

Title	テンサイRf1対立遺伝子の機能と進化機構に関する研究
Author(s)	荒河, 匠
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第13591号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13591
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/91049
Туре	theses (doctoral)
File Information	Takumi_Arakawa.pdf



テンサイ Rfl 対立遺伝子の機能と進化機構に関する研究

北海道大学大学院農学院

生物資源科学専攻 博士課程

荒河 匠

第1章	緒論	3
第2章	テンサイにおける雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の 分子的相互作用解析	8
第3章	作用力の異なる Rf1 対立遺伝子の機能解析	32
第4章	フダンソウから発見された Hypomorphic な <i>Rfl</i> 対立遺伝子 の特徴づけと稔性回復能の検出法について	64
第5章	Rfl の分子進化学的解析	87
第6章	総合論議	133
摘要		143
引用文南	¢	149

第1章 緒論

真核生物の進化の過程に細胞内共生が関わることは広く受け入れられている(Margulis 2004)。 即ち、ミトコンドリアの起源は α-proteobacteria か、もしくはそれに類する細菌様生物であると いう(Martijn *et al.* 2018)。ミトコンドリア獲得は宿主真核生物の体制に大きな変革をもたらし、 細胞の大きさの増大や、多細胞化、あるいは多様化に関与したと考えられている(Lane 2007)。 現生生物のミトコンドリアは、エネルギー生産等の基礎生化学的な過程からプログラム細胞死 のような高次生命現象に至る様々な場面で、重要な役割を果たしている(van del Bliek *et al.* 2017)。

ミトコンドリアは独自のゲノムを持つが、これは起源となった細菌様生物の名残と考えられ ている(Roger et al. 2017)。細胞内共生直後に多くの遺伝子は消失した可能性が高い (McCutcheon and Moran 2012)が、一部の遺伝子は共生の過程で核に移行した(Timmis et al. 2004)。ミトコンドリアに残された遺伝子の産物は、タンパク質複合体を形成したり、アミノ アシル化される(tRNA)など、ほぼすべて何らかの形で核遺伝子の産物と相互作用する(Gray 2015)。したがって、核ゲノムとミトコンドリアゲノムの協調が真核細胞を支えていると言え よう。結果として、核とミトコンドリアは共進化の関係に至り、実際そのような痕跡は多くの 生物種から得られている(Sloan et al. 2018)。

ミトコンドリアは進化のかなり初期から母性遺伝(片親遺伝)により伝達されたと考えられ ている(Greiner et al. 2015)。即ち、真核生物では伝達様式の異なる2種類のゲノムが進化過程 の大部分で共存していたことになる。このことが、進化遺伝学的に両ゲノムにどのような違い をもたらすのかが議論されてきた(Perlman et al. 2015)。例えば、それぞれのゲノムにかかる自 然選択が検討された。その結果、ミトコンドリアは母性遺伝するので、ミトコンドリアゲノム における突然変異のうち雄の機能(雄性配偶子形成)に関するものであれば負の選択を受けな いという性的な非対称性が考えられている(Sex-biased selective sieve, Frank 2012; Innocenti et al. 2011)。そのため、雄の機能を低下させるようなミトコンドリア変異は、雌機能や体細胞に対 してほぼ中立であれば集団中に維持される(Mother's curse、Frank and Hurst 1996; Milot et al. 2017)。こうしたアイデアをさらに推し進めると、ミトコンドリアを利己的因子ととらえるこ とができる。即ち、雄と雌の生殖器官にかけるリソースが trade-off の関係にある場合、雄機能 を損なうような変異によりその分のリソースが雌性器官に再分配できるならば、これはミトコ ンドリア自身の伝達率が向上する好ましい変異であり、いわばミトコンドリアによる、自身の 都合に合わせた宿主表現型の改変とみなせる。一方で、両性遺伝する核ゲノムにとって、雄機 能を損なう変異は自身の適応度を低下させる有害な変異である。このような両ゲノムの対立は

ゲノムコンフリクトと呼ばれる (Cosmides and Tooby 1981)。

核-ミトコンドリア間のゲノムコンフリクトが表出した好例が、被子植物における細胞質雄 性不稔性 (CMS: Cytoplasmic male sterility) と言われている (Schnable and Wise 1998)。CMS は、 S ミトコンドリアによって発現するが、核の花粉稔性回復遺伝子 (*Rf: Restorer-of-fertility* gene) があれば発現しないと遺伝学的に説明され、これはゲノムコンフリクトを究極要因として解釈 できるという。

CMS は 150 種以上の被子植物で見つかっている(Laser and Lersten 1972)。CMS は植物の性型の一つである雌性両全性異株(Gynodioecy、Darwin 1877)の主要な機構である。そのため、性分化に遺伝的コンフリクトや利己的因子が関与することの好例とも考えられてきた(Budar et al. 2006)。雌性両全性異株は自然界で安定な性型のように見えるが、雄性不稔個体(雌個体)は花粉により子孫を残す手段を失い適応度が下がると考えられることから、自然集団においてこの性型が維持される機構、即ち雌個体が毎世代出現する機構について理論的な研究が行われてきた。Lewis(1941)によると、細胞質にSミトコンドリアがある場合、雌個体が両全性個体よりわずかでも有利であれば(例、種子生産量が多い)、雌が維持される(Female advantage)。Lewis (1941)はRfについて検討しなかったが、その後Rfを加えたモデルが構築された(Delph et al. 2007)。Rfが集団中に固定されると雌個体は現れないことになるが、Rfが生育に悪影響を及ぼし、Rf 保持個体がコストを負うことを仮定するとRf 固定は回避されるという(Cost of restoration)。これらの変数を導入すると、Gynodioecy 集団においてSミトコンドリアとRf は相互に負の頻度依存的選択になりいずれも固定されない。あるいは、新たなSミトコンドリアが断続的に誕生し、古いものと置き換わっていくと説明できるという。

このような進化生物学や生態学的な興味の他、CMS 研究を推進したのは育種的な要請であ る(Kim and Zhang 2018)。F₁ハイブリッド育種は 20 世紀初頭より始まったが、小型の両全性 花のように受粉制御が難しい作物に応用するのは困難であった。これに対し、CMS を導入す れば自殖を避けて他殖を促すことが可能になる。CMS を利用した F₁ハイブリッド育種はタマ ネギを嚆矢として、現在では多くの作物において行われている(Budar *et al.* 2006)。CMS 利用 のF₁ハイブリッド育種には、雄性不稔系統([S]*rfrf*)、維持系統([N]*rfrf、*N は正常ミトコンド リア)、及び回復系統([N もしくは S]*RfRf*)が必要であるが、回復系統は栄養器官を収穫する 場合などは不要である。こうした遺伝子型の選抜はしばしば後代検定が必要となる煩雑な過程 であるため、分子マーカー等による効率的な選抜が望まれる。

被子植物ミトコンドリアゲノムは、これまで 60 以上の種あるいは細胞質について全塩基配 列に基づく構造が明らかにされている (Chen *et al.* 2017)。それらの比較解析によると、植物種 間あるいは種内において遺伝子コード域の塩基配列は比較的保存されているのに対し、遺伝子 配置や遺伝子間領域の塩基配列は著しい構造多型を示す(Gualberto and Newton 2017)。CMS 発 現に関与するSミトコンドリア固有 ORF (*S-orf*)は、そうした遺伝子間領域の、ミトコンドリ ア遺伝子の近接領域で発見され、これまでに 20 種以上報告されている(Chen and Liu 2014)。 *S-orf* は由来不明配列や既知配列が、しばしばキメラ状に組み合わされた遺伝子であるが、一次 構造上の保存性はほとんど無いため、進化的に独立に生じた可能性が高い(Kubo *et al.* 2011)。 キメラ状の遺伝子構造から、これらは複雑なゲノム再編成の過程で生じたと考えられている

(Hanson and Bentolila 2004)。一方、こうした範疇に含まれない例外的な S-orf もいくつか報告 されている。Silene vulgaris では Long non-coding RNA が CMS に関わる (Stone et al. 2017)。野 生ビート (Beta vulgaris ssp. maritima) 由来の G型 CMS ではミトコンドリア遺伝子 nad9、cox1 及び cox2 において、タンパク質コード域の末端が伸長あるいは欠失した変異が認められた (Ducos et al. 2001; Meyer et al. 2018)。調べられているほとんどのケースで、S-orf の翻訳産物 が蓄積することで花粉不稔が誘導されると考えられているが、一部の例外 (Luo et al. 2013) を

除き、CMS 発現機構の大部分は未解明である(Touzet and Meyer 2014)。

*Rf*の分子的実体も明らかにされている。これまでに、アルデヒド脱水素酵素(Cui *et al.* 1996)、 Pentatricopeptide-repeat (PPR) タンパク質 (Bentolila *et al.* 2002; Brown *et al.* 2003; Komori *et al.* 2004; Akagi *et al.* 2004)、アシル基転移酵素 (Fujii and Toriyama 2009)、グリシンリッチタンパク 質 (Itabashi *et al.* 2011)、及び Omal 様タンパク質 (Matsuhira *et al.* 2012) をコードする遺伝子 がクローン化された。最も報告例が多いのは PPR タンパク質をコードする *Rf*(*PPR-Rf*と総称) である。いくつかの *PPR-Rf*では、*S-orf*と *Rf*間の相互作用が分子レベルで詳しく調べられてい る。PPR タンパク質は塩基配列特異的な RNA 結合能をもつとされている(Fujii and Small 2011)。 *PPR-Rf*の翻訳産物も *S-orf*の転写産物に特異的に結合し、mRNA 分解、プロセッシング、ある いは翻訳阻害を通じて S-ORF タンパク質の蓄積を減ずるという (Chen and Liu 2014)。

PPR-Rf 領域において *PPR* 遺伝子はクラスターを形成しており、そのハプロタイプ分子構造 は種間あるいは種内で多様である(Geddy and Brown 2007; Mora *et al.* 2010; Melonek *et al.* 2016; Melonek *et al.* 2018)。例えばイネ *Rf1* 座では、AA ゲノムにおいて少なくとも6種類のハプロタ イプが存在する(Kato *et al.* 2007)。しかし、これらについては、遺伝学的機能が未解析である ため、詳細は不明である。PPR タンパク質コード遺伝子は植物ゲノムの中で巨大遺伝子ファミ リーを形成することから、ファミリー内における *PPR-Rf* の進化的位置づけが試みられた。そ の分子系統学的な解析によれば、*Rf* を含む一部の *PPR* 遺伝子は単一のクレードを形成し、こ れを総称して *Rf-like PPR* 遺伝子と呼ぶ(Fujii *et al.* 2011)。*Rf-like PPR* は被子植物特異的に存在 し、他のクレードに含まれる PPR 遺伝子と比較して進化速度が大きい (Geddy and Brown 2007; Fujii et al. 2011; Melonek et al. 2018)。これには、クラスター内における不等交差や遺伝子変換 を含む相同組換えが主要な役割を果たすという (Fujii et al. 2011)。さらに、Rf-like PPR 多様化 の意義が調べられたが、興味深いデータは塩基配列認識に直接関わるアミノ酸残基に対して多 様化を促す正の選択が検出されたことである (Fujii et al. 2011; Melonek et al. 2018)。同様な多 様化選択は病原抵抗性遺伝子などの病原体と共進化する遺伝子にしばしば見られるため

 (Tanaka and Nei 1989; Bergelson *et al.* 2001)、*Rf-like PPR* における正の選択は、ゲノム再編成に よって有害な ORF を生み出す利己的なミトコンドリアとの共進化の証左であると解釈された
(Fujii *et al.* 2011)。しかしながら、*Rf-like PPR* の誕生は進化的に非常に古く、*Rf-like PPR* がミ トコンドリアゲノム上の有害な ORF に呼応して進化したのか明らかではない。

現在のテンサイ(Beta vulgaris L.)品種は、専ら CMS を利用した三系交配による F_1 ハイブ リッド育種により作られている(Bosemark 2006)。テンサイ CMS は、Curly top 病抵抗性の集 団選抜品種'US-1'より発見され、ハイブリッド育種に使われるに至った(Owen 1945)。テンサ イ集団においては一般に維持系統遺伝子型の頻度がきわめて低く、平均 5%以下と言われてい る(Bosemark 2006)。そのため、効率的な選抜法が求められている。'US-1'より発見された細 胞質は発見者の名を冠して Owen 細胞質と呼ばれ、その遺伝モデルには不稔を引き起こす S 細 胞質と稔性回復遺伝子 X 及び Z が含まれる(Owen 1945)。連鎖解析が進められ、X は第三染色 体、Z は第四染色体に座乗していることが明らかになり、それぞれ Rf1 と Rf2 として遺伝学的 に同定された(Hagihara et al. 2005; Honma et al. 2014)。後述の通り Rf1 は分子的実体が明らか にされたが、Rf2 の実体は不明である。

NとSミトコンドリアの比較解析によって、S-orfの最有力候補 preSatp6 が発見された (Kubo et al. 2000; Satoh et al. 2004; Yamamoto et al. 2005)。preSatp6 は、ミトコンドリア ATP 合成酵素 サブユニットをコードするミトコンドリア遺伝子 atp6 の 5'末端伸長領域であり、両者は in-frame で融合している (Onodera et al. 1999)。これらは一続きの ORF として転写・翻訳され た後に前駆体ポリペプチドがプロセッシングされ、preSATP6 と ATP6 の 2 つの成熟タンパク質 ができると考えられているが、前駆体ポリペプチドは検出されていない (Yamamoto et al. 2005) ので、詳細は不明である。preSATP6 はミトコンドリア内膜においてホモオリゴマーを形成し ているという (Yamamoto et al. 2005)。

ポジショナルクローニングによって Rfl 領域が同定された。この領域には出芽酵母 Omal と 相同性を示す 4 コピーのペプチダーゼ様遺伝子(orf20 様遺伝子と総称)が直列に並んだクラ スターを形成していた(Matsuhira et al. 2012)。Omal は真核生物に広く保存される遺伝子であ

り、出芽酵母やヒトにおいてミトコンドリアタンパク質品質管理やミトコンドリアダイナミク スの制御を担っている(Käser *et al.* 2003; McBride and Soubannier 2010)。しかしながら、アミノ 酸配列を子細に検討すると、*orf20* 様遺伝子の翻訳産物は、ペプチダーゼ活性に必須な亜鉛結 合モチーフ内のアミノ酸変異によりその活性が失われている可能性が極めて高い(Matsuhira *et al.* 2012)。4 コピーの *orf20* 様遺伝子コピーそれぞれを含むゲノム断片を CMS 系統に形質転換 したところ、*orf20_{NK-198}*を導入した個体のみ稔性回復したことからこの遺伝子が *Rf1* の分子的実 体であると思われた(Matsuhira *et al.* 2012)。ペプチダーゼ活性をもたないと予想されるタンパ ク質がいかなる機構で稔性回復を行うのかは全く不明である。

rf1 対立遺伝子を保持する系統からは1コピーの orf20 様遺伝子が見つかった(Matsuhira et al. 2012)。ところが、その後の解析から Rf1 対立遺伝子の分子構造は非常に多様であることが判明し、コピー数やコード域の塩基配列が異なるハプロタイプが次々と発見されたことから、Rf1 は複対立遺伝子である (Moritani et al. 2013; Ohgami et al. 2016)。相同遺伝子のクラスター化や分子構造の多様性は PPR-Rf と共通している。これより、テンサイ Rf1 と PPR-Rf は進化的な機構に共通点があると予想された。このことは、PPR-Rf ではほとんど解析が進んでいない多様な分子バリアントの機能的側面について、テンサイ Rf1 の解析から何らかの洞察が得られる可能性を意味する。

本研究では、テンサイ *Rf1* に関する分子生物学的、遺伝学的、及び分子進化学的な調査を行った。第2章において、*Rf1 と preSatp6* 間の相互作用の分子基盤を解明した。第3章において *Rf1* の作用力と orf20 様遺伝子の機能の関係を明らかにした。その過程で CMS 発現機構の洞察 が得られた。第4章ではフダンソウ由来の Hypomorphic な rf1 アレルを特徴づけるとともに、 orf20 様遺伝子の機能に基づく優性 *Rf1* 識別マーカーを開発し、実証実験を行った。第5章にお いて、*Rf1* の進化過程を調査した。第6章では、得られた知見を基に多様な *Rf1* 対立遺伝子の 機能とその進化的側面について考察した。

第2章

テンサイにおける雄性不稔細胞質と 稔性回復遺伝子の分子的相互作用解析

第2章 テンサイにおける雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の分子的相互作用解析

緒言

テンサイ Owen 型 CMS において *S-orf* と *Rf1* それぞれの分子的実体は明らかにされた。遺伝 学的には両者の間に何らかの相互作用が予想されるが、その分子的基盤は明らかではない。本 章ではテンサイ形質転換実験系を利用し、両者間の分子的相互作用を調査した。実験系が確立 するなら、未解析であった多様な *Rf1* ハプロタイプの機能解明についてアプローチが可能にな る。そこで、テンサイ維持系統から発見されたが機能が不明であった *orf20* 様遺伝子について、 分子的な特徴づけを行った。

材料及び方法

2-1. 供試材料

北海道農業研究センター育成の NK-219mm-O、NK-219mm-CMS、TA-33BB-CMS 及び NK-198 を用いた (Matsuhira *et al.* 2012)。TA-33BB-CMS 及び NK-219mm-CMS はいずれも Owen 型細胞 質雄性不稔系統であり、NK-219mm-O は NK-219mm-CMS に対する維持系統で、唯一の形質転 換可能なテンサイ系統である (Kagami *et al.* 2015)。NK-198 は稔性回復系統である。PI 518644 及び PI 615522 の種子は United States Department of Agriculture (USDA) から入手した (Ohgami *et al.* 2016)。植物体は、温室で播種・育苗した後、北海道大学北方生物圏フィールド科学セン ター生物生産研究農場にて 24 時間日長 (自然日長に加え、白熱灯により夜間補光した)で、 育成した。

2-2. 花粉稔性調查

葯の肉眼観察及びアレキサンダー染色(Alexander 1969)によって総合的に花粉稔性を評価 した。評価基準は表 2-1 に示す。指数化する際には 3 日以上の調査日を設け、平均した。

2-3. コンストラクトの作製

2-3-1. 融合遺伝子

orf20 様遺伝子のコード域に加え 5'及び 3' 非翻訳領域を含むゲノム DNA 断片を、attB 配列 を含むプライマーを用いた PCR 反応により増幅した。以下、Gateway システム(Invitrogen, Carlsbad, CA)に従い BP 反応によって pDONR/zeo ベクター(Invitrogen)へクローニングし、 増幅断片の塩基配列を確認した。さらに、orf20 様遺伝子のコード域の 3'末端に in-frame で FLAG タグ配列を付加すべく、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit(Takara, Kusatsu, Japan)に準じて変 異導入を行った後、得られたベクターの塩基配列を確認し、LR 反応によってバイナリーベク ターpMDC32-Ω(松永 2012) ヘクローニングした。

2-3-2. プラスミド構築素過程

(1) Gateway クローニング

Gateway® BP Clonase® II enzyme mix (Invitrogen) 及び Gateway® LR Clonase® II enzyme mix (Invitrogen) を用い、プロトコールに従って行った。

(2) 形質転換

大腸菌株 TOP10 を宿主として、ヒートショック法(Mandel and Higa 1970)により行い、形 質転換大腸菌は zeocin あるいはカナマイシンを含む LB 寒天培地にて 37℃、16 時間培養した。 コロニーを形成した組換え大腸菌を zeocin あるいはカナマイシンを含む LB 培地 2 ml 中で 37℃、 16 時間振盪培養し、17,000g、1 分間遠心して集菌した後、沈殿から QIAprep Spin Miniprep Kit

(Qiagen, Hilden, Germany)を用いてプラスミド DNA を得た。抗生物質はいずれも終濃度 50 mg/L で用いた。

(3) Mutagenesis

PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit(Takara)に準じて変異導入を行った。変異部位を中心にして、15 塩基オーバーラップさせるようにプライマーを設計した。そのプライマーを用いた PCR 反応によって得られた増幅産物を Dpn I 処理し、(2)に従って大腸菌に形質転換した。

(4) 塩基配列解析

得られたプラスミド DNA を鋳型とし、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いてシーケンス反応を行った。ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。

2-4. アグロバクテリウム懸濁液の調製

作製したバイナリーベクターをエレクトロポーレーション法 (Dower *et al.* 1988) でアグロバ クテリウム LBA4404 株に導入し、25℃、暗所にて 3~4 日間培養し、リファンピシン、ストレ プトマイシン及びカナマイシンを含む LB 寒天培地上でコロニーを形成させた。コロニー由来 のアグロバクテリウムを、5 ml の LB 培地で 25℃、暗所にて 120 rpm で旋回培養した。2~3 日間培養を続けた後、培養液を等量の 80%グリセロール液と混合し、アグロバクテリウムスト ック液とし、-80℃で冷凍保存した。カルスとの共存培養を開始する 2~3 日前に、リファンピ シン、ストレプトマイシン及びカナマイシンを含む 5 ml の LB 培地に 100~200 µl のアグロバ クテリウムストック液を加え、旋回培養し、アグロバクテリウム懸濁液とした。抗生物質の濃 度はすべて 50 mg/L で調製した。

2-5. テンサイ組織培養と形質転換カルスの作出

テンサイ組織培養及び形質転換カルスの作出は、Kagami et al. (2015) に従った。

2-6. 粗ミトコンドリア抽出

生重量 100~200 mg のテンサイカルスに抽出 Buffer (pH8.0) [50 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M マンニトール、1 mM EDTA-Na₂、0.1% (w/v) BSA、1.0% (w/v) L-アスコルビン酸-Na、0.5% (w/v) ポリクラル AT]を加え、プラスチックペッスルで摩砕した。4℃、5,500 g で 10 分間遠心した 後、上清を回収し、4℃、6,500 g で 10 分間再び遠心した。上清を回収し、4℃、11,000 g で 15 分間遠心した後、上清を取り除いた。得られたペレットを洗浄 Buffer (pH7.4) [50 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5 M マンニトール、1 mM EDTA-Na₂] に懸濁し、再び4℃、11,000 g で 15 分間遠心 した。上清を取り除いた後、ペレットを洗浄 Buffer に懸濁し、粗ミトコンドリア抽出液とした。

2-7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

Schägger and von Jagow (1987) の手法に準じて行った。粗ミトコンドリア抽出液を SDS sample buffer [50mM Tris-HCl pH6.8、2% (w/v) SDS、10% glycerol、0.005% (w/v) Bromophenol blue、1% (v/v) β-mercaptoethanol] に懸濁し、95°Cで5分間熱変性させ精製標品とした。精製標品は、12% SDS ゲル [12% アクリルアミド、0.32% N,N'-メチレンビスアクリルアミド、37.5 mM Tris-HCl (pH8.8)、1% (w/v) SDS、0.1 % (w/v) 過硫酸アンモニウム、0.04% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylene-diamine] を用いた電気泳動によって分離した。

2-8. ウェスタンブロット解析

電気泳動によって分離したタンパク質をエレクトロブロッター(Bio-Rad, Hercule, CA)を用 いて、添付のプロトコールに従って Hybond-P PVDF メンブレン(GE Healthcare, Chicago, IL) に転写した。その後、Can Get Signal® system(Toyobo, Osaka, Japan)のプロトコールに従って メンブレンと一次抗体 [抗 DDDDK 抗体 (MBL, Nagoya, Japan)、抗 preSATP6 抗体及び抗 COXI 抗体(Yamamoto *et al.* 2005)]と二次抗体 [HRP 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体及び HRP 結合ヤギ 抗ウサギ IgG 抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)]を順次反応させた。シグナルの 検出は化学発光によって行った。ECL prime(GE Healthcare)を基質として化学発光させた後、 X 線フィルム(GE Healthcare)に露光させ、現像液(Hi-rendol, FUJIFILM)及び定着液(Hi-renfix, FUJIFILM)に浸漬し、現像を行った。現像した X 線フィルムはスキャンした後、GIMP2 (https://www.gimp.org/)及び PowerPoint(Office 365 Proplus; Microsoft, Redmond, WA)によって編集した。

2-9. 免疫沈降

DDDDK-tagged Protein Magnetic PURIFICATION KIT (MBL) のプロトコールに従って行った。 粗ミトコンドリア約 40 µg に対し、Protein Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts (Sigma, St. Louis, MO) 及び 2.5% (w/v) digitonin を含む 1 x PBS を懸濁し、4°C、30 分静置した。反応液 を 4°C、11,000 g で 15 分間遠心し、上清を回収した。digitonin の終濃度が 0.1% (w/v)になるよ うに 1 x PBS を加えた反応液に対し、Anti-DDDDK tag magnetic beads 約 4 µl スラリー/サンプル を 0.1% (w/v) digitonin を含む 1 x PBS で洗浄した後に加え、4°Cで一晩転倒混和した。その後、ビーズを集塊した上で上清を取り除き、0.1% (w/v) digitonin を含む 1 x PBS を 1 ml 加え、懸濁 した。この操作を 2 回繰り返した後、上清を取り除き、SDS sample buffer を加えて 95°Cで 5 分 間熱変性させ、精製標品とした。

2-10. Blue-Native PAGE

サンプル調製は、NativePAGE[™] Novex[®] Bis-Tris Gel System (Invitrogen) のプロトコールを 一部改変して行った。

カルス由来の粗ミトコンドリア抽出液に、等量の 2% (w/v) digitonin を含む 2 x NativePAGE[™] sample buffer (Invitrogen)を加え、氷上で 30 分間静置した後、4℃、11,500 g で 15 分間遠心し、 上清を回収し精製標品とした。

未成熟葯については、以下のように花粉発達ステージを特定した上で実験に供試した。花芽 ごとに未成熟葯を回収した後、葯を花芽につき1つずつアレキサンダー溶液(Alexander 1969) 中で押しつぶし、葯内部の小胞子を染色した。小胞子の形態によって発達ステージを判別し(北 崎 2009)、残りの葯をステージ別に1.5ml チューブにプールした。一つの花芽の中ですべての 葯の花粉発達ステージは同調することが確認されている(北崎 2009)。

1~4 mg の未成熟葯を液体窒素で凍結させ、破砕した後、1%(w/v) digitonin 及び Protein Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts (Sigma) を含んだ 1 x NativePAGETM sample buffer (Invitrogen) を 30 µl/mg(葯重量)加え、氷上で 30 分間静置した。次に、Benzonase Nuclease (Takara)を加え、室温で 30 分間静置した後、4℃、11,000 g で 15 分間遠心し、上清を回収し た。さらに、4℃、33,000g で 30 分間遠心した後に上清を回収し、精製標品とした。

電気泳動は NativePAGE[™] Novex[®] 4-16% Bis-Tris Gel (Invitrogen)を用い、NativePAGE[™] Novex[®] Bis-Tris Gel System (Invitrogen) のプロトコールに従って行った。

2-11. Blue native/SDS-PAGE 二次元電気泳動

Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System (Invitrogen) のプロトコールに準じて行った。Blue native PAGE 後のゲルから目的のレーンを切り出し、SDS 処理液(1×NuPAGE® LDS sample buffer (Invitrogen)、1×NuPAGE® Sample Reducing Agent(Invitrogen))、アルキル化溶液(1×NuPAGE® LDS sample buffer、5.6% (v/v) N,N-dimethyacrylamide (Fluka))、クエンチ溶液(1×NuPAGE® LDS sample buffer、1×NuPAGE® Sample Reducing Agent、20% ethanol)の順に浸し、それぞれ 60°C、15 分間で振とうした。次に、4-12% NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gels (Invitrogen)にセットし、二 次元目の電気泳動を行った。泳動バッファーには 1×NuPAGE® MES running buffer (Invitrogen)を用いた。

2-12. Total RNA 抽出

液体窒素で凍結させた 1~4 mg の未熟葯を破砕し、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いてプロトコールに従い Total RNA を抽出した。

2-13. qRT-PCR

Total RNA を DNase (Promega, Madison, WI) で処理した後、フェノール・クロロホルム溶液 (1:1)を加え、転倒混和した。17,000gで5分間遠心し、得られた上清をフェノール・クロロ ホルム溶液と懸濁して再度遠心を行った。上清を1/10容の3M酢酸ナトリウムと3倍容のエタ ノールと混和し、17,000gで15分間遠心した。上清を取り除き、70% (v/v) エタノールでリ ンスした。上清を除いて得られた沈殿を DEPC 水で懸濁し、精製 RNA とした。Super Script III First-strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) に準じて、約300 ngの精製 RNA を鋳型 にして逆転写反応を行った。なお、プライマーは oligo(dT)20を用いた。PCR 反応は、PowerUpTM SYBR® Green Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA)を用いて行った。蛍光の検出は Thermal Cycler Dice® Real Time System III (Takara)及び Multiplate RQ (Takara)を用いた。相 対発現量の算出は Δ Ct 法により行った (Kitazaki *et al.* 2011)。データの解析は Excel (Microsoft, Office 365 Proplus)を用いた。

2-14. PCR

プライマーの塩基配列、及び反応条件を付表 2-1 に示す。

結果

orf20 様遺伝子を高発現する形質転換カルスの作出

orf20 様遺伝子は未成熟葯においてのみ強く発現する(鏡 2013)が、テンサイ未成熟葯を大 量に収集するのは困難である。そこで、S-RfI の相互作用の分子基盤を調査するために orf20 様 遺伝子を高発現する形質転換カルスを作出した。カルスは取り扱いが簡便である上、preSATP6 タンパク質が蓄積している(Yamamoto et al. 2005)。しかしながら、導入した orf20 様遺伝子の 翻訳産物を安定して蓄積する形質転換カルスを得るのは難しい(北崎、松永 私信)。その理由 の一つとして、疎水性タンパク質のミトコンドリア輸送が一般に困難なことが考えられた(de Grey 2005)。実際、ORF20 様タンパク質にはいくつかの膜貫通ドメインが予測され、疎水性が 高い(荒河ら 2014)。そこで、mRNA の非翻訳領域(UTR: Untranslated region)に着目した。 UTR は翻訳産物のミトコンドリア輸送効率に関わることが示されている(mRNA trafficking; Michaud et al. 2010)。さらに、orf20 様遺伝子の UTR にそのような作用があることを示唆する データが得られていた(荒河ら 2014)。

UTR がミトコンドリア輸送効率を高めることを期待し、これを含む融合遺伝子を導入するこ ととした。稔性回復系統 NK-198([S]*Rf1Rf1*)由来の遺伝子コピー*orf20_{NK-198}、及び維持系統* TK-81mm-O([N]*rf1rf1*)由来の *orf20L*を用意した(Matsuhira *et al.* 2012)。これらの *orf20* 様遺 伝子の両末端の UTR とタンパク質コード域をベクターに組み込んだ上で、FLAG タグ配列を コード域 3'末端に in-frame で挿入した。この融合遺伝子を、タバコモザイクウイルス由来の Ω 配列を付加したカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを含むバイナリーベクター (松永 2012)に組み込んだ。作成したベクターをテンサイ CMS 系統 NK-219mm-CMS 由来の カルス(Kagami *et al.* 2015)に導入した。

得られた形質転換カルスから粗ミトコンドリアタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 及びウェス タンブロット解析を行った。抗 COXI 抗体を反応させると、すべてのサンプルにおいて 42kDa のシグナルバンドが得られた(図 2-1)。よって、いずれの試料も分解することなくメンブレン に写し取られている。抗 FLAG 抗体を反応させると、 *orf20_{NK-198}* 導入カルスから 43kDa 及び 41kDa、*orf20L* 導入カルスから 42kDa の特異的なバンドが得られた(図 2-1)。43kDa と 42kDa は、FLAG タグの分子量(~1kDa)を加えた ORF20 様タンパク質の予想の分子量と一致する。 これらのシグナルは供試したサンプルのほとんどで検出されたため、期待された UTR の効果 があったことが示唆された。41kDa については、アミノ末端が若干分解されたタンパク質と思 われる。

orf20_{NK-198}は preSatp6 とタンパク質レベルで相互作用する

ORF20様タンパク質を蓄積する形質転換カルスが得られたため、さらに S-*Rf1*相互作用の分 子基盤の調査を進めた。ORF20様タンパク質はアミノ酸配列が OMA1 に似ている (Matsuhira *et al.* 2012)。OMA1 は分子シャペロン様活性をもつことが示唆されているため (Käser *et al.* 2003)、 ORF20様タンパク質にも同様の作用があると考えるとタンパク質間相互作用が期待される。そ こで、S-ORF の最有力候補とされている preSATP6 とのタンパク質間相互作用の有無を共免疫 沈降法によって調査した。形質転換カルス由来の粗ミトコンドリアタンパク質より、抗 FLAG 抗体と反応するタンパク質を回収した。この画分 (沈殿画分)を SDS-PAGE 及びウェスタンブ ロット解析に供した。

沈殿画分において、*orf20_{NK-198}* 導入カルスから抗 FLAG 抗体と反応する 43kDa 及び 41kDa の 特異的なシグナルに加え、抗 preSATP6 抗体と反応する 39kDa のシグナルが得られた(図 2-2)。 一方で、*orf20L* 導入カルスからは抗 FLAG 抗体と反応する 42kDa のシグナルが得られたものの、 抗 preSATP6 と反応するシグナルは得られなかった(図 2-2)。抗 COXI 抗体を用いた検出では、 沈殿画分からシグナルは得られなかったことから、この条件において非特異的な結合は検出限 界以下である (図 2-2)。これらの結果から、preSATP6 と ORF20_{NK-198} は結合すること、すなわ ちタンパク質間相互作用が認められるが、*rf1* 由来の ORF20L ではこれが認められないことが 分かった。

ORF20_{NK-198}は preSATP6 と新規の複合体を形成する

preSATP6 は CMS 植物の全身でホモ多量体と思われる 250kDa の複合体を形成している (Yamamoto *et al.* 2005; 北崎 2009)が、ORF20_{NK-198} と preSATP6 の間でタンパク質間相互作用 が見られることを考慮すると、ORF20_{NK-198}存在下では少なくとも両者を含む新たな複合体が形 成されるはずである。この可能性を確かめるためには、タンパク質複合体の分離を行って、両 者が同一の複合体にあることを示せば良い。*orf20_{NK-198}*導入カルスと *orf20L* 導入カルスから得 られた粗ミトコンドリアタンパク質を穏和な界面活性剤 Digitonin で可溶化した後、まずタンパ ク質を複合体の状態で泳動できる手法である Blue native PAGE (BN-PAGE) を行った。続いて 分離した複合体に対して SDS-PAGE を行った。もし ORF20_{NK-198}及び preSATP6 が同一のタン パク質複合体に含まれるならば、この二次元電気泳動実験において両者は一次元目の BN-PAGE で同一サイズに分画され、二次元目の SDS-PAGE では各々が単量体として検出され るはずである。

orf20_{NK-198} 導入カルス由来のサンプルでは、抗 preSATP6 抗体によって、3 つのスポットが検出された。すなわち、一次元目のサイズが 250kDa、二次元目のサイズが 39kDa(250/39kDa と

示す)のスポットと、200/39kDa、及び 150/39kDa のスポットである(図 2-3A)。二次元目のサ イズ(39kDa)は preSATP6 の単量体の分子量と一致する(Yamamoto *et al.* 2005)。抗 FLAG 抗 体を用いると、200/43kDa 及び 90/43kDa の二つのスポットが検出された(図 2-3A)。抗 preSATP6 抗体による 200/39kDa スポットと抗 FLAG 抗体による 200/43kDa スポットは、一次元目の分子 量が完全に同一であるので(図 2-3B)、この 200kDa 複合体に preSATP6 及び ORF20_{NK-198} が含 まれることが示唆された。*orf20L* 導入カルス由来のサンプルでは、抗 preSATP6 抗体によって 250/39kDa、抗 FLAG 抗体によって 90/42kDa のシグナルが検出された(図 2-4A)。これらの一 次元目の分子量は一致しなかった(図 2-4B)。

rf1 分子バリアントに含まれる orf20 様遺伝子の相互作用解析

ORF20_{NK-198}の示す preSATP6 とのタンパク質問相互作用と稔性回復の関係を調べるために、 TK-81mm-O とは由来の異なる劣性 rf1 対立遺伝子の orf20 様遺伝子分子バリアントについてこ の相互作用能の有無を調査した。テンサイ集団における rf1 アレルには TK-81mm-O 由来の分 子バリアントの他、2 種類のバリアントが見つかっている(Ohgami et al. 2016)。これら 2 種の 分子バリアントに含まれる 3 つの orf20 様遺伝子コピー(図 2-5、orf20₅、orf20_{NK-219-2} 及び orf20_{NK-219-3})について上記と同様に、形質転換カルスを作製した。SDS-PAGE によって導入タ ンパク質の蓄積を確認すると、orf20s 導入カルスでは 44kDa 及び 41kDa、orf20_{NK-219-2} 及び orf20_{NK-219-3}導入カルスでは 43kDa のシグナルが検出された(図 2-1)。次に、BN-PAGE によっ て preSATP6 複合体を調査した(図 2-6)。orf20_{NK-198}導入カルス由来のサンプルでは、抗 preSATP6 抗体によって、250kDa より高分子側にスメア状のシグナルが現れ、これに加えて 200kDa 及び 150kDa のシグナルが特異的に検出された。200kDa シグナルは、前項の 200kDa/39kDa スポッ トを含む複合体と由来が同一であると思われ、preSATP6 と ORF20 様遺伝子の翻訳産物のタン パク質問相互作用の指標となる。一方で、orf20L 導入カルスにおいて、スメア状のシグナルに 加えて 150kDa にごくわずかなシグナルが得られた。orf20₅、orf20_{NK-219-2} 及び orf20_{NK-219-3} 導入 カルス由来のサンプルでは、スメア状のシグナルのみであった。

稔性回復株の未成熟葯において preSATP6 の 250kDa 複合体は著しく減少する

次に、この相互作用が葯において preSATP6 タンパク質にいかなる影響を与えるのかを調べた。稔性回復系統 NK-198 及び CMS 系統 TA-33BB-CMS を用意した。TA-33BB-CMS は TK-81mm-O と同じ *rf1*をもつ (Ohgami *et al.* 2016)。これらに加えて、由来の異なる *rf1*対立遺 伝子をもつ検定交配 2 系統を用いた。検定交配の交配組み合わせは、TA-33BB-CMS x PI 615522 (*orf20s*保持系統) 及び TA-33BB-CMS x PI 518644 (*orf20_{NK-219-2}-orf20_{NK-219-3} タンデム遺伝子ク*

ラスター保持系統)である(Ohgami *et al.* 2016)。これら2系統を開花誘導したところ、全ての 個体が雄性不稔であった(表 2-2)。

供試材料より未成熟葯由来のタンパク質を抽出し、BN-PAGE を行った。抗 preSATP6 抗体を 用いたウェスタンブロット解析を行ったところ、TA-33BB-CMS、TA-33BB-CMS x PI 615522 及 び TA-33BB-CMS x PI 518644 由来のサンプルでは 250kDa の比較的明瞭なシグナルが得られた。 一方で、NK-198 では 250kDa シグナルはよりスメア状で、強度も弱い。加えて、200kDa 及び 150kDa にごく弱いシグナルが得られた(図 2-7A)。後二者は NK-198 に特異的であり、露光時 間を長くしても他のサンプルからは検出されなかった(図 2-7B)。抗 COXI 抗体によって検出 された 420kDa のバンドはすべてのサンプルでほぼ同様であるので(図 2-7C)、NK-198 由来試 料に固有な抗 preSATP6 抗体のシグナルバンドの変化が不適切なサンプル調製に起因する可能 性はきわめて低い。

未成熟葯における orf20 様遺伝子の発現

花粉発達過程における orf20 様遺伝子の発現動態を調査し、遺伝子型間で比較を行った。花 粉発達ステージ毎に回収した未成熟葯から Total RNA を抽出し、リアルタイム PCR に供した。 orf20 様遺伝子コピー間の類似性が高いため、特異的なプライマーを設計するのが難しい (Matsuhira et al. 2012)。そこで、すべての orf20 様遺伝子に共通する領域にプライマーを設計 し、mRNA 量を定量した。材料として、TA-33BB-CMS、TA-33BB-CMS x PI 615522 及び TA-33BB-CMS x PI 518644 を用意した。加えて、TA-33BB-CMS x NK-198 の F₁の稔性回復個体 を TA-33BB-CMS に 2 回戻し交配し自殖した後代 BC₂F₂ から得られた *Rf1rf1* ヘテロ個体 (NK-198_B2 とする)を供試した。したがって、TA-33BB-CMS 以外の 3 系統は共通の *rf1* ア レルと、由来の異なる *Rf1* もしくは *rf1* をヘテロ接合で保持する。

Actin 及び *Ef1a* をリファレンスとした時の *orf20* 様遺伝子の相対発現量を図 2-8 及び表 2-3 に 示す。葯発達に伴う遺伝子の発現パターンは系統で類似しており、減数分裂期>四分子期>小 胞子期のように、発達初期で最も高い発現量を示し、花粉発達が進むにつれて徐々に減少して いた。系統間では、1~5 倍程度の量的な variation がみられた。例えば、減数分裂期の未成熟葯 の発現 (リファレンス遺伝子: *Actin*) においては、NK-198_B2 を基準とすると、TA-33BB-CMS、 TA-33BB-CMS x PI 615522 は約 0.3 倍、TA-33BB-CMS x PI 518644 は約 0.6 倍であった。

表2-1 肉眼観察による花粉稔性評価方法

稔性分類	葯の外観	葯の色	指数	稔性評価
Ν	大きく裂開し、花粉が大量に 飛散	レモン色	3	可稔
S.S.a	Nよりも花粉飛散量が少なく、 S.S.bより多い	黄色	2	〔2≦(平均指数)〕
S.S.b	花粉が手につく程度の裂開、 もしくは非裂開	オレンジ色	1	半不稔 〔1≦(平均指数)<2〕
C.S.	非裂開	白色	0	不稔 〔(平均指数)<1〕



図2-1 導入遺伝子由来のタンパク質蓄積確認実験

形質転換カルス由来の粗ミトコンドリアタンパク質を用いて、SDS-PAGEおよ びウェスタンブロット解析を行った。抗DDDDK抗体(αFLAG)は100 ng/ml、抗 COXI抗体(αCOXI)は42.5 ng/mlで反応に用いた。orf20_{NK-198}::flag、orf20L::flag、 orf20_s::flag、orf20L_{NK-219-2}::flag及びorf20L_{NK-219-3}::flagはそれぞれ当該コンストラク トを導入したカルスを示す。左にタンパク質の分子量(kDa)を示す。Nは空ベク ターを導入したカルス由来のサンプルを示し、Bは空白のレーンである。



図2-2 共免疫沈降法によるORF20-preSATP6タンパク質間相互作用解析 粗ミトコンドリアタンパク質を用いて抗FLAG抗体を用いた免疫沈降を行い、 SDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析によって検出した。Inputは粗ミトコン ドリアタンパク質、IPは免疫沈降したサンプルを示す。抗preSATP6抗体 (αpreSATP6)は42.5 ng/ml、抗DDDDK抗体(αFLAG)は40 ng/ml、抗COXI抗体 (αCOXI)は42.5 ng/mlで反応に用いた。orf20_{NK-198}::flagおよびorf20L::flag</sub>はそれ

(aCOAI) は42.5 ng/mi で反応に用いた。*brj20_{NK-198}::Jug*なよび*brj20L::Jug*はそれ ぞれ当該コンストラクトを導入したカルス、NTはNK-219mm-CMS由来の非形質 転換カルスを示す。右にタンパク質の分子量(kDa)を示す。



図2-3 orf20_{NK-198}::flag導入カルスの粗ミトコンドリアタンパク質を用いた二次元電気泳動 (A)粗ミトコンドリアタンパク質を、一次元目(水平方向)にBlue-native PAGE、二次元目(垂直方 向)にSDS-PAGEによって分離し、ウェスタンブロット解析によって検出した。矢印は泳動の方向を 示す。抗preSATP6抗体(αpreSATP6)は340 ng/ml、抗DDDDK抗体(αFLAG)は100 ng/mlで反応に用 いた。付した数字はタンパク質の分子量(kDa)を示す。

(B) Aで示した泳動像を重ねあわせた像を示す。抗preSATP6抗体によるシグナルをオレンジ、抗 FLAG抗体によるシグナルを青で示す。



図2-4 orf20L::flag導入カルスの粗ミトコンドリアタンパク質を用いた二次元電気泳動

- (A) 粗ミトコンドリアタンパク質を、一次元目(水平方向)にBlue-native PAGE、二次元目(垂直方 向)にSDS-PAGEによって分離し、ウェスタンブロット解析によって検出した。矢印は泳動の方 向を示す。抗preSATP6抗体(apreSATP6)は340 ng/ml、抗DDDDK抗体(aFLAG)は100 ng/mlで 反応に用いた。付した数字はタンパク質の分子量(kDa)を示す。
- (B) Aで示したブロット像を重ねあわせた像を示す。抗preSATP6抗体によるシグナルをオレンジ、抗 FLAG抗体によるシグナルを青で示す。



図2-5 テンサイ維持系統のrfl遺伝子座の分子構造の模式図

テンサイ集団からこれまで発見された*rf1*分子バリアントの構造を模式的に示す。四 角がエキソン、山型の線がイントロン、横棒線が遺伝子間領域を示す。横矢印の方向は 転写方向を示している。左側に系統名、各遺伝子コピーの下部に*orf20*様遺伝子名を示 す。*orf20_{NK-219-1}*は第2エキソンにおいてナンセンス変異(赤矢印)が生じているため、 偽遺伝子化している可能性が高い(ψで示す)。



図2-6 orf20様遺伝子導入カルスの粗ミトコンドリアタンパク質を用いたpreSATP6 複合体解析

粗ミトコンドリアタンパク質をBlue native PAGEによって分離し、ウェスタンブロット解析 によって検出を行った。抗preSATP6抗体の濃度は340 ng/mlである。レーン上部に導入したコ ンストラクト名を示す。左側に付した数字はタンパク質の分子量(kDa)を示す。200kDaの シグナルの位置を赤矢印で示す。

表2-2 検定交配F₁の花粉稔性

	Number of plants		
Cross	Restored ¹	Sterile ²	
TA-33BB-CMS x PI 615522	0	5	
TA-33BB-CMS x PI 518644	0	16	

¹N、S.S.a、及びS.S.bの合計

² C.S.



図2-7 未成熟葯由来のタンパク質を用いたpreSATP6複合体解析

四分子期の小胞子を含む未成熟葯から抽出したタンパク質をBlue native PAGEによって分離し、 ウェスタンブロット解析により検出した。左側に付した数字はタンパク質の分子量(kDa)を示す。 ブロット像上部に付した数字はサンプルの番号である。1. TA-33BB-CMS, 2. NK-198, 3. TA-33BB-CMS x PI 615522, 4. TA-33BB-CMS x PI 518644

(A, B) 抗preSATP6抗体を85 ng/mlで用いて検出を行った。AおよびBは同じブロットであり、露 光時間はそれぞれ10秒と1分である。(C) 抗COXI抗体を42.5 ng/mlで用いて検出を行った。



図2-8 未成熟葯におけるorf20様遺伝子のmRNA量

花粉発達ステージ毎に収集した未成熟葯からTotal RNAを抽出し、qRT-PCRに供試した。縦軸は、 Actinをリファレンス遺伝子とした時のorf20様遺伝子の相対発現量の平均を示す(n=2、NK-198_B2 の減数分裂期における発現量を1としている)。NK-198_B2は、TA-33BB-CMS x NK-198のF₁の稔性 回復個体をTA-33BB-CMSに二回戻し交配し、さらに自殖させた後代BC₂F₂から得られたRf1rf1へテロ 個体を示す。エラーバーは標準偏差を示す。横軸には、サンプルの葯発達ステージおよび供試系統 を示す。ステージはアルファベット1文字で示しており、Mは減数分裂期およびそれ以前の時期、T は四分子期、Sは小胞子期、Oは不稔により退化した小胞子を含むステージである。

	Anther	Referen	ice gene
Line	developmental Stage	Actin	eflα
	Meiosis	0.32 ± 0.08	0.37 ± 0.06
TA-33BB-CMS	Tetrad	0.17 ± 0.00	0.23 ± 0.01
	Microspore ^b	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.00
	Meiosis	0.35 ± 0.01	0.35 ± 0.08
TA-33BB-CMS x PI 615522	Tetrad	0.21 ± 0.02	0.30 ± 0.05
	Microspore ^b	0.13 ± 0.07	0.28 ± 0.10
	Meiosis	0.59 ± 0.12	0.68 ± 0.08
TA-33BB-CMS x PI 518644	Tetrad	0.37 ± 0.03	0.55 ± 0.15
11010011	Microspore ^b	0.22 ± 0.01	0.34 ± 0.08
	Meiosis	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.06
NK-198_B2 a	Tetrad	0.85 ± 0.15	0.88 ± 0.26
	Microspore	0.41 ± 0.01	0.90 ± 0.21

表2-3 未成熟葯におけるorf20様遺伝子のmRNA量 (n = 2, Mean ± SD)

^a TA-33BB-CMS x NK-198の F_1 の稔性回復個体をTA-33BB-CMSに二回戻し交配し、さらに自殖させた後代 BC_2F_2 から得られた*Rf1rf1*へテロ個体を示す。 ^b 不稔により退化した小胞子を含む。

考察

本章では、形質転換カルスと未成熟葯の調査によって、S-Rfl 相互作用の分子基盤には preSatp6 と Rfl 間のタンパク質間相互作用が関わることを明らかにした。

preSATP6 や ORF20 様タンパク質を含む複合体に差異を生ずる機構

preSATP6 は n-dodecyl-D-maltoside で可溶化した際には 200kDa 複合体として検出され、この 構成員が preSATP6 であったことから、ホモオリゴマーを形成するとされた(Yamamoto *et al.* 2005)。その後、Digitonin を用いた際には 250kDa 複合体として検出されたが、Digitonin 可溶化 試料で共免疫沈降するタンパク質が見当たらないことから、やはりホモオリゴマーである可能 性が高いと結論された(北崎 2009)。本章では、CMS 系統の葯より Digitonin 使用で 250kDa 複合体が検出できることを確認し、ホモオリゴマーとした。一般的に、同一の複合体でも界面 活性剤の変更により見かけの分子量が異なるという(Wittig *et al.* 2006)。これは界面活性剤の 種類により膜タンパク質に結合する脂質(Boundary lipids)の量が変化するためと考えられて いる。このことより、250kDa 複合体がホモオリゴマーであると結論しても矛盾はない。また、 ホモオリゴマーを形成する単量体の数が異なる可能性もある。一方、界面活性剤の変更により アクセサリータンパク質が脱落し、n-dodecyl-D-maltoside では見かけ上ホモオリゴマーとして 検出されている可能性もある。今後、この点について確認を進める必要がある。

preSATP6 を含むタンパク質複合体について、本章では分子量の異なるものが現れることを 見出した。すなわち、orf20_{NK-198}を高発現する形質転換カルスにおいては、250kDa、200kDa及 び150kDa 複合体が検出された。このうち、200kDa 複合体の出現は導入遺伝子に依存的であり、 本章では orf20_{NK-198}を導入した時のみ認められた。200kDa 複合体には ORF20_{NK-198}が含まれる こと、及び preSATP6 と ORF20_{NK-198}が結合できることから、orf20_{NK-198}が 200kDa 複合体の出現 を促していると考えて良い。さらに、preSATP6 と結合しない ORF20L を発現させた形質転換 カルスでは 200kDa 複合体が見られないことから、200kDa 複合体の出現には ORF20 様タンパ ク質と preSATP6 との結合が必須であると思われる。ORF20_{NK-198} や preSATP6 を除き、200kDa 複合体にいかなる構成因子が含まれるのかは不明である。

150kDa 複合体については、orf20L 導入カルスにおいても微弱に検出されている。さらに、 orf20_{NK-198}導入カルスでも精製ミトコンドリア由来のサンプルでは検出されない(荒河 2016)。 これらのことから、150kDa 複合体の出現は ORF20 様タンパク質と preSATP6 の結合とは無関 係と思われる。これらについて、詳細を調べる必要がある。

200kDa 複合体は Rf1 稔性回復葯においても検出されるので、異所的に orf20 様遺伝子を発現

させた場合に特有の複合体ではない。一方、稔性回復葯においては形質転換カルスとは異なる 現象も観察された。第一に稔性回復葯における 250kDa 複合体の蓄積量は CMS 葯よりも減少し ており、これは *orf20_{NK-198}* 導入カルスでは見られなかった(図 2-7 の NK-198 のレーン vs. 図 2-3A)。第二に 250kDa シグナルバンドは CMS 葯で非常に明瞭であるが、稔性回復葯では抗 preSATP6 抗体に反応するシグナルが非常にスメアで、印象としてはむしろカルスに近い。こ うした違いは、葯とカルスの生理的な違いなのかもしれない。

稔性回復葯と CMS 葯の間で preSATP6 単量体の量は変わらない(Yamamoto *et al.* 2005; 北崎 2009; 本研究第 3 章、第 4 章)。それ故に、BN-PAGE 上で 250kDa 複合体の蓄積量が減少する ように見えるのは preSATP6 の高次構造が変化し、複合体を維持できなくなったためと考える のが自然であろう。実際、この減少には 200kDa 複合体の出現が伴っており、その 200kDa 複合 体には分子シャペロンと類似の ORF20 様タンパク質が含まれている。従って、ORF20 様タン パク質が preSATP6 と結合し、結果として 250kDa 複合体の蓄積量が減少するというモデルが考 えられる。一方、スメア状シグナルの素性については何ら明らかではない。これは高次構造が 変化した preSATP6 が非特異的に様々な複合体と結合したものなのか、あるいは稔性回復葯と カルスのスメア状シグナルは類似の機構で生じているのかなど、今後調べる必要がある。

形質転換カルスにおいて異所的に発現させた ORF20 様タンパク質は、SDS-PAGE において 2 本もしくは 1 本のシグナルバンドとして検出された。抗原とした FLAG は読み取り枠の 3 末端 に融合しているので、2 本のバンドはアミノ酸末端が異なるタンパク質がカルスに蓄積してい ることを示唆する。なお、2 本バンドを生じた orf20_{NK-198} と orf20s は preSATP6 との結合能にお いて異なっており、現れるバンドの本数と結合能に直接の関連はないと思われる。複合体解析 においては、orf20_{NK-198} 及び orf20L 導入カルスのいずれからも 90kDa 複合体が検出された。両 者の翻訳産物の性質を考慮すると、90kDa 複合体は結合能の有無とは無関係であり、むしろ orf20 様遺伝子に共通した性質なのかもしれない。ヒト及び酵母 OMA1 はホモオリゴマーを形 成しているという(Bohovych et al. 2014)。分子量(90kDa)を踏まえるとホモダイマーである 可能性があるが、他のタンパク質が含まれる可能性もある。これは orf20 様遺伝子の機能を探 る上では重要であるため、構成員を明らかにする必要がある。

対立遺伝子の優劣性と orf20 様遺伝子機能の関係

前項では、いくつかのタンパク質複合体の消長が preSATP6 と ORF20 様タンパク質の相互作 用による preSATP6 高次構造の変化に起因する可能性を論じた。このタンパク質複合体の消長 は orf20_{NK-198}が関与する場合でのみ見られた。テンサイにおいて、劣性対立遺伝子に対応する

分子バリアントは3種である可能性が高く(Ohgami *et al.* 2016)、本章ではその全てについて preSATP6 と ORF20 様タンパク質の相互作用を検討した。その結果、*rf1* で発見されている4 種の orf20 様遺伝子(orf20L、orf20s、orf20_{NK-219-2}、及び orf20_{NK-219-3})を導入したカルス及びそ れらの遺伝子を保持する系統の葯においては、orf20_{NK-198}導入カルスや NK-198 *Rf1* を保持する 葯で見られたようなタンパク質複合体の消長は検出されなかった。すなわち、これらの結果は、 いずれの遺伝子も相互作用能を保持しないことを示している。従って、preSATP6 と ORF20 様 タンパク質の相互作用が稔性回復に重要である可能性が示唆された。

一方で, rf1 保持植物体の未熟葯における orf20 様遺伝子の発現量は、稔性回復系統 NK-198 と比較して 0.3~0.6 倍程度に減少していた。分子バリアント別に見た場合、発現量は orf20 様 遺伝子のコピー数と相関しているように見える。すなわち、orf20L を 2 コピー持つ TA-33BB-CMS と、orf20L+orf20s の TA-33BB-CMS x PI 615522 は最も少なく、orf20L+ orf20_{NK-219-2}+orf20_{NK-219-3} の TA-33BB-CMS x PI 518644 がそれに続き、orf20L+orf18+orf19+ orf20_{NK-198}+orf21 の NK-198_B2 が最も多い。preSATP6-ORF20 相互作用能を保持しない orf20 様 遺伝子コピーの発現量が増えても稔性回復が起こらないということは、この相互作用が稔性回 復に重要であることを支持するデータと見て良い。ただし、orf20 様遺伝子の発現量と稔性回 復能の関係については次章以降で検討する。

第3章

作用力の異なる Rfl 対立遺伝子の機能解析

第3章 作用力の異なる Rf1 対立遺伝子の機能解析

緒言

テンサイ *Rf1* 座からは多様なハプロタイプ(分子バリアント)が発見されている。しかしな がら、分子的な多様性が機能的な差異を生ずるのかは不明である。テンサイ系統 NK-305 は、 前章で解析した NK-198 *Rf1* とは異なる未解析の *Rf1* 対立遺伝子を保持することが示唆されてい た(上 2017)。本章では、NK-305 と NK-198 に由来する 2 つの *Rf1* 対立遺伝子の機能の差異を 詳細に調べ、その分子的基盤を調査した。

材料及び方法

3-1. 供試材料

第2章に準ずる。NK-305 は北海道農業研究センター育成の稔性回復系統である。供試材料 は2016~2018年に北海道大学食資源研究棟の隔離温室にて育成し、20℃、24時間日長(自然 日長に加えて、白熱灯により夜間補光した)で育成した。

3-2. Total DNA 抽出

Doyle and Doyle (1990)の方法に従い、緑葉から DNA を抽出した。マルチビーズショッカ ー (Yasui Kikai, Osaka, Japan)を用い、液体窒素中で凍結させた緑葉を粉砕した。CTAB 抽出液 [2% (w/v) CTAB、1% (w/v) PVP、1.4 M NaCl、20 mM EDTA、100 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.2% (w/v) 2-mercaptoethanol]を加えてよく混合し、65°Cで 30 分間加温した。室温で放冷後、クロ ロホルム・イソアミルアルコール溶液 (24:1)を等量加え、転倒混和した後、17,000 g で 15 分 間遠心した。上層を回収し、2-プロパノールを等量加え、穏やかに混合し常温で 5 分間静置し た。17,000 g で 10 分間遠心し、上清を取り除いた後、得られたペレットに TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA]を加え、60°Cで溶解させ粗 DNA 試料とした。

3-3. PCR 及びジェノタイピング

粗 DNA 試料を鋳型として、付表 2-1 に示すプライマー及び反応条件で PCR 反応を行った。 s17-Fw 及び s17-Rv を用いて増幅した PCR 産物は、制限酵素 *Hap* II 及び *Hind* III で消化した。 また、*petG-psbE* 遺伝子間領域のアンプリコンは制限酵素 *Hind* III で消化し、2%アガロースゲ ルを用いた電気泳動により分離した。その他のマーカーの反応液については、TR1 は 2%、s17 は 1.5%、o7 は 0.8%のアガロースゲルを使用した。

3-4. 花粉稔性調查

第2章に準ずる。

3-5. 統計解析

データの解析は R (R Language Definition 2017) 及び Excel (Microsoft, Office 365 Proplus) を 用いた。箱ひげ図の描画、Steel-Dwass test、Tukey-Kramer test 及び Welch's *t* test は R を用いて 行った。Fisher の正確確率検定は http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/exact/exact.html、Steel-Dwass test は http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/R を参照した (2018 年 7 月アクセス)。

3-6. 組織切片の作製及び形態観察

供試材料より花芽を採取し、FAA(50%エタノール、3.7%ホルムアルデヒド、5%酢酸)に浸 漬した。減圧及び減圧解除を繰り返し、組織に FAA を充分に浸透させた後、室温に一晩置き 固定した。FAA を除いた後、エタノールシリーズ(50%、75%、85%、95%)に昇順に各 30 分 ずつ浸漬し、少量の Eosin Yellow を含む 95%エタノール中に一晩静置した。95%エタノールに 30 分浸漬して余分な Eosin Yellow を除き、tert-ブタノール・エタノール混合溶液(1:3、1:1、 3:1)に 30 分ずつ浸漬した後、tert-ブタノールに 37℃で一晩浸漬し、エタノールから tert-ブ タノールへ置換した。その後、tert-ブタノールに浸漬したまま 60℃下に移し、パラフィン (Paraplast Plus, Sigma)を少量ずつ tert-ブタノールに溶解させ、組織中の tert-ブタノールをパ ラフィンに置換した。一晩 60℃にて放置し、完全に tert-ブタノールを蒸発させ、パラフィンブ ロックを作成した。包埋後の組織は、ロータリーミクロトーム (HM360; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて 10 μm の薄片切片化した。その後、薄片切片をスライドガラス(白縁磨フ ロスト No.2 MAS; MATSUNAMI, Kishiwada, Japan) に載せた少量の水滴に浮かべ、そのままス ライドガラスと共に約50℃に保ったパラフィン伸展機で保温し、水を蒸発させるとともに、ス ライドガラスに付着させた。パラフィン伸展機上で 42℃、24 時間以上静置したプレパラート を10分間キシレンに浸漬し、組織よりパラフィンを除いた後、濃度の異なるエタノール(99.5%、 90%, 70%, 50%, 30%, 0%) に降順に 3 分ずつ浸漬し、組織を水和した。0.05%トルイジンブルー にて染色し、水に 3 分間浸漬した後に、風乾させた。エンテランニュー (Merck, Darmstadt, Germany) 及び角カバーグラス 24mm x 24mm Thickness 0.12~0.17mm (MATSUNAMI) を用いて 封入した。室温にて一晩乾固させた後、光学顕微鏡(BX50; OLYMPUS, Tokyo, Japan)にて観 察し、CCD カメラ(OLYMPUS DP21)で写真撮影した。

3-7. Blue native PAGE

第2章に準ずる。

3-8. ウェスタンブロット解析

第2章に準ずる。定量解析の際は、Image J (https://imagej.nih.gov/ij/download.html)を用いてシ グナル強度を数値化した。各実験において検量線を作製することで定量性を確認した。

3-9. SDS-PAGE

第2章に準ずる。

3-10. コンストラクトの作製

第2章に準ずる。

- 3-11. アグロバクテリウム懸濁液の調製 第2章に準ずる。
- 3-12. テンサイ組織培養と形質転換カルスの作出第2章に準ずる。
- 3-13. 粗ミトコンドリア抽出第2章に準ずる。
- 3-14. Total RNA 抽出

第2章に準ずる。

3-15. qRT-PCR

第2章に準ずる。蛍光の検出は DNA-Engine PTC-200 (Bio-Rad) 及び Chromo 4 (Bio-Rad)、 OPTICON MONITOR version 3.1 (Bio-Rad) を用いた。

3-16. マルチプルアラインメント

アラインメントの作成は ClustalW (http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja)により行った。
結果

NK-305 は Rf1 により稔性回復している

NK-305 は新規の *Rf1* をもつ稔性回復系統と考えられたが(上 2017)、その詳細は不明であった。

まず、NK-305 の細胞質型を特徴づけた。TR1 はミトコンドリアゲノムの直列反復配列の反 復数を検出するミニサテライトマーカーである(Nishizawa *et al.* 2000)。TR1 のバンドサイズを、 Owen 細胞質をもつ TA-33BB-CMS や正常細胞質をもつ TA-33BB-O と比較すると、NK-305 は TA-33BB-CMS と同一であった(図 3-1A)。また、葉緑体ゲノムの *petG-psbE* 遺伝子間領域にあ る Owen 細胞質を特徴付ける *Hind* III サイト (Ran and Michaelis 1995)の有無を検出するマー カー (Cheng *et al.* 2009)によって、細胞質型を判定したところ、NK-305 から TA-33BB-CMS と同じバンドパターンが得られた(図 3-1B)。したがって、NK-305 は Owen 細胞質を保持する 系統である。

