PCR反応条件（温度サイクル、サイクルの回数等）は、設計されたプライマーセットを用いたPCRにおいて高感度でPCR増幅産物が得られるような条件を予備実験等により当業者であれば適切に選択および設定することができる。プライマーの T_m に基づいて適当なPCR反応条件を選択する方法は、当該技術分野においてよく知られており、例えば、最初に96℃で2分間の変性反応、次に96℃で30秒間、64℃で1分間、72℃で1.5分間を1サイクルとして30サイクル、最後に72℃で7分間の伸長反応により実施することができる。PCR反応液の組成、反応温度や時間は、プライマーとなるオリゴヌクレオチド配列の長さや塩基組成などに応じて適宜設定することができる。このようなPCRの一連の操作は、市販の

PCR キットや PCR 装置を利用して、その操作説明書に従って行うことができる。PCR 装置は、例えば、サーマルサイクラー TP600 (Takara 社製)、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社製)などが使用できる。

PCR 増幅産物の検出は、アガロースゲル電気泳動やキャピラリー電気泳動などの慣用の電気泳動等の方法を用いて行う。例えば、アガロースゲル電気泳動では、臭化エチジウム、SYBR Green 液等により染色し、そして増幅産物を単一のバンドとして検出する。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いて当該 PCR を行い、増幅産物を検出することもできる。

また、RT 型 CMS 遺伝子の検出をハイブリダイゼーション法で行う場合、用いるプローブとしては、RT 型 CMS 遺伝子の塩基配列の連続する部分配列からなるポリ (オリゴ)ヌクレオチド、あるいは、RT 型 CMS 遺伝子の塩基配列に対する相補配列の連続する部分配列からなるポリ (オリゴ)ヌクレオチド断片が用いられる。プローブの長さは特に限定されないが、例えば 15 塩基以上、好ましくは 20 塩基以上であれば目的とする遺伝子の間で特異的なハイブリッドを形成できる。上記ヌクレオチド断片は、例えば、各塩基配列を有するポリヌクレオチドを適当な制限酵素で切断するか、あるいは、周知の化学合成技術により、in vitro において合成することができる。また、前記の RT 型 CMS 遺伝子を特異的に増幅させるプライマーとして利用可能なオリゴヌクレオチドは、当該遺伝子を特異的に検出するためのプローブとしても使用可能であることは当業者にとって周知であるため、この知見を元にプローブとして利用可能なオリゴヌクレオチドを設計すればよい。

上記ヌクレオチド断片をプローブとして使用する場合、標識物質により標識化する。標識物質は、特に限定はされないが、例えば、蛍光物質、放射性同位体、酵素、アビジン若しくはビオチンなどを用いることができる。蛍光物質としては、フルオレッセンスイソチオシアネート (FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRIC)、シアニン色素 (例えば、Cy Dye™ シリーズの Cy3、Cy5 等)、アセチルアミノフルオレン (AFF)などが挙げられ、酵素としては、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼなどが挙げられ、放射性同位体としては、 ^{125}I や ^3H などが挙げられる。

上記のプローブとして用いるポリ (オリゴ)ヌクレオチド断片は、前記 RT 型

CMS 遺伝子とストリンジेंटな条件下でハイブリダイゼーションすることの特徴とする。ここで、ストリンジेंटな条件とは、前記遺伝子とポリ（オリゴ）ヌクレオチド断片との選択的かつ検出可能な特異的結合を可能とする条件である。ストリンジेंट条件は、塩濃度、有機溶媒（例えば、ホルムアミド）、温度、及びその他公知の条件によって定義される。ストリンジエンシーは、塩濃度を減じるか、有機溶媒濃度を増加させるか、又はハイブリダイゼーション温度を上昇させるかによって増加する。例えば、ストリンジेंटな塩濃度は、通常、NaCl 約 750 mM 以下及びクエン酸三ナトリウム約 75mM 以下、より好ましくは NaCl 約 500 mM 以下及びクエン酸三ナトリウム約 50 mM 以下、最も好ましくは NaCl 約 250 mM 以下及びクエン酸三ナトリウム約 25 mM 以下である。ストリンジेंटな有機溶媒濃度は、ホルムアミド約 35%以上、好ましくは約 50%以上である。ストリンジेंटな温度条件は、約 30°C 以上、好ましくは約 37°C 以上、より好ましくは約 42°C 以上である。その他の条件としては、ハイブリダイゼーション時間、洗浄剤（例えば、SDS）の濃度、及びキャリアーDNA の存否等であり、これらの条件を組み合わせることによって、様々なストリンジエンシーを設定することができる。

