



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	テンサイの細胞質雄性不稔性におけるミトコンドリア遺伝子突然変異に関する研究
Author(s)	千田, 峰生; SENDA, Mineo
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 18(4), 389-436
Issue Date	1993-11-29
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12155
Type	departmental bulletin paper
File Information	18(4)_p389-436.pdf



テンサイの細胞質雄性不稔性における ミトコンドリア遺伝子突然変異に関する研究*

千 田 峰 生

(北海道大学農学部植物育種学講座)

(平成5年3月17日受理)

Studies on the Mitochondrial Gene Mutation in the Male-Sterile Cytoplasms of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.).

MINEO SENDA

(Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

目 次

第1章 緒 論	389	4. <i>atp A</i> の偽遺伝子	415
第2章 正常およびCMS系統におけるミトコンドリア 遺伝子の構成比較	391	考 察	419
緒 言	391	第5章 <i>atp 6</i> 遺伝子の構造と発現	422
材料および方法	391	緒 言	422
結果および考察	393	材料および方法	422
1. RFLP分析	393	結 果	422
2. <i>cox III</i> 遺伝子	396	1. 塩基配列	422
3. <i>cob</i> 遺伝子	397	2. CMS系統における <i>atp 6</i> の構造	422
4. <i>atp 9</i> 遺伝子	397	3. CMS型 <i>atp 6</i> の上流に見出されたORF	423
第3章 <i>cox II</i> 遺伝子の構造と発現	398	4. 転写分析	423
緒 言	398	考 察	424
材料および方法	398	第6章 総合論議	425
結 果	400	摘 要	428
1. 塩基配列	400	謝 辞	429
2. S型CMS系統における <i>cox II</i> の構造	402	引用文献	430
3. 転写分析	402	Summary	433
4. <i>Scox II</i> 上流域の相同配列	404		
考 察	406		
第4章 <i>atp A</i> 遺伝子の構造と発現	408		
緒 言	408		
材料および方法	409		
結 果	409		
1. 塩基配列	409		
2. CMS系統における <i>atp A</i> の構造	410		
3. 転写分析	411		

第1章 緒 論

花粉の発育を妨げる突然変異のうち、細胞質遺伝を示す変異を特に細胞質雄性不稔性(CMS)という。CMSはヘテロシス育種を進める上で重要な形質であり、その発現機構の解明は育種学的に大きな意義を持つ。LASERとLERSTENの総説¹⁾によれば、CMSは140を越える植物種で発見されており、不稔性の由来に基づけば、同一種内の自然集団から発見された不稔(同質細胞質型)と種内又は種属間交雑を通じて生じたもの(異質細胞質型)の2種に大別できる。CMSの発現を担い得る細胞質オルガネ

*本報は北海道大学審査学位論文の一部である。

ラゲノムとしては葉緑体又はミトコンドリアゲノムが挙げられる。トウモロコシやソルガムを中心に先ず正常系統とCMS系統間でオルガネラDNAの制限酵素分析²⁾や産生タンパク質の構成比較³⁾が行われ、CMSとミトコンドリアゲノム変異との関連性が示された。次いで、葉緑体ゲノム関与の可能性を否定する、より直接的な証拠が、体細胞雑種の解析を通じて得られた。タバコ属、アブラナ属などではCMS植物と正常植物との間でプロトプラスト融合が行われ、多数の体細胞雑種が作られている。これらの雑種の葉緑体DNA(cpDNA)を調べてみると、多くの場合、植物体が花粉不稔であるにもかかわらず、cpDNAは正常親株タイプであったり、逆にCMSタイプの葉緑体ゲノムをもつ正常型体細胞雑種の生ずる事例がしばしば見いだされた⁴⁾。このような知見が集積するにつれ、CMSの分子機構の研究は主としてミトコンドリアゲノムを標的に進められることとなった。

高等植物のミトコンドリアゲノムは哺乳動物や酵母菌のミトコンドリアゲノムに比べてサイズが大きい(200~2400 kbp)。その上、反復配列を介した分子内、分子間組換えを頻繁に起こすことによって isomer 分子やサブゲノム分子が産み出され、不均一な multi-partite 構造もたらされる^{5,6)}。ヒトのミトコンドリアゲノムは、わずか 16 kbp に過ぎず、既に全塩基配列も決定されているので、遺伝子突然変異の同定も容易である⁷⁾。一方、ヒトで使われた方法を複雑な植物ミトコンドリアゲノムにそのまま適用し、突然変異の検出に応用することは現実的でない。高等植物では、CMSにかかわるミトコンドリアDNA(mtDNA)領域を特定するための別の解析手法が工夫されてきた。例えば、トウモロコシのT型CMSにおいては、正常株とCMS株のミトコンドリアから、それぞれcDNAを調製し、これらをプローブに用いてゲノムライブラリーのスクリーニングを行うことによって、T型CMS株でのみ特異的に発現しているキメラのミトコンドリア遺伝子 *T-urf 13* が発見された⁸⁾。CMSの発現にかかわると考えられるキメラのミトコンドリア遺伝子はベチュニアのCMSでも同定された⁹⁾。先ず、正常型とCMS型のベチュニアの間でプロトプラスト融合が行われ、次いで、RFLP分析を通じてCMS親ならびにCMS型の体細胞雑種の全てに共有されているmtDNA領域が見いだされた。この領域から見

つかったキメラ遺伝子は *S-pcf* と名付けられたが、トウモロコシの *T-urf 13* と同様、複数のミトコンドリア遺伝子のコード域あるいは隣接域の一部が複雑に融合した構造を有していた。このようなキメラ遺伝子は、進化の過程でミトコンドリアゲノムが再編成を繰り返すことによって、偶然生じた新しい読み取り枠と想像される。同様のキメラ遺伝子あるいは欠損遺伝子は、その後、ハツカダイコン¹⁰⁾、ソルガム¹¹⁾、ナタネ¹²⁾等のCMS系統からも相次いで報告された。

テンサイ (*Beta vulgaris* L.)のCMSは、OWEN¹³⁾によって品種US 201集団中に発見されたものであり、同質細胞質型に属する。正常系統とS型CMS系統間で、mt, cp両DNAの制限酵素分析^{14,15,16,17,18)}やミトコンドリア産生タンパク質の比較¹⁹⁾が試みられ、CMSとミトコンドリアゲノムの構造変異との関連性が示唆された。一方、グレートウェスタン社のOLDEMEYER博士らは、米国農務省(USDA)に保存中の野生ビートから、起源を異にする6種のCMS系統を選抜した。これらはGW359由来のI-12 61Lを反復親とする戻し交雑によって同質核親系統(isonuclear line)に作られ、さらに北海道大学農学部作物育種学教室で戻し交雑が繰り返された。その内、トルコ原産野生ビートの細胞質を有するI-12CMS(2)、パキスタン産野生ビート由来のI-12CMS(3)および中国東北部由来のI-12CMS(7)が、いずれもS型CMS細胞質とは異型のCMS細胞質をもつことが検定交配に基づく遺伝解析²⁰⁾やmtDNAの制限酵素分析¹⁸⁾から明らかとなった。

本研究では、このように遺伝的に多様なCMS系統を供試して、テンサイのCMSの分子機構の解明を企てた。ただ、テンサイにおいてはプロトプラストからの植物体再分化系が未だ確立していない。従って、ベチュニアで採用されたような体細胞雑種のmtDNA解析をテンサイに適用することは難しい。一方、著者が本研究に着手した1988年当時、正常系統とCMS系統の双方よりmtDNAクローンバンクを構築し、ミトコンドリアcDNAを用いて信頼度の高いディフェレンシャルスクリーニング実験を行うことは技術的に容易でなかった。また、このようなスクリーニング実験はCMS系統でのみ発現する遺伝子の同定には極めて有効である反面、この手法によっては転写量や転写パターン異なる遺

伝子を検出し得ないことを考慮に入れねばならない。加えてトウモロコシ T 型 CMS 系統で *T-urf 13* 遺伝子の同定に成功したのは、その背景として ① T 型 CMS 系統のミトコンドリアが特異的に生産する 13 kD タンパク質が既に知られており²⁾、*T-urf 13* コードタンパク質との比較解析が可能であった、② T 型 CMS 系統の組織培養を通じて細胞質復帰突然変異に起因する稔性回復植物が得られ、これらの植物において *T-urf 13* 域の欠失が検出された²¹⁾ 等の重要な知見が集積していたことに大きく助けられたと考えてよい。同じトウモロコシでも、このような知見に乏しい C 型 CMS 系統や S 型 CMS 系統に関しては、未だに CMS 関与遺伝子が見出されていない。

本論文では、先ず他の研究機関より入手した 9 種のミトコンドリア遺伝子クローンをプローブに用いて、正常細胞質、S 型ならびに S 型とは異型の CMS 細胞質をそれぞれ有する同質核親系統に関して、RFLP 分析を試みた。得られた結果をまとめて第 2 章に述べる。次いで RFLP を示した遺伝子の中で *cox II* (シトクロム酸化酵素サブユニット II 遺伝子)、*atp A* (F_1 -ATP 合成酵素サブユニット α 遺伝子) および *atp 6* (F_0 -ATP 合成酵素サブユニット 6 遺伝子) の 3 遺伝子はノーザンブロット解析を通じて、転写パターンが正常系統と CMS 系統間で明らかに異なることが判明した。そこで、これら 3 遺伝子については正常系統と CMS 系統間で塩基配列と転写産物の詳細な比較解析を行った。第 3 章 (*cox II* 遺伝子)、第 4 章 (*atp A* 遺伝子) ならびに第 5 章 (*atp 6* 遺伝子) は、これらの解析結果をまとめたものである。また、これらの章においては、CMS 細胞質を特徴づける変異遺伝子の生起機構についても考察を加えた。

第 2 章 正常および CMS 系統におけるミトコンドリア遺伝子の構成比較

結 言

トウモロコシ²²⁾ やハツカダイコン²³⁾ では正常および CMS 系統の双方について mtDNA の物理・遺伝子地図が作成され、詳細な比較解析がなされている。そのデータによれば正常型・CMS 型両ミトコンドリアゲノム間で遺伝子の配置は著しく異なるものの、制限酵素サイト変異は稀で、塩基配列レベル

での変異は極めて小さいことがうかがわれる。事実、データベース化された植物ミトコンドリア遺伝子の塩基配列を植物種間で比較すると、若干の例外を除いて、その相同性は 90% を越える。従ってテンサイの正常および CMS 系統の mtDNA を調べる際に、テンサイ以外の植物のミトコンドリア遺伝子を heterologous なプローブとして用いて、サザンブロット分析を行ってもハイブリダイゼーションのノイズが小さく、信頼度の極めて高い RFLP 像の得られることが期待される。遺伝子によっては、このようなサザンブロット分析を用いて、多型の有無のみならず、多型サイトやその成因についての推定が可能となる場合も少なくない。

高等植物のミトコンドリア遺伝子に関しては、現在まで多くの rRNA 遺伝子、タンパク質遺伝子ならびに tRNA 遺伝子が同定され、塩基配列が決定された。本章では、まず、これらの遺伝子の内、著者らの入手し得た 9 種のミトコンドリア遺伝子クローンをプローブに用いて RFLP 分析を行った。また、テンサイのミトコンドリア遺伝子のクローン化もあわせて進め、CMS 系統においてコード域やその近傍に構造変異の生じている遺伝子の検出を試みた。

材料および方法

1. 供試材料

供試材料を Table 2-1 に示す。TK81-MS と I-12CMS(R) は S 型細胞質を有する CMS 系統である。I-12CMS(2)、I-12CMS(3) および I-12CMS(7) は野生ビート由来の CMS 細胞質を有するが、いずれも S 型とは異なり、S-2、S-3、S-4 なる記号が与えられた²⁰⁾。正常系統として TK81-MS に対する O 型 (維持花粉親) 系統 TK81-0 ならびに I-12CMS の各系統に共通する O 型系統 I-12 61L を用いた。

2. mtDNA の調製

mtDNA の抽出は MIKAMI et al¹⁶⁾ の方法を改良し、肥大根より調製した。200 g の試料に氷冷した 300 ml の緩衝液 A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EGTA, 0.44 M ショ糖, 0.1% BSA, 5 mM 2-メルカプトエタノール) を加えて磨砕し、4 重のガーゼと 2 重のミラクロスで濾過した後、濾液を 4 °C、3000 rpm (水平ローター半径 107 mm)、10