NK-305 を開花させても雄性不稔個体は見つからないので、これは稔性回復系統である。 NK-305 における稔性回復に Rfl や Rf2 が関わるか検討した。NK-305 を花粉親として、 TA-33BB-CMS(遺伝子型は[S]rf1rf1rf2rf2)と検定交配を行った。得られた F1 は半不稔を示し たため(図 3-2)、これを花粉親としては遺伝解析に十分な個体数が得られないことが懸念され た。そこで、F₁個体を袋がけし、維持系統である TA-33BB-O([N]*rf1rf1rf2rf2*)の花粉を投入し た。これより得られた種子は、わずかな F₁花粉により自殖した F₂、及び TA-33BB-O と F₁の交 配次代である BC1F1 が混在した集団であると考えられる。この集団を温度の管理された温室に おいて育成し、得られた 55 個体を s17 マーカーによるジェノタイピングに供した。 s17 は orf20 様遺伝子クラスター下流の遺伝子間領域に設計された CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) マーカーである(Taguchi et al. 2014)。テンサイ品種では、アンプリコンの制限酵素 断片長の多型から 5 パターンが見つかっている (p1 から p5 と表記)。この集団からは 3 種の s17 電気泳動像が得られたが、それぞれ p2 ホモ接合体 (p2p2 と表記)、p2p4 及び p4p4 と解釈 できた(図 3-3A)。交配親である NK-305 及び TA-33BB-CMS (TA-33BB-O と同一の核遺伝子) 型)の s17 型は、それぞれ p2p2 及び p4p4 であるため(図 3-3A)、p2 アレルは NK-305 由来、 p4 は TA-33BB-CMS 由来であると考えられる。花粉稔性を葯の肉眼観察によって調査したとこ ろ、s17 遺伝子型毎に稔性が有意に異なっていた(表 3-1; p = 4.08 x 10⁻¹³, 稔性回復の有無 vs. 遺 伝子型; p = 1.92 x 10⁻¹⁵, 3 段階評価の稔性 vs. 遺伝子型; Fisher's exact test)。Rf2 の遺伝子型は、 o7 マーカーを用いて調査した。o7 は Rf2 領域(Honma et al. 2014)に座乗している遺伝子 orf7 の第1イントロンの断片長の多型を利用した DFLP(DNA fragments length polymorphism)マー

カーである (濵田 2016)。このマーカーによって、NK-305 では 1.4 kbp (K 型とする)及び TA-33BB-CMS では 2.6 kbp (T 型とする)のシグナルバンドが得られた (図 3-4)。分離集団に おいては、K 型ホモ接合体 (KK とする)、KT 及び TT が得られたものの (図 3-4)、o7 遺伝子 型と稔性回復に有意な相関は認められなかった (表 3-3; p = 1,稔性回復 vs. genotype; p = 0.985, 3 段階評価の稔性 vs. genotype; Fisher's exact test)。

NK-305 Rf1 は NK-198 Rf1 と作用力が異なる

稔性回復系統 NK-198 は優性 *Rf1* を保持し、NK-305 由来の *Rf1* とは異なる分子構造をもつ (Matsuhira *et al.* 2012; 上 2017)。由来の異なる *Rf1* の作用力を検討すべく、NK-198 *Rf1* 分離 集団を育成した。

NK-198 を花粉親として、TA-33BB-CMS に掛け合わせた F₁ を複数個体選び、これら稔性回 復 F₁ をさらに TA-33BB-CMS と交配した。得られた BC₁F₁の内、稔性回復を示す個体を選び出 し、再度 TA-33BB-CMS に戻し交雑した後に自殖することで BC₂F₂ を 83 個体得た。この BC₂F₂ 集団を NK-305 の混合集団と同条件で育成した。NK-198 の s17 電気泳動像は図 3-3B の通りで あり、これは p1p1 と解釈できる。BC₂F₂ 集団では p1p1、p1p4 及び p4p4 が得られ、各々のカテ ゴリーの個体数は期待通りの分離比であった(χ^2 test for 1:2:1; p = 0.081)。花粉稔性を調査した ところ、遺伝子型毎に稔性が有意に異なっていた(表 3-2; $p = 3.58 \times 10^{-9}$, 稔性回復の有無 vs. 遺 伝子型; $p = 5.95 \times 10^{-11}$; 3 段階評価の稔性 vs. 遺伝子型; Fisher's exact test)。

NK-198 *Rf1* 及び NK-305 *Rf1* の間で、稔性回復の程度を比較した。二つの集団(NK-305 の 混合集団及び NK-198 の BC₂F₂集団)の s17 型毎に稔性指数の平均を比べると、p1p1、p1p4 及 び p2p2 はいずれもよく稔性回復しており、群間に有意な差異は認められなかった(class a、図 3-5)。二つの集団の p4p4 はいずれもほぼ完全不稔で、同じグループであるが(class b、図 3-5)、 class a グループとは有意な差が見られた(p < 0.01; Steel-Dwass test)。さらに、p2p4 は稔性回復 しているがその程度は低い。このグループは、class a と class b のいずれとも有意に稔性が異な っていた(class c、図 3-5; p < 0.01; Steel-Dwass test)。

NK-305 Rf1 を保持する葯の発達過程

NK-198 *Rf1* 及び NK-305 *Rf1* が異なる稔性回復の程度を示すメカニズムを探るべく、葯及び 花粉粒を観察した。図 3-5 の class a に属する個体 (p1p1、p1p4 及び p2p2 個体) は正常系統 TA-33BB-O と花粉稔性は同等で、葯が淡黄~黄色を示すとともに裂開した。花粉粒をアレキサ ンダー染色液によって染色すると、細胞質が充実した花粉粒が観察された(図 3-2A, D, G)。 class b に属する個体 (二つの集団由来の p4p4 個体) は、CMS 系統 TA-33BB-CMS と同様、葯は白 くやせ細り、葯内容物に小胞子の残渣が観察された(図 3-2C, F, H)。class c に属する個体(p2p4 個体)の葯はオレンジ色かつ裂開が非常に稀にしか起こらない、典型的な半不稔個体の外観で あった(図 3-2B)。花粉粒については、花粉壁にエキシン様構造が認められるものの、花粉粒 のサイズが可稔個体よりも小さく、細胞質が充実していなかった(図 3-2E)。

次に、花粉形成過程における葯内部構造を調べた。NK-305 Rf1 の混合集団及び NK-198 BC₂F2 集団から s17 型毎に 2~3 個体選び出し、TA-33BB-O を対照として形態学的な調査に供した。 光学顕微鏡によって観察を行ったところ、花粉発達過程は 6 つのステージ(減数分裂期及び四 分子期、小胞子期[Sa, Sb-1, Sb-2]、花粉期)に分けられた(図 3-6、付図 3-1)。以下に、TA-33BB-O におけるこれらのステージの詳細及びシロイヌナズナ(Sanders et al. 1999)との対応を記述す る(図 3-6A-F)。減数分裂期はシロイヌナズナ(Sanders et al. 1999)との対応を記述す る(図 3-6A-F)。減数分裂期はシロイヌナズナ Stage 6 に対応し、花粉母細胞が減数分裂を開始 する。四分子期は Stage 7 に対応し、減数分裂が完了しカロース壁の内部に四分子が観察され る。小胞子期前期(以後、Sa 期とする)は Stage 8 に対応し、カロースが分解され各小胞子が 葯室において遊離している。小胞子期中期(Sb-1 期)は Stage 9 及び 10 に対応し、Sa 期に比 べて小胞子が空胞化しつつサイズが大きくなり、葯壁において内被が発達する。また、タペー ト組織が薄くなり始める。小胞子期後期(Sb-2 期)では、タペートがほぼ消失する。内被にお いて縞状の組織が観察され、これはシロイヌナズナ葯内被における"fibrous bands"の出現という 記述と一致する(Stage 11、Sanders et al. 1999)。花粉期では、小胞子内部が染色されるととも に、口辺細胞が崩壊し、葯が裂開する。

TA-33BB-O、plp1、plp4 及び p2p2 個体(以降、これらを可稔個体と総称)では、すべての ステージにおいて形態的な差異は見られなかった(図 3-6A-L、付図 3-1)。NK-305 の混合集団 由来の p4p4 個体では、減数分裂期及び四分子期において可稔個体との差は観察されなかった (図 3-6S, T)が、その後、顕著な発達異常が見られた。即ち、遊離小胞子を含む葯室における タペートの空胞化、あるいは葯室が変形するとともに凝集した葯内容物が観察され、最終的に 内被の縞状組織が見られるものの葯内容物は消失した(図 3-6U-X)。

一方で、p2p4 個体は Sa 期まで形態的な変化が認められなかった(図 3-6A-C, G-I, M-O; 付図 3-1A-C, G-I)。Sb-1 期では、タペート組織が Sa 期と比較して薄くなるのものの、可稔個体より も厚い傾向にあった(図 3-6D, J, P; 付図 3-1D, J)。Sb-2 期では、可稔個体はタペート組織がほ ぼ消失するのに対し、p2p4 個体ではタペートの残渣が認められた(図 3-6E, K, Q; 付図 3-1E, K)。 花粉期において、可稔個体は葯が裂開し、小胞子の内部が染色されるのに対して、p2p4 個体で は口辺細胞が完全に崩壊せず、葯の裂開が見られない上、小胞子の内部は染色されなかった(図 3-6F, L, R; 付図 3-1F, L)。

NK-305 Rf1 の量的効果と preSATP6 複合体蓄積量の関係

稔性回復系統 NK-198 では未成熟葯において 250kDa 複合体の量が著しく減少する(第2章; 北崎 2009)。NK-305 においても同様な現象が見られるか調べるため、TA-33BB-CMS、NK-198 及び NK-305 の四分子期の未熟葯からタンパク質を抽出し、BN-PAGE による複合体解析を行っ た。抗 preSATP6 抗体を用いた検出では、TA-33BB-CMS から 250kDa のバンドが得られ、NK-198 において 250kDa 及び 200kDa 付近にスメアかつ微弱なシグナルが検出される一方で、NK-305 では 250kDa のバンドがわずかに検出された(図 3-7A)。露光時間を長くすると NK-198 と NK-305 では 200kDa 及び 150kDa が検出され、200kDa のシグナル強度は、NK-198 よりも NK-305 の方が低かった(図 3-7B)。抗 COXI 抗体を用いると、420kDa のシグナルがすべてのサンプル で検出された(図 3-7C)。SDS-PAGE によって preSATP6 タンパク質の単量体の蓄積を調べると、 すべてのサンプルで 39kDa のシグナルが検出されたが、250kDa 複合体蓄積と相関のあるシグ ナル強度の変化は認められない(図 3-7D)。このことより、250kDa 複合体で減少に単量体自体 の減少は関わらないと思われる。

NK-305 *Rf1* による不完全な回復と 250kDa 複合体蓄積量の関連を明らかにすべく、NK-305 の混合集団から s17 型毎に複数個体選び、以下の実験に供試した。抗 preSATP6 抗体による 250kDa のシグナル強度を抗 COXI 抗体の 420kDa(Cytochrome c Oxidase 複合体: COX)のシグ ナル強度で標準化することで、preSATP6 の 250kDa 複合体の量を算出した。ただし、定量性を 確保するために抗体濃度を低くしたことにより、このブロットでは 200kDa や 150kDa のシグナ ルはほとんど検出されない。preSATP6 の 250kDa 複合体の量(preSATP6/COX)は、p4p4 個体 と比較して p2p4 個体は 45%、p2p2 個体は 90%減少し、それぞれ統計的に有意な差であった(図 3-8A, B; p4p4 vs. p2p4, p = 0.0019; p2p4 vs. p2p2, p = 0.0013; Tukey's multiple test)

NK-198 BC₂F₂集団における preSATP6 複合体の蓄積

NK-198 *Rf1* は 250kDa 複合体の蓄積において NK-305 *Rf1* と同様な減少効果を発揮するのか検 証した。NK-198 の BC₂F₂集団から s17 型毎に 3 個体選び、実験に供試した。preSATP6 複合体 の蓄積量 (preSATP6/COX) について、p1p4 個体は p4p4 個体と比べて 90%減少しており、その 差は統計的に有意であった (図 3-9A, B; p = 0.009; Welch's *t*-test)。p1p1 個体においては、この 条件下では 250kDa のシグナルは検出限界以下であった。

集団間でpreSATP6の蓄積量が同じであるか調べるため、NK-198 BC₂F₂分離集団から6個体、 NK-305 の混合集団から4 個体選んで、SDS-PAGE に供した。ウェスタンブロット解析におけ る抗 preSATP6 抗体によるシグナル強度を抗 COXI 抗体シグナルで標準化し、preSATP6 単量体 の蓄積量とした。集団内の蓄積量を比較したところ、NK-198 BC₂F₂集団由来の p1p4 を示す4 個体の平均は 1.51、p4p4 を示す 2 個体の平均は 1.12 であり、それらの間では有意な差は認め られなかった(図 3-10A、p = 0.13; *t*-test)。同様に、NK-305 の混合集団において、p2p4 を示す 1 個体は 0.75、p4p4 を示す 3 個体の平均は 0.82 であった(図 3-10A)。一方、集団間で比較を 行ったところ、NK-198 BC₂F₂集団の方が NK-305 の混合集団よりも preSATP6 の蓄積量が 1.7 倍多く、その差は有意であった(図 3-10B、p = 0.0038; Welch's *t*-test)。

NK-305 Rf1 及び NK-198 Rf1 由来 orf20 様遺伝子に相互作用能はあるか

preSATP6 の 250kDa 複合体の減少には preSATP6-ORF20_{NK-198}間の相互作用が関わる(第2章; 北崎 2009)。本章の前項まで示したように、NK-305 *Rf1* は、花粉稔性回復や 250kDa 複合体の 減少に遺伝子量効果を示す。この量的効果と相互作用能をもつ *orf20* 様遺伝子の関係を調査す べく、まず NK-305 と NK-198 それぞれの *Rf1* 座に含まれる 6 つの遺伝子コピー (NK-305 *Rf1: orf20_{NK-305-1}*, *orf20_{NK-305-2}*; NK-198 *Rf1: orf18, orf19, orf20_{NK-198}*, *orf21*; Matsuhira *et al.* 2012、上 2017) の翻訳産物の機能を特徴づけた。

第2章と同様にして、FLAG タグを付加した各コピーを高発現するテンサイ形質転換カルス を作出した。得られたカルスから粗ミトコンドリアを抽出し、SDS-PAGE を用いたウェスタン ブロット解析によって導入タンパク質の蓄積を調べた。抗 FLAG 抗体によって、orf20_{NK-305-1} 導入カルスでは 43kDa と 41kDa にシグナルが得られ、orf20_{NK-305-2}導入カルスでは 44kDa にシ グナルが検出された(図 3-11A)。orf18 及び orf19 導入カルスでは、43kDa と 41kDa の 2 つの バンドが得られ、orf21 導入カルスでは 43kDa のシグナルのみが検出された(図 3-12A)。

BN-PAGE でタンパク質複合体を分離し、抗 preSATP6 抗体を用いたウェスタンブロットを行 ったところ、すべてのサンプルで 250kDa のバンド及び高分子側にスメアなシグナルが得られ たのに加え、200kDa のバンドが orf20_{NK-305-1}、orf18、orf19、orf20_{NK-198} 及び orf21 導入カルス由 来のサンプルで検出された一方で、orf20_{NK-305-2} 及び empty vector 導入カルスでは検出されなか った (図 3-11B、図 3-12B)。200kDa 複合体は、orf20 様遺伝子と preSatp6 間のタンパク質間相 互作用の指標である (第 2 章) ため、NK-305 *Rf1* 及び NK-198 *Rf1* に含まれる orf20 様遺伝子の うち、orf20_{NK-305-2} を除くすべての遺伝子コピーの翻訳産物は preSATP6 と相互作用する可能性 が示唆された。

Rf1 の量的効果には相互作用能をもつ遺伝子コピーの発現量が関わる

*Rf1*の遺伝子量効果と転写産物量の関係を検討した。NK-198 BC₂F₂集団及び NK-305 の混合 集団から、s17 遺伝子型毎に 3~5 個体ずつ選び、花粉発達ステージ毎に未成熟葯を採取し、 qRT-PCR を行った。 まず、NK-305 の混合集団の調査を行った。第1エキソンの多型より、*orf20_{NK-305-1}*特異的プ ライマーを設計することができた(付図 3-2)。これを用いて qRT-PCR を行ったところ、各発 達ステージにおいて p2p2 個体由来のサンプルは p2p4 個体よりも mRNA 量が 1.5~2.2 倍多く、 これは有意であった(表 3-4、p < 0.05; Welch's *t*-test)。p4p4 個体では蛍光シグナルが得られな かったことにより、このプライマーの特異性が確認された。

次に、NK-198 BC₂F₂集団を加えて調査を行った。NK-198 *Rf1* についてはそれぞれの遺伝子 コピー特異的なプライマーを設計できないため(第2章; Matsuhira *et al.* 2012)、*orf20* 様遺伝子 共通のプライマーを実験に用いた(図 3-13、表 3-5)。各ステージにおいて、p1 及び p2 ホモ接 合体はそれぞれのヘテロ接合体よりも発現量が高い傾向にあり、それぞれ 1.52~1.91 倍、1.35 ~1.80 倍高かった(表 3-5、リファレンス遺伝子 *Actin*)。また、ホモ接合体間、及びヘテロ接 合体間で比較すると(すなわち p1p1 vs. p2p2、p1p4 vs. p2p4)、各ステージにおいて p1 保持個 体は p2 保持個体よりも高い発現を示す傾向にあった(表 3-5、ホモ接合体:1.24~1.53 倍、ヘ テロ接合体:1.15~1.25 倍; リファレンス遺伝子 *Actin*)。NK-305 集団由来の p4p4 個体は、開 花前の葯をバルクで集め定量したところ、調査した個体の中で最も低い発現量であった。



図 3-1 細胞質マーカーによるジェノタイピング

ミトコンドリアマーカーTR1(A)およびpetG-psbE遺伝子間領域を利用した色素体マーカー(B)のPCR反応液を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動した後のEtBr染色像を示す。左側にDNA断片長(kbp)を示し、*は非特異的なバンドを示す。Bにおいては、Owen細胞質をもつTA-33BB-CMSはpetG-psbE遺伝子間領域にHind IIIサイトがあるため、0.8 kbpのDNA断片が0.5 kbp及び0.3 kbpに消化される一方で、正常細胞質をもつTA-33BB-OはHind IIIによって消化されないため、0.8 kbpのDNA断片が検出される。



図3-2 代表的なテンサイ葯の外観及び花粉染色像

A-C, 開花後のテンサイ葯の外観を示す。Aが可稔、Bが半不稔、Cが不稔の葯である。

D-H, アレキサンダー染色による染色像を示す。D-Fは、NK-305の混合集団のうちs17型毎の代表的 な花粉粒を示す。Dが可稔(p2p2)、Eが半不稔(p2p4)、Fが不稔(p4p4)である。Gは維持系統 TA-33BB-O、HはCMS系統TA-33BB-CMSの花粉粒を示す。スケールバーは50μmを示す。



図 3-3 CAPSマーカーs17によるジェノタイピング

s17の反応液を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動した後のEtBr染色像を示す。(A)は、NK-305の混合集団、(B)はNK-198のBC₂F₂由来のサンプルの泳動像を示す。左側に反応産物のDNA断片 長(kbp)を示し、それぞれのレーンの下部にs17型を示す。pattern-2(p2)は1.4 kbp及び0.5 kbp、p4 は1.1 kbp及び0.6 kbp、p1は1.1 kbp及び0.8 kbpのDNA断片が検出される(Taguchi *et al.* 2014)。

.17					
(DNA fragments length、kbp)	Fully fertile ¹	Partial fertile ²	Sterile ³	Total	
p2p2	7	1	0	o	
(0.5, 1.4)		8	0	0	
p2p4	4	19	1	24	
(0.5, 0.6, 1.1, 1.4)	23		1	24	
p4p4	0	1	22	22	
(0.6, 1.1)	1		22	23	
T-4-1	11	21	22	5.5	
Total	32		23		

表 3-1 NK-305の混合集団におけるs17型と花粉稔性の分離

 1 N & L \langle / \ddagger S.S.a 2 S.S.b 3 C.S.

表 3-2	NK-198のBC ₂ F ₂ 集団におけるs17型と花粉稔性の分離				
17			Male fertility		
	s17				

17		Male leftility			
s17 (DNA fragments length、kbp)	Fully fertile ¹	Partial fertile ²	Sterile ³	Total	
p1p1	14	2	0	16	
(0.8, 1.1)	1	6	0	10	
p1p4	45	4	2	52	
(0.6, 0.8, 1.1)	49		3	52	
p4p4	0	3	12	15	
(0.6, 1.1)		3	12	15	
Total	59	9	15	02	
Total	68		15	83	

٦

Т

¹NもしくはS.S.a²S.S.b³C.S.



図 3-4 DFLPマーカーo7によるNK-305の混合集団のジェノタイピング o7の反応液を、0.8%アガロースゲルを用いて電気泳動した後のEtBr染色像を示す。左側に反応産 物のDNA断片長(kbp)を示し、下部にo7型を示す。

表 3-3 NK-305の混合集団におけるo7遺伝子型と花粉稔性の分離 Male fertility

о7	Fully fertile ¹ Partial fertile ²		Sterile ³	Total	
VV	2	3	2	0	
KK		5	3	8	
VТ	6	10	12	28	
K1	1	6	12	20	
TT	3	8	Q	10	
11		1	0	19	
Total	11	21	22	55	
10181	3	2	23	33	

 1 N & L < lt S.S.a 2 S.S.b 3 C.S.



図 3-5 s17型と花粉稔性

縦軸は稔性指数の平均値、横軸はs17型を示す。箱ひげ図のひげの上端と下端はそ れぞれ外れ値を除いた最大値と最小値、箱の上端は第三四分位、太線は中央値、箱 の下端は第一四分位を示す。白丸は外れ値を示す。上側のアルファベットは各クラ スを示し、異なるクラスの間に有意な差が検出された(p<0.01; Steel-Dwass test)。



図 3-6 花粉発達ステージ毎の未成熟葯の横断切片

維持系統TA-33BB-OおよびNK-305の混合集団の葯横断切片を花粉発達ス テージ毎(減数分裂期~花粉期)に作製した。TA-33BB-O(A-F)、p2p2個体 (G-L)、p2p4個体(M-R)の葯形態を示す。p4p4個体(S-X)の未熟葯のう ち、四分子期以降(U-X)は小胞子が正常な発達を示さなかった。Meiosis:減 数分裂期、Tetrad:四分子期、Microspore:小胞子期、Pollen:花粉期



図 3-7 未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析

TA-33BB-CMS (レーン1)、NK-198 (レーン2)、NK-305 (レーン3,4)の未成熟葯から タンパク質を抽出し、Blue native PAGE (A-C)及びSDS PAGE (D)の後にウェスタンブ ロット解析を行った結果を示す。中央の数字は分子量 (kDa)を示す。

(A) 抗preSATP6抗体(340 ng/ml)を用いて、露光時間10秒で検出したブロット像を示す

(B) Aと同じブロットで、露光時間5分で検出したブロット像を示す

(C) Aと同じメンブレンで抗COXI抗体(42.5 ng/ml)を用いて検出したブロット像を示す

(D) 抗preSATP6抗体(42.5 ng/ml) で検出したブロット像を示す





s17	n	Mean \pm SD	<i>p</i> -value
p4p4	3	1.568 ± 0.164	0.0019
p2p4	3	0.857 ± 0.068	0.0013
p2p2	2	0.118 ± 0.014	

図 3-8 NK-305混合集団の未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析 NK-305の混合集団のs17遺伝子型毎に複数個体選んで未成熟葯からタンパク質を抽出し、Blue native PAGE、ウェスタンブロット解析、及び定量解析を行った結果を示す。

(A) 上のブロット像は抗preSATP6抗体(68 ng/ml)で検出し、下のブロット像はAと同じメンブレンで抗COXI抗体(42.5 ng/ml)により検出した。左側の数字は分子量(kDa)を示す。

(B) preSATP6の250kDa複合体の量(抗preSATP6抗体による250kDaのシグナル強度を抗COXI抗体 による420kDaのシグナル強度で除した値)を示す。nは個体数、SDは標準偏差、*p*-valueはTukey-Kramer testによる検定のp値を示す。



(B)

s17	n	Mean \pm SD	<i>p</i> -value
p4p4	3	1.741 ± 0.258	0.009
p1p4	3	0.169 ± 0.022	-
plpl	3	ND	

図 3-9 NK-198集団の未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析 NK-198 BC₂F₂集団のs17遺伝子型毎に複数個体選んで未成熟葯からタンパク質を抽出し、Blue native PAGE、ウェスタンブロット解析、及び定量解析を行った結果を示す。

(A) 上のブロット像は抗preSATP6抗体(68 ng/ml)で検出し、下のブロット像はAと同じメンブレンで抗COXI抗体(42.5 ng/ml)で検出した。左側の数字は分子量(kDa)を示す。

(B) preSATP6 250kDa複合体の量(抗preSATP6抗体による250kDaのシグナル強度を抗COXI抗体による420kDaのシグナル強度で除した値)を示す。nは個体数、SDは標準偏差、p-valueはWelch's t-testによる検定のp値を示す。



 0.80 ± 0.07

NK-305

4

図 3-10	2つの集団の未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析
NK-198	BC ₂ F ₂ 集団およびNK-305の混合集団の未成熟葯からタンパク質を抽出し、SDS PAGE、
ウェスタ	ンブロット解析、及び定量解析を行った結果を示す。

_

_

(A) レーンの上部に集団名を示し、その下に各個体のs17型をそれぞれ示す。左側の1及び0.5はサ ンプルの希釈倍率を示す。上のブロット像は抗preSATP6抗体(42.5 ng/ml)で検出し、下のブロット 像は抗COXI抗体(42.5 ng/ml)で検出した。レーン下側にpreSATP6単量体の蓄積量(抗preSATP6抗 体と抗COXI抗体のシグナル強度の比)、ブロット像左側に検出に用いた抗体、ブロット像右側の数 字は分子量(kDa)を示す。

(B) preSATP6単量体の量(抗preSATP6抗体による39kDaのシグナル強度を抗COXI抗体による 42kDaのシグナル強度で除した値)を示す。nは個体数、SDは標準偏差、*p*-valueはWelch's *t*-testによ る検定のp値を示す。



図 3-11 NK-305 *Rf1* に含まれる*orf20*様遺伝子コピーを導入した形質転換カルスを 用いたウェスタンブロット解析

形質転換カルスから抽出したタンパク質を用いたウェスタンブロット解析である。各ブロット像の上部に導入したコンストラクト名を示す。VectorはEmpty vectorを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

(A) SDS PAGEにより得られたブロット像を示す。上のブロット像は抗DDDDK抗体(αFLAG、100 ng/ml)で検出した。下のブロット像は同一のメンブレンに対して抗COXI抗体(αCOXI、42.5 ng/ml)で検出した。ブロット像右側の*は非特異的なシグナルを示す。

(B) Blue native PAGEにより得られたブロット像を示す。抗preSATP6抗体を340 ng/mlに希釈して検出に用いた。右側の赤矢印は、200kDa複合体のシグナルの位置を示す。



図 3-12 NK-198 Rfl に含まれるorf20様遺伝子コピーを導入した形質転換カルスを 用いたウェスタンブロット解析

形質転換カルスから抽出したタンパク質を用いたウェスタンブロット解析である。各ブロット像の上部に導入したコンストラクト名を示す。VectorはEmpty vector、Blankは空白のレーンである。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

(A) SDS PAGEにより得られたブロット像を示す。上のブロット像は抗DDDDK抗体 (αFLAG、 100 ng/ml) で検出し、下のブロット像は同一のメンブレンに対して抗COXI抗体 (αCOXI、42.5 ng/ml) で検出した。

(B) Blue native PAGEにより得られたブロット像を示す。抗preSATP6抗体を340 ng/mlに希釈して検出に用いた。右側の赤矢印は、200kDa複合体のシグナルの位置を示す。

表 3-4 *orf20_{NK-305-1}*特異的なプライマーを用いたqRT-PCRにより見積もった未成熟葯におけるmRNA蓄積量(Mean ± SD; *p*-value, Welch's *t*-test)

	D.C		s17			
Developmental stage	gene	p2p2 (n=5)	p2p4 (n=4)	p4p4 (n=3)	(p2p2 vs. p2p4)	<i>p</i> -value
Meiosis		0.285 ± 0.079	0.177 ± 0.015	ND	1.61	0.0147
Tetrad	Actin	0.357 ± 0.112	0.188 ± 0.002	ND	1.9	0.0168
Microspore		0.185 ± 0.067	0.122 ± 0.031	NA	1.52	0.0548
Meiosis		0.097 ± 0.036	0.055 ± 0.009	ND	1.77	0.017
Tetrad	eflα	0.115 ± 0.046	0.053 ± 0.005	ND	2.16	0.009
Microspore		0.078 ± 0.009	0.043 ± 0.017	NA	1.8	0.048

ND: Not detected, NA: Not applicable



図 3-13 未成熟葯におけるorf20様遺伝子のmRNA量

花粉発達ステージ毎に収集した未成熟葯からTotal RNAを抽出し、qRT-PCRに供 試した。縦軸は、Actinをリファレンス遺伝子とした時のorf20様遺伝子の相対発現 量の平均を示す。エラーバーは標準偏差を示す。横軸には、サンプルのs17型およ び発達ステージを示す。p4p4はNK-305の混合集団由来であり、花粉発達ステージ を分けずに回収した未成熟葯を実験に供した。

表3-5 *orf20*様遺伝子に共通なプライマーを用いたqRT-PCRによるmRNA蓄積 量の見積もり

(A)	Developmental	a 17	Maan SD	Fold c		hange	
	Stage	S1 /	Mean±SD	Homo vs	Homo vs. Hetero		s. p2
		p1p1	1.09 ± 0.27	1	1 77*	Homo	1.53*
	Maiasis	p1p4	0.62 ± 0.14	pı	1.//*	Hetero	1.16
	Melosis	p2p2	0.71 ± 0.14		1.25		
		p2p4	0.53 ± 0.05	p2	1.55		
		p1p1	0.98 ± 0.19	1	1 01**	Homo	1.32
	Tatrad	p1p4	0.52 ± 0.06	pı	1.91**	Hetero	1.25
	Tetrad	p2p2	0.74 ± 0.13	2	1 0.0*		
		p2p4	0.41 ± 0.12	p2	1.80*		
		p1p1	0.49 ± 0.09	1	1.50	Homo	1.24
		p1p4	0.32 ± 0.10	pı	1.32	Hetero	1.15
	Microspore	p2p2	0.39 ± 0.09		1 4 1		
		p2p4	0.28 ± 0.08	p2	1.41		
	-	p4p4	0.22 ± 0.04				

(B)

Developmental	-17	MaartSD		Fold c	hange	
Stage	817	Mean±SD	Homo vs	s. Hetero	pl v	s. p2
	p1p1	0.32 ± 0.07	<i>n</i> 1	1 0.0**	Homo	1.39
Maiagig	p1p4	0.16 ± 0.04	pı	1.98**	Hetero	0.97
Wielosis	p2p2	0.23 ± 0.06	<i>a</i> 2	1 2 9		
	p2p4	0.17 ± 0.02	p2	1.38		
	p1p1	0.33 ± 0.05	- 1	1 00**	Homo	1.49**
Tatural	p1p4	0.17 ± 0.01	pı	1.89**	Hetero	1.60*
letrad	p2p2	0.22 ± 0.02		2.02**		
	p2p4	0.11 ± 0.03	p2	2.03***	2.03**	
	p1p1	0.22 ± 0.04	- 1	1.52*	Homo	1.47*
	p1p4	0.15 ± 0.04	pı	1.53*	Hetero	1.59
Microspore	p2p2	0.15 ± 0.03	2	1.65		
	p2p4	0.09 ± 0.02	p∠	1.05		
-	p4p4	0.06 ± 0.01				

リファレンス遺伝子は*Actin*(A)及び*ef1a*(B)である。s17型がp1p1, p1p4及 びp4p4を示すそれぞれ3個体、p2p2を示す5個体, p2p4を示す4個体を実験に供 した。p4p4個体はNK-305混合集団由来であり、花粉発達ステージを分けずに 回収した未成熟葯を用いた。(*p < 0.05, **p < 0.01; Tukey-Kramer test)

表 3-6 preSATP6の250kDa複合体の蓄積量と花粉稔性の関係

Population	s17	preSATP6 250kDa	Male fertility
	p4p4	1.000	Sterile ¹
NK-305 admixture	p2p4	0.547	Partial fertile ²
udilliAture	p2p2	0.075	Fully fertile ³
NK-198	p1p4	0.166 ^a	Eully fortile
BC_2F_2	p1p1	Not Detected	runy tertite

^a preSATP6の単量体の量を補正した値を示す ¹ C.S. ² S.S.b ³ NもしくはS.S.a

考察

本章では、テンサイに完全優性を示す *Rf1*(すなわち NK-198 *Rf1*)と不完全優性を示す *Rf1* (NK-305 *Rf1*)の2つの対立遺伝子があり、その分子基盤が preSATP6 複合体の蓄積量に関係 することを明らかにした。

優性 Rf1 対立遺伝子の分子バリアントからは相互作用能のある orf20 様遺伝子が見つかる

本章では、NK-305 *Rf1* にコードされている 2 つの *orf20* 様遺伝子のうち 1 つと、NK-198 *Rf1* にコードされている 4 つ全ての *orf20* 様遺伝子が preSATP6 との相互作用能を持つタンパク質を コードしていることを明らかにした。これは劣性対立遺伝子由来の *orf20* 様遺伝子のいずれも 相互作用能を示されないこと(前章)とは対照的であり、preSATP6 と相互作用能を持つタン パク質をコードすることと稔性回復に関係のあることが支持された。

Rf1 対立遺伝子の遺伝子量効果の分子基盤

NK-305 *Rf1* はホモ接合とヘテロ接合で稔性回復の程度が異なり、これは遺伝子量効果で説明 できる。本章の結果は、この遺伝子量効果が *orf20* 様遺伝子の mRNA 量と関係する可能性を示 している。すなわち、ホモ接合とヘテロ接合では 1.35 から 2.03 倍(共通プライマー)の差異 が検出された。一方、NK-305 *Rf1* には preSATP6 とタンパク質間相互作用が可能な *orf20_{NK-305-1}* とそのような能力を持たない *orf20_{NK-305-2}* がコードされている。前章で述べたように、相互作用 能を持たないコピーの mRNA 量は稔性回復に影響しない。従って、NK-305 *Rf1* の遺伝子量効 果に関わるのは専ら *orf20_{NK-305-1}* ではないかと思われる。実際、*orf20_{NK-305-1}* 特異的プライマーに よる解析結果ではホモ接合とヘテロ接合で 1.52 から 2.16 倍の差異が検出されており、矛盾は ない。

このような視点で NK-198 *Rf1* を見た場合、ホモ接合とヘテロ接合では mRNA 量に 1.52 から 1.98 倍の差異が見られた。NK-305 *Rf1* とは異なり、NK-198 *Rf1* の 4 コピーの *orf20* 様遺伝子は いずれも相互作用できるので、この結果は相互作用能を持つコピーの mRNA 量の差である。 よって、mRNA 量からは NK-198 *Rf1* にも量的効果が認められることになる。

NK-305 *Rf1* と NK-198 *Rf1* の間で相互作用能を持つコピーの mRNA 量を正確に比較するには、 *orf20_{NK-305-2}* 以外の全てを認識するプライマーが必要であるが、これは困難である。便法として、 共通プライマーによる比較を行ったところ、NK-198 *Rf1* は NK-305 *Rf1* よりも *orf20* 様遺伝子の mRNA 量が高い傾向にあった。これは、各対立遺伝子に含まれる *orf20* 様遺伝子のコピー数を 反映していると見て良く、NK-198 *Rf1* の方が強い対立遺伝子であることと一致する。なお、各

コピーにおけるアミノ酸変異については検討していないため、遺伝学的な作用力との関係につ いて今後の検討が必要である。

preSATP6の250kDa 複合体の量は相互作用能を持つ orf20 様遺伝子の mRNA 量に負に相関する

NK-305 Rf1 と NK-198 Rf1 なる対立遺伝子の遺伝子量を変ずることにより、preSATP6 と相互 作用能を持つ orf20 様遺伝子の mRNA 量は段階的に変わる。本章では、これが preSATP6 の 250kDa 複合体の蓄積量に影響することを見出した。NK-305 Rf1 の場合、分離集団における preSATP6 の 250kDa 複合体の蓄積量は, rf1rf1 個体を基準とすると Rf1rf1 個体では 1/2、Rf1Rf1 個体では 1/10 程度であった。一方で、NK-198 Rf1 の場合、分離集団における preSATP6 複合体 は、Rf1rf1 個体は rf1rf1 個体の 1/10 程度であり、Rf1Rf1 個体は検出限界以下であった。各遺伝 子型の orf20 様遺伝子の mRNA 量を踏まえると、preSATP6 複合体の蓄積量は相互作用能を持 っ orf20 様遺伝子の mRNA 量と負に相関していると見て良い。これら 2 つの集団において Rf1 遺伝子型に依存した preSATP6 単量体の蓄積量の変化は見られないことから、複合体の減少に 単量体の分解は関っていない可能性が高い。おそらくは、mRNA 量に応じて ORF20 様タンパ ク質が翻訳され、その量に応じて preSATP6 高次構造の変更の程度が決まるのであろう。

一方、NK-198 *Rf1* 分離集団と NK-305 *Rf1* 分離集団では preSATP6 蓄積量が異なることが分か った。両集団の p4p4 個体を比較しても蓄積量に差があることから、これは *Rf1* 遺伝子型とは 無関係であろう。両集団は核遺伝子背景が斉一ではないので、何らかの別な遺伝因子が関与し ているかもしれない。あるいは、試料を採取する際の環境条件や植物体のコンディションが影 響している可能性もある。今後、この点について調査を進める必要がある。

preSATP6 の 250kDa 複合体の蓄積量と表現型

対立遺伝子の組み合わせを変更し、250kDa複合体の蓄積量を段階的に変えることができた。 2 つの集団間の preSATP6 単量体の蓄積量の差を考慮し、遺伝子型毎の 250kDa 複合体の蓄積量 を求めると、表 3-6 に示す結果となる。これより、250kDa 複合体の蓄積量については NK-305 *Rf1* と NK-198 *Rf1* のいずれもが遺伝子量効果を示したことが分かる。すなわち、分子レベルでは いずれの対立遺伝子も不完全優性とみなせることになる。

このことと、花粉稔性回復との関係を検討した。まず、250kDa 複合体の蓄積量は概ね花粉 稔性回復と逆相関の関係にあることが示唆される。表 3-6 によれば、NK-305 の *rf1rf1* 個体にお ける 250Da 複合体の蓄積量を 1 とすると、いずれも完全稔性回復である NK-198 *Rf1* 分離集団 の *Rf1Rf1* 個体は検出限界以下 (ND)、*Rf1rf1* 個体は 0.166 である。同じく稔性回復個体である

NK-305 *Rf1* 分離集団の *Rf1Rf1* 個体では 0.075 となる。半不稔である NK-305 集団における *Rf1rf1* 個体は 0.547 である。この結果より、250kDa 複合体の蓄積量が ND から 0.166 までが完全稔性 回復、0.547 では半不稔、1 が完全不稔という対応関係が明らかになった。これより、0.166 と 0.547 の間に表現型として完全回復と半不稔を隔てる閾値が、0.547 と 1 の間に半不稔と完全不 稔を隔てる閾値が存在する可能性が示唆される。もしくは、本章では半不稔を示す遺伝子型を 一つしか解析していないので、あるいは 0.166 から 1 の範囲では花粉稔性と線形の関係にあり、 より細かく対応する表現型が異なるかもしれない。このことを明らかにするためには、新たに 異なる 250kDa 複合体の蓄積量を示す葯の表現型を調べる必要がある。一方で、250kDa 複合体 蓄積が ND から 0.166 まで蓄積しても、見かけ上表現型が変わらない(花粉稔性に影響がない) ことについては、環境を変じた場合の影響などを検討し、表現型の差異が現れるかどうか調べ る必要がある。

半不稔という表現型から考える CMS 発現機構

正常な花粉発達には小胞子期のタペート退化が不可欠である(Sanders et al. 1999)。NK-305 RfI 分離集団における Rf1rf1 半不稔個体ではタペート組織の退化が不十分であり、rf1rf1 不稔個 体ではタペート退化の代わりに空胞化が観察された。したがって、preSATP6の250kDa 複合体 の蓄積を量的に変じた場合、タペート退化が最も影響を受けることが示された。これは、稔性 回復株において orf20 様遺伝子の mRNA が葯発達初期にタペートで検出されること(松平 2007 と第5章)、及び orf20 様遺伝子の標的が preSATP6 であることと関連するように見える。タペ ートは花粉粒へ栄養を供給するなど花粉形成に重要な役割を果たす組織の一つであり、退化の タイミングの異常は花粉稔性に大きく影響する (Sanders et al. 1999)。 タペートの退化にはプロ グラム細胞死 (PCD: Programmed Cell Death) が関わり、タペート PCD の異常はいくつかの CMS 及び雄性不稔変異体で報告されている(Touzet and Meyer 2014; Gómez et al. 2015)。本章で示し たようなタペートの不十分な退化は、PCD の開始のタイミングが遅れているか、あるいは PCD のシグナルが不十分であるという、二つの可能性を示唆している。予備的ながら、タペート PCD の実行因子である UNDEAD (Phan et al. 2011)の mRNA を定量すると、四分子期において不稔 個体ではほとんど検出されず、半不稔個体は完全回復個体の約 1/3 程度であった(付表 3-1)。 他のステージではいずれの個体においても mRNA はほとんど検出されなかった。これらのこ とから、タペート退化が不十分である原因は、PCD の実行の遅れというよりは、シグナルの量 が不十分であることを示唆している。今後、詳細な検証が必要である。

preSATP6 複合体とタペート PCD を結びつける因子の 1 つとして、ROS (Reactive Oxygen

Species、活性酸素種)が挙げられる。ROS レベルとタペート PCD の関連はイネ、シロイヌナ ズナの雄性不稔変異体(Hu et al. 2011; Xie et al. 2014)やタバコ及びトマト(Yu et al. 2017)で 報告されている上、いくつかの CMS 植物でも報告されている (Balk and Leaver 2001; Jiang et al. 2007; Luo et al. 2013)。 テンサイにおいても CMS と ROS レベルは密接な関係にあるかもしれな い。前章で述べた通り、preSATP6の250kDa複合体はホモオリゴマーである可能性が高い。他 植物種における S-ORF ホモオリゴマーはダイコンとトウモロコシで報告されている (Rhoads *et* al. 1998; Duroc et al. 2009)。ダイコンでは、ホモオリゴマーが穏和な脱共役作用を示すことが示 唆されている(Duroc *et al.* 2009)。preSATP6 ホモオリゴマーも脱共役作用を保持するならば、 その蓄積量に比例してミトコンドリアの ROS レベルが変化するかもしれない。これと関連し て、培養細胞由来の CMS ミトコンドリアでは膜電位が低下している(荒河 2016)。さらに、 予備的なデータでは COX の活性は正常型と比べて 85%であった。テンサイ野生ビート由来の G型 CMS では COX 活性は正常型よりも 50%低下しており、これは COX サブユニットの変異 により、異常な COX 複合体が形成されるためと考えられている(Ducos et al. 2001; Meyer et al. 2018)。由来の異なる CMS ミトコンドリアであっても、類似の生理学的な特徴を示すのは興味 深い。電子伝達鎖は ROS の主要な生産の場となっている(Murphy 2009)ため、CMS ミトコン ドリアにおいて ROS レベルが変化しているという共通点があるかもしれない。今後、未成熟 葯における詳しい調査が必要である。

第4章

フダンソウから発見された Hypomorphic な *Rf1* 対立遺 伝子の特徴づけと稔性回復能の検出法について

第4章 フダンソウから発見された Hypomorphic な *Rf1* 対立遺伝子の特徴づけと稔性回復能の検 出法について

緒言

内山(2017)によれば、フダンソウ「仏国大葉」は第4染色体に連鎖する弱い稔性回復遺伝 子を保持し、この遺伝子の作用を強める修正遺伝子が、第3染色体上の rfl 座に密接に連鎖す るという。本章では、仏国大葉の orf20 様遺伝子の機能を調査することで、rfl の作用力や修正 遺伝子との関連を明らかにした。次に、今までに知見を総合し、orf20 様遺伝子の機能に基づ いた新規 Rfl マーカーを開発した。このマーカーの有効性を確かめるべく、未知遺伝資源を用 いた実証実験を行った。

材料及び方法

4-1. 供試材料

フダンソウ(*B. vulgaris* ssp. *vulgaris* Leaf Beet Group)「仏国大葉」は、農業生物資源ジーンバン クのアクセッションである(大神 2013)。

PI 546397 と PI 604551 はそれぞれデンマーク及びイタリア(ベネチア)原産の野生ビート (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*)で、いずれも United States Department of Agriculture (USDA)から 入手した。Kleinwanzlebener E (BETA81)、Weisse Kleinwanzlebener (BETA86)及び Kleinwanz-Zz (BETA1258) はいずれもドイツの古いテンサイ集団選抜品種で、The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK)から入手した。USDA から入手した Klein E (PI 590588) はおそらく Kleinwanzlebener E と同一品種と思われる。その他は第2章及び第3章に準ずる。

4-2. Total DNA 抽出

第3章に準ずる。

4-3. ジェノタイピング

第3章に準ずる。用いたプライマー及び反応条件は付表 2-1 に示す。o20-Dra は 1.5%、o19-Xsp は 2.0%アガロースゲルにより泳動した。

4-4. 花粉稔性調查

第2章に準ずる。

4-5. Blue native PAGE

第2章に準ずる。

4-6. ウェスタンブロット解析

第2章に準ずる。

4-7. SDS-PAGE

第2章に準ずる。

4-8. 形質転換

第2章に準ずる。

4-9. コンストラクトの作製

第2章に準ずる。用いたプライマーは付表 2-1 に示す。

- 4-10. アグロバクテリウム懸濁液の調製第2章に準ずる。
- 4-11. テンサイ組織培養と形質転換カルスの作出 第2章に準ずる。
- 4-12. 粗ミトコンドリア抽出第2章に準ずる。
- 4-13. Total RNA 抽出

第2章に準ずる。

4-14. qRT-PCR

第2章及び第3章に準ずる。

4-15. マルチプルアラインメント第3章に準ずる。

4-16. 統計解析

第3章に準ずる。

結果

仏国大葉は hypomorphic な rf1 対立遺伝子を持つ

仏国大葉の rfl アレルの機能を分子レベルで調査するため、以下のように仏国大葉の rfl アレ ルを保持する個体を育成した。仏国大葉を花粉親として TA-33BB-CMS にかけ合わせた F₁の内、 Rf2 領域が TA-33BB-CMS 型である個体(劣性 rf2 ホモ接合)を o7 マーカー(第3章)により 選び出した。これを、TA-33BB-O と 2 回戻し交配した BC₂F₁を温室において育成した。s17 に よってジェノタイピングを行うと p4p4 及び p4p5 の 2 種類の遺伝子型が得られた(図 4-1)。仏 国大葉の s17 型は p5p5 のみが検出されている(大神 2013)ことから、p4p5 ヘテロ接合体は仏 国大葉 rfl 及び TA-33BB-CMS rfl をヘテロでもつ個体とみなすことができる。p4p5 個体におい て、葯の外観は完全な花粉不稔であったものの、葯内容物には TA-33BB-CMS とは異なり花粉 壁がわずかに発達した小胞子の残渣が観察された(図 4-2)。

CMS 発現に関わる preSATP6 複合体(第2章と第3章)を調査した。仏国大葉由来の BC₂F₁ の p4p5 個体、NK-198 個体及び TA-33BB-CMS 個体より四分子期の小胞子を含む未成熟葯を採 取し、Blue native PAGE による複合体解析に供した。抗 preSATP6 抗体によって、明瞭な 250kDa のバンドが TA-33BB-CMS 及び p4p5 個体で検出された(図 4-3A)。シグナル強度に着目する と、TA-33BB-CMS よりも p4p5 個体の方がわずかにシグナル強度が低い。一方で、NK-198 か らは 250kDa、200kDa 及び 150kDa のシグナルバンドが検出されたが、その強度はいずれも TA-33BB-CMS や p4p5 個体の 250kDa のバンドよりも著しく低い(図 4-3A)。同一ブロットの 露光時間を長くすると、p4p5 個体において 200kDa 及び 150kDa のバンドが検出された(図 4-3B)。 これらのシグナル強度は NK-198 由来のサンプルよりも低い。抗 COXI 抗体による検出では、 すべてのサンブルで単一の明瞭な 420kDa のシグナルバンドが得られた(図 4-3C)。SDS-PAGE で分画したタンパク質試料のウェスタンブロット解析では、すべてのサンプルで抗 preSATP6 抗体に反応する 39kDa のバンドが検出された(図 4-3D)。

仏国大葉 rf1 における orf20 様遺伝子の翻訳産物の特性と mRNA 量

preSATP6 複合体に及ぼす仏国大葉 rfl の微弱な作用のメカニズムを探るべく、rfl 座にコードされる遺伝子に着目した。仏国大葉 rfl は 1 コピーの orf20 様遺伝子を保持 (orf20_{fukkoku} とする)し、そのコード域は orf20_{NK-198}と非常によく似ており、第 2 エキソンにおける 1 つの非同義置換 (TCT→TTT; Ser299→Phe299)のみ異なる (付図 4-1、大神 2013)。

orf20_{fukkoku} コード域の機能を調査した。FLAG タグを付加した *orf20_{fukkoku}* をテンサイ CMS カルスに形質転換し、抗 FLAG 抗体により 43kDa の導入タンパク質の蓄積が確認されるカルス

を得た(図 4-4A)。得られた形質転換カルスに対して Blue native PAGE による複合体解析を行 うと、*orf20_{fukkoku}* 導入カルス由来のサンプルから抗 preSATP6 抗体によって 250kDa 及び高分子 側のスメアなシグナルに加えて 200kDa のバンドが得られた(図 4-4B)。このシグナルバンド 像は、*orf20_{NK-198}* 導入カルス由来のサンプルと一致していた。

未熟葯における orf20_{fukkoku}の mRNA 量を qRT-PCR によって定量した(表 4-1)。orf20 様遺伝 子の共通領域に設計したプライマーを用いて仏国大葉 BC₂F₁の p4p5 個体及び NK-198 の葯を発 達ステージ毎に調べると、p4p5 個体の発現量は NK-198 の 1/3.9~1/8.1 であり、その差は有意 であった (p < 0.005; Welch's *t*-test)。

preSATP6 との相互作用能を保持する orf20 様遺伝子を識別するマーカーの開発

本章の結果を第2章及び第3章の結果とあわせるなら、preSATP6と翻訳後に相互作用する 能力を持つORF20様タンパク質をコードしているか否かが*Rf1*対立遺伝子の機能を決する要素 の一つと考えられる。そこで、*Rf1*対立遺伝子の機能推定に関わる新規のマーカーの作出を試 みた。

第2章、第3章、本章及び先行研究(Matsuhira *et al.* 2012; Ohgami *et al.* 2016)に基づき、塩 基配列決定と機能解析が完了している *orf20* 様遺伝子の一次構造比較を行った。翻訳産物のア ミノ酸配列を比較したところ、*orf20_{fukkoku}、orf20_{NK-305-1}、orf18、orf20_{NK-198}* 及び *orf21* は互いの 類似性が極めて高く、1つのグループを形成した。これらはいずれも *preSatp6* と翻訳産物同士 が相互作用し、200kDa 複合体を生ずることが確認されている。*orf20_{NK-219-3}* と *orf20L* は別な一 群を形成したが、これらはいずれも翻訳後に相互作用できない。残りについては *orf19* とそれ 以外に分けた。前者は翻訳後相互作用能があり、後者にはない。これより、翻訳後に相互作用 できる遺伝子のコピーは *orf20_{NK-198} グループ(orf20_{fukkoku}、orf20_{NK-305-1}、orf18、orf20_{NK-198}、及 び <i>orf21*) と *orf19* の 2 つのグループである(表 4-2)。*orf20* 様遺伝子のコード域内で制限酵素 切断部位を比較し、これらの 2 つのグループそれぞれに固有な塩基配列部位を見出した。これ らの固有塩基配列部位を検出する CAPS マーカーo20-Dra 及び o20-Xsp を開発した。

o20 の標的配列を図 4-5 に示す。TA-33BB-CMS、NK-219mm-O、p4p5、NK-305 及び NK-198 を供試し、それぞれ第 1 エキソンと第 3 エキソンに相同な 2 つのプライマーを用いて PCR を 行うと、1.2 kbp もしくは 1.0 kbp のアンプリコンが検出された(図 4-6)。orf20 様遺伝子の第 1 イントロンには in-del 多型が知られているので、第 1 イントロンの多型を利用したマーカー 20L-int(Moritani *et al.* 2013)のタイプと照合した。その結果、20L-int の L 型(Long-type)と S 型(Short-type)は、それぞれ 1.2 kbp と 1.0 kbp バンドの出現と一致した(図 4-6)。次に増幅さ れた DNA 断片を制限酵素(*Dra* I あるいは *Xsp* I)によって消化した。orf20_{NK-198} グループに属

する遺伝子コピーにのみ第2エキソンに Dra I 切断サイトがあり、かつそれらのコピーはすべ て 20L-int が S 型であるため(付図 4-1)、これらのコピー由来の 1.0 kbp の DNA 断片は Dra I によって消化され、0.8 kbp と 0.2 kbp が出現する(図 4-5)。供試材料のうち、p4p5、NK-305 及び NK-198 が orf20_{NK-198} グループに属する遺伝子コピーを保持するが、これらからのみ期待 されるバンドが検出された(orf20_{NK-198} タイプとする、図 4-6)。一方、ほとんどの orf20 様遺伝 子には増幅 DNA 断片内に 2 カ所の Xsp I 認識部位が存在する(20L-int が L 型の場合、3 か所) が、orf19 では第2 イントロン内にある 1 塩基置換(付図 4-1)が Xsp I 部位を損なっている(図 4-5)。そのため、0.8 kbp の特異的なバンドが出現する。実際、orf19 をもつ NK-198 からのみ 0.8 kbp の特異的なバンドが検出された(orf19 タイプとする、図 4-6)。なお、第3 エキソンの Xsp I 認識部位は orf20_{NK-219-2} で保存されていない(付図 4-1、図 4-5)ため、このコピーが含ま れる NK-219mm-O のみで 0.6 kbp の DNA 断片が検出される(orf20_{NK-219-2} タイプとする、図 4-6)。

未知遺伝資源における相互作用能を保持する orf20 様遺伝子の分布と Rf1 対立遺伝子の機能

o20-Dra 及び o20-Xsp マーカーの有効性を検討すべく、未知の *Rf1* 対立遺伝子を保持すると 思われる野生ビート2アクセッション及びテンサイ品種4アクセッションを用いた実験を行っ た。まず、これらから合計 16 個体を選び出して花粉親とし、TA-33BB-CMS と検定交配を行っ た。得られた F₁ 個体の花粉稔性調査を行うとともに、s17 と 20L-int を用いたジェノタイピン グを行った。両者の結果をあわせ、*Rf1* 対立遺伝子の機能を評価した(表 4-3)。

検定親の TA-33BB-CMS は s17 型が p4p4、20L-int 型は L である(これを p4p4/L と示す)ため、 F_1 は p4 アレルと花粉親由来のアレルをヘテロでもつと予想された。実際、観察されたすべての F_1 の遺伝子型は期待通りであった。

デンマーク由来の野生ビートである PI 546397 から 2 個体(個体番号 15-117 及び 15-116)を 選び出し、検定交配に供した。15-117 (p3p4/LS) 由来の F₁ は p3p4/LS が 5 個体、p4p4/LS が 4 個体であり、すべて花粉不稔を示した。15-116 (p1p3/LS) の後代は p1p4/LS が 7 個体、p3p4/LS が 8 個体であり、すべて不稔であった。

もう一つの野生ビートのアクセッションであるイタリア由来の PI 604551 から3 個体を選び、 検定交配を行った。15-158 (p3p3/S)の後代 14 個体はいずれも p3p4/LS を示し、稔性回復して いた。15-166 (p3p4/LS) 由来の F₁のうち、p3p4/LS を示す 8 個体は全て稔性回復していた。一 方、p4p4/LS を示す 9 個体は半不稔の 1 個体を除いてすべて不稔であった。15-173 (p1p3/LS) 由来 F₁ は、p3p4/LS を示す 7 個体が稔性回復し、p1p4/LS は 4 個体すべてが不稔であった。

テンサイ品種由来である BETA 86 及び BETA 81 からそれぞれ 3 個体及び 2 個体(いずれも p4p4/L)を選び F₁を得た。それら 61 個体はすべて p4p4/L を示し、16-1113 由来の 1 個体を除

いてすべて花粉不稔を示した。

テンサイ品種由来 PI 590588 から 5 個体を交配に供した。16-1001 は p5p5/LS を示した。さら に、20L-int を *Hin*d III を処理した時のバンドパターンは維持系統 NK-219mm-O と一致してい た(LS_type-219 と示す、Ohgami *et al.* 2016;村田 2017)。この F₁ (p4p5/LS) は 2 個体が半不 稔、2 個体が不稔であった。16-1007 (p5p5/LS_type-219) 由来の後代 1 個体 (p4p5/LS) は半不 稔を示した。16-1020 (p3p3/LS) の後代はすべて p3p4/LS を示し、3 個体が半不稔、8 個体が不 稔であった。16-1028 (p3p3/S) 由来の F₁ (p3p4/LS) は 10 個体が半不稔、3 個体が不稔であっ た。16-1033 (p3p3/S) の後代 8 個体はいずれも p3p4/LS を示し、かつ不稔であった。

テンサイ品種由来 BETA 1258 から選び出した 16-1082 (p3p3/S)の交配後代はすべて p3p4/LS を示し、5 個体が半不稔、2 個体が不稔であった。

以上のように、s17 と 20L-int による遺伝子型と花粉稔性は必ずしも一致しない。例えば、野 生ビート PI 546397 由来の 15-117 の後代のうち p3p4/LS 個体は不稔であるのに対し、同じく p3p4/LS である、PI 604551 由来の 15-158 の F₁ は稔性回復していた。そこで、新規マーカー o20-Dra 及び o20-Xsp による識別がこうした材料に対して有効か否か調査を行った。

得られた F₁集団より、s17 と 20L-int によるジェノタイプ毎に 1 個体あるいは 2 個体ずつ選び出し、o20-Dra 及び o20-Xsp によるジェノタイピングを行った。結果を図 4-7 に示す。o20-Dra マーカーにおける orf20_{NK-198}タイプは野生ビート 1 アクセッションとテンサイ 1 品種の合計 7 個体より検出された (表 4-3)。o20-Xsp マーカーにおける orf19 タイプ及び orf20_{NK-219-2}タイプ はそれぞれ 1 個体 (テンサイ品種) 及び 4 個体 (野生ビートとテンサイ品種) より検出された 一方で、未知のバンドバターンは観察されなかった (表 4-3、図 4-7)。以降、これらのマーカ 一型を簡便に示すため、o20-Dra マーカーにおける orf20_{NK-198}タイプは'+'、o20-Xsp マーカーにおける orf19 タイプと orf20_{NK-219-2} タイプはそれぞれ '19'と'219-2'と示し、それ以外を'-'で示す。これらを o20 [o20-Dra, o20-Xsp]の形で示す。例えば、ある個体の o20-Dra マーカーが orf20_{NK-198} タイプ、o20-Xsp マーカーが orf19 タイプであるならば、そのマーカー型は o20 [+, 19]と示す。これは、調査した個体における orf20_{NK-198} タイプもしくは orf19 タイプの orf20 様遺伝子の有無 を表す。

野生ビート PI 546397 由来の 2 個体(15-117 と 15-116)を花粉親とする F₁(4 個体)はいず れも花粉不稔であった。これら F₁より選び出した 17-1001(p3p4/LS)は o20 [-, -]であった。 一方、別な F₁ 個体 17-1002(p4p4/LS)は o20 [-, 219-2]であった。もう 1 つの花粉親 15-116(p1p3) 由来の F₁ である 17-1013 (p3p4/LS)は o20 [-, -]であり、17-1014 (p1p4/LS)からは o20 [-, 219-2] が検出された。以上より、これらの 4 個体の F₁ から、*orf20_{NK-198}*タイプもしくは *orf19* タイプ は見つからなかった。
もう一つの野生ビートアクセッション PI 604551 由来の F₁より、稔性回復個体である 17-1030、 17-1041、17-1063 及び 17-1066(いずれも p3p4/LS)を調査した。その結果、いずれも o20 [+, -] が検出された。同一アクセッション由来の F₁ である 17-1047 (p4p4/LS) 及び 17-1059 (p1p4/LS) は完全不稔であったが、o20 [-, -]を示した。

orf20_{NK-198}タイプが検出された個体における花粉稔性回復が Rf1 の作用によるものなのか 明らかにすべく、稔性回復個体 (17-1030、17-1063 及び 17-1066、いずれも p3p4/LS かつ o20 [+, -])の後代を調査した (表 4-4)。17-1030 の自殖後代 12 個体から p3p3、p3p4 及び p4p4 の 3 種 類の s17 型個体が得られた。このうち、p4p4 以外の 8 個体はいずれも o20 [+, -]であったが、全 て稔性回復していた。p4p4 個体は完全不稔であった。17-1063 及び 17-1066 は TA-33BB-CMS と交配し、BC₁F₁をそれぞれ 27 個体及び 18 個体得た。これらを調査したところ、完全不稔は p4p4 個体のみで、p3p4 個体はいずれも o20 [+, -]であり、稔性回復していた。なお、17-1066 由 来の BC₁F₁ において、稔性回復した p4p4 個体が 1 個体見られた。これらの 3 つの分離集団 (17-1030 の自殖後代、17-1063 及び 17-1066 由来の BC₁F₁) において、花粉稔性回復と Rf1 型 が独立であるという仮説は棄却された (p < 0.005; Fisher's exact test、表 4-4)。

テンサイ品種由来の BETA 86 及び BETA 81 の後代である 6 個体は完全不稔かつ p4p4/L であった。これらからはいずれも o20 [-, -]が検出された。

テンサイ品種由来 PI 590588 の F₁ (6 個体)を調査した。17-1140 (p4p5/LS、花粉稔性は半不 稔)より o20 [+, 19]が検出された。17-1144 (p4p5/LS、半不稔)は o20 [+, -]であった。16-1020 (p3p3)由来の F₁ (2 個体)は異なるパターンを示した。すなわち、17-1146 (p3p4/LS、不稔) は o20 [-, 219-2]である一方で、17-1151 (p3p4/LS、半不稔)から o20 [+, 219-2]が検出された。 17-1172 (p3p4/LS、半不稔)及び 17-1178 (p3p4/LS、不稔)は、いずれも o20 [-, -]であった。 このうち、17-1172 (p3p4/LS、半不稔)を TA-33BB-CMS と交配させ、BC₁F₁を6 個体得たが、 いずれも完全不稔であった (表 4-4)。

テンサイ品種由来 BETA 1258 の F1 である 17-1187 (p3p4/LS、半不稔) は、o20 [-, -]であった。

72



図 4-1 CAPSマーカーs17によるジェノタイピング

s17の反応液を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動した後のEtBr染色像を示す。仏国大葉の BC₂F₁及びTA-33BB-CMS由来のサンプルの泳動像を示す。左側に反応産物のDNA断片長(kbp)を 示し、それぞれのレーンの下部にs17型を示す。p4は1.1 kbp及び0.6 kbp、p5は1.7 kbpのDNA断片が 検出される(Taguchi *et al.* 2014)。



図4-2 仏国大葉BC₂F₁の花粉染色像

アレキサンダー染色による花粉粒の染色像を示す。仏国大葉BC₂F1のp4p5個体(A)及びp4p4個体(B)の花粉粒を示す。Cは維持系統TA-33BB-Oの花粉粒である。スケールバーは50 μmを示す。