また、プローブはマイクロアレイなどの固定化担体に固定化して用いてもよい。マイクロアレイの形成方法は特に限定されず、当業者が利用可能ないかなる方法を用いてもよく、例えば、固相担体表面で直接プローブを合成する方法（オン・チップ法）、又は予め調製したプローブを固相担体表面に結合する方法などがある。固相担体表面で直接プローブを合成する場合には、光照射で選択的に除去される保護基を用い、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィー技術及び固相合成技術を組み合わせて所定の微少なマトリックス領域でのオリゴヌクレオチドの選択的な合成を行う方法が一般的である。一方、予めプローブを調製して固相担体表面に結合する方法では、プローブ核酸の種類や固相担体の種類に応じて、スポット装置によりポリ陽イオン化合物やアミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤などで表面処理した固相担体の表面に点着する方法、反応活性基を導入したプローブ核酸を合成し、予め反応性基を形成させるように表面処理した固相担体表面に該プローブ核酸を点着して該プローブ核酸を固相担体表面に共有結合により結合固定させる方法などが利用できる。

本発明の方法に用いる上記RT型CMS遺伝子を検出するための試薬や器具を予め組み合わせてキット化することもできる。例えば、キットには、前記のプライマーセット、および/またはプローブとして用いるポリ(オリゴ)ヌクレオチドを少なくとも含んでいればよい。また、該キットには、必要に応じて、ゲノムDNA抽出用試薬、PCR用緩衝液やDNAポリメラーゼ等のPCR用試薬、染色剤や電気泳動用ゲル等の検出用試薬、ハイブリダイゼーション用緩衝液、洗浄バッファー、マイクロプレート、ナイロンメンブレン、標識物質、陽性や陰性の標準試料などを含んでもよい。キットの使用方法を記載した指示書等を含めることもできる。なお、キット中の試薬は溶液でも凍結乾燥物でもよい。

以下、実施例によって本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものでない。

(実施例1) RT98型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の同定

RT98型細胞質雄性不稔性のミトコンドリアを保有するRT98Cの種子由来カルスからミトコンドリアを精製し、ミトコンドリアゲノムDNAを抽出した。ミトコンドリアゲノムDNAの全塩基配列を次世代型シーケンサー(GS-FLXシステム、8 kb ペアエンド解析法)により決定し、525,913 bpのマスターサークルを明らかにした。

決定した塩基配列を6通りの読み枠で翻訳した結果を表示するゲノムビューアArtemisを用いてorfの検索を行った。RT98型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の候補を探索するため、日本晴(accession no. DQ167400)に見られない新規orfを調査した。まず、アミノ酸を70個以上コードするorfについて調査したところ、RT98型に特異的なorfを27個見出した(表1)。次に、既知の遺伝子とキメラ構造をなすこと、または、膜貫通領域を持つこと(TMHMM解析)について調査し、いずれかの条件を満たすorf340(配列番号9)、orf276(配列番号10)、orf210(配列番号11)、orf174(配列番号12)、orf113(配列番号13)、orf83a(配列番号14)をRT98型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の候補として選抜した。

表 1

RT98 に特異的な orf

Position*	Contig name	ORF	Trans-membrane domain	Chimeric	BlastN
4679:5701 forward	20	orf340	1	yes	28~1008 88% identical to Zea Mt (orf131a+orf138b)
112764:113594 reverse	16&390&273	orf276	2	yes	275~831 96% identical to NP (orf224+orf288)
250266:250898 forward	390&40	orf210	0	yes	327~569 95% identical to NP (orf224+CW-orf307)
405194:405718 forward	29	orf174	1	no	317~522 99% identical to chr 6
408933:409418 reverse	29	orf161	0	no	1~388 100% identical to NP, PA64S, 93-11 (tRNA-Cys)
264626:264967 forward	33	orf113	1	yes	98~432 93% identical to NP (Co-transcription of orf25 and cox3)
101409:101840 reverse	15	orf143	0	no	1~97 100% identical to chr 2
169876:170262 forward	37	orf128	0	no	1~387 100% identical to LD-CMS, CW-CMS
262401:262763 forward	40	orf120	0	no	1~363 100% identical to chr 1
401879:402238 forward	29	orf119	0	no	78~360 100% identical to chr 12
6225:6581 forward	20	orf118	0	no	No hits found
108543:108890 reverse	16	orf115	0	no	1~348 100% identical to LD-CMS
103009:103335 forward	15	orf108	0	no	141~241 100% identical to chr 12
403137:403457 forward	29	orf106	0	no	1~321 100% identical to chr 12
3678:3968 forward	20	orf96	0	no	229~265 94% identical to Boea Mt
403788:404063 forward	29	orf91	0	no	1~276 100% identical to chr 12
171266:171532 reverse	37	orf88	0	no	1~257 100% identical to LD-CMS, CW-CMS, NP chr 12
401898:402158 reverse	29	orf86	0	no	1~208 100% identical to chr 12
5885:6136 reverse	20	orf83a	1	no	139~252 92% identical to Sorghum Mt

170584:170835 reverse	37	orf83b	0	no	1~252 100% identical to LD-CMS, CW-CMS, NP chr 12
9132:9371 reverse	20	orf79	0	no	No hits found
408544:408780 reverse	29	orf78a	0	no	1~233 100% identical to chr 12
8414:8650 reverse	20	orf78b	0	no	No hits found
113040:113270 forward	16	orf76	0	no	1~231 96% identical to LD-CMS, NP, 93-11, PA64S
405130:405348 forward	29	orf72	0	no	148~208 100% identical to chr 11
264164:264379 reverse	32	orf71	0	no	1~216 100% identical to chr 1
262457:262669 reverse	40	orf70	0	no	1~213 100% identical to chr 1

