



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	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91049">http://hdl.handle.net/2115/91049</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Takumi_Arakawa.pdf



[Instructions for use](#)

# 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

## 目次

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 <i>Rfl</i> 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 <i>Rfl</i> の分子進化学的解析	... 87
第 6 章 総合論議	... 133
摘要	... 143
引用文献	... 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  $\alpha$ -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 Blik *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かるリソースが 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いている (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その他、CMS 研究を推進したのは育種的な要請である (Kim and Zhang 2018)。F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> ハイブリッド育種には、雄性不稔系統 ([S]*rflf*)、維持系統 ([N]*rflf*、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 Oma1 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<sub>1</sub> 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* は分子の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 *Rf1* 領域が同定された。この領域には出芽酵母 *Oma1* 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)。*Oma1* 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<sub>NK-198</sub>* 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 *Rfl* の分子的实际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。

*rfl* 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 *Rfl* 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、*Rfl* 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-Rfl* と共通している。これより、テンサイ *Rfl* と *PPR-Rfl* 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-Rfl* ではほとんど解析が進んでいない多様な分子バリエーションの機能的側面について、テンサイ *Rfl* 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 *Rfl* 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、*Rfl* 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 *Rfl* 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 *rfl* 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 *Rfl* 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、*Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* それぞれの分子の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 *Rfl* 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. 花粉稔性調査

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- $\Omega$  (松永 2012) へクローニングした。

## 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°C、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°C、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、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°C、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°C、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°C 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  $\mu$ l 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-Na<sub>2</sub>、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°C、5,500 g で 10 分間遠心した後、上清を回収し、4°C、6,500 g で 10 分間再び遠心した。上清を回収し、4°C、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-Na<sub>2</sub>] に懸濁し、再び 4°C、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, Hercules, 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-riendol, 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  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{l}$  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°C、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、破碎した後、1% (w/v) digitonin 及び Protein Inhibitor Cocktail for plant cell and tissue extracts (Sigma) を含んだ 1 x NativePAGE™ sample buffer (Invitrogen) を 30  $\mu\text{l}/\text{mg}$  (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°C、11,000 g で 15 分間遠心し、上清を回収した。さらに、4°C、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-dimethylacrylamide (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 の未熟葯を破碎し、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。17,000 g 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、17,000 g 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、PowerUp™ 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  $\Delta C_t$  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-*Rfl* 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成した。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与す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]*RflRfl*) 由来の遺伝子コピー *orf20<sub>NK-198</sub>*、及び維持系統 TK-81mm-O ([N]*rflrfl*) 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  $\Omega$  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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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-*Rfl* 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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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、*rfl* 由来の *ORF20L* ではこれが認められないことが分かった。

### **ORF20<sub>NK-198</sub> 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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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preSAMP6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preSAMP6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preSAMP6及びORF20<sub>NK-198</sub>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preSAMP6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分子バリエントに含まれるorf20様遺伝子の相互作用解析

ORF20<sub>NK-198</sub>の示すpreSAMP6とのタンパク質間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様遺伝子分子バリエ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由来の分子バリエントの他、2種類のバリエントが見つまっている(Ohgami *et al.* 2016)。これら2種の分子バリエントに含まれる3つのorf20様遺伝子コピー(図2-5、orf20<sub>S</sub>、orf20<sub>NK-219-2</sub>及びorf20<sub>NK-219-3</sub>)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、orf20<sub>S</sub>導入カルスでは44kDa及び41kDa、orf20<sub>NK-219-2</sub>及びorf20<sub>NK-219-3</sub>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preSAMP6複合体を調査した(図2-6)。orf20<sub>NK-198</sub>導入カルス由来のサンプルでは、抗preSAMP6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る、preSAMP6とORF20様遺伝子の翻訳産物のタンパク質間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。orf20<sub>S</sub>、orf20<sub>NK-219-2</sub>及びorf20<sub>NK-219-3</sub>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薬においてpreSAMP6の250kDa複合体は著しく減少する

次に、この相互作用が薬においてpreSAMP6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 (orf20<sub>S</sub>保持系統)及びTA-33BB-CMS x PI 518644 (orf20<sub>NK-219-2</sub>-orf20<sub>NK-219-3</sub>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 F<sub>1</sub> 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 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> から得られた *Rflrfl* 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 *rfl* アレルと、由来の異なる *Rfl* もしくは *rfl* をヘテロ接合で保持する。

*Actin* 及び *Efla* 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 > 小孢子期のように、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
N	大きく裂開し、花粉が大量に飛散	レモン色	3	可稔 〔 $2 \leq$ (平均指数) 〕
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	
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 〔 $1 \leq$ (平均指数) < 2〕
C.S.	非裂開	白色	0	不稔 〔 (平均指数) < 1 〕

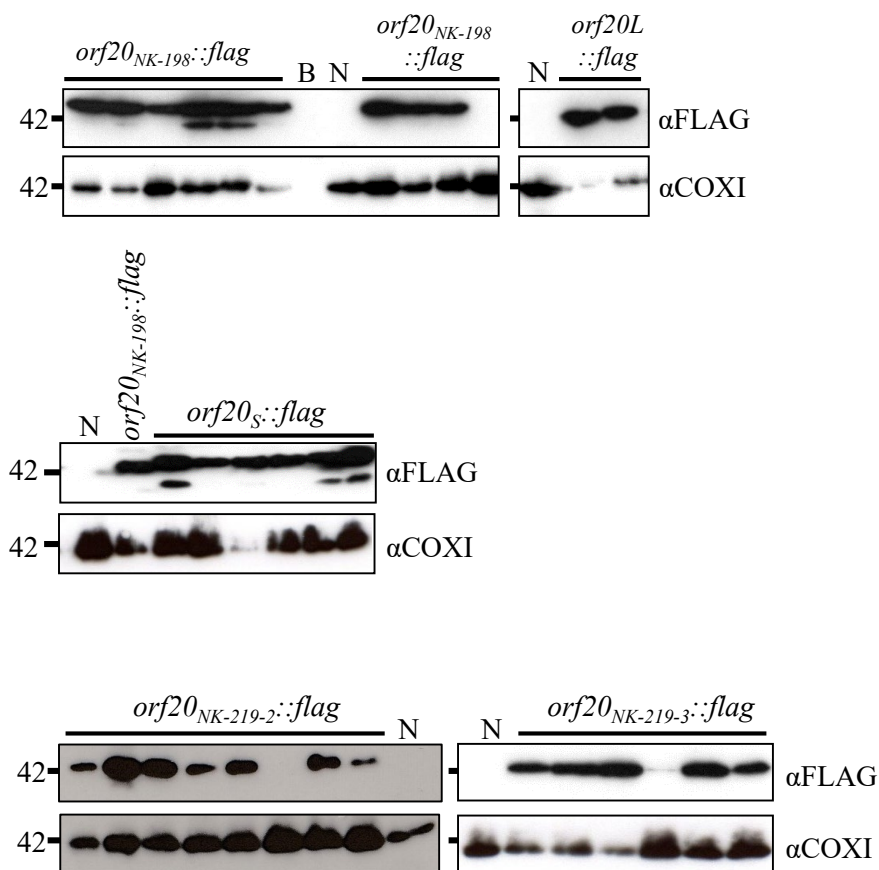


図2-1 導入遺伝子由来のタンパク質蓄積確認実験

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 ( $\alpha$ FLAG) は100 ng/ml、抗COXI抗体 ( $\alpha$ COXI) は42.5 ng/mlで反応に用いた。*orf20<sub>NK-198</sub>::flag*、*orf20<sub>L</sub>::flag*、*orf20<sub>S</sub>::flag*、*orf20<sub>NK-219-2</sub>::flag*及び*orf20<sub>NK-219-3</sub>::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。



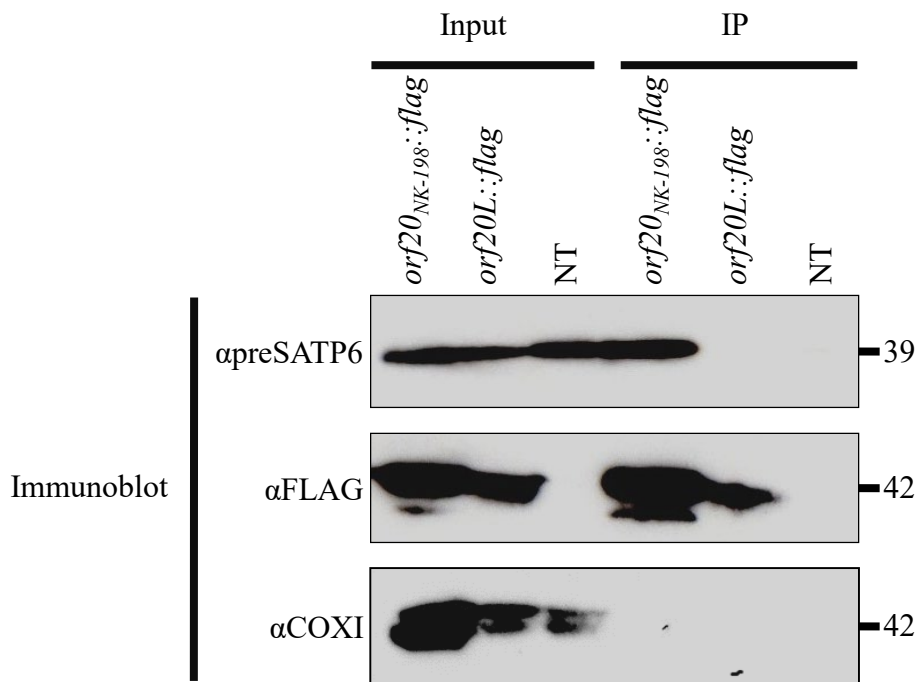


図2-2 共免疫沈降法によるORF20-preSASP6タンパク質間相互作用解析

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preSASP6抗体（αpreSASP6）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<sub>NK-198</sub>::flag*および*orf20L::flag*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。

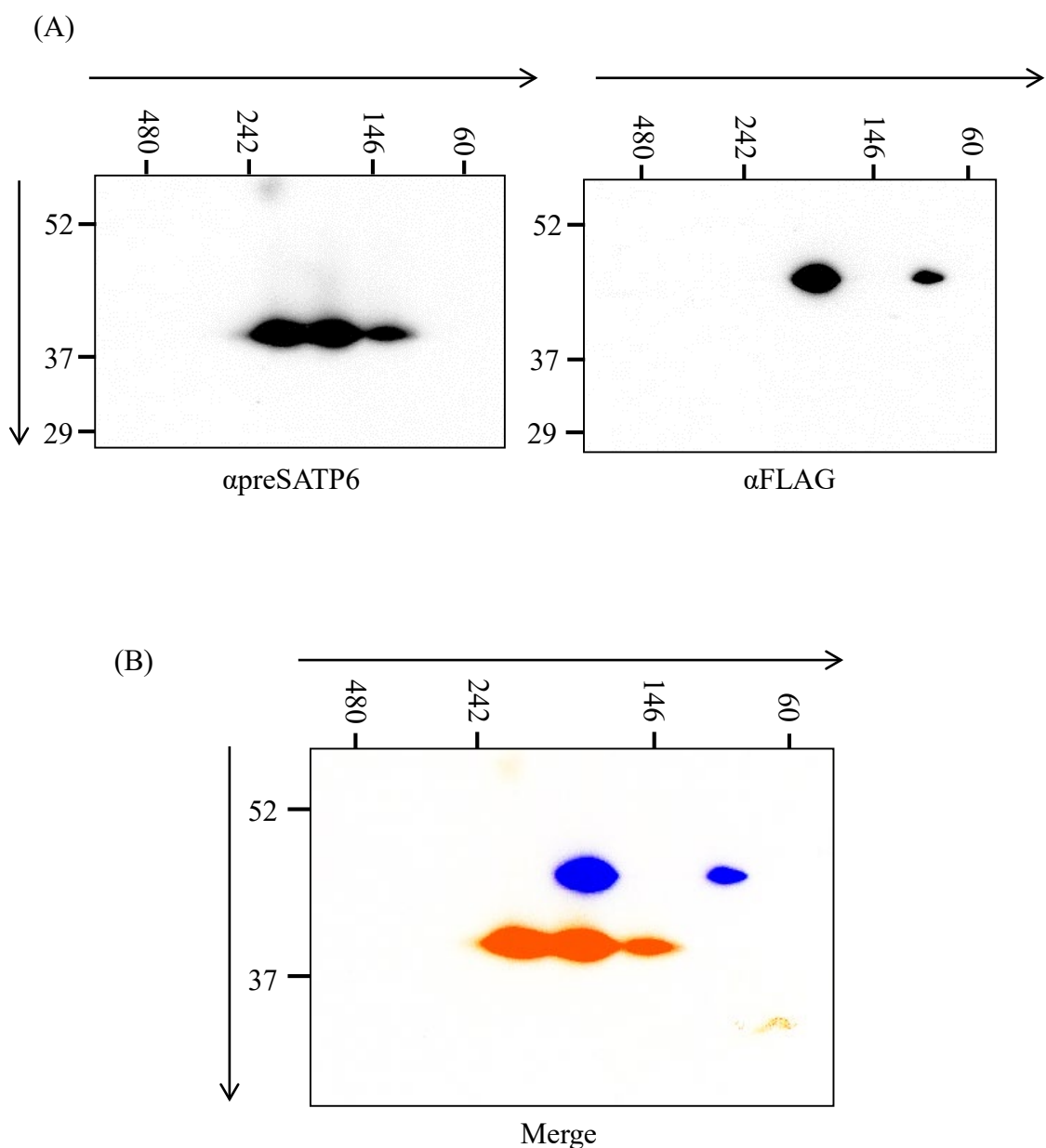


図2-3 *orf20*<sub>NK-198::flag</sub>導入カルの粗ミトコンドリアタンパク質を用いた二次元電気泳動  
 (A) 粗ミトコンドリアタンパク質を、一次元目（水平方向）にBlue-native PAGE、二次元目（垂直方向）にSDS-PAGEによって分離し、ウェスタンブロット解析によって検出した。矢印は泳動の方向を示す。抗preSATP6抗体（ $\alpha$ preSATP6）は340 ng/ml、抗DDDDK抗体（ $\alpha$ FLAG）は100 ng/mlで反応に用いた。付した数字はタンパク質の分子量（kDa）を示す。  
 (B) Aで示した泳動像を重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。

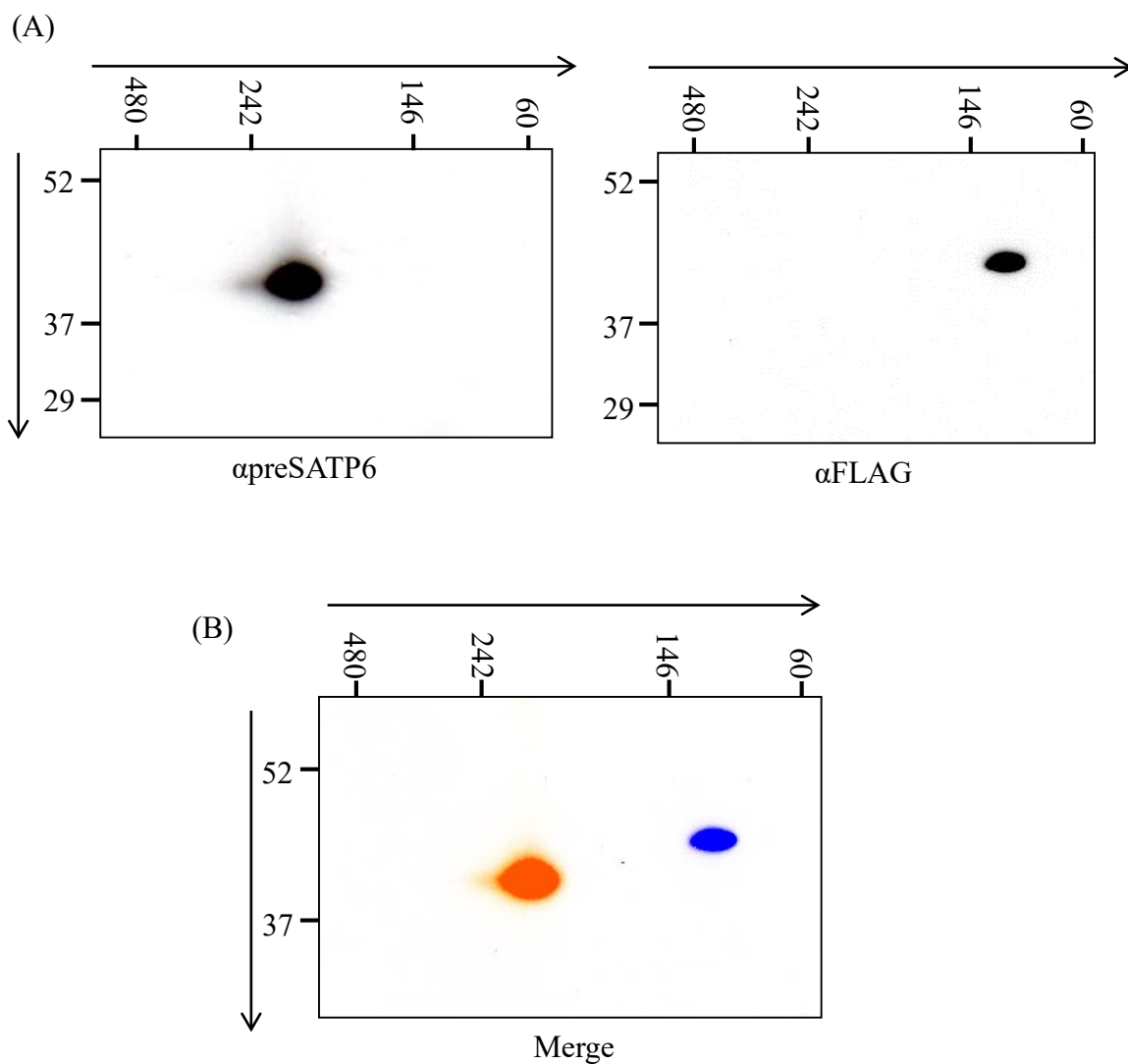


図2-4 *orf20L::flag*導入カリスの粗ミトコンドリアタンパク質を用いた二次元電気泳動  
 (A) 粗ミトコンドリアタンパク質を、一次元目（水平方向）にBlue-native PAGE、二次元目（垂直方向）にSDS-PAGEによって分離し、ウェスタンブロット解析によって検出した。矢印は泳動の方向を示す。抗preSATP6抗体（ $\alpha$ preSATP6）は340 ng/ml、抗DDDDK抗体（ $\alpha$ FLAG）は100 ng/mlで反応に用いた。付した数字はタンパク質の分子量（kDa）を示す。  
 (B) Aで示したブロット像を重ねあわせた像を示す。抗preSATP6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。

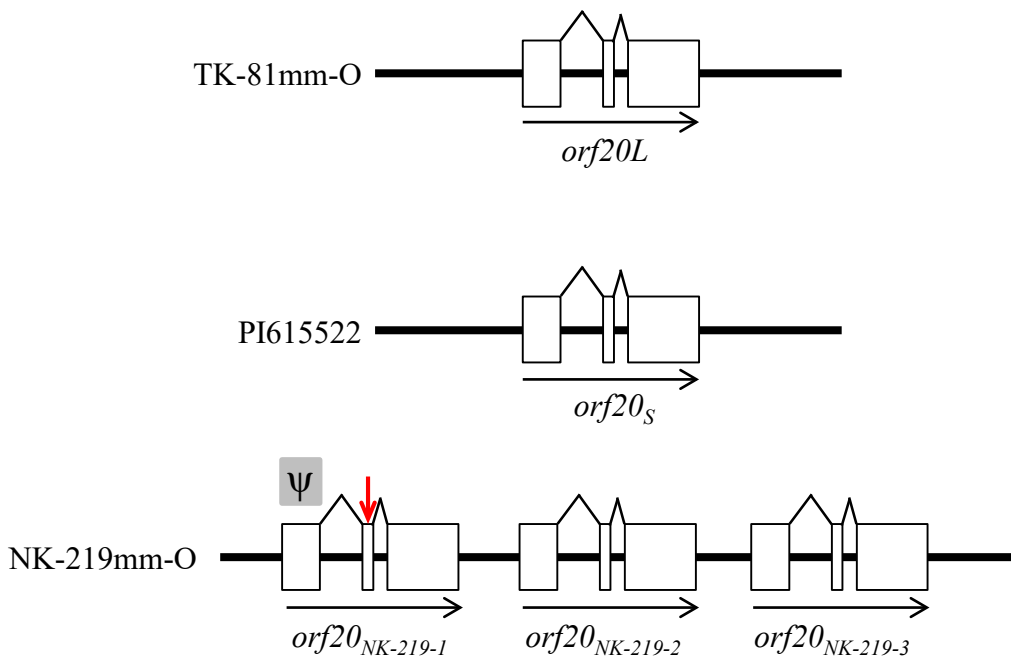


図2-5 テンサイ維持系統の*rfl*遺伝子座の分子構造の模式図

テンサイ集団からこれまで発見された*rfl*分子バリエーションの構造を模式的に示す。四角がエクソン、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<sub>NK-219-1</sub>*は第2エク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（ $\Psi$ で示す）。

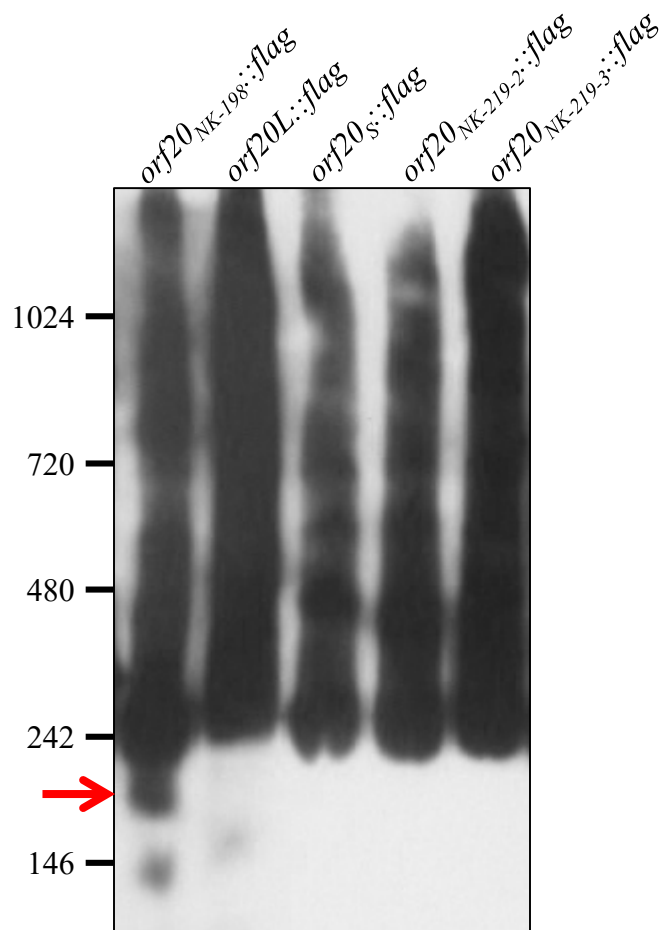


図2-6 *orf20*様遺伝子導入カルスの粗ミトコンドリアタンパク質を用いたpreS ATP6複合体解析

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preS ATP6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F<sub>1</sub>の花粉稔性

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

<sup>1</sup> N、S.S.a、及びS.S.bの合計

<sup>2</sup> C.S.

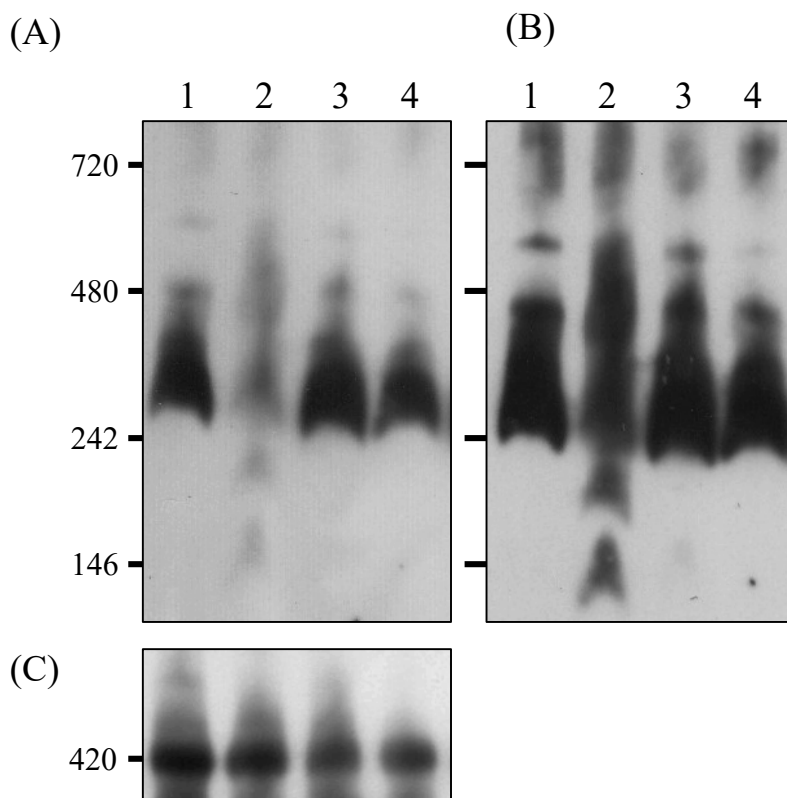


図2-7 未成熟葯由来のタンパク質を用いたpreS ATP6複合体解析

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preS ATP6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。

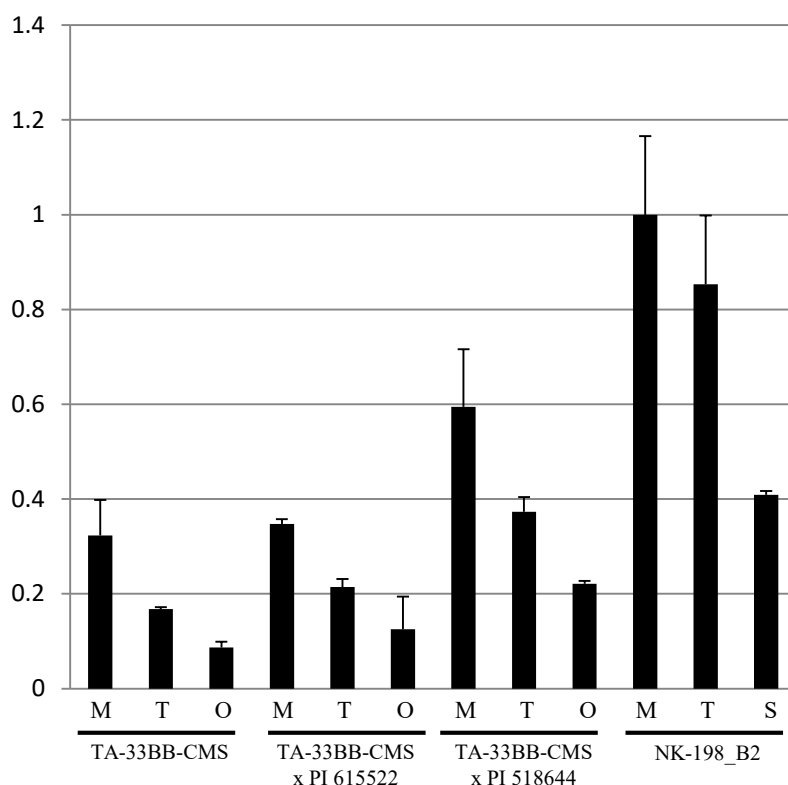


図2-8 未成熟葯における *orf20* 様遺伝子の mRNA 量

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 F<sub>1</sub> 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<sub>2</sub>F<sub>2</sub> から得られた *Rflrfl* ヘテロ個体を示す。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 は小孢子期、O は不稔により退化した小孢子を含むステージである。



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

Line	Anther developmental Stage	Reference gene	
		<i>Actin</i>	<i>efl<math>\alpha</math></i>
TA-33BB-CMS	Meiosis	0.32 $\pm$ 0.08	0.37 $\pm$ 0.06
	Tetrad	0.17 $\pm$ 0.00	0.23 $\pm$ 0.01
	Microspore <sup>b</sup>	0.09 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.00
TA-33BB-CMS x PI 615522	Meiosis	0.35 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.08
	Tetrad	0.21 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.05
	Microspore <sup>b</sup>	0.13 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.10
TA-33BB-CMS x PI 518644	Meiosis	0.59 $\pm$ 0.12	0.68 $\pm$ 0.08
	Tetrad	0.37 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.15
	Microspore <sup>b</sup>	0.22 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.08
NK-198_B2 <sup>a</sup>	Meiosis	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.06
	Tetrad	0.85 $\pm$ 0.15	0.88 $\pm$ 0.26
	Microspore	0.41 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.21

<sup>a</sup> TA-33BB-CMS x NK-198のF<sub>1</sub>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<sub>2</sub>F<sub>2</sub>から得られた*Rflrfl*ヘテロ個体を示す。

<sup>b</sup> 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薬の調査によって、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 系統の薬より 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) の量が増え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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* を導入した時のみ認められた。200kDa 複合体には ORF20<sub>NK-198</sub> が含まれること、及び preSATP6 と ORF20<sub>NK-198</sub> が結合できることから、*orf20<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub> 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<sub>NK-198</sub>* 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 *Rfl* 稔性回復薬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、稔性回復薬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。第一に稔性回復薬における 250kDa 複合体の蓄積量は CMS 薬よりも減少しており、これは *orf20<sub>NK-198</sub>* 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 薬で非常に明瞭であるが、稔性回復薬では抗 preSATP6 抗体に反応するシグナルが非常にスミアで、印象としてはむしろカルスに近い。こうした違いは、薬とカルスの生理的な違いなのかもしれない。

稔性回復薬と CMS 薬の間で 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、スミ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、あるいは稔性回復薬とカルスのスミ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<sub>NK-198</sub>* と *orf20<sub>S</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>L</sub>* 導入カルスのいずれからでも 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<sub>NK-198</sub>* 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

分子バリエーションは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、*rfl* で発見されている4種の *orf20* 様遺伝子 (*orf20L*、*orf20S*、*orf20<sub>NK-219-2</sub>*、及び *orf20<sub>NK-219-3</sub>*) を導入したカルス及びこれらの遺伝子を保持する系統の葯においては、*orf20<sub>NK-198</sub>* 導入カルスや NK-198 *Rfl* 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、*rfl* 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。分子バリエーション別に見た場合、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<sub>NK-219-2</sub>+orf20<sub>NK-219-3</sub>* の TA-33BB-CMS x PI 518644 がそれに続き、*orf20L+orf18+orf19+orf20<sub>NK-198</sub>+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 *Rf1* 対立遺伝子の機能解析

### 第3章 作用力の異なる *Rfl* 対立遺伝子の機能解析

#### 緒言

テンサイ *Rfl* 座からは多様なハプロタイプ（分子バリエーション）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 *Rfl* とは異なる未解析の *Rfl* 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 *Rfl* 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°C、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碎した。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. 花粉稔性調査

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 を十分に浸透させた後、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°C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°C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°C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、ロータリーマイクロトーム (HM360; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて 10  $\mu$ m 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°C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°C、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) 及び角カバーガラス 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 *Rf1* 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 F<sub>1</sub> 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、F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 花粉により自殖した F<sub>2</sub>、及び TA-33BB-O と F<sub>1</sub> の交配次代である BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 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 パターンが見ついている (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;  $p = 4.08 \times 10^{-13}$ , 稔性回復の有無 vs. 遺伝子型;  $p = 1.92 \times 10^{-15}$ , 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 (濱田 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 *Rfl* は NK-198 *Rfl* と作用力が異なる

稔性回復系統 NK-198 は優性 *Rfl* を保持し、NK-305 由来の *Rfl* とは異なる分子構造をもつ (Matsuhira *et al.* 2012; 上 2017)。由来の異なる *Rfl* の作用力を検討すべく、NK-198 *Rfl* 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  $F_1$  を複数個体選び、これら稔性回復  $F_1$  をさらに TA-33BB-CMS と交配した。得られた  $BC_1F_1$  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  $BC_2F_2$  を 83 個体得た。この  $BC_2F_2$  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。 $BC_2F_2$  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 ( $\chi^2$  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 *Rfl* 及び NK-305 *Rfl* 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  $BC_2F_2$  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 *Rfl* を保持する葯の発達過程

NK-198 *Rfl* 及び NK-305 *Rfl* 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 *R/1* の混合集団及び NK-198 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 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 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、p1p1、p1p4 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 *Rfl* 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 付近にスミ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 複合体の減少に単量体自体の減少は関わらないと思われる。

NK-305 *Rfl* 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、このプロットでは 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 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 集団における preSATP6 複合体の蓄積

NK-198 *Rfl* は 250kDa 複合体の蓄積において NK-305 *Rfl* と同様な減少効果を発揮するのか検証した。NK-198 の BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 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 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 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 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 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 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 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 *Rfl* 及び NK-198 *Rfl* 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<sub>NK-198</sub> 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 *Rfl* 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 *Rfl* 座に含まれる 6 つの遺伝子コピー (NK-305 *Rfl*: *orf20*<sub>NK-305-1</sub>, *orf20*<sub>NK-305-2</sub>; NK-198 *Rfl*: *orf18*, *orf19*, *orf20*<sub>NK-198</sub>, *orf21*; Matsuhira *et al.* 2012、上 2017) の翻訳産物の機能の特徴づけた。

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成した。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*<sub>NK-305-1</sub> 導入カルスでは 43kDa と 41kDa にシグナルが得られ、*orf20*<sub>NK-305-2</sub> 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*<sub>NK-305-1</sub>、*orf18*、*orf19*、*orf20*<sub>NK-198</sub> 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*<sub>NK-305-2</sub> 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 *Rfl* 及び NK-198 *Rfl* に含まれる *orf20* 様遺伝子のうち、*orf20*<sub>NK-305-2</sub> 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。

### *Rfl* 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に関わる

*Rfl* の遺伝子量効果と転写産物量の関係を検討した。NK-198 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 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 エキシソンの多型より、*orf20*<sub>NK-305-1</sub> 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 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 集団を加えて調査を行った。NK-198 *Rfl* 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。

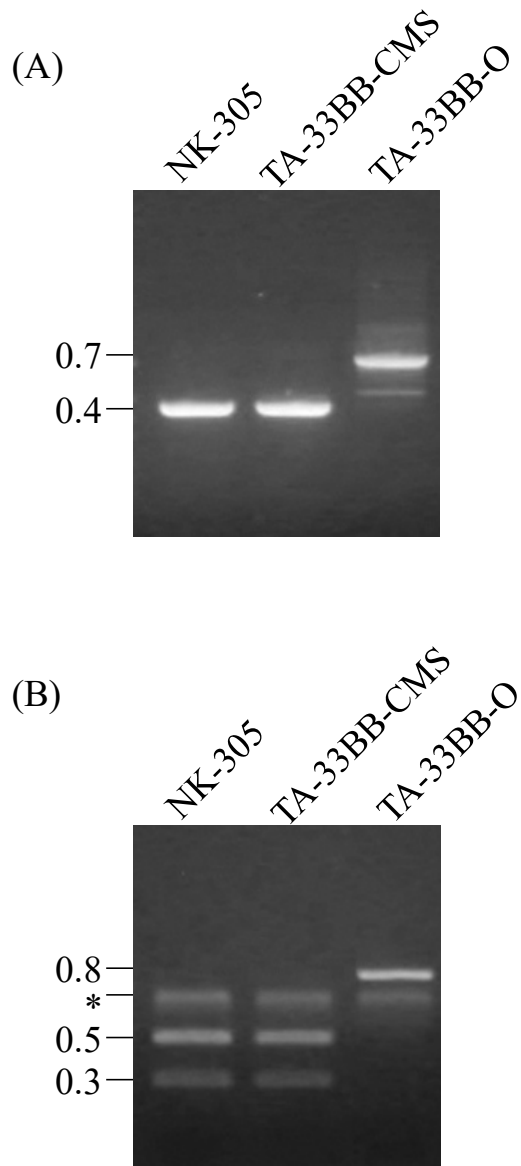


図 3-1 細胞質マーカーによるジェノタイプング

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。

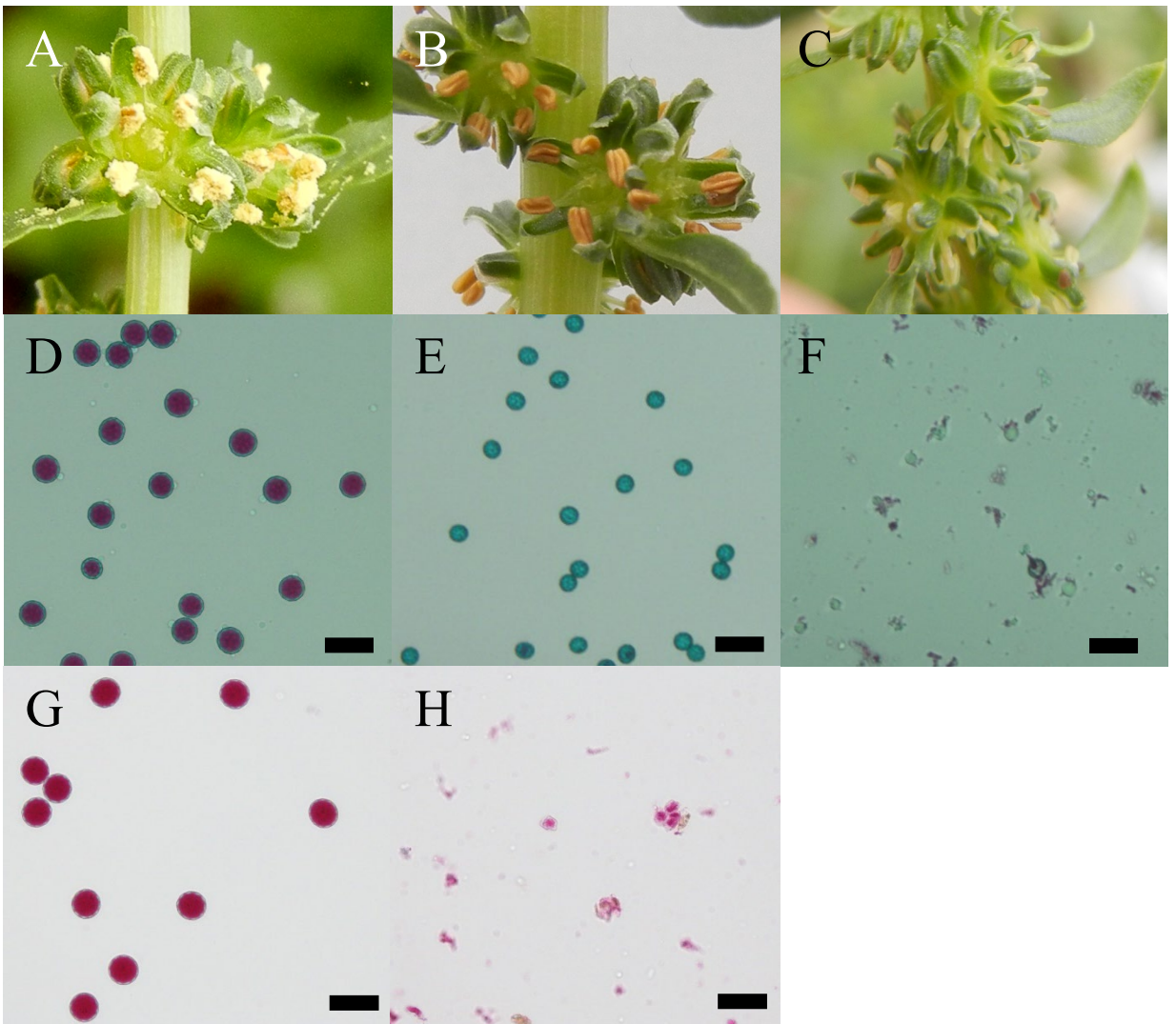


図3-2 代表的なテンサイ葯の外観及び花粉染色像

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 pollen 粒を示す。スケールバーは50 μmを示す。



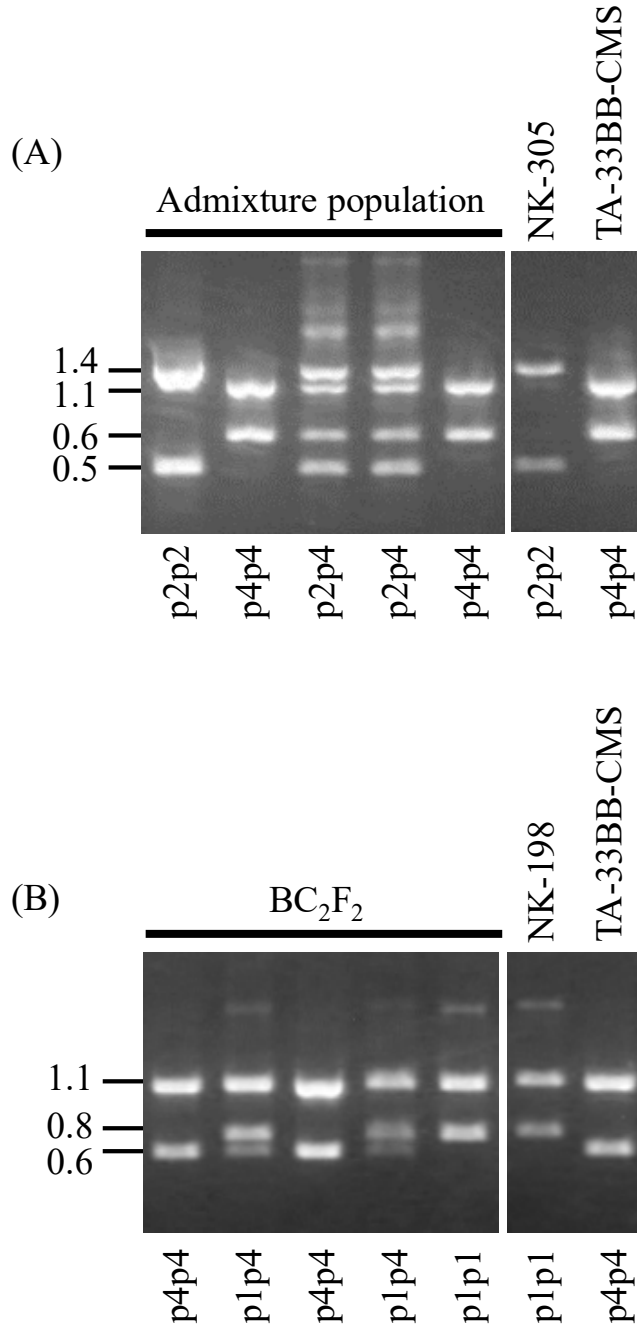


図 3-3 CAPSマーカーs17によるジェノタイプピング

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BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>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)。

表 3-1 NK-305の混合集団におけるs17型と花粉稔性の分離

s17 (DNA fragments length、 kbp)	Male fertility			Total
	Fully fertile <sup>1</sup>	Partial fertile <sup>2</sup>	Sterile <sup>3</sup>	
p2p2 (0.5, 1.4)	7	1	0	8
	8			
p2p4 (0.5, 0.6, 1.1, 1.4)	4	19	1	24
	23			
p4p4 (0.6, 1.1)	0	1	22	23
	1			
Total	11	21	23	55
	32			

<sup>1</sup>NもしくはS.S.a <sup>2</sup>S.S.b <sup>3</sup>C.S.

表 3-2 NK-198のBC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>集団におけるs17型と花粉稔性の分離

s17 (DNA fragments length、 kbp)	Male fertility			Total
	Fully fertile <sup>1</sup>	Partial fertile <sup>2</sup>	Sterile <sup>3</sup>	
p1p1 (0.8, 1.1)	14	2	0	16
	16			
p1p4 (0.6, 0.8, 1.1)	45	4	3	52
	49			
p4p4 (0.6, 1.1)	0	3	12	15
	3			
Total	59	9	15	83
	68			

<sup>1</sup>NもしくはS.S.a <sup>2</sup>S.S.b <sup>3</sup>C.S.

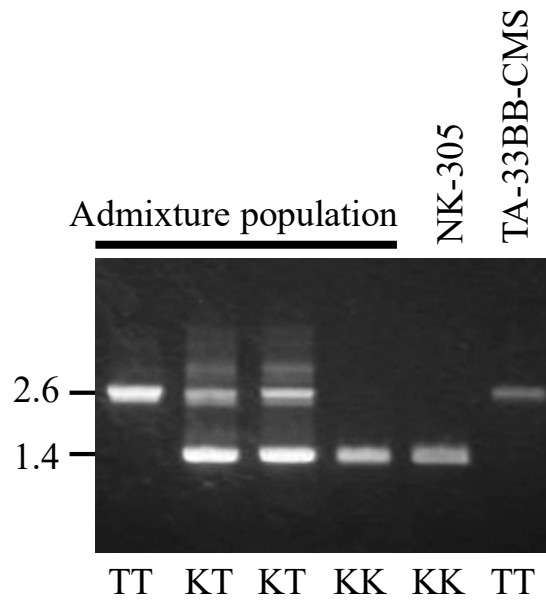


図 3-4 DFLPマーカーo7によるNK-305の混合集団のジェノタイプング

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

o7	Male fertility			Total
	Fully fertile <sup>1</sup>	Partial fertile <sup>2</sup>	Sterile <sup>3</sup>	
KK	2	3	3	8
	5			
KT	6	10	12	28
	16			
TT	3	8	8	19
	11			
Total	11	21	23	55
	32			

<sup>1</sup>NもしくはS.S.a <sup>2</sup>S.S.b <sup>3</sup>C.S.