図 4-3 未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析

仏国大葉BC₂F₁のp4p5個体(レーン1)、TA-33BB-CMS(レーン3)及びNK-198(レーン 2)の未成熟葯からタンパク質を抽出し、Blue native PAGE(A-C)及びSDS PAGE(D)の後 にウェスタンブロット解析を行った結果を示す。左側の数字は分子量(kDa)を示す。 (A) 抗preSATP6抗体(85 ng/ml)を用いて、露光時間は1分で検出したブロット像を示す

(B) Aと同じブロットで、露光時間は2時間で検出したブロット像を示す

(C) Aと同じメンブレンで抗COXI抗体(42.5 ng/ml)を用いて検出したブロット像を示す

(D) 抗preSATP6抗体(42.5 ng/ml) で検出したブロット像を示す



図 4-4 仏国大葉*rf*1座から見つかった*orf20*様遺伝子コピーを導入した形質転換カルスを 用いたウェスタンブロット解析

形質転換カルスから抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロット解析を行った。各ブロット 像の上部に導入したコンストラクト名を示す。Bは空白レーンを示し、NはEmpty vector導入カルス 由来のサンプルを示す。右側の数字は分子量(kDa)を示す。

(A) SDS PAGEにより得られたブロット像を示す。上のブロット像は抗DDDDK抗体(αFLAG、100 ng/ml)で検出し、下のブロット像は同一のメンブレンに対して抗COXI抗体(αCOXI、42.5 ng/ml)で検出した。

(B) Blue native PAGEにより得られたブロット像を示す。抗preSATP6抗体を340 ng/mlに希釈して検出に用いた。右側の赤矢印は、200kDa複合体のシグナルの位置を示す。

表 4-1 qRT-PCRによるorf20様遺伝子のmRNA量比較

Anther developmental stage	Reference gene	NK-198	p4p5	Fold-change	<i>p</i> -value
M · · ·	Actin	0.997 ± 0.248	0.256 ± 0.046	3.89	0.0035
Meiosis	efla	0.320 ± 0.068	0.056 ± 0.014	5.76	0.0014
T 4 1	Actin	0.897 ± 0.174	0.200 ± 0.023	4.48	0.0012
Tetrad	efla	0.327 ± 0.047	0.050 ± 0.007	6.68	0.0003
	Actin	0.444 ± 0.078	0.103 ± 0.017	4.29	0.0009
Microspore	efla	0.222 ± 0.036	0.028 ± 0.002	8.07	0.0004

 $(n = 3, \text{Mean} \pm \text{SD}, p$ -value; Welch's *t*-test)

表 4-2 orf20様遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列に基づくアラインメントスコア

				Group I			Grou	II dı		GroupIII	Grou	p IV
		orf18	orf20	orf21	fukkoku	305-1	orf20s	305-2	219-2	orf19	219-3	orf20L
	orf18		66	100	66	66	90	92	92	88	84	85
I	orf20			66	66	66	90	93	91	88	84	84
dnoré	orf21				66	66	90	92	92	88	84	85
C	fukkoku			,		66	90	93	91	88	84	84
	305-1						60	93	91	88	84	84
II	orf20s							67	92	91	85	88
Đ	305-2								96	89	85	86
	219-2									91	84	85
III.Đ	orf19										86	88
ΛI	219-3									/		96
G.	orf20L											
守 赤 い よ ろ オ o オ o オ o to オ o to	ごはpreSatp6と グループ分	ニタンパク! けした(G1 - 305-1 arth	質間相互作 roup1-4)。	用が確認さ 表中に示し PDD_ orfDD	ミれたコピー すのf20様遺化	-、青字は 伝子は以下 20 · · · ·	相互作用してに対応して	ないコピー ている。orf	· 老示子。 18, <i>orf18</i> ; 01	コピー間のプ rf20, <i>orf20_{NK}</i>	$\mathcal{F} \neq \mathcal{J} \vee \mathcal{X}$ $\mathcal{F} = \mathcal{I}_{298}$; orf21, \mathcal{C}_{1298} ; orf21, \mathcal{C}_{1298}	$\mathcal{V} \upharpoonright \mathcal{X} \supseteq \mathcal{F}$ orf21;



図 4-5 CAPSマーカーo20-Dra及びo20-Xspの概要

*orf20*様遺伝子の構造を模式的に示した。四角はエキソン、山型の線はイントロン、横棒線は遺伝子 間領域を示す。黒矢印はプライマーの設計位置を示す。赤の三角形は*Dra* I切断サイトを示し、Group I (*orf20_{fukkoku}*, *orf20_{NK-305-1}*, *orf18*, *orf20_{NK-198}*, *orf21*)のみに存在する(*orf20_{NK-198}*で示す、付図4-1)。プラ イマーで挟まれた領域は1.0 kbpであり、*Dra* I処理によって0.2 kbpと0.8 kbpのDNA断片が生じる。なお、 20L-intがL型の場合のPCR産物のサイズは1.2 kbpである。

緑の三角形は*Xsp* I切断サイトを示し、*orf20*様遺伝子に共通して第2イントロン及び第3エキソンに切 断サイトが2か所見られるが、*orf19とorf20_{NK-219-2}*は、それぞれ第2イントロン及び第3エキソンにおける 認識配列が保存されていない(括弧内に白抜き緑の三角形で示す、付図4-1)。20L-intがL型のコピー (*orf20_{NK-219-1}、orf20_{NK-219-3}*及び*orf20L*)は、それらに加えて第1イントロン内に*Xsp* I認識部位を有する (斜線パターンで塗りつぶした緑三角形で示す)。



図 4-6 CAPSマーカーo20-Dra及びo20-Xspによるgenotyping

o20-Dra及びo20-Xspによって得られたDNA断片をアガロースゲルで分離した後のEtBr染色像 を示す。電気泳動は、未処理区(Non-digest)及び2種の制限酵素の各処理区(ゲル左側に酵素の 名称を示す)を示す。泳動像の右側にDNA断片長(kbp)を示す。赤矢印、緑矢印及び薄緑の矢 印はそれぞれ、o20-Draにおける*orf20_{NK-198}タイプ、o20-Xspにおけるorf19タイプ及びorf20_{NK-219-2} タイプで得られるDNA断片のサイズを示す。泳動像上部の数字は以下のサンプルに対応する。1. TA-33BB-CMS、2. NK-219mm-O、3. p4p5個体、4. NK-305、5. NK-198、6. No template*

レーン上部に*orf20_{NK-198}グループ*に属するコピー(赤)及び*orf19*(緑)の有無を示し、それぞれの色で枠が塗りつぶされたサンプルはこれらのコピーを有する。白枠に219-2と記述したサン プル2 (NK-219mm-O)は*orf20_{NK-219-2}タイプを示す。それらの下に、20L-intのgenotype*(L型、S 型及びLS型)を示す (Moritani *et al.* 2013)。

	Pollen paren	ıt			F_1				
Strain	-							o20 ger	notype ^d
Source	Accession no. ^a	Plant ID	s17/20L-int ^b	s17/20L-int	Plant no.	Fertility ^e	Plant ID	o20-Dra	o20-Xsp
		15 117	n3n1/I S	p3p4/LS	5	Ca	17-1001	-	-
B. v. ssp. maritima	PI 546397	15-117	p3p4/L3	p4p4/LS	4	CS	17-1002	o20 genotype d o20-Dra o20-Xs - - - 219-2 + - + - + - + - + - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - + 19 + - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	219-2
originated in Denmark	(USDA)	15-116	n1n3/I S	p1p4/LS	7	C	17-1013	-	-
		15-110	pips/Es	p3p4/LS	8	0.5	17-1014	o20 genotype d o20-Dra o20-Xsp - - - 219-2 + - + - + - + - + - - - + - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - + 19 + 219-2 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	
		15-158	p3p3/S	p3p4/LS	8	N	17-1030	+	-
B. v. ssp. maritima originated in Italy (Venice)			1 1	1 1	6	Sf		+ - + - + - 	
				p3p4/LS	8	N	17-1041	+	0 genotype ^d -Dra 020-Xsp - 219-2 - 219-2 - 219-2 + - + -
	PI 604551	15-166	p3p4/LS	p4p4/LS	1	Sf	17-1047	_	-
	(USDA)			P .P 20	8	Cs	1, 101,		
				n3n4/LS	7	N	17-1063	+	-
		15-173	p1p3/LS	pop 20	,		17-1066	+	-
				p1p4/LS	4	Cs	17-1059	-	-
Sugar beet variety Weisse	BETA86	16-1048	p4p4/L	p4p4/L	14	Cs	17-1069	-	-
Kleinwanzlebener	(IPK)	16-1061	p4p4/L	p4p4/L	13	Cs	17-1084	-	-
C	DETA91	16 1113	p/p//I	n/n//I	1	Sf	17-1097	-	-
Kleinwanzlebener E	(IPK)	10-1115	p+p+/L	рчрчл	19	Cs	17-1098	-	1 020-Asp - 219-2 - - 219-2 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 19 - 219-2 - 219-2 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
	(II IX)	16-1118	p4p4/L	p4p4/L	11	Cs	17-1117	-	 + 19
Sugar beet variety Weisse Kleinwanzlebener	BETA86 (IPK)	16-1063	p4p4/L	p4p4/L	3	Cs	17-1127	-	-
		16 1001		4 5/I C	2	Sf	17-1140	+	10
		16-1001	p5p5/L8 (type-219)	p4p5/LS	2	Sf 17-1140 + Cs 17-1140 +		+	19
		16-1007	p5p5/LS (type-219)	p4p5/LS	1	Sf	17-1144	+	-
Sugar beet variety	PI 5900588	16 1020	2.2/1.6	2.4/1.0	3	Sf	17-1151	+	219-2
Klein E	(USDA)	16-1020	p3p3/LS	p3p4/LS	8	Cs	17-1146	-	219-2
		16 1000	2.2/5	2.4/1.0	10	Sf	17, 1170		
		16-1028	p3p3/S	p3p4/LS	3	Cs	1/-11/2	-	-
		16-1033	p3p3/S	p3p4/LS	8	Cs	17-1178	-	-
Sugar beet variety	BETA1258	16 1092	n ² n ² /S	n2n1/I C	5	Sf	17 1107		
Kleinwanz-Zz	(IPK)	10-1082	p3p3/3	pop4/LS	2	Cs	1/-110/	-	-
				Total	171				

表 4-3 Beta vulgaris遺伝資源を用いた検定交配と遺伝子型

^a USDA: United States Department of Agriculture, IPK: The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research ^b type-219は、20L-intの*Hind* III切断パターンがNK-219mm-Oと同一であるものを示す。

。花粉稔性はCsが完全不稔、Nが正常(NもしくはS.S.a)、Sfが半不稔である。

d o20-Draにおける $orf20_{NK-198}$ タイプを+、o20-Xspにおけるorf19タイプと $orf20_{NK-219-2}$ タイプをそれぞれ19と219-2

と示し、いずれでもない場合を-と示す。



図 4-7 CAPSマーカーo20-Dra及びo20-Xspによる検定交配個体のジェノタイピング o20-Dra及びo20-Xspによって得られたDNA断片をアガロースゲルで分離した後のEtBr染色像を示 す。電気泳動に用いたのは、未処理区(Non-digest)、及び2種の制限酵素の各処理区(左側に酵素 の名称を示す)である。泳動像の右側にDNA断片長(kbp)を示す。赤矢印、緑矢印及び薄緑の矢 印はそれぞれ、o20-Draにおけるorf20_{NK-198}タイプ、o20-Xspにおけるorf19タイプ及びorf20_{NK-219-2}タ イプの場合に得られるDNA断片のサイズを示す。ゲル上部に検定交配の花粉親のアクセッション番 号を示す(表4-3)。PとNはそれぞれ稔性回復系統NK-198と鋳型DNAを加えていない陰性対照を示 す。

Cross combination	a17	~20 ª	Fert	ility	Total	n voluo ^d	
Cross combination	817	020	Restored ^b	Sterile ^c	Total	<i>p</i> -value	
	p3p3	+	3	0			
17-1030 self	p3p4	+	5	0	12	2E-03	
	p4p4	-	0	4			
TA 22DD CMS v 17 1062	p3p4	+	18	0	27	2E-07	
1A-33BB-CMS x 17-1003	p4p4	-	0	9	21		
TA 22DD CMS - 17 10(6	p3p4	+	10	0	10	25.04	
1A-33BB-CMS x 17-1000	p4p4	-	1	7	18	3E-04	
TA 22DD CMS - 17 1172	p3p4	+	0	2	6	1	
1A-33DD-UNIS X 17-1172	p4p4	-	0	4	0	1	

表 4-4 o20マーカー型の分離と花粉稔性

^a o20型において、*orf20_{NK-198}タ*イプを+、そうではない場合は-と示す。

^bN、S.S.a、及びS.S.bの合計 。C.S. dFisher's exact testのp値を示す。

			Rf	l marker t	уре		Source			
·		s17	o20-Dra	o20-Xsp	20L-int_HindIII	Fertility Restoration ^a	Strain /Accession no.	Description	Plant ID in this study	
		p1	+	19	ND	Yes	NK-198	Sugar beet	-	
		p2	+	-	ND	Yes	NK-305 ^b	Sugar beet	-	
		2	+	-	ND	Yes	PI 604551	Wild beet	15-158, 15-166, 15-173	
	Yes	p3	+	219-2	ND	Yes?		~	16-1020	
			+	19	type-219	Yes?	PI 590588	PI 590588 Sugar beet	16-1001	
		р5	+	-	type-219	Yes?		Deel	16-1007	
			+	-	ND	No	Fukkoku-ouba ^b	Leaf beet	-	
111?		1	-	219-2	ND	No	PI 546397	Wild beet	15-116	
dno		pI	-	-	ND	No	PI 604551	Wild beet	15-173	
r Gr						No	PI 615522 ^b	Sugar beet	-	
οIο		р3	-	-	ND		PI 546397	Wild beet	15-116, 15-117	
rout							DI 500500	Sugar	16-1028,16-1033	
9	No		-	219-2	ND	No	PI 590588	beet	16-1020	
	INU		-	-	ND	Yes?	BETA1258	Sugar beet	16-1082	
					ND	No	TA-33BB-O ^b	Sugar beet	-	
		1	-				BETA81, BETA86	Sugar beet	-	
		p4	-	-	ND	No	PI 604551	Wild beet	15-166	
			-	219-2	ND	No	PI 546397	Wild beet	15-117	
		p5	-	219-2	type-219	No	NK-219mm-O ^b	Sugar beet	-	

表 4-5 orf20様遺伝子の構成から見たRfl対立遺伝子の多様性

^a 検定交配F₁における稔性回復の有無を示す。ただし、稔性回復が見られたもののうち、後代検定を行ってい ないものに関しては、Yes?と示した。

^b 先行研究に基づく(Matsuhira *et al.* 2012; Ohgami *et al.* 2016; 大神 2013; 上 2017)。

考察

仏国大葉から発見された、第4染色体の稔性回復遺伝子に対する修正遺伝子は*Rf1*座に近接 しており、*Rf1*対立遺伝子ではないかと考えられた(内山 2017)。しかしながら、これは遺伝 子の染色体マッピングと QTL 解析から考えた可能性の一つに過ぎない。一方で、修正遺伝子 のクローニングを表現型に基づいて進めるのは相当困難であることが予想される。よって、仏 国大葉が保持する *Rf1* 対立遺伝子を特徴づけ、分子的な機能に基づき修正遺伝子である可能性 を考察するのは意味があるだろう。

第2章で述べた通り、テンサイから発見された rfl アレルには、そこにコードされる orf20 様遺伝子の翻訳産物が preSATP6 と相互作用しないという共通点がある。当初、仏国大葉の Rfl 対立遺伝子は、圃場における葯の肉眼観察から劣性アレルと考えられていた。ところが、本章 では、仏国大葉由来 orf20 様遺伝子の翻訳産物が preSATP6 と相互作用する能力があることを形 質転換カルスで確認した。加えて、仏国大葉 rfl 保持個体の葯において、orf20 様遺伝子の mRNA 量は著しく少ないものの、わずかながら preSATP6 の 200kDa 複合体が出現していた。未成熟葯 における 200kDa 複合体の出現は、テンサイ rfl のいずれにおいても見られていない(第2章)。 これより分子レベルでは、仏国大葉 rfl は Hypomorphic なアレルであると考えて良いだろう。 このことは、仏国大葉の rfl を保持する個体の葯内容物にわずかながら稔性回復の痕跡が認め られることとも一致する。もし、こうした仏国大葉 rfl の微弱な作用が稔性回復を助けている とすれば、仏国大葉 rfl と第4染色体上の弱い稔性回復遺伝子が相互作用しているように見え たとしてもおかしくない。以上より、仏国大葉の Rfl 対立遺伝子が修正遺伝子であるとしても 矛盾はないことになる。

修正遺伝子は表現型に基づき直接選抜することができない。特に仏国大葉の修正遺伝子のよ うに、弱い稔性回復遺伝子を強めるような修正遺伝子は、テンサイのような三系交配により採 種を行う作物においては雄性不稔 F₁を得る際の障害となる恐れがある。この可能性は、修正遺 伝子を何らかの方法で除去できるならば減ずることができよう。*Beta* 属において *Rf1* 遺伝子座 はきわめて多様な分子バリアントを持っている(Moritani *et al.* 2013)。それ故、各々の分子バ リアントを予め特徴付けておくのは現実的ではない。一方で、第3章で述べたように、*Rf1* 対 立遺伝子の作用を決める要因は、第一に preSATP6 との相互作用能を持つ *orf20* 様遺伝子の有無 であり、第二に相互作用能を持つ *orf20* 様遺伝子の mRNA 量のようである。これに符合し、仏 国大葉の *Rf1* 対立遺伝子は相互作用する能力がある *orf20* 様遺伝子の有無が*Rf1* 対立遺伝 子の機能を判別する重要な鍵となる。即ち、相互作用能をもつ *orf20* 様遺伝子が存在すると、

85

その対立遺伝子は回復アレルか、もしくは修正遺伝子として振る舞う可能性が高い。

本研究では相互作用能をもつ orf20 様遺伝子の共通配列に着目し、新規マーカーを開発した。 このマーカーは既存の s17 や 20L-int と異なる標的配列を持つ。その有効性は、未利用遺伝資 源に対して発揮されることを示すことができた。例えば、s17 では p1 に連鎖する優性アレル(例、 NK-198) と劣性アレル(例、PI 546397 と PI 604551)を識別することができないが、このマー カーは両者を判別することが可能である。本章では、このマーカーにより相互作用能を有する コピーを持つと判定された個体は全て稔性回復していた。

これまでの知見を総合し、*Rf1*座の分子バリアントの分類を試みたのが表 4-5 である。ここ では、相互作用能を有するコピーの有無を第一項とした。これに分子マーカー型が続くが、s17 のマーカー型のうち、p1、p3、及び p5 は相互作用能を持つコピーに連鎖する事例と持たない コピーに連鎖する事例の両方が発見されている。これは、s17 が orf20 様遺伝子の下流の遺伝子 間領域をターゲットとしている(Taguchi et al. 2014)ことから、orf20 様遺伝子と s17 間の遺伝 子間領域(約 3.9 kbp)で組換えが起こっているためであると考えられる。20L-int-HindIII は NK-219mm-O に代表される分子バリアントを持つ劣性アレルの識別に有効と考えられてきた のだが、本章で劣性アレルに対応していない事例が見つかった。表 4-5 において仏国大葉の分 子バリアントは便宜的に回復しないことにしているが、葯内容物にわずかな回復の痕跡が見ら れることは前述の通りである。p3 で相互作用能を有するコピーが見つからないのにも関わらず 稔性回復した事例については、第4 染色体上の *Rf*の関与を検討すべきであろう。以上のよう な多様な分子バリアントが進化してきた背景については、次章以降で論ずる。

第5章

Rf1 の分子進化学的解析

第5章 Rfl の分子進化学的解析

緒言

orf20 様遺伝子の翻訳産物は、真核生物に広く保存されている Omal 遺伝子と相同性を示す ことから、Rfl は Omal と進化的に密接な関係を持つことが示唆されていた。しかしながら、 その詳細は明らかではない。本章では Rfl の進化過程を明らかにすべく、分子系統学的解析と 機能解析を行った。

材料及び方法

5-1. 供試材料

表 5-1 にまとめて示す。タマネギはスーパーマーケットで購入した。その他は第2章に従う。

5-2. バイオインフォマティクス

マルチプルアラインメントは第4章に準ずる。塩基配列とアミノ酸配列の取得及び相同性検 索は、NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)、Phytozome (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal. html)、miyakogusa.jp(http://www.kazusa.or.jp/lotus/index.html)と CuGenDB(http://cucurbitgenomics. org/organism/1)を用いて行った。膜貫通ドメインの予測は TMHMM を用いて行った (Emanuelsson *et al.* 2007; http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)。シンテニー解析における模式図の描画 には、SnapGene® Viewer (Version 4.2.3; http://www.snapgene.com/)及び PowerPoint (Microsoft Office 365 ProPlus)を用いた。*AtOMA1*の発現解析には、Arabidopsis eFP Browser 2.0 を用いた

(Winter et al. 2007; http://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html)。

5-3. Total DNA 抽出

第3章に準ずる。一部の個体は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて添付のプロトコールに 従い抽出を行った。

5-4. Total RNA 抽出

第2章に準ずる。根、緑葉、花茎及び花芽は抽苔させたテンサイから回収し、液体窒素で凍 結させた後、乳棒で破砕した。

5-5. RT-PCR 及び qRT-PCR

第2章及び第3章に準ずる。RT-PCR は、Go taq(Promega)を用いて添付のプロトコールに

従い行った。

5-6. 分子系統学的解析

マルチプルアラインメント及び系統樹の描画は MEGA7 (Kumar *et al.* 2016) を用いて行った。 MEGA7 に搭載された ClustalW アルゴリズムによってアミノ酸配列あるいは塩基配列を整列化 し、必要に応じて配列に修正を加えた。近隣結合法における進化距離は Poisson correction 法に 基づいて推定し、サイト間の変異率のばらつきを γ 分布に基づいてモデル化した (shape parameter = 5)。翻訳産物のアミノ酸配列全長を解析に供試したが、各サイトにおいてカバー率 が 90%以上になるサイトのみを解析に用いた。即ち、ギャップのある配列が 10%未満含まれる サイトは許容した。最尤法において、配列間のペアワイズ距離は JTT (Jones-Taylor-Thornton) モデルに基づいて計算し、サイト間の変異率のばらつきは γ 分布に従うと仮定した (5 カテゴ リー、parameter = 0.8551)。用いるサイトの条件は近隣結合法と同様である。得られた系統樹の 信頼性はブートストラップ法によって評価した。

5-7. 正の選択の検出

アラインメントは PAL2NAL v14 (Suyama *et al.* 2006; http://www.bork.embl.de/pal2nal/) によっ て行った。選択圧 (dN/dS; dN: 非同義置換率, dS: 同義置換率)の検出は PAML v4.9h (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) に含まれる codeml における枝モデル及びコド ンモデルを用いた (Yang *et al.* 2007)。

枝モデルにおける選択圧の検出では、すべての系統群にかかる選択圧が均一であると仮定したモデル(帰無仮説)において得られる dN/dS(ω_0)と特定の枝のみで選択圧が異なるモデル (対立仮説)において検出される dN/dS(ω_2)の二つが得られる。両モデルの適合性は尤度比検定によって評価した(Yang *et al.* 2007)。

コドンモデルにおける選択圧の検出は、全てのサイトで dN/dS が均一であると仮定するモデ ル M0 (帰無仮説) に加えて、4 種のコドン置換モデル M1、M2、M7 及び M8 によって行った。 M1 は中立モデルであり、dN/dS = 0 (純化選択) あるいは dN/dS = 1 (中立進化) の 2 種の離散 分布を示すコドン置換カテゴリーを仮定している。M2 は、それに加えて dN/dS > 1 というカテ ゴリーを含むような正の選択モデルである。M7 は中立モデルであるが、M1 とは異なって dN/dS が連続的な β 分布を示すと仮定している。M8 は M7 に加えて、dN/dS > 1 を許容したモデルで ある。したがって、M1 と M7 はそれぞれ M2 と M8 に対する帰無仮説として用いることができ る。もし、M1 か M7 が棄却され M2 あるいは M8 が採用されるならば、対象としている遺伝子 が正の選択をうけるコドンを含んでいる可能性が示唆される。コドン置換モデルの適合性は尤 度比検定によって評価した(Yang *et al.* 2007)。正の選択を受けるコドンは M8 モデルにおける Bayes Empirical Bayes 法により同定した(Yang *et al.* 2007)。

5-8. 一過性発現系による細胞内局在調査

GFP 融合遺伝子の作製及び植物細胞への一過性発現は Matsuhira *et al.* (2012)に従った。融合 遺伝子の作製過程は以下の通りである。対象とした遺伝子のコード域の 5'末端から 300 bp を PCR によって増幅した。このプライマーは、アンプリコンの両端に Sal1及び NcoI 認識サイト を付加するように設計されている。この増幅産物及び GFP 遺伝子を含むベクターpTH2 (Chiu *et al.* 1996) プラスミド DNA を、制限酵素 Sal1及び NcoI によって処理し、ライゲーション反応 を行った。pTH2 の GFP 遺伝子の開始コドンに NcoI サイトが含まれているため、この反応後 には、対象遺伝子の 3'末端に in-frame で GFP コード配列が融合した遺伝子が得られる。ミト コンドリア局在マーカーとして、シロイヌナズナ F₁-ATPase δ-subunit-RFP 融合タンパク質を発 現するベクターpMt-R を用いた (Arimura and Tsutsumi 2002)。

これらのプラスミド DNA 約 1µg を 1µm 径の金粒子(Bio-Rad) 0.5mg、1/10 容の 3M 酢酸ナ トリウム及び 3 倍容 100%エタノールと混和し、-20℃で 30 分静置した後、17,000g で 5 分間遠 心した。上清を取り除いて 70%エタノールでリンスし、17,000g で 1 分間遠心した。再度上清 を取り除き、100%エタノールを加えて混和した。この懸濁液を用いて、パーティクルガン法に よってタマネギ表皮細胞に遺伝子導入し、融合タンパク質を発現させた。遺伝子導入には、 GIE-III IDERA (Tanaka, Ishikari, Japan)を用いた。蛍光シグナルの検出は Nikon Eclipse E600

(Nikon, Tokyo, Japan)を用いて行い、CCD camera [CoolSNAP MYO (Photometrics, Tucson, AZ)] によって撮影した。画像の取得及び処理は ImageJ によって行った。

5-9. 形質転換

第2章に準ずる。

5-10. コンストラクトの作製

第2章に準ずる。*AtOMA1、BvOMA1-1*及び *BvOMA1-2* はそれぞれシロイヌナズナ Col-0系統 の緑葉、テンサイ TA-33BB-CMS の緑葉及び NK-305 の未成熟葯由来の cDNA を鋳型として、 コード域を PCR により増幅した。

5-11. アグロバクテリウム懸濁液の調製

第2章に準ずる。

- 5-12. テンサイ組織培養と形質転換カルスの作出第2章に準ずる。
- 5-13. 粗ミトコンドリア抽出

第2章に準ずる。

5-14. SDS-PAGE

第2章に準ずる。

5-15. ウェスタンブロット解析

第2章に準ずる。

5-16. 精製ミトコンドリア抽出

Lind *et al.* (1991) の手法を一部改変した。15~30g の培養細胞に対して三倍量の氷冷した R buffer (pH 7.8) [0.5 M mannitol、2 mM EGTA、0.1% (w/v) bovine serum albumen (BSA)、5 mM β -mercaptoethanol、25 mM MOPS-KOH (pH 7.5)]を加え、ガラスホモジェナイザー (Sansho, Tokyo, Japan)を用いて4°Cで摩砕した。摩砕したカルスを含む溶液を4重のガーゼとミラクロス (Merck) で濾し、濾液を4°C、2,500 g、10 分間遠心した。上清を回収し、4°C、12,000g、15 分間遠心し た。上清を除いた後、W buffer (pH 7.5) [0.5 M mannitol、2 mM EGTA、0.1% (w/v) BSA、5 mM MOPS-KOH (pH 7.5)]を加え、ペレットを懸濁した後、再度4°C、12,000 g、15 分間遠心した。 上清を除き、ペレットを2~3ml の W buffer で懸濁した後、percoll (Sigma) 不連続密度勾配液 (上層 25% percoll/W buffer、下層 50% percoll/W buffer) に重層し、4°C、40,000 g、45 分間遠 心した。25%/50% percoll 液の境界面のミトコンドリア面分を回収し、希釈 buffer (pH 7.5) [0.5 M mannitol、5 mM MOPS-KOH (pH 7.5)] で 2 回洗浄して percoll を取り除いた後、遠心によっ てミトコンドリアを沈殿させた。PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) を用いてタ ンパク質濃度を測定した後、精製ミトコンドリアを 10 mg/ml になるように希釈バッファーで 懸濁し、精製標品とした。

5-17. 共免疫沈降

第2章に準ずる。ただし、精製ミトコンドリア 200 µg を実験に供した。

5-18. BN-PAGE

第2章に準ずる。

5-19. In situ ハイブリダイゼーション

In situ ハイブリダイゼーションは Cold Spring Harbor Arabidopsis Genetics Course のプロトコール (https://www.arabidopsis.org/cshl-course/5-in_situ.html) 及び Matsuhira *et al.* (2006)に準じて行った。

(1) 組織切片の作製

第3章に準ずる。ただし、FAA 固定は6時間で統一した。

(2) プローブの調製

標的配列をシロイヌナズナ Col-0 及びテンサイ TA-33BB-O のゲノム DNA を鋳型として PCR によって増幅し、pBluescript SK ベクターのマルチクローニングサイトへクローン化した。得 られたプラスミド DNA を鋳型とし、M13 プライマーを用いて PCR 増幅した後、ゲル精製によ って精製 DNA 断片を得た。これを鋳型として、*in vitro* 転写を DIG RNA Labeling Kit (Roche) のプロトコールに準じて行い、プローブを合成した。

(3) ハイブリダイゼーション及びシグナルの検出

パラフィン伸展機上で 42°C、24 時間以上静置した切片を 10 分間、2 回キシレンに浸漬し脱 パラフィンを行った後、エタノール希釈シリーズ (100%, 100%, 90%, 70%, 50%, 30%, 0%) に 1 分間ずつ降順に浸漬して水和した。Proteinase K 溶液 (20 mg/L (w/v) Proteinase K for Sugar beet or 1 mg/L (w/v) for *Arabidopsis*、100 mM Tris-HCl pH7.5、 50 mM EDTA) で 37°C、30 分間処理し た後、アセチル化溶液 (1.3% (v/v) Triethanolamine, 0.5% (v/v) 無水酢酸) に室温で 10 分間浸漬 した。その後、エタノール希釈シリーズに 1 分間ずつ昇順に浸漬して脱水し、減圧下で 60 分 間乾燥した。プローブを含むハイブリダイゼーション溶液 (50% Formamide, 300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 5 mM EDTA, 5% Dextran sulfate, 1% Blocking Reagent (Roche), 150 μ g/mL yeast tRNA, 10U/ μ l RNase inhibitor (Takara)) を切片上にのせて、湿潤箱の中で 42°C、一晩イン キュベートした。

4 x SSPE (20 x SSPE = 0.2 M NaH₂PO₄, 20 mM EDTA, 3M NaCl, pH7.4) で室温、5 分間の洗浄 を二回繰り返し、0.2 x SSPE で 55°C、15 分間の洗浄を 3 回行った。その後、RNase 溶液 (5 μ g/mL RNase A, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl) 中に 37°C、30 分間浸漬した。0.2 x SSPE で 55°C、15 分間の洗浄を 3 回行った後、ブロッキング溶液 (1% Blocking Reagent, 100 mM Maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5)、BSA wash solution (1% BSA, 0.3% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl) の順にそれぞれ 30 分間浸漬した。抗 DIG 抗体 (Roche) を BSA

92

wash solution で 600 倍希釈した溶液を滴下し、37°Cで 1 時間抗体反応を行った。BSA wash solution で室温 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後に、TNM-50 (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) に 5 分間浸漬した。NBT/BCIP stock solution (Roche) を TNM-50 で 50 倍希釈した溶液を切片上にのせ、暗所かつ室温で発色反応を行った。発色を確認した後、 TE buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0) に 5 分間浸漬して発色を停止させ、微 分干渉顕微鏡 (OLYMPUS BX50) で観察した。撮影は CCD カメラ (OLYMPUS DP21) によっ て行った。

5-20. サザンハイブリダイゼーション

Sambrook et al. (1989) の方法に準じて行った。

Total DNA に RNase A (Qiagen) を終濃度 20 µg/L になるように加え、37℃で1時間以上イン キュベートした後に、等量のフェノール・クロロホルム溶液(1:1)を加えて懸濁し、17,000g で 10 分間遠心した。得られた上清を等量のクロロホルムと混和し、再度同条件で遠心した。 上清を回収した後に、1/10 容の 3M 酢酸ナトリウム及び 3 倍容のエタノールと混和し、17,000g で 10 分間遠心した。上清を取り除き、70%エタノールでリンスした。上清を除き、得られた沈 殿を TE buffer で溶解させ、精製 DNA 標品とした。

精製 DNA 10 µg を *Hind* III で完全消化した後、1.0 %アガロースゲルで 100V、6 時間電気泳動した後、アルカリ溶液 (0.5M NaOH, 1.5M NaCl) に 20 分間浸漬した。その後、中和液 (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl, pH7.5) に 20 分間、20 x SSC (3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム) に 5 分間浸漬し、ナイロンメンブレン (GE healthcare) にキャピラリーブロッティングを 20 x SSC 中で一晩行った。プローブは DIG DNA synthesis kit (Roche) に従って調製した。ハイブリダイ ゼーション及びシグナルの検出は、Roche のプロトコール (https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General_Information/1/dig-application-manual-for-filter-hybridisation-i ris.pdf) に従って操作を行い、その過程で DIG Easy HybTM (Roche)、抗 DIG 抗体 (Roche)、CSPD (Roche) を用いた。フィルムへの感光及び現像は、第 2 章「ウェスタンブロット解析」の項 に準ずる。

5-21. PCR

用いたプライマー及び反応条件は付表 2-1 に示す。

結果

テンサイゲノムにおける OMA1 相同配列

テンサイゲノム中に含まれる OMA1 相同遺伝子を探索すべく、テンサイ系統 KWS2320 のリ ファレンスゲノム情報(RefBeet-1.2.2、Dohm et al. 2014)に対して相同性検索を行った。シロ イヌナズナ AtOMAI (Migdal et al. 2017)の翻訳産物のアミノ酸配列をクエリとして、テンサイ ゲノムアセンブリに対して tblastn を行ったところ、4 つの相同遺伝子が見つかった(図 5-1、 付表 5-1、付表 5-2)。これらはいずれも 3 つのエキソン及び 2 つのイントロンから構成されて いた (図 5-1)。最も高い相同性を示す 2 つの遺伝子 LOC104906584 (BvOMA1-1 とする: E-value [blastp、vs. AtOMA1の結果を示す]=E-179)とLOC104906603(BvOMA1-2とする: E-value = 4E-109) は同じ scaffold にあり、20 kbp 離れた位置にタンデムに並んでいた(図 5-1、付表 5-1、 付表 5-2)。両遺伝子の座乗する scaffold は"chromosome 3 unlocalized scaffold"と記載されるのみ で、第3染色体上の位置が不明である。最近、KWS2320とは別系統と手法を用いたテンサイ ゲノム情報が公開された(EL10 アセンブリ; Funk *et al*. 2018)。両ゲノム情報を比較すると、例 えば scaffold の数は EL10 が 40 であるのに対し、RefBeet-1.2.2 は 40,508 であることから、EL10 を質の高い情報とみなせる。EL10において、BvOMA1-1のコード域の塩基配列をクエリとした blastn を行ったところ、第3染色体の末端から約10.7 MB の位置に相同配列が見いだされた(図 5-1、付表 5-1)。これはそう根病抵抗性遺伝子座 Rz2 (Capistrano-Gossmann et al. 2017; Funk et al. 2018) に近接していた。EL10 では BvOMA1-1 に随伴する BvOMA1-2 は見つからない (図 5-1)。 これらとは別系統であるテンサイ E60系統の BAC ライブラリーより、BvOMA1-1のコード域 を含む BAC クローン(60 kbp)の塩基配列が得られている(勝山 2012)。この BAC クローン においても、随伴する BvOMA1-2 の相同配列は見つからなかった(図 5-1)。

RefBeet-1.2.2 において、残りの2つの遺伝子は第3染色体のアセンブリに含まれ、互いに約 45 kbp 離れた位置に近接していた(図 5-1、付表 5-1)。3 番目に高い相同性を示す LOC104888051 (E-value = 2E-72、付表 5-2) は、TK-81mm-Oのrflに含まれる orf20L (Matsuhira et al. 2012) とコード域の塩基配列が完全に一致した(KWS2320 orf20L と呼称する)。一方で、LOC104888056 は最も低い相同性を示した(E-value = 3E-33、付表 5-2)。KWS2320と異なるテンサイ系統NK-198 においては、orf20L の代わりに orf18 から orf21 までの 4 つの orf20 様遺伝子がコードされてい る (Matsuhira et al. 2012)。この遺伝子クラスターから 40 kbp 離れた位置に、LOC104888056 の 相同遺伝子が見つかった(図 5-1、付表 5-1)が、これはフレームシフト変異によって開始コド ンから+387 bp の ORF の途中に終止コドンが生じていた(付図 5-1)。EL10 アセンブリにおい ては、第3 染色体の末端から約 2.5 Mb 付近に orf20_{NK-198} 及び orf19 のそれぞれに類似のコピー が3コピーずつ、計6コピーの orf20 様遺伝子がコードされている(図 5-1、付表 5-1)。この遺 伝子クラスターから 10 kbp 離れた位置に LOC104888056 の相同遺伝子が見つかり、タンパク質 コード域にはナンセンス変異やフレームシフト変異は見つからなかった。

BvOMA1-1、orf20 様遺伝子クラスター及び *LOC104888056* の位置関係が明らかにされているのは EL10 アセンブリのみで、いずれも第3 染色体から見つかる。*BvOMA1-1 と orf20* 様遺伝子 クラスターは約 8.2 Mb 離れて位置していた(図 5-1、付表 5-1)。

OMA1 タンパク質において、亜鉛結合モチーフはペプチダーゼ活性に必須であり(HExxH、 Käser *et al.* 2003)、真核生物で広く保存されている。このモチーフのアミノ酸配列は、BvOMA1-1 及び BvOMA1-2 がいずれも HEVGH で保存型であった(付図 5-2)。一方で、KWS2320 ORF20L は HQVGH、LOC104888056 は TQVAD といずれも変異型であった(付図 5-3)。

Beteae 連におけるテンサイ OMA1 相同遺伝子の分布

前項の結果よりテンサイでは *BvOMA1-2* 及び *LOC104888056* が presence/absence 多型(p/a 多型)を示す可能性が考えられる。4 つのテンサイ *OMA1* 相同遺伝子に p/a 多型が見られるかどうか、テンサイが属する Beteae 連(*Beta* 属及び *Patellifolia* 属)における分布を、PCR 増幅の 有無によって調査した。

BvOMA1-1 及び *BvOMA1-2* は塩基配列が類似しているので、両者に共通な領域にプライマー を設計し、第1エキソンに見られる合計約 200 bp の in-del 多型(付図 5-4)を検出に利用し、 増幅されたアンプリコンの断片長からこれらの遺伝子の有無を判定した。*orf20* 様遺伝子及び *LOC104888056* については、それぞれに特異的なプライマーを用いた。PCR 増幅の有無を表 5-1 に示す。

BvOMA1-1 のシグナルは Patellifolia 属と Beta 属の全ての供試個体から検出された。BvOMA1-2 は Patellifolia 属植物からは検出されない。一方、B. trygina から B96-5 の 3 個体と、B. v. vulgaris の 1 個体からシグナルが得られ、その他の個体から増幅は確認されなかった。orf20 様遺伝子 は、Patellifolia 属植物からは検出されないが、B. trygina の B96-5 の 4 個体、及び Beta 節に属す るすべての個体からバンドが得られた。LOC104888056 は、Patellifolia 属植物からは検出され ず、Corollinae 節では B. trygina の B96-5 の 4 個体から検出された。Beta 節のうち B. vulgaris 種 以外の供試植物では、B. patula からは検出されなかったが、B. macrocarpa では 3 個体全てから 増幅が確認された。一方で、B. vulgaris では B. v. adanensis の 1 アクセッション 3 個体を除いた 11 個体より検出された。

BvOMA1-2 及び LOC104888056 の転写解析

前項までに、*BvOMA1-2* 及び *LOC104888056* は *Beta* 属に広く分布しているが、p/a 多型を示 すことが分かった。これら 2 つの遺伝子について、以下のような調査を行った。

BvOMA1-2 の転写産物のタンパク質コード域(CDS: coding sequence)の塩基配列を BvOMA1-1 と比較したところ、CDS における多数の塩基置換に加えて 5 つの in-del 多型が見られた(付図 5-4)。即ち、BvOMA1-2 には、BvOMA1-1 を基準として、第1エキソンにおいて A283-C435 に 153 塩基、G599-A655 に 57 塩基の欠失があり、第2エキソンの T1019-T1024 に 6 塩基の欠失、 T1074 と C1075 の間に 5 塩基の挿入、及び G1071 と C1072 の間に 16 塩基の挿入が見られた。 RefBeet-1.2.2(Dohm *et al.* 2014)に記載されている mRNA-seq 情報によれば、BvOMA1-2 には スプライシングバリアントが存在する(BvOMA1-2_X2 とする)。BvOMA1-2_X2 は、第2エキ ソン 3'末端のスプライシングの位置が変化し、 35 塩基の欠失が生じていた。これはフレーム シフト変異であり、第3 エキソン内部に終止コドンが生じる(付図 5-4、BvOMA1-1 における A1172 の位置)。

LOC104888056 と KWS2320 *orf20L* の CDS の塩基配列を比較すると、多数の塩基置換に加え 30 以上の in-del 多型が見られ(付図 5-5)、アラインメントスコアは 67 であった。*LOC104888056* についても、RefBeet-1.2.2 の mRNA-seq 情報ではスプライシングバリアント (*LOC104888056*_ X2) が見つかった。*LOC104888056*_X2 は第1エキソン内にドナー部位があるので、第1エキ ソンが 117 塩基欠落する (付図 5-5)。

こうしたデータが再現されるかどうかを調べるべく、RT-PCR を行った。表 5-1 に基づき、 *BvOMA1-1* 及び *BvOMA1-2* の両方をもつ系統として NK-305 を選び出した。この系統の未熟葯 由来の cDNA を用いて、両遺伝子の第1エキソンの in-del 多型を含む領域をターゲットとした PCR を行うと、0.2 kbp と 0.3 kbp の二つのバンドが検出された(図 5-2A)。さらに、cDNA よ り *BvOMA1-2* の CDS 配列全長を PCR 増幅し、クローン化してシーケンス解析すると、第1イ ントロンあるいは第2イントロンがスプライシングされていないバリアントや、*BvOMA1-2_*X2 と同様に第2エキソン 3^{*}末端のスプライシング位置が変化したものが見つかった。 *LOC104888056* についても、TA-33BB-O 由来の緑葉、根及び花芽から cDNA を抽出し、第1エ キソンを PCR 増幅したところ、0.7 kbp の単一のシグナルバンドが得られた(図 5-2B)。バン ドサイズより、リファレンスゲノムに見られるようなスプライシングバリアントは検出されな いと思われる。シグナル強度は緑葉で最も低かった(図 5-2B)。

被子植物における OMA1 相同遺伝子

次に、被子植物における OMA1 相同遺伝子を探索した。AtOMA1 のアミノ酸配列をクエリと して、公開されている被子植物ゲノム DNA 塩基配列に対し、tBlastn を行った。相同性を示し た塩基配列を含む遺伝子に付されている情報を基に、翻訳産物のアミノ酸配列を得た。これと AtOMA1 アミノ酸配列の blastp を行った。単子葉植物 3 種、基部被子植物アムボレラ(Amborella trychopoda)、ナデシコ目 4 種(テンサイを含む)、キク類 7 種、バラ類 21 種、及びユキノシタ 目に属する Kalanchoe fedtschenkoi の合計 37 種の解析結果を図 5-3 及び付表 5-2 に示す。

調査した37種すべてより相同配列が発見された一方で、遺伝子のコピー数が異なっていた。 24種は1コピーであったが、13種は複数コピー保持していた。最もコピー数が多いのはタル ウマゴヤシ(Medicago truncatula)の8コピーであった。マメ目の他の種においてダイズ(Glycine max)は2コピー、ミヤコグサ(Lotus japonicas)は2コピーであった。しかしながら、単一種 のみを解析した目を除き、全ての種が複数コピー種であった目はマメ目以外に見つからない。 同一目内に1コピー種と複数コピー種が混在する目は、10のうち6であった。

*OMA1*相同遺伝子を複数コピー保持する種において、AtOMA1 アミノ酸配列との類似性が高 い遺伝子に加え、類似性が低い遺伝子が見られた(付表 5-2)。例えば、オランダイチゴ(*Fragaria vesca*)では合計 3 コピーの *OMA1*相同遺伝子が見つかった。そのうち、*LOC101311625*の E-value は E-175 であったが、*LOC101311329*は 3E-43、*LOC105353198*は 2E-74 と比較的配列類似性が 低い。そこで、解析に供した被子植物種で最も遠縁と思われる単子葉類のイネのオーソログ *LOC4330648*の E-value (5E-141)を基準とし、上回っているものを派生型、下回っているもの を保存型として分類した。なお、イネに含まれる2コピーの遺伝子はAtOMA1 との E-value が より低い方をオーソログとみなした(5.00E-141 [LOC4330648] vs. 2.00E-19 [LOC107280146])。 保存型コピーに分類された遺伝子は *OMA1*オーソログである可能性が高い。保存型コピーは 30 種において1コピーで保持されたが、5つの目6種で保存型が2コピー見つかった[ワタ (*Gossypium raimondii*)、タルウマゴヤシ、ダイズ、レタス(*Lactuca sativa*)、ゴマ(*Sesamum indicum*)、 キスア(*Chenopodium quinoa*)]。一方で、ミヤコグサは2コピーいずれも派生型であった (E-value: E-135、E-107)。なお、テンサイ相同遺伝子のうち、*BvOMA1-1*のみが保存型であ り、KWS2320 *orf20L*を含む他の3 遺伝子は派生型であった。

ナデシコ目において、キヌアは2コピー、ホウレンソウ(Spinacia oleracea)は1コピー、ア マランサス(Amaranthus hypochondriacus)は 1 コピーであった。キヌアの相同遺伝子である *CqOMA1-1*及び*CqOMA1-2*はいずれも保存型であった(いずれもE-valueは2E-177、vs. AtOMA1)。 その周辺領域 200 kbp は互いに高い相同性を示し(図 5-4A)、 *CqOMA1-1* 周辺の約 300kbp は *BvOMA1-1*の周辺領域 600 kb と相同性を示した(図 5-4B)。

orf20 様遺伝子の進化には系統特異的な遺伝子重複が関わる

前項までの結果を踏まえると、テンサイにおけるコピー数の増大は、系統特異的な遺伝子重 複が関わる可能性が示唆された。テンサイ第3染色体における OMA1 相同遺伝子の重複を特徴 づけるべく、シンテニー解析及び分子系統学的解析を行った。

まず、テンサイリファレンスゲノム RefBeet-1.2.2 における BvOMA1-1 周辺 600 kb と orf20 様 遺伝子周辺 100 kb に含まれる遺伝子を比較したところ、病原抵抗性遺伝子及び Pentatricopeptide-repeat 遺伝子が共通して見つかったが、それら以外は相同性を示さなかった (付表 5-3)。次に、シロイヌナズナと、テンサイ近縁種であるホウレンソウの OMAI 周辺を調 査した。これらの2種において OMA1 相同遺伝子は1コピーである(図 5-3)。周辺領域 100~ 600 kbp に座乗する遺伝子をクエリとして互いのリファレンスゲノムに対し相同性検索を行っ た。その結果、テンサイ BvOMA1-1 が位置する第3染色体 10.5 Mb の遺伝子の配置は、他の2 種の *OMA1* 相同遺伝子が含まれる領域である、 シロイヌナズナ第 5 染色体の 21 Mb と、 ホウレ ンソウのある scaffold (NW 018931419.1) に保存されていた (図 5-5A)。これらのシンテニー 領域は、遺伝子間領域を含めると 500 kbp(テンサイ)、72 kbp(シロイヌナズナ)及び 200 kbp (ホウレンソウ) に及んだ (図 5-5A)。なお、ホウレンソウドラフトゲノムでは染色体レベル のアセンブリはなされていない。これらのシンテニー領域に含まれる遺伝子のうち、OMAI相 同遺伝子のコード域のみ、シロイヌナズナで逆位が起きていた(図 5-5A)。テンサイ第 3 染色 体 2 Mb の orf20 様遺伝子周辺領域 100 kbp における遺伝子の配置は、ホウレンソウの別の scaffold(NW 018931398.1)の部分領域 100 kbp で保存されていたものの、当該領域において orf20 様遺伝子や OMA1 相同配列は見つからなかった (図 5-5B)。一方で、シロイヌナズナにテ ンサイ orf20 様遺伝子周辺領域やホウレンソウ NW 018931398.1 とシンテニーを示すゲノム領 域は見つからなかった。

次に、テンサイ OMA1 相同遺伝子の系統関係を明らかにすべく、分子系統学的解析を行った。 テンサイから BvOMA1-1、BvOMA1-2、KWS2320 orf20L 及び orf20_{NK-198} を供試したが、 LOC104888056 は他の相同遺伝子との類似性がきわめて低いことから解析から除外した。他の 被子植物については、派生型コピーは同様の理由から解析に適さないと考えられたので、保存 型コピーを選び出し、解析に供した。合計 43 の OMA1 相同遺伝子に加え、外群としてゼニゴ ケ (Marchantia polymorpha) の OMA1 を用いた。これらの翻訳産物のアミノ酸配列を解析に供 試した (図 5-6、図 5-7、付図 5-6、付図 5-7)。

近隣結合法及び最尤法いずれにおいても、ナデシコ目由来の OMA1 相同遺伝子は単系統群を 形成した。さらにナデシコ目クレード内において、KWS2320 orf20L 及び orf20_{NK-198} は単一のク レード(以下、orf20 クレードとする)を形成した。

98

ナデシコ目クレードにおけるトポロジーは、解析条件によって異なっていた。アミノ酸配列 を近隣結合法に供したところ、アマランサス AhOMA1 が先に分岐した後に、キヌア及びホウレ ンソウの OMA1 相同遺伝子が単系統群として分岐し、テンサイの 4 遺伝子のみで一つのクレー ドを形成した(図 5-6)。その後、orf20 クレードが先に分岐し、BvOMA1-1 と BvOMA1-2 の間 で枝が分かれていた(図 5-6)。一方、最尤法による予測では、 AhOMA1、orf20 クレードが先 に分岐したが、このノードは三分岐であった(図 5-7)。残りの遺伝子については、BvOMA1-1 及び BvOMA1-2 が単系統群として分岐した後に、ホウレンソウ SoOMA1 が分岐し、キヌアの 2 つの相同配列が単一のクレードを形成していた(図 5-7)。いずれの系統樹においても orf20 ク レードの内部枝は、内群における他のすべての内部枝及び末端枝よりも長かった。

orf20 様遺伝子は OMA1 オーソログとは選択圧が異なる

前項の系統解析において、*orf20 クレードの*内部枝は比較的長かったことから、このグルー プに対する選択圧が変化していることが示唆された。これを検証すべく、遺伝子に作用する自 然選択を検討した。

選択圧は、CDSの同義置換率あたりの非同義置換率の比(dN/dS)を指標とした。CDSのdN/dSが1を上回っていた場合、アミノ酸配列の変化に対して正の選択がかかっていると考えられる(多様化選択)。dN/dSが1より低い場合、負の選択がかかっていると考えられる(純化選択)。

まず、*OMA1* オーソログと orf20 様遺伝子で dN/dS が異なるのか調べた。*OMA1* オーソログ は被子植物における保存型コピー、orf20 様遺伝子は KWS2320 orf20L 及び orf20_{NK-198} を解析に 供試した。まず、帰無仮説としてすべての遺伝子において dN/dS が同一であると仮定した (One ratio model)。このモデルにおいて dN/dS 値は 0.24 であった (表 5-2)。次に、対立仮説として 保存型コピーと orf20 様遺伝子で dN/dS が異なるとしたモデルを仮定した (Branch model)。こ の条件下において、保存型 *OMA1* は 0.22、orf20 様遺伝子は 1.23 であった (表 5-2)。これら二 つのモデルの適合性を評価すべく尤度比検定 (Yang 2007) を行ったところ、帰無仮説は棄却さ れた (p=2E-35; Chi-square test)。

この結果によれば、orf20 様遺伝子に対する選択圧は他の OMA1 オーソログと異なることが 示唆された。次に、正の選択を受けるアミノ酸残基の有無を調べるべく、サイトモデルによる 選択圧の検出を行った。今までに塩基配列が明らかにされた 11 種の orf20 様遺伝子を解析に供 した。なお、orf20_{NK-219-1} は偽遺伝子化している可能性が高いので(Ohgami et al. 2016)、解析か ら除外した。KWS2320 orf20L は TK-81mm-O 由来の orf20L と同一の遺伝子であるのでこちら で代替している。

まず、正の選択を受けるサイトの有無を調べた。モデルは 5 つ想定した(M0、M1a、M2a、

99

M7 及び M8; 材料および方法の項参照)。M0 は、dN/dS がすべてのサイトで均一であると仮定 している(帰無仮説)。M1a 及び M7 は、dN/dS が1以下であると仮定しており、これらは M0 に対する対立仮説である。M2a 及び M8 は、これらのモデルに加えて dN/dS が1を上回ること を想定に入れたモデルである。したがって、M2a 及び M8 は、それぞれ M1a 及び M7 の対立仮 説となる。

これらのモデルにおいて算出された dN/dS 値は 2.45 (M0)、0.44 (M1a)、3.57 (M2a)、0.40 (M7) 及び 3.58 (M8) であった (表 5-3)。まず、M0-M1a 間、M0-M7 間の尤度を用いて検定 すると、M0 モデルは棄却された (p = 1.9E-07, M0 vs. M1a; p = 2.4E-07, M0 vs. M7; Chi-square test)。さらに、M1a-M2a 間と M7-M8 間で尤度を比較したところ、M1a 及び M7 は棄却された (p = 2.6E-33, M1a vs. M2a; p = 2.1E-33, M7 vs. M8; Chi-square test)。よって、orf20 様遺伝子に正 の選択を受けるコドンが含まれる可能性が高い。Bayes Empirical Bayes analysis (Yang *et al.* 2005) により、M8 モデルにおいて正の選択を受ける可能性が有意に高い (p < 0.05) と予測されたア ミノ酸残基は 37 個であった。そのうち 26 個 (70.3%) は予想膜貫通ドメインに含まれていた (図 5-8)。

OMA1 オーソログに orf20 様遺伝子と同等の機能はあるか

前項の結果によれば、orf20 様遺伝子に対する選択圧が OMA1 オーソログとは異なる可能性 が高い。このことから両者のコード域の機能が異なることを示唆されたため、調査を行った。

まず、 $orf20_{NK-198}$ 及び OMA1 オーソログ (*BvOMA1-1* とシロイヌナズナ *AtOMA1*) の翻訳産 物のアミノ酸配列を比較した。アラインメントスコアを指標にすると、オーソログ間の値(55) よりもオーソログと ORF20_{NK-198}間の類似性は低かった(36 [vs. AtOMA1]、47 [vs. BvOMA1-1])。 これは予測 M48 ペプチダーゼドメインにおいても同様であった(オーソログ間: 71; orf20_{NK-198}—オーソログ間: 45 [vs. AtOMA1]、51 [vs. BvOMA1-1])。ORF20_{NK-198}固有の in-del 多 型が 7 つ見つかり、そのうち 4 つは M48 ペプチダーゼドメイン内に位置する(図 5-9)

次に実験的に機能を調査した。orf20 様遺伝子の翻訳産物の機能は既に第2章で述べた。以下の一連の実験において、AtOMA1 と BvOMA1-1 を調査した。

まず、これらの翻訳産物の細胞内局在を調べた。シロイヌナズナ Col-0 系統より AtOMA1、 テンサイ系統 TA-33BB-O より BvOMA1-1 の開始コドンから 300 bp の領域をそれぞれ PCR 増幅 し、GFP 遺伝子を含むベクターpTH2(Chiu et al. 1996)に個別にクローン化することで、GFP 遺伝子との融合遺伝子を作成した。得られたベクターをタマネギ表皮細胞に遺伝子導入し、GFP 融合タンパク質を一過的に発現させた。その結果、GFP を融合した AtOMA1 及び BvOMA1-1 のいずれからも顆粒状の GFP タンパク質の蛍光シグナルが得られた。これはミトコンドリアマ ーカーとした RFP タンパク質の蛍光シグナルとほぼ一致した(図 5-10)。

次に、preSatp6 との相互作用の有無を調査すべく、OMA1 遺伝子を高発現する形質転換カル スを作出した。Col-0 及び TA-33BB-O 由来の cDNA を鋳型に、それぞれ AtOMA1 及び BvOMA1-1 のタンパク質コード域を PCR 増幅した。これらの DNA 断片を個別にクローン化した後に、3' 末端に FLAG タグ配列を付加し、得られた融合遺伝子をテンサイ CMS 培養細胞において異所 的に発現させた。SDS-PAGE によって導入タンパク質の蓄積を確認したところ、AtOMA1 導入 カルス由来のサンプルから 48 kDa と 28 kDa、BvOMA1-1 導入カルスから 52 kDa と 32 kDa の特 異的なシグナルがほとんどの細胞株から検出された(図 5-11)。

得られた形質転換カルスを共免疫沈降に供し、タンパク質間相互作用を調査した。陽性対照 として orf20_{NK-198}導入カルス(第2章)も実験に用いた。カルスよりミトコンドリアタンパク 質を抽出し、抗 FLAG 抗体を付加したビーズとインキュベートした後に、ビーズを沈殿させた。 沈殿画分において、抗 FLAG 抗体による特異的なシグナルがすべての形質転換カルスから得ら れたものの、抗 preSATP6 抗体を用いると orf20_{NK-198}導入カルスのみで 39kDa のバンドが検出 され、AtOMA1 もしくは BvOMA1-1 導入カルスのいずれからもシグナルバンドは得られなかっ た(図 5-12)。

orf20_{NK-198}の発現により preSATP6 高次構造が変化する(第2章)が、OMA1 遺伝子でも同様 の現象が見られるか調査した。前述の形質転換カルスを用いて Blue native PAGE による複合体 解析を行った。調査したすべてのサンプルから 250kDa より高分子側にスメアなシグナルが得 られた(図 5-13)。orf20_{NK-198}導入カルスにおいて 200kDa 及び 150kDa のシグナルが得られる 一方、これらのシグナルバンドは AtOMA1 もしくは BvOMA1-1 導入カルスから検出されなかっ た(図 5-13)。

OMA1 相同遺伝子間で発現パターンが異なる

次に、OMA1 相同遺伝子間で発現パターンの比較を行った。シロイヌナズナ AtOMA1 の発現 量については、公開されているマイクロアレイデータ(Winter et al. 2007)を参照した。その結 果、全身で発現が確認され、根を基準にして2倍以上の発現変動があった組織はすべて発現上 昇が見られた(図 5-14)。その詳細は以下の通りである。乾燥種子で9倍、未熟葯(花発達の 第 12 ステージ)で2.5倍、成熟花粉で3倍、未熟種子(ステージ7~10)で2.3~6.6倍高かっ た(図 5-14、付表 5-4)。

テンサイ OMA1 相同遺伝子の mRNA 量を調査した。抽苔したテンサイ系統 TA-33BB-O の植物体 3 個体について根、緑葉、花茎、花芽、未熟葯を除いた花芽、及び未熟葯から個別に Total RNA を抽出し、リアルタイム PCR に供した。TA-33BB-O から *BvOMA1-2* の配列は検出されな

101

い(表 5-1)。根を1とすると、未熟葯は3、他の器官は1~1.25であった(図 5-15A、表 5-4)。

同様にして、*orf20* 様遺伝子特異的なプライマーを用いて実験を行ったところ、*orf20* 様遺伝 子の根における mRNA 量を1とすると、花芽で116、未熟葯で473 であった(図 5-15B、表 5-4)。 未熟葯を除いた花芽では19 であり、花芽の発現量から84%低下した(図 5-15B、表 5-4)。

orf20 様遺伝子及び BvOMA1-1 の両者が共通して発現する未成熟葯において、in situ ハイブリ ダイゼーションを葯発達ステージ毎に行い、発現を時空間的に調べた。

シロイヌナズナ Col-0 の葯横断切片に対して、*AtOMA1* の第1エキソンの部分配列に設計し たプローブを用いた検出を行った。なお、*AtOMA1* の第1エキソンに相同な配列は Col-0 ゲノ ム(TAIR10.1)において、*AtOMA1* の他には見つからない。小胞子の形態から葯の発達ステー ジを特定し、3つのステージについて調査した(Stage 6、Stage 7 及び Stage 9:それぞれ小胞子 母細胞、四分子及び小胞子を含む; Sanders *et al.* 1999)。 アンチセンスプローブにより、Stage 6 の未成熟葯ではシグナルは検出されない一方で、Stage 7 及び Stage 9 において小胞子及びタペ ート組織での発色が認められ、発色の程度はセンスプローブよりも強かった(図 5-16)。

テンサイについても同様の実験を行うべく、戻し交配系統 TA-33BB-CMS::*Rfl_{NK-198}*を用いた。 これは NK-198 を一回親、 TA-33BB-CMS を反復親として 6 回戻し交配した系統であり、作製 過程において各世代の稔性回復個体でかつ s17 マーカー型が p1p4 の個体(第 3 章参照)を花 粉親としているため、この系統の稔性回復個体は NK-198 *Rfl* と TA-33BB-CMS 由来の *rfl* のへ テロ接合体であると考えられる。なお、NK-198 から *BvOMA1-2* は検出されない(菅谷 2017)。 回復個体の減数分裂期、四分子期及び小胞子期中期(Sb-1 期)の 3 つのステージについて調査 を行った。これらのステージはそれぞれシロイヌナズナ Stage 6、Stage 7 及び Stage 9 に対応す る(第 3 章)。*BvOMA1-1* の第 1 エキソンの部分配列に設計したアンチセンスプローブにより、 小胞子期中期のみにおいて小胞子とタペート組織での発色が認められ、発色の程度はセンスプ ローブよりも強かった(図 5-17A)。一方で、*orf20* 様遺伝子の 3'非翻訳領域に設計したプロー ブを用いると、減数分裂期における小胞子とタペート組織、四分子期におけるタペート組織で 特異的な発色が観察された(図 5-17B)。

テンサイ OMA1 相同遺伝子の検出に用いたプローブの特異性を、サザンブロット解析で確認 した。TK-81mm-O (*BvOMA1-2* は検出されない、表 5-1) 由来のゲノム DNA を Hind III 処理し、 アガロースゲル電気泳動により分離した後、そのゲルをメンブレンに転写した。メンブレンに *BvOMA1-1* の DNA プローブをハイブリダイズさせたところ、3.4 kbp に単一のバンドが検出さ れた (図 5-18)。*orf20* 様遺伝子のプローブが特異的であることは示されている (Matsuhira *et al.* 2012)。

102

相同組換えが Rf1 対立遺伝子の多様性の獲得に関わる

前章の結果から *Rf1* 対立遺伝子間で *orf20* 様遺伝子の構成が多様である可能性が高く、本章 においてコード域に多様化選択が検出された。このような *Rf1* の多様性獲得のメカニズムを明 らかにすべく、これまでに同定された *Rf1* 分子バリアント間の構造比較を行った。比較対象と したのは、NK-198 *Rf1*、TK-81mm-O *rf1*、PI615522 *rf1*、NK-219mm-O *rf1*、NK-305 *Rf1* 及び仏 国大葉 *rf1* である(Matsuhira *et al.* 2012; Ohgami *et al.* 2016; 大神 2013; 上 2017)。相互比較の 結果明らかになった互いの関係は以下の通りである。