*Position は RT98 ミトコンドリア全塩基配列に対応

選抜した orf340、orf276、orf210、orf174、orf113、orf83a について、稔性回復遺伝子の有無によって、転写産物の修飾が異なる orf を同定するため、稔性回復遺伝子を保持しない細胞質雄性不稔系統 RT98A における発現と稔性回復遺伝子を保持する稔性回復系統 RT98C における発現をノーザンブロット解析により比較した。

各 orf のノーザンブロット解析に用いるプローブは下記表 2 に示すプライマーを用いて作製した。

表 2

ノーザンブロット解析に用いたプローブ作製のためのプライマー

Genes	Forward sequence	Reverse sequence
orf340	ATGAGAATCGATTTAGTCCG (配列番号 1 5)	CTAGTTCTGATATAGACCAA (配列番号 1 6)
orf276	ATGCTGCGCTTCGAACGTAT (配列番号 1 7)	CTAGGAGGCTGAGTTTGTAT (配列番号 1 8)
orf210	ATGGAGAACCCACCAGGGCC (配列番号 1 9)	TTAGTACTTATTTATTTTCT (配列番号 2 0)
orf174	ATGAAAGAATTCGTTTACTT (配列番号 2 1)	TTAGTTTTTTCCTAATTGCG (配列番号 2 2)
orf113	GATGGGACGCTCCAGTGTAT (配列番号 2 3)	TTTCCCAACGAAAAACGAA (配列番号 2 4)
orf83a	ATGGTGTGGACGCCCTAGC (配列番号 2 5)	TTAAATGAGAAGACTGGATG (配列番号 2 6)

ノーザンブロット解析では、orf113 は細胞質雄性不稔系統 RT98A と稔性回復系

統 RT98C における発現にバンドパターンに差が見られ、稔性回復遺伝子の存在下で転写産物が修飾されることを示したのに対し、他の orf は RT98A と RT98C における発現に差が見られなかった (図 3)。これらの結果より、orf113 は直接細胞質雄性不稔性に関与していること、すなわち、RT98 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子であることが明らかとなった。orf113 は、配列番号 1 に示す塩基配列を有し、既報のイネミトコンドリアゲノムには存在しなかった。

(実施例 2) 各イネ系統のゲノム DNA における orf113 の検出

orf113 の塩基配列の上流側および下流側の塩基配列より設計した下記の特異的プライマーを用い、複数のイネ系統のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った。

その結果、orf113 は RT98 型細胞質雄性不稔性のみで増幅が見られた (図 4)。

orf113 プライマー F1 : 5' -GATGGGACGCTCCAGTGTAT-3' (配列番号 5) (orf113 の ATG 開始コドンから 176 nt 上流)

orf113 プライマー R1 : 5' -TTTTCCCAACGAAAAACGAA-3' (配列番号 6) (orf113 の停止コドンから 77 nt 下流)

(実施例 3) RT102 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の同定

RT102 型細胞質雄性不稔性のミトコンドリアを保有する RT102C の種子由来カルスからミトコンドリアを精製し、ミトコンドリアゲノム DNA を抽出した。ミトコンドリアゲノム DNA の全塩基配列を次世代型シーケンサー (GS-FLX システム、8 kb ペアエンド解析法) により決定し、502,250 bp のマスターサークルを明らかにした。

決定した塩基配列を 6 通りの読み枠で翻訳した結果を表示するゲノムビューア Artemis を用いて、orf の検索を行った。細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の候補を探索するため、日本晴 (accession no. DQ167400) に見られない新規 orf を調査した。まず、アミノ酸を 70 個以上コードする orf について調査したところ、RT102 型に特異的な orf を 27 個見出した (表 3)。次に、既知の遺伝子とキメラ構造をなすこと、または、膜貫通領域を持つこと (TMHMM 解析) について調査し、いずれかの条件を満たす orf352 (配列番号 27)、orf133 (配列番号 28)、orf117 (配列番号 29)、orf110 (配列番号 30)、orf98 (配列番号 31) を細胞質雄性不稔性の原因遺伝子の候補として選抜した。なお、orf114 は上記条件を満たすが、イ

