



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	低温環境におけるコムギとイネのミトコンドリア遺伝子発現制御機構の解析
Author(s)	栗原, 志保
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	第8408号
Issue Date	2007-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/100167
Type	doctoral thesis
File Information	Kurihara-Y_PhD_Thesis_Rev20260731.pdf



低温環境におけるコムギとイネの
ミトコンドリア遺伝子発現制御機構の解析

改定版（2026 年 7 月 3 1 日）

栗原 志保

改定版について

本書は、2007 年 12 月に北海道大学に冊子体として提出した博士学位論文「低温環境におけるコムギとイネのミトコンドリア遺伝子発現制御機構の解析」の原稿ファイルを基に再編集し、PDF 化したものである。

本改定版には、誤植の修正、軽微な訂正、およびバイオインフォマティクス関連ウェブアドレスの更新・補足が施されているが、研究内容、分析結果および考察に変更はない。

関連論文について

関連する主な論文として、以下の国際誌原著論文 2 報、国際誌総説 1 報および国内誌総説 1 報がある。

Kurihara-Yonemoto, S. and Handa, H. (2001) Low temperature affects the processing pattern and RNA editing status of the mitochondrial *cox2* transcripts in wheat. *Current Genetics*, **40**, 203-208.

Kurihara-Yonemoto, S. and Kubo, T. (2010) Increased accumulation of intron-containing transcripts in rice mitochondria caused by low temperature: is cold-sensitive RNA editing implicated? *Current Genetics*, **56**, 529-541.

Kurihara-Yonemoto, S. (2014) Post-transcriptional regulation in mitochondria of rice and wheat at low temperatures. *JARQ (Japan Agricultural Research Quarterly)*, **48**, 17-28.

栗原志保 (2016) 作物のミトコンドリアの低温応答. *北農*, **83**, 277-289.

2026 年 7 月 31 日

低温環境におけるコムギとイネのミトコンドリア遺伝子発現制御機構の解析

栗原 志保

目次

I 章 緒論	1
II 章 低温環境下の <i>cox2</i> 遺伝子の発現	5
1. コムギ <i>cox2</i> 遺伝子	5
1) 材料と方法	8
2) 結果	8
2. イネ <i>cox2</i> 遺伝子	29
1) 材料と方法	29
2) 結果	30
3. 考察	41
III 章 グループ II イントロンを持つミトコンドリア遺伝子の発現	44
1. 1 個のイントロンで分断される遺伝子の発現解析	44
1) 材料と方法	44
2) 結果	46
2. 複数のイントロンで分断される遺伝子の発現解析	74
1) 材料と方法	74
2) 結果	75
3. IBS (Intron Binding Sites) の RNA エディティング	94
1) 材料と方法	94
2) 結果	95
4. 考察	101
IV 章 スプライシング補助因子の探索	104
1. 材料と方法	104
2. 結果	106
3. 考察	118
V 章 総合考察	119
VI 章 摘要	122
謝辞	126
引用文献	128
巻末付表	138

I 章 緒論

低温（本論文では 0～15℃を指す）は作物生産にとって有害となる場面が多く、長く農学上の重要問題として認識されてきた。作物生産に対し低温が害となる場面は、低収・不作をもたらす冷害（気候の年次変動）（北海道農業試験場 1994a, b）と栽培地域拡大の制限（地理的要因）に代表されよう。これらを踏まえると、低温に対する作物の応答機構の解明は北方圏農業の潜在的な可能性を高める上で重要な意義を持つと期待される。

酒井と吉田（1983）によれば、植物の活動と温度との関わりは、機能タンパク質と温度との物理化学的な問題と、生体を構成する膜脂質の問題に還元されるという。すなわち、低温の植物体に対する影響とは、生体酵素群の至適温度からの逸脱や膜流動性の変化に起因する生体構成分子の不全に端を発し、それらが様々な生理的反応や傷害を引き起こすことである。具体的には、低温により膜脂質が液晶相から固相へ転ずると、膜の透過性の増大、溶質の溶出、細胞内イオン濃度の均衡の喪失、ATP の供給低下、原形質流動停止、膜結合酵素の活性化エネルギーの増加、あるいは物質代謝の不均衡に起因する有害物質の蓄積を引き起こすという（酒井と吉田、1983）。こうした二次的に発生する異常が一定期間続くと植物体に傷害を与えると考えられている。一般に、軽微な傷害であれば常温に戻すことで回復が見込まれるが、低温感受性の強い植物では 5℃でわずか 2～3 時間の低温処理でも不可逆的な傷害となる（酒井と吉田、1983）。

低温環境下の植物体に関しては種々の研究例があり、それらは以下の 3 つに大別できよう。各々についていくつかの研究を例示する。

（1）形態学・細胞学的変化

穂孕期のイネを 12℃で 4 日間処理すると、小孢子期の葯において、タペート細胞の肥大や崩壊、小孢子の発育の遅れ等の異常が認められる（Satake and Hayase 1970; Nishiyama 1976）。肥大したタペート細胞においては、ミトコンドリア等の細胞内小器官の形態異常は認められないが、数は増大する（Nishiyama 1984）。一方、低温感受性植物 *Cornus stolonifera* 由来カルスを 0℃で処理すると、12 時間経過後、粗面小胞体の滑面化が認められる。24 時間経過後には細胞膜やミトコンドリア膜の崩壊に先行してトノプラストが崩壊する（酒井と吉田 1983）。

（2）生理・生化学的变化

いくつかの植物種では、単離ミトコンドリアのコハク酸酸化酵素活性が低温に伴い低下することが明らかにされている。また、*C. stolonifera* では低温環境下でのシアン耐性呼吸経路の活性化とシトクローム系呼吸経路の活性低下が認められるという。オルガネラ膜の流動性に関してはトノプラストの相転移温度が13~14°C、ミトコンドリアについては9~10°Cである（酒井と吉田 1983）。

（3）分子生物学的変化

植物体を低温環境下におき、発現が変動する遺伝子の研究が盛んに行われ、シロイヌナズナマイクロアレイを用いた解析では低温により 514 個の遺伝子が発現量の変化を示したと報告されている（Vogel et al. 2005）。サトウキビでは34 個の低温誘導性遺伝子が単離され、そのうち 20 個が新規の遺伝子であったという（Nogueira et al. 2003）。これまでに報告された低温誘導性遺伝子には DREB1 等の著名な転写因子の他、AOX のようなミトコンドリア遺伝子が含まれている（Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005; Ito et al. 1997; Takumi et al. 2002; Li et al. 2007）。

以上のように、低温に対する植物体の反応は非常に複雑であり、生体構成分子の不全が多岐に亘る異常を引き起こすことを示唆している。一方、ミトコンドリアに関連する異常を指摘する研究事例が多いのも事実で、この分野の研究の進展が大いに期待される。しかしながら、先述のような細胞学的あるいは生理学的な研究、あるいは核ゲノムコードのミトコンドリア遺伝子の発現解析が盛んに進められている反面、ミトコンドリアゲノムコードの遺伝子発現に関しては研究例がほとんど無い。

ミトコンドリアは α -プロテオバクテリアを祖とするが、ミトコンドリア機能を担う遺伝子の大部分（一説には 2,000~3,000 個）は核ゲノムに、残りが自身のゲノムにコードされる（Binder and Brennicke 2003; Millar et al. 2005）。最近になって、ドイツ、日本あるいは米国のグループが相次いで被子植物ミトコンドリアゲノムの全塩基配列を発表し、遺伝情報の全貌が明らかになった（Unsold et al. 1997; Kubo et al. 2000; Notsu et al. 2002; Handa 2003; Clifton et al. 2004; Sugiyama et al. 2005）。それによれば、ゲノムサイズは 221,853bp（ナタネ）~569,630bp（トウモロコシ）、コードされる遺伝子数は 50~60 個でゲノムの 10%程度を占める。イントロンは 20~24 個で、全てグループ II 型である。ミトコンドリア遺伝子の発現制御に必要なタンパク質性因子は 1 つを除き全て核ゲノムにコードされている。

現在、ミトコンドリア遺伝子は概ね以下のようなプロセスを経て発現すると考えられている。すなわち、核ゲノムにコードされる RNA ポリメラーゼが数種類のプロモーター配列からの転写を担い、一次転写産物から数段階の RNA プロセシングを受けた成熟 mRNA が翻訳に供される (Binder and Brennicke 2003)。

被子植物ミトコンドリア遺伝子の発現は専ら T7/T3 ファージ型 RNA ポリメラーゼが行い、これは単量体で機能する RNA ポリメラーゼである。葉緑体ではファージ型と原核生物型の RNA ポリメラーゼを併用するためにシグマ因子が不可欠であるが、ミトコンドリアには知られていない (Gray and Lang 1998; 田中 2005)。

RNA プロセシングには特徴的なステップがいくつか含まれている。一つは RNA 編集 (RNA エディティング) である (Maier et al. 1996)。被子植物の RNA 編集は転写後に RNA 上の特定のシトシン残基をウラシル残基に置換し、翻訳開始コドンや終止コドンの創出あるいは指定するアミノ酸残基の変更等、ゲノム DNA 上とは異なる遺伝情報を作り出すプロセスである。生化学的にはシトシン塩基の脱アミノ化反応で、編集部位の上流数塩基を指標に部位特異性が決まることを示すデータが得られつつある (Kubo and Kadowaki 1997; Williams et al. 1998; Farré et al. 2001; Takenaka et al. 2004)。第二にスプライシングが挙げられるが、被子植物ミトコンドリアゲノムのイントロンにはシス-スプライシング型と、トランス-スプライシング型の2種類が見つかっている (Chapdelaine and Bonen 1991; Pereira de Souza et al. 1991; Morawala-Patell et al. 1998)。トランス-スプライシング型イントロンはシス-スプライシング型イントロンが分割された形状で、2つの RNA が別個に転写された後にスプライシング反応に供される。トランス-スプライシング型イントロンは元来シス-スプライシング型イントロンであったものが進化の過程でゲノム再編成により分割されたこと、さらにシス→トランス型への進化がいくつかの被子植物種で独立に生じた可能性が指摘されている (Knoop 2004; 杉山 2005)。被子植物ミトコンドリアイントロンは他生物種で報告されている自己触媒能を失っているらしく、核ゲノムにコードされている何らかの補助因子が必須と考えられている (Bonen and Vogel 2001)。以上のようなステップの他、原核生物でも見られるような転写産物末端のトリミングやポリ A を介した転写産物の安定性変更 (Kuhn et al. 2001; Gagliardi et al. 2004)、あるいは葉緑体ゲノムで行われているようなポリシストロニックな転写産物の切断を経て、成熟 mRNA が完成する。以上に加え、ミト

コンドリア遺伝子の発現調節はミトコンドリア数や遺伝子コピー数の増減、翻訳効率の変更、あるいは翻訳後制御により行われているものと推測される。

ミトコンドリア遺伝子の発現調節に関しては、少なくとも器官特異的に行われているのは間違いないようである。例えば、単離ミトコンドリアを用いたタンパク質合成実験では、器官によっては固有のポリペプチドが検出されるという (Lind et al. 1991; De Paepe et al. 1993)。タバコでは、花器官におけるミトコンドリア数の増大が細胞 1 個あたりのミトコンドリア転写産物の増加の要因らしい (Huang et al. 1994)。別の例では、ミトコンドリアゲノム型が異なるいくつかのインゲンマメ系統の遺伝子コピー数と転写産物蓄積量を調べたところ、両者に相関が認められず、転写レベルあるいは転写後レベルで RNA 量の調節を行っていることが示唆されている (Woloszynska et al. 2006)。

低温に対してミトコンドリア遺伝子の発現が変化するか否かについて調査した事例はこれまでにないが、前述のような細胞学的あるいは生理・生化学的なデータを考慮すれば何らかの変化が生じていても不思議ではない。もし、温度刺激に対してミトコンドリア遺伝子発現が変化するなら、低温とミトコンドリアの関係に関する貴重な事例となるのはもちろんのこと、ミトコンドリア遺伝子発現制御研究を進める上で良い実験系となることが期待できる。

本研究は以上のような観点から立案したものである。研究材料としては熱帯原産の低温感受性植物イネと半乾燥地帯原産で低温馴化能を持つ植物コムギを用い、各々について低温に対するミトコンドリア遺伝子発現の変化を調べ、一般性を探ることとした。第 II 章では、ミトコンドリア遺伝子 *cox2* の発現をモデルケースとして低温や各種のストレスに対する反応を調べた。第 III 章では、イントロン保持遺伝子全てを調査対象とし、同様の実験を行った。第 IV 章ではスプライシングに関わると思われる核ゲノムコード遺伝子について低温に対する応答性を調査した。得られたデータをもとに、低温とミトコンドリア遺伝子発現との関わりを中心に考察を加えて第 V 章にまとめた。

II 章 低温環境下の *cox2* 遺伝子の発現

cox2 遺伝子は、シトクローム c 酸化酵素サブユニット 2 をコードする遺伝子であり、一部の例外 (Nugent and Palmer 1991) を除き被子植物ミトコンドリアゲノムに広くコードされている。遺伝子構造が幅広い植物種で調べられており、現生被子植物の *cox2* はシス-スプライシング型イントロンを二つ持つ祖先型から二つのイントロンのいずれか、もしくは両方を失った派生型と考えられるに至った (Bonnen et al. 1984; Notsu et al. 2002; Kubo et al. 2000; Unseld et al. 1997; Kudla et al. 2002; Lippok et al. 1992; Handa 2003)。遺伝子発現調節についてトウモロコシやコムギを使った解析例が多数あり (Lupold et al. 1999; Ikeda and Gray 1999)、*cox2* は被子植物ミトコンドリア遺伝子解析のモデルシステムといっている。

本章では、低温環境におけるミトコンドリア遺伝子発現のモデルケースとして、コムギおよびイネ *cox2* 遺伝子の転写と翻訳について詳しい解析を行った。

1. コムギ *cox2* 遺伝子

1) 材料と方法

(1) 植物材料と育成条件

供試材料を表 1 に示す。‘チホクコムギ’と‘農林 61 号’は本邦コムギ品種で、それぞれ北海道立北見農業試験場、および佐賀県農業試験場育成である。

‘Valuevskaya’ (ロシア)、‘Mironovskaya 808’ (ウクライナ)、‘Iohardi’ (アメリカ)、‘Manitou’ (カナダ)、‘Norstar’ (カナダ)、および ‘Chinese Spring’ (中国) は海外のコムギ品種で、育成国を括弧内に記した。‘C30’ は *Aegilops columunaris* を母本 (一回親) に用い、‘Chinese Spring’ を花粉親 (反復親) として連続戻し交雑を行い育成した細胞質置換系統である (Tsunewaki et al. 1996; 常脇 1981)。

特に断らない限り、植物体は昼 20°C/夜 15°C、光量子密度 $400 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長 15 時間の条件で生育させた。低温処理は、昼 2.0°C/夜 0.5°C、光量子密度 $200 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長 8 時間で行った。暗黒下における植物体育成は、催芽種子を暗黒下において 20°C で 7 日間、1 葉期まで生育させ、低温処理区は 2.8°C で行った。乾燥ストレスを与えたコムギは、まずポットに播種し昼 20°C/夜 15°C、光量

子密度 $250 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長 15 時間の条件で 3 葉期まで生育させた。その後、目で見て萎れがわかるようになるまで 5 日間灌水を停止した。ABA 処理を施すコムギは、まず改変型ホーグランド水溶液 (Arnon and Hoagland 1940) (pH6.5、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ の代わりに KH_2PO_4 を使用) を用いた水耕栽培を昼 20°C /夜 15°C 、光量子密度 $250 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長 15 時間の条件下で 3 葉期まで行い、その後地下部を $50 \mu \text{M}$ ABA に 24 時間浸漬した。塩ストレス処理では上記の ABA の代わりに 400mM NaCl を用いた。

(2) 全 RNA の抽出とノーザンハイブリダイゼーション

全 RNA は、標準的なグアニジンチオシアネート法 (Sambrook et al. 1989)、または Trizol 試薬 (Invitrogen 社、USA) を用いて抽出した。

$20 \mu \text{g}$ もしくは $10 \mu \text{g}$ の全 RNA を、1.25%変性アガロースゲル (0.66 M ホルムアルデヒドを含む) を用いて、MOPS バッファー (20mM MOPS、 1mM EDTA、 5mM 酢酸ナトリウム、pH7.0) システムで電気泳動し、Nylon Membranes, positively-charged (Roche 社、Switzerland) の上に転写させた。プローブの標識、ハイブリダイゼーションおよび検出は、Digoxigenin System (Roche 社、Switzerland) を用い、X 線フィルム (富士フィルム) で検出した。定量化にあたっては、X 線フィルムのシグナルバンドの強度をアプリケーションソフトウェア Multi-Analyst (BIO-RAD Laboratories 社、USA) で測定した。

(3) cDNA の合成と PCR による増幅

全 RNA を RNase-free DNase I (GE Healthcare Bio-Sciences 社、USA) によって Assay Buffer (40mM Tris-HCl pH7.5, 10mM CaCl_2) 中 30 分間 37°C でインキュベートした。cDNA の一次鎖は $0.5 \mu \text{g}$ の全 RNA から、プライマー P7 もしくは P2 と逆転写酵素 Super Script II (Invitrogen 社 USA) を用いて合成した。PCR の条件は、 94°C で 2 分を 1 サイクル行い、次に 94°C で 45 秒、 60°C で 60 秒、 72°C で 60 秒を 1 サイクルとして 30 サイクル、最後に 72°C で 7 分を 1 サイクル行った。

(4) 塩基配列解析

PCR 産物は TOPO TA クローニングキット (Invitrogen 社、USA) を用いて

pCR2.1-TOPO ベクターにクローニングした。シーケンシング反応は、Thermo Sequenase fluorescent-labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (GE Healthcare Bio-Sciences 社、USA) を用いて行った。反応産物を、自動 DNA シーケンサー Li-Cor 4200 L (Li-Cor 社、USA) を用いて解析した。

(5) オリゴヌクレオチド

本実験で用いたオリゴヌクレオチドは巻末付表 1 の P1~P7 である。プライマーの位置と方向は、図 1A に示す。

(6) 粗ミトコンドリア画分の単離とタンパク質濃度の測定

粗ミトコンドリア画分は、Kemble の方法 (1987) の変法により得た。石英砂を入れた乳鉢に、試料を 5~8mm 幅に刻んで入れ、緩衝液 A (0.4M Sucrose, 3mM EDTA, 0.1mM EGTA, 50mM Tris-HCl pH8.0, 0.1g/l BSA, 70 μ l/l メルカプトエタノール) を注ぎ、乳鉢を用いて破碎した。4 重ガーゼおよび 2 重のミラクロースで濾過した後、濾液を 4°C/130×g/5 分で遠心し、沈殿した石英砂と植物体残渣を除去した。上清を 4°C/1,500×g/10 分で遠心し、沈殿した核および葉緑体画分を除去した。さらに、回収した上清を 4°C/17,000×g/15 分で遠心した。上清を取り除き、沈殿に緩衝液 B (0.4M Sucrose, 3mM EDTA, 0.1mM EGTA, 50mM Tris-HCl pH8.0) を加え懸濁し、4°C/130×g/5 分ならびに 4°C/1,500×g/10 分の遠心により上清を得、再び 4°C/17,000×g/15 分で遠心し、沈殿を粗ミトコンドリア画分とした。これを 1×PBS 緩衝液に懸濁し、Bradford のマイクロアッセイ法 (Bradford 1976) を用いてタンパク質の濃度を測定した。

(7) 抗ペプチド血清

用いた抗 COXII 血清は、コムギとイネで共通する COXII の C 末端アミノ酸配列 (NH₂- KDYADWVSNQLILQTN -COOH) に対応する合成オリゴペプチドでウサギを免疫して得られたものである (半田裕一博士、私信)。

(8) ウェスタンブロット分析

粗ミトコンドリア画分を Laemmli (1970) の方法に従い、SDS-PAGE により分離した。15%ポリアクリルアミドゲルを作製し、1×PBS 緩衝液に懸濁した粗ミトコンドリア画分をタンパク量に換算して 20 μ g もしくは 35 μ g ずつサン

プルバッファー (62.5mM Tris-HCl pH6.8、4% SDS (w/v)、20% グリセリン (w/v)、10% メルカプトエタノール (v/v)、0.1% ブロモフェノールブルー (BPB, w/v)) に溶解した。泳動後のゲルは、CBB 染色液 (0.25%クマシーブリリアントブルー (CBB) R-250、30%メタノール (v/v)、7%酢酸 (v/v)) で染色し、脱染液 (30%メタノール (v/v)、7%酢酸 (v/v)) ですすいだ。また、ゲルで分離したタンパク質は PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Immobilon, Millipore 社、USA) に電氣的に転写した。一次抗体には、抗 COXII 血清を 1 : 2,000 になるように希釈して用いた。二次抗体には Horseradish Peroxidase で標識した抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare Bio-Sciences 社、USA) を、最終濃度が 1 : 3,000 になるように希釈して用いた。シグナルバンドの検出には、ECL 試薬 (GE Healthcare Bio-Sciences 社、USA) を用いた。

2) 結果

(1) コムギ *cox2* 遺伝子の前駆体転写産物は低温によって増加する。

コムギ *cox2* 遺伝子発現の低温に対する影響を調べるため、4 葉期に至った‘チホクコムギ’を 7 日間低温処理し、茎葉部の全 RNA を抽出し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。コムギ *cox2* はイントロンを一つ保持する分断遺伝子である (Bonen et al. 1984)。プライマー P1 と P3 で PCR 増幅したエキソン 1 の全長とイントロンの一部 104bp を含む領域をプローブ (以下、プローブ E1-I、図 1 A 参照) に用いたところ、低温処理区と常温区のいずれにおいても 2.7kb と 1.5kb の二つの転写産物にハイブリダイズした (図 2 A)。しかしながら 2.7kb 転写産物のシグナル強度は明瞭に異なり、低温処理区の方が常温区より強い。一方、1.5kb 転写産物のシグナル強度は両区で差がなかった。

2.7kb と 1.5kb の 2 種類の転写産物の由来を調べるために、プライマー P4 と P5 で PCR 増幅したイントロンの 3'末端側 738bp からなるプローブ (以下、プローブ I、図 1 A 参照) を用いたノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、2.7kb 転写産物のみが検出され、1.5kb 転写産物は全く現れなかった (図 2 B)。これらの結果より、2.7kb の転写産物はイントロンを含む *cox2* 遺伝子の前駆体転写産物であり、1.5kb 転写産物は、イントロンを含まない成熟 mRNA であることが示された。

(2) 低温環境下の *cox2* 転写産物蓄積の経時的解析

cox2 の転写産物蓄積を経時的に追跡するため、2 葉期の‘チホクコムギ’、‘Chinese Spring’、‘Valuevskaya’の3品種を14日間低温処理し、その後常温下の回復栽培を7日間行った。その間に逐次茎葉部の採取を行い、全RNAを抽出した。プローブ E1-I もしくはプローブ I を用いたノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、図3に示すようなハイブリダイゼーション像が得られた。プローブ E1-I やプローブ I で検出される 2.7 kb 転写産物は、‘チホクコムギ’においては低温処理3日目より、‘Chinese Spring’においては1日目より、また‘Valuevskaya’においては4日目より蓄積量を増し、いずれも処理日数に応じて増大した。一方、1.5kbの成熟型転写産物は低温の影響を受けない(図3)。また、低温処理後常温に戻して1日後には、2.7kb 転写産物の蓄積量は大幅に減少し、1週間後には低温処理以前のレベルまで戻っていた。‘チホクコムギ’(図3A)の2.7kbと1.5kb 転写産物のシグナル強度を数値化し、見かけの蓄積量が一定の1.5kb 転写産物を各処理区の内部対照として 2.7kb vs. 1.5kb のシグナルバンド強度比を百分率で表したもの(以下、2.7/1.5 比)を図3A下の表に示す。これによれば、7日間の低温処理により 2.7kb 転写産物の蓄積量は2.4倍に、14日間の低温処理により 4.5倍になると見積もられる。

(3) *cox2* 転写産物に対する光と低温の交互作用

ミトコンドリア遺伝子の転写活性には光周性があることが報告されている(Okada and Brennicke 2006)ので、*cox2* 遺伝子発現に対する温度と光の交互作用の影響を検討するため、暗黒下育成の‘チホクコムギ’にさらに暗黒下で7日間の低温処理を施し、茎葉部の全RNAを抽出してノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、プローブ E1-I は暗黒低温区と暗黒常温区の両区で 2.7kb と 1.5kb の二つの転写産物にハイブリダイズし、2.7kb 転写産物のシグナル強度は暗黒低温処理区の方が暗黒常温区より明らかに強かった(図4A)。一方、1.5kb 転写産物のシグナル強度は両区でほぼ同一であった。さらに、プローブ I を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、2.7kb の転写産物のみハイブリダイズし、1.5kb の転写産物は全く検出されなかった(図4B)。2.7kb シグナル強度は、プローブ E1-I で検出されるものとほぼ同様であった。これらの結果より、暗黒下においても *cox2* の前駆体転写産物は低温によって増加することが分かり、温度と光の交互作用の影響は見られなかった。

(4) 低温環境下の *cox2* 遺伝子発現の器官特異性

低温環境における *cox2* 遺伝子発現変動の器官特異性を調査するため、2 葉期まで育成した ‘Valuevskaya’ に、1、3、および 7 日間の低温処理を施し、茎葉部および根の全 RNA を抽出した。また、温室で出穂開花させた成熟体植物に同じ低温処理を施し、小穂の全 RNA を抽出した。プローブ E1-I を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、いずれの試料においても 2.7kb と 1.5kb の転写産物にハイブリダイズした(図 5)。低温処理の効果について、2.7kb 転写産物のシグナル強度は、いずれの器官においても低温処理期間に応じて強くなる傾向がみられる一方、1.5kb シグナルは変動しない。また、器官同士を比較した場合、2.7kb と 1.5kb の転写産物のシグナル強度はともに根部で最も強く、小穂がこれに次ぎ、最低は茎葉部であった。生殖器官や根部はミトコンドリア生合成が活発な器官である (Geddy et al. 2005 ; Huang et al. 1994; Smart et al. 1994; Landschutze et al. 1995; Lohrmann et al. 2001; Schmidt-Bleek et al. 1997; Ribichich et al. 2001; Felitti et al. 1997) ので、本実験の結果はこれを反映していると思われる。

(5) 乾燥、ABA もしくは NaCl ストレスに対する *cox 2* 遺伝子発現の検討

低温環境は植物体に乾燥をもたらすことが知られている (Kacperska 1993、吉田ら 1998) ので、乾燥やこれに関連するストレスに対する *cox2* 遺伝子発現の変動を調べた。3 葉期まで育成した ‘Valuevskaya’ に、乾燥、ABA もしくは NaCl 処理を施し、茎葉部の全 RNA を抽出した。プローブ E1-I を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、いずれの処理区においても 2.7 および 1.5kb の転写産物が検出されたが、対照区と比較して有意なシグナル強度の差異は認められなかった (図 6)。

(6) 低温環境下の *cox2* 前駆体転写産物蓄積の品種間差異

低温環境における *cox2* 遺伝子発現変動の品種間差異を調べるため、‘Mironovskaya 808’、‘Norstar’、‘Iohardi’、‘Manitou’、‘Chinese Spring’、‘農林 61 号’、および ‘C30’ を 2 葉期まで育成した後に、7 日間の 5℃明条件下の低温処理を施し、その後常温 20℃の温室に移し 1 日置いた。この間、逐次茎葉部を採取し、全 RNA を抽出した。プローブ E1-I を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、図 7 に示すような像を得た。これに基づき、

2.7kb と 1.5kb のシグナルバンドの強度を数値化し、(2) 項と同様に 2.7/1.5 比を算出して表 2 にまとめた。その結果、2.7/1.5 比は、低温処理以前では 17~68 であったのに対し、低温処理 7 日目では 43~138 となり、供試した 7 品種全てで 1.5~2.5 倍の 2.7kb 転写産物の蓄積増が認められた。一方、低温処理を始めて 2 日目では 'C30' の 2.7/1.5 比は 68 から 83 に増加しているのに対して 'Mironovskaya 808'、'Norstar' はそれぞれ 25 から 28 へ、29 から 28 へと殆んど変化は見られない等、低温処理開始後およそ 4 日間は 2.7kb シグナル増加速度に品種間差異が認められた。また、この期間においては、'Manitou' や 'Norstar' のように、いったん蓄積した 2.7kb 転写産物が一過的に減少するケースも検出された。常温に戻した 1 日目では、全ての品種で 2.7/1.5 比が減少した。

また、'Chinese Spring' の細胞質置換系統 'C30' では、'Chinese Spring' や他の 6 品種に比較して全体に *cox2* 遺伝子の転写産物の発現が低く、2.7/1.5 比が高かった (図 7、表 2)。さらに、常温環境下のウェスタン分析を行うと COXII タンパク質の発現レベルが 'チホクコムギ' よりも非常に低かった (データは示していない)。

(7) 低温環境下における *cox 2* 転写産物の RNA エディティング

コムギ *cox2* 遺伝子のコード領域には全部で 17 箇所の C から U への RNA エディティング部位が報告されている (図 9 A ; Covello and Gray 1990)。ここでは後述のイネ *cox2* のエディティング部位との対応が容易に理解されるように、エディティング部位の番号付けを両植物種で統一した。低温環境下のコムギ *cox2* 遺伝子の RNA エディティングを調べるために、cDNA の塩基配列を分析した。4 葉期まで育成した 'チホクコムギ' に 7 日間の低温処理を行い、全 RNA を抽出した。プライマー P7 で逆転写を行った cDNA プールより、プライマー P1 と P7 を用いて成熟 mRNA に対応する cDNA を、さらにプライマー P6 と P7 を用いて前駆体転写産物のエキソン 2 に対応する cDNA をそれぞれ PCR 増幅した (図 8)。またプライマー P2 で逆転写を行った cDNA プールからは、プライマー P1 と P2 を用いて前駆体転写産物のエキソン 1 に対応する cDNA を PCR 増幅した (図 8)。これらの PCR 産物をクローン化し、それぞれ 23~29 個の cDNA クローンの塩基配列を分析した。

得られた塩基配列より各エディティング部位を抜き出し、模式的に表 3 に示

す。また、エディティングを生じた総部位数に基づき cDNA クローンを分別し表 4 にまとめた。成熟 mRNA に由来する cDNA クローンは、温度条件に拘わらず、殆ど完全にエディティングを生じていた。この内訳は常温区では、24 クローンのうち 1 クローンの 1 箇所（サイト 9）のみがエディティングを生じていなかった。低温環境下では、24 クローンのうち 2 クローンのそれぞれ 1 箇所ずつ（サイト 2 およびサイト 9）がエディティングを生じていなかった。

成熟 mRNA とは対照的に、前駆体転写産物由来の cDNA からは多様なクローンが得られた。前駆体転写産物のエキソン 1 について、常温区では、8 種類の cDNA クローンが得られた（表 3）。このうち、6 箇所全てのエディティング部位が T 残基のものが最多であった（表 4）。一方、低温処理区では、17 種類の cDNA クローンが得られ、1 箇所のみがエディティングされたクローンが最も多い（表 3、4）。前駆体転写産物のエキソン 2 については、常温区では 15 種類の cDNA クローンのうち、11 箇所全てエディティングされたものが最多で、低温処理区では 21 種類の cDNA クローンのうち、7 箇所と 9 箇所エディティングされたものが同数で最多である（表 3、4）。

解析した cDNA プールにおける各エディティング部位のエディティング頻度をグラフにまとめ、図 9 に示した。常温区と低温処理区を比較すると、エキソン 1 のサイト 2 とサイト 9 およびエキソン 2 のサイト 10 の頻度低下が顕著であった。特にエキソン 1 のサイト 9 は常温環境の 67% に対して、低温環境では 24% であった。

（8）低温環境におけるコムギ COXII ポリペプチドの蓄積

転写パターンの変化が COXII 翻訳産物の蓄積量の変化を伴うかどうかを調べるため、ウェスタン分析を行った。2 葉期の‘チホクコムギ’に対して 14 日間の低温処理と引き続き常温による回復栽培を 7 日間行い、逐次茎葉部を採取した。ウェスタン分析の結果、見かけの分子量 32kDa の単一シグナルバンドが検出された（図 10、11）。コムギ COXII ポリペプチドのアミノ酸配列から推定される分子量は約 30kDa なのでこのシグナルは COXII を特異的に検出したものと考えられる。低温処理 3 日、5 日、7 日、9 日、14 日間、および常温復帰後 7 日間では、処理以前と同程度の COXII ポリペプチド蓄積量が認められた（図 10）。また、‘チホクコムギ’を暗黒下で生育して黄化させ、14 日間の低温処理と、引き続き 7 日間の常温回復栽培を行ったが、採取した試料のシグナルバンドの変

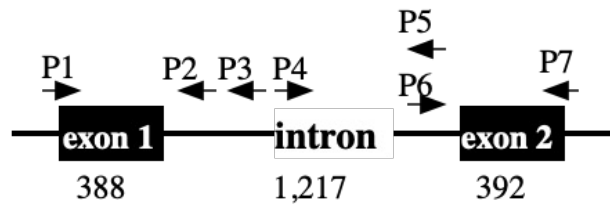
化は認められなかった（図 11）。

表1 本研究に用いたコムギ品種

品種・系統	まき性	耐凍性	栽培地
Valuevskaya	秋まき	1	Russia
Mironovskaya 808	秋まき	1	Ukraine
Norstar	秋まき	1	Canada
Iohardi	秋まき	1	USA
チホクコムギ	秋まき	2	日本（北海道）
Manitou	春まき	4	Canada
Chinese Spring	春まき	不明	中国
農林61号	春まき	不明	日本（本州）
C30	春まき	5	（細胞質置換系統）

‘C30’は*Aegilops columunaris*を母本に用い、‘Chinese Spring’を花粉親として連続戻し交雑を行い育成した細胞質置換系統（Tsunewaki et al. 1996; 常脇 1981）。耐凍性は、1（強）～5（弱）（Kuwabara et al. 1998; Yoshida et al. 1998による）。

A



B

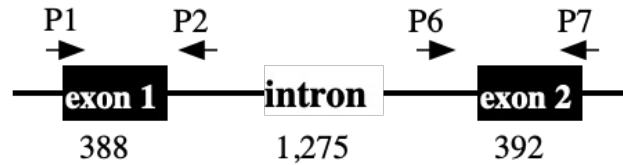


図1 コムギ (A) とイネ (B) の*cox2* の構造 (Bonnen et al. 1984; Covello and Gray 1989; Notsu et al. 2002)

エキソンとイントロンの長さをbase pairs で示す。プライマー組P1+P3を用いてエキソン1とイントロンを増幅したPCR産物 (E1-I) およびプライマー組P4+P5を用いてイントロンを増幅したPCR産物 (I) をプローブとして、コムギおよびイネのノーザンハイブリダイゼーションに用いた。また、プライマー組P6+P7を用いてエキソン2を増幅したPCR産物 (E2) をプローブとしてイネのノーザンハイブリダイゼーションに用いた。また、プライマー組P1+P7、P1+P2、およびP6+P7をRT-PCR に用いた。プライマーはDDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバーX01108の配列をもとに設計した。

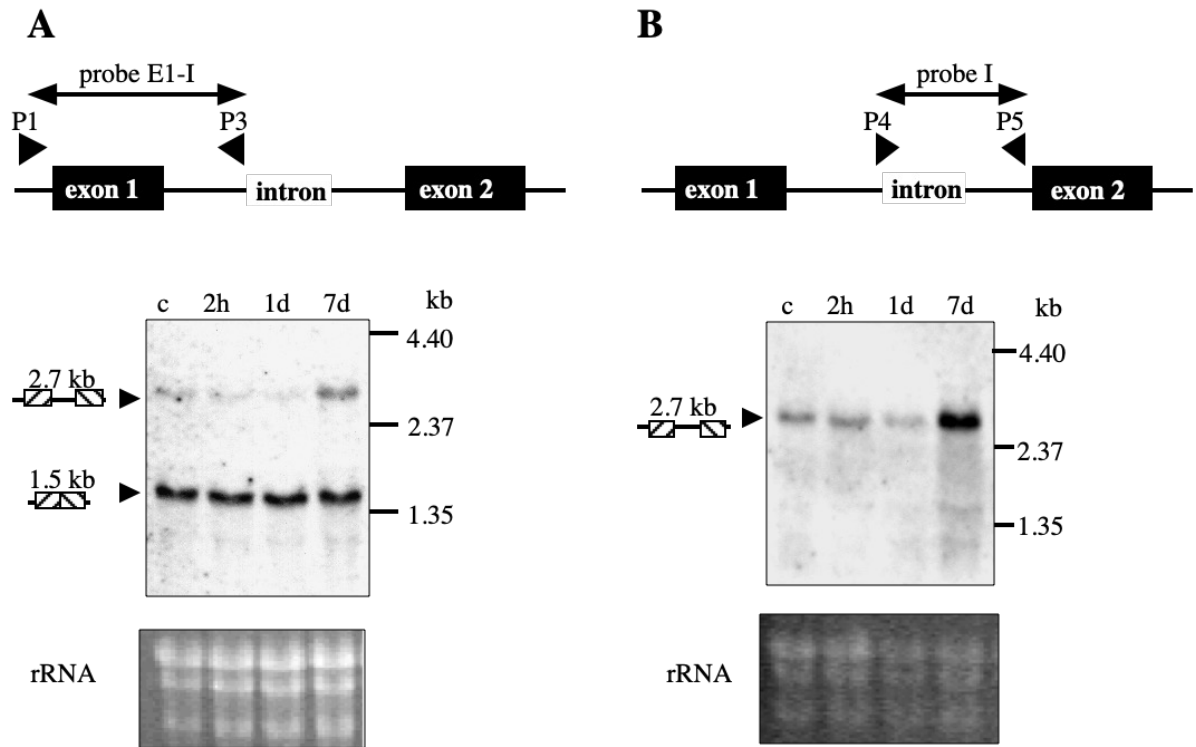


図2 コムギ*cox2* のノーザン解析

全RNA20 μ gずつ泳動した。(A)プローブE1-Iを用いた分析。(B)プローブIを用いた分析。c:対照区(昼20°C/夜15°C); 2h, 1d, 7d:低温処理(昼2°C/夜0.5°C)2時間、1日、7日間。RNAマーカのサイズを右に、転写産物のサイズを左に示す。

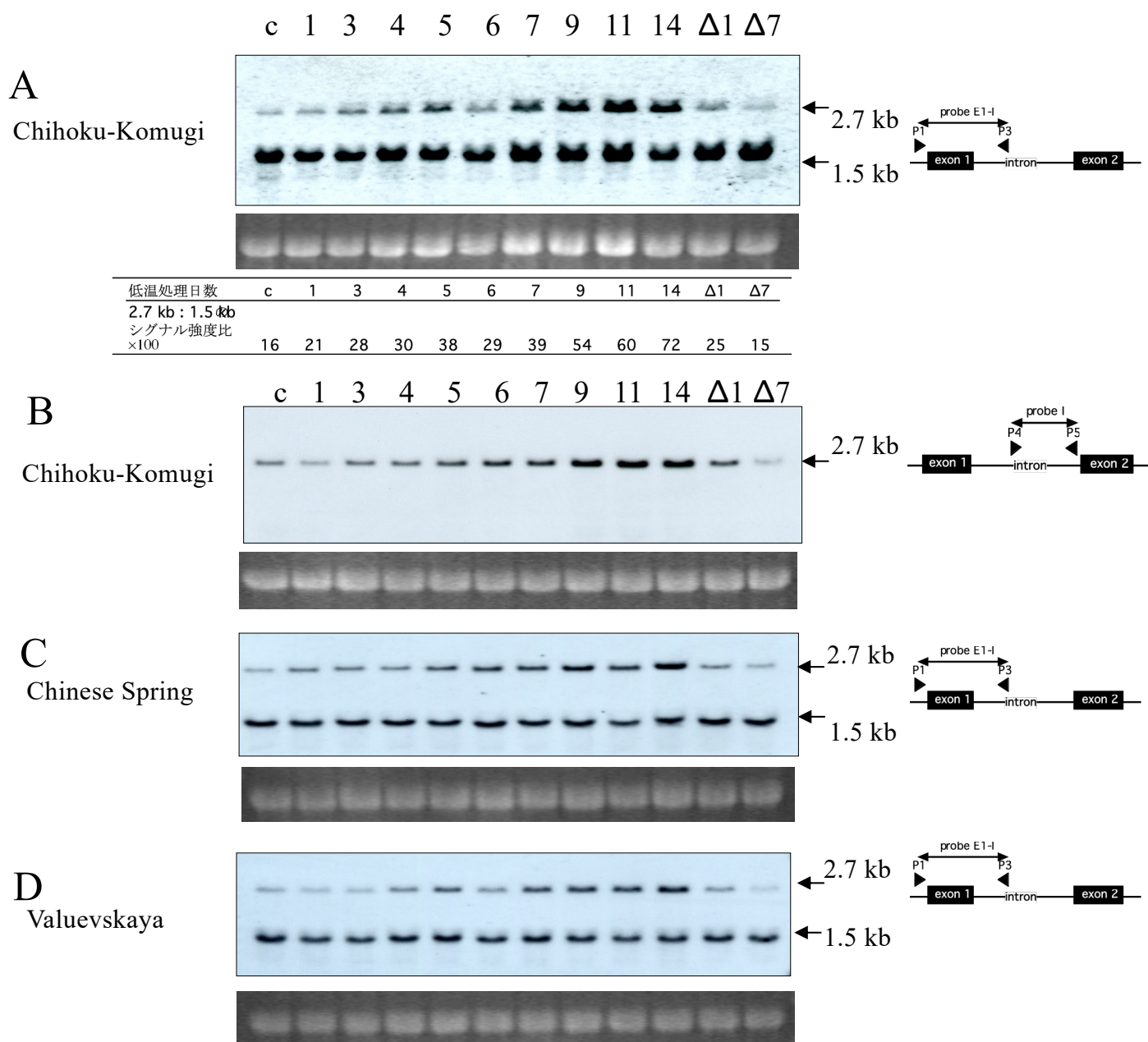


図3 低温環境下の経時的なコムギ*cox2*のノーザン解析

全RNA20μgずつ泳動した。(A), (B): 品種'チホクコムギ'; (C): 品種'Chinese Spring'; (D): 品種'Valuevskaya'; c: 対照区(昼20°C/夜15°C); 1d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 9d, 11d, 14d: 低温処理区(昼2°C/夜0.5°Cで1日、3日、4日、5日、6日、7日、9日、11日、14日); Δ1, Δ7: 14日間の低温処理の後、常温(昼20°C/夜15°C)に戻して1日および7日置いた区。図右に用いたプローブを示す。

表の数値は、Multi-Analyst (Bio-Rad laboratories社、USA) によって2.7kbおよび1.5kbの転写産物のシグナル強度を数値化し、見かけの蓄積量が一定の1.5kbの転写産物を各処理区の内部対照とし、2.7kb vs. 1.5kbのシグナルバンド強度比を百分率で表した数値である。

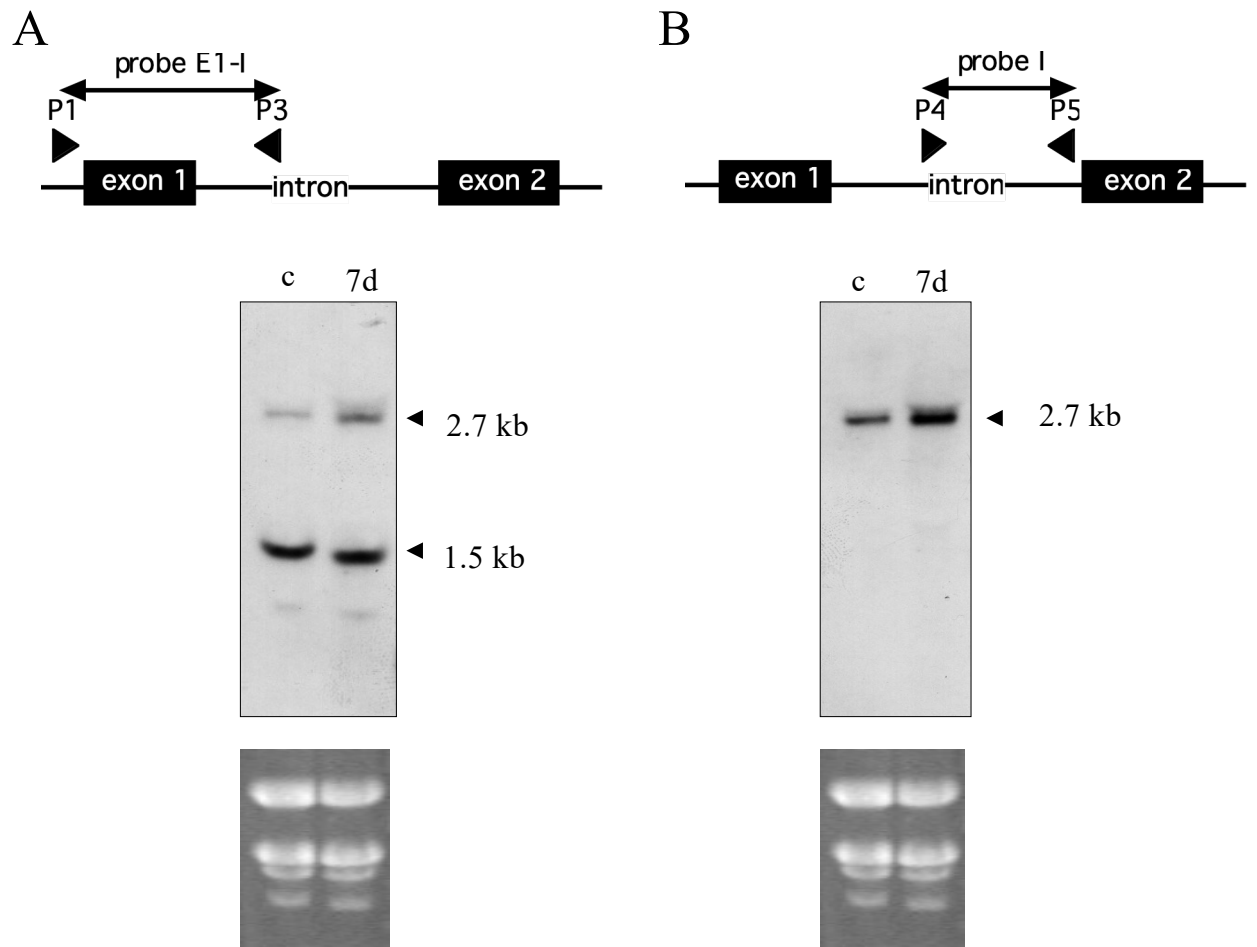


図4 暗黒下のコムギ*cox2*のノーザン解析

全RNA20 μ gずつ泳動した。(A) プローブE1-Iを用いた分析。(B) プローブIを用いた分析。c: 対照区 (20°C) ; 7d: 低温処理 (2.8°C) 7日間。

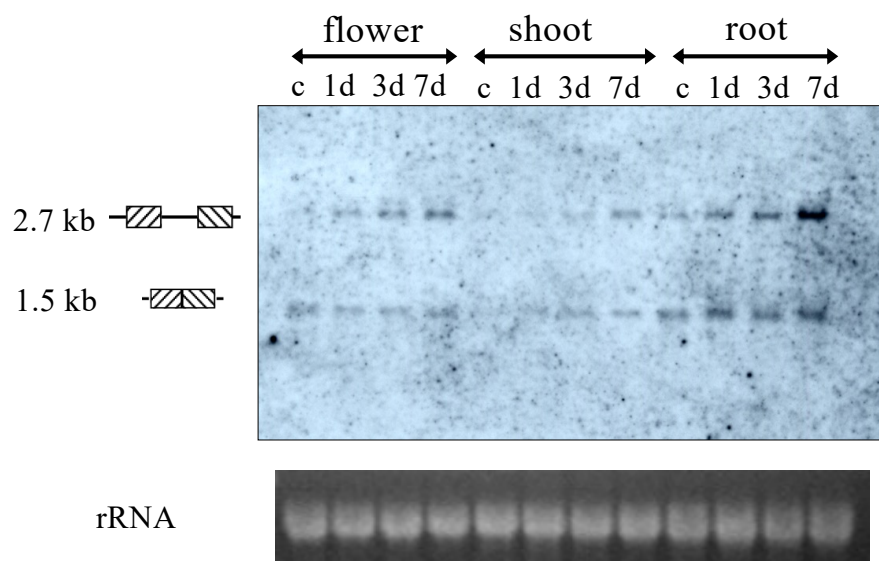


図5 小穂、茎葉部、根のコムギ*cox2*のノーザン解析

全RNA10 μ gずつ泳動した。c: 対照区（昼20 $^{\circ}$ C/夜15 $^{\circ}$ C）；1d, 3d, 7d: 低温処理（昼2.0 $^{\circ}$ C/夜0.5 $^{\circ}$ C）1日、3日、および7日間。

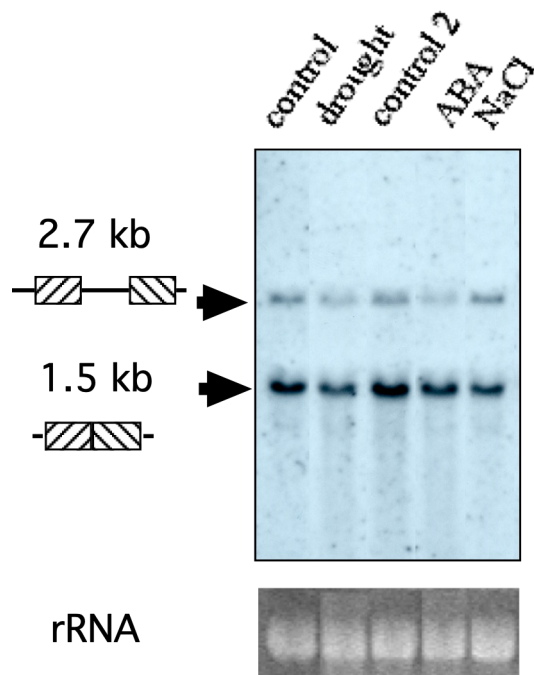


図6 環境ストレス下のコムギ*cox2*のノーザン解析

全RNA10 μ gずつ泳動した。control:対照区; drought:目で見て萎れがわかるようになるまで5日間灌水を停止; control 2: 水耕栽培対照区; ABA: 地下部を50 μ M ABAに24時間浸漬; NaCl: 地下部を400mM NaClに24時間浸漬。