NK-305 *Rf1* は NK-198 *Rf1* と PI615522 *rf1* の両者と相同性を示した(図 5-19)。*orf20_{NK-305-1}*の コード域は *orf20_{NK-198}* と最もよく似ており、第1エキソンに非同義置換と同義置換が1つずつ、 第2エキソンに非同義置換を有する(付図 5-8、付図 5-9)。イントロンに塩基置換は見られな い。両者の相同性は上流 1.5 kbp 及び下流 1.6 kbp に及んでいた(付図 5-8)。さらに、*orf20_{NK-305-1}*の上流域約 4.7 kbp は *orf20s* と高い類似性を示した(付図 5-10)。一方で、*orf20_{NK-305-2}* と *orf20s* は、第1と第2エキソン、第1イントロンは完全一致であったが、第2イントロンに 12 個の 塩基置換、第3イントロンには 11 個の置換及び *orf20_{NK-305-2}* における 3 bp の欠失が見られた(付 図 5-10)。これらの塩基置換のある領域(第2イントロンと第3エキソン)を他の *orf20* 様遺伝 子と比較したところ、*orf20_{NK-305-2}* は NK-198 *Rf1* 由来の *orf18* (*orf21*) と完全に一致した(付図 5-11、付図 5-12)。*orf20_{NK-305-2}* と *orf20s* 間の相同性は下流 5.2 kbp に及ぶ(付図 5-10)一方で、 *orf20_{NK-305-2}*の上流約 3.3 kbp は *orf19* の上流域と最も高い類似性を示した(図 5-19、付図 5-13)。

仏国大葉 *rf1* は NK-198 *Rf1* と相同性を示した(図 5-19)。*orf20_{fukkoku}* のコード域は *orf20_{NK-198}* と一塩基多型を除き、完全一致であった(大神 2013)。*orf20_{fukkoku}* の上流域は *orf21*、下流域は *orf18* に対して相同性を示した(大神 2013)。



図5-1 テンサイゲノムにおけるOMA1相同遺伝子の模式図

KWS2320ゲノム(中段、Refbeet-1.2.2: Dohm *et al.* 2014)、EL10ゲノム(上段、Funk *et al.* 2018) 及びBAC配列(下段、Bacterial artificial chromosome、78A10: 勝山 2013;33E19,4F1: Matsuhira *et al.* 2012)における*OMA1*相同遺伝子の座乗位置及びコピー数を模式的に示した。

最上段における横太線は染色体断片を示す。縦線はOMA1及びRf1の座乗位置を示し、両者の間の 物理距離(点線両矢印)は8.2Mbである。Rzはそう根病抵抗性遺伝子座(Rhizomania resistance locus; Capistrano-Gossmann et al. 2017; Funk et al. 2018)を示す。その下部における3つの色付き四角と2本の 山形の細線は、遺伝子の構造を模式的に示し、色分けと遺伝子の対応は最上部右端の凡例に示す通 りである。横細線は遺伝子間領域を示す。各染色体及びBACの配列の左側あるいは下部に系統名と 染色体番号(あるいはBACのID番号)、括弧内に配列のアクセッション番号を示す。unlocalised scaffoldは座乗位置が特定されていないscaffoldを示し、unpublishedは未発表の配列である。ψは偽遺 伝子を示す。

Section	Species	ID	Accession no. / Line	BvOMA1-1	BvOMA1-2	orf20-like gene	LOC104888056	Source ^a
-	Patellifolia patellaris	1	IDBBNR 7042					USDA
		2	IDBBNR 7042					
		3	IDBBNR 4686					
		4	IDBBNR 4686					
		5	WB240				ND	
		6	WB240				ND	
		7	WB240				ND	
		8	WB240				ND	
	Patellifolia procumbens	9	IDBBNR 4728				ND	
		10	IDBBNR 4728				ND	
		11	IDBBNR 4728				ND	
		12	IDBBNR 4728				ND	
		13	IDBBNR 4730					
		14	IDBBNR 4730					
		15	1918					
		16	1918					
	Patellifolia webbiana	29	IDBBNR 5781					
		30	IDBBNR 5776					
		31	IDBBNR 5783					
		32	IDBBNR 5783					
		33	IDBBNR 5783					
		34	IDBBNR 5783					
		35	IDBBNR 5783					
Corollinae	Beta macrorhiza	38	IDBBNR 4679					
		39	IDBBNR 4679					
	Beta trigyna	17	IDBBNR 4757					
		18	IDBBNR 4757					
		19	B96-120					
		20	B96-120					
		21	B96-5					
		22	B96-5					
		23	B96-5					
		24	B96-5					
		25	ARMEN					
		26	ARMEN					
Beta	Beta macrocarpa	47	BETA648					IPK
		48	BETA709					
		49	BETA874					
	Beta patula	36	IDBBNR 4714					USDA
		37	IDBBNR 4714					
	Beta vulgaris ssp.	27	BGRC56777					FAL
	maritima	28	BGRC56777					
		50	BGRC56777					
	Beta vulgaris ssp.	41	TA-33BB-O					HARC
	vulgaris	42	TK-81mm-O					
		43	NK-305					
		44	I-12CMS(3)					GW
		45	I-12CMS(R)					
		46	BETA1050					IPK
	Beta vulgaris ssp.	51	BETA2161					
	adanensis	52	BETA1474					
		53	BETA1474					
		54	BETA1474					
		55	BETA1474					
-	-	-	No template					

表5-1 Beteae連におけるOMA1相同遺伝子の分布

PCR増幅が確認された区画を黒で塗りつぶし、検出限界以下であった区画は空白で示した。ND はデータがない区画を示す。

^a USDA, United States Department of Agriculture; IPK, The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research; FAL, BA Zuchtungsforschung Genbank; HARC, Hokkaido Agricultural Research Center; GW, The Great Western Sugar Company



図 5-2 BvOMA1-2 (A) 及びLOC104888056 (B) の転写解析

RT-PCRの増幅産物のアガロースゲル電気泳動像を示す。泳動像の上部に器官名を示し、 逆転写酵素(RTase: Reverse-transcriptase)の有無を+及び-で示す。ゲル左側に標的遺伝 子の名称を示し、右側にアンプリコンの断片長を付した(kbp)。



図5-3 被子植物におけるOMAI相同遺伝子のコピー数

被子植物の系統関係、種名、OMAI相同遺伝子のコピー数、及び目名を示す。目より上位の分類群 を系統樹に付した。Totalは相同遺伝子のコピー数を示し、それらを保存型(Conserved)と派生型 (Diverged)に分類し、それぞれの数を示した。テンサイ(Beta vulgaris)はRefbeet-1.2.2アセンブリの データを用いた。オオムギ(Hordeum vulgare)の相同遺伝子の一つではシーケンスのギャップがあっ たため、便宜的に保存型に分類した(*で示す)。


図5-4 OMA1相同遺伝子の周辺領域のドットプロット

キノア及びテンサイゲノム由来のscaffold間の相同性検索の結果を示す。二つの配列間で相同性を 示す領域を黒点で示す。赤太線は*OMA1*相同遺伝子の座乗位置、赤文字は遺伝子の名称を示す。縦 軸と横軸に付された番号は各配列における物理的な位置を示す(bp)。

 (A) キノア由来の配列を示し、縦軸はNW_018742987.1 (*CqOMA1-1*を含む)、横軸は NW_018744460.1 (*CqOMA1-2*を含む)の部分配列である。

(B) 縦軸はテンサイ由来のscaffold (NW_017567367.1、*BvOMA1-1*及び*BvOMA1-2*を含む)、横軸 はキノア由来のscaffoldの部分配列 (NW_018742987.1、*CqOMA1-1*を含む) である。





図5-5 テンサイ、ホウレンソウ及びシロイヌナズナのOMAI相同遺伝子周辺領域のシンテニー

シンテニー解析の結果を模式的に示した。ゲノム配列は黒の棒線で示す。その下部の太矢印は遺伝 子とその転写方向を示し、配置が保存されている遺伝子を赤あるいはピンクで塗りつぶした。また、 配列間で相同性を示す遺伝子を点線で結んだ。各ゲノム配列の左端には、植物の名称、染色体番号と 物理的な位置(あるいはscaffold名)を示し、括弧内には配列の物理的な長さを示す。ホウレンソウに はscaffoldのアクセッション番号を付した。

(A) テンサイ*BvOMA1-1*の周辺領域と、そのシンテニー領域(シロイヌナズナ及びホウレンソウ) を示す。*OMA1*相同遺伝子を黒矢印で示す。3種間で配置が保存されている遺伝子は赤で塗りつぶされ、 ピンクで色付けされた遺伝子はテンサイとホウレンソウのみで配置が保存されている。

(B) テンサイrfl領域とホウレンソウにおけるシンテニー領域を示す。KWS2320-orf20L及び LOC104888056の座乗位置を黒矢印で示す。ホウレンソウにおける対応領域には、orf20Lの相同配列は 存在せず、果実の成熟に関わる遺伝子(abscisic stress-ripening protein)が座乗する。



0.05

図5-6 近隣結合法によって予測された被子植物OMA1相同遺伝子の分子系統樹

*OMA1*相同遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列を基に近隣結合法によって推測された系統関係を示 す。ゼニゴケ*MpOMA1*を外群とした。各ノードに付した数字はブートストラップ値(1000反復)で ある。スケールバーは進化距離を示す。ナデシコ目を除く双子葉植物クレードは縮合した。縮合前 の系統樹を付図5-6に示す。遺伝子と植物種は以下のように対応している。*AhOMA1: Amaranthus hypochondriacus; CqOMA1-1, CqOMA1-2: Chenopodium quinoa; SoOMA1: Spinacia oleracea; ZmOMA1: Zea mays; OsOMA1: Oryza sativa; MpOMA1: Marchantia polymorpha*



図5-7 最尤法による被子植物OMAI相同遺伝子の分子系統学樹

OMA1相同遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列を基に最尤法によって推測された系統関係を示す。 ゼニゴケMpOMA1を外群とした。各ノードに付した数字はブートストラップ値(1000反復)である。 スケールバーは進化距離を示す。ナデシコ目およびゴマ(Sesamum indicum: SiOMA1-1, SiOMA1-2) を除く双子葉植物クレードは縮合した。縮合前の系統樹を付図5-7に示す。

表5-2 枝モデルにおけるOMAI相同遺伝子の選択圧

Model	ω ₀	ω _{OMA1}	ω _{orf20}	Parameter no.	lnL ^a	<i>p</i> -value ^b
One ratio	0.24	-	-	85	-36059.34	-
Branch	-	0.22	1.23	86	-35982.20	2.0E-35

^a各モデルにおける対数尤度を示す。

b尤度比検定によるp値を示す

表5-3 サイトモデルにおけるorf20様遺伝子の選択圧

Model	ω	Parameter no.	lnL ^a	<i>p</i> -value ^b
M0	2.45	21	-2870.16	-
Mla	0.44	22	-2856.59	1.9E-07
M2a	3.57	24	-2781.58	2.6E-33
M7	0.40	22	-2856.82	2.4E-07
M8	3.58	24	-2781.58	2.1E-33

△各モデルにおける対数尤度を示す。 ▷尤度比検定によるp値を示す

orf20 NK-198	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN	60
orf20 Fukkoku	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN	60
orf20_NK-305-1	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN	60
orf18	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN	60
orf21	MAWYRNSREVYNALKI NI RSKTEGT I PTPRVHSNSSSI EYNQSTNKCSGI EGSAKSGYEN	60
orf20 219-2	MAWYRNSREVYNAI KI NI RSKTEGT I PTPRVHSNSSSI FYNGST-KCSGI FGSAKSGYEN	59
orf20_NK-305-2	MAWYRNSREVYNAI KI NI RSKTEGT I PTPRVHSNSSSI FYNGST-KCSGI FGSAKSGYEN	59
orf19	MAWYRNSREVYNALKINERSKTEGT I PTPRVHSNSSSI FYNGSTNKOSGI FGSAKSGYEN	60
orf20 S	MAWYRNSREVYNAI KI NI RSKTEGTIPTPRVHSNSSSI FYNOST-KOSGI FGSAKSGYEN	50
orf20	MAWYRNSREVVNALKI NI RSKTEGTI PTRVHSNSSSI EVNOST-KOSGI EGSAKSGVEN	50
arf202 210-3		50
01120_219 0		55
	ՠ֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎֎	
orf20 NK-198	GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVE <mark>SW</mark> LEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP	119
orf20 Fukkoku	GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVE <mark>SW</mark> LEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP	119
orf20_NK-305-1	GFKHHQEISSFSGYARRNYHGDKTEVSVE <mark>SW</mark> LEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP	119
orf18	GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVE <mark>SW</mark> LEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP	119
orf21	GEKHHQEISSESGEARRNYHGDKTEVSVESWLEKELVPIGLILTEG-ILGYPHVHPVVVP	119
orf20 219-2	GEKHHQEISSESGEARRNYHGDKTEVSVESWIEKILIIALI-LIAYRHVHPVVVP	113
orf20_NK-305-2	GEKHHQEISSESGEARRNYHGDKTEVSVESWIEKILLGIAIMISTG-IEAYRHVHPVVVP	118
orf19	GEKHHQEISSESGEARRNYHGDKTEVSAESI LEKILI I AVALI- LAYRHVHPVVVP	116
orf20 S	GEKHHOEISSESGEARRNYHODKTEVSVESWIEKILLGIALMISTG-IEAYRHVHPVVVP	118
orf20	GEKHHOEISSESGEARRNYHGVKTEVSVEERVEKILLGIALLISHSGMIAEEYIHDVVVP	110
arf202 $210-3$		110
01120_219 0		115
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
orf20 NK-198	YTGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELE	179
orf20 Fukkoku	YTGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELE	179
orf20_NK-305-1	YTGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELE	179
orf18	YTGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIEQHILESLEREINHHELELE	179
orf21	YTGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIEQHILESLEREINHHELELE	179
orf20 219-2	YTGRKHYVI MSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIEQHIIESIEREINHHEIEIE	173
orf20_NK-305-2	YTGRKHYVI ISTTDENEKGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIEQHIIESIEREINHHEIEIE	178
orf19	YTGRKHYVI MSTTRENENGEVEKRKIQPATHPDTERVRSIEQHIIESI EREINHHEIEIE	176
orf20 S		178
orf201		179
orf20 219-3		170
01120_210 0	********:**** *** *** *****************	175
orf20_NK-198	RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLL	235
orf20_Fukkoku	RDETFKE <mark>K</mark> TIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEG <mark>M</mark> NWEIFVVDKPLVESS <mark>Y</mark> LL	235
orf20_NK-305-1	RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLL	235
orf18	LERDETFKE <mark>K</mark> TIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEG <mark>M</mark> NWEIFVVDKPLVESS <mark>Y</mark> LL	237
orf21	LERDETFKE <mark>K</mark> TIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEG <mark>M</mark> NWEIFVVDKPLVESS <mark>Y</mark> LL	237
orf20_219-2	LELERDETLKENTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSYLF	233
orf20_NK-305-2	RDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF	234
orf19	RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF	232
orf20 S	RDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF	234
orf20L	LELERDETFKEKTIWKEETDHDKDSRKKHSGAKITTNH-FGMNWFIFVVDKPWVFSSCIF	238
orf20 219-3	LELERDETFKEKTIWKEETDHDKDSRKKHSGAKITTNH-EGMNWEIFVVDKPWVFSSCIF	238

	-	

図 5-8 orf20 様遺伝子翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアラインメント(次ページへ続く)

orf20_NK-198	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLIS-LNVILFKILF	294
orf20_Fukkoku	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAE <mark>D</mark> STAFFWLLIS-LNVILFKILF	294
orf20_NK-305-1	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAE <mark>D</mark> STAFFWLLIS-LNVILFKILF	294
orf18	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAE <mark>D</mark> STAFFWLLIS-LNVILFKILF	296
orf21	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAE <mark>D</mark> STAFFWLLIS-LNVILFKILF	296
orf20 219-2	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAENRTAFFWWSMS-LYVIIFEVLF	292
orf20_NK-305-2	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMS-LYVIIFEVLF	293
orf19	DGKIVVYTGLLNHFNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEHWTALFWWSMLGFYVTLFEILF	292
orf20 S	GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMS-LYVIIFEVLF	293
orf20L	GGKIVVYTGLLNHCISDAELATIIAHQVGHAVARHEAE <mark>H</mark> WTTLLW <mark>SILLVI</mark> YMTIFQYLF	298
orf20 219-3	GGKIVVYTGLLNHCISDAELATIIAHQVGHAVARHEAEHWTTLLWSILLVIYMTIFQILF	298
-	.*************************************	
orf20_NK-198	TEPESANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI	353
orf20_Fukkoku	TEPEFANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI	353
orf20_NK-305-1	TEPEFANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI	353
orf18	TEPESANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQAR <mark>AP</mark> QLLPRT- <mark>ICLSLVGLFSS</mark> VFILY <mark>Y</mark> GRKEI	355
orf21	TEPESANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQAR <mark>AP</mark> QLLPRT- <mark>ICLSLVGLFSS</mark> VFILY <mark>Y</mark> GRKEI	355
orf20_219-2	TARKFANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQAR <mark>APQ</mark> LLPRT- <mark>ICLSLVGLFSS</mark> VFILY <mark>Y</mark> GRKEI	351
orf20_NK-305-2	TARKFANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQAR <mark>APQ</mark> LLPRT- <mark>ICLSLVGLFSS</mark> VFILY <mark>Y</mark> GRKEI	352
orf19	TAPEFANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQAR <mark>FHQ</mark> LLPRTT <mark>LRLGFVGLSSL</mark> VFILY <mark>F</mark> GRKEI	352
orf20_S	TARKFANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQAR <mark>FHQ</mark> LLPRTT <mark>LHLGFL</mark> GL <mark>SSL</mark> VFILY <mark>F</mark> GRKEI	353
orf20L	TAPEFANAISKLLSRHPLLQKVWKIIQAR <mark>FHQ</mark> LLPRTT <mark>LHLGFL</mark> GL <mark>SSL</mark> VFILY <mark>F</mark> GRKEI	358
orf20_219-3	TAPEFANAISKLLSRHPLLQKLWKIIQAT <mark>AHH</mark> LLPRT- <mark>-ALGVVGLFSL</mark> VFILY <mark>F</mark> GRKEI	356
	* : *** **** ******: ****** : ****** *:** * *****:****	
orf20_NK-198	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	413
orf20_Fukkoku	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	413
orf20_NK-305-1	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	413
orf18	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	415
orf21	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	415
orf20_219-2	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	411
orf20_NK-305-2	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	412
orf19	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	412
orf20_S	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	413
orf20L	EADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	418
orf20_219-3	EADHIGVLLMASAGYNPRVAPQAYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEAD	416

or†20_NK-198	KIYNEVVAGRAIQGLQ 429	
ort20_Fukkoku	KIYNEVVAGRAIQGLQ 429	
orf20_NK-305-1	KIYNEVVAGRAIQGLQ 429	
ort18	KIYNEVVAGRAIQGLQ 431	
or†21	KIYNEVVAGRAIQGLQ 431	
or†20_219-2	KIYNEVVAGRAIQGLQ 427	
or†20_NK-305-2	KIYNEVVAGRAIQGLQ 428	
ort19	KIYNEVVAGRAIQGLQ 428	
or†20_5	KIYNEVVAGRAIQGLQ 429	
ort20L	KIYNEVVAGRAIQGLQ 434	
or†20_219-3	KIYNEVVAGRAIUGLU 432	

図 5-8 orf20 様遺伝子翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアラインメント

コドンモデル M8 において正の選択を受けると予測されたアミノ酸残基を水色で示した。膜 貫通ドメインは灰色で示した。アスタリスクは全ての配列で共通したアミノ酸残基を示す。

AtOMA1 BvOMA1-1 ORF20_NK-198	MSWYRRTKLVFDSLRRNINPKILPRSHVTSRINNPIGSSNPSAKFSSISSREVGLRS MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVQSPIPRINSNSSSLFYNQFKSSVISGSPSISS MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKS	57 60 56
	*:***.:::*:::::::::::::::::::::::::::::	
AtOMA1 BvOMA1-1	WTSLGRNTNRIAYNPFLSQPKRYYYVDRYQVRHFKPRGPGRWFQNPRTVFTVVLVGSVGL KFGYLNGVKQNQSSLFSCVTSRNYHVDRNQIYHFKPRGFKSWFENPRHIFIAVVIGSGVV	117 120
ORF20_NK-198	GYFNG-FKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFGI	107
AtOMA1	ITLIVGNTETIPYTKRTHFILLSKPMEKLLGETQFEQIKKTYQGKILPATHPESIRVRLI	177
Bv0MA1-1		180
UKI ZU_NK-190		133
AtOMA1	AKEVIDALQRGLSNERVWSDLGYASTESSLGGGSDKGVKEMEMAMSGEDTMTDMKWSKED	237
BvOMA1-1	SKDIIESLERGISHERAWSSPGYATESVSHHEIDGHETMKALTEGMDEKVPGDWHKEE	238
ORF20_NK-198	FQHILESLEREINHHELELE	187
AtOMA1	QVLDDQWIQKSRKKDSKAHAATSHLEGISWEVLVVNEPIVNAFCLPAGKIVVFTGLLN	295
BvOMA1-1	EVLDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTTNHLEGLNWEVLVVNEPVVNAFCLPGGKIVVFTGLLK	298
ORF20_NK-198	TIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLLGGKIVVYTGLLN : :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :	247
AtOMA1	HFKSDAEVATVIGHEVGHAVARHVAEGITKNLWFAILQLVLYQFVMPDLVNTMSALF	352
BvOMA1-1	HFKSDAELATIIG HEVGH AVARHSAEQITKNMWFAILQLILYQFIAPDFANAMSNLL	255
ORF20_NK-198	HCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPESANARSKLL * :****:*.*:*:*************************	307
A+OMA1	I RI PESRKMETEADYIGUUU ASAG	377
BvOMA1-1	LRLPFSRKMEIEADYIGLLLMASAG	380
ORF20_NK-198	LRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRTICLSLVGLFSSVFILYYGRKEIEADHIGVLLMASAG ** *: : : *****:**:**:**	367
AtOMA1	YDPRVAPTVYEKLGKLGGDALGDYLSTHPSGKKRSKLLAQANVMEEALMIYREVQAGR	435
BvOMA1-1	YDPRIAPQVYEKLGKISGESSSLTEYLSTHPSGKKRAQLLARAHIMQEAVDMYREIVAGR	440
ORF20_NK-198	YDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYNEVVAGR ****:** **:**. * * : *:*** : *::***:*.:*:*** :*.*: ***	423
AtOMA1	TGVEGFL 442	
BvOMA1-1	-AIEGFL 446	
ORF20_NK-198	-AIQGLQ 429 .::*:	

図 5-9 OMA1 オーソログ及び orf20_{NK-198} の翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアラ インメント

アスタリスクは3つの配列間で共通するアミノ酸残基を示す。BvOMA1-1の予想 M48 ペプチダーゼドメインに含まれるアミノ酸残基を灰色で塗りつぶした。亜鉛結合モチー フを太字と下線で示した。



図5-10 OMAI相同遺伝子の翻訳産物の細胞内局在

融合タンパク質を一過的に発現させたタマネギ表皮細胞の蛍光観察像を示す。A及びBは、それぞれAtOMA1-GFP、BvOMA1-1-GFP由来の蛍光シグナル像である。B及びEはF₁-ATPase δ-subunit-RFP 由来の蛍光シグナル像である。C及びFは、それぞれAとB、DとEを重ね合わせた像を示す。スケールバーは50 μmを示す。



図5-11 形質転換培養細胞における導入遺伝子由来タンパク質蓄積確認実験 形質転換カルス由来のタンパク質をSDS-PAGEで分離し、ウェスタンブロット解析を行っ た。ブロット像の上部に導入したコンストラクト名を示す。Non-transgenicは非形質転換カル ス由来のサンプルを示す。ブロット像左側にタンパク質の分子量(kDa)を示し、右側のアス タリスクは非特異的なシグナルの位置を示す。検出には、抗DDDDK抗体(A)を100 ng/ml、 抗COXI抗体(B)を42.5 ng/mlで用いた。



図5-12 共免疫沈降法によるpreSATP6とのタンパク質間相互作用解析

形質転換カルス由来の精製ミトコンドリアタンパク質をSDS-PAGEで分離し、ウェスタンブ ロット解析を行った。ブロット像の上部に導入したコンストラクト名を示す。Non-transgenic は非形質転換カルス由来のサンプルを示す。Inputはミトコンドリアタンパク質、IPは抗FLAG 抗体を用いて免疫沈降したサンプルを示す。ブロット像の右側に抗体の名称を示し、抗 DDDDK抗体(aFLAG)は40 ng/ml、抗preSATP6抗体(apreSATP6)は42.5 ng/mlで検出に用い た。左側にタンパク質の分子量(kDa)を示す。



図5-13 形質転換カルスを用いたpreSATP6複合体解析

形質転換カルス由来の粗ミトコンドリアタンパク質をBlue native PAGEで分離し、ウェスタ ンブロット解析を行った。ブロット像の上部に導入したコンストラクト名を示す。Nontransgenicは非形質転換カルス由来のサンプルを示す。検出には抗preSATP6抗体を340 ng/mlで 用いた。左側にタンパク質の分子量(kDa)を示す。200kDaのシグナルの位置を赤矢印で示 す。





図5-15 テンサイOMA1相同遺伝子の器官毎のmRNA量

BvOMA1-1(A)及び*orf20L*(B)をターゲットとして行ったqRT-PCRの結果を示す。TA-33BB-Oの抽苔した植物体から各器官毎にTotal RNAを抽出し、解析に供した(n=3)。縦軸は 根を1とした時の相対発現量を示し、リファレンス遺伝子は*Actin*を用いた。エラーバーは標準偏 差を示す。横軸は器官名を示す。Flower bud Δ antherは未熟葯を除いた花芽を示す。NDは検出限 界以下であったことを示す。

R	eference gene		Actin		efla
	Target gene	BvOMA1-1	orf20L	BvOMA1-1	orf20L
	Root	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.91	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.95
	Leaf	1.25 ± 0.21	ND ^a	1.45 ± 0.33	ND
Omenn	Scape	1.08 ± 0.08	ND	1.42 ± 0.07	ND
Organ	Flower bud	1.19 ± 0.90	115.90 ± 64.61	1.38 ± 1.09	123.40 ± 75.93
	Flower bud∆anther	1.00 ± 0.18	19.43 ± 21.28	0.96 ± 0.17	17.08 ± 15.29
	Immature anther	3.25 ± 1.57	473.08 ± 9.04	3.40 ± 1.58	487.03 ± 15.37

表5-4 テンサイOMA1相同遺伝子のqRT-PCRによるmRNA蓄積量の見積もり

Mean \pm SD, n = 3; ^a Not detected



図5-16 シロイヌナズナ未成熟葯におけるAtOMA1 mRNAの局在

*AtOMA1*の第1エキソンに設計したプローブを用いて検出を行った(上部:アンチセンス鎖、下 部:センス鎖)。最上部に葯の発達ステージを示す(Sanders *et al.* 1999)。スケールバーは50 µm を示す。 各組織の略称は以下に対応している。MMC, Microspore mother cells; Tds, Tetrads; MSp, Microspore; T, Tapetum



図5-17 テンサイ未成熟葯におけるBvOMA1-1とorf20様遺伝子 mRNAの局在

*BvOMA1-1*の第1エキソンに設計したプローブ(A)、及び*orf20*様遺伝子の3'非翻訳領域に設計したプローブ(B)を用いて検出を行った(上部:アンチセンス鎖、下部:センス鎖)。パネルの上部に葯の発達ステージを示す(第3章)。スケールバーは50 μmを示す。各組織の略称は以下に対応している。MMC, Microspore mother cells; Tds, Tetrads; MSp, Microspore; T, Tapetum 123

		Anther	developmental	stage ^a
Target	Tissue	Meiosis	Tetrad	Microspore
$A \neq OM A I$	Tapetum			
AIOMAI	Microspore			
$B_{\rm W}OMA1$	Tapetum			
BVOMA1-1	Microspore			
ort 10 like gang	Tapetum			
orj20-like gene	Microspore			

^aシグナルが検出されたステージ及び組織を黒で塗りつぶした。



図5-18 サザンブロット解析のブロット像

*BvOMA1-1*の第1エキソンに設計したプローブを用いて検出を行ったブロット像を示す。左側に DNA断片長(kbp)を示す。TK-81mm-O由来の精製DNAを*Hind*IIIで処理し、解析に供した。



図5-19 PI615522 *rf1*、NK-305 *Rf1*、NK-198 *Rf1*及び仏国大葉*rf1*の分子構造比較 五角形はORF (イントロンは省略している)及びその転写方向を示し、その上部あるいは下 部に遺伝子名を示す。四角形はBNRトランスポゾン(Heitkam and Schmidt 2009)様配列を示す。 配列間の相同領域は灰色の四角で結んだ。



図5-20 Rfl分子進化モデル

青四角は共通祖先が保持していた*OMAI*遺伝子のタンパク質コード域、その左側の太線は発現調節 領域を示す。これらの色の変化は機能分化を示す。横細棒は*OMAI*相同遺伝子周辺領域を示す。赤丸 は、*RfI*進化に重要な機能的変異を示す。右下のオレンジ色の四角は*LOC104888056*を示す。下部の太 横棒はテンサイ第3染色体を示す。

双子葉植物の共通祖先では、OMA1は一コピーであり、その周辺領域はテンサイOMA1座でも保存 されている。ヒユ科の共通祖先においてRf1周辺領域の遺伝子の配置が形成される。その後、Beta属分 岐時に遺伝子重複が起こるとともに、両者の発現調節領域に変異が生じることで、祖先遺伝子の発現 をこれら2遺伝子で補うように発現する(Duplication-degeneration-complementation model)。Beta属が 進化する過程で、オーソログとパラログにそれぞれ遺伝子重複が起こり現在の4つのテンサイ相同遺 伝子が生じる。OMA1座におけるパラログ(BvOMA1-2、左端)は退化する途中なのかもしれない。一 方、Rf1座の1コピーはタンパク質コード域における変異によりpreSatp6とのタンパク質間相互作用能 と減数分裂期の未熟葯における発現能を獲得する(orf20様遺伝子におけるNeo-functionalization)。な お、このコピーはOMA1オーソログの機能を部分的に有していると思われる。もう一方のコピー(右 端)は変異が蓄積してLOC104888056となるが、これは退化しつつある遺伝子かもしれない。これら2 つの遺伝子座はどちらも第3染色体上に座乗し、互いに8.2 Mb離れている。

考察

本章では、テンサイ *Rf1* の進化過程において、系統特異的な遺伝子重複と機能分化といった 分子進化の機構が関わることを明らかにした。*Rf*誕生過程についての先行研究はほとんどなく、 今後は他植物種の事例との比較が必要である。

Rf1 進化における Neo-functionalization 及び Duplication-degeneration-complementation

本章では、まず Rf1 を構成する orf20 様遺伝子の進化的位置づけを行った。その結果、orf20 様遺伝子は OMA1 のパラログであることを明らかにした。これより、orf20 様遺伝子は OMA1 より進化してきたことになる。そうであるなら、両者の機能の比較は、前章まで明らかにして きた Rf1 の特性がいかに進化してきたのかという問題を分子進化学的側面からアプローチして いることになる。形質転換カルスの結果によれば、OMA1 オーソログである BvOMA1-1 は preSatp6 と相互作用しない。このことは、BvOMA1-1 が発現している TA-33BB-CMS の未熟葯 において preSatp6 との相互作用は検出されない(第2章)ことからも支持される。AtOMA1 と preSatp6 の相互作用も検出されないことから、OMA1 オーソログは一般に preSatp6 との明白な 相互作用能を保持しないのであろう。これらのことから orf20 様遺伝子は、preSatp6 との相互 作用能を遺伝子重複後に獲得した可能性が高い。preSatp6 との相互作用は稔性回復に重要であ ることは、前章までに述べた。したがって、Rf1 の起源には、OMA1 が遺伝子重複後に獲得し た preSatp6 との相互作用能が関わる可能性が高い。

遺伝子発現パターンを比較すると、orf20様遺伝子はほぼ雄性器官特異的に発現しているが、 BvOMA1-1 と AtOMA1 は全身で発現している。興味深いことに、BvOMA1-1 と AtOMA1 の発現 パターンは同一ではなく、AtOMA1 と比較して BvOMA1-1 では四分子期の未熟葯における発現 が失われていた(表 5-5)。未熟葯において orf20 様遺伝子は減数分裂期から四分子期に発現し ており、BvOMA1-1 の四分子期の発現の欠落を orf20 様遺伝子が相補しているように見える(表 5-5)。このことから orf20 様遺伝子には、preSatp6 と相互作用して稔性回復を行う以外に OMA1 を代替する何らかの機能があるかもしれない。実際、そのような可能性は、テンサイにおいて rf1 対立遺伝子の分子バリアントを網羅的に調査しても、明白な機能喪失コピーが見つからな いこと(Ohgami et al. 2016; 第2章)からも示唆される。一方で、減数分裂期における orf20 様 遺伝子の発現は、OMA1 オーソログには見られない性質である。これについては、遺伝子重複 後に獲得した特性と思われる。

OMA1 オーソログは、調べた限り全ての被子植物種より見つかるため、生体にとって重要な 役割を果たす遺伝子と見て良い。しかしながら、*OMA1* オーソログ欠損変異体の詳細な解析は

128

シロイヌナズナでのみ行われているに過ぎない(Migdal *et al.* 2017)。これによれば、同変異体 では酸化的リン酸化の活性が低下し、ストレス応答が変化するというが、花粉稔性の低下は報 告されていない(Migdal *et al.* 2017)。従って、花粉発達過程における *OMA1* の機能は不明であ る(濱口 2006; Migdal *et al.* 2017)。

葯における orf20 様遺伝子、BvOMA1-1、及び AtOMA1 の発現パターンは、AtOMA1 を祖先遺 伝子とすると、分子進化学における Duplication-Degeneration-Complementation model によく当て はまる (DDC モデル、Panchy et al. 2016)。すなわち、重複した遺伝子コピーの発現パターンが 相補的に祖先遺伝子の発現パターンをなぞっているように見える。このモデルは祖先遺伝子の 機能を重複遺伝子間で分担するなら、重複コピーは突然変異による崩壊を免れると主張してお り、orf20 様遺伝子がパラログとして維持される機構に関わる可能性がある。これに加え、 preSatp6 との相互作用や減数分裂期の発現は新たに獲得した機能である可能性が非常に高い。 これに当てはまる分子進化学のモデルは Neofunctionalization である (Panchy et al. 2016)。以上 より、少なくとも OMA1 オーソログとその重複遺伝子コピーのそれぞれの発現制御領域に生じ た突然変異によりパラログが進化的に維持されたこと、パラログが減数分裂期の発現能と preSatp6 との相互作用能を獲得したことが関与したと考えて良いだろう。こうした説明は、 Sub-neofunctionalizaton (He and Zhang 2005) にも合致するように見える。

Rfl 進化には系統特異的な重複が関わる

前項で論じたような Rf1 進化は被子植物種分化のどのタイミングで生じたのだろうか。テン サイ OMA1 相同遺伝子は全て第3 染色体上で発見された。orf20 様遺伝子と BvOMA1-1 は 8.2 Mb 離れて位置していたが、それらの近傍にはそれぞれ LOC104888056 と BvOMA1-2 が座乗してい た。後2者は、固有の in-del や塩基多型が多数見られる上、Beta vulgaris 種内において p/a 多型 があり、かつ、転写産物のスプライシングバリアントが見られた。orf20 様遺伝子や BvOMA1-1 ではスプライシングバリアントはこれまでに見つかっていない。これらを踏まえると、 LOC104888056 と BvOMA1-2 は生育に必須ではない可能性が高く、機能が退化しつつある遺伝 子かもしれない。しかし、本章の結果でもそれらの mRNA が検出されていることから、偽遺 伝子化しているとは結論はできない。今後詳細な検討が必要である。ただ、これらが重複した タイミングは orf20 様遺伝子誕生後と思われるので、Rf1 誕生のシナリオからは除外して良いだ ろう。

orf20 様遺伝子の分布は、Beta 節の 3 種 (B.vulgaris, B. macrocarpa, B. patula) と Corollinae 節 の B. trygina に及んでいた。これら近縁野生種のうち、B. v. adanensis と B. trygina から orf20 様

129

遺伝子がクローン化されている(上 2017、亀井 2008)。一方で、被子植物全体では OMA1 が 重複している植物種がいくつか見つかったものの、マメ目以外は目以下の分類群における系統 特異的な重複であった。ナデシコ目において、テンサイとキヌア(Chenopodium quinoa)を除 き、OMAI相同遺伝子は1コピーである。キヌアは2コピー保持しているが、いずれも保存型 であり、両者の周辺領域もよく似ている。さらに、キヌアは C. pallidicaule と C. suecicum 間の 種間交雑によって進化的に最近(440万年前)誕生した異質倍数体である(Jarvis *et al.* 2017) ことを考慮すると、キヌア OMAI 相同遺伝子のコピー数の増加は種間交雑に伴うゲノム倍化に 起因する可能性が高い。これらの事実は Beta 属の分岐後に、orf20 様遺伝子が重複した可能性 を支持する。しかしながら、分子系統解析によれば、用いる手法の違いによって *orf20* 様遺伝 子の分岐のタイミングは異なる。即ち、OMAI 相同遺伝子アミノ酸配列を用いた場合、近隣結 合法によると orf20 様遺伝子の分岐は Betoideae 亜科の分岐後だが、最尤法によればナデシコ目 の共通祖先において起きたと推測された。最尤法による系統関係が正しいとすると、ナデシコ 目において Beta 属以外のすべての植物種で orf20 様遺伝子が脱落したという仮定が必要になる。 ここでは、Betoideae 亜科が分岐した後に遺伝子重複が起きたという近隣結合法に基づき、orf20 様遺伝子の分岐年代を予備的に推定すると約4,900万年前と予測され(付表 5-5)、これは Beta 属—Patellifolia 属の分岐 (2,500 万年前、Romeiras et al. 2016) よりも古い。 今のところ Patellifolia 属に orf20 様遺伝子は見つかっていないため、二次的に消失したのかもしれないが、詳細は不 明である。

遺伝子重複のメカニズム

テンサイにおける OMA1 相同遺伝子の遺伝子重複を特徴づけるため、シンテニー解析を行っ たところ、BvOMA1-1 周辺領域の遺伝子の配置は、双子葉植物の共通祖先においてすでに確立 し保存されている傾向が強い一方、orf20 様遺伝子周辺のシンテニー領域はヒユ科の共通祖先 で形成されたことが示唆された。後者のホウレンソウにおけるシンテニー領域には OMA1 相同 配列は見つからない。さらに、BvOMA1-1 と orf20 様遺伝子の周辺領域間では、多重遺伝子族 (病原抵抗性遺伝子及び Pentatricopeptide-repeat 遺伝子)を除いて共通する遺伝子が見つからな い。もし、Betoideae 亜科の分岐後に orf20 様遺伝子が重複したとすると、まず現在の Rf1 周辺 領域に見られるような遺伝子の配置が先に形成され、その後 OMA1 相同遺伝子が単独で遺伝子 重複したのだろう。この重複のメカニズムは不明であるが、コード域の構造(エキソンとイン トロンの数)が保存されていることから、おそらくゲノム DNA 配列が重複したと考えられる。 被子植物において OMA1 相同遺伝子を探索したところ、複数コピー保持する種は存在するが、 以上のような進化過程を経ている植物種は多くない。多くの種は保存型 OMA1 相同遺伝子が1 コピーであり、37 種のうち 6 種が 2 コピーの保存型を保持していた。そのうちゴマを除く 5 種で系統特異的な全ゲノム重複(WGD: Whole genome duplication)や倍数化が進化的に最近起 きたことが報告されている。マメ目では系統特異的な WGD が起こっており、調べた 3 種の共 通祖先において一度(~5,800 万年前)、ダイズでは分岐後にもう一度起きている(~1,300 万 年前、Schmutz et al. 2010; Young et al. 2011)。さらに、タルウマゴヤシはダイズと比較して遺伝 子重複の頻度が 3 倍程度多いという(Young et al. 2011)。ワタは 1,300~2,000 万年前に WGD が起こった一方で、レタスは約 4,500 万年前に、WGD が起きた後二倍体と交雑して六倍体の 祖先種が生じたという(Wang et al. 2012; Reyes-Chin-Wo et al. 2017)。これらのことから、被子 植物において OMA1 相同遺伝子の重複に関わる主たる機構は WGD と思われ、orf20 様遺伝子 で推測された過程をたどっている例はあまり見られない。

一方で、派生型に分類される OMAI 遺伝子については、それらの機能解析がなされておらず 詳細は不明である。派生型コピーは orf20 様遺伝子のように新機能を獲得しているか、さらに は Rf として機能している可能性は考え得る。なお、派生型コピーを有する種で、属内あるい は種内で CMS が報告されているのは、オランダイチゴ (Fragaria vesca)、タルウマゴヤシ (Medicago truncatula)、ヒマワリ (Helianthus annuus)、イネ (Oryza sativa)及びオオムギ (Hordeum vulgare) である (Laser and Lersten 1972; Kaul 1988)。

以上のような考察を総括した Rf1 の分子進化モデルを図 5-20 に図示した。

Rfl の多様化のメカニズム

テンサイ *Rf1* 遺伝子座は *orf20* 様遺伝子の構成を変えることで対立遺伝子の作用力を増減さ せている(第3章、第4章)。その機構を既知の分子バリアント間の構造比較により検討した ところ遺伝子間領域を介した相同組換えが示唆された。仏国大葉 *rf1* は NK-198 *Rf1* の部分断片 が組み合わさることで生じた分子バリアントである。NK-305 *Rf1* は PI615522 *rf1* 及び NK-198 *Rf1* 由来の塩基配列をキメラ状にもつ。これを詳細に検討すると、*orf20_{NK-305-2}* のコード域内が *orf20* & *orf18*(*orf21*)の両者が関わる相同組換えの産物であることも示唆された。このことは、 *orf20* 様遺伝子の翻訳産物を多様化させる機構に相同組換えが関わる可能性を支持する。前章 までの結果によれば、*orf20_{NK-305-2}* と *orf20* & *tpreSatp6* と相互作用せず、*orf18* は相互作用能を持 つ。このことから、*orf18* 相同配列由来の C 末端側の約 100 アミノ酸により相互作用は付与で きないと思われる。*orf20* 様遺伝子が *preSatp6* と相互作用する機構についてはよく分かってい ない。こうした自然界に存在する組換え産物の解析を通じて、何らかの情報が得られるかもし

131

れない。

これまでにテンサイから見つかった orf20 様遺伝子は塩基配列が多様化しており、OMAI オ ーソログとはコード域における自然選択が異なっていると思われる。さらに、最尤法における 枝モデル及びコドンモデルのいずれを用いても多様化選択が示唆された。コドンモデルにおい て、正の選択下にあると予想されたコドンの多くは膜貫通ドメインに局在していた。出芽酵母 においてミトコンドリア内膜に結合するプロテアーゼ Ymel は Omal のようにミトコンドリア 内膜タンパク質品質管理を行うが、これが基質を認識し膜外へ引き出す機能には膜貫通ドメイ ンが重要であるという(Lee et al. 2017)。これと同様に、orf20 様遺伝子の翻訳産物が preSatp6 翻訳産物の高次構造を変える分子シャペロン様活性に膜貫通ドメインが重要であるとすると、 その領域の突然変異は機能を損なうとも考えられるので、多様化とは相容れない。一方で、一 般的には多様化選択が共進化に関わる遺伝子に見られること (Tanaka and Nei 1989; Bergelson *et* al. 2001)を考えると、膜貫通ドメインの多様化は認識できる基質を多様化させるのかもしれな。 い。しかし、こうした結論は尚早である。なぜなら、本章で解析に用いた配列が少ない上、遺 伝子変換や組換えが起こる遺伝子は最尤法による多様化選択の検出において偽陽性が生じる 可能性が高くなるという(Anisimova *et al.* 2003; Casola and Hahn 2009)。*orf20* 様遺伝子のタン パク質コード域において遺伝子変換(上 2017)や相同組換え(本章)が示唆されているため、 解析に用いる配列の数を増やしたり、他の統計量を指標にするなど慎重に検討すべきである。

第6章

総合論議

第6章 総合論議

本研究では、テンサイ CMS における花粉稔性回復に翻訳後制御が関わることを明らかにし、 育種系統や Beta 属遺伝資源における Rfl 対立遺伝子や相同遺伝子の分子レベルの多様性が機能 的に、あるいは進化遺伝学的にどのような意義を持つのかを総合的に考察するデータが得られ た。

テンサイ CMS の翻訳後制御はユニークなシステムである

第2章で述べたような、Rf が S-ORF 翻訳産物の高次構造を変化させる翻訳後制御メカニズ ムは、他植物種で未だ報告例がない。テンサイのシステムを特徴づけるのは Rf のターゲット が S-orf 翻訳産物であるにもかかわらず S-ORF 蓄積量を減少させない点である。Rf と S-orf 間 の分子レベルの相互作用が調べられているのはイネ、ペチュニア及びダイコンにおける PPR タ ンパク質 (Kazama and Toriyama, 2003; Gillman et al. 2007; Uyttewaal et al. 2008) であるが、これ らは S-orf の mRNA をターゲットとしており、直接的 (Kazama et al. 2008) もしくは間接的 (Hu et al. 2012) に結合すると言われている。PPR-Rf はタンパク質複合体に含まれ、mRNA をプロ セッシング、分解あるいは翻訳阻害することで S-orf 翻訳産物の蓄積を阻害する (Chen and Liu 2014)。一方で、テンサイ Rfl の翻訳産物は S-ORF (preSATP6) に直接結合し、250kDa 複合体 を減少させるが単量体の蓄積に影響を与えない。

なぜテンサイ CMS において翻訳後制御が進化したのだろうか。これには、S-orf の発現メカ ニズムが関わるかもしれない。即ち、PPR-Rf が見つかっている CMS において S-orf はミトコ ンドリア遺伝子とポリシストロンを形成するのに対し、preSatp6 は atp6 の 5'末端に in-frame で 結合したプレ配列である(Onodera et al. 1999; Yamamoto et al. 2005)。しかも、atp6 のプレ配列 は ATP6が ATP 合成酵素の Fo部位に組み込まれるために重要な役割を果たす(Zeng et al. 2007)。 そのため、preSatp6 の翻訳は atp6 の遺伝子発現に必須であると思われる。もし、RNA プロセ ッシングや翻訳阻害により preSatp6 の翻訳産物量を変更しようとするなら、ミトコンドリア機 能に必須である atp6 の発現に影響を及ぼしかねない。

CMS が種間交雑に起源を持つ植物種が知られている(Kaul 1988)が、Owen 細胞質において は複数の研究者が種内変異であると結論しており(Fénart *et al.* 2006; Nishizawa *et al.* 2007; Darracq *et al.* 2011)、反証は見つかっていない。*B. vulgaris* 栽培種における Owen 細胞質の分布 はテンサイ、ガーデンビート、家畜ビート及びフダンソウに及んでいるという(Bonavent *et al.* 1989; Cheng *et al.* 2009; Yoshida *et al.* 2012)が、野生ビートにおいてこれまでに Owen 細胞質が 発見されたのはフランス大西洋岸由来の *B. v. maritima* のみであり、デンマーク、イベリア半島、 モロッコおよびマカロネシアからは見つからないという(Fénart *et al.* 2008; Leys *et al.* 2014; 佐 野 2018)。加えて、B. vulgaris において 20 種以上のミトコンドリアゲノムを調査しても、atp6 に preSatp6 もしくは類似のプレ配列を保持するタイプは稀であった(本間 2010)。以上より、 Owen 細胞質は元来フランス大西洋岸の野生ビートが保持する細胞質であった可能性が考えら れる。これについては、今後野生ビート遺伝資源を用いた詳細な解析が必要である。

以上の Owen 細胞質の進化過程に関する議論に対して、orf20 様遺伝子の相互作用能を持つコ ピーの分布は興味深いのだが、この情報は僅少である。理論的には、稔性回復能は S-orf を保 持する植物体に有利に働くため(Werren 2011)、相互作用能を持つ orf20 様遺伝子の分布と Owen 細胞質の分布は一致することが考えられる。 本研究ではテンサイとフダンソウの相互作用を持 *つ orf20* 様遺伝子を特徴付けた。さらにテンサイにおいては一般に稔性回復遺伝子の出現頻度 が高い(Bosemark 2006)。以上より、相互作用能を持つコピーは B. vulgaris 栽培種に広く分布 している可能性が高く、Owen 細胞質が全ての栽培種から発見されることと一致しているよう に見える。一方で、イタリアの野生ビート由来の Rfl 対立遺伝子から相互作用コピーの存在が 示唆された(第4章)。このアクセッションのミトコンドリア型は Owen 細胞質ではない(TR ハプロタイプが min07、由井 私信)。さらに、フダンソウ「仏国大葉」も Owen 細胞質を保持 しないし(大神 2013)、テンサイにおいて Owen 細胞質の頻度は高くないという (Yoshida et al. 2012)。このように、子細に検討していくと相互作用能をもつコピーと preSatp6 の分布は一致 しない可能性が示唆されるが、結論に至るにはデータが不足している。こうした調査には本研 究で開発した新規 DNA マーカー(第4章)が有効かもしれない。なお、このマーカーはコー ド域のごく少数の塩基多型のみを識別しているため、この欠点を補うためには塩基配列解析や タンパク質間相互作用解析など多方面からの検討が不可欠である。加えて、本研究では orf20 様遺伝子の相互作用能の有無だけではなく、発現量も稔性回復表現型を決定する重要な要素で あることを明らかにした(表 6-1)。*RfI* の進化と Owen 細胞質の関係を論ずるには、相互作用 能と発現量に関する情報が不可欠であろう。

Rf1 対立遺伝子の機能とその進化的側面

相互作用能をもつ orf20 様遺伝子コピーはどのように進化してきたのだろうか。コピー間の 系統関係を予測する上で、塩基配列やアミノ酸置換に基づいた系統樹は不適である。なぜなら、 コード域における相同組換えが示唆されているため(第5章)、置換を過大もしくは過少に見 積もってしまう恐れがあるためである。系統ネットワーク(Huson and Bryant 2006)は、この 問題を解消できる。これを用いて予測した系統関係を図 6-1 に示す。得られた系統ネットワー クは網状構造を示し、これは相同組換えにより生じるパターン(Huson and Bryant 2006)によ く似ている。これより、orf20 様遺伝子の進化に相同組換えが主要な役割を果たしている可能 性が高い。相互作用能を持つコピーは2グループを形成する(第4章)が、これらはネットワ ーク上で離れて位置したことからそれぞれ独立に生じた可能性が高い。これより、相同組換え が相互作用能の進化に何らかの役割を果たした可能性は否定できないだろう。

相同組換えは、もう一つの重要な要素である発現量に関与するだろうか。Rf1座における orf20 様遺伝子のように、クラスターを形成する遺伝子座において不等交差が生ずると遺伝子コピー 数が変化した分子バリアントが現れる。 表 6-1 によると、RfI 対立遺伝子間で orf20 様遺伝子の mRNA 量は 10 倍程度の variation が見られた。最も高い発現を示す NK-198 Rf1 において、4 コ ピーの orf20 様遺伝子がクラスターを形成している。このように概ね mRNA 量はコピー数と相 関しているように見える。これと関連して、ショウジョウバエにおいて、タンデム (cis) に並 んだ2コピーの重複遺伝子は、trans 配置の2コピーよりも発現量がしばしば高いという観察は 一考に値する (Loehlin and Carroll 2016)。著者は、実験的に NK-198 Rf1 に含まれる orf20_{NK-198}と 他のコピー(orf18, orf19, orf21)のゲノム断片をそれぞれ1コピーのみ形質転換した植物体 を作出し、それら導入遺伝子を交配により集積させて trans 配置の状態を作出したが、完全回 復に至らず(荒河 2016)、遺伝子発現量が不足していることが理由として考えられた。以上よ り、十分なmRNA 量を確保するためにタンデムに並んだ構造が重要である可能性がある。す なわち、相同組換えは、遺伝子コピー数を変化させることにより発現量が異なる分子バリアン トを作出するという意義があるのかもしれない。このことは、RfI が複合遺伝子座として機能 している可能性を示唆するが、さらなる調査が必要である。さらに、コピー数が同一のアレル であっても mRNA 量が異なる事例が見つかることから、 すべての orf20 様遺伝子コピーが同じ 発現量とは限らない(例えば、TA-33BB-O rfl vs. 仏国大葉 rfl; 表 6-1)。よって、相同組換え と mRNA 量の関係は慎重に検討すべきである。

Rf1 対立遺伝子の機能的な多様性は preSATP6 の 250kDa 複合体に対する作用力が多様である ことを反映していた。B. vulgaris 栽培種において多様な Rf1 対立遺伝子が維持される機構はよ く分からない。これについては、作用力の弱い対立遺伝子(単独では十分に稔性回復できない 仏国大葉 rf1 や NK-305 Rf1)が発見されたことに注意すべきであろう。一つの可能性として、 Rf1 は進化的に未熟な段階にあるのかもしれない。理論的な研究によれば、CMS-Rf システムに 基づく雌性両全性異株が維持されるためには Rf を持つ植物体に生育に不利になるようなコス トがかかることが予測されている(Cost of restoration; Delph et al. 2007)。ORF20 様タンパク質 は分子シャペロン様活性をもつが、本研究で示した preSATP6 との相互作用以外にいかなる活 性を保持するのか不明である。こうした、いわゆる雑多(promiscuous)な活性が、例えば、呼 吸鎖複合体に作用すると生体や適応度に悪影響を与えるかもしれない。preSatp6 非存在集団で は、Rf1 には稔性回復のメリットはなく、むしろそのような悪影響がより顕著に現れるであろ う。野生ビートにおける Owen 細胞質の頻度は一般的に低いが、集団間で異なるという (Fénart *et al.* 2008; Leys *et al.* 2014; 佐野 2018)から、稔性回復のメリットは総じて大きくないと思われる。実際、NK-198 *Rf1*と同じ分子構造をもつアレルはテンサイ遺伝資源で稀である (Moritani *et al.* 2013)。集団内の細胞質やそのほかの遺伝要因などによって最適な *Rf1*分子バリアントが異なるとすれば、多様な *Rf1*対立遺伝子が見つかることの説明となり得るが、各 *Rf1*対立遺伝子における機能の進化的側面については不明な点が多い。野生種を含めたより多くの *Beta* 属由来の *Rf1*対立遺伝子の分子構造や機能を明らかにするとともに、Owen 細胞質の地理的分布と関連付けた調査が必要である。

植物 Rf 進化に共通のメカニズムが関わるか

本研究は、*Rf*誕生の過程を解明した初めての研究例である。テンサイ *Rf1* は進化的に最近生 じたことから分子進化過程を調査するのに好適な材料である。他植物種において同様の研究は ほとんどないが、*PPR-Rf*とミトコンドリアアルデヒド脱水素酵素(mtALDH)をコードする *Rf*から得られているデータをまとめ、テンサイ *Rf1* と比較した(表 6-2)。

3 者間で共通しているのは遺伝子重複が Rf 進化に関わるという点のみである。一方、PPR-Rf とテンサイ Rfl で共通している点は多い。両者に共通する進化機構の一つである相同組換えを 援用すると、以下のような共通点も見つかる。例えば、相同組換えによりクラスター内のコピ ーを交換した分子バリアントを作り出すことが可能である。NK-305 Rfl のような、相互作用能 を持つ orf20 様遺伝子コピーと持たないコピーの双方を保持する分子バリアントはその好例で あろう(第3章)。このような視点で PPR-Rf の再検討を試みた。ダイコン Rfo ではクラスター を形成する3つの PPR 遺伝子について、稔性回復に与る PPR-B 以外の一つは偽遺伝子で、残 りは稔性回復とは無関係であるという(Uyttewaal et al. 2008)。クラスター内に偽遺伝子が含ま れるのは NK-219mm-O rf1 で見られるし、相互作用能のないコピーが含まれるのは NK-305 Rf1 と同様である。PPR-Rfについては、イネやオオムギにおいて複対立遺伝子である可能性が高く (Melonek et al. 2016; Melonek et al. 2018)、詳細に検討するならテンサイ Rfl のようにコピー数 の増加により mRNA 量が増えている分子バリアントが発見されるかもしれない。さらに、テ ンサイ Rf1 と PPR-Rf のいずれからもコード域の多様化選択が検出される。即ち、RF 様 PPR タ ンパク質における RNA の認識部位(Fujii et al. 2011)と ORF20 様タンパク質の膜貫通ドメイ ンのいずれからも正の選択が検出された。しかしながら、後者については慎重に検討すべきで ある(第5章 'Rflの多様化のメカニズム'の項)。以上より、コードするタンパク質が異なって いても Rf にかかる自然選択は共通している可能性が示唆された。 今後、 テンサイ Rf1 で得られ たデータに基づいて進化モデルを構築し、PPR-Rf へ適用することが可能かどうかを検討する必

要があろう。

本研究において orf20 様遺伝子の祖先遺伝子が Omal であることを確認し、orf20 様遺伝子が パラログであるとした。さらに、オーソログとパラログの機能を比較し、orf20 様遺伝子の preSatp6との相互作用能能がパラログにおいて獲得された機能であること、及びテンサイ Omal オーソログにおいても祖先型との機能的な違いがあることを見出した。以上に基づきテンサイ RfI 進化には、分子進化学における DDC モデルと Neofunctionalization が当てはまると結論した。 即ち、RfI が稔性回復能以外の機能を保持する可能性は極めて高い。PPR-Rf ではこの点につい てほとんど検討されていない。一方、トウモロコシ mtALDH(rf2a)が稔性回復能以外の機能 をもつ可能性が高いことは、以下の事実から示唆されている。すなわち、調べられたほとんど の自殖系統において rf2a は機能遺伝子をコードしていること (Schnable and Wise 1994)、rf2a 機能欠損変異体(正常細胞質を保持)は下部に位置する雄蕊において花粉稔性が低下すること (Liu et al. 2001)、及び RF2A は多くの器官で発現し、複数種のアルデヒドを分解する活性があ ること(Liu and Schnable 2002)、の3点である。さらに、rf2aと遺伝子重複によって生じたコ ピー (rf2b) との比較により、両者間で機能分担が起こっている可能性が示唆されたが (Liu and Schnable 2002)、他の植物種由来の mtALDH オーソログとの比較はなされていないことから機 能分化の過程は不明である。古典遺伝学的モデルでは、Rfには稔性回復以外の機能はないこと、 及び劣性アレルは機能喪失していることが含意であったが、分子的データとの整合性について 検証していく必要がある。

Rfl 進化過程の生物学的な意義づけ

生物進化においては新規の形質が次々に現れるが、それを可能にするのは新規の機能を持つ 遺伝子の出現である。遺伝子重複は、そうした新規の機能を獲得するのに主要なメカニズムで あるとされてきた (Ohno 1970; Panchy *et al.* 2016)。本研究により、テンサイ *orf20* 様遺伝子が 系統特異的な重複によって生じたパラログであることが明らかになり、先行研究との対比が可 能になった。

数多くの遺伝子重複による進化の事例のうち、最も注目されるのは Out-of-testis 仮説である (Kaessmann 2010)。これは、ヒトとショウジョウバエにおいて進化的に最近生じた重複遺伝 子が雄性器官特異的に発現することが多いという観察に基づき提唱された。即ち、雄性配偶子 は小型で大量に形成されるため、新機能を自然選択にかける場として都合が良いという。シロ イヌナズナにおいても新たな重複遺伝子の発現部位として成熟花粉が最も多いという(Cui *et al.* 2015)。テンサイ *orf20* 様遺伝子は遺伝子重複により花粉四分子期の *Oma1* 機能が分離独立 したともみなせるので、これによく適合する。これと関連し、ショウジョウバエにおいて雄性 器官特異的に発現する遺伝子のうち、核コードのミトコンドリア遺伝子の重複コピーが好んで 選択され、それらの多くはエネルギー伝達に関する機能を保持していたという(Gallach *et al.* 2010)。これは、雄性器官に悪影響を及ぼすミトコンドリア変異(Mother's curse)を補完する メカニズムと解釈された。この事例と *Rf* 進化から、核-ミトコンドリア間の性的対立を解消 するメカニズムとして、遺伝子重複は生物に共通なのかもしれない。

以上のように、*Rf1* 進化過程には植物以外の研究事例との共通点がいくつか見つかる。しか しながら、Out-of-testis 仮説や Mother's curse はあくまでも傾向や理論を示すにとどまっており、 実証データに乏しく何らかの機構を提案するには至っていない。テンサイ *Rf1* には培養細胞に よる機能検定実験系や豊富な遺伝資源などの研究リソースがある。今後、*Rf1* 進化過程の詳細 を解析することにより、生物進化における重要な機構を明らかにできるかもしれない。

			Do	se-effect		Protein-protein	
Derivation	s17/20L-int	Degree of fertility restoration	on fertility restoration	on the accumulation of 250kDa complex	orf20-like gene	interaction with preSATP6	<i>orf20-like</i> gene mRNA ^b
TA-33BB-O	p4/L	C.S.	No	No	orf20L	I	0.11
PI 615522	p3/S	C.S.	No	No	$orf20_S$	I	0.18
	(E				orf20 _{NK-219-1}	ND	
NK-219mm-O	p3/LS (type-219)	C.S.	No	No	orf20 _{NK-219-2}	I	0.38
					orf20 _{NK-219-3}	I	
Fukkoku-ouba	p5/S	C.S. ^a	No?	No?	orf20 _{fukkoku}	+	0.25
SUE AIN	2/04	4 5 5	Vac	Vac	orf20 _{NK-305-1}	+	0.01
CUC-VINI	C /7d	0.6.6	1 C2	I CS	orf20 _{NK-305-2}	I	0.01
					orf18	+	
801 AN	5/1s	N	No	V	orf19	+	1 00
061- VI VI	c/Id	2	0NI	51	orf20 _{NK-198}	+	1.00
					orf21	+	
a 葯内部に未発達	■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■ ■	擦され、ごくわずかに	こ回復する。		1 , , ,		

表6-1 Bf1対立遺伝子の作用力とorf20様遺伝子の機能

▶ 発現量は、*orf20*様遺伝子共通プライマーを用いて定量した、四分子期の未熟葯におけるmRNA量を示す。各アレルの発現量を便宜的に 調べるため、TA-33BB-CMSと交配した後代において、p4アレルをヘテロでもつ個体のmRNA量からp4p4個体のmRNA量の半量を減じた 値を算出し、p1p4個体により標準化した相対値を示す。



比較
過程の
分子進化
† 3 Rf
切におい
被子植物
表6-2

oduct	Sugar beet OMA1-like Mitochondrial inner membrane protein quality control Post-translational level Hypomorph (product, expression) Yes	Petunia, Radish, Rice, Rapeseed, etc. PPR RNA metabolism Post-transcriptional or Translational level Amorph, Hypomorph (product) Yes	Maize mtALDH Aldehyde metabolism Unknown Hypomorph (product), Amorph No
me	1-6	2-33 (Rf-like PPR)	1
rrence	Yes	Yes	Yes
nce time	After subfamily divergence	After speciation?	After monocots divergence
de	Segmental duplication, Tandem duplication	Tandem duplication and Others?	Segmental duplication?
Ľ	Yes? (Transmembrane domain)	Yes (RNA recognition site)	No
tention	Neofunctionalization, DDC	Unknown	Subfunctionalization?
storation	Yes?	Unknown	Yes