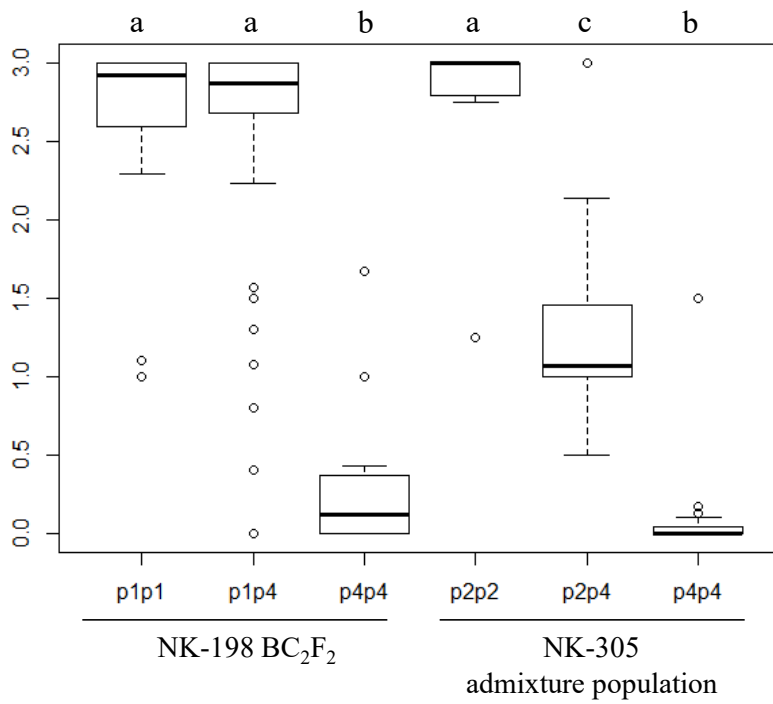


図 3-5 s17型と花粉稔性

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は有意な差が検出された ( $p < 0.01$ ; Steel-Dwass test)。

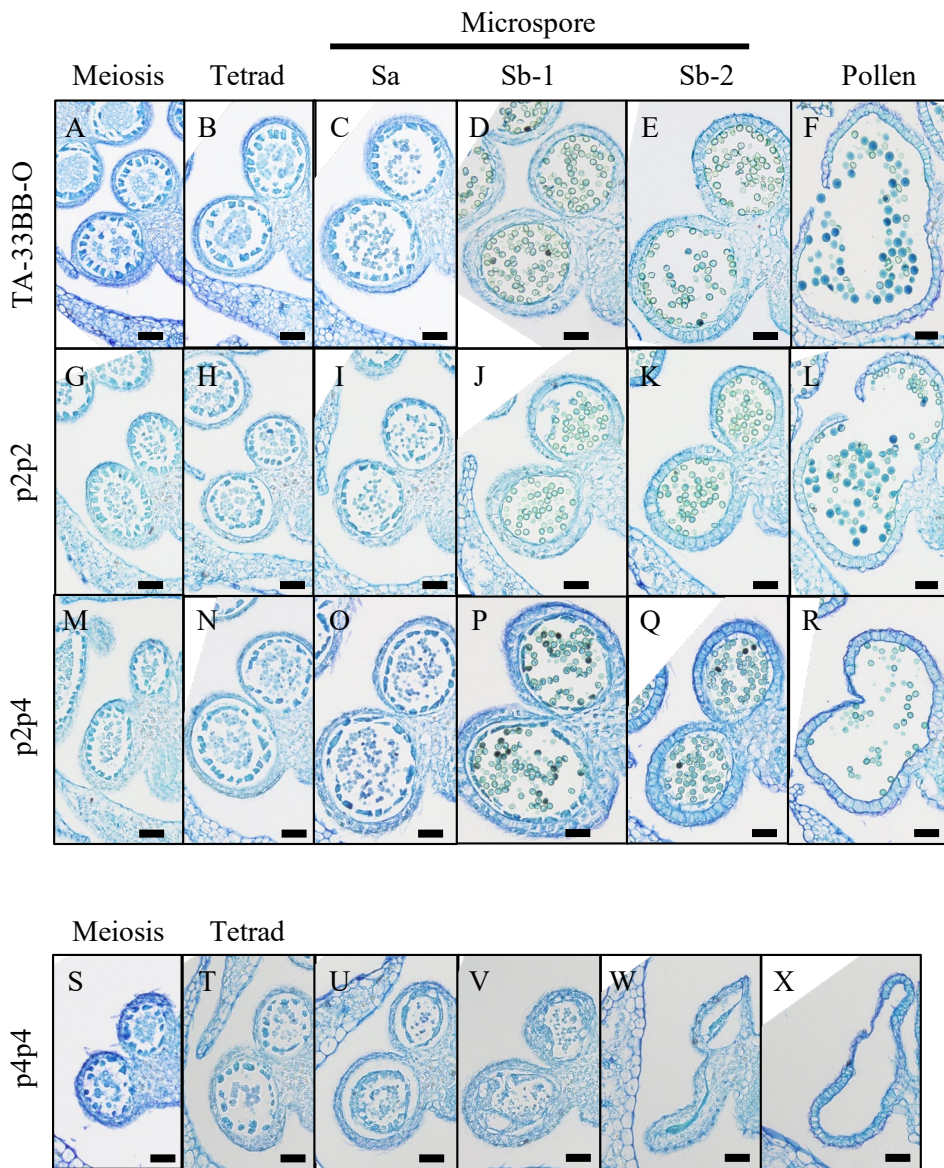


図 3-6 花粉発達ステージ毎の未成熟葯の横断切片

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）は小孢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: 小孢子期、Pollen: 花粉期

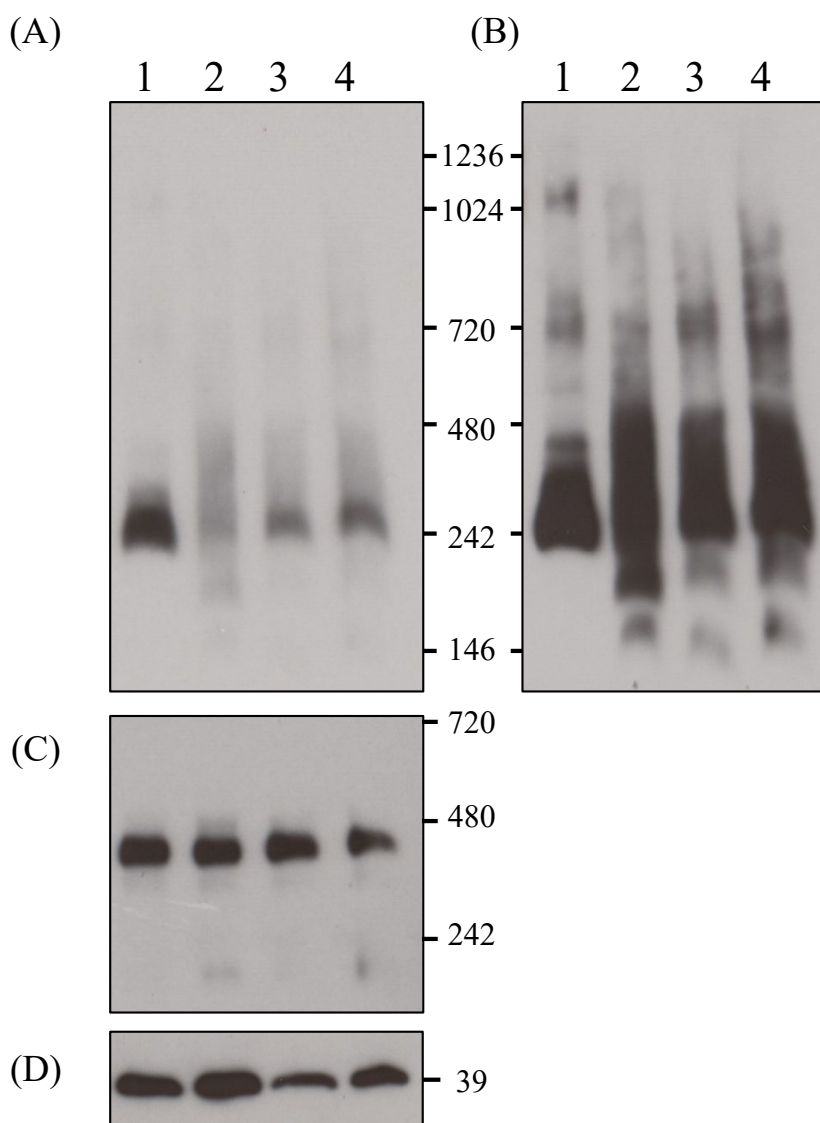
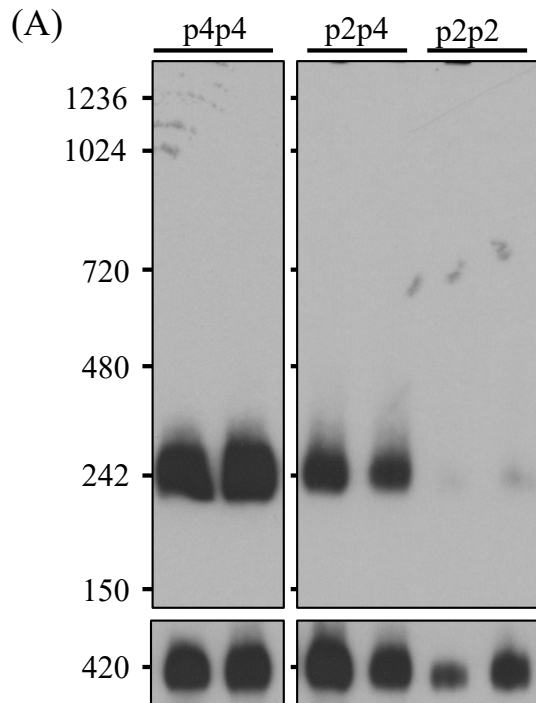


図 3-7 未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析

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



(B)

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



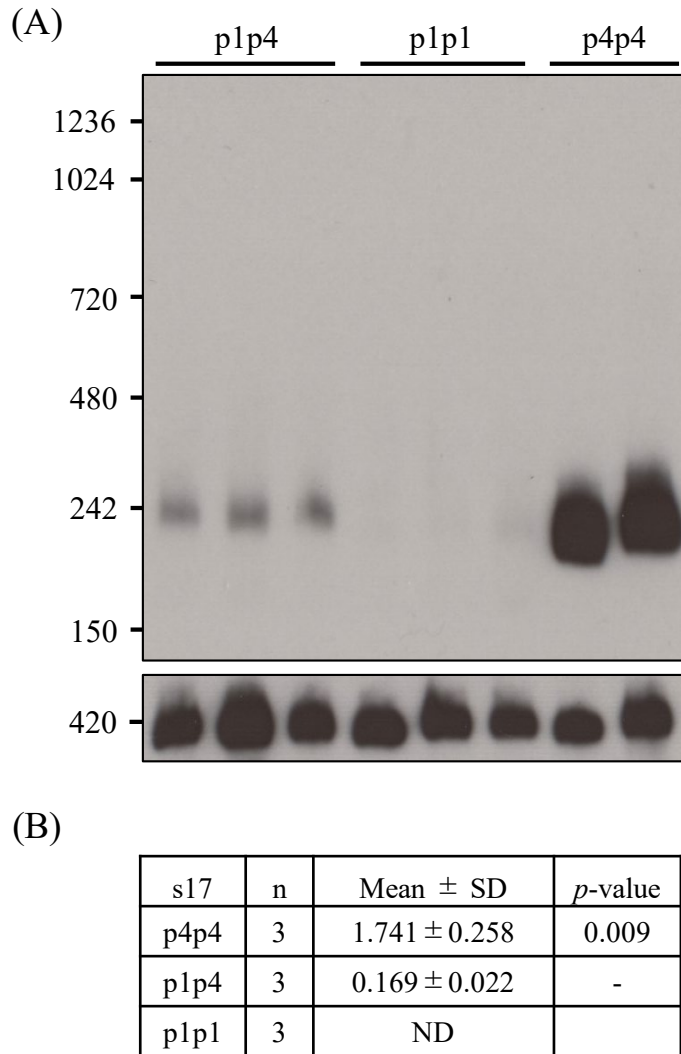
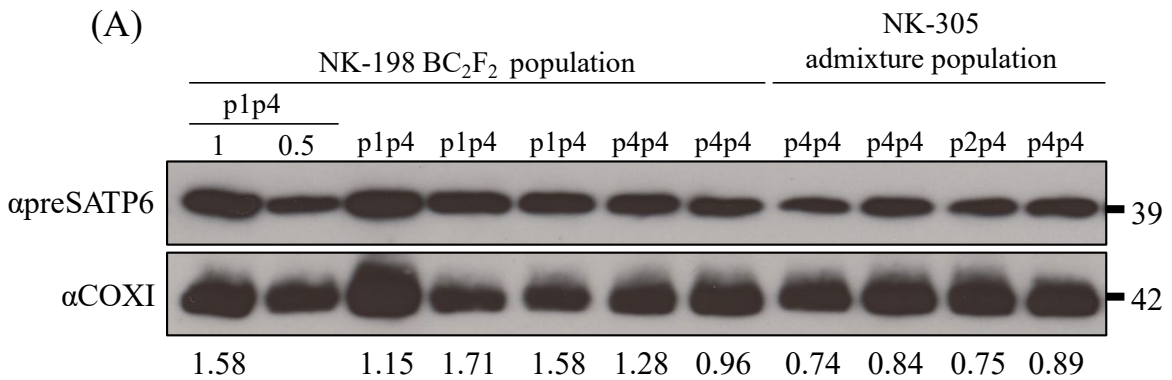


図 3-9 NK-198集団の未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析

NK-198 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>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preSASP6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) preSASP6 250kDa複合体の量 (抗preSASP6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。



(B)

Population	n	Mean ± SD	<i>p</i> -value	Fold change
NK-198	6	1.38 ± 0.29	0.0038	1.71
NK-305	4	0.80 ± 0.07	-	-

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<sub>2</sub>F<sub>2</sub>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。

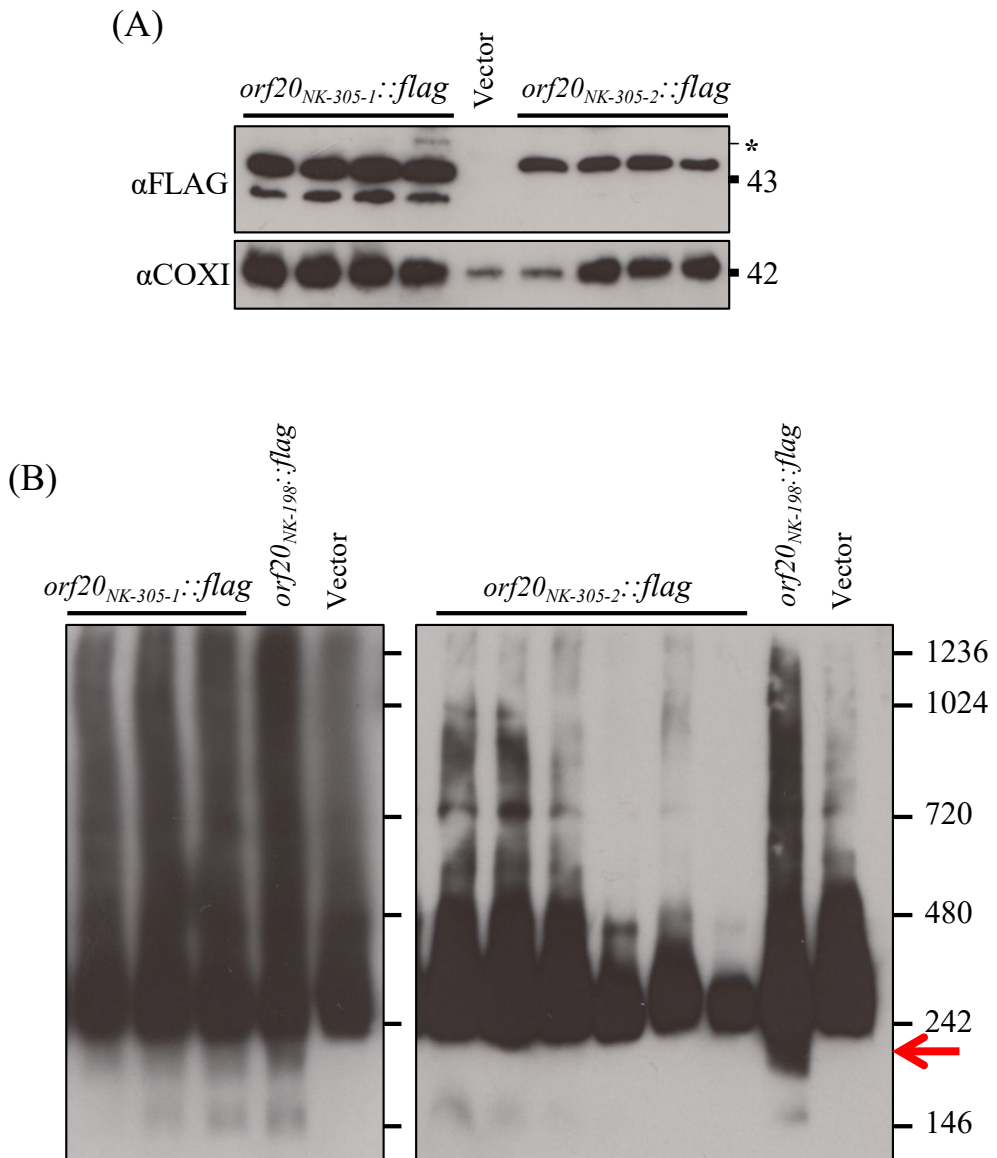


図 3-11 NK-305 *Rfl* に含まれる *orf20* 様遺伝子コピーを導入した形質転換カルスを用いたウェスタンブロット解析

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 ( $\alpha$ FLAG、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 ( $\alpha$ COXI、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。

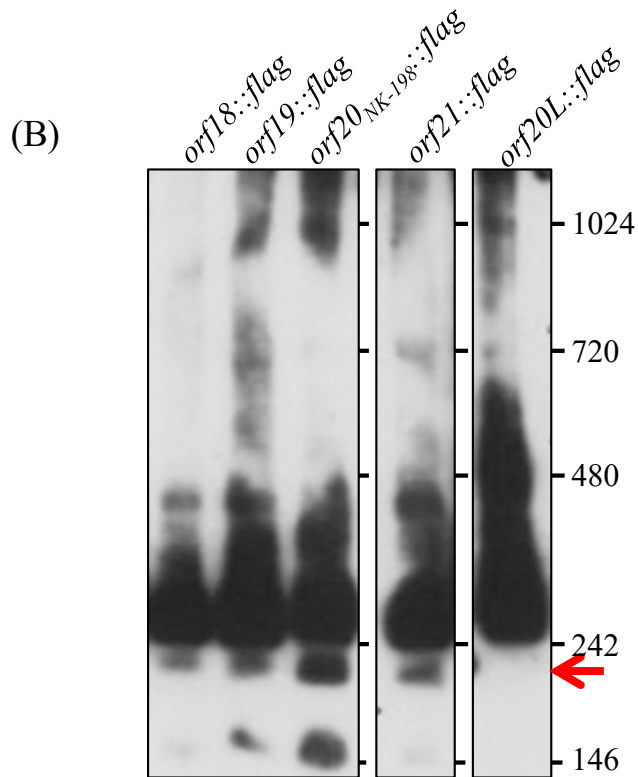
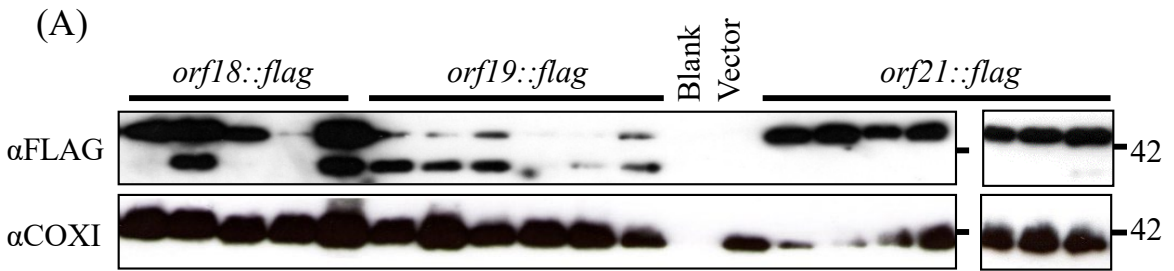


図 3-12 NK-198 *Rfl* に含まれる *orf20* 様遺伝子コピーを導入した形質転換カルスを用いたウェスタンブロット解析

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 ( $\alpha$ FLAG、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 ( $\alpha$ COXI、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*<sub>NK-305-1</sub> 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  $\pm$  SD; *p*-value, Welch's *t*-test)

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

ND: Not detected, NA: Not applicable

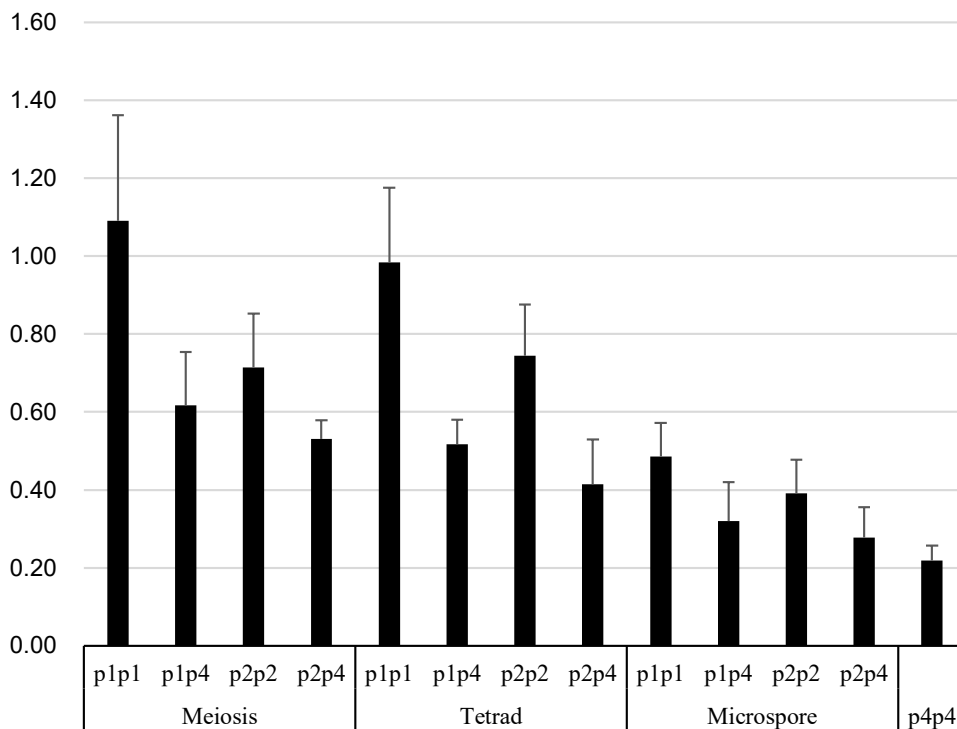


図 3-13 未成熟葯における *orf20* 様遺伝子の mRNA 量

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 Stage	s17	Mean±SD	Fold change			
			Homo vs. Hetero		p1 vs. p2	
Meiosis	p1p1	1.09 ± 0.27	p1	1.77*	Homo	1.53*
	p1p4	0.62 ± 0.14			Hetero	1.16
	p2p2	0.71 ± 0.14	p2	1.35		
	p2p4	0.53 ± 0.05				
Tetrad	p1p1	0.98 ± 0.19	p1	1.91**	Homo	1.32
	p1p4	0.52 ± 0.06			Hetero	1.25
	p2p2	0.74 ± 0.13	p2	1.80*		
	p2p4	0.41 ± 0.12				
Microspore	p1p1	0.49 ± 0.09	p1	1.52	Homo	1.24
	p1p4	0.32 ± 0.10			Hetero	1.15
	p2p2	0.39 ± 0.09	p2	1.41		
	p2p4	0.28 ± 0.08				
-	p4p4	0.22 ± 0.04				

(B)

Developmental Stage	s17	Mean±SD	Fold change			
			Homo vs. Hetero		p1 vs. p2	
Meiosis	p1p1	0.32 ± 0.07	p1	1.98**	Homo	1.39
	p1p4	0.16 ± 0.04			Hetero	0.97
	p2p2	0.23 ± 0.06	p2	1.38		
	p2p4	0.17 ± 0.02				
Tetrad	p1p1	0.33 ± 0.05	p1	1.89**	Homo	1.49**
	p1p4	0.17 ± 0.01			Hetero	1.60*
	p2p2	0.22 ± 0.02	p2	2.03**		
	p2p4	0.11 ± 0.03				
Microspore	p1p1	0.22 ± 0.04	p1	1.53*	Homo	1.47*
	p1p4	0.15 ± 0.04			Hetero	1.59
	p2p2	0.15 ± 0.03	p2	1.65		
	p2p4	0.09 ± 0.02				
-	p4p4	0.06 ± 0.01				

リファレンス遺伝子は*Actin* (A) 及び*efla* (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
NK-305 admixture	p4p4	1.000	Sterile <sup>1</sup>
	p2p4	0.547	Partial fertile <sup>2</sup>
	p2p2	0.075	Fully fertile <sup>3</sup>
NK-198 BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	p1p4	0.166 <sup>a</sup>	Fully fertile
	p1p1	Not Detected	

<sup>a</sup> preSATP6の単量体の量を補正した値を示す

<sup>1</sup> C.S. <sup>2</sup> S.S. <sup>3</sup> 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 *Rfl* (すなわち NK-198 *Rfl*) と不完全優性を示す *Rfl* (NK-305 *Rfl*) 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 *Rfl* 対立遺伝子の分子バリエーション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 *Rfl* 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 *Rfl* 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。

### *Rfl* 対立遺伝子の遺伝子量効果の分子基盤

NK-305 *Rfl* 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 *Rfl* には preSATP6 とタンパク質間相互作用が可能な *orf20*<sub>NK-305-1</sub> とそのような能力を持たない *orf20*<sub>NK-305-2</sub> 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 *Rfl* の遺伝子量効果に関わるのは専ら *orf20*<sub>NK-305-1</sub> ではないかと思われる。実際、*orf20*<sub>NK-305-1</sub> 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 *Rfl* 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 *Rfl* とは異なり、NK-198 *Rfl* 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 *Rfl* にも量的効果が認められることになる。

NK-305 *Rfl* とNK-198 *Rfl* 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*<sub>NK-305-2</sub> 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 *Rfl* はNK-305 *Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* と NK-198 *Rfl* 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 *Rfl* の場合、分離集団における preSATP6 の 250kDa 複合体の蓄積量は、*rflrfl* 個体を基準とすると *Rflrfl* 個体では 1/2、*RflRfl* 個体では 1/10 程度であった。一方で、NK-198 *Rfl* の場合、分離集団における preSATP6 複合体は、*Rflrfl* 個体は *rflrfl* 個体の 1/10 程度であり、*RflRfl* 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つ *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 *Rfl* 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 *Rfl* 分離集団と NK-305 *Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* と NK-198 *Rfl* 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 *rflrfl* 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 *Rfl* 分離集団の *RflRfl* 個体は検出限界以下 (ND)、*Rflrfl* 個体は 0.166 である。同じく稔性回復個体である

NK-305 *Rfl* 分離集団の *RflRfl* 個体では 0.075 となる。半不稔である NK-305 集団における *RflRfl* 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孢子期のタペート退化が不可欠である (Sanders *et al.* 1999)。NK-305 *Rfl* 分離集団における *RflRfl* 半不稔個体ではタペート組織の退化が不十分であり、*rflrfl* 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、未成熟薬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 *Rfl* 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 *Rfl* 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. 花粉稔性調査

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 *rf1* 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 *rf1* 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 につけ合わせた F<sub>1</sub> 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 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 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 *rf1* 及び TA-33BB-CMS *rf1* 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 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 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)。同一プ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、すべてのサンプルで単一の明瞭な 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 *rf1* の微弱な作用のメカニズムを探るべく、*rf1* 座にコードされる遺伝子に着目した。仏国大葉 *rf1* は 1 コピーの *orf20* 様遺伝子を保持 (*orf20<sub>fukkoku</sub>* とする) し、そのコード域は *orf20<sub>NK-198</sub>* 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<sub>fukkoku</sub>* コード域の機能を調査した。FLAG タグを付加した *orf20<sub>fukkoku</sub>* 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<sub>fukkoku</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 導入カルス由来のサンプルと一致していた。

未熟薬における *orf20<sub>fukkoku</sub>* 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 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> の p4p5 個体及び NK-198 の薬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 *Rfl* 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、*Rfl* 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<sub>fukkoku</sub>*、*orf20<sub>NK-305-1</sub>*、*orf18*、*orf20<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-219-3</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* グループ (*orf20<sub>fukkoku</sub>*、*orf20<sub>NK-305-1</sub>*、*orf18*、*orf20<sub>NK-198</sub>*、及び *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<sub>NK-198</sub>* グループに属

する遺伝子コピーにのみ第2エクソンに *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*<sub>NK-198</sub> 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*<sub>NK-198</sub> 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エクソンの *Xsp* I 認識部位は *orf20*<sub>NK-219.2</sub> 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*<sub>NK-219.2</sub> 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 *Rfl* 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 *Rfl* 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 F<sub>1</sub> 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、*Rfl* 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 *Hind* 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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 によるジェノタイプピングを行った。結果を図 4-7 に示す。o20-Dra マーカーにおける *orf20<sub>NK-198</sub>* タイプは野生ビート 1 アクセションとテンサイ 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<sub>NK-219-2</sub>* 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、未知のバンドパターンは観察されなかった (表 4-3、図 4-7)。以降、これらのマーカー型を簡便に示すため、o20-Dra マーカーにおける *orf20<sub>NK-198</sub>* タイプは '+'、o20-Xsp マーカーにおける *orf19* タイプと *orf20<sub>NK-219-2</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 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 F<sub>1</sub> (4 個体) はいずれも花粉不稔であった。これら F<sub>1</sub> より選び出した 17-1001 (p3p4/LS) は o20 [-, -] であった。一方、別な F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> から、*orf20<sub>NK-198</sub>* 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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<sub>NK-198</sub>* 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、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 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 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 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 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>) 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 F<sub>1</sub> (6 個体) を調査した。17-1140 (p4p5/LS、花粉稔性は半不稔) より o20 [+,-]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 F<sub>1</sub> (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 [-,-]である一方で、17-1151 (p3p4/LS、半不稔) から o20 [+,-]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、BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> である 17-1187 (p3p4/LS、半不稔) は、o20 [-,-]であった。

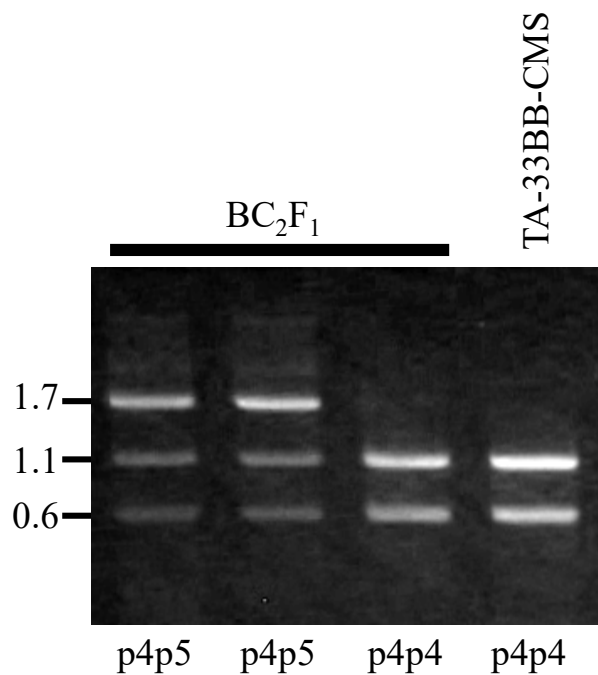


図 4-1 CAPS マーカー s17 によるジェノタイプング

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 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 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)。

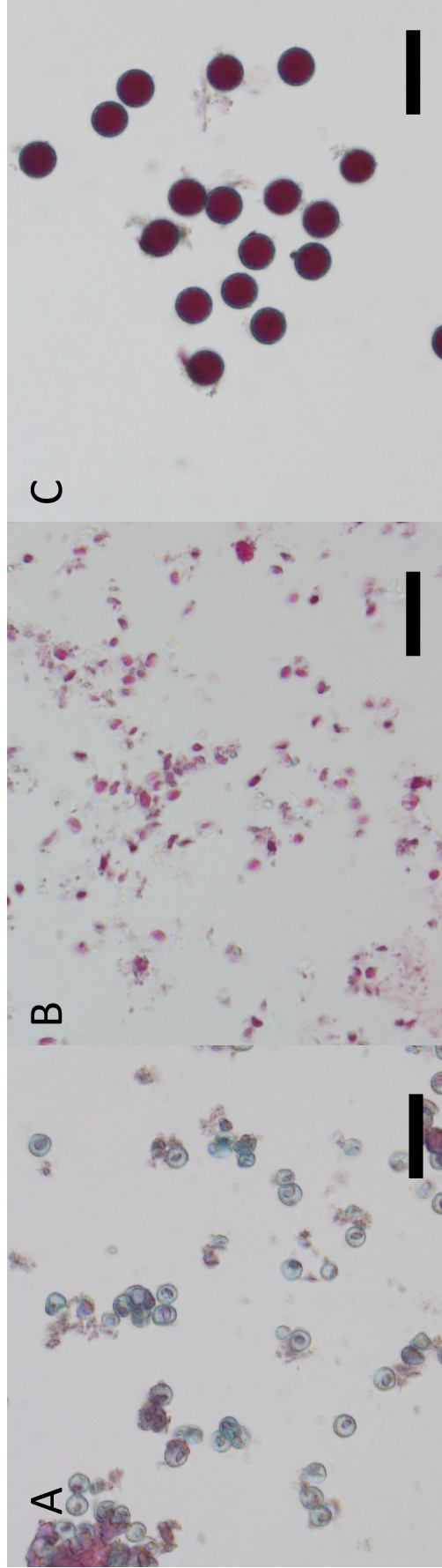


図4-2 仏国大葉 $BC_2F_1$ の花粉染色像

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 $BC_2F_1$ 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  $\mu\text{m}$ を示す。

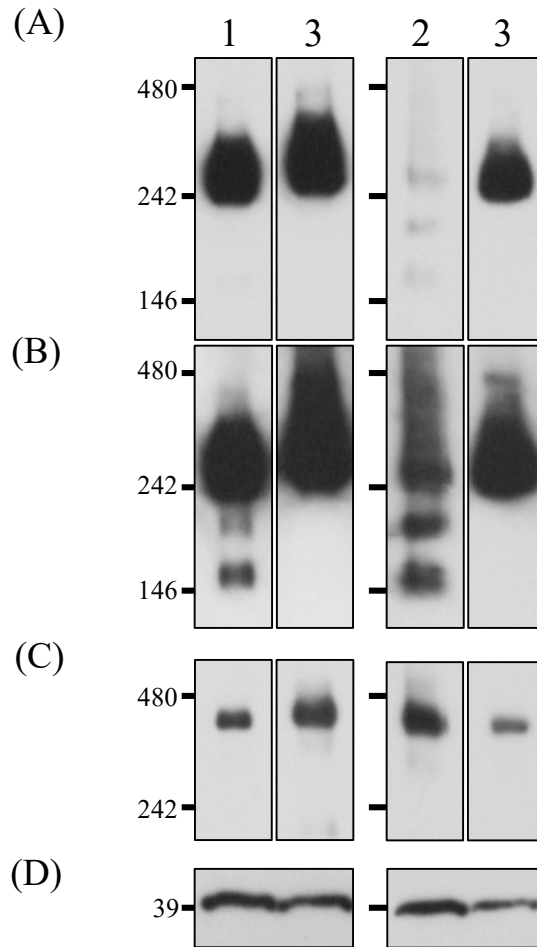


図 4-3 未成熟葯から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析

仏国大葉BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>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



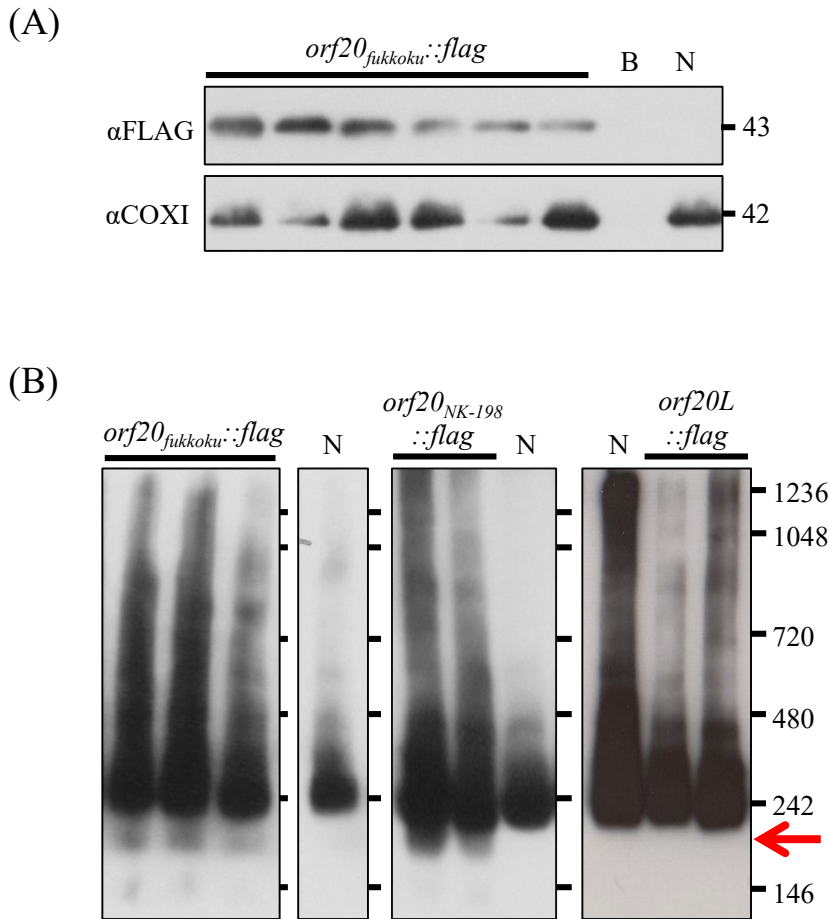


図 4-4 仏国大葉 $rfI$ 座から見つかった $orf20$ 様遺伝子コピーを導入した形質転換カルスを用いたウェスタブロット解析

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 ( $\alpha$ FLAG、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 ( $\alpha$ COXI、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
Meiosis	<i>Actin</i>	0.997 ± 0.248	0.256 ± 0.046	3.89	0.0035
	<i>efl1a</i>	0.320 ± 0.068	0.056 ± 0.014	5.76	0.0014
Tetrad	<i>Actin</i>	0.897 ± 0.174	0.200 ± 0.023	4.48	0.0012
	<i>efl1a</i>	0.327 ± 0.047	0.050 ± 0.007	6.68	0.0003
Microspore	<i>Actin</i>	0.444 ± 0.078	0.103 ± 0.017	4.29	0.0009
	<i>efl1a</i>	0.222 ± 0.036	0.028 ± 0.002	8.07	0.0004

(*n* = 3, Mean ± 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メントスコア

	Group I				Group II		Group III	Group IV			
	<i>orf18</i>	<i>orf20</i>	<i>orf21</i>	<i>fukkoku</i>	<i>305-1</i>	<i>orf20s</i>		<i>305-2</i>	<i>219-2</i>	<i>219-3</i>	<i>orf20L</i>
<b>Group I</b>	<b><i>orf18</i></b>	99	100	99	99	90	92	92	88	84	85
	<b><i>orf20</i></b>		99	99	99	90	93	91	88	84	84
	<b><i>orf21</i></b>			99	99	90	92	92	88	84	85
	<b><i>fukkoku</i></b>				99	90	93	91	88	84	84
	<b><i>305-1</i></b>					90	93	91	88	84	84
<b>G II</b>	<b><i>orf20s</i></b>					90	93	91	88	84	84
	<b><i>305-2</i></b>						97	92	91	85	88
	<b><i>219-2</i></b>							96	89	85	86
<b>G III</b>	<b><i>orf19</i></b>								91	84	85
<b>G IV</b>	<b><i>219-3</i></b>									86	88
	<b><i>orf20L</i></b>										96

赤字は*preSatp6*とタンパク質間相互作用が確認されたコピー、青字は相互作用しないコピーを示す。コピー間のアライメントスコアによりグループ分けした (Group 1-4)。表中に示す*orf20*様遺伝子は以下に対応している。*orf18*, *orf18*; *orf20*, *orf20*<sub>NK-198</sub>; *orf21*, *orf21*; *fukkoku*, *orf20*<sub>fukkoku</sub>; *305-1*, *orf20*<sub>NK-305-1</sub>; *orf20s*, *orf20s*; *305-2*, *orf20*<sub>NK-305-2</sub>; *219-2*, *orf20*<sub>NK-219-2</sub>; *orf19*, *orf19*; *219-3*, *orf20*<sub>NK-219-3</sub>; *orf20L*, *orf20L*

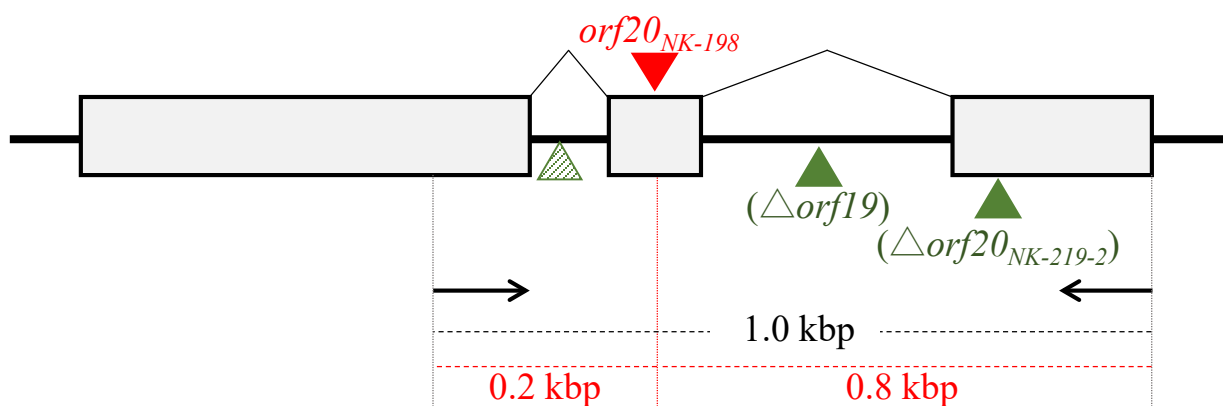


図 4-5 CAPSマーカーo20-Dra及びo20-Xspの概要

*orf20*様遺伝子の構造を模式的に示した。四角はエクソン、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<sub>fukkoku</sub>*, *orf20<sub>NK-305-1</sub>*, *orf18*, *orf20<sub>NK-198</sub>*, *orf21*) のみに存在する (*orf20<sub>NK-198</sub>* 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エクソンに切断サイトが2か所見られるが、*orf19*と*orf20<sub>NK-219-2</sub>*は、それぞれ第2イントロン及び第3エク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<sub>NK-219-1</sub>*、*orf20<sub>NK-219-3</sub>*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)。

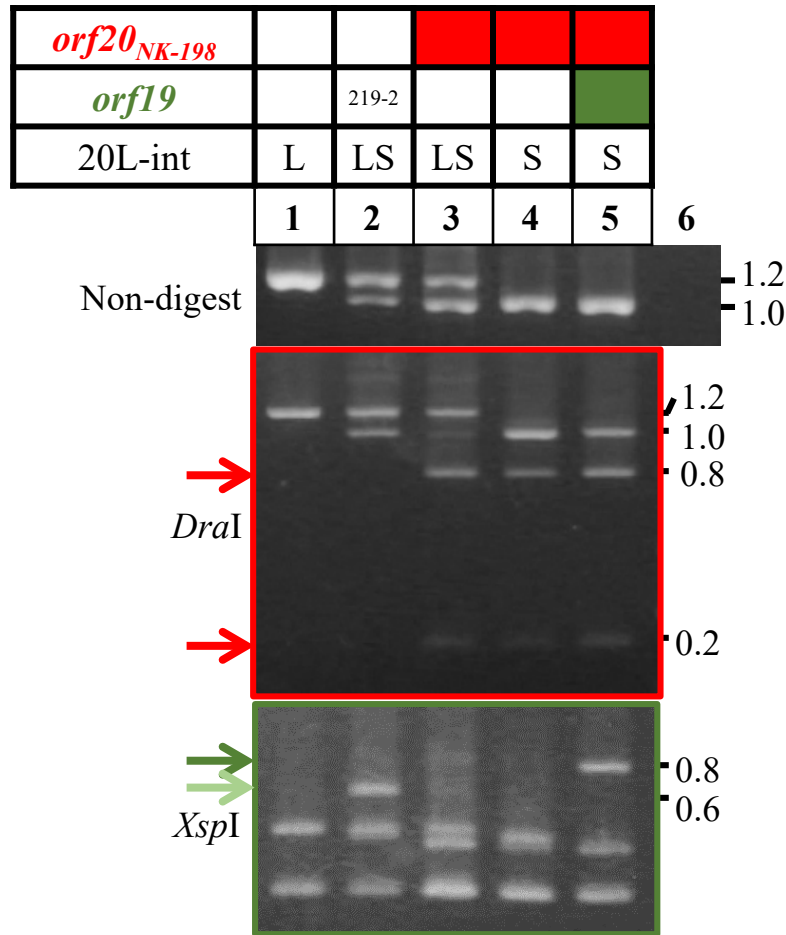


図 4-6 CAPSマーカーo20-Dra及びo20-Xspによるgenotyping

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*<sub>NK-198</sub>タイプ、o20-Xspにおける*orf19*タイプ及び*orf20*<sub>NK-219-2</sub>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*<sub>NK-198</sub>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*<sub>NK-219-2</sub>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)。

表 4-3 *Beta vulgaris* 遺伝資源を用いた検定交配と遺伝子型

Pollen parent				F <sub>1</sub>					
Strain		Plant ID	s17/20L-int <sup>b</sup>	s17/20L-int	Plant no.	Fertility <sup>c</sup>	Plant ID	o20 genotype <sup>d</sup>	
Source	Accession no. <sup>a</sup>							o20-Dra	o20-Xsp
<i>B. v. ssp. maritima</i> originated in Denmark	PI 546397 (USDA)	15-117	p3p4/LS	p3p4/LS	5	Cs	17-1001	-	-
				p4p4/LS	4		17-1002	-	219-2
		15-116	p1p3/LS	p1p4/LS	7	Cs	17-1013	-	-
				p3p4/LS	8		17-1014	-	219-2
<i>B. v. ssp. maritima</i> originated in Italy (Venice)	PI 604551 (USDA)	15-158	p3p3/S	p3p4/LS	8	N	17-1030	+	-
					6	Sf			
		15-166	p3p4/LS	p3p4/LS	8	N	17-1041	+	-
				p4p4/LS	1	Sf	17-1047	-	-
				8	Cs				
		15-173	p1p3/LS	p3p4/LS	7	N	17-1063	+	-
p1p4/LS	4			Cs	17-1059	-	-		
Sugar beet variety Weisse Kleinwanzlebener	BETA86 (IPK)	16-1048	p4p4/L	p4p4/L	14	Cs	17-1069	-	-
		16-1061	p4p4/L	p4p4/L	13	Cs	17-1084	-	-
Sugar beet variety Kleinwanzlebener E	BETA81 (IPK)	16-1113	p4p4/L	p4p4/L	1	Sf	17-1097	-	-
					19	Cs	17-1098	-	-
		16-1118	p4p4/L	p4p4/L	11	Cs	17-1117	-	-
Sugar beet variety Weisse Kleinwanzlebener	BETA86 (IPK)	16-1063	p4p4/L	p4p4/L	3	Cs	17-1127	-	-
Sugar beet variety Klein E	PI 5900588 (USDA)	16-1001	p5p5/LS (type-219)	p4p5/LS	2	Sf	17-1140	+	19
					2	Cs			
		16-1007	p5p5/LS (type-219)	p4p5/LS	1	Sf	17-1144	+	-
		16-1020	p3p3/LS	p3p4/LS	3	Sf	17-1151	+	219-2
					8	Cs	17-1146	-	219-2
		16-1028	p3p3/S	p3p4/LS	10	Sf	17-1172	-	-
	3			Cs					
16-1033	p3p3/S	p3p4/LS	8	Cs	17-1178	-	-		
Sugar beet variety Kleinwanz-Zz	BETA1258 (IPK)	16-1082	p3p3/S	p3p4/LS	5	Sf	17-1187	-	-
					2	Cs			
				Total	171				

<sup>a</sup> USDA: United States Department of Agriculture, IPK: The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research

<sup>b</sup> type-219は、20L-intのHind III切断パターンがNK-219mm-Oと同一であることを示す。

<sup>c</sup> 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。

<sup>d</sup> o20-Draにおけるorf20<sub>NK-198</sub>タイプを+、o20-Xspにおけるorf19タイプとorf20<sub>NK-219-2</sub>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。

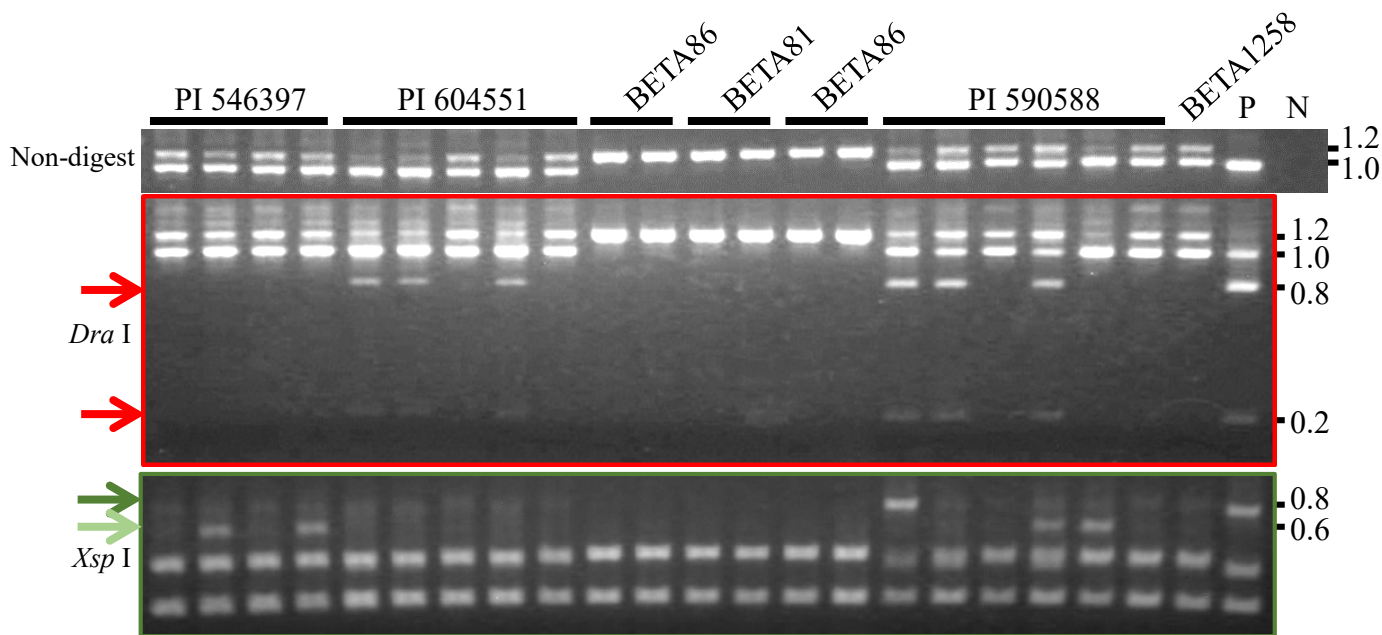


図 4-7 CAPSマーカーo20-Dra及びo20-Xspによる検定交配個体のジェノタイプピング

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。

表 4-4 o20マーカー型の分離と花粉稔性

Cross combination	s17	o20 <sup>a</sup>	Fertility		Total	p-value <sup>d</sup>
			Restored <sup>b</sup>	Sterile <sup>c</sup>		
17-1030 self	p3p3	+	3	0	12	2E-03
	p3p4	+	5	0		
	p4p4	-	0	4		
TA-33BB-CMS x 17-1063	p3p4	+	18	0	27	2E-07
	p4p4	-	0	9		
TA-33BB-CMS x 17-1066	p3p4	+	10	0	18	3E-04
	p4p4	-	1	7		
TA-33BB-CMS x 17-1172	p3p4	+	0	2	6	1
	p4p4	-	0	4		