Table 2-1. List of sugar beet materials used in the experiment

Line	Fertile/Sterile	Cytoplasmic type	Cytoplasmic source
TK81-0	Fertile	N	Japanese sugar beet cultivar
TK81-MS	Sterile	S	Japanese sugar beet cultivar
I-12 61L	Fertile	N	American sugar beet cultivar
I-12CMS(R)	Sterile	S	American sugar beet cultivar
I-12CMS(2)	Sterile	S-2	Wild beet from Turkey
I-12CMS(3)	Sterile	S-3	Wild beet from Pakistan
I-12CMS(7)	Sterile	S-4	Wild beet from Manchuria

分間遠心した。上清を4℃, 15000 rpm (定角ローター, 71 mm)で15分間遠心して得た粗ミトコンドリア沈澱を緩衝液Aで再び懸濁し, MgCl₂ (終濃度10 mM)を加えて, DNase処理(終濃度50 µg/ml)を室温で1時間行った。次に緩衝液B (10 mM TES pH 7.2, 0.6 M ショ糖, 20 mM EDTA)を加え4℃, 11000 rpm (定角ローター, 71 mm)で20分間遠心後, 沈澱をさらにB液で懸濁して, 同様の遠心操作を3回繰り返してミトコンドリア沈澱を得た。TE緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA)に懸濁し, 20%ザルコシルとプロテアーゼK(終濃度100 µg/ml)を加え, 室温で1時間処理した。その後, フェノール処理で除タンパクし, CsCl₂-EtBr平衡密度勾配遠心により, RNAを除き, 精製DNAを分画した。

3. mtRNAの調製

HANSEN and MARCKER²⁴⁾の方法に従って肥大根または葉より調製した。mtDNA抽出の場合と同様の方法により単離した粗ミトコンドリア沈澱を塩酸グアニジン溶液(8 M 塩酸グアニジン, 5 mM クエン酸ナトリウム, 0.5%ザルコシル)で懸濁した。懸濁液にCsCl₂を加え(2.5 mlの懸濁液に対し1 gのCsCl₂), CsCl₂クッション(5.7 M CsCl₂, 0.1 M EDTA pH 7.5)に重層した後, 20℃, 23000 rpm (日立SRP28SAローター)で24時間遠心して, mtRNAを沈澱として分画した。

4. 制限酵素処理

1~1.5 µgのmtDNAに1~2 µl(10~20 units)の制限酵素を加え全量50 µlの反応液中で完全分解した。電気泳動は0.5~2%の水平平板アガロースゲルを用いて, 32 Vで12~16時間行った。泳動後ゲルを1 µg/ml エチジウムブロマイド液中で染色し,

254 nmの紫外線照明下で写真撮影した。

5. サザンブロット分析

制限酵素で切断したDNA断片を0.8%アガロース電気泳動で分画した後, 0.5 M NaOH-1.5 M NaCl液中に30分間浸漬し, DNA変性を行った。ゲルをトランスファー台にのせ, アルカリトランスファー液(0.25 M NaOH, 1.5 M NaCl)により一晩アルカリブロッティングを行い, 変性DNAをナイロンメンブランフィルター(Hybond N)に固定した。ハイブリダイゼーションに当たってはフィルターをあらかじめハイブリダイゼーション緩衝液(50%ホルムアミド, 50 mM リン酸ナトリウム pH 6.5, 5×SSC, 5% Irish liquor, 500 µg/mlの熱変性したニシン精子DNA)中で42℃, 2~3時間保温した後, ³²P標識したDNAプローブを加え, さらに16~20時間保温した。ハイブリダイゼーション後フィルターを2×SSCと1% SDSの混合液で65℃, 20分間ずつ2回洗浄し, さらに0.2×SSC, 1% SDSおよび0.16×SSC, 1% SDSで1回ずつ洗浄した後, X線フィルムと増感紙を用いて-80℃で1~2日感光させた。

6. ノーザンブロット分析

20 µgのmtRNAを50%ホルムアルデヒド中で65℃, 10分間熱変性し, アガロース変性ゲル(1%アガロース, 20 mM MOPS-NaOH pH 7.0, 6%ホルムアルデヒド)を用いて電気泳動した。泳動後, ゲルをトランスファー台にのせ20×SSC(3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム)により, 一晩ブロッティングを行い, RNAをナイロンメンブランフィルターに移した。フィルターを3~5分間UV照射し, RNAを固定した。ハイブリダイゼーションは, 5項のサザンブロット分析の方法に従った。

7. DNAプローブの調製

25 ng の DNA 断片に 50 ng のランダム合成プライマーを加え、95°C、5 分間で熱処理後、急冷して DNA 断片とプライマーをアニールさせた。その後、dNTP (dGTP, dATP, dTTP 終濃度 0.5 mM), DTT (終濃度 2 mM), HEPES 緩衝液 (終濃度 HEPES 90 mM, MgCl₂ 10 mM) および 25 μ Ci (約 0.9 MBq) の [α -³²P] dCTP を加え、5 ユニットの Klenow 酵素を用い、37°C、3 時間酵素反応を行った。再び熱変性し、1 本鎖に解離させてプローブとした。

8. プラスミドクローニング

mtDNA (1 μ g) と 5 μ g のプラスミドをそれぞれ適当な制限酵素で完全分解した。切断したプラスミドの 5' 末端をアルカリフォスファターゼ (BAP) で脱リン酸した。mtDNA の制限酵素断片 (100 ng) と 250 ng のプラスミド DNA を T4DNA リガーゼにより 16°C、一晚連結反応を行った後、塩化カルシウムで被感染能を賦与した大腸菌 JM 109 に加え、0°C、40 分間で静置した。次に 42°C、3 分間熱処理し、2 \times TY 液体培地 (1.6% バクトトリプトン、1% 酵母抽出物、0.5% NaCl) 中に移し、37°C で 30 分間静置培養を続けた。さらにアンピシリン (終濃度 50 μ g/ml), X-Gal (終濃度 200 μ g/ml), IPTG (終濃度 200 μ g/ml) を含む 2 \times TY 上層寒天培地 (2 \times TY, 0.8% 寒天) を用いて 37°C、一晚培養しコロニー形成させ白色コロニーを組換え体として選抜した。

9. コロニーハイブリダイゼーション

選抜した白色コロニーを 2 \times TY 寒天培地上にの

せたニトロセルロースフィルター上に移し、37°C、12 時間培養し、コロニーを形成させた。そのフィルターを 0.5 M NaOH で変性処理後、中和処理を施し真空条件下で 80°C、2 時間ベーキングを行った。ハイブリダイゼーションについては 5 項のサザンプロット分析の方法に従った。

10. プラスミド DNA の調製

組換え体コロニーを 2 \times TY 液体培地 (終濃度 50 μ g/ml アンピシリン) 中で 37°C、一晚振盪培養した。8000 rpm で 5 分間遠心し、集菌した後上清を捨て、沈澱をグルコース緩衝液 (50 mM グルコース、25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) で懸濁した。2 倍量のアルカリ SDS 溶液 (0.2 M NaOH, 1% SDS) を加え、5 分間氷冷し 3M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) 溶液で中和後、水中でさらに 60 分間放置した。10000 rpm で 10 分間遠心して上清を回収し、等量のイソプロパノールを加えて -20°C に置いた。20 分後、12000 rpm で 5 分間遠心し、プラスミドまたは M13RF DNA を沈澱させた。沈澱物を TE 緩衝液に溶解し、CsCl₂-EtBr 平衡密度勾配遠心または LiCl 沈澱で RNA を除いて DNA を精製した。

結果および考察

1. RFLP 分析

テンサイの正常系統 (TK81-0, I-12 61L), S 型 (TK81-MS, I-12CMS(R)) および異型 CMS 系統 (I-12CMS(2), I-12CMS(3), I-12CMS(7)) より調製した mtDNA の Hind III, EcoR I および BamH I 分解物を用いて RFLP 分析を行った。サザンハイブリダイゼーションに供したプローブは

Table 2-2. List of gene probes used in the RFLP analysis

Gene	Product	Fragment	Source	Reference
<i>atp A</i>	Alpha subunit of F ₁ ATPase Complex	1.5 kbp EcoR I-Hind III	Pea	Morikami and Nakamura (1987)
<i>atp 6</i>	Subunit 6 of F ₀ ATPase Complex	0.7 kbp Sty I	<i>Oenothera</i>	Schuster and Brennicke (1987)
<i>atp 9</i>	Subunit 9 of F ₀ ATPase Complex	0.7 kbp Xho I-EcoRV	Pea	Morikami and Nakamura (1987)
<i>cox I</i>	Cytochrome oxidase subunit I	1.6 kbp EcoR I	Sugar beet	Senda et al. (1991)
<i>cox II</i>	Cytochrome oxidase subunit II	0.4 kbp Sal I-Hind III	Sugar beet	Senda et al. (1991)
<i>cox III</i>	Cytochrome oxidase subunit III	1.1 kbp EcoR I-Pst I	<i>Oenothera</i>	Hiesel et al. (1987)
<i>cob</i>	Apocytochrome b	1.4 kbp EcoR I	Wheat	Boer et al. (1985)
<i>rrn 26</i>	26S rRNA	4.4 kbp Sal I	Pea	Huh and Gray (1982)
<i>rrn 18</i>	18S rRNA	2.6 kbp BamH I	Pea	Huh and Gray (1982)

Table 2-3. Restriction fragment length polymorphisms detected in the normal and CMS lines. Fragment sizes are indicated in kbp

Gene probe	Line	DNA fragments hybridized with gene probe		
		BamH I	EcoR I	Hind III
<i>atp A</i>	TK81-O	3.6, 3.1	1.8	3.7
	I-12 61L	3.6, 3.1	1.8	3.7
	TK81-MS	5.0, 3.6	1.8	2.7
	I-12CMS(R)	5.0, 3.6	1.8	2.7
	I-12CMS(2)	20.0, 10.5, 3.1	1.8	6.0
	I-12CMS(3)	20.0, 10.5, 3.1	1.8	6.0
	I-12CMS(7)	20.0, 10.5, 3.1	1.8	6.0
<i>atp 6</i>	TK81-O	28.5, 26.5	4.2	4.2, 1.4
	I-12 61L	28.5, 26.5	4.2	4.2, 1.4
	TK81-MS	7.4	3.2	4.2, 0.5
	I-12CMS(R)	7.4	3.2	4.2, 0.5
	I-12CMS(2)	7.4	3.2	4.2, 0.5
	I-12CMS(3)	7.4	3.2	4.2, 0.5
	I-12CMS(7)	7.4	3.2	4.2, 0.5
<i>atp 9</i>	TK81-O	6.5	1.1	10.2
	I-12 61L	6.5	1.1	10.2
	TK81-MS	6.5	1.1	7.2
	I-12CMS(R)	6.5	1.1	7.2
	I-12CMS(2)	6.5	1.1	10.2
	I-12CMS(3)	6.5	1.1	10.2
	I-12CMS(7)	6.5	1.1	10.2
<i>cox I</i>	TK81-O	2.4	1.6	7.2
	I-12 61L	2.4	1.6	7.2
	TK81-MS	2.4	1.6	7.2
	I-12CMS(R)	2.4	1.6	7.2
	I-12CMS(2)	2.4	1.6	7.2
	I-12CMS(3)	2.4	1.6	7.2
	I-12CMS(7)	2.4	1.6	7.2
<i>cox II</i>	TK81-O	1.8	2.1	5.2
	I-12 61L	1.8	2.1	5.2
	TK81-MS	1.8, 3.2	1.7, 2.1	6.9, 7.4
	I-12CMS(R)	1.8, 3.2	1.7, 2.1	6.9, 7.4
	I-12CMS(2)	1.8	2.1	5.2
	I-12CMS(3)	1.8	2.1	5.2
	I-12CMS(7)	1.8	2.1	5.2
<i>cox III</i>	TK81-O	9.0	5.2	3.7
	I-12 61L	9.0	5.2	3.7
	TK81-MS	7.0	5.2	3.7
	I-12CMS(R)	7.0	5.2	3.7
	I-12CMS(2)	9.0	5.2	3.7
	I-12CMS(3)	9.0	5.2	3.7
	I-12CMS(7)	9.0	5.2	3.7