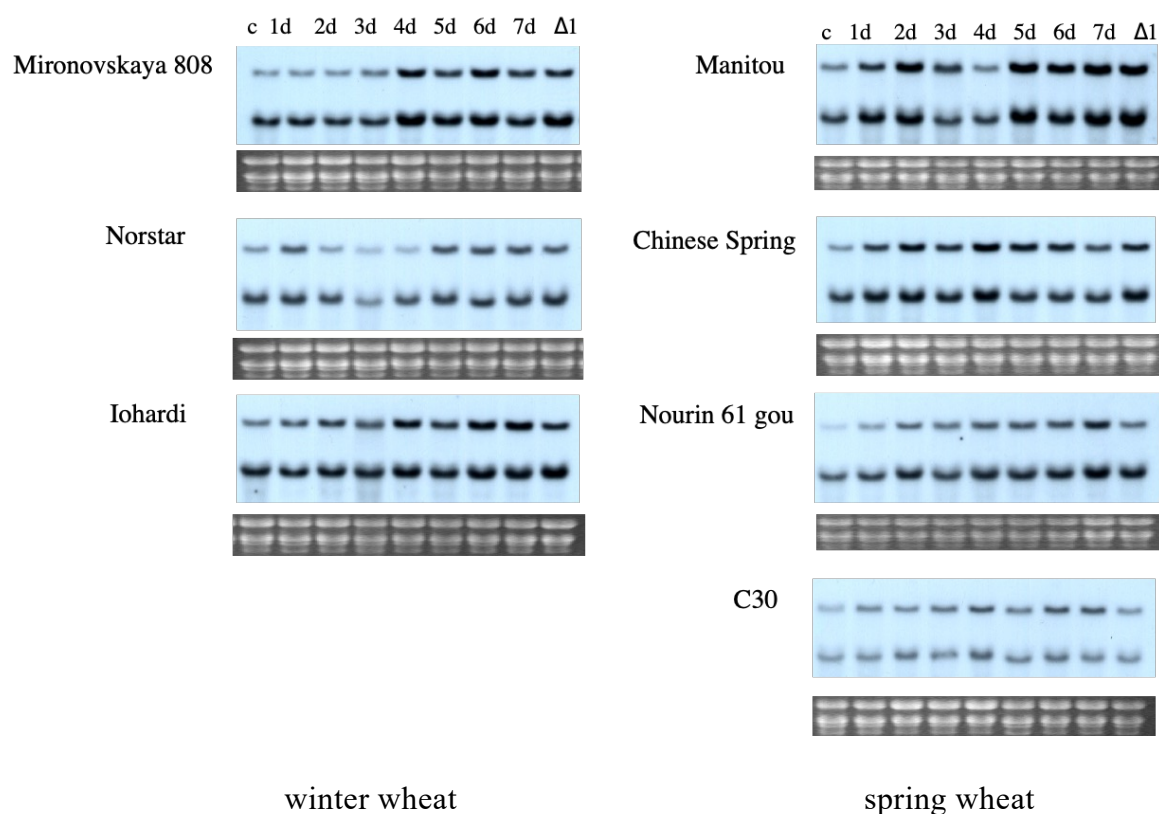


図7 コムギ*cox2*のノーザンハイブリダイゼーション像に見出された品種間差異

全RNA20 μ gずつ泳動した。左列は秋まき品種、上から‘Mironovskaya 808’ ‘Norstar’ および‘Iohardi’。右列は春まき品種・系統、上から‘Manitou’ ‘Chinese Spring’ ‘農林61号’ および‘C30’。それぞれの栽培地は表1に示す。c: 対照区（昼20°C/夜15°C）；1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d: 低温処理区（5°C明条件で1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日）； Δ 1: 7日間の低温処理の後、温室（平均20°C）に移し1日回復させた区。

表2 低温環境下の*cox2*前駆体転写産物蓄積のコムギ品種間差異

cold treatment									
variety/race	control	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	Δ1d
Mironovskaya 808	25	26	28	35	47	39	47	45	39
Norstar	29	38	28	32	23	45	49	46	39
Iohardi	29	38	44	40	51	44	54	54	40
Manitou	34	41	53	55	36	50	57	50	49
Chinese Spring	30	44	52	49	53	57	58	46	47
Nourin 6 gou	17	26	34	37	38	40	39	43	31
C30	68	101	83	115	107	100	118	138	102

数値は、Multi-Analyst (Bio-Rad laboratories社、USA)によって2.7kbと1.5kb転写産物のシグナル強度を数値化し、見かけの蓄積量が一定の1.5 kb転写産物を各処理区の内部対照として2.7kb vs 1.5kbのシグナルバンド強度比を百分率で表した。

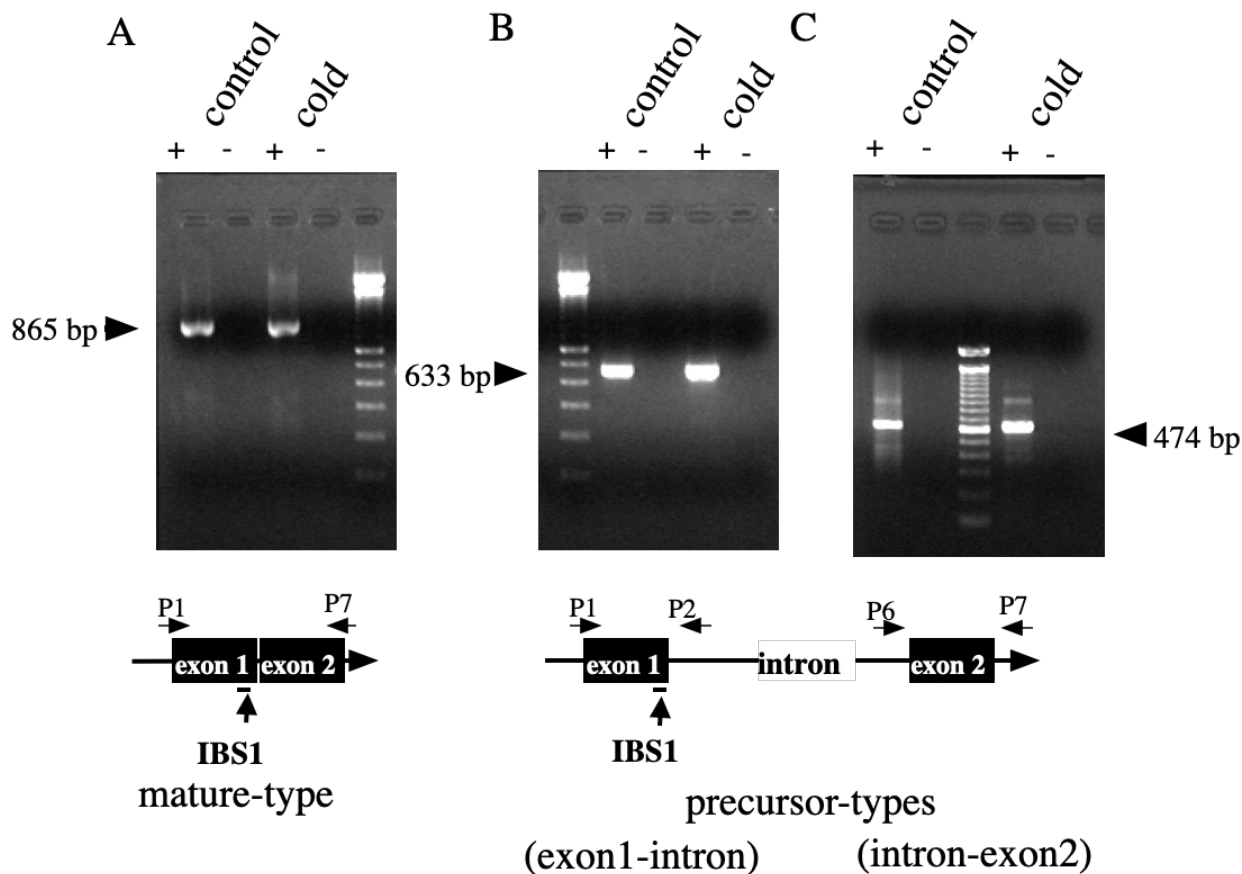


図8 RNAエディティング解析のためのコムギ*cox2*のRT-PCR

(A): 成熟転写物。プライマーP1とP7を使用；(B): エクソン1を含む前駆体転写物。プライマーP1とP2を使用；(C): エクソン2を含む前駆体転写物。プライマーP6とP7を使用。 control: 対照区（昼20°C/夜15°C）；cold:低温処理区（昼2°C/夜0.5°Cで7日）。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。IBS1: Intron Binding Site 1.

表3 コムギ*cox2*の各cDNAクローンにおけるのRNAエディティングの状態

エディティング部位																			エディティ ングの数	クローン 数
2	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
常温P1-P7																				
U	U	U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	16箇所	1		
U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	17箇所	23		
クローン数合計																		24		
低温P1-P7																				
C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	16箇所	1		
U	U	U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	16箇所	1		
U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	17箇所	22		
クローン数合計																		24		

エディティング部位						エディティ ングの数	クロー ン 数	エディティング部位											エディティ ングの数	クロー ン 数			
2	4	6	7	8	9			10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					
常温P1-P2								常温P6-P7															
C	C	C	C	C	C	0箇所	3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0箇所	2				
U	U	C	C	C	C	2箇所	1	C	C	C	C	C	U	C	C	C	C	1箇所	1				
C	C	U	U	U	C	3箇所	1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	1箇所	1				
C	U	C	U	U	U	4箇所	1	C	U	C	C	C	U	C	C	C	C	2箇所	1				
U	U	U	C	U	U	5箇所	1	U	U	U	C	C	C	C	C	C	C	3箇所	1				
U	U	U	U	U	C	5箇所	3	U	U	C	C	C	U	C	C	C	C	3箇所	1				
C	U	U	U	U	U	5箇所	3	U	U	C	C	C	C	C	U	U	U	6箇所	1				
U	U	U	U	U	U	6箇所	11	C	C	C	C	C	U	U	U	C	U	6箇所	1				
クローン数合計							24	C	U	U	U	U	U	C	U	C	U	C	7箇所	1			
								U	U	U	U	U	C	C	U	C	U	U	8箇所	1			
								U	U	U	U	U	U	U	U	C	U	C	9箇所	1			
								U	U	U	U	U	U	U	U	U	C	U	C	10箇所	2		
								U	U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	10箇所	1			
								C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	10箇所	1			
								U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	11箇所	8			
								クローン数合計											24				
低温P1-P2								低温P6-P7															
C	C	C	C	C	C	0箇所	3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0箇所	2				
C	U	C	C	C	C	1箇所	4	C	C	C	C	C	C	U	C	C	C	1箇所	1				
C	C	U	C	C	C	1箇所	1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	1箇所	1				
C	C	C	U	C	C	1箇所	1	C	U	C	C	C	C	C	C	C	U	C	2箇所	1			
C	C	C	C	U	C	1箇所	3	C	C	C	C	U	C	C	C	U	C	3箇所	1				
C	C	C	C	C	U	1箇所	1	U	C	C	C	C	C	C	U	C	U	4箇所	1				
C	U	C	C	U	C	2箇所	1	C	C	C	C	U	C	U	U	C	C	4箇所	1				
C	C	U	C	U	C	2箇所	1	U	C	C	C	C	U	C	U	C	U	5箇所	1				
C	C	C	U	U	C	2箇所	1	U	U	U	U	U	C	C	U	C	U	7箇所	1				
C	U	C	U	U	C	3箇所	1	C	U	U	U	C	U	U	C	U	C	7箇所	1				
C	C	U	U	U	C	3箇所	1	C	U	U	U	U	U	U	C	C	U	C	7箇所	1			
U	C	U	U	U	C	4箇所	2	C	U	U	U	U	C	U	U	C	C	U	7箇所	1			
C	U	U	U	U	C	4箇所	2	C	U	U	C	U	C	U	U	U	U	C	7箇所	1			
C	U	C	U	U	U	4箇所	1	C	U	U	U	C	U	U	U	C	U	U	8箇所	1			
U	U	U	U	U	C	5箇所	4	U	U	U	U	U	U	U	C	U	C	9箇所	1				
C	U	U	U	U	U	5箇所	1	U	U	U	C	U	U	U	C	U	U	9箇所	2				
U	U	U	U	U	U	6箇所	1	C	U	U	U	U	U	U	C	U	U	9箇所	1				
クローン数合計							29	C	U	U	C	U	U	U	U	U	U	9箇所	1				
								U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	10箇所	1				
								U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	10箇所	2				
								U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	11箇所	2				
								クローン数合計											25				

上の表：図8AのRT-PCR産物（成熟転写産物）をクローニングし、RNAエディティングの状態を解析した。；下の表：図8のBとCのRT-PCR産物（前駆体転写産物）をクローニングし、RNAエディティングの状態を解析した。エディティング部位のおおよその位置を図9Aに示す。常温：昼20°C/夜15°Cの区；低温：昼2°C/夜0.5°Cで7日低温処理した区。P1、P2、P6、およびP7：RT-PCRに用いたプライマー（図8参照）。エディティング部位9は、IBS1 (Intron Binding Site 1)上に位置する。

表4 コムギ*cox2*のcDNAクローンにおける、RNAエディティングの生じたサイト数ごとのクローン数

	0箇所	1箇所	2箇所	3箇所	4箇所	5箇所	6箇所	7箇所	8箇所	9箇所	10箇所	11箇所	12箇所	13箇所	14箇所	15箇所	16箇所	17箇所	合計
常温P1-P7																			
クローン数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	23	24
低温P1-P7																			
クローン数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	22	24

	0箇所	1箇所	2箇所	3箇所	4箇所	5箇所	6箇所	合計
常温P1-P2								
クローン数	3	0	1	1	1	7	11	24
低温P1-P2								
クローン数	3	10	3	2	5	5	1	29

	0箇所	1箇所	2箇所	3箇所	4箇所	5箇所	6箇所	7箇所	8箇所	9箇所	10箇所	11箇所	合計
常温P6-P7													
クローン数	2	2	1	2	0	0	2	1	1	1	4	8	24
低温P6-P7													
クローン数	2	2	1	1	2	1	0	5	1	5	3	2	25

表3から、エディティングの生じたサイト数ごとに該当クローンの数を数えた。上の表は成熟転写産物（図8AのRT-PCR産物）の結果、中央の表はエキソン1を含む前駆体転写産物（図8BのRT-PCR産物）の結果、下の表はエキソン2を含む前駆体転写産物（図8CのRT-PCR産物）の結果を示す。常温：昼20°C/夜15°Cの区；低温：昼2°C/夜0.5°Cで7日低温処理した区。P1、P2、P6、およびP7：RT-PCRに用いたプライマー（図8参照）。

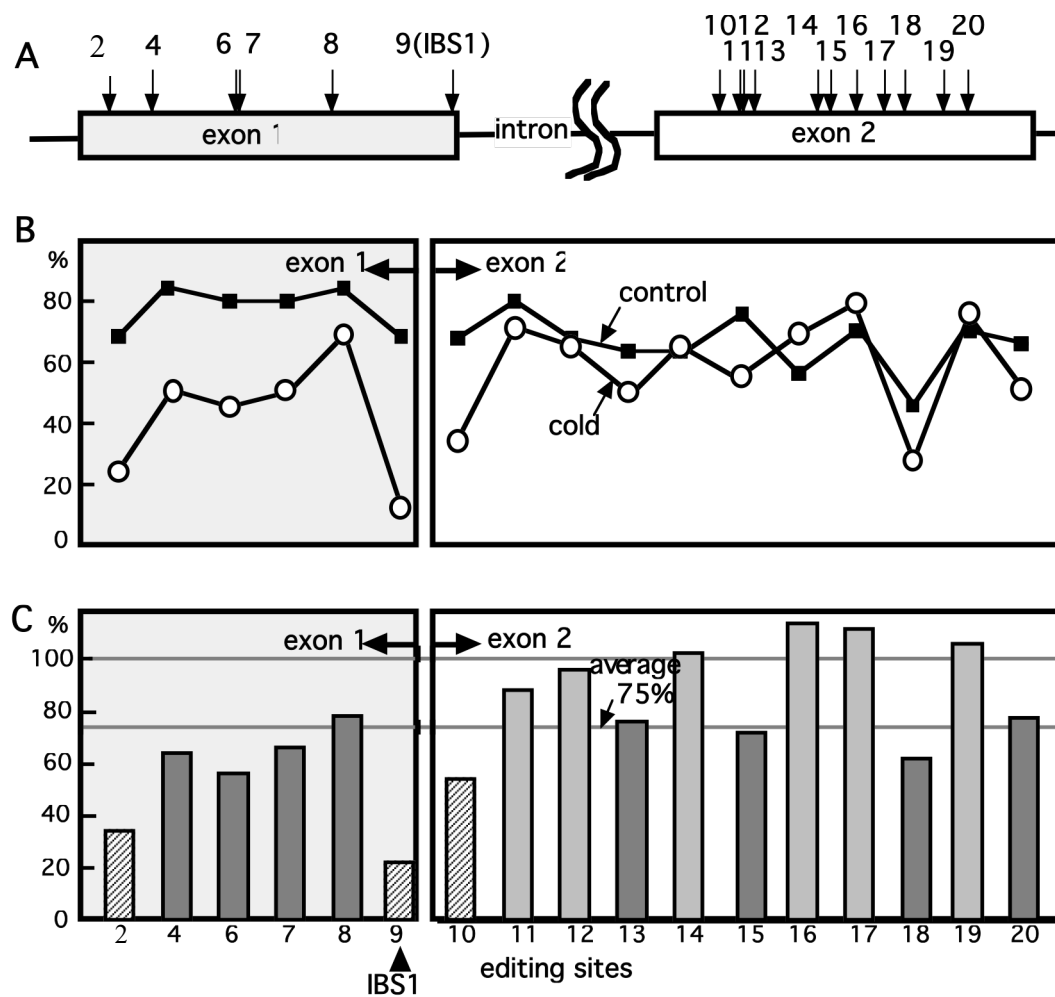


図9 (A) コムギ*cox2*のRNAエディティング部位 (Covello and Gray 1990)。IBS1: エディティングサイト9は、Intron Binding Site 1上に位置する。

(B) 対照区と低温処理区における、前駆体型転写物の17箇所でのRNAエディティング頻度 (%)。control: 昼20°C/夜15°C の区; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで7日低温処理した区。

(C) 低温処理がRNAエディティング頻度に及ぼす影響。常温区を100とした時の低温処理区のエディティング頻度 (%)。

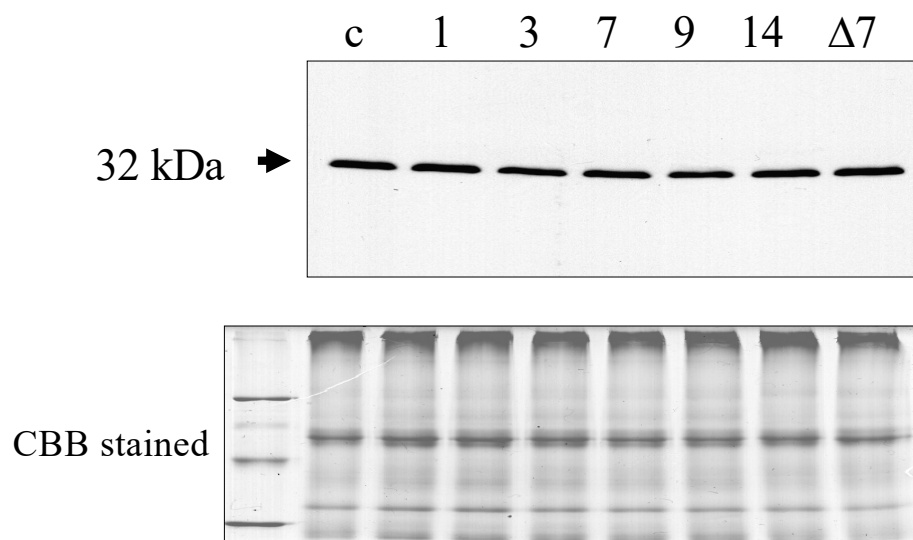


図10 コムギCOXIIタンパク質のウェスタン分析

タンパク質量20 μ gずつ泳動した。c: 対照区（昼20 $^{\circ}$ C/夜15 $^{\circ}$ C）；1, 3, 7, 9, 14: 低温処理区（昼2 $^{\circ}$ C/夜0.5 $^{\circ}$ Cで1日、3日、7日、9日、14日）； Δ 7: 14日間の低温処理の後、常温（昼20 $^{\circ}$ C/夜15 $^{\circ}$ C）に戻して7日置いた区。

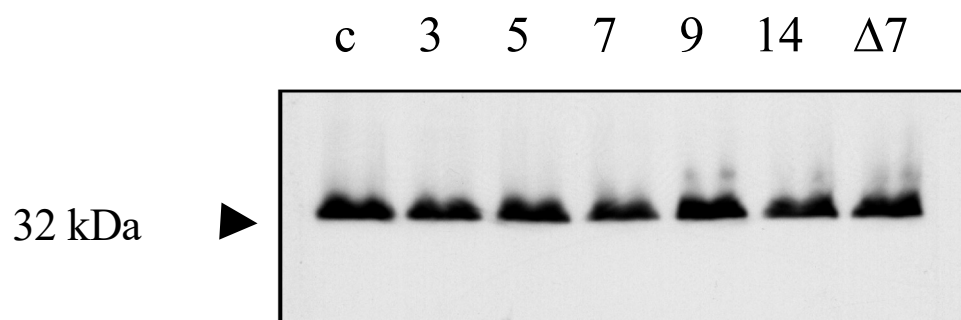


図11 暗黒条件下のコムギCOXIIタンパク質のウェスタン分析
 タンパク質量35 μ gずつ泳動した。c: 対照区（昼20 $^{\circ}$ C/夜15 $^{\circ}$ C）；3, 5, 7, 9, 14:低温処理区（昼2 $^{\circ}$ C/夜0.5 $^{\circ}$ Cで3日、5日、7日、9日、14日）； Δ 7: 14日間の低温処理の後、常温（昼20 $^{\circ}$ C/夜15 $^{\circ}$ C）で7日置いた区。

2. イネ *cox2* 遺伝子

1) 材料と方法

(1) 植物材料と育成条件

北海道立上川農業試験場育成イネ品種‘ほしのゆめ’を用いた。供試材料は播種後明条件で、常温 25℃で 3 葉期まで生育させた後、12℃もしくは 4℃の低温処理を行った。茎葉部を採取した。

(2) 全 RNA の抽出とノーザンハイブリダイゼーション

前節 1) – (2) に準ずる。

(3) RNA エディティング解析

cDNA は、逆転写酵素 Super Script III (Invitrogen 社、USA) を用いて合成した。PCR 増幅および塩基配列分析は、前節 1) – (3) (4) に準ずる。

RT-PCR 実験に用いたプライマーは、コムギ *cox2* 遺伝子解析に用いた P1、P2、P6 および P7 を用いた (図 1 B、巻末付表 1)。

(4) 3'末端に poly-A の付加した転写産物の定量的 RT-PCR

全 RNA を RNase-free DNase I (GE Healthcare Bio-Sciences 社、USA) を含む Assay Buffer (40mM Tris-HCl pH7.5, 10mM CaCl₂) に溶解し 30 分間 37℃でインキュベートした。cDNA は 20 µl の反応液中に 5 µg の全 RNA、500ng の oligo (dT)₁₂₋₁₈、200 units の逆転写酵素 SuperScript III (Invitrogen 社、USA) を用い、添付プロトコールに従い合成した。陰性対照区には逆転写酵素の代わりに滅菌水を用いた。PCR は、プライマーそれぞれ 4pmol、PCR 酵素 Hot start EX Taq (5units/µl、タカラバイオ社) 0.1µl (1unit)、dNTP それぞれ 4nmol、また、10×EX Taq buffer 2µl を、20µl 容量で反応させた。なお、反応に用いる cDNA の量は事前に検討した (図 15 下の説明文参照)。PCR の条件は、95℃で 2 分を 1 サイクル、次に 95℃で 30 秒、56℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 19~27 サイクル、最後に 72℃で 7 分を 1 サイクルとした。得られた PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色によりバンドを検出した。

プライマーに用いたオリゴヌクレオチドは、P43、P44、および P45 である (巻末付表 3)。位置と方向は図 15 に示す。

(5) 粗ミトコンドリア画分の単離とタンパク質濃度の測定
前節 1) – (6) に準ずる。

(6) ウェスタンブロット分析

粗ミトコンドリア画分 20 μ g ずつを用いた。他は、前節 1) – (8) に準ずる。

2) 結果

(1) 低温環境における *cox2* 遺伝子の転写パターン

低温環境下におけるイネ *cox2* 遺伝子の転写パターンを調べるため、14 日間の 12°C もしくは 4°C の低温処理と、処理後常温による回復栽培を行った。この間、逐次茎葉部を採取し、全 RNA を抽出した。イネ *cox2* はコムギと同様にイントロンを一つ保持する分断遺伝子であり、塩基配列の相同性も 98.8% である (Notsu et al. 2002) ので、コムギのプライマーやプローブを用いた解析が可能である。さらに前節のプローブ 2 種に加え、イネ全 DNA を鋳型にしてプライマー P6 と P7 で増幅させたイントロンの 3' 末端側 72bp とエキソン 2 を含むプローブ (以下、プローブ I-E2) を用意した。プローブ E1-I を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、2.6kb、1.3kb および 1.0kb の 3 種の転写産物にハイブリダイズした (図 12A)。同一の試料に対してプローブ I とプローブ I-E2 を用いたノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、それぞれ図 12B と図 12C に示す像を得た。プローブ I では 2.6kb 転写産物のみが検出されたのに対し、プローブ I-E2 ではプローブ E1-I と同じ 3 種類の転写産物が検出された。これらの結果より、2.6kb の転写産物はイントロンを含む *cox2* 遺伝子の前駆体転写産物であり、1.3kb と 1.0kb の転写産物はスプライシングを経た転写産物と考えられる。

12°C 処理を行った場合、2.6kb 転写産物のシグナル強度は、処理後 3 日目から上昇し始め、処理後 14 日では著しく高くなったが、常温に戻して 1 日後には、やや下降した。1.3kb の転写産物は、2.6kb の転写産物とは対照的に、処理日数に従ってやや下降し、常温に戻して 1 日後では上昇した。1.0kb の転写産物は、殆ど変化しなかった。シグナル強度の変動を、見かけ上変動の無い 1.0kb 転写産物のシグナル強度に対する百分率として示す (表 5)。その結果、2.6kb と 1.0kb 転写産物のシグナル強度比の百分率 (2.6/1.0 比) が低温処理により 13 から 59

へと 4.5 倍になったのに対し、1.3/1.0 比は対照区および全処理区を通じ、79 から 113 の間を推移した。

4℃処理を行った場合では、7 日後でも 14 日後でも 3 種の転写産物に変化は見られなかった。常温に戻して 1 日後では 2.6kb の転写産物のシグナル強度が上昇していた。

(2) 低温環境下のイネ *cox2* 遺伝子の RNA エディティング

イネ *cox2* 遺伝子のコード域には全部で 19 箇所の C から U への RNA エディティングが報告されている (図 14A; Notsu et al. 2002)。低温環境下のイネ *cox2* 遺伝子の RNA エディティングを調べるために、cDNA の塩基配列を分析した。3 葉期のイネに 12℃もしくは 4℃処理を 14 日間行い、全 RNA を抽出した。前節と同様に、成熟 mRNA、エキソン 1 を含む前駆体転写産物、およびエキソン 2 を含む前駆体転写産物に対応する cDNA を得た (図 13)。これらをクローン化し、成熟 mRNA に対応する cDNA については 10~11 クローン、前駆体転写産物に対応する cDNA についてはそれぞれ 20~24 クローンを解析した。

前節と同様にデータをまとめ、表 6 と 7 に示す。成熟 mRNA に対応する cDNA は、いずれの処理区においても 19 箇所全て T 残基のクローンが最も多く、1 ないし 3 箇所を除き全てエディティングを生じているクローンが残り占める (表 6-1、7)。前駆体転写産物のエキソン 1 については、常温区、12℃区および 4℃区で、それぞれ 16、15 および 14 種類のクローンが得られた (表 6-2)。エディティング部位数で分類した場合、各部位数に比較的平均にクローンが分布しているが、12℃および 4℃区では 9 箇所全てがエディティングされたクローンは無く、さらに 12℃区では 8 箇所エディティングされたクローンも無かった (表 7)。前駆体転写産物のエキソン 2 については、常温区、12℃区および 4℃区で、それぞれ 12、19 および 16 種類のクローンが得られた (表 6-2)。これらについても各部位数に比較的平均にクローンが分布しているが、エキソン 1 とは異なり、10 箇所全てにおいてエディティングを生じたクローンが 3 処理区より 1 個以上見つかった (表 7)。

解析した cDNA プールにおける各エディティング部位のエディティング頻度をグラフにまとめ、図 14B に示した。常温と 4℃処理区では大きな差異が見られなかったのに対し、12℃処理区ではサイト 9、サイト 15 およびサイト 12 における頻度の低下が顕著であり、逆にサイト 17 における頻度の上昇が顕著であ

った。サイト 9 は 12℃処理区では全くエディティングが生じていなかった。

(3) 低温環境における poly-A 付加転写産物量の変化

原核生物、葉緑体およびミトコンドリアでは転写産物の 3'末端に付加された poly-A が転写産物の分解促進シグナルとなることが知られている (O'Hara et al. 1995; Kudla et al. 1996; Gagliardi and Leaver 1999)。そこで、低温に伴う poly-A 付加転写産物の増減を半定量的 RT-PCR により調査した。12℃で 14 日間処理したイネ茎葉部の RNA と、対照となる常温育成イネの茎葉部由来 RNA を以下のような解析に供した。

3'末端に poly-A が付加され、イントロンを含む転写産物を標的として、プライマー P43 と P44 (図 15 左、巻末付表 3) を用い、鋳型 RNA 量を 125ng とし、19~27 サイクルまで、2 サイクルずつ変化させた PCR を行った。その結果、低温・常温いずれの区も 21~27 サイクルまで PCR サイクル数に応じた PCR 産物の増加が認められた (図 15 上)。両処理区由来の増幅産物を比較したところ、低温処理区では常温区の 2~4 倍の割合で増加していると考えられた (図 15 上)。

次に、3'末端に poly-A が付加されたスプライシングを経ている転写産物を標的として、プライマー P43 と P45 (図 15 左、巻末付表 3) を用い、鋳型 RNA 量を 12.5ng とし、19~27 サイクルまで、2 サイクルずつ変化させた PCR を行った。その結果、いずれの区も 21~27 サイクルまで PCR サイクル数に応じた PCR 産物の増加が認められた (図 15 下)。両区由来の増幅産物を比較すると、低温処理区の PCR 産物は、同一 PCR 条件下で常温区よりも若干少ないことがわかった (図 15 下)。

(4) 低温環境におけるイネ COXII ポリペプチドの蓄積

低温環境におけるイネ COXII ポリペプチドの蓄積量を調べるため、3 葉期のイネに 14 日間の 12℃もしくは 4℃処理を行い、逐次茎葉部を採取した。試料をウェスタン分析に供したところ、コムギと同様に見かけの分子量約 32kDa のシグナルが検出され、COXII ポリペプチドを特異的に検出したと考えられた (図 16)。シグナルバンドの強度は 12℃および 4℃区において変化はなかった (図 16)。

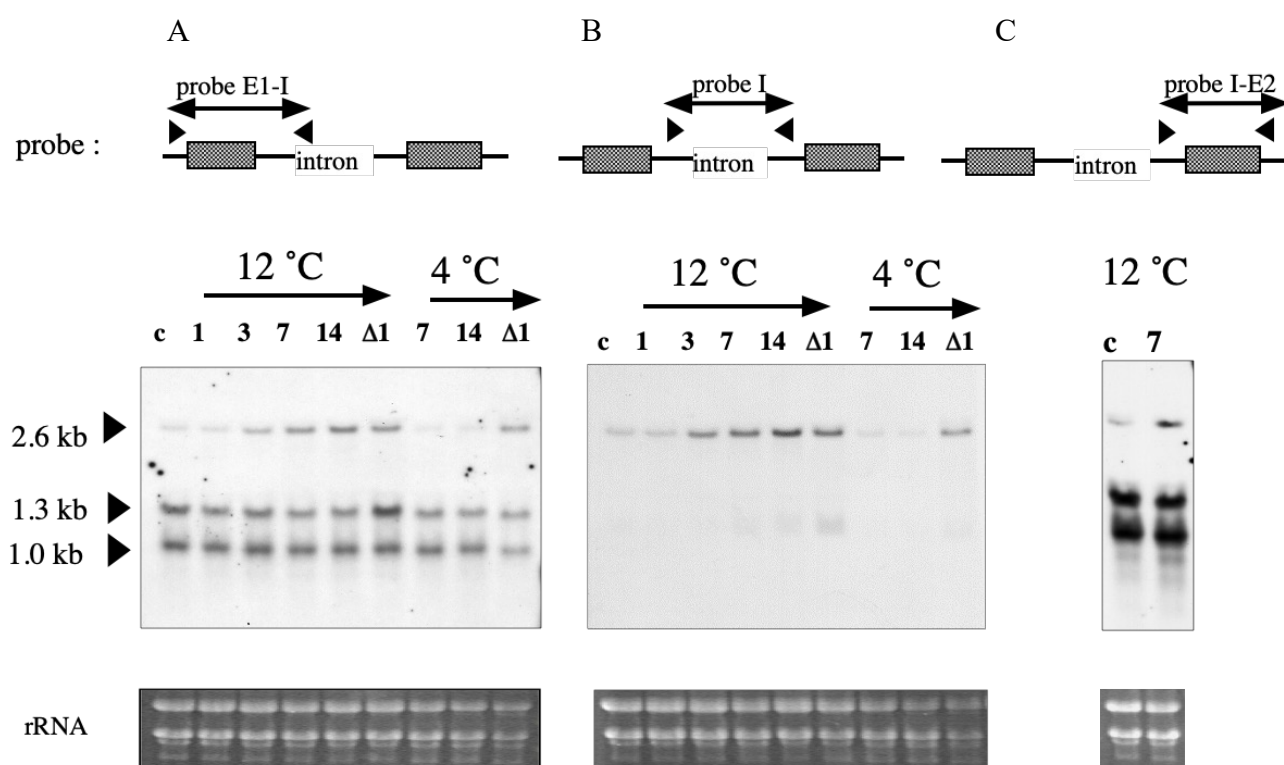


図12 イネ*cox2*のノーザン解析

全RNA20μgずつ泳動した。(A) プローブE1-Iを用いた分析 (B) プローブIを用いた分析 (C) プローブI-E2を用いた分析。c: 対照区 (25°C) ; 1, 3, 7, 14: 低温処理 (12°Cまたは4°C) 1日、3日、7日、および14日間; Δ1: 低温処理14日間施した後、常温 (25°C) で1日回復させた区。

表5 12°C低温環境下のイネ*cox2*シグナル強度比

低温処理日数	c	1	3	7	14	Δ1
2.6-kb : 1.0-kbのシグナル強度比 ×100	13	14	29	44	59	44
1.3-kb : 1.0-kbのシグナル強度比 ×100	97	85	82	79	81	113

数値は、Multi-Analyst (Bio-Rad laboratories社、USA) により、図12Aの2.6kb、1.3kb、および1.0kbの転写産物のシグナル強度を数値化し、見かけの蓄積量が一定の1.0kbの転写産物を各処理区の内部対照として、2.6kb vs. 1.0kb、および1.3kb vs. 1.0kbのシグナルバンド強度比を百分率で表している。1, 3, 7, 14: 低温処理 (12°C) 1日、3日、7日、および14日間; Δ1: 低温処理14日間施した後、常温 (25°C) で1日回復させた区。

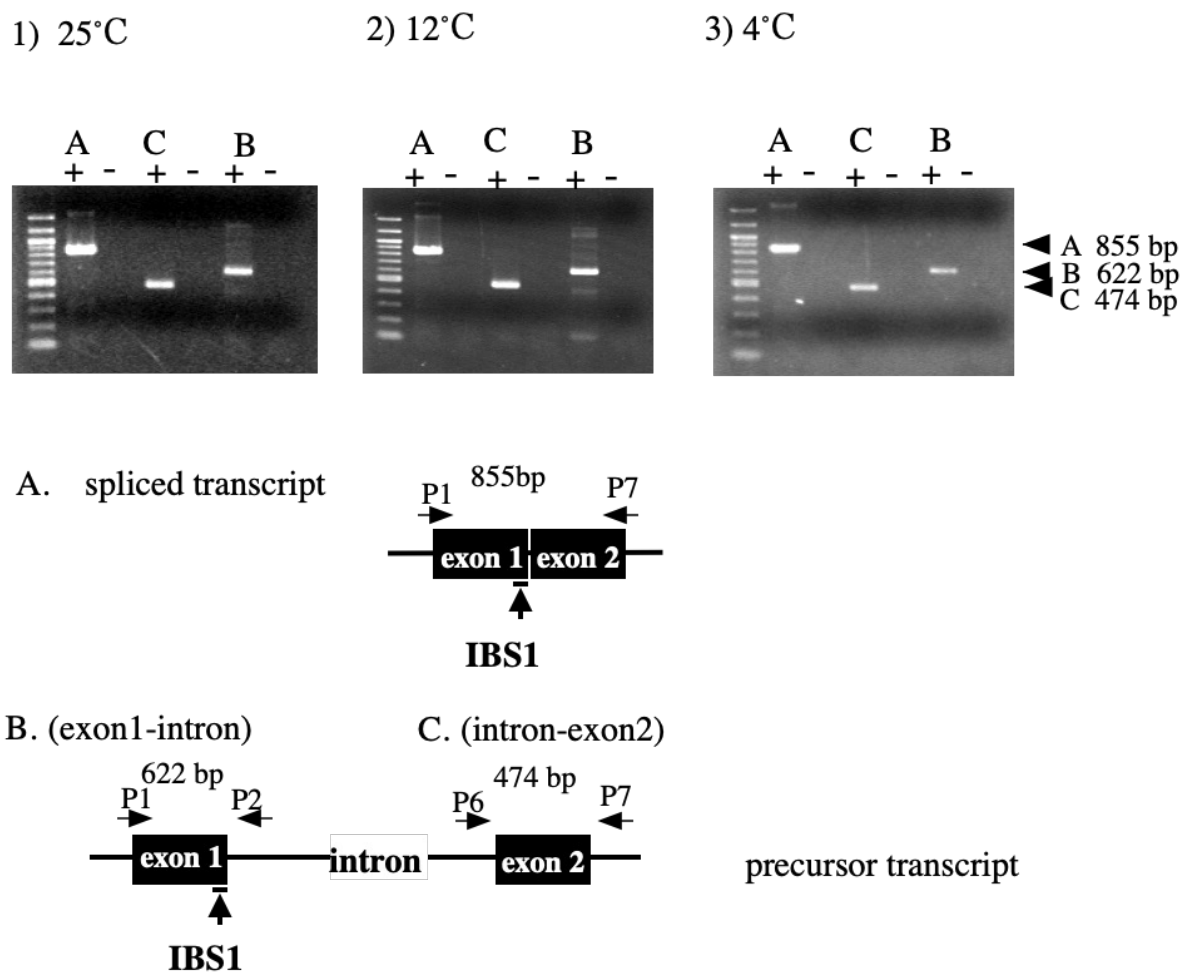


図13 RNAエディティングの解析のためのイネ*cox2*のRT-PCR

1) 25°C: 常温区 ; 2) 12°C: 12°Cで14日間の低温処理を施した区; 3) 4°C: 4°Cで14日間の低温処理を施した区。(A) スプライシングを経た転写物 ; (B) エクソン1を含む前駆体型転写物 ; (C) エクソン2を含む前駆体型転写物。+: 逆転写酵素を使用した区 ; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。右はRT-PCR産物のサイズを示す。 IBS1: Intron Binding Site 1.

表6-1 イネ*cox2*の各cDNAクローンにおけるのRNAエディティングの状態（スプライシング完了転写産物）

		エディティング部位																				エディティ ングの数	クローン 数
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20			
常温	P1-P7	U	C	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	17箇所	1
		U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	U	18箇所	1
		U	U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	18箇所	1
		U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	18箇所	2
		U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	19箇所	5
		クローン数合計																				10	
12℃	P1-P7	U	C	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	16箇所	1
		U	C	U	U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	17箇所	2
		U	U	U	U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	18箇所	1
		U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	18箇所	1
		U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	19箇所	5
		クローン数合計																				10	
4℃	P1-P7	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	C	C	U		17箇所	1
		U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	18箇所	2
		U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	19箇所	8
		クローン数合計																				11	

図13中のAのRT-PCR産物（スプライシング完了した転写産物）をクローニングし、RNAエディティングの状態を解析した。常温：25℃の常温区; 12℃:12℃で14日低温処理した区; 4℃:4℃で14日低温処理した区。エディティング部位のおおよその位置を図14Aに示す。P1とP7はRT-PCRに用いたプライマーを示す（図13参照）。

表6-2 イネ*cox2*の各cDNAクローンにおけるのRNAエディティングの状態（前駆体転写産物）

エディティング部位												エディティング部位											
										エディティ ングの数	クロー ン数											エディティ ングの数	クロー ン数
1	2	3	4	5	6	7	8	9			10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
常温 P1-P2												常温 P6-P7											
C	C	C	C	C	C	C	C	C	0箇所	5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0箇所	5
C	C	C	U	C	C	C	C	C	1箇所	1	C	C	C	C	U	C	C	C	C	C	C	1箇所	1
C	C	C	C	C	C	C	C	C	1箇所	1	U	C	C	C	U	C	C	C	C	C	C	2箇所	1
C	C	C	C	C	C	U	C	C	2箇所	1	U	C	C	C	U	C	U	C	C	C	C	3箇所	1
C	C	C	U	C	C	C	C	U	3箇所	1	C	U	U	U	U	U	C	C	C	C	C	5箇所	2
C	C	U	U	C	U	C	U	C	4箇所	1	U	C	C	C	U	U	U	C	C	U	U	6箇所	1
C	C	C	U	C	C	C	U	C	4箇所	1	U	U	U	U	U	U	U	C	C	C	C	7箇所	1
U	C	C	U	C	U	U	U	C	5箇所	1	U	U	U	U	U	U	U	C	U	C	U	8箇所	2
U	C	C	U	U	U	U	U	C	6箇所	2	U	U	U	U	U	U	U	C	C	U	U	8箇所	1
U	C	U	U	C	U	U	C	U	6箇所	1	U	U	U	U	U	U	U	U	C	U	U	9箇所	3
U	U	U	U	C	U	U	U	C	7箇所	2	U	U	U	U	U	U	U	C	C	U	U	9箇所	1
U	C	U	U	U	U	U	U	C	7箇所	1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	10箇所	2
U	C	U	U	C	U	U	U	U	7箇所	1											クローン数合計	21	
C	C	U	U	U	U	U	U	U	7箇所	3													
U	C	U	U	U	U	U	U	U	8箇所	1													
U	U	U	U	U	U	U	U	U	9箇所	1													
クローン数合計										24													
12℃ P1-P2												12℃ P6-P7											
C	C	C	C	C	C	C	C	C	0箇所	2	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	1箇所	2
C	C	C	U	C	C	C	C	C	1箇所	1	C	C	C	U	C	C	C	C	C	C	C	1箇所	2
C	C	C	C	C	C	C	C	C	1箇所	1	U	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	2箇所	1
C	C	C	U	C	U	C	C	C	2箇所	1	U	C	C	C	C	C	C	U	C	C	C	2箇所	1
U	C	C	U	C	C	C	C	U	3箇所	1	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	U	2箇所	1
C	C	C	U	C	U	U	C	C	3箇所	1	U	U	C	U	C	C	C	U	C	C	C	4箇所	1
C	C	C	U	C	C	C	U	C	3箇所	1	U	C	C	U	U	C	C	U	C	C	C	4箇所	1
U	C	C	U	C	U	C	U	C	4箇所	1	U	C	C	C	U	U	C	U	C	C	C	4箇所	1
C	C	C	U	C	U	U	U	C	4箇所	2	U	C	C	C	U	C	U	U	C	C	C	4箇所	1
U	U	U	U	C	C	C	C	C	5箇所	1	U	U	U	U	C	C	C	C	U	C	C	5箇所	1
U	C	C	U	C	U	U	U	C	5箇所	3	U	U	U	U	C	C	C	C	C	C	U	5箇所	1
C	C	U	U	C	U	U	U	C	5箇所	1	U	U	C	U	U	C	C	C	C	C	U	5箇所	1
C	C	C	U	U	U	U	U	C	5箇所	1	U	U	U	U	U	C	U	U	C	C	C	7箇所	1
U	C	U	U	C	U	U	U	C	6箇所	2	U	C	C	U	U	U	U	C	C	U	U	7箇所	1
U	C	U	U	U	U	U	U	C	7箇所	4	U	U	U	U	U	C	U	U	C	U	U	8箇所	1
クローン数合計										23	U	C	C	U	U	U	U	U	U	U	U	8箇所	1
											C	U	C	U	U	U	U	U	C	U	U	9箇所	1
											U	U	C	U	U	U	U	U	U	U	U	10箇所	1
クローン数合計											クローン数合計											21	
4℃ P1-P2												4℃ P6-P7											
C	C	C	C	C	C	C	C	C	0箇所	5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0箇所	3
C	C	C	U	C	C	C	C	C	1箇所	1	C	C	C	C	U	C	C	C	C	C	C	1箇所	1
U	C	C	C	C	C	C	C	C	2箇所	1	U	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	2箇所	1
C	C	C	U	C	C	C	U	C	2箇所	1	C	U	U	U	C	C	C	C	C	C	C	3箇所	1
C	C	C	U	C	C	C	C	U	2箇所	1	U	U	U	U	C	C	C	U	C	C	C	5箇所	1
U	C	C	U	U	C	C	C	C	3箇所	1	U	C	C	C	U	U	U	C	C	C	C	5箇所	1
C	C	C	U	C	U	C	U	C	3箇所	1	U	C	C	C	U	U	U	C	C	C	U	5箇所	1
C	C	C	U	C	C	U	U	C	3箇所	1	U	C	C	C	U	U	C	C	U	U	U	5箇所	1
C	C	U	U	C	C	C	U	U	4箇所	1	U	C	C	C	U	C	U	C	C	U	U	5箇所	1
U	C	C	U	C	C	C	C	U	5箇所	2	U	U	U	U	U	U	C	C	C	C	C	6箇所	1
U	C	U	U	C	U	U	U	C	6箇所	2	U	U	U	U	U	U	U	C	C	C	C	7箇所	1
U	U	U	U	U	U	U	U	C	8箇所	1	U	C	C	U	U	U	U	C	U	C	U	7箇所	1
U	U	U	U	C	U	U	U	U	8箇所	2	U	U	U	U	U	U	U	C	U	C	U	8箇所	1
U	C	U	U	U	U	U	U	U	8箇所	2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	C	U	9箇所	2
クローン数合計										22	U	U	U	U	U	U	U	C	U	U	U	9箇所	2
											U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	10箇所	1
クローン数合計											クローン数合計											20	

図13中のBとCのRT-PCR産物（前駆体転写産物）をクローニングし、RNAエディティングの状態を解析した。常温：25℃の常温区; 12℃:12℃で14日低温処理した区; 4℃:4℃で14日低温処理した区。エディティング部位のおおよその位置を図14Aに示す。P1、P2、P6、およびP7はRT-PCRに用いたプライマーを示す（図13参照）。

表7 イネ*cox2*のcDNAクローンにおける、RNAエディティングの生じたサイト数ごとのクローン数

	0箇所	1箇所	2箇所	3箇所	4箇所	5箇所	6箇所	7箇所	8箇所	9箇所	10箇所	11箇所	12箇所	13箇所	14箇所	15箇所	16箇所	17箇所	18箇所	19箇所	合計
常温P1-P7																					
クローン数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	5	10
12℃ P1-P7																					
クローン数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	5	10
4℃ P1-P7																					
クローン数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	8	11

	0箇所	1箇所	2箇所	3箇所	4箇所	5箇所	6箇所	7箇所	8箇所	9箇所	合計
常温P1-P2											
クローン数	5	2	1	1	2	1	3	7	1	1	24
12℃ P1-P2											
クローン数	2	2	1	3	3	6	2	4	0	0	23
4℃ P1-P2											
クローン数	5	1	3	3	1	2	2	0	5	0	22

	0箇所	1箇所	2箇所	3箇所	4箇所	5箇所	6箇所	7箇所	8箇所	9箇所	10箇所	合計
常温P6-P7												
クローン数	5	1	1	1	0	2	1	1	3	4	2	21
12℃ P6-P7												
クローン数	0	4	3	0	4	3	0	2	3	1	1	21
4℃ P6-P7												
クローン数	3	1	1	1	0	5	1	2	1	4	1	20

表6から、エディティングの生じたサイト数ごとに該当クローンの数を数えた。上の表はスプライシングを完了した転写産物（図13AのRT-PCR産物）の結果、中央の表はエキソン1を含む前駆体転写産物（図13BのRT-PCR産物）の結果、下の表はエキソン2を含む前駆体転写産物（図13CのRT-PCR産物）。常温：25℃の区; 12℃: 12℃で14日低温処理した区; 4℃：4℃で14日低温処理した区。P1、P2、P6、およびP7：RT-PCRに用いたプライマー。