<sup>a</sup> o20型において、*orf20<sub>NK-198</sub>*タイプを+、そうではない場合は-と示す。

<sup>b</sup> N、S.S.a、及びS.S.bの合計 <sup>c</sup> C.S. <sup>d</sup> Fisher's exact testのp値を示す。



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

		<i>Rfl</i> marker type				Fertility Restoration <sup>a</sup>	Source		
		s17	o20-Dra	o20-Xsp	20L-int_HindIII		Strain /Accession no.	Description	Plant ID in this study
Group I or Group III?	Yes	p1	+	19	ND	Yes	NK-198	Sugar beet	-
		p2	+	-	ND	Yes	NK-305 <sup>b</sup>	Sugar beet	-
		p3	+	-	ND	Yes	PI 604551	Wild beet	15-158, 15-166, 15-173
			+	219-2	ND	Yes?	PI 590588	Sugar beet	16-1020
		p5	+	19	type-219	Yes?			16-1001
			+	-	type-219	Yes?			16-1007
	No	p1	-	219-2	ND	No	PI 546397	Wild beet	15-116
			-	-	ND	No	PI 604551	Wild beet	15-173
		p3	-	-	ND	No	PI 615522 <sup>b</sup>	Sugar beet	-
			-	-	ND	No	PI 546397	Wild beet	15-116, 15-117
			-	219-2	ND	No	PI 590588	Sugar beet	16-1028,16-1033
			-	-	ND	Yes?	BETA1258	Sugar beet	16-1082
		p4	-	-	ND	No	TA-33BB-O <sup>b</sup>	Sugar beet	-
			-	-	ND	No	BETA81, BETA86	Sugar beet	-
			-	-	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 <sup>b</sup>	Sugar beet	-

<sup>a</sup> 検定交配F<sub>1</sub>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。

<sup>b</sup> 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 *Rfl* 座に近接しており、*Rfl* 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 *Rfl* 対立遺伝子の特徴づけ、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 F<sub>1</sub> 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 *Rfl* 遺伝子座はきわめて多様な分子バリエーションを持っている (Moritani *et al.* 2013)。それ故、各々の分子バリエーション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、*Rfl* 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 量のようなものである。これに符合し、仏国大葉の *Rfl* 対立遺伝子は相互作用する能力がある *orf20* 様遺伝子の mRNA 量が少ないために作用力が低い可能性が高い。よって、相互作用能をもつ *orf20* 様遺伝子の有無が *Rfl* 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、

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* 座の分子バリエーション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エーション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エーション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エーション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 *Oma1* 遺伝子と相同性を示すことから、*Rfl* は *Oma1* 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](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、乳棒で破碎した。

#### 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  $\gamma$  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  $\gamma$  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 ( $\omega_0$ ) 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 ( $\omega_2$ ) 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  $\beta$  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 *Sal*I 及び *Nco*I 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 *Sal*I 及び *Nco*I 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 *Nco*I 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 F<sub>1</sub>-ATPase  $\delta$ -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 1 $\mu$ g を 1 $\mu$ m 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°C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。*AtOMAI*、*BvOMAI-1* 及び *BvOMAI-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  $\beta$ -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画分を回収し、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。Pierce™ 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  $\mu$ g 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](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 µg/mL yeast tRNA, 10U/µl RNase inhibitor (Takara)) を切片上にのせて、湿潤箱の中で 42°C、一晚インキュベートした。

4 x SSPE (20 x SSPE = 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA, 3M NaCl, pH7.4) で室温、5 分間の洗浄を二回繰り返す、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 µg/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

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 MgCl<sub>2</sub>, 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へのせ、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°C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-iris.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/General_Information/1/dig-application-manual-for-filter-hybridisation-iris.pdf)) に従って操作を行い、その過程で DIG Easy Hyb™ (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 *OMAI* 相同配列

テンサイゲノム中に含まれる *OMAI* 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* (*BvOMAI-1* とする: E-value [blastp, vs. *AtOMAI* の結果を示す] = E-179) と *LOC104906603* (*BvOMAI-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、*BvOMAI-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 *BvOMAI-1* に随伴する *BvOMAI-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、*BvOMAI-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 *BvOMAI-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 の途中で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<sub>NK-198</sub>* 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ため、両者に共通な領域にプライマーを設計し、第1エク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。

## ***BvOMAI-2* 及び *LOC104888056* の転写解析**

前項までに、*BvOMAI-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。

*BvOMAI-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 *BvOMAI-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、*BvOMAI-2* には、*BvOMAI-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 エキシソンの 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、*BvOMAI-2* にはスプライシングバリエントが存在する (*BvOMAI-2\_X2* とする)。*BvOMAI-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、*BvOMAI-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エント (*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、*BvOMAI-1* 及び *BvOMAI-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 エキシソンの 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 *BvOMAI-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エントや、*BvOMAI-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 エキシソンを 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エ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 *OMAI* 相同遺伝子

次に、被子植物における *OMAI* 相同遺伝子を探索した。At*OMAI* 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 At*OMAI* 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 trichopoda*)、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。

*OMAI* 相同遺伝子を複数コピー保持する種において、At*OMAI* 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 *OMAI* 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 At*OMAI* 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 *OMAI* 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*)、キヌア (*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、Bv*OMAI-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、ハウレンソウ (*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 *CqOMAI-1* 及び *CqOMAI-2* はいずれも保存型であった (いずれも E-value は 2E-177、vs. At*OMAI*)。その周辺領域 200 kbp は互いに高い相同性を示し (図 5-4A)、*CqOMAI-1* 周辺の約 300kbp は Bv*OMAI-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 *OMAI* 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 *BvOMAI-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 (附表 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 *OMAI* 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 *BvOMAI-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 *OMAI* 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 *OMAI* 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 *OMAI* 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 *BvOMAI-1*、*BvOMAI-2*、KWS2320 *orf20L* 及び *orf20<sub>NK-198</sub>* 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 *OMAI* 相同遺伝子に加え、外群としてゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の *OMAI* 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 *OMAI* 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<sub>NK-198</sub>* は単一のクレード (以下、*orf20* クレードとする) を形成した。

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 *AhOMAI* が先に分岐した後に、キヌア及びホウレンソウの *OMAI* 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、*BvOMAI-1* と *BvOMAI-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、*AhOMAI*、*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、*BvOMAI-1* 及び *BvOMAI-2* が単系統群として分岐した後に、ホウレンソウ *SoOMAI* 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 *OMAI* 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、*OMAI* オーソログと *orf20* 様遺伝子で  $dN/dS$  が異なるのか調べた。*OMAI* 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<sub>NK-198</sub>* 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 *OMAI* 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 *OMAI* 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<sub>NK-219-1</sub>* 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、



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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub> 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<sub>NK-198</sub>*—オーソログ間: 45 [vs. *AtOMA1*], 51 [vs. *BvOMA1-1*])。ORF20<sub>NK-198</sub> 固有の in-del 多型が 7 つ見つかかり、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、*OMAI* 遺伝子を高発現する形質転換カルスを作成した。Col-0 及び TA-33BB-O 由来の cDNA を鋳型に、それぞれ *AtOMAI* 及び *BvOMAI-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、*AtOMAI* 導入カルス由来のサンプルから 48 kDa と 28 kDa、*BvOMAI-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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub>* 導入カルスのみで 39kDa のバンドが検出され、*AtOMAI* もしくは *BvOMAI-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<sub>NK-198</sub>* の発現により *preSATP6* 高次構造が変化する (第 2 章) が、*OMAI* 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<sub>NK-198</sub>* 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 *AtOMAI* もしくは *BvOMAI-1* 導入カルスから検出されなかった (図 5-13)。

### ***OMAI* 相同遺伝子間で発現パターンが異なる**

次に、*OMAI* 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 *AtOMAI* 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 *OMAI* 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 *BvOMAI-2* の配列は検出されな

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、*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 *BvOMAI-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、*AtOMAI* の第 1 エキシ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、*AtOMAI* の第 1 エキシソンに相同な配列は Col-0 ゲノム (TAIR10.1) において、*AtOMAI* 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::*Rf1*<sub>NK-198</sub> 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 *Rf1* と TA-33BB-CMS 由来の *rf1* のヘテロ接合体であると考えられる。なお、NK-198 から *BvOMAI-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)。*BvOMAI-1* の第 1 エキシ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 *OMAI* 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 (*BvOMAI-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 *BvOMAI-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)。

### 相同組換えが *Rfl* 対立遺伝子の多様性の獲得に関わる

前章の結果から *Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* 分子バリエーション間の構造比較を行った。比較対象としたのは、NK-198 *Rfl*、TK-81mm-O *rfl*、PI615522 *rfl*、NK-219mm-O *rfl*、NK-305 *Rfl* 及び仏国大葉 *rfl* 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 *Rfl* は NK-198 *Rfl* と PI615522 *rfl* の両者と相同性を示した (図 5-19)。*orf20<sub>NK-305-1</sub>* のコード域は *orf20<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-305-1</sub>* の上流域約 4.7 kbp は *orf20<sub>S</sub>* と高い類似性を示した (付図 5-10)。一方で、*orf20<sub>NK-305-2</sub>* と *orf20<sub>S</sub>* 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<sub>NK-305-2</sub>* 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<sub>NK-305-2</sub>* は NK-198 *Rfl* 由来の *orf18* (*orf21*) と完全に一致した (付図 5-11、付図 5-12)。*orf20<sub>NK-305-2</sub>* と *orf20<sub>S</sub>* 間の相同性は下流 5.2 kbp に及ぶ (付図 5-10) 一方で、*orf20<sub>NK-305-2</sub>* 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 *rfl* は NK-198 *Rfl* と相同性を示した (図 5-19)。*orf20<sub>fukukoku</sub>* のコード域は *orf20<sub>NK-198</sub>* と一塩基多型を除き、完全一致であった (大神 2013)。*orf20<sub>fukukoku</sub>* 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)。

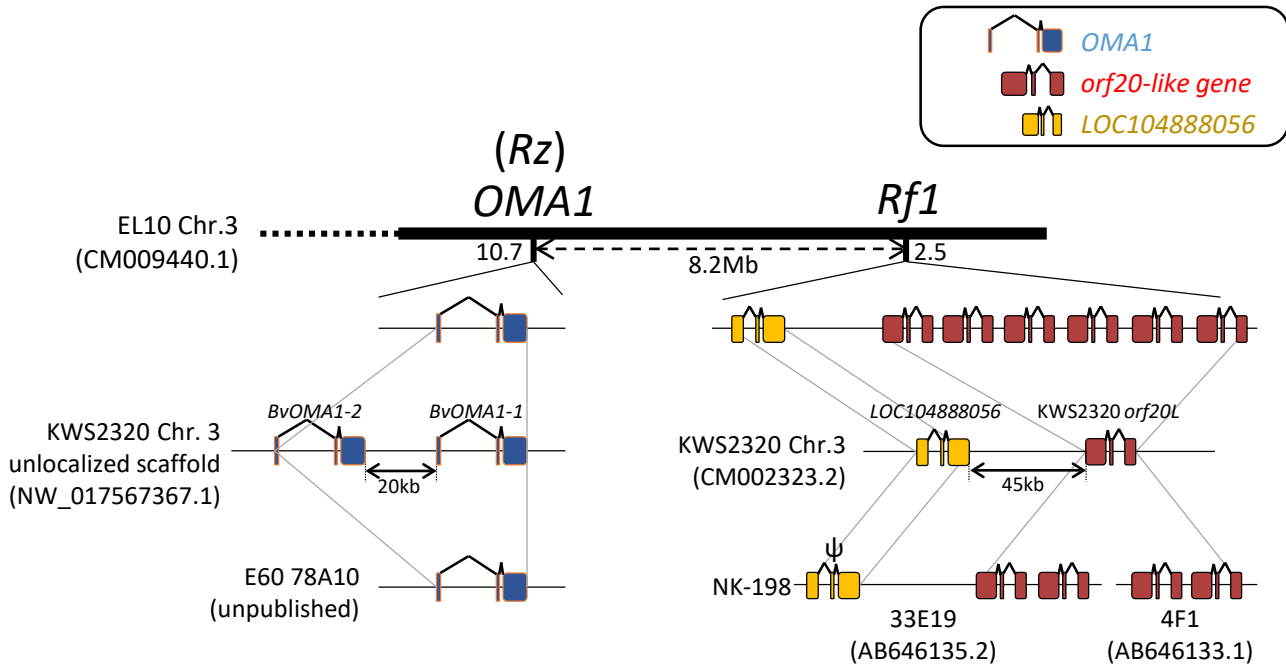


図5-1 テンサイゲノムにおけるOMA1相同遺伝子の模式図

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ス番号を示す。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。

表5-1 Beteae連におけるOMAI相同遺伝子の分布

Section	Species	ID	Accession no. / Line	BvOMAI-1	BvOMAI-2	orf20-like gene	LOC104888056	Source <sup>a</sup>
-	<i>Patellifolia patellaris</i>	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	
	<i>Patellifolia procumbens</i>	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					
<i>Patellifolia webbiana</i>	29	IDBBNR 5781						
	30	IDBBNR 5776						
	31	IDBBNR 5783						
	32	IDBBNR 5783						
	33	IDBBNR 5783						
	34	IDBBNR 5783						
	35	IDBBNR 5783						
Corollinae	<i>Beta macrorhiza</i>	38	IDBBNR 4679					
		39	IDBBNR 4679					
	<i>Beta trigyna</i>	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	<i>Beta macrocarpa</i>	47	BETA648					IPK
		48	BETA709					
		49	BETA874					
	<i>Beta patula</i>	36	IDBBNR 4714					USDA
		37	IDBBNR 4714					
	<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>maritima</i>	27	BGRC56777					FAL
		28	BGRC56777					
		50	BGRC56777					
	<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>vulgaris</i>	41	TA-33BB-O					HARC
		42	TK-81mm-O					
		43	NK-305					
		44	I-12CMS(3)					GW
		45	I-12CMS(R)					
		46	BETA1050					IPK
	<i>Beta vulgaris</i> ssp. <i>adanensis</i>	51	BETA2161					
52		BETA1474						
53		BETA1474						
54		BETA1474						
55		BETA1474						
-	-	-	No template					

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。

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

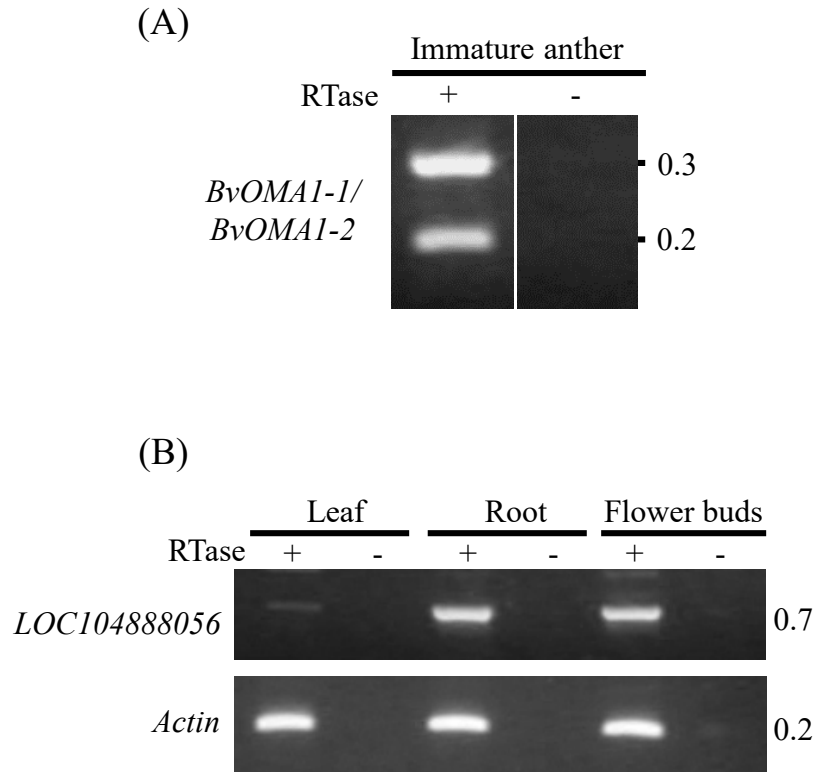


図 5-2 *BvOMAI-2* (A) 及び *LOC104888056* (B) の転写解析

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)。

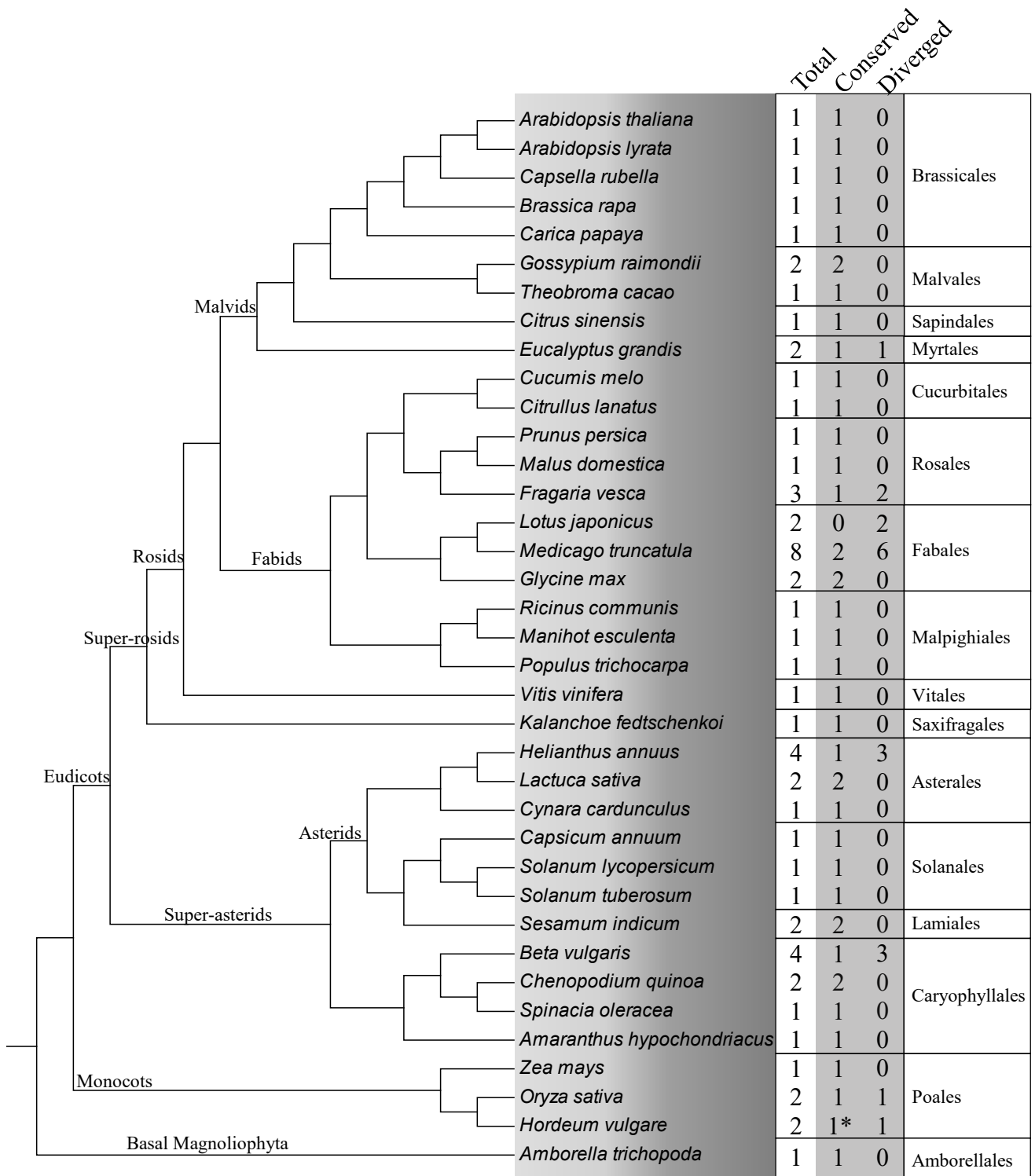


図5-3 被子植物におけるOMAI相同遺伝子のコピー数

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)。



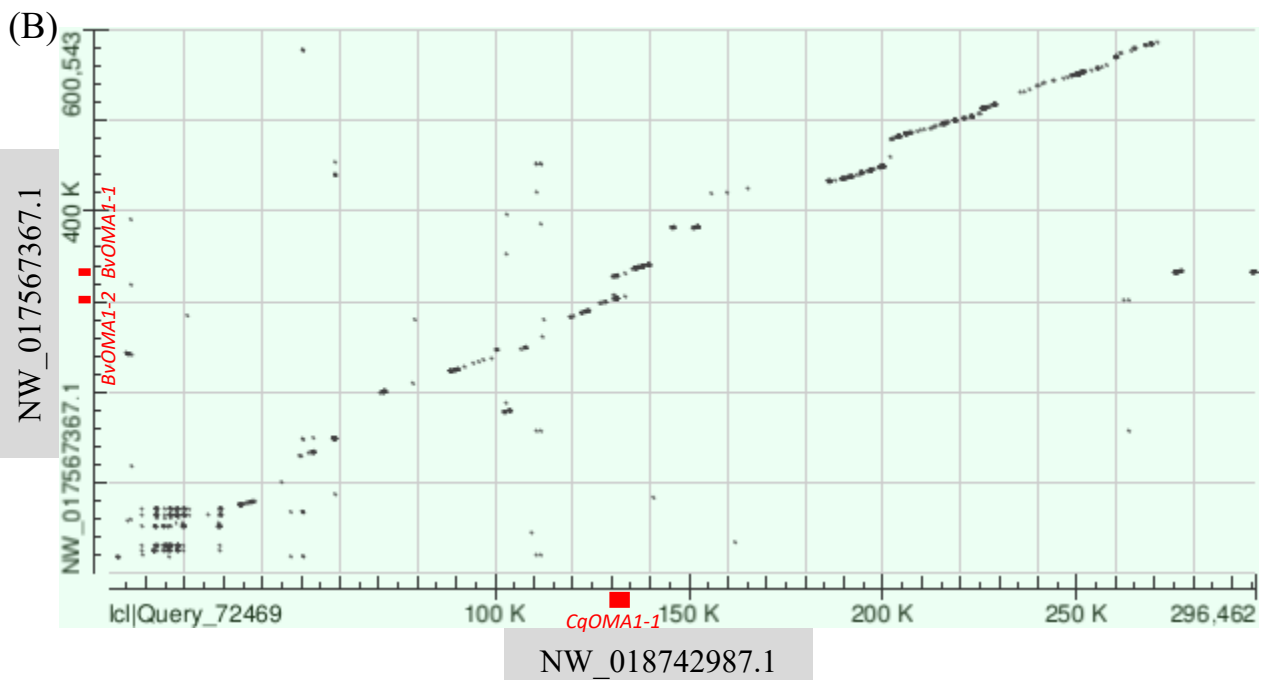
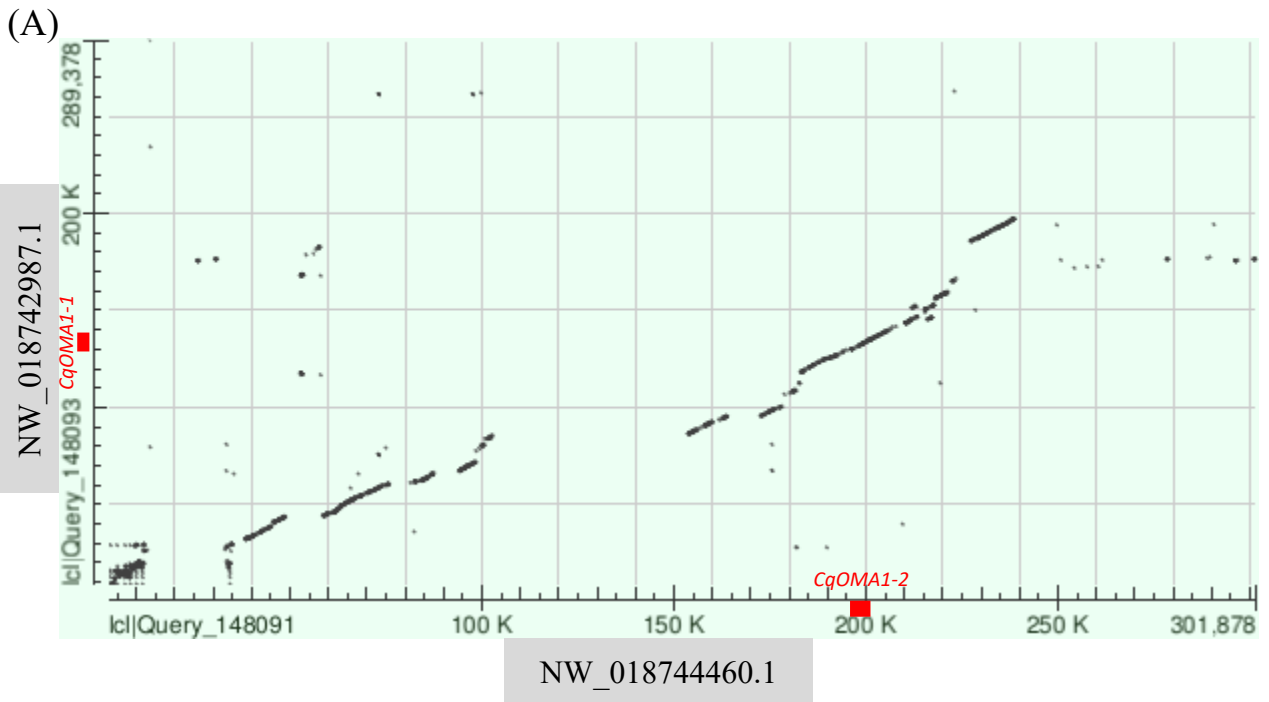


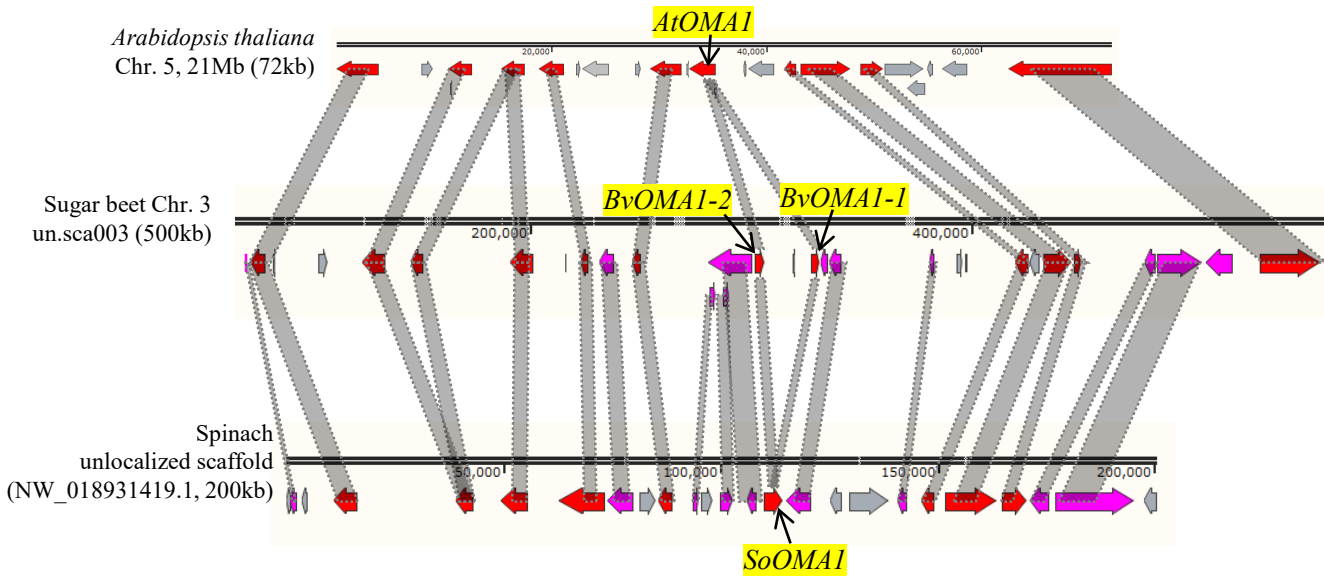
図5-4 *OMAI*相同遺伝子の周辺領域のドットプロット

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*OMAI*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 (*CqOMAI-1*を含む)、横軸はNW\_018744460.1 (*CqOMAI-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、*BvOMAI-1*及び*BvOMAI-2*を含む)、横軸はキノア由来のscaffoldの部分配列 (NW\_018742987.1、*CqOMAI-1*を含む) である。

(A)



(B)

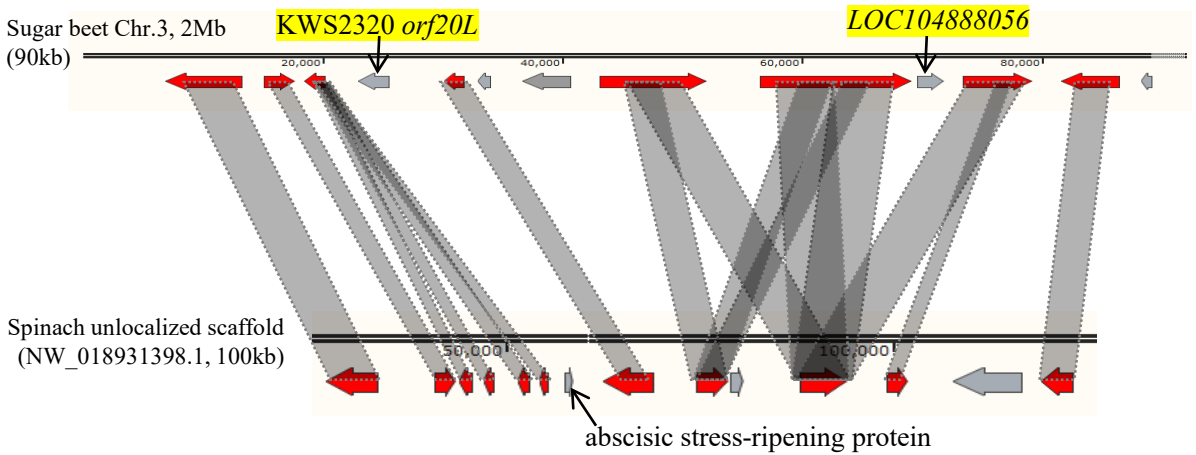


図5-5 テンサイ、ホウレンソウ及びシロイヌナズナのOMAI相同遺伝子周辺領域のシンテニー

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のアクセス番号を付した。

(A) テンサイ*BvOMAI-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。*OMAI*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*rf1*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。

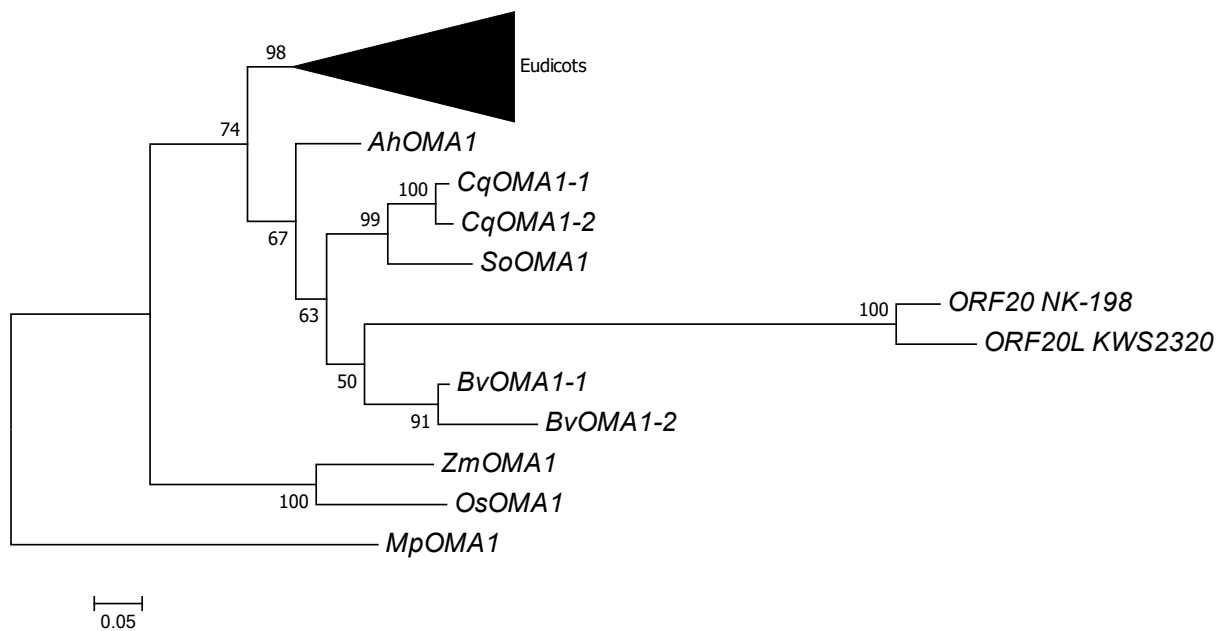


図5-6 近隣結合法によって予測された被子植物*OMA1*相同遺伝子の分子系統樹

*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*

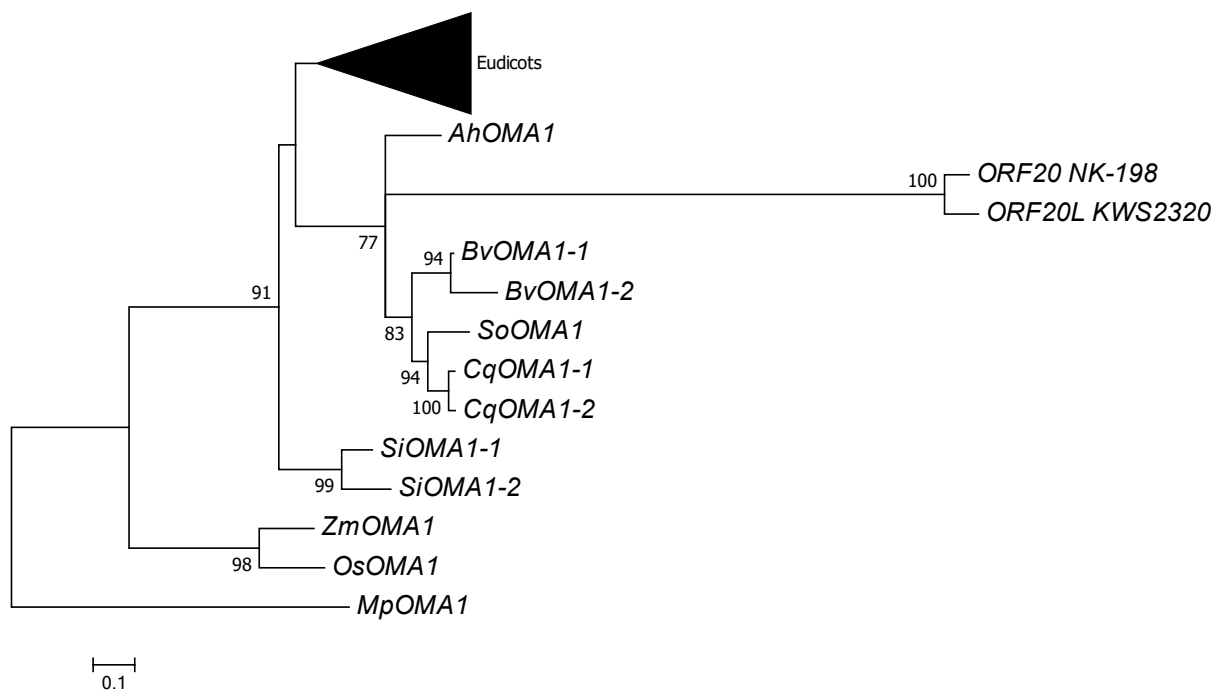


図5-7 最尤法による被子植物*OMA1*相同遺伝子の分子系統学樹

*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	$\omega_0$	$\omega_{OMAI}$	$\omega_{orf20}$	Parameter no.	lnL <sup>a</sup>	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
One ratio	0.24	-	-	85	-36059.34	-
Branch	-	0.22	1.23	86	-35982.20	2.0E-35

<sup>a</sup> 各モデルにおける対数尤度を示す。

<sup>b</sup> 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	$\omega$	Parameter no.	lnL <sup>a</sup>	<i>p</i> -value <sup>b</sup>
M0	2.45	21	-2870.16	-
M1a	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

<sup>a</sup> 各モデルにおける対数尤度を示す。

<sup>b</sup> 尤度比検定による *p* 値を示す

```

orf20_NK-198 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGSTNKCSGLFSGSAKSGYFN 60
orf20_Fukkoku MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGSTNKCSGLFSGSAKSGYFN 60
orf20_NK-305-1 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGSTNKCSGLFSGSAKSGYFN 60
orf18 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGSTNKCSGLFSGSAKSGYFN 60
orf21 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGSTNKCSGLFSGSAKSGYFN 60
orf20_219-2 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGST-KCSGLFSGSAKSGYFN 59
orf20_NK-305-2 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGST-KCSGLFSGSAKSGYFN 59
orf19 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGSTNKCSGLFSGSAKSGYFN 60
orf20_S MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGST-KCSGLFSGSAKSGYFN 59
orf20L MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGST-KCSGLFSGSAKSGYFN 59
orf20_219-3 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGST-KCSGLFSGSAKSGYFN 59
*****

orf20_NK-198 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP 119
orf20_Fukkoku GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP 119
orf20_NK-305-1 GFKHHQEISSFSGYARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP 119
orf18 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP 119
orf21 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFG-ILGYPHVHPVVVP 119
orf20_219-2 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKLL-----LALI-LIAYRHVHPVVVP 113
orf20_NK-305-2 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKLLGIALMLSTG-IFAYRHVHPVVVP 118
orf19 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSAESLLEKLL-----LAVALI-LIAYRHVHPVVVP 116
orf20_S GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKLLGIALMLSTG-IFAYRHVHPVVVP 118
orf20L GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVFRVEKLLGIALIISHSGMIAFFYLHPVVVP 119
orf20_219-3 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVFRVGKLLGIAIILHSGMTAFLYLHPVVVP 119
*****:***** ***** * :*:* : : : :*****

orf20_NK-198 YTGRKHVLMSTTRENIEGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 179
orf20_Fukkoku YTGRKHVLMSTTRENIEGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 179
orf20_NK-305-1 YTGRKHVLMSTTRENIEGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 179
orf18 YTGRKHVLMSTTRENIEGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 179
orf21 YTGRKHVLMSTTRENIEGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 179
orf20_219-2 YTGRKHVLMSTTRENIEGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 173
orf20_NK-305-2 YTGRKHVLI STTDENEKGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 178
orf19 YTGRKHVLMSTTRENENGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHI ESLEIREINHHELELE 176
orf20_S YTGRKHVLI STTDENEKGEVEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 178
orf20L YTGRKHVILSTTHENENGEFEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 179
orf20_219-3 YTGRKHVILSTTHENENGEFEKRKIQATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 179
*****:*** ** *.*****:*****:*****

orf20_NK-198 ----RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLL 235
orf20_Fukkoku ----RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLL 235
orf20_NK-305-1 ----RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLL 235
orf18 LE--RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLL 237
orf21 LE--RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLL 237
orf20_219-2 LELERDETLKENTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSYLF 233
orf20_NK-305-2 ----RDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF 234
orf19 ----RDETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF 232
orf20_S ----RDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF 234
orf20L LELERDETFKEKTIWKEETHDKDSRKKHSGAKITTNH-EGMNWEIFVVDKPLVESSCIF 238
orf20_219-3 LELERDETFKEKTIWKEETHDKDSRKKHSGAKITTNH-EGMNWEIFVVDKPLVESSCIF 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    GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLIS-LNVILFKILF 294
orf20_NK-305-1  GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLIS-LNVILFKILF 294
orf18            GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLIS-LNVILFKILF 296
orf21            GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLIS-LNVILFKILF 296
orf20_219-2     GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAENRTAFFWWSMS-LYVIIFEVLF 292
orf20_NK-305-2  GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMS-LYVIIFEVLF 293
orf19            DGKIVVYTGLLNHFNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEHWTALFWWSMLGFYVTLFEILF 292
orf20_S         GGKIVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMS-LYVIIFEVLF 293
orf20L          GGKIVVYTGLLNHCISDAELATIIAHQVGHAVARHEAEHWTLLWSILLVIYMTIFQYLF 298
orf20_219-3     GGKIVVYTGLLNHCISDAELATIIAHQVGHAVARHEAEHWTLLWSILLVIYMTIFQILF 298
.*****          *****:**. *: : : :*: **

```

```

orf20_NK-198      TEPEANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARAPQLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI 353
orf20_Fukkoku    TEPEFANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARAPQLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI 353
orf20_NK-305-1  TEPEFANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARAPQLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI 353
orf18            TEPEANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARAPQLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI 355
orf21            TEPEANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARAPQLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI 355
orf20_219-2     TARKFANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARAPQLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI 351
orf20_NK-305-2  TARKFANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARAPQLPRT-ICLSLVGLFSSVFILYYGRKEI 352
orf19            TAPEFANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARFHQLPRTTTLRLGFVGLSSLVFIYFGRKEI 352
orf20_S         TARKFANARSKLLLRHPLLQKVWIKIARFHQLPRTTTLHLGFLGLSSLVFIYFGRKEI 353
orf20L          TAPEFANAISKLLSRHPLLQKVWIKIARFHQLPRTTTLHLGFLGLSSLVFIYFGRKEI 358
orf20_219-3     TAPEFANAISKLLSRHPLLQKLVKIKIATAHLLPRT-ALGVVGLFSLVFIYFGRKEI 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
*****          *****.*****