Table 2-3. Continued

Gene probe	Line	DNA fragments hybridized with gene probe		
		BamH I	EcoR I	Hind III
<i>cob</i>	TK81-O	15.0	2.1	2.3, 0.7
	I-12 61L	15.0	2.1	2.3, 0.7
	TK81-MS	23.5	2.1	3.2, 0.7
	I-12CMS(R)	23.5	2.1	3.2, 0.7
	I-12CMS(2)	15.0	2.1	2.3, 0.7
	I-12CMS(3)	15.0	2.1	2.3, 0.7
	I-12CMS(7)	15.0	2.1	2.3, 0.7
<i>rrn 26</i>	TK81-O	26.5, 20.5, 8.2	2.1	2.4
	I-12 61L	26.5, 20.5, 8.2	2.1	2.4
	TK81-MS	25.0, 23.5, 14.5	2.1	2.4
	I-12CMS(R)	25.0, 23.5, 14.5	2.1	2.4
	I-12CMS(2)	26.5, 22.0, 14.5, 7.8	2.1	2.4
	I-12CMS(3)	28.0, 25.0, 14.5	2.1	5.2
	I-12CMS(7)	28.0, 25.0, 14.5	2.1	5.2
<i>rrn 18</i>	TK81-O	5.7	11.5	4.3
	I-12 61L	5.7	11.5	4.3
	TK81-MS	5.7	11.5	4.3
	I-12CMS(R)	5.7	11.5	4.3
	I-12CMS(2)	5.7	11.5	4.3
	I-12CMS(3)	5.7	11.5	4.3
	I-12CMS(7)	5.7	11.5	4.3

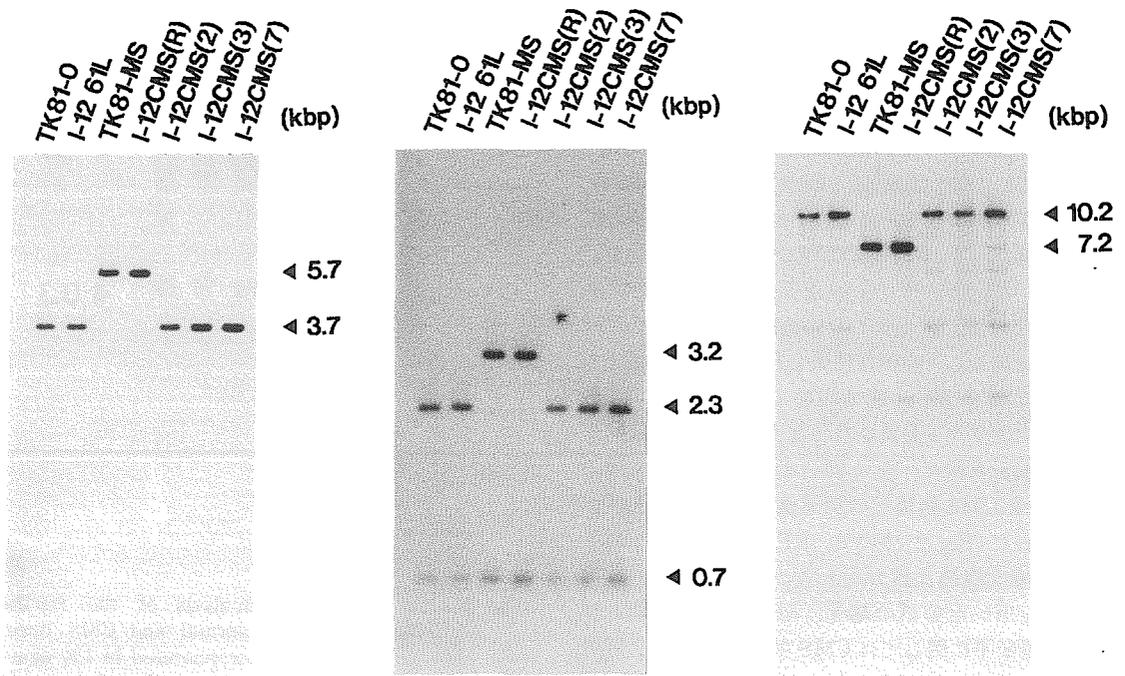


Fig. 2-1 Southern blot analysis of mtDNAs from the normal and CMS lines. MtDNA was digested with Hind III and electrophoresed in 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a Nylon membrane filter and hybridized with radiolabeled probes. The probes were *cox III*, *cob* and *atp 9* (see Table 2-2). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

atp A, *atp 6* 等9種のミトコンドリア遺伝子クローンである (Table 2-2)。Table 2-3 に示すように *cox I* と *rrn 18* を除く7種の遺伝子プローブを用いた分析において RFLP が検出された。例えば *atp 6* プローブによる RFLP 像は正常型と CMS 型の2型に群別される (Table 2-3, Fig. 5-1)。*atp A* や *rrn 26* をプローブにした場合には, I-12CMS (2), (3) および (7) の異型 CMS 系統を正常系統や S 型 CMS 系統から区別し得る多型が見出された (Table 2-3, Fig. 4-1)。また他の4プローブ (*cox II*, *cox III*, *cob* および *atp 9*) による分析においては S 型 CMS 系統でのみ多型が検出された (Table 2-3, Figs. 2-1, 3-3)。

RFLP を検出したミトコンドリア遺伝子についてその多型断片をクローン化し制限酵素切断地図を作成した。正常系統として TK81-O, S 型 CMS 系統として TK81-MS, また異型 CMS 系統として I-12CMS(2) を選び, それぞれの mtDNA を分析に用いた。トウモロコシやコムギ等, 他の植物ミトコンドリア遺伝子の情報を参照すると *cox II*, *cox III*, *atp A* ならびに *atp 9* については読み取り枠内に Hind III サイトの存在する可能性が少ない。そのため, これらの4遺伝子に関しては Hind III 断片をクローン化した。一方, *atp 6* はコード域内に Hind III サイト, *cob* には Hind III, EcoRI および BamHI サイトの含まれる可能性が高いので, *atp 6* については EcoRI 断片, *cob* は EcoRI と Hind III の両断片をそれぞれクローン化し, 構造解析に供した。なお, *rrn 26* については Hind III, EcoRI, BamHI サイトが遺伝子内に多数存在するのみならず, テンサイでは *rrn 26* を介して相同組換えを起こし, 複雑な構造を有するため, プラスミドによるクローンは容易でない^{25,26}。しかもノーザンプロット分析を行ったところ, 正常系統および CMS 系統で, 全く同一の転写物が得られ, *rrn 26* と CMS 発現との関連性は極めて小さいと考えられた (Fig. 2-2) ので, RFLP 解析を行うに止め, 詳細な構造比較は行わなかった。クローン化 DNA を用いた分析の結果, *cox II*, *atp A* および *atp 6* 遺伝子に関しては CMS 系統に特徴的な構造変異が遺伝子近傍に見出されたので, 塩基配列の決定と詳しい転写分析を進めた。それらのデータについては, 章をあらためて論議する事とし, ここでは *cox III*, *cob* および *atp 9* 遺伝子の解析結果を述べ

る。

2. *cox III* 遺伝子

TK81-0 と TK81-MS より *cox III* プローブと分子雑種を形成する 3.7 kbp および 5.7 kbp Hind III 断片を pUC プラスミドにクローン化し, 制限酵素切断地図を作った (Fig. 2-3)。*cox III* については既にマツヨイグサ²⁷, トウモロコシ²⁸, ダイズ²⁹, ソラマメ³⁰, ヒマワリ³¹, コムギ³², ならびにイネ³³ で塩基配列が報告されており, いずれもコード域内に Nco I, Pvu II サイトが約 700 bp 隔たって存在

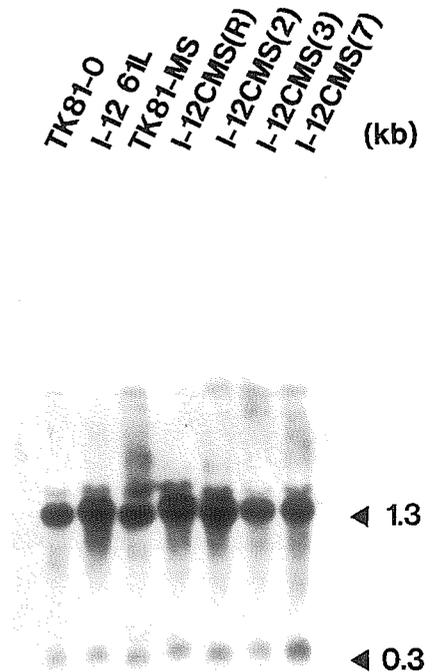


Fig. 2-2 Northern blot analysis of the *rrn 26* locus from the normal and CMS lines. MtRNA was electrophoresed in 1% agarose-formamide gel, transferred onto a Nylon membrane filter, and hybridized with the pea *rrn 26* probe (see Table 2-2). Sizes of transcripts are indicated in kb.

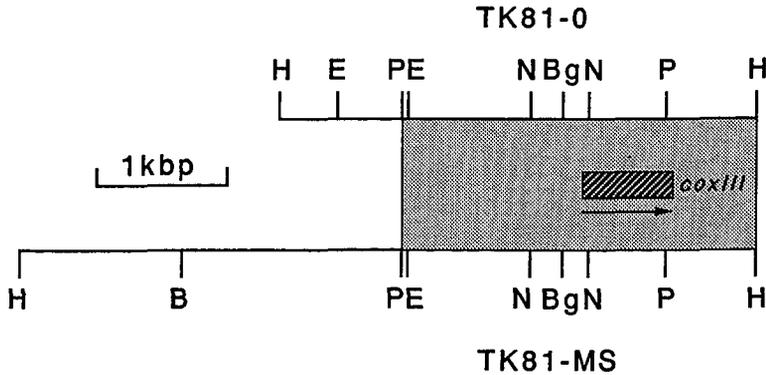


Fig. 2-3 Restriction maps of the mtDNA regions containing *cox III* gene from TK81-0 and TK81-MS. The hatched box represents the coding region. The polarity of transcription is indicated by horizontal arrow. Homologous region between TK81-0 and TK81-MS mtDNAs is also indicated by stippled region. Restriction sites are B, BamH I; Bg, Bgl II; E, EcoR I; H, Hind III; N, Nco I; and P, Pvu II.

する。Fig. 2-3 に示すようにテンサイ *cox III* においても両制限サイトは保存されている。以上のデータに基づけば、S型ゲノム(TK81-MS)の構造変異部位は *cox III* の読み取り枠より 1500~2000 bp 上流にあると考えられる。

3. cob 遺伝子

cob 遺伝子の塩基配列はトウモロコシ³⁴⁾、コムギ³⁵⁾、マツヨイグサ³⁶⁾ならびにイネ³⁷⁾で決定された。いずれにおいてもコード域内に、Hind III サイ

トと EcoR I サイトが保存されており、両サイトは約 700 bp 隔たっている。コムギ *cob* では、さらに終止コドン付近に BamH I サイトが存在するが、他の植物にはみられない。これらのデータを参考にして、テンサイ TK81-0 の 2.1 kbp EcoR I および 2.3 kbp Hind III クローンならびに TK81-MS の 2.1 kbp EcoR I および 3.2 kbp Hind III クローンに *cob* ORF の推定領域をマッピングした (Fig. 2-4)。構造変異は *cob* の 3' 下流 700 bp~1200 bp の部位で起こっていると推定される。

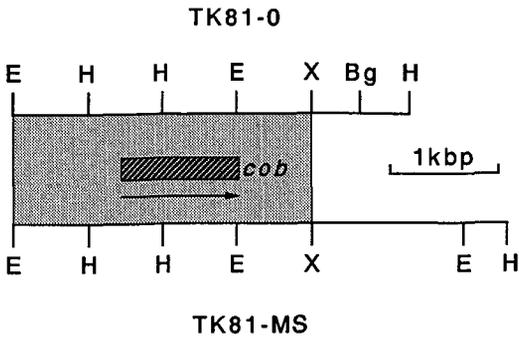


Fig. 2-4 Restriction maps of the mtDNA regions containing *cob* gene from TK81-0 and TK81-MS. The hatched box represents the coding region. The polarity of transcription is indicated by horizontal arrow. Homologous region between TK81-0 and TK81-MS mtDNAs is also indicated by stippled region. Restriction sites are Bg, Bgl II; E, EcoR I; H, Hind III; and X, Xho I.