摘要

- mRNA trafficking の効果を期待して、orf20 様遺伝子の非翻訳領域(UTR)を含む強制発現 コンストラクトを作成し、テンサイ CMS カルスに形質転換した。導入遺伝子には、稔性回 復系統 NK-198 の Rf1 由来の orf20_{NK-198}と維持系統 TK-81mm-O の rf1 由来の orf20L を使用 した。
- 形質転換カルスを用いてウェスタンブロット解析を行うとほとんどの細胞株で導入タンパク質特異的なシグナルが検出された。UTRによる発現効率の上昇が示唆された。
- 3. 共免疫沈降法により、*orf20_{NK-198}*の翻訳産物は preSATP6 と結合するが、*orf20L*の翻訳産物 は結合しないことが分かった。
- Blue native/SDS 二次元電気泳動及びウェスタンブロット解析により、orf20_{NK-198}導入カルス において 250kDa、200kDa 及び 150kDa の preSATP6 複合体が検出され、そのうち、200kDa 複合体には ORF20_{NK-198} が含まれていた。一方、orf20L 導入カルスにおいては 250kDa の preSATP6 複合体のみが検出された。
- 5. この preSATP6 の高次構造の変化は、由来の異なる 2 種の *rf1* 由来の *orf20* 様遺伝子を導入 したカルスにおいて検出されなかった。
- 6. 稔性回復系統及び由来の異なる3種のrflを保持するCMS系統の未成熟葯を複合体解析に 供試したところ、CMS 個体ではいずれも preSATP6の250kDa 複合体のみが検出された一 方で、稔性回復個体では250kDa 複合体は著しく減少し、200kDa 及び150kDa 複合体がわ ずかに検出された。
- これらの個体の未成熟葯における *orf20* 様遺伝子の mRNA を qRT-PCR により定量したところ、稔性回復個体を1とすると、CMS 個体は 0.3~0.6 であった。
- Rf1 と preSatp6 の分子的相互作用はタンパク質レベルで起こり、おそらく ORF20_{NK-198}の結合により preSATP6 の高次構造が変化するものと思われる。この作用は rf1 アレル由来の orf20 様遺伝子では失われていた。したがって、翻訳後相互作用が稔性回復に重要である。
- 9. 遺伝子型と花粉稔性の関係から、稔性回復系統 NK-305 は Owen 細胞質を保持し、かつ、 *Rfl* によって稔性回復していることが分かった。
- 10. NK-305 *Rf1* 分離集団と NK-198 *Rf1* 分離集団の花粉稔性を調査したところ、NK-305 *Rf1* は 不完全優性対立遺伝子、NK-198 *Rf1* は完全優性対立遺伝子であった。
- 11. NK-305 *Rfl* ヘテロ接合体は花粉粒の中身が充実せず、稔性回復が不完全であった。この個体は、小胞子期の葯におけるタペート組織の退化が不十分であった。
- 12. 未成熟葯を用いた複合体解析によって、NK-305 では preSATP6 の 250kDa 複合体が減少し、
 200kDa 及び 150kDa 複合体が出現していた。後2者の複合体の蓄積量は NK-198 よりも少なかった。
- NK-305 *Rf1* 分離集団において、未成熟葯における preSATP6 の 250kDa 複合体の蓄積量は *Rf1* 遺伝子量と相関を示し、250kDa 複合体の蓄積に対する *Rf1* 遺伝子量効果が認められた。
- 14. NK-198 Rf1 分離集団においては、Rf1 ヘテロ接合体は劣性ホモ個体の 250kDa 複合体の蓄積 量から 90%低下し、Rf1 ホモ接合体では検出限界以下であった。したがって、250kDa 複合 体に対する NK-198 Rf1 の作用力は NK-305 Rf1 よりも強い。
- 15. 2 つの分離集団における preSATP6 単量体の蓄積量が約 1.7 倍異なることを見出した。この 差異と *Rf1* 遺伝子型との相関は見られなかった。
- 16. 形質転換カルスを用いて複合体解析を行い、orf20 様遺伝子各コピーの preSatp6 との相互作用能を調査したところ、NK-305 Rf1 由来の orf20_{NK-305-1}、NK-198 Rf1 由来の 4 コピーはいずれも相互作用能を保持していた。NK-305 Rf1 由来の orf20_{NK-305-2} は preSatp6 と相互作用しなかった。
- 17. NK-305 Rf1 分離集団における orf20_{NK-305-1}の mRNA を定量すると、Rf1 遺伝子量と相関した。

- NK-305 *Rf1* 及びNK-198 *Rf1* 分離集団を供試し、*orf20* 様遺伝子共通プライマーにより mRNA を定量すると、*Rf1* 遺伝子量との相関が見られ、*Rf1* ホモ接合体はヘテロ接合体よりも有意 に発現量が高かった。さらに、NK-198 *Rf1* 保持個体は NK-305 *Rf1* 保持個体よりも発現量が 高い傾向にあった。
- 19. したがって、*Rf1* 対立遺伝子の作用力は *orf20* 様遺伝子の量的効果であり、それは未成熟葯 における preSATP6 複合体の蓄積量に現れることが示唆された。
- 20. 仏国大葉 rfl を保持する個体の花粉稔性は、葯外観上は完全不稔であったが、花粉粒の残 渣が認められ、ごくわずかな稔性回復を示す。
- 21. 仏国大葉 *rfl* 保持個体の未熟成葯において preSATP6 の 200kDa 複合体がわずかに検出された。
- 22. 形質転換カルスを用いた複合体解析によれば、仏国大葉 *rf1* 由来の *orf20_{fukkoku}* は *preSatp6* と 相互作用する。
- 23. 仏国大葉 *rf1* 保持個体の未成熟葯において、*orf20* 様遺伝子の mRNA 量は NK-198 の 1/3.9 ~1/8 倍であった。
- したがって、仏国大葉 rf1 は Hypomorphic な Rf1 対立遺伝子である。このアレルに含まれる orf20_{fukkoku} は preSatp6 との相互作用能を保持するが、発現量が著しく低下していた。
- 26. preSatp6 と相互作用する orf20 様遺伝子は、修正遺伝子として機能する可能性があるため、 維持系統選抜においてこれを除去する必要がある。
- 27. orf20 様遺伝子のタンパク質コード域と相互作用能の有無を照合したところ、相互作用できるコピーは2つのグループに分けられることが判明した。

- 28. 相互作用能をもつ orf20 様遺伝子を識別するマーカーo20-Dra と o20-Xsp を開発した。これ らは、orf20 様遺伝子のコード域をターゲットとした CAPS マーカーである。
- 29. 未知 *Rf1* 対立遺伝子を含むと思われる野生ビートとテンサイ品種由来の *Rf1* 対立遺伝子の 機能とタイプを調査したところ、既存の *Rf1* マーカー(s17 と 20L-int) では稔性回復アレ ルを識別することができなかった。
- 30. o20-Dra と o20-Xsp によりジェノタイピングを行ったところ、相互作用能をもつと判定され た *RfI* 対立遺伝子を保持する個体はすべて稔性回復していた。
- 31. したがって、o20-Dra と o20-Xsp は稔性回復アレルを識別できる可能性が示唆された。これ らのタイプと s17 マーカー型を組み合わせたところ、*Rf1* 対立遺伝子における *orf20* 様遺伝 子の構成が多様であることが示唆された。
- 32. *Rf1* の進化過程に関する分子進化学的な調査を行った。*orf20* 様遺伝子は *OMA1* と相同性を 示すので、被子植物における *OMA1* 相同遺伝子を特徴づけた。
- 33. テンサイゲノムにおいて、4 種の OMA1 相同遺伝子が見つかった。AtOMA1 との E-value により相同性の高い順に並べると、BvOMA1-1、BvOMA1-2、KWS2320 orf20L、LOC104888056 である。前2者は第3染色体末端から10.7 Mb、後2者は2.5 Mb に位置しており、両者は 8.2 Mb 離れていた。
- 34. OMA1に保存されている亜鉛結合モチーフは、BvOMA1-1とBvOMA1-2はいずれもHEVGH の保存型である一方で、KWS2320 ORF20L は HQVGH、LOC104888056 は TQVAD と変異 型であった。
- 35. PCR 増幅によってテンサイ OMA1 相同遺伝子の分布を調査したところ、Beta vulgaris 種内 において BvOMA1-2 と LOC104888056 は presense/absense 多型が見られた。
- 36. 転写産物解析において、*BvOMA1-2* と *LOC104888056* の mRNA が検出されたものの、スプ ライシングバリアントが見られた。

- 37. 被子植物において、調査した全ての植物種は OMAI 相同遺伝子を1 コピー以上保持していた。相同性を基に保存型と派生型に分類したところ、37 種のうち6種が保存型を2 コピー持っていた。このコピー数の増加は全ゲノム重複が主たるメカニズムである可能性が示唆された。
- 38. これらの結果からテンサイにおけるコピー数の増加は系統特異的な重複が示唆された。
- 39. シンテニー解析により、BvOMA1-1 周辺領域の遺伝子の配置は、双子葉植物の共通祖先に おいてすでに確立し保存されている。一方で、orf20 様遺伝子周辺のシンテニー領域はヒユ 科の共通祖先で形成された後、OMA1 相同遺伝子が単独で遺伝子重複した可能性が高い。
- 40. 分子系統解析により、orf20 様遺伝子は Betoideae 亜科分岐後に生じたパラログである可能 性が示唆された。系統樹において orf20 クレードの内部枝は他のすべての内部枝及び末端 枝よりも長かった。
- 41. 最尤法による選択圧の検出において、*orf20* 様遺伝子は *OMA1* オーソログとは異なる自然選 択を受けている可能性が示唆された。サイトモデルによると、*orf20* 様遺伝子から多様化選 択が検出され、正の選択を受けると予測されたアミノ酸残基の 70% (26/37) は予想膜貫通 ドメインに位置していた。これらのことから、*orf20* 様遺伝子の翻訳産物は *OMA1* オーソロ グと機能的に異なる可能性が示唆された。
- 42. 翻訳産物のアミノ酸配列を比較すると、ORF20 様タンパク質は、オーソログ間の類似性よ りも低かった。
- **43**. *AtOMA1* と *BvOMA1-1* の GFP 融合遺伝子を作成し、細胞内局在を調査したところ、いずれ もミトコンドリア局在であった。
- 44. 形質転換カルスによる調査において、*AtOMA1* と *BvOMA1-1* は *preSatp6* と相互作用しなかった。
- **45**. 発現パターンを調べると、*AtOMA1* と *BvOMA1-1* は全身で発現するが、*orf20* 様遺伝子はほ ぼ雄性器官特異的に発現していた。

- 未成熟葯を用いた in situ ハイブリダイゼーションによると、AtOMA1 と比較して BvOMA1-1 は四分子期における発現が喪失していた。orf20 様遺伝子はこれを相補するとともに、減数 分裂期において発現していた。
- 47. したがって、*orf20* 様遺伝子は稔性回復以外の機能を保持する可能性が示唆された。*orf20* 様遺伝子の進化的な維持には Duplication-degeneraton-complementation モデルが関わる。
- 48. *orf20* 様遺伝子の *preSatp6* との相互作用能と減数分裂期における発現は Neofunctionalization に当てはまる。
- 49. Rfl 多様化のメカニズムを調べるべく、Rfl 対立遺伝子間の構造比較を行った。
- 50. 仏国大葉 *rf1* は NK-198 *Rf1* の部分断片が組み合わさることで生じた分子バリアントである 一方で、NK-305 *Rf1* は PI615522 *rf1* 及び NK-198 *Rf1* 由来の塩基配列をキメラ状にもつ。さ らに、*orf20_{NK-305-2}*のコード域内が *orf20_s* と *orf18* (*orf21*) の両者が関わる相同組換えの産物 であることも示唆された。
- 51. これらのことから、*Rf1* 対立遺伝子の多様性に遺伝子間領域およびコード域における相同 組換えが関わることが示された。
- 52. orf20 様遺伝子の CDS を用いた系統ネットワークによると、全てのコピーは1回以上の相 同組換えを経て進化したことが示唆された。相互作用能をもつコピーは独立に生じた可能 性が高い。

引用文献

- 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.
- Alexander, M.P. (1969). Differential Staining of Aborted and Nonaborted Pollen. Stain Technol. 44: 117–122.
- Anisimova, M., Nielsen, R., and Yang, Z. (2003). Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. Genetics 164: 1229–1236.
- Arimura, S. and Tsutsumi, N. (2002). A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in Arabidopsis mitochondrial division. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 5727–5731.
- Balk, J. and Leaver, C.J. (2001). The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. Plant Cell 13: 1803–1818.
- 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. 99: 10887–10892.
- Bergelson, J., Kreitman, M., Stahl, E.A., and Tian, D. (2001). Evolutionary Dynamics of Plant R-Genes. Science 292: 2281–2285.
- van der Bliek, A.M., Sedensky, M.M., and Morgan, P.G. (2017). Cell Biology of the Mitochondrion. Genetics 207: 843–871.
- Bohovych, I., Donaldson, G., Christianson, S., Zahayko, N., and Khalimonchuk, O. (2014). Stress-triggered Activation of the Metalloprotease Oma1 Involves Its C-terminal Region and Is Important for Mitochondrial Stress Protection in Yeast. J. Biol. Chem. 289: 13259–13272.
- Bonavent, J.-F., Bessone, L., Geny, A., Berville, A., Denizot, J.-P., and Brian, C. (1989). A possible origin for the sugar beet cytoplasmic male sterility source Owen. Genome **32**: 322–327.
- Bosemark, N.O. (2006). Genetics and breeding. In A.P. Draycott, ed (Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK).
- Brown, G.G., Formanová, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Zhang, J., Cheung, W.Y., and Landry, B.S. (2003). The radish Rfo restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. Plant J. 35: 262–272.
- Bryant, D. (2003). Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. Mol. Biol. Evol. 21: 255–265.
- **Budar, F., Touzet, P., and Pelletier, G.** (2006). Cytoplasmic male sterility C. Ainsworth, ed (Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK).
- **Capistrano-Gossmann, G.G. et al.** (2017). Crop wild relative populations of Beta vulgaris allow direct mapping of agronomically important genes. Nat. Commun. **8**: 15708.
- Casola, C. and Hahn, M.W. (2009). Gene conversion among paralogs results in moderate false detection of positive selection using likelihood methods. J. Mol. Evol. 68: 679–687.

- Chen, L. and Liu, Y.-G. (2014). Male Sterility and Fertility Restoration in Crops. Annu. Rev. Plant Biol. 65: 579–606.
- Chen, Z., Zhao, N., Li, S., Grover, C.E., Nie, H., Wendel, J.F., and Hua, J. (2017). Plant Mitochondrial Genome Evolution and Cytoplasmic Male Sterility. Crit. Rev. Plant Sci. 36: 55–69.
- Cheng, D., Kitazaki, K., Xu, D., Mikami, T., and Kubo, T. (2009). The distribution of normal and male-sterile cytoplasms in Chinese sugar-beet germplasm. Euphytica 165: 345–351.
- Chiu, W.L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. Curr. Biol. 6: 325–330.
- Cosmides, L.M. and Tooby, J. (1981). Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. J. Theor. Biol. 89: 83–129.
- Cui, X., Lv, Y., Chen, M., Nikoloski, Z., Twell, D., and Zhang, D. (2015). Young genes out of the male: An insight from evolutionary age analysis of the pollen transcriptome. Mol. Plant 8: 935–945.
- Cui, X., Wise, R.P., and Schnable, P.S. (1996). The rf2 nuclear restorer gene of male-sterile T-cytoplasm maize. Science 272: 1334–1336.
- Darracq, A., Varré, J.S., Maréchal-Drouard, L., Courseaux, A., Castric, V., Saumitou-Laprade, P.,
 Oztas, S., Lenoble, P., Vacherie, B., Barbe, V., and Touzet, P. (2011). Structural and content diversity of mitochondrial genome in beet: A comparative genomic analysis. Genome Biol. Evol. 3: 723–736.
- Darwin, C. (1877). The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species (Murray John: London).
- Delph, L., Touzet, P., and Bailey, M. (2007). Merging theory and mechanism in studies of gynodioecy. Trends Ecol. Evol. 22: 17–24.
- **Dohm, J.C. et al.** (2014). The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (Beta vulgaris). Nature **505**: 546–549.
- **Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W.** (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. **16**: 6127–6145.
- Doyle, J.T. and Doyle, J.L. (1990). Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.
- Ducos, E., Touzet, P., and Boutry, M. (2001). The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. Plant J. 26: 171–180.
- **Duroc, Y., Hiard, S., Vrielynck, N., Ragu, S., and Budar, F.** (2009). The Ogura sterility-inducing protein forms a large complex without interfering with the oxidative phosphorylation components in rapeseed mitochondria. Plant Mol. Biol. **70**: 123–137.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat. Protoc. 2: 953–971.
- Fénart, S., Touzet, P., Arnaud, J.-F., and Cuguen, J. (2006). Emergence of gynodioecy in wild beet (Beta vulgaris ssp. maritima L.): a genealogical approach using chloroplastic nucleotide sequences. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 273: 1391–1398.

- Fénart, S., Arnaud, J.-F., De Cauwer, I., and Cuguen, J. (2008). Nuclear and cytoplasmic genetic diversity in weed beet and sugar beet accessions compared to wild relatives: new insights into the genetic relationships within the Beta vulgaris complex species. Theor. Appl. Genet. 116: 1063–1077.
- Frank, S.A. and Hurst, L.D. (1996). Mitochondria and male disease. Nature 383: 224.
- Frank, S.A. (2012). Evolution: Mitochondrial burden on male health. Curr. Biol. 22: R797–R799.
- 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. 108: 1723–1728.
- Fujii, S. and Small, I. (2011). The evolution of RNA editing and pentatricopeptide repeat genes. New Phytol. 191: 37–47.
- Fujii, S. and Toriyama, K. (2009). Suppressed expression of RETROGRADE-REGULATED MALE STERILITY restores pollen fertility in cytoplasmic male sterile rice plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 106: 9513–9518.
- Funk, A., Galewski, P., and McGrath, J.M. (2018). Nucleotide-binding resistance gene signatures in sugar beet, insights from a new reference genome. Plant J. 95: 659–671.
- Gallach, M., Chandrasekaran, C., and Betrán, E. (2010). Analyses of Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes Suggest Gene Duplication as a Mechanism for Resolving Intralocus Sexually Antagonistic Conflict in Drosophila. Genome Biol. Evol. 2: 835–850.
- 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.
- Gillman, J.D., Bentolila, S., and Hanson, M.R. (2007). The petunia restorer of fertility protein is part of a large mitochondrial complex that interacts with transcripts of the CMS-associated locus. Plant J. 49: 217–227.
- Gómez, J.F., Talle, B., and Wilson, Z.A. (2015). Anther and pollen development: A conserved developmental pathway. J. Integr. Plant Biol. 57: 876–891.
- Gray, M.W. (2015). Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. 112: 10133–10138.
- Greiner, S., Sobanski, J., and Bock, R. (2015). Why are most organelle genomes transmitted maternally? BioEssays 37: 80–94.
- **de Grey, A.D.N.J.** (2005). Forces maintaining organellar genomes: is any as strong as genetic code disparity or hydrophobicity? BioEssays **27**: 436–446.
- Gualberto, J.M. and Newton, K.J. (2017). Plant Mitochondrial Genomes: Dynamics and Mechanisms of Mutation. Annu. Rev. Plant Biol. 68: 225–252.
- Hagihara, E., Itchoda, N., Habu, Y., Iida, S., Mikami, T., and Kubo, T. (2005). Molecular mapping of a fertility restorer gene for Owen cytoplasmic male sterility in sugar beet. Theor. Appl. Genet. 111: 250– 255.

- Hanson, M.R. and Bentolila, S. (2004). Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. Plant Cell 16: S154-69.
- He, X. and Zhang, J. (2005). Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution. Genetics 169: 1157–1164.
- Heitkam, T. and Schmidt, T. (2009). BNR a LINE family from Beta vulgaris contains a RRM domain in open reading frame 1 and defines a L1 sub-clade present in diverse plant genomes. Plant J. 59: 872– 882.
- Hohmann, S., Kadereit, J., and Kadereit, G. (2006). Understanding Mediterranean-Californian Disjunctions: Molecular Evidence from Chenopodiaceae-Betoideae. Taxon 55: 67–78.
- Honma, Y., Taguchi, K., Hiyama, H., Yui-Kurino, R., Mikami, T., and Kubo, T. (2014). Molecular mapping of restorer-of-fertility 2 gene identified from a sugar beet (Beta vulgaris L. ssp. vulgaris) homozygous for the non-restoring restorer-of-fertility 1 allele. Theor. Appl. Genet. 127: 2567–2574.
- Hu, J. et al. (2012). The Rice Pentatricopeptide Repeat Protein RF5 Restores Fertility in Hong-Lian
 Cytoplasmic Male-Sterile Lines via a Complex with the Glycine-Rich Protein GRP162. Plant Cell 24: 109–122.
- Hu, L., Liang, W., Yin, C., Cui, X., Zong, J., Wang, X., Hu, J., and Zhang, D. (2011). Rice MADS3 Regulates ROS Homeostasis during Late Anther Development. Plant Cell 23: 515–533.
- Huson, D.H. and Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. Mol. Biol. Evol. 23: 254–267.
- Innocenti, P., Morrow, E.H., and Dowling, D.K. (2011). Experimental Evidence Supports a Sex-Specific Selective Sieve in Mitochondrial Genome Evolution. Science 332: 845–848.
- Itabashi, E., Iwata, N., Fujii, S., Kazama, T., and Toriyama, K. (2011). The fertility restorer gene, Rf2, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. Plant J. 65: 359–367.
- Jarvis, D.E. et al. (2017). The genome of Chenopodium quinoa. Nature 542: 307–312.
- Jiang, P., Zhang, X., Zhu, Y., Zhu, W., Xie, H., and Wang, X. (2007). Metabolism of reactive oxygen species in cotton cytoplasmic male sterility and its restoration. Plant Cell Rep. 26: 1627–1634.
- Kaessmann, H. (2010). Origins, evolution, and phenotypic impact of new genes. Genome Res. 20: 1313– 1326.
- Kagami, H., Kurata, M., Matsuhira, H., Taguchi, K., Mikami, T., Tamagake, H., and Kubo, T. (2015). Sugar beet (Beta vulgaris L.). Methods Mol. Biol. **1223**: 335–347.
- Käser, M., Kambacheld, M., Kisters-Woike, B., and Langer, T. (2003). Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. J. Biol. Chem. 278: 46414–46423.
- Kato, H., Tezuka, K., Feng, Y.Y., Kawamoto, T., Takahashi, H., Mori, K., and Akagi, H. (2007). Structural diversity and evolution of the Rf-1 locus in the genus Oryza. Heredity 99: 516–524.
- Kaul, M.L.H. (1988). Male sterility in higher plants. (Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg)

- Kazama, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Sugita, M., and Toriyama, K. (2008). Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. Plant J. 55: 619–628.
- 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.
- Kim, Y.-J. and Zhang, D. (2018). Molecular Control of Male Fertility for Crop Hybrid Breeding. Trends Plant Sci. 23: 53–65.
- Kitazaki, K., Kubo, T., Kagami, H., Matsumoto, T., Fujita, A., Matsuhira, H., Matsunaga, M., and Mikami, T. (2011). A horizontally transferred tRNA Cys gene in the sugar beet mitochondrial genome: evidence that the gene is present in diverse angiosperms and its transcript is aminoacylated. Plant J. 68: 262–272.
- Komori, T., Ohta, S., Murai, N., Takakura, Y., Kuraya, Y., Suzuki, S., Hiei, Y., Imaseki, H., and Nitta, N. (2004). Map-based cloning of a fertility restorer gene, Rf-1, in rice (Oryza sativa L.). Plant J. 37: 315–325.
- Kubo, T., Kitazaki, K., Matsunaga, M., Kagami, H., and Mikami, T. (2011). Male Sterility-Inducing Mitochondrial Genomes: How Do They Differ? Crit. Rev. Plant Sci. 30: 378–400.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A., and Mikami, T. (2000). The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (Beta vulgaris L.) reveals a novel gene for tRNA(Cys)(GCA). Nucleic Acids Res. 28: 2571–6.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870–1874.
- Lane, N. (2007). Mitochondria: Key to Complexity. In Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes (Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg)
- Laser, K.D. and Lersten, N.R. (1972). Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Rev. 38: 425–454.
- Lee, S., Lee, H., Yoo, S., and Kim, H. (2017). Molecular insights into the m -AAA protease-mediated dislocation of transmembrane helices in the mitochondrial inner membrane. J. Biol. Chem. 292: 20058–20066.
- Lewis, D. (1941). Male Sterility in Natural Populations of Hermaphrodite Plants the Equilibrium Between Females and Hermaphrodites To Be Expected With Different Types of Inheritance. New Phytol. 40: 56–63.
- Leys, M., Petit, E.J., El-Bahloul, Y., Liso, C., Fournet, S., and Arnaud, J.-F. (2014). Spatial genetic structure in Beta vulgaris subsp. maritima and Beta macrocarpa reveals the effect of contrasting mating system, influence of marine currents, and footprints of postglacial recolonization routes. Ecol. Evol. 4: 1828–1852.
- Lind, C., Hallden, C., and Moller, I.M. (1991). Protein synthesis in mitochondria purified from roots, leaves and flowers of sugar beet. Physiol. Plant. 83: 7–16.

- Liu, F., Cui, X., Horner, H.T., Weiner, H., and Schnable, P.S. (2001). Mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity is required for male fertility in maize. Plant Cell 13: 1063–1078.
- Liu, F. and Schnable, P.S. (2002). Functional Specialization of Maize Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenases. Plant Physiol. 130: 1657–1674.
- Loehlin, D.W. and Carroll, S.B. (2016). Expression of tandem gene duplicates is often greater than twofold. Proc. Natl. Acad. Sci. 113: 5988–5992.
- Luo, D. et al. (2013). A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. Nat. Genet. 45: 573–577.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53: 159–162.
- Margulis, L. (2004). Serial endosymbiotic theory (SET) and composite individuality Transition from bacterial to eukaryotic genomes. Microbiol. Today 31: 172–174.
- Martijn, J., Vosseberg, J., Guy, L., Offre, P., and Ettema, T.J.G. (2018). Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. Nature 557: 101–105.
- Matsuhira, H., Shinada, H., Yui-Kurino, R., Hamato, N., Umeda, M., Mikami, T., and Kubo, T. (2006). An anther-specific lipid transfer protein gene in sugar beet: its expression is strongly reduced in male-sterile plants with Owen cytoplasm. Physiol. Plant. 129: 407–414.
- Matsuhira, H. et al. (2012). Unusual and Typical Features of a Novel Restorer-of-Fertility Gene of Sugar Beet (Beta vulgaris L.). Genetics **192**: 1347–1358.
- McBride, H. and Soubannier, V. (2010). Mitochondrial Function: OMA1 and OPA1, the Grandmasters of Mitochondrial Health. Curr. Biol. 20: R274–R276.
- McCutcheon, J.P. and Moran, N.A. (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 10: 13–26.
- Melonek, J., Stone, J.D., and Small, I. (2016). Evolutionary plasticity of restorer-of-fertility-like proteins in rice. Sci. Rep. 6: 35152.
- Melonek, J., Zhou, R., Bayer, P.E., Edwards, D., Stein, N., and Small, I. (2018). High intraspecific diversity of Restorer-of-fertility-like genes in barley. Plant J.
- Meyer, E.H., Lehmann, C., Boivin, S., Brings, L., De Cauwer, I., Bock, R., Kühn, K., and Touzet, P. (2018). CMS-G from Beta vulgaris ssp. maritima is maintained in natural populations despite containing an atypical cytochrome c oxidase. Biochem. J. 475: 759–773.
- Michaud, M., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.-M. (2010). RNA trafficking in plant cells: targeting of cytosolic mRNAs to the mitochondrial surface. Plant Mol. Biol. **73**: 697–704.
- Migdal, I., Skibior-Blaszczyk, R., Heidorn-Czarna, M., Kolodziejczak, M., Garbiec, A., and Janska, H. (2017). AtOMA1 Affects the OXPHOS System and Plant Growth in Contrast to Other Newly Identified ATP-Independent Proteases in Arabidopsis Mitochondria. Front. Plant Sci. 8: 1543
- Milot, E., Moreau, C., Gagnon, A., Cohen, A.A., Brais, B. and Labuda, D. (2017) Mother's curse neutralizes natural selection against a human genetic disease over three centuries. Nat. Ecol. Evol., 1,

1400-1406.

- Mora, J.R.H., Rivals, E., Mireau, H., and Budar, F. (2010). Sequence analysis of two alleles reveals that intra-and intergenic recombination played a role in the evolution of the radish fertility restorer (Rfo). BMC Plant Biol. 10: 35.
- Moritani, M., Taguchi, K., Kitazaki, K., Matsuhira, H., Katsuyama, T., Mikami, T., and Kubo, T. (2013). Identification of the predominant nonrestoring allele for Owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet (Beta vulgaris L.): development of molecular markers for the maintainer genotype. Mol. Breed. 32: 91–100.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem. J. 417: 1–13.
- Nishizawa, S., Kubo, T., and Mikami, T. (2000). Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets. Curr. Genet. 37: 34–38.
- Nishizawa, S., Mikami, T., and Kubo, T. (2007). Mitochondrial DNA Phylogeny of Cultivated and Wild Beets: Relationships Among Cytoplasmic Male-Sterility-Inducing and Nonsterilizing Cytoplasms. Genetics 177: 1703–1712.
- Ohgami, T., Uchiyama, D., Ue, S., Yui-Kurino, R., Yoshida, Y., Kamei, Y., Kuroda, Y., Taguchi, K., and Kubo, T. (2016). Identification of molecular variants of the nonrestoring restorer-of-fertility 1 allele in sugar beet (Beta vulgaris L.). Theor. Appl. Genet. 129: 675–688.
- Ohno, S. (1970). Evolution by Gene Duplication. (Springer-Verlag, New York.)
- **Onodera, Y., Yamamoto, M.P., Kubo, T., and Mikami, T.** (1999). Heterogeneity of the atp6 Presequences in Normal and Different Sources of Male-Sterile Cytoplasms of Sugar Beet. J. Plant Physiol. **155**: 656–660.
- Owen, F. V. (1945). Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beet. J. Agric. Res. 71: 423-440.
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., and Shiu, S.-H. (2016). Evolution of Gene Duplication in Plants. Plant Physiol. 171: 2294–2316.
- Perlman, S.J., Hodson, C.N., Hamilton, P.T., Opit, G.P., and Gowen, B.E. (2015). Maternal transmission, sex ratio distortion, and mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. 112: 10162–10168
- Phan, H.A., Iacuone, S., Li, S.F., and Parish, R.W. (2011). The MYB80 Transcription Factor Is Required for Pollen Development and the Regulation of Tapetal Programmed Cell Death in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 23: 2209–2224.
- Ran, Z. and Michaelis, G. (1995). Mapping of a chloroplast RFLP marker associated with the CMS cytoplasm of sugar beet (Beta vulgaris). Theor. Appl. Genet. 91: 836–840.
- **Reyes-Chin-Wo, S. et al.** (2017). Genome assembly with in vitro proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. Nat. Commun. **8**: 14953.
- Rhoads, D.M., Brunner-Neuenschwander, B., Levings, C.S., and Siedow, J.N. (1998). Cross-Linking and Disulfide Bond Formation of Introduced Cysteine Residues Suggest a Modified Model for the Tertiary Structure of URF13 in the Pore-Forming Oligomers. Arch. Biochem. Biophys. 354: 158–164.

- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A., and Kamikawa, R. (2017). The Origin and Diversification of Mitochondria. Curr. Biol. 27: R1177–R1192.
- Romeiras, M.M., Vieira, A., Silva, D.N., Moura, M., Santos-Guerra, A., Batista, D., Duarte, M.C., and Paulo, O.S. (2016). Evolutionary and Biogeographic Insights on the Macaronesian Beta-Patellifolia Species (Amaranthaceae) from a Time-Scaled Molecular Phylogeny. PLOS ONE 11: e0152456.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York
- Sanders, P.M., Bui, A.Q., Weterings, K., McIntire, K.N., Hsu, Y.-C., Lee, P.Y., Truong, M.T., Beals, T.P., and Goldberg, R.B. (1999). Anther developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants. Sex. Plant Reprod. 11: 297–322.
- Satoh, M., Kubo, T., Nishizawa, S., Estiati, A., Itchoda, N., and Mikami, T. (2004). The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. Mol. Genet. Genomics 272: 247– 256.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 166: 368–379.
- Schmutz, J. et al. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. Nature 463: 178–183.
- Schnable, P.S. and Wise, R.P. (1994). Recovery of heritable, transposon-induced, mutant alleles of the rf2 nuclear restorer of T-cytoplasm maize. Genetics **136**: 1171–1185.
- Schnable, P.S. and Wise, R.P. (1998). The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends Plant Sci. 3: 175–180.
- Sloan, D.B., Warren, J.M., Williams, A.M., Wu, Z., Abdel-Ghany, S.E., Chicco, A.J., and Havird, J.C. (2018). Cytonuclear integration and co-evolution. Nat. Rev. Genet. 19: 635–648.
- Stone, J.D., Koloušková, P., Sloan, D.B., and Štorchová, H. (2017). Non-coding RNA may be associated with cytoplasmic male sterility in Silene vulgaris. J. Exp. Bot. 68: 1599–1612.
- Suyama, M., Torrents, D., and Bork, P. (2006). PAL2NAL: robust conversion of protein sequence alignments into the corresponding codon alignments. Nucleic Acids Res. 34: W609–W612.
- Taguchi, K., Hiyama, H., Yui-Kurino, R., Muramatsu, A., Mikami, T., and Kubo, T. (2014). Hybrid Breeding Skewed the Allelic Frequencies of Molecular Variants Derived from the Locus for Cytoplasmic Male Sterility in Sugar Beet (L.). Crop Sci. 54: 1407.
- Tamura, K., Battistuzzi, F.U., Billing-Ross, P., Murillo, O., Filipski, A., and Kumar, S. (2012). Estimating divergence times in large molecular phylogenies. Proc. Natl. Acad. Sci. 109: 19333–19338.
- Tanaka, T. and Nei, M. (1989). Positive darwinian selection observed at the variable-region genes of immunoglobulins. Mol. Biol. Evol. 6: 447–459.
- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., and Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. Nat. Rev. Genet. 5: 123–135.

- **Touzet, P. and Meyer, E.H.** (2014). Cytoplasmic male sterility and mitochondrial metabolism in plants. Mitochondrion **19**: 166–171.
- Uyttewaal, M., Arnal, N., Quadrado, M., Martin-Canadell, A., Vrielynck, N., Hiard, S., Gherbi, H., Bendahmane, A., Budar, F., and Mireau, H. (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, K. et al. (2012). The draft genome of a diploid cotton Gossypium raimondii. Nat. Genet. 44: 1098–1103.
- Werren, J.H. (2011). Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation. Proc. Natl. Acad. Sci. 108: 10863–10870.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., and Provart, N.J. (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. PLOS ONE 2: e718.
- Wittig, I., Braun, H.-P., and Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. Nat. Protoc. 1: 418–428.
- Xie, H.-T., Wan, Z.-Y., Li, S., and Zhang, Y. (2014). Spatiotemporal Production of Reactive Oxygen Species by NADPH Oxidase Is Critical for Tapetal Programmed Cell Death and Pollen Development in Arabidopsis. Plant Cell 26: 2007–2023.
- Yamamoto, M.P., Kubo, T., and Mikami, T. (2005). The 5'-leader sequence of sugar beet mitochondrial atp6 encodes a novel polypeptide that is characteristic of Owen cytoplasmic male sterility. Mol. Genet. Genomics 273: 342–349.
- Yang, Z. (2005). Bayes Empirical Bayes Inference of Amino Acid Sites Under Positive Selection. Mol. Biol. Evol. 22: 1107–1118.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood. Mol. Biol. Evol. 24: 1586– 1591.
- Yoshida, Y., Matsunaga, M., Cheng, D., Xu, D., Honma, Y., Mikami, T., and Kubo, T. (2012). Mitochondrial minisatellite polymorphisms in fodder and sugar beets reveal genetic bottlenecks associated with domestication. Biol. Plant. 56: 369–372.
- Young, N.D. et al. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. Nature **480**: 520–524.
- Yu, S.-X., Feng, Q.-N., Xie, H.-T., Li, S., and Zhang, Y. (2017). Reactive oxygen species mediate tapetal programmed cell death in tobacco and tomato. BMC Plant Biol. 17: 76.
- Zeng, X., Kucharczyk, R., di Rago, J.-P., and Tzagoloff, A. (2007). The Leader Peptide of Yeast Atp6p Is Required for Efficient Interaction with the Atp9p Ring of the Mitochondrial ATPase. J. Biol. Chem.
 282: 36167–36176.

- 荒河 匠、栗野 里香、久保 友彦(2014) 植物ミトコンドリアへの強疎水性タンパク質輸送は 可能か. てん菜研究会報 第55号 pp. 27-29
- 荒河 匠(2016)テンサイ細胞質雄性不稔性発現と花粉稔性回復における翻訳後制御過程の研究. 修士論文 北海道大学大学院農学院
- 上 幸代(2017) テンサイ *Rf1* 座における多様な対立遺伝子に関する研究. 修士論文 北海道 大学大学院農学院
- 内山 大輔(2017)日本フダンソウより発見された新規花粉稔性回復遺伝子に関する遺伝学的 研究. 修士論文 北海道大学大学院農学院
- 大神 貴史(2013) テンサイ Owen 型 CMS に対する雄性不稔維持アレル rfl の構造解析. 卒業 論文 北海道大学農学部
- 鏡 豊代 (2013) テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く稔性回復遺伝子 *Rf1* の同定と作用力 に関する研究. 学位論文 北海道大学大学院農学研究科
- 勝山 嵩也 (2013) テンサイ稔性回復遺伝子*Rf1*の分子進化学的研究. 修士論文 北海道大学大学院農学院
- 亀井 陽子(2008) テンサイ*Rf1(Rf-MPLs)*の進化過程-近縁種*Beta trigyna*およびケイトウ
 (*Celosia cristata*)の*MPL*遺伝子との構造比較- 修士論文 北海道大学大学院農学院
- 北崎 一義(2009) テンサイOwen型細胞質雄性不稔性における花粉稔性回復機構の解明. 学位 論文 北海道大学大学院農学研究科
- 佐野 千紘(2018) Beta属におけるRf1対立遺伝子の多様性に関する研究. 卒業論文 北海道大 学農学部
- 菅谷 元 (2017) テンサイ*Rf1*相同遺伝子の構造と機能に関する研究. 卒業論文 北海道大学農 学部
- 濵口 祐子(2006)テンサイ稔性回復遺伝子*Rf1のシ*ロイヌナズナカウンターパート遺伝子の機 能解析. 修士論文 北海道大学大学院農学院
- 濵田 宏之 (2016) テンサイ稔性回復遺伝子*Rf2*候補領域のDNA構造多型解析. 修士論文 北海 道大学大学院農学院
- 本間 雄二朗(2010) Beta vulgarisにおけるatp6プレシーケンス構造の多様性並びに新規の植物 ミトコンドリアゲノム構造の多型調査法に関する研究. 卒業論文 北海道大学農学部
- 松永 宗幸(2012)テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔ミトコンドリア機能の解明. 学位論文 北 海道大学大学院農学研究科
- 松平 洋明(2007) テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔に働く花粉稔性回復遺伝子 Rfl のクローン 化と機能解析. 学位論文 北海道大学大学院農学研究科
- 村田 智己(2017)テンサイとデンマーク由来野生ビートにおける Rfl 対立遺伝子構成の差異 ならびにテンサイ新規ミトコンドリア DNA 分子の構造と分布.卒業論文 北海道大学農 学部

目次		ページ
付表 2-1	本研究で用いたプライマー	S1
付図 3-1	花粉発達ステージ毎の未成熟葯の横断切片	S3
付図 3-2	orf20 様遺伝子の第1エキソン部分配列のマルチブルアラインメント	S4
付表 3-1	UNDEAD 特異的なプライマーを用いた qRT-PCR	S5
付図 4-1	orf20 様遺伝子のコード域の塩基配列のマルチプルアラインメント	S6
付表 5-1	テンサイゲノムにおける OMAI 相同遺伝子の座乗位置	S12
付表 5-2	被子植物における OMAI 相同遺伝子	S13
付図 5-1	LOC104888056 第 1 エキソン部分配列のマルチブルアラインメント	S14
付図 5-2	BvOMA1-1 及び BvOMA1-2 の翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアラインメント	S15
付図 5-3	KWS2320 orf20L 及び LOC104888056 の翻訳産物のアミノ酸配列のマルチブルアラインメント	S16
付図 5-4	BvOMA1-1 及び BvOMA1-2 の CDS のマルチプルアラインメント	S17
付図 5-5	KWS2320 orf20L 及び LOC104888056 の CDS のマルチプルアラインメント	S20
付表 5-3	BvOMA1-1 (A) および orf20 様遺伝子 (B) 周辺領域の遺伝子	S23
付図 5-6	近隣結合法によって予測された被子植物 OMA1 相同遺伝子の系統樹	S24
付図 5-7	最尤法による被子植物 OMA1 相同遺伝子の分子系統樹	S25
付表 5-4	マイクロアレイデータにおける AtOMA1 の mRNA 量	S26
付図 5-8	<i>orf20_{NK-198} 及び orf20_{NK-305-1} の</i> 塩基配列のアラインメント	S27
付図 5-9	<i>orf20_{NK-198} </i> 及び <i>orf20_{NK-305-1} の翻訳</i> 産物のアミノ酸配列のアラインメント	S35
付図 5-10	PI615522 rfl と NK-305 Rfl の塩基配列のアラインメント	S36
付図 5-11	orf20s、orf20 _{NK-305-2} 及び orf18 のコード域の塩基配列のマルチプルアラインメント	S53
付図 5-12	<i>orf20_s、orf20_{NK-305-2} 及び orf18 の翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアラインメント</i>	S57
付図 5-13	orf19及び orf20 _{NK-305-2} の上流域 3.5 kbp の塩基配列のアラインメント	S58
付表 5-5	orf20 様遺伝子の分岐年代推定	S63

付表2-1 本研究 Purpose	Section	アイマーン CAT CAT CATAGON Marker name Target region/Marker name	Nucleotide sequences (5-3)	Composition	Cycle
		dTT IS	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
		NTO C- 861-3N 07 fin-NTO C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAGCTGGGTGGTCGTCGGATTGAGGGTT		
			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCAGGAATATCATAGCCATT		
		NID 6- 70760-NID 6	GGGGACCACTTTGTACAAGAAGCTGGGTTGCATGGGGTAATCACATCCA		
	ſ	ATTE COM	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
	4	N10 5-2-10-20 NK-510-21 0 5	6666ACCACTTTGTACAAGAAAGCT66GT66ACCT66ATTGA66GTTAA		
		ATTE COM	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
		NID C- ENCENNATION	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGCATGGGGTAATCACATCCA		
			6666ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
		NTO C-SuzfineNTOC	GGGGACCACTTTGTACAAGAAGCTGGGTTGGCAAATCTATGCTTGG		
		GTUDE OWNE GTUDE	6666ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
		NID C- 1-302-3N NZGO-NID C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAGCTGGGTGGTCCTGGATTGAGGGTT		
		SULTED AND 31 ITD	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
		NID C- 2-30 E-MN NZGO-NID C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGGCAAATCTATGCTTGG		
	,		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
Plasmid	ŝ	ALL STUR-STUR-STUR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGCATGGGGTAATCACATCCA	PrimeSTAR max (Takara)	
construction		sultrb and alltrb	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT	Tau or princis: 0.2 μινι cach Total: 50 μl	[20 C J Sec; JJ C IO Sec; /2 C 4 IIIII] v 35 mila 77°C 7 min
			GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGACCTGGATTGAGGGTTAA		
			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
		NICE- IZGO-NICC	6666ACCACTTT6TACAA6AA6CT666T6GTAT6CCAT6ATCATTT666		
	F	$S_{\rm H}$ TTP $C_{C_{\rm M}}$ $S_{\rm H}$ TTP	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAACCATT		
	t		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGCATGGGGTAATCACATCCA		
	Ċ		TCAGGATTATAAGGATGATGATGATAAGTGACCATTTACCAACCA		
	† 1	read-oven apping ior <i>organized gene</i>	GTCACTTATCATCATCATCCTTATAATCCTGAAGACCTTGAATTGCACGTCCTGCTACAA		
			GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCATGGTACAGAAGATCAAGG		
		BVOMAI-1 CUS	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCACAGAAAACCTTCAATTGCGCG		
	•		TTTTCTGGATTATAAGGATGATGATGATGATGAGTGAACCCAGCTTTCTTGT		
	ų	r LAG-overlapping lot DVOMA1-1	GGGTTCACTTATCATCATCATCATCATAATCCAGAAAACCTTCAATTGC		
	n N		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGTCATGGTACAGAAGAACAAAAC		
		AIUMAI CUS	6666ACCACTTTGTACAAGAAAGCT666TCTAAAGAAAGCCTTCAAC6CCAG		
		EI AG availanning far 140M11	CTTICTTGATT ATAAGGATGATGATGATGATAAGTAGACCCAGCTTTCTTGT		
		Trade of the store	GGGTCTACTTATCATCATCCTTATAATCAAGAAAGCCTTCAACGCC		

				3	-
Purpose	Section	1 I arget region/Marker name	Nucleonde sequences (2-3)	Composition	Cycle
		TRI	AGAACTTCGATAGGCGAGAGG	5	98°C 1 min
	6		GCAATTTTCAGGGCATGAACC	Go taq (Promega)	105°C 30 55°C 30
	n	Jyon Joon	TAAAGGAAAAGATAAGAG	rair of primers: 0.2 µM cach Total: 10 µl	[93 C 30 Sec, 33 C 30 Sec, 72 C 1 mm]
		Tacd-Orad	TGGGAATTGCCCATGAAT	-	
	r c	£1.º	CAATCTGTGGTGCTGACCAAA		
	у, с	81/	GATTAAAGAGGGCTGCTGAAGCCGAGA		
	e		CTAAGAAATACTTCATCCCATGTCCTGC	Blend Taq (Toyobo)	[95-U 30 sec, 58-U 30 sec, 72-U 3 mm]
	'n	/0	TGACCAAGATCCCAAGATTTGATATGG	Pair of primers: 0.2 µM each Total: 10 u1	x 35 cycle, 72°C 7 min
Genotyping		c c	CTGAATTTGGCTACAATTTATCGCGC	10 01 1001	98°C 1 min [95°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 1.5 min] x 35
	4	070	TTACTGAAGACCTTGAATTGCACG		cycle, 72°C 7 min
			GGTCAAACAGAATCAAAGTAGCTTG		
		EXON 1 OI BVUMAI-1 and BVUMAI-2	ATTGCA6GCAATATTTTCCCC		
	ų		AGTTTGGAAGATTATTCAGGCTAGA	Go taq (Promega)	
	ŝ	exon 3 of <i>orf20-like</i> gene	TTACTGAAGACCTTGAATTGCACG	Pair of primers: 0.2 µM each Total: 10 µ1	[95 U 30 sec, 56 U 30 sec, 72 U 1 mm]
		2300007010013-1	ATGGCATTTCACAGAAATTCAAGG		x 35 cycle, 12 U 5 mm
		exon 1 of LUC/10400010	CCCAATAATTGCAGCCAATTCAG		
		10000	TCTCCTTCAGTCGACATGTCATGGTACAAGAAGAACAAAACTCGT		
		AIOMAI	TAGGATCCATGGCAAACCACCGTCCTGGTCCT		
Intracellular	ı		TCTCCTTCAGTCGACATGGCATGGTACAGAAGA		
localization	n	DVOWA1-1	TAGGATCCATGGACCAAGATTTAAAAACCTCTTGGT		
			TCTCCTTCAGTCGACATGGCATTTCACAGAAATTCAAGGT		
		BVOMA1-2	GGATCCATGGCCACCATGAATTAGTTT	PrimeSTAR max (Takara)	
			ACGCGTCGACCCATTGATCATCAAGAACCTGAT	Pair of primers: 0.2 µM each Total: 50 ul	[98 U 5 sec, 55 U 10 sec, 72 U 1 mm]
		AIOIMAI	GCTCTAGACGATTCCCTGCGACGCAA		x 33 cycle, 12 U 3 min
in situ	ų	1 1110.4	GCTCTAGAATGGCATGGTACAGAAGATCAA		
hybridization	n	I-I FMOM	ACGCGTCGACTTGTAGCCAATTCAGCATCTGATT		
			AGCTTGCAAAGCCACTGGGGCGA		
		NID C 861-3N AZÍA	GGAACCAAATTAGATTGAATTAACAAGTGG		
	3 0	concerning (Chan-	GGAAGCATAGTGGGGGCT		
	C-7	auas anti-nzfin	CACAGCATGCCCAACCTGAT		
	ſ	0,0000	TTCCAATTGGACTAATCTTGACTTT		
	ς,	UJ 2 U NK-305-1	TTCTCCAATTTCATTCTCACG		
		Antin	AGACCTTCAATGTGCCTGCT		
0.0 T.U.	3 (ACIM	ACGACCAGCAGGATCCAAAC	R green mix (Thermo Scientific)	50°C 2 min, 95°C 2 min
dk1-FCK	C-7	5 J25	TGAGGCTGGTATCTCCCAAGG	rair of primers: 0.2 µM each Total: 10 ul	[95°C 15 sec, 60.8°C 1 min] x 40 cycle
		clia	TTGAGT ACTTGGGGGTGGTG	-	
	ç	TRUET	ATATACAAATTACAATGGAATTTTTGGTC		
	n	ONDEAD	CTCCCCTCGATCACCTTCAAAGAAGTCGTT		
	v	BNOM41-1	ATGGGGCTAAGACTACTACAAACCA		
	r	1-11/10/4/7	GAAAACAATCTTCCCACCTGG		
		-			



付図 3-1 花粉発達ステージ毎の未成熟葯の横断切片

NK-198のBC₂F₂集団のp1p1個体(A-F)、p1p4個体(G-L)の葯横断切片を花粉発達ステージ毎(減数分裂期~花粉期)に示す。

orf20_NK-305-1	ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAAACTCAACTTGCGTTCC	60
orf20_NK-305-2	ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC	60
orf20L	ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC	60

orf20 NK-305-1	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC	120
orf20_NK-305-2	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC	120
orf20L	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC	120

orf20 NK-305-1	AATCAATCTACTAATAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAAT	180
orf20_NK-305-2	AATCAATCTACTAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAAT	177
orf20L	AATCAATCTACTAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAAT	177

orf20 NK-305-1	GGCTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTATGCAAGGAGAAATTATCAT	240
orf20_NK-305-2	GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT	237
orf20L	GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAACTATCAT	237
	** ************************************	
	>305MPL1-s	pe-Fw
orf20_NK-305-1	GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTTGAATCATGGCTGGAAAAATTCCTTGTTCCAATTGGA	300
orf20_NK-305-2	GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTTGAATCATGGCTGGAAAAATTACTTCTTGGAATTGCA	297
orf20L	GGTGTTAAAACCGAAGTAAGTGTTGAATTTCGGGTGGAAAAATTACTTCTTGGAATTGCA	297
	**** **********************************	
orf20_NK-305-1	CTAATCTTGACTTTTGGTATACTTGGTTACCCTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCA	357
orf20_NK-305-2	CTAATGTTGAGTACTGGTATATTTGCTTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCA	354
orf20L	CTAATAATCTCGCATTCTGGTATGATTGCTTTCTTTTATTTGCACCCAGTAGTTGTGCCA	357
	***** * * * ****** *** ** * * ** ******	
	305MPL1-spe-Rv<	
orf20_NK-305-1	TATACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATGTCAACAACTCGTGAGAATGAAATTGGAGAA	417
orf20_NK-305-2	TATACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATATCAACAACTGATGAGAATGAAAAGGGAGAA	414
orf20L	TATACAGGAAGGAAGCATTATGTGATTTTGTCAACAACTCATGAGAATGAAAATGGAGAA	417

orf20_NK-305-1	GTTGAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATA	477
orf20_NK-305-2	GTTGAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATA	474
orf20L	TTTGAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGAGAGGGTTAGGTCTATA	477

付図 3-2 orf20 様遺伝子の第1エキソン部分配列のマルチプルアラインメント

*orf20_{NK-305-1}、orf20_{NK-305-2}*及び *orf20L* の第1エキソンの塩基配列を示す。*orf20_{NK-305-1}* 特異的プライマー (305MPL1-spe-Fw 及び 305MPL1-spe-Rv)の設計部位を灰色で塗りつぶした。右側の数字は塩基数を示 し、開始コドンの第一塩基を+1 としている。アスタリスクは3つの配列間で共通している残基を示す。

	s17			
Anther developmental stage	p2p2	p2p4	p4p4	
Meiosis	ND ^a	0.02 ± 0.03	-	
Tetrad	1.94 ± 0.50	0.72 ± 0.02	-	
Microspore	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.01	-	
Non-classfied	-	-	0.09 ± 0.09	

付表3-1 UNDEAD特異的なプライマーを用いたqRT-PCRのサマリー

Mean \pm SD, n = 2; ^a Not detected

	(Exon 1) >20L-i	nt–Fw
orf21	TTAGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	768
orf18	TTAGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	768
orf20_NK-198	TTAGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	762
orf20_fukkoku	TTAGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	762
orf20_NK-305-1	TTAGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	762
orf20_NK-219-1	TATGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	759
orf20_NK-219-2	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	756
orf20_NK-305-2	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	759
orf19	TTTGATGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTTCAACTCTGATGCTGAA	753
orf20_S	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	759
orf20_NK-219-3	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACTGGATTGCTCAACCATTGCATCTCTGATGCTGAA	771
orf20L	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACTGGATTGCTCAACCATTGCATCTCTGATGCTGAA	771
	* * ***********************************	
	/ Intron 1	
orf21	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	828
orf18	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	828
orf20_NK-198	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	822
orf20_fukkoku	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	822
orf20_NK-305-1	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	822
orf20_NK-219-1	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAACTATCTGC	819
orf20_NK-219-2	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	816
orf20_NK-305-2	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGC	819
orf19	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGC	813
orf20_S	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGC	819
orf20_NK-219-3	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCGTGGGACTCCAACCATCGGC	831
orf20L	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCGTGGGACTCCAACCATCGGC	831

		0.4.0
ortzi		840
		040 040
or 120_NK-198		840 940
or 120_1UKKOKU		040 040
or 120_NK-305-1		840 970
01120_NK-219-1		0/9
0r120_NK-219-2		004 007
or 120_NK-305-2		007 001
		001
0r120_3		007 000
0r120_NK-219-3		002
OFIZUL		002
	יזייזייייי איזיייייי איזיייייי	
orf21		
orf18		
orf20 NK-198		
orf20 fukkoku		
orf20 NK-305-1		
orf20 NK-219-1	CTTCCTGAAATAGCTTTATATTCTATCAGTATCTTGTAGTAGTTCTTTACTAGACTGCAG	939
orf20 NK-219-2		
orf20 NK-305-2		
orf19		
orf20_S		
orf20_NK-219-3	AGCTCAGGAATAGCTTTATATTCTATCAGTAGCTTGTAGTAGTTCTTTACTAGACTGCAG	942
orf20L	AGCTCAGGAATAGCTTTATATTCTATCAGTAGCTTGTAGTAGTTCTTTACTAGACTGCAG	942
	↑ Xsp I	

orf21		
orf18		
orf20_NK-198		
orf20_fukkoku		
orf20_NK-305-1		
orf20_NK-219-1	CAATAGATAATATTTGGTTATTAATATTCATGGGTGATTCGGGTTCATATTTAGGCGTAT	999
orf20_NK-219-2		
orf20_NK-305-2		
orf19		
orf20_S		
orf20_NK-219-3	GAATAGATAATATTTGGTTATCAATATACATGGGTGATTCCGGTTCATATTTAGGCGTAT	1002
orf20L	GAATAGATAATATTTGGTTATCAATATACATGGGTGATTCCGGTTCATATTTAGGCGTAT	1002
orf21	GAACTATACAAAAAAAGAACTATACAAAAAAA	862
orf18	GAACTATACAAAAAAAGAACTATACAAAAAAA	862
orf20_NK-198	GAACTATACAAAAAAAGAACTATACAAAAAAA	856
orf20_fukkoku	GAACTATACAAAAAAAGAACTATACAAAAAAA	856
orf20_NK-305-1	GAACTATACAAAAAAA	856
orf20_NK-219-1	CAAATGATTCAAGATATTGTATGAAGTTATGAACTATACAAAAAACATGAAAGGAATTAT	1059
orf20_NK-219-2	GAACTATACAAAAAACATGAAAGGAATTAT	864
orf20_NK-305-2	GAACTATACAAAAAACATGAAAGGAATTAT	867
orf19	GAACTATACAAAAAACATGAAAGGAATTAT	861
orf20 S	GAACTATACAAAAAACATGAAAGGAATTAT	867
orf20_NK-219-3	CAAATGATTTAAGATATTGTATGAAGTTATGAACTATACAAAAAACATGAAAGAAA	1062
orf20L	CAAATGATTTAAGATATTGTATGAAGTTATGAACTATACAAAAAACATGAAAGGAATTAT	1062

orf21	CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	909
orf18	CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	909
orf20_NK-198	CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	903
orf20 fukkoku	CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	903
orf20_NK-305-1	CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	903
orf20_NK-219-1	ATGAAATTTTTT-TTGATGAATTTTAGGTTATCAGGTTACATTATGAATGTCATACGTCA	1118
orf20_NK-219-2	ATGAAAAAAAAA-CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	923
orf20_NK-305-2	ATGAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	925
orf19	ATGAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	919
orf20 S	ATGAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA	925
orf20_NK-219-3	ATGAAAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATTATATTGCATTATGAATGTCATATGTCA	1122
orf201	ATGAAAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATTATATTGCATTATGAATGTCATATGTCA	1122
011202	***************************************	1122
	/ Exon 2	
orf21	ATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT	969
orf18	ATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT	969
orf20 NK-198	ATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT	963
orf20 fukkoku	ATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT	963
orf20_NK-305-1	ATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT	963
orf20_NK-219-1	ATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT	1178
orf20_NK_210_7	ATGTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGGCTCGACATCAGGCAGAGAATC	983
orf20 NK-305-2	ATGTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGGCTCGACATCAGGCAGAGGATC	985
orf19	ATGTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGGCTGGACATGAGGCAGAGCATT	979
orf20 S	ATGTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGGCACACACA	985
orf20_NK-210-2	ATGTGGTGGTATATATTTGTTAGGTTGGGCATGCCTGCCCGACATGAGGCAGACACA	1182
orf201	ΔΤGTGGTGGTGTGTTTGTTTGTTΔGGCLTGGGCLTGCCTGCCCCCCCCCC	1122
	** ************************************	1102
	·····································	

↓DraI

	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
orf21	CGACAGCATTTTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTA <mark>TTTAAA</mark> ATTCT	1024
orf18	CGACAGCATT-TTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTA <mark>TTTAAA</mark> ATTCT	1024
orf20 NK-198	CGACAGCATTTTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTA	1018
orf20 fukkoku	CGACAGCATT-TTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTA	1018
orf20_NK_305_1		1018
r = 100 NK - 210 I		1010
01120_NK-219-1		1230
ortzu_NK-219-2		1038
or†20_NK-305-2	GGACAGCATICITCIGGIGGICAAIGICCCICIACGIGAIAAIAIIIGAAGIICI	1040
orf19	GGACAGCATTGTTCTGGTGGTCAATGTTAGGGTTCTACGTGACATTATTTGAAATTCT	1037
orf20_S	GGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATGTCCCTCTACGTGATAATATTTGAAGTTCT	1040
orf20_NK-219-3	GGACAACATTGTTGTGGTCGATACTGTTAGTGATATACATGACAATATTTCAAATTCT	1240
orf20L	GGACAACATTGTTGTGGTCGATACTGTTAGTGATATACATGACAATATTTCAATATCT	1240
	**** *** ** **** * * * * **** * *****	
orf21		108/
orf10		1004
		1004
ort20_NK-198		10/8
or†20_tukkoku	ATTTACTGAGCCTGAATTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTTT	10/8
orf20_NK-305-1	ATTTACTGAGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCT	1078
orf20_NK-219-1	ATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTT	1295
orf20_NK-219-2	ATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCT	1098
orf20_NK-305-2	ATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCT	1100
orf19	ATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTT	1097
orf20 S	ATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCT	1100
$orf20_NK-210-3$	ATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAATATCAAAAACTACTCTCAAGGCATCCTCTCT	1300
orf20		1200
OFIZUL		1300
	******** ** * *** *********************	
	/ Intron 2	
orf21	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1144
orf18	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1144
orf20 NK-198	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1120
····		1130
orf20_fukkoku	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf10	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf21	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1204 1204
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf21 orf18 orf20_NK-198	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1204 1204 1204 1198
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf18 orf20_NK-198 orf20_fukkoku	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1204 1204 1204 1198 1198
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf18 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_NK-305-1	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1204 1204 1198 1198 1198
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf18 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1204 1204 1204 1198 1198 1198 1198 1198 1415
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf20_NK-198 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1204 1204 1204 1198 1198 1198 1198 1415 1218
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1204 1204 1204 1198 1198 1198 1198 1198 1415 1218
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf20_NK-219-3 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf20_NK-305-2	GCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1204 1204 1198 1198 1198 1198 1415 1218 1220
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf18 orf20_NK-198 orf20_NK-305-1 orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S	GCAAAAGTAAGTCICITACTCITACAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICITTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITACAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITACACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1360 1204 1204 1198 1198 1198 1198 1198 1415 1218 1220 1217
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf18 orf20_NK-198 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S	GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTATCTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITACACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1360 1360 1360 1360
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf18 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3	GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTATCTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATCA GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATCA	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1360 1204 1204 1198 1198 1198 1198 1198 1198 1198 1218 1220 1217 1220 1420
orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L orf21 orf18 orf20_NK-198 orf20_fukkoku orf20_NK-305-1 orf20_NK-219-1 orf20_NK-219-2 orf20_NK-305-2 orf19 orf20_S orf20_NK-219-3 orf20L	GCAAAAGTAAGTCICITTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT GCAAAAGTAAGTCICTTACTCITTAAAATGTTTTCITGATGATTAACAAACATGTGGTACT ***********************************	1138 1138 1138 1355 1158 1160 1157 1160 1360 1360 1360 1360 1360 1360 1360