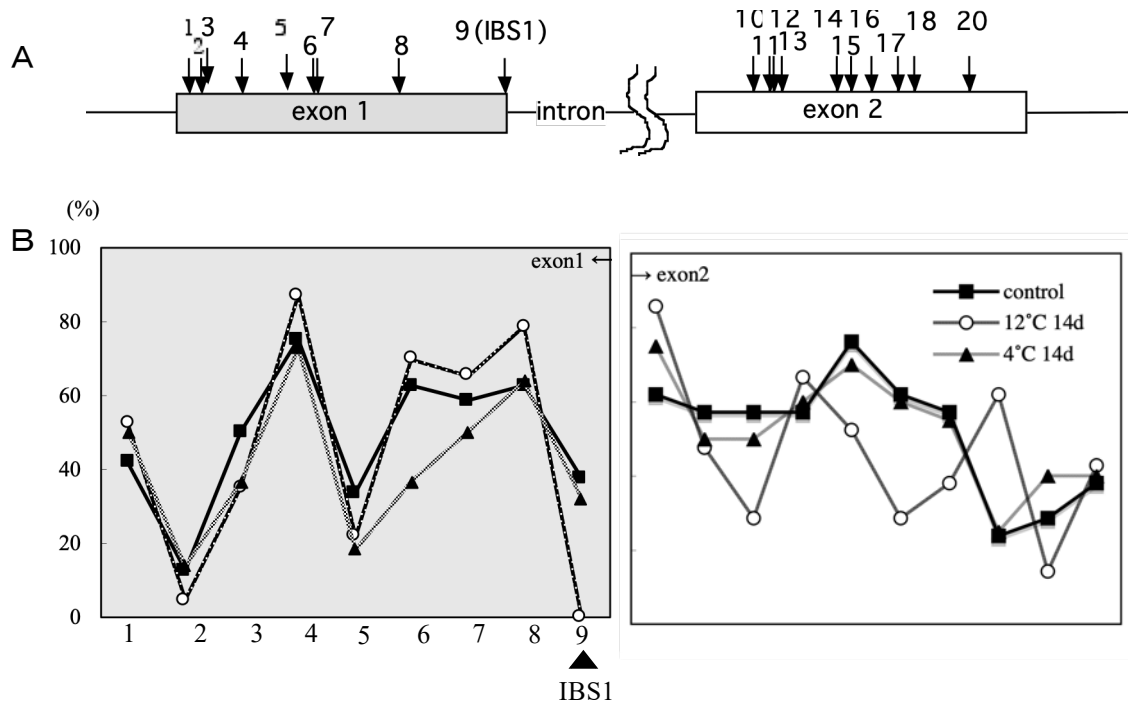


図14 (A) イネ *cox2* のRNAエディティングサイト (Notsu et al. 2002)

IBS1: エディティング部位9は、Intron Binding Site 1上に位置する。

(B) 前駆体型転写物の、19箇所のRNAエディティング頻度 に及ぼす低温の影響

対照区は25°C

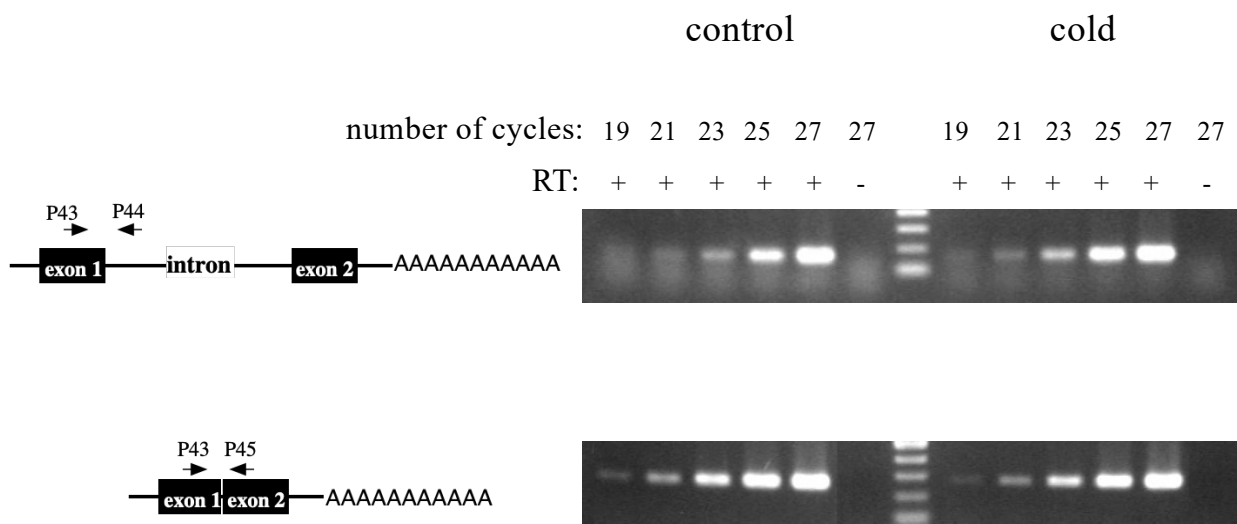


図15 3'末端にpoly-Aの付加したイネ*cox2*転写産物の定量的RT-PCR

control: 25°C; cold: 12°Cで14日間低温処理。予備実験として、PCRサイクル数を25に固定し、鋳型RNA量に対するPCR産物量のカイネティクスを調べた。25サイクルにおいて指数増加期のPCR産物量に基づき、cDNA合成に用いる全RNA量を前駆体転写産物（上）では125ng、スプライシングの完了した転写産物（下）では12.5ngと決定した。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

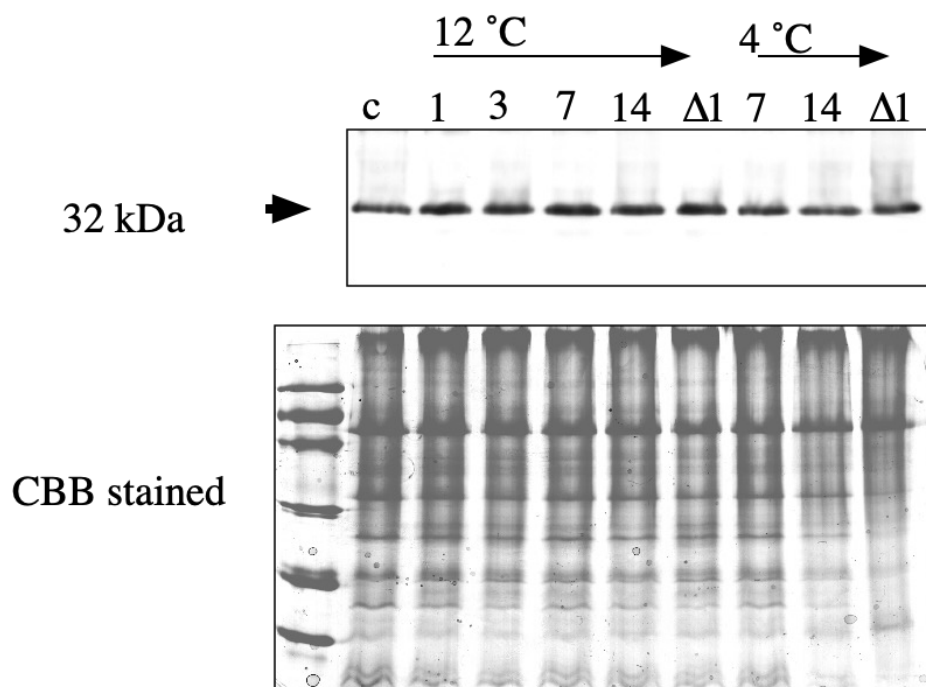


図16 イネCOXIIタンパク質のウェスタン分析

タンパク質量20 μ gずつ泳動した。c: 対照区 (25 $^{\circ}$ C) ; 1, 3, 7, 14: 低温処理区 (12 $^{\circ}$ Cまたは4 $^{\circ}$ Cで1日、3日、7日、14日) ; Δ 1: 14日間の低温処理の後、常温 (25 $^{\circ}$ C) で1日回復栽培した区。

3. 考察

本章では低温環境における植物ミトコンドリア遺伝子発現のモデルケースとして、コムギとイネの *cox2* の解析を行った。コムギ *cox2* 遺伝子に関しては、転写や RNA プロセッシングに関する解析例が多数報告されている (Hanic-Joyce and Gray 1991; Covello and Gray 1989, 1990; Gualberto et al. 1989) が、イネに関しては RNA エディティング部位の決定 (Notsu et al. 2002) を除いて転写解析例は無い。本研究で検出したコムギ *cox2* の 2 種類の転写産物は、Bonen et al. (1984) が報告した主要な 2 種類の転写産物と大きさが一致する。おそらく Hanic-Joyce and Gray (1991) が同定した翻訳開始コドンから -170nt に位置する転写開始点より、2.7kb 前駆体が転写され、これよりイントロン (1,217nt) が切り出され 1.5kb 成熟 mRNA になると思われる。一方、イネについてはイントロンを含む 2.6kb 転写産物と、イントロン (1,275nt) を含まない 1.3 および 1.0kb 転写産物が検出された。2.6kb 転写産物は前駆体と思われるものの、1.3 および 1.0kb 転写産物については、どちらか一方のみが成熟 mRNA なのか、あるいは両方が翻訳反応に寄与するのか不明である。今後、これらの転写産物を詳細に特徴づけることが必要である。一方、RNA エディティングに関しては興味深い共通パターンが明らかになった。すなわち、コムギとイネにおいて温度条件にかかわらずエキソン 1 のサイト 2、および 9 は他の部位よりもエディティングされる頻度が低い。同様の結果はトウモロコシ、ペチュニアあるいはテンサイの *cox2* でも報告されており (Yang and Mulligan 1991; Sutton et al. 1991; Estiati 2000)、被子植物 *cox2* に普遍的な現象かも知れない。ところで Verbitskiy et al. (2006) によれば部分的にエディティングが生じた転写産物はエディティング中間体であることから、得られた cDNA クローンはエディティングの過程を表していると考えられる。それ故、これら 3 つの部位がエディティングを生じる順序は他の部位よりも後である傾向が強いと見て良い。エディティングの順序が 3' から 5' 方向へ厳密に決まっているトリパノソーマ (Kable et al. 1996) とは異なり、被子植物ミトコンドリアでは、RNA エディティングの順序を示す報告は見あたらないので、本研究で見いだした現象は特異な例である。

コムギやイネにおいて一定期間の低温の遭遇は、*cox2* 転写産物のサイズには影響を与えないが、前駆体転写産物の蓄積量を大きく変えることがわかった。低温と *cox2* 発現との関連性に着目した解析例がこれまでにないため、これが普遍

的な現象か否かは不明であるが、供試したコムギ品種全てで前駆体の蓄積が観察されたこと、同じイネ科作物でも熱帯起源のイネで半乾燥冷涼地域起源のコムギと同様の現象が見つかったことは興味深い。ただし、イネにおける 4℃処理では前駆体の蓄積増は起こらず、常温に戻した回復栽培の初期に初めて蓄積増が起るため、*cox2* 前駆体の増加は低温で特異的に生ずるというよりは、むしろ低温によって引き起こされる何らかのストレスに二次的に応答している可能性をまず検証すべきであろう。関連して、低温とは無関係にコムギ発芽時に *cox2* 前駆体転写産物の蓄積量に変動するという報告があり (Li-Pook-Than et al. 2004)、興味深い。

低温に伴うストレスを明らかにするため、本章ではいくつかの低温に関連すると思われるストレスについて *cox2* 前駆体転写産物との関連を調査した。低温によって乾燥が進んだ植物体は、塩ストレスと同様に浸透圧ストレスが徐々に高まると考えられ (Kacperska 1993; 吉田ら 1998)、この過程では ABA が浸透圧ストレスのシグナル伝達に関わることが知られている (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki 2005)。ところが、本実験では、乾燥、NaCl および ABA 処理はいずれも *cox2* 前駆体転写産物の増加を引き起こさなかった。このことから、*cox2* 前駆体転写産物の増加は浸透圧ストレスと直接関係ない可能性が高い。今後、低温や乾燥以外の生理的条件を幅広く探索し、*cox2* 転写パターンを調査する必要がある。

前駆体として転写された *cox2* 転写産物は、RNA エディティングとスプライシングを経て成熟 mRNA になるので、前駆体蓄積量の調節は転写、RNA プロセッシング、あるいは RNA 安定性の段階で行われると思われる。低温による前駆体の蓄積がいかなる機構で生ずるのかは現時点では推測の域を出ないが、得られたデータより考察してみたい。

第一に考えられるのは、転写の上昇もしくは前駆体分解活性の低下である。RNA エディティングパターンに関して観察された現象は、低温処理区で基質となる前駆体 RNA が 4 倍に増加してプロセス途上のエディティング中間体が出現し、それらの多くでエディティング順序が後になるエディティング部位 2、5 および 9 のエディティング反応が未完遂と解釈するなら実験結果とよく符合する。ただし、低温環境下において、poly-A を介した RNA 分解機構がイネ *cox2* 前駆体蓄積増加に関与しているか否かを検討したところ、低温環境下で poly-A 付加前駆体転写産物は 2~4 倍の増加、成熟 mRNA ではやや減少と見積もられ

た。ノーザン解析による前駆体転写産物増加は 4.5 倍とほぼ同程度の増加であることを考慮すると、poly-A を介した RNA 分解機構が低温環境における前駆体転写産物の増加に積極的に関与していると結論することは出来ない。

一方、RNA プロセッシング活性低下の可能性については、成熟 mRNA の蓄積量に変化していないことから主要因と断定することはできない。前駆体蓄積増に伴う RNA エディティング頻度の低下は、次章で検討するように、少なくとも他のミトコンドリア遺伝子でも認められる普遍的現象ではない。ただし、第 IV 章で明らかにするように核コードのスプライシング因子の不全が示唆されるため、いくつかの複合要因により前駆体蓄積が引き起こされている可能性も残る。

低温による *cox2* 前駆体転写産物の蓄積増は、成熟 mRNA や翻訳産物に殆ど影響を与えないことから、この現象の生物学的意義は不明である。これについては、他のミトコンドリア遺伝子の解析結果とあわせ、総合考察で論議する。

III 章 グループ II インترونを持つミトコンドリア遺伝子の発現

コムギとイネのミトコンドリア遺伝子には、それぞれ合計して 22 個と 23 個のグループ II インترونがある（表 8、9; Ogihara et al. 2005; Notsu et al. 2002）。このうち、イントロンを一つだけ保持するのが、*cox2*、*rps3*、*rpl2*（コムギでは偽遺伝子）および *ccmFc* で、*nad1*、*nad2*、*nad4*、*nad5* および *nad7* は複数個のイントロンで分断されている。第 II 章では *cox2* 前駆体転写産物蓄積量が低温処理に伴い増大することが分かった。本章では、それ以外の分断遺伝子の発現について低温の影響を調査した。イントロンを一つだけ保持する遺伝子については第 II 章と同様のアプローチを採り、複数のイントロンを保持する遺伝子については異なる手法を採用した。また、第 II 章で見つかった前駆体蓄積に伴う RNA エディティング頻度の変化について普遍性を探るため、イネ *nad5* と *nad7* を対象に調査した。

1. 1 個のイントロンで分断される遺伝子の発現解析

1) 材料と方法

(1) 植物材料

コムギは北海道立北見農業試験場育成の‘チホクコムギ’を用いた。昼 20°C / 夜 15°C、光量子密度 $400 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長 15 時間の条件で 2 葉期まで育てた。低温処理は昼 2.0°C / 夜 0.5°C、光量子密度 $200 \mu \text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長 8 時間で 14 日間行った。その後常温下の回復栽培を 7 日間行った。暗黒下における黄化植物体育成は、催芽種子を暗黒下において 20°C で 7 日間 1 葉期まで生育させ、低温処理は 2.8°C で 5 日間行った。

イネは北海道立上川農業試験場育成の‘ほしのゆめ’を用いた。低温処理は第 II 章に準じて行った。

いずれも茎葉部を採取した。

(2) コムギのミトコンドリアの単離とタンパク質濃度の測定、およびミトコンドリア DNA の抽出

ミトコンドリアの単離は、Boutry らの方法 (1984) と Newton の方法 (1994) を参考にして、以下のように行った。氷冷したブレンダーのカップに 4°C の MOPS buffer (0.4M Mannitol, 25mM MOPS, 1mM EGTA, 4mM Cysteine

0.2% Bovine serum albumin / pH7.8 by KOH)を 270ml 注ぎ、低温処理を 5 日間行った黄化コムギの茎葉部 30g を 5~8mm 幅に刻んで入れて粉碎した。4 重のミラクロースで濾過した後、濾液を 4°C/1,000×g/1 分、さらに 4°C/2,000×g/10 分で遠心して沈殿物を捨てた。上清を 4°C/10,000×g/15 分で遠心し沈殿を得た。上清を除去し、沈殿に MOPS buffer を加え懸濁し、4°C/2,000×g/15 分で遠心し沈殿物を捨て、さらに上清を 4°C/10,000×g/20 分で遠心し、沈殿を粗ミトコンドリア画分とした。上清を取り除き、沈殿を 2ml の MOPS buffer に懸濁した。懸濁液を、45、26、および 13.5% Percoll (v/v)不連続密度勾配 (0.25M Sucrose、0.5% Bovine serum albumin、10mM MOPS / pH7.3 by HCl) に重層し、スィングローター (Hitachi SRP28SA) を用い 4°C/27,000×g/90 分で遠心した。45%と 26%の境界面を回収し、3 倍量の Mt dilution buffer (0.3M Mannitol, 10mM Tricine, 1mM EGTA / pH7.3 by KOH)を加えてゆっくり混ぜた。4°C/10,000×g/20 分で遠心し上清を除き、粘度の高い精製ミトコンドリア懸濁液を得た。

30 μ l のミトコンドリア懸濁液に 370 μ l の TE buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 20mM EDTA)、100 μ l の 10% N-Lauroylsarcosine Sodium Salt (w/v)、および 5 μ l の 20mg/ml Proteinase K を加え 37°Cで一晩インキュベートした。その後、等量の Phenol : Chloroform : Iso-Amyl Alcohol (25 : 24 : 1 mixed, pH7.9) を加えて除タンパクを行い、核酸をエタノール沈殿させた。さらに、RNase A 処理を行い、再度 Phenol : Chloroform : Iso-Amyl Alcohol 抽出とエタノール沈殿を行ってミトコンドリア DNA を得た。

(3) PCR

コムギ *rps3* 遺伝子の単離には BD Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories Inc. USA)を用い、95°Cで 1 分を 1 サイクル、次に 94°Cで 30 秒、68°Cで 3 分を 30 サイクル、68°C3 分を 1 サイクル、70°Cで 10 分を 1 サイクルというプログラムで PCR を行った。

(4) 塩基配列決定と解析

塩基配列決定は第 II 章に準ずる。塩基配列解析は、アプリケーション・ソフトウェア Genetyx -Mac ver.13 (ジェネティックス社) を用いて行った。

(5) 全 RNA の抽出とノーザン解析

全 RNA は、Trizol 試薬 (Invitrogen 社、USA) を用いて抽出した。RNA の泳動、ブロッティング、ハイブリダイゼーションおよび検出は、第 II 章に準ずる。

(6) オリゴヌクレオチド

用いたオリゴヌクレオチド P8~P19 を巻末付表 1 に示す。位置と方向を図 17、18 もしくは 19 に示す。

(7) ウェスタン分析

Bradford のマイクロアッセイ法 (Bradford 1976) を用いて、得られた精製ミトコンドリア懸濁液のタンパク質濃度を測定し、10 μ g のタンパク質を用い、第 II 章に準じて行った。転写後のメンブレンを Ponceau S 染色液 (1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) 酢酸) で染色した。コムギ CCMFc 抗体は Giegé et al. (2004) による。

2) 結果

(1) コムギ *rps3* 遺伝子のクローン化

実験を開始した 2003 年にはコムギ *rps3* 遺伝子の塩基配列情報がなかったもので、イネ *rps3* 遺伝子の塩基配列情報 (Nakazono et al. 1995; DDBJ/EMBL/GenBank データベースのアクセッション番号 D21251) をもとにその単離を試みた。イネの配列をもとに 5'非翻訳領域と 3'非翻訳領域に相当するプライマー P8 と P13 (図 17) を用い、コムギミトコンドリア DNA もしくは全 DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、ミトコンドリア DNA より約 3.6kb の断片を得た。得られた PCR 産物をクローン化し塩基配列を決定したところ、他の高等植物種ミトコンドリア *rps3* と高い相同性があり、コムギミトコンドリア *rps3* であると判断した (図 20)。

コムギ *rps3* 遺伝子は、被子植物 *rps3* 遺伝子 (Bock et al. 1994; Nakazono et al. 1995; Unseld et al. 1997; Handa 2003) と同様に、コード領域にシス型イントロンがひとつ存在する (図 20)。コード領域の長さはエキソン 1 が 74bp、イントロンが 1,739bp、エキソン 2 が 1,609bp であった (図 17A、図 20)。各々の領域の、イネ、トウモロコシ、テンサイ、*Oenothera*、シロイヌナズナ、ナタ

ネ、タバコもしくはゼニゴケに対する相同性を表 10 にまとめる。*rps3*の開始コドンから終止コドンまでのゲノム塩基配列を指標に、UPGMA 法によって系統樹を作成したところ、系統関係をよく反映していることが明らかになった (図 21)。塩基配列を仔細に調べると、イネで報告されているエキソン 2 の 63bp の欠失 (Nakazono et al. 1995 図 20 の Os-D21251, 2,430-2,431) はコムギに認められず、欠失を挟む直列反復配列 (5'-TGA(C)CG-3') が保存されるのは双子葉類やトウモロコシと同型であった。またイントロン内 (図 20 の Ta 1,321-1,322) にコムギ固有の欠失が見られるが、それ以外はトウモロコシと最も相同性が高い。

(2) 低温環境下におけるコムギ *rps3* 遺伝子の発現

コムギ *rps3* 転写産物検出のために、エキソン 2 領域のうち 876bp、およびイントロン領域のうち 1,037bp を、それぞれプライマー P11+P12、およびプライマー P9+P10 を用いてコムギの全 DNA より PCR 増幅させ (図 17A)、プローブとして用いた。得られたプローブはそれぞれ E2 および I と名付け、ノーザンハイブリダイゼーションに用いた。図 22A に示すように、プローブ E2 は、4.7~5.6kb に亘る不鮮明なバンドと、3.0kb の鮮明なバンドを検出した。プローブ I は 4.7~5.6kb に亘る不鮮明なバンドと、3.3kb の弱いシグナルバンドを検出した (図 22B)。プローブ E と I で共通に 4.7~5.6kb に亘る不鮮明なバンドが検出されることから、これが前駆体転写産物であり、プローブ E2 のみで検出される 3.0kb バンドがイントロン (1.7kb) を失った成熟 mRNA と思われる。プローブ I でのみ検出された 3.3kb 転写産物の由来については考察で述べる。

コムギ *rps3* の低温環境下における発現を調べるために、2 葉期のコムギに低温処理を施し、茎葉部の RNA を抽出してノーザン解析を行った。4.7~5.6kb の前駆体転写産物群と 3.0kb の成熟 mRNA はともに低温処理 1 日目に蓄積量を増し、6 日目に一旦減少するが、7 日目に再び増加し始め、14 日目までその状態が続いた (図 22A、B)。植物体を常温に戻すと、1 日目に蓄積量の減少が認められ、7 日目にはほぼ処理以前と同レベルになった (図 22A、B)。プローブ I で検出される 3.3kb 転写産物の増減もほぼ同様に推移した (図 22B)。

(3) 低温環境下におけるコムギ *ccmFc* 遺伝子の発現

コムギ *ccmFc* 転写産物検出のため、以下のようなプローブを調製した。すな

わち、5'非翻訳領域、エキソン 1 およびイントロンの約 1/3 を含む *EcoRI* 断片 (1,439bp) をプローブ 5U-E1-I とし、コムギの全 DNA を鋳型にしてプライマー P14 と P15 で PCR 増幅したイントロンのみからなる 681bp をプローブ I とした (図 18A)。これらを用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、プローブ 5U-E1-I は、2.7kb、1.7kb の転写産物に加え、4.0~5.0kb に亘る不鮮明なシグナルバンドを検出した (図 23A)。プローブ I は上述の転写産物のうち、1.7kb 転写産物を検出せず、代わりに 1.0kb の微弱なシグナルを検出した (図 23B)。プローブ 5U-E1-I とプローブ I で共通に検出される 4.0~5.0kb の転写産物群と 2.7kb 転写産物が前駆体転写産物であり、プローブ 5U-E1-I でのみ検出される 1.7kb 転写産物がイントロン (1.0kb) を失った成熟 mRNA と思われる。また、プローブ I のみで検出される 1.0kb 転写産物はスプライシングにより切り出されたイントロンと考えられる。

続いてコムギ *ccmFc* の低温環境下における発現を調査した。4.0~5.0kb の前駆体転写産物群と 2.7kb の前駆体転写産物は低温処理 5 日目に若干蓄積量を増して 6 日目に一旦減少するが、7 日目以降に再び増加し始め 14 日目まで経時的に蓄積量を増していった (図 23A、B)。植物体を常温に戻すと、1 日目に蓄積量の減少が認められ、7 日目にはほぼ処理以前と同レベルになった (図 23A、B)。一方、1.7kb 成熟 mRNA の蓄積量はほとんど変化しない (図 23A)。

低温環境が *ccmFc* 遺伝子の翻訳産物に与える影響を調べるため、ウェスタン解析を行った。黄化コムギに低温処理を 5 日間行ったコムギを供試したところ、55kDa のシグナルバンドを検出したが、対照区とのシグナル強度の差異は認められなかった (図 24)。なお、緑色コムギの粗ミトコンドリア画分を用いてウェスタン解析を行った結果、明瞭なシグナルが検出されなかった。

(4) 低温環境下におけるイネ *rps3* 遺伝子の発現

イネ *rps3* の発現解析を行うため、コムギ *rps3* 遺伝子のプローブ E2 とプローブ I を用いたノーザンハイブリダイゼーションを行った。プローブ E2 は、4.8~5.4kb の不鮮明なバンドおよび 3.0kb の転写産物を検出した (図 25A)。プローブ I は上記転写産物のうち 3.0kb 転写産物を検出せず、代わりに 3.4kb の微弱なシグナルを検出した (図 25B)。プローブ E2 およびプローブ I で共通に検出される 4.8~5.4kb の転写産物群は前駆体転写産物で、プローブ E2 のみが検出する 3.0kb 転写産物はイントロン (1.8kb) を失った成熟 mRNA と考えられ

る。3.4kb 転写産物については考察で述べる。

イネ幼植物体に 12℃もしくは 4℃の低温処理を行い、ノーザン解析を行った。その結果、12℃の低温処理を施すと 4.8～5.4kb の転写産物群は、処理 3 日目で蓄積量を増し始めることがわかった (図 25A、B)。一方、常温に戻すと 1 日目には対照区と同レベルまで低下した (図 25A、B)。これとは対照的に、3.0kb 成熟 mRNA の蓄積量は低温処理の日数とともに明確に低下し、常温に戻すと 1 日目にして蓄積量が最高となった (図 25A)。3.4kb の転写産物は、低温処理 7 日目から蓄積量を増し始め、常温に戻して 1 日目には減少する (図 25B)。一方、4℃の低温処理では、4.8～5.4kb および 3.0kb の両方の転写産物が蓄積量を減じており、3.4kb 転写産物のシグナルは検出されなかった (図 25A、B)。常温に戻すと、4.8～5.4kb および 3.0kb 転写産物の蓄積量が回復する (図 25A、B)。

(5) 低温環境下におけるイネ *ccmFc* 遺伝子の発現

イネ *ccmFc* の発現解析を行うため、コムギ *ccmFc* 遺伝子のプローブ 5U-E1-I とプローブ I を用いたノーザンハイブリダイゼーションを行った。プローブ 5U-E1-I は、4.8～5.5、2.7 および 1.7kb の 3 種類の転写産物を検出した (図 26A)。プローブ I は 4.8～5.5、2.7 および 1.0kb の転写産物を検出した (図 26B)。プローブ 5U-E1-I およびプローブ I で共通に検出される 4.8～5.5kb と 2.7kb 転写産物群は前駆体転写産物で、プローブ 5U-E1-I のみが検出する 1.7kb 転写産物はイントロン (1.0kb) を失った成熟 mRNA と考えられる。

イネ幼植物体に 12℃もしくは 4℃の低温処理を行い、ノーザン解析を行った。その結果、12℃の低温処理を施すと 4.8～5.5kb の転写産物は経時的に増加し、14 日目で最大となった。2.7kb 転写産物の蓄積は処理日数に伴いわずかに増加した (図 26A)。一方、1.7kb 成熟 mRNA は殆ど変化しない。常温に戻して 1 日目には 4.8～5.4kb 転写産物の蓄積量は顕著に低下するが、2.7kb 転写産物の蓄積量は変化しない。1.7kb 成熟 mRNA の蓄積量は上昇した (図 26A)。4℃の低温処理では、プローブ 5U-E1-I で検出される全ての転写産物の蓄積量が減少し、常温に戻すと 1 日目で 4.8～5.5kb と 2.7kb の転写産物は蓄積量が無処理区と同程度にまで回復したが、1.7kb 成熟 mRNA の蓄積量は回復しない (図 26A)。

(6) 低温環境下におけるイネ *rpl2* 遺伝子の発現

イネ *rpl2* 転写産物検出のため、以下のようなプローブを調製した。すなわち、

イネの全 DNA を鋳型として、5'非翻訳領域からエキソン 1 の 2/3 を含む 562bp (プライマーP16+P17) とイントロン領域 770bp (プライマーP18+P19) を PCR により増幅した (図 19)。前者を E1、後者を I と名付けノーザンハイブリダイゼーションのプローブとした。プローブ E1 では、9.0、6.4、4.5 および 3.0kb の転写産物が検出された (図 27A)。プローブ I では、6.4、3.0 および 1.5kb の転写産物が検出された (図 27B)。プローブ I で検出された 1.5kb のシグナルは、イントロンの 1,481bp のサイズと一致することから、スプライシングによって切り出されたイントロンと考えられる。その他の転写産物については考察で述べる。

低温環境下における *rpl2* の発現をノーザン解析により調査したが、発現量が少なく、低温処理による蓄積量の変化を論ずるに足るシグナル強度が得られなかった (図 27)。一方、低温から常温に戻した場合、全ての転写産物の蓄積量が 1 日目より増加した (図 27)。

表8 コムギミトコンドリア遺伝子のイントロン

	gene	<i>cis</i> -splicing	<i>trans</i> -splicing
complex I	<i>nad1</i>	1	3
	<i>nad2</i>	3	1
	<i>nad4</i>	3	0
	<i>nad5</i>	2	2
	<i>nad7</i>	4	0
complex IV	<i>cox2</i>	1	0
ribosomal proteins	<i>rps3</i>	1	0
cytochrome <i>c</i> biogenesis	<i>ccmFc</i>	1	0
total:		16	6

Ogihara et al. (2005) より編集

表9 イネミトコンドリア遺伝子のイントロン

	gene	<i>cis</i> -splicing	<i>trans</i> -splicing
complex I	<i>nad1</i>	1	3
	<i>nad2</i>	3	1
	<i>nad4</i>	3	0
	<i>nad5</i>	2	2
	<i>nad7</i>	4	0
complex IV	<i>cox2</i>	1	0
ribosomal proteins	<i>rps3</i>	1	0
	<i>rpl2</i>	1	0
cytochrome <i>c</i> biogenesis	<i>ccmFc</i>	1	0
total:		17	6

Notsu et al. (2002) より編集

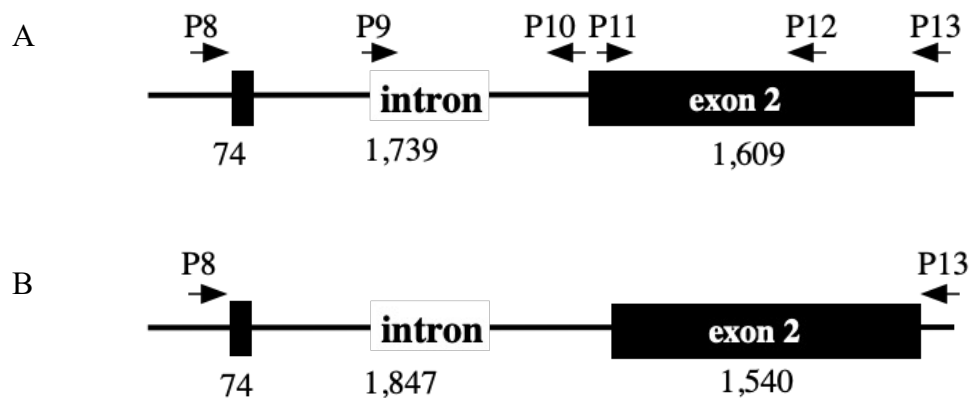


図17 コムギ (A) とイネ (B) の *rps3* の構造

エキソンとイントロンの長さをbase pairs で示す。(A)コムギのミトコンドリアDNAを鋳型に、イネ *rps3* 遺伝子の塩基配列情報から設計したプライマー組P8+P13を用いてPCRで単離した。プライマー組P11+P13を用いてエキソン2を増幅したPCR産物 (E2) と、プライマー組P9+P10を用いてイントロンを増幅したPCR産物 (I) をそれぞれプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションに用いた。(B) DDBJ/EMBL/GenBank データベースアクセス番号 D21251 (Nakazono et al. 1995)をもとに作図。

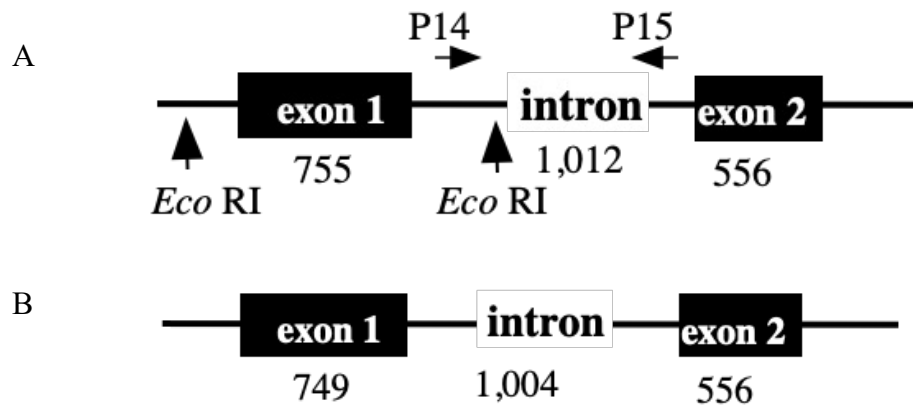


図18 コムギ (A) とイネ (B) の *ccmFc* の構造 (Giegé et al. 2004; Notsu et al. 2002)

エキソンとイントロンの長さをbase pairs で示す。*Eco*RI断片 (5U-E1-I) と、プライマー組P14+P15を用いてイントロンを増幅したPCR産物 (I) をそれぞれプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションに用いた。プライマーはDDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバーX01108をもとに設計した。

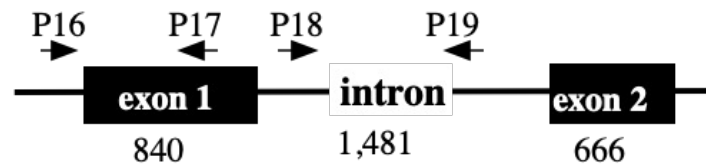


図19 イネ *rpl2* の構造 (Kubo et al. 1996)

エキソンとイントロンの長さをbase pairs で示す。プライマー組P16+P17を用いて5' 非翻訳領域とエキソン1を増幅したPCR産物 (E1) と、プライマー組P18+P19を用いてイントロンを増幅したPCR産物 (I) をそれぞれプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションに用いた。プライマーはDDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバーD78336をもとに設計した。

			P8		
Ta	1	CTTCGCGTCGACACAGGGAACCTGTGGACGACATGGGTTTAGAATTCGAATAAACGAGA			60
Os-D21251	1	-----			1
Zm-AY506529	1	-----			1
Mp-NC001660	1	-----			1
Bv-BA000009	1	-----			1
Ob-X59140	1	-----			1
At-Y08501	1	-----			1
Bn-AP006444	1	-----			1
Nt-BA000042	1	-----			1
				exon 1	
Ta	61	CCCTATCGACCAATAGAGGAAGGGCGGAAGGGGAAAGTAAAGTCTAGCGACAT			120
Os-D21251	1	-----			1
Zm-AY506529	1	-----			1
Mp-NC001660	1	-----			1
Bv-BA000009	1	-----			1
Ob-X59140	1	-----			1
At-Y08501	1	-----			1
Bn-AP006444	1	-----			1
Nt-BA000042	1	-----			1
		**			
Ta	121	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGATCTGAATCGTAGTTCAGATCCAA			180
Os-D21251	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGATCTGAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
Zm-AY506529	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGATCTGAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
Mp-NC001660	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGATCTGAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
Bv-BA000009	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGATCTGAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
Ob-X59140	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGATCTGAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
At-Y08501	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGAAAAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
Bn-AP006444	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGAAAAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
Nt-BA000042	2	TGGCACGAAAAGGAATCCGATTTTCGGTAAGACTTGATCTGAATCGTAGTTCAGATCCAA			61
		exon 1 ← → intron			
Ta	181	GTCGGTTCAGTGAGGGCGACCGCGAAGTCACCGAATGGGTTCGGTCCGCTTTTCCCTGA			240
Os-D21251	62	GTCGGTTCAGTGAGGGCGACCGCGAAGTCACCGAATGGGTTCGGTCCGCTTTTCCCTGA			121
Zm-AY506529	62	GTCGGTTCAGTGAGGGCGACCGCGAAGTCACCGAATGGGTTCGGTCCGCTTTTCCCTGA			121
Mp-NC001660	62	GTTGGTTTATGA			74
Bv-BA000009	62	GTTGGTTTATGA			74
Ob-X59140	62	GTTGGTTCAGTGAGGGCGACCGCGAAGTCACCGAATGGGTTCGGTCCGCTTTTCCCTTC			116
At-Y08501	62	GTCGGTTCAGTGAGGGCGACCGCGAAGTCACCGAATGGGTTCGGTCCGCTTTTCCCTTC			116
Bn-AP006444	62	GTCGGTTCAGTGAGGGCGACCGCGAAGTCACCGAATGGGTTCGGTCCGCTTTTCCCTTC			116
Nt-BA000042	62	GTTGGTTTATGAGGGCGACCGCGAAGTCACCGAATGGGTTCGGTCCGCTTTT			111

図20 コムギ*rps3*の塩基配列 および他の植物種の*rps3*遺伝子とのアライメント

Ta, Os, Zm, Mp, Bv, Ob, At, Bn, Nt: コムギ、イネ、トウモロコシ、ゼニゴケ、テンサイ、*Oenothera*、シロイヌナズナ、ナタネ、およびタバコ。種名の後の記号はDDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバーを示す。; 矢印は、単離やプローブ作製に用いたプライマーおよびエクソンとイントロンの位置を示す。; ***:開始コドンと終止コドン。;:イネにおける欠損部の前後のダイレクトトリピートの位置を示す。

Ta	241	TC	TTTGT	TTGTCCCC	CCAAAA	A	G	CGTG	SAGGACGTTGCAGATGTCCGGGACGGA	297	
Os-D21251	122	TC	TTTGT	TTGTCCCC	CCAAAA	A	A	CGTG	SAGGACGTTGCAGATGTCCGGGACGGA	179	
Zm-RV506529	122	TC	TTTGT	TTGTCCCC	CCAAA	---	---	G	CGTG	SAGGACGTTGCAGATGTCCGGGACGGA	175
Mp-NC001660	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75	
Bv-BA000009	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75	
Ob-X69140	117	AG	TTTGT	CCATATTTT	GAT	AGTTA	A	SCGTGG	SAGGACGTTGCAGATGTCCGGGACGGA	176	
At-Y08501	117	AG	TTTAT	CCATATTTT	AAAA	---	---	A	CGTG	SAGGACGTTGCAGATGTCCGGGACGGA	173
Bn-AP006444	117	AG	TTTAT	CCATATTTT	AAAA	---	---	A	CGTG	SAGGACGTTGCAGATGTCCGGGACGGA	174
Nt-BA000042	112	AG	TTT	---	CCCAGATTA	GAT	ATCA	AG	---	164	
Ta	298	CAC	GACTTCTTCT	AACGCTAGAGACCACA	GGAGAA	A	ACCCGGGAC	CAGAGCATGTCGTG	357		
Os-D21251	180	CAC	GACTTCTTCT	AACGCTAGAGACCACA	GGAGAA	A	ACCCGGGAC	CAGAGCATGTCGTG	239		
Zm-RV506529	176	CAC	GACTTCTTCT	AACGCTAGAGACCACA	GGAGAA	A	ACCCGGGAC	CAGAGCATGTCGTG	235		
Mp-NC001660	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Bv-BA000009	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Ob-X69140	177	---	ACGACTTCTTCT	AAC	AT	GA	A	CCCACT	GGGAGAC	235	
At-Y08501	174	CAC	GACTTCTTCT	AACGCTAGAGACCACA	GGAGAA	A	ACCCGGGAC	CAGAGCATGTCGTG	233		
Bn-AP006444	175	CAC	GACTTCTTCT	AACGCTAGAGACCACA	GGAGAA	A	ACCCGGGAC	CAGAGCATGTCGTG	234		
Nt-BA000042	165	CAC	GACTTCTTCT	AAG	CTAGAGACCACA	GGAGAC	ACCC	A	GGACT	224	
Ta	358	AAG	AC	SCACAC	GGG	CGGGCGT	GCTTCGACCGTGTCTCCGGGGCACAGTTGAATGTAGA	417			
Os-D21251	240	AAG	AC	SCACAC	GGG	CGGGCGT	GCTTCGACCGTGTCTCCGGGGCACAGTTGAATGTAGA	299			
Zm-RV506529	236	AAG	AC	SCACAC	GGG	CGGGCGT	GCTTCGACCGTGTCTCCGGGGCACAGTTGAATGTAGA	295			
Mp-NC001660	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Bv-BA000009	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Ob-X69140	236	AAG	AA	SCACACT	GGG	CGGGCGT	GCTTCGACCGTGTCTCCGGGGCACAGTTGAATGTAGA	295			
At-Y08501	234	AAG	AA	SCACACT	GGAT	GGGCGT	GCTTCGACCGTGTCTCCGGGGCACAGTTGAATGTAGA	293			
Bn-AP006444	235	AAG	AA	SCACACT	GGAT	GGGCGT	GCTTCGACCGTGTCTCCGGGGCACAGTTGAATGTAGA	294			
Nt-BA000042	225	AAG	AA	SCACACT	GGAC	GGGCGT	GCTTCGACCGTGTCTCCGGGGCACAGTTGAATGTAGA	284			
Ta	418	TAT	CATGAACGCGAGG	AT	AGGATACCAGGCCGAGAAACCCGGGC	---	AGT	ACTC	---	471	
Os-D21251	300	TAT	CATGAACGCGAGG	AT	AGGATACCAGGCCGAGAAACCCGGGC	---	AGT	ACTC	---	353	
Zm-RV506529	296	TAT	CATGAACGCGAGG	AT	AGGATACCAGGCCGAGAAACCCGGGC	---	AGT	ACTC	---	354	
Mp-NC001660	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Bv-BA000009	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Ob-X69140	296	TAT	CATGAACGCGAGG	TG	AGGATACCAGGCCGAGAAACCCGGGC	---	ACC	ACTC	---	350	
At-Y08501	294	TAT	CATT	ACGCGAGG	TGT	AGGATACCAGGCCGAGAAACCCGGGC	---	ACT	---	349	
Bn-AP006444	295	TAT	CATT	ACGCGAGG	TGT	AGGATACCAGGCCGAGAAACCC	---	ACC	---	351	
Nt-BA000042	285	TAT	CATGAACGCGAGG	TG	AGGATACCAGGCCGAGAAACCCGGGC	---	ACC	ACTC	---	338	
Ta	472	CCT	AT	TGTGCCGATCGCTAGCGCATCCAGGGCCCCGGCGCCAGCTCT	CT	CTGGAGAGGGCC	---	---	---	531	
Os-D21251	354	CCT	AT	TGTGCCGATCGCTAGCGCATCCAGGGCCCCGGCGCCAGCTCT	CT	CTGGAGAGGGCC	---	---	---	413	
Zm-RV506529	355	CCT	AT	TGTGCCGATCGCTAGCGCATCCAGGGCCCCGGCGCCAGCTCT	CT	CTGGAGAGGGCC	---	---	---	414	
Mp-NC001660	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Bv-BA000009	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Ob-X69140	351	CCT	AT	TGTGCCGATCGCTAGCGCATCCAGGGCCCCGGCGCCAGCTCT	CT	CTGGAGAGGGCC	---	---	---	408	
At-Y08501	350	CCT	AT	TGC	CCGATCGCTAGCGCATCCAGGT	---	CCCGGGCGCCAGCTCT	CT	CTGGAGAGGGCC	408	
Bn-AP006444	352	CCT	AT	TGC	CCGATCGCTAGCGCATCCAGGT	---	CCCGGGCGCCAGCTCT	CT	CTGGAGAGGGCC	410	
Nt-BA000042	339	CCT	AT	TGTGCC	ATCGCTAGCGCATCCAGGGCCCCGGCGCCAGCTCT	CT	CTGGAGAGGGCC	---	---	397	
Ta	532	GT	CACTGATCTGAA	AGTGC	GTCTG	CGGTTCCGGATAGACTGAT	CTGC	SACGCGCTA	---	588	
Os-D21251	414	GT	CACTGATCTT	AA	AGTGC	GTCTG	CGGTTCCGGATAGACTGAT	CTGC	SACGCGCTA	470	
Zm-RV506529	415	GT	CACTGATCTT	AA	AGTGC	GTCTG	CGGTTCCGGATAGACTGAT	CTGC	SACGCGCTA	471	
Mp-NC001660	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Bv-BA000009	75	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	75		
Ob-X69140	409	TAG	C	TGATCTGAG	AGTGC	TAA	TT	CGGTTCCGGATAGACT	CTCA	467	
At-Y08501	409	TAG	T	CGATCTGAG	AGTGC	TAA	TT	CGGTTCCGGATAGACT	TC	467	
Bn-AP006444	411	TAG	T	CGATCTGAG	AGTGC	TAA	TT	CGGTTCCGGATAGACT	TC	469	
Nt-BA000042	398	TAG	C	TGATCTGAG	AGTGC	TAA	TT	CGGTTCCGGATAGACT	TC	451	

Ta	589	-----GCCCCAGGATCAAT	AAA	AAACAGTGCTAAGT	622					
Os-D21251	471	-----GCCCCAGGATCAAT	AAA	AAACAGTGCTAAGT	503					
Zm-AY506529	472	-----GCCCCAGGATCAAG	AAA	AAACAGTGCTAAGT	505					
Mp-NC001660	75	-----			75					
Bv-BA000009	75	-----			75					
Ob-X69140	468	CCCTCTCCATTAGTCGAGCTTCTCC	GCCCC	GGATCAAT	AG	AAACAGTGCTAAGT	527			
At-Y08501	468	-----	CCCAT	AGAAA	ATC	AAACAGTGCTAAGT	498			
Bn-AP006444	470	-----	CCCAT	AATAA	ATC	AAACAGTGCTAAGT	500			
Nt-BA000042	452	-----	CACC	GCCCC	GGATCAAT	AG	AAACAGTGCTAAGT	489		
Ta	623	TTCAATT	TCAGATC	AGTG	AATAACC	AAAA	AGAGAGC	TTTCTCGCTCGGCGCC	675	
Os-D21251	504	TTCAATT	TCAGATC	AGTG	AATAACC	GGAAAA	AGAGAGC	TTTCTCGCTCGGCGCC	557	
Zm-AY506529	506	TTCAATT	TCAGATC	AGTG	AATAACC	GGAAAA	AGAGAGC	TTTCTCGCTCGGCGCC	559	
Mp-NC001660	75	-----							75	
Bv-BA000009	75	-----							75	
Ob-X69140	528	TGAGATC	AGTG	AATAACC	GGAAAA	AGAGAGC	TTTCTCGCTCGGCGCC	CTAAGC	587	
At-Y08501	499	TTCAAGAT	AGTG	AATAACC	GGAAAA	AGAGAGC	TTTCTCGCTCGGCGCC	CTAAGC	557	
Bn-AP006444	501	TTCAAGAT	AGTG	AATAACC	GGAAAA	AGAGAGC	TTTCTCGCTCGGCGCC	CTAAGC	559	
Nt-BA000042	490	TTCAAGATC	AGTG	AATAACC	GGAAAA	AGAGAGC	TTTCTCGCTCGGCGCC	CTAAGC	549	
Ta	676	ACACTATGCTCCGCTTCAACAATGAGAGTTTTTCGGTGGAAACCGGTGAACACGCGAGCT							735	
Os-D21251	558	GCACATGCTCCGCTTCAACAATGAGAGTTTTTCGGTGGAAACCGGTGAACACGCGAGCT							617	
Zm-AY506529	560	GCACATGCTCCGCTTCAACAATGAGAGTTTTTCGGTGGAAACCGGTGAACACGCGAGCT							619	
Mp-NC001660	75	-----							75	
Bv-BA000009	75	-----							75	
Ob-X69140	588	GCACATGCTCCGCTTCAACTT	AG	GAGAGTTTTTCGGTGGAAACCGGTGAACACGCGAGCT					647	
At-Y08501	558	GCACATGCTCCGTTTT	ACAAATGAGAGTTTTTCGGTGGAAACCGGTGAACACGCGAGCT						617	
Bn-AP006444	560	GCACATGCTCCGTTTT	ACAAATGAGAGTTTTTCGGTGGAAACCGGTGAACACGCGAGCT						619	
Nt-BA000042	550	GCACATGCTCCGCTTCAACAATGAGAGTTTTTCGGTGGAAACCGGTGAACACGCGAGCT							609	
Ta	736	GGTTAGATGCGTGGGG	CAGAGGGCTCGTAGTACCTG	ATAGCGCAGCTATGCAGTGGAGGG					795	
Os-D21251	618	GGTTAGATGCGTGGGG	CAGAGGGCTCGTAGTACCTG	ATAGCGCAGCTATGCAGTGGAGGG					677	
Zm-AY506529	620	GGTTAGATGCGTGGGG	CAGAGGGCTCGTAGTACCTG	ATAGCGCAGCTATGCAGTGGAGGG					679	
Mp-NC001660	75	-----							75	
Bv-BA000009	75	-----							75	
Ob-X69140	648	GGTTAGG	TGCGTGGGG	CAGAGGGCTCT	TAGTACCTG	ATAGCGCAGCTATGCAGTGGAGGG			707	
At-Y08501	618	GGTTAGATG	TGCGG	CAGAGGGCTCGTAGTACCTG	ATAGCG	TAGCTATGCAGTGGAGGG			677	
Bn-AP006444	620	GGTTAGATG	TGCGG	CAGAGGGCTCGTAGTACCTG	ATAGCGCAGCTATGCAGTGGAGGG				679	
Nt-BA000042	610	GGTTAGATGCGTGGGG	CAGAGGGCTCGTAGTACCTG	ATAGCGG	GCTAC	GCAGTGGAGGG			669	
Ta	796	GAGGAGCCTA	ATCGACCCCTTCTTTT	-----	TTTTTT	ATTCAGAGC	AC	AAAA	846	
Os-D21251	678	GAGGAGCCTA	ATCGACCCCTTCTTTT	-----	TTTTTT	ATTCAGAGC	AC	AAAA	728	
Zm-AY506529	680	GAGGAGCCTA	ATCGACCCCTTCTTTT	-----	TTTTTT	ATTCAGAGC	AT	AAAA	730	
Mp-NC001660	75	-----							75	
Bv-BA000009	75	-----							75	
Ob-X69140	708	GAGGAGCCTA	ATCGACCT	TCTTCTTT	TCTTTTTTT	TTTTTT	TTCAAGG	AAAA	765	
At-Y08501	678	GAGGAGCCTA	ATCGACCCCTTCTTTT	-----	TTTTTT	TTCTTT	GAA	AAAA	726	
Bn-AP006444	680	GAGGAGCCTATA	ATCGACCCCTTCTTTT	-----	TTTTTT	TTCAAGG	AAAA		728	
Nt-BA000042	670	GAGGAGCCTA	ATCGACCCCTTCTTTT	-----	TTTCTT	TGAAAA	AGCAGTAA		719	
Ta	847	GCA	AG	CAAAA	GAGATTG	GA	CTCTCGGATGAGACTAAGCAGCT	ACCG	TTCCGAC	901
Os-D21251	729	GCACAGTACAAA	GAGATTG	GA	CTCTCGGATGAGACTAAGCAGCT	ACCG	TTCCGAC		783	
Zm-AY506529	731	GCACAGTACAAA	GAGATTG	GA	CTCTCGGATGAGACTAAGCAGCT	ACCG	TTCCGAC		785	
Mp-NC001660	75	-----							75	
Bv-BA000009	75	-----							75	
Ob-X69140	766	GCA	GTACAAA	GAGATTG	GA	CTCTCGGATGAGACTAAGCAGCT	ACCG	TTCCGAC	822	
At-Y08501	727	GCA	GTACAAA	GAGATTG	GA	CTCTCGGATGAGACTAAGCAGCT	ACCG	TTCCGAC	783	
Bn-AP006444	729	GCA	GTACAAA	GATTTT	GA	CTCTCGGATGAGACTAAGCAGCT	ACCG	TTCCGAC	785	
Nt-BA000042	720	GCA	GTAA	AG	GAGATTG	GA	CTCTCGGATGAGACTAAGCAGCT	ACCG	TTCCGAC	774