```

```

orf20_NK-198      KIYNEVVAGRAIQGLQ 429
orf20_Fukkoku    KIYNEVVAGRAIQGLQ 429
orf20_NK-305-1  KIYNEVVAGRAIQGLQ 429
orf18            KIYNEVVAGRAIQGLQ 431
orf21            KIYNEVVAGRAIQGLQ 431
orf20_219-2     KIYNEVVAGRAIQGLQ 427
orf20_NK-305-2  KIYNEVVAGRAIQGLQ 428
orf19            KIYNEVVAGRAIQGLQ 428
orf20_S         KIYNEVVAGRAIQGLQ 429
orf20L          KIYNEVVAGRAIQGLQ 434
orf20_219-3     KIYNEVVAGRAIQGLQ 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	MSWYRRTKLVFDSLRRNINPKILPRSHVTS---RINNPIGSSNPSAKFSSISSREVLRS	57
BvOMA1-1	MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVQSPIPRINSNSSLFYNQFKSSVISGSPSIS	60
ORF20_NK-198	MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFG----TIPTPRVHSNSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKS	56
	*:***: :*: *	
AtOMA1	WTSLGRNTNRIAYNPFLSQPKRYYYVDYRQVRFHFKPRGPGRWFQNPRTVFTVVLVGSVGL	117
BvOMA1-1	KFGYLNQVQKQSSSLFSCVTSRNYHVDRNQIYHFKPRGFKSWFENPRHIFIAVVI GSGVV	120
ORF20_NK-198	GYFNG-FKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVES-----WLEKFLVPIGLILTFGI	107
	: : . * . * * : * : : . : : . : : : :	
AtOMA1	ITLIVGNTETIPYTKRTHFILLSKPMKLLGETQFEQIKKTYQGKILPATHPESIRVRLI	177
BvOMA1-1	ITVYFGNSEVVPYTKRKHVLLSRTLERRIGDSQFEKMKEDFKGKILPAIHPSVSRVRLI	180
ORF20_NK-198	LGYPHVHPVVVPYTKRKHVLLMSTRENEIG-----EVEKRKIQPATHPDTRVRSI	159
	: : : : ** * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * : * * * :	
AtOMA1	AKEVIDALQRGLSNERVWSDLGASTESSLGGSKGVKEMEMAMSGEDTMDMKWSKED	237
BvOMA1-1	SKDIIESLERGISHERAWSSPGYATES---VSHHEIDGHE <b>TMKALTEGMDEKVPGDWHKEE</b>	238
ORF20_NK-198	FQHILESLERINHHELELE-----RDETFKEK	187
	: : : : * * : : : . *	
AtOMA1	QVLDDQWIQSRKKDS---KAHAATSHLEGISWEVLVNEPIVNAFCLPAGKIVVFTGLLN	295
BvOMA1-1	<b>EVLDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTT</b> NHLEGLNWEVLVNEPVVNAFCLPGGKIVVFTGLLK	298
ORF20_NK-198	TIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLLGGKIVVYTGGLN	247
	: : : : : : : : : * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * :	
AtOMA1	HFKSDAEVATVIG <b>HEVGH</b> AVARHVAEGITKNLWFAILQ---LVLYQFVMPDLVNTMSALF	352
BvOMA1-1	HFKSDAELATII <b>HEVGH</b> AVARHSAEQITKNMWFAILQ---LILYQFIAPDFANAMSNLL	255
ORF20_NK-198	HCNSDAELATII <b>HQVGH</b> AVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPESANARSKLL	307
	* : * * * * : * :	
AtOMA1	LRLPFSR-----KMEIEADYIGLLLLASAG	377
BvOMA1-1	<b>LRLPFSR-----KMEIEADYIGLLLLMASAG</b>	380
ORF20_NK-198	LRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPTICLSLVGLFSSVFIYYGRKEIEADHIGVLLMASAG	367
	** * : : : * * * * * : * :	
AtOMA1	YDPRVAPTVEKLGKLG--DALGDYLSTHPSGKKRSKLLAQANVMEEALMIYREVQAGR	435
BvOMA1-1	<b>YDPRIAPQVYEKLGKISGESSL</b> TEYLSTHPSGKKRAQLLARAHIHQEAVDMYREIVAGR	440
ORF20_NK-198	YDPRVAPQVYDKLAKPLG----DWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYNEVVAGR	423
	* * * * : * :	
AtOMA1	TGVEGFL 442	
BvOMA1-1	-AIEGFL 446	
ORF20_NK-198	-AIQGLQ 429	
	: : * :	

図 5-9 OMA1 オースログ及び *orf20<sub>NK-198</sub>* 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。



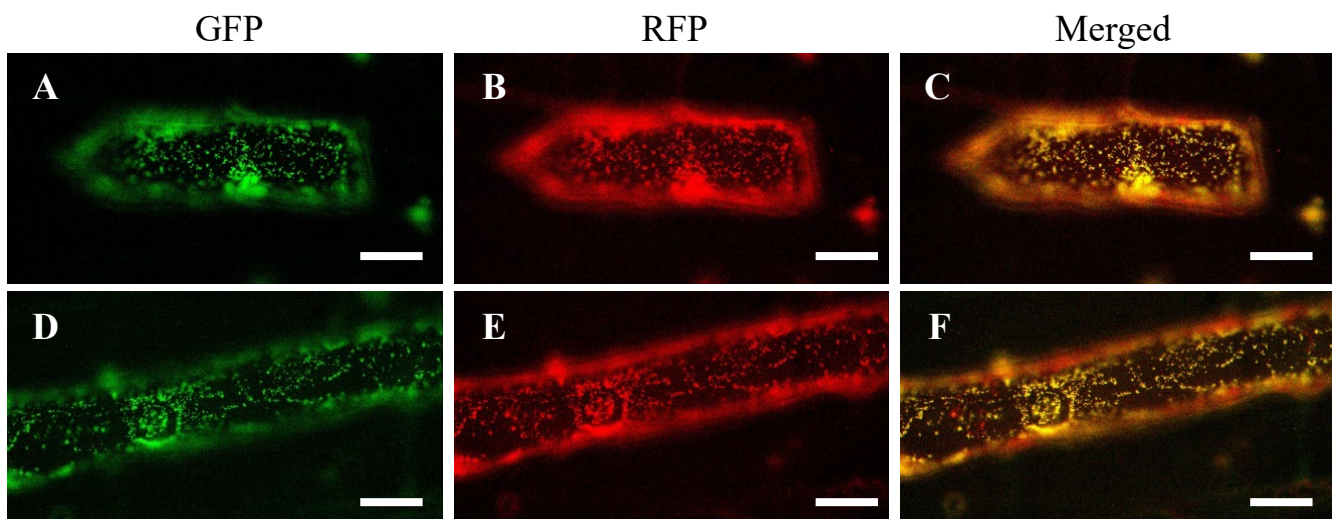


図5-10 *OMA1*相同遺伝子の翻訳産物の細胞内局在

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F<sub>1</sub>-ATPase  $\delta$ -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  $\mu$ mを示す。



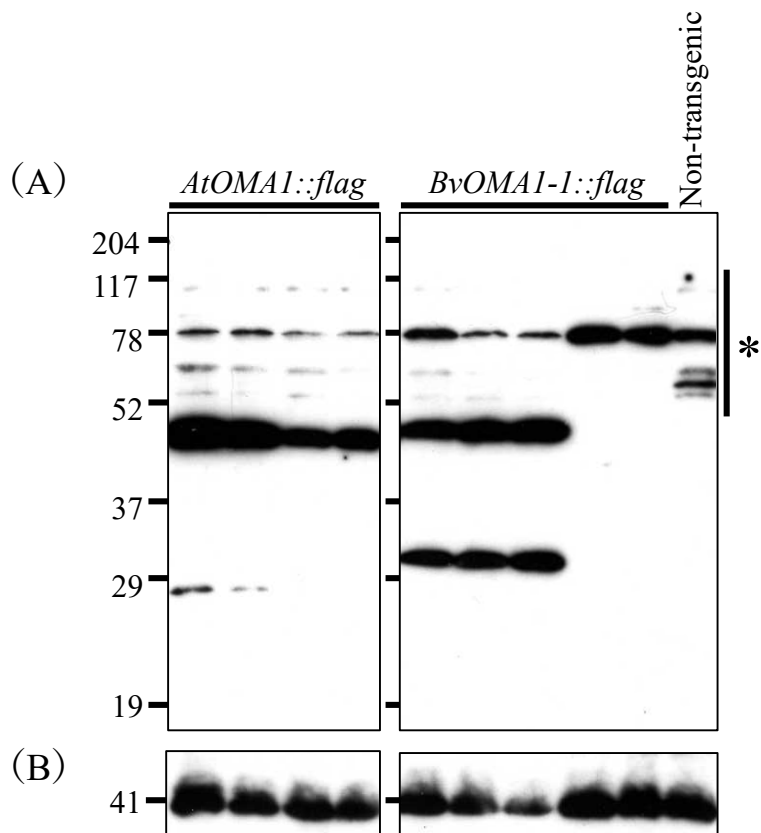


図5-11 形質転換培養細胞における導入遺伝子由来タンパク質蓄積確認実験

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。

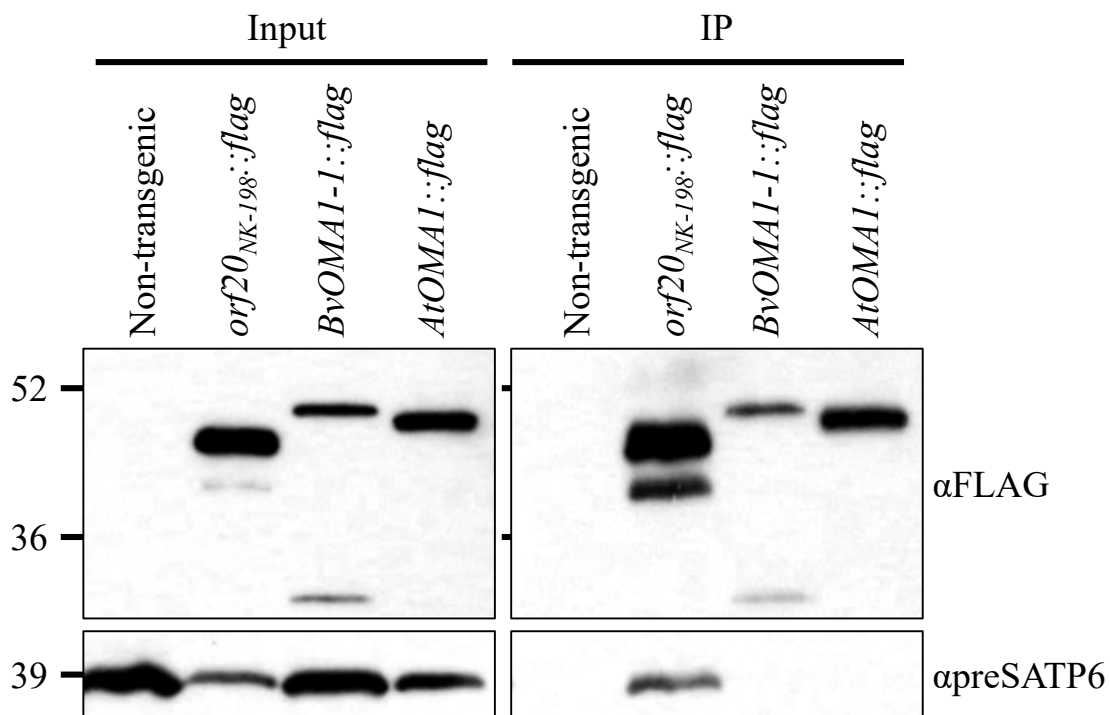


図5-12 共免疫沈降法によるpreSAMP6とのタンパク質間相互作用解析

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(αFLAG)は40 ng/ml、抗preSAMP6抗体(αpreSAMP6)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。

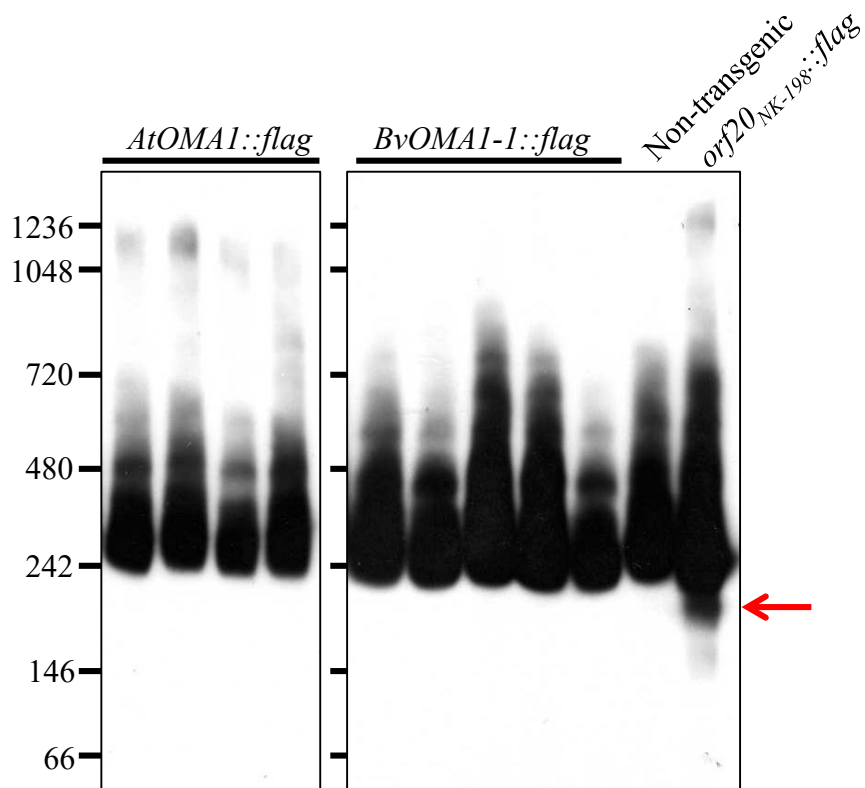


図5-13 形質転換カルスを用いたpreS ATP6複合体解析

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。Non-transgenicは非形質転換カルス由来のサンプルを示す。検出には抗preS ATP6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。

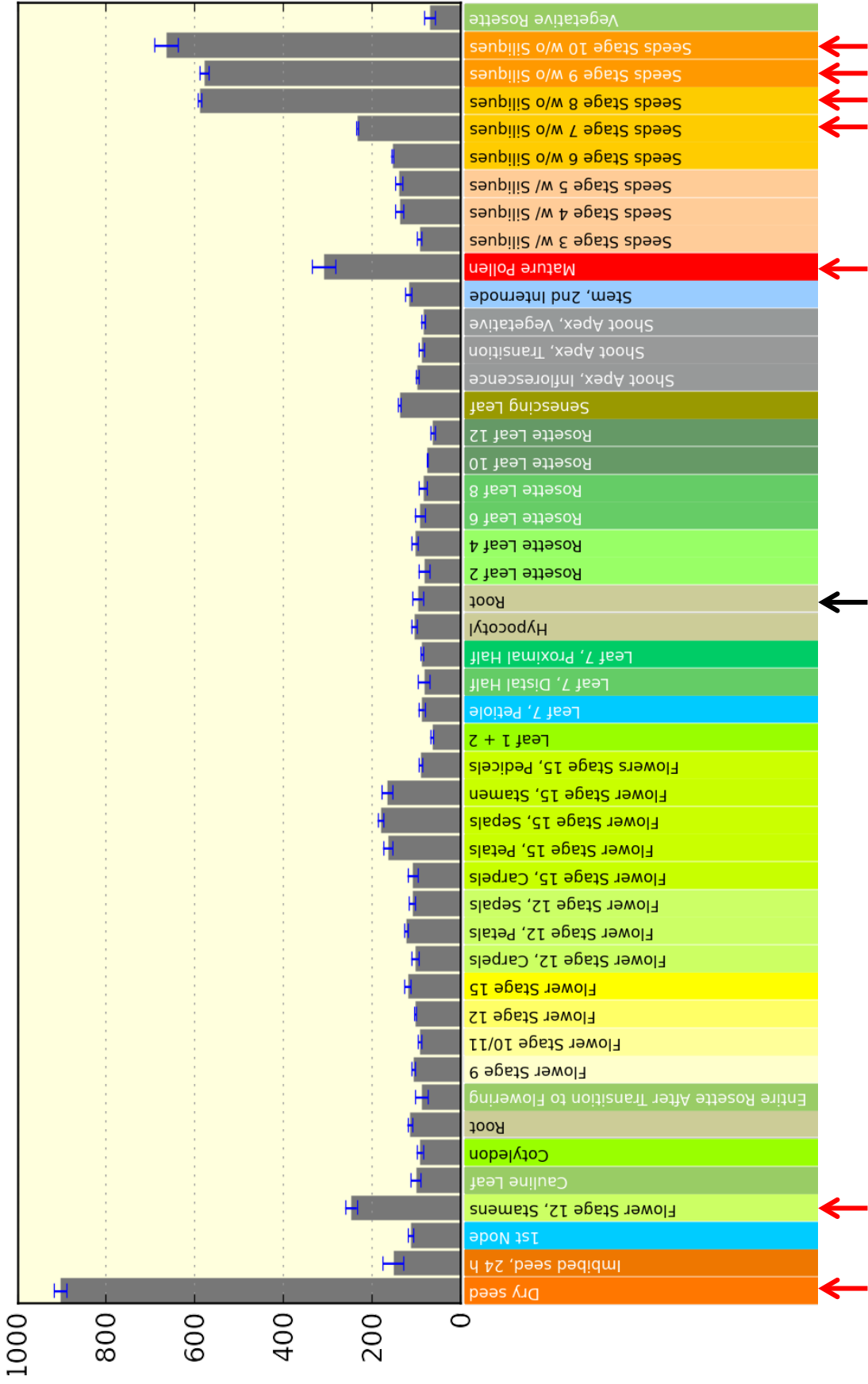


図5-14 マイクロアレイデータベースにおけるAtOMAIのmRNA量

縦軸に相対発現量、横軸に器官名及びその発達ステージを示す。根の発現量（黒矢印で示す）よりも2倍以上の発現変動が見られた器官を赤矢印で示す。

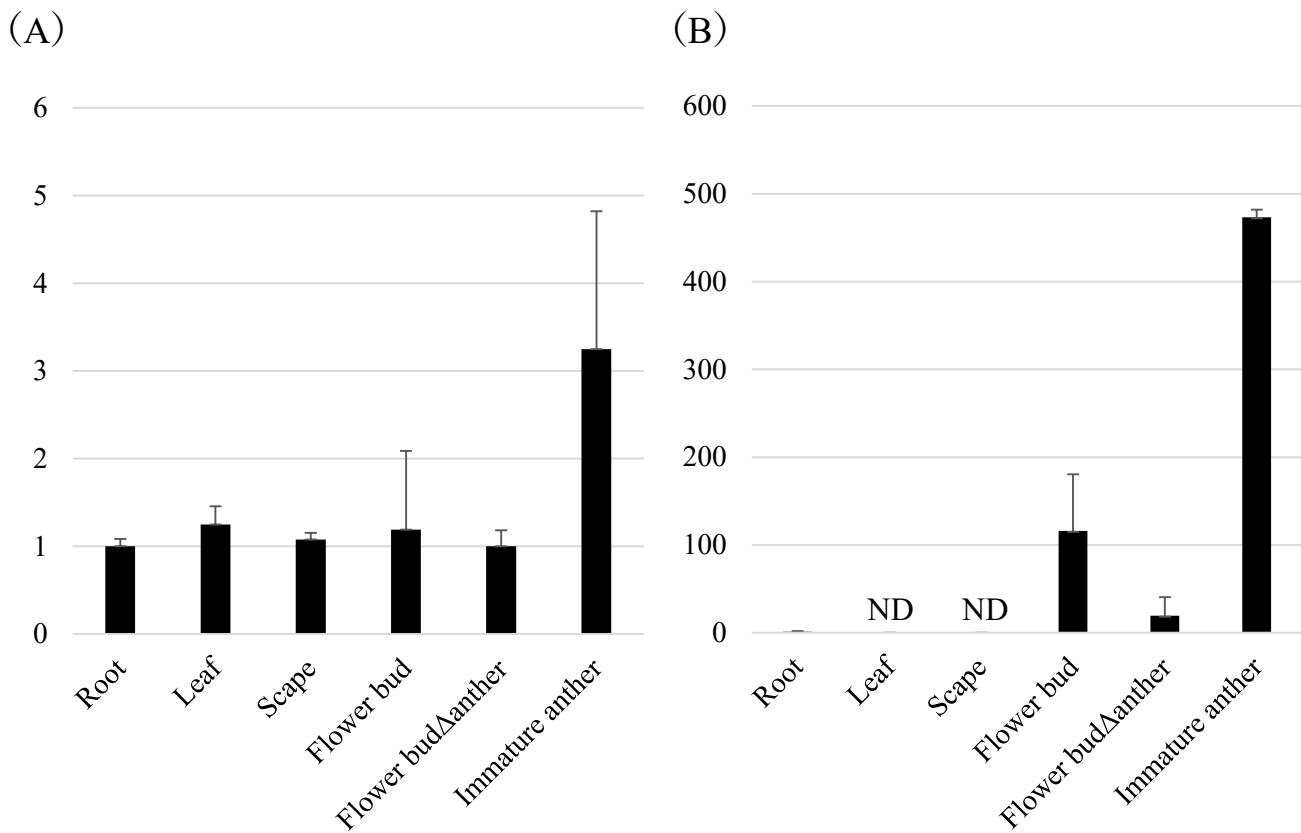


図5-15 テンサイ *OMA1* 相同遺伝子の器官毎の mRNA 量

*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 $\Delta$ 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。

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

Reference gene		<i>Actin</i>		<i>efla</i>	
Target gene		<i>BvOMAI-1</i>	<i>orf20L</i>	<i>BvOMAI-1</i>	<i>orf20L</i>
Organ	Root	1.00±0.09	1.00±0.91	1.00±0.12	1.00±0.95
	Leaf	1.25±0.21	ND <sup>a</sup>	1.45±0.33	ND
	Scape	1.08±0.08	ND	1.42±0.07	ND
	Flower bud	1.19±0.90	115.90±64.61	1.38±1.09	123.40±75.93
	Flower budΔanther	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

Mean ± SD, *n* = 3; <sup>a</sup> Not detected

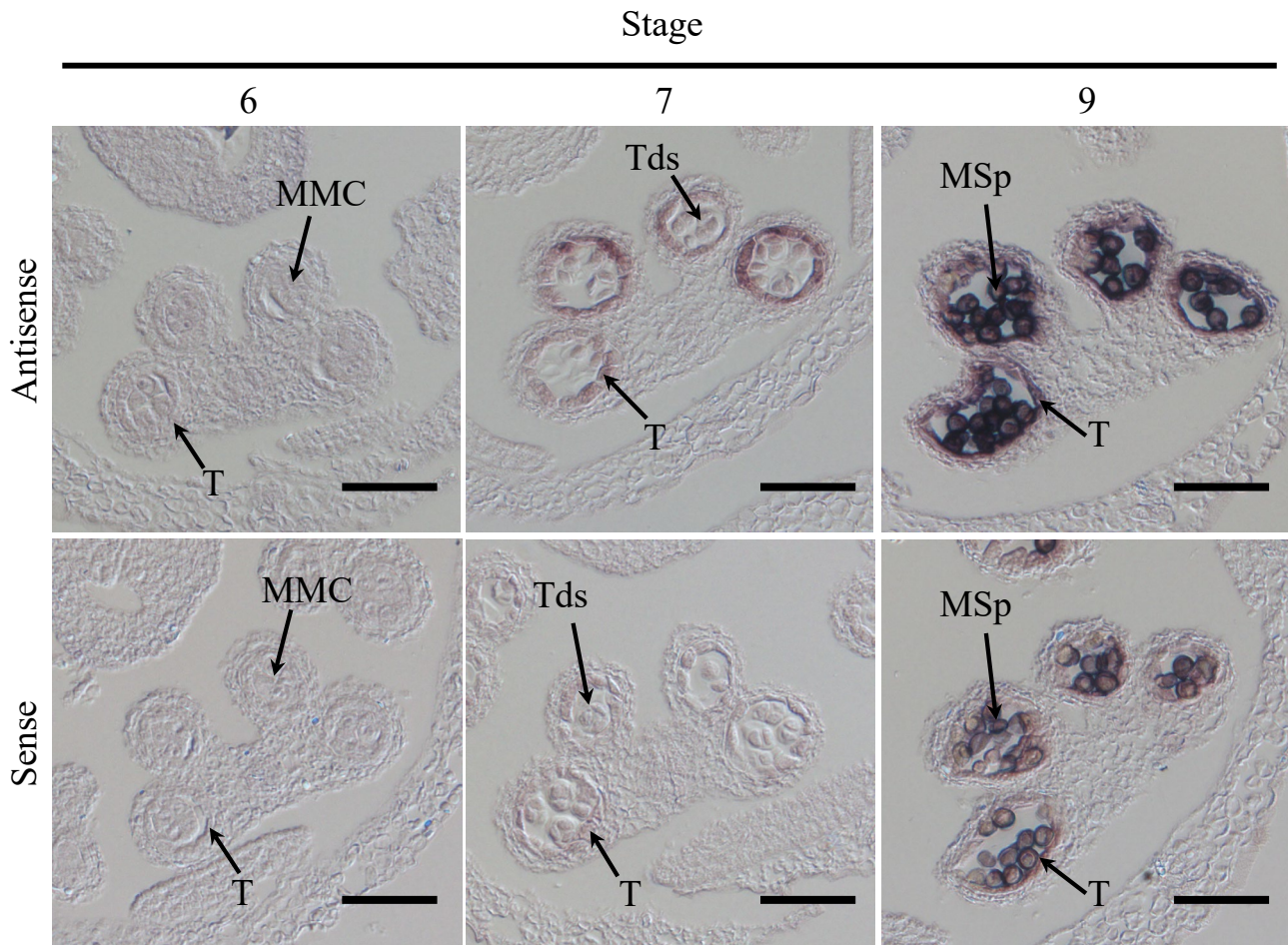


図5-16 シロイヌナズナ未成熟葯における*AtOMAI* mRNAの局在

*AtOMAI*の第1エク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  $\mu\text{m}$ 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



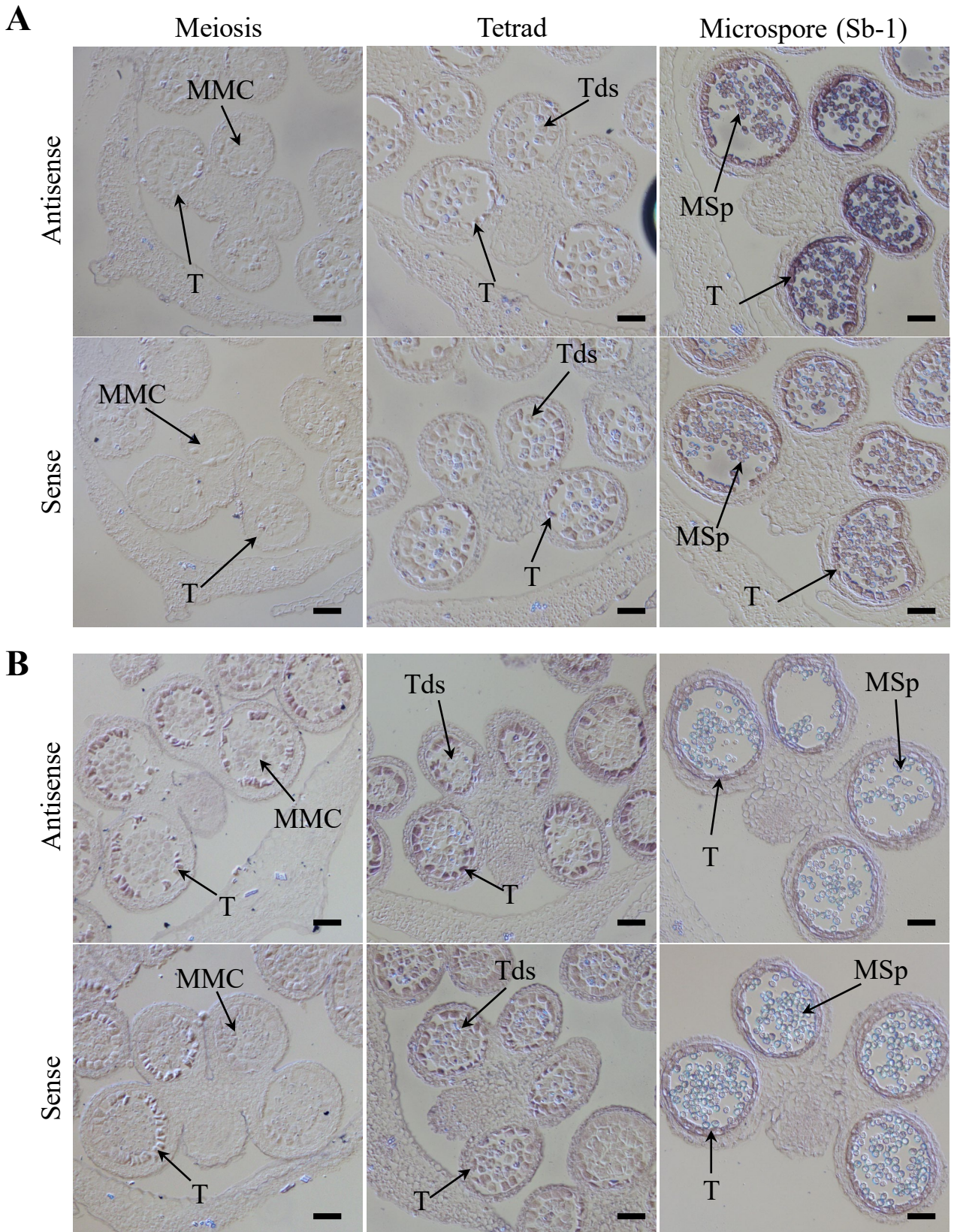


図5-17 テンサイ未成熟葯における*BvOMAI-1*と*orf20*様遺伝子 mRNAの局在

*BvOMAI-1*の第1エク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  $\mu$ m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



表5-5 シロイヌナズナとテンサイの*OMAI*相同遺伝子 mRNA局在の比較

Target	Tissue	Anther developmental stage <sup>a</sup>		
		Meiosis	Tetrad	Microspore
<i>AtOMAI</i>	Tapetum			
	Microspore			
<i>BvOMAI-1</i>	Tapetum			
	Microspore			
<i>orf20-like gene</i>	Tapetum			
	Microspore			

<sup>a</sup> 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。

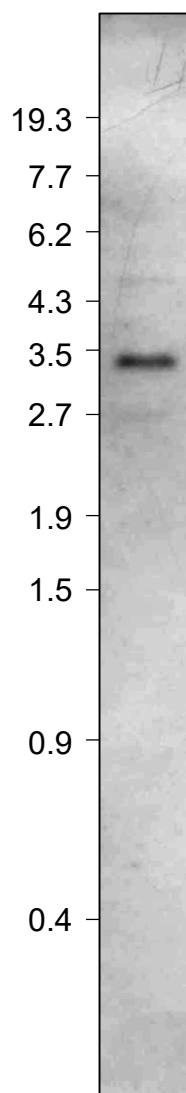


図5-18 サザンブロット解析のブロット像

*BvOMAI-1*の第1エク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。

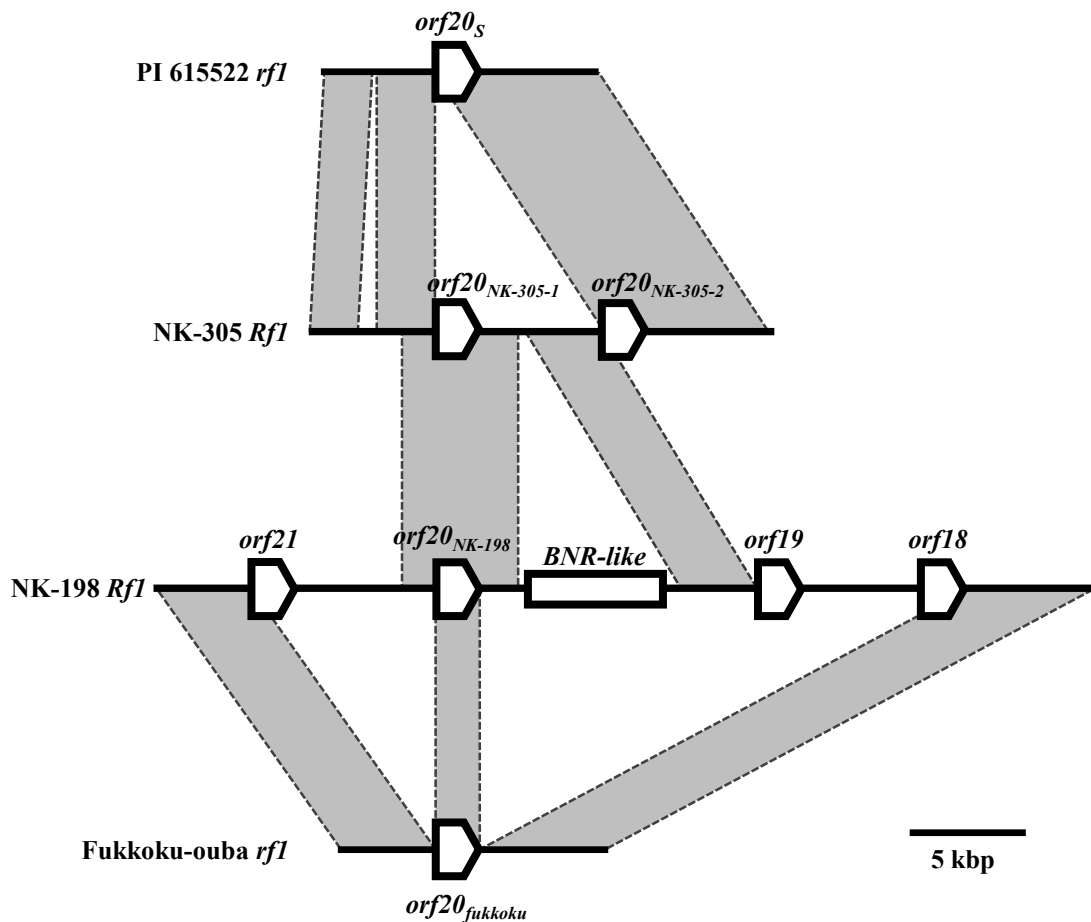


図5-19 PI615522 *rfl*、NK-305 *Rfl*、NK-198 *Rfl*及び仏国大葉*rfl*の分子構造比較

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。

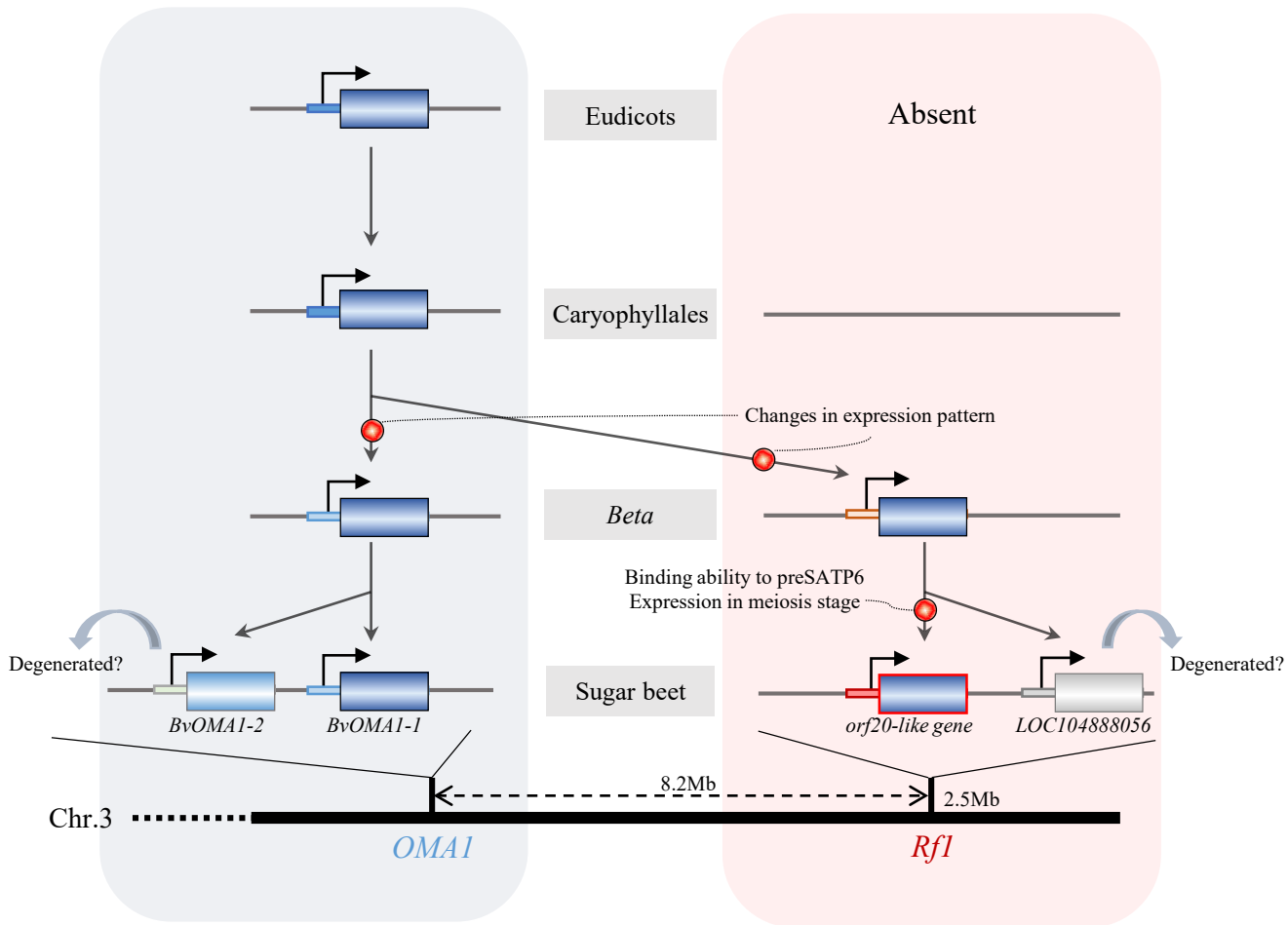


図5-20 *Rfl*分子進化モデル

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、*Rfl*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*LOC10488056*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、*OMAI*は一コピーであり、その周辺領域はテンサイ*OMAI*座でも保存されている。ヒユ科の共通祖先において*Rfl*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。*OMAI*座におけるパラログ（*BvOMAI-2*、左端）は退化する途中なのかもしれない。一方、*Rfl*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薬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*OMAI*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*LOC10488056*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 *OMAI* 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 *OMAI* 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的側面からアプローチしていることになる。形質転換カラスの結果によれば、*OMAI* オーソログである *BvOMAI-1* は *preSarp6* と相互作用しない。このことは、*BvOMAI-1* が発現している TA-33BB-CMS の未熟葯において *preSarp6* との相互作用は検出されない（第2章）ことから支持される。*AtOMAI* と *preSarp6* の相互作用も検出されないことから、*OMAI* オーソログは一般に *preSarp6* 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、*preSarp6* 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。*preSarp6* 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、*OMAI* が遺伝子重複後に獲得した *preSarp6* 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、*BvOMAI-1* と *AtOMAI* は全身で発現している。興味深いことに、*BvOMAI-1* と *AtOMAI* の発現パターンは同一ではなく、*AtOMAI* と比較して *BvOMAI-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、*BvOMAI-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、*preSarp6* と相互作用して稔性回復を行う以外に *OMAI* 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エーション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、*OMAI* 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。

*OMAI* 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、*OMAI* オーソログ欠損変異体の詳細な解析は

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 *OMAI* 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、*BvOMAI-1*、及び *AtOMAI* の発現パターンは、*AtOMAI* 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 *OMAI* オース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-neofunctionalization (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 *Rfl* 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 *OMAI* 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 *BvOMAI-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 *BvOMAI-2* が座乗していた。後二者は、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エーションが見られた。*orf20* 様遺伝子や *BvOMAI-1* ではスプライシングバリエーション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 *BvOMAI-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、*Rfl* 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

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 *OMAI* 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. sueticum* 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 *OMAI* 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、*BvOMAI-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。後者のハウレンソウにおけるシンテニー領域には *OMAI* 相同配列は見つからない。さらに、*BvOMAI-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 *OMAI* 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 *OMAI* 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 *OMAI* 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 *OMAI* 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。

### ***Rf1* 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エーション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エーションである。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*<sub>NK-305-2</sub> のコード域内が *orf20<sub>s</sub>* と *orf18(orf21)* の両者に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に関わる可能性を支持する。前章までの結果によれば、*orf20*<sub>NK-305-2</sub> と *orf20<sub>s</sub>* は *preSatp6* 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



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 Yme1 は Oma1 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、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 F<sub>0</sub> 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* 様遺伝子の特徴付けた。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 (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)。*Rfl* 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。

### ***Rfl* 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。*Rfl*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増加した分子バリエーションが現れる。表 6-1 によると、*Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* に含まれる *orf20*<sub>NK-198</sub> 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成し、それら導入遺伝子を交配により集積させて *trans* 配置の状態を作成したが、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エーションを作成するという意義があるのかもしれない。このことは、*Rfl* 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。

*Rfl* 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 *Rfl* 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 *rfl* や NK-305 *Rfl*) 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、*Rfl* 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、*Rfl* 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。

う。野生ビートにおける Owen 細胞質の頻度は一般的に低い、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 *Rfl* 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 *Rfl* 分子バリエーションが異なるとすれば、多様な *Rfl* 対立遺伝子が見つかることの説明となり得るが、各 *Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* 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* で共通している点が多い。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エーション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エーション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 *rfl* 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 *Rfl* 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エーションが発見されるかもしれない。さらに、テンサイ *Rfl* 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 *Rfl* 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

要がある。

本研究において *orf20* 様遺伝子の祖先遺伝子が *Oma1* 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* との相互作用機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 *Oma1* 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 *Rf1* 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、*Rf1* 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。

### ***Rf1* 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、*Rfl* 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 *Rfl* 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、*Rfl* 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。



表6-1 *Rf1*対立遺伝子の作用力と *orf20*様遺伝子の機能

Derivation	s17/20L-int	Degree of fertility restoration	Dose-effect		<i>orf20</i> -like gene	Protein-protein interaction with preSASP6	<i>orf20</i> -like gene mRNA <sup>b</sup>
			on fertility restoration	on the accumulation of 250kDa complex			
TA-33BB-O	p4/L	C.S.	No	No	<i>orf20L</i>	-	0.11
PI 615522	p3/S	C.S.	No	No	<i>orf20S</i>	-	0.18
NK-219mm-O	p5/LS (type-219)	C.S.	No	No	<i>orf20<sub>NK-219-1</sub></i>	ND	0.38
					<i>orf20<sub>NK-219-2</sub></i>	-	
					<i>orf20<sub>NK-219-3</sub></i>	-	
Fukkoku-ouba	p5/S	C.S. <sup>a</sup>	No?	No?	<i>orf20<sub>fukkoku</sub></i>	+	0.25
NK-305	p2/S	S.S.b	Yes	Yes	<i>orf20<sub>NK-305-1</sub></i>	+	0.81
					<i>orf20<sub>NK-305-2</sub></i>	-	
NK-198	p1/S	N	No	Yes	<i>orf18</i>	+	1.00
					<i>orf19</i>	+	
					<i>orf20<sub>NK-198</sub></i>	+	
					<i>orf21</i>	+	

<sup>a</sup> 葯内部に未発達の花粉粒が観察され、ごくわずかに回復する。

<sup>b</sup> 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。

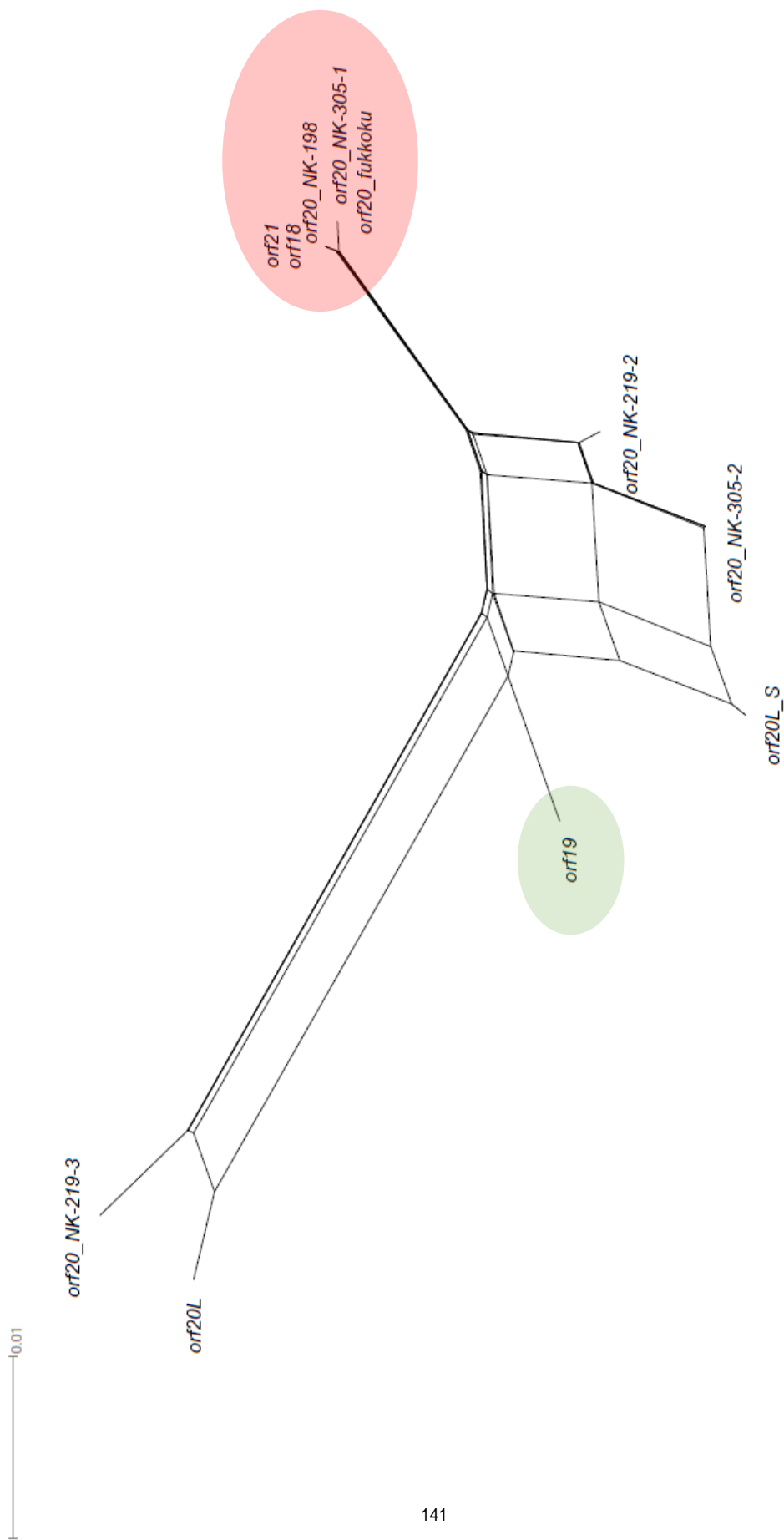


図6-1 *orf20*様遺伝子のタンパク質コード域の塩基配列を基に描いた系統ネットワーク

SplitsTree (ver. 4.14.8, Huson and Bryant 2006) を使用した。系統関係の推定はNeighbor-Net法 (Bryant 2003) により行った。スケールバーに付した数字は進化距離を示す。赤の領域に含まれる遺伝子は $orf20_{NK-198}$ グループに属し、緑の領域は*orf19*を含む。

表6-2 被子植物におけるRf分子進化過程の比較

Species	Sugar beet	Petunia, Radish, Rice, Rapeseed, etc.	Maize
Gene product	OMA1-like	PPR	mtALDH
Function	Mitochondrial inner membrane protein quality control	RNA metabolism	Aldehyde metabolism
Molecular interaction with <i>S-orf</i>	Post-translational level	Post-transcriptional or Translational level	Unknown
Muller's morph of recessive allele	Hypomorph (product, expression)	Amorph, Hypomorph (product)	Hypomorph (product), Amorph
Gene cluster	Yes	Yes	No
Copy number per genome	1-6	2-33 (Rf-like PPR)	1
Occurrence	Yes	Yes	Yes
Divergence time	After subfamily divergence	After speciation?	After monocots divergence
Mode	Segmental duplication, Tandem duplication	Tandem duplication and Others?	Segmental duplication?
Diversifying selection	Yes? (Transmembrane domain)	Yes (RNA recognition site)	No
Model for duplicate gene retention	Neofunctionalization, DDC	Unknown	Subfunctionalization?
Function other than fertility restoration	Yes?	Unknown	Yes

## 摘要

1. 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 *Rfl* 由来の *orf20<sub>NK-198</sub>* と維持系統 TK-81mm-O の *rfl* 由来の *orf20L* を使用した。
2. 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<sub>NK-198</sub>* 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。
4. 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<sub>NK-198</sub>* 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<sub>NK-198</sub> 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 *rfl* 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 系統の未成熟薬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。
7. これらの個体の未成熟薬における *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。
8. *Rfl* 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<sub>NK-198</sub> 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 *rfl* 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 *Rfl* 分離集団と NK-198 *Rfl* 分離集団の花粉稔性を調査したところ、NK-305 *Rfl* は不完全優性対立遺伝子、NK-198 *Rfl* 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、小孢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。
13. NK-305 *Rfl* 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 *Rfl* 遺伝子量と相関を示し、250kDa 複合体の蓄積に対する *Rfl* 遺伝子量効果が認められた。
14. NK-198 *Rfl* 分離集団においては、*Rfl* 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、*Rfl* 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 *Rfl* の作用力は NK-305 *Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* 由来の *orf20*<sub>NK-305-1</sub>、NK-198 *Rfl* 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 *Rfl* 由来の *orf20*<sub>NK-305-2</sub> は *preSatp6* と相互作用しなかった。
17. NK-305 *Rfl* 分離集団における *orf20*<sub>NK-305-1</sub> の mRNA を定量すると、*Rfl* 遺伝子量と相関した。

18. NK-305 *Rfl* 及びNK-198 *Rfl* 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、*Rfl* 遺伝子量との相関が見られ、*Rfl* 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 *Rfl* 保持個体はNK-305 *Rfl* 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、*Rfl* 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* 保持個体の未成熟葯において 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 *rfl* 由来の *orf20<sub>fukukoku</sub>* は *preSatp6* と相互作用する。
23. 仏国大葉 *rfl* 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。
24. したがって、仏国大葉 *rfl* は Hypomorphic な *Rfl* 対立遺伝子である。このアレルに含まれる *orf20<sub>fukukoku</sub>* 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。
25. 仏国大葉 *rfl* は第 4 染色体上の *Rf* の作用を促進する修正遺伝子として機能する可能性が示唆されていた。仏国大葉 *rfl* が *preSatp6* に対し弱い作用力を持っていることから、*orf20<sub>fukukoku</sub>* が修正遺伝子として機能している可能性が示唆された。
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 *Rfl* 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 *Rfl* 対立遺伝子の機能とタイプを調査したところ、既存の *Rfl* 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 *Rfl* 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、*Rfl* 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. *Rfl* 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* 相同遺伝子の特徴づけた。
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エントが見られた。

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、*BvOMAI-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、*OMAI* 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 *OMAI* オース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 *OMAI* オース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、オースログ間の類似性よりも低かった。
43. *AtOMAI* と *BvOMAI-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、*AtOMAI* と *BvOMAI-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、*AtOMAI* と *BvOMAI-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。



46. 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、*AtOMAI* と比較して *BvOMAI-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 *rfl* は NK-198 *Rfl* の部分断片が組み合わさることによって生じた分子バリエーションである一方で、NK-305 *Rfl* は PI615522 *rfl* 及び NK-198 *Rfl* 由来の塩基配列をキメラ状にもつ。さらに、*orf20*<sub>NK-305-2</sub> のコード域内が *orf20<sub>s</sub>* 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、*Rfl* 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 Blik, 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., Lafortest, 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 cytoplasm 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 Rfl 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., Billings-Ross, P., Murillo, O., Filipowski, 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 Schagger, 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 *Rfl* 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 *Rfl* 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 *Rfl* の分子進化的研究. 修士論文 北海道大学大学院農学院
- 亀井 陽子 (2008) テンサイ *Rfl* (*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 *Rfl* 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 *Rfl* 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
- 濱口 祐子 (2006) テンサイ稔性回復遺伝子 *Rfl* 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
- 濱田 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 雄二郎 (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

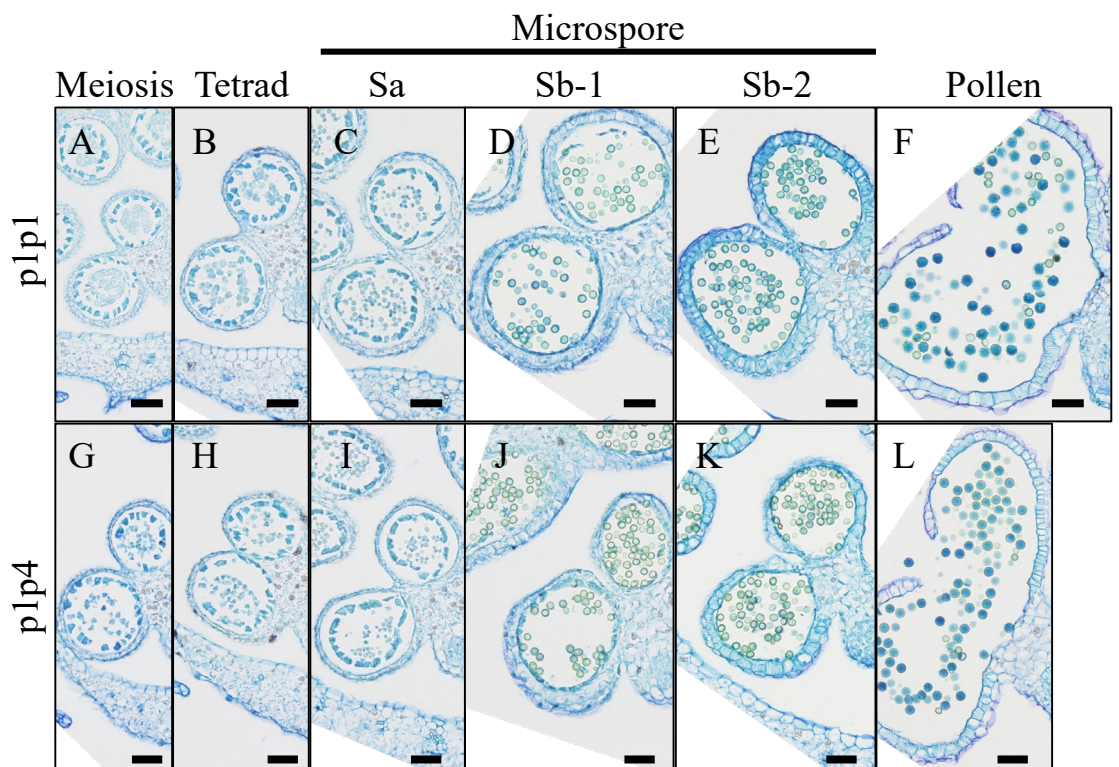
目次		ページ
付表 2-1	本研究で用いたプライマー	S1
付図 3-1	花粉発達ステージ毎の未成熟葯の横断切片	S3
付図 3-2	<i>orf20</i> 様遺伝子の第 1 エキソン部分配列のマルチプルアラインメント	S4
付表 3-1	<i>UNDEAD</i> 特異的なプライマーを用いた qRT-PCR	S5
付図 4-1	<i>orf20</i> 様遺伝子のコード域の塩基配列のマルチプルアラインメント	S6
付表 5-1	テンサイゲノムにおける <i>OMAI</i> 相同遺伝子の座乗位置	S12
付表 5-2	被子植物における <i>OMAI</i> 相同遺伝子	S13
付図 5-1	<i>LOC104888056</i> 第 1 エキソン部分配列のマルチプルアラインメント	S14
付図 5-2	<i>BvOMAI-1</i> 及び <i>BvOMAI-2</i> 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 <i>orf20L</i> 及び <i>LOC104888056</i> 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	S16
付図 5-4	<i>BvOMAI-1</i> 及び <i>BvOMAI-2</i> の CDS のマルチプルアラインメント	S17
付図 5-5	KWS2320 <i>orf20L</i> 及び <i>LOC104888056</i> の CDS のマルチプルアラインメント	S20
付表 5-3	<i>BvOMAI-1</i> (A) および <i>orf20</i> 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 <i>OMAI</i> 相同遺伝子の系統樹	S24
付図 5-7	最尤法による被子植物 <i>OMAI</i> 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 <i>AtOMAI</i> の mRNA 量	S26
付図 5-8	<i>orf20<sub>NK-198</sub></i> 及び <i>orf20<sub>NK-305-1</sub></i> の塩基配列のアラインメント	S27
付図 5-9	<i>orf20<sub>NK-198</sub></i> 及び <i>orf20<sub>NK-305-1</sub></i> の翻訳産物のアミノ酸配列のアラインメント	S35
付図 5-10	PI615522 <i>rf1</i> と NK-305 <i>Rf1</i> の塩基配列のアラインメント	S36
付図 5-11	<i>orf20<sub>S</sub></i> 、 <i>orf20<sub>NK-305-2</sub></i> 及び <i>orf18</i> 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<sub>S</sub></i> 、 <i>orf20<sub>NK-305-2</sub></i> 及び <i>orf18</i> 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	S57
付図 5-13	<i>orf19</i> 及び <i>orf20<sub>NK-305-2</sub></i> 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	<i>orf20</i> 様遺伝子の分岐年代推定	S63

付表2-1 本研究で用いたプライマー及びPCRの反応条件

Purpose	Section	Target region/Marker name	Nucleotide sequences (5'-3')	Composition	Cycle
Plasmid construction	2	5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS1/98</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTGGGATTTGAGGGGTT	PrimeSTAR max (Takara) Pair of primers: 0.2 μM each Total: 50 μl	98°C 1 min [98°C 5 sec, 55°C 10 sec, 72°C 4 min] x 35 cycle, 72°C 7 min
		5'UTR- <i>orf20L</i> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTGGGATTTGAGGGGTTA		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS2/162</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS2/163</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS2/164</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS3/165</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS3/166</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS3/167</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS3/168</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS3/169</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
	3	5'UTR- <i>orf18</i> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf19</i> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf20</i> <sub>MS3/169</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf21</i> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
	4	5'UTR- <i>orf21</i> <sub>MS3/169</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
		5'UTR- <i>orf21</i> <sub>MS3/170</sub> -3'UTR	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
	2-4	FLAG-overlapping for <i>orf20</i> -like gene	TCAGGATTAAGGATGATGATAGTGACCAATTACCAACCGCATCTTTIAGCAGCTT GTCACTTATCATCATCTTAAATCCTGAAGACCTTGAATTCGACGCTCTGCTACAA		
		<i>BvOM1-1</i> CDS	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
	5	FLAG-overlapping for <i>BvOM1-1</i>	TTTTCTGGATTAAAGGATGATGATAGTGACCAATTACCAACCGCATCTTTIAGCAGCTT GGGTTCACCTTATCATCATCTTAAATCCTGAAGACCTTGAATTCGACGCTCTGCTACAA		
		<i>AtOM1</i> CDS	GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT		
FLAG-overlapping for <i>AtOM1</i>		TTTTCTGGATTAAAGGATGATGATAGTGACCAATTACCAACCGCATCTTTIAGCAGCTT GGGTTCACCTTATCATCATCTTAAATCCTGAAGACCTTGAATTCGACGCTCTGCTACAA			
		GGGGACAAGTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT GGGGACCACCTTTGTACAAAAGAGCTGGGTGGCTAGGAATATCATAAACCAATT			

付表2-1 本研究で用いたプライマー及びPCRの反応条件(続き)

Purpose	Section	Target region/Marker name	Nucleotide sequences (5'-3')	Composition	Cycle	
Genotyping	3	TRI	AGAACCTTCGATAGCGGAGG GCAATTTTCAGGGCATGAACC	Go taq (Promega) Pair of primers: 0.2 μM each Total: 10 μl	98°C 1 min [95°C 30 sec, 55°C 30 sec, 72°C 1 min] x 35 cycle, 72°C 3 min	
		<i>psbG-psbE</i>	TAAAGGAAAAGATAAAGAT TGGGAAATTGCCCATGAAT			
	3,4	s17	CAATCTGTGGTGTGACAAA GATTAAGAGGGGTCTGAAAGCGGAGA	Blend Taq (Toyobo) Pair of primers: 0.2 μM each Total: 10 μl	98°C 1 min [95°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 3 min] x 35 cycle, 72°C 7 min	
		o7	CTAAGAAATATCTATCCCATGTCTGC TGACCAAGATCCCAAGATTTGATATGG			
	4	o20	CTGAATTGGCTACAAATTATCGGCG TACTGAAGAGCCTTGAATTGCACG		98°C 1 min [95°C 30 sec, 58°C 30 sec, 72°C 1.5 min] x 35 cycle, 72°C 7 min	
		Exon 1 of <i>BvOM1-1</i> and <i>BvOM1-2</i>	GGTCAACAGAAATCAAGTATGCTTG ATTGCAAGCAATATTTTCCCC			
	5	exon 3 of <i>orf20-like</i> gene	AGTTTGAAGATATTCAGGCTAGA TTACTGAAGACCTTGAATTGCACG	Go taq (Promega) Pair of primers: 0.2 μM each Total: 10 μl	98°C 1 min [95°C 30 sec, 56°C 30 sec, 72°C 1 min] x 35 cycle, 72°C 3 min	
		exon 1 of <i>LOC104888056</i>	ATGGCAATTCACAGAAATTCAAAGG CCCATAATTGCAGCAATTCAG			
	Intracellular localization	5	<i>AtOM1</i>	TCTCCTTCAGTCGACATGTGATGTTACAGAAGAACAAAACCTCGT TAGGATCCATGGGAAACCACCGTCTGGTCTT		
			<i>BvOM1-1</i>	TCTCCTTCAGTCGACATGGCATGGTACAGAGA		
			<i>BvOM1-2</i>	TAGGATCCATGGACCAAGATTTAAACCTCTGGT TCTCCTTCAGTCGACATGGCATTTACAGAAATTCAAAGGT		
			<i>AtOM1</i>	GGATCCATGGCCACCCACCATGAATTAGTTT ACGGCTCACCATTGATCATCAAGAACCTGAT		
<i>BvOM1-1</i>			GCTCTAGAGCATTTCCCTGGCAGCGCA GCTCTAGAAATGGCATGGTACAGAAGATCAA			
<i>orf20<sub>NK-108</sub></i> 3'UTR			ACCGCTCGACTTGTAGCCAAATTCAGCATCTGATT AGCTTGAAGCCACTGGGCGA			
<i>orf20-like</i> gene			GGAAACCAATTAGATTGAATTAACAAGTGG GGAAGAAGCATAGTGGGGCT			
<i>orf20<sub>NK-305-1</sub></i>			CACAGCATGCCAACCTGAT TTCCAAATGGACTAATCTTGACTTT			
<i>Actin</i>			TGCTCAATTTCAATTCACG AGACTTCAATGTGCCTGCT			
<i>ef1a</i>			ACGACCAGCAAGATCCAAAC TGAGGCTGGTATCTCCAAAG			
<i>UNDEAD</i>			TTGAGTACTTGGGGGTGGT ATATACAAATTAGAAATGGAATTTTGGTTC			
<i>BvOM1-1</i>			CTCCCCTGCATCACCTTCAAGAAAGTGGTT ATGGGGCTAAGACTACTACAACCA GAAAACAACAATTTCTCCACCTGG			
qRT-PCR	2-5			SYBR green mix (Thermo Scientific) Pair of primers: 0.2 μM each Total: 10 μl	50°C 2 min, 95°C 2 min [95°C 15 sec, 60.8°C 1 min] x 40 cycle	



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BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>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 ATGGCGTGGTACAGAAATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTTGC GTTCC 60
orf20_NK-305-2 ATGGCGTGGTACAGAAATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTTGC GTTCC 60
orf20L ATGGCGTGGTACAGAAATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTTGC GTTCC 60
*****

orf20_NK-305-1 AAAACATTTGGTACTATTCCAACCTCAAGAGTTCATTGGAATTCCTCATCTTTGTTTAC 120
orf20_NK-305-2 AAAACATTTGGTACTATTCCAACCTCAAGAGTTCATTGGAATTCCTCATCTTTGTTTAC 120
orf20L AAAACATTTGGTACTATTCCAACCTCAAGAGTTCATTGGAATTCCTCATCTTTGTTTAC 120
*****

orf20_NK-305-1 AATCAATCTACTAATAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAATCTGGGTATTTAAT 180
orf20_NK-305-2 AATCAATCTACTAA---GTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAATCTGGGTATTTAAT 177
orf20L AATCAATCTACTAA---GTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAATCTGGGTATTTAAT 177
*****

orf20_NK-305-1 GGCTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTATGCAAGGAGAAATTATCAT 240
orf20_NK-305-2 GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT 237
orf20L GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAACTATCAT 237
** *****

orf20_NK-305-1 GGTGATAAACCGAAGTAAGTGTGAATCATGGCTGGAAAAATTCCTTGTCCAATTGGA 300
orf20_NK-305-2 GGTGATAAACCGAAGTAAGTGTGAATCATGGCTGGAAAAATTA CTCTTGAATTGCA 297
orf20L GGTGTTAAACCGAAGTAAGTGTGAATTTGGGTGGAAAAATTA CTCTTGAATTGCA 297
**** *****

orf20_NK-305-1 CTAAT---CTTGACTTTTGGTATACTTGGTTACCCTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCA 357
orf20_NK-305-2 CTAAT---GTTGAGTACTGGTATATTTGCTTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCA 354
orf20L CTAATAATCTCGCATTCTGGTATGATTGCTTTCTTTTATTTGCACCCAGTAGTTGTGCCA 357
*****

orf20_NK-305-1 TATACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATGTCAACAACCTCGTGAGAATGAAATGGAGAA 417
orf20_NK-305-2 TATACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATATCAACAACCTGATGAGAATGAAAAGGAGAA 414
orf20L TATACAGGAAGGAAGCATTATGTGATTTTGTCAACAACCTCATGAGAATGAAAATGGAGAA 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<sub>NK-305-1</sub>*、*orf20<sub>NK-305-2</sub>* 及び *orf20L* の第 1 エキシソンの塩基配列を示す。*orf20<sub>NK-305-1</sub>* 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。



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

Anther developmental stage	s17		
	p2p2	p2p4	p4p4
Meiosis	ND <sup>a</sup>	0.02 ± 0.03	-
Tetrad	1.94 ± 0.50	0.72 ± 0.02	-
Microspore	0.05 ± 0.05	0.02 ± 0.01	-
Non-classified	-	-	0.09 ± 0.09

Mean ± SD, *n* = 2; <sup>a</sup> Not detected

	(Exon 1)	>20L-int-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	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	753
orf20_S	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAA	759
orf20_NK-219-3	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACTGGATTGCTCAACCATTGCATCTCTGATGCTGAA	771
orf20L	TTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACACTGGATTGCTCAACCATTGCATCTCTGATGCTGAA	771

\* \* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

/ Intron 1

orf21	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	828
orf18	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	828
orf20_NK-198	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	822
orf20_fukkoku	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	822
orf20_NK-305-1	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	822
orf20_NK-219-1	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCCTGGGACTCCAATTATCTGC	819
orf20_NK-219-2	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCATGGGACTCCAATTATGTGC	816
orf20_NK-305-2	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCCTGGGACTCCAATTATGTGC	819
orf19	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCCTGGGACTCCAATTATGTGC	813
orf20_S	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCCTGGGACTCCAATTATGTGC	819
orf20_NK-219-3	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCGTGGGACTCCAACCATCGGC	831
orf20L	TTGGCTACAATTATCGCGCATCAGGTATATAAAAATTCGTGGGACTCCAACCATCGGC	831

\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

orf21	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	846
orf18	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	846
orf20_NK-198	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	840
orf20_fukkoku	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	840
orf20_NK-305-1	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	840
orf20_NK-219-1	TTAAGCTGATGGTAAATACTTAATAGAATATAAAAATTCCTGGGACTCCAACCAAAAAG	879
orf20_NK-219-2	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	834
orf20_NK-305-2	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	837
orf19	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	831
orf20_S	TTAAGCTGATGGTAAATA-----	837
orf20_NK-219-3	TTAAGCTCATGGTTGATAGAATATAAAAAT-----TATTTCTGGGACTCCAACCAAAA	882
orf20L	TTAAGCTCATGGTTGATAGAATATAAAAAT-----TATTTCTGGGACTCCAACCAAAA	882

\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

orf21	-----	
orf18	-----	
orf20_NK-198	-----	
orf20_fukkoku	-----	
orf20_NK-305-1	-----	
orf20_NK-219-1	CTTCCTGAAATAGCTTTATATTCTATCAGTATCTTGTAGTAGTTCCTTACTAGACTGCAG	939
orf20_NK-219-2	-----	
orf20_NK-305-2	-----	
orf19	-----	
orf20_S	-----	
orf20_NK-219-3	AGCTCAGGAATAGCTTTATATTCTATCAGTAGCTTGTAGTAGTTCCTTACTAGACTGCAG	942
orf20L	AGCTCAGGAATAGCTTTATATTCTATCAGTAGCTTGTAGTAGTTCCTTACTAGACTGCAG	942

↑ XspI

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 (次ページへ続く)