4. atp 9 遺伝子

atp 9 は制限酵素分析に汎用される酵素の切断サイトをコード域内に有していないので、Fig. 2-5 に示すテンサイクローンの物理地図より直接 *atp 9* ORF の位置を推定することは困難であった。そこで、エンドウ *atp 9* プローブを用いたサザンブロット分析を通じて、クローン内の *atp 9* とハイブリダイズする領域を特定したところ、BamH I-Xho I (2600 bp) 領域に *atp 9* の存在することが明らかになった。また、XUE et al.³⁸⁾ はテンサイ正常系統(I 13M4)における *atp 9* の塩基配列を報告しており、このデータを参考にすれば、*atp 9* は BamH I サイトから約 350 bp 離れて位置することになる。したがって、S型ゲノムを特徴づける構造変異部位は *atp 9* の 5' 上流 1000~2400 bp の間にあるとみてよい (Fig. 2-5)。

これら 3 遺伝子については構造変異部位が読み取

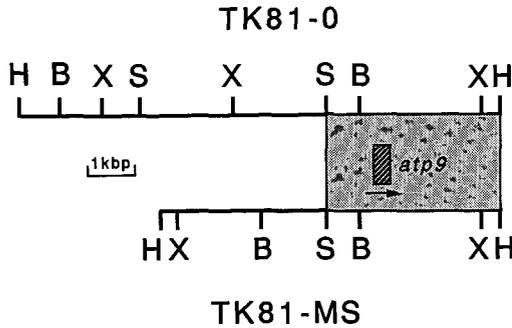


Fig. 2-5 Restriction maps of the mtDNA regions containing *atp 9* gene from TK81-0 and TK81-MS. The hatched box represents the coding region. The polarity of transcription is indicated by horizontal arrow. Homologous region between TK81-0 and TK81-MS mtDNAs is also indicated by stippled region. Restriction sites are B, BamHI; H, Hind III; S, Sma I; and X, Xho I.

り枠から大きく隔たっており、CMS発現との関連は少ないと考えられる。

第3章 *cox II* 遺伝子の構造と発現

緒 言

シトクロム酸化酵素はミトコンドリア内膜に結合し、電子伝達系の末端酸化を担う重要な酵素である。この酵素は核およびミトコンドリアゲノムにそれぞれコードされるサブユニットの会合体でありミトコンドリアゲノムにはサブユニット I, II, III の遺伝子(*cox I*, *cox II*, *cox III*)が含まれる。*cox II* は、トウモロコシ³⁹⁾で塩基配列が決定されて以来、マツヨイグサ⁴⁰⁾、コムギ⁴¹⁾、イネ⁴²⁾、エンドウ⁴³⁾、ダイズ⁴⁴⁾、ペチュニア⁴⁵⁾、ニンジン⁴⁶⁾において相次いで遺伝子構造が決定され、ミトコンドリア遺伝子の構造的特徴や進化を探る上から有益な知見が累積している。

一方、*cox II* の相同域がミトコンドリアゲノム内に反復して存在することが、コムギ⁴¹⁾等で知られており、*cox II* を介したゲノム再編成の可能性が示唆されている。特にペチュニア CMS 系統⁹⁾やトウモロコシ C 型 CMS 系統⁴⁷⁾では、CMS 発現に関与すると考えられるキメラ遺伝子が *cox II* 配列の一部を含んでおり、CMS 遺伝子成立の機構を考察する上で、きわめて興味深い。本章ではテンサイの正

常系統と S 型 CMS 系統より *cox II* 遺伝子を単離し、その分子構造と転写機構を比較解析した。

材料および方法

1. 供試材料

供試材料は、テンサイ正常系統 (TK81-0, I-12 61L), 5 種の CMS 系統 (TK81-MS, I-12CMS (R), I-12CMS(2), I-12CMS(3), I-12CMS(7)) に加え、Table 3-1 に示す、フダンソウ 15 品種、テーブルビート 8 品種ならびに飼料ビート 3 品種と *B. maritima*, *B. adanensis*, *B. trigyna* の 3 野生種を用いた。mtDNA の調製、サザンブロット分析、プラスミドクローニング、mtRNA の調製およびノーザンブロット分析の手法は第 2 章に詳述した。

Table 3-1. List of spinach beet, table beet and fodder beet genotypes used in RFLP analysis

Subspecies	English name	Name of variety
<i>cicla</i>	Spinach beet	KM-1
		MD-1
		NS-1
		Sc-1
		YS-1
		YS-2
		Akane kyona
		Hirakuki seiyo ohbakyona
		Miyazaki zairai
		Natsuna
		Nihon hudansou
		Seiyo hudansou
		Shirokuki hudanna
Shirokuki seiyo ohbakyona		
<i>esculenta</i>	Table beet	Swiss chard
		Boltardy
		Detroit dark red
		Nero
		Rubidus
		New globe
		Egyptian flat luxor
<i>rapa</i>	Fodder beet	Monopoly
		Motora
		MEKA
		M. G. M
		Sugar mangold

2. total DNA の調製

約 10 g の成葉を液体窒素中で粉末状にし 10 ml の緩衝液 C (0.35 M ショ糖, 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) と 10 ml の緩衝液 D (緩衝液 C, 2% ザルコシル, 40 mM EDTA pH 8.0) を加え、室温で 60 分間放置した。その後、20 ml のフェノール飽和溶液 (0.5 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.0) を加えて、3000 rpm (水平ローター半径 107 mm) で 10 分間遠心し、上層を回収し、フェノール抽出を繰り返した。等量のイソプロパノールおよび 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム pH 7.0 を加えて、 -20°C に 20 分間置き、12000 rpm で 10 分間 (定角ローター, 71 mm) 遠心して、DNA を沈澱させた。沈澱を TE 緩衝液に溶解し CsCl₂-EtBr 平衡密度勾配遠心法により RNA を除き、精製 DNA を得た。

3. M13 をベクターに用いた DNA クローニング

ライゲーション反応および被感染能菌の熱処理までは、プラスミドクローニングと同様に行った。次に、増殖中の大腸菌、X-Gal, IPTG を H 上層寒天培地 (1% パクトトリプトン, 0.8% NaCl, 0.8% 寒天) に加え、 37°C 、12 時間培養し、透明ブラックを組換え体として選抜した。

4. M13 RF DNA および 1 本鎖 DNA の調製

M13 RF DNA の調製については、第 2 章 10 項のプラスミド DNA の調製法に従った。また、M13 1 本鎖 DNA の調製は、まず、M13 を含む大腸菌培養液 1 ml をサンプリングチューブに移し 8000 rpm で 5 分間遠心した後、上清を他のチューブに移した。20% PEG/2M NaCl を 200 μl 加えよく混合し、室温で 15 分間静置した後に 8000 rpm, 5 分間遠心して M13 を沈澱させた。沈澱を TE 緩衝液に溶解し、等量の TE 飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えて除タンパクを行い、上層をエタノール沈澱した。沈澱を適量の TE 緩衝液に溶解し、1 本鎖 DNA 標品を得た。

5. 塩基配列決定法

Sequenase^R Ver. 2.0 キット (United States Biochemical Corporation) のプロトコールに従い、ジデオキシヌクレオチド法により塩基配列を決定した。M13 から調製した 1 本鎖 DNA 溶液 7 μl (1~2

μg) に M4 プライマー (-40 プライマー) 1 μl (0.5 pmol) および Sequenase 緩衝液 (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl) 2 μl を加え、 65°C 2 分間加温した後、徐々に冷却してアニーリングさせた。次に、dNTP (dGTP, dATP, dTTP 各 1.5 μM) 混合液 2.5 μl , 0.1 M DTT 1 μl および 10 μCi (0.37 MBq) の [α -³²P] dCTP を加え、T7 DNA ポリメラーゼ (Sequenase) を用いて、 37°C 、5 分間でラベリング反応を行った。別のチューブに ddGTP 混合液 (8 μM ddGTP, 80 μM dGTP, 80 μM dATP, 80 μM dTTP, 80 μM dCTP, 50 mM NaCl), ddATP 混合液, ddTTP 混合液, ddCTP 混合液をそれぞれ 2.5 μl 入れておき、反応終了後、反応液のうち 3.5 μl を各チューブに移して、 37°C 、30 分間ターミネーション反応を行った。さらに反応停止溶液 (95% ホルムアミド, 20 mM EDTA, 0.05% BPB, 0.05% XC) を 4 μl 加えて混合し、 75°C ~ 80°C で 2 分間加温した後、2~3 μl を 5% ポリアクリルアミド変性ゲルで電気泳動した。泳動後、ゲルを真空乾燥し、X 線フィルムに感光させてシークエンスラダーを得た。塩基配列の検索と解析には GENETYX プログラム (ソフトウェア開発 KK) を使用した。

6. RNase プロテクション分析

Trans Probe Kit (ファルマシア) のプロトコールに従い、目的の DNA 断片を挿入した Bluescript より、RNA プローブを作成した。まず、挿入 DNA の 3' 側を適当な制限酵素で切断した Bluescript を鋳型に T3 または T7 RNA ポリメラーゼを用いて、 15°C で 1 時間 RNA 合成反応を行い、RNA プローブを合成した。次に、RPA II キット (Ambion, USA) のプロトコールに準拠し、前述の RNA プローブを用いて、RNA プロテクション分析を行った。まず、20 μg の mtRNA に 5×10^5 cpm の RNA プローブを加え、ハイブリダイゼーション溶液 (80% ホルムアミド, 40 mM PIPES pH 6.4, 450 mM NaOAc pH 6.4, 1 mM EDTA) 中で、一晩 45°C でハイブリダイゼーション反応を続けた後、RNase で 37°C 、30 分間処理した。RNase を失活させてから、2 本鎖 RNA を熱変性し、6% ポリアクリルアミド変性ゲルを用いて、電気泳動を行った。

結 果

1. 塩基配列

正常系統(TK81-0)の *cox II* について塩基配列を

決定した。Fig. 3-1 に示すように、タンパク質コード領域は 2243 bp からなり、1463 bp のイントロンによって、382 bp の 5' エキソンと 398 bp の 3' エキソンに分断される。ペチュニア *cox II*⁴⁵⁾ と比較す