ンディカ品種 93-11 のミトコンドリアゲノム(accession no. DQ167399)と 100%一致したため候補から除外した。

表 3

RT102 に特異的な orf

Position*	Contig name	ORF	Trans-membrane domain	chimeric	BlastN
280968:284123 forward	35	orf1051	0	no	996~1117 partially similar to <i>Tripsacum dactyloides</i> mt
277276:280407 forward	35	orf1043	0	no	Partially similar to <i>Cucumis melo</i> subsp. <i>melo</i> mitochondrial sequence.
267924:268982 reverse	4&2	orf352	3	yes	503~1059 partially identical to NP (orf288)
351355:351840 reverse	216	orf161	0	no	1~388 100% identical to NP
249164:249619 forward	32&177	orf151	0	no	1~456 100% identical to CW-CMS&PA64S
284118:284555 reverse	35&177	orf145	0	no	1~180 100% identical to NP, PA64S, 93-11
163052:163483 reverse	223	orf143	0	no	1~97 100% identical to chr 2
268928:269329 forward	2&35	orf133	0	yes	1~327 100 identical to NP (orf165)
196706:197092 forward	30	orf128	0	no	1~387 100% identical to LD-CMS&CW-CMS
382276:382638 forward	218	orf120	0	no	1~363 100% identical to chr 1
123728:124087 reverse	221	orf119	0	no	73~360 100% identical to chr 12
284344:284697 forward	35&177	orf117	1	no	33~354 100% identical to NP, PA64S, 93-11
16459:16803 reverse	225	orf114	1	no	1~345 100% identical to 93-11_mt
277144:277476 reverse	35	orf110	2	no	200~333 99% identical to NP, PA64S, 93-11
164652:164978 forward	223	orf108	0	no	141~241 99% identical to chr 12
122509:122829 reverse	221	orf106	0	no	1~321 100% identical to chr 12
169864:170169 forward	223	orf101	0	no	No hit found
282636:282932 reverse	35	orf98	1	no	limited similarity to <i>Vitis vitis</i> , in orf1051
121903:122178 reverse	221	orf91	0	no	1~276 100% identical to chr 12
198096:198362 reverse	30	orf88	0	no	1~267 100% identical to LD-CMS&CW-CMS
123808:124068 forward	221	orf86	0	no	1~208 100% identical to chr 12
197414:197665 reverse	30	orf83	0	no	1~252 100% identical to LD-CMS&CW-CMS

350966:351202 reverse	216	orf78	0	no	1~233 99% identical to chr 12
268200:268430 forward	4	orf76	0	no	1~231 almost identical to LD-CMS
283235:283453 reverse	35	orf72	0	no	No hit found, in orf1051
384039:384254 reverse	218	orf71	0	no	1~216 100% identical to chr 1
382332:382544 reverse	218	orf70	0	no	1~213 100% identical to chr 1

*Position は RT102 ミトコンドリア全塩基配列に対応

既報の日本晴ミトコンドリアゲノム配列における機能既知の遺伝子(atp1、atp6、cox3、orfB)および既報の機能未知の orf(orf165、orf284、orf288)について、稔性回復遺伝子の有無によって、転写産物の修飾が異なる orf を同定するため、稔性回復遺伝子を保持しない細胞質雄性不稔系統 RT102A における発現と稔性回復遺伝子を保持する稔性回復系統 RT102C における発現をノーザンブロット解析により比較した。

各遺伝子のノーザンブロット解析に用いるプローブは下記表 4 に示すプライマーを用いて作製した。

表 4

ノーザンブロット解析に用いたプローブ作製のためのプライマー

Probe	Forward sequence	Reverse sequence
atp1	ACAGAGCTCTTTTATCGCGG (配列番号 3 2)	TCCCCTTTTTCGTTGAAGG (配列番号 3 3)
atp6	AGGGTATGATACCCTTAGC (配列番号 3 4)	GAGATCGTAGAAACATGAGC (配列番号 3 5)
cox3	TGGGGTTTTAGATCCTTGGG (配列番号 3 6)	ACCTCCCCACCAATAGATAG (配列番号 3 7)
orfB	CTTCTGGTTATGCCTTTTCC (配列番号 3 8)	AGATTATGCTTCCTTGCCCG (配列番号 3 9)
orf165	CTCGATGAAACCTCTACTTC (配列番号 4 0)	TCAGCTGGTTAGAGCAAAGG (配列番号 4 1)
orf284	CTATCTGAGCCTTTACGAGC (配列番号 4 2)	GGAATTCGGTTCTTTTCGAGC (配列番号 4 3)
orf288	ATGCAGGAAGCTGCTAATCG (配列番号 4 4)	AGGAAGCGGAGTTTTGATCC (配列番号 4 5)

その結果、orf288 をプローブとしたときのみ、転写産物の大きさに差が見られた (図 5)。orf288 そのものの遺伝子は RT102 のゲノム上に存在せず、前記候補遺伝子のうち、orf352 は既知の配列 orf288 の一部を含むキメラ構造になってい

たため（図2）、orf352についてRT102AとRT102Cにおける発現をノーザンブロット解析により比較した。

orf352のノーザンブロット解析に用いる特異的なプローブを図2に示す領域に設計し、プローブは配列番号44と配列番号45に示すプライマーを用いて作製した。

その結果、orf352のバンドパターンに差が見られた（図6）。これらの結果より、orf352は直接細胞質雄性不稔性に関与していること、すなわち、RT102型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子であることが明らかとなった。orf352は、配列番号4に示すアミノ酸配列を有する。