```

orf21 -----
orf18 -----
orf20_NK-198 -----
orf20_fukkoku -----
orf20_NK-305-1 -----
orf20_NK-219-1 CAATAGATAATATTTGGTTATTAATATTCATGGGTGATTCCGGTTCATATTTAGGCGTAT 999
orf20_NK-219-2 -----
orf20_NK-305-2 -----
orf19 -----
orf20_S -----
orf20_NK-219-3 GAATAGATAATATTTGGTTATCAATATACATGGGTGATTCCGGTTCATATTTAGGCGTAT 1002
orf20L GAATAGATAATATTTGGTTATCAATATACATGGGTGATTCCGGTTCATATTTAGGCGTAT 1002

```

```

orf21 -----GAACTATACAAAAAA----- 862
orf18 -----GAACTATACAAAAAA----- 862
orf20_NK-198 -----GAACTATACAAAAAA----- 856
orf20_fukkoku -----GAACTATACAAAAAA----- 856
orf20_NK-305-1 -----GAACTATACAAAAAA----- 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 CAAATGATTTAAGATATTGTATGAAGTTATGAACTATACAAAAAACATGAAAGGAATTAT 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-TTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATACGTCA 1118
orf20_NK-219-2 ATGAAAAAAAAA-CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA 923
orf20_NK-305-2 ATGAAAAAAAAA-CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA 925
orf19 ATGAAAAAAAAA-CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA 919
orf20_S ATGAAAAAAAAA-CTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCA 925
orf20_NK-219-3 ATGAAAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATTATATTGCATTATGAATGTCATATGTCA 1122
orf20L ATGAAAAAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATTATATTGCATTATGAATGTCATATGTCA 1122

```

\*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\*

/ Exon 2

```

orf21 ATTTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT 969
orf18 ATTTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT 969
orf20_NK-198 ATTTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT 963
orf20_fukkoku ATTTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT 963
orf20_NK-305-1 ATTTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT 963
orf20_NK-219-1 ATTTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGGATT 1178
orf20_NK-219-2 ATGTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGAATC 983
orf20_NK-305-2 ATGTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATC 985
orf19 ATGTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGCATT 979
orf20_S ATGTGGTGGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATC 985
orf20_NK-219-3 ATGTGGTGGTATATATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGCATT 1182
orf20L ATGTGGTGGTATATATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGCATT 1182

```

\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*

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 (次ページへ続く)

↓ DraI

```

orf21      CGACAGCATT---TTTCTGGTTGTTAATATCC---CTCAACGTGATATTATTTAAAATTCT 1024
orf18      CGACAGCATT---TTTCTGGTTGTTAATATCC---CTCAACGTGATATTATTTAAAATTCT 1024
orf20_NK-198 CGACAGCATT---TTTCTGGTTGTTAATATCC---CTCAACGTGATATTATTTAAAATTCT 1018
orf20_fukkoku CGACAGCATT---TTTCTGGTTGTTAATATCC---CTCAACGTGATATTATTTAAAATTCT 1018
orf20_NK-305-1 CGACAGCATT---TTTCTGGTTGTTAATATCC---CTCAACGTGATATTATTTAAAATTCT 1018
orf20_NK-219-1 GGACAATATTGCTTCTGGTTCTTATTAGGG---ATCTACGTGACATTATTTCAAATTCT 1235
orf20_NK-219-2 GGACAGCATT---CTTCTGGTGGTCAATGTCC---CTCTACGTGATAATATTTGAAGTTCT 1038
orf20_NK-305-2 GGACAGCATT---CTTCTGGTGGTCAATGTCC---CTCTACGTGATAATATTTGAAGTTCT 1040
orf19      GGACAGCATT---GTTCTGGTGGTCAATGTTAGGGTTCTACGTGACATTATTTGAAATTCT 1037
orf20_S    GGACAGCATT---CTTCTGGTGGTCAATGTCC---CTCTACGTGATAATATTTGAAGTTCT 1040
orf20_NK-219-3 GGACAACATT---GTTGTGGTCGATACTGTTAGTGATATACATGACAATATTTCAAATTCT 1240
orf20L     GGACAACATT---GTTGTGGTCGATACTGTTAGTGATATACATGACAATATTTCAAATATCT 1240
          ****  ***  ** *****  * *          * ** *** * ***** **  ***

```

```

orf21      ATTTACTGAGCCTGAATCTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1084
orf18      ATTTACTGAGCCTGAATCTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1084
orf20_NK-198 ATTTACTGAGCCTGAATCTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1078
orf20_fukkoku ATTTACTGAGCCTGAATTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1078
orf20_NK-305-1 ATTTACTGAGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1078
orf20_NK-219-1 ATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1295
orf20_NK-219-2 ATTTACTGCGGTAATTTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1098
orf20_NK-305-2 ATTTACTGCGGTAATTTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1100
orf19      ATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1097
orf20_S    ATTTACTGCGGTAATTTGCCAATGCAAGATCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTT 1100
orf20_NK-219-3 ATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAATATCAAACTACTCTCAAGGCATCCTCTCTT 1300
orf20L     ATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAATATCAAACTACTCTCAAGGCATCCTCTCTT 1300
          ***** ** * *** ***** ***** ***** *****

```

/ Intron 2

```

orf21      GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1144
orf18      GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1144
orf20_NK-198 GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1138
orf20_fukkoku GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1138
orf20_NK-305-1 GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1138
orf20_NK-219-1 GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1355
orf20_NK-219-2 GCAAAAGTAAGTATCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1158
orf20_NK-305-2 GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1160
orf19      GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1157
orf20_S    GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1160
orf20_NK-219-3 GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1360
orf20L     GCAAAAGTAAGTCTTACTCTTAAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACT 1360
          ***** *****

```

```

orf21      GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1204
orf18      GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1204
orf20_NK-198 GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1198
orf20_fukkoku GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1198
orf20_NK-305-1 GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1198
orf20_NK-219-1 GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1415
orf20_NK-219-2 GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1218
orf20_NK-305-2 GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATCA 1220
orf19      GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATCA 1217
orf20_S    GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATCA 1220
orf20_NK-219-3 GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTA 1420
orf20L     GCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATCA 1420
          ***** *****

```

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 (次ページへ続く)

↓ XspI

```

orf21      CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGATATCCATTTG 1263
orf18      CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGATATCCATTTG 1263
orf20_NK-198  CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGATATCCATTTG 1257
orf20_fukkoku  CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGATATCCATTTG 1257
orf20_NK-305-1  CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGATATCCATTTG 1257
orf20_NK-219-1  CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGATATCCATTTG 1474
orf20_NK-219-2  CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGATATCCATTTG 1277
orf20_NK-305-2  CATTGCCCGGACCTAGTCACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGACATCCATTTG 1280
orf19      CATTGCCCGGACCTCGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGACATCCATTTG 1277
orf20_S     CATTGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGACATCCATTTG 1280
orf20_NK-219-3  CAT-GCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTATATATCCATTTG 1479
orf20L     CATTGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGATTTCAATTTAGACATCCATTTG 1480
*** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

orf21      AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1323
orf18      AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1323
orf20_NK-198  AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1317
orf20_fukkoku  AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1317
orf20_NK-305-1  AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1317
orf20_NK-219-1  AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1534
orf20_NK-219-2  AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1337
orf20_NK-305-2  AAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1340
orf19      AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1337
orf20_S     AAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1340
orf20_NK-219-3  AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTATAGAACTAAATAGAGAG 1539
orf20L     AGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACTAAATAGAGAG 1540
* ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

orf21      GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1383
orf18      GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1383
orf20_NK-198  GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1377
orf20_fukkoku  GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1377
orf20_NK-305-1  GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1377
orf20_NK-219-1  GTGTGATGCTAATAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1594
orf20_NK-219-2  GTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1397
orf20_NK-305-2  GTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1400
orf19      GTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCAATATATGGAT 1397
orf20_S     GTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCAATATATGGAT 1400
orf20_NK-219-3  GTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGAT 1599
orf20L     GTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCACTGAGTAATGGTTTTGGATCAATATATGGAT 1600
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

orf21      TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1443
orf18      TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1443
orf20_NK-198  TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1437
orf20_fukkoku  TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1437
orf20_NK-305-1  TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1437
orf20_NK-219-1  TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1654
orf20_NK-219-2  TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1457
orf20_NK-305-2  TGCTATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1460
orf19      TGCTATATCCACATATTCTATACTTTGCCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATT 1457
orf20_S     TGCTATATCCACATATTCTATACTTTGCCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATT 1460
orf20_NK-219-3  TGCTATATCCACAGTTCTATCATTTGCCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATG 1659
orf20L     TGCTATATCCACATATTCTATACTTTGCCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATT 1660
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

```

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 (次ページへ続く)



```

orf21      ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1738
orf18      ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1738
orf20_NK-198 ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1732
orf20_fukkoku ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1732
orf20_NK-305-1 ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1732
orf20_NK-219-1 ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1949
orf20_NK-219-2 ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1752
orf20_NK-305-2 ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1755
orf19      ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1755
orf20_S    ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1758
orf20_NK-219-3 ACAACCCGCGAGTTGCACCTCAAGCATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1953
orf20L    ACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGA 1958
** *****

```

```

orf21      ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1798
orf18      ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1798
orf20_NK-198 ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1792
orf20_fukkoku ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1792
orf20_NK-305-1 ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1792
orf20_NK-219-1 ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 2009
orf20_NK-219-2 ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1812
orf20_NK-305-2 ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1815
orf19      ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1815
orf20_S    ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 1818
orf20_NK-219-3 ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 2013
orf20L    ACTGTTTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATG 2018
*****

```

```

orf21      TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1858
orf18      TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1858
orf20_NK-198 TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1852
orf20_fukkoku TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1852
orf20_NK-305-1 TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1852
orf20_NK-219-1 TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 2069
orf20_NK-219-2 TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1872
orf20_NK-305-2 TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1875
orf19      TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1875
orf20_S    TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 1878
orf20_NK-219-3 TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 2073
orf20L    TTATGAAGGAAGCAGATAAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTC 2078
*****

```

**orf20-CDS3' -Rv<**

```

orf21      TTCAGTAA 1866
orf18      TTCAGTAA 1866
orf20_NK-198 TTCAGTAA 1860
orf20_fukkoku TTCAGTAA 1860
orf20_NK-305-1 TTCAGTAA 1860
orf20_NK-219-1 TTCAGTAA 2077
orf20_NK-219-2 TTCAGTAA 1880
orf20_NK-305-2 TTCAGTAA 1883
orf19      TTCAGTAA 1883
orf20_S    TTCAGTAA 1886
orf20_NK-219-3 TTCAGTAA 2081
orf20L    TTCAGTAA 2086
*****

```

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

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。*orf20<sub>fukkoku</sub>*に見られる(*orf20<sub>NK-198</sub>*と比較した際の)非同義置換をピンクで塗りつぶした(1036番目の塩基)。o20のプライマー設計位置を灰色、*Dra* I及び*Xsp* I認識部位をそれぞれ赤及び黄緑で色付けした。

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

KWS2320			EL10			BAC		
Accession no.	Gene	Position	Accession no.	Gene	Position	ID	Gene	Position
NW_017567367.1 (Chromosome 3 unlocalized scaffold)	<i>BvOMAI-1</i>	327,302..331,422	CM009440.1 (Chromosome 3)	EL10 <i>BvOMAI-1</i>	10,738,367..10,741,893	78A10	E60 <i>BvOMAI-1</i>	- <sup>a</sup>
	<i>BvOMAI-2</i>	301,862..306,206		<i>orf20<sub>EL10-1</sub></i>	2,453,935..2,455,800 complement		4F1	<i>orf18</i>
CM002323.2 (Chromosome 3)	KWS2320 <i>orf20L</i> 2,397,803..2,400,302 complement			<i>orf20<sub>EL10-2</sub></i>	2,460,941..2,462,823 complement	33E19	<i>orf19</i>	-
				<i>orf20<sub>EL10-3</sub></i>	2,471,512..2,473,394 complement		<i>orf20<sub>NK-198</sub></i>	13,577..15,436 complement
				<i>orf20<sub>EL10-4</sub></i>	2,485,364..2,487,246 complement		<i>orf21</i>	21,533..23,398 complement
				<i>orf20<sub>EL10-5</sub></i>	2,499,220..2,501,079 complement			
	<i>orf20<sub>EL10-6</sub></i>	2,507,177..2,509,036 complement						
	<i>LOC104888056</i>	2,444,473..2,446,764		<i>LOC104888056<sub>EL10</sub></i>	2,519,891..2,521,960		<i>LOC104888056<sub>NK-198</sub></i>	64,076..65,892

<sup>a</sup> 33E19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OMAI相同遺伝子

Species	Accession no./ver.	Source	Gene ID/Locus tag	Protein ID	E-value (blastp, vs AtOMA1)	E-value (tblastn)	Accession no.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GCF_000001735.4	NCBI	AT5G51740	NP_199987.2	-	-	NC_003076.8
<i>Arabidopsis lyrata</i>	GCF_000004255.2	NCBI	LOC9301950	XP_020871151.1	0	9.00E-179	NW_003302548.1
<i>Capsella rubella</i>	GCF_000375325.1	NCBI	LOC17876312	XP_006280471.1	0	4.00E-172	NW_006238916.1
<i>Brassica rapa</i>	GCF_000309985.1	NCBI	LOC103832871	XP_009107217.1	0	0	NC_024795.1
<i>Carica papaya</i>	ASGPB v0.4	Phytozome	evm.model.supercontig_3.252	-	0	7.20E-122	supercontig_3
<i>Gossypium raimondii</i>	GCF_000327365.1	NCBI	LOC105800101	XP_012486475.1	0	1.00E-109	NC_026934.1
			LOC105784204	XP_012465493.1	0	3.00E-92	NC_026929.1
<i>Theobroma cacao</i>	GCF_000208745.1	NCBI	LOC18605434	XP_007038496.2	0	4.00E-93	NC_030852.1
<i>Citrus sinensis</i>	GCF_000317415.1	NCBI	LOC102628298	XP_006490270.1	0	4.00E-116	NC_023054.1
<i>Eucalyptus grandis</i>	GCF_000612305.1	NCBI	LOC104449442	XP_018716323.1	0	7.00E-49	NW_010092438.1
			LOC104449451	XP_010061917.1	2.00E-109	-	-
<i>Cucumis melo</i>	GCF_000313045.1	NCBI	LOC103484017	XP_008439127.1	0	9.00E-106	NW_007546273.1
<i>Citrus limon</i>	ver. 1 (cv. 97103)	CuGenDB	Clal006239	-	0	1.05E-102	Chr5
<i>Prunus persica</i>	GCF_000346465.2	NCBI	LOC18786766	XP_007220466.1	0	1.00E-98	NC_034010.1
<i>Malus domestica</i>	GCF_000148765	NCBI	LOC103439668	XP_008376469.1	0	3.00E-103	NC_024239.1
			LOC103428393	pseudo	-	-	-
			LOC103410361	pseudo	-	1.00E-87	NW_007546017.1
<i>Fragaria vesca</i>	GCF_000184155.1	NCBI	LOC101311625	XP_004308146.1	1.00E-175	-	-
			LOC101311329	XP_011470439.1	3.00E-43	4.00E-97	NC_020497.1
			LOC105353198	XP_011470438.1	2.00E-74	-	-
<i>Lotus japonicus</i>	ver 3.0	miyagogusa.jp	Lj0g3v0300499.1	-	E-135	-	-
			Lj0g3v0245029.1	-	E-107	-	-
<i>Medicago truncatula</i>	GCF_000219495.3	NCBI	LOC25497161	XP_013452478.1	1.00E-178	-	-
			LOC25496738	XP_024642061.1	6.00E-85	2.00E-91	NC_016412.2
			LOC11422922	XP_024642281.1	1.00E-52	-	-
			LOC11424089	XP_003618269.1	6.00E-53	-	-
			LOC112422711	XP_024642063.1	1.00E-15	-	-
			LOC11434890	lncRNA	-	-	-
			LOC25488489	XP_013458801.1	5.00E-178	3.00E-89	NC_016409.2
			LOC11433354	XP_024639089.1	2.00E-34	-	-
			LOC25482437	XP_013466444.2	1.00E-46	3.00E-17	NC_016407.2
<i>Glycine max</i>	GCF_000004515.5	NCBI	LOC100799127	XP_003534034.1	0	2.00E-114	NC_038245.1
			LOC100800848	XP_003527421.1	3.00E-179	8.00E-107	NC_038242.1
			LOC100776010	pseudo	-	4.00E-78	NC_038248.1
<i>Ricinus communis</i>	GCF_000151685.1	NCBI	LOC266010	XP_015580938.1	0	9.00E-114	NW_002994278
<i>Mamihot esculenta</i>	GCF_001659605.1	NCBI	LOC110618286	XP_021617128.1	3.00E-154	1.00E-103	NC_035166
<i>Populus trichocarpa</i>	GCF_000002775.4	NCBI	LOC7482168	XP_002318862.2	0	1.00E-117	NC_037296.1
			LOC18105916	pseudo	-	4.00E-68	NC_037299.1
<i>Vitis vinifera</i>	GCF_000003745.3	NCBI	LOC100253134	XP_002269952.1	0	2.00E-106	NC_012022.3
<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i>	v1.0	Phytozome	Kalalp005580376	-	0	5.10E-95	Scaffold_55
<i>Helianthus annuus</i>	r1.2	Phytozome	HanXROChr05g01141341	-	5.00E-176	4.50E-89	Chr05
			HanXROChr03g0061581	-	5.00E-51	1.90E-34	Chr03
			HanXROChr04g0116241	-	3.00E-70	2.00E-23	Chr04
			HanXROChr02g0052421	-	4.00E-48	6.70E-16	Chr02
<i>Lactuca sativa</i>	GCF_002870075.1	NCBI	LOC111904027	XP_023755572.1	4.00E-176	5.00E-91	NW_019674144.1
			LOC111905900	XP_023757398.1	1.00E-154	1.00E-72	NW_019674486.1
<i>Cynara cardunculus</i>	GCF_001531365.1	NCBI	LOC112525233	XP_024991037.1	0	2.00E-96	NC_037540.1
<i>Capsicum annuum</i>	GCF_000710875.1	NCBI	LOC107863395	XP_016564775.1	0	5.00E-132	NC_029979.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	GCF_000188115.4	NCBI	LOC101268739	XP_004234149.1	0	3.00E-112	NC_015440.3
<i>Solanum tuberosum</i>	GCF_000226075.1	NCBI	LOC102601487	XP_006348046.1	0	1.00E-115	NW_006239023.1
<i>Sesamum indicum</i>	GCF_000512975.1	NCBI	LOC105179240	XP_011101145.1	0	2.00E-99	NW_011628055.1
			LOC105160725	XP_011076507.2	0	2.00E-95	NC_026148.1
<i>Beta vulgaris</i>	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_019107970.1	4.00E-109	-	-
			LOC104888051 (KWS2320 ort20L)	XP_010671183.1	2.00E-72	2.00E-27	CM002323.2
			LOC104888056	XP_010671188.1	3.00E-33	-	-
<i>Spinacia oleracea</i>	GCF_002007265.1	NCBI	LOC110782423	XP_021842267.1	1.00E-175	6.00E-72	NW_018931419.1
<i>Chenopodium quinoa</i>	GCF_001683475.1	NCBI	LOC110729760 (CqOMA1-1)	XP_021765235.1	2.00E-177	2.00E-108	NW_018742987.1
			LOC110697159 (CqOMA1-2)	XP_021730195.1	2.00E-177	3.00E-106	NW_018744460.1
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	v2.1	Phytozome	AH019489-RA	-	4.00E-161	2.00E-145	Scaffold_13
<i>Zea mays</i>	GCF_000005005.2	NCBI	LOC100279801	NP_001146229.1	1.00E-143	1.00E-70	NC_024463.2
<i>Oryza sativa</i>	GCF_001433935.1	NCBI	LOC4330648 (OsOMA1)	XP_015622867.1	5.00E-141	7.00E-80	NC_029257.1
			LOC107280146	XP_015625979.1	2.00E-19	-	-
<i>Hordeum vulgare</i>	r1	Phytozome	HORVU6Hr1G074020*	-	3.00E-91	2.60E-71	chr6H
			HORVU7Hr1G017750	-	1.00E-36	3.50E-24	chr7H
<i>Amborella trichopoda</i>	GCF_000471905.2	NCBI	LOC18447851	XP_020531387.1	3.00E-167	1.00E-47	NW_006500346.1
<i>Marchantia polymorpha</i>	GCA_003032435.1	NCBI	MARPO_0030s002	PTQ42271.1	7.00E-113	6.00E-29	KZ772702.1

\*コード域におけるシーケンスにギャップがある

```

LOC104888056_EL10      ATGGCATTTCACAGAAATTC AAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCAG 50
LOC104888056_TA-33BB-0 ATGGCATTTCACAGAAATTC AAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCAG 50
LOC104888056_KWS2320  ATGGCATTTCACAGAAATTC AAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCAG 50
LOC104888056_NK-198   ATGGCATTTCACAGAAATTC AAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCAG 50
*****

LOC104888056_EL10      CTTCAATTCCAAGTTACTTA CTTAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100
LOC104888056_TA-33BB-0 CTTCAATTCCAAGTTACTTA CTTAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100
LOC104888056_KWS2320  CTTCAATTCCAAGTTACTTA CTTAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100
LOC104888056_NK-198   CTTCAATTCCAAGTTACTTA CTTAACTTCATCTCATTCCAATTCCTATT 100
*****

LOC104888056_EL10      CTTTGTTTTACACTCAATTT AAGTTTTTTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150
LOC104888056_TA-33BB-0 CTTTGTTTTACACTCAATTT AAGTTTTTTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150
LOC104888056_KWS2320  CTTTGTTTTACACTCAATTT AAGTTTTTTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150
LOC104888056_NK-198   CTTTGTTTTACACTCAATTT AAGTTTTTTAGGTTACATGGGTCTCCTTCA 150
*****

LOC104888056_EL10      ATTTCTTCAAATGTGGGTA CTTCAATAGGTTTAAACATAATCAAACAG 200
LOC104888056_TA-33BB-0 ATTTCTTCAAATGTGGGTA CTTCAATAGGTTTAAACATAATCAAACAG 200
LOC104888056_KWS2320  ATTTCTTCAAATGTGGGTA CTTCAATAGGTTTAAACATAATCAAACAG 200
LOC104888056_NK-198   ATTTCTTCAAATGTGGGTA CTTCAATAGGTTTAAACATAATCAAACAG 200
*****

LOC104888056_EL10      AATTATTTCTGGTGTGCTA CTTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAAAAAA 250
LOC104888056_TA-33BB-0 AATTATTTCTGGTGTGCTA CTTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAAAAAA 250
LOC104888056_KWS2320  AATTATTTCTGGTGTGCTA CTTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAAAAAA 250
LOC104888056_NK-198   AATTATTTCTGGTGTGCTA CTTACTATCAGAAATTCTCTTGAAGTTAAAAAAA 250
*****

LOC104888056_EL10      CTCAGAATTTCTTTGGAAA CAGCTAAAAAAAATAATTCATGGTGGGGG 300
LOC104888056_TA-33BB-0 CTCAGAATTTCTTTGGAAA CAGCTAAAAAAAATAATTCATGGTGGGGG 300
LOC104888056_KWS2320  CTCAGAATTTCTATGGAAA CAGCTAAAAAACTAATTCATGGTGGGGG 300
LOC104888056_NK-198   CTCAGAATTTCTTTGGAAA CAGCTAAAAAACTAATTCATGGTGGGGG 300
*****

LOC104888056_EL10      GACGGTATTTTATTTGTG ATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350
LOC104888056_TA-33BB-0 GACGGTATTTTATTTGTG ATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350
LOC104888056_KWS2320  GACGGTATTTTATTTGTG ATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350
LOC104888056_NK-198   GATGGTATTTTGTGTTGTG ATGACTATTTATTATAGCATTTCAGAAGTTGT 350
** *****

LOC104888056_EL10      AC-----CCTTTACAGAA AGGAAGCATCTTGTGATTCCGCTAACATC 392
LOC104888056_TA-33BB-0 AC-----CCTTTACAGAA AGGAAGCATCTTGTGATTCCGCTAACATC 392
LOC104888056_KWS2320  AC-----CCTTTACAGAA AGGAAGCATCTTGTGATTCCGCTAACATC 392
LOC104888056_NK-198   ACACTTGTACCCTTTACAGAA AGGAAGCATCTTGTGATTCCGCTAACATC 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      MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVQSPIPRFNSNSSSLFYNQFKSSII SGSPSISS 60
BvOMA1-2_X1  MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVSPVPRINSNSSSLFYNQFKSSII SGSPSISS 60
BvOMA1-2_X2  MAWYRRSRFVYNAYKSLNSKLLLPKSPVSPVPRINSNSSSLFYNQFKSSII SGSPSISS 60
*****
*****

BvOMA1-1      KFGYLNQVQKQSSLFSCVTRRNYHVDNRQIYHFKPRGFKSWFENPRHIFIAVVISGSGV 120
BvOMA1-2_X1  KFGYLNQVQKQSSLFSCVTRRNYHVDNQIYLF----- 94
BvOMA1-2_X2  KFGYLNQVQKQSSLFSCVTRRNYHVDNQIYLF----- 94
*****
*****

BvOMA1-1      ITVYFGNSEVVPYTKRKHLVLLSRTLERRIGDSQFEKMKKEEFKGIKPAIHPDSVRVRLI 180
BvOMA1-2_X1  -----LERRYGEFRFEKRKEDFKGIKPAIHPDSVRVRLI 129
BvOMA1-2_X2  -----LERRYGEFRFEKRKEDFKGIKPAIHPDSVRVRLI 129
*****
*****

BvOMA1-1      SKDIIESLGRGISHERAWSSPGYATESVSHHEIDGHETMKALTEGMEKVPDWHKEEEV 240
BvOMA1-2_X1  SKDIIESLGRGISHERAWST-----KALTEGMEKVPDRDWHKEEEV 170
BvOMA1-2_X2  SKDIIESLGRGISHERAWST-----KALTEGMEKVPDRDWHKEEEV 170
*****
*****

BvOMA1-1      LDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTTNHLEGLNWEVLVNEPVVNAFCLPGGKIVVFTGLLKHF 300
BvOMA1-2_X1  LDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTTNHLEGLNWEVLVNEPFVNASYFPGGKIVVFTGLLKHL 230
BvOMA1-2_X2  LDDKWVKDSRKKGEKHGAKTTTNHLEGLNWEVLVNEPFVNASYFPGGKIVVFTGLLKHL 230
*****
*****

BvOMA1-1      KSDAELATIIGHEVGHAVARHSAEQITKNMWFILQLILYQFIAPDFANAMSNLLLRPLF 360
BvOMA1-2_X1  KSDAELATIIGHEVGHAVARHSAERITWIMSFASLQLIL--LIALDFAYAR---YLQISS 285
BvOMA1-2_X2  KSDAELATIIGHEVGHAVARHSAERITWIMSFASLQLIL--LIALDFAYAR---YLQISS 285
*****
*****

BvOMA1-1      SRKMEIEADYIG-----LLLMSAGYDPRIAPQVYEKLGKISGESSSLTEYLSTH 410
BvOMA1-2_X1  YVGVLLILSFDRKGEIEADYIGLLLMSAGYDPRIAPQVYEKLGKISGESSSLKEYLSTH 345
BvOMA1-2_X2  YRGNRSRLHWT-----ASDGF-C-WIRP-----TNCTSSI----- 313
:                ** *: **      :. :**:

BvOMA1-1      PSGKKRAQLLARAHIHQEAVDMYREIVAGRAIEGFL 446
BvOMA1-2_X1  PSGKKRAQLLARAHIHQEAVDIYREIVAGHAIEGFL 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      MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNGSTKCSGLFGSAKSGYFNG 60
LOC104888056_X1    MAFHRNSRFVYNALKPSFNSKLLTKTSSHSNSYSLFYTFKYSRHLHGSPSISKCGYFNG 60
LOC104888056_X2    MAFHRNS-----RLHGSPSISKCGYFNG 24
                    **.:***                ..  *.*.*****

KWS2320-ORF20L      FKHHQEISSFSGFARRNYHGKTEVSVFEFRVEKLLLGIALIIS-HSGMIAFFYLHPVVVP 119
LOC104888056_X1    FKHTQNR-IISGVATIRNS-LEVKKTQKFYQKQKKTNSWWVDGIFVMTIYYSISEVVP 118
LOC104888056_X2    FKHTQNR-IISGVATIRNS-LEVKKTQKFYQKQKKTNSWWVDGIFVMTIYYSISEVVP 82
                    *** *:  :**.* .  ::. : :* ::* : :.  ::::.* . ***

KWS2320-ORF20L      YTGRKHVILSTTHENENGEFEKRKIQP-----ATHPDERVRSIFQHILESLEIREINH 174
LOC104888056_X1    FTERKHLVIPLTSLEIKIGESMKKKLYDGKTLHARHPASVRARVFEHIIVSLDHKLIHE 178
LOC104888056_X2    FTERKHLVIPLTSLEIKIGESMKKKLYDGKTLHARHPASVRARVFEHIIVSLDHKLIHE 142
                    :* *** **  *:* * : **  *:*:      * ** : *.* :*:*: **:::.*

KWS2320-ORF20L      ELELELELERDETFKEKTIWKEETDHDKDSRKKHSGAKITTNHEGMNWEIFVVDKPWVES 234
LOC104888056_X1    G-----NGSKTTTKHL----EVFVDEPRVFS 201
LOC104888056_X2    G-----NGSKTTTKHL----EVFVDEPRVFS 165
                    .:* **:*      *:*:*:* * *

KWS2320-ORF20L      SCIFGGKIVVYTGLLNHCISDAELATIIAHQVGHAVARHEAEHWTTLLWSILLVIYMTIF 294
LOC104888056_X1    FCFPGGMIAVSTGLLNYFHSDELAAIIGTQVADAVARPFAEFFPKYMLAMFVSIIN-- 259
LOC104888056_X2    FCFPGGMIAVSTGLLNYFHSDELAAIIGTQVADAVARPFAEFFPKYMLAMFVSIIN-- 223
                    *:* ** *.* *****:  **:*:*:*:* **.* ***** **.. . : :::: .