	↓ Xsp I	
orf21	CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCATTTAGATATCCATTTG	1263
orf18	CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCATTTAGATATCCATTTG	1263
orf20 NK-198	CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCATTTAGATATCCATTTG	1257
orf20 fukkoku	CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCATTTAGATATCCATTTG	1257
orf20 NK-305-1	CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCATTTAGATATCCATTTG	1257
orf20_NK-219-1	CAT-GCCCGGACCTAGTAACTIGTTIGTCATTIGTCAGCGATTICATTIAGATATCCATTIG	1474
orf20_NK_210_7		1277
orf20_NK_305-2	CATTGCCCGGACCTAGTCACTTGTTTGTCATTGCCAGCGATTTCATTAGACATCCATTG	1280
orf19	CATTGCCCGGACCTCGTAACTTGTTTCATTGCCAGCGATTTCATTAGACATCCATTG	1200
orf20 S	CATTGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTGTCAGCGATTTCATTTAGACATCCATTTG	1280
$orf20_{K}=210=3$		1/70
orf201		1/10
UTIZUL		1400
	ጥጥ ተተተተተተተተተ ተና የተተተተተተተተተተተተተተተተተተተተተተተ	
orf21	AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG	1323
orf18	AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG	1323
orf20 NK-198	ΔGΔGCΔΔGTTΔΔΔTTTGTΔTCΔΔGTTGTGGΔΔTGGΔΔΔΔGTΔΔTΔGΔΔCTΔΔΔTΔGΔGGG	1317
orf20_fukkoku	AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAAATAGAGAG	1317
arf20 NK-305-1		1217
orf20 NK-210-1		157/
$01120_NK-219-1$		1004
01120_NK-219-2		12/0
01120_NK-300-2		1040
		100/
OrT20_5		1340
OrT20_NK-219-3		1539
ort20L	AGAGGAAGTTAAATTTGTATGAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAAGTAATAGAAGTAAATAGAGA	1540
	* *************************************	
orf21	GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT	1282
orf18	GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT	1200
orf20 NK-100		1000
01120_NK^{-190}		1077
		10//
OF 120_NK-300-1		15//
0r120_NK-219-1		1094
OrT2U_NK-219-2		139/
ort20_NK-305-2		1400
orfly	GIGIGAIGCIAACAAAAICIAAICCAIIACIGAGIAAIGGIIIIGGAICAAIAIAIGGAI	1397
orf20_5	GIGIGAIGCIAACAAAAICIAAICCAIIACIGAGIAAIGGIIIIGGAICAAIAIAIGGAI	1400
or†20_NK-219-3	G I G I GA I GC I AACAAAA I C I AA I CCA I I AC I GAG I AA I GG I I I I GGA I CGA I A I A I GGA I	1599
ort20L	GIGIGAIGCIAACAAAAICIAAICCAIIACIGAGIAAIGGIIIIGGAICAAIAIAIGGAI	1600
	*********** ***************************	
ouf01	TOOTATATTOCACACATTOTATCOTTTCTCCCACATAACATTAAATTAACATTATCTTCTTATC	1440
ortzi		1443
		1443
ort20_NK-198		143/
orf20_tukkoku		1437
orf20_NK-305-1	IGCTATATICCACAGATICTATCCTTIGTCGCAGATAACATTAAATTATGTIGTTATG	143/
ort20_NK-219-1	IGCIAIAIICCACAGAIICIAICCIIIGICGCAGATAACATTAAATTTATGTTGTTTATG	1654
ort20_NK-219-2	IGCIAIAIICCACAGAIICIAICCTTTGTCGCAGATAACATTAAATTTATGTTGTTTATG	1457
orf20_NK-305-2	IGCIAIAIICCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAAATTTATGTTGTTTATG	1460
orf19	IGCIAIATTCCACATATTCTATACTTTGCCGCAGATAACATTAAATTGATGTTGTTTATT	1457
orf20_S	IGCTATATTCCACATATTCTATACTTTGCCGCAGATAACATTAAATTGATGTTGTTTATT	1460
orf20_NK-219-3	TGCTATATTCCACAGGTTCTATCATTTGCCGCAGATAACATTAAATTTATGTTGTTTATG	1659
orf20L	TGCTATATTCCACATATTCTATACTTTGCCGCAGATAACATTAAATTGATGTTGTTTATT	1660

orf21	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1501
orf18	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1501
orf20_NK-198	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1495
orf20_fukkoku	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1495
orf20_NK-305-1	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1495
orf20_NK-219-1	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1712
orf20_NK-219-2	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1515
orf20_NK-305-2	CACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAAC	1518
orf19	TACATTTGACACATTAAAATTGAGTTGTGGACTATAATATATATGCGAGTTAGGTAAC	1515
orf20_S	TACATTTGACACATTAAAATTGAGTTGTGGACTATAATATATATGCGAGTTAGGTAAC	1518
orf20_NK-219-3	CACATTTGACACATTAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATAT	1719
orf20L	TACATTTGACACATTAAAATTGAGTTGTGGACTATAATATATATGCGAGTTAGGTAAC	1718
	********** **** *****	
	/ Exon 3 ↓ XspI	
orf21	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGC	1561
orf18	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGG <mark>CTAG</mark> AGCTCCACAATTACTGC	1561
orf20 NK-198	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGG <mark>CTAG</mark> AGCTCCACAATTACTGC	1555
orf20 fukkoku	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGC	1555
orf20 NK-305-1	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGC	1555
orf20_NK-219-1	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGC	1772
orf20 NK-219-2	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGC	1575
orf20_NK-305-2	ATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGC	1578
orf19		1575
orf20 S		1578
orf20_NK-219-3	ATATGGTGTCAATTTACAGACTTTGGAAGATTATTCAGGCTACAGCTCATCACTTACTGC	1779
orf201	ATAGAGTGTCAATTTACAGGGTTTGGAAGATTATTCAGG <mark>CTAG</mark> ATTTCATCAATTACTGC	1778
	*** ***********************************	1770
orf21	CACGAACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGATTGTTTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATT	1618
orf18	CACGAACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGATTGTTTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATT	1618
orf20 NK-198		1612
orf20 fukkoku		1612
orf20 NK-305-1		1612
orf20_NK-219-1	CACGAACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGATTGTTTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATT	1829
orf20_NK_210_2		1632
orf20 NK-305-2		1635
orf10		1635
orf20 S		1638
01120_3		1000
orf201		1838
		1000
	ጥጥጥጥጥጥጥ ጥጥ ጥጥ ጥጥጥጥጥጥጥ ጥጥጥጥጥ ጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥ	
orf91		1670
orf10		1670
rf20 NK - 100		1670
orf20 fukkoku		1672
or120_10KK0KU		1672
$01120_NK^{-}300^{-}1$		1072
or 120_NK-219-1		1009
UT 120_NK-219-2		1092
01120_NN-305-2		1095
		1095
		1000
ortzu_NK-219-3		1000
OTT2UL	I I GUI GUAAGGAAA I AGAAGGAGAI GAGAI I GGAGI GGI I CI GAI GGCI I CI GCI GGAI	1898

orf21	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	738
orf18	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	738
orf20_NK-198	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	732
orf20_fukkoku	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	732
orf20_NK-305-1	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	732
orf20_NK-219-1	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	949
orf20_NK-219-2	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	752
orf20 NK-305-2	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	755
orf19	ACGACCCGCGAGTTGCA	CCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1	755
orf20 S			758
$arf20 NK_{210}$			052
01120_NIX 219 0	ACCACCCCCCCCCCCCCC		050
			900
	ጥጥ ጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥ	ጥጥጥጥጥጥ ጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥጥ ጥጥጥጥ	
orf21	ACTGTTTAGCAACTCAT	CCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1	798
orf18	ACTGTTTAGCAACTCAT	CCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1	798
orf20 NK-198	ACTGTTTAGCAACTCAT	CCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1	792
orf20 fukkoku	ACTGTTTAGCAACTCAT	CCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1	792
orf20_NK-305-1			792
$orf20_NK-219-1$			2000
orf20 NK-210-2			Q12
orf20 NK-305-2			815
orf10			Q15
orf20 S	ACTETTACCAACTCAT		010
01120_3	ACTOTITAGCAACTCAT		010
01120_NK-219-3	ACTOTITACCAACTCAT		2013
OFIZUL			2018
	<u> </u>	**************************************	
orf21	TTATGAAGGAAGCAGAT	AAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTCAAGGTC 1	858
orf18	TTATGAAGGAAGCAGAT	AAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTCAAGGTC 1	858
orf20 NK-198	TTATGAAGGAAGCAGAT	AAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTCAAGGTC 1	852
orf20 fukkoku	ΤΤΑΤGAAGGAAGCAGAT		852
orf20 NK-305-1			852
orf20 NK-210-1			032
orf20 NK-210-2	TTATGAAGGAAGCAGAT		272
orf20_NK_205_2	TTATCAACCAACCACAT		075
01120_NK-300-2			075
			070
			0/0
0r120_NK-219-3			2073
OFIZUL			2078
orf20-6		ᠰᡣᡯᡯᡯᡮᡮᡮᡮᡮᡮᡮᡮ᠋ᡵ᠋ᢆᡘᡱ᠋᠋ᡎ᠋ᢆᡘᡱ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ᠋ᡎᡩ	
orf21	TTCAGTAA 1866	付回 4.1 arf20 様遣伝子のコード域の炬其配列	ال
orf18	TTCAG TAA 1866	因 4-1 0fj20 保度因 1 0 2 下域の塩茎能外	1V)
orf20 NK-198	TTCAG TAA 1860	マルチプルアラインメント	
orf20 fukkoku	TTCAG TAA 1860	右側の番号は開始コドンの第一塩基を+1 とし	.7
orf20 NK-305-1	TTCAG TAA 1860		
orf20 NK-210-1	TTCAGTAA 2077	付した。アスタリスクは全ての配列で共通した	2塭
orf20 NK-219-2	TTCAG TAA 1880	基を示す。orf20 _{fukkoku} に見られる(orf20 _{NK-198} と比	比較
orf20_NK-305-2	TTCAG TAA 1883	した際の)非同義置換をピンクで涂りつぶし	た
orf19	TTCAG TAA 1883	(102(采日の悔甘) 20 のプニノー 部門仕屋	 马子.
orf20_S	TTCAG TAA 1886	(1030 街日の塩本)。020 のノフィマー設計位直	ミど
orf20_NK-219-3	TTCAG TAA 2081	灰色、Dra I 及び Xsp I 認識部位をそれぞれ赤及	とび
orf20L	TTCAG <u>TAA</u> 2086	黄緑で色付けした。	

BAC	Position	ਲ ।	- - 13,57715,436 complement 21,53323,398 complement	64,07665,892
	Gene	E60 BvOMAI-I	orf18 orf19 orf20 _{NK-198} orf21	LOC104888056 _{NK-198}
	D	78A10	4F1 33E19	
EL10	Position	10,738,36710,741,893	2,453,935.2,455,800 complement 2,460,9412,462,823 complement 2,471,5122,473,394 complement 2,485,3642,487,246 complement 2,499,2202,501,079 complement 2,507,1772,509,036 complement	2,519,8912,521,960
	Gene	EL10 BvOMAI-I	orf20 _{EL10-1} orf20 _{EL10-2} orf20 _{EL10-3} orf20 _{EL10-4} orf20 _{EL10-6}	$LOC104888056_{EL10}$
	Accession no.	CM009440.1 (Chromosome 3)		
KWS2320	Position	327,302331,422 301,862306,206	2,397,8032,400,302 complement	2,444,4732,446,764
	Gene	BvOMAI-I BvOMAI-2	KWS2320 orf20L	LOC104888056
	Accession no.	NW_017567367.1 (Chromodome 3 unlocalized scaffold)	CM002323.2 (Chromosome 3)	

付表5-1 テンサイゲノムにおけるOMAI相同遺伝子の座乗位置

a33E19とは異なるBACクローン上にあるため、位置を示していない

付表5-2 被子植物におけるOMA1相同遺伝子

Antidegen Antime OC 00001254 NOB ATTG110 NP 199973 - - NO 00001553 Canadia nakular OC 00001553 NOB NOB <	Species	Accession no./ver.	Source	Gene ID/Locus tag	Protein ID	E-value (blastp, vs AtOMA1)	E-value (tblastn)	Accession no.
Instrument 667 900013521 NCH 1/X701199 X7 NUPRITI 0 9001171 0 60011731 NW 00208401 Bronzen man 621 90013511 NCH LOC [17111] X7 90017111 0 7001701 NW 00208401 Bronzen man 627 90017131 NCH LOC [1501710] X7 90017131 0 7001701 NCH	Arabidonsis thaliana	GCF_000001735.4	NCBI	AT5G51740	NP 199987.2			NC 003076.8
Capedia adulta OCT (2007)131 NYIII (CC197)11 20 4488-171 60 4488-171 60 6488-171 60 6488-171 60 6488-171 60 6488-171 60 64 60 No. 18 100 </td <td>Arabidonsis hvrata</td> <td>GCF_000004255.2</td> <td>NCBI</td> <td>LOC9301950</td> <td>XP_020871151.1</td> <td>0</td> <td>9.00E-179</td> <td>NW 003302548 1</td>	Arabidonsis hvrata	GCF_000004255.2	NCBI	LOC9301950	XP_020871151.1	0	9.00E-179	NW 003302548 1
Bossiss range OCT_00009931 NY11 10.01031211 N 0 7.82 223 strengta Genyslaw ransmall GC_0002183.1 NCII 10.0103011 N 10.0103011 0 7.82 31.82 30.80 0.010301 N 0 7.82 31.85 0 30.80 0.010301 0 4.86 10.85 N 0 4.86 10.85 N 0 4.86 10.85 N 0 4.86 N N N N N 0 4.86 N	Cansella rubella	GCF_000375325.1	NCBI	LOC17876312	XP_006280471.1	0	4.00E-172	NW 0062389161
Grad paged ASGPB 04 Peptone emandal aproxing 1323 0 7.28/123 empercing 1323 Computer across OCT 000279511 NTII LCC(050216 XP 00540211 0 1000-07 XR 000011 Constant CCT 000279511 NTII LCC(050216 XP 00540211 0 4000-07 XR 000011 Constant CCT 00017951 NTII LCC(040404 XP 00054011 2000-07 XR 0000101 Constant CCT 00017951 NTII LCC(040404 XP 00054011 2000-07	Brassica rana	GCF_000309985.1	NCBI	LOC103832871	XP 009107217.1	0	0	NC 024795.1
Genymerannender GCF 90027454.1 NYIII LCC(158290 XP 812464731 0 1.081-10 XY 802931 Theolong count GCF 90027451.1 NYIII LCC(158290 XP 01245611.2 0 3.061-251 XY 000231.1 XY 000231.1 XY 000231.1 0 3.061-251 XY 000231.1	Carica papaya	ASGPB v0.4	Phytozome	evm.model.supercontig 3.252		0	7.20E-122	supercontig 3
Index of a construct of (C) 000014.1 NR III Incrementation 0 3.08-22 NC 090291 Curran altering 0.1 0.1 0.01001 0.1 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.01001 0.000110 0.0000100 0.0000100 0.0000100 0.0001100 0.0000100 0.0001100	Gossypium raimondii	GCF 000327365.1	NCBI	LOC105800101	XP 012486475.1	0	1.00E-109	NC 026934.1
Theohema case OCT #002745.1 NCB LOC1989414 NP 0024847.2 0 4409-52 NC 008231 DataOpus gradu OCT #003745.1 NCB LOC1052538 NP 005491.1 0 4409-16 NV 002541 DataOpus gradu OCT #003745.1 NCB LOC1054241 NV 100371.1 0 9409-160 NV 9002481.1 Create and: CC #003745.1 NCB LOC1054293 NV 9003491.71 0 4409-160 NV 9002481.1 Create and: CC #0031465.1 NCB LOC10540371 Personal 0 1.0510.1 Code MBa denotes CF #0031455.1 NCB LOC10411651 Personal Code 1.06174.1 NCB LOC10411651 Personal Code 1.06174.1 NCB LOC10411651 Personal Code 57 Code 57 <thcode 57<="" td="" th<=""><td></td><td>_</td><td></td><td>LOC105784204</td><td>XP 012465493.1</td><td>0</td><td>3.00E-92</td><td>NC 026929.1</td></thcode>		_		LOC105784204	XP 012465493.1	0	3.00E-92	NC 026929.1
Chrassmania OCF 00031943.1 NCB LOC1023228 XP 0940970.0 0 4407-118 NC 023051 Carant refs CCT 00012005.1 NCB LOC10440412 XP 01017017.1 0 4407-10 NOB NOB NO 000203.1 Carant refs CCT 0031466.2 NCB LOC1040039 0 1187-102 NO 000203.1 Corollo harmor CCT 0031466.2 NCB LOC1070603 XP 0215016.1 0 1485-102 NO 8801 Mall monewar CCT 0031466.2 NCB LOC1041003 page 100-0 1006-10 NC 992331 Mall monewar CCT 0018415.1 NCB LOC1041003 page 100-0 1006-10 NC 992431 Locn 11152 XP 0403614.0 1006-13 NCB LOC2041031 - - - - Mall genesa v3 0 mylograp Intel (10000397 VP 01040418.1 200-11 - - - Mall genesa v3 0 mylograp 1 Intel (10000397 VP 01040418.1 - - <td>Theobroma cacao</td> <td>GCF_000208745.1</td> <td>NCBI</td> <td>LOC18605434</td> <td>XP_007038496.2</td> <td>0</td> <td>4.00E-93</td> <td>NC_030852.1</td>	Theobroma cacao	GCF_000208745.1	NCBI	LOC18605434	XP_007038496.2	0	4.00E-93	NC_030852.1
Includging pradit 647 (0001200-11) NC II LOC1044042 XP 01051231 0 7085-00 NV 01072031 Clasmin medic GCT 00011015 NC III LOC10440451 XP 01051071 2085-00 P0001071 2085-00 P0001071 2085-00 P0001071 2085-00 P0001071 P000107107 P0001071071	Citrus sinensis	GCF 000317415.1	NCBI	LOC102628298	XP 006490270.1	0	4.00E-116	NC 023054.1
Communit Control Control Not (Control <	Eucalyptus grandis	GCF 000612305.1	NCBI	LOC104449442	XP 018716323.1	0	7.005 40	NIW 010002420 1
Carenti mio OCT 00011041 NCB LOC13346017 NP 0005927.11 0 0.006.106 NP 007597.31 Diratic parise OCT 00014952 NCB LOC1070060 NP 007596.11 0 1.085.102 Cub Cub Maint donue OCT 00014952 NCB LOC1070060 NP 001046.11 0 1.006.103 NC 001011 Maint donue CGT_00014155.1 NCB LOC1070060 NP 001046.11 1.006.103 NC 00297.11 Progeta voca CGT_00014155.1 NCB LOC1024011.02 NP 001046.11 1.006.107 NC 00297.11 Loc Independent ver 3.0 mpskapas jp 1.0024005491.1 2.017.11 1.001.107 NC 00497.1 Melicage runcaula Ver 3.0 mpskapas jp 1.0024005491.1 2.017.11 1.001.107 NC 00497.2 Melicage runcaula Ver 3.00497.3 NCB LOC1132577.10 NP 00451261.1 1.001.107 NC 00497.2 LOC1132577.10 NP 00451261.1 1.001.107 NC 00492.2 1.002.107 NC 00492.2 1.002.107 <		_		LOC104449451	XP 010061917.1	2.00E-109	7.00E-49	NW_010092438.1
Cranula langua Prance persua (CF, 00014615) Oct.00214052 NCB Cot.0014053 (CF, 000146155) NCB NC (CF, 000146157) NC (CF, 00014617)	Cucumis melo	GCF 000313045.1	NCBI	LOC103484017	XP 008439127.1	0	9.00E-106	NW 007546273.1
Prane persea OCT 0001864652 NCBI LOC1876/50 XP 0953/e041 0 1.00 NC 0.20231 Melle omstrar GCT 00018765 NCBI LOC10240968 XP 0953/e041 0 1.00E107 NN 0024017.1 Fregaria suca GCT 000184153.1 NCB LOC10111053 XP 09430144.1 1.00E137 NN 00254017.1 Iotin ippontos ver 3.0 miyalogesa ja LQ5254071.0 E1137 4.00 NC 0.20231 Medrogar innexidua GCT 00021993.3 NR BH LQ5254071.0 NR 0145201.1 6.00 NR 0.00423 Medrogar innexidua GCT 00021993.3 NR BH LQ5254071.0 NR 0145201.1 6.00 NR 0.00423 LOC2396778 XP 0144231.1 6.00 S.00 NR 0.00423 NR 0.00402.2 NR 0.00402.2 NR 0.00401.2	Citrullus lanatus	ver. 1 (cv. 97103)	CuGenDB	Cla006239	-	0	1.05E-102	Chr5
Malue alonestics OCT_00014785 NCBI LOC(0343986 XP 0 3001-00 NC (0228-1) Fregoris vesca OCT_000181153.1 NCBI LOC(0342933.3) peads 1.001-17 1.001-37 NK (0228-1) Latar japportav ws 3.0 mipakogas.pp Ligh-japhologika NK (0110113) NK (011013) NK (0110113) NK (011013) NK	Prunus persica	GCF 000346465.2	NCBI	LOC18786766	XP 007220466.1	0	1.00E-98	NC 034010.1
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Malus domestica	GCF_000148765	NCBI	LOC103439668	XP_008376469.1	0	2 00E 102	NC 024220-1
Fregrist verset CCF_000114153. NCHI LCC10416163. Product 1.008-37 NV00754017.1 Latta japanicas wr 30 miyakogas.jp LG21011163. NV 04308146.1 1.001-14 4.008-37 NC 020071.1 Latta japanicas wr 30 miyakogas.jp LG210011163.1 NV 0110011.1 2.113 . . . Medicage rancatula CCF_00219083. NC HI LCC2407161 S.70 0454501.1 . <td></td> <td></td> <td></td> <td>LOC103428393</td> <td>pseudo</td> <td>-</td> <td>3.00E-103</td> <td>NC_024239.1</td>				LOC103428393	pseudo	-	3.00E-103	NC_024239.1
Fragora vasca GCF_000184153.1 NCBI LOC(01311823 XP 014704510 L000-13 4.005-97 NC 020497.1 Lotus japonicar vr 3.0 miyakogan.jp 1.00(103118) XP 014704181.1 2.007.4 4.005-97 NC 020497.1 Medicago ranecatular GCF_00021987.3 NCBI 1.00(23497161.1 XP 01440481.1 6.006-25.3 1.006-175 2.007.9 NC 014012.2 Medicago ranecatular GCF_00021987.3 NCBI 1.00(23497161.1 XP 00440281.1 1.006-175 2.007.91 NC 016409.2 LOC21464200 XP 00440281.1 1.006-53 1.006-13 1.006-13 1.006-13 1.006141 NC 016409.2 LOC21464300 XP 00440281.1 1.0062443 1.006-14 1.0021497.1 NC 016409.2 1.00114123 3.001-91 NC 016409.2 Glycine max GCF_00004515.5 NCBI LOC1007100 XP 004508081.1 3.001-91 NC 016409.2 Mastar constant GCF_000151685.1 NCBI LOC2464210.1 NC 0125921.1 NC 01409.2 Mastar constant GCF_000015165.1				LOC103410361	pseudo	-	1.00E-87	NW 007546017.1
International constraints International constraints International constraints International constraints No. 20097.1 Mailerage rescands GCF_0021949.3 NCBI International constraints NC Internaternatinternaternational constraints NC Interna	Fragaria vesca	GCF_000184155.1	NCBI	LOC101311625	XP_004308146.1	1.00E-175		
Latar japonican vs 3.0 miyaloogana.jp LOC(353198 XP 0114704.81. 2.007.74 Medicago truncatula GCF_000219495.3 NCBI Lipha/0404991.0 E.137 - - Medicago truncatula GCF_000219495.3 NCBI LipCay4911.0 XP 01352478.1 4.007.55 - - LOC(142792 XP 0246428.01.1 4.007.55 -				LOC101311329	XP_011470439.1	3.00E-43	4.00E-97	NC_020497.1
Lotis provides ver 3.0 miyakoguna jp Ligh/s000499:1 - FL:15 - - Medicago truncaular GCF_00021949:3 NCB Ligh/s000499:1 Ver 01552178:1 10001:178 -				LOC105353198	XP_011470438.1	2.00E-74		
Medicago truncatula GCF_000219495.3 NCB Light/0246023.1 PD1-15 FL-107 - - Medicago truncatula GCF_000219495.3 NCB LGC25406738 XP 0344206.1 0.00E-13 - </td <td>Lotus japonicus</td> <td>ver 3.0</td> <td>miyakogusa.jp</td> <td>Lj0g3v0300499.1</td> <td>-</td> <td>E-135</td> <td>-</td> <td>-</td>	Lotus japonicus	ver 3.0	miyakogusa.jp	Lj0g3v0300499.1	-	E-135	-	-
Medicago runcanda GCF_00219495.3 NCB LOC25407161 XP 01452474.1 1.000-178 LOC25407538 XP 02442361.1 6.00E-55 2.00E-91 NC_016412.2 LOC254071211 XP 03442361.1 6.00E-55 2.00E-91 NC_016412.2 LOC25408489 XP 01442361.1 1.00E-178 2.00E-91 NC_016412.2 LOC25408489 XP 0145801.1 2.00E-91 NC_016402.2 0.01E-91 NC_016402.2 LOC25484890 XP 01548641.2 1.00E-46 3.00E-17 NC_016407.2 LOC25484890 XP 01548641.2 1.00E-46 3.00E-17 NC_016407.2 LOC2548217 XP 0154641.2 1.00E-46 4.00E.78 NC_035241.1 Recine commutic OCF 00015165.1 NCB 1.00C10018928 XP 00354041.1 0.00E-171 NC_035241.1 Marka contractic commutic OCF 00015165.1 NCB 1.00C1001536 XP 0021862.2 0 1.00E-117 NC 035241.1 Marka contractic commutic OCF 00003753.3 NCB 1.00C10025314.4 XP 002209521.1 0 2.00E-16 NC				Lj0g3v0245029.1	-	E-107	-	-
Inclusion Inclusion <t< td=""><td>Medicago truncatula</td><td>GCF_000219495.3</td><td>NCBI</td><td>LOC25497161</td><td>XP_013452478.1</td><td>1.00E-178</td><td></td><td></td></t<>	Medicago truncatula	GCF_000219495.3	NCBI	LOC25497161	XP_013452478.1	1.00E-178		
Image: Section of the sectio				LOC25496738	XP_024642061.1	6.00E-85		
International control of the second				LOC11422922	XP_024642281.1	1.00E-52	2.00E-91	NC 016412.2
International constraints In				LOC11424089	XP_003618269.1	6.00E-53		
International constraints In				LOC112422711	XP_024642063.1	1.00E-15		
International constraints In				LOC11434890	lncRNA	-		
LOC1143354 XP 0246300801 2005-34 3.00E-17 NC.016072 Glycine max GCE_00004515.5 NCBI LOC10079127 XP 00354064.1 0 2.00E-141 NC 035243.1 ILOC100000048 XP 00354064.1 0 2.00E-141 NC 035243.1 ILOC100000048 XP 0035724.11 3.00E-179 NC 035243.1 ILOC10007010 pseudo - 4.00E-78 NC 035243.1 ILOC10076010 XP 0025005.1 0.00E-101 NV 0352438.1 Manihol escularua GCE 00003745.3 NCBI LOC101616280 XP 021605.2 0 1.00E-101 NC 035243.1 Itis vinifara GCE 00003745.3 NCBI LOC1010523134 XP 00210952.1 0 2.00E-106 NC 017223.1 Kalanchoc fedischenkoj v1.0 Phytozome Kaladp0550376.2 - 0 5.10E-59 Seafidd 3.5 HanXRQCn03g006181 - 5.00E-176 4.00E-46 Chc63 NC 01722.3 NC 0162421 - 0.00E-176 A.00E-176 S.00E-17 NC 0162443.5 Lactaca safra GCE 000037				LOC25488489	XP_013458801.1	5.00E-178	3.00E-89	NC_016409.2
Glycine max GCF_000004515.5 NCBI L0X234247 XP 0134644.2 1.00E-06 2.00E-114 NC 038245.1 Ricinus communis GCF_000151685.1 NCBI L0C100076010 pseudo - 4.00E-78 RC 038245.1 Monitot ecculenta GCF_00151685.1 NCBI L0C2364010 XP 015580918.1 0 9.00E-114 NN C 038245.1 Monitot ecculenta GCF_00159605.1 NCBI L0C2364010 XP 02117128.1 3.00E-154 NN C 03296.7 Popula trickourpa GCF_00003745.3 NCBI L0C1401818 XP 02117128.1 3.00E-175 NC 03296.7 Istinifera GCF_00003745.3 NCBI L0C1401818 XP 00219952.1 0 2.00E-176 NC 03296.1 Istinifera inform GCF_00003745.3 NCBI L0C140161818 - 5.00E-176 NC 017522.3 Istinifera inform r1.2 Phytozone Kaladp09503176 - 5.00E-176 NC 01752.3 NC 0197414.1 Lattice sative GCF_00151154.5.1 NCBI L0C110960272.1 - 4.00E-148 6.				LOC11433354	XP_024639089.1	2.00E-34	3.00E-17	NC 016407.2
Chychie max C.F. (00004515.5) NCBI LOC(10/97012/T) XP 005540541 0 200E-114 NC 0582421 Ricinas comunits GCF 000151655.1 NCBI LOC(100700048 XP 005574211.1 300E-179 KO 058242.1 Manihot excutenta GCF 0000575.4 NCBI LOC(100700146 pstudo - 4,00E-78 NC 058242.1 Popular inchocorpa GCF 00000275.4 NCBI LOC(10075016 pstudo - 4,00E-163 NC 05726.1 Vita sinifera GCF 00000275.4 NCBI LOC(10025116 pstudo - 4,00E-68 NC 07296.1 Vita sinifera GCF 000003745.3 NCBI LOC(100251141 - 5 00E-176 NC 01022.3 Kalanche felschenhoi v.1.0 Phytozome HaXRQCh05g01414 - 5 00E-161 NC 0105 HaXRQCh05g0151 NCBI LOC(11094007427 XP 022757378.1 1 00E-172 NW 010674144.1 Charac andmundus GCF 002870075.1 NCBI LOC(1109400727 XP 022757378.1 1 00E-172 NW 010674144.1 Cha		CCT 000004515.5	NCDI	LOC25482437	XP_013466444.2	1.00E-46		
Image: Control of the second	Glycine max	GCF_000004515.5	NCBI	LOC100799127	XP_003534034.1	0	2.00E-114	NC_038245.1
Ricinus communis GCF 000151685.1 NCB1 LDC.106100 XP 0167178.1 0 0.00E-114 NV 00294278 Manihot excelenta GCF 00002775.4 NCB1 LDC.10618286 XP 02167128.1 3.00E-154 1.00E-103 NC 035166 Popular irchocarpa GCF 00002775.4 NCB1 LDC.1010251314 XP 02167128.1 3.00E-154 1.00E-108 NC 037290.1 Vitis vinifera GCF 000002775.4 NCB1 LDC.1010253134 XP 002269952.1 0 2.00E-168 NC 037290.1 Kalanchoe fedschenkai vi.0 Phytozome Kalandbö50376 - 0 5.00E-51 1.00E-108 NC 017202.3 Heitorithus annus r1.2 Phytozome HaxRQChd\\$2016241 - 5.00E-51 1.00E-14 NW 019674486.1 Locc11194027 XP 02375372.1 4.00E-176 X.00E-14 NW 0196744486.1 Cymara cardunculus GCF 000101975.1 NCB1 LOC11094027 XP 02375372.1 4.00E-176 X.00E-174 NW 019674444.1 Ger 00019157.1 NCB1 LOC11094027 XP 02375372.1 <				LOC100800848	XP_003527421.1	3.00E-179	8.00E-107	NC_038242.1
Richus communis O.F. 90015185.1 N.Bit LDC110618286 XP 01558055.1 0 9.00E-114 NW 00294278 Monitor exculenta GCF_0005905.1 NCB1 LDC110618286 XP 00218862.2 0 1.00E-103 NC 037296.1 Populas trichocarpa GCF_00000745.3 NCB1 LDC18105916 pseudo - 4.00E-68 NC 037299.1 Vitis vinifera GCF_00000745.3 NCB1 LDC18105916 pseudo - 0 5.00E-51 1.00E-85 NC 01202.3 Kalandrobe (edischenkic) v.1.0 Phytozome HalaxR0Chd9501531 - 5.00E-51 1.00E-34 Chr03 Helianthus annus rl.2 Phytozome HauxR0Chd920165241 - 3.00E-70 2.00E-34 Chr04 Lactuce sativa GCF_002870075.1 NCB1 LOC111904027 XP 02375572.1 4.00E-174 N.00E-72 NW 019674144.1 Cynara cardunculus GCF_00020075.1 NCB1 LOC11904027 XP 02375573.1 1.00E-134 NC 037540.1 Copara cardunculus GCF_0001815.4 NCB1 <td></td> <td></td> <td>NODI</td> <td>LOC1007/6010</td> <td>pseudo</td> <td>-</td> <td>4.00E-/8</td> <td>NC_038248.1</td>			NODI	LOC1007/6010	pseudo	-	4.00E-/8	NC_038248.1
Mathind elschenda CCF_00002775.4 NCB1 LDC/482166 XP 02101728.1 3.00E-154 1.00E-103 NC 032796.1 Populus richocarpa GCF_00002775.4 NCB1 LDC/482166 XP 002318862.2 0 1.00E-117 NC 037296.1 Vitis vitifera GCF_00002775.4 NCB1 LDC/10253134 XP 00220952.1 0 2.00E-106 NC 037296.1 Kalanchoe fedischenkoi V.0 Phytozome Kalanchoe fod/0550376 - 0 5.10E-95 Scaffold 55 Hellanthus annus r1.2 Phytozome Kalanchoe fod/0550376 - 0 5.00E-16 Ch03 Loccl1002051314 . 5.00E-176 1.90E-34 Ch03 Ch04 HauxRQChol0201541 - 3.00E-176 S.00E-91 NW 01967144.1 Loccl110905900 XP 023759372.1 4.00E-176 S.00E-16 Ch02 Crarac cardunculus GCF_00013815.1 NCBI LOC(11905900 XP 023759372.1 4.00E-176 NW 01967448.1 Capicicam annuam GCF_00013815.1 NCBI LOC(10763395	Ricinus communis	GCF_000151685.1	NCBI	LOC8266010	XP_015580938.1	0	9.00E-114	NW_002994278
Characterization Characterization Characterization Characterization Characterization Characterization Characterization Characterization Vitis vinifera GCF 00000745.3 NCBI LOCISI05916 pseudo - 4.00E-68 NC 012022.3 Kalandp0055916 vi.0 Phytozome Kalandp00550376 - 0 2.00E-136 NC 012022.3 Kalandp00550376 - 5.00E-51 1.90E-34 Chr03 Chr03 HaltxR0Chr05g001381 - 5.00E-57 2.00E-23 Chr04 HanxR0Chr05g005221 - 4.00E-48 6.70E-16 Chr02 LOCI1090900 XP 02375572.1 4.00E-48 1.00E-174 1.00E-124 Cymara cardunculus GCF 000158115.4 NCBI LOCI1090900 XP 02375572.1 4.00E-48 6.70E-16 Chr02 Capscium annum GCF 00015815.4 NCBI LOCI1090900 XP 02375572.1 4.00E-176 5.00E-132 NK 02974486.1 Capscium annum GCF 00015815.4 NCBI LOCI109058738 XP 00424449.1 0 </td <td>Maninot escuienta Populus trichogarma</td> <td>GCF_001659605.1</td> <td>NCBI</td> <td>LOC110618286</td> <td>XP_02161/128.1 XP_002218862.2</td> <td>3.00E-154</td> <td>1.00E-103</td> <td>NC_035166</td>	Maninot escuienta Populus trichogarma	GCF_001659605.1	NCBI	LOC110618286	XP_02161/128.1 XP_002218862.2	3.00E-154	1.00E-103	NC_035166
Vitis vinifera GCF 000003745.3 NCBI LOC10023134 XP 002269452.1 0 2.00E-106 NC 001292.1 Katanchor fedschenkoi vi.0 Phytozome Kalanchor fedschenkoi - 0 5.00E-176 NC 001292.1 Helanhus annus ri.2 Phytozome Kalanchor fedschenkoi - 0 5.00E-176 4.50E-89 Clut05 HanxRCCholgd001381 - 5.00E-176 4.50E-89 Clut05 HanxRCCholgd0015241 - 5.00E-16 1.09E-34 Clut05 Loccture sativa GCF 002870075.1 NCBI LOC11094027 XP 023753572.1 4.00E-18 6.70E-16 Clut02 Cynara cardunculus GCF 00158115.4 NCBI LOC110252333 XP 012375375.1 0 5.00E-132 NC 0239731 Solaum tubcopersium GCF 000158115.4 NCBI LOC1026048729 XP 0042341491 0 3.00E-112 NC 023976.1 Solaum tubcopersium GCF 00015815.1 NCBI LOC102763395 XP 010569177.1 0 5.00E-132 NC 023902.1 S	Fopulus iricnocarpa	GCI_000002773.4	NCBI	LOC/482108	AP_002518802.2	0	1.00E-117	NC_037296.1
Kalamotor Oct 000030120_3 NCB1 DOC10023137 AV 002093211 0 2.00E-106 NC 012023 Kalamotor File Kalamotor Kalamotor 0 5.00E-51 0.00E-34 Chrd3 Helianthus annus rl.2 Phytozome HanXRQChr05g0141341 - 5.00E-51 1.90E-34 Chrd3 Lactuce sativa GCF_002870075.1 NCBI LOC11020201221 - 3.00E-70 2.00E-76 5.00E-51 1.90E-14 Chrd3 Caracacrdmuculus GCF_001531365.1 NCBI LOC11090900 XP 023753788.1 1.00E-176 5.00E-91 NW 019674144.1 Capsicum annuum GCE 000710875.1 NCBI LOC1109500 XP 02375378.1 0.00E-176 5.00E-71 NW 019674480.1 Solanum tuberosum GCE 000188115.4 NCBI LOC1022333 XP 040434149.1 0 3.00E-112 NC 01540.3 Solanum tuberosum GCF 00012075.1 NCBI LOC10406384 (BOMA1-1) XP 01063950.1 0.00E-199 NV 01628052.1 Beta vulgaris GCF 00020775.1 NCBI	Vitio vinifona	GCE 000002745.2	NCDI	LOC100252124	VB 002260052 1	-	4.00E-08	NC_012022.2
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Vilis Vilijera Kalanahaa fadtaahankai	v1.0	Phytozome	Kalada0055s0376	AF_002209932.1	0	5 10E 95	Scaffold 55
Introduction District Constraint Distrit Constant District Constant <thd< td=""><td>Helianthus annuus</td><td>r1.2</td><td>Phytozome</td><td>HanXROChr05e0141341</td><td>_</td><td>5.00E-176</td><td>4 50E-89</td><td>Chr05</td></thd<>	Helianthus annuus	r1.2	Phytozome	HanXROChr05e0141341	_	5.00E-176	4 50E-89	Chr05
Image: Construct and the second sec			,	HanXROChr03g0061581	_	5.00E-170	1.90E-34	Chr03
Lactuca sativa GCF_002870075.1 NCBI Loc(110904027 XP 02375572.1 4.00E-48 6.70E-16 Chro2 Cynara cardunculus GCF_001531365.1 NCBI LoC(111905900 XP 02375578.1 1.00E-154 1.00E-152 NC 037540.1 0 2.00E-96 NC 037540.1 NC 037540.1 NC 015440.3 NC 01507240 XP 01101145.1 0 2.00E-95 NC 026483.1 Sesamum indicum GCF_00011025.2 NCBI LoC(104906634 (BvOMA1-1) XP 0109107970.1 4.00E-109 NW 012767367.1 LoC(1049888051 (KW 93220 orf20L) XP 01011183.1 2.00E-72 CM002323				HanXROChr04g0116241	_	3.00E-70	2.00E-23	Chr04
Lactuca sativa GCF_002870075.1 NCBI LOC111904027 XP 02375572.1 4.00E-176 5.00E-91 NW 019674144.1 Cynara cardunculus GCF 001531365.1 NCBI LOC111905900 XP 02375738.1 1.00E-154 1.00E-72 NW 019674144.1 Capsicum annuum GCF 0010875.1 NCBI LOC11252233 XP 02490197.1 0 2.00E-91 NW 019674144.1 Solanum hyperpericum GCF 00010875.1 NCBI LOC107863395 XP 04234149.1 0 3.00E-112 NK 019574144.1 Solanum hyperpericum GCF 000188115.4 NCBI LOC107863395 XP 04234149.1 0 3.00E-112 NK 06239023.1 Solanum hyperpericum GCF 000192075.1 NCBI LOC102601487 XP 006534004.1 0 1.00E-115 NW 006239023.1 Sesamum indicum GCF_000511025.2 NCBI LOC104906584 (BXOMA1-1) XP 010693659.1 1.00E-179 4.00E-90 NW_017567367.1 LOC104906603 (BXOMA1-2) XP 0101071183.1 3.00E-33 2.00E-27 CM002323.2 Spinacia oleracea GCF 002007265.1 NCBI				HanXROChr02g0052421	-	4.00E-48	6.70E-16	Chr02
Image: Constraint of the second sec	Lactuca sativa	GCF 002870075.1	NCBI	LOC111904027	XP 023755572.1	4.00E-176	5.00E-91	NW 019674144.1
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$		_		LOC111905900	XP 023757398.1	1.00E-154	1.00E-72	NW 019674486.1
Capsicum annuum GCF 000710875.1 NCBI LOC107863395 XP 016564775.1 0 5.00E-132 NC 029979.1 Solanum livopersicum GCF 000188115.4 NCBI LOC107267339 XP 004234149.1 0 3.00E-112 NC 0129979.1 Solanum livopersicum GCF 000188115.4 NCBI LOC102601487 XP 004234149.1 0 3.00E-112 NC 0129979.1 Solanum livopersicum GCF 000512975.1 NCBI LOC102601487 XP 004234149.1 0 3.00E-112 NC 0023023.1 Sesamum indicum GCF_000511025.2 NCBI LOC105160725 XP 01107507.2 0 2.00E-95 NC 026148.1 Beta vulgaris GCF_000511025.2 NCBI LOC104906603 (BvOMA1-2) XP 010671183.1 2.00E-72 NW 01757367.1 LOC104906603 (BvOMA1-2) XP 010671183.1 2.00E-72 NW 018744987.1 NU 01757367.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC1079760 (CqOMA1-1) XP 01874267.1 1.00E-175 6.00E-72 NW 018744987.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC107279760 (C	Cvnara cardunculus	GCF 001531365.1	NCBI	LOC112525233	XP 024991037.1	0	2.00E-96	NC 037540.1
$ \begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Capsicum annuum	GCF 000710875.1	NCBI	LOC107863395	XP 016564775.1	0	5.00E-132	NC 029979.1
Solanum tuberosum GCF 000226075.1 NCBI LOC102601487 XP 006348046.1 0 1.00E-115 NW 006239023.1 Sesamum indicum GCF_000512975.1 NCBI LOC105179240 XP 011101145.1 0 2.00E-99 NW 011628055.1 Beta vulgaris GCF_000511025.2 (RefBeet-1.2.2) NCBI LOC104906584 (BvOMA1-1) XP 010693659.1 1.00E-179 4.00E-90 NW_017567367.1 LOC104906603 (BvOMA1-2) XP 010671183.1 2.00E-72 2.00E-27 CM002323.2 Spinacia oleracea GCF 002007265.1 NCBI LOC104888056 XP 010671188.1 3.00E-72 NW 018931419.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC10729760 (CqOMA1-1) XP 021730195.1 2.00E-177 2.00E-108 NW 0187424867.1 Amaranthus hypochondriacus v2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-145 Scaffold 13 Zea mavs GCF_001433935.1 NCBI LOC10728014 NP 001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC 024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC10728	Solanum lycopersicum	GCF 000188115.4	NCBI	LOC101268739	XP 004234149.1	0	3.00E-112	NC 015440.3
Sesamum indicum GCF_000512975.1 NCBI LOC105179240 XP 011101145.1 0 2.00E-99 NW 011628055.1 Beta vulgaris GCF_000511025.2 (RefBect-1.2.2) NCBI LOC104906584 (BxOMA1-1) XP 0100693659.1 1.00E-179 4.00E-90 NW_017567367.1 LOC104906584 (BxOMA1-2) XP 0100693659.1 1.00E-179 4.00E-109 4.00E-90 NW_017567367.1 LOC104906603 (BxOMA1-2) XP 010671183.1 2.00E-72 2.00E-27 CM002323.2 LOC104888051 (KWS2320 or120L) XP 010671183.1 3.00E-33 2.00E-72 NW 018931419.1 Chenopolum quinoa GCF_00163475.1 NCBI LOC110729760 (Cq0MA1-1) XP 010671183.1 3.00E-33 NW 018742987.1 Amaranthus hypochondriacus v2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-177 2.00E-145 Scaffold 13 Zea mays GCF_001433935.1 NCBI LOC10729760 (Cq0MA1-2) XP 01562367.1 5.00E-141 7.00E-145 Scaffold 13 Zea mays GCF_001433935.1 NCBI LOC100279801 NP 001146229.1 1.00E-143 1.00E	Solanum tuberosum	GCF 000226075.1	NCBI	LOC102601487	XP 006348046.1	0	1.00E-115	NW 006239023.1
Loc 105160725 XP 011076507.2 0 2.00E-95 NC 026148.1 Beta vulgaris GCF_000511025.2 (RefBeet-1.2.2) NCBI Loc 104906538 (BxOMA1-1) XP 010693659.1 1.00E-179 4.00E-90 NW_017567367.1 Loc 104906503 (BxOMA1-2) XP 01010770.1 4.00E-109 4.00E-90 NW_017567367.1 Loc 104988051 (KW2320 orf20L) XP 010671188.1 3.00E-33 2.00E-72 2.00E-27 CM002323.2 Spinacia oleracea GCF_001683475.1 NCBI Loc 110729760 (CgOMA1-1) XP 021842267.1 1.00E-175 6.00E-72 NW 018931419.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI Loc 110729760 (CgOMA1-2) XP 021730195.1 2.00E-177 3.00E-108 NW 018742987.1 Loc 110697159 (CqOMA1-2) XP 021730195.1 2.00E-177 3.00E-106 NW 018742987.1 Amaranthus hypochondriacus v2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-74 Scaffold 13 Zea mays GCF 000005005.2 NCBI Loc 100279801 NP 00146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC 024463.2 Ory	Sesamum indicum	GCF_000512975.1	NCBI	LOC105179240	XP 011101145.1	0	2.00E-99	NW 011628055.1
Beta vulgaris GCF_000511025.2 (RefBeet-1.2.2) NCBI LOC104906584 (BvOMA1-1) XP 010693659.1 1.00E-179 4.00E-09 NW_017567367.1 LOC104906603 (BvOMA1-2) XP 019107970.1 4.00E-109 4.00E-109 0.00E-72 2.00E-72 CM002323.2 Spinacia oleracea GCF 002007265.1 NCBI LOC104888056 XP 010671188.1 3.00E-73 2.00E-72 VM 018931419.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC104782423 XP 021842267.1 1.00E-175 6.00E-72 NW 0187442987.1 Amaranthus hypochondriacus V.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-145 Scaffold 13 Zea mays GCF 000005005.2 NCBI LOC100279801 NP 001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC 024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC10728014 XP 015622867.1 5.00E-141 7.00E-80 NC_029257.1 Hordeum vulgare rl Phytozome HORVUfH1G074020* - 3.00E-197 0.00E-71 chr6H Hordeum vulgare rl				LOC105160725	XP_011076507.2	0	2.00E-95	NC_026148.1
International control (RefBeet-1.2.2)	Beta vulgaris	GCF_000511025.2	NCBI	LOC104906584 (BvOMA1-1)	XP_010693659.1	1.00E-179	4 00E 90	NW 0175673671
LOC104888051 (KWS2320 orf20L) XP 010671183.1 2.00E-72 2.00E-27 CM002323.2 Spinacia oleracea GCF 00207265.1 NCBI LOC104888056 XP 010671188.1 3.00E-33 0.00E-72 NW 018931419.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC110729760 (CqOMA1-1) XP 021765235.1 2.00E-177 2.00E-108 NW 018742987.1 Amaranthus hypochondriacus v2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-145 Scaffold 13 Zea mays GCF_000005005.2 NCBI LOC100279801 NP 01164229.1 1.00E-143 1.00E-145 Scaffold 13 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC107280146 XP 015622867.1 5.00E-141 7.00E-80 NC_029257.1 Hordeum vulgare rl Phytozome HORVU6H1G074020* - 3.00E-91 2.60E-71 chn6H Amborella trichopoda GCF 000471905.2 NCBI LOC10430648 (OsOMA1) XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 HORVUHIGH1G074020* - 1.00E-36 3.50E-24 <td></td> <td>(RefBeet-1.2.2)</td> <td></td> <td>LOC104906603 (BvOMA1-2)</td> <td>XP_019107970.1</td> <td>4.00E-109</td> <td>4.001-90</td> <td>NW_017507507.1</td>		(RefBeet-1.2.2)		LOC104906603 (BvOMA1-2)	XP_019107970.1	4.00E-109	4.001-90	NW_017507507.1
Image: Spinacia oleracea GCF_001683475.1 NCBI LOC104888056 XP 010671188.1 3.00E-33 2.00E-17 NC0212.32 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC110729760 (CqOMA1-1) XP 021842267.1 1.00E-175 6.00E-72 NW 018931419.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC110729760 (CqOMA1-2) XP 021730195.1 2.00E-177 3.00E-106 NW 018742987.1 Amaranthus hypochondriacus v2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-145 Scaffold 13 Zea mays GCF_000005005.2 NCBI LOC100279801 NP_001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC_024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC10279801 NP_001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC_024463.2 Hordeum vulgare rl Phytozome HORVUGF16074020* - 3.00E-91 2.00E-71 chnFH Amborella trichopoda GCF_000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia				LOC104888051 (KWS2320 orf20L)	XP_010671183.1	2.00E-72	2.00E-27	CM002323.2
Spinacia oleracea GCF 002007265.1 NCBI LOC110782423 XP 021842267.1 1.00E-175 6.00E-72 NW 018931419.1 Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC110729760 (CqOMA1-1) XP 021842267.1 1.00E-175 6.00E-72 NW 018931419.1 Amaranthus hypochondriacus V2.1 NCBI LOC110697159 (CqOMA1-2) XP 021730195.1 2.00E-177 3.00E-106 NW 0187424867.1 Amaranthus hypochondriacus V2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-145 Scaffold 13 Zea mays GCF_001433935.1 NCBI LOC100279801 NP 001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC 024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC107280146 XP 015622867.1 5.00E-141 7.00E-80 NC_029257.1 Hordeum vulgare rl Phytozome HORVUGH1G074020* - 3.00E-91 2.00E-71 chn6H Marchantia polymorpha GCF_000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia				LOC104888056	XP_010671188.1	3.00E-33	2.002 27	01100252512
Chenopodium quinoa GCF_001683475.1 NCBI LOC110729760 (c_Q0MA1-1) XP 021765235.1 2.00E-177 2.00E-108 NW 018742987.1 Amaranthus hypochondriacus v2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-177 3.00E-105 NW 018742987.1 Zea maxs GCF_000005005.2 NCBI LOC100279801 NP 001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC 024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC4330648 (osOMA1) XP 015622867.1 5.00E-141 7.00E-80 NC_029257.1 Hordeum vulgare rl Phytozome HORVU6Hr1G074020* - 3.00E-91 2.60E-71 chn6H Amborella trichopoda GCF_000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-10 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA_00302435.1 NCBI MARPO_0030s002 PTQ42271.1 7.00E-10 NW 006500346.1	Spinacia oleracea	GCF_002007265.1	NCBI	LOC110782423	XP_021842267.1	1.00E-175	6.00E-72	NW_018931419.1
Image: International constraints Image: Internationa constraints Image: Internationa cons	Chenopodium quinoa	GCF_001683475.1	NCBI	LOC110729760 (CqOMA1-1)	XP_021765235.1	2.00E-177	2.00E-108	NW_018742987.1
Amaranthus hypochondriacus V2.1 Phytozome AH019489-RA - 4.00E-161 2.00E-145 Scaffold 13 Zea mays GCF 000005005.2 NCBI LOC100279801 NP_001146229.1 1.00E-1613 1.00E-70 NC 024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC100279801 NP_001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC 024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC107280146 XP_015625979.1 2.00E-141 7.00E-80 NC_029257.1 Hordeum vulgare rl Phytozome HORVUGH1G074020* - 3.00E-91 2.60E-71 chr6H Marchantia polymorpha GCF 000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA_00302435.1 NCBI MARPO_0030s002 PTQ42271.1 7.00E-107 K2712702.1				LOC110697159 (CqOMA1-2)	XP_021730195.1	2.00E-177	3.00E-106	NW_018744460.1
Zee mays GCF 00005005.2 NCBI LOC100279801 NP 001146229.1 1.00E-143 1.00E-70 NC 024463.2 Oryza sativa GCF_001433935.1 NCBI LOC4330648 (0sOMA1) XP 015622867.1 5.00E-141 7.00E-80 NC_029257.1 Hordeum vulgare rl Phytozome HORVU6Hr1G074020* - 3.00E-91 2.60E-71 chn6H Amborella trichopoda GCF_000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 02531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA_003032435.1 NCBI MARPO_0030s002 PTQ42271.1 7.00E-107 6.0E-29 KZ772702.1	Amaranthus hypochondriacus	v2.1	Phytozome	AH019489-RA	-	4.00E-161	2.00E-145	Scaffold_13
Oryza sativa GCF_001433955.1 NCBI LOC4330648 (0sOMA1) XP 015622867.1 5.00E-141 7.00E-80 NC_029257.1 Hordeum vulgare r1 Phytozome HORVU6Hr1G074020* - 3.00E-91 2.60E-71 c.hr6H Amborella trichopoda GCF_000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA 003032435.1 NCBI MARPO 0030s002 PTQ42271.1 7.00E-107 LODE-29 KZ772702.1	Zea mays	GCF_000005005.2	NCBI	LOC100279801	NP_001146229.1	1.00E-143	1.00E-70	NC_024463.2
Image: Hordeum vulgare rl Phytozome LOC:107280146 XP 015625979.1 2.00E-19 - Hordeum vulgare rl Phytozome HORVU6Hr10074020* - 3.00E-91 2.60E-71 chr6H Maborella trichopoda GCF 000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA 003032435.1 NCBI MARPO 0030s002 PTQ42271.1 7.00E-113 6.00E-29 KZ772702.1	Oryza sativa	GCF_001433935.1	NCBI	LOC4330648 (OsOMA1)	XP_015622867.1	5.00E-141	7.00E-80	NC_029257.1
Inoraeum vugare ri Phytozone HOK VU6hr100/4020* - 3.00E-91 2.60E-71 chr6H Amborella trichopoda GCF_000471905.2 NCBI HORVU7hr160/1750 - 1.00E-36 3.50E-24 chr7H Amborella trichopoda GCF_000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA_003032435.1 NCBI MARPO_0030s002 PTQ42271.1 7.00E-113 6.00E-29 KZ772702.1	II and annound a sure	-1	Disstances	LOC107280146	XP_015625979.1	2.00E-19	2 (05 7)	-
HOK VU /HT LOU //20 - LOUE-56 3.50E-24 chr/H Amborella trichopoda GCF_000471905.2 NCBI LOC18447851 XP 020531387.1 3.00E-167 1.00E-47 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA_003032435.1 NCBI MARPO_0030s002 PTQ42271.1 7.00E-113 6.00E-29 KZ772702.1	Horaeum vuigare	ri	Pnytozome	HORVU6Hr1G0/4020*	-	3.00E-91	2.60E-/1	chr6H
Amooretia iricnopoaa GCF_0004/1905.2 NCBI LOU:1847/851 XP 020531387.1 S.00E-16/ IOUE-47 NW 006500346.1 Marchantia polymorpha GCA_003032435.1 NCBI MARPO_0030s002 PTQ42271.1 7.00E-113 6.00E-29 KZ772702.1	4	CCE 000471005.0	NCDI	HUK VU/HrIG017/50	- VD 020521207.1	1.00E-36	5.50E-24	cnr/H
тагенанца розтограва ОСА 003052455.1 INCDI INARTO 00308002 P1Q42271.1 (A00E-113 0.00E-29 KZ//2/02.1 макто 00308002 P1Q42271.1 (A00E-113 0.00E-29 KZ//2/02.1	Amborena Irichopoda Marchantia nohmomha	GCA_002022425.1	NCBI	MARRO 0020-002	AP_02053138/.1 PTO/2271.1	5.00E-10/ 7.00E-112	1.00E-4/	K7772202 1
	магспаниа рогутогрна	GCA_005052455.1	NUBI	MARPO_00508002	P1Q422/1.1	/.00E-113 *コード歯におけるいーかい	0.00E-29 スにギャップがち	NL//2/02.1

ATGGCATTTCACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCCAG 50 L0C104888056 EL10 L0C104888056 TA-33BB-0 ATGGCATTTCACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCCAG 50 L0C104888056 KWS2320 ATGGCATTTCACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCCAG 50 ATGGCATTTCACAGAAATTCAAGGTTTCTCTACAATGCTCTAAAACCCCAG 50 L0C104888056 NK-198 L0C104888056_EL10 CTTCAATTCCAAGTTACTTACTAAAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100 L0C104888056 TA-33BB-0 CTTCAATTCCAAGTTACTTACTAAAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100 L0C104888056_KWS2320 CTTCAATTCCAAGTTACTTACTAAAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100 L0C104888056_NK-198 CTTCAATTCCAAGTTACTTACTAAAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100 ******* L0C104888056 EL10 CTTTGTTTTACACTCAATTTAAGTTTTTTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150 L0C104888056_TA-33BB-0 CTTTGTTTTACACTCAATTTAAGTTTTTTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150 CTTTGTTTTACACTCAATTTAAGTATTCTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150 L0C104888056_KWS2320 L0C104888056_NK-198 CTTTGTTTTACACTCAATTTAAGTATTCTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150 ******* ATTTCTTCAAAATGTGGGTACTTCAATAGGTTTAAACATAATCAAAACAG 200 L0C104888056 EL10 L0C104888056_TA-33BB-0 ATTTCTTCAAAATGTGGGTACTTCAATAGGTTTAAACATAATCAAAACAG 200 L0C104888056 KWS2320 ATTTCTTCAAAATGTGGGTACTTCAATGGGTTTAAACATACTCAAAACAG 200 L0C104888056 NK-198 ATTTCTTCAAAATGTGGGTACTTCAATAGGTTTAAACATAATCAAAACAG 200 ***** AATTATTTCTGGTGTTGCTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAAAAAA 250 L0C104888056 EL10 L0C104888056_TA-33BB-0 AATTATTTCTGGTGTTGCTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAAAAAA 250 AATTATTTCTGGTGTTGCTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAGAAAA 250 L0C104888056_KWS2320 AATTATTTCTGGTGTTGCTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAAAAAA 250 L0C104888056 NK-198 ***** L0C104888056_EL10 CTCAGAATTTCTTTGGAAAACAGCTAAAAAAAAAAAAATTCATGGTGGGGG 300 L0C104888056 TA-33BB-0 CTCAGAATTTCTTTGGAAAACAGCTAAAAAAAAAAAAATTCATGGTGGGGG 300 L0C104888056 KWS2320 L0C104888056 NK-198 CTCAGAATTTCTTTGGAAAACAGCTAAAAAAAACTAATTCATGGTGGGGC 300 L0C104888056 EL10 GACGGTATTTTATTTGTGATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350 GACGGTATTTTATTTGTGATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350 L0C104888056_TA-33BB-0 L0C104888056 KWS2320 GACGGTATTTTTTTGTGATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350 L0C104888056 NK-198 GATGGTATTTTGTTTGTGATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350 L0C104888056_EL10 AC-----CCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCGCTAACATC 392 AC----CCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCGCTAACATC 392 L0C104888056_TA-33BB-0 AC-----CCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCACTAACATC 392 L0C104888056 KWS2320 L0C104888056_NK-198 ACACTTGTACCCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCACTAACATC 400 **

付図 5-1 LOC104888056 の第1エキソン部分配列のマルチプルアラインメント

アスタリスクは配列間で共通した塩基を示す。右側に付した数字は開始コドンの第一塩基を +1 としている。フレームシフト変異を赤字で示し終止コドンを太文字及び下線で示した。

BvOMA1-1	MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVQSPIPRFNSNSSSLFYNQFKSSIISS	60
BvOMA1-2_X1	MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVPSPVPRINSNSSSLFYNQFKSSIISGSPSISS	60
BvOMA1-2 X2	MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVPSPVPRINSNSSSLFYNQFKSSIISGSPSISS	60
_	***************************************	
BvOMA1-1	KFGYLNGVKQNQSSLFSCVTRRNYHVDRNQIYHFKPRGFKSWFENPRHIFIAVVIGSGVV	120
BvOMA1-2_X1	KFGYLNGVKQNQSSLFSCVTRRNYHVDTNQIYLF	94
BvOMA1-2_X2	KFGYLNGVKQNQSSLFSCVTRRNYHVDTNQIYLF	94
_	***********************	
BvOMA1-1	ITVYFGNSEVVPYTKRKHLVLLSRTLERRIGDSQFEKMKEEFKGKILPAIHPDSVRVRLI	180
BvOMA1-2_X1	ERRYGEFRFEKRKEDFKGKILPAIHPDSVRVRLI	129
BvOMA1-2_X2	ERRYGEFRFEKRKEDFKGKILPAIHPDSVRVRLI	129
	**** *: :*** **:*********************	
BvOMA1-1	SKDIIESLERGISHERAWSSPGYATESVSHHEIDGHETMKALTEGMDEKVPGDWHKEEEV	240
BvOMA1-2_X1	SKDIIESLGRGISHERAWSTKALTEGMDEKVPRDWHKEEEV	170
BvOMA1-2_X2	SKDIIESLGRGISHERAWSTKALTEGMDEKVPRDWHKEEEV	170
	****** ********************************	
BvOMA1-1	LDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTTNHLEGLNWEVLVVNEPVVNAFCLPGGKIVVFTGLLKHF	300
BvOMA1-2_X1	LDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTTNHLEGLNWEVLVVNEPFVNASYFPGGKIVVFTGLLKHL	230
BvOMA1-2_X2	LDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTTNHLEGLNWEVLVVNEPFVNASYFPGGKIVVFTGLLKHL	230

BvOMA1-1	KSDAELATIIG HEVGH AVARHSAEQITKNMWFAILQLILYQFIAPDFANAMSNLLLRLPF	360
BvOMA1-2_X1	KSDAELATIIG HEVGH AVARHSAERITWIMSFASLQLILLIALDFAYARYLQISS	285
BvOMA1-2_X2	KSDAELATIIG HEVGH AVARHSAERITWIMSFASLQLILLIALDFAYARYLQISS	285

BvOMA1-1	SRKMEIEADYIGLLLMASAGYDPRIAPQVYEKLGKISGESSSLTEYLSTH	410
BvOMA1-2_X1	YVGVLLILSFDRKGEIEADYIGLLLMASAGYDPRIAPQVYEKLGKISGESSSLKEYLSTH	345
BvOMA1-2_X2	YRGNRSRLHWTTNCTSSIASDGFC-WIRPTNCTSSI	313
_	· ** *: * * · · · · · **:	
BvOMA1-1	PSGKKRAQLLARAHIMQEAVDMYREIVAGRAIEGFL 446	
BvOMA1-2_X1	PSGKKRAQLLARAHIMKEAVDIYREIVAGHAIEGFL 381	
BvOMA1-2_X2		

付図 5-2 BvOMA1-1 及び BvOMA1-2 の翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアラインメント アスタリスクは配列間で共通したアミノ酸残基を示す。亜鉛結合モチーフを太文字及び下線 で示した。

KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTKCSGLFGSAKSGYFNG MAFHRNSRFVYNALKPSFNSKLLTKTSSHSNSYSLFYTQFKYSRLHGSPSISSKCGYFNG MAFHRNSRLHGSPSISSKCGYFNG **:***	60 60 24
KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	FKHHQEISSFSGFARRNYHGVKTEVSVEFRVEKLLLGIALIIS-HSGMIAFFYLHPVVVP FKHTQNR-IISGVATIRNS-LEVKKTQKFYGKQLKKTNSWWVDGIFFVMTIYYSISEVVP FKHTQNR-IISGVATIRNS-LEVKKTQKFYGKQLKKTNSWWVDGIFFVMTIYYSISEVVP *** *: :**: *: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::	119 118 82
KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	YTGRKHYVILSTTHENENGEFEKRKIQPATHPDTERVRSIFQHILESLEREINHH FTERKHLVIPLTSLEIKIGESMKKKLYDGKTLHARHPASVRARVVFEHIIVSLDHKLIHE FTERKHLVIPLTSLEIKIGESMKKKLYDGKTLHARHPASVRARVVFEHIIVSLDHKLIHE :* *** ** *: *: ** *:*: *** *:*: ***:*:*:*:*:*:*:	174 178 142
KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	ELELELERDETFKEKTIWKEETDHDKDSRKKHSGAKITTNHEGMNWEIFVVDKPWVES GEVFVVDEPRVFS GNGSKTTTKHLEVFVVDEPRVFS .*:* **:* *:****:*	234 201 165
KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	SCIFGGKIVVYTGLLNHCISDAELATIIA HQVGH AVARHEAEHWTTLLWSILLVIYMTIF FCFPGGMIAVSTGLLNYFHSDSELAAIIG TQVAD AVARPFAEFFPKYMLAMFVISIIN FCFPGGMIAVSTGLLNYFHSDSELAAIIG TQVAD AVARPFAEFFPKYMLAMFVISIIN *: ** *.* *****: **:***: ****** **: ::::::::	294 259 223
KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	QYLFTAPEFANAISKLLSRHPLLQKVWKIIQARFHQLLPRTTLHLGFLGLSSLVFI PSARIVKIIQARACKLRPFTAGLIKSGLNFTGLLLLCFA PSARIVKIIQARACKLRPFTAGLIKSGLNFTGLLLLCFA :: ****** :* * *: *. *. * * *	350 298 262
KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	LYFGRKEIEADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKL PLDCYFRWRKMEADYIGLQLMSSAGYDPRVAPQAYQKLRRPLDCYFRWRKMEADYIGLQLMSSAGYDPRVAPQAYQKLRR	407 338 302
KWS2320-ORF20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	LARADVMKEADKIYNEVVAGRAIQGLQ 434 QTIA 342 QTIA 306 :.:*	

付図 5-3 KWS2320 orf20L 及び LOC104888056 の翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアライン メント