（実施例4）各イネ系統のゲノムDNAにおけるorf352の検出

orf352の塩基配列の上流側および下流側の塩基配列より設計した下記の特異的プライマーを用い、複数のイネ系統のゲノムDNAを鋳型にしてPCRを行ったところ、orf352はRT102型細胞質雄性不稔系統のみで増幅が見られた（図7）。

orf352プライマーF2：5' - GATTCCTATTGGTGCAGAAA-3'（orf352のATG開始コドンから228bp上流）（配列番号7）

orf352プライマーR2：5' - CATGCACCTTTGTTTGGATG-3'（orf352の停止コドンから241bp下流）（配列番号8）

産業上の利用可能性

本発明は、イネRT型細胞質雄性不稔性を用いた三系法によるハイブリッド品種の育成分野において利用できる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. 以下の(a)～(c)のいずれかに示す DNA を含むイネ RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子。

(a) 配列番号 1 または 3 に示す塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 1 または 3 に示す塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつイネ RT 型細胞質雄性不稔性に関与する DNA

(c) 配列番号 1 または 3 に示す塩基配列に対して 80%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつイネ RT 型細胞質雄性不稔性に関与する DNA

2. 以下の(d)～(f)のいずれかに示すタンパク質をコードするイネ RT 型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子。

(d) 配列番号 2 または 4 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(e) 配列番号 2 または 4 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイネ RT 型細胞質雄性不稔性に関与するタンパク質

(f) 配列番号 2 または 4 に示すアミノ酸配列に対して 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつイネ RT 型細胞質雄性不稔性に関与するタンパク質

3. 被検イネにおける請求項 1 または 2 に記載の遺伝子の存在を検出することを特徴とする、RT 型雄性不稔細胞質を有するイネ系統の判別方法。

4. 請求項 1 または 2 に記載の遺伝子の存在の検出が、配列番号 1 もしくは配列番号 3 に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列を含む DNA 領域を検出することにより行われる、請求項 3 に記載の方法。

5. 検出が、PCR 法またはハイブリダイゼーション法により行われる、請求項 3 または 4 に記載の方法。

6. 請求項 3～5 のいずれかに記載の方法により判別された RT 型雄性不稔細胞質を有するイネ系統を受粉系統とし、該細胞質雄性不稔に対して花粉稔性を回

復する稔性回復遺伝子を保有または導入したイネ系統を授粉系統として交配することを特徴とするイネハイブリッド種子の生産方法。

7. 配列番号1もしくは配列番号3に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列を増幅するための、少なくとも15塩基以上の長さのオリゴヌクレオチドから構成される、RT型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子増幅用プライマーセット。

8. 以下の(A)または(B)のプライマーセットである、請求項7に記載のプライマーセット。

(A)配列番号5に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドと配列番号6に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとから構成される、RT98型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子増幅用プライマーセット

(B)配列番号7に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドと配列番号8に示す塩基配列を含むオリゴヌクレオチドとから構成される、RT102型細胞質雄性不稔性の原因遺伝子増幅用プライマーセット

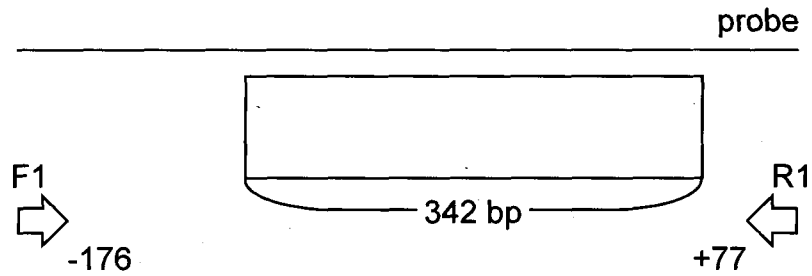
9. 配列番号1もしくは配列番号3に記載の塩基配列、または該塩基配列の部分配列にハイブリダイズし、請求項1に記載の遺伝子を検出するための少なくとも15塩基以上の長さのオリゴヌクレオチドからなるプローブ。

10. 請求項7または8に記載のプライマーセット、および/または、請求項9に記載のプローブを含む、RT型雄性不稔細胞質を有するイネ系統の判別用キット。

図 1

(A)

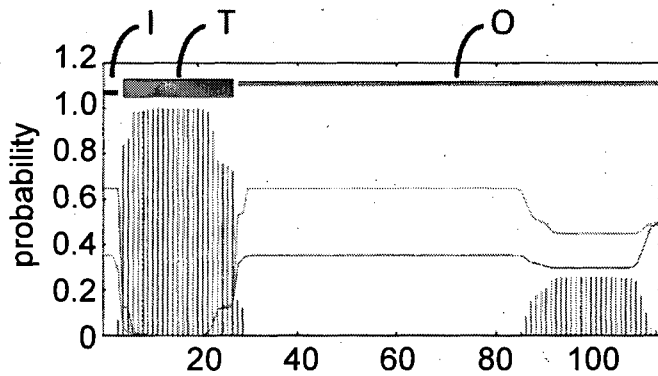
orf113_RT98の構造



(B)