Ta	902	G CGCCCTGACCTATCTTGATTCAAA---CCGAAACCC-TCTCTAAGGTGGAGCCT	955
Os-D21251	784	G CGCCCTGACCTATCTTGATTAAAA---CCGAAACCC-TCTCTAAGGTGGAGCCT	837
Zm-RY506529	786	G CGCCCTGACCTATCTTGATTAAATAAA---CCGAAACCC-TCTCTAAGGTGGAGCCT	843
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	823	G CGCCCTGACCTATCTTGATTGTTGA---CCGAAACCTATCTA-AAGGCGAGCCT	875
At-Y08501	784	GGACCCCTGACC-GATTTTGATTAAAG-GACCGAAACCC-TATCTAAATGAAGCCT	838
Bn-AP006444	786	G CGCCCTGACCTATCTTGATTAAAG---CCGAAACCC-TATCTAAATGAAGCCT	837
Nt-BA000042	775	G CGCCCTGACCTATCTTGATTAAAG---CCGAAACCC-TATCTAAGGTGGAGCCT	828
Ta	956	AGTTGAGCTGTCAATTCAAA-GAATAATGGGAA---TCCAAATC-CACTTTTAGGGAT	1009
Os-D21251	838	AGTTGAGCTGTCAATTCAAA-GAATAATGGGAA---TAAATC-CACTTTTAGGGAT	891
Zm-RY506529	844	AGTTGAGCTGTCAATTCAAA-GAATAATGGGAA---TCAATC-CACTTTTAGGGAT	897
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	876	AGTT-----GTCAACCAATGATAGATTGGAAATGTTGAGAAC-CACTAGTAGGGAT	928
At-Y08501	839	AGTTTAGCTGTCAACCAATGATAGATTGAAAT---AGAAATATCCGGGATTAAT	895
Bn-AP006444	838	AGTTTAGCTGTCAACCAATGATAGATTGAATTTATAGAAATATCCGGGATTAAT	897
Nt-BA000042	829	AGTTTAGCTGTCAACCAATGAT---GATTAATGAAA-GAAAC-CACTAGTAGGGAT	884
Ta	1010	ATAGATGAGTCTCGCTCAGTAAG---AGAGTTGTAG-ATTCGTAGAGAGGATCAG--	1063
Os-D21251	892	ATAGATGAGTCTCGCTCAGTAAG---AGAGTTGTAG-ATTCGTAGAGAGGATCAG--	945
Zm-RY506529	898	ATAGATGAGTCTCGCTCAGTAAG---AGAGTTGTAG-ATTCGTAGAGAGGATCAG--	951
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	929	ATGATGAGTCTCGCTCAGTAAG---AGAGTTAGAG-ATTCGTAGAGAGGAGAG--	982
At-Y08501	896	ATAGATGAGATTTCTCTCAATAAGGGAGATTCTAG-AAAAGGATAGTTGTTTCCT	954
Bn-AP006444	898	ATAGATGAGATTTCTCTCAATAAGGGAGATTCTAG-AAAAGGATAGTTGTTTCCT	956
Nt-BA000042	885	ATGATGAGTCTCGCTCAGTAAG---AGAGTTGTAG-ATTCGTAAACAGGAGA----	937
Ta	1064	-AGTACGCGCTACAAAGGCGCTAGCCATGAAAGT-AGTGGAAAGATATAGTACT	1122
Os-D21251	946	-AGTACGCGCTACAAAGGCGCTAGCCATGAAAGT-AGTGGAAAGATATAGTACT	1004
Zm-RY506529	952	-AGTACGCGCTACAAAGGCGCTAGCCATGAAAGT-AGTGGAAAGATATAGTACT	1010
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	983	-AGCCTTTACTTGATATTCTCTCCGTAAAGGCGCCTTAGCCTATCTATAGTCTTAGGCCA	1041
At-Y08501	955	AGGCTGCAATCTTTCTAAAGAAAGAGCGAGAACTTTTCTTTGAGAAAAAGGTGCT	1014
Bn-AP006444	957	AGACTGCAATCTTTCTAAAGAAAGAGCGAGAACTTGCTTTGAGAAAAAGGTGCT	1016
Nt-BA000042	938	-----	938
Ta	1123	TTTGTAATACCCCTCCGGGSCCCCCGGTTGTTTGCGCGCCCTACCCCAACGTTAGAC	1182
Os-D21251	1005	TTTGTAATACCCCTCCGGGSCCCCCAGTTGTTTGCGCGCCCTACCCCAACGTTAGAC	1064
Zm-RY506529	1011	TTTGTAATACCCCTCCGGGSCCCCCGGTTGTTTGCGCGCCCTACCCCAACGTTAGAC	1070
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1042	GGCCCGGCTTTGCTCGAACCGCTAATCAATTAAGTTTAGGCTTTTGTTCAGGGTGCG	1101
At-Y08501	1015	TGTTGCGGTAAGTAGCTTTTATATCAATAAAGCGGAAGGTT-----	1061
Bn-AP006444	1017	TGTTGCGGTAAGTAGCTTTTATATCAATAAAGCGGAAGGTTTGTGATATTATA	1076
Nt-BA000042	938	-----	938
Ta	1183	TATTGCCTTTTAGCCTACGCTTGCTGCTTGCA--CATGGATTGATAGATCTATCGAA	1240
Os-D21251	1065	TATTGCCTTTTAGCCTACGCTTGCTGCTTCCCCCCCCCGAAGCGAGAC-TCTATCCAG	1123
Zm-RY506529	1071	TATTGCCTTTTAGCCTACGCTTGCTGCTTGCA--CATGGATTGATAGATCTATCGAA	1128
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1102	CGGGTTTGTTTATTAGGSCCTTTCCTTCAATGACACTGCCTCTTCCCTGCTGCGAG	1161
At-Y08501	1062	-----	1062
Bn-AP006444	1077	AAGACGCGTTAGCACTTTCTTTTAAATAGTTTAGCTTAAGTAGAGTGCAGAAAGGG	1136
Nt-BA000042	938	-----AGAGCTTTACTTCAATGACACTGCCTCTTCCCTGCTGCGAG	981

Ta	1241	TCCATGCTTCCCCGCCCCAAGCGAGACTCTATCCAGATCTCAAGAATACGAGCTAG	1300
Os-D21251	1124	---ATCTCAAGAGATAACGA-GCTAGGCGG---CGGGCGGCAAGAA-AGGGGCGGG	1174
Zm-AY506529	1129	TCCATGCTTCCCCGCCCCAAGCGAGACTCTATCCAGATCTCAAGAATACGAGCTAG	1188
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1162	GGCCGTGCACGAACCATACTGCACCCCGTCCGATCAGGTACAGTTGCTTCGCTGTAG	1221
At-Y08501	1062	-----	1062
Bn-AP006444	1137	CTTGTTTGTATTATTAGGGTCGCTGGTTTAGAACCTATACACACCAAGGGCTTTTCT	1196
Nt-BA000042	982	GGCCGTG---AACCACCAACCGCACCCCGCCGATCAGGTACAGTTGCTTCGCTGTAG	1037
Ta	1301	GGGCGG---CGGGCAAGGAAG-----	1321
Os-D21251	1175	CGGGCGGTCGGGGCTTGGCGATACGTTCTTCTTTCAAGCGTTTTGCCATAGAGCGA	1234
Zm-AY506529	1189	GGGCGG---CGGGCAAGGAAGGGGGCGGGCCGCG---GGTCGGGGCTTG-GCGA	1240
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1222	GCCCATTTAGGTTAGGGGGCATTGCTCACTTCTTACCACCTCCGGTGTGTATCTGACA	1281
At-Y08501	1062	---AATGACAACTGCTCTTCTGTTGCCAGGGCCTTGCAAGAACCAACCGCCCCC	1117
Bn-AP006444	1197	TTCAATGACAACTGCTCTTCTGTTGCCAGGGCCTTGCAAGAACCAACCGCCCCC	1256
Nt-BA000042	1038	GCTATTTAGGTTAGGTTCCAAACCTCACTTCTTACCACCTCCGGTGTGTATCTACA	1097
Ta	1322	-----GGGCGG	1328
Os-D21251	1235	GGGCGTCTTCTGGGGCGGCGCTTACTTGAAATCCACCGCTGTTCCACACCGG	1294
Zm-AY506529	1241	TA-CGTTCTTCTT---CGAGCGTTTGCCATAGAGCGAGG-GGTCCTTCTGGGTGG	1296
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1282	TCTTGCTAGCTTCAACTCGGTTGAATAGAAATCATTGATTCCTTGATGTCCATTTTC	1341
At-Y08501	1118	--GCCCCATCAGTACCACTTCTTCGAGCGCGGGTAGCTACTTAGGTTAGAGGGC	1175
Bn-AP006444	1257	CCGCCCCATCAGTACCACTTCTTCGAGCGCGGGTAGCTACTTAGGTTAGAGGAA	1316
Nt-BA000042	1098	TCTTCTAGCTAGAACTCGTTCGAATAGAAATCATTGATTCCTTGCTGTCAATTT--C	1155
Ta	1329	GGCGTTTATTGAAATGACACCGCTGTTCAGCAGCGGGGGCCTTGACAGAAAGCA	1388
Os-D21251	1295	GGGCTTGCACGAA--GCACACCGCCGATTAGTAGCAGTTGCTTCGCTGATGGGCC	1352
Zm-AY506529	1297	GGCGTTTATTGAAATGACACCGCTGTTCAGCAGCGGGGGCCTTGACAGAAAGCA	1356
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1342	TTATTCATTTAGGGCGCTCGGCGGTGCTCCTTTCTCA----AACCAGAACAGT-TG	1395
At-Y08501	1176	ATTGCCCTAGTTCTTACTACCTCCGGTGTGTATCACATGTTGCTAGCTTCAACTCG	1235
Bn-AP006444	1317	GAACCCCTAGTTCTTACTACCTCCGGTGTGTATCACATGTTGCTAGCTTCAACTCG	1376
Nt-BA000042	1156	TTATTCATTCATTGCGTTCCGGCGGTGCTCCTTTCTCATCTCAACCATACTACT-TG	1214
Ta	1389	ACCTAC-GATTAGTAGCAGTTGCTTTCGCTGATGGGCACGTGAGGGGGGCAATTGTCC	1447
Os-D21251	1353	AGTAGGGGGGCATTGTCCCTCAGTT---CTTACACG---TCAGGTGTGAATCGACA	1406
Zm-AY506529	1357	ACCGCCCGATTAGTAGCAGTTGCTTTCGCTGATGGGCCTGCGAGGGGGCAATTGTCC	1414
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1396	ACGTTAGGGAGATTAGGGAGAGACCACTGAGCGAA-TCGACCGA-GGGAC-TT--GA	1450
At-Y08501	1236	GTTGAATAGATCATTGATTCTCTCTCTGTCCATTTTATTCATTCAAGGCGCTCGG	1295
Bn-AP006444	1377	GTTGAATAGATCATTGATTCTCTCTCTGTCCATTTTATTCATTCAAGGCGCTCGG	1436
Nt-BA000042	1215	ACGTTAGGGAGATTAGGGAGAGACCGCTGAGCGAA-GCGACCGA-AGGAC-TT--GA	1269
Ta	1448	-CTCGTCTTACCAACCTCAGGTGTATA----CATCTACTTATTATCTTTT-TTTT	1500
Os-D21251	1407	TCTACTTATTATCTTCTTTTTTTCATCAAGCCTGACCTCAGCTGTCCATTTCT--TATT	1464
Zm-AY506529	1415	-CTCGTCTTACCAACCTCAGGTGTATATCGACATCTACTTATTATCTTTATTTTT	1473
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1451	CTT-ATCCAAACCGAGGATAGCGGCACAGCGTTGCTATCACGAGC-AGGTCGCTTG	1508
At-Y08501	1296	CGGGTGCTCCTTTTCAAACCAAAACACTCTGACGTTAGGGAGATAGAACACCTGA	1355
Bn-AP006444	1437	CGGGTGCTCCTTTTCAAACCAAAACACTCTGACGTTAGGGAGATAGAACACCTGA	1496
Nt-BA000042	1270	CTT-ATCCGACCGAGCGATAGCGGCTTAAGCGTTGCTATCACGAGC-AGGTCGCTTC	1327

Ta	1501	ATGCAAGC--GTGA-----CCTCAGCTGTCCA--TTTATTATTATTACAGGGCGC---	1547
Os-D21251	1465	ATTTCAGGGCGCCCTAGTGGACTTGGCGGTGCTCCTTTTCAAAACAGACAACTCTGA	1524
Zm-AY506529	1474	ATGCAAGCTACTGAGATATGCCTCAGCTGTCCA--TTTATTATTATTACAGGGCGC---	1528
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1509	---TTGACCGG---	1518
At-Y08501	1356	GCGAACCGATCAAGGGGACTTGAAGTT-ATCCGACCGAAGATAGAGCTTAACTTAA	1414
Bn-AP006444	1497	GCGAACCGATCAAGGGGACTTGAAGTT-ATCCGACCGAAGATAGAGCTTAA-----	1549
Nt-BA000042	1328	---TTGATCGG---	1337
Ta	1548	---CCTAGTGGACTT---GGCGGTGCTCCTTTCTCAAAACAGACAACT-CTGACGTTAG	1602
Os-D21251	1525	ACGTTAGGGAAATAGGGAGACCACTGAGCGAACCAACCGAGGGGACTTTACTTATC	1584
Zm-AY506529	1529	---CCTAGTGGACTT---GGCGGTGCTCCTTTCTAAACCAAGACAACT-CTGACGTTAG	1583
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1519	-----	1519
At-Y08501	1415	GTTAGCCTCTC--ACGA-GCAGC-GT-GCTGCGC-----	1444
Bn-AP006444	1550	GTTAGCCTCTC--ACGA-GCAGC-GTCGCTGCGC-----	1580
Nt-BA000042	1338	-----	1338
Ta	1603	GGAAATAGGGAGAGCACCTGAGCGAA-CCGACCGA-AGGGACTTT---ACTT-ATCC	1656
Os-D21251	1585	CGAACCGAACGTTAG-CGGCTTAGCTTAGCCTATCACGAGCTGCGTTGCTGCTTGATCG	1643
Zm-AY506529	1584	GGAAATAGGGAGAGCACCTGAGCGAA-CCGACCGA-AGGGACTTTCTTACTT-ATCC	1640
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1519	-----	1519
At-Y08501	1445	-----	1445
Bn-AP006444	1581	-----	1581
Nt-BA000042	1338	-----	1338
Ta	1657	GACCGAACGTTAGCGGCTTAGCTTAGCCTATCACGAGC-TGCCTTGCTGC--TTGATC	1713
Os-D21251	1644	GAGCAGAAACGGATGCGCGTGCTAA-CCTTTGCGGCTAGTGCCTCAACCGTTGCTT	1702
Zm-AY506529	1641	GACCGAACGTTAGCGGCTTAGCTTAGCCTATCACGAGC-AGCGTTGCTGC--TTGATC	1697
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1519	-----	1519
At-Y08501	1445	-----	1445
Bn-AP006444	1581	-----	1581
Nt-BA000042	1338	-----	1338
Ta	1714	GGCGGGGAGGAGATCTCAAGTATGGGGCAAGGATCAGCGCTTTGACTTTGCTTTGT	1773
Os-D21251	1703	GTTGGGGAGGAGATCTCAAGTATGGGGCAAGGATCAGCGCTTTGACTTTGCTTTGT	1762
Zm-AY506529	1698	GGCGGGGAGGAGATCTCAAGTATGGGGCAAGGATCAGCGCTTTGACTTTGCTTTGT	1757
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1519	---GGGAGGAGCATCTCAAGTATGGGGCAAGGATCAGCGCTTTGACTTTG-----T	1569
At-Y08501	1445	---GGGGAGGAGCATCTCAAGTATGGGGCAAGGATCAGCGCTTTGACTTTG-----T	1496
Bn-AP006444	1581	---GGGGAGGAGCATCTCAAGTATGGGGCAAGGATCAGCGCTTTGACTTTG-----T	1632
Nt-BA000042	1338	---GGGGAGGAGCATCTCAAGTATGGGGCAAGGATGTTGCGTTTTGACTTTG-----T	1389
← P10 →			
Ta	1774	CCCCGGGATCCACCACAGGTTGGGTTTGAGAGCCGTGTGATGGGTGACTATCTAGCAGC	1833
Os-D21251	1763	CCCCGGGATCCACCACAGGTTGGGTTTGAGAGCCGTGTGATGGGTGACTATCTAGCAGC	1822
Zm-AY506529	1758	CCCCGGGATCCACCACAGGTTGGGTTTGAGAGCCGTGTGATGGGTGACTATCTAGCAGC	1817
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1570	CCCCGGGATCCACCACAGGTTGGGTTTGAGAGCCGTGTGATGGGTGACTATCTAGCAGC	1629
At-Y08501	1497	CTCCGGGATCCACCACAGGTTGGGTTTGAGAGCCGTGTGATGGGTGACTATCTAGCAGC	1556
Bn-AP006444	1633	CTCCGGGATCCACCACAGGTTGGGTTTGAGAGCCGTGTGATGGGTGACTATCTAGCAGC	1692
Nt-BA000042	1390	CTCCGGGATCCACCACAGGTTGGGTTTGAGAGCCGTGTGATGGGTGACTATCTAGCAGC	1449

Ta	1834	5TTCAAGAGAGCACGTGTATGTAGTCTGCGCTGGTGAATGGAGCCCCCG-----CC3CAA	1888
Os-D21251	1823	5TTCAAGAGAGCACGTGTATGTAGTCTGCGCTGGTGAATGGAGCCCCCG-----CC3CAA	1877
Zm-AY506529	1818	5TTCAAGAGAGCACGTGTATGTAGTCTGCGCTGGTGAATGGAGCCCCCG-----CC3CAA	1872
Mp-NC001660	75	-----	75
Bv-BA000009	75	-----	75
Ob-X69140	1630	5TTCAAGAGAGCACGTGTATGTAGTCTGCGCTGGTGAATGGAGCCCCCG-TATCAAG3CAA	1684
At-Y08501	1557	5TTCAAGAGAGCACGTGTATGTAGTCTGCGCTGGTGAATGGAGCCCCCG-TATCAAG3CAA	1611
Bn-AP006444	1693	5TTCAAGAGAGCACGTGTATGTAGTCTGCGCTGGTGAATGGAGCCCCCG-TATCAAG3CAA	1747
Nt-BA000042	1450	5TTCAAGAGAGCACGTGTATGTAGTCTGCGCTGGTGAATGGAGCCCCCGTATCAAG3CAA	1505
Ta	1889	AAAAGAGCGGCTCTTCCACGGCTCTGTACACATTGACTCTATTTATTATTATGGTAAA	1948
Os-D21251	1878	AAAAGAGCGGCTCTTCCACGGCTCTGTACACATTGACTCTATTTATTATTATGGTAAA	1937
Zm-AY506529	1873	AAAAGAGCGGCTCTTCCACGGCTCTGTACACATTGACTCTATTTATTATTATGGTAAA	1932
Mp-NC001660	75	-----TTATTATTATGGTAAA	90
Bv-BA000009	75	-----TTATTATTATGGTAAA	90
Ob-X69140	1685	GAAAGAGCGGCTCTTCCACGGCG-----ACCATTGACTCTATTTATTATTATGGTAAA	1739
At-Y08501	1612	AAAATAGCGGCTCTTCTACGGCGGGGTCACTATTGACTCTATTTATTATTATGGTAAA	1671
Bn-AP006444	1748	AAAAGAGCGGCTCTTCTACGGCGGGGTCACTATTGACTCTATTTATTATTATGGTAAA	1807
Nt-BA000042	1506	GAGGAGCGGCTCTTCCACGGCGGAGTCAACATTGACTCTATTTATTATTATGGTAAA	1565
Ta	1949	TCATTGTATCAGATGTCAATCTTAGATCTTATTTAGTTTCGATACGTCCACCTACGAGA	2008
Os-D21251	1938	TCATTGTATCAGATGTCAATCTTAGATCTTATTTAGTTTCGATACGTCCACCTACGAGA	1997
Zm-AY506529	1933	TCATTGTATCAGATGTCAATCTTAGATCTTATTTAGTTTCGATACGTCCACCTACGAGA	1992
Mp-NC001660	91	TTGTGTATCAGATGTCAATCTTAGATCTTATTTAGTTTCGATACGTCCACCTACGAGA	150
Bv-BA000009	91	TTGTGTATCAGATGTCAATCTTAGATCTTATTTAGTTTCGATACGTCCACCTACGAGA	150
Ob-X69140	1740	TCAGTGTATCAGATGTCAATCTGAGATCTTATTTTCGGTTCGATACGTCCACCTACGAGA	1799
At-Y08501	1672	TTTGTGTATCAGATGTCAATCTGAGATCTTATTTTCGGTTCGATACGTCCACCTACGAGA	1731
Bn-AP006444	1808	TTTGTGTATCAGATGTCAATCTGAGATCTTATTTTCGGTTCGATACGTCCACCTACGAGA	1867
Nt-BA000042	1566	TCAGTGTATCAGATGTCAATCTGAGATCTTATTTTCGGTTCGATACGTCCACCTACGAGA	1625
Ta	2009	CTCACCCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	2068
Os-D21251	1998	CTCACCCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	2057
Zm-AY506529	1993	CTCACCCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	2052
Mp-NC001660	151	ATCACCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	210
Bv-BA000009	151	CTTACCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	210
Ob-X69140	1800	CTCACCCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	1859
At-Y08501	1732	CTCACCCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	1791
Bn-AP006444	1868	CTCACCCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	1927
Nt-BA000042	1626	CTCACCCTTTGGCTTTTCGTCTCGGTAGGTGTATTATTCTACATTTTCCCAAAGGACATTC	1685
Ta	2069	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	2128
Os-D21251	2058	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	2111
Zm-AY506529	2053	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	2106
Mp-NC001660	211	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	270
Bv-BA000009	211	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	264
Ob-X69140	1860	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	1913
At-Y08501	1792	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	1845
Bn-AP006444	1928	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	1981
Nt-BA000042	1686	ATTCATTTCTTTCTTCCCGTCCGATCACACGACTAAACGAAAGAAACACAGAAATCA	1739
Ta	2129	AGACCCGTAATACAGGAAAGGGGCTGGTGGCCGAC-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	2185
Os-D21251	2112	AGACCCGGA-----AGGATAGGGGCCGGTGGTGGGC-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	2165
Zm-AY506529	2107	AGACCCGGA-----AGGATAGGGGCCGGTGGTGGGC-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	2160
Mp-NC001660	271	CCATTCTCAAGTTATCAGGCTATTATACGACACACAGTAAACAGAGAATGAAGTC	330
Bv-BA000009	265	AGACCCGGA-----AGGAGAGGGGCCGGTGGTGGGA-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	318
Ob-X69140	1914	AGACCCGGA-----AGGAGAGGGGCCGGTGGTGGGA-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	1967
At-Y08501	1846	AGACCCGGA-----AGGAGAGGGGCCGGTGGTGGGA-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	1902
Bn-AP006444	1982	AGACCCGGA-----AGGAGAGGGGCCGGTGGTGGGA-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	2038
Nt-BA000042	1740	AGACCCGTA-----AGGAGAGGGGCCGGTGGTGGGC-----ATTTGGGAAGTCGGGCCGATC	1793

Ta	2186	GGGTGTCTTCATTCAAGCGAGGGTACAGAGGAAAGACGAACGAAGTGAGAGGCCGGGGG	2245
Os-D21251	2166	GGGTGTCTTCATTCAAGCGAGGGTACAGAGGAAAGACGAACGAAGTGAGAGGCCGGGGG	2225
Zm-RV506529	2161	GGGTGTCTTCATTCAAGCGAGGGTACAGAGGAAAGACGAACGAAGTGAGAGGCCGGGGG	2220
Mp-NC001660	331	GGGATTTGGGCCAATAA-----ACGCTATGATTCATGATCGATTGCCATCAATACAG	384
Bv-BA000009	319	GAGTGTCTTTATTCAAGCGAGGGTACGAAAGAGACGAACGAAGTGAGAGCCGAAGG	378
Ob-X69140	1968	GGGTGTCTTCATTCAACGATGATACAGAGAGAGACGAACGAAGTAGGAGGCCGGGGG	2027
At-V08501	1903	GAGTGTCTTCATTCAAGCGACGATACAGAGAGAGACGAACGAAGTGAGAGGCCGGGGG	1962
Bn-AP006444	2039	GGGTGTCTTC-----GCGACGATACAGAGAGAGACGAACGAAGTGAGAGGCCGGGGG	2092
Nt-BA000042	1794	GGGTGTCTTCATTCAAGCGAGGGTACAGAGAGAGACGAACGAAGTGAGAGGCCGGGGG	1853
Ta	2246	GCAGGGAAAGAGTTCGAGTCGATC-----GACCGGGAGAGCA---AAAC	2287
Os-D21251	2226	GCAGGGAAAGAGTTCGAGTCGATC-----GACCGGGAGAGCA---AAAC	2267
Zm-RV506529	2221	GCAGGGAAAGAGTTCGAGTCGATC-----GACCGGGAGAGCA---AAAC	2262
Mp-NC001660	385	AGA---TTGACCAATTACTTCGAGTCAGCGA---TTGGAT-GGCCGACATCACTCTA	436
Bv-BA000009	379	GCCGGGAAAGAGTTCGAGTCGATCAGGC-----TTGACGACCAATAAGCA---AAAC	429
Ob-X69140	2028	GCAGGGAAAGAGTTCGAGTCGATCAGGC-----TCGACGACCGGGAGAGCA---AAAC	2078
At-V08501	1963	GCAGGGAAAGAGTTCGAGTCGATCAGGC-----TCGACGACCGAATAAGCA---AAAC	2013
Bn-AP006444	2093	GCAGGGAAAGAGTTCGAGTCGATCAGGC-----TCGACGACCGAATAAGCA---AAAC	2143
Nt-BA000042	1854	GCAGGGAAAGAGTTCGAGTCGATCAGGC-----TCGACGATCGGGAGAGCA---AAAC	1904
Ta	2288	GAAATCCGGATTTGGCCGAAAAGAGTGCACGCTATGGATACCATGACCGATCACCATCG	2347
Os-D21251	2268	GAAATCAGGATTTGGCCGAAAAGAGTGCACGCTATGGATACCATGACCGATCACCATCG	2327
Zm-RV506529	2263	GAAATCAGGATTTGGCCGAAAAGAGTGCACGCTATGGATACCATGACCGATCACCATCG	2322
Mp-NC001660	437	CTTTCAAGTATCTGGCCGAAGAC-GAATATGATGACAGAGAGCGTCCGATGATCGC	495
Bv-BA000009	430	GAAATCCGGATTTGGCCGAAAAGAGCAACGCTATGGATACCATGACCGATCACCATCG	489
Ob-X69140	2079	GAAATCAGGATTTGGCCGAAAAGAGCAAGGCTATGGATACCATGACCGATCACCATCG	2138
At-V08501	2014	GAAATCCGGGTTGGCCGAAAAGAAACACGCTATGGATACCATGACCGATACCTTCG	2073
Bn-AP006444	2144	GAAATCCGGGGTGGCCGAAAAGAAACACGCTATGGATACCATGACCGATCACCATCG	2203
Nt-BA000042	1905	GAAATCAGGATTTGGCCGAAAAGAGCAAGGCTATGGATACCATGACCGATCACCATCG	1964
Ta	2348	AGAAAGAGGATTTTGATAAATCACTTCGGGTGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	2407
Os-D21251	2328	AGAAAGAGGATTTTCTAATCACTTCGGGTGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	2387
Zm-RV506529	2323	AGAAAGAGGATTTTCTAATCACTTCGGGTGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	2382
Mp-NC001660	496	TATGCTTCTCTCGCTTCGCGCTTCATTCTGGTACTTGCGTGCTGAAAAAAATA	555
Bv-BA000009	490	ATAAGAGAGATCTTTCTAATCACTTCGGGTGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	549
Ob-X69140	2139	ATAAGAGAGATCTTTCTAATCACTTCGGGTGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	2198
At-V08501	2074	ATAAGAGAGATCTTTCTAATCACTTCGGATGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	2133
Bn-AP006444	2204	ATAAGAGAGATCTTTCTAATCACTTCGGATGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	2263
Nt-BA000042	1965	ATAAGAGAGATCTTTCTAATCACTTCGTGTGAGCGGGGCCCTTCAGCATCCGAATAC	2024
Ta	2408	GCCGGGGTTGTAATGACATAGCTTTCCTTATGGGAATGCGCTCCTTACTAAAAAGG	2467
Os-D21251	2388	GCCGGGGTTGTAATGACATAGCCTTCTTGATAGAAATGACG-----	2430
Zm-RV506529	2383	GCCGGGGTTGTAATGACATAGCCTTCTTGATAGAAATGACGACTCCTTCATAAAAAC	2442
Mp-NC001660	556	GCATTTTGGGTCCGAGGACA-TTCTTTGGTTTTCCGG-----	597
Bv-BA000009	550	GCCGAGGTTGTAATGACATAGCCTTCTTGATAGAAATGATTCCTTCCTTCAAAAACG	609
Ob-X69140	2199	GCCGGGGTTTAAATGACATAGCCTTCTTGATAGAAATGACGACTCCTTCGAAAAACG	2258
At-V08501	2134	GCCGGGGTTGTAATGACATAGCCTTCTTGATAGAAATGACGACTCCTTCGAAAAACG	2193
Bn-AP006444	2264	GCCGGGGTTGTAATGACATAGCCTTCTTGATAGAAATGACGACTCCTTCGAAAAACG	2323
Nt-BA000042	2025	GCCGGGATTGAATGACATAGCCTTCTTGATAGAAATGACGACTCCTTCGAAAAAC	2084
Ta	2468	ATAGATCAAGTTATTTTT---ACCAAGAGTCCCGCTGTGACGGCCCGACGAGTCAT	2524
Os-D21251	2431	-----GCCCCGACGAGTCAT	2444
Zm-RV506529	2443	AGTTATTCAAGTTCTTTTTTTTAACCAAGAGTCCCGCTGTGACGGCCCGACGAGTCAT	2502
Mp-NC001660	598	-----	598
Bv-BA000009	610	AGTTATTCAAGTTCTTTTT---CCCAAGAGTCCGCTACGACGGCCCGACGAGTCAT	666
Ob-X69140	2259	AGTTATTCAAGTTCTTTTT---CCCAAGAGTCCCGCTCCGACGGCCCGACGAGTCAT	2315
At-V08501	2194	AGTTATTCAAGTTATTTTT---CCCAATAGTCCCGCTCCGACGGCCCGACGAGTTAT	2250
Bn-AP006444	2324	AGTTATTCAAGTTCTTTTT---CCCAAGAGTCCCGCTCCGACGGCCCGACGAGTTAT	2380
Nt-BA000042	2085	ACTTATTCAAGTTCTTTTT---CCCAAGAGTCCCGCTCCGACGCCCCGACGAGTCAT	2141

Ta	2525	CTACTAAAAGGACCCTCCCGCTGTGCGCCCTCCTTGATTATTCGGTCATGCAATAC	2584
Os-D21251	2445	CTACTAAAAGGACCCTCCCGCTGTGCGCCCTCCTTGATTATTCGGTCATGCAATAC	2504
Zm-AY506529	2503	CTACTAAAAGGACCCTCCCGCTGTGCGCCCTCCTTGATTATTCGGTCATGCAATAC	2562
Mp-NC001660	598	-----CGTGTTTCTTGATTATTTTATGCAATAC	630
Bv-BA000009	667	CTACTTAAAAGGACCCTCCCGTSCAGTGCGCCCTTCCTTGATTATTCGGTCATGCAATAC	726
Ob-X69140	2316	CTACTTAAAAGGACCCTCCCGTSCAGTGCCTCCCTCCTTGATTATTCGGTCATGCAATAC	2375
At-Y08501	2251	CTAC-----GGACCTCCCTSCAGTGCGCCCTCCTTGATTTTTGTGTCATGCAATAC	2304
Bn-AP006444	2381	CTAC-----GGACCTCCCTSCAGTGCGCCCTCCTTGATTTTTGTGTCATGCAATAC	2434
Nt-BA000042	2142	CTACTTAAAAGGACCCTCCCGTSCAGTGCGCCCTTCCTTGATTATTCGGTCATGCAATAC	2201
Ta	2585	TTTTTTAATACCTAGAAATAAATGCATTTTCGACCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	2644
Os-D21251	2505	TTTTTTAATACAAAGAACAAATGCATTTTCGACCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	2564
Zm-AY506529	2563	TTTTTTAATACAAAGAACAAATGCATTTTCGACCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	2622
Mp-NC001660	631	TTCTTTAATCTAAGAACC AATTCATTTTATCCTAT---GTTTACAGAGTCCTGTG	687
Bv-BA000009	727	TTATTGATACAAAGAAATAATGCATTTTCGATCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	786
Ob-X69140	2376	TTTTTGAATACAAAGAAC AATGCATTTTCGACCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	2435
At-Y08501	2305	TTTTTTAATACAAAGAAC AATTTATTTTCGACCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	2364
Bn-AP006444	2435	TTTTTTAATACAAAGAAC AATGATTTTCGACCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	2494
Nt-BA000042	2202	TTATTGATACAAAGAACAAATTCATTTTCGACCCCGTCTAGTTCTCAATCATTTTCGTG	2261
Ta	2645	GCACCGGGTGTGGCTGAACCATCTACGATGGGGGGAGCGAA-----GGGAGGAGCTT	2697
Os-D21251	2565	GCACCGGGTGTGGCTGAACCATCTACGATGGGGGGAGCGAA-----GGGAGGAGCTT	2617
Zm-AY506529	2623	GCACCGGGTGTGGCTGAACCATCTACGATGGGGGGAGCGAA-----GGGAGGAGCTT	2675
Mp-NC001660	688	GCACAGGGCGTAAGCTAATCATCTATGATTTGGGAGAGCAATTCGGCCAGAGCCGAGCGAA	747
Bv-BA000009	787	GCACCGGGCGTGGTGTGAACCATCTACGATGATAGAGCTATGGG-CAGGGAGGAGCTT	845
Ob-X69140	2436	GCACCGGGCGTGGCTGAACCATCTACGATGGGGGGAGCGAATCGA-CAGGGAGGAGCGAA	2494
At-Y08501	2365	GCACCGGGCGCCCTGAACCATCTACGATGGGGAGAGCGAATGCA-CAGGGAGGAGCTT	2423
Bn-AP006444	2495	GCACCGGGCGCCCTGAACCATCTACGATGGGGAGAGCGAATGCA-CAGGGAGGAGCTT	2553
Nt-BA000042	2262	GCACCGGGCGTGGCTGAACCATCTACGATGGGGGGAGCTATGCA-CAGGGAGGAGCTT	2320
Ta	2698	AGATAAGAGATACGCTCTCGCATCGCTTTTTTTTAGAAGGCTCACCAGCGAGAA	2755
Os-D21251	2618	AGATAAGAGATACGCTCTCGCATCGCTTTTTTTTAGAAGGCTCACCAGCGAGAA	2675
Zm-AY506529	2676	AGATAAGAGATACGCTCTCGCATCGCTTTTTTTTAGAAGGCTCACCAGCGATAA	2733
Mp-NC001660	748	GGACACAAAGCGGGGAGTCAATTTTACACCCAGTCCCACTTATTTTGGATCTATC	807
Bv-BA000009	846	AGATAAGAGATACGTTCTCGCATCGCTTTTTTTGTGGAAGGCTCACCAGCGAGAA	903
Ob-X69140	2495	CGAGTTGAGATACGTTCTCGCATCGCTTTTTTTGTGGAAGGCTCAGCTACCGAGAA	2552
At-Y08501	2424	ACGAGAGAGATACGTTCTCGATCGCTTTTTTTGTGGAAGGCTCACCAGCGAGAA	2481
Bn-AP006444	2554	ACGAGAGAGATACGTTCTCGATCGCTTTTTTTGTGGAAGGCTCACCAGCGAGAA	2611
Nt-BA000042	2321	AGATAAGAGATACGTTCTTGCATCGCTTTTTTTGTGGAAGGCTCACCAGCGAGAA	2378
Ta	2756	AGTGTTTTGGCCCGAGCCAAAAGAGGTTGATCCACTTCATTTCGCCAGCGAATGATCTT	2815
Os-D21251	2676	AGTGTTTTGGCCCGAGCCAAAAGAGGTTGATCCACTTCATTTCGCCAGCGAATGATCTT	2735
Zm-AY506529	2734	AGTGTTTTGGCCCGAGCCAAAAGAGGTTGATCCACTTCATTTCGCCAGCGAATGATCTT	2793
Mp-NC001660	808	ATATTTTAAAGGTATGCCCGTTTAGGA-AGCTACATCTCTTCCAGTCG--TATTA	864
Bv-BA000009	904	AGTGTTTTGGCCGAGGCCAAAAGAGGTTGACCCACTTCATTTCGCCAGCGAATGATCTT	963
Ob-X69140	2553	AGAGTTTTGGCCGAGGACAAAAGGAGTTGCCCACTTCATTTCGCCAGGAAATGATCTT	2612
At-Y08501	2482	AGTGTTTTGGCCGAGGCCAAAATAGGTTGACCCACTTCATTTCGCTTGCGAATGATCTT	2541
Bn-AP006444	2612	AGTGTTTTGGCCGAGGCCAAAATAGGTTGACCCACTTCATTTCGCTTGCGAATGATCTT	2671
Nt-BA000042	2379	AGTGTTTTGGCCGAGGCCAAAAGAGGTTGACCCACTTATTTCGCCAGCGAATGATCTT	2438
← P12 →			
Ta	2816	CGCTTCGCGGGACACAAAAACCACCATTCGCTCTTTCCTTTCTTCGGTGCTACCTTT	2875
Os-D21251	2736	CGCTTCGCGGGACACAAAAACCACCATCTCGCTCTTTCCTTTCTTCGGTGCTACCTTT	2795
Zm-AY506529	2794	CGCTTCGCGGGACACAAAAACCACCATCTCGCTCTTTCCTTTCTTCGGTGCTACCTTT	2853
Mp-NC001660	865	TATTT-----A-----	871
Bv-BA000009	964	CGCTTCGCGGGAGGAGAAAAACCACCATCTCGCTCTTTCCTTTCTTCGGTGCTACCTTT	1023
Ob-X69140	2613	CGCTTCGCTGGAGGACAAAAACCACCATCTCGCTCTTTCCTTTCTTCGGTGCTACCTTT	2672
At-Y08501	2542	CGCTTCGCGGGACAACTAAACCACCATCTCGCTCTTTCCTTCTTCGGTGCTACCTTT	2601
Bn-AP006444	2672	CGCTTCGCGGGACAACTAAACCACCATCTCGCTCTTTCCTTCTTCGGTGCTACCTTT	2731
Nt-BA000042	2439	CGCTTCGCGGGACACAAAAACCACCATCTCGCTCTTTCCTTTCTTCGGTGCTACCTTT	2498

Ta	2876	TTT TTTCCAGGGATGGGGTTGGGGTGATATAACCT TTTTGTAGT ATGCCCGGAA	2935
Os-D21251	2796	TTT TTTCCAGGGATGGGGTTGGGGTGATATAACCA TTTTGTAGT ATGCCCGGAA	2855
Zm-AY506529	2854	TTT TTTCCAGGGATGGGGTTGGGGTGATATAACCA TTTTGTAGT ATGCCCGGAA	2913
Mp-NC001660	872	-----	872
Bv-BA000009	1024	TTCTTTCCAGGGATGGGATTTAAGTTTATATAACCTG TTTTGTAGT ATGCCCGGAA	1083
Ob-X69140	2673	TTCTTTCCAGGGATGGGGTTGGGGTGATATAACCACT TTTTGTAGT ATGCCCGGAA	2732
At-Y08501	2602	TTCTTTCTAAGATGGGGTTGGGGTGATATAACCACTTTGA TGGTGGGA	2652
Bn-AP006444	2732	TTCTTTCTAAGATGGGGTTGGGGTGATATAACCACTTTGA TGGTGGGA	2782
Nt-BA000042	2499	TTT TTTCCAGGGATGGGGTTGGGGTGATATAACCT TTTTGTAGT ATGCCCGGAA	2558
Ta	2936	CAACTCCTAGCTCAATTTAGGATCAATGTAGGACCTCATGGGTAGGATAGGTAATG	2995
Os-D21251	2856	CAACTCCTAGGTCATTAAGGATCAATGTAGGACCTCATGGGTAGGATAGGTAATG	2915
Zm-AY506529	2914	CAACTCCTAGGTCATTAAGGATCAATGTAGGACCTCATGGGTAGGATAGGTAATG	2973
Mp-NC001660	872	-----	872
Bv-BA000009	1084	CAACTCCTAGGTCATTAAGGATCAATGTTGGACCTCATGGGTAGGATAGGTAATG	1143
Ob-X69140	2733	CAACTCCTAGGTCATTAAGGATCAATGTTGGAGCTCATGGGTAGGATAGGTAATG	2792
At-Y08501	2653	CAACTCCTCAATCAATTAAGGTCATGTTGGACCTCGTGGGTAGGATAGGTAATG	2712
Bn-AP006444	2783	CAACTCACTCAATCAATTAAGGTCATGTTGGACCTTTTGGGTAGGATAGGTAATG	2842
Nt-BA000042	2559	CAACTCCTAGGTCATTAAGGATCAATGTTGGACCTCATGGGTAGGATAGGTAATG	2618
Ta	2996	GAATTGATAGAGAAATTCATAGACCTAGGTAAGATAGGAATTTGATAAAGGGATAGAG	3055
Os-D21251	2916	GAATTGATAGAGAAATTCATCTACCTAGGTAAGATAGGCAATTTGATAAAGGGATAGAG	2975
Zm-AY506529	2974	GAATTGATAGAGAAATTCATAGACCTAGGTAAGATAGGCAATTTGATAAAGGGATAGAG	3033
Mp-NC001660	872	-----	872
Bv-BA000009	1144	GAATTGATAGAAATTCATAGATCTAGGTAAGATAGGATTTGATAAAGGGATAGAG	1203
Ob-X69140	2793	GAATTGATAGAGAAATTCATAGACCTAGGTAAGATAGGAGATTTGATAAAGGGATAGAG	2852
At-Y08501	2713	GAATTGATAGAGAAATTAACACCTAGGTAAGATAGAGATTTGATAAAGGTATAGAT	2772
Bn-AP006444	2843	GAATTGATAGAGAAATTCATACCTAGGTAAGATAGAGATTTGATAAAGGTATAGAT	2902
Nt-BA000042	2619	GAATTGATAGAGAAATTCATAGACCTAATTAAGATAGGAGATTTGATAAAGGGATAGAG	2678
Ta	3056	ATGATGATAGAGATCATACTGAGAAAGAGGATATTCCGTACGGGTACAACCTTATTTG	3115
Os-D21251	2976	ATGATGATAGAGATCATACTGAGAAAGAGGATATTCCGTACGGGTACAACCTTATTTG	3035
Zm-AY506529	3034	ATGATGATAGAGATCATACTGAGAAAGAGGATATTCCGTACGGGTACAACCTTATTTG	3093
Mp-NC001660	872	-----	872
Bv-BA000009	1204	ATGATGATAGAGATCATACTGAAACATTAAGATTTGTACGGGTCTAATCTTATTTG	1263
Ob-X69140	2853	ATGATGATAGAGATCATACTGAGAAACGAGAGAATTCGGTACGGGTACAACCTTATTTG	2912
At-Y08501	2773	ATGATGATAGAGATCATACTGAGAAAGAGAGGAATTCCGTACGGTACAACCTTATTTT	2832
Bn-AP006444	2903	ATGATGATAGAAATCATACTGAGAAAGAGAGGAATTCCGTATAGGTACAACCTTATTTT	2962
Nt-BA000042	2679	ATGATGATAGAGATCATACTGAGAAACGAGAGAATTCGGTACGGGTACAACCTTATTTG	2738
Ta	3116	AACGAAGTGC AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAATACCTTAATT	3175
Os-D21251	3036	AACGAAGTGC AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAATACCTTAATT	3095
Zm-AY506529	3094	AACGAAGTGC AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAATACCTTAATT	3153
Mp-NC001660	872	----- AAAAAATGCAATCTTTATTTTCTAATCAACAAACACTAATACCTTAATT	921
Bv-BA000009	1264	AACGAAGTGA AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAATACCTTAATT	1323
Ob-X69140	2913	AACGAAGTGA AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAATACCTTAATT	2972
At-Y08501	2833	TACGAAGTCA AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAAGACCTTAATT	2892
Bn-AP006444	2963	TACGAAGTCA AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAAGACCTTAATT	3022
Nt-BA000042	2739	AACGAAGTGA AAAAAATGCGATCTTTT TGTCTAATAGACAAACACTAATACCTTAATT	2798
Ta	3176	GAGTCGGTAAGATCAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCTGATTGCTCAGACATCTCT	3235
Os-D21251	3096	GAGTCGGTAAGATCAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCTGATTGCTCAGACATCTCT	3155
Zm-AY506529	3154	GAGTCGGTAAGATCAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCTGATTGCTCAGACATCTCT	3213
Mp-NC001660	922	CAGCAGTCAATAGCTTCTGTTTATCAAGTGCTTCTCTAATTGCTCAGACATCTCT	981
Bv-BA000009	1324	GAGTCGGTCAGATCAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCCGATTGCTCAGACATCTCT	1383
Ob-X69140	2973	GAGTCGGTCAGATCAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCCGATTGCTCAGACATCTCT	3032
At-Y08501	2893	GAGTCAGTCAATATAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCCGATTGCTCAGACATCTCT	2952
Bn-AP006444	3023	GAGTCAGTCAATATAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCTGATTGCTCAGACATCTCT	3082
Nt-BA000042	2799	GAGTCGGTCAGATCAATCTGTTTATCAAGTGCTTCTCCGATTGCTCAGACATCTCT	2858