アスタリスクは配列間で共通したアミノ酸残基を示す。亜鉛結合モチーフを太文字及び下線で示 した。

BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	/Exon 1 ATGGCATGGTACAGAAGATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTATAAAAGCTTGAATTCCAAG ATGGCATGGTACAGAAGATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTATAAAAGCTTGAATTCCAAG ATGGCATGGTACAGAAGATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTATAAAAGCTTGAATTCCAAG **********************************	60 60 60
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	TTATTATTGCCTAAAAGTCCAGTTCAATCTCCTATTCCAAGATTTAATTCCAATTCATCT TTATTATTGCCTAAAAGTCCAGTTCCATCTCCTGTTCCAAGAATTAATT	120 120 120
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	TCTTTGTTTTACAATCAATTTAAGTCTTCTATAATTTCTGGGTCACCTTCAATTTCTTCA TCTTTGTTTTACAATCAATTTAAGTCTTCTATAATTTCTGGGTCACCTTCAATTTCTTCA TCTTTGTTTTACAATCAATTTAAGTCTTCTATAATTTCTGGGTCACCTTCAATTTCTTCA *********************	180 180 180
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	AAATTTGGGTATTTGAATGGGGTTAAACAGAATCAAAGTAGCTTGTTTTCTTGTGTTACT AAATTTGGGTATTTGAATGGGGTTAAACAGAATCAAAGTAGCTTGTTTTCTTGTGTTACT AAATTTGGGTATTTGAATGGGGTTAAACAGAATCAAAGTAGCTTGTTTTCTTGTGTTACT **********************************	240 240 240
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	AGGAGAAATTACCATGTTGATAGAAACCAAATTTACCATTTTAAACCAAGAGGTTTTAAA AGGAGAAATTACCATGTCGATACAAACCAAATTTACCTTTTT	300 282 282
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	TCTTGGTTTGAGAATCCTAGACATATATTCATCGCAGTAGTGATTGGTTCTGGTGTTGTG	360
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	ATCACTGTTTATTTTGGCAATTCAGAAGTTGTGCCCTATACAAAAAGGAAACATCTTGTA	420
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	CTTTTGTCAAGAACCCTAGAGAGGAGGAGAATTGGGGGATTCTCAATTTGAGAAGAAGATGAAGGAA CTAGAGAGGAGAGATATGGGGAATTTCGATTTGAGAAGAGGAAGGA	480 327 327
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	GAGTTTAAGGGGAAAATATTGCCTGCAATACACCCTGATAGTGTGAGGGTTAGGTTGATA GATTTTAAGGGGAAAATATTGCCTGCAATACACCCTGATAGTGTGAGGGTTAGGTTGATA GATTTTAAGGGGAAAATATTGCCTGCAATACACCCTGATAGTGTGAGGGTTAGGTTGATA ** *********************************	540 387 387
BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	TCTAAAGACATAATTGAGTCATTAGAAAGAGGGATAAGCCATGAAAGAGCATGGAGTAGT TCTAAAGACATAATTGAGTCATTAGGAAGAGGGATAAGCCATGAAAGAGCATGGAGTA TCTAAAGACATAATTGAGTCATTAGGAAGAGGGATAAGCCATGAAAGAGCATGGAGTA **********************************	600 445 445

付図 5-4 BvOMA1-1 及び BvOMA1-2の CDS のマルチプルアラインメント

(次ページへ続く)

BvOMA1-1	CCTGGATACGCCACCGAAAGCGTTAGCCATCACGAGATCGATGGGCATGAAACTATGAAG	660
BvOMA1-2_X1	CGAAG	450
BvOMA1-2_X2	CGAAG	450

BvOMA1-1	GCATTAACTGAGGGGATGGATGAGAAAGTGCCAGGGGATTGGCATAAGGAGGAGGAGGAGGTT	720
BvOMA1-2_X1	GCATTAACTGAGGGGATGGATGAGAAAGTGCCAAGGGATTGGCATAAGGAGGAGGAGGAGGTT	510
BvOMA1-2_X2	GCATTAACTGAGGGGATGGATGAGAAAGTGCCAAGGGATTGGCATAAGGAGGAGGAGGAGGTT	510

BvOMA1-1	CTTGATGATAAGTGGGTTAAAGATAGTAGGAAGAAGGGGGG	780
BvOMA1-2_X1	CTTGATGATAAGTGGGTTAAAGATAGTAGGAAGAAGGGGGG	570
BvOMA1-2_X2	CTTGATGATAAGTGGGTTAAAGATAGTAGGAAGAAGGGGGG	570

BvOMA1-1	ACTACAAACCATTTGGAGGGATTGAATTGGGAAGTTCTGGTTGTGAACGAAC	840
BvOMA1-2_X1	ACTACAAACCATTTGGAGGGCTTGAATTGGGAAGTTCTGGTTGTGAATGAA	630
BvOMA1-2_X2	ACTACAAACCATTTGGAGGGCTTGAATTGGGAAGTTCTGGTTGTGAATGAA	630

BvOMA1-1	AATGCCTTTTGTTTACCAGGTGGGAAGATTGTTGTTTTCACTGGATTGCTCAAGCATTTC	900
BvOMA1-2_X1	AATGCCTCTTATTTTCCAGGTGGGAAGATTGTTGTTTTCACTGGATTGCTCAAGCATTTA	690
BvOMA1-2_X2	AATGCCTCTTATTTTCCAGGTGGGAAGATTGTTGTTTTCACTGGATTGCTCAAGCATTTA	690
	****** ** *** *************************	
	/Exon 2	
BvOMA1-1	AAATCAGATGCTGAATTGGCTACAATTATTGGACATGAGGTTGGACATGCTGTGGCTCGA	960
BvOMA1-2_X1	AAATCAGATGCTGAATTGGCTACAATTATTGGACATGAGGTTGGACATGCTGTGGCTCGA	750
BvOMA1-2_X2	AAATCAGATGCTGAATTGGCTACAATTATTGGACATGAGGTTGGACATGCTGTGGCTCGA	750

BvOMA1-1	CATTCTGCAGAACAAATTACAAAGAATATGTGGTTTGCAATCTTGCAACTGATCCTTTAT	1020
BvOMA1-2_X1	CATTCTGCAGAACGAATTACATGGATTATGTCGTTTGCAAGCTTGCAACTGATCCTTC	808
BvOMA1-2_X2	CATTCTGCAGAACGAATTACATGGATTATGTCGTTTGCAAGCTTGCAACTGATCCTTC	808
	************* *************************	
BvOMA1-1	CAATTCATCGCGCCTGATTTTGCTAATGCAATGTCAAATCTTCTTTTAAGG	1071
Bv0MA1-2_X1	TCATCGCACTGGATTTTGCTTATGCAAGATATTTACAAATATCTTCATATGTAGGT	864
BvOMA1-2_X2	TCATCGCACTGGATTTTGCTTATGCAAGATATTTACAAATATCTTCATAT	858
	****** * ******** ****** * ****** * ****	
	/ LXUIT 5	1110
$B_{V} \cap M \Delta 1 = 2 X 1$	GTTCTTTTAATTCTTTCTTTTGACCGAAAAGGGGAAATTAGAAGGAGATTACATTGGACTG	02/
$B_V 0 MA1 = 2 X2$		889
	* *****************	000
BvOMA1-1	CTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCACGAATTGCACCTCAAGTATATGAGAAGCTG	1179
BvOMA1-2 X1	CTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCACGAATTGCACCTCAAGTATATGAGAAGCTG	984
BvOMA1-2 X2	CTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCACGAATTGCACCTCAAGTATATGA	942
	***************************************	- 12

付図 5-4 BvOMA1-1 及び BvOMA1-2の CDS のマルチプルアラインメント

(次ページへ続く)

BvOMA1-1 BvOMA1-2_X1 BvOMA1-2_X2	GGTAAGATCTCTGGTGAATCATCGTCGCTGACGGAATATCTCTCAACTCATCCGGGG GGTAAGATCTCTGGTGAATCATCATCGCTGAAGGAATATCTCTCCAACTCATCCAGGG 	1239 1044
Bv0MA1−1 Bv0MA1−2_X1 Bv0MA1−2_X2	AAAAAGCGTGCTCAGTTATTAGCTCGAGCTCATATTATGCAAGAAGCAGTGGATATGTAC AAAAAGCGTGCTCAGTTATTAGCTCGAGCTCATATTATGAAAGAAGCAGTGGATATATAC 	1299 1104
BvOMA1−1 BvOMA1−2_X1 BvOMA1−2_X2	CGTGAAATTGTAGCAGGACGCGCAATTGAAGGTTTTCTG TGA 1341 CGTGAAATTGTAGCAGGACACGCAATTGAAGGTTTTTTG TGA 1146	

付図 5-4 BvOMA1-1 及び BvOMA1-2の CDS のマルチプルアラインメント

アスタリスクは配列間で共通した塩基を示す。右側に付した数字は開始コドンの第一塩基を +1 としている。終止コドンを太文字及び下線で示した。

KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAAACTCAACTTGCGTTCC ATGGCATTTCACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCCAGCTTCAATTCC ATGGCATTTCACAGAAATTCAAGGTT	60 60 26
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC AAGTTACTTACTAAAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATTCTTTGTTTTAC 	120 111
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	AATCAATCTACTAAGTGTAGTGGGT-TATTTGGGT-CTGCAAAATCTGGGTAT ACTCAATTTAAGTATTCTAGGTTACATGGGTCTCCTTCAATTTCTTCAAAATGTGGGTAC ACATGGGTCTCCTTCAATTTCTTCAAAATGTGGGTAC ***** * ** * ** **	171 171 63
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	TTTAATGGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGA TTCAATGGGTTTAAACATACTCAAAACAGAATTATTTCTGGTGTTGCTACTATCAGA TTCAATGGGTTTAAACATACTCAAAACAGAATTATTTCTGGTGTTGCTACTATCAGA ** *********************************	228 228 120
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	AACTATCATGGTGTTAAAACCGAAGTAAGTGT-TGAATTTCGGGTGGAAAAA-TTACT AATTCTCTTGAAGTTAAGAAAACTCAGAAATTCTATGGAAAACAGCTAAAAAAAA	284 288 180
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	TCTTGGAATTGCACTAATAATCTCGCATTCTGGTATGATTGCTTTCTTT	343 340 232
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	CAGTAGTTGTGCCATATACAGGAAGGAAGCATTATGTGATTTTGTCAACAACTCATGAGA CAGAAGTTGTACCCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCACTAACATCTCTTGAGA CAGAAGTTGTACCCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCACTAACATCTCTTGAGA *** ***** ** * ***** **************	403 400 292
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	ATGAAAATGGAGAATTTGAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACAC TAAAAATTGGGGAATCTATGAAGAAGAAGAAATTGTATGATGGGAAAACATTGCATGCTAGAC TAAAAATTGGGGAATCTATGAAGAAGAAATTGTATGATGGGAAAACATTGCATGCTAGAC *** *** **** * **** * ****	448 460 352
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	ACCCTGATACTGAGAGGGGTTAGGTCTATATTCCAACACATTCTTGAATCACTGGAAAGAG ACCCTGCTAGTGTGAGGGCTAGAGTAGTAGTATTTGAACACATCATTGTCTCTCT ACCCTGCTAGTGTGAGGGCTAGAGTAGTAGTATTTGAACACATCATTGTCTCTCT	508 512 404
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	AGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAACTCGAACTCGAAAGAGAGATGAAACTTTCAAGG TGATCACAAGCTCATACATGAAGGGAATG TGATCACAAGCTCATACATGAAGGGAATG * ***** * *** ** ***	568 541 433
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	AGAAAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGATCATGATAAAGATAGTAGGAAGAAGCATAGTG GATCGATCGATC	628 545 437

付図 5-5 KWS2320 orf20L 及び LOC104888056 の CDS のマルチプルアラインメント

(次ページへ続く)
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	GGGCTAAGATAACTACTACCATGAAGGGATGAATTGGGAAATTTTCGTTGTCGATAAAC TAAGACAACTACTAAGCATTTGGAAGTTTTCGTTGTCGACGAAC TAAGACAACTACTAAGCATTTGGAAGTTTTCGTTGTCGACGAAC ***** ********* *** * ***	688 589 481
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	CGTGGGTTGAGTCCAGTTGTATATTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACTGGATTGCTCA CTCGGGTTTTTTCCTTTTGTTTTCCAGGTGGAATGATTGCTGTTTCTACTGGGTTGCTCA CTCGGGTTTTTTCCTTTTGTTTTCCAGGTGGAATGATTGCTGTTTCTACTGGGTTGCTCA * ***** *** *** * ****	748 649 541
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	ACCATTGCATCTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTTGGGCATGCTG ACTATTTCCATTCAGATTCTGAATTGGCTGCAATTATTGGGACTCAGGTTGCGGATGCTG ACTATTTCCATTCAGATTCTGAATTGGCTGCAATTATTGGGACTCAGGTTGCGGATGCTG ** *** * ** ** *** ********* ******* * *	808 709 601
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	TGGCTCGACATGAGGCAGAGCATTGGACAACATTGTTGTGGTCGATACTGTTAGTGATAT TGGCTCGGCCTTTTGCAGAATTCTTTCCAAAGTATA-TGTTGGCTATGT TGGCTCGGCCTTTTGCAGAATTCTTTCCAAAGTATA-TGTTGGCTATGT ******* * * ***** * *** *	868 757 649
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	ACATGACAATATTTCAAT-ATCTATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAATATCAAAA TTGTCATTTCGATTATCAATCC-CAGTGCCAGAATTGTGAAGA TTGTCATTTCGATTATCAATCC-CAGTGCCAGAATTGTGAAGA * ***** ** ** ** * * * ** ***	927 799 691
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	CTACTCTCAAGGCATCCTCTCTTGCAAAAGGTTTGGAAGATTATTCAG-GCTAGATTTCA TTATTCAGGCTAGAGCTTGTAAACTACGGCCATTCACCGCTGG-CTTGA TTATTCAGGCTAGAGCTTGTAAACTACGGCCATTCACCGCTGG-CTTGA ** ** ****	986 847 739
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	TCAATTACTGCCACGAACTACCTTGCACTTGGGCTTTCTTGGATTGTCTTCCTTGGTGTT TCAAAT-CTGGACTGAATTTTACCGGGCTTCTTCTG-CTGTGTTTTGCACCATT TCAAAT-CTGGACTGAATTTTACCGGGCTTCTTCTG-CTGTGTTTTGCACCATT **** * *** *** *** * ** * ***** * * ****	1046 899 791
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	TATTCTTTATTTTGGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGCTTCTGATGGC GGATTGTTATTTTCGTTGGAGGAAGATGGAAGCAGATTACATTGGCCTACAGTTGATGTC GGATTGTTATTTTCGTTGGAGGAAGATGGAAGCAGATTACATTGGCCTACAGTTGATGTC * ****** ** *** * * ***********	1106 959 851
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	TTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACT TTCTGCTGGATACGACCCACGAGTTGCACCTCAAGCATATCAGAAGCTGAGAAGGC TTCTGCTGGATACGACCCACGAGTTGCACCTCAAGCATATCAGAAGCTGAGAAGGC *******************************	1166 1015 907
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	GGGCGACTGGAACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGC AAACTATAGCT <u>TAG</u> - AAACTATAGCT <u>TAG</u> - **** * ***	1226 1029 921
KWS2320-orf20L LOC104888056_X1 LOC104888056_X2	TCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGC	1286

付図 5-5 KWS2320 orf20L 及び LOC104888056 の CDS のマルチプルアラインメント

 KWS2320-orf20L
 AATTCAAGGTCTTCAGTAA
 1305

 LOC104888056_X1

 LOC104888056_X2

付図 5-5 KWS2320 orf20L 及び LOC104888056 の CDS のマルチプルアラインメント

アスタリスクは配列間で共通した塩基を示す。右側に付した数字は開始コドンの第一塩基を+1 としている。終止コドンを太文字及び下線で示した。

付表5-3 BrOMAI-I (A)およびの720 株遺伝子(B)周辺領域の遺伝子 (A)

carboxylestenase 1-like uncharacterized protein
carboxylesterase 1-like uncharacterized protein
uncharacterized protein
,
racterized mitochondrial protein A
transcription factor bHLH120
transcription factor bHLH120
transcription factor bHLH118
keratin, type I cytoskeletal 9-1
or-like serine/threonine-protein kina
dycosyltransferase family 64 prote
subtilisin-like protease SBT
sopeptide repeat-containing prote
3-ketoacyl-CoA synthase 5
alpha-L-fucosidase 1-li
uncharacterized protei
racterized mitochondrial proteii
uncharacterized prote
disease resistance protein R
EAD-box ATP-dependent R1
xyloglucan galactosyltransfe
uncharacterized prote
uncharacterized prote
SH iron-sulfur domain-containi
UPF0051 protein ABCI8, ch
K(+) efflux antiporte
and histidine-rich domain-cont
box C/D snoRNA proteii
otein transport protein Sec24-li
protein TPX2-like
a and nobiodanylation enooff

(B)							
	Beta vulgaris		Spinacia oleracea			Arabidopsis thaliana	
Gene ID	Description	Gene ID	Description	E-value	Locus tag	Description	E value
LOC104888048	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g42310, mitochondrial-like isoform X1	LOC110798202	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g42310, mitochondrial-like	0	AT5G36300	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily	5E-84
LOC104888049	60S ribosomal protein L13-1	LOC110798181	60S ribosomal protein L13-1-like	8E-46	AT5G23900	Ribosomal protein L13e family protein	2E-50
LOC104888050	vegetative cell wall protein gp1-like	LOC110798172	cell surface glycoprotein 1-like	1E-92	No hit	•	
LOC104888051	mitochondrial metalloendopeptidase OMA1 (KWS2320 orf20L)	LOC110782423	uncharacterized protein	3E-30	AT5G51740	Peptidase family M48 family protein	1E-28
LOC104888089	UPF0481 protein At3g47200-like	LOC110798143	UPF0481 protein At3g47200-like isoform X1	4E-162	AT2G36430	transmembrane protein, putative (DUF247)	4E-62
LOC104888090	•			,		•	,
LOC104888053	protein KRI1 homolog	LOC110790508	protein kril	5E-151	AT3G24080	KRR1 family protein	6E-56
LOC10488054	probable disease resistance protein RF45	LOC110798107	putative disease resistance protein Atl g50180 isoform X2	0	AT3G46730	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	8E-85
LOC104888055	uncharacterized protein	LOC110798107	putative disease resistance protein Atl g50180 isoform X2	0	AT3G46710	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	6E-90
LOC104888056	mitochondrial metalloendopeptidase OMA1 isoform X1	LOC110782423	uncharacterized protein	2E-18	AT5G51740	Peptidase family M48 family protein	2E-15
LOC104888057	probable disease resistance protein RF45 isoform X1	LOC110798107	putative disease resistance protein Atlg50180 isoform X2	0	AT5G35450	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family	2E-89
LOC104888058	uncharacterized protein	LOC110798089	probable zinc transporter protein DDB_G0282067	0	AT2G04620	zinc transporter-like protein	7E-134
1 0010469050	[ecDNA				,		

上記CO-1996年の1月の1月回源域の遺伝子のD1番号とアノテーション研究を示す。これらの各遺伝子をホウレンソウ及びシロイスナメナのゲノム情報に対して相同性検索し、最も高い類似性を示した遺伝子のD1番号(あるいはLouis tag)とE-value(blastp)を中央および右側に示す。テンサイのMAI相同遺伝子を太字で示す。 配置が保存されたいた遺伝子を赤(三種間)あるいはピング(テンサイーホウレンング閉)で塗りつぶした。BOMAI-1 との70稼遺伝子の同辺領域において共通して存在する遺伝子を勝縁な示した。



付図5-6 近隣結合法によって予測された被子植物OMA1相同遺伝子の系統樹

*OMA1*相同遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列を基に近隣結合法によって推測された系統関係を示す。ゼニゴケMpOMA1を外群とした。各ノードに付した数字はブートストラップ値(1000反復)であるが、50%未満は省略した。スケールバーは進化距離を示す。



付図5-7 最尤法による被子植物OMA1相同遺伝子の分子系統樹

*OMA1*相同遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列を基に最尤法によって推測された系統関係を示す。 ゼニゴケMpOMA1を外群とした。各ノードに付した数字はブートストラップ値(1000反復)である が、50%未満は省略した。スケールバーは進化距離を示す。

付表5-4 マイクロアレイデータにおけるAtOMA1のmRNA量

Group #	Tissue	Expression Level	Standard Deviation	Samples
1	Dry seed	902.62	13.8	RIKEN-NAKABAYASHI1A, RIKEN-NAKABAYASHI1B,
1	Imbibed seed, 24 h	151.44	23.36	RIKEN-NAKABAYASHI2A, RIKEN-NAKABAYASHI2B,
1	1st Node	111.06	6.18	ATGE_28_A2,ATGE_28_B2,ATGE_28_C2,
1	Flower Stage 12, Stamens	246.36	13.2	ATGE_36_A,ATGE_36_B,ATGE_36_C,
1	Cauline Leaf	100.0	11.49	ATGE_26_A,ATGE_26_B,ATGE_26_C,
1	Cotyledon	91.34	7.08	ATGE_1_A,ATGE_1_B,ATGE_1_C,
1	Root	113.56	5.59	ATGE_9_A,ATGE_9_B,ATGE_9_C,
1	Entire Rosette After Transition to Flowering	87.36	14.53	ATGE_23_A,ATGE_23_B,ATGE_23_C,
1	Flower Stage 9	106.01	3.92	ATGE_31_A2,ATGE_31_B2,ATGE_31_C2,
1	Flower Stage 10/11	91.8	3.57	ATGE_32_A2,ATGE_32_B2,ATGE_32_C2,
1	Flower Stage 12	101.31	2.01	ATGE_33_A,ATGE_33_B,ATGE_33_C,
1	Flower Stage 15	118.28	7.1	ATGE_39_A,ATGE_39_B,ATGE_39_C,
1	Flower Stage 12, Carpels	101.7	8.79	ATGE_37_A,ATGE_37_B,ATGE_37_C,
1	Flower Stage 12, Petals	121.35	4.1	ATGE_35_A,ATGE_35_B,ATGE_35_C,
1	Flower Stage 12, Sepals	108.81	6.73	ATGE_34_A,ATGE_34_B,ATGE_34_C,
1	Flower Stage 15, Carpels	107.38	11.47	ATGE_45_A,ATGE_45_B,ATGE_45_C,
1	Flower Stage 15, Petals	163.65	10.44	ATGE_42_B,ATGE_42_C,ATGE_42_D,
1	Flower Stage 15, Sepals	179.75	6.69	ATGE_41_A,ATGE_41_B,ATGE_41_C,
1	Flower Stage 15, Stamen	165.23	12.22	ATGE_43_A,ATGE_43_B,ATGE_43_C,
1	Flowers Stage 15, Pedicels	89.0	4.56	ATGE_40_A,ATGE_40_B,ATGE_40_C,
1	Leaf1+2	63.86	3.71	ATGE_5_A,ATGE_5_B,ATGE_5_C,
1	Leaf 7, Petiole	87.3	7.09	ATGE_19_A,ATGE_19_B,ATGE_19_C,
1	Leaf 7, Distal Half	82.26	12.98	ATGE_21_A,ATGE_21_B,ATGE_21_C,
1	Leaf 7, Proximal Half	86.53	2.96	ATGE_20_A,ATGE_20_B,ATGE_20_C,
1	Hypocotyl	103.88	6.71	ATGE_2_A,ATGE_2_B,ATGE_2_C,
1	Root	95.66	11.25	ATGE_3_A,ATGE_3_B,ATGE_3_C,
1	Rosette Leaf 2	81.55	12.53	ATGE_12_A,ATGE_12_B,ATGE_12_C,
1	Rosette Leaf 4	102.38	7.38	ATGE_13_A,ATGE_13_B,ATGE_13_C,
1	Rosette Leaf 6	91.05	11.46	ATGE_14_A,ATGE_14_B,ATGE_14_C,
1	Rosette Leaf 8	83.8	9.54	ATGE_15_A,ATGE_15_B,ATGE_15_C,
1	Rosette Leaf 10	74.25	0.33	ATGE_18_A,ATGE_18_B,ATGE_18_C,
1	Rosette Leaf 12	62.31	4.89	ATGE_17_A,ATGE_17_B,ATGE_17_C,
1	Senescing Leaf	137.46	3.15	ATGE_25_A,ATGE_25_B,ATGE_25_C,
1	Shoot Apex, Inflorescence	96.78	3.68	ATGE_29_A2,ATGE_29_B2,ATGE_29_C2,
1	Shoot Apex, Transition	87.86	5.74	ATGE_8_A,ATGE_8_B,ATGE_8_C,
1	Shoot Apex, Vegetative	83.73	4.68	ATGE_6_A,ATGE_6_B,ATGE_6_C,
1	Stem, 2nd Internode	117.09	7.22	ATGE_27_A,ATGE_27_B,ATGE_27_C,
1	Mature Pollen	307.46	26.49	ATGE_73_A,ATGE_73_B,ATGE_73_C,
1	Seeds Stage 3 w/ Siliques	92.56	4.77	ATGE_76_A,ATGE_76_B,ATGE_76_C,
1	Seeds Stage 4 w/ Siliques	137.26	9.48	ATGE_77_D,ATGE_77_E,ATGE_77_F,
1	Seeds Stage 5 w/ Siliques	138.51	7.31	ATGE_78_D,ATGE_78_E,ATGE_78_F,
1	Seeds Stage 6 w/o Siliques	153.73	1.99	ATGE_79_A,ATGE_79_B,ATGE_79_C,
1	Seeds Stage 7 w/o Siliques	232.7	1.21	ATGE_81_A,ATGE_81_B,ATGE_81_C,
1	Seeds Stage 8 w/o Siliques	588.08	3.33	ATGE_82_A,ATGE_82_B,ATGE_82_C,
1	Seeds Stage 9 w/o Siliques	577.66	10.86	ATGE_83_A,ATGE_83_B,ATGE_83_C,
1	Seeds Stage 10 w/o Siliques	663.98	26.77	ATGE_84_A,ATGE_84_B,ATGE_84_D,
1	Vegetative Rosette	68.76	11.91	ATGE_89_A,ATGE_89_B,ATGE_89_C,

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	-GAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATATCAACAAGAAAATCACATTGT194 ACATAATACAAATAAACAATAAAGTAAT-AGACATTAATACAAGTATAATATTATATA -194 * * * * ***** * * ** ** * * * ** * * * *	5 4
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	-TCATAGGAAAACTCCTAT-AACATTTGCATACATTGT-AGGTCTTTGTTGC -189 ATCATTGTGGTACTTTAATTAAAATTCTAATAATAACATAATCAACTAATAGTGATATGA -188 **** * *** ** ** *** *** *** *** ***	6 4
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ACTT-TAATCCCTCGGGCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTTAATCTACGTTTTTT -183 AATTATGAATAACAAAATAATGGACAATAATAC-AAATGTATATTAAACATTGACTATTT -182 * ** * * * * ** ** ** **** ** ***** * *	7 5
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CTATTGCAACAATTACTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTTCACT -178 GGACCTTATTGGACCTTATTAGACCTGATTGAAACTTATTG-GACCTTATTAGA -177 ***** * * *** ** *** ** * * * * * * *	2
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTTGGTATAAAAAGCAATATTTCAGAACAAAGCAGCATTGTGCACCCGAGAGA -172 CCTGAT-TGGAACTTATTGCACCTGATTGAAACT-TATTGCACCTGGAACTTATTGGA -171 ** * * ** ** * * ** ** ** *** **** *	9 6
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ACATACCAT-TCATATAGAAGAATATGATTTTTTTTCAACAACTTTTCAAGA -167 CCTTATTAGACCTTATTGGAAGTTATTGCCCTTATTAGACCTTATTACAACTTATCTGAA -165 * ** * * *** * *** ** ** ** ** ** *** **	8 6
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TAAAAAAAGCATACAATATAAAATTAAAGAACATGTAAATCTCCAAC -163CTTATTGGACCTGAAACTTAATTTTTTTAAGTTGAGCAGAACGCACCCTAAATCTCCAAT -159**<	1 6
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AACATTTGAAAAAACCTAAAAAAAAAGCATCTATTGTAAATGAACATTTAGTCT -157 TATAAAATAACATAGGTCGGAATAAAAAGAAAGTATTGTAAATGAACATTTAGTCT -154 * * *** *** ** ** ** ** *******	7 0
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AAATTTAAAGAACCTAACTTTTAAATGTAAAAATTTGAAAAAAGGAATCTCGCCAACAAC -151 AAATTTAAAGAACCTAACTTTTAAATGTAAATTTAAAAAAGGAATCTCGCCAACAAC -148 ************************************	7 3
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CATTTTTCCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAACATTTTT -145 CATTTTTCCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAACATTTTT -142 ************************************	7 3
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CTTAAATCATAAATTCTTAAAATATTAAACCTACATCGTTTAACAGAAGGTGCACCATCC -139 CTTAAATCATAAATTCTTAAAATATTAAACCTACATCGTTTAACAGAGGGGGGCACCATCC -136 ************************************	7 3
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCCTATTTGCGCTTTTCCATTCCCTAAAAAACCGAGT -133 TTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCCTATTTGCGCTTTTTCATTCCCTAAAAAACCGAGT -130 ************************************	7 3
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGTAGTCCTCTCAAAAAAAA	8 3

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AATTACGCCCTAAATTTTTCTGGTAACGCCCTAAATACGGTATTTTCATACCGTATTTAT AATTACGCCCTAAATTTTTCTGGTAACGCCCTAAATACGGTATTTTCATACCGTATTTAT *******************************	-1218 -1183
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ATACCTGCATTTCTTTCCTCTCTTTTCCCCTTCACTCACT	-1158 -1124
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CATAACTGCCACCAATTTCTCTCTCCCCCACCACCACCACCACCACCA	-1098 -1096
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ATATTCTTCTCCAATTTCACACTTCTGACTCTTATGTCTTCTAACAACATTGTGCCGGCA ATATTCTTCTCCCAATTTCACACTTTTGACTCCTATGTCTTCTAACAACATTGTGTCGGCA **********************************	-1038 -1036
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CCACCACCGACGTACCCCCGACACCCCACCATCGTCGTATCCCGGCCACCACCGCCG CCACCACCGACGTACCCCCGACACCCCCACCATCGTCGTATCCCGGCCACCACCGCCG **********************	-978 -976
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TACCCCCGACACCACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCCGTTTTCTTATTTTCTGAA TACCCCCGACACACCACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCCGTTTTCTTTATTTTCTGA- ************************************	-918 -917
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTTTTTTTTAAAAAAAGGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCACCACTGGTGGAGGCG -TTTTTTTTAAAAAAAGGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCATCACTGGTGGAGGCG ******** **************************	-858 -858
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TCCATG-CAGGCGCCTCACCATGTGGTGAAGCGCCTGCCATAGACGCCTCCCCTTTTTT TCCATGGCAGGCGCCTCACCATGTGGTGAAGCGCCTGCCATAGACGCCTCCCCTTTTTT ***** ********************	-799 -798
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TAAAAAAATTTCAAATTACTGTTAATGAAGAAACATAGAAGAGGAGGGTGGGT	-739 -738
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GGTTGTGGTGCGGTGGCAGTGTGTCGGTGGTGCGGCGCAGTACTGGTGCGACGGCGACTG GGTTGTGGTGCGGTGGCAGTGTGTCGGTGGTGCGGCGCAGTATTGGTGCGACGGCGACTG ************************************	-679 -678
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GTGCGGCGGTGGTGGTGCAATGGTCCCCAATGGTAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGT GTGCGGCGGTGGTGGTGCAACGGTCCCCAATGGTAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGT **********	-619 -618
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GAATGTAGAAGGTGGAAAATCTGAAAATGGAAAAATACGTATATTATACGTATTTAGGGC GAATGTAGAAGGTGGAAAATATGAAAATGGAAAAATACGTATATTATACGTATTTAGGGC ****************	-559 -558
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GTTAGTAAGATATTCTAGGGCGTCGTTTAGCAAATGAGAAAAGATAATACACTCTAGTTG GTTAGTAAGATATTCTAGGGCGTCGTTTAGCAAATGAGAAAAAATAATACACTCTAGCTG ***********************************	-499 -498

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TCGTAGACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGG TCGTAGACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGG *********************************	-439 -438
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GTAGAAATATTTTGTTCCATTTATTAAATGAGAAAATTTCATCCCCTGATCCCAATTATC GTAGAAATATTTTGTTCCATTTATTAAATGAGAAAATTTCATCCCCCTGATCCCAATTATC ***************************	-379 -378
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AAATCAACATCTAAAAATTTAAAATGAGTAGGTACGTAACGAAAAACGAATGACTCTCGA AAATCAACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAAACGAATGACTCTCGA ************************************	-319 -318
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TAATAGTACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTGCATAGTTTGTTGCGTAGTGCATA TAATAGTACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTGCATAGTTTGTTGCGTAGTGCATA ***********************************	-259 -258
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GCTGGCTGCAAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACTTTTGCACTTTCGGAATTCAGCAG GCTGGCTGCAAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACTTTTGCACTTTCGGAATTCAGCAG *********************************	-199 -198
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GAATATCATAACCATTTATGGAAGCAACAACTCTTGTGACCCATTTCATCTAAAACCCTT GAATATCATAGCCATTTATGGAAGCAACAACTCTTGTGACCCATTTCATCTAAAACCCTT ********* ************************	-139 -138
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AATCTCATAAATTTTACATTTCAGAATTCAAAAATCACGTAATTTTTTTT	-79 -79
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TACTTGAACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCAGC TACTTGAACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCACC *********************************	-19 -19
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTTTGTTGTTCAAAAATC -1 TTTTGTTGTTCAAAAATC -1 **********	
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	/ Exon 1 ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC *****************************	60 60
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC **********************	120 120
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AATCAATCTACTAATAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAAT AATCAATCTACTAATAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAAT **************************	180 180
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT GGCTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTATGCAAGGAGAAATTATCAT ** **********************	240 240
付図 5-8 orf20 _{NK-1}	198及び orf20 _{NK-305-1} の塩基配列のアラインメント(次ページへ続く)

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTTGAATCATGGCTGGAAAAATTCCTTGTTCCAATTGGA GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTTGAATCATGGCTGGAAAAATTCCTTGTTCCAATTGGA ********************************	300 300
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CTAATCTTGACTTTTGGTATACTTGGTTACCCTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT CTAATCTTGACTTTTGGTATACTTGGTTACCCTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT *********************************	360 360
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATGTCAACAACTCGTGAGAATGAAATTGGAGAAGTT ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATGTCAACAACTCGTGAGAATGAAATTGGAGAAGTT ****************	420 420
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTC GAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTC ******************************	480 480
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CAACACATTCTTGAATCACTGGAAAGAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAAAGA CAACACATTCTTGAATCACTGGAAAGAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAAAGA ********************************	540 540
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GATGAAACTTTCAAGGAGAAAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAAGATAGT GATGAAACTTTCAAGGAGAAAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAAGATAGT ********************	600 600
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AGGAAGAAGCATAGTGGGGGCTAAGATAACTACTACCATTTGGAAGGGATGAATTGGGAA AGGAAGAAGCATAGTGGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTTGGAAGGGATGAATTGGGAA ****************	660 660
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTATTTAT	720 720
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCG GTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCG **********************************	780 780
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	/ Intron 1 CATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTTAATA CATCAGGTATATAAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTTAATA ***************************	840 840
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GAACTATACAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATG GAACTATACAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATG **********************************	900 900
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	/ Exon 2 TCAATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGG TCAATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCCCGACATGAGGCAGAGG *****************************	960 960
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ATTCGACAGCATTTTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTATTTAAAATTCTAT ATTCGACAGCATTTTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTATTTAAAATTCTAT ********************	1020 1020

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTACTGAGCCTGAATCTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTTAAGGCATCCTCTTGC TTACTGAGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTTGC ******************************	1080 1080
orf20 NK-198		11/0
orf20 NK-305-1		1140
01120_MX 000 1	*****	1140
orf20_NK-198	TACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTACA	1200
orf20_NK-305-1	TACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTACA	1200

orf20_NK-198	TGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCATTTAGATATCCATTTGAGA	1260
orf20_NK-305-1	TGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCATTTAGATATCCATTTGAGA	1260
orf20_NK-198		1320
ort20_NK-305-1	GGAAGIIAAAIIIGIAIGAAGIIGIGGAAIGGAAAGIAAAIAGAAGIAAAIAGAAGIAAAIAGAGAGIG	1320
500 NW 100		1000
ort20_NK-198		1380
0r120_NK-305-1		1380
orf20_NK-198	TATATTCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAAATTTATGTTGTTTATGCAC	1440
orf20_NK-305-1	TATATTCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAAATTTATGTTGTTTATGCAC	1440

orf20 NK-198	ATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATAT	1500
orf20_NK-305-1	ATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATAT	1500

		1500
or120_NK=198		1560
01120_00 1	***************************************	1500
orf20 NK-108	ACTATCT&CTT&TCCCTT&TT&TT&TT&TTATTATT&TT&TT&TT&TT&TT&TT&T	1620
orf20_NK-305-1	ACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGATTGTTTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATTGGTCGG	1620

orf20 NK-198		1680
orf20 NK-305-1	AAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCCG	1680
_	*************************	
orf20 NK-198	CGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGAACTGTTTA	1740
orf20 NK-305-1	CGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGAACTGTTTA	1740

orf20 NK-198	GCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGGAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAG	1800
orf20 NK-305-1	GCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAG	1800

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTCAAGGTCTTCAG <u>TAA</u> GAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTCAAGGTCTTCAG <u>TAA</u> ***********************************	1860 1860
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTGTGGTAATCA CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTATGGTAATCA *********************************	1920 1920
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AAATTAAACAGCTCATCGATCATTATATTGTCGTTATATTTCATCTGTTTGACAAAGTTT AAATTAAACAGCTCATGGATCATTATATTGTCGTTATATTTCGTCTGTTTGACAAAGTTT ********************************	1980 1980
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AGAGGTTAATTTGAGTTGAGAACTTGCTATTAGTATGTTATCCACTTGTTAATTCAATCT AGAGGTTAATTTGAGTTGAAAACTTGCTATTAGT-TGTTATCCACTTGTTAATTCAATCT ********************	2040 2039
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AATTTGGTTCCTATGTTAATCACTGCTCTTTTTCTCCTTCAAGAGATCCTCTCTATCTTT AATTTGGTTCCTATGTTAATCACTGCTCTTTTTCTCCCTTCAAGAGATCCTCTCTATCTTT ************************	2100 2099
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTCTTTTTTAAGCAGTAGTAGTAGATAGCAGAGTAGTGGAGATGAGTTTCTCTTTTAGG TTCTTTTTTAAGCAGTAGTAGTAGATAGCAGAGTAGTAGAGATGAGTTTCTCTTTTAGG ********************************	2160 2159
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TAGATATTAGTATAAACCGGGAAAGGGTCACTCAAAATACAAATTAAATGTTTTCAAAAC TAGATATTAGTATAAACCGGGGAAGGGTCACTCAAAATACAAATTAAATGTTTTCAAAAC *****************************	2220 2219
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CATCCGTTTTCCTCTTTGCCTCCCTAGCTAAACTATCCGCAAGGCTATTTGCTCCTCTTC CATCCGTTTTCCCCTTTGCCTCCCTAGCTAAACTATCCGCAAGGCTATTTGCTCCTCTTC *********** ******************	2280 2279
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CTTCGTGAGTTAGTCTAACGCCTTCTTGATCTTGGAGCAACTCCCTGCAAGGATCAATCA	2340 2338
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AATGAGAGAGGTAATCTTTTAAAGTATTTGAATTAATAGTTGAGAGTTGAGAGTTGTT	2400 2398
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	CCCTCAATCCAGGACCCAAGGTACCCAAATGATCATGGCATACCATACCCAAGCAAG	2460 2458
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ATTAGTATCCAAGAAGAAGAAGATGCATCAGTGTTAATTTTTAGGTGGTTTAGCGGTGGAGG ATTAGTATCCAAGAAGAAGAAGATGCATCAGCGTTAATTTTTAGGTGGTTTAGCGGTGGAGG *******************************	2520 2518
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AATCCAAGCTGAGGGAACAACGGGATTGGGAGCTTTACCTACC	2580 2578
付図 5-8 orf20 _{NK-1}	₁₉₈ 及び orf20 _{NK-305-1} の塩基配列のアラインメント(次ページへ続く)	

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AAAGAACCATTCTGTGACGGTCCAAATGGAATTTTTATAAGGACATCTGATGGTATATTT AAAGAATCATTCTGTGACGGTCCAAATGGAATTTTTATAAGGACATCTGATGGTATATTT ****** *************************	2640 2638
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTCTTTTTGAAAAAGATGTTTTGTCCACATTTTGATCTCTTGATGGGTCTGTAACTAAAT TTCTTTTTGAAAAAGATGTTTTGTCCACATTTTGATCTCTTGATGGGTCTGTAACTAAAT ******************************	2700 2698
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AATAAACCAAATCAGAAATCTGCCGTTAGAATCTTTCTTCTAAGAACACTTTCACGTGAT AATAAGCCAAATCAGAAATATGCTGTTAGAATCTTTCTTCTAAGAACACTTTCACGTGAT ***** ************* *** *************	2760 2758
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TCAAGTTTCTATATTGATTTTAGTGTTTTAGACAAACATAACCTTGAATTTTCAAAAAGT TCAAGTTTCTATATTGATTTTAGTGTTTTTAGACAAACATAACCTTGAGTTTTTAAAAAGT **********************	2820 2818
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTTTATAAAAAAAAAATCACCTTATATAGACACTATTATTCTAATTGAAAAAACTA TTTTTATAAAAAAAAAA	2875 2878
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTAGTAAATTAAAAATTTCAGGGCCTATTTGGTATCACTCCCAATTTAACTAAC	2935 2937
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AGGCGTTTGATACTTCTATCCTTGAAATAATGTTAGTAATTTAGAGTCGAAATTATACCA AGGCGTTTGGTACTTCTATCCTTGAAATAATGTTAGTAATTTAGAGTCGAAATTATACCA ******** **************************	2995 2997
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TTTCAAAGTCAGCTTCTTCCTTAATTCTATATGACATTAGACCACCACCATATGAAAAATTTG TTTCAAAGTCAGCTTCTTCCTTAATTCTATATGACATTAGACCACCATATGATAAATTTG *************************	3055 3057
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GCAATAATTTGGCAATATATAGCACTATGTTCTTTGAATCTTAGCTGTAGTGGTGCAATA GCAATAATTTGGCAATATATAGCACTATGTTCTTTGAATCTTTGCTGTAGTGGTGCAATA **********************************	3115 3117
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	ATAACTAATCTTGCACCTCCTTTAAGACTAAGAAGTCAAATACCTTGCTTG	3175 3177
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TAGATAACAATCGTATCATATTAGTTGGTAATACGATGATATCTCTTTATTATAAATAGC GAAATAAAAATCATATCAT	3235 3237
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TAGTTTTGAGGTTCAAAACTTTCATCAATTATCTCTAATAATTAAT	3295 3294
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TA-TGGAGAGAGCTTCAGTTAAGTTAGCTTTTCTAGTTGTCCTCGTAGCTTCTGCATCAT TAATGGAGAGAGCTTCAGTTAAGTTA	3354 3354

orf20_NK-198 GTAAGTGTCTCTGATAATCTCCAAAATTATCTTTGTATTAGCAAAATTATTTTCTACTGT 3414 orf20_NK-305-1 GTAAGTGTCTCTGATAATCTCCAAAATTATCTTTGTATTGGCAAAATTATATTCTACTGT 3414

付図 5-8 orf20_{NK-198}と orf20_{NK-305-1}の塩基配列のアラインメント

*orf20_{NK-198}と orf20_{NK-305-1}*の上流域 1.5 kbp とコード域、下流域 3.5 kbp の塩基配列のアラインメントを示す。右側の番号は各 ORF の開始コドンの第一塩基を+1 として付した。アスタリスクは両者で共通した塩基を示す。

orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN ************************************	60 60
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFGILGYPHVHPVVVPY GFKHHQEISSFSGYARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFGILGYPHVHPVVVPY *********************************	120 120
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	TGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELER TGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELER *********************************	180 180
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	DETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLLGGKIV DETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLLGGKIV ************************************	240 240
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	VYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPESA VYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPEFA ************************************	300 300
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	NARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRTICLSLVGLFSSVFILYYGRKEIEADHIGV NARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRTICLSLVGLFSSVFILYYGRKEIEADHIGV ************************************	360 360
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	LLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYNEVV LLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYNEVV ***********************************	420 420
orf20_NK-198 orf20_NK-305-1	AGRAIQGLQ 429 AGRAIQGLQ 429 ******	

付図 5-9 *orf20_{NK-198}* 及び *orf20_{NK-305-1}* の翻訳産物のアミノ酸配列のアラインメント アスタリスクは両者で共通したアミノ酸残基を示す。

TGCATTTGATGATTTGAATGTGTTGGTTATTGTCTTCAAGCTTAAATGTGCCTATATTAA	-4858
TACAACTTTTTTTAAGGTATATTTGTACATGATTTCATTTCTTAACTAGTATTTGGGTTT	-4798
GGGTGTTGTCCCGGGATAGTATTGTTTTCTGAATTTGATATGCATTTTTTTT	-4738 -5403
CCATTAAAATATACTCCCTCCGTCCCAAAATATAGTTTCCATTTCCATTTTGGGTGTCCC CCATTAAAATATACTCCCTCCGTCCCAAAATATAGTTTCCATTTCCATTTTGGGTGTCCC **************************	-4678 -5343
AAAATATAGTTCCCATATCCCATTTCCATATTTAGTTCCACGTTTTTTCGTAATTTGTCT AAAATATAGTTCCCATATCCCATTTCCATATTTAGTTCCACATTTTTTCGTAATTTGTCT ********************************	-4618 -5283
AGAAAAACCGTGTCCCCTCATTTATTTGCTTCTTGAATTTTGGTTTTTCCTTTGTTTATT AGAAAAACCGTGTCCCCTCATTTATTTGCTTCTTGAATTTTGGTTTTTCCTTTGTTTATT *****************************	-4558 -5223
CAACCAAAATGTTACAATTAATGCTCTTCCACCAATTATTCTCCACCTCTTTCTCCTAAAA CAACCAAAATGTTACAATTAATGCTCTTCTACCAATTATTCTCCCACTCTTTCTCCTAAAA **********	-4498 -5163
TCATCTTTTCCCATACAACATTTATTTAAATAAACAAAAAA	-4438 -5104
ATTCTACTTACATAAATTACCGTGAAAAAAGGGAAATGGGAACTATATTTTGGGACGGAG ATTCTACTTACATAAATTACCGTGAAAAAAGGGAAATGGGAACTATATTTTGGGACGGAG ******************************	-4378 -5044
GGAGTATTAAGTAAAACTCAACATTTAAACCATACAAATATAATAATAATGGAGACTTAAA GGAGTATTAAGTAAAAACTCAACATTTAAACCATACAAATATAATAATATGGAGACTTAAA ********************************	-4318 -4984
GCATGATTAAAAGTTGGTTGAGATGGTAATTGTGTCATGTATAATAACAAGAGACTACAA GCATGATTAAAAGTTGGTTGAGATGGTAATTGTGTCATGTATAATAACAAGAGACTACAA ********************************	-4258 -4924
GTTCAAATCTTGTTGCAAGCTTATTTTACTTTTGTTAATTGACATGAGATATATACACAT GTTCAAATCTTGTTGCAAGCTTATTTTACTTTTGTTAATTGACATGAGATATATACACAT ***************************	-4198 -4864
TGGACAAATCTACTGAAGTAACAGAGGTGCCACGTGGTGGGTATACATTGTCACGCACAC TGGACAAATCTACTGAAGTAACAGAGGTGCCACGTGGTGGGTATACATTGTCACGCACAC ******************************	-4138 -4804
	IGCATTIGATGATTIGAATGIGITGGITATIGICTICAAGCITAAATGIGCCTATATTAA IACAACTTITTITAAGGIATATTIGIACATGATTIGATATGCATTITCITAACTAGTATTIGGGITT GGGIGITGICCCCGGGATAGTATIGITTICTGAATTIGATATGCATTITTITTITTCATTI

orf20_S orf20_NK-305-1	CTTTAAATATATTTGTATAGATGAACTAGAACTGTTTTCTTCTAATAATAAAGAACGATA -407 CTTTAAATATATTTGTATAGATGAACTAGAACTGTTTTCTTCTAATAATAAAGAACGATA -474 **********************
orf20_S orf20_NK-305-1	AGGATGAAGTTTATTAACAGATGGTCTGTAGAAAATGTGATTTGCTTCAACTTTGTAAGG -401 AGGATGAAGTTTATTAACAGATGGTCTGTAGAAAATGTGATTTGCTTCAACTTTGTAAGG -468 *********************
orf20_S orf20_NK-305-1	TAAAATCATGGCAATTAAGCTTTTAGGCGAGGAAATTAAGATCATGAATATTATTTAATT -395 TAAAATCATGGCAATTAAGCTTTTAGGCGAGGAAATTAAGATCATGAATATTATTTAATT -462 *******************
orf20_S orf20_NK-305-1	TGTAAACTCTTTGTATATCTATCATTTTGTTGCTTATAGTATGCACCATTTTCCTATGTC -389 TGTAAACTCTTTGTATATCTATCATTTTGTTGCTTATAGTATGCACCATTTTCCTATGTC -456 ************************************
orf20_S orf20_NK-305-1	TTCAAAGCCTCAAAGGAATACTCCATTTCTTTTTTTTTT
orf20_S orf20_NK-305-1	GGTGATTGGTGAAGTCCCTAGAACCGTGCATTTTGAGTAAAAAATTAACTGAACAGGTT -377 GGTGATTGGTGAAGTCCCTAGAACCGTGCATTTTGAGTAAAAAAATTAACTGAACAGGTT -444 **********************************
orf20_S orf20_NK-305-1	GAAACTTTTTATTTGTAAATCATATAAAATTTTTGTTGCATCAGTCAAAAGTA -372 GAAACTTTTTATTTGTAAATCATATAAAATTTTTGTTGCATCAGTCAAAACTCAAAAGTA -438 ************************************
orf20_S orf20_NK-305-1	ACAGAGGGTGCAAATTGCGGAATTACTTCCTCATATACTTTGATGTACCGTTGATATGGT -366 ACAGAGGGTGCAAATTGCGGAATTACTTCCTCATATACTTTGATATACCGTTGATATGGT -432 *************************
orf20_S orf20_NK-305-1	ACACTCAATACTAATTTATGTTCATTTGCTTATTTGAAATTTTCTTATTTTGTTCATTTC -360 ACACTCAATACTAATTTATGTTCATTTGCTTATTTGAAATTTTCTTATTTTGTTCATTTC -426 *********************
orf20_S orf20_NK-305-1	ААТGATTTCAAATAAATAATAGGCAAAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACA -354 ААТGATTTCAAATAAATAATAGGCAAAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACA -420 ************************
orf20_S orf20_NK-305-1	ТТТАGGTATATGATAAAATTTATACAAATTTTAATGAAAAAAAA
orf20_S orf20_NK-305-1	TTAAGCTAAGCTAAAGTTGACTTTTAAGCTCTCTCCTTTTATGATGCAACAAAGATTTTG -342 TTAAGCTAAGCTAAAGTTGACTTTTAAGCTCTCTCCTTTTATGATGCAACAAAGATTTTG -408 ************
orf20_S orf20_NK-305-1	TTTTAGCACTAGCTACTTTTTCTATCCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACTCA -336 TTTTAGCACTAGCTACTTTTTCTATCCCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACTCA -402 ************************************

orf20_S orf20_NK-305-1	AATTTCATCAATTTTGATTATGTTTTTTCACCATGTAAGAAAATATCTTATCATGTGTTT -33 AATTTCATCAATTTTGATTATGTTTTTTCACCATGTAAGAAAATATCTTATCATGTGTTT -39 *******************	305 968
orf20_S orf20_NK-305-1	TTCGTAATCGAGGAAACCCCATATAGGAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATA -32 TTCGTAATCGAGGAAACCCCATATAGGAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATA -39 ************************************	245 908
orf20_S orf20_NK-305-1	TCAACAGGAAAATCACATTGTTCATAGGAAAACTCCTATAACATTTGCATACATTGTAGG -31 TCAACAGGAAAATCACATTGTTCATAGGAAAACTCCTATAACATTTGCATACATTGTAGG -38 ************************************	85 }48
orf20_S orf20_NK-305-1	TCATTGTTGCACTTTATTCCCTCGGCCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTTAATCTA -31 TCATTGTTGCACTTTATTCCCTCGGCCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTTAATCTA -37 ************************************	25 '88
orf20_S orf20_NK-305-1	CGTTTTTTCTATTGCAACAATTACTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTC -30 CGTTTTTTCTATTGCAACAATTACTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTC -37 ************************************)65 '28
orf20_S orf20_NK-305-1	CATTTTTGGTATAAAAAGCAACATTTCAGAACAAAGCATGGATTATGCACTAGGGTACCA -30 CATTTTTGGTATAAAAAGCAACATTTCAGAACAAAGCATGGATTATGCACTAGGGTACCA -36 ************************************)05)68
orf20_S orf20_NK-305-1	TTCATATAGAAGAATATGATTTTTTTCAACAACTTTTCAAGATAAAAAAAA)45 308
orf20_S orf20_NK-305-1	ATAAAATTAAAGAACATGTAAGAGTGCGTTTTATTCAACTTATTGGCCCTGAACTTATTG -28 ATAAAATTAAAGAACATGTAAGGGTGCGTTTTATTCAACTTATTGGCCCTGAACTTATTG -35 *******************	385 548
orf20_S orf20_NK-305-1	GACCTTATCTGAACTGAATTTATTGAACCTGAACTGAAC	325 188
orf20_S orf20_NK-305-1	GATTGGACCTGATTCAACTTATTGGACCTGATTAAACCTGATT	'82 28
orf20_S orf20_NK-305-1	GGAACTTATTGGAACTTATTG-ACCTTATTGAAACCTATTAGAC -27 CTTATTGGCCCTGATTGAAACTTATTAGACCTTATTGGACCTGATTGAAACTTATTAGAC -33 * ******* ** ******* *******	'39 }68
orf20_S orf20_NK-305-1	CTTATTGG	'31 308
orf20_S orf20_NK-305-1		'31 248
付図 5-10 PI6155	22 <i>rf1</i> と NK-305 <i>Rf1</i> の塩基配列のアラインメント(次ページに続く)	

orf20 S		-2731
orf20_NK-305-1	AATAATGATTATTAATTATCTCTTATGATACTCCCTCCGTCCCATAATATAGTGCTCACT	-3188
orf20 S		-2731
orf20_NK-305-1	TCTCATTTTTCACAAGAATTAAGGAAAATGGAAAGAGTTTTAGGATTTCACAAATTAGAC	-3128
orf20_S	CCCTGATTGAAACTTATTAGACCTTATTGGACCTGATTGAAACTTATTAGAC	-2679
orf20_NK-305-1	CTTATTGGCCCTGATTGAAACTTATTAGACCTTATTGGACCTGATTGAAACTTATTAGAC ***********************************	-3068
orf20_S	CTTATTGGACCTTATTCGACAAAAACATTGACCATGAATAACATAAAATATTACCACTAA-	-2620
or†20_NK-305-1	CIIAIIGGACCIIAIICGACAAAAACAIIGACCAIGAAIAACAIAAAIAIIACCACACACA	-3008
orf20_S	CGTAAATACTACCCCTCAAAATTTTTTATGGAGTAATAATTATTATAATTCGT	-2567
or†20_NK-305-1	GCACIAACGIAAAIACIACCCCCICAAAAIIIIIIAIGGAGIAAIAAIIAIIAIIAAIICGI **********************************	-2948
orf20_S	CCTTTAAAAATAATGATTATTAATTATCTCTTATGATA	-2529
orf20_NK-305-1	CCTTTAAAAATAATGATTATTAATTATCTCTTATGATACTCCCTCC	-2888
orf20_S		-2529
orf20_NK-305-1	TGCTCACTTCTCATTTTTCACAAGAATTAAGGAAAATGGAAAGAGTTTTAGGATTTCACA	-2828
orf20_S		-2529
orf20_NK-305-1	AAAATATATATTTAAGTAAATGTTTATTGGGTGTTTTGGTCTTGGAACTAGTTTTTTCT	-2768
orf20_S		-2529
orf20_NK-305-1	TCTTTTTCCTTTAAAATAAAATGAAAGAGCAATAAATATACCTTGGAATGGTGTAAAACA	-2708
orf20_S		-2529
orf20_NK-305-1	ATAAATAGGGGCACACATTTTACAAGAAAGTAGGGGTATTTTTGAAAGTTTTATGTAGAA	-2648
orf20_S		-2529
orf20_NK-305-1	ATGAAGGATAATTTAGTCCAAATAAATTGAAAAAAAAAA	-2588
orf20_S	ATTAATTTAATAA	-2516
orf20_NK-305-1	ACACCCAAAGAGGAATGCAAGCACTATATTATGGGACGGAGGAGTAATTAAT	-2528
orf20_S	AAAAATTTACTATTTATATATTTGCCTATACATAACTTTCACCACTAATATGTTTTGATT	-2456
orf20_NK-305-1	AAAAATTTACTATTTATATATTTGCCTATACATAACTTTCACCACTAATATGTTTTGATT ************************	-2468
orf20_S	TTATAAAACACTAGTAGAAAATCAAAAGTTAATTAACATTTATTGCTAACAAGTTAAAAT	-2396
orf20_NK-305-1	TTATAAAACACTAGTAGAAAATCAAAAGTTAATTAACATTTATTGCTAACAAGTTAAAAT *****************************	-2408
付図 5-10 PI6155	22 rfl と NK-305 Rfl の塩基配列のアラインメント(次ページに続く)

orf20_S orf20_NK-305-1	TGACACATATAAAAAATTAACATTTATTGAAGAGGGTGATGTAGAAGATGAAGAAAGA	2336 2348
orf20_S orf20_NK-305-1	CCCCGATGAAGAAAGATACTCTAGTGATGATGATGAAGCAATCAAT	2276 2288
orf20_S orf20_NK-305-1	TCTTTCATTGTTATTAGTAACGAAAACATGTTATCTCTAGTTATTTAAAGACGAATTGCA -2 TCTTTCATTGTTATTAGTAACGAAAACATGTTATCTCTAGTTATTTAAAGACGAATTGCA -2 ************************************	2216 2228
orf20_S orf20_NK-305-1	AATTATTGTAATTATAATTATTATTATTATTGTTAACCTTAATTATTTGACCATGATTAT -2 AATTATTGTAATTATAATTATTATTATTATTGTTAACCTTAATTATTTGACCATGATTAT -2 ************************************	2156 2168
orf20_S orf20_NK-305-1	ААТАТТАТТААТАGCAATATGAATAATCAAATAATAGACAATAATACAAGTATAATACT -2 ААТАТТАТТТААТАGCAATATGAATAATCAAATAATAGACAATAATACAAGTATAATACT -2 ************************************	2096 2108
orf20_S orf20_NK-305-1	АСАСАТТGTGGTACTTTAATAAAAAATTCTAATAATAACATAATCAGCTAATAGTAATAT -2 Асасаттgtggtactttaataaaaattctaataataacataatcagctaatagtaatat -2 **********************	2036 2048
orf20_S orf20_NK-305-1	GAATAATAAAATAATAGACATAATACAGATAAATAACAAAATAATAGACATAATACAAAAT GAATAATAAAATAA	1976 1988
orf20_S orf20_NK-305-1	AAACAATAAAGTAATAGACATTAATACAAGTATAATATTATATAATCATTGTGGTACTTT – AAACAATAAAGTAATAGACATTAATACAAGTATAATATTATATAATCATTGTGGTACTTT – ***********************	1916 1928
orf20_S orf20_NK-305-1	ААТТААААТТСТААТААТААСАТААТСААСТААТАGTGATATGAAATTATGAATAACAAA — ААТТААААТТСТААТААТААСАТААТСААСТААТАGTGATATGAAATTATGAATAACAAA — **********************************	1856 1868
orf20_S orf20_NK-305-1	ATAATGGACAATAATACAAATGTATATTAAACATTGACTATTTGGACCTTATTGGGACCT ATAATGGACAATAATACAAATGTATATTAAACATTGACTATTTGGACCTTATTGG-ACCT ***********************************	1796 1809
orf20_S orf20_NK-305-1	TTATTTAGACCTGATTCAA-CTTATTGGACCTTATTAGACCTGATTGGAACTTATTGCAC - TATTAGACCTGATTGAAACTTATTGGACCTTATTAGACCTGATTGGAACTTATTGCAC - * *********** ** ******	1737 1751
orf20_S orf20_NK-305-1	CTGATTGAAACTTATTGCACCTGGAACTTATTGGACCTTATTAGACCTTATTGGAAGTTA - CTGATTGAAACTTATTGCACCTGGAACTTATTGGACCTTATTAGACCTTATTGGAAGTTA - ************************************	1677 1691
orf20_S orf20_NK-305-1	TTGCCCTTATTAGACCTTATTACAACTTATCTGAACTTATTGGACCTGAAACTTAATTTT - TTGCCCTTATTAGACCTTATTACAACTTATCTGAACTTATTGGACCTGAAACTTAATTTT - *********************************	1617 1631
付図 5-10 PI6155	22 rf1 と NK-305 Rf1 の塩基配列のアラインメント(次ページに続く)	

orf20_S orf20_NK-305-1	TTTAAGTTGAGCAGAACGCACCCTAAATCTCCAATTATAAAATAACATAGGTCGGAATAA – TTTAAGTTGAGCAGAACGCACCCTAAATCTCCCAATTATAAAATAACATAGGTCGGAATAA – ***********************************	1557 1571
orf20_S orf20_NK-305-1	АААGAAAGTATTGTAAATGAACATTTAGTCTAAATTTAAAGAACCTAACTTTTAAATGTA - АААGAAAGTATTGTAAATGAACATTTAGTCTAAATTTAAAGAACCTAACTTTTAAATGTA - ************************************	1497 1511
orf20_S orf20_NK-305-1	AATTTAAAAAAGGAATCTCGCCAACAACCATTTTTCCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAG - AATTTAAAAAAGGAATCTCGCCAACAACCATTTTTCCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAG - ************************************	1437 1451
orf20_S orf20_NK-305-1	АТТТААТGAAACAGATAACAACATTTTTCTTAAATCATAAATTCTTAAAATATTAAACCT - ATTTAATGAAACAGATAACAACATTTTTCTTAAATCATAAATTCTTAAAATATTAAACCT - ************************	1377 1391
orf20_S orf20_NK-305-1	ACATCGTTTAACAGAGGGTGCACCATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCCTATTTG - ACATCGTTTAACAGAGGGTGCACCATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCCTATTTG - ************************************	1317 1331
orf20_S orf20_NK-305-1	CGCTTTTCCATTCCCTAAAAAACCGAGTCTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGTAGT - CGCTTTTTCATTCCCTAAAAAACCGAGTCTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGTAGT - ******* ****************************	1257 1271
orf20_S orf20_NK-305-1	CGTCTCAAAAAAAAAAAAGGCTTTGCTAAATTACGCCCTAAATTTTTCTGGTAACGCCCT - CGTCTCAAAAAAAAAAAAAGGCTTTGCTAAATTACGCCCTAAATTTTTCTGGTAACGCCCT - ************************************	1197 1211
orf20_S orf20_NK-305-1	AAATACGGTATTTTCATACCGTATTTATATACCTGCATTTCTTTC	1137 1151
orf20_S orf20_NK-305-1	ACTCACTCACTTTCTCTCTCCCCCCCACCACCACTGCCACCACCACCACCACCACTATT - ACTCACTCACTTTCTCTCTCCCCCCCCACCACCACCACCA	1077 1091
orf20_S orf20_NK-305-1	CTTCTCCAATTTCACACTTTTGACTCCTATGTCTTCTAACAACATTGTGTCGGCACCACC - CTTCTCCAATTTCACACTTTTGACTCCTATGTCTTCTAACAACATTGTGTCGGCACCACC - ***********************************	1017 1031
orf20_S orf20_NK-305-1	ACCACCGACGTACCCCCGACACCCCACCATCGTCGTATCCCGGCCACCACCGCCGTACCC - ACCACCGACGTACCCCCGACACCCCACCATCGTCGTATCCCGGCCACCACCGCCGTACCC - **********************************	957 971
orf20_S orf20_NK-305-1	CCGACACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCCGTTTTCTTATTTTCTGATTTTTT CCGACACACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCCGTTTTCTTTATTTTCTGATTTTTT ******************************	897 911
orf20_S orf20_NK-305-1	TTTAAAAAAAAGGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCACCACTGGTGGAGGCGTCCATG - TTTTAAAAAAA-GGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCATCACTGGTGGAGGCGTCCATG - *** ****** *************************	837 852
付図 5-10 PI615522	2 <i>rf1</i> とNK-305 <i>Rf1</i> の塩基配列のアラインメント(次ページに続く)	