KWS2320-ORF20L      QYLFTAPEFANAISKLLSRHPLLQKVWKIIQARFHQLPRTT----LHLGFLGLSSLVFI 350
LOC104888056_X1    -----PSARIVKIIQARACKLRPFTAGLIKSGLNFTGLLLLCFA 298
LOC104888056_X2    -----PSARIVKIIQARACKLRPFTAGLIKSGLNFTGLLLLCFA 262
                    :: *****  :* * *:*      *.* **  * *

KWS2320-ORF20L      ---LYFGRKEIEADHIGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKL 407
LOC104888056_X1    PLDCYFRWRKMEADYIGLQLMSSAGYDPRVAPQAYQKLRR----- 338
LOC104888056_X2    PLDCYFRWRKMEADYIGLQLMSSAGYDPRVAPQAYQKLRR----- 302
                    **  :::*:*:*: **:******.*:* * :

KWS2320-ORF20L      LARADVMKEADKIYNEVVAGRAIQGLQ 434
LOC104888056_X1    -----QTIA----- 342
LOC104888056_X2    -----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。

```

/Exon 1
BvOMA1-1      ATGGCATGGTACAGAAGATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTATAAAAAGCTTGAATTCCAAG 60
BvOMA1-2_X1   ATGGCATGGTACAGAAGATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTATAAAAAGCTTGAATTCCAAG 60
BvOMA1-2_X2   ATGGCATGGTACAGAAGATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTATAAAAAGCTTGAATTCCAAG 60
*****

BvOMA1-1      TTATTATTGCCTAAAAGTCCAGTTCAATCTCCTATTCCAAGATTTAATTCCAATTCATCT 120
BvOMA1-2_X1   TTATTATTGCCTAAAAGTCCAGTTCCATCTCCTGTTCCAAGAATTAATTCCAATTCATCT 120
BvOMA1-2_X2   TTATTATTGCCTAAAAGTCCAGTTCCATCTCCTGTTCCAAGAATTAATTCCAATTCATCT 120
*****

BvOMA1-1      TCTTTGTTTTACAATCAATTTAAGTCTTCTATAAATTTCTGGGTCACCTTCAATTTCTTCA 180
BvOMA1-2_X1   TCTTTGTTTTACAATCAATTTAAGTCTTCTATAAATTTCTGGGTCACCTTCAATTTCTTCA 180
BvOMA1-2_X2   TCTTTGTTTTACAATCAATTTAAGTCTTCTATAAATTTCTGGGTCACCTTCAATTTCTTCA 180
*****

BvOMA1-1      AAATTTGGGTATTTGAATGGGGTTAAACAGAATCAAAGTAGCTTGTTTTCTTGTTACT 240
BvOMA1-2_X1   AAATTTGGGTATTTGAATGGGGTTAAACAGAATCAAAGTAGCTTGTTTTCTTGTTACT 240
BvOMA1-2_X2   AAATTTGGGTATTTGAATGGGGTTAAACAGAATCAAAGTAGCTTGTTTTCTTGTTACT 240
*****

BvOMA1-1      AGGAGAAATTACCATGTTGATAGAAACCAAATTTACCATTTTAAACCAAGAGGTTTTAAA 300
BvOMA1-2_X1   AGGAGAAATTACCATGTCGATACAAACCAAATTTACCTTTTT----- 282
BvOMA1-2_X2   AGGAGAAATTACCATGTCGATACAAACCAAATTTACCTTTTT----- 282
*****

BvOMA1-1      TCTTGGTTTGAGAATCCTAGACATATATTCATCGCAGTAGTGATTGGTTCTGGTGTGTG 360
BvOMA1-2_X1   -----
BvOMA1-2_X2   -----

BvOMA1-1      ATCACTGTTTATTTGGCAATTCAGAAGTTGTGCCCTATACAAAAGGAAACATCTTGTA 420
BvOMA1-2_X1   -----
BvOMA1-2_X2   -----

BvOMA1-1      CTTTTGTCAAGAACCCTAGAGAGGAGAATTGGGGATTCTCAATTTGAGAAGATGAAGGAA 480
BvOMA1-2_X1   -----CTAGAGAGGAGATATGGGGAATTTGATTTGAGAAGAGGAAGGAA 327
BvOMA1-2_X2   -----CTAGAGAGGAGATATGGGGAATTTGATTTGAGAAGAGGAAGGAA 327
*****

BvOMA1-1      GAGTTTAAGGGGAAAATATTGCCTGCAATACACCCTGATAGTGTGAGGGTTAGGTTGATA 540
BvOMA1-2_X1   GATTTTAAGGGGAAAATATTGCCTGCAATACACCCTGATAGTGTGAGGGTTAGGTTGATA 387
BvOMA1-2_X2   GATTTTAAGGGGAAAATATTGCCTGCAATACACCCTGATAGTGTGAGGGTTAGGTTGATA 387
*****

BvOMA1-1      TCTAAAGACATAATTGAGTCATTAGAAAGAGGGATAAGCCATGAAAGAGCATGGAGTAGT 600
BvOMA1-2_X1   TCTAAAGACATAATTGAGTCATTAGAAAGAGGGATAAGCCATGAAAGAGCATGGAGTA— 445
BvOMA1-2_X2   TCTAAAGACATAATTGAGTCATTAGAAAGAGGGATAAGCCATGAAAGAGCATGGAGTA— 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      GCATTAAGTGAAGGGATGGATGAGAAAGTGCCAGGGGATTGGCATAAGGAGGAGGAGTT 720
BvOMA1-2_X1   GCATTAAGTGAAGGGATGGATGAGAAAGTGCCAAGGGATTGGCATAAGGAGGAGGAGTT 510
BvOMA1-2_X2   GCATTAAGTGAAGGGATGGATGAGAAAGTGCCAAGGGATTGGCATAAGGAGGAGGAGTT 510
*****

BvOMA1-1      CTTGATGATAAGTGGGTTAAAGATAGTAGGAAGAAGGGGGAGAAACATGGGGCTAAGACT 780
BvOMA1-2_X1   CTTGATGATAAGTGGGTTAAAGATAGTAGGAAGAAGGGGGAGAAACATGGGGCTAAGACT 570
BvOMA1-2_X2   CTTGATGATAAGTGGGTTAAAGATAGTAGGAAGAAGGGGGAGAAACATGGGGCTAAGACT 570
*****

BvOMA1-1      ACTACAAACCATTTGGAGGGATTGAATTGGGAAGTTCTGGTTGTGAACGAACCAGTTGTA 840
BvOMA1-2_X1   ACTACAAACCATTTGGAGGGCTTGAATTGGGAAGTTCTGGTTGTGAATGAACCATTTGTA 630
BvOMA1-2_X2   ACTACAAACCATTTGGAGGGCTTGAATTGGGAAGTTCTGGTTGTGAATGAACCATTTGTA 630
*****

BvOMA1-1      AATGCCTTTTGTACCAGGTGGGAAGATTGTTGTTTTCACTGGATTGCTCAAGCATTTTC 900
BvOMA1-2_X1   AATGCCTCTTATTTCCAGGTGGGAAGATTGTTGTTTTCACTGGATTGCTCAAGCATTTA 690
BvOMA1-2_X2   AATGCCTCTTATTTCCAGGTGGGAAGATTGTTGTTTTCACTGGATTGCTCAAGCATTTA 690
***** ** **
                                     /Exon 2

BvOMA1-1      AAATCAGATGCTGAATTGGCTACAATTATTGGACATGAGGTTGGACATGCTGTGGCTCGA 960
BvOMA1-2_X1   AAATCAGATGCTGAATTGGCTACAATTATTGGACATGAGGTTGGACATGCTGTGGCTCGA 750
BvOMA1-2_X2   AAATCAGATGCTGAATTGGCTACAATTATTGGACATGAGGTTGGACATGCTGTGGCTCGA 750
*****

BvOMA1-1      CATTCTGCAGAACAATTACAAGAATATGTGGTTTGAATCTTGCAACTGATCCTTTAT 1020
BvOMA1-2_X1   CATTCTGCAGAACGAATTACATGGATTATGTCGTTTGAAGCTTGCAACTGATCCTTC-- 808
BvOMA1-2_X2   CATTCTGCAGAACGAATTACATGGATTATGTCGTTTGAAGCTTGCAACTGATCCTTC-- 808
***** ** **

BvOMA1-1      CAATTCATCGCGCTGATTTTGTCTAATGCAATGT-----CAAATCTTCTTTAAGG----- 1071
BvOMA1-2_X1   ----TCATCGCACTGGATTTTGTCTAATGCAAGATATTTACAAATATCTTCATATGTAGGT 864
BvOMA1-2_X2   ----TCATCGCACTGGATTTTGTCTAATGCAAGATATTTACAAATATCTTCATAT----- 858
***** * ***** * ***** * *
                                     /Exon 3

BvOMA1-1      -----CTTCCTTTTCCCGAAAAATGGAAATAGAAGCAGATTACATTGGACTG 1119
BvOMA1-2_X1   GTTCTTTAATTCTTTCTTTGACCGAAAAGGGGAAATAGAAGCAGATTACATTGGACTG 924
BvOMA1-2_X2   -----AGGGGAAATAGAAGCAGATTACATTGGACTG 889
* *****

BvOMA1-1      CTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCACGAATTGCACCTCAAGTATATGAGAAGCTG 1179
BvOMA1-2_X1   CTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCACGAATTGCACCTCAAGTATATGAGAAGCTG 984
BvOMA1-2_X2   CTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCACGAATTGCACCTCAAGTATATGA----- 942
*****

```

付図 5-4 *BvOMAI-1* 及び *BvOMAI-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	GGTAAGATCTCTGGTGAATCATCGTCGCTGACGGAATATCTCTCAACTCATCCATCGGGG	1239
BvOMA1-2_X1	GGTAAGATCTCTGGTGAATCATCATCGCTGAAGGAATATCTCTCAACTCATCCATCAGGG	1044
BvOMA1-2_X2	-----	

BvOMA1-1	AAAAAGCGTGCTCAGTTATTAGCTCGAGCTCATATTATGCAAGAAGCAGTGGATATGTAC	1299
BvOMA1-2_X1	AAAAAGCGTGCTCAGTTATTAGCTCGAGCTCATATTATGAAAGAAGCAGTGGATATATAC	1104
BvOMA1-2_X2	-----	

BvOMA1-1	CGTGAAATTGTAGCAGGACGCGCAATTGAAGGTTTTCT <b><u>TGA</u></b>	1341
BvOMA1-2_X1	CGTGAAATTGTAGCAGGACGCGCAATTGAAGGTTTTCT <b><u>TGA</u></b>	1146
BvOMA1-2_X2	-----	

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<sup>\*</sup>を太文字及び下線で示した。

```

KWS2320-orf20L      ATGGCGTGGTACAGAAATCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTGCGTTCC 60
LOC104888056_X1    ATGGCATTTACAGAAATCAAGGTTTGTCTACAATGCTCTAAAACCCAGCTCAATCC 60
LOC104888056_X2    ATGGCATTTACAGAAATCAAGGT----- 26
***** * *****

KWS2320-orf20L      AAAACATTTGGTACTATTCCAACCTCAAGAGTTTCATTGCAATTCCTCATCTTTGTTTTAC 120
LOC104888056_X1    AAGTTACTTACTAAAACCTCATCTC-----ATTCCAATTCCTATTCTTTGTTTTAC 111
LOC104888056_X2    -----

KWS2320-orf20L      AATCAATCTA-----CTAAGTGTAGTGGGT-TATTTGGGT--CTGCAAATCTGGGTAT 171
LOC104888056_X1    ACTCAATTTAAGTATTCTAGGTTACATGGGTCTCCTTCAATTTCTTCAAATGTGGGTAC 171
LOC104888056_X2    -----ACATGGGTCTCCTTCAATTTCTTCAAATGTGGGTAC 63
***** * ** * ** *****

KWS2320-orf20L      TTTAATGGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAG---GAGA 228
LOC104888056_X1    TTCAATGGGTTTAAACATACTCAAAA---CAGAATTATTTCTGGTGTGCTACTATCAGA 228
LOC104888056_X2    TTCAATGGGTTTAAACATACTCAAAA---CAGAATTATTTCTGGTGTGCTACTATCAGA 120
** ***** ***** ** * * *****

KWS2320-orf20L      AACTATCATGGTGTTA--AAACCGAAGTAAGTGT-TGAATTTGCGGTGGAAAAA-TTACT 284
LOC104888056_X1    AATTCTCTTGAAGTTAAGAAAACCTCAGAAATTCTATGGAAAACAGCTAAAAAAACTAAT 288
LOC104888056_X2    AATTCTCTTGAAGTTAAGAAAACCTCAGAAATTCTATGGAAAACAGCTAAAAAAACTAAT 180
** * ** * ** ***** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *

KWS2320-orf20L      TCTTGAATTGCACTAATAATCTCGCATTCTGGTATGATTGCTTTCTTTTATTGCACC- 343
LOC104888056_X1    TCATGG---TGGGTGGACGGTAT---TTTTTTTGTGATGACTATTTATTATA-GCATT 340
LOC104888056_X2    TCATGG---TGGGTGGACGGTAT---TTTTTTTGTGATGACTATTTATTATA-GCATT 232
** *** ** * * * ** * * ** * ** * ** * ** *

KWS2320-orf20L      CAGTAGTTGTGCCATATACAGGAAGGAAGCATTATGTGATTTTGTCAACAACCTCATGAGA 403
LOC104888056_X1    CAGAAGTTGTACCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCTAACATCTCTTGAGA 400
LOC104888056_X2    CAGAAGTTGTACCTTTACAGAAAGGAAGCATCTTGTGATTCCTAACATCTCTTGAGA 292
*** ***** ** * ***** ***** ***** *****

KWS2320-orf20L      ATGAAAATGGAGAATTTGAGAAGC-----GGAAAATACAACCTGCTACAC 448
LOC104888056_X1    TAAAAATTGGGAATCTATGAAGAAGAAATTGTATGATGGGAAAACATTGCATGCTAGAC 460
LOC104888056_X2    TAAAAATTGGGAATCTATGAAGAAGAAATTGTATGATGGGAAAACATTGCATGCTAGAC 352
*** ** * ** * * ** * ***** * * *****

KWS2320-orf20L      ACCCTGATACTGAGAGGGTTAGGTCTATATTCCAACACATTCTTGAATCACTGGAAAGAG 508
LOC104888056_X1    ACCCTGCTAGTGTGAGGGCTAGAGTAGTATTTGAACACATCATTGTCTCTCT----- 512
LOC104888056_X2    ACCCTGCTAGTGTGAGGGCTAGAGTAGTATTTGAACACATCATTGTCTCTCT----- 404
***** ** ** ***** ** * ***** ***** ** **

KWS2320-orf20L      AGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAACTCGAACTCGAAAGAGATGAACTTTCAAGG 568
LOC104888056_X1    ----TGATCAC-----AAGCTCATACATGAAGGAATG----- 541
LOC104888056_X2    ----TGATCAC-----AAGCTCATACATGAAGGAATG----- 433
* ***** * ** * ** * **

KWS2320-orf20L      AGAAAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGATCATGATAAAGATAGTAGGAAGAAGCATAGTG 628
LOC104888056_X1    -----GATC----- 545
LOC104888056_X2    -----GATC----- 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      GGGCTAAGATAACTACTAACCATGAAGGGATGAATTGGGAAATTTTCGTTGTCGATAAAC 688
LOC104888056_X1    ----TAAGACAACACTAAGCAT-----TTGGAAGTTTTCGTTGTCGACGAAC 589
LOC104888056_X2    ----TAAGACAACACTAAGCAT-----TTGGAAGTTTTCGTTGTCGACGAAC 481
                    ***** ***** ***                * **** ***** ***** ***

KWS2320-orf20L      CGTGGGTTGAGTCCAGTTGTATATTTGGTGGGAAGATTGTTGTTTACTGATTGCTCA 748
LOC104888056_X1    CTCGGGTTTTTTCCTTTTGTTCAGGTGGAATGATTGCTGTTTCTACTGGTTGCTCA 649
LOC104888056_X2    CTCGGGTTTTTTCCTTTTGTTCAGGTGGAATGATTGCTGTTTCTACTGGTTGCTCA 541
* ***** ** **** *          ***** * ***** ***** ***** *****

KWS2320-orf20L      ACCATTGCATCTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCGCATCAGTTGGGCATGCTG 808
LOC104888056_X1    ACTATTTCCATTGAGATTCTGAATTGGCTGCAATTATTGGGACTCAGTTGCCGATGCTG 709
LOC104888056_X2    ACTATTTCCATTGAGATTCTGAATTGGCTGCAATTATTGGGACTCAGTTGCCGATGCTG 601
** *** *   ** ** ***** ***** * * ***** * *****

KWS2320-orf20L      TGGCTCGACATGAGGCAGAGCATTGGACAACATTGTTGTGGTCGATACTGTTAGTGATAT 868
LOC104888056_X1    TGGCTCGGCCTTTTGCAGAATCTTTCCAAAGT-----ATA-TGTTGGCTATGT 757
LOC104888056_X2    TGGCTCGGCCTTTTGCAGAATCTTTCCAAAGT-----ATA-TGTTGGCTATGT 649
***** * * ***** * *** *                *** **** * ** *

KWS2320-orf20L      ACATGACAATATTTCAAT-ATCTATTTACTGCGCCTGAATTTGCCAATGCAATATCAAAA 927
LOC104888056_X1    TTGT----CATTCGATTATCAATCC-CAGTGCCAGAATT-----GTGAAGA 799
LOC104888056_X2    TTGT----CATTCGATTATCAATCC-CAGTGCCAGAATT-----GTGAAGA 691
*          ***** ** ** *   * * ** *****                * ** *

KWS2320-orf20L      CTA CTCTCAAGGCATCCTCTCTTGC AAAAGTTTGAAGATTATTCAG-GCTAGATTTCA 986
LOC104888056_X1    TTATTC--AGGC--TAGAGCTTGTA--CT--ACGGCATTACCGCTGG-CTTGA 847
LOC104888056_X2    TTATTC--AGGC--TAGAGCTTGTA--CT--ACGGCATTACCGCTGG-CTTGA 739
** ** ***** ***** ** * * * ***** ** * ** *

KWS2320-orf20L      TCAATTACTGCCACGAACCTTGCACCTTGGGCTTTCTTGATTGTCTTCTTGGTGTT 1046
LOC104888056_X1    TCAAAT-CTGGACTGAATT---TTAC---CGGGCTTCTTCTG-CTGTGTTTGCACCATT 899
LOC104888056_X2    TCAAAT-CTGGACTGAATT---TTAC---CGGGCTTCTTCTG-CTGTGTTTGCACCATT 791
***** * ** ***** * ** * ***** * * ** ** **

KWS2320-orf20L      TATTCCTTATTTTGGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGCTTCTGATGGC 1106
LOC104888056_X1    GGATTGTTATTTTCGTTGGAGGAAGATGGAAGCAGATTACATTGGCCTACAGTTGATGTC 959
LOC104888056_X2    GGATTGTTATTTTCGTTGGAGGAAGATGGAAGCAGATTACATTGGCCTACAGTTGATGTC 851
* ***** ** ** * * ** ***** ***** * * ***** *

KWS2320-orf20L      TTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGC AAAGCCACT 1166
LOC104888056_X1    TTCTGCTGGATACGACCCACGAGTTGCACCTCAAGCATATCAGAAGCTGAGAAGGC---- 1015
LOC104888056_X2    TTCTGCTGGATACGACCCACGAGTTGCACCTCAAGCATATCAGAAGCTGAGAAGGC---- 907
***** ***** ***** ***** * ***** ** **

KWS2320-orf20L      GGGCGACTGGAAGTGTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGC 1226
LOC104888056_X1    -----AACTAT--AGC-----TTAG- 1029
LOC104888056_X2    -----AACTAT--AGC-----TTAG- 921
                    **** * **                               ****

KWS2320-orf20L      TCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGC 1286
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  
(次ページへ続く)

```
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<sup>\*</sup>を太文字及び下線で示した。

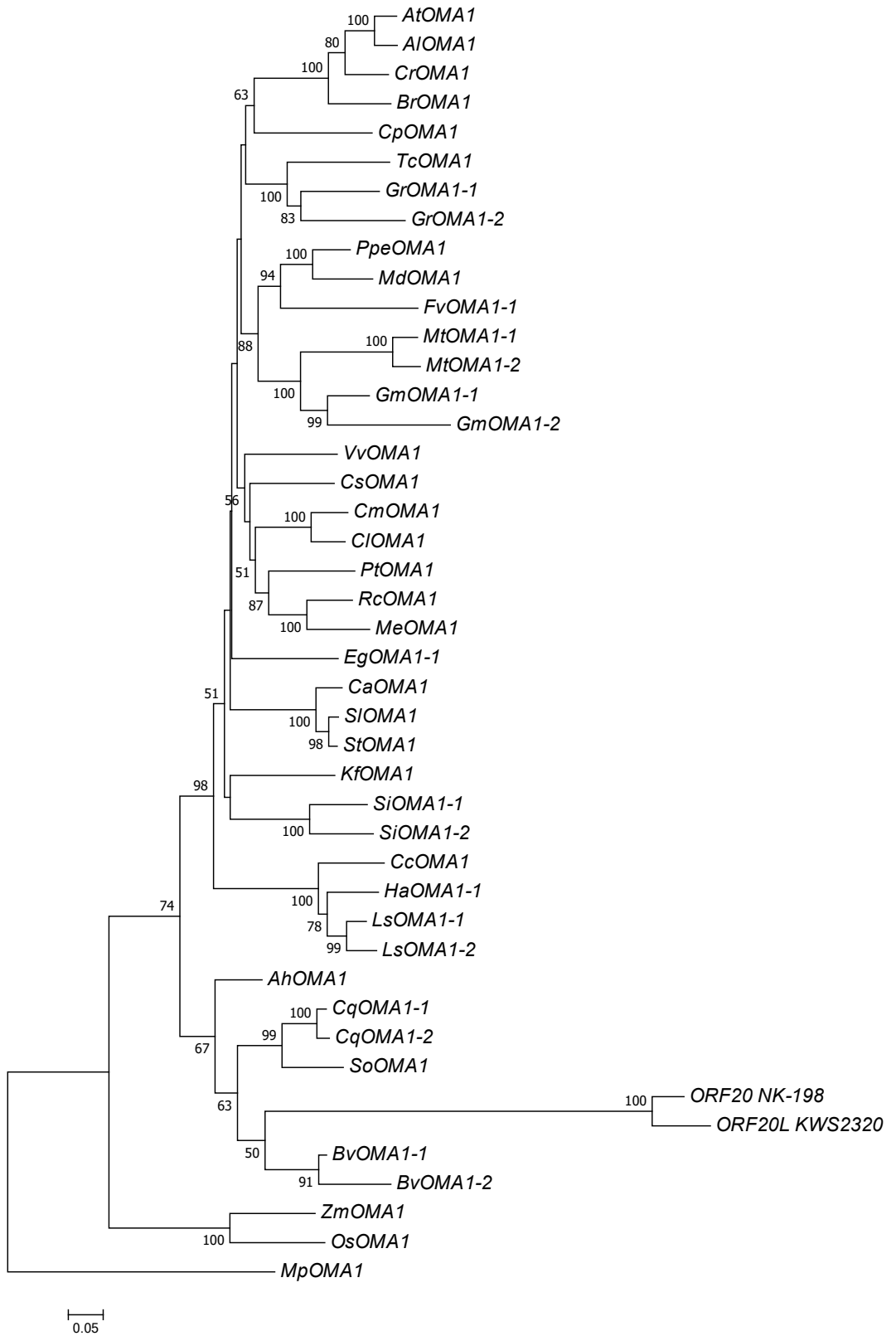
付表5-3 *BOsMA1-1* (A)および*ort20*の隣接遺伝子の遺伝子

<i>Beta vulgaris</i>		<i>Spinacia oleracea</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Gene ID	Description	Gene ID	Description	Locust tag	Description
LOC104906573	carboxylesterase 1	LOC10782435	carboxylesterase 1-like	ATSG62180	carboxylesterase 20 (CXE20)
LOC104906574	unchacterized protein	LOC10782433	unchacterized protein	ATIG53405	Protein kinase superfamily protein
LOC104906579	unchacterized protein	LOC10782436	unchacterized protein	ATZG13940	hypothetical protein
LOC104906580	unchacterized protein	LOC10782437	unchacterized protein	ATSG51790	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
LOC104906575	transcription factor bHLH118	LOC10782438	transcription factor bHLH120-like	ATSG51790	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
LOC104906576	transcription factor bHLH120	LOC10782439	transcription factor bHLH118-like	ATSG48150	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
LOC104906602	unchacterized protein	LOC10782396	keratin, type I cytoskeletal 9-like	ATSG48150	Copa-like polyprotein/retrotransposon
LOC104906577	receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g25390	LOC10782429	receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g25390	ATSG51770	Protein kinase superfamily protein
LOC104906578	glycosyltransferase family 64 protein C4	LOC10782281	glycosyltransferase family 64 protein C4-like	ATSG58320	ECTOPICALLY PARTING CELLS
LOC104906583	subtilisin-like protease SBTL3	LOC10782280	subtilisin-like protease SBTL3	ATSG61750	subtilase L3
LOC104906580	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g66520-like	LOC10782424	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g66520-like	ATSG66520	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
LOC104906581	3-ketoadyl-CoA synthase 5-like	LOC10782427	3-ketoadyl-CoA synthase 5-like	ATIG19400	3-ketoadyl-CoA synthase 4
LOC104906582	alpha-L-fucosidase 1-like	LOC10782426	alpha-L-fucosidase 1-like	ATIG19400	alpha-L-fucosidase 1
LOC104906603	unchacterized protein	LOC10782425	unchacterized protein	ATSG63140	Peptidase family M48 family protein
LOC104906584	unchacterized protein	LOC10782433	unchacterized protein	ATZG13940	Peptidase family M48 family protein
LOC104906585	unchacterized protein	LOC10782434	unchacterized protein	ATSG14770	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
LOC104906586	putative disease resistance protein RGA1	LOC1077981	disease resistance protein RGA2-like	ATSG62190	DEAD box RNA helicase (PRH75)
LOC104906587	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 7	LOC10776874	xyloglucan galactosyltransferase XLT2	ATIG62220	glycosyltransferase 18
LOC104906588	xyloglucan galactosyltransferase XLT2	LOC10782418	unchacterized protein	ATIG65880	hypothetical protein
LOC104906589	unchacterized protein	LOC10781568	unchacterized protein	ATSG28145	hypothetical protein
LOC104906590	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein NEET	LOC10782279	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein NEET	ATFG0720	2, non, 2, sulfur cluster-binding protein
LOC104906591	UPP0051 protein ABC18, chloroplastic	LOC10778781	UPP0051 protein ABC18, chloroplastic	ATHG04770	ATP binding cassette protein 1 (ABC18)
LOC104906592	K(+)-efflux antiporter 5	LOC10782417	K(+)-efflux antiporter 5	ATSG61710	K <sup>+</sup> -efflux antiporter 5
LOC104906593	cysteine and histidine-rich domain-containing protein RAR1	LOC10782416	cysteine and histidine-rich domain-containing protein RAR1	ATIG04940	translocase at the inner envelope membrane of chloroplasts 20
LOC104906594	box CD snoRNA protein 1-like	LOC10782415	box CD snoRNA protein 1-like	ATIG44340	hypothetical protein
LOC104906595	protein transport protein Sec24-like CEF	LOC10782414	protein transport protein Sec24-like At4g32640	ATSG01770	Cell cycle regulated microtubule associated protein
LOC104906596	unchacterized protein LOC104906595 isoform X1	LOC10782395	unchacterized protein TPX2-like	ATSG16600	cleavage and polyadenylation specificity factor 160
LOC104906596	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	LOC10782390	cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1		

(B)

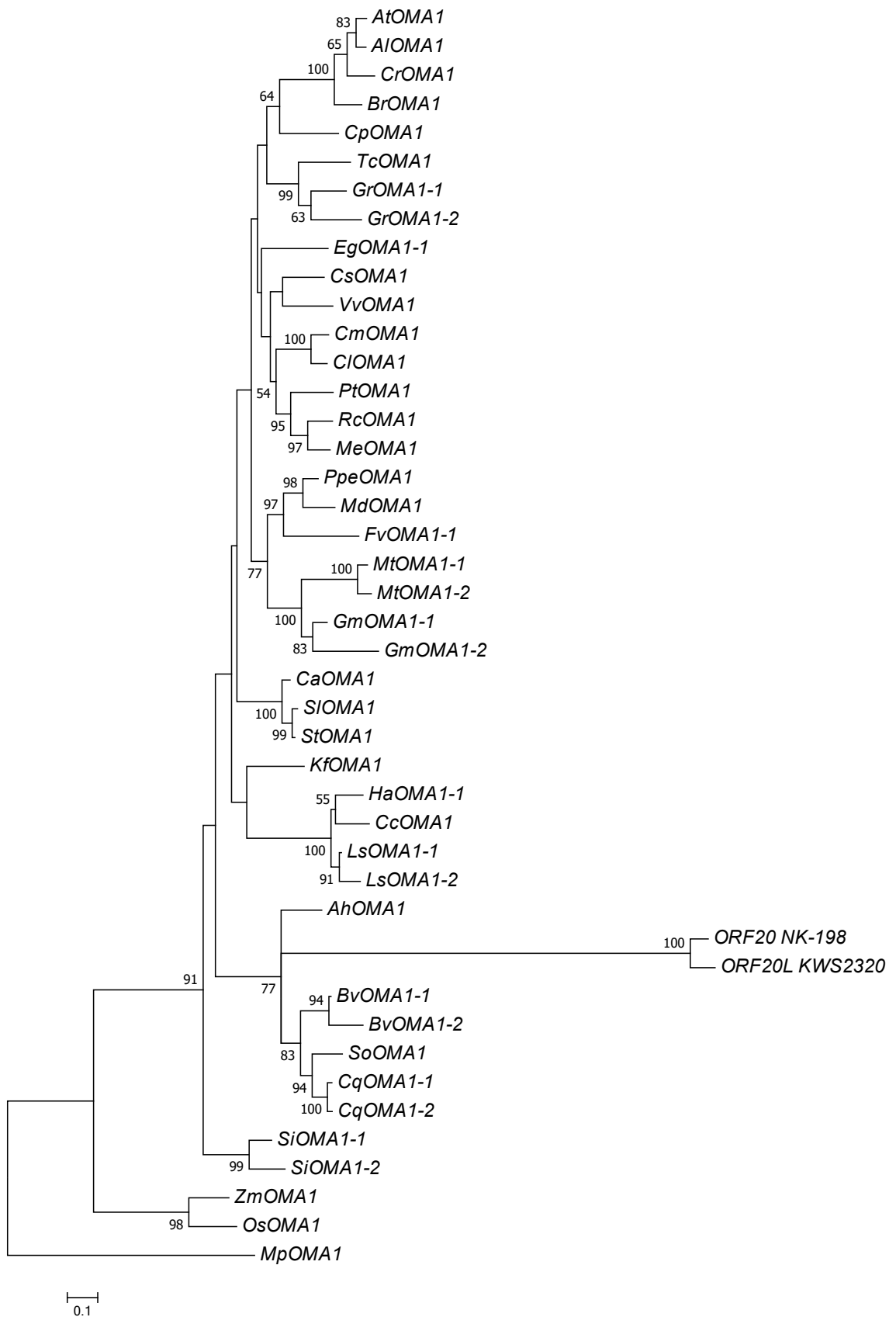
<i>Beta vulgaris</i>		<i>Spinacia oleracea</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>	
Gene ID	Description	Gene ID	Description	Locust tag	Description
LOC104888048	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g23210, mitochondrial-like isoform X1	LOC10798202	pentatricopeptide repeat-containing protein At5g23210, mitochondrial-like	ATSG63000	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily
LOC104888049	60S ribosomal protein L13-1	LOC10798181	60S ribosomal protein L13-1-like	ATSG23900	Ribosomal protein L13c family protein
LOC104888050	vegetative cell wall protein gpl-like	LOC10798172	cell surface glycoprotein 1-like	No hit	
LOC104888051	mitochondrial metalloendopeptidase OMA1 (KW52320 ort201)	LOC10782423	UPP0481 protein At3g47200-like isoform X1	ATSG51740	Peptidase family M48 family protein
LOC104888052	UPP0481 protein At3g47200-like	LOC10798143	UPP0481 protein At3g47200-like isoform X1	ATSG6430	transmembrane protein, putative (DUF247)
LOC104888053	protein KRR1 homolog	LOC10796508	protein kn1	ATG24080	KRR1 family protein
LOC104888054	probable disease resistance protein RF45	LOC10798107	putative disease resistance protein At1g50180 isoform X2	ATG46730	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
LOC104888055	unchacterized protein	LOC10798107	putative disease resistance protein At1g50180 isoform X2	ATG46710	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
LOC104888056	mitochondrial metalloendopeptidase OMA1 isoform X1	LOC10782423	unchacterized protein	ATSG1740	Peptidase family M48 family protein
LOC104888057	probable disease resistance protein RF45 isoform X1	LOC10798107	putative disease resistance protein At1g50180 isoform X2	ATSG5450	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
LOC104888058	unchacterized protein	LOC10798089	probable zinc transporter protein DDB_G0282067	ATG04620	zinc transporter-like protein
LOC104888059	unchacterized protein				

左端にて *OMA1* 周辺領域の遺伝子の ID 番号とアブレーション情報を示す。これらの各遺伝子存在ホウレンソウ間の各遺伝子 (テンカイ-ホウレンソウ間) で検出された。 *BOsMA1-1* と *ort20* 隣接遺伝子の周辺領域において共通して存在する遺伝子を緑色で示した。配置が保存されていた遺伝子を赤 (三相同) あるいはピンク (テンカイ-ホウレンソウ間) で検出された。 *BOsMA1-1* と *ort20* 隣接遺伝子の周辺領域において共通して存在する遺伝子を緑色で示した。



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*AtOMAI*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	Leaf 1 + 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_16_A,ATGE_16_B,ATGE_16_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      -GAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATATCAACAAGAAAATCACATTGT--- -1945
orf20_NK-305-1   ACATAATACAAATAAA--CAATAAAGTAAT-AGACATTAATACAAGTATAATATTATATA -1944
                * * * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      -TCATAGGAAAACCTCCTAT-AACATTTGCATA----CATTGT-AGGTCTTTGT----TGC -1896
orf20_NK-305-1   ATCATTGTGGTACTTTAATTAATAATTCTAATAATAACATAATCAACTAATAGTGATATGA -1884
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      ACTT-TAATCCCTCGGGCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTAATCTACGTTTTTTTT -1837
orf20_NK-305-1   AATTATGAATAACAAAATAATGGACAATAATAC-AAATGTATATTAACATTGACTATTT -1825
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      -----CTATTGCAACAATTACTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTTCACT -1782
orf20_NK-305-1   GGACCTTATTGGACC--TTATTAGACCTGAT----TGAAACTTATTG-GACCTTATTAGA -1772
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      TTTGGTATAAAAAGCAATATTTTACAACAAGCAGCATTGTGCACCCGAGA-----GA -1729
orf20_NK-305-1   CCTGAT-TGGAACCTTATTGCACCTGATTGAAACT-TATTG--CACCTGGAACCTTATTGGA -1716
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      ACATACCAT-TCATATAGAAGAATATGATTTTTTTTCAAC-----AACTTTTCAAGA -1678
orf20_NK-305-1   CCTTATTAGACCTTATTGGAAGTTATTGCCTTATTAGACCTTATTACAACCTTATCTGAA -1656
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      TAAAAAAGCATACAATATAA-----AATTAA--AGAACATG---TAAATCTCCAAC -1631
orf20_NK-305-1   CTTATTGGACCTGAACTTAATTTTTTTAAGTTGAGCAGAACGCACCCTAAATCTCCAAT -1596
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      AACATTTGAAAAACCTA-----AAAAAAGCATCTATTGTAATGAACATTTAGTCT -1577
orf20_NK-305-1   ----TATAAATAACATAGGTGCGAATAAAAAGAAAGTATTGTAATGAACATTTAGTCT -1540
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      AAATTTAAGAACCTAACTTTTAAATGTAATAATTTGAAAAAGGAATCTCGCCAACAAC -1517
orf20_NK-305-1   AAATTTAAGAACCTAACTTTTAAATGTAATAATTTGAAAAAGGAATCTCGCCAACAAC -1483
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      CATTTTTCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAACATTTTT -1457
orf20_NK-305-1   CATTTTTCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAACATTTTT -1423
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      CTAAATCATAAATTCTTAAATATTAACCTACATCGTTTAAACAGAAGGTGCACCATCC -1397
orf20_NK-305-1   CTAAATCATAAATTCTTAAATATTAACCTACATCGTTTAAACAGAGGGTGCACCATCC -1363
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      TTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCTATTTGCGCTTTTCCATTCCCTAAAAACCGAGT -1337
orf20_NK-305-1   TTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCTATTTGCGCTTTTCCATTCCCTAAAAACCGAGT -1303
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
orf20_NK-198      CTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGTAGTCCTCTCAAAAAAAA-TAAGGCTTTGCTA -1278
orf20_NK-305-1   CTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGTAGTCCTCTCAAAAAAAAATAAGGCTTTGCTA -1243
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf20_NK-198      AATTACGCCCTAAATTTTTCTGGTAACGCCCTAAATACGGTATTTTCATACCGTATTTAT -1218
orf20_NK-305-1   AATTACGCCCTAAATTTTTCTGGTAACGCCCTAAATACGGTATTTTCATACCGTATTTAT -1183
*****

orf20_NK-198      ATACCTGCATTTCTTTCTCTCTTTCCCTTCACTCACTCACTTTCTCTCTCCTCTCCAC -1158
orf20_NK-305-1   ATACCTGCATTTCTTTCTCTCTTTCCCTTCACTCACTCACTTTCTCTCTCCTCTCCA- -1124
*****

orf20_NK-198      CATAACTGCCACCAATTTCTCTCTCCTCTCCACCACAAGTCCACCACACCACCCTACC -1098
orf20_NK-305-1   -----CCACAAGTCCACCACACCACCCTACC -1096
*****

orf20_NK-198      ATATTCTTCTCCAATTTACACTTCTGACTCTTATGTCTTCTAACAACATTGTGCCGGCA -1038
orf20_NK-305-1   ATATTCTTCTCCAATTTACACTTTTGACTCCTATGTCTTCTAACAACATTGTGCCGGCA -1036
*****

orf20_NK-198      CCACCACCACCGACGTACCCCGACACCCACCATCGTTCGTATCCCGGCCACCACCGCCG -978
orf20_NK-305-1   CCACCACCACCGACGTACCCCGACACCCACCATCGTTCGTATCCCGGCCACCACCGCCG -976
*****

orf20_NK-198      TACCCCGACACACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCCGTTTTCTTTATTTTCTGAA -918
orf20_NK-305-1   TACCCCGACACACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCCGTTTTCTTTATTTTCTGA- -917
*****

orf20_NK-198      TTTTTTTTTTAAAAAAGGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCACCCTGGTGGAGGCG -858
orf20_NK-305-1   -TTTTTTTTTAAAAAAGGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCATCACTGGTGGAGGCG -858
*****

orf20_NK-198      TCCATG-CAGGCGCCTCACCATGTGGTGAAGCGCCTGCCATAGACGCCTCCCCTTTTTT -799
orf20_NK-305-1   TCCATGGCAGGCGCCTCACCATGTGGTGAAGCGCCTGCCATAGACGCCTCCCCTTTTTT -798
*****

orf20_NK-198      TAAAAAAATTTCAAATTAAGTGAATGAAGAAACATAGAAGAGGAGGGTGGGTACGAC -739
orf20_NK-305-1   TAAAAAAATTTCAAATTAAGTGAATGAAGAAACATAGAAGAGGAGGGTGGGTACGAC -738
*****

orf20_NK-198      GGTGTGGTGGTGGTGGCAGTGTGTGGTGGTGGCGCAGTACTGGTGGCAGGCGACTG -679
orf20_NK-305-1   GGTGTGGTGGTGGTGGCAGTGTGTGGTGGTGGCGCAGTACTGGTGGCAGGCGACTG -678
*****

orf20_NK-198      GTGCGGCGGTGGTGGTGAATGGTCCCAATGGTAAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGT -619
orf20_NK-305-1   GTGCGGCGGTGGTGGTGAACGGTCCCAATGGTAAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGT -618
*****

orf20_NK-198      GAATGTAGAAGGTGAAAAATCTGAAAATGAAAAATACGTATATTATACGTATTTAGGGC -559
orf20_NK-305-1   GAATGTAGAAGGTGAAAAATGAAAAATGAAAAATACGTATATTATACGTATTTAGGGC -558
*****

orf20_NK-198      GTTAGTAAGATATTCTAGGCGTCGTTAGCAAATGAGAAAAGATAATACACTCTAGTTG -499
orf20_NK-305-1   GTTAGTAAGATATTCTAGGCGTCGTTAGCAAATGAGAAAAATAATACACTCTAGCTG -498
*****

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)



```

orf20_NK-198      TCGTAGACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGG -439
orf20_NK-305-1   TCGTAGACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGG -438
*****

orf20_NK-198      GTAGAAATATTTTGTTCATTTATTAATGAGAAAATTTTCATCCCCTGATCCCAATTATC -379
orf20_NK-305-1   GTAGAAATATTTTGTTCATTTATTAATGAGAAAATTTTCATCCCCTGATCCCAATTATC -378
*****

orf20_NK-198      AAATCAACATCTAAAAATTTAAATGAGTAGGTACGTAACGAAAACGAATGACTCTCGA -319
orf20_NK-305-1   AAATCAACATCTAAAAATTTAAATGACTAGGTACGTAACGAAAACGAATGACTCTCGA -318
*****

orf20_NK-198      TAATAGTACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTCATAGTTTGTTCGCTAGTGCATA -259
orf20_NK-305-1   TAATAGTACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTCATAGTTTGTTCGCTAGTGCATA -258
*****

orf20_NK-198      GCTGGCTGCAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACCTTTTGCACCTTTCGGAATTCAGCAG -199
orf20_NK-305-1   GCTGGCTGCAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACCTTTTGCACCTTTCGGAATTCAGCAG -198
*****

orf20_NK-198      GAATATCATAACCATTTATGGAAGCAACAACCTCTTGTGACCCATTTTCATCTAAAACCTT -139
orf20_NK-305-1   GAATATCATAGCCATTTATGGAAGCAACAACCTCTTGTGACCCATTTTCATCTAAAACCTT -138
*****

orf20_NK-198      AATCTCATAAATTTTACATTTTCAAGATTCAAAATCAGTAATTTTTTTTTTTGGTATGT -79
orf20_NK-305-1   AATCTCATAAATTTTACATTTTCAAGATTCAAAATCAGTAATTTTTTTTTTTGGTATGT -79
*****

orf20_NK-198      TACTTGAACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCAGC -19
orf20_NK-305-1   TACTTGAACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTCAAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCACC -19
*****

orf20_NK-198      TTTTGTGTTTCAAAAATC -1
orf20_NK-305-1   TTTTGTGTTTCAAAAATC -1
*****

/ Exon 1

orf20_NK-198      ATGGCGTGGTACAGAAATTCAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACCTCAACTGCGTTCC 60
orf20_NK-305-1   ATGGCGTGGTACAGAAATTCAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAAACCTCAACTGCGTTCC 60
*****

orf20_NK-198      AAAACATTTGGTACTATTCCAACCTCCAAGAGTTCATTTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC 120
orf20_NK-305-1   AAAACATTTGGTACTATTCCAACCTCCAAGAGTTCATTTCGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC 120
*****

orf20_NK-198      AATCAATCTACTAATAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAAT 180
orf20_NK-305-1   AATCAATCTACTAATAAGTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAAT 180
*****

orf20_NK-198      GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT 240
orf20_NK-305-1   GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTATGCAAGGAGAAATTATCAT 240
** *****

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf20_NK-198      GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTGAATCATGGCTGGAAAAATTCCTTGTTCCAATTGA 300
orf20_NK-305-1   GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTGAATCATGGCTGGAAAAATTCCTTGTTCCAATTGA 300
*****

orf20_NK-198      CTAATCTTGACTTTTGGTATACTTGGTTACCTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT 360
orf20_NK-305-1   CTAATCTTGACTTTTGGTATACTTGGTTACCTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT 360
*****

orf20_NK-198      ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATGTCAACAACCTCGTGAGAATGAAATTGGAGAAGTT 420
orf20_NK-305-1   ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATGTCAACAACCTCGTGAGAATGAAATTGGAGAAGTT 420
*****

orf20_NK-198      GAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTC 480
orf20_NK-305-1   GAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTC 480
*****

orf20_NK-198      CAACACATTCTTGAATCACTGGAAGAGAGATTAATCACCATGAACCTGAACTCGAAAGA 540
orf20_NK-305-1   CAACACATTCTTGAATCACTGGAAGAGAGATTAATCACCATGAACCTGAACTCGAAAGA 540
*****

orf20_NK-198      GATGAACTTTCAAGGAGAAAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAAGATAGT 600
orf20_NK-305-1   GATGAACTTTCAAGGAGAAAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAAGATAGT 600
*****

orf20_NK-198      AGGAAGAAGCATAGTGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTTGGAAGGGATGAATTGGGAA 660
orf20_NK-305-1   AGGAAGAAGCATAGTGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTTGGAAGGGATGAATTGGGAA 660
*****

orf20_NK-198      ATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTATTTATTAGGTGGGAAGATTGTT 720
orf20_NK-305-1   ATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTATTTATTAGGTGGGAAGATTGTT 720
*****

orf20_NK-198      GTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCG 780
orf20_NK-305-1   GTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCG 780
*****
      / Intron 1
orf20_NK-198      CATCAGGTATATAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTTAATA 840
orf20_NK-305-1   CATCAGGTATATAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTTAATA 840
*****

orf20_NK-198      GAACTATACAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATG 900
orf20_NK-305-1   GAACTATACAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAGATTACATTATGAATGTCATATG 900
*****
      / Exon 2
orf20_NK-198      TCAATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGG 960
orf20_NK-305-1   TCAATTTGGTGGTATGTATTTGTTAGGTTGGGCATGCTGTGGCTCGACATGAGGCAGAGG 960
*****

orf20_NK-198      ATTCGACAGCATTTTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTATTTAAATCTAT 1020
orf20_NK-305-1   ATTCGACAGCATTTTTCTGGTTGTTAATATCCCTCAACGTGATATTATTTAAATCTAT 1020
*****

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf20_NK-198      TTACTGAGCCTGAATCTGCCAATGCAAGATCAAACACTCTTAAGGCATCCTCTCTTGC 1080
orf20_NK-305-1   TTACTGAGCCTGAATTTGCCAATGCAAGATCAAACACTCTTAAGGCATCCTCTCTTGC 1080
*****
                / Intron 2
orf20_NK-198      AAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGC 1140
orf20_NK-305-1   AAAAGTAAGTCTCTTACTCTTAAATGTTTTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGC 1140
*****

orf20_NK-198      TACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTACA 1200
orf20_NK-305-1   TACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTGCATAATTGCAAACATATATTACA 1200
*****

orf20_NK-198      TGCCCGGACCTAGTAACCTGTTTCATTTGTCAGCGATTTTCATTTAGATATCCATTTGAGA 1260
orf20_NK-305-1   TGCCCGGACCTAGTAACCTGTTTCATTTGTCAGCGATTTTCATTTAGATATCCATTTGAGA 1260
*****

orf20_NK-198      GCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACAATAAGAGAGGTG 1320
orf20_NK-305-1   GCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAGTAATAGAACAATAAGAGAGGTG 1320
*****

orf20_NK-198      TGATGCTAATAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGATTGC 1380
orf20_NK-305-1   TGATGCTAATAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGATTGC 1380
*****

orf20_NK-198      TATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATGCAC 1440
orf20_NK-305-1   TATATCCACAGATTCTATCCTTTGTCGCAGATAACATTAATTTATGTTGTTTATGCAC 1440
*****

orf20_NK-198      ATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAACATATG 1500
orf20_NK-305-1   ATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATATATATGTGAGTTAGGTAACATATG 1500
*****
                / Exon 3
orf20_NK-198      GTGTCAATTTACAGAGTTTGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGCCACGA 1560
orf20_NK-305-1   GTGTCAATTTACAGAGTTTGAAGATTATTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGCCACGA 1560
*****

orf20_NK-198      ACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGATTGTTTTCTCGGTGTTTATTCTTTATTATGGTCGG 1620
orf20_NK-305-1   ACTATCTGCTTGTCCCTTGTTGGATTGTTTTCTCGGTGTTTATTCTTTATTATGGTCGG 1620
*****

orf20_NK-198      AAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCG 1680
orf20_NK-305-1   AAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCG 1680
*****

orf20_NK-198      CGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGAAGTGTTA 1740
orf20_NK-305-1   CGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAAAGCCACTGGGCGACTGGAAGTGTTA 1740
*****

orf20_NK-198      GCAACTCATCATTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAG 1800
orf20_NK-305-1   GCAACTCATCATTGCAAGAATGAGAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAG 1800
*****

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf20_NK-198      GAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTCAAGGTCTTCAGTAA 1860
orf20_NK-305-1   GAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAGGACGTGCAATTCAAGGTCTTCAGTAA 1860
*****

orf20_NK-198      CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTGTGGTAATCA 1920
orf20_NK-305-1   CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTATGGTAATCA 1920
*****

orf20_NK-198      AATTA AACAGCTCATCGATCATTATATTGTCGTTATATTTTCATCTGTTTGACAAAGTTT 1980
orf20_NK-305-1   AATTA AACAGCTCATGGATCATTATATTGTCGTTATATTTTCGTCTGTTTGACAAAGTTT 1980
*****

orf20_NK-198      AGAGGTTAATTTGAGTTGAGA AACTTGCTATTAGTATGTTATCCACTTGTTAATTC AATCT 2040
orf20_NK-305-1   AGAGGTTAATTTGAGTTGAAA AACTTGCTATTAGT-TGTTATCCACTTGTTAATTC AATCT 2039
*****

orf20_NK-198      AATTTGGTTCCTATGTTAATCACTGCTCTTTTTCTCCTTCAAGAGATCCTCTCTATCTTT 2100
orf20_NK-305-1   AATTTGGTTCCTATGTTAATCACTGCTCTTTTTCTCCTTCAAGAGATCCTCTCTATCTTT 2099
*****

orf20_NK-198      TTCTTTTTTAAAGCAGTAGTAGTAGATAGCAGAGTAGTGGAGATGAGTTTCTCTTTTAGG 2160
orf20_NK-305-1   TTCTTTTTTAAAGCAGTAGTAGTAGATAGCAGAGTAGTGGAGATGAGTTTCTCTTTTAGG 2159
*****

orf20_NK-198      TAGATATTAGTATAAACCGGGAAAGGGTCACTCAAATACAAATTAATGTTTTCAA AAC 2220
orf20_NK-305-1   TAGATATTAGTATAAACCGGGAAAGGGTCACTCAAATACAAATTAATGTTTTCAA AAC 2219
*****

orf20_NK-198      CATCCGTTTTCTCTTTGCCTCCCTAGCTAAACTATCCGCAAGGCTATTTGCTCCTCTTC 2280
orf20_NK-305-1   CATCCGTTTTCCCTTTGCCTCCCTAGCTAAACTATCCGCAAGGCTATTTGCTCCTCTTC 2279
*****

orf20_NK-198      CTTGAGTGTAGTCTAACGCCTTCTTGATCTTGGAGCAACTCCCTGCAAGGATCAATCA 2340
orf20_NK-305-1   CTTGAGTGTAGTCTAACGCCTTCTTGATCT-GGAGCAACTCCCTGCAAGGATCAATCA 2338
*****

orf20_NK-198      AATGAGAGAGGTAATCTTTTAAAGTATTTGAATTAATAGTTGAGAGTTGAGAGTTGTTAA 2400
orf20_NK-305-1   AATGAGAGAGGTAATCTTTTAAAGTATTTGAATTAATAGTTGAGAGTTGAGAGTTGTTAA 2398
*****

orf20_NK-198      CCCTCAATCCAGGACCCAGGTACCCAAATGATCATGGCATACCATACCCAAGCAAGCAAG 2460
orf20_NK-305-1   CCCTCAATCCAGGACCCAGGTACCCAAATGATTATGGCATACCATACCCAAGCAAGCAAG 2458
**** *****

orf20_NK-198      ATTAGTATCCAAGAAGAAAGATGCATCAGTGTTAATTTTTAGGTGGTTTAGCGGTGGAGG 2520
orf20_NK-305-1   ATTAGTATCCAAGAAGAAAGATGCATCAGCGTTAATTTTTAGGTGGTTTAGCGGTGGAGG 2518
*****

orf20_NK-198      AATCCAAGCTGAGGGAACAACGGGATTGGGAGCTTTACCTACCTTAGGTTGGTTTTGGGT 2580
orf20_NK-305-1   AATCCAAGCTGAGGGAACAACGGGATTGGGAGCTTTACCTACCTTAGGTTGGTTTTGGGT 2578
*****

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf20_NK-198      AAAGAACCATTCTGTGACGGTCCAAATGGAATTTTTATAAGGACATCTGATGGTATATTT 2640
orf20_NK-305-1   AAAGAATCATTCTGTGACGGTCCAAATGGAATTTTTATAAGGACATCTGATGGTATATTT 2638
*****

orf20_NK-198      TTCTTTTTGAAAAGATGTTTTGTCCACATTTTGATCTCTTGATGGGTCTGTAACATAAT 2700
orf20_NK-305-1   TTCTTTTTGAAAAGATGTTTTGTCCACATTTTGATCTCTTGATGGGTCTGTAACATAAT 2698
*****

orf20_NK-198      AATAAACCAATCAGAAATCTGCCGTTAGAATCTTTCTTCTAAGAACAACCTTTCACGTGAT 2760
orf20_NK-305-1   AATAAGCCAAATCAGAAATATGCTGTTAGAATCTTTCTTCTAAGAACAACCTTTCACGTGAT 2758
*****

orf20_NK-198      TCAAGTTTCTATATTGATTTTAGTGTTTTAGACAAACATAACCTTGAATTTTCAAAAAGT 2820
orf20_NK-305-1   TCAAGTTTCTATATTGATTTTAGTGTTTTAGACAAACATAACCTTGAATTTTCAAAAAGT 2818
*****

orf20_NK-198      TTTT-----ATAAAAAAAAAATCACCTTATATAGACACTATTATTCTAATTGAAAAAACTA 2875
orf20_NK-305-1   TTTTATAAAAAAAAAAAAAATCACCTTATATAGACACTATTATTCTAATTGAAAAAACTA 2878
*****

orf20_NK-198      TTAGTAAATTAATAATTCAGGGCCTATTTGGTATCACTCCAATTTAACTAACATATCT 2935
orf20_NK-305-1   TTAGTAAATTAATAATCTCAGGGCCTATTTG-TACTCACTCCAATTTAACTAACATATCT 2937
*****

orf20_NK-198      AGGCGTTTGATACTTCTATCCTTCAAATAATGTTAGTAATTTAGAGTCGAAATTATACCA 2995
orf20_NK-305-1   AGGCGTTTGGTACTTCTATCCTTCAAATAATGTTAGTAATTTAGAGTCGAAATTATACCA 2997
*****

orf20_NK-198      TTTCAAAGTCAGCTTCTTCTTAATTCTATATGACATTAGACCACCATATGAAAAATTTG 3055
orf20_NK-305-1   TTTCAAAGTCAGCTTCTTCTTAAATTCTATATGACATTAGACCACCATATGATAAATTTG 3057
*****

orf20_NK-198      GCAATAATTTGGCAATATATAGCACTATGTTCTTTGAATCTTAGCTGTAGTGGTGAATA 3115
orf20_NK-305-1   GCAATAATTTGGCAATATATAGCACTATGTTCTTTGAATCTTTGCTGTAGTGGTGAATA 3117
*****

orf20_NK-198      ATAACTAATCTTGCACCTCCTTTAAGACTAAGAAGTCAAATACCTTGCTTGATAGATTTGG 3175
orf20_NK-305-1   ATAACTAATCTTGCACCTCCTTTAAGACTAAGAAGTCAAATACCTTGCTTGATAGATTTGG 3177
*****

orf20_NK-198      TAGATAACAATCGTATCATATTAGTTGGTAATACGATGATATCTCTTTATTATAAATAGC 3235
orf20_NK-305-1   GAAATAAAAATCATATCATATCAGTTAATAATACGATGATATCTCTTCATTATAAATAGC 3237
* ****

orf20_NK-198      TAGTTTTGAGGTTCAAACCTTTCATCAATTATCTCTAATAATTAATTTCCACTTATAATA 3295
orf20_NK-305-1   TAGTTTTGAGGCTCAAACCTTTCATCAATTATCTCTA---ATTAACCTCCACTTATAATA 3294
*****

orf20_NK-198      TA-TGGAGAGAGCTTCAGTTAAGTTAGCTTTTCTAGTTGTCCTCGTAGCTTCTGCATCAT 3354
orf20_NK-305-1   TAATGGAGAGAGCTTCAGTTAAGTTAGCTTTTCTAGTTGTCCTCGTAGCTTCTGCATCAT 3354
**

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf20_NK-198      GTAAGTGTCTCTGATAATCTCCAAAATTATCTTTGTATTAGCAAATTATTTTCTACTGT 3414
orf20_NK-305-1   GTAAGTGTCTCTGATAATCTCCAAAATTATCTTTGTATTGGCAAATTATATTCTACTGT 3414
*****
orf20_NK-198      TTGAATCTCTAATATAATATACAATCTTAGCCACTAACTCATGACG- 3460
orf20_NK-305-1   TTGAATCTCTAATACTCCCTCCGTCCCATATTTTTTATTAAT-ACGG 3460
*****          * * *          * * * * *