1	AA	CCCAACCGGT	GATTTCTGAC	AAGTCTTTCT	TCATTTCTCG	AGAGAGCGGA	GCAGTCA	AAG	AATGAACCAA	-1											
2&3	CC	TGAATTGGGA	GAGCAAGAAT	C		A				-1											
	M	I	V	R	E	W	L	F	F	T	M	A	P	C	D	A	A	E	P	W	
1,2&3	ATG	ATT	GTT	CGA	GAA	TGG	CTA	TTC	TTC	ACA	ATG	GCT	CCT	TGT	GAT	GCA	GCG	GAA	CCA	TGG	60
	Q	L	G	F	Q	D	A	A	T	P	M	M	Q	G	I	I	D	L	H	H	
1,2&3	CAA	TTA	GGA	TTT	CAA	GAC	GCA	GCA	ACA	CCT	ATG	ATG	CAA	GGA	ATA	ATC	GAC	TTA	CAT	CAT	120
	D	I	F	F	F	L	I	L	I	L	V	F	V	S	W	I	L	V	R	A	
1,2&3	GAT	ATC	TTT	TTC	TTC	CTC	ATT	CTT	ATT	TTG	GTT	TTC	GTA	TCA	TGG	ATC	TTG	GTT	CGC	GCT	180
	L	W	H	F	H	Y	K	K	N	P	I	P	Q	R	I	V	H	G	T	T	
1,2&3	TTA	TGG	CAT	TTC	CAC	TAT	AAA	AAA	AAT	CCA	ATC	CCG	CAA	AGG	ATT	GTT	CAT	GGA	ACT	ACT	240
	I	E	I	I	R	T	I	F	P	S	I	I	L	M	F	I	A	I	P	S	
1,2&3	ATC	GAG	ATT	ATT	CGG	ACC	ATC	TTT	CCC	AGT	ATC	ATC	CTG	ATG	TTC	ATT	GCT	ATA	CCA	TCA	300
	F	A	L	L	Y	S	M	D	E	V	V	V	D	P	A	I	T	I	K	A	
1,2&3	TTT	GCT	CTG	TTA	TAC	TCA	ATG	GAC	GAG	GTA	GTA	GTA	GAT	CCA	GCC	ATT	ATC	AAA	GCT	360	
	I	G	H	Q	W	Y	R	T	Y	E	Y	S	D	Y	N	S	S	D	E	Q	
1,2&3	ATT	GGA	CAT	CAA	TGG	TAT	CGG	ACT	TAT	GAG	TAT	TCG	GAC	TAT	AAC	AGT	TCC	GAT	GAA	CAG	18&3
	S	L	T	F	D	S	Y	T	I	P	E	D	D	P	E	L	G	Q	S	R	
1,2&3	TCA	CTC	ACT	TTT	GAC	AGT	TAT	ACG	ATT	CCA	GAA	GAT	GAT	CCA	GAA	TTG	GGT	CAA	TCA	CGT	1943
	L	L	E	V	D	N	R	V	V	V	P	A	K	T	H	I	R	I	I	V	
1,2&3	TTA	TTA	GAA	DG	GAC	AAT	AGA	GTG	GTT	GTA	CCA	GCC	AAA	ACT	CAT	ATA	CGT	ATT	ATT	GTA	2003
	T	S	A	D	V	L	H	S	W	A	V	P	S	S	G	V	K	C	D	A	
1&2	ACA	TCC	GCT	GAT	GTA	CTT	CAT	AGT	TGG	GCT	GTA	CCT	TCC	TCA	GGT	GTC	AAA	TGT	GAT	GCT	2063
3														TT	ATG	ACA	ACA	GGT	GGA	ACA	2063
	V	P	G	R	L	N	Q	T	S	I	L	V	Q	R	E	G	V	Y	Y	G	
1&2	GTA	CCT	GGT	CGT	TTA	AAT	CAG	ACC	TCT	ATT	TTG	GTA	CAA	CGA	GAA	GGA	GTT	TAC	TAT	GGT	2123
3	AGT	GAA	ATA	GCT	GGT	TCG	TGG	TCC	GAT	ACC	TGG	ATT	GAT	GCC	TTT	TAT	GCC	CCC	GCA	GCG	2123
	S	E	I	A	G	S	W	S	D	T	W	I	D	A	F	Y	G	P	A	A	
	Q	C	S	E	I	C	G	T	N	H	A	F	M	P	I	V	V	E	A	V	
1&2	CAG	TGC	AGT	GAA	ATT	TGT	GGA	ACT	AAT	CAT	GCT	TTT	ATG	CCT	ATC	GTC	GTA	GAA	GCT	GTT	2183
3	GGG	GGC	GAA	GGC	GAA	GGG	GAA	AAG	GAT	ACA	GGT	ACT	TCA	GGT	GAA	GCC	AGT	GAA	GTA	2183	
	G	G	E	G	E	G	E	K	D	T	G	T	S	G	G	E	A	S	E	V	
	S	R	K	D	Y	G	S	R	V	S	N	Q	L	I	P	Q	T	G	E	A	
1&2	TCT	AGG	AAA	GAT	TAT	GGT	TCT	CGG	GTA	TCT	AAT	CAA	TTA	ATC	CCC	CAA	ACC	GGG	GAA	GCT	2243
3	CCT	GCT	CCT	CCT	CAG	GAT	CAG	GGG	GCG	CTA	CCT	GGT	CAA	GAA	GAG	GGT	AGG	GTA	GCA	TCT	2243
	P	A	P	P	Q	D	Q	G	A	L	P	G	Q	E	E	G	R	V	A	S	
	TAA	CGCGAAATGA	AAGAATAGGG	TGAAGAAGAG	AAGCCGCTAA	GAAGCTTCGC	TCGCTCGCTC	TAACGCTCG													
1&2	GCT	CCG	CCT	CAG	GAT	CAG	GGG	GCG	CTA	CCT	GGT	CAA	GAA	GAG	GGT	AGG	GTA	GCA	CCT	TCT	2303
3	A	P	P	Q	D	Q	G	A	L	P	G	Q	E	E	G	R	V	A	P	S	
	GTA	GCT	GAC	GTC	CGA	CAG	GAG	TTA	GAC	AGC	TTT	GTC	TCT	TCA	TTT	AAT	AAA	ATA	GCG	ATG	
3	V	A	D	V	R	Q	E	L	D	S	F	V	S	S	F	N	K	I	A	M	
	AGG	TCG	GAT	CGC	CTC	ATC	GCT	ATT	GGA	GAC	AGG	TTG	TCC	CTG	GAA	ACG	GCA	ACA	GCG	GAA	
3	R	S	D	R	L	I	A	I	G	D	R	L	S	L	E	T	A	T	A	E	
	AAA	AGA	GCC	AAA	ATC	CTG	GAG	GGG	ATG	CGC	CAT	ATT	GCA	TCC	TTA	GAG	GGG	GCA	ACC	CBA	
3	K	R	A	K	I	L	E	G	M	R	H	I	A	S	L	E	G	A	T	R	
	CCG	AAA	TCC	GGG	ACA	AAG	GCC	GCT	GAC	GCC	TTG	ATC	CGC	TTT	GTT	CGG	GCA	TGG	GAG	GAA	
3	P	K	S	G	T	K	A	A	D	A	L	I	R	F	V	R	A	W	E	E	
	GGT	TGA	TTCAACCAAC	CCATTACTGC	TACGTAGGCG	CGATCGGGCC	GTTGACAGACA	CTTAAGCATG	GTTAG												
3	G	*																		2614	

Fig. 3-1 DNA sequence of the sugar beet *Ncox II*(1), *Scox II-1*(2) and *Scox II-2*(3) genes. Only sequence differences are shown. The predicted amino acid sequences are indicated above *Ncox II* and below *Scox II*. The DNA sequence was translated according to the universal genetic code. The putative ribosome-binding site is boxed. A triangle indicates the intron position. Horizontal arrows denote the repeated sequences in the *Scox II-2* 3' exon.

```

SUGAR BEET : GTGCGCCTCTTCACGAAGGTGATTTAAGTGCACGAAATGCCTTAAAGTGAATATAGTTCGCAAAGCATCTGGC
PETUNIA   :           G       A           T       G       G

SUGAR BEET : TTACTGGTAATCTCCCATTCCTCCGTCGTCGAGAGACTTTTCTAACTATAGCATGCCAGAAACGGGGAGTTGATTGA
PETUNIA   :       C           C           AA           ----

SUGAR BEET : GGTGGTTATACCTATACCCGGAATGCTCTCAACATAGGAGCCTATGGTTCCATTCTTGTGTTGCTGGAGGTAC
PETUNIA   :           G       C           C       G

SUGAR BEET : ACATCCCTCTTCTCGGTGTAGAGCGATATACGAGAAATAGATGCTCAGCCTGCAATGTCCGATAACGGCGCTGAA
PETUNIA   :           G       A

SUGAR BEET : GTAGTGAATCTAGCGGCACCATAGCAATGGCATACAACCTTTGGACCTAACGGCCGGCCAGTAACTTTTCGGAAT
PETUNIA   :           T           G       T           T

SUGAR BEET : GGGGGATCCCCGCTGGCAACAACACAGTAGTAGTTGCGGAACTACTGGCCGGGAGAGGACAATAACCTTATTG
PETUNIA   :           T           G           -CCT G -

SUGAR BEET : CCTGCTCCTCTTCTTCGCTTCGGGACGGAGGTCTACGGTAGGTAAACAGCAGGCACAAGCACCTTGACCGAAGG
PETUNIA   :           AG

SUGAR BEET : GGACCAGCGCTTCTACTCTTCCACCGCACCGAGGAGCCGCTCGCAGTGAGAAGCAAGGGATGTCGTGAACGGTGG
PETUNIA   :           C       ----- T -TT C

SUGAR BEET : GAGGTCACAGAGAATTGACCTATTCATAGAGTGATCCTATGATCGATACAGGATATGTAATCTCTC-TTTTTTTT
PETUNIA   :           AG           A C A

SUGAR BEET : TCTA---TAGTTAGG---TTAAAAAAGAAGGGTGAAGTCAACTTCTCAGCTAGAGTTGGGGATGGGACCTTTGGCA
PETUNIA   :           TTC T CT AAAA           T G

SUGAR BEET : TAATGCACGCTGGAACGTGGGAATTCGAGGTCTCATGAACGACCACTAAAAACCACTTTGTTTTGTTTTGTT-
PETUNIA   :           T T           G           T

SUGAR BEET : -----CACGATATCCGGTCAGGCCTATGGGTGGATCCTTTTAGATCTACGAG-CTTTATGCCCCGGCCGTCA
PETUNIA   : GTGGACAA           C           G C GGCCG           T

SUGAR BEET : CATGAGCATAGAAAATCTATACTCGAGCCTTCAACTGGGCCCTGACAGGATAGGTGAGGAATCACTCTGGATCT
PETUNIA   :           GG           C

SUGAR BEET : TATTTCTTAGAGCCTACAACCTTCGCCGAGCCGACTAGCATCCTTTTCCCGTGCGCATTTATCGAACAAGAAGAC
PETUNIA   : C T T - G           C A T T

SUGAR BEET : GACTATAAGATAGAATTCGCTTTTCGTTGGTGAAGTGGTCGCCATACCTTCTGCCTGTCCTATGTGTGTTGGAAC
PETUNIA   : G C           C AA --A C           TC A

SUGAR BEET : CAGGTCTTTTTCGGTTACAGCCTTCCCTCGAATACATAGGGTAGGTAGGGCTGGGTAAGAAGGGTCCCTGTT
PETUNIA   : T           C       CT           G T A T C

SUGAR BEET : GCCAATAAACTTTTCCCGTSCCTTACTTTTTTAAAGTAAGTAAGTAGACTTTTCGTCGCCATACTTATTCTCTAA
PETUNIA   : C           SCCTTACTTTTTTAAAGTAAGTAAGTAGACTTTTCGTCGCCATACTTATTCTCTAA

SUGAR BEET : GTGAATTGGCATTACCTTACTCTAAAGAGTCAGTCAATTTTCATSCCTTCCCTTCGATTCTCTTACTCATAAA
PETUNIA   : -----AAC

SUGAR BEET : GGGTCTTACGGTCGGGAGAAGTACCTAAAACCTAAAGAAAAATAGTGCTCTTTCTAAGAGTAGGCGTGGAGAGCTT
PETUNIA   :           --           T

SUGAR BEET : TTTGCGGGGAAACTTGCAAGTACAGTTTGGGGGGAGCGGGCGCTCGACCCAAC
PETUNIA   :           T
    
```

Fig. 3-2 Sequence alignment of the sugar beet *Ncox II* intron with the *Petunia* intron. Only sequence differences are shown. Dashes indicate gaps that are necessary to align the two sequences. The vertical arrows mark the 107 bp insertion sequence in the sugar beet intron. The direct repeats are boxed. Nucleotides found in *Scox II-1* and *Scox II-2* which differ from those in *Ncox II* are indicated above the *Ncox II* sequence.