ORF113_RT98の膜貫通領域

TMHMM posterior probabilities for Sequence

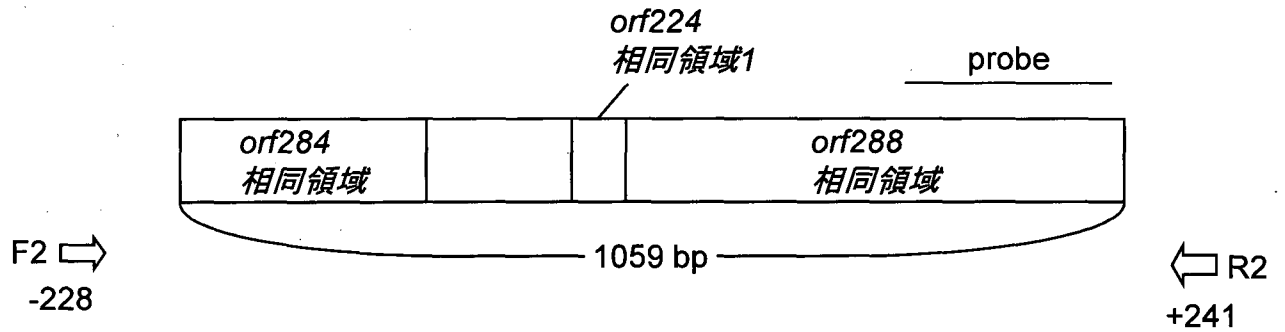


T: Transmembrane — I: Inside — O: Outside —

図 2

(A)

orf352_RT102のキメラ構造



(B)