Ta	3236	TTTCAACTGAGGACCAATCCATCTCATTTCGTTCCATTTTGTAGTAAATAGTGAGGGAT	3295
Os-D21251	3156	TTTCAACTGAGGACCAATCCATCTCATTTCGTTCCATTTTGTAGTCAATAGTGAGGGAT	3215
Zm-AY506529	3214	TTTCAACTGAGGACCAATCCATCTCATTTCGTTCCATTTTGTAGTAAATAGTGAGGGAT	3273
Mp-NC001660	982	TGGAACT--AGACCAAAAG--ATCATTTCGACAAATATGTAGTCTATATTTAAACAG	1038
Bv-BA000009	1384	TTTCAACCGAAGAGCAAAAGAGATCATTTCGTTCTATTTTGTAGTAAATAGTGAGGAG	1443
Ob-X69140	3033	TTTCAACCGAGGACCAAAAGAGATCATTTCGTTCTATTTTGTAGTCAATTTGTAGGGAT	3092
At-Y08501	2953	TTTCAACTGAGAGCAAAAGAGATCATTTCATTCATTTTGTAGTAAATAGTGAGGGAG	3012
Bn-AP006444	3083	TTTCAACTGAGAGCAAAAGAGATCATTTCATTCATTTTGTAGTAAATAGTGAGGGAG	3142
Nt-BA000042	2859	TTTCAACCGAGGACCAAAAGAGATCATTTCGTTCCATTTTGTAGTAAATAGTGAGGGAT	2918
Ta	3296	ATTCCATTATATATGCCAAAGGGGTGGAGGGGATACGTATTTGTTGTTCTGGTCGATTA	3355
Os-D21251	3216	ATTCCATTATATATGCCAAAGGGGTGGAGGGGATACGTATTTGTTGTTCTGGTCGATTA	3275
Zm-AY506529	3274	ATTCCATTATATATGCCAAAGGGGTGGAGGGGATACGTATTTGTTGTTCTGGTCGATTA	3333
Mp-NC001660	1039	ATTAA-----AATGCCCATATG--TGAGGGGATCCGTATTTGTTGTTCTGGTCGATTA	1092
Bv-BA000009	1444	ATTCCATTATATATGAAGGGGGGTAGAGGGGATCCGTATATGTTGTTCTGGTCGATTA	1503
Ob-X69140	3093	ATCCATTATATATGAAGGGGTTAGAGGGGATCCGTATATGTTGTTCTGGTCGATTA	3152
At-Y08501	3013	ATTCCA-----AAGGGGTGGAGGGATCCGTATATGTTTTCGGTCGATTA	3060
Bn-AP006444	3143	ATTCCA-----AAGGGGTGGAGGGATCCGTATATGTTTTCGGTCGATTA	3190
Nt-BA000042	2919	ATTCCATTATATATGAAGGGGTGGAGGGGATCCGTATATGTTGTTCTGGTCGATTA	2978
Ta	3356	GGGGTGCAG--AATAGCTAGACTGAATGCGGAAGTATGGAAAACATCTTGTAAT	3412
Os-D21251	3276	GGGGTGCAG--AATAGCTAGACTGAATGCGGAAGTATGGAAAACATCTTGTAAT	3332
Zm-AY506529	3334	GGGGTGCAG--AATAGCTAGACTGAATGCGGAAGTATGGAAAACATCTTGTAAT	3390
Mp-NC001660	1093	AATGGTGCAG--AATAGCTAGACTGAATGCAAAAGTACGGTGAACATCTTTACAT	1149
Bv-BA000009	1504	AAGGGTGCAG--AATAGCTAGACTGAATGCGGAAGTATGGAAAACATCTTGTAAT	1560
Ob-X69140	3153	AAGGGTGCAG--AATAGCTAGACTGAATGCGGAAGTATGGAAAACATCTTGTAAT	3209
At-Y08501	3061	AAGACGCAGCAGAAAGGCTCAACTAATGCTATAGCCTAGAAAACCTTCTGTAAT	3120
Bn-AP006444	3191	AAGACGCAGCAGAAAGGCTCAACTAATGCTATAGCCTAGAAAACCTTCTGTAAT	3250
Nt-BA000042	2979	AAGGGTGCAG--AATAGCTAGACTGAATGCGGAAGTATGGAAAACATCTTGTAAT	3035
Ta	3413	GTATTTAACCAGAAATCGATTATGCTCCTGCGGAAGTATCTACTCGTACGGGAATTTCA	3472
Os-D21251	3333	GTATTTAACCAGAAATCGATTATGCTCTGCGGAAGTATCTACTCGTACGGGAATTTCA	3392
Zm-AY506529	3391	GTATTTAACCAGAAATCGATTATGCTCCTGCGGAAGTATCTACTCGTACGGGAATTTCA	3450
Mp-NC001660	1150	GTITTTTCGATCAATTTGATTATGCGAAACACAGCATCTACTCTTATGGATCTTA	1209
Bv-BA000009	1561	GTATTTAACCAGAAATCGATTATGCTCTGCGGAAGTATCTACTCGTTACGGGAATCTA	1620
Ob-X69140	3210	GTATTTAACCAGAAATCGATTATGCTCCTGCGGAAGTATCTACTCGTTACGGGAATCTA	3269
At-Y08501	3121	GTATTTAACCATAAATCGATTATGCTCCTGCGGAAGTATCTACTCGTTACGGGAATCTA	3180
Bn-AP006444	3251	GTATTTAACCAGAAATCGATTATGCTCCTGCGGAAGTATCTACTCGTTACGGGAATCTA	3310
Nt-BA000042	3036	GTATTTAACCAGAAATCGATTATGCTCCTGCGGAAGTATCTACTCGTTACGGGAATCTA	3095
Ta	3473	GGTGTCAAGTGCGGATCTCATATAGT-----CAAAATAGAGGGGAC-----GTGCTATA	3523
Os-D21251	3393	GGTGTCAAGTGCGGATCTCATATAGT-----CAAAATAGAGGGGAC-----GTGCTATA	3443
Zm-AY506529	3451	GGTGTCAAGTGCGGATCTCATATAGT-----CAAAATAGAGGGGAC-----GTGCTATA	3501
Mp-NC001660	1210	GGTGTCAAGTGCGGTTTCATATTTTAAACAAAAAAGGGGACAGTTGTGCTATA	1269
Bv-BA000009	1621	GGTGTCAAGTGCGGATTTCTTATAGT-----CAAAATAG-----GTGCTATA	1656
Ob-X69140	3270	GGTGTCAAGTGCGGATTTCTTATAGT-----AGTAA-----GTGCTATA	3302
At-Y08501	3181	GGTGTCAAGTGCGGATTTTCATATAGT-----CAAAAAAAGGGGAC-----GTGCTATA	3231
Bn-AP006444	3311	GGTGTCAAGTGCGGATTTTCATATAGT-----CAAAAAAAGGGGAC-----GTGCTATA	3361
Nt-BA000042	3096	GGTGTCAAGTGCGGATTTTCATATAGT-----CAAAAAAAGGGGAC-----GTGCTATA	3146
Ta	3524	TCCGAACGTACGAATATAGTAATATTTTAAATGCAGATGTAGTAGGGGTTGCCAAC	3582
Os-D21251	3444	TCCGAACGTACGAATATAG-----	3464
Zm-AY506529	3502	TCCGAACGTACGAATATAG-----	3522
Mp-NC001660	1270	TCCGAACGTACGAATTTCTAA-----	1293
Bv-BA000009	1656	-----	1656
Ob-X69140	3302	-----	3302
At-Y08501	3232	TCCGAACGTACGAATATAG-----	3252
Bn-AP006444	3362	TCCGAACGTACGAATATAG-----	3382
Nt-BA000042	3147	TCCGAACGTACGAATATAG-----	3167

exon2 ← * *

P13

表10 コムギ*rps3*と他の植物種*rps3*との相同性

species	Accession number of DDBJ/EMBL/GenBank data base	homology (%) with the <i>Triticum aestivum</i> sequence		
		exon 1	intron	exon 2
<i>Oryza sativa</i>	D21251	100.0	97.5	97.0
<i>Zea mays</i>	AY506529	100.0	98.6	96.3
<i>Marchantia polymorpha</i>	NC_001660	85.1	-	66.6
<i>Beta vulgaris</i>	BA000009	93.2	-	87.6
<i>Oenothera berteriana</i>	X69140	95.9	82.8	90.0
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Y08501	90.5	82.2	88.3
<i>Brassica napus</i>	AP006444	90.5	76.8	88.7
<i>Nicotiana tabacum</i>	BA000042	94.6	84.2	91.6

ゼニゴケとテンサイの*rps3*にはイントロンがない。

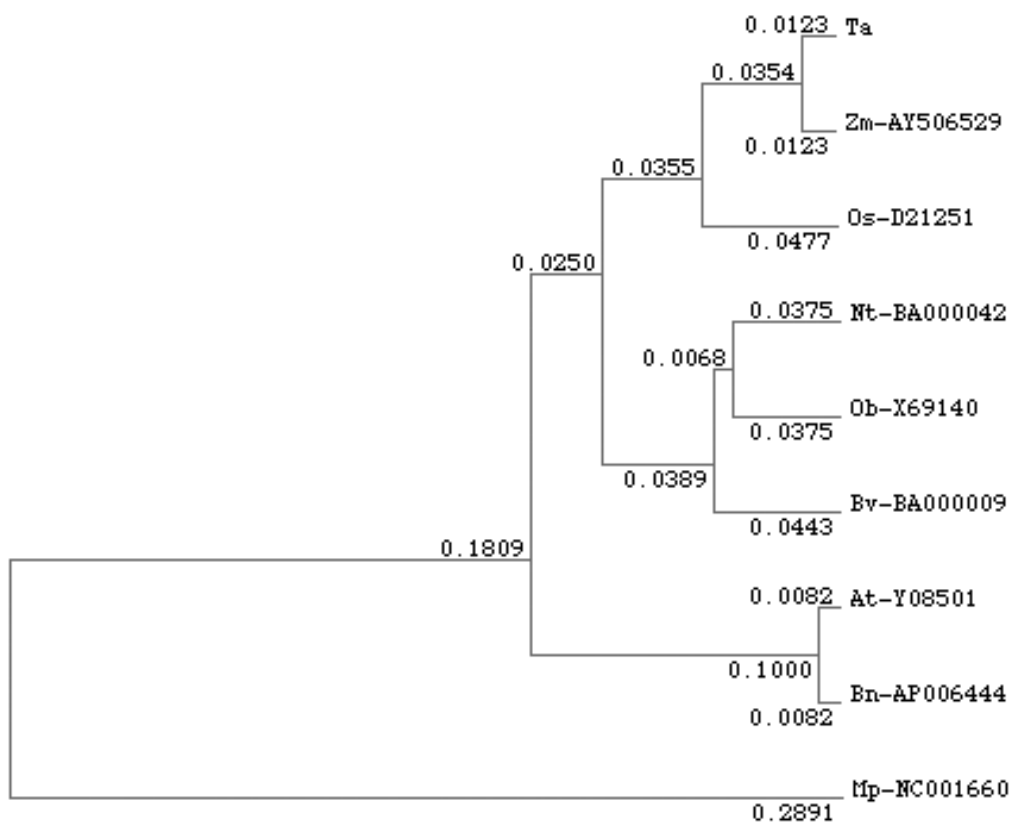


図21 植物*rps3*の系統樹

ゲノム塩基配列を用いUPGMA法によって作図した。分岐点の上下に示す数値は共通の祖先からの系統発生的距離を示す。Ta, Os, Zm, Mp, Bv, Ob, At, Bn, Nt: コムギ、イネ、トウモロコシ、ゼニゴケ、テンサイ、*Oenothera*、シロイヌナズナ、ナタネおよびタバコ。種名の後の記号はDDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバーを示す。

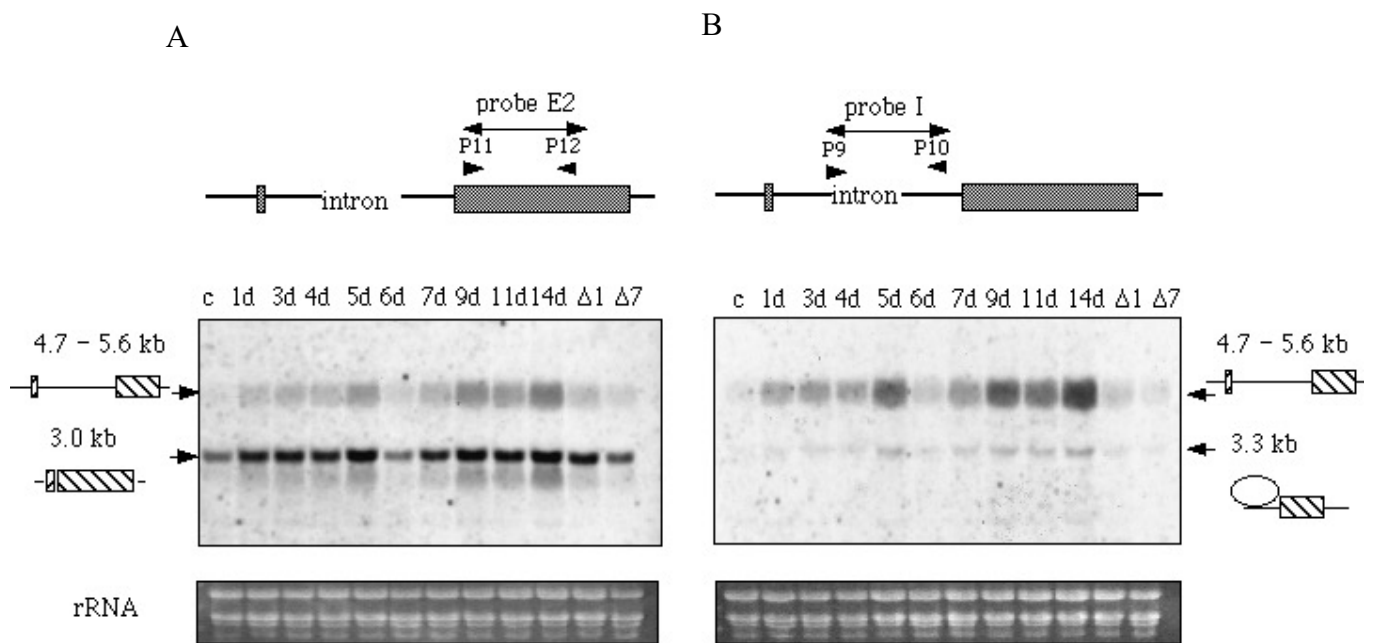


図22 コムギ *rps3* のノーザン解析

全RNA 20 μ g ずつ電気泳動に用いた。(A) プローブ E2 を用いた分析。(B) プローブ I を用いた分析。c: 対照区; 1d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 9d, 11d, 14d: 低温処理 (昼 2°C/夜 0.5°C) 1日、3日、4日、5日、6日、7日、9日、11日、14日間; Δ1, Δ7: 低温処理 14 日間の後、常温 (昼 20°C/夜 15°C) に戻して 1日、7日間。検出された転写産物のサイズを左右に示す。高分子の転写産物は、4.7kb から 5.6kb の幅広い分子サイズを呈した。

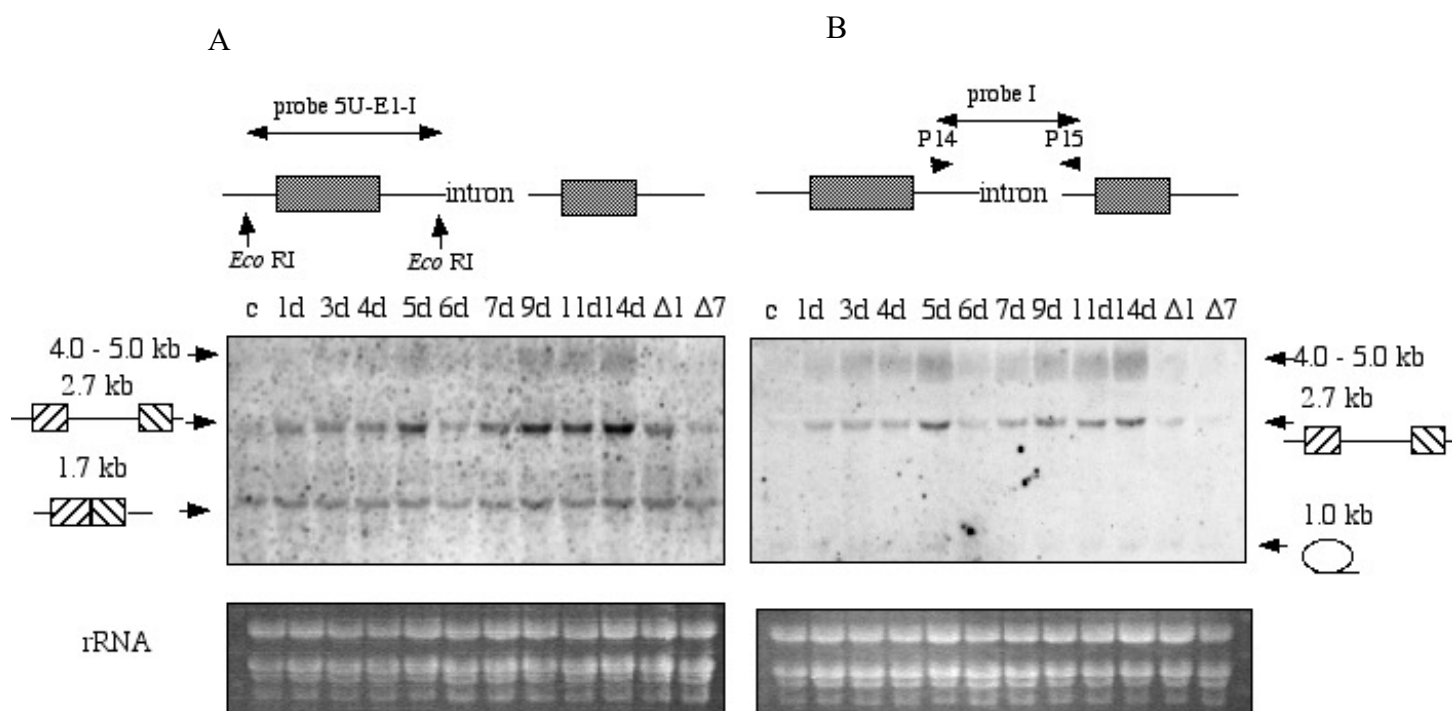


図23 コムギ*ccmFc*のノーザン解析

全RNA20 μ gずつ電気泳動に用いた。(A)プローブ5U-E1-Iを用いた分析。(B)プローブIを用いた分析。c: 対照区; 1d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 9d, 11d, 14d: 低温処理（昼20°C/夜0.5°C）1日、3日、4日、5日、6日、7日、9日、11日および14日間; Δ1, Δ7: 低温処理の後、常温（昼20°C/夜15°C）に戻して1日、7日間。検出された転写産物のサイズを左右に示す。高分子の転写産物は、4.0kbから5.0kbの幅広い分子サイズを呈した。

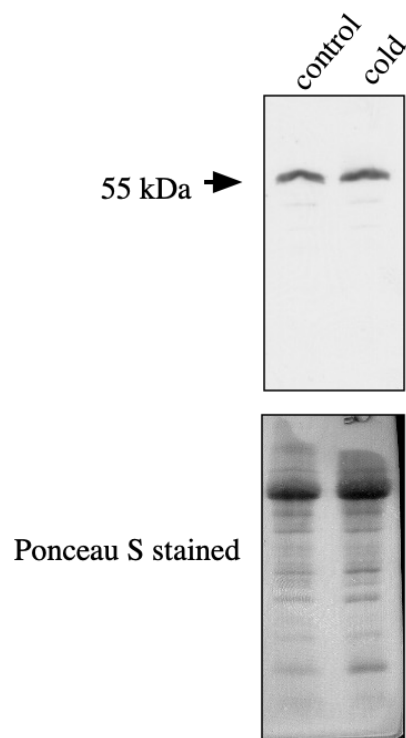


図24 暗黒条件下のコムギCCMFcタンパク質のウェスタン分析
ミトコンドリアタンパク質量10 μ gずつ泳動に用いた。 control: 対
照区 (20 $^{\circ}$ C) ; cold:低温処理区 (2.8 $^{\circ}$ C、5日間)

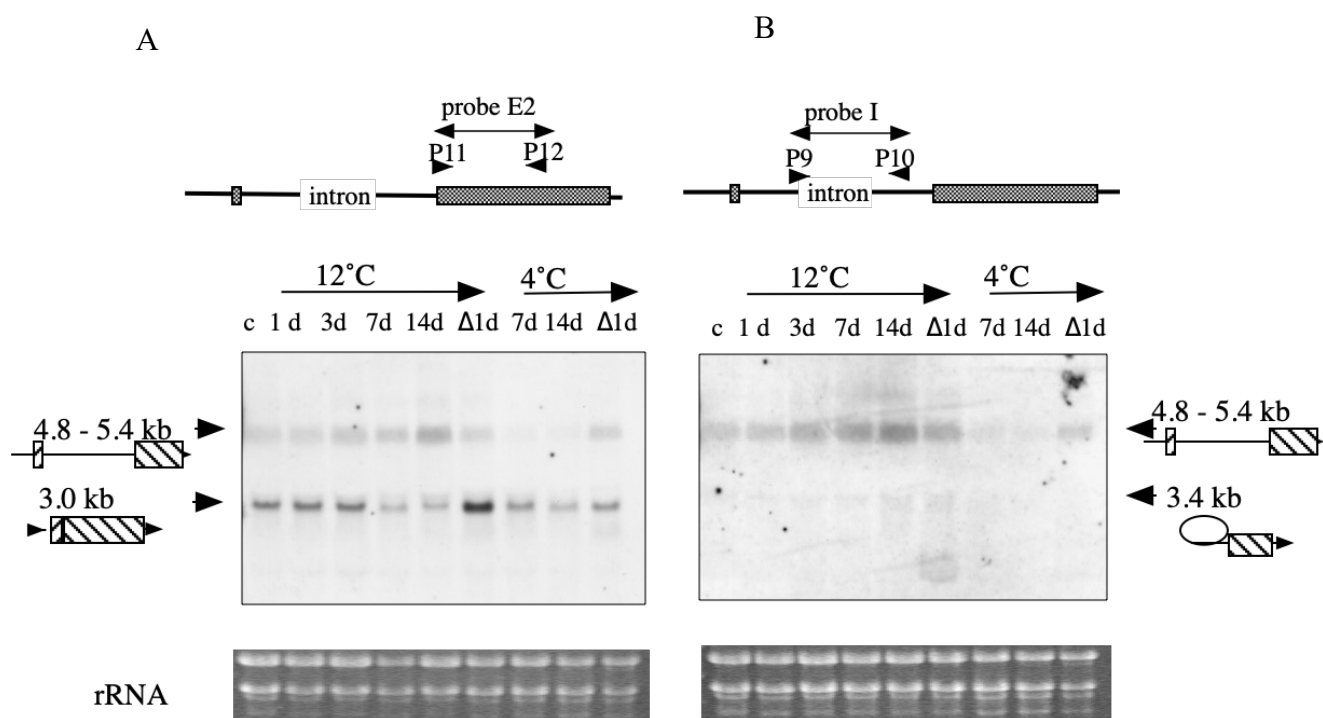


図25 イネ *rps3* のノーザン解析

全RNA 20 μ g ずつ電気泳動に用いた。(A) プローブE2を用いた分析。(B) プローブIを用いた分析。c: 対照区(25°C) ; 1d, 3d, 7d, 14d: 低温処理 (12°Cまたは4°C) 1日、3日、7日、および14日間; Δ1: 低温処理 (12°Cまたは4°C) 14日間施した後、常温 (25°C) に戻した区。検出された転写産物のサイズを左右に示す。高分子の転写産物は、4.8kbから5.4kbの幅広い分子サイズを呈した。

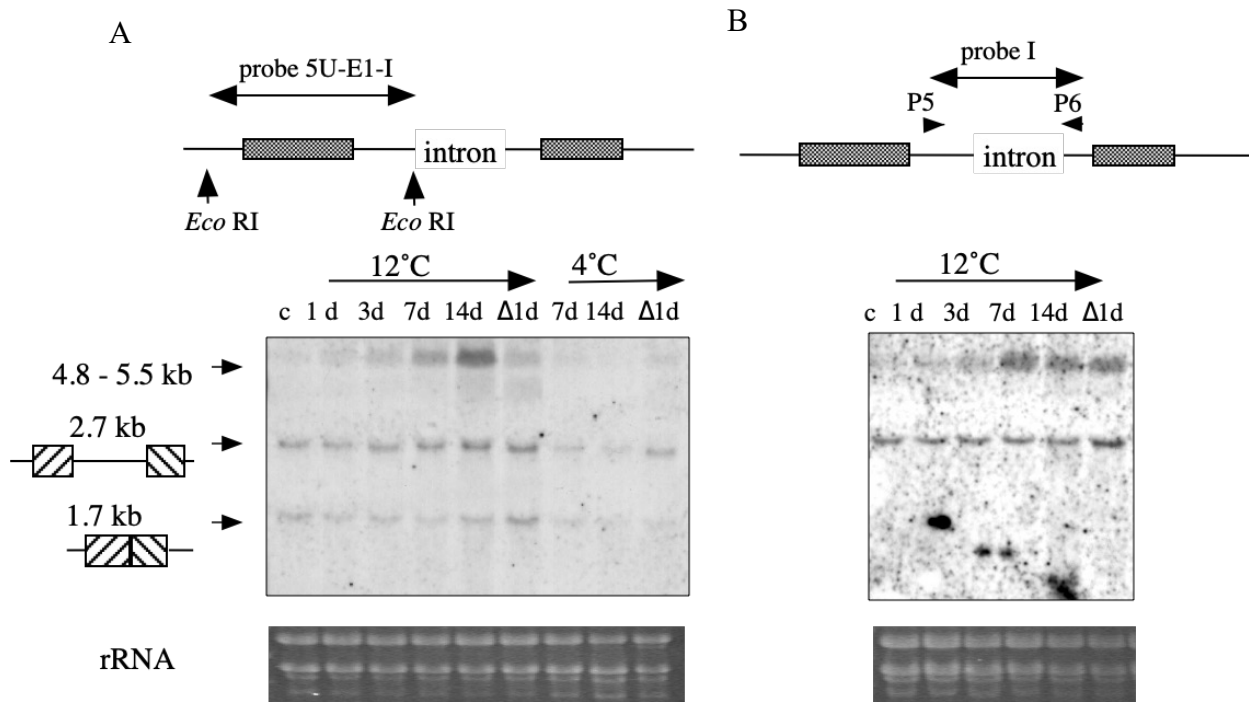


図26 イネ*ccmFc*のノーザン解析

全RNA20 μ gずつ電気泳動に用いた。(A) プローブ5U-E1-Iを用いた分析。(B) プローブIを用いた分析。c: 対照区(25°C) ; 1d, 3d, 7d, 14d: 低温処理 (12°Cまたは4°C) 1日、3日、7日、および14日間; Δ1: 低温処理 (12°Cまたは4°C) 14日間施した後、常温 (25°C) に戻して1日後。検出された転写産物のサイズを左に示す。高分子の転写産物は、4.8kbから5.5kbの幅広い分子サイズを呈した。

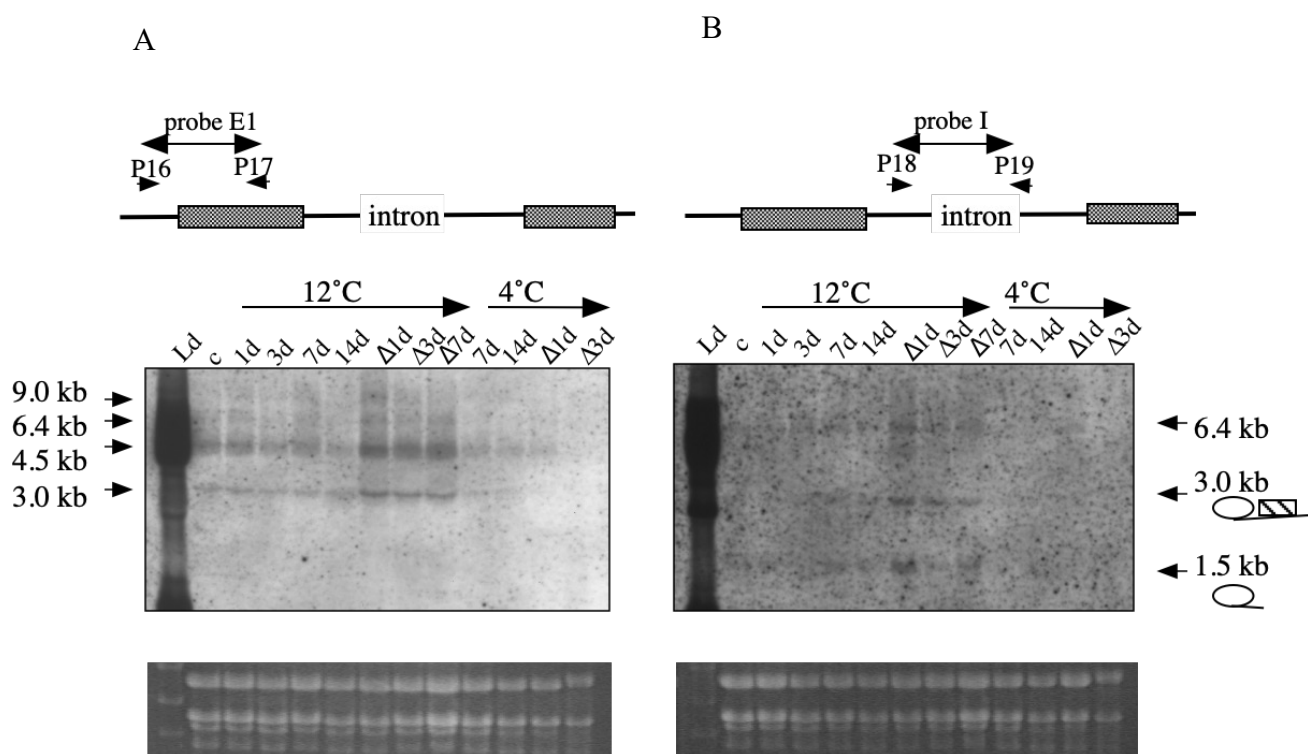


図27 イネ *rpl2* のノーザン解析

全RNA20 μ gずつ電気泳動に用いた。十分なシグナル強度が得られなかった。(A)プローブE1を用いた分析。(B)プローブIを用いた分析。Ld: RNA ラダー；c: 対照区(25 $^{\circ}$ C)；1d, 3d, 7d, 14d: 低温処理（12 $^{\circ}$ Cまたは4 $^{\circ}$ C）1日、3日、7日および14日間； Δ 1, Δ 3, Δ 7: 低温処理（12 $^{\circ}$ Cまたは4 $^{\circ}$ C）を14日間施した後、常温（25 $^{\circ}$ C）に戻して1日、3日、7日後。検出された転写産物のサイズを左右に示す。

2. 複数のイントロンで分断される遺伝子の発現解析

1) 材料と方法

(1) 植物材料

‘チホクコムギ’を二葉期まで昼 20°C/夜 15°Cで育て、低温処理（昼 2.0°C/夜 0.5°C、14 日間）を行った（第 II 章参照）。‘ほしのゆめ’を 3 葉期まで 25°Cで育て、12°Cの低温処理を 14 日間行った（第 II 章参照）。いずれも茎葉部を採取した。

(2) 全 RNA の抽出と定量的 RT-PCR

全 RNA は、Trizol 試薬（Invitrogen 社、USA）を用いて抽出した。

全 RNA を RNase-free DNase I（GE Healthcare Bio-Sciences 社、USA）によって Assay Buffer（40mM Tris-HCl pH7.5, 10mM CaCl₂）中 30 分間 37°Cでインキュベートした。cDNA は、20 μ l の反応液中に 5 μ g の全 RNA、50ng のランダムヘキサマープライマー、200units の逆転写酵素 SuperScript III（Invitrogen 社、USA）を用い、添付プロトコールに従い合成した。陰性対照区には逆転写酵素の代わりに滅菌水を用いた。RNA 量 125ng、50ng、25ng もしくは 5ng に由来する cDNA を用いてプライマーそれぞれ 4pmol、PCR 酵素 Hot start EX Taq（5units/ μ l、タカラバイオ社）0.1 μ l（1unit）、dNTP それぞれ 4nmol、また、10 $\times$ EX Taq buffer 2 μ l を、20 μ l 容量で反応させた。PCR の条件は、95°Cで 2 分を 1 サイクル、次に 95°Cで 30 秒、2 種のプライマーのうち T_m 値の高い方をアニーリング温度として 30 秒、72°Cで 30 秒を 19~31 サイクル、最後に 72°Cで 7 分を 1 サイクルである。得られた PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色によりバンドを検出した。

(3) オリゴヌクレオチド

巻末付表 2 および 3 に示す。プライマーとして用いたオリゴヌクレオチドの組は、イントロンごとに、イントロンを含む転写産物の 5'末側エキソンとイントロンの接合部およびイントロン-スプライシングを経た転写産物の 5'末端側エキソンと 3'末側エキソンの接合部を増幅し、PCR 産物の長さが 100 から 307bp になるように設計した。シス型イントロン-スプライシングのみを行う遺伝子の例、トランス型イントロン-スプライシングも行う遺伝子の例として、それぞれ

コムギとイネの *nad7*、イネ *nad2* のプライマーの位置と方向を図 28 に示す。

2) 結果

(1) ノーザン解析と定量的 RT-PCR の整合性

イントロンを複数保持する遺伝子やトランス型のスプライシングを行う遺伝子は、各イントロンの複雑なスプライシングパターンを反映して多様な転写産物を生ずるため、ノーザン解析では転写産物の増減を追跡するのが困難である。そこで、こうした遺伝子については定量的 RT-PCR によりイントロンを含む転写産物と含まない転写産物の量を比較することとした。初めに、定量的 RT-PCR とノーザン解析の整合性を調べるために、第 II 章で詳細なノーザン解析を行ったコムギ *cox2* 遺伝子をモデルとして実験を行い、鋳型 RNA に含まれる標的 RNA 量を反映した PCR 産物を得るための条件を検討した。まず PCR サイクル数を 25 に固定し、鋳型 RNA 量に対する PCR 産物量のカイネティクスを調べた。前駆体型転写産物を標的とするプライマー P43 と P44 (図 29A 上) を用いたところ、25~125ng の範囲で鋳型 RNA 量を反映した PCR 産物の増加が観察された (図 29A 左)。一方、成熟 mRNA を標的とするプライマー P43 と P45 (図 29A 上) を用いた RT-PCR では、鋳型 RNA 量 50ng と 125ng で見た目の PCR 産物量が等しくなりプラトーに達していると思われた (図 29A 右)。

続いて鋳型 RNA 量を固定し、PCR サイクル数に対する PCR 産物量のカイネティクスを調べた。前駆体型転写産物を標的とするプライマー P43 と P44 では、鋳型 RNA 量を 125ng に固定し、PCR サイクルを 19~27 サイクルまで、2 サイクルずつ変化させた。その結果、21~27 サイクルまで PCR サイクル数に応じた PCR 産物の増加が認められた (図 29B 上)。一方、成熟 mRNA を標的とするプライマー P43 と P45 では、鋳型 RNA 量を 25ng に固定し、19~25 サイクルまで PCR サイクルに応じた PCR 産物の増加が認められ、25 サイクルと 27 サイクルでは PCR 産物量はほぼ等しくなり、プラトーに達していると思われた (図 29B 下)。以上のような 2 段階の実験より PCR 産物量のカイネティクスを求め、指数増加期の PCR 産物量に基づき常温区と低温処理区の標的 RNA 量を比較した。*cox2* 前駆体転写産物の場合、同一 PCR 条件下で低温処理区の PCR 産物は常温区よりも明らかに多く、およそ 2 サイクル分増加しているように見える (図 29B 上)。これより、低温処理により *cox2* 前駆体転写産物がおよそ $2^2=4$ 倍に増加していると考えられた。一方、*cox2* 成熟 mRNA の場合、常温区

と低温処理区で PCR 産物量は変わらない (図 29B 下)。以上の結果は第 II 章のノーザン解析のデータとほぼ一致する。

(2) シス-スプライシング型イントロンを保持するコムギミトコンドリア遺伝子の低温環境下における発現

コムギミトコンドリア遺伝子のうち、シス-スプライシング型イントロンのみを保持する *nad4*、*nad7*、*rps3* および *ccmFc* について、転写産物プール内の各イントロンによる分断部位におけるイントロンを含む分子またはスプライシングを経た分子の量の低温による変化を、定量的 RT-PCR により解析した。結果を図 30～38 に示す。解析した全ての遺伝子について、低温処理によりイントロンを含む転写産物が増加し、その割合は 4 倍以上 (*rps3*、*ccmFc*、*nad4* のイントロン 1 および *nad7* のイントロン 1～4) もしくは 4 倍未満 (*nad4* のイントロン 2 および 3) であった。また、スプライシングを経た転写産物蓄積量は低温処理により増加するかまたは変化しなかった。4 倍以上蓄積したのは *nad7* のイントロン 1 で分断されていた部位で、4 倍未満の増加を示したのは *nad4* のイントロン 1 および 2、*nad7* のイントロン 2 および 3、*rps3* のイントロンおよび *ccmFc* のイントロンで分断されていた部位である。*nad4* のイントロン 3、*nad7* のイントロン 4 で分断されていた部位では変化が見られなかった。結果をまとめて表 11 に示す。

(3) イントロンを保持するイネミトコンドリア遺伝子の低温環境下における発現

イネミトコンドリアゲノムで同定された 23 箇所のイントロンによる分断部位の全てについて定量的 RT-PCR による発現解析を行った。結果の一部を図 39～41 に示す。解析した分断部位のうち、低温処理によりイントロンを含む転写産物が増加したのは *cox2*、*rps3*、*ccmFc*、*rpl2* の各イントロン、*nad1* のイントロン 1、2 および 4、*nad2* のイントロン 1、3 および 4、*nad4* のイントロン 1、2 および 3、*nad5* のイントロン 4、*nad7* のイントロン 1 および 4 の合計 16 種であった。増加の割合は 4 倍以上 (*cox2*、*rps3*、*ccmFc* の各イントロン、*nad1* のイントロン 1 および 4、*nad2* のイントロン 3 および 4 および *nad4* のイントロン 1) もしくは 4 倍未満 (*rpl2* イントロン、*nad1* のイントロン 2、*nad2* のイントロン 1、*nad4* のイントロン 2 および 3、*nad5* のイントロン 4、*nad7* のイ

ントロン 1 および 4) である。*nad1* のイントロン 3、*nad2* のイントロン 2、*nad5* のイントロン 1、2 および 3、*nad7* のイントロン 2 および 3 については低温処理によるイントロンを含む転写産物の増加は認められなかった。スプライシングを経た転写産物蓄積量に関しては低温処理により増加せず、変化しない場合 (*rpl2*、*ccmFc* の各イントロン、*nad1* のイントロン 1、3 および 4、*nad2* のイントロン 1、2 および 4、*nad4* のイントロン 2、*nad5* のイントロン 1、2 および 3、*nad7* のイントロン 2、3 および 4) と、やや減少する場合 (*cox2*、*rps3* の各イントロン、*nad1* のイントロン 2、*nad2* のイントロン 3、*nad4* のイントロン 1 および 3、*nad5* のイントロン 4 および *nad7* のイントロン 1) がみられた。減少の割合は 1/2～3/4 程度と見積もられる。結果をまとめて表 12 に示す。

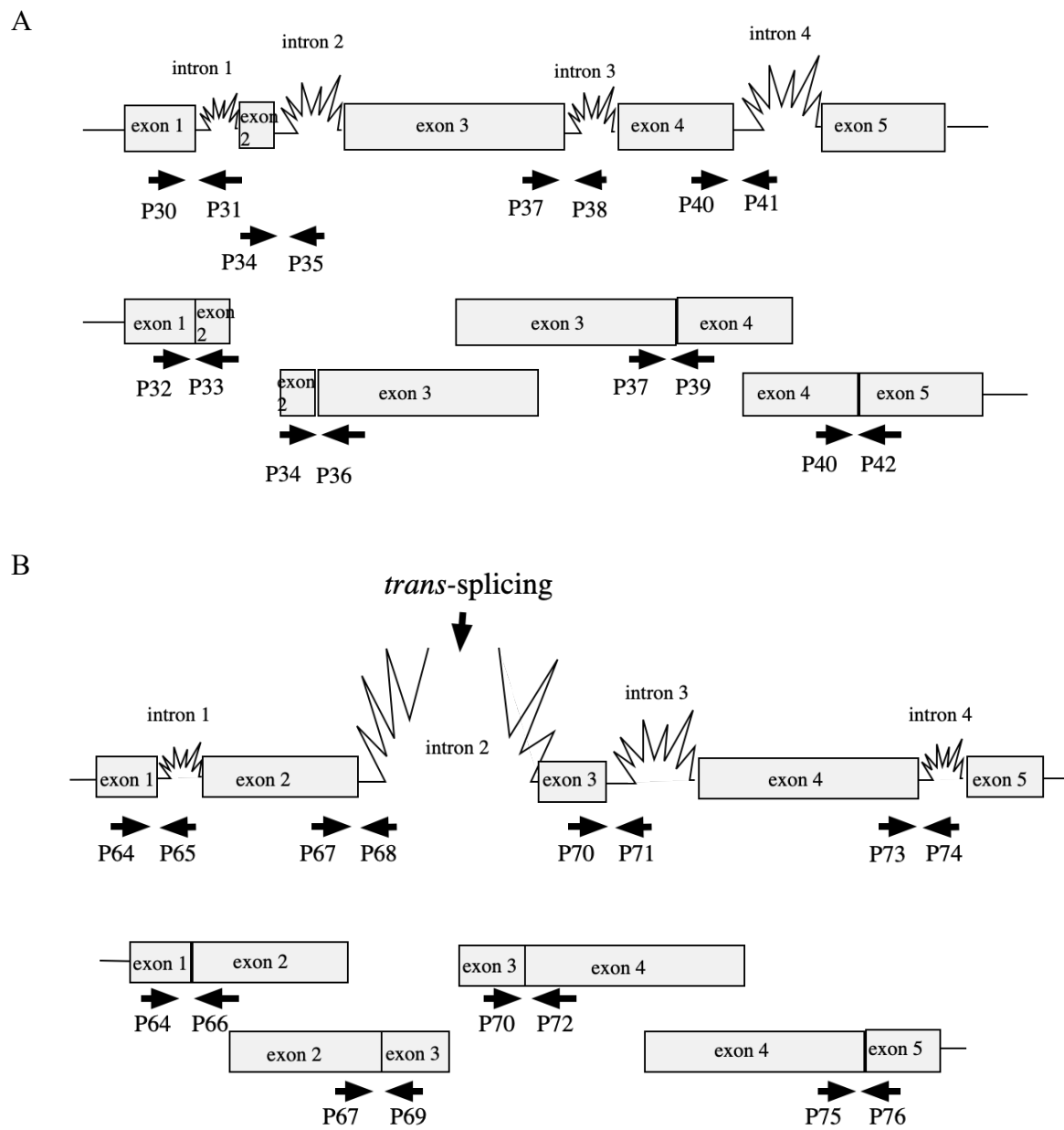


図28 プライマー設計例

(A)イントロン-スプライシングが全てシス型である遺伝子における例（コムギとイネの*nad7*） (B)シス型とトランス型の両方のイントロン-スプライシングを行う遺伝子における例（イネ*nad2*）

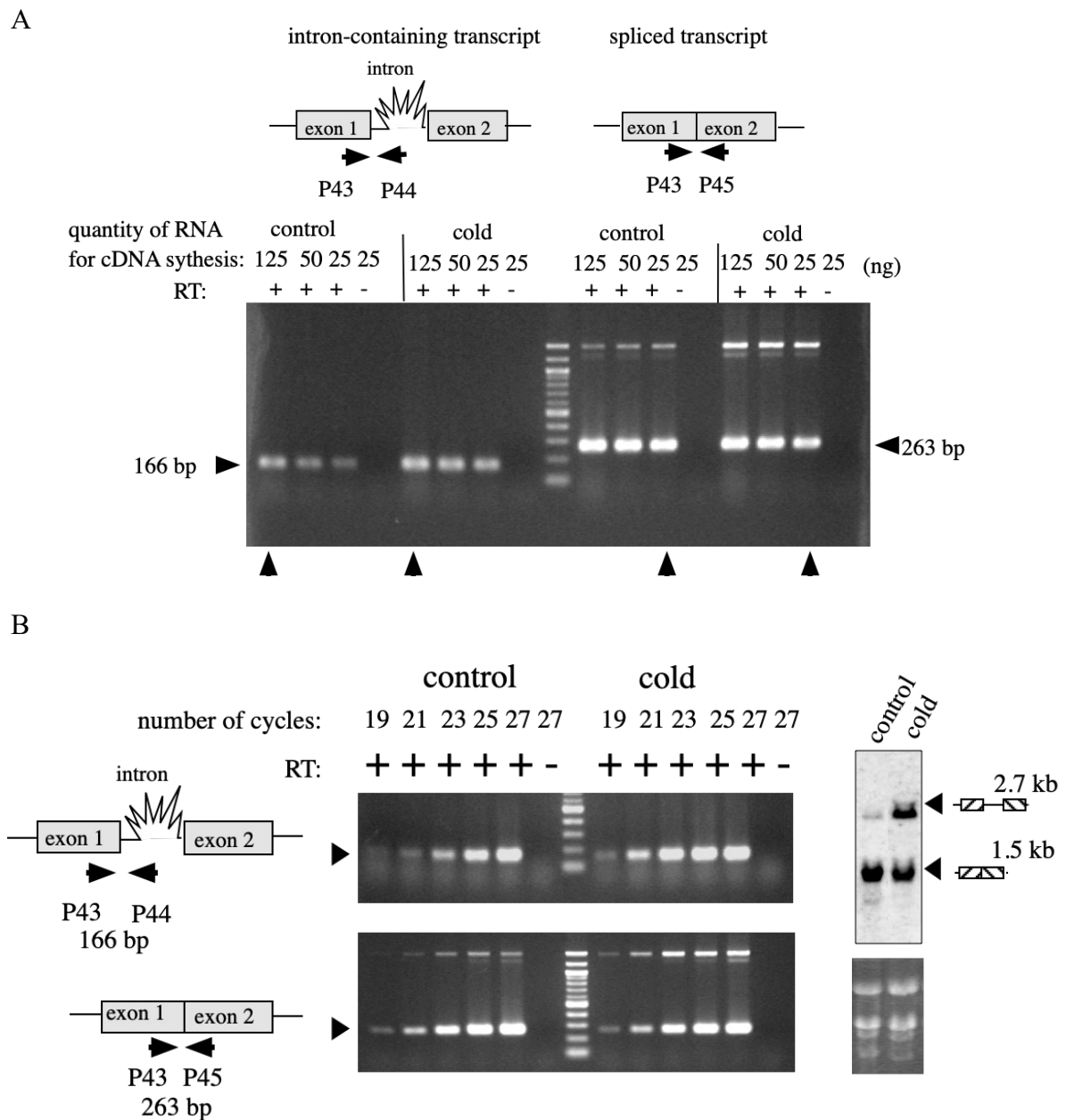


図29 コムギ*cox2*の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。+: 逆転写酵素を使用した区; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

(A)予備試験 (本試験に用いるRNA量の検討)。cDNA合成に用いた全RNA量を上に示す。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、56°C30秒、72°C30秒を25サイクル、最後に72°C7分。鋳型RNA量に対するPCR産物量のカイネティクスを調べた。PCR産物量に基づき、本試験のcDNA合成に用いる全RNA量を、前駆体転写産物(左)では125ng、成熟転写産物(右)では25ngと決定した。(B)本試験。PCRの条件は、サイクル数以外を予備試験と同様に、サイクル数を19から27まで2サイクルずつ増加させた。右図は同じRNAを用いたノーザン解析。

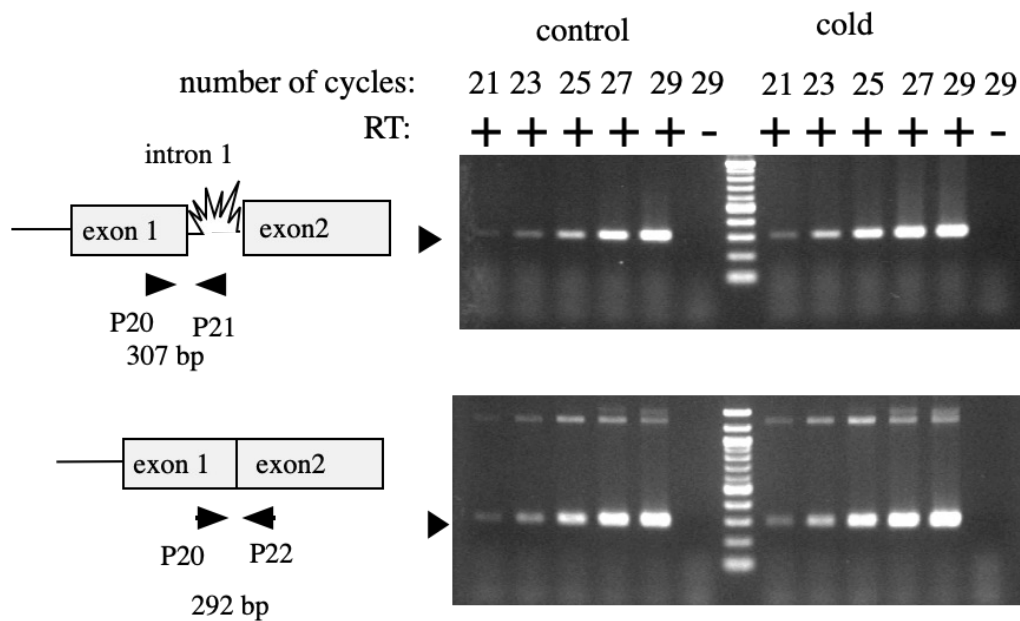


図30 コムギ*nad4*イントロン1のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。cDNA合成に用いた全RNA量は、イントロン1を含む転写産物の増幅のために125ng、スプライシングを経た転写産物の増幅のために25ngである。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

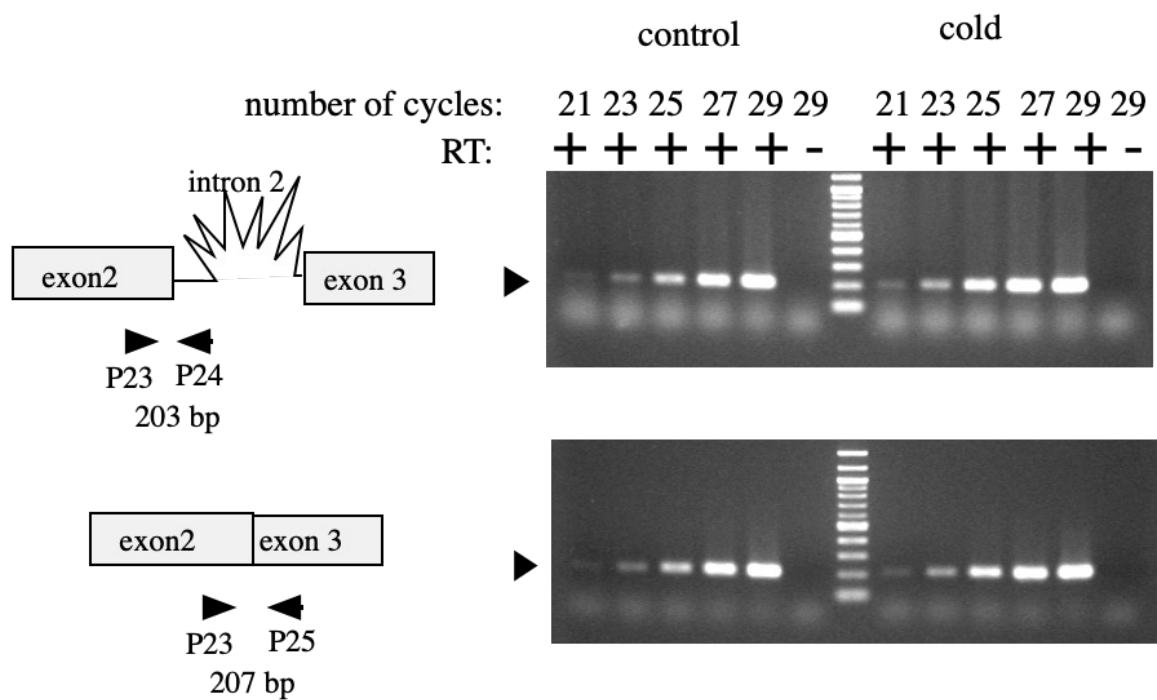


図31 コムギ*nad4*イントロン2のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。cDNA合成に用いた全RNA量は、イントロン2を含む転写産物の増幅のために125ng、スプライシングを経た転写産物の増幅のために25ngである。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