るとエクソンの塩基配列は高い同一性(94.9%)を示した。一方、イントロンについては、これまでに報告されたものでは最も長く、ペチュニアのイントロン(1353 bp)との比較によれば、イントロン3'末端部に107 bpの塩基配列の挿入がみられる(Fig. 3-2)。また、開始コドンから数えて14 bp上流には、5'-AGCAGTCA-3'というシャインダルガルノ(SD)配列に似た配列³⁴⁾が存在する。

2. S型CMS系統における *cox II* の構造

第2章で述べたRFLP分析を通じて、S型CMS系統では *cox II* が2コピー存在することが明らかとなった(Fig. 3-3)。そこで両コピーをそれぞれ含むと考えられるHind III断片についてクローン化を行った。その結果、Fig. 3-4に示すように2種類のHind IIIクローン(6.9 kbp, 7.4 kbp)が得られ

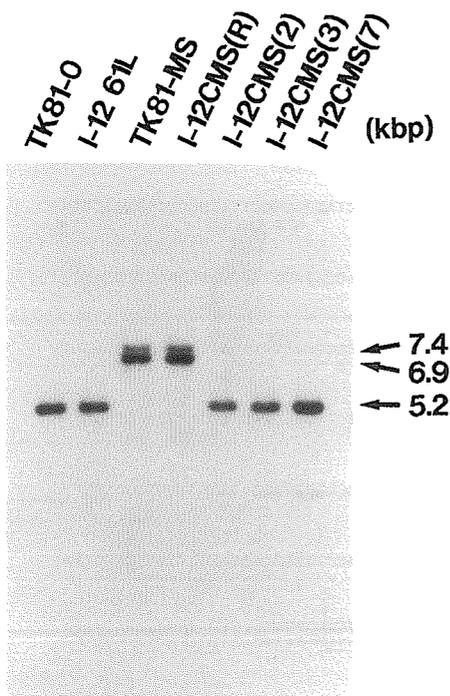


Fig. 3-3 Southern blot analysis of mtDNAs from the normal and CMS lines. MtDNA was digested with HindIII and electrophoresed in 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a Nylon membrane filter and hybridized with radiolabeled *Ncox II* probe (410 bp SalI-Hind III fragment; probe 1 shown in Fig. 3-4). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

た。両クローンとも5'領域には同一の制限酵素サイトが分布しているが、3'末端には構造差の存在することが明らかになった。6.9 kbpと7.4 kbp Hind IIIクローン中の *cox II* ORF(それぞれ *Scox II-1*, *Scox II-2*と名付ける)の塩基配列を決定したところ(Fig. 3-1), *Scox II-1*, *Scox II-2*ともに5'上流域から3'エクソンの途中まで共通の構造を示したが、*Scox II-2*では+2044の位置で構造変異を起こし、そのため *Scox II-1*よりも101コドン伸長したORFを形成している。101コドンの塩基配列についてコンピューター検索を行ったが、同一性のある遺伝子はデータベース中に見出されなかった。次に正常系統の *cox II* (*Ncox II*)との比較を試みた。*Scox II-1*はコード領域ならびに3'隣接域ともに *Ncox II*と酷似していたがイントロンに2箇所、SD様配列付近に1箇所の塩基置換がみられた(Figs. 3-1, 3-2)。さらに興味あることに *Scox II-1*, *Scox II-2*ともにATG開始コドンの上流50 bpから *Ncox II*とは全く異なる構造を有していた(Figs. 3-1, 3-4)。

3. 転写分析

正常系統(TK81-0)とS型CMS系統(TK81-MS)間で *cox II* の転写パターンを比較した。*Ncox II*の5'エクソンを含む800 bp Xho I-BamH I断片(プローブ2, Fig. 3-4)をプローブに用いて、ノーザンブロット分析を行ったところ、*Ncox II*の主要転写物のサイズは1.3 kbであったのに対して、TK81-MSでは1.6 kbに相当する主要転写産物が検出された(Fig. 3-5)。また、3'エクソンを含む410 bp Sal I-Hind III断片(プローブ1, Fig. 3-4)をプローブとした場合にも同様の結果が得られ、*cox II*の転写パターンが正常およびS型CMS系統間で相違することが確かめられた。

次に、*Scox II-1*と*Scox II-2*がともに転写されているか否かを調べるため、*Scox II-1*に特異的な領域をプローブに用いて、TK81-MSのmtRNAとハイブリダイゼーションを行った。その結果、シグナルは検出されなかった。しかし、ノーザンブロット分析よりも検出感度のすぐれたRNaseプロテクション分析法を用いて、*Scox II-2*転写物の同定を行ったところ、RNAプローブと分子雑種を形成し、RNase分解をまぬがれたバンドが確認され、少量ながら転写が行われていることが確かめられた

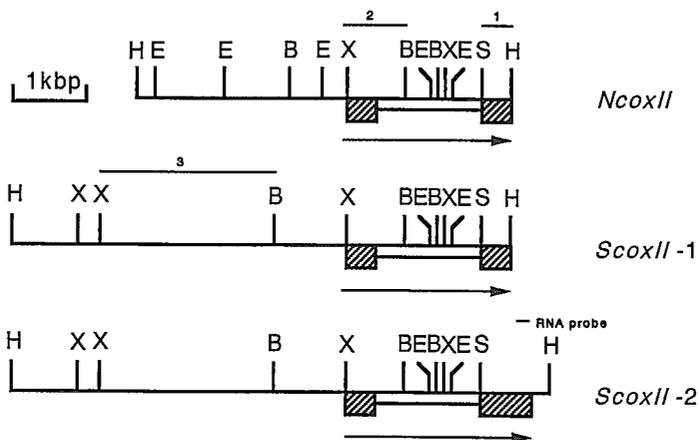


Fig. 3-4 Restriction maps of the mtDNA regions containing *cox II* gene from TK81-0 (*Ncox II*) and TK81-MS (*Scox II-1*, *Scox II-2*). The hatched boxes represent exons, while the bar shows an intron. The polarity of transcription is indicated by horizontal arrow. The location and extent of the three probe DNAs (for Southern and Northern blot analysis in Fig. 3-3, 3-5 and 3-7) and the RNA probe (for the RNase protection assay in Fig. 3-6) is indicated over the map. Restriction sites are B, BamHI; E, EcoRI; H, Hind III; S, Sal I; and X, Xho I.

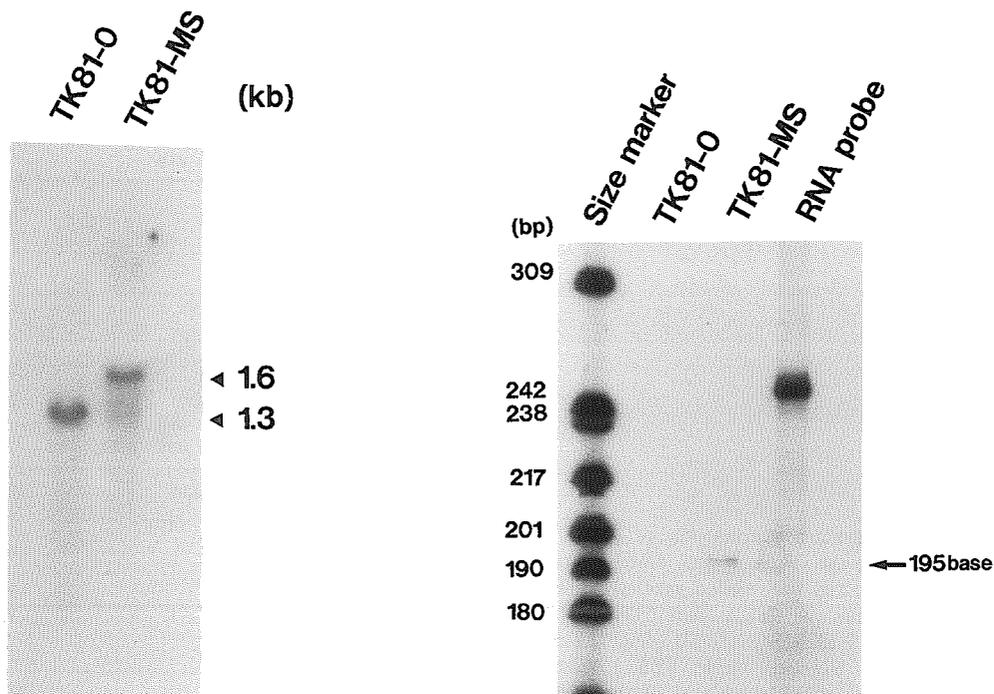


Fig. 3-5 Northern blot analysis of the *cox II* locus from the TK81-0 and TK81-MS. MtRNA was electrophoresed in 1% agarose-formamide gel, transferred onto a Nylon membrane filter, and hybridized with the *Ncox II* 5' exon probe (800 bp XhoI-BamHI fragment; probe 2 shown in Fig. 3-4). Sizes of transcripts are indicated in kb.

Fig. 3-6 RNase protection assay of *Scox II-2* transcript.

(Fig. 3-6)。

4. *Scox II* 上流域の相同配列

前項に述べたように *Scox II* 遺伝子は *Ncox II* とは異なる転写パターンを示すが、これは転写制御にかかわる 5' 上流域の構造差に起因すると想像される。著者は *Scox II* 上流域の起源を明らかにするための実験を企てた。まず、*Scox II*-1 の 5' 上流域 (2400 bp BamHI-XhoI 断片; プロブ 3, Fig. 3-4) をプロブとして、正常系統 (TK81-0, I-12 61L), S 型 (TK81-MS, I-12CMS(R)) および S 型

とは異型の CMS 系統 (I-12CMS(2), (3), (7)) の mtDNA に関する RFLP 分析を行った (Fig. 3-7)。その結果、正常系統においてはハイブリダイズするバンドが検出されず、相同領域は存在しないようである。TK81-MS mtDNA を用いた場合には *Scox II*-1, *Scox II*-2, のそれぞれを含む Hind III 断片 (6.9 kbp および 7.4 kbp) としかハイブリダイズしなかった。それに対して異型 CMS 系統である I-12CMS(2) においては、6.3 kbp Hind III 断片、また I-12CMS(3) および (7) では、6.3 kbp と 4.6 kbp の 2 本のバンドにハイブリダイゼーションシグナルが検出された。既述の RFLP 分析 (Fig. 3-3) より、異型 CMS 系統には *Ncox II* と構造の共通な *cox II*

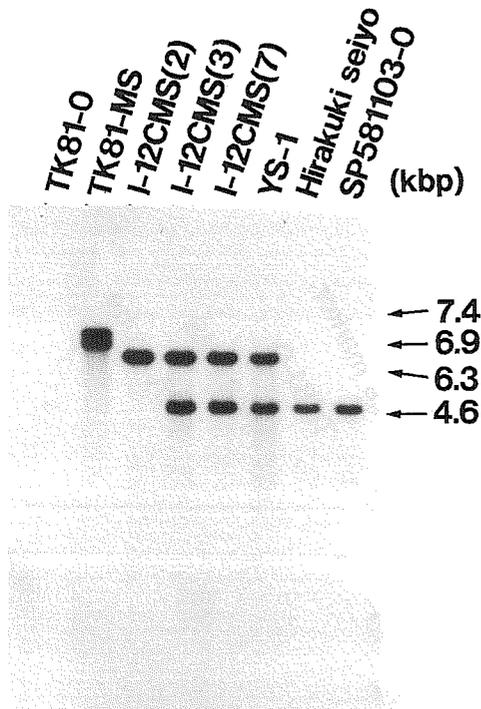


Fig. 3-7 Southern blot analysis of total DNAs from the normal and CMS sugar beet lines, and the related species. The DNA sources are; Sugar beet (TK81-0, TK81-MS, I-12CMS(2), I-12CMS(3), I-12CMS(7)), Spinach beet (YS-1, Hirakuki seiyo ohbakyona) and *B. maritima* (SP 581103-0). Total DNA was digested with Hind III and electrophoresed in 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a Nylon membrane filter and hybridized with the 5' flanking sequence of *Scox II*-1 (BamHI-XhoI 2400 bp fragment; probe 3 shown in Fig. 3-4). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

Table 3-2. Hind III fragment length polymorphisms detected in *B. vulgaris* ssp. *cicla* mitochondrial genomes. The DNA bound to a Nylon membrane filter was hybridized with the 5' flanking region of *Scox II*-1 (2400 bp XhoI-BamHI fragment; probe 3 shown in Fig. 3-4). ND indicates a non-detectable fragment. Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp

<i>B. vulgaris</i> subspecies	Name of variety	Hind III fragment size (kbp)
<i>saccharifera</i> (sugar beet)	TK81-0	ND
	TK81-MS	6.9, 7.4
	I-12CMS(2)	6.3
	I-12CMS(3)	4.6, 6.3
	I-12CMS(7)	4.6, 6.3
<i>cicla</i> (spinach beet)	Hirakuki seiyo ohbakyona	4.6
	Swiss chard	ND
	Miyazaki zairai	ND
	NS-1	ND
	MD-1	ND
	YS-2	ND
	Natsuna	ND
	KM-1	4.6, 6.3
	YS-1.	4.6, 6.3
	Sc-1	4.6, 6.3
Akane kyona	4.6, 6.3	
Shirokuki seiyo ohbakyona	4.6, 6.3	
Shirokuki hudanna	4.6, 6.3	
Nihon hudansou	4.6, 6.3	
Seiyo hudansou	4.6, 6.3	

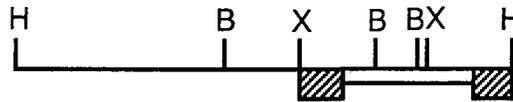
(A) HindIII 6.3kbp region (I-12CMS(2) and (3))



HindIII 4.6kbp region (I-12CMS(3))



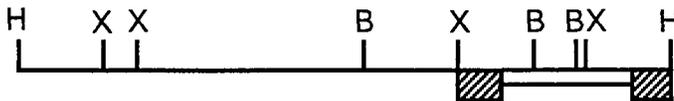
(B) I-12CMS(2) *coxII* gene



HindIII 6.3kbp region (I-12CMS(2))



ScoxII-1 (TK81-MS)



(C)

```

                XhoI                               Start
TTTCTGACAAGTCTTTCTTCATTTCCTCGAGAGAGCGCAGCAGTCAAAGAATGAACCAAATGATT
*****
GCAAGAATCAGTCTTTCTTCATTTCCTCGAGAGAGCACAGCAGTCAAAGAATGAACCAAATGCGA
    
```

Fig. 3-8 (A) Restriction maps of the 6.3 kbp-Hind III clone in I-12CMS(2) and I-12CMS(3), and the 4.6 kbp-Hind III clone in I-12CMS(3). (B) Restriction maps of the intact *cox II* clone and the 6.3 kbp-Hind III clone in I-12CMS(2), and the *Scox II-1* clone in TK81-MS. The location of 52 bp homology region (marked with the 'R') is also shown. The hatched boxes represent exons, while the bar shows an intron. Restriction sites are B, BamHI; E, EcoRI; H, Hind III; and X, Xho I. (C) Sequence alignments of the homologous portions of the *cox II* gene mitochondrial genome. The location of the ATG start codon and Xho I recognition site are also presented.