orf352_RT102の膜貫通領域

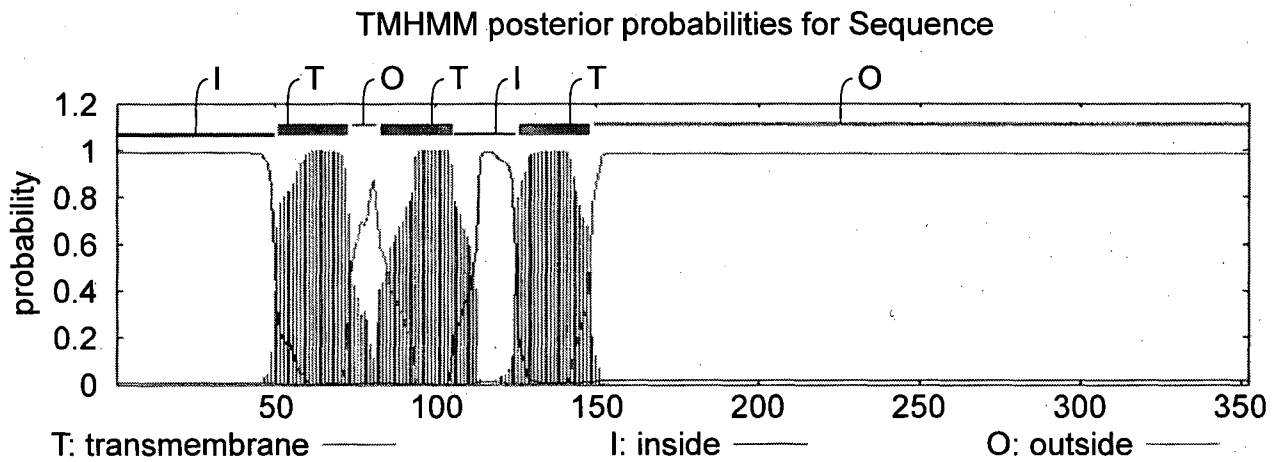


図 3

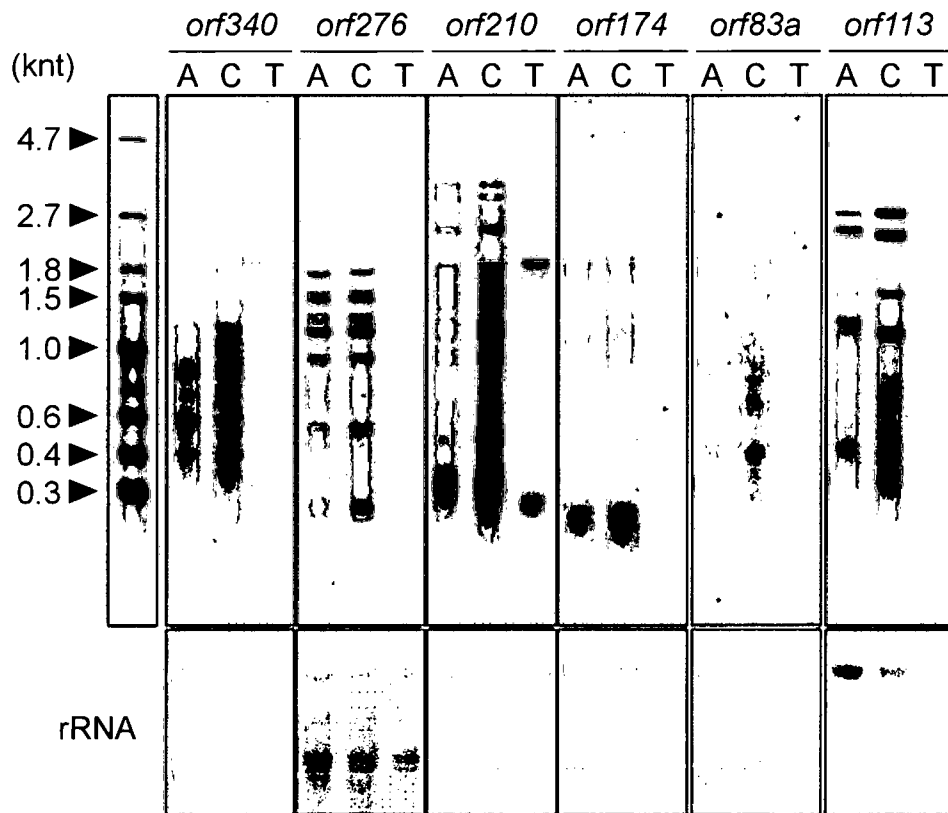


図 4

orf113_RT98の検出

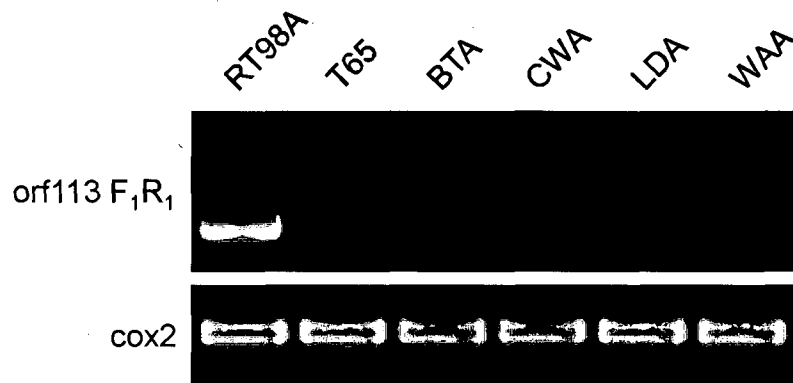


図 5

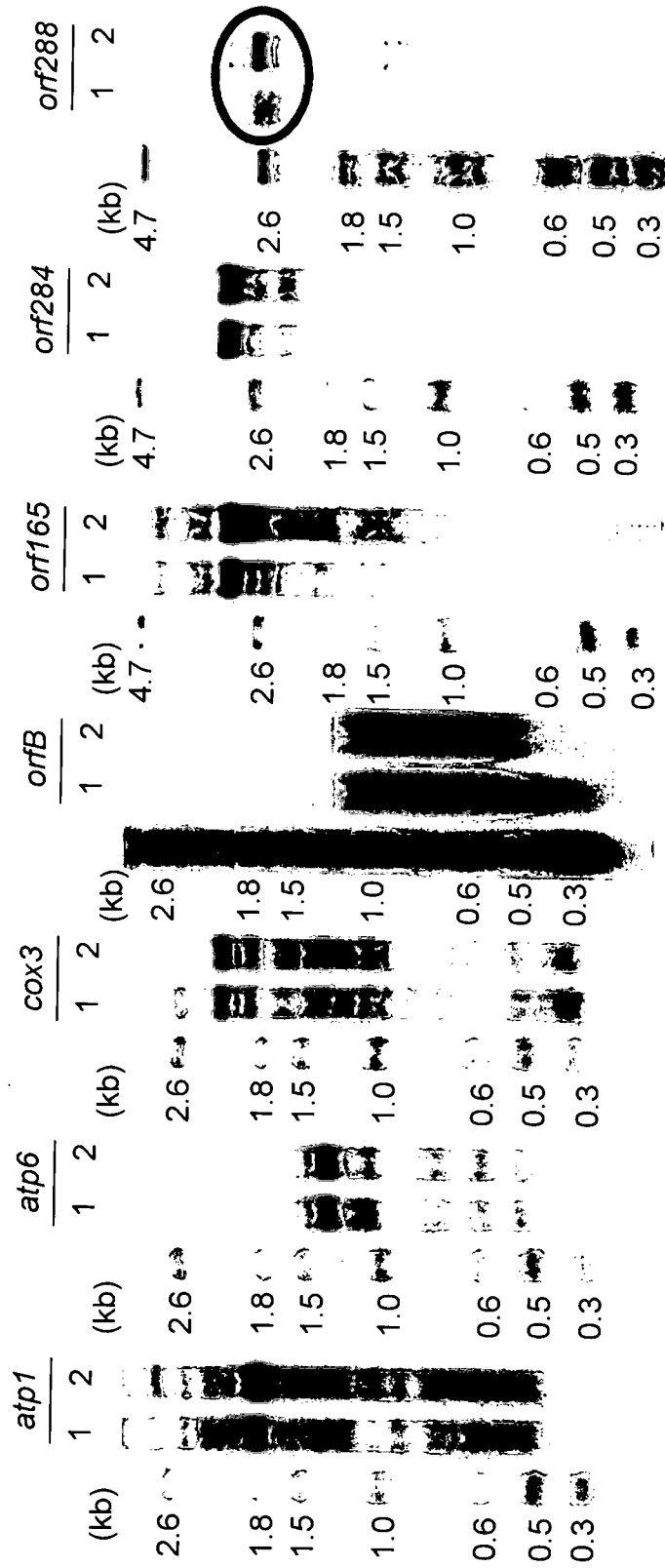


図 6

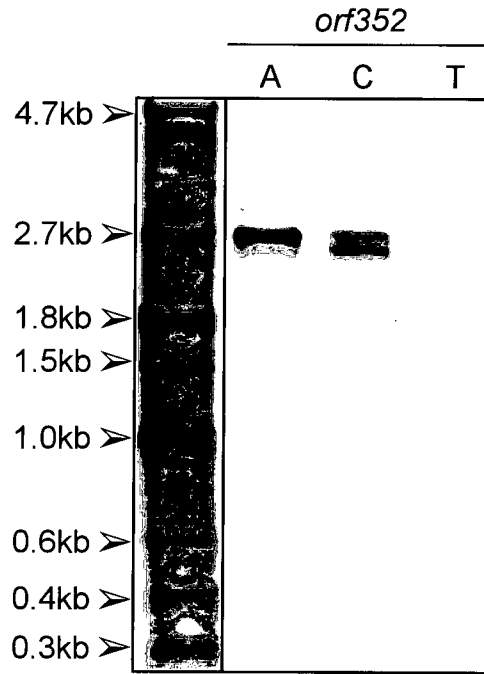
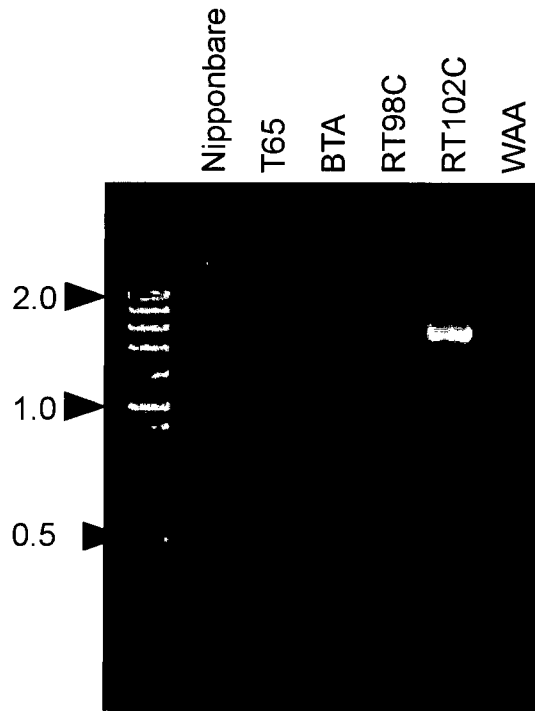


図 7

orf352_RT102の検出



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066528

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H1/02(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/00-15/90, A01H1/02, C12Q1/00-1/24, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101514342 A (SOUTH CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY), 26 August 2009 (26.08.2009), entire text; claims; sequence listing & CN 101514342 B	1-10
Y	Hayato MURATA et al., "Oryza rufipogon ni Yurai suru T61C, RT98C, RT102C no Motsu Yusei Funen Saiboshitsu no Hikaku Kaiseki", Breeding research, 2010, vol.12, separate volume 2, page 146	1-10
Y	WANG, Jun, et al., Rice-Map: a new-generation rice genome browser., BMC genomics, 2011, Vol.12, pages 165(1-8)	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 August, 2013 (27.08.13)Date of mailing of the international search report
10 September, 2013 (10.09.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/066528