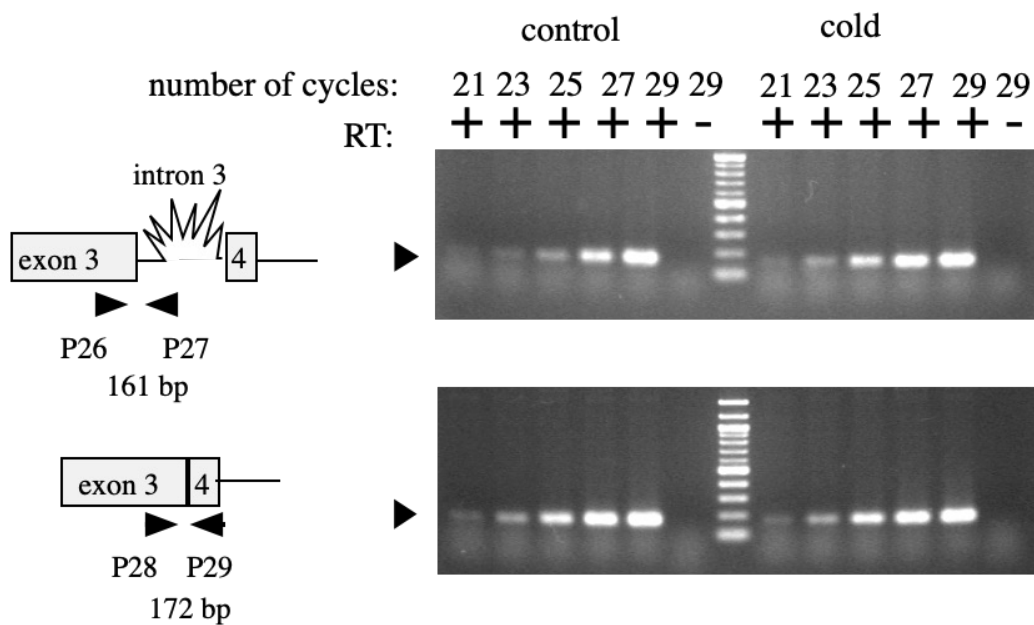


図32 コムギ*nad4*-イントロン3のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。

cDNA合成に用いた全RNA量は、イントロン3を含む転写産物の増幅のために125ng、スプライシングを経た転写産物の増幅のために25ngである。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

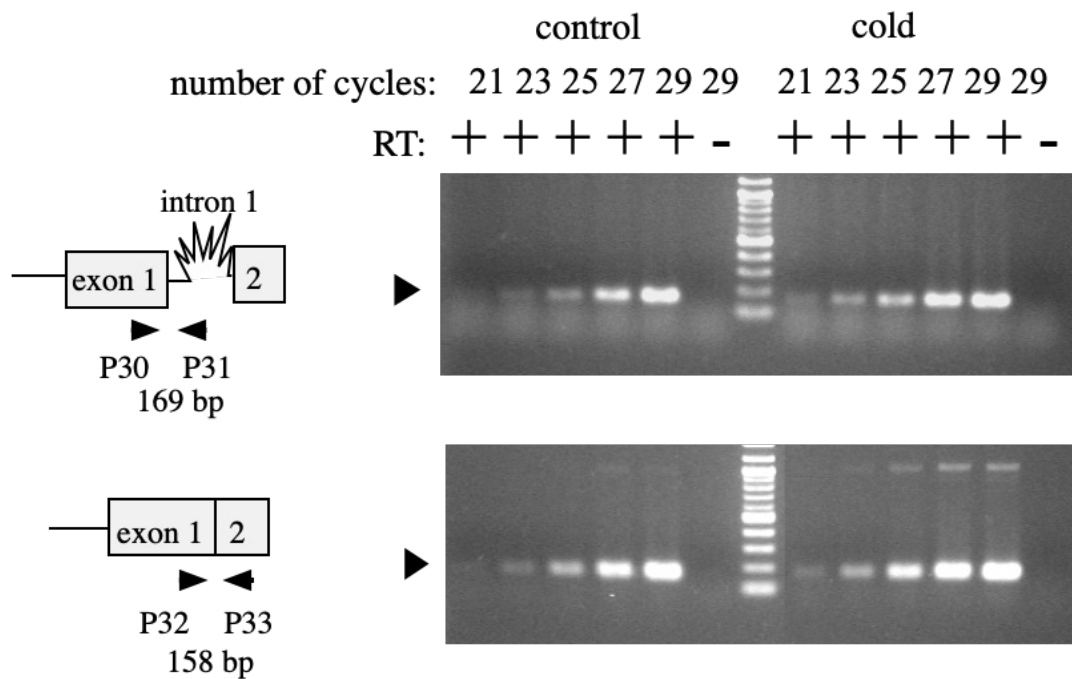


図33 コムギ*nad7*-イントロン1のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。

cDNA合成に用いた全RNA量は、イントロン1を含む転写産物の増幅のために125ng、スプライシングを経た転写産物の増幅のために25ngである。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

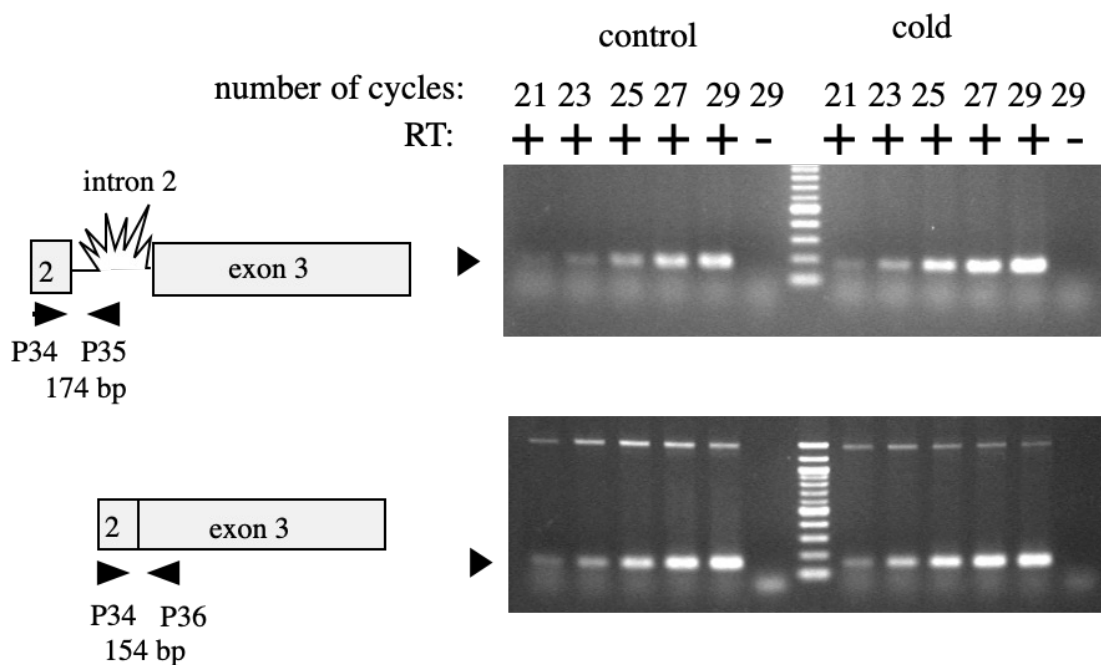


図34 コムギ*nad7*-イントロン2のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。

cDNA合成に用いた全RNA量は、イントロン2を含む転写産物の増幅のために125ng、スプライシングを経た転写産物の増幅のために25ngである。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

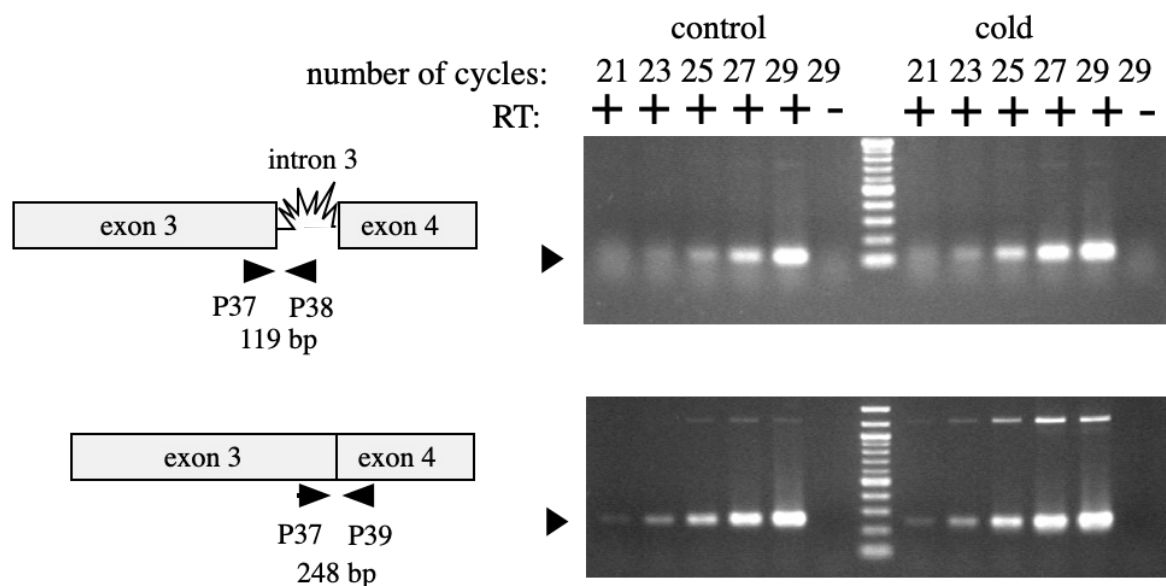


図35 コムギ*nad7*-イントロン3のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。

cDNA合成に用いた全RNA量は、イントロン3を含む転写産物の増幅のために125ng、スプライシングを経た転写産物の増幅のために25ngである。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

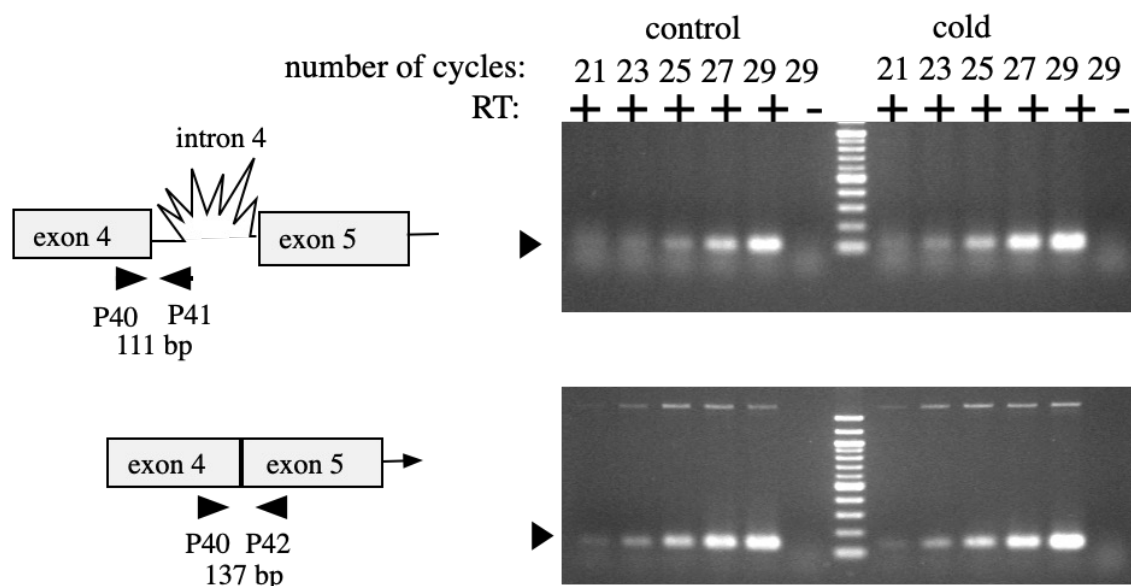


図36 コムギ*nad7*-イントロン4のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。

cDNA合成に用いた全RNA量は、イントロン4を含む転写産物の増幅のために125ng、スプライシングを経た転写産物の増幅のために25ngである。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

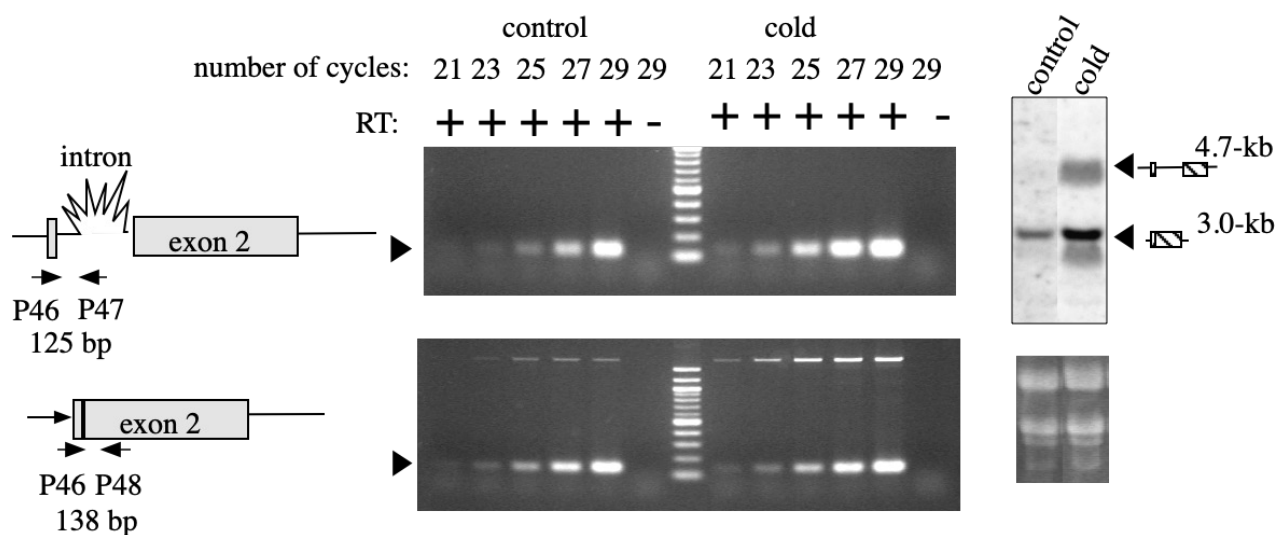


図37 コムギ*rps3*のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。
 全RNA量50ngに由来するcDNAを用いた。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、49°C30秒、72°C30秒を21サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ29まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。
 右図は同じRNAを用いたノーザン解析。

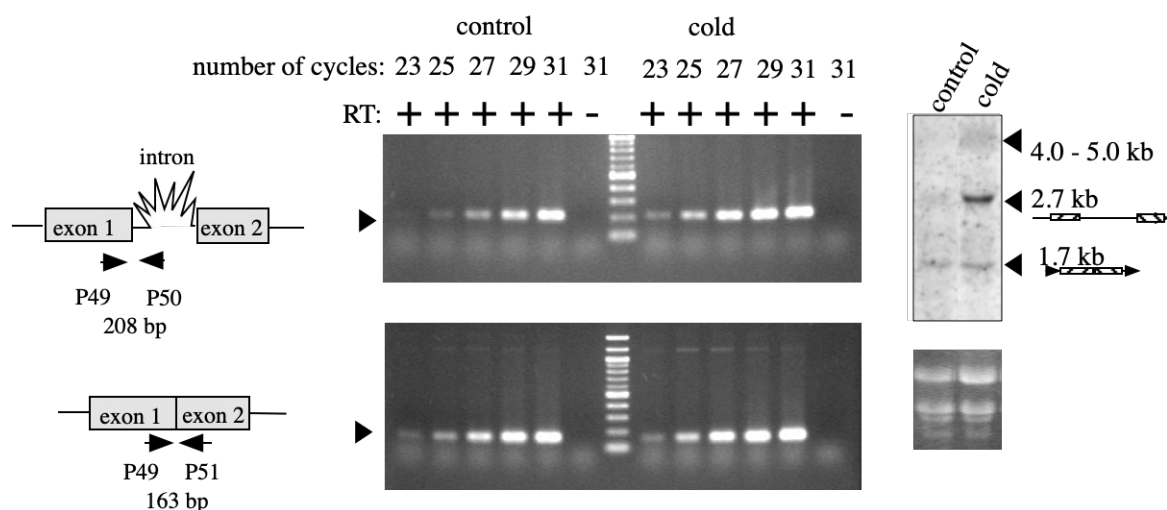


図38 コムギ*ccmFc*のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 昼20°C/夜15°C; cold: 昼2°C/夜0.5°Cで14日間低温処理。
 全RNA量125ngに由来するcDNAを用いた。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、54°C30秒、72°C30秒を23サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ31まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。
 右図は同じRNAを用いたノーザン解析。

表11 低温環境における、シス型イントロンのみを持つコムギミトコンドリア遺伝子の転写産物量の変化

				intron-		interval ²				bulged A ⁴			
				containing transcripts	spliced transcripts	consensus ¹		size of domain V	space without pairing	size of ³ domain VI	in the domain VI	consensus ⁵	
				under low temperature	under low temperature	sequence 5'GKGYG-		(nt)	(nt)	(nt)	((nt))	-AY3'	size of intron (nt)
gene	intron	splicing	temperature										
complex I	<i>nad4</i>	1	<i>cis</i>	↑	↗	GUGCG	34	3	3	78	A(-7)	AC	1,021
		2	<i>cis</i>	↗	↗	GGGCG	38	3	3	39	G(-7)	AU	3,399
		3	<i>cis</i>	↗	→	GGGCG	34	2	2	71	A(-7)	AC	1,649
	<i>nad7</i>	1	<i>cis</i>	↑	↑	GUGCG	34	3	3	31	A(-7)	AC	813
		2	<i>cis</i>	↑	↗	GGGCG	34	2	2	84	A(-7)	AU	1,311
		3	<i>cis</i>	↑	↗	GUGCG	34	3	3	94	A(-8)	AC	997
		4	<i>cis</i>	↑	→	GUGCG	34	2	2	96	A(-7)	AC	1,699
complex IV	<i>cox2</i>	1	<i>cis</i>	↑	→	GUGCG	34	3	3	22	A(-7)	AC	1,217
ribosomal protein	<i>rps3</i>	1	<i>cis</i>	↑	↗	GGGCG	34	2	2	93	A(-7)	AU	1,739
cytochrome <i>c</i> biogenesis	<i>ccmFc</i>	1	<i>cis</i>	↑	↗	GUGCG	38	2	2	43	A(-8)	AC	1,012

↑: 4倍以上増加、↗: やや増加、→: 変化無し、↘: 減少。¹: イントロン5' 末端の保存的塩基配列、²: ドメインVとVIの間のヘリックス構造に寄与していない塩基の数。³: ドメインVI (²の部分からイントロン3'末端までの長さ。⁴: ドメインVIの、塩基対をなさないアデノシンまたはグアノシン (反応性の高い残基が攻撃基となり、イントロン切り出しのための輪投げ構造の中間体を作る)。括弧の中はイントロン3'末端から数えた塩基の位置。⁵: イントロン3'末端の保存的塩基配列。

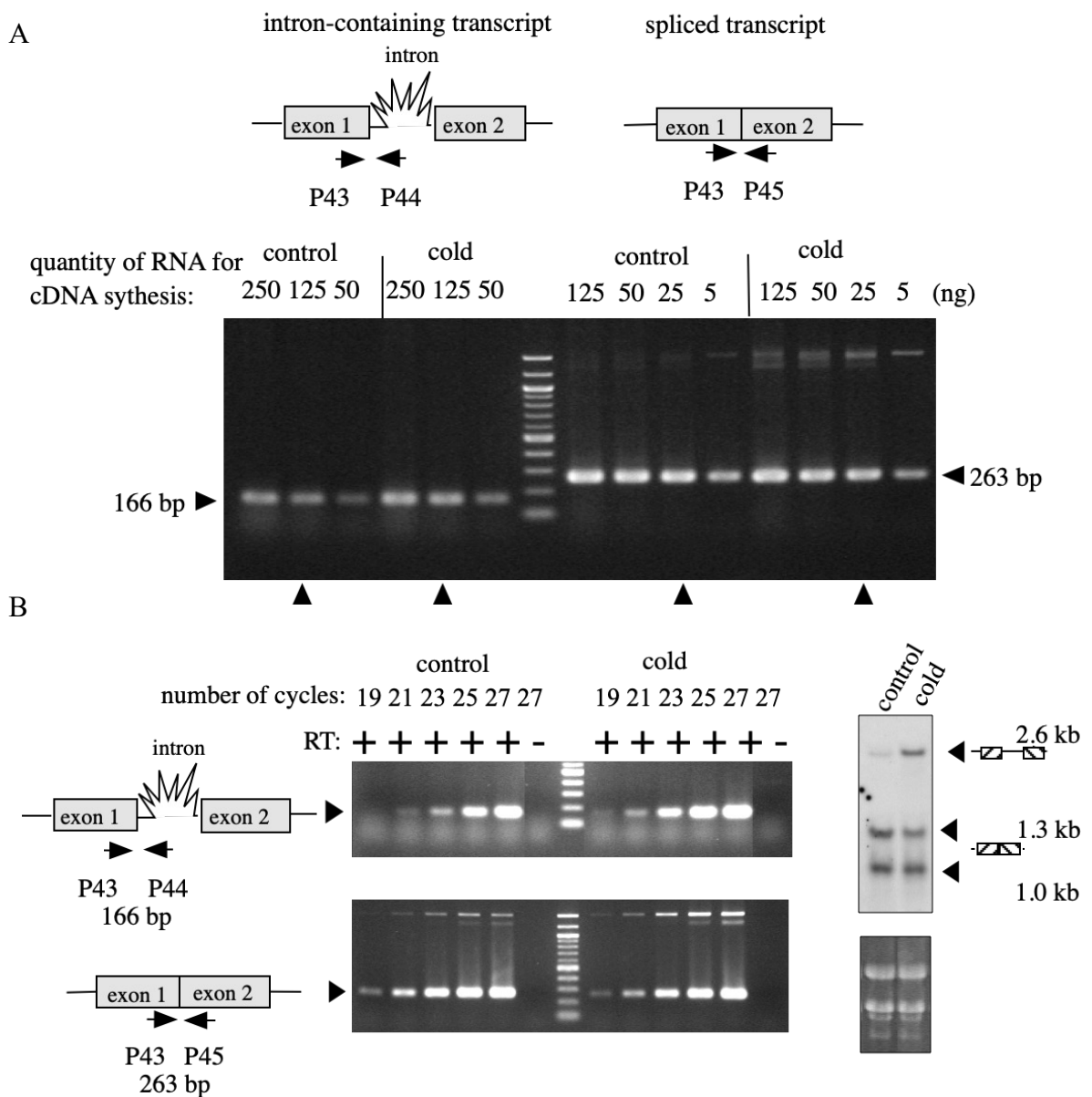


図39 イネ*cox2*の定量的RT-PCR

control: 25°C; cold: 12°Cで14日低温処理。

(A)予備試験 (本試験に用いるRNA量の検討)。cDNA合成に用いた全RNA量を上に示す。鋳型RNA量に対するPCR産物量のカイネティクスを調べた。PCR産物量に基づき、本試験のcDNA合成に用いる全RNA量を、前駆体転写産物(左)では125ng、スプライシングを経た転写産物(右)では25ngと決定した。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、56°C30秒、72°C30秒を25サイクル、最後に72°C7分。(B)本試験。PCRの条件は、サイクル数以外を予備試験と同様に、サイクル数を19から27まで2サイクルずつ増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区; -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。右図は同じRNAを用いたノーザン解析。

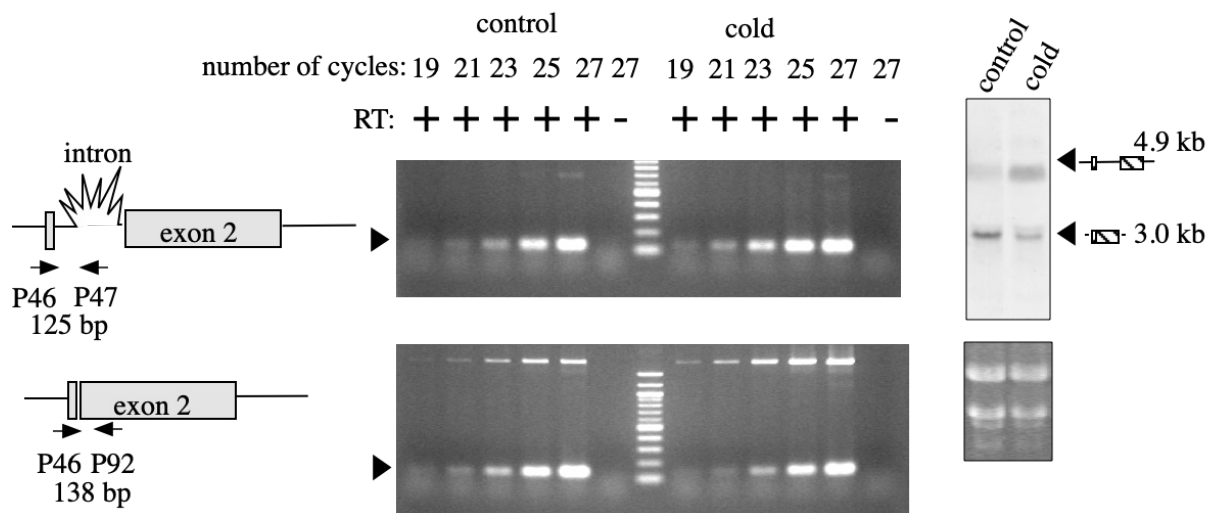


図40 イネ*rps3*のスプライシング前後の定量的RT-PCR

control: 25°C; cold: 12°Cで14日間低温処理。

全RNA量125ngに由来するcDNAを用いた。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、48°C30秒、72°C30秒を19サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ27まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。右図は同じRNAを用いたノーザン解析。

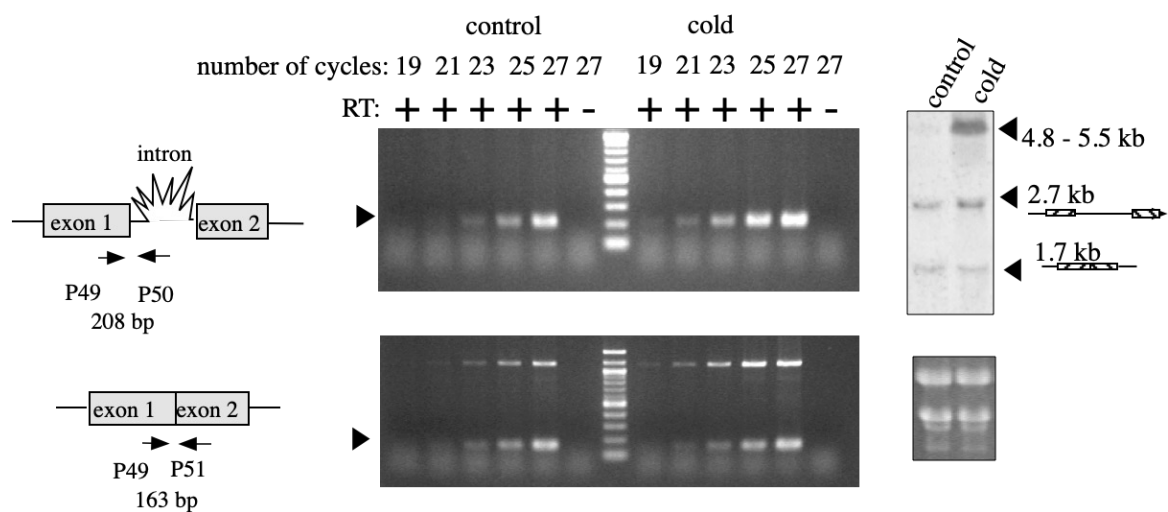


図41 イネ*ccmFc*のスプライシング前後の定量的RT-PCR

contrl: 25°C; cold: 12°Cで14日間低温処理。

全RNA量125ngに由来するcDNAを用いた。PCRの条件は、初めに95°Cで2分、次に95°C30秒、52°C30秒、72°C30秒を19サイクル、最後に72°C7分。サイクル数以外を同じ条件にし、サイクル数を2サイクルずつ27まで増加させた。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。右図は同じRNAを用いたノーザン解析。

表12 低温環境における、イントロンを持つイネミトコンドリア遺伝子の転写物量の変化

complex I	gene	intron	splicing	intron- containing		spliced transcripts under low temperature	consensus ¹ sequence	size of domain V (nt)	interval ²		size of ³ domain VI (nt)	bulged A ⁴ in the domain VI (nt)	consensus ⁵ sequence -AY3'	size of intron (nt)
				transcripts under low temperature	transcripts under low temperature				space without pairing (nt)	space without pairing (nt)				
	<i>nad1</i>	1	<i>trans</i>	↑	→	→	GAGGGGGCG	47	2	2	45	-	AUU	separated
		2	<i>cis</i>	↗	↗	↗	GUGCG	34	2	2	17	A(-10)	AU	1,610
		3	<i>trans</i>	→	→	→	GCGCG	34	2	2	43	A(-12)	ACUCCCG	separated
		4	<i>trans</i>	↑	→	→	GUGCG	34	4	4	68	A(-7)	ACC	separated
	<i>nad2</i>	1	<i>cis</i>	↗	→	→	GCGCG	34	2	2	20	U(-7)	AU	1,210
		2	<i>trans</i>	→	→	→	GUGCG	30	4	4	53	A(-7)	AU	separated
		3	<i>cis</i>	↑	↗	↗	GGCG	37	3	3	150	A(-7)	AU	2,397
		4	<i>cis</i>	↑	→	→	GGCG	34	2	2	59	A(-7)	AU	1,402
	<i>nad4</i>	1	<i>cis</i>	↑	↗	↗	GUGCG	34	3	3	79	A(-7)	AC	1,254
		2	<i>cis</i>	↗	→	→	GGCG	37	3	3	39	G(-7)	AU	3,438
		3	<i>cis</i>	↗	↗	↗	GGCG	34	2	2	72	A(-7)	AC	2,933
	<i>nad5</i>	1	<i>cis</i>	→	→	→	-	34	3	3	101	A(-8)	-	853
		2	<i>trans</i>	→	→	→	-	34	4	4	33	A(-8)	ACCG	separated
		3	<i>trans</i>	→	→	→	GGCG	34	0	0	50	A(-8)	AU	separated
		4	<i>cis</i>	↗	↗	↗	GUGCG	34	2	2	24	A(-7)	AC	926
	<i>nad7</i>	1	<i>cis</i>	↗	↗	↗	GUGCG	34	3	3	31	A(-7)	AC	813
		2	<i>cis</i>	→	→	→	GGCG	34	2	2	84	A(-7)	AU	1,310
		3	<i>cis</i>	→	→	→	GUGCG	34	3	3	94	A(-8)	AC	996
		4	<i>cis</i>	↗	→	→	GUGCG	34	2	2	96	A(-7)	AC	1,684
complex IV	<i>cox2</i>	1	<i>cis</i>	↑	↗	↗	GUGCG	34	3	3	22	A(-7)	AC	1,275
ribosomal proteins	<i>rps3</i>	1	<i>cis</i>	↑	↗	↗	GGCG	34	2	2	93	A(-7)	AU	1,847
	<i>rpl2</i>	1	<i>cis</i>	↗	→	→	GUGUG	30	2	2	33	A(-8)	AC	1,481
cytochrome c biogenesis	<i>ccmFc</i>	1	<i>cis</i>	↑	→	→	GUGCG	38	2	2	43	A(-8)	AC	1,004

↑: 4倍以上増加、↗: やや増加、→: 変化無し、↘: 減少。¹: インترون5' 末端の保存的塩基配列。‘.’で
は保存的塩基配列が認められない。²: ドメインVとVIの間のヘアックス構造に寄与していない塩基の数。³: ドメイ
ンVI(²の部分からイントロン3'末端まで)の長さ。⁴: ドメインVIの、塩基対をなさないアデノシンまたはそれに代
わるグアノシン、ウリジン (反応性の高い残基が攻撃基となり、イントロン切り出しのための輪投げ構造の中間
体を作る)。括弧の中はイントロン3'末端から数えた塩基の位置。‘.’では、塩基対をなさないヌクレオシド
が認められない。⁵: インترون3'末端の保存的塩基配列。‘.’では保存的塩基配列が認められない。

3. IBS (Intron Binding Sites)における RNA エディティング

1) 材料と方法

(1) 植物材料と育成条件、全 RNA の抽出

イネ品種‘ほしのゆめ’を用いた。育成条件および全 RNA の抽出は、前節に準ずる。

(2) RT-PCR

cDNA 合成は前節 1) – (2) に準ずる。全 RNA 量 187.5ng に由来する cDNA を用いて、プライマーそれぞれ 6pmol、PCR 酵素 Hot start EX Taq (5units/μl、タカラバイオ社) 0.15 μl (1.5unit)、dNTP をそれぞれ 6nmol、また、10×EX Taq buffer 3 μl を 30μl 容量で反応させた。PCR の条件は、95℃、2 分を 1 サイクル、次に 95℃で 30 秒、アニーリング温度として *nad5* 遺伝子は 51℃、*nad7* 遺伝子は 54℃で 30 秒、72℃で 30 秒を 25 サイクル、最後に 72℃で 7 分を 1 サイクルとした。また、対照試験として、アニーリング温度を 56℃にしたこと以外は同じ条件で *cox2* 遺伝子の増幅を行った。得られた PCR 産物は、10μl を 2%アガロースゲルに電気泳動し臭化エチジウム染色し、バンドサイズの確認に用いた。残りをシーケンス解析に用いた。

(3) オリゴヌクレオチド

nad5 遺伝子のエキソン 4 とイントロン 4 の接合部分、エキソン 4 とエキソン 5 の接合部分を増幅するため、それぞれプライマー P89 と P90 の組 (巻末付表 3、図 44 左)、P89 と P91 の組 (巻末付表 3) を用いた。*nad7* 遺伝子のエキソン 1 とイントロン 1 の接合部分、エキソン 1 とエキソン 2 の接合部分を増幅するため、それぞれプライマー P30 と P31 の組 (巻末付表 3、図 28A、図 44 右)、P32 と P33 の組 (巻末付表 3、図 28A) を用いた。また、*cox2* 遺伝子エキソン 1 とイントロンの接合部分、エキソン 1 とエキソン 2 の接合部分を増幅するため、それぞれプライマー P43 と P44 の組、P43 と P45 の組 (巻末付表 3、図 39) を用いた。

(4) RNA エディティング解析

PCR 産物をダイレクトシーケンシングによって解析した。シーケンシング反

応には、DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter 社、USA) を用いた。反応産物の解析には、自動 DNA キャピラリーシーケンサー CEQ8000 DNA Analysis System (Beckman Coulter 社、USA) を用いた。

2) 結果

(1) cDNA クローン解析とダイレクトシーケンス解析の整合性

イネ *cox2* のエディティング部位 9 はグループ II イントロンの Intron Binding Site1 (IBS1) に相当するため、転写産物のエディティングの有無とスプライシングとの関連が示唆される (図 42、14)。イネミトコンドリア遺伝子において、*cox2* 以外に IBS と推測される領域に RNA エディティングが生じるのは、*nad5* 遺伝子に 1 箇所、*nad7* 遺伝子に 3 箇所、および *rps3* 遺伝子に 1 箇所である (表 13)。これらについてエディティングの頻度を調査するダイレクトシーケンス実験系の構築を試みた。全 RNA より作製した cDNA 集団より標的配列を増幅し、ダイレクトシーケンスにおけるチャートで RNA エディティングの頻度を反映した C と U のピークが得られるか否かを確かめるため、イネ *cox2* の IBS1 をモデルケースとして実験を行った。その結果、常温区の前駆体転写産物では、U vs. C の相補鎖 A vs. G のピーク比がおおよそ 1 : 2 を示し、cDNA クローン解析の結果 (U vs. C が 9 : 15) とほぼ一致した (図 43、14、表 6-2)。低温区の前駆体転写産物では、ダイレクトシーケンスで A のピークは現れず、cDNA クローン解析で U を持つクローンが皆無であった結果と一致した (図 43、14、表 6-2)。また、スプライシングを経た転写産物では両区とも T のピークのみが観察され (データは示していない)、cDNA クローン解析の結果と一致した (表 6-1)。

(2) *nad5* エキソン 4 と *nad7* エキソン 1 の 3' 末端付近の RNA エディティング

IBS と推測される領域のうち、*nad5* のエキソン 4 と *nad7* のエキソン 1 の 3' 末端の 2 箇所の RNA エディティングの状態をダイレクトシーケンシングにより解析した。

nad5 エキソン 4 には、3' 末端から -5nt の位置に RNA エディティング部位がある。イントロン 4 のスプライシングを経た転写産物では、温度条件に拘わらずこのサイトのエディティングは完全に終了していた (データは示していない)。イントロン 4 を含む転写産物では、常温区と低温区のいずれにも G のピークが

見られるものの A のピークに比較すると非常に低く、殆どエディティングは終了していると考えられる (図 44 左)。

nad7 エキソン 1 には、3' 末端から -7nt の位置に RNA エディティング部位がある。イントロン 1 のスプライシングを経た転写産物では、温度条件に拘わらずこのサイトのエディティングは完全に終了していた (データは示していない)。一方、イントロン 1 を含む転写産物では、両区とも A vs. G のピーク比がおおよそ 1 : 2 を示した (図 44 右)。これより、このサイトのエディティング頻度は温度の影響は受けず 25°C でも 12°C でも、転写産物プールの約 1/3 がエディティングを生じていると推定される。

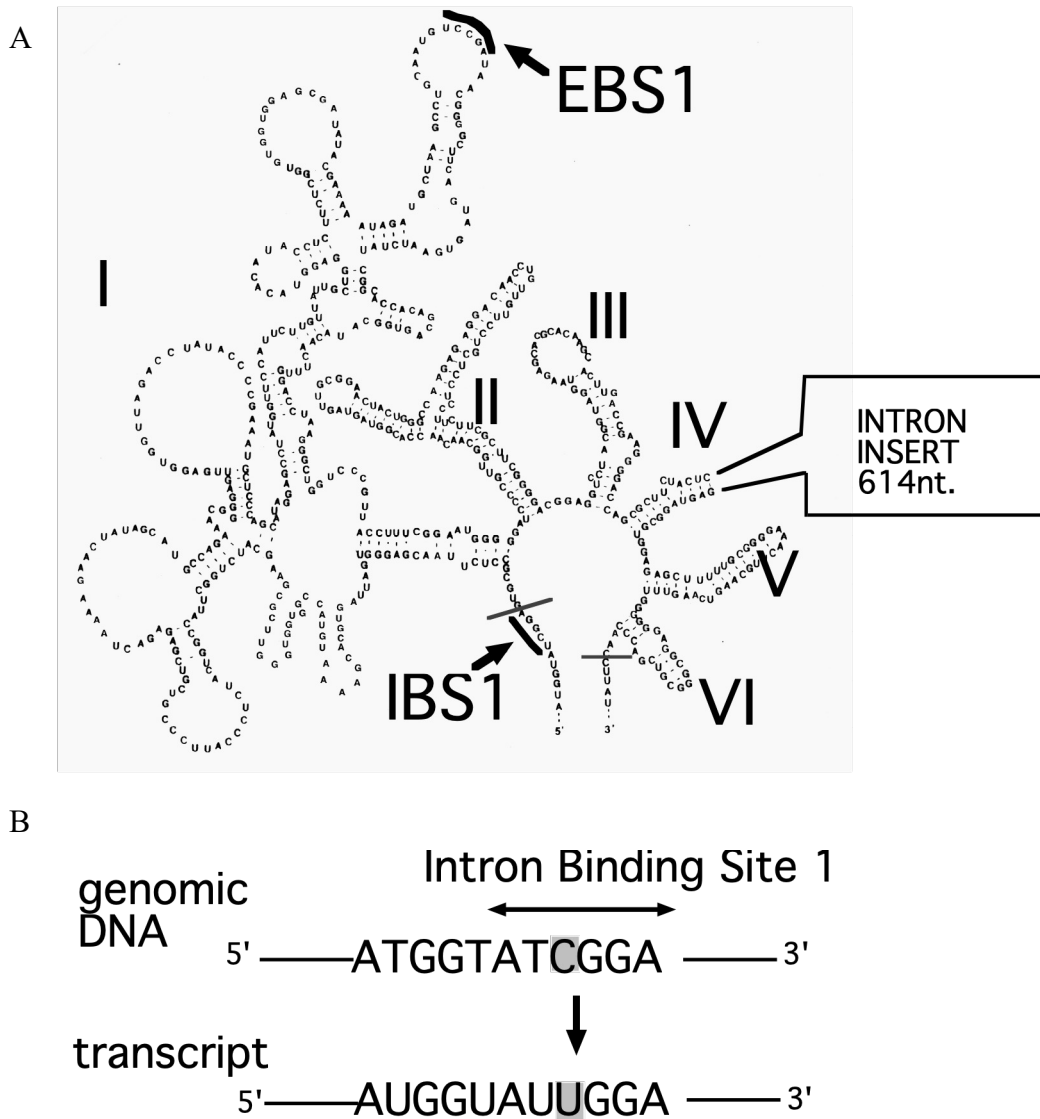


図42 コムギ*cox2*のグループIIイントロンの二次構造 (A) と、コムギとイネの*cox2*のIntron Binding Site 1 (IBS1)のRNAエディティング部位 (B)

(A)塩基配列を横断する二本の直線はイントロンのエキソンとの境界を示す。I~VI:グループIIイントロンはIからVIまでのドメインを持つ。IBS1:Intron Binding Site 1、イントロンの5' 末側エキソンの3' 末端に位置する。EBS1:Exon Binding Site 1、ドメインI上にありIBS1と相補的塩基配列を持つ。IBS1とEBS1のペアリングは、イントロンのスプライシングに必要な高次構造形成に影響を及ぼすと言われている。(B)エキソン1の3' 末端から4つめの塩基シトシンがRNAエディティング部位である。

表13 イネミトコンドリア遺伝子のIBS領域にあるRNAエディティング部位

	gene	intron	splicing	the editing sites * on IBSs
complex I	<i>nad1</i>	1	<i>trans</i>	-
		2	<i>cis</i>	-
		3	<i>trans</i>	-
		4	<i>trans</i>	-
	<i>nad2</i>	1	<i>cis</i>	-
		2	<i>trans</i>	-
		3	<i>cis</i>	-
		4	<i>cis</i>	-
	<i>nad4</i>	1	<i>cis</i>	-
		2	<i>cis</i>	-
		3	<i>cis</i>	-
	<i>nad5</i>	1	<i>cis</i>	-
		2	<i>trans</i>	-
		3	<i>trans</i>	-
		4	<i>cis</i>	5nt before
	<i>nad7</i>	1	<i>cis</i>	7nt before
		2	<i>cis</i>	4nt before
		3	<i>cis</i>	1nt before
		4	<i>cis</i>	-
complex IV	<i>cox2</i>	1	<i>cis</i>	4nt before
ribosomal proteins	<i>rps3</i>	1	<i>cis</i>	6nt before
	<i>rpl2</i>	1	<i>cis</i>	-
cytochrome c biogenesis	<i>ccmFc</i>	1	<i>cis</i>	-

*: 5' 末側エキソンのIBS領域 (Intron binding Site 1とIntron Binding Site 2) 上にあるRNA エディティング部位。イントロンの接合部位から何nt上流に位置するかを示す。'-' は、IBS領域にエディティング部位が存在しないことを示す。

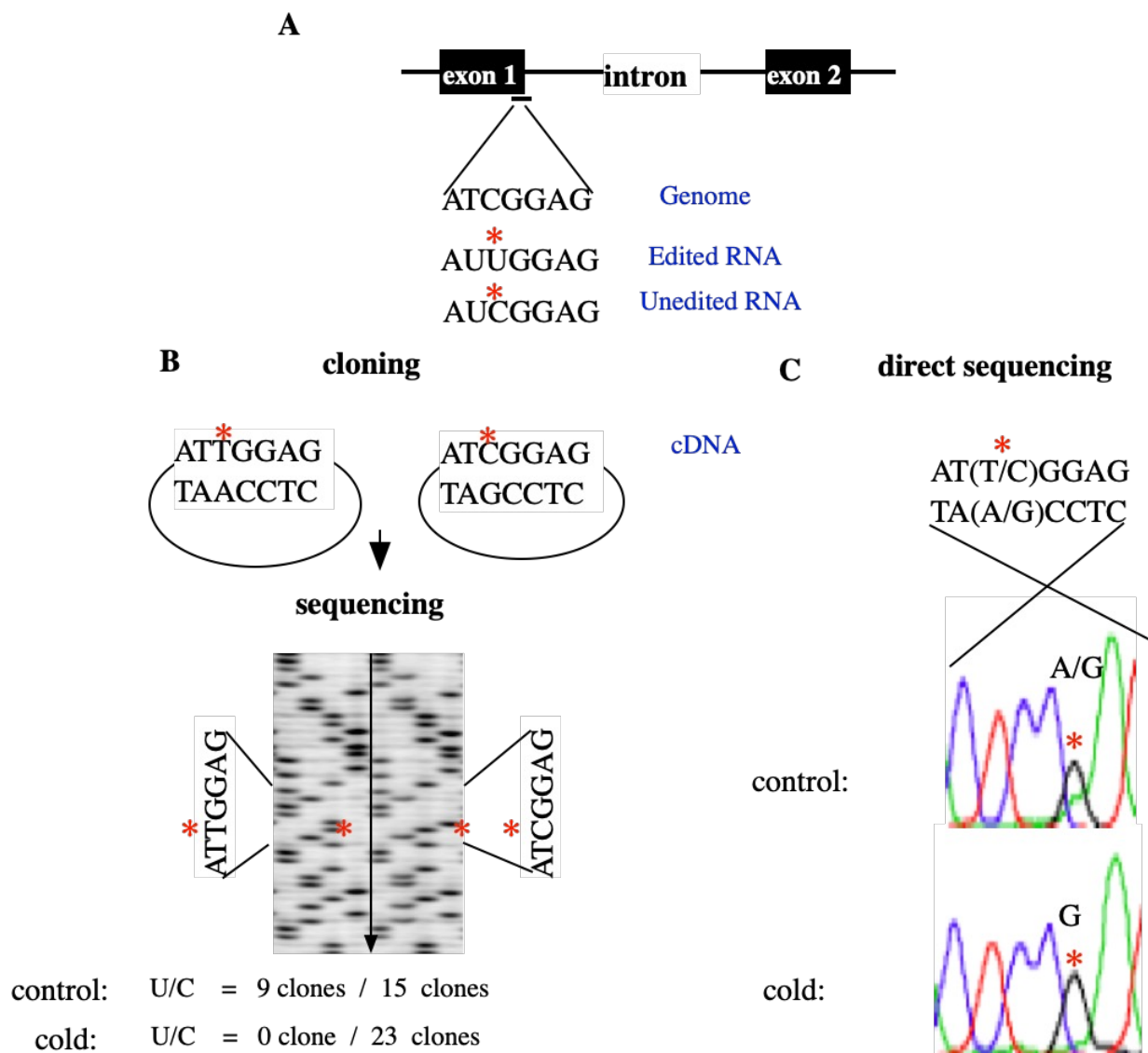


図43 クローニング後のシーケンスとダイレクトシーケンスの結果の整合性
(イネ*cox2*の前駆体転写産物のIBS1のRNAエディティング解析)

control: 25°C; cold: 12°Cで14日間低温処理。

(A)イネ*cox2*のIBS1のRNAエディティング部位。

(B) *cox2*前駆体転写産物のクローニング後のシーケンシング解析。

ラダーの各レーンは、左から、G、A、T、C。UとCのクローン数は、II章表6-2
(エディティング部位9)に寄る。

(C) *cox2*前駆体転写産物のダイレクトシーケンシング解析。

チャートの黒：G、緑：A、赤：T、青：C。

エディティング部位のダイレクトシーケンスによるチャートのピークの高さの
比は、クローニング後のシーケンスによるエディティングされたクローンの比
と整合性がある。

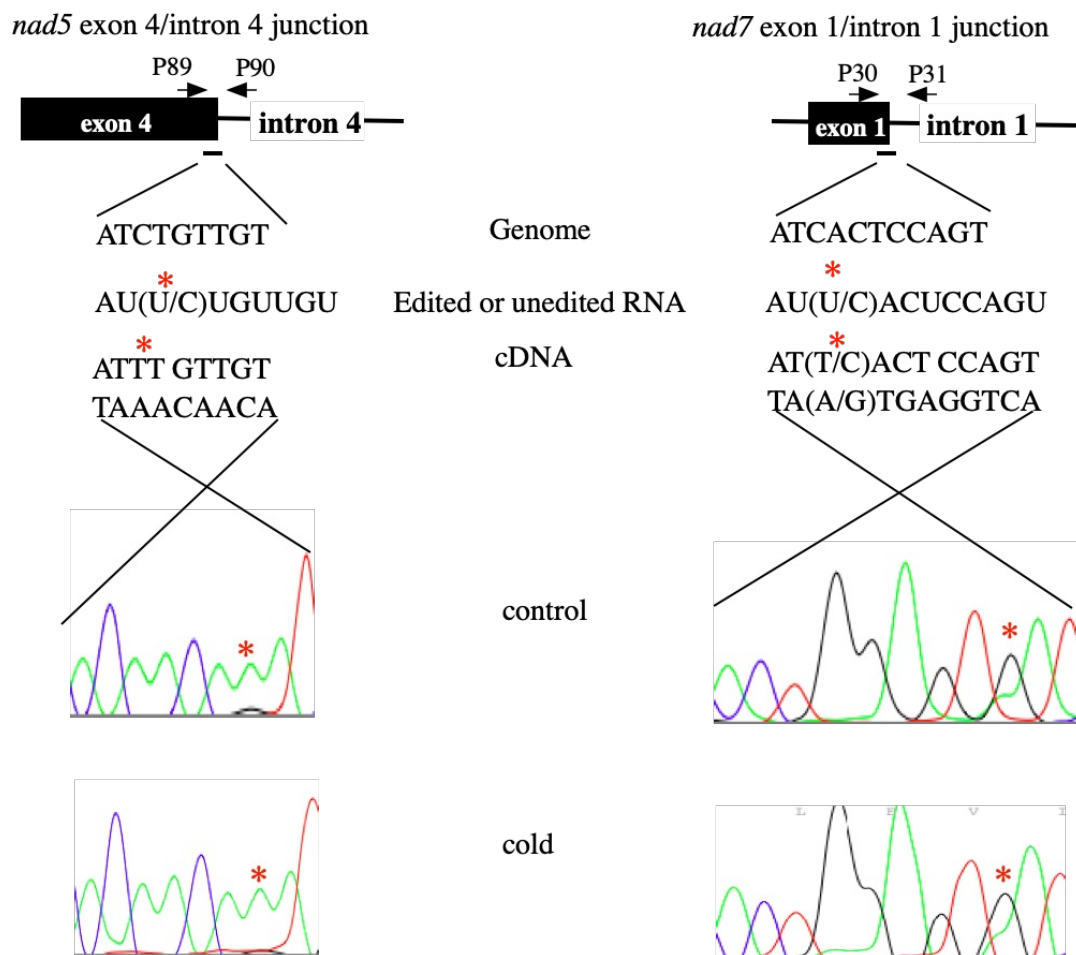


図44 ダイレクトシーケンスによる、イネ*nad5*のイントロン4を含む転写産物、および*nad7*のイントロン1を含む転写産物の、IBS領域のRNAエディティング解析

control: 25°C; cold: 12°Cで14日間低温処理
 黒 : G、緑 ; A、赤 : T、青 : C

4. 考察

本章では、グループ II イントロンで分断された遺伝子の前駆体転写産物の蓄積量が低温により普遍的に増加するか否かを検討するため、網羅的な発現解析を行った。イントロンを一つ保持する遺伝子については第 II 章と同様のノーザン解析を主体とした実験を進めた。その結果、第 II 章で述べたコムギ *cox2* の場合とは異なり、各遺伝子からは多様な転写産物が検出された。例えば、コムギ *rps3* ではプローブ E2 と I で共通に検出される前駆体転写産物は 4.7~5.6kb で単一分子種ではないようである。また、コムギ *rps3* のプローブ I でのみ検出される 3.3kb 転写産物のような前駆体転写産物以外の分子種は、コムギ *cox2* では検出されない。