遺伝子が1コピー含まれていると想像されるが、これに加えて、*Scox II* 5' 上流の相同域が同一ゲノム中に少なくとも1箇所(I-12CMS(2))または2箇所(I-12CMS(3), (7)) 存在するようである。

そこで、I-12CMS(2)と(3)から *Scox II* 5' 域相同

断片をクローン化し、制限酵素切断地図を作成した (Fig. 3-8)。制限酵素サイトの分布に基づけば、6.3 kbp および 4.6 kbp Hind III クローンはいずれも *Scox II* の 5' 上流域と同一の構造を有すると考えられる。そのうち、6.3 kbp Hind III クローンは

cox II ORF の約 30 bp 上流に位置する Xho I サイトも保持していることが判ったので, I-12CMS(2) の 6.3 kbp クローンおよび *cox II* クローン (5.2 kbp Hind III クローン, Fig. 3-8) について Xho I サイト周辺の塩基配列を決定した。その結果, Fig. 3-8 から明らかのように ATG 開始コドン末端とする 52 bp の共通配列が見出された。

一方, CMS 系統の他に 3 種の野生種, *B. maritima* (SP581103-0), *B. adanensis* (Egypt), *B. trigyna* (SP753012-0) およびフダンソウ 9 系統についても RFLP (Fig. 3-7, Table 3-2) が検出された。すなわち, 3 種の野生種とフダンソウの 1 系統 (Hirakuki seiyo ohbakyona) では, *Scox II* 上流域プローブとハイブリダイズする Hind III 断片は 4.6 kbp 断片のみであった。これに対して, フダンソウの 8 系統 (KM-1, YS-1, Sc-1, Akane Kyona, Shirokuki seiyo ohbakyona, Shirokuki hudanna, Nihon hudansou, Seiyo hudansou) では I-12CMS(3), (7) と同様, 6.3 kbp および 4.6 kbp Hind III 断片にハイブリダイゼーションシグナルが検出され, これらのフダンソウの細胞質ゲノムと S-3, S-4 型細胞質ゲノムとの類似性が示唆される。

考 察

テンサイの正常および S 型 CMS 系統はそれぞれ 1 コピー (*Ncox II*) ならびに 2 コピー (*Scox II-1*, *Scox II-2*) の *cox II* 遺伝子を含む。塩基配列分析の結果, *Ncox II* と *Scox II* 遺伝子は開始コドンのわずか 50 bp 上流から構造が全く異なり, 転写パターンも互いに著しく相違することが判明した。先に, MOON et al.⁴³⁾ はエンドウの *cox II* に関して S1 マッピング実験を行い, 転写物の 5' 末端が開始コドンの上流 285 bp と 302 bp の位置に相当することを報告した。従って, テンサイの両系統間にみられた *cox II* 転写パターンの相違は転写調節にかかわる 5' 上流域の構造差による可能性が極めて高い。また, S 型 CMS 系統よりクローン化された *Scox II-2* 遺伝子においてはコード域の 3' 端が 101 コドン分伸長している。RNase プロテクション分析より *Scox II-2* についても僅かながら転写物が確認されており, イネの Boro 型 CMS 系統に見出された *atp 6* 遺伝子の事例⁴⁴⁾ と酷似する。こうした *Scox II* 遺伝子の 5' 上流域あるいは 3' コード域の構造変異が CMS の発現と関連するか否かは, 今回の実験結果のみでは結論できない。一方, S 型 CMS 系統における *cox II* 構造の成因については示唆的なデータを得た。

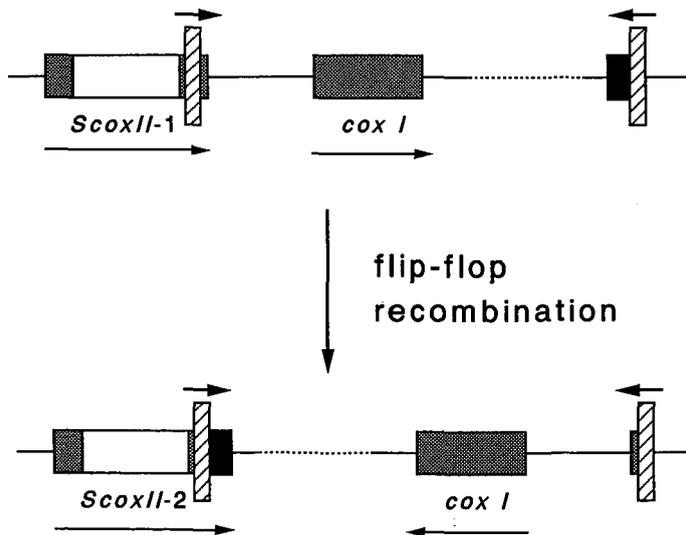


Fig. 3-9 Possible mechanism of the generation of the *Scox II-2* gene by inverted repeat (hatched box)-mediated flip-flop recombination. The orientation of the inverted repeat is shown by bold horizontal arrow. The stippled boxes represent exons, while the open boxes show introns. The polarity of transcription is indicated by horizontal arrow.

Scox II の 5' 上流域の相同配列は正常系統に見出されなかったのに対し、S-2 型 CMS 系統ではミトコンドリアゲノム中に少なくとも 1 箇所、S-3 型と S-4 型 CMS 系統では 2 箇所に含まれている。S-2 型 CMS 系統で検出された *Scox II* 5' 上流相同域をクローニングして塩基配列を決定したところ、*Ncox II* 遺伝子と 52 bp にわたる共通配列が見いだされた。S-2 型 CMS 系統には機能を有すると考えられる *cox II* 遺伝子が 1 コピー存在し、その構造は制限酵素切断地図より判断すれば *Ncox II* と同一とみなされる。また、開始コドンに続く上流域には 52 bp 共通配列も配置されていることを確かめた。従って、*Scox II*-1 は S-2 型の祖先型ミトコンドリアゲノムにおいて、intact な *cox II* 遺伝子と *Scox II* 5' 上流配列間で 52 bp 共通配列を介した組換えが生じた結果出現した可能性が高い。また S-3 および S-4 型 CMS 系統はさらに 1 箇所の *Scox*

II 5' 上流域を含んでいるが、この領域には *Ncox II* との 52 bp 共通配列は見出されなかった。S-3 型や S-4 型 CMS 系統に固有の *Scox II* 5' 上流相同配列はフダンソウと 3 種の野生種 *B. maritima*, *B. adanensis* および *B. trigyna* にも共通に存在する。しかもフダンソウにおいては、S-3 および S-4 型と同じ RFLP パターンを示す系統と、上記 3 野生種と RFLP パターンを共有する系統が混在しており、S-3 や S-4 型細胞質の起源を考える上で興味深いデータといえる。

一方、*Scox II*-2 遺伝子の成因については以下のような 2 つの解釈が可能である。先に、BREARS and LONSDALE²⁵⁾ は S 型 CMS 系統の mtDNA 物理地図を試作し、逆位反復配列の 1 つが *cox II* 3' 下流に近接して存在しており、この逆位反復配列を介した分子内組換えが実際に起こっていることを報告した。Fig. 3-9 に模式的に示すように、この逆位

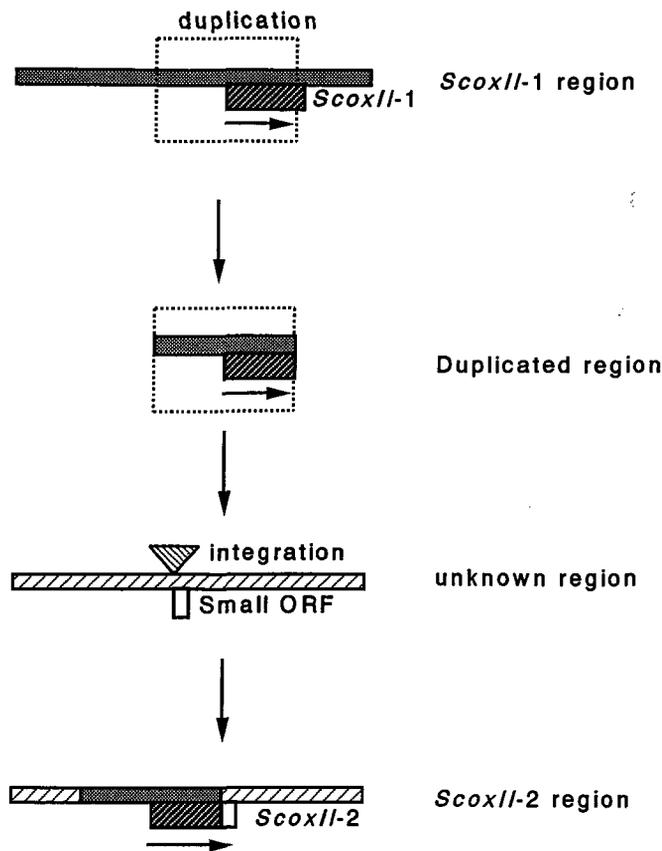


Fig. 3-10 Possible mechanism of the generation of the *Scox II*-2 gene by the duplication/integration model of Folkerts and Hanson (1989). The hatched box represents the coding region, and the small ORF is indicated by the open box. The polarity of transcription is shown by horizontal arrow.