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	IGARASHI Keisuke, et al., Whole genomic sequencing of RT98 mitochondria derived from <i>Oryza rufipogon</i> and northern blot analysis to uncover a cytoplasmic male sterility-associated gene., <i>Plant & cell physiology</i> , 2013 Feb, Vol.54, No.2, pages 237-243	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01H1/02(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/00-15/90, A01H1/02, C12Q1/00-1/24, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	CN 101514342 A (SOUTH CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY) 2009.8.26, 全文、例えば、特許請求の範囲、配列表 & CN 101514342 B	1-10
Y	村田隼人、外 3 名、 Oryza rufipogon に由来する T61C,RT98C,RT102C の持つ雄性不稔細胞質の比較 解析、 育種学研究、2010、第 12 巻、別冊 2 号、pages 146	1-10

C 欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 27.08.2013	国際調査報告の発送日 10.09.2013
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号	特許庁審査官 (権限のある職員) 清水 晋治 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B	3535
--	--	----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WANG, Jun, et al., Rice-Map: a new-generation rice genome browser., BMC genomics, 2011, Vol.12, pages 165(1-8)	1-10
T	IGARASHI Keisuke, et al., Whole genomic sequencing of RT98 mitochondria derived from Oryza rufipogon and northern blot analysis to uncover a cytoplasmic male sterility-associated gene., Plant & cell physiology, 2013 Feb, Vol.54, No.2, pages 237-243	1-10