```

付図 5-8 *orf20<sub>NK-198</sub>* と *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の塩基配列のアラインメント

*orf20<sub>NK-198</sub>* と *orf20<sub>NK-305-1</sub>* 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      MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN 60
orf20_NK-305-1   MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGTIPTPRVHSNSSSLFYNQSTNKCSGLFGSAKSGYFN 60
*****

orf20_NK-198      GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFGILGYPHVHPVVVPY 120
orf20_NK-305-1   GFKHHQEISSFSGYARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLILTFGILGYPHVHPVVVPY 120
*****:*****

orf20_NK-198      TGRKHVYLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELER 180
orf20_NK-305-1   TGRKHVYLMSTTRENEIGEVEKRKIQPATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELER 180
*****

orf20_NK-198      DETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLLGGKIV 240
orf20_NK-305-1   DETFKEKTIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGMNWEIFVVDKPLVESSYLLGGKIV 240
*****

orf20_NK-198      VYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPESA 300
orf20_NK-305-1   VYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPEFA 300
***** *

orf20_NK-198      NARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPTICLSLVGLFSSVFIYYGRKEIADHIGV 360
orf20_NK-305-1   NARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPTICLSLVGLFSSVFIYYGRKEIADHIGV 360
*****

orf20_NK-198      LLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYNEVV 420
orf20_NK-305-1   LLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYNEVV 420
*****

orf20_NK-198      AGRAIQGLQ 429
orf20_NK-305-1   AGRAIQGLQ 429
*****

```

付図 5-9 *orf20<sub>NK-198</sub>* 及び *orf20<sub>NK-305-1</sub>* 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。

```

orf20_S          TGCATTTGATGATTTGAATGTGTTGGTTATTGTCTTCAAGCTTAAATGTGCCTATATTA  -4858
orf20_NK-305-1  -----

orf20_S          TACAACTTTTTTTAAGGTATATTTGTACATGATTTTCATTTCTTAAGTAGTATTTGGGTTT  -4798
orf20_NK-305-1  -----

orf20_S          GGGTGTTGTCCCGGGATAGTATTGTTTTCTGAATTTGATATGCATTTTTTTTTTTCATTT  -4738
orf20_NK-305-1  ----GTTGCCCGGGATAGTATTGATTCTGAATTTGATATGCATTTTTTTTTT-CATTT  -5403
          **** *****

orf20_S          CCATTAATACTCCCTCCGTCCTCCAAAATATAGTTTCCATTTCCATTTTGGGTGTCCC  -4678
orf20_NK-305-1  CCATTAATACTCCCTCCGTCCTCCAAAATATAGTTTCCATTTCCATTTTGGGTGTCCC  -5343
          *****

orf20_S          AAAATATAGTCCCATATCCCATTTCCATATTTAGTCCAGTTTTTTTCGTAATTTGTCT  -4618
orf20_NK-305-1  AAAATATAGTCCCATATCCCATTTCCATATTTAGTCCAGTTTTTTTCGTAATTTGTCT  -5283
          *****

orf20_S          AGAAAAACCGTGTCCCTCATTATTTGCTTCTTGAATTTGGTTTTTCTTTGTTTATT  -4558
orf20_NK-305-1  AGAAAAACCGTGTCCCTCATTATTTGCTTCTTGAATTTGGTTTTTCTTTGTTTATT  -5223
          *****

orf20_S          CAACCAAATGTTACAATTAATGCTCTTCCACCAATTATTCTCCACTCTTTCTCCTAAAA  -4498
orf20_NK-305-1  CAACCAAATGTTACAATTAATGCTCTTCCACCAATTATTCTCCACTCTTTCTCCTAAAA  -5163
          *****

orf20_S          TCATCTTTTCCCATACAACATTTATTTAAATAACAAAAATCATTACTATTGATCTTAT  -4438
orf20_NK-305-1  TTATCTTTTCCCATACAACATTTATTTAA-TAACAAAAATCATTACTATTGATCTTAT  -5104
          * *****

orf20_S          ATTCTACTTACATAAATTACCGTGAAAAAGGGAAATGGGAATATATTTGGGACGGAG  -4378
orf20_NK-305-1  ATTCTACTTACATAAATTACCGTGAAAAAGGGAAATGGGAATATATTTGGGACGGAG  -5044
          *****

orf20_S          GGAGTATTAAGTAAACTCAACATTTAAACCATACAAATATAATAATATGGAGACTTAAA  -4318
orf20_NK-305-1  GGAGTATTAAGTAAACTCAACATTTAAACCATACAAATATAATAATATGGAGACTTAAA  -4984
          *****

orf20_S          GCATGATTAAGTTGGTTGAGATGGTAATTGTGTCATGTATAATAACAAGAGACTACAA  -4258
orf20_NK-305-1  GCATGATTAAGTTGGTTGAGATGGTAATTGTGTCATGTATAATAACAAGAGACTACAA  -4924
          *****

orf20_S          GTTCAAATCTTGTGCAAGCTTATTTACTTTTGTTAATTGACATGAGATATATACACAT  -4198
orf20_NK-305-1  GTTCAAATCTTGTGCAAGCTTATTTACTTTTGTTAATTGACATGAGATATATACACAT  -4864
          *****

orf20_S          TGGACAAATCTACTGAAGTAACAGAGGTGCCACGTGGTGGGTATACATTGTCACGCACAC  -4138
orf20_NK-305-1  TGGACAAATCTACTGAAGTAACAGAGGTGCCACGTGGTGGGTATACATTGTCACGCACAC  -4804
          *****

```

付図 5-10 PI61552 *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          CTTTAAATATATTTGTATAGATGAACTAGAACTGTTTTCTTCTAATAATAAGAACGATA -4078
orf20_NK-305-1  CTTTAAATATATTTGTATAGATGAACTAGAACTGTTTTCTTCTAATAATAAGAACGATA -4744
*****

orf20_S          AGGATGAAGTTTATTAACAGATGGTCTGTAGAAAATGTGATTTGCTTCAACTTTGTAAGG -4018
orf20_NK-305-1  AGGATGAAGTTTATTAACAGATGGTCTGTAGAAAATGTGATTTGCTTCAACTTTGTAAGG -4684
*****

orf20_S          TAAATCATGGCAATTAAGCTTTTAGCGGAGGAAATTAAGATCATGAATATTATTTAATT -3958
orf20_NK-305-1  TAAATCATGGCAATTAAGCTTTTAGCGGAGGAAATTAAGATCATGAATATTATTTAATT -4624
*****

orf20_S          TGAAACTCTTTGTATATCTATCATTTTGTGCTTATAGTATGCACCATTTTCCTATGTC -3898
orf20_NK-305-1  TGAAACTCTTTGTATATCTATCATTTTGTGCTTATAGTATGCACCATTTTCCTATGTC -4564
*****

orf20_S          TTCAAAGCCTCAAAGGAATACTCCATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTCAAGT -3838
orf20_NK-305-1  TTCAAAGCCTCAAAGGAATACTCCATTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT----TTGGTCAAGT -4508
*****

orf20_S          GGTGATTGGTGAAGTCCCTAGAACCGTGCATTTTGAGTAAAAAATTAAGTGAACAGGTT -3778
orf20_NK-305-1  GGTGATTGGTGAAGTCCCTAGAACCGTGCATTTTGAGTAAAAAATTAAGTGAACAGGTT -4448
*****

orf20_S          GAAACTTTTTATTTGTAATCATATAAAATTTTTGTTGCATCAGTCAAAA-----GTA -3725
orf20_NK-305-1  GAAACTTTTTATTTGTAATCATATAAAATTTTTGTTGCATCAGTCAAAACTCAAAGTA -4388
*****

orf20_S          ACAGAGGGTGCAAATTCGGAATTACTTCCTCATATACTTTGATGTACCGTTGATATGGT -3665
orf20_NK-305-1  ACAGAGGGTGCAAATTCGGAATTACTTCCTCATATACTTTGATATACCGTTGATATGGT -4328
*****

orf20_S          ACACTCAACTAATTTATGTTTCATTTGCTTATTTGAAATTTTCTATTTTGTTCATTTT -3605
orf20_NK-305-1  ACACTCAACTAATTTATGTTTCATTTGCTTATTTGAAATTTTCTATTTTGTTCATTTT -4268
*****

orf20_S          AATGATTTCAAATAAATAATAGGCAAAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACA -3545
orf20_NK-305-1  AATGATTTCAAATAAATAATAGGCAAAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACA -4208
*****

orf20_S          TTTAGGTATATGATAAAATTTATACAAATTTTAAATGAAAAAAAATGTTGAAACAAAAAT -3485
orf20_NK-305-1  TTTAGGTATATGATAAAATTTATACAAATTTTAAATGAAAAAAAATGTTGAAACAAAAAT -4148
*****

orf20_S          TTAAGCTAAGCTAAAGTTGACTTTTAAGCTCTCTCCTTTTATGATGCAACAAAGATTTTG -3425
orf20_NK-305-1  TTAAGCTAAGCTAAAGTTGACTTTTAAGCTCTCTCCTTTTATGATGCAACAAAGATTTTG -4088
*****

orf20_S          TTTTAGCACTAGCTACTTTTTCTATCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACCTCA -3365
orf20_NK-305-1  TTTTAGCACTAGCTACTTTTTCTATCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACCTCA -4028
*****

```

付図 5-10 PI61552 *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      AATTCATCAATTTTGATTATGTTTTTCACCATGTAAGAAAATATCTTATCATGTGTTT -3305
orf20_NK-305-1 AATTCATCAATTTTGATTATGTTTTTCACCATGTAAGAAAATATCTTATCATGTGTTT -3968
*****

orf20_S      TTCGTAATCGAGGAAACCCATATAGGAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATA -3245
orf20_NK-305-1 TTCGTAATCGAGGAAACCCATATAGGAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATA -3908
*****

orf20_S      TCAACAGGAAAATCACATTGTTTCATAGGAAACTCCTATAACATTTGCATACATTGTAGG -3185
orf20_NK-305-1 TCAACAGGAAAATCACATTGTTTCATAGGAAACTCCTATAACATTTGCATACATTGTAGG -3848
*****

orf20_S      TCATTGTTGCACTTTATTCCCTCGGCCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTAATCTA -3125
orf20_NK-305-1 TCATTGTTGCACTTTATTCCCTCGGCCCTCGTATATTGATATTAAGTGTATTTAATCTA -3788
*****

orf20_S      CGTTTTTTTCTATTGCAACAATTACTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTC -3065
orf20_NK-305-1 CGTTTTTTTCTATTGCAACAATTACTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTC -3728
*****

orf20_S      CATTTTTGGTATAAAAAGCAACATTTCAGAACAAGCATGGATTATGCACTAGGGTACCA -3005
orf20_NK-305-1 CATTTTTGGTATAAAAAGCAACATTTCAGAACAAGCATGGATTATGCACTAGGGTACCA -3668
*****

orf20_S      TTCATATAGAAGAATATGATTTTTTCAACAACTTTTCAAGATAAAAAAAGCACACAAT -2945
orf20_NK-305-1 TTCATATAGAAGAATATGATTTTTTCAACAACTTTTCAAGATAAAAAAAGCACACAAT -3608
*****

orf20_S      ATAAAATTAAGAACATGTAAGAGTGCCTTTTATTCAACTTATTGGCCCTGAACTTATTG -2885
orf20_NK-305-1 ATAAAATTAAGAACATGTAAGAGTGCCTTTTATTCAACTTATTGGCCCTGAACTTATTG -3548
*****

orf20_S      GACCTTATCTGAACTGAATTTATTGAACCTGAACTGAACTTATTGGAACCTATTAACCT -2825
orf20_NK-305-1 GACCTTATCTGAACTGAATTTATTGAACCTGAACTGAACTTATTGGAACCTATTAACCT -3488
*****

orf20_S      GATTGGACCTGATTCAACTTATTGGACCTGATTAACCTGATT----- -2782
orf20_NK-305-1 GATTGGACCTGATTCAACTTATTGGACCTGATTAACCTGATTATTGAAACCTATTAGAC -3428
*****

orf20_S      -----GGAACTTATTGGAACCTATTG-ACCTTATTGAAACCTATTAGAC -2739
orf20_NK-305-1 CTTATTGGCCCTGATTGAAACTTATTAGACCTTATTGGACCTGATTGAAACTTATTAGAC -3368
* ***** * ***** * ***** * ***** * *****

orf20_S      CTTATTGG----- -2731
orf20_NK-305-1 CTTATTGGACCTTATTGACAAAAACATTGACCATGAATAACATAAATATTACCACTAAC -3308
*****

orf20_S      ----- -2731
orf20_NK-305-1 GTAAATACTACCCCTCAAATTTTTTATGGAGTAATAATTATTATAATTCGTCCTTTAAA -3248

```

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 ----- -2731
orf20_NK-305-1 AATAATGATTATTAATTATCTTATGATACTCCCTCCGTCCATAATATAGTGCTCACT -3188

orf20_S ----- -2731
orf20_NK-305-1 TTCATTTTTCACAGAATTAAGGAAAATGAAAGAGTTTTAGGATTTACAAATTAGAC -3128

orf20_S -----CCCTGATTGAACTTATTAGACCTTATTGGACCTGATTGAACTTATTAGAC -2679
orf20_NK-305-1 CTTATTGGCCCTGATTGAACTTATTAGACCTTATTGGACCTGATTGAACTTATTAGAC -3068
*****

orf20_S CTTATTGGACCTTATTGACAAAAACATTGACCATGAATAACATAAATATTACCACTAA- -2620
orf20_NK-305-1 CTTATTGGACCTTATTGACAAAAACATTGACCATGAATAACATAAATATTACCACTAAG -3008
*****

orf20_S -----CGTAAATACTACCCCTCAAATTTTTTATGGAGTAATAATTATTATAAATTCGT -2567
orf20_NK-305-1 GCCTAACGTAAATACTACCCCTCAAATTTTTTATGGAGTAATAATTATTATAAATTCGT -2948
*****

orf20_S CCTTTAAAATAATGATTATTAATTATCTTATGATA----- -2529
orf20_NK-305-1 CCTTTAAAATAATGATTATTAATTATCTTATGATACTCCCTCCGTCCATAATATAG -2888
*****

orf20_S ----- -2529
orf20_NK-305-1 TGCTCACTTCTCATTTTTTACAGAATTAAGGAAAATGAAAGAGTTTTAGGATTTACACA -2828

orf20_S ----- -2529
orf20_NK-305-1 AAAATATATATTTAAGTAAATGTTTATTGGGTGTTTTGGTCTTGGAAGTAGTTTTTTTCT -2768

orf20_S ----- -2529
orf20_NK-305-1 TCTTTTCTTTAAAATAAAATGAAAGAGCAATAAATATACCTTGAATGGTGTAAAACA -2708

orf20_S ----- -2529
orf20_NK-305-1 ATAAATAGGGGCACACATTTTACAAGAAAGTAGGGGTATTTTTGAAAGTTTTATGTAGAA -2648

orf20_S ----- -2529
orf20_NK-305-1 ATGAAGGATAATTTAGTCCAAATAAATTGAAAAAAAAGAAATAGGCATAACATTTTGGG -2588

orf20_S -----ATTAATTTAATAA -2516
orf20_NK-305-1 ACACCCAAAGAGGAATGCAAGCACTATATTATGGGACGGAGGGAGTAATTAATTTAATAA -2528
*****

orf20_S AAAAATTTACTATTTATATATTTGCCTATACATAACTTTACCCTAATATGTTTTGATT -2456
orf20_NK-305-1 AAAAATTTACTATTTATATATTTGCCTATACATAACTTTACCCTAATATGTTTTGATT -2468
*****

orf20_S TTATAAAACACTAGTAGAAAATCAAAGTTAATTAACATTTATTGCTAACAAGTTAAAAT -2396
orf20_NK-305-1 TTATAAAACACTAGTAGAAAATCAAAGTTAATTAACATTTATTGCTAACAAGTTAAAAT -2408
*****

```

付図 5-10 PI61522 *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      TGACACATATAAAAAATTAACATTTATTGAAGAGGGTGATGTAGAAGATGAAGAAAGATA -2336
orf20_NK-305-1 TGACACATATAAAAAATTAACATTTATTGAAGAGGGTGATGTAGAAGATGAAGAAAGATA -2348
*****

orf20_S      CCCCGATGAAGAAAGATACTCTAGTGATGATAATGAAGCAATCAATTGACAACAATTATG -2276
orf20_NK-305-1 CCCCGATGAAGAAAGATACTCTAGTGATGATAATGAAGCAATCAATTGACAACAATTATG -2288
*****

orf20_S      TCTTTCATTGTTATTAGTAACGAAAACATGTTATCTCTAGTTATTTAAAGACGAATTGCA -2216
orf20_NK-305-1 TCTTTCATTGTTATTAGTAACGAAAACATGTTATCTCTAGTTATTTAAAGACGAATTGCA -2228
*****

orf20_S      AATTATTGTAATTATAATTATTATTATTATTGTTAACCTTAATTATTTGACCATGATTAT -2156
orf20_NK-305-1 AATTATTGTAATTATAATTATTATTATTATTGTTAACCTTAATTATTTGACCATGATTAT -2168
*****

orf20_S      AATATTATTTAATAGCAATATGAATAATCAAATAATAGACAATAATACAAGTATAATACT -2096
orf20_NK-305-1 AATATTATTTAATAGCAATATGAATAATCAAATAATAGACAATAATACAAGTATAATACT -2108
*****

orf20_S      ACACATTGTGGTACTTTAATAAAAAATTCTAATAATAACATAATCAGCTAATAGTAATAT -2036
orf20_NK-305-1 ACACATTGTGGTACTTTAATAAAAAATTCTAATAATAACATAATCAGCTAATAGTAATAT -2048
*****

orf20_S      GAATAATAAAATAATAGACATAATACAGATAAATAACAAAATAATAGACATAATACAAAT -1976
orf20_NK-305-1 GAATAATAAAATAATAGACATAATACAGATAAATAACAAAATAATAGACATAATACAAAT -1988
*****

orf20_S      AAACAATAAAGTAATAGACATTAATACAAGTATAATATTATATAATCATTGTGGTACTTT -1916
orf20_NK-305-1 AAACAATAAAGTAATAGACATTAATACAAGTATAATATTATATAATCATTGTGGTACTTT -1928
*****

orf20_S      AATTAAAATTCTAATAATAACATAATCAACTAATAGTGATATGAAATTATGAATAACAAA -1856
orf20_NK-305-1 AATTAAAATTCTAATAATAACATAATCAACTAATAGTGATATGAAATTATGAATAACAAA -1868
*****

orf20_S      ATAATGGACAATAATACAAATGTATATTAACATTGACTATTTGGACCTTATTGGACCT -1796
orf20_NK-305-1 ATAATGGACAATAATACAAATGTATATTAACATTGACTATTTGGACCTTATTGG-ACCT -1809
*****

orf20_S      TTATTTAGACCTGATTCAA-CTTATTGGACCTTATTAGACCTGATTGGAACCTTATTGCAC -1737
orf20_NK-305-1 TA--TTAGACCTGATTGAACTTATTGGACCTTATTAGACCTGATTGGAACCTTATTGCAC -1751
* ***** ** *****

orf20_S      CTGATTGAACTTATTGCACCTGGAACCTTATTGGACCTTATTAGACCTTATTGGAAGTTA -1677
orf20_NK-305-1 CTGATTGAACTTATTGCACCTGGAACCTTATTGGACCTTATTAGACCTTATTGGAAGTTA -1691
*****

orf20_S      TTGCCCTTATTAGACCTTATTACAACCTATCTGAACTTATTGGACCTGAACTTAATTTT -1617
orf20_NK-305-1 TTGCCCTTATTAGACCTTATTACAACCTATCTGAACTTATTGGACCTGAACTTAATTTT -1631
*****

```

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      TTTAAGTTGAGCAGAACGCACCCTAAATCTCCAATTATAAAATAACATAGGTCGGAATAA -1557
orf20_NK-305-1 TTTAAGTTGAGCAGAACGCACCCTAAATCTCCAATTATAAAATAACATAGGTCGGAATAA -1571
*****

orf20_S      AAAGAAAGTATTGTAATGAACATTTAGTCTAAATTTAAGAACCTAACTTTTAAATGTA -1497
orf20_NK-305-1 AAAGAAAGTATTGTAATGAACATTTAGTCTAAATTTAAGAACCTAACTTTTAAATGTA -1511
*****

orf20_S      AATTTAAAAAAGGAATCTCGCCAACAACCATTTTCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAG -1437
orf20_NK-305-1 AATTTAAAAAAGGAATCTCGCCAACAACCATTTTCTAAAAGGTAAAACAAGTTGCAAG -1451
*****

orf20_S      ATTTAATGAAACAGATAACAACATTTTCTTAAATCATAAATTCTTAAATATTTAAACCT -1377
orf20_NK-305-1 ATTTAATGAAACAGATAACAACATTTTCTTAAATCATAAATTCTTAAATATTTAAACCT -1391
*****

orf20_S      ACATCGTTTAAACAGAGGGTGCACCATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCTATTG -1317
orf20_NK-305-1 ACATCGTTTAAACAGAGGGTGCACCATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCTATTG -1331
*****

orf20_S      CGCTTTTCCATTCCCTAAAAAACCAGTCTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGTAGT -1257
orf20_NK-305-1 CGCTTTTCCATTCCCTAAAAAACCAGTCTAAAGCTATTGTTATAATACACTCTAGTAGT -1271
*****

orf20_S      CGTCTCAAAAAAATAAGGCTTTGCTAAATTACGCCCTAAATTTTCTGGTAACGCCCT -1197
orf20_NK-305-1 CGTCTCAAAAAAATAAGGCTTTGCTAAATTACGCCCTAAATTTTCTGGTAACGCCCT -1211
*****

orf20_S      AAATACGGTATTTTCATACCGTATTTATATACCTGCATTCTTTCTCTCTTTCCCTTC -1137
orf20_NK-305-1 AAATACGGTATTTTCATACCGTATTTATATACCTGCATTCTTTCTCTCTTTCCCTTC -1151
*****

orf20_S      ACTCACTCACTTTCTCTCTCTCTCCACCACAACCTGCCACCACACCACCACTACCATATT -1077
orf20_NK-305-1 ACTCACTCACTTTCTCTCTCTCTCCACCACAACCTGCCACCACACCACCACTACCATATT -1091
*****

orf20_S      CTTCTCCAATTTACACTTTTGACTCCTATGTCTTCTAACAACATTGTGTCGGCACCACC -1017
orf20_NK-305-1 CTTCTCCAATTTACACTTTTGACTCCTATGTCTTCTAACAACATTGTGTCGGCACCACC -1031
*****

orf20_S      ACCACCGACGTACCCCGACACCCACCATCGTCGTATCCGGGCCACCACCGCGTACCC -957
orf20_NK-305-1 ACCACCGACGTACCCCGACACCCACCATCGTCGTATCCGGGCCACCACCGCGTACCC -971
*****

orf20_S      CCGACACACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCGGTTTTCTTTATTTTCTGATTTTTT -897
orf20_NK-305-1 CCGACACACCACCACCATCCCCTTTTTCTCTACTCGGTTTTCTTTATTTTCTGATTTTTT -911
*****

orf20_S      TTTAAAAAAAAGGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCACCCTGGTGGAGGCGTCCATG -837
orf20_NK-305-1 TTTAAAAAAAAGGGGAGGCGTCCACCATGGACGCCCCACCCTGGTGGAGGCGTCCATG -852
*** ***** *****

```

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      GCCGGCGCCTCACCATGTGGTGAAGCGCCTGCCATAGACGCCTCCCCTTTTTTTTTAAAA -777
orf20_NK-305-1 GCAGGCGCCTCACCATGTGGTGAAGCGCCTGCCATAGACGCCTCCCCTTTTTTTTTAAAA -792
** *****

orf20_S      AAATTTCAAATTACTATTAATGAAGAAACATAGAAGAGGAGGGTGGGTTACGACGGTTGT -717
orf20_NK-305-1 AAATTTCAAATTACTGTTAATGAAGAAACATAGAAGAGGAGGGTGGGTTACGACGGTTGT -732
*****

orf20_S      GGTGCGGTGGCAGTGTGTCGGTGGTGC GGCGCAGTA-----CTGGTGC GG -672
orf20_NK-305-1 GGTGCGGTGGCAGTGTGTCGGTGGTGC GGCGCAGTATTGGTGC GACGGCGACTGGTGC GG -672
*****

orf20_S      CGGTGGTGGTGCAACGGTCCCCAATGGTAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGTGAATGT -612
orf20_NK-305-1 CGGTGGTGGTGCAACGGTCCCCAATGGTAATGTGGGAGAAGAGGGGAGAGAAGTGAATGT -612
*****

orf20_S      AGAAGGTGAAAATATGAAAATGAAAATACGTATATTATACGTATTTAGGGCGTTAGT -552
orf20_NK-305-1 AGAAGGTGAAAATATGAAAATGAAAATACGTATATTATACGTATTTAGGGCGTTAGT -552
*****

orf20_S      AAGATATTCTAGGGCGTCGTTAGCAAATGAGAAAAATAATACACTCTAGTTGTCGTAG -492
orf20_NK-305-1 AAGATATTCTAGGGCGTCGTTAGCAAATGAGAAAAATAATACACTCTAGCTGTCGTAG -492
*****

orf20_S      ACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGGTAGAA -432
orf20_NK-305-1 ACTCTCAATATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCACTTACTCGGGTAGAA -432
*****

orf20_S      ATATTTTGTTCATTTATTAATGAGAAAATTTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAAATCA -372
orf20_NK-305-1 ATATTTTGTTCATTTATTAATGAGAAAATTTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAAATCA -372
*****

orf20_S      ACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAACGAATGACTCTCGATAATAG -312
orf20_NK-305-1 ACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAACGAATGACTCTCGATAATAG -312
*****

orf20_S      TACACCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTCATAGTTTGTTCGTAAGTGCATAGCTGGC -252
orf20_NK-305-1 TACACCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTCATAGTTTGTTCGTAAGTGCATAGCTGGC -252
*****

orf20_S      TGCAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACCTTTTGCACCTTCGGAATTCAGCAGGAATAT -192
orf20_NK-305-1 TGCAAAGAAATCTTTTGCACAGAGAAAACCTTTTGCACCTTCGGAATTCAGCAGGAATAT -192
*****

orf20_S      CATAGCCATTTATGGAAGCAACAACCTCTTGTGACCCATTTTCATCTAAAACCCCTTAATCTC -132
orf20_NK-305-1 CATAGCCATTTATGGAAGCAACAACCTCTTGTGACCCATTTTCATCTAAAACCCCTTAATCTC -132
*****

orf20_S      ATAAATTTTACATTTTACAATTCAAAAATCACGTAATTTTTTTTTTGGTATGTACTTGA -72
orf20_NK-305-1 ATAAATTTTACATTTTACAATTCAAAAATCACGTAATTTTTTTTTTGGTATGTACTTGA -72
*****

```

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          ACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTC AAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCACCTTTTGT -12
orf20_NK-305-1  ACCCAGTTCATAACTGACCCTGAAATTC AAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCACCTTTTGT -12
*****

orf20_S          GTTCAAAAATC -1
orf20_NK-305-1  GTTCAAAAATC -1
*****

/ Exon 1
orf20_S          ATGGCGTGGTACAGAAATTC AAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTTGC GTTCC 60
orf20_NK-305-2  ATGGCGTGGTACAGAAATTC AAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTTGC GTTCC 60
*****

orf20_S          AAAACATTTGGTACTATTCCA ACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTG TTTTAC 120
orf20_NK-305-2  AAAACATTTGGTACTATTCCA ACTCCAAGAGTTCATTCGAATTCCTCATCTTTG TTTTAC 120
*****

orf20_S          AATCAATCTACTAAGTGTAG TGGGTTATTTGGGCTGCAAAATCTGGGTATTTTAATGGG 180
orf20_NK-305-2  AATCAATCTACTAAGTGTAG TGGGTTATTTGGGCTGCAAAATCTGGGTATTTTAATGGG 180
*****

orf20_S          TTTAAACATCATCAAGAGAT TAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCATGGT 240
orf20_NK-305-2  TTTAAACATCATCAAGAGAT TAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCATGGT 240
*****

orf20_S          GATAAAACCGAAGTAAGTGT TGAATCATGGCTGAAAAATTA CTCTTGAATTGCACTA 300
orf20_NK-305-2  GATAAAACCGAAGTAAGTGT TGAATCATGGCTGAAAAATTA CTCTTGAATTGCACTA 300
*****

orf20_S          ATGTTGAGTACTGGTATATT TGGCTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATATACA 360
orf20_NK-305-2  ATGTTGAGTACTGGTATATT TGGCTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATATACA 360
*****

orf20_S          GGAAGGAAGCATTATGTGCT TATATCAACAACCTGATGAGAATGAAAAGGGAGAAGTTGAG 420
orf20_NK-305-2  GGAAGGAAGCATTATGTGCT TATATCAACAACCTGATGAGAATGAAAAGGGAGAAGTTGAG 420
*****

orf20_S          AAGCGGAAAATACAACCTG CTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTCCAA 480
orf20_NK-305-2  AAGCGGAAAATACAACCTG CTACACACCCTGATACTGATAGGGTTAGGTCAATATTCCAA 480
*****

orf20_S          CACATTCTTGAATCACTGG AAAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAAAGAGAT 540
orf20_NK-305-2  CACATTCTTGAATCACTGG AAAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAAAGAGAT 540
*****

orf20_S          GAAACTTTCAAGGAGATAAC CATTGGAAAGGAGAGACAGTTGATGATAAAGATAGTAGG 600
orf20_NK-305-2  GAAACTTTCAAGGAGATAAC CATTGGAAAGGAGAGACAGTTGATGATAAAGATAGTAGG 600
*****

orf20_S          AAGAAGCATAGTGGGGCTA AGATAACTACTAACCATTGGAAAGGGTTGAATTGGGAAATT 660
orf20_NK-305-2  AAGAAGCATAGTGGGGCTA AGATAACTACTAACCATTGGAAAGGGTTGAATTGGGAAATT 660
*****

```

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      TTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTGTTTATTTGGTGGGAAGATTGTTGTT 720
orf20_NK-305-2 TTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTGTTTATTTGGTGGGAAGATTGTTGTT 720
*****

orf20_S      TACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCGCAT 780
orf20_NK-305-2 TACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATTATCGCGCAT 780
*****
/ Intron 1
orf20_S      CAGGTATATAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTAAATAGAA 840
orf20_NK-305-2 CAGGTATATAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGGTAAATAGAA 840
*****

orf20_S      CTATACAAAAACATGAAAGGAATTATATGAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAG 900
orf20_NK-305-2 CTATACAAAAACATGAAAGGAATTATATGAAAAAACTGATGAATTTTAGGTTATCAG 900
*****
/exon2
orf20_S      ATTACATTATGAATGTCATATGTCAATGTGGTGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCT 960
orf20_NK-305-2 ATTACATTATGAATGTCATATGTCAATGTGGTGTATGATTTGTTAGGTTGGGCATGCT 960
*****

orf20_S      GTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATGTCCTCTAC 1020
orf20_NK-305-2 GTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATGTCCTCTAC 1020
*****

orf20_S      GTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTA 1080
orf20_NK-305-2 GTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCGTAAATTTGCCAATGCAAGATCAAAACTA 1080
*****
/ Intron 2
orf20_S      CTCTTAAGGCATCCTCTCTTGCAAAGTAAGTCTTACTCTTAAATGTTTTCTTGATG 1140
orf20_NK-305-2 CTCTTAAGGCATCCTCTCTTGCAAAGTAAGTCTTACTCTTAAATGTTTTCTTGATG 1140
*****

orf20_S      ATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTG 1200
orf20_NK-305-2 ATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACATATGTTACTG 1200
*****

orf20_S      CATAATTGCAAACATATCACATTGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGAT 1260
orf20_NK-305-2 CATAATTGCAAACATATCACATTGCCCGGACCTAGTAACTTGTTTCATTTGTCAGCGAT 1260
*****

orf20_S      TTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAG 1320
orf20_NK-305-2 TTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGAATGGAAAAG 1320
*****

orf20_S      TAATAGAACTAAATAGAGAGGTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGG 1380
orf20_NK-305-2 TAATAGAACTAAATAGAGAGGTGTGATGCTAACAAAATCTAATCCATTACTGAGTAATGG 1380
*****

orf20_S      TTTTGATCAATATATGGATTGCTATATTCCACATATTCTATACTTTGCCGAGATAACA 1440
orf20_NK-305-2 TTTTGATCGATATATGGATTGCTATATTCCACAGATTCTATCCTTTGTCGAGATAACA 1440
*****
***** *****

```

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      TTAAATTGATGTTGTTTATTTACATTTGACACATTAATAATTGAGTTGTGGACTATAATAT 1500
orf20_NK-305-2 TTAAATTTATGTTGTTTATGCACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGACTATAATAT 1500
*****
                                  /Exon 3
orf20_S      ATATGCGAGTTAGGTAACATAGAGTGTCAATTTACAGGTTTGAAGATTATTCAGGCTA 1560
orf20_NK-305-2 ATATGTGAGTTAGGTAACATATGGTGTCAATTTACAGAGTTTGAAGATTATTCAGGCTA 1560
*****

orf20_S      GATTTTCATCAATTAAGTCCACGAAGTACCTTGCACCTTGGGCTTTCTTGGATTGTCTTCT 1620
orf20_NK-305-2 GAGCTCCACAATTAAGTCCACGAAGTATCT---GCTTGTCCCTTGTGGATTGTTTCT 1617
** ** ***** ** **** * ** *****

orf20_S      TGGTGTATTCTTTATTTTGGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGTCTC 1680
orf20_NK-305-2 CGGTGTATTCTTTATTTTGGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTGGAGTGTCTC 1677
*****

orf20_S      TGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAA 1740
orf20_NK-305-2 TGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGGAGTTGCACCTCAAGTATATGACAAGCTTGCAA 1737
*****

orf20_S      AGCCACTGGGCGACTGGAAGTGTGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGT 1800
orf20_NK-305-2 AGCCACTGGGCGACTGGAAGTGTGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGAGAGCAAAGT 1797
*****

orf20_S      TGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAG 1860
orf20_NK-305-2 TGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAGTTGTAGCAG 1857
*****

orf20_S      GACGTGCAATTCAAGGTCTTCAGTAA 1886
orf20_NK-305-2 GACGTGCAATTCAAGGTCTTCAGTAA 1883
*****

orf20_S      CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTATGGAATCA 1946
orf20_NK-305-2 CCATTTACCAACCAGCATCTTCTTTTAGCAGCTTCGCCTGTTTATGAATTATGGAATCA 1943
*****

orf20_S      AAATTAACAGCTCATGGATCATTATTTGTCGTTATATTTGCTCTGTTTGACAAAGTTT 2006
orf20_NK-305-2 AAATTAACAGCTCATGGATCATTATTTGTCGTTATATTTGCTCTGTTTGACAAAGTTT 2003
*****

orf20_S      AGAGGTTAATTTGAGTTGAAAAGTCTGCTATTAGTATGTTATCCTATCCCAGTACCTTGT 2066
orf20_NK-305-2 AGAGGTTAATTTGAGTTGAAAAGTCTGCTATTAGTATGTTATCCTATCCCAGTACCTTGT 2063
*****

orf20_S      TAATTCATCTAATTTAGTTCCTATGTTAATTCAGTCTCTTTTCTCCTTAATAGATC 2126
orf20_NK-305-2 TAATTCATCTAATTTAGTTCCTATGTTAATTCAGTCTCTTTTCTCCTTAATAGATC 2123
*****

orf20_S      CTCTCTATCCGTTTTTCTTTTTCTTTTTGAGAAAAGGAGCATCATAGATAAATATAAAT 2186
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          CGAAGTCATTACAACTAACTAGAGCTTCCAATATAAGTCCCTGGAAGTCCGAAAGCAA 2246
orf20_NK-305-2  CGAAGTCATTACAACTAACTAGAGCTTCCAATATAAGTCCCTGGAAGTCCGAAAGCAA 2243
*****

orf20_S          TAGTAGTAGATAGCATAGTAGAGATGAGTTTCTCTTTTAGGTAGATAGTAGATAGGAGGA 2306
orf20_NK-305-2  TAGTAGTAGATAGCATAGTAGAGATGAGTTTCTCTTTTAGGTAGATAGTAGATAGGAGGA 2303
*****

orf20_S          TCGATAGATGACCCACCATTGTCGCCGCTTCGGCGCCACCAACACCAGGGGAAGAAGAG 2366
orf20_NK-305-2  TCGATAGATGACCCACCATTGTCGCCGCTTCGGCGCCACCAACACCAGGGGAAGAAGAG 2363
*****

orf20_S          CCTCCAATCTGGCCACCACCGGATATAGGAATACCAAGCATAGGTTTGCCACCTGGATAT 2426
orf20_NK-305-2  CCTCCAATCTGGCCACCACCGGATATAGGAATACCAAGCATAGATTGCCACCTGGATAT 2423
*****

orf20_S          CAATTCACCTCTTAACGTCCATGGATGTGATTACCCATGCATGGATAAACGAGACTGTG 2486
orf20_NK-305-2  CAATTCACCTCTTAACGTCCATGGATGTGATTACCCATGCATGGATAAACGAGACTGTG 2483
*****

orf20_S          ATTGGCCCTGCATGTTTCGTTGTGGCAAATGCAATGGCACTTGTTGCCTCAGTAAATGA 2546
orf20_NK-305-2  ATTGGCCCTGCATGTTTCGTTGTGGCAAATGCAATGGCACTTGTTGCCTCAGTAAATGA 2543
*****

orf20_S          TTTATGAGTAGACACATGACATATCTCCCTTATATTATTGTTTCATTTTGAGTTAGTTAT 2606
orf20_NK-305-2  TTTATGAGTAGACACATGAGATATCTCCCTTATATTATTGTTTCATTTTGAGTTAGTTAT 2603
*****

orf20_S          ACTCCCTCCTCTTTTTCTTAGTTGCTATATTCCATTTTGGATACAAAATCACATGAGA 2666
orf20_NK-305-2  ACTCCCTCCTCTTTTTCTTAGTTGCTATATTCCATTTTGGATACAAAATCACATGAGA 2663
*****

orf20_S          ATTTTGACTTTCTTAATTTTATATATGTAAGAAAAAACAATAGTATTTTATTAGATTT 2726
orf20_NK-305-2  ATTTTGACTTTCTTAATTTTATATATGTAAGAAAAAACAATAGTATTTTATTAGATTT 2723
*****

orf20_S          CTCTCAAATGTGTAATTTTCATATATAGTTTTTTT-ATAATTTTCTCGTATACATAACTC 2785
orf20_NK-305-2  CTCTCAAATGTGTAATTTTCATATATAGTTTTTTTATAATTTTCTCGTATACATAACTC 2783
*****

orf20_S          AACATATTAAGGTTTGAAGTCATGACTGGGAGCAAGAAACCACGCGGTGGGGCTCACAG 2845
orf20_NK-305-2  AACATATTAAGGTTTGAAGTCATGACTGCGAGCAAGAAACCACGCGGTGGGGCTCACAG 2843
*****

orf20_S          CAGCGCCAGCAGGAAGGACGAGTGAAAAAATTAGGGTGAATTAGTGTGGCTCTGATACC 2905
orf20_NK-305-2  CAGCGCCAGCAGGAAGGACGAGTGAAAAAATTAGGGTGAATTAGTGTGGCTCTGATACC 2903
*****

orf20_S          ATGACAAATTGATTAGAGTTTAATGATTTGTGTTACTACTGTAAACTTAGAGTTTACAT 2965
orf20_NK-305-2  ATGACAAATTGATTAGAGTTTAATGATTTGTGTTACTATTGTAAACTTAGAGTTTATAT 2963
*****