orf20_S orf20_NK-305-1	GCCGGCGCCTCACCATGTGGTGAAGCGCCTGCCATAGACGCCTCCCCTTTTTTTT
orf20_S orf20_NK-305-1	AAATTTCAAATTACTATTAATGAAGAAACATAGAAGAGGAGGGTGGGT
orf20_S orf20_NK-305-1	GGTGCGGTGGCAGTGTGTCGGTGGTGCGGCGCAGTACTGGTGCGG -672 GGTGCGGTGGCAGTGTGTCGGTGGTGCGGCGCAGTATTGGTGCGACGGCGACTGGTGCGG -672 ************************************
orf20_S orf20_NK-305-1	CGGTGGTGGTGCAACGGTCCCCAATGGTAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGTGAATGT -612 CGGTGGTGGTGCAACGGTCCCCAATGGTAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGTGAATGT -612 ************************************
orf20_S orf20_NK-305-1	AGAAGGTGGAAAATATGAAAATGGAAAAATACGTATATTATACGTATTTAGGGCGTTAGT -552 Agaaggtggaaaatatgaaaatggaaaatacgtatattatacgtatttagggcgttagt -552 ***********************************
orf20_S orf20_NK-305-1	AAGATATTCTAGGGCGTCGTTTAGCAAATGAGAAAAAATAATACACTCTAGTTGTCGTAG -492 AAGATATTCTAGGGCGTCGTTTAGCAAATGAGAAAAAATAATACACTCTAGCTGTCGTAG -492 ************
orf20_S orf20_NK-305-1	ACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGGGTAGAA -432 ACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGGGTAGAA -432 ***********
orf20_S orf20_NK-305-1	ATATTTTGTTCCATTTATTAAATGAGAAAATTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAAATCA -372 ATATTTTGTTCCATTTATTAAATGAGAAAATTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAAATCA -372 ************************************
orf20_S orf20_NK-305-1	ACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAAACGAATGACTCTCGATAATAG -312 ACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAAACGAATGACTCTCGATAATAG -312 ************************************
orf20_S orf20_NK-305-1	TACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTGCATAGTTTGTTGCGTAGTGCATAGCTGGC -252 TACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTGCATAGTTTGTTGCGTAGTGCATAGCTGGC -252 ***********************************
orf20_S orf20_NK-305-1	TGCAAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACTTTTGCACTTTCGGAATTCAGCAGGAATAT -192 TGCAAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACTTTTGCACTTTCGGAATTCAGCAGGAATAT -192 **********
orf20_S orf20_NK-305-1	CATAGCCATTTATGGAAGCAACAACTCTTGTGACCCATTTCATCTAAAACCCCTTAATCTC -132 CATAGCCATTTATGGAAGCAACAACTCTTGTGACCCATTTCATCTAAAACCCCTTAATCTC -132 ************************************
orf20_S orf20_NK-305-1	ATAAATTTTACATTTCAGAATTCAAAAATCACGTAATTTTTTTT
付図 5-10 PI61552	22 rf1 と NK-305 Rf1 の塩基配列のアラインメント(次ページに続く)

orf20_S orf20_NK-305-1	ACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCACCTTTTGTT ACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCACCTTTTGTT ******************************	-12 -12
orf20_S orf20_NK-305-1	GTTCAAAAATC -1 GTTCAAAAATC -1 *******	
orf20_S orf20_NK-305-2	/ Exon 1 ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC *****************************	60 60
orf20_S orf20_NK-305-2	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTGTTTTAC AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC *********************************	120 120
orf20_S orf20_NK-305-2	AATCAATCTACTAAGTGTAGTGGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAATGGG AATCAATCTACTAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAATGGG ***********************	180 180
orf20_S orf20_NK-305-2	TTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCATGGT TTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCATGGT **********************************	240 240
orf20_S orf20_NK-305-2	GATAAAACCGAAGTAAGTGTTGAATCATGGCTGGAAAAATTACTTCTTGGAATTGCACTA GATAAAACCGAAGTAAGTGTTGAATCATGGCTGGAAAAATTACTTCTTGGAATTGCACTA **********************************	300 300
orf20_S orf20_NK-305-2	ATGTTGAGTACTGGTATATTTGCTTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATATACA ATGTTGAGTACTGGTATATTTGCTTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATATACA ******************************	360 360
orf20_S orf20_NK-305-2	GGAAGGAAGCATTATGTGCTTATATCAACAACTGATGAGAATGAAAAGGGAGAAGTTGAG GGAAGGAAGCATTATGTGCTTATATCAACAACTGATGAGAATGAAAAGGGAGAAGTTGAG ***********	420 420
orf20_S orf20_NK-305-2	AAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTCCAA AAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTCCAA ***************************	480 480
orf20_S orf20_NK-305-2	CACATTCTTGAATCACTGGAAAGAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAAAGAGAGA CACATTCTTGAATCACTGGAAAGAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAAAGAGAGA ****************************	540 540
orf20_S orf20_NK-305-2	GAAACTTTCAAGGAGATAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAAGATAGTAGG GAAACTTTCAAGGAGATAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAAGATAGTAGG *****************	600 600
orf20_S orf20_NK-305-2	AAGAAGCATAGTGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTTGGAAGGGTTGAATTGGGAAATT AAGAAGCATAGTGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTTGGAAGGGTTGAATTGGGAAATT *************	660 660
付図 5-10 PI615522	<i>: rfl</i> と NK-305 <i>Rfl</i> の塩基配列のアラインメント(次ページに続く))

orf20_S orf20_NK-305-2		720 720
01720_MX 000 2	************	720
orf20_S orf20_NK-305-2	TACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCGCAT TACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCGCAT *******	780 780
orf20_S orf20_NK-305-2	/ Intron 1 CAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTTAATAGAA CAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTTAATAGAA	840 840
orf20_S orf20_NK-305-2	CTATACAAAAAACATGAAAGGAATTATATGAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAG CTATACAAAAAACATGAAAGGAATTATATGAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAG	900 900
orf20 S	**************************************	960
orf20_NK-305-2	ATTACATTATGAATGTCATATGTCAATGTGGTGGTATGTAT	960
orf20_S orf20_NK-305-2	GTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATGTCCCTCTAC GTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATGTCCCTCTAC ******************************	1020 1020
orf20_S orf20_NK-305-2	GTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTA GTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTA *****************************	1080 1080
orf20_S orf20_NK-305-2	/ Intron 2 CTCTTAAGGCATCCTCTTGCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATG CTCTTAAGGCATCCTCTTGCAAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATG *********************************	1140 1140
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTG ATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTG ************************************	1200 1200
orf20_S orf20_NK-305-2	CATAATTGCAAAACATATCACATTGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGAT CATAATTGCAAAACATATCACATTGCCCGGACCTAGTCACTTGTTTCATTTGTCAGCGAT ************************************	1260 1260
orf20_S orf20_NK-305-2	TTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAG TTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAG ********************	1320 1320
orf20_S orf20_NK-305-2	TAATAGAACTAAATAGAGAGGTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGG TAATAGAACTAAATAGAGAGGTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGG *****************************	1380 1380
orf20_S orf20_NK-305-2	TTTTGGATCAATATATGGATTGCTATATTCCACATATTCTATACTTTGCCGCAGATAACA TTTTGGATCGATATATGGATTGCTATATTCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACA ******** **************************	1440 1440
付図 5-10 PI61552	22 rfl と NK-305 Rfl の塩基配列のアラインメント(次ページに続く))

orf20_S orf20_NK-305-2	TTAAATTGATGTTGTTTATTTACATTTGACACATTAAAATTGAGTTGTGGACTATAATAT TTAAATTTATGTTGTTTATGCACACATTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATAT ****** ************************	1500 1500
	/Exon 3	
orf20_S orf20_NK-305-2	ATATGCGAGTTAGGTAACATAGAGTGTCAATTTACAGGGTTTGGAAGATTATTCAGGCTA ATATGTGAGTTAGGTAACATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTATTCAGGCTA	1560 1560
	արդարան արդարարարարարարարություն, դարդարարարարարարարարարար հարարարարարարարարար	
orf20_S orf20_NK-305-2	GATTTCATCAATTACTGCCACGAACTACCTTGCACTTGGGCTTTCTTGGATTGTCTTCCT GAGCTCCACAATTACTGCCACGAACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGATTGTTTTCCT	1620 1617
	ላሉ ሉሉ ተተተተተተተተተተተተተተተተተ ተለ ተተተለ ለ ለት ተተተተተተተ ተተተተተ	
orf20_S orf20_NK-305-2	TGGTGTTTATTCTTTATTTTGGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGCTTC CGGTGTTTATTCTTTATTATGGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGCTTC ********************************	1680 1677
orf20 S	TGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAA	1740
orf20_NK-305-2	TGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAA	1737

orf20_S	AGCCACTGGGCGACTGGAACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGT	1800
orf20_NK-305-2	AGCCACTGGGCGACTGGAACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGT	1797

orf20_S	TGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAG	1860
orf20_NK-305-2	TGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAG **********************************	1857
orf20 S	GACGTGCAATTCAAGGTCTTCAG TAA 1886	
orf20_NK-305-2	GACGTGCAATTCAAGGTCTTCAG TAA 1883	

orf20 S	CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTATGGTAATCA	1946
orf20 NK-305-2	CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTATGGTAATCA	1943

orfoo s		2006
orf20_8 0rf20_NK-305-2	AAATTAAACAGCTCATGGATCATTATATTGTCGTTATATTCGTCGTCTGTTTGACAAAGTTT	2000
01120_1110 000 2	******	2000
orf20 S		2066
orf20_NK-305-2	AGAGGTTAATTTGAGTTGAAAAACTTGCTATTAGTATGTTATCCTATCCCACTGACCTTGT	2000
01120_1110 000 2	***************************************	2000
orf20 S		2126
orf20 NK-305-2	TAATTCAATCTAATTTAGTTCCTATGTTAATTCACTGCTCTTTTTCTCCTTTAATAGATC	2123
_	***************************************	
orf20 S	CTCTCTATCCCTTTTTCTTTTTTCACAAAACCACCATCAT	2106
orf20_NK-305-2	CTCTCTATCCGTTTTTCTTTTTCTTTTTGAGAAAAGGAGCATCATAGATAAATATAAAT	2183

付図 5-10 PI615522	rfl と NK-305 Rfl の塩基配列のアラインメント(次ページに続く))

orf20_S orf20_NK-305-2	CGAAGTCATTACAAACTAAACTAGAGCTTCCAATATAAGTCCCTGGAAGTCCGAAAGCAA CGAAGTCATTACAAACTAAACT	2246 2243
orf20_S orf20_NK-305-2	TAGTAGTAGATAGCATAGTAGAGATGAGTTTCTCTTTTAGGTAGATAGTAGATAGGAGGA TAGTAGTAGATAGCATAGTAGAGATGAGTTTCTCTTTTAGGTAGATAGTAGATAGGAGGA *************	2306 2303
orf20_S orf20_NK-305-2	TCGATAGATGACCCACCATTGTCGCCGCTTTCGGCGCCACCACACCAGGGGAAGAAGAG TCGATAGATGACCCACCATTGTCGCCGCTTTCGGCGCACCAACACCAGGGGAAGAAGAG ***********	2366 2363
orf20_S orf20_NK-305-2	CCTCCAATCTGGCCACCACCGGATATAGGAATACCAAGCATAGGTTTGCCACCTGGATAT CCTCCAATCTGGCCACCACCGGATATAGGAATACCAAGCATAGATTTGCCACCTGGATAT ********************************	2426 2423
orf20_S orf20_NK-305-2	CAATTCACTCCTTAACGTCCATGGATGTGATTACCCCATGCATG	2486 2483
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTGGCCCTGCATGTTTCGTTGTGGCAAATGCAATGGCACTTGTTGCCTCAGTAAAATGA ATTGGCCCTGCATGTTTTGTTGTGGCAAATGCAATGGCACTTGTTGCCTCAGTAAAATGA *****************************	2546 2543
orf20_S orf20_NK-305-2	TTTATGAGTAGACACATGACATATCTTCCCTTATATTATTGTTCATTTTGAGTTAGTT	2606 2603
orf20_S orf20_NK-305-2	ACTCCCTCCTCTTTTTTCTTAGTTGCTATATTCCATTTTTGGATACAAAATCACATGAGA ACTCCCTCCTCTTTTTTCTTAGTTGCTATATTCCATTTTTGGATACAAAATCACATGAGA *********************************	2666 2663
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTTTGACTTTCTTTAATTTTATATATGTAAGAAAAAAACATAGTATTTTATTAGATTT ATTTTGACTTTCTTTAATTTTATATATGTAAGAAAAAAAA	2726 2723
orf20_S orf20_NK-305-2	CTCTCAAATGTGTAATTTTCATATATAGTTTTTTT-ATAATTTTCTCGTATACATAACTC CTCTCAAATGTGTAATTTTCATATATAGTTTTTTTATAATTTTCTCGTATACATAACTC ***************************	2785 2783
orf20_S orf20_NK-305-2	AACATATTAAGGTTTGAAGTCATGACTGGGAGCAAGAAACCACGCGGGTGGGGGCTCACAG AACATATTAAGGTTTGAAGTCATGACTGCGAGCAAGAAACCACGCGGGTGGGGGCTCACAG **********************************	2845 2843
orf20_S orf20_NK-305-2	CAGCGCCAGCAGGAAGGACGAGTGAAAAAAATTAGGGTGAATTAGTGTGGCTCTGATACC CAGCGCCAGCAGGAAGGACGAGTGAAAAAAATTAGGGTGAATTAGTGTGGCTCTGATACC **********************************	2905 2903
orf20_S orf20_NK-305-2	ATGACAAATTGATTAGAGTTTAATGATTTGTGTTACTACTGTTAAACTTAGAGTTTACAT ATGACAAATTGATTAGAGTTTAATGATTTGTGTTACTATTGTTAAACTTAGAGTTTATAT **************************	2965 2963
付図 5-10 PI61552	22 rfl と NK-305 Rfl の塩基配列のアラインメント(次ページに続く)	1

orf20_S orf20_NK-305-2	ATATCCTAAGTTTACATCCAAGGCCTTAGGCCCAATATATACAACTCAACATATATACAA ATATCCTAAGTTTACATCCAAGGCCTTAGGCCCCAATATATACAACTCAACATATATACAA **********	3025 3023
orf20_S orf20_NK-305-2	GGTCCAATATGTATCAACAAAATGAAAAATAAAAACATAATGTAGCAACTAGCAACTAAA GGTCCAATATGTATCAACAAAATGAAAAATAAAAACATAATGTAGCAACTAGCAACTAAA ********************	3085 3083
orf20_S orf20_NK-305-2	AAAAGACGGAGAGAGTATTTAAGTTAACAATATAATGATAATTAAATCAGTGTAAGTATT AAAAGACGGAGAGAGTATTTAATTTA	3145 3143
orf20_S orf20_NK-305-2	AGTCAAGATCTAGATTGAAATTACTCTCCGACGACCTCCCCGACCCATTTGCCTTTATGT AGTCAAGATCTAGATTGAAATTACTCTCCGACGACCTCCCCGACCCATTTGCCTTTATGT ********************************	3205 3203
orf20_S orf20_NK-305-2	AATCAATCATTATATACAACCTCCGATTCTTTTGATGGCAACTATTTGAATGTTACCTTT AATCAATCATTATATACAACCTCCGATTCTTTTGATGGCAACTATTTGAATGTTACCTTT *******************************	3265 3263
orf20_S orf20_NK-305-2	АТСААСАТGAAACTTTAACTATTAATATCTTTATTAATTATTAACATAATTTACTAC	3325 3323
orf20_S orf20_NK-305-2	TTATAAATTATTTAAATATATACCTTGAGATTAATTTTCCTAACATTTATTT	3385 3383
orf20_S orf20_NK-305-2	ACATTTGCTTTTATATTTTATAAAGAAAATGGTGATGGTTAGAAGTATATATATATGAGT ACATTTGCTTTTATATTTTATAAAGAAAATGGTGATGGTTAGAAGTATATATATATGAGT **********	3445 3443
orf20_S orf20_NK-305-2	AGTTCAATAGTCAAAGCCTTGCAAATTAAAGAAACGGCGGAAGAGTATATTGAAAATTTA Agttcaatagtcaaagccttgcaaattaaagaaacggcggaagagtatattgaaaattta *****************	3505 3503
orf20_S orf20_NK-305-2	TATTGTCACCTTTTTTAATAGATGAGTCGATGATGGTCTAAAATTGAGGCTTCTAATATG TATTGTCACCTTTTTTAATAGATGAGTCGATGATGGTCTAAAATTGAGGCTTCTAATATG ********************************	3565 3563
orf20_S orf20_NK-305-2	CGCTAGCTTAGATTAAAGAGAACAGGAAATTGTTATGACAATTTGCGTAAGTTGACTGAG CGCTAGCTTAGATTAAAGAGAACAGGAAATTGTTATGACAATTTGCGTAAGTTGACTGAG ***********************************	3625 3623
orf20_S orf20_NK-305-2	ATCATCATGAAGTCGAGTATTAGCAACCTTAGTAATTTATAATTCCTCCGTTTCTTTTA ATCATCATGAAGTCGAGTATTAGCAACCTTAGTAATTTATAATTCCTCCGTTTCTTTTA ******************************	3685 3683
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTTACTCATTTTATTTTGGGCGAGAATCAAGGAAGAAGTACAAAAGTATGAGACAAAAA ATTTACTCATTTTATTTT	3745 3743
付図 5-10 PI615522	rfl と NK-305 Rfl の塩基配列のアラインメント(次ページに続く))

orf20_S orf20_NK-305-2	CTGAAAAGATAAAGAGAAAAACTGAAAAGTGCGAGAAATAAAGTAAAAAAGTGGGTTAAA 3 CTGAAAAGATAAAGAGAAAAACTGAAAAGTGCGAGAAATAAAGTAAAAAAGTGGGTTAAA 3 *******************	805 803
orf20_S orf20_NK-305-2	AATATTAAAAAGTGGATCACATGGGTAGAAAAGGAGGAGAAAATAAAT	3865 3863
orf20_S orf20_NK-305-2	CAAAAATAGAAAAAGCAGCAGTGTCACAGTGTGCAGATTAAAAAGAAACAAAC	3925 3923
orf20_S orf20_NK-305-2	AAAATGTATAAATTAAAAAGAAATGGAGGGAGTAATACTTAACACATAAATATTGTTTAT 3 AAAATGTATAAATTAAAAAGAAATGGAGGAGGAGTAATACTTAACACATAAATATTGTTTAC 3 **********************	3985 3983
orf20_S orf20_NK-305-2	TAATTGAAGCTCGAGCTTCACTCAGATACATGATTTTTAATTTTTTATGACCTATCATAG 4 TAATTGAAGCTCGAGCTTCACTCAGATACATGATTTTTAATTTTTTATGACCTATCATAG 4 ************************************	1045 1043
orf20_S orf20_NK-305-2	TAAGTTTGCGGTGCTACTTTGATCCTTCCTTTATGATAAGACACATCCCTTTATTCTCTA 4 TAAGTTTGCGGTGCTACTTTGATCCTTCCTTTATGATAAGACACATCCCTTTATTCTCTA 4 ************************************	105 103
orf20_S orf20_NK-305-2	AGAGAATCACTTAAATTTATAAGGTATAAAGTTAACGCTATAAGTTAAAGAGGTCATTTT 4 AGAGAATCACTTAAATTTATAAGGTATAAAGTTAACGCTATAAGTTAAAGAGGTCATTTT 4 *********************************	165 163
orf20_S orf20_NK-305-2	TAGATAATAGGTCACCTTGTATGTAAATAGGTCACTTCTACTAAAAATTTCCCCGTATAG 4 TAGATAATAGGTCACCTTGTATGTAAATAGGTCACTTCTACTAAAAATTTTCCCCGTATAG 4 ************************************	1225 1223
orf20_S orf20_NK-305-2	CAAGTTACAATTGTGTTAACCCAAATTATGGTAACATTTTGTACTTTTATCAACTCCGAC 4 CAAGTTACAATTGTGTTAACCCAAATTATGGTAACATTTTGTACTTTTATCAACTCCGAC 4 ************************	1285 1283
orf20_S orf20_NK-305-2	TCATACTTGATATTCGAATAACCTCACTTATCAAGTCAATGCAAGCAA	1345 1343
orf20_S orf20_NK-305-2	TTTTGTTCGCCTTAATGTCGAGACCAGTCTATCTAAAAGAACTTTTTTTT	1405 1401
orf20_S orf20_NK-305-2	TACCTAAAAGAACTTATTATTAGTTATTGGCTACAAAACCACACAAATATTCAATACAAT 4 TACCTAAAAGAACTTATTATTAGTTATTGGCTACAAAACCACACAAATATTCAATACAAT 4 ************************************	465 461
orf20_S orf20_NK-305-2	CTCAAGCTACAACTTCAAAGATTAAAGATTCCCTCACCCATCACATTCATATACAATATA 4 CTCAAGCTACAACTTCAAAGATTAAAGATTCCCTCACCCATCACATTCATATACAATATA 4 *************	1525 1521
付図 5-10 PI61552	22 rf1 と NK-305 Rf1 の塩基配列のアラインメント(次ページに続く)	

orf20_S orf20_NK-305-2	TTGGTCTATCAGTGATATGATTGAATAAGTTGCACTCAATTGTATTGACCTACATAAGTA TTGGTCTATCAGTGATATGATTGAATAAGTTGCACTCAATTGTATTGACCTACATAAGTA ********************************	4585 4581
orf20_S orf20_NK-305-2	TGGCCTTTATAATTACATAAAGGTGATCCAAAGTTCCAATAATATCAATGAGATTTGAAG TGGCCTTTATAATTACATAAAGGTGATCCAAAGTTCCAATAATATCAATGAGATTTGAAG *************************	4645 4641
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTGTTTCCAGATATTCACTCAACCAAATATACCTTACGACAACTTCATCCTGAAATCTT ATTGTTTCCAGATATTCACTCAACCAAATATACCTTACGACAACTTCATCCTGAAATCTT ********************************	4705 4701
orf20_S orf20_NK-305-2	CGGTTTGTGACAGTACTCCACTTTTAATTCAATGGTCAAATATTTATACCTTAACCCTTA CGGTTTGTGACAGTACTCCACTTTTAATTCAATGGTCAAATATTTATACCTTAACCCTTA **************	4765 4761
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTCAATGCCCATAATGTTGATGATCATGTGAAGTAGTGCAATATATAGCTTTACTTCAT ATTCAATGCCCATAATGTTGATGATCATGTGAAGTAGTGCAATATATAGCTTTACTTCAT ****************************	4825 4821
orf20_S orf20_NK-305-2	CTAAAAATGCATTAAAAAATTTAGTCAATTGATTGAATATAAACTAGCTAACTCGTGTAC CTAAAAATGCATTAAAAAATTTAGTCAATTGATTGAATATAAACTAGCTAACTCGTGTAC ************************************	4885 4881
orf20_S orf20_NK-305-2	TACTCAACCAAGATGGTTTCATGTCAATGATAAATAGCTCATTGTTTCTGAACCTCATAA TACTCAACCAAGATGGTTTTATGTCAATGATAAATAGGTCATTGTTTCTGAACCTCATAA *****************************	4945 4941
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTTTCCATATCATCTCCTTCATCACACCATGAAGGGAGCTTCTTTCAAGCTGTCGATTC ATTTTCCATATCATAT	5005 5001
orf20_S orf20_NK-305-2	TGATTTTCGTCCTTGTGGCTTTCGCTTCATGTAAGTGTCTTTTATCTCTTATGATTCTTG TGATTTTCGTCCTTGTGGCTTTCGCTTCGTGTAAGTATCTTTTATCTCTTATGATTCTTG *********************************	5065 5061
orf20_S orf20_NK-305-2	CATGTGAATTAAGATGCATATATGGTTGTCTTGATATAGTTTTCTTCACCTAA CATGTGAATTAAGATGCATACATGGTTGTCTTGACTCTTGATATAGATTTCTTCACCTAA *************************	5118 5121
orf20_S orf20_NK-305-2	ACAGCTCTTCTAGTACTATTATCGATTGATGGAGTTTATACTATATTGCAGTTCTTTGTC ATAGCTCTTCTAGTATTATTATTGATTGGTGGGGGGTCATACTATATTGCAGTTCTTTGTC * ************ ***** ***** *** ** * ****	5178 5181
orf20_S orf20_NK-305-2	CATTTACAGCAGAAGCAAGACACAAGCACGTGCATCATAGTAATTGCCACCATCGTCGTG CATTTACAGCAGAAGCAAGACACAAGCACGTGCATCATAGTAATTGCCACCATCGTCGTG *******************************	5238 5241
orf20_S orf20_NK-305-2	GACGTCCTGATCCAGCACCAACACCGGCGCCTGTGCCAGCATCTAATGAAGGCATACCAC GACGTCCTGATCCAGCACCAACACCGGCGCCTGTGCCAGCATCTAATGAAGGCATACCAC *******************************	5298 5301
付図 5-10 PI615522	rfl と NK-305 Rfl の塩基配列のアラインメント(次ページに続く))

orf20_S orf20_NK-305-2	CATATCAAATCCATGGTTGTGGTTACCCATGTAGTGACTCCAACGACTGTGATTGGCCTT CATATCAAATCCATGGTTGTGGTTACCCATGTAGTGACTCGAACGACTGTGATTGGCCTT *******************************	5358 5361
orf20_S orf20_NK-305-2	GTACAGAATGCGGTGTCAACAGAACTTGTGCTTATGAAGAGCCCTTCTTTCCATCACCA- GTACAGAATGCGGTGTCAACAGAACTTGTGCTTATGAAGAGCCCTTCTTTCCATCACCAT ********************	5417 5421
orf20_S orf20_NK-305-2	AGTATGGAAACCCCCAACACAGAATCACCACTATCACCAGCAC CACCTGTTCCATCACCAAGTATGGAAACGCCAACACAAGAACCACCACCACTATCACCAGCAC ******************************	5460 5481
orf20_S orf20_NK-305-2	CGGCACCTGATAATGGCATTGGCGTAGGTGTGCCACCATATCAAATCCACGGTTGTGGCT CGGCACCTGATAATGGCATTGGCGTAGGTGTGCCACCATATCAAATCCACGGTTGTGGCT ****************************	5520 5541
orf20_S orf20_NK-305-2	ACCCATGTAGTGACTCCAATGATTGTGATTGGCCTTGTACAGTATGTGGTGTCAACGGAA ACCCATGTAGTGACTCCAATGATTGTGATTGGCCTTGTACAGTATGTGGTGTCAACGGAA *******************************	5580 5601
orf20_S orf20_NK-305-2	CTTGTGCTTTTGAAGAGCCCTTCTTTCCATCATCATCACCTGTTCCATCACCAAGTATGA CTTGTGCTTTTGAAGAGCCATTCTTTCCATCATCACCTGTTCCATCACCAAGTATAG *******************************	5640 5658
orf20_S orf20_NK-305-2	AAACCCCCAACACAAGAACCACCACTATCACCAGCACCGGCACCTGATAATGGCATTGGCG AAACTCCCAACACAAGAACCACCACTATCACCAGCACCGGCACCTGATAATGGCATTGGCG **** ******************************	5700 5718
orf20_S orf20_NK-305-2	TAGGTGTGCCACCATATCAAACTCACGGTTGTGGCTACCCATGTAGTGACTCCAACGATT TAGGTGTGCCACCATATCAAATCCACGGTTGTGGCTACCCATGTAGTGACTCCAACGATT ***********************************	5760 5778
orf20_S orf20_NK-305-2	GTGATTGGCCTTGTACAATCTGTGGTGCTGGCCAAACCTGTACTTTTGATGAGCCCTTCT GTGATTGGCCTTGTACAATATGTGGTGCTGACCAAACCTGTACTTTTGATGAGCCCTTCT *******************************	5820 5838
orf20_S orf20_NK-305-2	TTACATCACCCTCGCTTGCTCCATTACCTCCCACAGAAGCACCCATTCCACAATGGGTAC TTACATCACCCTCGCTTGCTCCATTACCTCCCACAGAAGCACCCATTCCACAATGGGTAC ************************************	5880 5898
orf20_S orf20_NK-305-2	CTGGTAATGGCATCGCGGCACCACCATATCAGATTCATGGTTGTGGTTACCCATGTAACG CTGGTAATGGCATCGCGGCACCACCATATCAGATTCATGGTTGTGGTTACCCATGTAACG ***********************************	5940 5958
orf20_S orf20_NK-305-2	ACTCCAATGACTGTGATGCACCCTGTACAGTCTGTTGTGCAAACTATACCTGCTGTTATG ACTCCAATGACTGTGATGCACCCTGTACAGTCTGTTGTGCAAACTATACCTGCTGTTATG ********************************	6000 6018
orf20_S orf20_NK-305-2	ATGTGGCTGATCCTGAGTACATGCTACCACCTATGTCACCCTCTGAGCCACCGAAATTAT ATGTGGCTGATCCTGAGTACATGCTACCACCTATGTCACCCTCTGAGCCAC-GAAATTAT *******************************	6060 6077

orf20_S orf20_NK-305-2	TACCTCTTCCACCATCTCCACCTCCATCTACAGAGGATGTAGAATATGATGATATGTTTG TACCTCTTCCACCATCTCCACCTCCATCTACAGAGGATGTAGAAAATGATGATATGTTTG **********	6120 6137
orf20_S orf20_NK-305-2	CACCACAACCTGCTTATGATATAGGAACGCCTGCGGAACTTCCACCACGAGGATACGAAT CACCACAACCTGCTTATGATATAGGAACGCCTGCGGAACTTCCACCACCAGGATACGAAT ***********************************	6180 6197
orf20_S orf20_NK-305-2	TCCCGCCGTATCAAATCCATGGTTGTGGCTATGGCCCCTGCATGGACTCCAACGACTGCG TCCCGCCGTATCAAATCCATGGTTGTGGCTATGGCCCCTGCATGGACTCCAACGACTGCG **********************************	6240 6257
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTGGCCCTGCACATCCTGCTGCTCTAATCATACATGTTGCTATGAGGAGCCTATGTTTC ATTGGCCCTGCACATCCTGCTGCTCTAATCATACATGTTGCTATGAGGAGCCTATGTTTC *********************************	6300 6317
orf20_S orf20_NK-305-2	GATGAAAATCCTCAAACACACAAATTCCAAAGAAAAAGTATAGTAACACAAATGTAATAAA GATGAAAATCCTCAAACACACAAAATTCCAAAGAAAA-GTATAGTAACACAATGTAATAAA ****************************	6360 6376
orf20_S orf20_NK-305-2	ACTTA-GTGTTCCTGTATTACTTTAAATCACATTTGACCTATATTCTTCAATTGCTATGT ACTAAAGTGTTCCT-TATTACTTAAAATCACATTTGACCTATATTCTTCAATTGCTATGT *** * ******** *********************	6419 6435
orf20_S orf20_NK-305-2	CATTGTCTAATGATTGAAAGCAAGTACTTTTATTTCTGTGTCATACAAATGTAAGCAAGA CATTGTCTGGTAATTGCAAGCAAGTACTTCTATTTCTGTGTCATACAAATGTAAGCAAAA ******* * **** *******************	6479 6495
orf20_S orf20_NK-305-2	TCAATAAAGAATATATACAACTACGTTAATCAATTGCTACTATCAAACTGCATTTTCTGT TTAATAAAGAATATATACAACTACGTTAATCAATTGCTACTATCAAATTGCATTTTCTAT * ***********************************	6539 6555
orf20_S orf20_NK-305-2	CAAACAACAGTATAATTATTGTGAATTTGTGACGCACTCTAGTAAATAAA	6599 6607
orf20_S orf20_NK-305-2	GTAAGCATTAAATGACTGATTCATCAGCTCTACGCCTATATCACAATTTCAGAGTAGATA CTAAGCATTAAATGACTGATTCATCAGCTCTACGCCTATATCACAATTTCAGAGTAGATA *****************************	6659 6667
orf20_S orf20_NK-305-2	CATTGCGAGATTTCTGTTGTAAGAACCATTTTGATCATGTTTCTGTAACAG-CAACATGA CATTGCGAGATTTCTGTTGTAAGAACCATTTTGATCATGTTGCTGTTACAGACAACATGA ***********************************	6718 6727
orf20_S orf20_NK-305-2	TTTCCAGTATATTTTGTTTACAAATTTCCTTCGTCGAGGAAATTGTGACATTATTA TTTTCAGTAGATTTTGTTTATAAATTTCGTTCGTCGAGGAAATTCTGACATGTATTATTA *** ***** ********* ******* **********	6774 6787
orf20_S orf20_NK-305-2	AGATACCAACTCTACTACTA-AGATACCAACTTAAATTCTGGTATAGGTTCCATTCTAATTAAT	6788 6847

orf20_S		6788
orf20_NK-305-2	CAACTTAGATTCATTCTTAGTTGATTTCACATCTTAATTCGTCAACTTTCATAGAGAACT	6907
orf20_S orf20_NK-305-2	CATCACAGGATAAGCCAGTTTAGTTCAACAATAGTATATTCCCCCGCCAAAATCCACATA	6788 6967
orf20_S		6788
or†20_NK-305-2	ATGTTTTGAGAGTTTTAATTGCAAGTGGTATACCATCAAGCTTTTTCAGTTTTGACTTTG	/02/
orf20_S orf20_NK-305-2	ATTAATCAAGATCAATATAAATCCTTTCCTCGAAAAGAAAAAACGATATAAATCCTAGCT	6788 7087
orf20_S orf20_NK-305-2	CCAATTCGTAAAAGAATTTTACCAAAGTACTTCCTCCGTTTCGTTTCAAATGCAACAAAA	6788 7147
orf20_S orf20_NK-305-2	GGGTATTATTTGTGAGATATAAAATTTCCAATTGTTGCGTTTAAAACGAGATGGAGGAAG	6788 7207
orf20_S orf20_NK-305-2	СGTTAAAAGTTGTAAGACAACAAAATGAAAACAAATGGATAAATTTCATAATATATTCAA СATTAAAAGTTGTAAGACAACAAAATGAAAACAAATGGATAAATTTCATAATATATTCAA * *****************	6848 7267
orf20_S orf20_NK-305-2	CACTACCTTCTTTTGCTCAACATCACATAAACACATCCGCACCTGACAATCATTATTCAT CTCTACCTTCTTTTGCTCAACATCACATAAACACATCCGCACCTGACAATCATTATTCAT * ***********************************	6908 7327
orf20_S orf20_NK-305-2	ТААААСАССССВАТААААТАААТАССАВТТСТВАААТСАТВВАТАТВАААТТСАСАВТААА Таааасасстватаааатаасаавттствааатсатвватваастсасавтааа ********* *************************	6968 7387
orf20_S orf20_NK-305-2	AAAAAGTATTAAAAAACACCAGCTGAGGCAAACACAAGATCAACAAAGAGGTAAAAAATA AAGA-GTATAAAAAAACACCAGCTGAAGCAAA	7028 7418
orf20_S orf20_NK-305-2	AAAAATGGTCG 7039	

*orf20*_s と *orf20*_{NK-305-1}の上流域 5 kbp、*orf20*_s と *orf20*_{NK-305-2}のコード域及び下流域約 5 kbp の塩基配列の アラインメントを示す。右側の番号は各 ORF の開始コドンの第一塩基を+1 として付した。アスタリスク は両者で共通した塩基を示す。

orf20_S	${\tt ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC}$	60
orf20_NK-305-2	ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC	60
<mark>orf18</mark>	ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACTCAACTTGCGTTCC	60

orf20 S	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC	120
orf20 NK-305-2	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC	120
orf18	AAAACATTTGGTACTATTCCAACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC	120

500.0		4 7 7
orf20_S		1//
orf20_NK-305-2		1//
ort18	AA I CAA I C I AC I AA <mark>I AA</mark> G I G I AG I GGG I I A I I I GGG I C I GCAAAA I C I GGG I A I I I I AA I	180

orf20_S	GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT	237
orf20_NK-305-2	GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT	237
<mark>orf18</mark>	GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT	240

	CCTCATAAAACCCAACTAACTCTTCAATCATCCCTCCAAAAATTACTTCTT	207
01120_3 orf20 NK-205-2	COTCATAAAACCCAAACTAACTGTTCAATCATCATCCCCCCCAAAAATTACTTCTTCCAAATTGCA	297
$\frac{120}{120}$		200
	***************************************	500
orf20_S	CTAAT <mark>G</mark> TTGA <mark>G</mark> T <mark>AC</mark> TGGTATA <mark>T</mark> TTG <mark>C</mark> TTACC <mark>G</mark> TCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT	357
orf20_NK-305-2	CTAAT <mark>G</mark> TTGA <mark>G</mark> TACTGGTATA <mark>T</mark> TTG <mark>C</mark> TTACC <mark>G</mark> TCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT	357
<mark>orf18</mark>	CTAAT <mark>C</mark> TTGA <mark>CTTT</mark> TGGTATA <mark>C</mark> TTG <mark>G</mark> TTACC <mark>C</mark> TCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT	360
	***** **** * ****** *** **** **********	
orf20_S	ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTAT <mark>A</mark> TCAACAACT <mark>GA</mark> TGAGAATGAAA <mark>AG</mark> GGAGAAGTT	417
orf20_NK-305-2	ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTAT <mark>A</mark> TCAACAACT <mark>GA</mark> TGAGAATGAAA <mark>AG</mark> GGAGAAGTT	417
orf18	ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTAT <mark>G</mark> TCAACAACT <mark>CG</mark> TGAGAATGAAA <mark>TT</mark> GGAGAAGTT	420

	CACAACCCCAAAATACAACCTCCTACACACCCCTCATACTCATACCCTTACCTCAATATTC	777
orf20_NK_205_2		4// /77
$\frac{120}{120}$		477
	***************************************	400
orf20_S	CAACACATTCTTGAATCACTGGAAAGAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAA	534
orf20_NK-305-2	CAACACATTCTTGAATCACTGGAAAGAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAA	534
<mark>or†18</mark>	CAACACAIICIIGAAICACIGGAAAGAGAGAGAIIAAICACCAIGAACICGAACICGAA <mark>CIC</mark>	540

orf20_S	AGAGATGAAACTTTCAAGGAGATAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAA	591
orf20_NK-305-2	AGAGATGAAACTTTCAAGGAGATAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAA	591
<mark>orf18</mark>	GAAAGAGATGAAACTTTCAAGGAGAAAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAA	600

付図 5-11 orf2	0s、 orf20 _{NK-305-2} 、及び orf18 のコード域の塩基配列のマルチプルアラ	インメント

<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	GATAGTAGGAAGAAGCATAGTGGGGGCTAAGATAACTACTACCATTTGGAAGGGTTGAAT GATAGTAGGAAGAAGCATAGTGGGGGCTAAGATAACTACTACCATTTGGAAGGGTTGAAT GATAGTAGGAAGAAGCATAGTGGGGGCTAAGATAACTACTACCATTTGGAAGGG <mark>A</mark> TGAAT **********************************	651 651 660
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TGGGAAATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTGTTTATTTGGTGGGAAG TGGGAAATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTGTTTATTTGGTGGGAAG TGGGAAATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTA **********************************	711 711 720
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	ATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATT ATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATT ATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATT *******************************	771 771 780
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	ATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGG ATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGG ATCGCGCATCAGGTATATAAAACTATTCA TGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGG *********************************	831 831 840
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TTAATAGAACTATACAAAAAA <mark>CATGAAAGGAATTATATGAAAAAA</mark> ACTGATGAATTTTA TTAATAGAACTATACAAAAAA <mark>CATGAAAGGAATTATATGAAAAAAA</mark> ACTGATGAATTTTA TTAATAGAACTATACAAAAAA *************************	891 891 875
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	Ex GGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCAATGTGGTGGTATGTAT	on 2 951 951 935
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	GGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATG GGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATG GGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATTCGACAGCATTTTTCTGGTTGTTAATA ***************************	1011 1011 995
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TCCCTCTACGTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGA TCCCTCTACGTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGA TCCCTCAACGTGATATTATTTAAAATTCTATTTACTGAGCCTGAATCTGCCAATGCAAGA ****** ******** *******************	1071 1071 1055
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TCAAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTGCAAAAGTAAGT	1131 1131 1115
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACAT TTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACAT TTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACAT *******************************	1191 1191 1175

付図 5-11 orf20s、 orf20_{NK-305-2}、及び orf18 のコード域の塩基配列のマルチプルアラインメント

<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	ATGTTACTGCATAATTGCAAAACATATCACATTGCCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTT ATGTTACTGCATAATTGCAAAACATATCACATTGCCCCGGACCTAGTCACTTGTTTCATTT ATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTACAT-GCCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTT *******************************	1251 1251 1234
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	GTCAGCGATTTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGA GTCAGCGATTTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGA GTCAGCGATTTCATTTAGA <mark>T</mark> ATCCATTTGA <mark>G</mark> AGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGA *******************	1311 1311 1294
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	ATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAGGGTGTGATGCTAA <mark>C</mark> AAAATCTAATCCATTACT ATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAGGTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCATTACT ATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAGGGTGTGATGCTAA <mark>T</mark> AAAATCTAATCCATTACT *********************	1371 1371 1354
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	GAGTAATGGTTTTGGATCAATATATGGATTGCTATATTCCACA <mark>T</mark> ATTCTATACTTTGCCG GAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGATTGCTATATTCCACAGATTCTATCCTTTGTCG GAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGATTGCTATATTCCACAGATTCTATCCTTTG ********************************	1431 1431 1414
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	CAGATAACATTAAATTGATGTTGTTTATTTACATTTGACACATTAAAATTGAGTTGTGGA CAGATAACATTAAATTTATGTTGTTGTTTATGCACATTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGA CAGATAACATTAAATTTATGTTGTTTATGCACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGA ********************	1491 1491 1474
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	CTATAATATATATG <mark>C</mark> GAGTTAGGTAACATA <mark>GA</mark> GTGTCAATTTACAG <mark>G</mark> GTTTGGAAGATTA CTATAATATATATGTGAGTTAGGTAACATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTA CTATAATATATATGTGAGTTAGGTAACATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGGAAGATTA ***********************	1551 1551 1534
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TTCAGGCTAGA <mark>TT</mark> TC <mark>AT</mark> CAATTACTGCCACGAACTA <mark>C</mark> CT <mark>TGC</mark> ACTTG <mark>GGCT</mark> TTCTTGGAT TTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGCCACGAACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGAT TTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGCCACGAACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGAT *********** ** **********************	1611 1608 1591
<mark>orf20_8</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TGT <mark>C</mark> TTCCTTGGTGTTTATTCTTTATTTTTGGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTG TGTTTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATTATGGTCGGAAGGAA	1671 1668 1651
<mark>orf20_8</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	GAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACA GAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACA GAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACA ***********************************	1731 1728 1711
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	AGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGAACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGA AGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGAACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGA AGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGAACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGA *******************************	1791 1788 1771

付図 5-11 orf20s、 orf20_{NK-305-2}、及び orf18 のコード域の塩基配列のマルチプルアラインメント

付図 5-11 orf20s、 orf20_{NK-305-2}、及び orf18 のコード域の塩基配列のマルチプルアラインメント 3 つの orf20 様遺伝子を比較し、多型残基のうち orf20s型を黄緑、orf18 型を黄色で塗りつぶし、 それらの色を用いて orf20_{NK-305-2} に見られる多型残基がいずれの型であるかを塗り分けて示した。 ただし、orf20_{NK-305-2}特異的な一塩基置換(1238 番目の塩基)についてはピンクで示している。右側 の番号は開始コドンの第一塩基を+1 として付した。アスタリスクは全ての配列で共通した塩基を 示す。
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQST <mark>K-</mark> CSGLFGSAKSGYFN MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQST <mark>K-</mark> CSGLFGSAKSGYFN MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQST <mark>NK</mark> CSGLFGSAKSGYFN ************************************	59 59 60
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKLLLGIALMLSTGIFAYRHVHPVVVPY GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKLLLGIALMLSTGIFAYRHVHPVVVPY GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFGILGYPHVHPVVVPY *********************************	119 119 120
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	TGRKHYVL <mark>I</mark> STTDENEKGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELE TGRKHYVLISTTDENEKGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELE TGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEREINHHELELEL ******** *** *** ***	178 178 180
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	RDETFKE <mark>I</mark> TIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEG <mark>L</mark> NWEIFVVDKPLVESS <mark>C</mark> LFGGK RDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLFGGK ERDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLLGGK ****** *****************************	237 237 240
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	IVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMSLYVIIFEVLFTARK IVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMSLYVIIFEVLFTARK IVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPE ***********************************	297 297 300
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	FANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQAR <mark>FH</mark> QLLPRT <mark>TLHLGFL</mark> GL <mark>S</mark> SLVFILY <mark>F</mark> GRKEIEADH FANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRT <mark>IC-LSLV</mark> GLFSSVFILYYGRKEIEADH SANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRT <mark>IC-LSLV</mark> GLFSSVFILYYGRKEIEADH ************************************	357 356 359
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	IGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYN IGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYN IGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYN *******************	417 416 419
<mark>orf20_S</mark> orf20_NK-305-2 <mark>orf18</mark>	EVVAGRAIQGLQ 429 EVVAGRAIQGLQ 428 EVVAGRAIQGLQ 431	

付図 5-12 orf20s、orf20_{NK-305-2}、及び orf18 の翻訳産物のアミノ酸配列のマルチプルアラインメント

3 つの orf20 様遺伝子の翻訳産物を比較し、orf20s型のアミノ酸残基を黄緑、orf18 型を黄色で塗りつぶ し、orf20_{NK-305-2} に見られる多型残基がいずれの型であるかを塗り分けで示した。アスタリスクは全ての配 列で共通したアミノ酸残基を示す。

orf19 orf20_NK-305-2	ATAAAATGATAAAAAAAAAAAAACACACACATCATAAGTAACCGATTAA-ACAAGT AAATATAGTCATGTGGGATCTTATTAAATTCAACATGACATGTATTTTATTAATATGTAC *** * * ** * * * * * *** **** **** **	-3448 -3441
orf19 orf20_NK-305-2	CACAAATAGGTTAAAACTCAATAGAAGAAGAAACAGACATACAAACCTAACTCAACCAAGGA TTTTTATAATTTTTACAAATACAAAACTAAAGATATATGTCTCAAAGTTTTGCATTGA *** ** * * **** ** * *** *** ***	-3388 -3383
orf19 orf20_NK-305-2	TAATCAAAAGGTAGATTTAAAATGAGAAAACGCGCAAAACATGCGTGAAAAGTGTAACTGTGTAGATT-AAAATGAAACGAAGGGAGTACAATCTTAGC** <tr< td=""><td>-3349 -3324</td></tr<>	-3349 -3324
orf19 orf20_NK-305-2	-ATTGACTTATTTAAAACAATTTTTCCAAAAAAAAAA	-3297 -3269
orf19 orf20_NK-305-2	A-ACATCGTCTAGGATAATATTGAAGGATGGACAACAATAAACTAAAAAGTTACAATCAC ACACATAGTCTAGCATAATATTGAGGGATGAACAACAATATAATACACTAAAA * **** ****** ****************	-3238 -3216
orf19 orf20_NK-305-2	ATCATTATTTTGCAGTTGTAGTTCCATTTGCAGCAGAAGCAAGATGCAAAAATGAAGCAC AGTTAGTTTGCAGTTGTAGTTCCATTTGTAGCAGAAGCAAGATGCAAAAATGAAGCAC *** ********************************	-3178 -3158
orf19 orf20_NK-305-2	CCCCACCAATATCAGGGGTAGCAACACCAGCTCCAGCACCAGTGCCGCCGCCGCCGCTAGCAG CCCCACCAATATCAGGGGTAGCAACACCAGCTCCAGCACCAGCGCCGCCGCCGCCGCTAGCAG **********************************	-3118 -3098
orf19 orf20_NK-305-2	TAACACCTACAGGCGTACCAGCATATCAAATTCACGGTTGTGGCTACCCGTGCAGTGACT TAACACCTACAGGCGTACCAACATATCAAATTCACGGTTGTGGCTACCCGTGCAGTGACT ************************************	-3058 -3038
orf19 orf20_NK-305-2	CCAATGACTGTGATTGGCCTTGTACTATATGCTGTGGCCAAAACCAAACTTGTTGTTATG CCAATGACTGTGATTGGCCTTGTACTATATGCTGTGGCCAAAACCAAACTTGTTGTTATG ****************************	-2998 -2978
orf19 orf20_NK-305-2	ATTTGCCTTTCGATGGTTAACATAAAACAGCACTTTTTTTT	-2938 -2919
orf19 orf20_NK-305-2	GGTACTACAATAAATAATGTTATACAATTCCACATAAACTTAGTAATCTATCATAATAAT GGTACTACAATAAATAATGTTATACAATTCCACATAAACTTAGTAAGTTGTCACAATAAT *****************************	-2878 -2859
orf19 orf20_NK-305-2	GTTCAATAATGAAGTACTAAATCCAGTCTCTCGTGATTCAACTAGAAAATCTCTTCTAGC GTTCAATAATGAAGTACTAAATCTAGTCTCTCGTGATTCAACTAGAAAATCTCTTCTAGC ************************************	-2818 -2799
orf19 orf20_NK-305-2	TCACTAGATGGTCCTTCTACGATAGCATGGTTTCGAACTTTTCGATTCATTAGAATTGAA TCACTAGATGGTCCTTCTACGATAGCATGGTTTCGAACTTTTCGATTCATTAGAATTGAA ***************************	-2758 -2739

orf19 orf20_NK-305-2	TTATGTATATTTCTACTTGTGTTTGATTCAATCCTGCCAATAATGTGATTTATACATGGT TTATGTATATTTCTACTTGTGTTTGATTCAATCCTGCCAATAATGTGATTTATACATGGT **********************************	-2698 -2679
orf19 orf20_NK-305-2	GGTATAAGATTGTAACCGTTATTGTTGTATTGTATTCATCATATTTATAATCCCTCTATC GGTATAAGATTGTAACCGTTATTGTTGTATTGTA	-2638 -2619
orf19 orf20_NK-305-2	TCTAATTGTTTGCTTAATTTGAGGATTAATTAAGGTTGGCCTAGTGGTTGTGAGGTCCCT TCTAATTGTTTGCTTAATTTGAGGATTAATTAAGGTTGGCCTAGTGGTTGTGAGGTCCCT ********************************	-2578 -2559
orf19 orf20_NK-305-2	CTACCACCTATTGAATAGGAGCTCGATTCTCACCTTTTGCAAATTCTTGTAAGGAAATGC CTACCACCTATTGAATAGGAGCTCGATTCTCACCTTTTGCAAATTCTTGTAAGGAAATGC ************************************	-2518 -2499
orf19 orf20_NK-305-2	TCCTTATCTTAAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	-2458 -2440
orf19 orf20_NK-305-2	TCCGATTTCAAAGACAGTATTCGAGTATTGTATTATTTTCAGTTACGTGGTAGTAAAATT TCCGATTTCAAAGACAGTATTCTAGTATTGTATT	-2398 -2380
orf19 orf20_NK-305-2	AAAAAGAAATTGTGATAGTTTGAAAATATGTGTTAAGAAACTCAAAGATCTTAGATCTTA AAAAAGAAATTGTGATAGTTTGAAAATATGTGTTAAGAAACTCAAAGATCTTAGATCTTA *********************************	-2338 -2320
orf19 orf20_NK-305-2	GATCTGCCGTTGCACAACGTAACTTAACTAGACCTTTAATATCCCATTGTAAATGATTAA GATCTGCCGTTGCACTACGTAACTTAACT	-2278 -2260
orf19 orf20_NK-305-2	AAATTACAAAAAGTTGATATTTGGAAAGTATATTTTGAGACGAATGACTATGACAGACA	-2218 -2200
orf19 orf20_NK-305-2	ACTACATTAGATGAATAATGTCAAAATTCAATATGAACCACTAAAAACGGAGGAAGTATA ACTACATTAGATGAATAATGTCAAAATTCAATATGAACCACTAAAAACGGAGGAAGTATA ***************************	-2158 -2140
orf19 orf20_NK-305-2	TATGAATTCAGATCGTCAAAATCAGGGATGTCTCAGACAATTTAGGGGTCCCGTGCCATC TATGAATTCAGATCGTCAAAATCAGGGATGTCTCAGACAATTTAGGGGTCCCGTGCCATC **********************************	-2098 -2080
orf19 orf20_NK-305-2	CATTTTATTAATACACATCTTTTTGTAAGGTATATTAGTACATAATTTGATTCCTTAATG CATTTTATTAATACACATCTTTTTGTAAGGTATATTAGTACATAATTTGATTTCTTAATG *********************************	-2038 -2020
orf19 orf20_NK-305-2	AACTAGAACT-TTTTATTCTAAGGTCTTGTTTGGTTGACAAAACAAA	-1979 -1960

orf19 orf20_NK-305-2	AAATTCCTAGAAAGTAGAAGTATATGAATAAGTTGTTTGGTTGG	-1919 -1900
orf19 orf20_NK-305-2	TGTACTTCTTAGGAAGTTCTACTTCCTCCAAAATGGAGGAAGTTACTTAC	-1859 -1840
orf19 orf20_NK-305-2	CTAGATAAGTAGAGCTTCCCATAGGAAGTTCTACTTCCCATTATCAACCAAACACAATTT CTAGATAAGTAGAGCTTCCCATAGGAAGTTCTACTTCCCATTATCAACCAAACACAAATTT **********	-1799 -1780
orf19 orf20_NK-305-2	TACACTTCCTAGGAATTTCAAATACATGGAAAAAATAACTTCCTAGGAAGGCTAGAACCG TACACTTCCTAGGAATTTCAAATACATGGAAAAAATAACTTCCTAGGAAGGCTAGAACCG ********************************	-1739 -1720
orf19 orf20_NK-305-2	TGCATTTTGAGTAAAAAAATTAACTAAACAGGTTGAAACTTTTTATTTGTATATCATATA TGCATTTTGAGTAAAAAAATTAACTCAACAGGTTGAAACTTTTTATTTGTATATCATATA ****************************	-1679 -1660
orf19 orf20_NK-305-2	AAATTTTTGTTGCATCAGTCAAAAGTAACAGAGGGTTCAAATTGCGGAATTCGTTCCTCA AAATTTTTGTTGCATCAGTCAAAAGTAACAGAGGGGTTCAAATTGCGGAATTCGTTCCTCA ********************************	-1619 -1600
orf19 orf20_NK-305-2	TATACTTAGATGTACGGTTGACATGGTACACTCAATACTAATTTATGTTCATTTGCTTAT TATACTTAGATGTACGGTTGACATGGTACACTCAATACTAATTTATGTTCATTTGCTTAT **********************************	-1559 -1540
orf19 orf20_NK-305-2	TTAGAATTCTCTTATTTAATATATTTTGTTCATTTGAATGATTTCAAATAAAT	-1499 -1480
orf19 orf20_NK-305-2	AAAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACATTTAGGTATATGATAAAATTTGTA AAAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACATTTAGGTATATGATAAAATTTGTA **************	-1439 -1420
orf19 orf20_NK-305-2	САААТТТТААТGAAAAAAAAAATGTTGAAACAAAAATTTAAACTAAGCTACAGTTGACTT САААТТТТААТGAAAAAAAAA-TGTTGAAACAAAAATTTAAACTAAGCTACAGTTGACTT ***********************************	-1379 -1361
orf19 orf20_NK-305-2	TTAAGCTCTCTCCTTTTCTGATGCAACAAAGATTTGTTTTAGCACTAGCTACTTCTTCTA TTAAGCTCTCCCTTTTCTGATGCAACAAAGATTTGTTTCAGCACTAGCTACTTCTTCTA ***************************	-1319 -1301
orf19 orf20_NK-305-2	TCCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACTCAAATTTCATCAATTTTGATTATATT TCCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACTCAAATTTCATCAATTTTGATTATATT ************************	-1259 -1241
orf19 orf20_NK-305-2	TTTTCACCATGTAAGAAAATATCTTATCAGGAGTTTTTTGTAATCGAGGAAACCCATATA TTTTCACCATGTAAGAAAATATCTTATCATGAGTTTTTTGTAATCGAGGAAACCCATATA ****************************	-1199 -1181

orf19 orf20_NK-305-2	GGAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATATCAACAAGAAAATCACATTGTTCA GGAAATTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATATCAACA	-1139 -1139
orf19 orf20_NK-305-2	TAGGAAAACTCCTATAACATTTGCATACATTGTAGGTCTTTGTTGCACTTTAATCCCTCG GGAAAACTCCTATAACATTTGCATACATTGTAGGTCTTTGTTGCACTTTAATCCCTCG ********************************	-1079 -1081
orf19 orf20_NK-305-2	GGCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTTAATCTACGTTTTTTTCTATTGCAACAATTA GGCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTTAATCTATATTTTTTTCTATTGCAACAATTA ******************************	-1019 -1021
orf19 orf20_NK-305-2	CTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTTCACTTTTGGTATAAAAAGCAATAT CTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTTCACTTTTGGTATAAAAAGCAATAT *********************************	-959 -961
orf19 orf20_NK-305-2	TTCAGAACAAAGCAGCATTGTGCACCCGAGAGAACATACCATTCATATAGAAGAATATGA TTCAGAACAAAGCAGCATTGTGCACCCGAGAGAACATACCATTCATATAGAAGAATATGA ***********************	-899 -901
orf19 orf20_NK-305-2	TTTTTTTCAACAACTTTTCAAGATAAAAAAAGCATACAATATAAAATTAAAGAACATGT TTTTTTTCAACAACTTTTCAAGATAAAAAAAGCATACAATATAAAATTAAAGAACATGT ***********************************	-839 -841
orf19 orf20_NK-305-2	АААТСТССААСААСАТТТGAAAAAACCTAAAAAAAGCATCTATTGTAAATGAACATTT АААТСТССААСААСАТТТGAAAAAACCTAAAAAAAGCATCTATTGTAAATGAACATTT ********************************	-779 -781
orf19 orf20_NK-305-2	АGTCTAAATTTAAAGAACCTAACTTTTAAATGTAAAAATTTGAAAAAAGGAATCTCGCCA Agtctaaatttaaagaacctaacttttaaatgtaaaaatttgaaaaaaggaatctcgcca ********************	-719 -721
orf19 orf20_NK-305-2	ACAACCATTTTTCCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAAC– ACAACCATTTTTCCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAACA ************************	-660 -661
orf19 orf20_NK-305-2	TTTTTCTTAAATCATAAATTCTTAAAATATTAAACCTACATCGTTTAACAGAAGGTGCAC TTTTTCTTAAACCATAAATTCTTAAAATATTAAACCTACATCGTTTAACAGAAGGTGCAC *********** ************************	-600 -601
orf19 orf20_NK-305-2	CATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCCTATTTGCGCTTTTCCATTCCCTAAAAAAC CATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCCTATTTGCGCTTTTCCATTCCCTAAAAAAC ******************	-540 -541
orf19 orf20_NK-305-2	CGAGTCTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGAAGTCCTCTCAAAAAAAA	-481 -481
orf19 orf20_NK-305-2	CTAGTTGTCGTAGACTCTCAGCATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTT CTAGTTGTCGTAAACTCTCAGCATGTGTCATTTAAAGACTCGTAACGCATTGACGCACTT ************ ***********************	-421 -421

orf19 orf20_NK-305-2	ACTCGAAATATTTTGTTCCATTTATTAGAGAAAATTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAA -361 ACTCGAAATATTTTGTTCCATTTATTAGAGAAAATTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAA -361 ************************************
orf19 orf20_NK-305-2	ATCAACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAAACGAATGACTCTCGATA -301 ATCAACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAAACGAATGACTCTCGATA -301 ************************************
orf19 orf20_NK-305-2	ATAGTACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTGCGTAGTGCATAGCTGGCTG
orf19 orf20_NK-305-2	AAATCTTTTGCACAGAGAAAACTTTTGCACTTTCGGAATTCAGTAGGAATATCATAACCA -181 AAATCTTTTGCACAGAGAAAACTTTTGCACTTTCGGAATTCAGTAGGAATATCATAACCA -181 ***********************************
orf19 orf20_NK-305-2	TTTATGGAAGCAACAACTCTTGTGACCCATTTCATCTAAAATCTTAATCTCGTAAATTTT -121 TTTATGGAAGCAACAACTCTTGGGACCCATTTCATCTGAAATCTTAATCTCGTAAATTTT -121 ***********************************
orf19 orf20_NK-305-2	ACCTTTCAAAAATTCAAAAATCACATAATTTTTTTGGTATGTTACTTGAACCCAGTTCAT -61 ACCTTTCAAAAATTCAAAAATCACATAATTTTTTTTGGTATGTTACTTGAACCCAGTTCAT -61 ************************************
orf19 orf20_NK-305-2	AACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCAGCTTTTGTTGTTCAAAAATC -1 AACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCAGCTTTTGTTGTTCAAAAATC -1 ************************************

右側の番号は各 ORF の開始コドンの第一塩基を+1 として付した。アスタリスクは両者で共通した塩基 を示す。

	Data Coverage									84.30%	95.70%	80.43%	95.05%	93.98%	95.91%	85.16%
	Max Time												ı	65.00		
	Min Time	-	-	-		ı	-	-	-	-	-	-		56.00		1
	CI_Upper				ı	ı				19.76	23.29	50.73	65.00	65.00	65.00	
	CI_Lower	I	Ţ	Ţ	I	I	I	Ţ	I	0.00	0.00	0.00	11.36	56.00	38.64	1
	DivTime	-	-	-	ı	ı	-	-	-	6.31	7.38	19.60	35.05	56.00	49.08	-
	Rate	2.09	2.76	0.28	0.92	0.49	0.52	0.66	0.80	2.40	0.50	0.50	0.58	0.80	1.10	0.80
	StdErr(RelTime)									0.02	0.02	0.05	0.04	0.01	0.02	0.00
	RelTime	I	I	I	I	I	I	I	I	0.02	0.03	0.07	0.13	0.21	0.18	0.32
	Des2					ı				2	9	4	10	12	11	8
	Des1	I	I	I	ı	I	I	I	I	1	5	3	L	14	6	13
JEAL	NodeId	1	2	3	4	5	9	7	8	6	10	11	12	13	14	15
	Node Label	ORF20_NK-198	ORF20L_KWS2320	BvOMA1-1	BvOMA1-2	CqOMA1-1	CqOMA1-2	SoOMA1	AtOMA1	ı	1	1	1	1	T	

付表5-2 のf20様遺伝子の分岐年代推定

Reltree(Tamura *et al.* 2012)によって分岐年代を推定した。近隣結合法により、アミノ酸配列に基づいて系統関係を推定した。進化距離はPoisson correction法に基づいて推定し、サイト 間の変異率のばらつきをγ分布に基づいてモデル化した(shape parameter = 5)。アミノ酸配列全長を解析に供試したが、アラインメントされたアミノ酸残基のうち、ギャップを含むも のを全て除いた。Chenopodiaceae-Betoideaeの分岐に対し、Chenopodipollis multiplexの花粉粒の化石記録(65-56 Mya; Hohmann et al. 2006)に基づいて制約を付した。灰色で塗りつぶした行 は、orf20様遺伝子の分岐に関する情報である。DivTimeは分岐年代を示し、CIは95%信頼区間を示す。