複数の転写開始点やプロセッシング部位の存在は複雑な転写産物を生ずるが、各々の転写産物は単一のシグナルバンドとして現れるはずなので、今回観察された分子サイズの幅が広いバンドとは異なる。シロイヌナズナの *rps3* と *atp9* の転写解析で同様の幅広のバンドが見られる (Fig2, Okada and Brennicke 2006)。テンサイミトコンドリアゲノムクローンバンクを用いた転写解析では、同様のバンドを検出する領域も認められているが、詳細は明らかにされていない (久保友彦博士、私信)。こうした転写産物は各々の末端を決定することにより、何らかの情報が得られると期待される。一方、コムギおよびイネ *rps3* においてプローブ I でのみ検出される、それぞれ 3.3kb と 3.4kb の転写産物は、おそらくスプライシングの最初のステップであるエステル転移反応のみが終了してイントロンとエキソン 2 がつながったもの (図 22B 右と図 25B 右に図示) と思われる。これを検証するためには、この転写産物が投げ縄構造を持つか否かを確認する必要がある。

コムギ *rps3*、コムギ *ccmFc*、イネ *rps3* およびイネ *rpl2* については、他の研究グループによるノーザン解析の報告例がある (Li-Pook-Than et al. 2004; Giegé et al. 2004; Nakazono et al. 1995; Kubo et al. 1996; Subramanian et al. 2001) ものの、検出される分子種は必ずしも一致しない。この原因としては、まず用いた材料の核遺伝子型の違いが挙げられよう。類似の事例は、細胞質雄性不稔株において稔性回復遺伝子の有無によりミトコンドリア遺伝子転写産物が変更される例をはじめ、多数報告されている (Chase 2007)。また、供試材料の生育ステージの違いも転写プロファイルに影響を与えることがわかっている (Li-

Pook-Than et al. 2004)。

本章では、ノーザン解析に加えて定量的 RT-PCR 解析を行った。コムギ *cox2*、コムギ *rps3*、イネ *cox2*、イネ *rps3*、およびイネ *ccmFc* では、ノーザン解析と定量的 RT-PCR の結果はほぼ一致し (表 14)、解析手法に問題はないと考えられる。低温に伴うコムギ *ccmFc* の成熟転写産物量はノーザン解析では変化がみられず (図 23A)、他方定量的 RT-PCR では微増の傾向を示した (図 38 下) が、ほぼ誤差の範囲とみてよい。定量的 RT-PCR に供したコムギ 10 箇所とイネ 23 箇所のイントロン分断部位のうち、低温処理によりイントロンを含む転写産物の蓄積量が減少したものは一つもなく、増加する (コムギ 10 箇所全てとイネ 16 箇所) か変化しなかった (イネ 7 箇所) (表 11、12)。従って、低温処理によるイントロンを含む転写産物の蓄積増はかなり普遍的な現象と見て良い。各イントロンについて 5'末端の塩基配列、ドメイン V の長さ、ドメイン V と VI の間のヘリックス構造に寄与していない塩基の数、ドメイン VI の長さ、スプライシングの攻撃基となるドメイン VI の塩基対をなさないアデノシンの有無と位置、3'末端の塩基配列、およびイントロンの長さについてまとめたが、低温による蓄積量の変化との相関を示すデータは得られなかった (表 11、12)。このことは、低温によるイントロンを含む転写産物の蓄積はイントロンの一次構造や二次構造とは無関係であることを示唆している。加えて *cox2* においては、IBS1 の RNA エディティング頻度が低温に伴い急速に低下したが、同様に低温によるイントロンを含む転写産物の蓄積増加が見られる *nad5* や *nad7* (エキソン 1) の IBS 領域ではそのような現象は認められない。従って、低温に伴う IBS 領域の RNA エディティング頻度の低下は普遍的な現象ではないことが明らかになった。しかしながら、グループ II イントロンにおいて、イントロンの高次構造形成がスプライシングに重要であり、IBS と EBS (Exon Binding Site) の相互作用は高次構造形成に影響を及ぼすと言われている (Michel and Ferat 1995)。そのため、今回分析できなかったイネ *nad7* における他の 2 箇所および *rps3* についても調べてみる必要があると考える。

前駆体の蓄積が増加した遺伝子について興味深いのは、スプライシングを経た mRNA の蓄積量について、増加するもの、変化しないもの、および減少するものの 3 種類に分けられることである。あるいは、各々について固有の制御機構を検討するべきなのかも知れない。

表14 低温環境下の、イントロンを含む転写産物量およびスプライシングを完了した転写産物量の変化
(ノーザン解析と定量的RT-PCRの結果の比較)

gene	intron	northern analysis		quantitative RT-PCR
		transcript size (kb)	change under low temperature	change under low temperature
wheat <i>cox2</i>	contained	2.7	↑	↑
	spliced out	1.5	→	→
rice <i>cox2</i>	contained	2.6	↑	↑
	spliced out	1.3	↘	↘
		1.0	→	↘
wheat <i>rps3</i>	contained	4.7-5.6	↑	↑
		3.3	↑	
	spliced out	3.0	↗	↗
rice <i>rps3</i>	contained	4.8-5.4	↑	↑
		3.4	↑	
	spliced out	3.0	↘	↘
wheat <i>ccmFc</i>	contained	4.0-5.0	↑	↑
		2.7	↑	
	spliced out	1.7	→	↗
rice <i>ccmFc</i>	contained	4.8-5.5	↑	↑
		2.7	↗	
	spliced out	1.7	→	→

コムギの低温処理：昼2°C/夜0.5°Cで14日間

イネの低温処理：12°Cで14日間

↑：4倍以上増加、↗：やや増加、→：変化無し、↘；減少

IV 章 スプライシング補助因子の探索

高等植物ミトコンドリアグループ II インترونには自己触媒能がない (Binder and Brennicke 2003) ため、スプライシングには補助因子を要する。しかしながらこれまでに塩基配列が決定されたミトコンドリアゲノムにはただ 1 つ可能性のある *mat-R* を除きそのような因子がコードされていない (Kubo and Mikami 2007) ので、かかる因子は核ゲノムにコードされていると思われる。実際、酵母やその他のモデル生物では核ゲノムにスプライシング因子がいくつか同定されている。しかし、高等植物では詳細な解析例はほとんど無い。イネは核ゲノムの全塩基配列が決定されているので、既に他生物種で同定されたスプライシング因子の相同配列を探索することが可能である。以上の見地から、本章ではミトコンドリアイントロンのスプライシングに関わる候補因子をイネゲノムより探して、低温との関係について調査を行った。

1. 材料と方法

(1) 植物材料と育成条件

イネ品種‘ほしのゆめ’を明条件で、3 葉期まで常温 25℃で生育させた後、12℃の低温処理を 14 日間行った。茎葉部を採取した。

(2) 全 RNA の抽出

全 RNA は、Trizol 試薬 (Invitrogen 社、USA) を用いて抽出した。

(3) イネマイクロアレイ実験

Rice Oligo Microarray 22k (Agilent Tech.社、USA) を用いた。このマイクロアレイのオリゴプローブは、遺伝子の 3'非翻訳領域の 60mer である。マイクロアレイ実験は、独立行政法人農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンターにおいて、同センター編集・発行のプロトコル「マイクロアレイ実験&解析テキスト」(2005) に従い、下記の様に行った。標識した cRNA の合成に先立ち、試料となる全 RNA の品質を 2100 Bioanalyzer (Agilent Tech.社、USA) によって検査し、問題がないことを確認した。常温区、低温区の RNA をそれぞれ

Cyanine3 (green)もしくはCyanine5 (red)により標識した合計4種類のcRNAを断片化した後、二枚のマイクロアレイスライドを用いて競合的ハイブリダイゼーションを行った。すなわち、スライド1にはCyanine3で標識した常温区のcRNAとCyanine5で標識した低温区のcRNAを競合的にハイブリダイゼーションさせ、スライド2にはCyanine5で標識した常温区のcRNAとCyanine3で標識した低温区のcRNAを競合的にハイブリダイゼーションさせた。洗浄と乾燥の後、Microarray Scanner (Agilent Tech.社、USA)を用いスライドのスキャンを行った。次に、ソフトウェア Feature Extraction (Agilent Tech.社、USA)を用い、スポット画像を数値化した。次に、ソフトウェア Excel (Microsoft 社、USA)を用い、得られた数値からコントロールスポット、シグナル強度が飽和または不均一なスポット、バックグラウンドが不均一なスポット、およびシグナルに対するノイズの占める割合が高い可能性があるシグナル強度150以下のスポットを排除した。二枚のマイクロアレイのLogRatio: $\log_{10}$ (Cyanine5色素強度/Cyanine3色素強度)の相関係数を算出し、カラースワップの相関が高いことを確かめた。さらに、カラースワップデータ間でシグナルの増減において矛盾の見られるスポットのうちLogRatioの絶対値が0.05以上(Cyanine5色素強度/Cyanine3色素強度の比が、双方とも1.12以上または0.89以下)のスポットをエラースポットとして数えた。エラースポット数の全体遺伝子数に占める割合を算出し、データの信憑性が高いことを確かめた。最後に、目的遺伝子のスポットとシグナル強度データを抜粋し解析した。

(4) 定量的 RT-PCR、オリゴヌクレオチド

cDNA合成は第III章-2-1)-(2)に準ずる。RNA量125ngに由来するcDNAを鋳型に用い、プライマーそれぞれ4pmol、PCR酵素 Hot start EX Taq (5units/ μ l、タカラバイオ社) 0.1 μ l (1unit)、dNTPそれぞれ4nmol、また、10 $\times$ EX Taq buffer 2 μ lを20 μ lの容量で反応させた。PCRの条件は、*osmrs2-1*遺伝子では、95 $^{\circ}$ C2分を1サイクル、次に95 $^{\circ}$ C30秒、50 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C30秒を25~31サイクル、最後に72 $^{\circ}$ C7分を1サイクルとした。*osnMat-1b*遺伝子では、95 $^{\circ}$ C2分を1サイクル、次に95 $^{\circ}$ C30秒、53 $^{\circ}$ C30秒、72 $^{\circ}$ C30秒を25~33サイクル、最後に72 $^{\circ}$ C7分を1サイクルとした。次に得られたPCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動し臭化エチジウム染色によりバンドを検出した。本実験で用いたオリゴヌクレオチドP97~P100は巻末付表4に示す。

(5) バイオインフォマティクス

PSORT (Nakai and Horton 1999) は <http://psort.nibb.ac.jp/form.html>、TargetP (Emanuelsson et al. 2000) は <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>、Predotar (Small et al. 2004) は <http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html> で行った。TMHMM (Sonnhammer et al. 1998) は <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> で行った。また、Mitoprot (Claros and Vincens 1996) は <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>、ChloroP (Emanuelsson et al. 1999) は <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> で行った。

(6) バイオインフォマティクス (2026 年改定版補足)

(2026 年 7 月追記) 本研究で使用した上記の細胞内局在および膜貫通領域推定ツールのうち、PSORT、TargetP および TMHMM については、2026 年 7 月現在も後継または継続運用されているウェブサービスが利用可能である。一方、Predotar および MitoProt については、本研究当時に利用したウェブサーバーは現在利用できない。また、ChloroP については、本研究当時の独立したサービスは利用できず、その機能の一部は TargetP に引き継がれている。

現在利用可能な関連ウェブサイト (2026 年 7 月確認)

WoLF PSORT (PSORT の後継サービス) : <https://wolfpsort.hgc.jp/>

TargetP 2.0: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>

TMHMM 2.0: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>

2. 結果

(1) *atmrs2-1* のイネオーソログ *osmrs2-1*

酵母ミトコンドリア遺伝子に関しては、合計 4 個のグループ II イントロンがみついているが 4 イントロン全てのスプライシングに作用する補助因子として *MRS2* (DDBJ/EMBL/GenBank データベースのアクセッション番号 AAA34795) 遺伝子が単離された (Wiesenberger et al. 1992)。その後、シロイヌナズナにおいて *MRS2* のホモログが複数コピー明らかにされ *atmrs2* ファミリーと呼ばれている。そのうち *atmrs2-1* (アクセッション番号 AJ297816) は酵母 *mrs2* 変異を相補することが確かめられた (Schock et al. 2000)。イネのデ

データベースより *atmrs2-1* 相同配列を tblastn 検索した結果、高い類似性を示す完全長 cDNA クローン（アクセッション番号 AK099209）を発見した。この遺伝子を *osmrs2-1* と呼ぶこととする。*osmrs2-1* と *atmrs2-1* のコード領域塩基配列の相同性は 69% である。*osmrs2-1* と *atmrs2-1* がコードする推定アミノ酸はそれぞれ 436 と 442 残基であり、両者のアミノ酸配列の類似性と同一性はそれぞれ 92.3%、76.1% と高い。酵母 MRS2 と比較すると、全域では類似性 56.4%、同一性 13.9% である。*osmrs2-1*・*atmrs2-1* の推定アミノ酸と MRS2 のアミノ酸配列のアライメントを図 45A に示す。

次に、イネゲノムより *osmrs2-1* 塩基配列を検索した結果、6 番染色体（アクセッション番号 NC_008399）に座乗し、シングルコピーであることが分かった。また、cDNA とゲノム DNA の塩基配列の比較より、*osmrs2-1* 遺伝子のコード領域は 4 つの標準的なスプライソソーム型イントロンで分断された 5 つのエキソンで構成されており（図 45B）、*atmrs2-1* とは 5' 末端部分の配列が異なり、*osmrs2-1* の 2 つめのイントロンは *atmrs2-1* には存在しない。

続いて、*osmrs2-1* の推定タンパク質の細胞内局在性および膜貫通領域を複数のコンピュータプログラムを用いて推定した。PSORT と TargetP では、葉緑体に局在する可能性が高く（それぞれ 0.932、0.928）、ミトコンドリアに局在する可能性は低かった（表 15）。Predotar では、色素体・ミトコンドリア・ER 以外が 0.78 と最も高い値を示し、次に高い値は色素体の 0.22 であった（表 15）。プロテオーム研究のデータより植物体のタンパク質種の 10% は色素体に存在することから 0.1 はバックグランド値であり、Predotar による色素体局在推定値 0.22 は高い値とは言えない。また、このタンパク質の膜貫通領域を推定するために、TMHMM サービスで解析した結果、C 末端に 2 箇所の膜貫通領域があり、*atmrs2-1* の推定タンパク質や酵母 MRS2 でも同様の構造が認められた（図 46）。OsMRS2-1 の C 末端と酵母 MRS2 の膜貫通領域を含む部分（OsMRS2-1 のアミノ酸 316 番目以降、ScMRS2 の 257 番目から 377 番目まで）の類似性は 71.1%、同一性は 26.4% と高い。この領域を図 45A に赤線で示す。次に、OsMRS2-1 がミトコンドリアに輸送される可能性について Mitoprot で解析したところ、0.7879 の高い値を示した（表 15）。一方、ChloroP によると、0.565 の値で色素体に輸送されると推定された（表 15）。これらの結果から、このタンパク質の細胞内局在性を特定することは難しいが、葉緑体あるいはミトコンドリアいずれかの膜タンパク質として存在する可能性は高いと考えられる。

(2) イネゲノム中の *nMat-1* 相同配列

シロイヌナズナとイネの核ゲノム中には、グループ II イントロンのスプライシング補助因子と推定される逆転写/成熟化酵素の ORFs がコードされていることが明らかにされている (Mohr and Lambowitz 2003)。そのうち *atnMat-1a* については突然変異体がミトコンドリア *nad4* イントロンのスプライシングに異常を来すことが明らかにされている (Nakagawa and Sakurai 2006)。それらについてイネデータベース解析を進めたところ、*osnMat-1b* の完全長 cDNA クローン (アクセッション番号 AK072336) が見つかり、mRNA として転写されていることが分かった。*osnMat-1b* の推定アミノ酸は 733 残基であり、ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) *cox2* の可動性イントロンにコードされている ORF743 (*mpcox2-I2*) の推定タンパク質 (アクセッション番号 YP_717176) と、アミノ酸配列が類似している (図 47)。すなわち、両者全域の類似性と同一性はそれぞれ 59.5%、17.9%、スプライシング補助因子として活性を持つと推定されるドメイン X では、それぞれ 83.5%、35.0% である。

次に、イネゲノムより *osnMat-1b* の塩基配列を検索した結果、10 番染色体 (アクセッション番号 NC_008403) に座乗し、シングルコピーであることが分かった。また、cDNA とゲノム DNA の塩基配列の比較の結果、*osnMat-1b* 遺伝子はイントロンを持たない。

続いて、*osnMat-1b* の推定タンパク質の細胞内局在性および膜貫通領域を複数のコンピュータプログラムを用いて推定した。PSORT では、核、ミトコンドリアのマトリックスに局在する可能性がそれぞれ 0.70、0.36 であった (表 15)。Predotar、TargetP では、ミトコンドリアに局在する可能性がそれぞれ 0.82、0.980 と高い値を示した (表 15)。また、TMHMM サービスで解析した結果、膜貫通領域が存在しないことが分かった (図 48)。ゼニゴケ *cox2-I2* の推定タンパク質も同様に膜貫通領域が認められなかった (図 48)。次に、OsnMAT-1b がミトコンドリアに輸送される可能性について Mitoprot で解析したところ、0.8108 の高い値を示した (表 15)。また、ChloroP によると、色素体に輸送される可能性は 0.505 の値を示した。これらの結果から、このタンパク質はミトコンドリアのマトリックスに存在する可能性が高い。

(3) 核コードスプライシング因子の低温に伴う遺伝子発現の変動

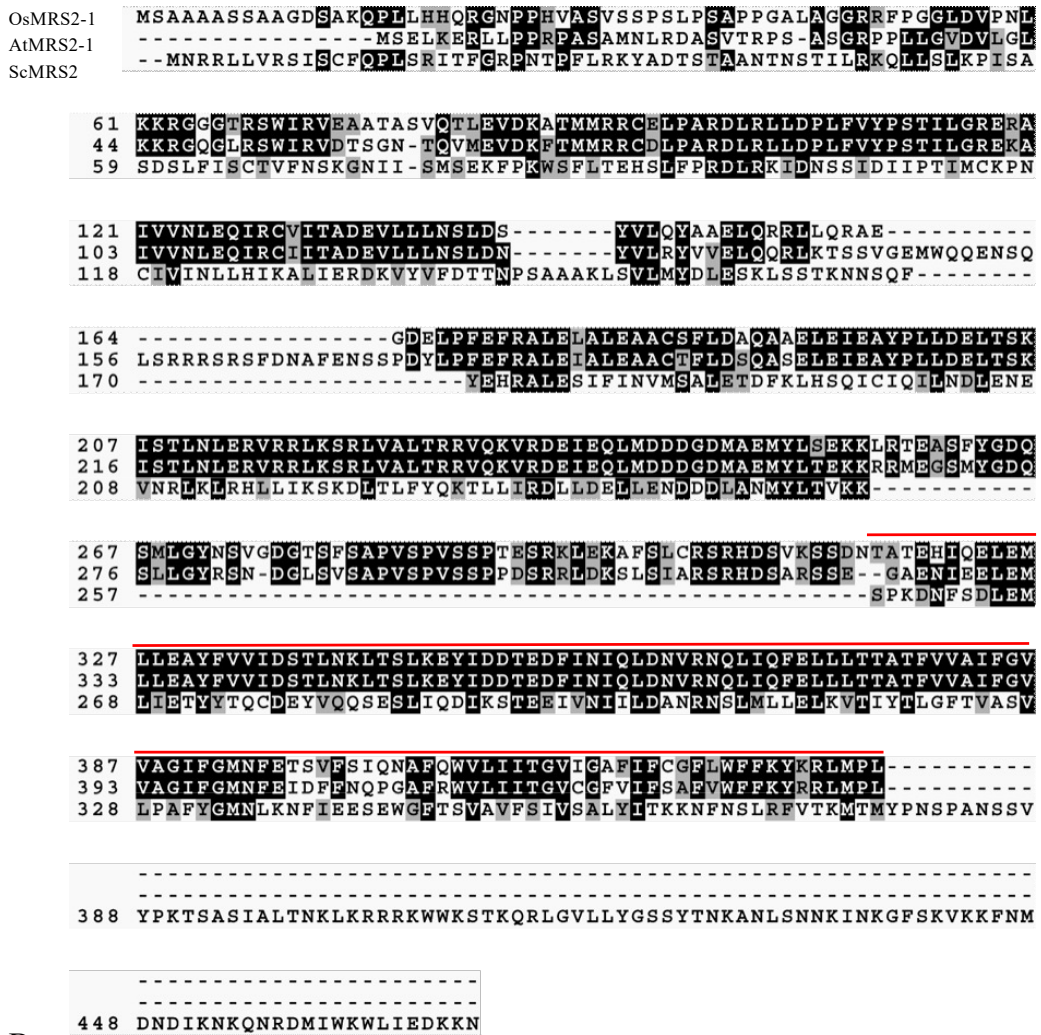
低温処理によりイントロン-スプライシング因子の発現が変動するか否かを

調べるために、常温対照区と低温処理区由来の RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。実験結果の全体を図 49 に示す。2 枚のスライドの LogRatio 値の近似直線は $y = -0.8731x - 0.0059$ で表され、 R^2 値は 0.9065 である。また、エラースポット数は 95 個であり、解析に用いた全体の遺伝子数 15,055 個に占める割合は 0.63% である。これらのデータより、カラースワップデータ間での再現性が高く、実験データの信憑性が高いことが示された。

次に、マイクロアレイ上の *cox2*、*osmrs2-1*、および *osnMat-1b* のスポット画像とシグナル強度を図 50 に示す。各遺伝子のスポットのシグナル強度は、Cyanine5 低温区・Cyanine3 常温区・Cyanine3 低温区・Cyanine5 常温区の順に、*cox2* が 1,704、1,056、1,120 および 703、*osmrs2-1* が 170、334、176 および 224 であり、*osnMat-1b* が 660、538、591 および 526 である。相対的に *osmrs2-1* と *osnMat-1b* の発現量は *cox2* より少ない。マイクロアレイ 2 枚の、LogRatio を低温区 vs. 常温区 の発現比として表すと、*cox2* ではスライド 1 が 1.61 倍、スライド 2 が 1.59 倍であり、低温により発現が増加している。用いたマイクロアレイのオリゴプローブは遺伝子の 3' 非翻訳領域 (60mer) なので、この値は、ノーザン解析 (図 12) で検出される 2.6kb、1.3kb および 1.0kb の転写産物蓄積量総和を反映していると考えられる。*osmrs2-1* の発現比は、スライド 1 が 0.51 倍、スライド 2 が 0.79 倍であり、低温により減少している。また、*osnMat-1b* の発現比はそれぞれ 1.23 倍、1.12 倍であり、温度の影響を殆ど受けていない。

マイクロアレイ解析の結果を確認するために、定量的 RT-PCR を行った。結果を図 51 に示す。プライマー P97+P98 (巻末付表 4、図 45B) によって *osmrs2-1* のエキソン 3 の 155bp を増幅した結果、低温によって発現量がやや減少しており、その結果はマイクロアレイの結果と一致する (図 50)。プライマー P99+P100 (巻末付表 4、図 47) によって *osnMat-1b* の C 末端に近い場所に位置するドメイン X (Mohr and Lambowitz 2003; RNA 成熟化酵素をコードし、スプライシングを補助すると推測される領域) の 158bp を増幅した結果、明確な差は観察できなかった (図 51)。以上の結果はマイクロアレイ解析と一致する (図 50)。

A



B

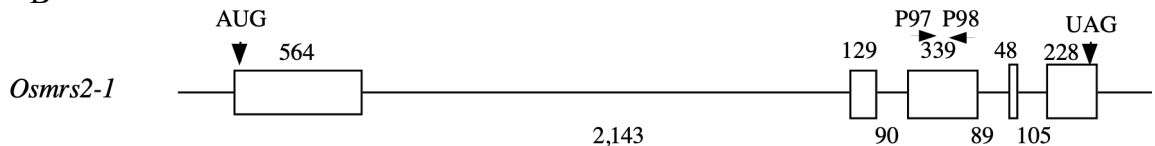


図45 イネにおけるシロイヌナズナ *atmrs2-1* のオーソログ *osmrs2-1*

(A) OsMRS2-1・AtMRS2-1 (DDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバー AJ297816より推定)・酵母MRS2 (アクセッションナンバー AAA34795)のアライメント。一致するアミノ酸は背景を黒で、類似アミノ酸は灰色で示す。赤線部分に2箇所の膜貫通領域を含む (図46参照)。

(B) *osmrs2-1* の遺伝子構造。エキソンを長方形で、エキソンとイントロンの長さを塩基数で示す。P97とP98は定量的RT-PCRに用いたプライマー。

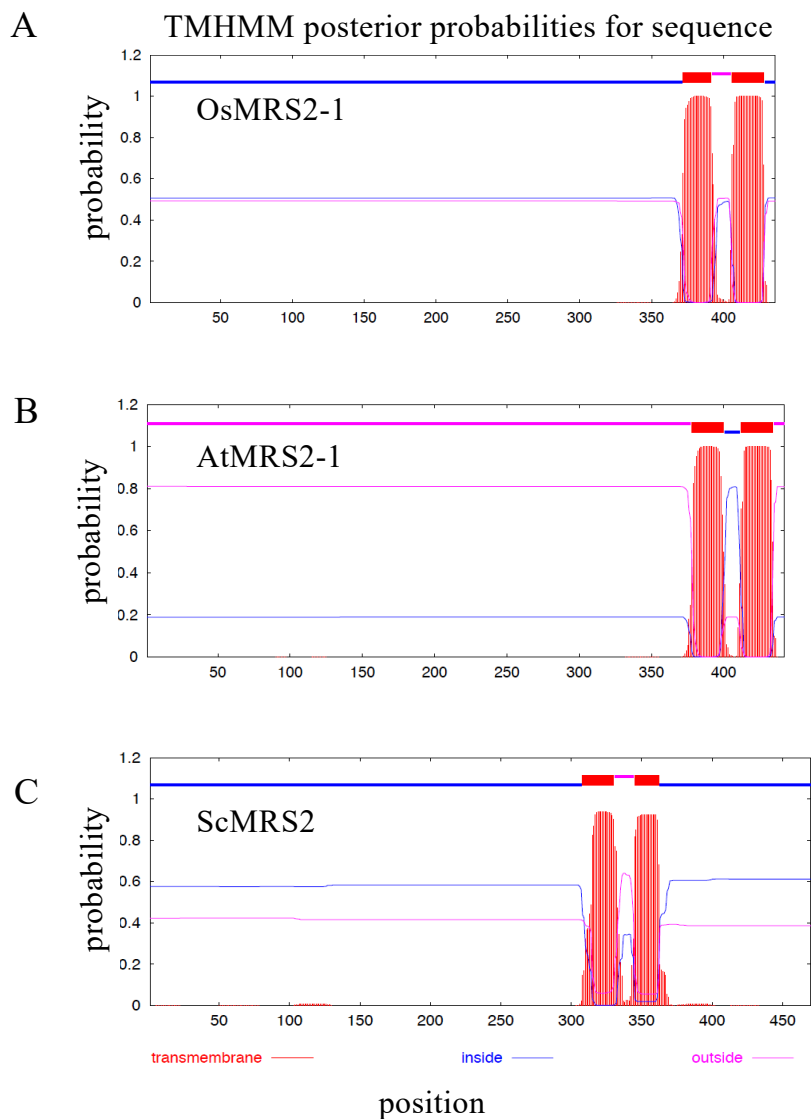


図46 OsMRS2-1・AtMRS2-1・酵母MRS2の膜貫通領域の推定

TMHMMサービス (Center for Biological Sequence

Analysis :<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) によって解析した。

(A) OsMRS2-1、(B) AtMRS2-1 (DDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバー AJ297816より推定)、(C) 酵母MRS2 (アクセッションナンバー AAA34795)

表15 コンピュータプログラムによるOsMRS2-1とOsnMAT-1bの細胞内局在位置の推定

program	web. site	prediction of localization		OsMRS2-1	OsnMAT-1b
MitoProt II 1.0a4	http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html	mitochondria	probability	0.7879	0.8108
ChloroP v. 1.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/	chloroplasts	score	0.565	0.505
PSORT v. 6.4	http://psort.nibb.ac.jp/form.html	chloroplast thylakoid membrane	affirmative certainty	0.932	-
		nucleus	affirmative certainty	0.600	0.700
		plasma membrane	affirmative certainty	0.600	-
		Golgi body	affirmative certainty	0.400	-
		mitochondrial matrix space	affirmative certainty	-	0.360
		peroxisome	affirmative certainty	-	0.338
Predotar v. 1.03	http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html	mitochondria	probability	0.01	0.82
		plastids	probability	0.22	0.00
		ER	probability	0.00	0.29
		elsewhere	probability	0.78	0.13
TargetP v. 1.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/	chloroplasts	prediction	0.918	0.154
		mitochondria	prediction	0.036	0.890
		secretory pathway	prediction	0.035	0.000
		other	prediction	0.102	0.022

‘-’ は数値が得られなかった場所。

参考文献: Claros and Vicens 1996 (MitoProt), Emanuelsson et al. 1999 (ChloroP), Nakai and Horton 2000 (PSORT), Small et al. 2004 (Predotar), and Emanuelsson et al. 2000 (TargetP).

OsnMAT-1b
AtnMAT-1a
MpCOXII-12

```

1  MPPPPPRRALLAPLLRLRAFSSSSSSLAHHPPLPPPPRRHQFVAADAITGOGGGGNPLDP
1  -----MKRLTYPLSSLRNIVEHPCNTFHKPTSSLS-----ISPTLKSESREPSSTQDP
161 SHVLGSQRIMHTCLLLTHTPKRRKALCEHKATGKGSKHLPLYLCRFYISSTTSAPWDPKVD

61  AOLLEDDPVAITASLWVSSFRPOPTAAAPPPPSLSPFLSRLELWVLAYOKAYADETGSYL
50  YSLLEQDPVDICLSLWVSSFSPPSATFS---NLTGFLSKFPLWVLAYQRTCAHVTGTFF
221 VSDIVVRNGVDALVDLWSSFRRRDWIYHD----LSNYLKSMDINSAYQKLRPNPGSMNP

121 PRS--SIPASTLSSLLALRNAVL--ARFRGRLTPPLRSPRAAAAAODPATLSKRKL R
107 PRN--AIHANALRSLLSLONAVTRSGGKPRWNDKKNQYVRSPDKISLGGEGMSKGV R
277 GTHGLTIDGTSFRKLQALRDAVLDESSEPIEWGGTKIITKPGKREKISLGIE-----

177 ALLTPGPAPFQDRVVOELLLLLEPVYEAFSPKSPAFRPGRSPhAAIRTIRRSFAPYL
165 RIIESEEP-IFQDRVVEVLLMILEPFFEAFSSSKSHGFRPGRNPHTVIRTIRSNFAGYL
328 -----CFQDRIVQEVLMMLLEPIYESIFSRSHGWRPGRSHTALRTIRSDFKKTN

237 WYIKGDLSPLLHSPDPALVVGALIRDVRDKKVVDLVSALLTPP-----VTARPGDEDA
224 WFKGDVSEMLDHVDVDVVMNCLOKVVDEKVLGLIESSLKFSDKRVLKRVVEKHGNDNG
379 WIPGNINKLPDIVNHGILCHIMRRKIRDKKLKLIALAGGLKAKI-----

291 AKKKK-----KRKYQKKKVLPEGEPKPDYWLQTFEGFAPEEALTOPDNGHCGVLSPLLA
284 LGTKRRIEREKRNKTKKKLSDDEPKPDYWLTFYSFAPKEAAKVPSTGYCGVLSPLLA
423 -----IMPYGNIEESNLGTFOG---RILSPILS

346 NVCLDELDWMEEKIKELYRPSKSDVVGEGDGEVQ--NTSWPEFVPTSGPDKTRKVDYI
344 NVCLNELDRFMETKIVEYFSPCKDDSIWKES-IEDGCHNPAPWPEFVPSGKEKTRKMDYI
448 NIYEEFDIWIIEERIQQYNLGRKETRSWVLLRKQKGK---MRKARLRSDPFNPLYRMEYR

404 RGGHFLIGVRGPRADAVALRKOLVEFCDQFRIRKLDNESLPIEHTKGMFLDHVLCRR
403 RYGGHFLIGIRGPREDAVKMRKEIIDFCDRVFGVRLDNSKLEIEHISGIGIQLDHIICRR
505 RYGDFFLIIRGPLSDAKAIRQECETFLREKLKLLNMEKTHIKHISVGIPFLGHRIGRR

464 VVIPTLRYTATGGKIISEKGVGTLLSVASLQOCIKQFRKLEFLKGDREPDPOPCFRMPH
463 VVIPTLRYTGSGGSIIVSKGVGTLLSVASLEQCIRQFRRLAFVKGDDPEPLPCNPMY
565 VVHTKQRYQTQEG-WRWRIKKKVILTMADMMQLKLRLOQQAFLAGNGDP--LPNFGMLS

524 ATCAHTNAQMNKILLTMAEWYRYADNRKKVVLFCSTYIIRGSLAKLYAAKYKLRSRAKVYK
523 SEQSHENSQMNKFLETHADWYRYADNRKKAVCFAYVIRSSLAKLYAAKYKLRSRAKVYS
622 LPQSEANRRMNLSILRGYAWYQFAGNKGATAYLAYVLRSSLAKMFAAKEKLKSLKKVFO

584 IASRLSRPLKDK-KGQSPHYHLLRMGLVDSIDGLQYTRMSMVDPDYTPLPSGWRPDH
583 IASRDLSEPLSESSNNSAPEYSDLLRMGLVDAIEGVQFSRMSLIPSCDYTPFPRNWIPIH
682 IAGDLDGRALEAR-----YPVGVTDQVEAWQOSVSGKGTP-----

643 EKILLEYIKLTDQOTLDEONSCIREEGLITPODYISMLVWSYKKNAVLLPSFKENDHKG S
643 EQVLCQEIYRLQDPKFPFCGLRSIKREGLTLPODEISEAVWDPKT----LGAWRSKYENKR
718 RDILGFNEISQRNRVRSRLGHTKKR-----

703 TEDLGSDDDELGDDEEIGNLDHVDSPKVAEMP
699 EADDG-----LOKLDST-----

```

図47 OsnMAT1-1b・AtnMAT1-1a・ゼニゴケのミトコンドリアCOXII-12のアライメント

緑線はOsnMat-1bの定量的RT-PCRに用いたプライマー組P99とP100の位置を示す。青線はRT motifs（逆転写酵素活性領域）、赤線はdomain X（成熟化酵素活性領域）を示す（Mohr and Lambowitz 2003）。一致するアミノ酸は背景を黒で、類似アミノ酸は灰色で示す。

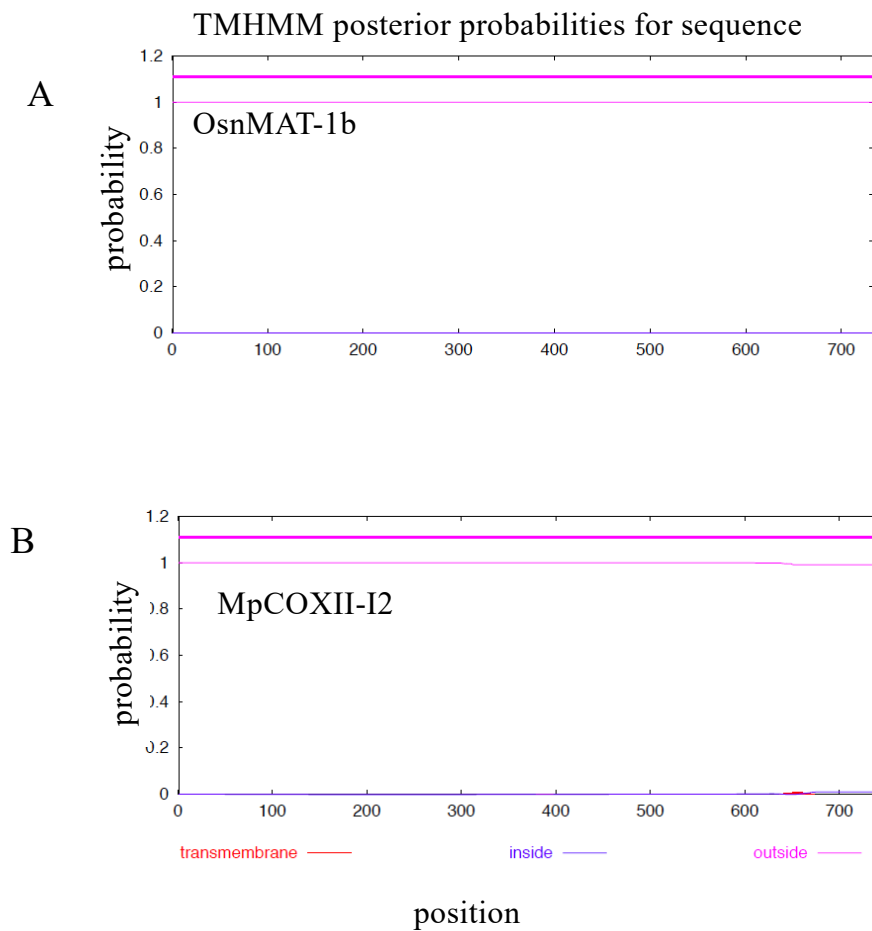


図48 OsnMAT-1b、ゼニゴケCOXII-I2の膜貫通領域の推定

TMHMMサービス (Center for Biological Sequence Analysis : <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) によって解析した。

(A) OsnMAT-1b、(B)ゼニゴケCOXII-I2 (DDBJ/EMBL/GenBankデータベースのアクセッションナンバー AY 717176)

これらの推定タンパク質に膜貫通領域は無いと推定される。

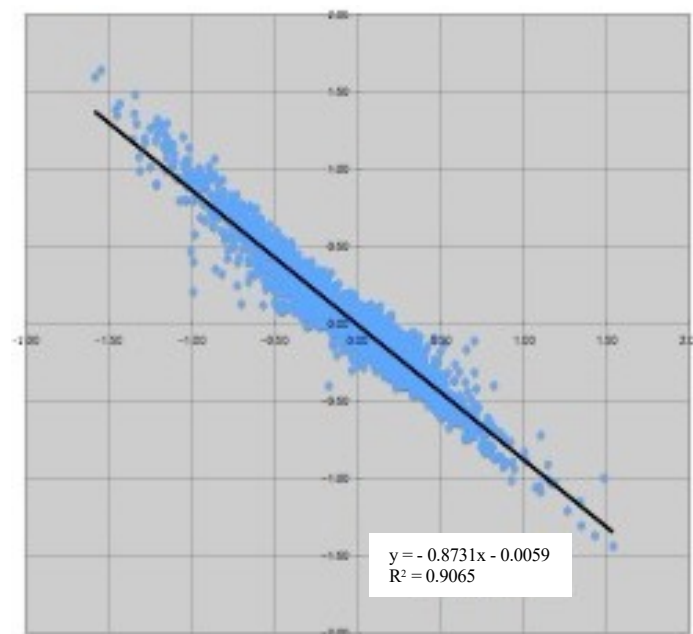


図49 イネマイクロアレイのカラースワップデータの散布

x 軸はスライド 1 のLogRatioを、y軸はスライド 2 のLogRatioの値を示す。
 $y=-0.8731x-0.0059$ は、散布の近似直線を示す。
 R^2 値はカラースワップ間のLogRatioの相関値を示す。

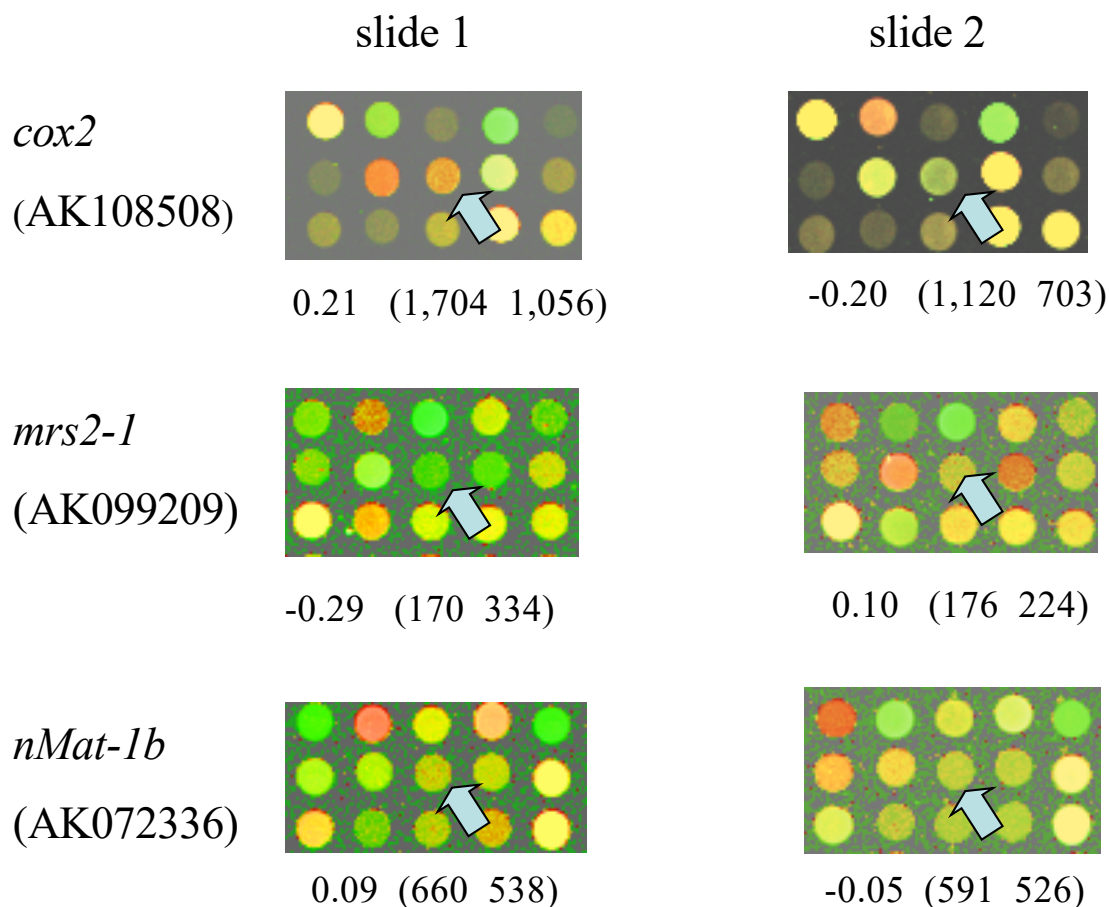


図50 イネオリゴマイクロアレイによるイネ*cox2*・*mrs2-1*・*nMat-1b*遺伝子の発現解析

目的の遺伝子は、それぞれの画像の中央（矢印）のスポットである。スライド1には、Cyanine3で標識した常温区のcRNAとCyanine5で標識した低温区のcRNAを競合的にハイブリダイゼーションさせた。スライド2にはCyanine5で標識した常温区のcRNAとCyanine3で標識した低温区のcRNAを競合的にハイブリダイゼーションさせた。Cyanine3の発現量が多い場合は緑、Cyanine5の発現量が多い場合は赤色、両者の発現量が同じ場合は黄色を呈す。画像の下の数値は低温区と常温区の発現比のLogRatio： $\log_{10}(\text{rProcessedSignal}/\text{gProcessedSignal})$ の値を、括弧内の数値はシグナル強度（低温処理区、常温区）を示す。常温区:25℃; 低温処理区:12℃で14日間低温処理。

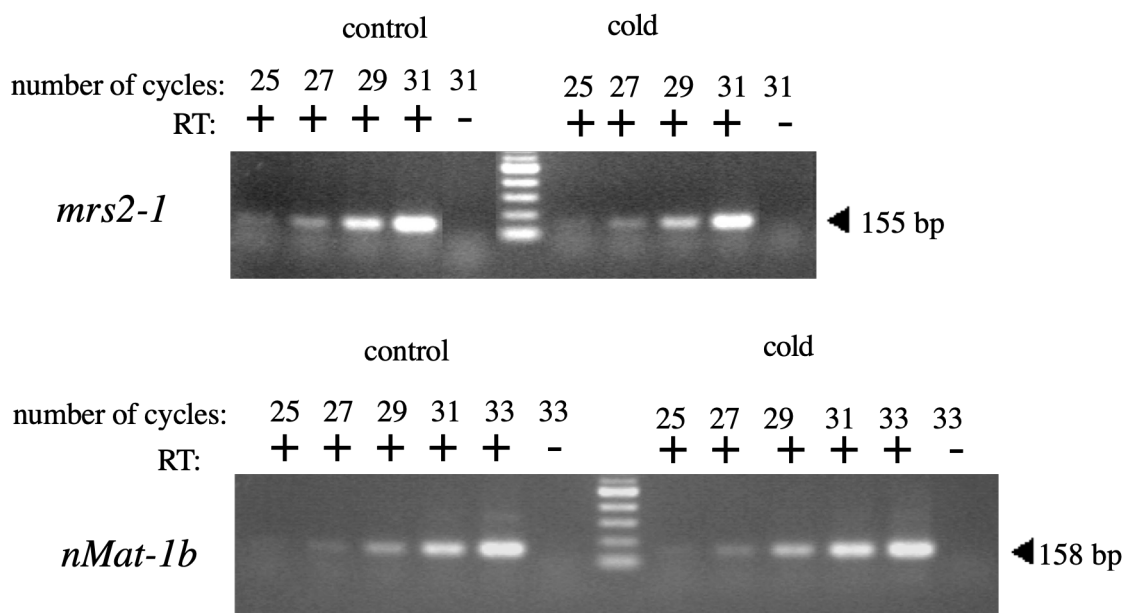


図51 定量的RT-PCRによるイネ*mrs2-1*・*nMat-1b*遺伝子の発現解析

control: 25°C; cold: 12°Cで14日間低温処理。cDNA合成に用いた全RNA量は、それぞれ125ngである。PCRの条件は、*mrs2-1*遺伝子では、95°C2分を1サイクル、次に95°C30秒、50°C30秒、72°C30秒を25～31サイクル、最後に72°C7分を1サイクル、*nMat-1b*遺伝子では、95°C2分を1サイクル、次に95°C30秒、53°C30秒、72°C30秒を25～33サイクル、最後に72°C7分を1サイクルである。+: 逆転写酵素を使用した区； -: 逆転写酵素を用いなかった陰性対照区。

3. 考察

オルガネライントロンのスプライシングの制御は、複数のイントロンに対して行われるものと、個別のイントロンに対するものに分かれていると考えられている (Bonen and Vogel 2001)。前者を代表する制御因子が酵母 *MRS2* であり、後者を代表する制御因子が *atnMat-1a* である。

酵母 *MRS2* は、ミトコンドリアの内膜に局在し Mg^{2+} トランスポーターとして機能していることが確かめられ (Bui et al. 1999; Kolisek et al. 2003; Weghuber et al. 2006)、 Mg^{2+} の恒常性がグループ II イントロンスプライシングに重要な役割を果たすことが明らかにされている (Gregan et al. 2001; Kolisek et al. 2003)。本研究では、酵母 *mrs2* 変異を相補する *atmrs2-1* (Schock et al. 2000) のアミノ酸配列相同性に基づき、イネより *osmrs2-1* を見いだした。イネミトコンドリアにおいても、酵母と同様に Mg^{2+} の恒常性がイントロンスプライシングに関わるかどうか今後検証する必要がある。また、*AtMRS2-1* (Schock et al. 2000) や *OsMRS2-1* (本研究) の細胞内局在性は特定できていない。今後、局在性についても特定を進める必要がある。一方、*nMat-1* ホモログについては、イネミトコンドリアのイントロンスプライシングに関与する可能性のあるコピーを同定するには至らなかった。今後、イネに限らずに塩基配列データが豊富に蓄積する植物種を対象に *nMat-1* 相同遺伝子を探索し、同遺伝子ファミリーの特徴付けを進める必要がある。