```

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      ATATCCTAAGTTTACATCCAAGGCCTTAGGCCAATATATACAACCTCAACATATATACAA 3025
orf20_NK-305-2 ATATCCTAAGTTTACATCCAAGGCCTTAGGCCAATATATACAACCTCAACATATATACAA 3023
*****

orf20_S      GGTCCAATATGTATCAACAAAATGAAAAATAAAAACATAATGTAGCAACTAGCAACTAAA 3085
orf20_NK-305-2 GGTCCAATATGTATCAACAAAATGAAAAATAAAAACATAATGTAGCAACTAGCAACTAAA 3083
*****

orf20_S      AAAAGACGGAGAGAGTATTTAAGTTAACAATATAATGATAATTAATCAGTGTAAGTATT 3145
orf20_NK-305-2 AAAAGACGGAGAGAGTATTTAATTTAACAATATAATGATAATTAATCAGTGTAAGTATT 3143
*****

orf20_S      AGTCAAGATCTAGATTGAAATTACTCTCGACGACCTCCCGACCCATTTGCCTTTATGT 3205
orf20_NK-305-2 AGTCAAGATCTAGATTGAAATTACTCTCGACGACCTCCCGACCCATTTGCCTTTATGT 3203
*****

orf20_S      AATCAATCATTATATACAACCTCCGATTCTTTTGATGGCAACTATTTGAATGTTACCTTT 3265
orf20_NK-305-2 AATCAATCATTATATACAACCTCCGATTCTTTTGATGGCAACTATTTGAATGTTACCTTT 3263
*****

orf20_S      ATCAACATGAAACTTTAACTATTAATATCTTTATTAATTATTAACATAATTTACTACTAA 3325
orf20_NK-305-2 ATCAACATGAAACTTTAACTATTAATATCTTTATTAATTATTAACATAATTTACTACTAA 3323
*****

orf20_S      TTATAAATTATTTAAATATATACCTTGAGATTAATTTTCCTAACATTTATTTACTACTA 3385
orf20_NK-305-2 TTATAAATTATTTAAATATATACCTTGAGATTAATTTTCCTAACATTTATTTACTACTA 3383
*****

orf20_S      ACATTTGCTTTTATATTTTATAAAGAAAATGGTGATGGTTAGAAGTATATATATATGAGT 3445
orf20_NK-305-2 ACATTTGCTTTTATATTTTATAAAGAAAATGGTGATGGTTAGAAGTATATATATATGAGT 3443
*****

orf20_S      AGTTCAATAGTCAAAGCCTTGCAAATTAAGAAACGGCGGAAGAGTATATTGAAAATTTA 3505
orf20_NK-305-2 AGTTCAATAGTCAAAGCCTTGCAAATTAAGAAACGGCGGAAGAGTATATTGAAAATTTA 3503
*****

orf20_S      TATTGTCACCTTTTTAATAGATGAGTCGATGATGGTCTAAAATTGAGGCTTCTAATATG 3565
orf20_NK-305-2 TATTGTCACCTTTTTAATAGATGAGTCGATGATGGTCTAAAATTGAGGCTTCTAATATG 3563
*****

orf20_S      CGCTAGCTTAGATTAAGAGAACAGGAAATTGTTATGACAATTTGCGTAAGTTGACTGAG 3625
orf20_NK-305-2 CGCTAGCTTAGATTAAGAGAACAGGAAATTGTTATGACAATTTGCGTAAGTTGACTGAG 3623
*****

orf20_S      ATCATCATGAAGTCGAGTATTAGCAACCTTAGTAATTTATAATTCCTCCGTTTCTTTTAA 3685
orf20_NK-305-2 ATCATCATGAAGTCGAGTATTAGCAACCTTAGTAATTTATAATTCCTCCGTTTCTTTTAA 3683
*****

orf20_S      ATTTACTCATTTTATTTTGGGCGAGAATCAAGGAAGAAGTACAAAAGTATGAGACAAAAA 3745
orf20_NK-305-2 ATTTACTCATTTTATTTTGGGCGAGAATCAAGGAAGAAGTACAAAAGTATGAGACAAAAA 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          CTGAAAAGATAAAGAGAAAACTGAAAAGTGCAGAAAATAAGTAAAAAGTGGGTAAA 3805
orf20_NK-305-2  CTGAAAAGATAAAGAGAAAACTGAAAAGTGCAGAAAATAAGTAAAAAGTGGGTAAA 3803
*****

orf20_S          AATATTAAGTGGATCACATGGGTAGAAAAGGAGGAGAAAATAATGTGACATGTTAC 3865
orf20_NK-305-2  AATATTAAGTGGATCACATGGGTAGAAAAGGAGGAGAAAATAGATGTGACATGTTAC 3863
*****

orf20_S          CAAAAATAGAAAAGCAGCAGTGTGCAGTGTGCAGATTAAGAAAAGAAACCAAAAAA 3925
orf20_NK-305-2  CAAAAATAGAAAAGCAGCAGTGTGCAGTGTGCAGATTAAGAAAAGAAACCAAAAAA 3923
*****

orf20_S          AAAATGTATAAATTAAGAAAATGGAGGGAGTAATACTTAACACATAAATATTGTTTAT 3985
orf20_NK-305-2  AAAATGTATAAATTAAGAAAATGGAGGGAGTAATACTTAACACATAAATATTGTTTAC 3983
*****

orf20_S          TAATTGAAGCTCGAGCTTCACTCAGATACATGATTTTTAATTTTTTATGACCTATCATAG 4045
orf20_NK-305-2  TAATTGAAGCTCGAGCTTCACTCAGATACATGATTTTTAATTTTTTATGACCTATCATAG 4043
*****

orf20_S          TAAGTTTGGGGTGTACTTTGATCCTTCCTTTATGATAAGACACATCCCTTTATTCTCTA 4105
orf20_NK-305-2  TAAGTTTGGGGTGTACTTTGATCCTTCCTTTATGATAAGACACATCCCTTTATTCTCTA 4103
*****

orf20_S          AGAGAATCACTTAAATTTATAAGGTATAAAGTTAACGCTATAAGTTAAAGAGGTCATTTT 4165
orf20_NK-305-2  AGAGAATCACTTAAATTTATAAGGTATAAAGTTAACGCTATAAGTTAAAGAGGTCATTTT 4163
*****

orf20_S          TAGATAATAGGTCACCTTGTATGTAATAGGTCACTTCTACTAAAATTTCCCGTATAG 4225
orf20_NK-305-2  TAGATAATAGGTCACCTTGTATGTAATAGGTCACTTCTACTAAAATTTCCCGTATAG 4223
*****

orf20_S          CAAGTTACAATTGTGTTAACCCAAATTATGGTAACATTTTGTACTTTTATCAACTCCGAC 4285
orf20_NK-305-2  CAAGTTACAATTGTGTTAACCCAAATTATGGTAACATTTTGTACTTTTATCAACTCCGAC 4283
*****

orf20_S          TCATACTTGATATTGAATAACCTCACTTATCAAGTCAATGCAAGCAAATCATGTTAAAC 4345
orf20_NK-305-2  TCATACTTGATATTGAATAACCTCACTTATCAAGTCAATGCAAGCAAATCATGTTAAAC 4343
*****

orf20_S          TTTTGTTCGCCTTAATGTCGAGACCAGTCTATCTAAAAGAACTTTTTTTTTTTTACAAT 4405
orf20_NK-305-2  TTTTGTTCGCCTTAATGTCGAGACCAGTCTATCTAAAAGAACTTTTTTTTTTTT--ACAAT 4401
*****

orf20_S          TACCTAAAAGAACTTATTATTAGTTATTGGCTACAAAACCACACAAATATTCAATACAAT 4465
orf20_NK-305-2  TACCTAAAAGAACTTATTATTAGTTATTGGCTACAAAACCACACAAATATTCAATACAAT 4461
*****

orf20_S          CTCGAAGCTACAACCTCAAAGATTAAGATTCCCTCACCCATCACATTATATACAATATA 4525
orf20_NK-305-2  CTCGAAGCTACAACCTCAAAGATTAAGATTCCCTCACCCATCACATTATATACAATATA 4521
*****

```

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      TTGGTCTATCAGTGATATGATTGAATAAGTTGCACTCAATTGTATTGACCTACATAAGTA 4585
orf20_NK-305-2 TTGGTCTATCAGTGATATGATTGAATAAGTTGCACTCAATTGTATTGACCTACATAAGTA 4581
*****

orf20_S      TGGCCTTTATAATTACATAAAGGTGATCCAAAGTTCCAATAATATCAATGAGATTTGAAG 4645
orf20_NK-305-2 TGGCCTTTATAATTACATAAAGGTGATCCAAAGTTCCAATAATATCAATGAGATTTGAAG 4641
*****

orf20_S      ATTGTTTCCAGATATTTCACTCAACCAATATACCTTACGACAACCTTCATCCTGAAATCTT 4705
orf20_NK-305-2 ATTGTTTCCAGATATTTCACTCAACCAATATACCTTACGACAACCTTCATCCTGAAATCTT 4701
*****

orf20_S      CGGTTTGTGACAGTACTCCACTTTTAATTCAATGGTCAAATATTTATACCTTAACCCCTTA 4765
orf20_NK-305-2 CGGTTTGTGACAGTACTCCACTTTTAATTCAATGGTCAAATATTTATACCTTAACCCCTTA 4761
*****

orf20_S      ATTCAATGCCATAATGTTGATGATCATGTGAAGTAGTGAATATATAGCTTTACTTCAT 4825
orf20_NK-305-2 ATTCAATGCCATAATGTTGATGATCATGTGAAGTAGTGAATATATAGCTTTACTTCAT 4821
*****

orf20_S      CTAAAAATGCATTAATAAATTTAGTCAATTGATTGAATATAAACTAGCTAACTCGTGTAC 4885
orf20_NK-305-2 CTAAAAATGCATTAATAAATTTAGTCAATTGATTGAATATAAACTAGCTAACTCGTGTAC 4881
*****

orf20_S      TACTCAACCAAGATGGTTTCATGTCAATGATAAATAGCTCATTGTTTCTGAACCTCATAA 4945
orf20_NK-305-2 TACTCAACCAAGATGGTTTCATGTCAATGATAAATAGGTCATTGTTTCTGAACCTCATAA 4941
***** ***** *****

orf20_S      ATTTTCCATATCATCTCCTTCATCACACCATGAAGGGAGCTTCTTTCAAGCTGTCGATT 5005
orf20_NK-305-2 ATTTTCCATATCATCTCCTTCATCACACCATGAAGGGAGCTTCTTTCAAGCTGTCGATT 5001
***** *****

orf20_S      TGATTTTCGTCCTTGTGGCTTTGCTTCATGTAAGTGTCTTTATCTCTTATGATTCTTG 5065
orf20_NK-305-2 TGATTTTCGTCCTTGTGGCTTTGCTTCATGTAAGTGTCTTTATCTCTTATGATTCTTG 5061
***** ***** *****

orf20_S      CATGTGAATTAAGATGCATATATGGTTGTCTTGA-----TATAGTTTCTTCACCTAA 5118
orf20_NK-305-2 CATGTGAATTAAGATGCATATATGGTTGTCTTGA-----TATAGTTTCTTCACCTAA 5121
***** ***** *****

orf20_S      ACAGCTCTTCTAGTACTATTATCGATTGATGGAGTTTATACTATATTGCAGTTCTTTGTC 5178
orf20_NK-305-2 ATAGCTCTTCTAGTATTATTATTGATTGGTGGGGGCATACTATATTGCAGTTCTTTGTC 5181
* ***** ***** ** * * *****

orf20_S      CATTTACAGCAGAAGCAAGACACAAGCACGTGCATCATAGTAATTGCCACCATCGTCGTG 5238
orf20_NK-305-2 CATTTACAGCAGAAGCAAGACACAAGCACGTGCATCATAGTAATTGCCACCATCGTCGTG 5241
*****

orf20_S      GACGTCTGATCCAGCACCAACACCGGCGCCTGTGCCAGCATCTAATGAAGGCATACCAC 5298
orf20_NK-305-2 GACGTCTGATCCAGCACCAACACCGGCGCCTGTGCCAGCATCTAATGAAGGCATACCAC 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          CATATCAAATCCATGGTTGTGGTTACCCATGTAGTGACTCCAACGACTGTGATTGGCCTT 5358
orf20_NK-305-2  CATATCAAATCCATGGTTGTGGTTACCCATGTAGTGACTCGAACGACTGTGATTGGCCTT 5361
*****

orf20_S          GTACAGAATGCGGTGTCAACAGAACTGTGCTTATGAAGAGCCCTTCTTTCCATCACCA- 5417
orf20_NK-305-2  GTACAGAATGCGGTGTCAACAGAACTGTGCTTATGAAGAGCCCTTCTTTCCATCACCAT 5421
*****

orf20_S          -----AGTATGGAACCCCAACACAAGAATCACCCTATCACCAGCAC 5460
orf20_NK-305-2  CACCTGTTCCATCACCAAGTATGGAACGCCAACACAAGAACCACCCTATCACCAGCAC 5481
*****

orf20_S          CGGCACCTGATAATGGCATTGGCGTAGGTGTGCCACCATATCAAATCCACGGTTGTGGCT 5520
orf20_NK-305-2  CGGCACCTGATAATGGCATTGGCGTAGGTGTGCCACCATATCAAATCCACGGTTGTGGCT 5541
*****

orf20_S          ACCCATGTAGTGACTCCAATGATTGTGATTGGCCTTGTACAGTATGTGGTGTCAACGGAA 5580
orf20_NK-305-2  ACCCATGTAGTGACTCCAATGATTGTGATTGGCCTTGTACAGTATGTGGTGTCAACGGAA 5601
*****

orf20_S          CTTGTGCTTTTGAAGAGCCCTTCTTTCCATCATCATCACCTGTTCCATCACCAAGTATGA 5640
orf20_NK-305-2  CTTGTGCTTTTGAAGAGCCATTCTTTCCATCATCA---CCTGTTCCATCACCAAGTATAG 5658
*****

orf20_S          AAACCCCAACACAAGAACCACCCTATCACCAGCACGGCACCTGATAATGGCATTGGCG 5700
orf20_NK-305-2  AAACCCCAACACAAGAACCACCCTATCACCAGCACGGCACCTGATAATGGCATTGGCG 5718
****

orf20_S          TAGGTGTGCCACCATATCAAACCTCACGGTTGTGGCTACCCATGTAGTGACTCCAACGATT 5760
orf20_NK-305-2  TAGGTGTGCCACCATATCAAATCCACGGTTGTGGCTACCCATGTAGTGACTCCAACGATT 5778
*****

orf20_S          GTGATTGGCCTTGTACAATCTGTGGTGTGGCCAAACCTGTACTTTTGTAGAGCCCTTCT 5820
orf20_NK-305-2  GTGATTGGCCTTGTACAATATGTGGTGTGGCCAAACCTGTACTTTTGTAGAGCCCTTCT 5838
*****

orf20_S          TTACATCACCTCGCTTGTCCATTACCTCCCACAGAAGCACCCATTCCACAATGGGTAC 5880
orf20_NK-305-2  TTACATCACCTCGCTTGTCCATTACCTCCCACAGAAGCACCCATTCCACAATGGGTAC 5898
*****

orf20_S          CTGGTAATGGCATCGCGGCACCACCATATCAGATTCATGGTTGTGGTTACCCATGTAACG 5940
orf20_NK-305-2  CTGGTAATGGCATCGCGGCACCACCATATCAGATTCATGGTTGTGGTTACCCATGTAACG 5958
*****

orf20_S          ACTCCAATGACTGTGATGCACCCTGTACAGTCTGTTGTGCAAACCTATACCTGCTGTTATG 6000
orf20_NK-305-2  ACTCCAATGACTGTGATGCACCCTGTACAGTCTGTTGTGCAAACCTATACCTGCTGTTATG 6018
*****

orf20_S          ATGTGGCTGATCCTGAGTACATGCTACCACCTATGTCACCCTCTGAGCCACGGAAATTAT 6060
orf20_NK-305-2  ATGTGGCTGATCCTGAGTACATGCTACCACCTATGTCACCCTCTGAGCCAC--GAAATTAT 6077
*****

```

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          TACCTCTTCCACCATCTCCACCTCCATCTACAGAGGATGTAGAATATGATGATATGTTTG 6120
orf20_NK-305-2  TACCTCTTCCACCATCTCCACCTCCATCTACAGAGGATGTAGAAAATGATGATATGTTTG 6137
*****

orf20_S          CACCACAACCTGCTTATGATATAGGAACGCCTGCGGAACCTCCACCACCAGGATACGAAT 6180
orf20_NK-305-2  CACCACAACCTGCTTATGATATAGGAACGCCTGCGGAACCTCCACCACCAGGATACGAAT 6197
*****

orf20_S          TCCGCGCGTATCAAATCCATGGTTGTGGCTATGGCCCCTGCATGGACTCCAACGACTGCG 6240
orf20_NK-305-2  TCCGCGCGTATCAAATCCATGGTTGTGGCTATGGCCCCTGCATGGACTCCAACGACTGCG 6257
*****

orf20_S          ATTGGCCCTGCACATCCTGCTGCTCTAATCATAATGTTGCTATGAGGAGCCTATGTTTC 6300
orf20_NK-305-2  ATTGGCCCTGCACATCCTGCTGCTCTAATCATAATGTTGCTATGAGGAGCCTATGTTTC 6317
*****

orf20_S          GATGAAAATCCTCAAACACACAAAATCCAAAGAAAAAGTATAGTAACACAATGTAATAAA 6360
orf20_NK-305-2  GATGAAAATCCTCAAACACACAAAATCCAAAGAAAA-GTATAGTAACACAATGTAATAAA 6376
*****

orf20_S          ACTTA-GTGTTCCTGTATTACTTTAAATCACATTTGACCTATATTCTTCAATTGCTATGT 6419
orf20_NK-305-2  ACTAAAGTGTTCCT-TATTACTTTAAATCACATTTGACCTATATTCTTCAATTGCTATGT 6435
*** * ***** ***** *****

orf20_S          CATTGTCTAATGATTGAAAGCAAGTACTTTTATTTCTGTGTCATACAAATGTAAGCAAGA 6479
orf20_NK-305-2  CATTGTCTGGAATTGCAAGCAAGTACTTCTATTTCTGTGTCATACAAATGTAAGCAAAA 6495
***** * **** ***** ***** ***** ***** ***** *

orf20_S          TCAATAAAGAATATATACAACCTACGTTAATCAATTGCTACTATCAAACCTGCATTTTCTGT 6539
orf20_NK-305-2  TTAATAAAGAATATATACAACCTACGTTAATCAATTGCTACTATCAAATTGCATTTTCTAT 6555
* ***** *****

orf20_S          CAAACAACAGTATAATTATTGTGAATTTGTGACGCACTCTAGTAAATAAAGTGGGTTGAA 6599
orf20_NK-305-2  CAAACAACAGTATAATTA-----TTGTGACGTACTCTAATAAATAAAGTGGGTTGAA 6607
***** ***** ***** ***** *****

orf20_S          GTAAGCATTAAATGACTGATTCATCAGCTCTACGCCTATATCACAATTTGAGAGTAGATA 6659
orf20_NK-305-2  CTAAGCATTAAATGACTGATTCATCAGCTCTACGCCTATATCACAATTTGAGAGTAGATA 6667
*****

orf20_S          CATTGCGAGATTTCTGTTGTAAGAACCATTTTGATCATGTTTCTGTAACAG-CAACATGA 6718
orf20_NK-305-2  CATTGCGAGATTTCTGTTGTAAGAACCATTTTGATCATGTTGCTGTTACAGACAACATGA 6727
***** ***** *****

orf20_S          TTTCCAGTATATTTGTTTACAAATTTCCCTTCGTCGAGGAAATTGTGACAT----TATTA 6774
orf20_NK-305-2  TTTCCAGTAGATTTGTTTATAAATTTCCCTTCGTCGAGGAAATTGTGACATGTATTATTA 6787
*** ***** ***** ***** ***** ***** *****

orf20_S          AGATACCAACT-----CTA----- 6788
orf20_NK-305-2  AGATACCAACTTAAATTCGGTATAGGTTCCATTCTAATTAATATCATCGGCATACTCCT 6847
***** *****

```

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 ----- 6788
orf20_NK-305-2 CAACTTAGATTCATTCTTAGTTGATTTACATCTTAATTCGTCACTTTCATAGAGAACT 6907

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 CATCACAGGATAAGCCAGTTTAGTTCAACAATAGTATATTCCCCGCCAAAATCCACATA 6967

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 ATGTTTTGAGAGTTTTAATTGCAAGTGGTATACCATCAAGCTTTTTCAGTTTTGACTTTG 7027

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 ATTAATCAAGATCAATATAAATCCTTTCCTCGAAAAGAAAAACGATATAAATCCTAGCT 7087

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 CCAATTCGTAAAAGAATTTTACCAAAGTACTTCTCCGTTTCGTTTCAAATGCAACAAAA 7147

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 GGGTATTATTTGTGAGATATAAAATTTCCAATTGTTGCGTTTAAAACGAGATGGAGGAAG 7207

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 CGTTAAAAGTTGTAAGACAACAAAATGAAAACAATGGATAAATTCATAATATATTTCAA 6848
CATTAAAAGTTGTAAGACAACAAAATGAAAACAATGGATAAATTCATAATATATTTCAA 7267
* *****

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 CACTACCTTCTTTTGTCAACATCACATAAACACATCCGCACCTGACAATCATTATTCAT 6908
CTCTACCTTCTTTTGTCAACATCACATAAACACATCCGCACCTGACAATCATTATTCAT 7327
* *****

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 TAAACACCCGATAAAATAAATACCAGTTCTGAAATCATGGATATGAAATTCACAGTAAA 6968
TAAACACCTGATAAAATAAATACCAGTTCTGAAATCATGGATATGAAACTCACAGTAAA 7387
***** *****

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 AAAAAGTATTA AAAAACACCAGCTGAGGCAAACACAAGATCAACAAAGAGGTAAAAAATA 7028
AAGA-GTATAAAAAAACACCAGCTGAAGCAA----- 7418
** * **** *****

orf20_S ----- 6788
orf20_NK-305-2 AAAAATGGTCG 7039
-----

```

付図 5-10 PI615522 *rfl* と NK-305 *Rfl* の塩基配列のアラインメント

*orf20<sub>s</sub>* と *orf20<sub>NK-305-1</sub>* の上流域 5 kbp、*orf20<sub>s</sub>* と *orf20<sub>NK-305-2</sub>* 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      ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTGCGTTCC 60
orf20_NK-305-2 ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTGCGTTCC 60
orf18        ATGGCGTGGTACAGAAATTCAAGGTTTGTCTACAATGCTTTAAACTCAACTGCGTTCC 60
*****

orf20_S      AAAACATTTGGTACTATTCCAAGTCCAAGAGTTCATTGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC 120
orf20_NK-305-2 AAAACATTTGGTACTATTCCAAGTCCAAGAGTTCATTGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC 120
orf18        AAAACATTTGGTACTATTCCAAGTCCAAGAGTTCATTGAATTCCTCATCTTTGTTTTAC 120
*****

orf20_S      AATCAATCTACTAA---GTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAA 177
orf20_NK-305-2 AATCAATCTACTAA---GTGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAA 177
orf18        AATCAATCTACTAATAAGGTAGTGGGTTATTTGGGTCTGCAAAATCTGGGTATTTTAA 180
*****

orf20_S      GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT 237
orf20_NK-305-2 GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT 237
orf18        GGGTTTAAACATCATCAAGAGATTAGCTCTTTCTCTGGTTTTGCAAGGAGAAATTATCAT 240
*****

orf20_S      GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTGAATCATGGCTGGAAAATTACTTCTTGGAAATTGCA 297
orf20_NK-305-2 GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTGAATCATGGCTGGAAAATTACTTCTTGGAAATTGCA 297
orf18        GGTGATAAAACCGAAGTAAGTGTGAATCATGGCTGGAAAATTACTTCTTGGAAATTGCA 300
*****

orf20_S      CTAATGTTGAGTACTGGTATATTGCTTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT 357
orf20_NK-305-2 CTAATGTTGAGTACTGGTATATTGCTTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT 357
orf18        CTAATCTTGACTTTGGTATACTTGGTTACCGTCATGTGCACCCAGTAGTTGTGCCATAT 360
*****

orf20_S      ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATATCAACAAGTATGAGAATGAAAAGGAGAAGTT 417
orf20_NK-305-2 ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATATCAACAAGTATGAGAATGAAAAGGAGAAGTT 417
orf18        ACAGGAAGGAAGCATTATGTGCTTATATCAACAAGTATGAGAATGAAAATGGAGAAGTT 420
*****

orf20_S      GAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGTTAGGTCAATATTC 477
orf20_NK-305-2 GAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGTTAGGTCAATATTC 477
orf18        GAGAAGCGGAAAATACAACCTGCTACACACCCTGATACTGATAGGTTAGGTCAATATTC 480
*****

orf20_S      CAACACATTCTTGAATCACTGGAAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAA--- 534
orf20_NK-305-2 CAACACATTCTTGAATCACTGGAAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAA--- 534
orf18        CAACACATTCTTGAATCACTGGAAGAGAGATTAATCACCATGAACTCGAACTCGAACTC 540
*****

orf20_S      ---AGAGATGAACTTTCAAGGAGATAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAA 591
orf20_NK-305-2 ---AGAGATGAACTTTCAAGGAGATAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAA 591
orf18        GAAAGAGATGAACTTTCAAGGAGATAACCATTTGGAAGGAGGAGACAGTTGATGATAAA 600
*****

```

付図 5-11 *orf20<sub>S</sub>*、*orf20<sub>NK-305-2</sub>*、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  
(次ページへ続く)

```

orf20_S      GATAGTAGGAAGAAGCATAGTGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTGGAAGGGTTGAAT 651
orf20_NK-305-2 GATAGTAGGAAGAAGCATAGTGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTGGAAGGGTTGAAT 651
orf18       GATAGTAGGAAGAAGCATAGTGGGGCTAAGATAACTACTAACCATTGGAAGGGATGAAT 660
*****

orf20_S      TGGGAAATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTGTTTATTGGTGGGAAG 711
orf20_NK-305-2 TGGGAAATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTGTTTATTGGTGGGAAG 711
orf18       TGGGAAATTTTCGTTGTTGATAAACCGTTGGTTGAGTCCAGTTATTATTAGGTGGGAAG 720
*****

orf20_S      ATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATT 771
orf20_NK-305-2 ATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATT 771
orf18       ATTGTTGTTTACACCGGATTGCTCAACCATTGCAACTCTGATGCTGAATTGGCTACAATT 780
*****

/ Intron 1
orf20_S      ATCGCGCATCAGGTATATAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGG 831
orf20_NK-305-2 ATCGCGCATCAGGTATATAAACTATTCCTGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGG 831
orf18       ATCGCGCATCAGGTATATAAACTATTCATGGGACTCCAATTATGTGCTTAAGCTGATGG 840
*****

orf20_S      TTAATAGAACTATACAAAAAATGAAAGGAATTATATGAAAAAAACTGATGAATTTTA 891
orf20_NK-305-2 TTAATAGAACTATACAAAAAATGAAAGGAATTATATGAAAAAAACTGATGAATTTTA 891
orf18       TTAATAGAACTATACAAAAA-----ACTGATGAATTTTA 875
*****

/ Exon 2
orf20_S      GGTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCAATGTGGTGGTATGATTTGTTAGGTT 951
orf20_NK-305-2 GGTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCAATGTGGTGGTATGATTTGTTAGGTT 951
orf18       GGTATCAGATTACATTATGAATGTCATATGTCAATTTGGTGGTATGATTTGTTAGGTT 935
*****

orf20_S      GGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATG 1011
orf20_NK-305-2 GGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTCAATG 1011
orf18       GGGCATGCTGTGGCTCGACATCAGGCAGAGGATCGGACAGCATTCTTCTGGTGGTAAATA 995
*****

orf20_S      TCCCTCACGTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCTAAATTTGCCAATGCAAGA 1071
orf20_NK-305-2 TCCCTCACGTGATAATATTTGAAGTTCTATTTACTGCGCTAAATTTGCCAATGCAAGA 1071
orf18       TCCCTCACGTGATAATATTTAAAATTCTATTTACTGAGCCTGAATCTGCCAATGCAAGA 1055
*****

/ Intron 2
orf20_S      TCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTTGCAAAGTAAGTCTTACTCTTAAATGTT 1131
orf20_NK-305-2 TCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTTGCAAAGTAAGTCTTACTCTTAAATGTT 1131
orf18       TCAAACTACTCTTAAGGCATCCTCTCTTGCAAAGTAAGTCTTACTCTTAAATGTT 1115
*****

orf20_S      TTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACAT 1191
orf20_NK-305-2 TTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACAT 1191
orf18       TTCTTGATGATTAACAAACATGTGGTACTGCTACTGCATAACTGTGTTACTGCATCACAT 1175
*****

```

付図 5-11 *orf20<sub>S</sub>*、*orf20<sub>NK-305-2</sub>*、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  
(次ページへ続く)

```

orf20_S      ATGTTACTGCATAATTGCAAAACATATCACATGCCCCGGACCTAGTAACCTGTTTCATT 1251
orf20_NK-305-2 ATGTTACTGCATAATTGCAAAACATATCACATGCCCCGGACCTAGTCACTTGTTCATT 1251
orf18        ATGTTACTGCATAATTGCAAACTATATTACATGCCCCGGACCTAGTAACCTGTTTCATT 1234
*****
orf20_S      GTCAGCGATTTTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGA 1311
orf20_NK-305-2 GTCAGCGATTTTCATTTAGACATCCATTTGAAAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGA 1311
orf18        GTCAGCGATTTTCATTTAGATATCCATTTGAGAGCAAGTTAAATTTGTATCAAGTTGTGGA 1294
*****
orf20_S      ATGAAAAGTAATAGAATAAATAGAGAGGTGTGATGCTAAACAAAATCTAATCCATTACT 1371
orf20_NK-305-2 ATGAAAAGTAATAGAATAAATAGAGAGGTGTGATGCTAAACAAAATCTAATCCATTACT 1371
orf18        ATGAAAAGTAATAGAATAAATAGAGAGGTGTGATGCTAAATAAATCTAATCCATTACT 1354
*****
orf20_S      GAGTAATGGTTTTGGATCAATATATGGATTGCTATATTCCACATATTCTATCCTTTGCCG 1431
orf20_NK-305-2 GAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGATTGCTATATTCCACAGATTCTATCCTTTGCCG 1431
orf18        GAGTAATGGTTTTGGATCGATATATGGATTGCTATATTCCACAGATTCTATCCTTTGCCG 1414
*****
orf20_S      CAGATAACATTAATTTGATGTTGTTATTACATTTGACACATTAATAATTGAGTTGTGGA 1491
orf20_NK-305-2 CAGATAACATTAATTTATGTTGTTATGCACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGA 1491
orf18        CAGATAACATTAATTTATGTTGTTATGCACATTTGACACAATAAATTTGAGTTGTGGA 1474
*****
                                                    / Exon 3
orf20_S      CTATAATATATATGGAGTTAGGTAACATAGAGTGTCATTTACAGGGTTTGAAGATTA 1551
orf20_NK-305-2 CTATAATATATATGGAGTTAGGTAACATAGAGTGTCATTTACAGAGTTTGAAGATTA 1551
orf18        CTATAATATATATGGAGTTAGGTAACATAGAGTGTCATTTACAGAGTTTGAAGATTA 1534
*****
orf20_S      TTCAGGCTAGATTTCATCAATTACTGCCACGAACTACCTTGCCTTGGCTTTCTTGGAT 1611
orf20_NK-305-2 TTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGCCACGAACTATCT---GCTTGTCCCTTGTGGAT 1608
orf18        TTCAGGCTAGAGCTCCACAATTACTGCCACGAACTATCT---GCTTGTCCCTTGTGGAT 1591
*****
orf20_S      TGTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATTGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTG 1671
orf20_NK-305-2 TGTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATTGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTG 1668
orf18        TGTTCCTCGGTGTTTATTCTTTATTGTCGGAAGGAAATAGAAGCAGATCACATTG 1651
*****
orf20_S      GAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACA 1731
orf20_NK-305-2 GAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACA 1728
orf18        GAGTGCTTCTGATGGCTTCTGCTGGATACGACCCGCGAGTTGCACCTCAAGTATATGACA 1711
*****
orf20_S      AGCTTGCAAAGCCACTGGCGACTGGAAGTGTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGA 1791
orf20_NK-305-2 AGCTTGCAAAGCCACTGGCGACTGGAAGTGTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGA 1788
orf18        AGCTTGCAAAGCCACTGGCGACTGGAAGTGTAGCAACTCATCCATTTGCAAGAATGA 1771
*****

```

付図 5-11 *orf20<sub>s</sub>*、*orf20<sub>NK-305-2</sub>*、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  
(次ページへ続く)

```

orf20_S      GAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAG 1851
orf20_NK-305-2 GAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAG 1848
orf18       GAGCAAAGTTGTTAGCTCGAGCTGATGTTATGAAGGAAGCAGATAAGATATACAATGAAG 1831
*****

orf20_S      TTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTCTTCAGTAA 1886
orf20_NK-305-2 TTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTCTTCAGTAA 1883
orf18       TTGTAGCAGGACGTGCAATTC AAGGTCTTCAGTAA 1866
*****

```

付図 5-11 *orf20<sub>S</sub>*、*orf20<sub>NK-305-2</sub>*、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 *orf20<sub>S</sub>* 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<sub>NK-305-2</sub>* 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<sub>NK-305-2</sub>* 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。

```

orf20_S      MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGT IPTPRVHSNSSLFYNQSTK-C-SGLFSGAKSGYFN 59
orf20_NK-305-2 MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGT IPTPRVHSNSSLFYNQSTK-C-SGLFSGAKSGYFN 59
orf18      MAWYRNSRFVYNALKLNLRSKTFGT IPTPRVHSNSSLFYNQSTNKCSGLFSGAKSGYFN 60
*****

orf20_S      GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKLLGIALMLSTGIFAYRHVHPVVVPY 119
orf20_NK-305-2 GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKLLGIALMLSTGIFAYRHVHPVVVPY 119
orf18      GFKHHQEISSFSGFARRNYHGDKTEVSVESWLEKFLVPIGLLITFGILGYPHVHPVVVPY 120
*****

orf20_S      TGRKHYVLI STTDENEKGEVEKRI QPATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 178
orf20_NK-305-2 TGRKHYVLI STTDENEKGEVEKRI QPATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 178
orf18      TGRKHYVLMSTTRENEIGEVEKRI QPATHPDTDRVRSIFQHILESLEIREINHHELELE 180
*****

orf20_S      RDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF GGK 237
orf20_NK-305-2 RDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLNWEIFVVDKPLVESSCLF GGK 237
orf18      ERDETFKEITIWKEETVDDKDSRKKHSGAKITTNHLEGLMWEIFVVDKPLVESSYLL GGK 240
*****

orf20_S      IVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMSLYVIIFEVLF TARK 297
orf20_NK-305-2 IVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHQAEDRTAFFWWSMSLYVIIFEVLF TARK 297
orf18      IVVYTGLLNHCNSDAELATIIAHQVGHAVARHEAEDSTAFFWLLISLNVILFKILFTEPE 300
*****

orf20_S      FANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARFHQLLPRTLHLGFLGLSIVFILYFGRKEIEADH 357
orf20_NK-305-2 FANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRTIC-LSLVGLFSSVFILYFGRKEIEADH 356
orf18      SANARSKLLLRHPLLQKVWKIIQARAPQLLPRTIC-LSLVGLFSSVFILYFGRKEIEADH 359
*****

orf20_S      IGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYN 417
orf20_NK-305-2 IGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYN 416
orf18      IGVLLMASAGYDPRVAPQVYDKLAKPLGDWNCLATHPFARMRAKLLARADVMKEADKIYN 419
*****

orf20_S      EVVAGRAIQGLQ 429
orf20_NK-305-2 EVVAGRAIQGLQ 428
orf18      EVVAGRAIQGLQ 431
*****

```

付図 5-12 *orf20<sub>s</sub>*、*orf20<sub>NK-305-2</sub>*、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、*orf20<sub>s</sub>* 型のアミノ酸残基を黄緑、*orf18* 型を黄色で塗りつぶし、*orf20<sub>NK-305-2</sub>* 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      --ATAAATGATAAAAA---AAAAAACACACATCATAAGTAACCGATTAA-ACAAGT -3448
orf20_NK-305-2  AAATATAGTCATGTGGGATCTTATTAATTCACATAACATGATTTTATTAATATGTAC -3441
          *** * * **      *   * ***   **** * * ***   ***** *

orf19      CACAAATAGGTTAAACTCAATAGAAGAAAACAGACATACAAACCTAACTCAACCAAGGA -3388
orf20_NK-305-2  TTTTATAATTTTA---CAAATACAAACTAAAGATATATGTCTCAAAGTTTTGCATTGA -3383
          *** ** *   **** ** * * *** **   * ** *   ** **

orf19      TA---ATCAAAAG-----GTAGATTTAAATGAGA--AAACGCGCAAAA----- -3349
orf20_NK-305-2  CATGCGTGAAAAGTGAAGTGTAGATT-AAAATGAAACGAAGGGAGTACAATCTTAGC -3324
          *   * *****   **** ** * * ** * * * **

orf19      -ATTGACTTAT----TTAAA---CAATTTTCCAAAAAAAATGATATAAACTTTGTT -3297
orf20_NK-305-2  CACTAACTCATGATGCAAGATCTCAAGTCTT---AAAAATAATGATATAA-CTTTGTT -3269
          * * *** **   * ** *   *** * **   **** * **** * **** *

orf19      A-ACATCGTCTAGGATAATATTGAAGGATGGACAACAATAAACTAAAAAGTTACAATCAC -3238
orf20_NK-305-2  ACACATAGTCTAGCATAATATTGAGGGATGAACAACAATA---TAATACACTAAA----- -3216
          * **** ***** ***** **** * **** *   *** *   ** **

orf19      ATCATTATTTGCAGTTGTAGTTCATTTGCAGCAGAAGCAAGATGCAAAAATGAAGCAC -3178
orf20_NK-305-2  --AGTTAGTTGCAGTTGTAGTTCATTTGTAGCAGAAGCAAGATGCAAAAATGAAGCAC -3158
          *** *****

orf19      CCCACCAATATCAGGGGTAGCAACACCAGCTCCAGCACCAGTGCCGCGCCGCTAGCAG -3118
orf20_NK-305-2  CCCACCAATATCAGGGGTAGCAACACCAGCTCCAGCACCAGTGCCGCGCCGCTAGCAG -3098
          *****

orf19      TAACACCTACAGGCGTACCAGCATATCAAATTCACGGTTGTGGCTACCCGTGCAGTGACT -3058
orf20_NK-305-2  TAACACCTACAGGCGTACCAACATATCAAATTCACGGTTGTGGCTACCCGTGCAGTGACT -3038
          *****

orf19      CCAATGACTGTGATTGGCCTTGTACTATATGCTGTGGCCAAAACCAAATTGTTGTTATG -2998
orf20_NK-305-2  CCAATGACTGTGATTGGCCTTGTACTATATGCTGTGGCCAAAACCAAATTGTTGTTATG -2978
          *****

orf19      ATTTGCCTTTGATGGTTAACATAAAACAGCACTTTTTTTTCTAAGTAGTCATAAAGAG -2938
orf20_NK-305-2  ATTTGCCTTTGATGGTTAACATAAAACAGCACTTTTTTTTCTAAGTAGTCATAAAGAG -2919
          *****

orf19      GGTACTACAATAAATAATGTTATAACAATTCACATAAACTTAGTAATCTATCATAAATAAT -2878
orf20_NK-305-2  GGTACTACAATAAATAATGTTATAACAATTCACATAAACTTAGTAAGTTGTCACAATAAT -2859
          ***** * ** *****

orf19      GTTCAATAATGAAGTACTAAATCCAGTCTCTCGTGATTCAACTAGAAAATCTCTTCTAGC -2818
orf20_NK-305-2  GTTCAATAATGAAGTACTAAATCTAGTCTCTCGTGATTCAACTAGAAAATCTCTTCTAGC -2799
          *****

orf19      TCACTAGATGGTCCTTCTACGATAGCATGGTTTTCGAACTTTTCGATTGATTAGAATTGAA -2758
orf20_NK-305-2  TCACTAGATGGTCCTTCTACGATAGCATGGTTTTCGAACTTTTCGATTGATTAGAATTGAA -2739
          *****

```

付図 5-13 *orf19* 及び *orf20<sub>NK-305-2</sub>* の上流域 3.5 kbp の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf19          TTATGTATATTTCTACTTGTGTTTGATTCAATCCTGCCAATAATGTGATTTATACATGGT -2698
orf20_NK-305-2 TTATGTATATTTCTACTTGTGTTTGATTCAATCCTGCCAATAATGTGATTTATACATGGT -2679
*****

orf19          GGTATAAGATTGTAACCGTTATTGTTGTATTGTATTCATCATATTTATAATCCCTCTATC -2638
orf20_NK-305-2 GGTATAAGATTGTAACCGTTATTGTTGTATTGTATTCATCATATTTATAATCCCTCTATC -2619
*****

orf19          TCTAATTGTTTGCTTAATTTGAGGATTAATTAAGGTTGGCCTAGTGGTTGTGAGGTCCCT -2578
orf20_NK-305-2 TCTAATTGTTTGCTTAATTTGAGGATTAATTAAGGTTGGCCTAGTGGTTGTGAGGTCCCT -2559
*****

orf19          CTACCACCTATTGAATAGGAGCTCGATTCTCACCTTTTGCAAATTCCTGTAAGGAAATGC -2518
orf20_NK-305-2 CTACCACCTATTGAATAGGAGCTCGATTCTCACCTTTTGCAAATTCCTGTAAGGAAATGC -2499
*****

orf19          TCCTTATCTTAAAAAAGAAAAAAGAAAGAAATGCTTGCTCAATATTTTATGTTTTT -2458
orf20_NK-305-2 TCCTTATCTTAAAAAAGAAAAAAGAAAGAAAGAAATGCTTGCTCAATATTTTATGTTTTT -2440
*****

orf19          TCCGATTTCAAAGACAGTATTCGAGTATTGTATTATTTTCAGTTACGTGGTAGTAAAATT -2398
orf20_NK-305-2 TCCGATTTCAAAGACAGTATTCGAGTATTGTATTATTTTCAGTTACGTGGTAGTAAAATT -2380
*****

orf19          AAAAAGAAATTGTGATAGTTTGAAAATATGTGTTAAGAAACTCAAAGATCTTAGATCTTA -2338
orf20_NK-305-2 AAAAAGAAATTGTGATAGTTTGAAAATATGTGTTAAGAAACTCAAAGATCTTAGATCTTA -2320
*****

orf19          GATCTGCCGTTGCACAACGTAACCTTAAGTACCTTTAATATCCCATTGTAATGATTAA -2278
orf20_NK-305-2 GATCTGCCGTTGCACACTAAGTACCTTTAATATCCCATTGTAATGATTAA -2260
*****

orf19          AAATTACAAAAAGTTGATATTTGGAAAGTATATTTTGAGACGAATGACTATGACAGACAA -2218
orf20_NK-305-2 AAATTACAAAAAGTTGATATTTGGAAAGTATATTTTGAGACGAATGACTATGACAGACAA -2200
*****

orf19          ACTACATTAGATGAATAATGTCAAATTCATATGAACCACTAAAAACGGAGGAAGTATA -2158
orf20_NK-305-2 ACTACATTAGATGAATAATGTCAAATTCATATGAACCACTAAAAACGGAGGAAGTATA -2140
*****

orf19          TATGAATTCAGATCGTCAAATCAGGGATGTCTCAGACAATTTAGGGGTCCCGTGCCATC -2098
orf20_NK-305-2 TATGAATTCAGATCGTCAAATCAGGGATGTCTCAGACAATTTAGGGGTCCCGTGCCATC -2080
*****

orf19          CATTTTATTAATACACATCTTTTTGTAAGGTATATTAGTACATAATTTGATTCCTTAATG -2038
orf20_NK-305-2 CATTTTATTAATACACATCTTTTTGTAAGGTATATTAGTACATAATTTGATTCCTTAATG -2020
*****

orf19          AACTAGAACT-TTTTATTCTAAGGTCTTGTGGTTGACAAAACAATCATGGGAAGTGA -1979
orf20_NK-305-2 AACTAGAACTGTTTTATTCTAAGGCCTTGTGGTTGACAAAACAATCATGGGAAGTGC -1960
*****

```

付図 5-13 *orf19* 及び *orf20<sub>NK-305-2</sub>* の上流域 3.5 kbp の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf19      AAATTCCTAGAAAGTAGAAGTATATGAATAAGTTGTTTGGTTGGCAAATCATGGAATT -1919
orf20_NK-305-2 AAATTCCTAGAAAGTAGAAGTATATGAATAAGTTGTTTGGTTGGCAAATCATGGAATT -1900
*****

orf19      TGTACTTCTTAGGAAGTTCTACTTCCTCCAAAATGGAGGAAGTTACTTACCTAGGTCCCC -1859
orf20_NK-305-2 TGTACTTCTTAGGAAGTTCTACTTCCTCCAAAATGGAGGAAGTTACTTACCTAGGTCCCC -1840
*****

orf19      CTAGATAAGTAGAGCTTCCCATAGGAAGTTCTACTTCCCATTATCAACCAAACACAATTT -1799
orf20_NK-305-2 CTAGATAAGTAGAGCTTCCCATAGGAAGTTCTACTTCCCATTATCAACCAAACACAATTT -1780
*****

orf19      TACTTCTTAGGAATTTCAAATACATGGAAAAATAACTTCTAGGAAGGCTAGAACCG -1739
orf20_NK-305-2 TACTTCTTAGGAATTTCAAATACATGGAAAAATAACTTCTAGGAAGGCTAGAACCG -1720
*****

orf19      TGCATTTTGAGTAAAAAATTAACATAACAGGTTGAAACTTTTTATTTGTATATCATATA -1679
orf20_NK-305-2 TGCATTTTGAGTAAAAAATTAACATAACAGGTTGAAACTTTTTATTTGTATATCATATA -1660
*****

orf19      AAATTTTGTTCATCAGTCAAAGTAACAGAGGTTCAAATTGCGGAATTCGTTCTCA -1619
orf20_NK-305-2 AAATTTTGTTCATCAGTCAAAGTAACAGAGGTTCAAATTGCGGAATTCGTTCTCA -1600
*****

orf19      TATACTTAGATGTACGGTTGACATGGTACACTCAATACTAATTTATGTTTCATTTGCTTAT -1559
orf20_NK-305-2 TATACTTAGATGTACGGTTGACATGGTACACTCAATACTAATTTATGTTTCATTTGCTTAT -1540
*****

orf19      TTAGAATTCTCTTATTTAATATATTTTGTTCATTTGAATGATTTCAAATAAATAATAGGC -1499
orf20_NK-305-2 TTAGAATTCTCTTATTTAATATATTTTGTTCATTTGAATGATTTCAAATAAATAATAGGC -1480
*****

orf19      AAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACATTTAGGTATATGATAAAATTTGTA -1439
orf20_NK-305-2 AAAAAATAGCCTTTAAATGTATCATGCTCGCAACATTTAGGTATATGATAAAATTTGTA -1420
*****

orf19      CAAATTTAATGAAAAAATGTTGAAACAAAATTTAACTAAGCTACAGTTGACTT -1379
orf20_NK-305-2 CAAATTTAATGAAAAAATGTTGAAACAAAATTTAACTAAGCTACAGTTGACTT -1361
*****

orf19      TTAAGCTCTCCTTTTCTGATGCAACAAAGATTTGTTTTAGCACTAGCTACTTCTTCTA -1319
orf20_NK-305-2 TTAAGCTCTCCTTTTCTGATGCAACAAAGATTTGTTTCAGCACTAGCTACTTCTTCTA -1301
*****

orf19      TCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACCAAATTTTCAATTTTGAATATATT -1259
orf20_NK-305-2 TCCCATAAAATTCGCCATTTGTTTTCTCAAACCAAATTTTCAATTTTGAATATATT -1241
*****

orf19      TTTTACCATGTAAGAAAATATCTTATCAGGAGTTTTTGTAAATCGAGGAAACCCATATA -1199
orf20_NK-305-2 TTTTACCATGTAAGAAAATATCTTATCAGGAGTTTTTGTAAATCGAGGAAACCCATATA -1181
*****

```

付図 5-13 *orf19* 及び *orf20<sub>NK-305-2</sub>* の上流域 3.5 kbp の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)



```

orf19      GGAAACTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATATCAACAAGAAAATCACATTGTTCA -1139
orf20_NK-305-2 GGAAATTGCTTATAAAGCTAGTGAATCAACGAAATATCAACA----- -1139
*****

orf19      TAGGAAAACCTCTATAACATTTGCATACATTGTAGGTCTTTGTTGCACTTTAATCCCTCG -1079
orf20_NK-305-2 ---GGAAAACCTCTATAACATTTGCATACATTGTAGGTCTTTGTTGCACTTTAATCCCTCG -1081
*****

orf19      GGCCTCGTATATTGATATTAAGTGATTTTAATCTACGTTTTTTTCTATTGCAACAATTA -1019
orf20_NK-305-2 GGCCTCGTATATTGATATTAAGTGATTTTAATCTATATTTTTTTCTATTGCAACAATTA -1021
*****

orf19      CTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTTCACTTTTGGTATAAAAAGCAATAT -959
orf20_NK-305-2 CTACTTTGGATAATTTTACATCTATTGCAACAATTTCACTTTTGGTATAAAAAGCAATAT -961
*****

orf19      TTCAGAACAAGCAGCATTGTGCACCCGAGAGAACATACCATTTCATATAGAAGAATATGA -899
orf20_NK-305-2 TTCAGAACAAGCAGCATTGTGCACCCGAGAGAACATACCATTTCATATAGAAGAATATGA -901
*****

orf19      TTTTTTTCAACAACTTTTCAAGATAAAAAAAGCATACAATATAAAATTAAGAACATGT -839
orf20_NK-305-2 TTTTTTTCAACAACTTTTCAAGATAAAAAAAGCATACAATATAAAATTAAGAACATGT -841
*****

orf19      AAATCTCCAACAACATTTGAAAAACCTAAAAAAAAGCATCTATTGTAATGAACATTT -779
orf20_NK-305-2 AAATCTCCAACAACATTTGAAAAACCTAAAAAAAAGCATCTATTGTAATGAACATTT -781
*****

orf19      AGTCTAAATTTAAGAACCTAACTTTTAAATGTA AAAATTTGAAAAAGGAATCTCGCCA -719
orf20_NK-305-2 AGTCTAAATTTAAGAACCTAACTTTTAAATGTA AAAATTTGAAAAAGGAATCTCGCCA -721
*****

orf19      ACAACCATTTTCTAAAAGGTAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAAC- -660
orf20_NK-305-2 ACAACCATTTTCTAAAAGGTAACAAGTTGCAAGATTTAATGAAACAGATAACAACA -661
*****

orf19      TTTTCTTAAATCATAAATTCTTAAATATTA AACCTACATCGTTTAAACAGAAGGTGCAC -600
orf20_NK-305-2 TTTTCTTAAACCATAAATTCTTAAATATTA AACCTACATCGTTTAAACAGAAGGTGCAC -601
*****

orf19      CATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCTATTTGCGCTTTTCCATTCCCTAAAAAAC -540
orf20_NK-305-2 CATCCTTTATGCGTACTTGGATGCATGTTCTATTTGCGCTTTTCCATTCCCTAAAAAAC -541
*****

orf19      CGAGTCTAAAGCTATTGTTATAATACTCTAGAAAGTCTCTCAAAAAAAAAAAAA-CACT -481
orf20_NK-305-2 CGAGTCTAAAGCTATTGTTATAATACTCTAGAAAGTCTCTCAAAAAAAAAAAAAACT -481
*****

orf19      CTAGTTGTCGTAGACTCTCAGCATGTGTCATTTAGAGACTCGTAACGCATTGACGCAC TT -421
orf20_NK-305-2 CTAGTTGTCGTAAACTCTCAGCATGTGTCATTTAAAGACTCGTAACGCATTGACGCAC TT -421
*****

```

付図 5-13 *orf19* 及び *orf20<sub>NK-305-2</sub>* の上流域 3.5 kbp の塩基配列のアラインメント (次ページへ続く)

```

orf19          ACTCGAAATATTTTGTTCATTTATTAGAGAAAATTTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAA -361
orf20_NK-305-2 ACTCGAAATATTTTGTTCATTTATTAGAGAAAATTTTCATCCCCTGATCCCAATTATCAA -361
*****

orf19          ATCAACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAACGAATGACTCTCGATA -301
orf20_NK-305-2 ATCAACATCTAAAAATTTAAAATGACTAGGTACGTAACGAAAACGAATGACTCTCGATA -301
*****

orf19          ATAGTACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTCGGTAGTGCATAGCTGGCTGCAAAAG -241
orf20_NK-305-2 ATAGTACACCCCATTAATCCATTCTTAGTTTGTTCGGTAGGGCATAGCTGGCTGCAAAAG -241
*****

orf19          AAATCTTTTGCACAGAGAAAACCTTTTGCACCTTCGGAATTCAGTAGGAATATCATAACCA -181
orf20_NK-305-2 AAATCTTTTGCACAGAGAAAACCTTTTGCACCTTCGGAATTCAGTAGGAATATCATAACCA -181
*****

orf19          TTTATGGAAGCAACAACCTCTTGTGACCCATTTTCATCTAAAATCTTAATCTCGTAAATTTT -121
orf20_NK-305-2 TTTATGGAAGCAACAACCTCTTGGGACCCATTTTCATCTGAAATCTTAATCTCGTAAATTTT -121
*****

orf19          ACCTTTCAAATTCAAAAATCACATAATTTTTTTTGGTATGTTACTTGAACCCAGTTCAT -61
orf20_NK-305-2 ACCTTTCAAATTCAAAAATCACATAATTTTTTTTGGTATGTTACTTGAACCCAGTTCAT -61
*****

orf19          AACTGACCCTGAAATTCAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCAGCTTTTGTGTTCAAAAATC -1
orf20_NK-305-2 AACTGACCCTGAAATTCAGAATTTGGAGCAAAGTTAGCAGCTTTTGTGTTCAAAAATC -1
*****

```

付図 5-13 *orf19* と *orf20<sub>NK-305-2</sub>* の上流域 3.5 kbp の塩基配列のアラインメント

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。

付表5-5 *orf20* 様遺伝子の分岐年代推定

Node Label	NodeId	Des1	Des2	RelTime	StdErr(ReITime)	Rate	DivTime	CI_Lower	CI_Upper	Min Time	Max Time	Data Coverage
ORF20 NK-198	1	-	-	-	-	2.09	-	-	-	-	-	-
ORF20L KWS2320	2	-	-	-	-	2.76	-	-	-	-	-	-
BvOMA1-1	3	-	-	-	-	0.28	-	-	-	-	-	-
BvOMA1-2	4	-	-	-	-	0.92	-	-	-	-	-	-
CqOMA1-1	5	-	-	-	-	0.49	-	-	-	-	-	-
CqOMA1-2	6	-	-	-	-	0.52	-	-	-	-	-	-
SoOMA1	7	-	-	-	-	0.66	-	-	-	-	-	-
AtOMA1	8	-	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-	-
-	9	1	2	0.02	0.02	2.40	6.31	0.00	19.76	-	-	84.30%
-	10	5	6	0.03	0.02	0.50	7.38	0.00	23.29	-	-	95.70%
-	11	3	4	0.07	0.05	0.50	19.60	0.00	50.73	-	-	80.43%
-	12	7	10	0.13	0.04	0.58	35.05	11.36	65.00	-	-	95.05%
-	13	14	12	0.21	0.01	0.80	56.00	56.00	65.00	56.00	65.00	93.98%
-	14	9	11	0.18	0.02	1.10	49.08	38.64	65.00	-	-	95.91%
-	15	13	8	0.32	0.00	0.80	-	-	-	-	-	85.16%

Retree (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 $\gamma$ 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、アラニ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。