本章におけるマイクロアレイおよび定量的 RT-PCR の両解析の結果、イネに 12°C 14 日の低温処理を施すと *osmrs2-1* の発現が低下することを明らかにした (図 50、51)。このことは、低温に伴いイントロンを含む転写産物がいずれも増加傾向にあること (表 12) との関連を示唆する。あるいは低温処理に伴い、ミトコンドリアスプライシング制御因子の発現調節が変化し、第二章や第三章で発見したような現象が起こるのかも知れない。今後、*osmrs2-1* の突然変異体を得て解析することができれば、研究の新たな展開が期待できる。さらに、ミトコンドリアスプライシング制御因子の全容を明らかにし、各々の低温処理に対する応答を調査する必要がある。

V 章 総合考察

本研究では、イネやコムギで低温に伴いイントロンを含むミトコンドリア前駆体転写産物蓄積が普遍的に増加することを明らかにした。同時に一部の遺伝子の前駆体転写産物において RNA エディティングの頻度が低下するが、これについては普遍性が認められない。こうした現象が見られるのは、今のところイネでは 12°C、コムギでは 0.5~4°C であり、他の温度域（例えばイネ 4°C）では認められない。

イネにおいては、12°C と 4°C では生体に与える低温の影響は明瞭に区別される。12°C は冷害発生温度域に相当し、これ以下であればいわゆる **chilling injury** を発生する限界温度である。外見上、12°C では花粉不稔と生育の極端な遅れが認められるのみでその他の傷害は発生しない。一方、4°C は致死的な温度域であり、長期間の曝露は枯死をもたらす。2 から 4°C の低温処理は、幼苗に奇形・黄白斑紋の発生・萎凋等の傷害を与える。葉齢によりその程度は異なるが、20 時間から 24 時間のこの温度域の低温処理を施すと、常温に戻しても復活できず枯死するという報告がある（大谷と土井 1942 ; 櫛渕ら 1974）。生理的にも、ATP 含量が 25°C から 6°C までは一定なのに対し、4°C 以下では急激に低下する（Kabaki et al. 1982）。12°C と 4°C では発現誘導される遺伝子の種類に明確な違いがあり、例えば MAP キナーゼ経路遺伝子の一種をコードする *OsMEK1* や *OsMAP1* は 12°C で、bZIP 型転写因子をコードする *lip19* は 4°C でそれぞれ特異的に誘導され、独自のシグナル伝達経路を形成する（Wen et al. 2002）。おそらく、本研究で見いだしたミトコンドリア前駆体転写産物蓄積増加は 12°C 温度域で生ずる生体反応の一種と考えられる。もし、低温がイントロンの高次構造形成あるいはスプライシング装置に直接作用していわゆる物理化学的反応速度論的遅滞をもたらしているのであれば、4°C でも前駆体転写産物蓄積が観察されるはずである。

コムギにおいては、0.5~4°C の温度域は低温馴化により体内水分の減少や体内糖分組成の変化が生じ、低温耐性を獲得する温度域である（Yoshida et al. 1998; Fowler and Gusta 1977）。ミトコンドリア前駆体転写産物蓄積が増加すること、また、スプライシングを経た転写産物も同様に増加傾向にあり減少する転写産物がないことは、低温馴化温度域で生じる生体反応の一種と推定される。

前駆体転写産物蓄積の増加が生体にとっていかなる意義を持つのかは不明で

ある。本研究で調査した限り、イネにおける 12℃処理による *cox2* の翻訳産物、およびコムギにおける 0.5～2.8℃処理による *cox2* と *ccmFc* の翻訳産物は、いずれも蓄積量に変動しなかった。これに関連し、イネ幼苗の呼吸やシトクローム c 酸化酵素活性は 30～9℃まではほぼ直線的に推移し、12℃付近での急速な低下は認められないという (Kabaki et al. 1982)。従って、前駆体転写産物蓄積の増加は翻訳産物の蓄積量や呼吸活性と直接関係があるとはいえない。しかし、コムギと同様に低温馴化能を持っているシロイヌナズナでは、低温処理を施すとシトクローム経路の能力が上昇するという (Armstrong et al. 2006)。今後、コムギについて、成熟型転写産物蓄積が明確に増加する遺伝子の翻訳産物の蓄積量や、低温処理によるシトクローム経路の能力の変化を調べてみる必要がある。一方、イネの生体全体では 12℃処理により地上部の RNA 含量が著しく増加するという (梶木ら、1983)。あるいは、ミトコンドリア前駆体転写産物蓄積の増加はこの現象の一環であるのかもしれない。今後は、ミトコンドリアのみならず、イネの 12℃温度域、およびコムギの 0.5～4℃温度域における生体の RNA 代謝の意義も視野に入れつつ研究を進める必要がある。

前駆体転写産物蓄積が増加する機構については、詳細は不明であるが、いくつかの示唆的なデータが得られた。まず、各イントロン分断部位におけるスプライシングを経た分子と経ていない分子の低温処理に伴う増減については表 16 の 4 パターンにまとめられ、これ以外のパターンは見つからない。

表 16：スプライシング未了分子と完了分子の蓄積量の低温による変化

	イントロンを含む分子	スプライシングを経た分子	イネ	コムギ
パターン 1	増	増	0	7
パターン 2	増	変化無し	8	3
パターン 3	増	減	8	0
パターン 4	変化無し	変化無し	7	0

イネには 12℃14 日、コムギには昼 2℃/夜 0.5℃14 日の低温処理を施した。

この表より、以下の 2 点を読み取ることができる。すなわち、i.イントロンを含む分子の蓄積量は低温に伴い増加するか変化しないが、減少するものは無い、ii.スプライシングを経た分子の蓄積量増減は、イントロンを含む分子の挙動とは一致しない、の 2 点である。このことより、イントロンを含む転写産物とス

プライシングを経た転写産物は異なる制御を受けているものと思われる。植物ミトコンドリア遺伝子は転写後制御を受けていることが示されており、例えば転写活性と RNA 蓄積量は一致しない。トウモロコシの実生ではプロモーターの活性は *rrn18* > *rrn26* > *atp1* > *atp6* > *atp9* > *cob* > *cox3* であったが、RNA 蓄積量は *rrn18* > *rrn26* > *atp9* > *atp1* > *cox3* > *cob* > *atp6* となる (Mulligan et al. 1991)。また、シロイヌナズナの幼苗ではミトコンドリア遺伝子の転写活性は日中高く夜間に低下するが、RNA 蓄積量は遺伝子ごとに恒常的に一定に保たれている (Okada and Brennicke 2006)。これらの報告から、各遺伝子が独自の制御を受けていることが窺える。従って、本実験で明らかになった現象を考察する上では、スプライシング、転写活性あるいは転写産物安定性等の諸要因の一つに原因を帰するだけでは不十分で、それらが複合的に作用する機構が関わっていると考えるべきである。

本研究ではオルガネライントロンのスプライシングに関わると思われる核遺伝子 *osmrs2-1* の発現が低温に伴い減少することを明らかにした。*osmrs2-1* の機能や翻訳産物が機能する場は確定していないが、低温に伴い発現が減少する因子が存在するという知見の意義は大きい。すなわち、スプライシング効率の低下は前駆体転写産物の蓄積増と成熟転写産物の減少をもたらすので、これは表 16 のパターン 3 に関わる機構として有力である。その他のパターン 1、2 および 4 については他の要因、例えば転写活性や転写産物の安定性を加味して研究を進める必要があるだろう。特に、転写産物の安定性に関しては現時点で全体像が明らかになっているとは言い難い (Gagliardi et al. 2004) ので、今後の展開に注目していく必要がある。

V 章. 摘要

(1) 本研究では、イネやコムギのミトコンドリア遺伝子が低温に伴いその発現を変えることを明らかにした。

(2) 先ず、ミトコンドリア遺伝子 *cox2* をモデル遺伝子として採り上げ、コムギ *cox2* の低温環境下 (0.5°C~5°C) の発現を、ノーザン解析により解析した。その結果、イントロンを含む前駆体転写産物 (2.7kb) とスプライシングを完了した成熟転写産物 (1.5kb) が検出された。前者は低温に伴い蓄積を増し、一方後者は変化しなかった。

(3) 発現の変化が始まる時期や度合いはコムギ遺伝子型により違いはみられるものの、低温に伴い共通して *cox2* の前駆体転写産物蓄積の増加が観察された。また、茎葉部・小穂・根で同じ現象が観察され、器官特異性はない。乾燥、ABA、および NaCl 処理を施したが、コムギ *cox2* の前駆体転写産物蓄積の増加は観察されなかった。また、暗黒下でも低温によるその増加が観察され、温度と光による交互作用は認められない。

(4) イネ *cox2* の低温環境下 (12°C、4°C) の発現をノーザン解析によって解析した。前駆体転写産物 (2.6kb) とスプライシングを完了した 2 種類の転写産物 (1.3kb と 1.0kb) が検出された。12°C の低温に伴い、前駆体転写産物は蓄積し、1.3kb の転写産物はやや減少、1.0kb 産物は変化しなかった。4°C の低温では、いずれの転写産物量も変化しなかった。

(5) イントロンを含んだ転写産物およびスプライシングを経た転写産物の蓄積の低温による変化を調べるため、スプライシング部位を挟んだプライマーを用いた定量的 RT-PCR の実験系を構築した。

(6) コムギのシス型イントロンのみを持つミトコンドリア遺伝子について、1 個のイントロンを持つ遺伝子 (*rps3*、*ccmFc*) はノーザン解析によって、複数のイントロンを持つ遺伝子は定量的 RT-PCR によって、低温環境下の発現を解析した。その結果、いずれの遺伝子も低温 (0.5~2°C) により、イントロンを含む

転写産物の蓄積が増加した。スプライシングを経た転写産物は、増加したものと変化しないものがあった。

(7) イネミトコンドリアゲノムには 23 個のグループ II インترونが見つかる。これらを保持する全ての遺伝子について、コムギと同じ手法で 12°C の低温下の転写産物蓄積を解析した。その結果、イントロンを含む転写産物の蓄積については、増加する場合と変化しない場合が認められた。一方、スプライシングを経た転写産物の蓄積に関しては、低下又は無変化のいずれかであった。

(8) 各イントロンについて 5'末端の塩基配列、ドメイン V の長さ、スプライシングの攻撃基となるドメイン VI の塩基対をなさないアデノシンの有無と位置、3'末端の塩基配列、およびイントロンの長さ等について検討した。その結果、低温による転写産物蓄積の変化との相関を示すデータは得られなかった。したがって、低温によるイントロンを含む転写産物の蓄積はイントロンの一次構造や二次構造とは無関係と考えられる。

(9) コムギ *cox2* の RNA エディティングの状態を調べた。成熟転写産物は温度に拘わらずほぼ全てのエディティング部位でエディティングを完了していた。一方、前駆体転写産物では 0.5~2°C の低温により全体に頻度が低下し、特に IBS1 (Intron Binding Site 1) のエディティング頻度が著しく低下していた。

(10) イネ *cox2* の RNA エディティングの状態を調べた。スプライシングを完了した転写産物は温度に拘わらずほぼ全てのエディティング部位でエディティングを完了していた。一方、前駆体転写産物では 12°C の低温により全体の頻度は変化しないが、IBS1 のエディティングが全く生じていなかった。4°C の低温では常温 (25°C) と違いがみられなかった。

(11) イネ *nad5* インترون 4、*nad7* インترون 1 のそれぞれ隣接上流エクソンの IBS 領域には RNA エディティング部位がある。また、これらのイントロンを含む転写産物の蓄積は低温により増加する。これらの IBS 領域のエディティングの状態を調べた。その結果、*nad5* インترون 4 を含む転写産物では温度に拘わらずエディティングが完了していた。*nad7* インترون 1 を含む転写産

物では温度に拘わらず、1/3 の転写産物でエディティングが生じていた。したがって、*cox2* でみられた、低温に伴うイントロンを含む転写産物蓄積増加と IBS1 の RNA エディティング頻度の低下の関連性には、普遍性が認められなかった。

(1 2) ミトコンドリアでは転写産物の 3'末端に付加された poly-A が転写産物の分解促進シグナルとなる。イネ *cox2* において、poly-A の付加した前駆体転写産物とスプライシングを完了した転写産物について、低温に伴う蓄積の変化を調べた。その結果、その増減はノーザン解析の結果と同様であった。したがって、poly-A を介した RNA 分解機構が、低温環境における前駆体転写産物の増加に関与しているとは言えない。

(1 3) イネとコムギの COXII タンパク質およびコムギの CCMFc タンパク質の蓄積量をウェスタン分析により解析した。低温による変化は認められなかった。

(1 4) シロイヌナズナの核遺伝子 *atmrs2-1* は、Mg²⁺ トランスポーターとして働くことによりグループ II イントロンのスプライシングに関わると推測されている。*atmrs2-1* のイネオースログ *osmrs2-1* の cDNA 完全長クローンを、イネデータベースから見出した。

(1 5) イネ核ゲノムより *osmrs2-1* 塩基配列を検索した結果、6 番染色体に座乗しシングルコピーであることがわかった。また、*osmrs2-1* 遺伝子のコード領域はイントロンで分断された 5 つのエキソンで構成されている。

(1 6) OsMRS2-1 の推定アミノ酸配列を精査した結果、AtMRS2-1 や酵母 MRS2 と同様に、2 個の膜貫通領域が予想された。葉緑体あるいはミトコンドリアいずれかの膜タンパク質として存在する可能性は高いと考えられる。

(1 7) *osmrs2-1* の発現を、イネマイクロアレイと定量的 RT-PCR により解析した。12°C の低温により転写産物の蓄積が減少することがわかった。スプライシング効率の低下は、前駆体転写産物の蓄積増と成熟転写産物の減少をもたら

すはずである。このような蓄積の増減パターンを示す遺伝子として、*rps3* (リボソームタンパク質 S3) をはじめ 7 種のイネ遺伝子がみつかった。これらの発現には *osmr-s2-1* の翻訳産物が関わっている可能性が考えられる。

(18) *osnMat1-b* は、イネ核ゲノムにコードされる ORF であり、可動性イントロン上にコードされている逆転写/成熟化酵素に由来し、グループ II イントロンのスプライシング補助因子と推定されている。イネデータベース解析を進めたところ、*osnMat1-b* の完全長 cDNA クローンが見つかり、mRNA として転写されていることがわかった。

(19) *OsnMAT-1b* の推定アミノ酸配列を精査した結果、ミトコンドリア輸送シグナルペプチド領域が予想され、膜貫通領域は認められなかった。それ故ミトコンドリアのマトリックスに存在する可能性が高い。

(20) *osnMat1-b* の発現を、イネマイクロアレイ解析と定量的 RT-PCR により解析した。その結果、この遺伝子の転写産物の蓄積量は、12°C の低温による影響を受けなかった。

謝辞

本論文のとりまとめにあたっては、北海道大学農学研究院教授 三上哲夫博士には親切な指導とともに綿密なご校閲を賜りました。北海道農業試験場地域基盤研究部適応生態研究室長（現農業生物資源研究所副研究主幹）半田裕一博士には、ご校閲をいただくとともに、本研究に着手する機会を賜わり、投稿論文の共著者として研究の遂行にあたり助言とご協力、ご指導をいただきました。北海道大学農学研究院准教授 久保友彦博士には親切な指導と綿密なご校閲とともに、忍耐強いご指導と研究遂行にあたり実験の細部に至るまで多くの助言をいただきました。また、北海道大学農学研究院教授 佐野芳夫博士には貴重なご助言とご校閲を賜りました。慎んで深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、北海道農業研究センター地域基盤研究部冷害生理研究室研究官（現米品質研究チーム研究員）松葉修一氏にはイネ材料の育成についてご指導とご協力をいただききました。地域基盤研究部適応生態研究室主任研究官（現低温耐性研究チーム主任研究員）下坂悦生氏、同研究室長（現低温耐性研究チーム上席研究員）小沢憲二郎博士、同研究室重点支援研究員・非常勤職員の皆様には、同じ研究室のメンバーとして多大なるご協力をいただき、非常勤職員 米内山知子氏には熟練技術による実験支援をいただきました。同センター寒地飼料作物育種研究チーム研究員 田村健一氏にはキャピラリーシーケンサーのご指導をいただき、同センター業務 2 科の皆様には多くの技術支援をいただきました。また、マイクロアレイ実験の遂行にあたり、農業資源生物研究所ゲノムリソースセンター長 長村吉晃博士、同センタースタッフ 本山立子氏のご指導をいただきました。なお、マイクロアレイの実験は、農林水産技術会議事務局筑波事務所研究交流課の農林交流センターワークショップの一環として行いました。これらの方々に慎んで深く感謝の意を表します。

コムギ品種 ‘Chinese Spring’ の alloplasmic line ‘C30’ は、京都大学名誉教授 常脇恒一郎博士より、コムギ品種 ‘Mironovskaya 808’・‘Norstar’・‘Iohardi’・‘Manitou’ は北海道農業研究センター畑作研究部 麦育種研究室（現パン用小麦研究チーム）より、コムギ・イネの COXII 抗体とコムギ *ccmFc* クローン（*EcoRI*）は半田裕一博士より、また、コムギ CCMFc 抗体は、フランス Institute de Biologie Moléculaire des Plantes-Centre National de la Recherche Scientifique Philippe Giegé 博士より賜りました。お礼申し上げます。

す。

この間、ご指導とご激励をいただきました北海道農業試験場地域基盤研究部長 大野清春博士、同研究部長（現北海道大学名誉教授）大澤勝次博士、北海道農業研究センター地域基盤研究部長（現筑波大学教授）奥野員敏博士、同研究部長（現低温耐性研究チーム長）佐藤裕博士、同センター研究管理監 山口秀和博士、同センター研究管理監 上原康樹博士に深く感謝いたします。

また、国内外の植物ミトコンドリア研究者の多くの方々と北海道農業研究センター低温耐性研究チームの皆様から、多くの親切で有益な助言をいただきました。心から深く感謝の意を表します。さらに、松平洋明博士をはじめとする北海道大学農学研究院応用生命科学部門育種工学分野遺伝子制御学研究室の皆様には大変お世話になり、また、溢れるばかりの眩しい若さで私を若返らせてくれました。ありがとうございます。

最後になりましたが、夫栗原栄樹さんと娘栗原雅子さんに感謝いたします。

2007年 12月

栗原 志保

引用文献

- Armstrong, A.F., Logan, D.C., Tobin, A.K., O'Toole, P. and Atkin, O.K. (2006) Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ*, **29**, 940-949.
- Arnon, D.I. and Hoagland, D. R. (1940) Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Sci*, **50**, 463-485.
- Binder, S. and Brennicke, A. (2003) Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Phil Trans R Soc Lond B*, **358**, 181-189.
- Bock, H., Brennicke, A. and Schuster, W. (1994) *rps3* and *rpl16* genes do not overlap in *Oenothera* mitochondria: GTG as a potential translation initiation codon in plant mitochondria? *Plant Mol Biol*, **24**, 811-818.
- Bonen, L., Boer, H.P. and Gray, M.W. (1984) The wheat cytochrome oxidase subunit II gene has an intron insert and three radical amino acid changes relative to maize. *EMBO J*, **3**, 2531-2536.
- Bonen, L. and Vogel, J. (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet*, **17**, 322-331.
- Boutry, M., Faber, A., Carbonnier, M. and Briquet, M. (1984) Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products: Detection of variant polypeptides associated with cytoplasmic male sterility. *Plant Mol Biol*, **3**, 445-452.
- Bradford, M.M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Bui, D.C., Grogan, J., Jarosch, E., Ragnini, A. and Schweyen, R.J. (1999) The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **274**, 20438-20443.
- Chapdelaine, Y. and Bonen, L. (1991) The wheat mitochondrial gene for subunit I of the NADH dehydrogenase complex: a trans-splicing model for this gene-in-pieces. *Cell*, **65**, 465-472.
- Chase, C.D. (2007) Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. *Trends Genet*, **23**, 81-90.

- Claros, M.G. and Vincens, P. (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem*, **41**, 779-786.
- Clifton, S.W., Minx, P., Fauron, C.M., Gibson, M., Allen, J.O., Sun, H., Thompson, M., Barbazuk, W.B., Kanuganti, S., Tayloe, C., Meyer, L., Wilson, R.K. and Newton, K.J. (2004) Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol*, **136**, 3486-3503.
- Covello, P.S. and Gray, M.W. (1989) RNA editing in plant mitochondria. *Nature*, **341**, 662-666.
- Covello, P.S. and Gray, M.W. (1990) RNA sequence and the nature of the CuA-binding site in cytochrome c oxidase. *FEBS Lett*, **268**, 5-7.
- De Paepe, R., Forchioni, A., Chetrit, P. and Vedel, F. (1993) Specific mitochondrial proteins in pollen: presence of an additional ATP synthase beta subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 5934-5938.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H and von Heijne, G. (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci*, **8**, 978-984.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, **300**, 1005-1006.
- Estiati, A. (2000) Studies on genome structure and gene content in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mitochondrial DNA. *Ph. D. Thesis*, Hokkaido University, Sapporo.
- Farré, J., C. Leon, G., Jordana, X. and Araya, A. (2001) *cis* Recognition elements in plant mitochondrion RNA editing. *Mol Cell Biol*, **21**, 6731-6737.
- Felitti, S.A., Chan, R.I., Gago, G., Valle, E.M. and Gonzalez, D.H. (1997) Expression of sunflower cytochrome c mRNA is tissue-specific and controlled by nitrate and light. *Physiol Plant*, **99**, 342-347.
- Fowler, D.B. and Gusta, L.V. (1977) Influence of fall growth and development on cold tolerance of rye and wheat. *Can J Plant Sci*, **57**, 751-755.
- Gagliardi, D. and Leaver, C.J. (1999) Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO J*, **18**, 3757-3766.

- Gagliardi, D., Stepien, P.P., Temperley, R.J., Lightowlers, R.N. and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M.A (2004) Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends Genet*, **20**, 260-267.
- Geddy, R., Mahe, L. and Brown, G.G. (2005) Cell-specific regulation of a *Brassica napus* CMS-associated gene by a nuclear restorer with related effects on a floral homeotic gene promoter. *Plant J*, **41**, 333-345.
- Giegé, P., Rayapuram, N., Meyer, E.H., Grienemberger, J.M. and Bonnard, G. (2004) CcmFc involved in cytochrome *c* maturation is present in a large sized complex in wheat mitochondria. *FEBS Lett*, **563**, 165-169.
- Gray, M.W. and Lang, B.F. (1998) Transcription in chloroplasts and mitochondria: a tale of two polymerases. *Trends Microbiol*, **6**, 1-3.
- Gregan, J., Kolisek, M. and Schweyen, R.J. (2001) Mitochondrial Mg²⁺ homeostasis is critical for group II intron splicing *in vivo*. *Genes Dev*, **15**, 2229-2237.
- Gualberto, J.M., Lamattina, L., Bonnard, G., Weil, J.H. and Grienemberger, J.M. (1989) RNA editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. *Nature*, **341**, 660-662.
- Handa, H. (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res*, **31**, 5907-5916.
- Hanic-Joyce, P.J. and Gray, M.W. (1991) Accurate transcription of a plant mitochondrial gene *in vitro*. *Mol Cell Biol*, **11**, 2035-2039.
- 北海道農業試験場. (1994a) 北海道における平成5年冷害の解析-水稲・飼料作物編, 札幌.
- 北海道農業試験場. (1994b) 北海道における平成5年冷湿害の解析-畑作編, 札幌.
- Huang, J., Stuck, F., Matzinger, D.F. and Levings, C.J (1994) Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number. *Plant Cell*, **6**, 439-448.
- Ikeda, T.M. and Gray, M.W. (1999) Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol Cell Biol*, **19**, 8113-8122.

- Ito, Y., Saisho, D., Nakazono, M., Tsutsumi, N. and Hirai, A. (1997) Transcript levels of tandem-arranged alternative oxidase genes in rice are increased by low temperature. *Gene*, **203**, 121-129.
- Kabaki, N., Yoneyama, T. and Tajima, K. (1982) Physiological mechanism of growth retardation in rice seedlings as affected by temperature. *Japan Jour Crop Sci*, **51**, 82-88.
- 桃木信幸, 田嶋公一, 雨宮昭. (1983) 低温によるイネの生育阻害の生理的研究 第I報 低温下の生長と代謝および苗の活着阻害の生理. *農技研報D*, **34**, 1-68.
- Kable, M.L., Seiwert, S.D., Heidmann, S. and Stuart, K. (1996) RNA editing: a mechanism for gRNA-specified uridylate insertion into precursor mRNA. *Science*, **273**, 1189-1195.
- Kacperska, A. (1993) Water potential alterations - A prerequisite or a triggering stimulus for the development of freezing tolerance in overwintering herbaceous plant? In Li, P. and Christersson, L. (eds.), *Advance in Plant Cold Hardiness*, 73-91.
- Kemble, R.J. (1987) A rapid, single leaf, nucleic acid assay for determining the cytoplasmic organelle complement of rapeseed and related *Brassica* species. *Theor Appl Genet*, **73**, 364-370.
- Knoop, V. (2004) The mitochondrial DNA of land plants: peculiarities in phylogenetic perspective. *Curr Genet*, **46**, 123-139.
- Kolisek, M., Zsurka, G., Weghuber, J., Schweyen, R.J. and Schweigel, M. (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *EMBO J*, **22**, 1235-1244.
- Kubo, N., Ozawa, K., Hino, T. and Kadowaki, K. (1996) A ribosomal protein L2 gene is transcribed, spliced, and edited at one site in rice mitochondria. *Plant Mol Biol*, **31**, 853-862.
- Kubo, N. and Kadowaki, K. (1997) Involvement of 5' flanking sequence for specifying RNA editing sites in plant mitochondria. *FEBS Lett*, **413**, 40-44.
- 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**, 2571-2576.
- Kubo, T. and Mikami, T. (2007) Organization and variation of angiosperm mitochondrial genome. *Physiol Plant*, **129**, 6-13.

- Kudla, J., Hayes, R. and Gruissem, W. (1996) Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *EMBO J*, **15**, 7137-7146.
- Kudla, J., Albertazzi, F.J., Blazevic, D., Hermann, M. and Bock, R. (2002) Loss of the mitochondrial *cox2* intron 1 in a family of monocotyledonous plants and utilization of mitochondrial intron sequences for the construction of a nuclear intron. *Mol Genet Genomics*, **267**, 223-230.
- Kuhn, J., Tengler, U. and Binder, S. (2001) Transcript lifetime is balanced between stabilizing stem-loop structures and degradation-promoting polyadenylation in plant mitochondria. *Mol Cell Biol*, **21**, 731-742.
- 櫛渕欽也, 和田純二, 金沢俊光, 浪岡実, 角田公正. (1974) 水稻冷害の実際的研究 第41報 幼苗期の低温障害. *東北農業研究*, **15**, 88-91.
- Kuwabara, T., Udachin, R.A., Alekseeva, E.N. and Kudaeva, N.B. (1998) Comparisons of frost resistance among Japanese, Russian and Scandinavian wheat cultivars. *Misc Pub Hokkaido Natl Agric Exp Stn*, **56**, 55-58.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landschutze, V., Muller-Rober, B. and Willmitzer, L. (1995) Mitochondrial citrate synthase from potato: predominant expression in mature leaves and young flower buds. *Planta*, **196**, 756-764.
- Li, F., Zhang, Y., Wang, M., Zhang, Y., Wu, X. and Guo, X. (2007) Molecular cloning and expression characteristics of alternative oxidase gene of cotton (*Gossypium hirsutum*). *Mol Biol Rep*, **in press**.
- Li-Pook-Than, J., Carrillo, C. and Bonen, L. (2004) Variation in mitochondrial transcript profiles of protein-coding genes during early germination and seedling development in wheat. *Curr Genet*, **46**, 374-380.
- Lind, C., Halldén, C. and Møller, I.M. (1991) Protein synthesis in mitochondria purified from roots, leaves and flowers of sugar beet. *Physiol Plant*, **83**, 7-16.
- Lippok, B., Brennicke, A. and Wissinger, B. (1992) The *coxII* gene in carrot mitochondria contains two introns. *Mol Gen Genet*, **232**, 322-327.
- Lohrmann, J., Sweere, U., Zabaleta, E., Bäurle, I., Keitel, C., Kozma-Bognar, L., Brennicke, A., Schäfer, E., Kudla, J. and Harter, K. (2001) The response regulator ARR2: a pollen-specific transcription factor

- involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics*, **265**, 2-13.
- Lupold, D.S., Caoile, A.G. and Stern, D.B. (1999) Genomic context influences the activity of maize mitochondrial *cox2* promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 1670-1675.
- Maier, R.M., Zeltz, P., Kössel, H., Bonnard, G., Gualberto, J.M. and Grienemberger, J.M. (1996) RNA editing in plant mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol*, **32**, 345-365.
- Michel, F. and Ferat, J. (1995) Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem*, **64**, 435-461.
- Millar, A.H., Heazlewood, J.L., Kristensen, B.K., Braun, H.P. and Møller, I.M. (2005) The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci*, **10**, 36-43.
- Mohr, G. and Lambowitz, A.M. (2003) Putative proteins related to group II intron reverse transcriptase/maturases are encoded by nuclear genes in higher plants. *Nucleic Acids Res*, **31**, 647-652.
- Morawala-Patell, V., Gualberto, J.M., Lamattina, L., Grienemberger, J.M. and Bonnard, G. (1998) Cis- and trans-splicing and RNA editing are required for the expression of *nad2* in wheat mitochondria. *Mol Gen Genet*, **258**, 503-511.
- Mulligan, R.M., Leon, P. and Walbot, V. (1991) Transcriptional and posttranscriptional regulation of maize mitochondrial gene expression. *Mol Cell Biol*, **11**, 533-543.
- Nakagawa, N. and Sakurai, N. (2006) A mutation in At-nMat1a, which encodes a nuclear gene having high similarity to group II intron maturase, causes impaired splicing of mitochondrial NAD4 transcript and altered carbon metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **47**, 772-783.
- Nakai, K. and Horton, P. (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, **24**, 34-36.
- Nakazono, M., Itadani, H., Wakasugi, T., Tsutsumi, N., Sugiura, M. and Hirai, A. (1995) The *rps3-rpl16-nad3-rps12* gene cluster in rice mitochondrial DNA is transcribed from alternative promoters. *Curr Genet*, **27**, 184-189.

- Newton, K.J. (1994) Procedure for isolating mitochondria and mitochondrial DNA and RNA. In Freeling, M. and Walbot, V. (eds.), *The Maize Handbook*. Springer-Verlag, New York, 549-556.
- Nishiyama, I. (1976) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XII. Classification of tapetal hypertrophy on the basis of ultrastructure. *Proc Crop Sci Soc Japan*, **45**, 254-262.
- Nishiyama, I. (1984) Climate influence on pollen formation and fertilization. In Tsunoda, S. and Takahashi, T. (eds.), *Biology of Rice*. Elsevier, Amsterdam, 153-171.
- Nogueira, F.T., De Rosa, V.E.Jr., Menossi, M., Ulian, E.C. and Arruda, P. (2003) RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiol*, **132**, 1811-1824.
- 農業生物資源研究所イネゲノムリソースセンター. (2005) マイクロアレイ実験 & 解析テキスト, つくば.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakozono, M., Hirai, A. and Kadowaki, K. (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics*, **268**, 434-445.
- Nugent, J.M. and Palmer, J.D. (1991) RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell*, **66**, 473-481.
- O'Hara, E.B., Chekanova, J.A., Ingle, C.A., Kushner, Z.R., Peters, E. and Kushner, S.R. (1995) Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 1807-1811.
- Ogihara, Y., Yamazaki, Y., Murai, K., Kanno, A., Terachi, T., Shiina, T., Miyashita, N., Nasuda, S., Nakamura, C., Mori, N., Takumi, S., Murata, M., Futo, S., Murai, K. and Tsunewaki, K. (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res*, **33**, 6235-6250.
- 大谷義雄, 土井彌太郎. (1942) 水稻冷害の生理学的研究 (予報) [XI] 幼苗に於ける低温障害. *日本作物学会紀事*, **16**, 9-11.

- Okada, S. and Brennicke, A. (2006) Transcript levels in plant mitochondria show a tight homeostasis during day and night. *Mol Genet Genomics*, **276**, 71-78.
- Pereira de Souza, A., Jubier, M.F., Delcher, E., Lancelin, D. and Lejeune, B. (1991) A *trans*-splicing model for the expression of the tripartite *nad5* gene in wheat and maize mitochondria. *Plant Cell*, **3**, 1363-1378.
- Ribichich, K.F., Tioni, M.F., Chan, R.L. and Gonzalez, D.H. (2001) Cell-type-specific expression of plant cytochrome c mRNA in developing flower and roots. *Plant Physiol*, **125**, 1603-1610.
- 酒井昭, 吉田静夫. (1983) *植物と低温*. 東京大学出版会, 東京.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Satake, T. and Hayase, H. (1970) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. *Proc Crop Sci Soc Japan*, **39**, 468-473.
- Schmidt-Bleek, K., Heiser, V., Thieck, O., Brennicke, A. and Grohmann, L. (1997) The 28.5-kDa iron-sulfur protein of mitochondrial complex I is encoded in the nucleus in plants. *Mol Gen Genet*, **253**, 448-454.
- Schock, I., Gregan, J., Steinhauser, S., Schweyen, R., Brennicke, A. and Knoop, V. (2000) A member of a novel *Arabidopsis thaliana* gene family of candidate Mg²⁺ ion transporters complements a yeast mitochondrial group II intron-splicing mutant. *Plant J*, **24**, 489-501.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F. and Lurin, C. (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, **4**, 1581-1590.
- Smart, C.J., Moneger, F. and Leaver, C.J. (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell*, **6**, 811-825.
- Sonnhammer, E.L., von Heijne, G. and Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **6**, 175-182.
- Subramanian, S., Fallahi, M. and Bonen, L. (2001) Truncated and dispersed *rpl2* and *rps19* pseudogenes are co-transcribed with neighbouring downstream genes in wheat mitochondria. *Curr Genet*, **39**, 264-272.

- Sugiyama, Y., Watase, Y., Nagase, M., Makita, N., Yagura, S., Hirai, A. and Sugiura, M. (2005) The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol Genet Genomics*, **272**, 603-615.
- 杉山康雄. (2005) 度重なるゲノムの再編成は独特な転写・翻訳系を生み出した. *蛋白質核酸酵素*, **50**, 1786-1791.
- Sutton, C.A., Conklin, P.L., Pruitt, K.D. and Hanson, M.R. (1991) Editing of pre-mRNAs can occur before *cis* and *trans*-splicing in *Petunia* mitochondria. *Mol Cell Biol*, **11**, 4274-4277.
- Takenaka, M., Neuwirt, J. and Brennicke, A. (2004) Complex *cis*-elements determine an RNA editing site in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res*, **32**, 4137-4144.
- Takumi, S., Tomioka, M., Eto, K., Naydenov, N. and Nakamura, C. (2002) Characterization of two non-homoeologous nuclear genes encoding mitochondrial alternative oxidase in common wheat. *Genes Genet Syst*, **77**, 81-88.
- 田中寛. (2005) 葉緑体の転写装置. *蛋白質核酸酵素*, **50**, 1848-1849.
- 常脇恒一郎. (1981) 27.コムギ属における細胞質因子の遺伝的特性とその起源. *細胞質因子とその利用-プラスミド研究からの展開*- 飯野徹雄, 小関治男, 広田幸敬編. 共立出版, 289-299.
- Tsunewaki, K., Wang, G.Z. and Matsuoka, Y. (1996) Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*. 1. Production of alloplasmic common wheats and their fertilities. *Genes Genet Syst*, **71**, 293-311.
- Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. and Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*, **15**, 57-61.
- Verbitskiy, D., Takenaka, M., Neuwirt, J., van der Merwe, J.A. and Brennicke, A. (2006) Partially edited RNAs are intermediates of RNA editing in plant mitochondria. *Plant J*, **47**, 408-416.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk, H.A., Fowler, S.G. and Thomashow, M.F. (2005) Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J*, **41**, 195-211.
- Weghuber, J., Dieterich, F., Froschauer, E.M., Svidova, S. and Schweyen, R.J. (2006) Mutational analysis of functional domains in Mrs2p, the

- mitochondrial Mg²⁺ channel protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, **273**, 1198-1209.
- Wen, J.Q., Oono, K. and Imai, R. (2002) Two novel mitogen-activated protein signaling components, OsMEK1 and OsMAP1, are involved in a moderate low-temperature signaling pathway in rice. *Plant Physiol*, **129**, 1880-1891.
- Wiesenberger, G., Waldherr, M. and Schweyen, R.J. (1992) The nuclear gene MRS2 is essential for the excision of group II introns from yeast mitochondrial transcripts *in vivo*. *J Biol Chem*, **267**, 6963-6969.
- Williams, M.A., Kutcher, B.M. and Mulligan, R.M. (1998) Editing site recognition in plant mitochondria: the importance of 5'-flanking sequences. *Plant Mol Biol*, **36**, 229-237.
- Woloszynska, M., Kmiec, B., Mackiewicz, P. and Janska, H. (2006) Copy number of bean mitochondrial genes estimated by real-time PCR does not correlate with the number of gene loci and transcript levels. *Plant Mol Biol*, **61**, 1-12.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005) Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*, **10**, 88-94.
- Yang, A.J. and Mulligan, M. (1991) RNA editing intermediates of *cox2* transcripts in maize mitochondria. *Mol Cell Biol*, **11**, 4278-4281.
- Yoshida, M., Abe, J., Moriyama, M. and Kuwabara, T. (1998) Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiol Plant*, **103**, 8-16.
- 吉田みどり, 森山真久, 川上顕. (1998) 低温認識による耐凍性と病害抵抗性の発現と分化. *植物の科学調節*, **33**, 213-221.

付表1 コムギおよびイネミトコンドリア遺伝子のプローブ調製とRNAエディティング解析、およびコムギ*rps3*の単離に用いたプライマー

gene	5'→3'	number of nucleotide	Accession number of DDBJ/EMBL/GenBank data base or Fig. 20
<i>cox2</i>	P1 CCAACGCCGACGTCAAGATCAGTCT	80-104	X01108
	P2 TGGGAGCATTTTCGGGGTATAGGTCT	711-687	
	P3 AGTAGTTCGCAACTACTACCGTGG	954-930	
	P4 GTTGTTCCTGCTCCTCCTTCTTCGC	975-999	
	P5 CGCAAAAAGCTCTCCACGCCTACTC	1712-1688	
	P6 GAGTAGGCGTGGAGAGCTTTTTGCG	1688-1712	
	P7 CCCC GGTTTAGTTGGTTTGGAGGAT	2161-2137	
<i>rps3</i>	P8 CTTCGCGTCGACAAGGAAACTGTG	1260-1283	D21251
	P9 GCAGTGGAAGGGAAGGAGCCTAAA	785-808	Fig. 20 Ta
	P10 TCACCCATCACACGGCTCTCAAAC	1821-1798	
	P11 GTTCGATACGTCCACCTACGAAAC	1986-2009	
	P12 AGAAAGGAAAGAGCGATATGGTGG	2861-2838	
	P13 GTTCGCAACCCCTACTACATCTGC	4880-4857	D21251
<i>ccmFc</i>	P14 GACCACACTGAGAGACACGAAAGCG	1272-1296	AY500223
	P15 AGACCGGGGAAGTTGAGGAGAGATG	1952-1928	
<i>rpl2</i>	P16 TAGAGGTTTCATCGAGTGATGACGA	1086-1110	D78336
	P17 GAACGCAATGCGTTCTCCACTT	1647-1626	
	P18 CACGATTGGTGCTGACCACACT	2210-2222	
	P19 GTAGTGGTCGGCCTTCCCATCT	2970-2949	

付表2 コムギミトコンドリア遺伝子の定量的RT-PCRに用いたプライマー

	gene	intron	target junction	5'→3'	size of amplified product (bp)	number of nucleotide	Accession number of DDBJ /EMBL /GenBank database or Fig. 2
complex I	nad4	1	exon 1-intron 1	P20 TGTGGAAAGCCTTCGATGGCTTCC	307	554-577	X57164
				P21 GCAGAGGAAAAGCTTGATCCCAGC			
			exon 1-exon 2	P20 the above	292	1843-1820	
				P22 TCTTTGTCTCGAACCCCATACCCC			
		2	exon 2-intron 2	P23 TCATTGCCTACTCCTCAGTAGCCC	203	2268-2291	
				P24 GGACGCCTCGAATCGACGCTTTTG			
			exon 2-exon 3	P23 the above	207	5872-5849	
				P25 TCGGCATGGTGCTCACTAAACCTC			
		3	exon 3-intron 3	P26 TGATTTTAGGCGCGGCGTATTCCC	161	6011-6034	
				P27 TTTGGTAGTTCAACGGACGGTCGC			
			exon 3-exon 4	P28 CCCTGTGGCTATATAATCGTGTGG	172	6055-6078	
				P29 CTTACGGATGTATGCATGCAATCC			
	nad7	1	exon 1-intron 1	P30 GTGGAACGTGCGGAACCATATTG	169	715-739	X75036
				P31 TATCCAAAGTCAGGTAGGGCGGTTT			
			exon 1-exon 2	P32 GGAACGGGCAAATCAAGAATTTTC	158	617-639	
				P33 CTCGATTAATTTCTCAGTCCCTC			
		2	exon 2-intron 2	P34 GAGGGACTGAGAAATTAATCGAG	174	1565-1587	
				P35 GTCGTCGCCATATTCAATATGTC			
			exon 2-exon 3	P34 the above	154	3029-3007	
				P36 TATTGAGCTCGTAATGGTACCTC			
		3	exon 3-intron 3	P37 CAAAGGATTGGGGATTCAAGTGGTG	119	3371-3394	
				P38 TGCTTTTGTAGGGTCAGGCAGAAC			
			exon 3-exon 4	P37 the above	248	4615-4592	
				P39 AGGACATAGCTTACGATCATCGGC			
		4	exon 4-intron 4	P40 AGCCGATGATCGTAAGCTATGTCC	111	4591-4614	
				P41 AACCTGAGTCTCGGTTAAGAACGG			
			exon 4-exon 5	P40 the above	137	6426-6403	
				P42 GTGCTTCAACTGCGGTATAGGTAG			
complex IV	cox2		exon 1-intron	P43 GGACGGGGTATTAGTAGATCCAGCC	166	481-505	X01108
				P44 TTAGTCTCTCGACGACGGGAATGGG			
			exon 1-exon 2	P43 the above	263	1960-1936	
				P45 CTGAGGAAGGTACAGCCCAACTATG			
ribosomal protein	rps3		exon 1-intron	P46 CACGAAAAGGAAATCCAATTTTCGG	125	124-147	fig. 20 Ta
				P47 AACAAAGATCAGGAAAAGACGGAC			
			exon 1-exon 2	P46 the above	138	2000-1977	
				P48 GTGGACGTATCGAACTAAAATAAG			
cytochrome b	cyt b		exon 1-intron	P49 TTACCAACGAGCCGACTGCTGATG	208	916-939	AY500223
				P50 ACCCGGATCGAATCAGAGTTCACG			
			exon 1-exon 2	P49 the above	163	2090-2067	
				P51 CGGGACCCAAGGGCAATCGTTGAG			

付表3 イネミトコンドリア遺伝子の定量的RT-PCR及びRNAエディ
ティング解析（ダイレクトシーケンス）に用いたプライマー

	gene	intron	target junction	5'→3'	size of amplified product (bp)	number of nucleotide	Accession number of DDBJ /EMBL /GenBank da base
complex I	<i>nad1</i>	1	exon 1-intron 1	P51 TATGTTAAGTCTGGTCGCTTGGGC P52 TCCGTATATCATAGGCGACCGAAC	179	11269-11292 11447-11424	BA000029
			exon 1-exon 2	P51 the above P53 TGAGCTGCAGATCGTAATGCTCCT	183	241539-241562	
		2	exon 2-intron 2	P54 AGGAGCATTACGATCTGCAGCTCA P55 GGTTAGGGGAAGATCCGAGCGATT	123	241562-241539 241440-241463	
			exon 2-exon 3	P54 the above P56 CCATATCTGCTTTTGCCTCATGAC	130	240016-240039	
		3	exon 3-intron 3	P57 CTAGCAGAACTAATCGAGCTCCG P58 TAAGTCAGAATGAGTCCCGAGAC	147	239967-239944 239821-239844	
			exon 3-exon 4	P59 TCTAGCAGAACTAATCGAGCTC P60 AGATCATATTGGCATACTCTCCC	131	239968-239946 251361-251383	
		4	exon 4-intron 4	P61 TGGGAGAGTATGCCAATATGATC P62 TCATTGCTGTGCTTACACACTAG	188	251384-251362 251197-251219	
			exon 4-exon 5	P61 the above P63 TAAACCAGATCGAACAAGGGATC	120	315206-315228	
		1	exon 1-intron 1	P64 AGTTAGTAATGTGGTTGGCTTGG P65 TCGCACATTCATAATAGCGTTCGG	250	405425-405402 405176-405199	
			exon 1-exon 2	P64 the above P66 CGAAACACATCGAAATGGTACCAG	188	404028-404051	
		2	exon 2-intron 2	P67 TCTGAATTTTCCACGGAAGCCGCG P68 ATTGATCGGTAGTAGTCCGGTCGC	100	403860-403837 403761-403784	
			exon 2-exon 3	P67 the above P69 GATCGAAGTGGGTAGCTCCAGTAG	118	363873-363850	
		3	exon 3-intron 3	P70 TCTATGGGTCTACTGGAGCTACCC P71 GTACCACCCATCTACCCTACTAC	205	363841-363864 364045-364022	
			exon 3-exon 4	P70 the above P72 TAGAAAGGAATGCTGTACCGGGG	210	366447-366424	
		4	exon 4-intron 4	P73 TGGGTTGTGGGGCTTACTTCTAG P74 TGATTTCGGTAAGCTACGTGCCGG	142	366901-366924 367042-367019	
			exon 4-exon 5	P75 CTATTTGTTCTTCGCGCTTTGGG P76 CGACTTGTACGATCCATTGGTTC	166	366881-366904 368448-368425	
	<i>nad4</i>	1	exon 1-intron 1	P20 cf. appendix 2 P21 cf. appendix 2	307		
			exon 1-exon 2	P20 cf. appendix 2 P22 cf. appendix 2	292		
		2	exon 2-intron 2	P23 cf. appendix 2 P77 TGACGCCTCGAATCGACGCTTTTG	203	200760-20073	
			exon 2-exon 3	P23 cf. appendix 2 P25 cf. appendix 2	207		
		3	exon 3-intron 3	P26 cf. appendix 2 P27 cf. appendix 2	161		
			exon 3-exon 4	P78 CCCTTTGGCTATATAATCGTGTGG P29 cf. appendix 2	172	204362-20438	
	<i>nad5</i>	1	exon 1-intron 1	P79 TCAGAATAGCTCCATGGATCTC P80 TCCCGACATGCTATGATACC	181	20639-20660 20819-20800	BA000029
			exon 1-exon 2	P79 the above P81 TGCGGATCCTCAGACATATATG	151	21642-21621	
		2	exon 2-intron 2	P82 CTCGGGAGTCTCTTTGTAGGATAC P83 CGTGTGGGTAAATTGTGACCTCG	124	22730-22753 22853-22830	
			exon 2-exon 3	P84 ATTTCTAGTACCAACTAATTC P85 TACCTAAACCAATCATCATAT	146	22639-22659 314652-314672	
		3	exon 3-intron 3	P86 ATATGATGATTGGTTTAGGTA P87 TCTGTGACATGCTATGTT	144	314672-314652 314529-314547	
			exon 3-exon 4	P86 the above P88 ACTAAACAGAATAGGTATTAG	128	232884-232904	
		4	exon 4-intron 4	P89 ATCTCGTACACATTCGACGATTG P90 GTAGAGTCGGGTTTCCCGTTT	154	232655-232632 232502-232522	
			exon 4-exon 5	P89 the above P91 CCAAGAAGATAGAGATCCCACAT	141	231589-231612	
	<i>nad7</i>	1	exon 1-intron 1	P30 cf. appendix 2 P31 cf. appendix 2	169		
			exon 1-exon 2	P32 cf. appendix 2 P33 cf. appendix 2	158		
		2	exon 2-intron 2	P34 cf. appendix 2 P35 cf. appendix 2	174		
			exon 2-exon 3	P34 cf. appendix 2 P36 cf. appendix 2	154		
		3	exon 3-intron 3	P37 cf. appendix 2 P38 cf. appendix 2	119		
			exon 3-exon 4	P37 cf. appendix 2 P39 cf. appendix 2	248		
		4	exon 4-intron 4	P40 cf. appendix 2 P41 cf. appendix 2	111		
			exon 4-exon 5	P40 cf. appendix 2 P42 cf. appendix 2	137		

付表3の続き

	gene	target junction	5'→3'	size of amplified product (bp)	number of nucleotide	Accession number of DDBJ /EMBL /GenBank data base
complex IV	<i>cox2</i>	exon 1-intron	P43 cf. appendix 2	166		
			P44 cf. appendix 2			
		exon 1-exon 2	P43 cf. appendix 2	263		
			P45 cf. appendix 2			
ribosomal proteins	<i>rps3</i>	exon 1-intron	P46 cf. appendix 2	125		
			P47 cf. appendix 2			
		exon 1-exon 2	P46 cf. appendix 2	138		
			P92 GTGGACGTATCGAACTGAAATAAG		3367-3344	D21251
	<i>rpl2</i>	exon 1-intron	P93 ATGGAGCGTACAAAGTCGATCGTG	141	1927-1950	D78336
			P94 TTGGATACCCGCATCAGATCGAAG		2067-2044	
cytochrome <i>c</i> biogenes	<i>ccmFc</i>	exon 1-intron	P93 the above	197		
			P95 CCCTTCAACCCGACCTTTATTAC		3604-3581	
		exon 1-exon 2	P49 cf. appendix 2	208		
			P50 cf. appendix 2			
		exon 1-exon 2	P49 cf. appendix 2	163		
			P96 CGGAACCCAAAGGCAATCGTTGAG		332396-332373	BA000029

付表4 イネ核ゲノムにコードされた、スプライシング補助候補
遺伝子の定量的RT-PCRに用いたプライマー

gene		5'→3'	number of nucleotide	Accession number of DDBJ /EMBL /GenBank data base
<i>Osmrs2-1</i>	P97	CATCCTTCTATGGCGATCAGTC	882-903	AK099209
	P98	CTTCACACTGTCATGCCTACTC	1036-1015	
<i>OsnMat-1b</i>	P99	TCAGGATGTTCCATGCCACACAAG	37053-37030	AC087599
	P100	GGCAGCATATAACTTTGCCAAGGAC	36896-36920	