反復配列が *Scox II-1* ORF 中に完全に含まれていると仮定すれば、*Scox II-2* は *Scox II-1* の組換え産物と考えられ、BREARS and LONSDALE のデータと矛盾しない。一方、テンサイの *Scox II-2* と同様に3' 端の伸長した *cox II* コピーがベチュニアでも見出されているが⁴⁵⁾、この場合は、通常の構造を備えた *cox II* が、まず重複した後、ゲノムに挿入され、読み取り枠が伸びたと解釈されている⁴⁹⁾ (Fig. 3-10)。テンサイ *Scox II-2* 遺伝子が、いずれの機構によって産み出されたのかを明らかにするためには、逆位反復配列とその隣接域の塩基配列を決定する必要がある。

高等植物において最初に塩基配列の決定されたミトコンドリア遺伝子はトウモロコシの *cox II* 遺伝子である。その後、マツヨイグサ、コムギ、イネ、エンドウ、ダイズ、ベチュニア、ニンジンで相次いで *cox II* 遺伝子の塩基配列が報告された。これらのデータを検討してみると、1) ダイズ、エンドウ、マツヨイグサの *cox II* はイントロンを欠くのに対し、2) ベチュニアとニンジンおよび単子葉植物の *cox II* には 794-1353 bp の介在配列が存在する、3) ニンジンの *cox II* においては既知の *cox II* のイントロンに加え、1075 bp にわたる第二のイントロンが存在する、4) 植物種間で見られるイントロンの構造差は主として塩基配列の挿入に起因している、という特徴が明らかとなった。本論文に述べたテンサイ *cox II* はこれまで分析された中で最も長いイントロンを有するベチュニア *cox II* 遺伝子よりもさらに 110 bp 長いイントロンを持つ。そのサイズ差の原因はイントロン3' 末端部にみられた 107 bp の塩基配列の挿入であった。また、挿入配列の両末端には 6 bp の反復配列 (5'-GCCTTC-3') が配置されており (Fig. 3-2)、イネ、コムギ、あるいはベチュニアと同様、トランスポゾンによる挿入を示唆するフットプリントとも考えられる⁴²⁾。最近、*Vigna* 属のリョクトウおよびササゲにおいては、*cox II* がミトコンドリアゲノムから核ゲノムへ転移していることが報告された⁵⁰⁾。*cox II* のゲノム間転移には転写産物の逆転写と輸送という機構が想定されているようである。

このように植物の *cox II* 遺伝子の進化には、先述のトランスポゾンによる挿入、短い反復配列を介した相同組換えなど多様な変異機構が複雑に働いている可能性が高い。今後、さらに多くの植物で *cox*

II 遺伝子の構造を明らかにすることによって、ミトコンドリア遺伝子の進化に関する重要な知見が得られることが期待される。

第4章 *atp A* 遺伝子の構造と発現

緒言

ATP 合成酵素 (F_1F_0 -ATPase) 複合体はバクテリアにおいても真核細胞のミトコンドリアや葉緑体でも、 F_1 と F_0 の2つのドメイン(機能単位)から構成される。光リン酸化反応に関与する葉緑体 F_1F_0 -ATPase では F_1 ドメインの5サブユニットのうち3つが葉緑体ゲノムにコードされ、 F_0 ドメインの4サブユニットに関しては3つが葉緑体ゲノムコードである⁵¹⁾。それに対して酸化的リン酸化反応にあずかるミトコンドリア F_1F_0 -ATPase では、 F_0 ドメインを構成するサブユニット6、9および F_1 ドメインの α サブユニットをそれぞれコードする遺伝子がミトコンドリアゲノムに含まれている⁵²⁾。これらの遺伝子の中で α サブユニット遺伝子 (*atp A*) は酵母や哺乳動物では、核ゲノム中に存在しており、ミトコンドリア遺伝子の進化を考察する上で注目される⁵³⁾。そのため、トウモロコシ^{54,55)}、マツヨイグサ⁵⁶⁾、エンドウ⁵⁷⁾、*Nicotiana plumbaginifolia*⁵⁸⁾、コムギ⁵⁹⁾、ハツカダイコン⁶⁰⁾、ヒマワリ⁶¹⁾において、その構造が相次いで明らかにされた。その結果、いずれの植物種の遺伝子もイントロンをもたず、コード域に関する塩基配列の相同性は高く、種間で90%を越えていることが明らかになった。

一方、トウモロコシ、ヒマワリあるいはハツカダイコンの正常系統と CMS 系統間では *atp A* 隣接域に構造変異の生じていることが報告されている。特にヒマワリにおいては、正常系統と CMS 系統との間で mtDNA の物理地図を比較すると、構造差異が *atp A* 近傍にしか見出されず、*atp A* 近傍の変異と CMS 発現との関連性が指摘された^{62,63)}。テンサイの *atp A* 遺伝子も正常系統と CMS 系統間で、その隣接域の構造が著しく異なっており、正常系統と S 型ならびに異型 CMS 系統のミトコンドリアゲノムをそれぞれ特徴づける変異が検出された。

本章では、それらのデータとともに、ミトコンドリアゲノム内での *atp A* 遺伝子の転写機構を比較解析した。

材料および方法

1. 供試材料

テンサイ正常系統 (TK81-0, I-12 61L) および 5 種の CMS 系統 (TK81-MS, I-12CMS(R), I-12CMS(2), I-12CMS(3), I-12CMS(7)) の計 7 系統の肥大根より第 2 章に述べた方法で mtDNA, mtRNA を調製し、実験に供試した。フダンソウの 1 系統 (Miyazaki zairai) については、肥大根を形成しないため、成葉より mtDNA を抽出し、クローニングに用いた。また、total DNA は、第 3 章の方法に従ってテンサイ 7 系統の他に、テーブルビート、飼料ビート、フダンソウの計 26 品種 (Table 3-1) の成葉から調製し、RFLP 分析に用いた。サザンプロット分析、ノーザンプロット分析、RNase プロテクション分析、プラスミドクローニングおよび塩基配列決定法は第 2 章および第 3 章に詳述した通りである。

2. 成葉からの mtDNA の調製

テンサイや *B. maritima* の 1 系統 (SP673000-0) を除いて、大部分の野生種では、肥大根が形成されない。これらの野生種に関しては HANSON et al.⁶⁴⁾ の方法を改良して、成葉から mtDNA を調製した。500 g の成葉を氷冷した 450 ml の LGB 緩衝液 (0.3 M マンニトール, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 3 mM EDTA, 0.1% BSA, 1% PVP, 9 mM 2-メルカプトエタノール) 中で磨砕し、4 重のガーゼと 2 重のミラクロスで濾過した後、濾液を 4°C, 3500 rpm (水平ローター, 半径 107 mm) で 10 分間遠心した。上清を 4°C, 11000 rpm (定角ローター, 半径 71 mm) で 30 分間遠心して得た粗ミトコンドリア沈澱を 20 ml の LGB 緩衝液に懸濁し、再び 4°C, 3500 rpm で 10 分間遠心した。上清を別のチューブに移して、DNase 処理を行った。これ以降の操作については肥大根からの mtDNA 調製法 (第 2 章) に従った。

3. RT-PCR 法

SINGER-SAM et al.⁶⁵⁾ の方法に従って、mtRNA から cDNA を合成し、増幅した。すなわち、DNase 処理した 5 μ g の mtRNA を PCR 反応混合液 (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% (w/v) ゼラチン, 200 μ M

dNTPs, 1 μ M プライマー) に溶解し、AMV 逆転写酵素と Taq ポリメラーゼをそれぞれ 1 μ l 加え、サーマルサイクラー中で、50°C, 8 分間保温した後、95°C, 1 分 → 60°C, 2 分 → 73°C, 2 分 30 秒の反応を 30 サイクル継続することにより cDNA の合成と増幅を行った。増幅 cDNA を Klenow 酵素で末端修復し、平滑末端化した上で EcoRV で切断したベクター (Bluescript KS+) に連結した。形質転換した大腸菌のうち、目的の挿入 DNA をもつものを複数クローン選び、その塩基配列を決定した。

4. プライマー伸長法

プライマー伸長法は、SAMBROOK et al.⁶⁶⁾ の方法に従った。すなわち、目的とする領域のすぐ下流の配列と相補的な 30 nt のオリゴヌクレオチドを T4 キナーゼにより 5' 末端標識し、プライマーとした。このプライマー (10⁴~10⁵ cpm) を 10~20 μ g の mtRNA とともに RNA-DNA ハイブリダイゼーション液 (80%ホルムアミド, 40 mM PIPES pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.4 M NaCl) 中で 85°C, 10 分間加熱後、30°C で一晩アニーリング反応を行い、エタノール沈澱した。沈澱物を RT 反応液 (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM DTT, 8 mM MgCl₂, 0.8 mM dNTPs, 50 μ g/ml アクチノマイシン D, 1 U/ μ l RNase インヒビター) に溶解し、AMV 逆転写酵素を加えて、45°C, 1 時間反応させ、cDNA を合成した。0.5 M EDTA pH 8.0 で cDNA 合成反応を停止させた後、RNase A で 37°C, 30 分間 RNA 分解反応を行った。一方、前述のプライマーを用い、目的の領域を含む一本鎖 DNA とアニーリングしてシークエンス反応を行い、反応物と cDNA をともに 6% アクリルアミド変性ゲルで電気泳動し、RNA の 5' 末端を決定した。

結 果

1. 塩基配列

エンドウの *atp A* プローブを用いて、正常系統 TK81-0 より抽出した mtDNA の Hind III 分解物との間でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、3.7 kbp 断片にハイブリダイゼーションシグナルが現れた (Fig. 4-1) ので、この断片について、制限酵素切断地図を作成し (Fig. 4-2), *atp A* 領域の塩基配列を決定した (Fig. 4-3)。コンピュー

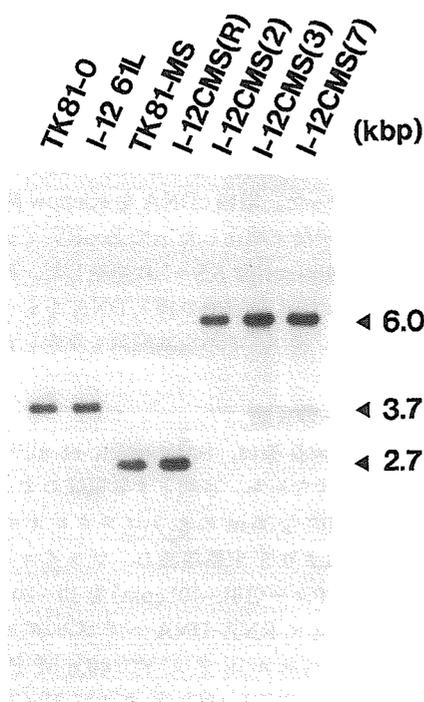


Fig. 4-1 Southern blot analysis of mtDNAs from the normal and CMS lines. MtDNA was digested with Hind III and electrophoresed in 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a Nylon membrane filter and hybridized with radiolabeled pea *atp A* probe (see Table 2-2). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

ターによるホモロジー検索を試みたところ、1518 bp から成る *atp A* ORF が見出された。エンドウの *atp A* と比較した場合、塩基配列レベルでは 94.6% という高い相同性を示した。また、開始コドンから数えて 12 bp 上流には、5'-TCTATTCT-3' というシャインダルガルノ (SD) 配列に似た配列が存在する。

タンパク質をコードする植物ミトコンドリア遺伝子は、これまでに調べられた限り、すべて RNA エディティングを生じている⁶⁷⁾。テンサイ *atp A* 遺伝子の mRNA についても同様の修飾を受けているか否かを明らかにするため、*atp A* コード域を含む cDNA クローンの塩基配列を決め、ゲノム DNA の塩基配列と比較した結果、C 末端に近い 3 箇所、C → U 塩基変換が見出された (Fig. 4-3)。これらの C → U エディティングによって、3 箇所ともにコードされるアミノ酸残基がプロリンからロイシ

Table 4-1. Effect of RNA editing on predicted amino acid sequences of sugar beet *atp A* polypeptide

Plant species	Amino-acid position		
	393	431	472
Sugar beet ¹⁾	P → L	P → L	P → L
<i>Oenothera</i> ¹⁾	L	L	P → L
Maize ²⁾	S	P	L
Pea ²⁾	L	L	L
Radish ²⁾	S	P	P
Sunflower ²⁾	S	P	L

¹⁾ The amino acid sequence was deduced from the mRNA sequences

²⁾ The amino acid sequence was deduced from the gene sequences

▼
 AGU-CC-AAA (1174-1181)
 *** ** ***
 AGUACCGAAA (1287-1296)
 * * * * *
 AUU-CC-AAA (1411-1418)

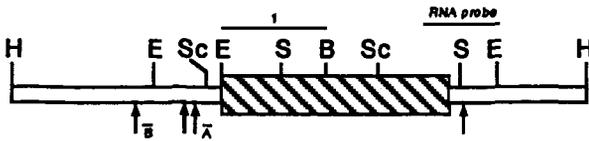
Fig. 4-4 Short consensus-sequence around the editing sites of sugar beet *atp A* gene. Asterisks indicate homologous nucleotides. Numbering of nucleotides is from the translation start of *atp A*. Arrowhead indicates an editing site.

ンへ変化しており、他の植物種の *atp A* アミノ酸配列と比較した場合、相同性が向上する (Table 4-1)。さらに 3 箇所のエディティング部位周辺の塩基配列を互いに比較したところ、エディティングモチーフとも想像される短いコンセンサス配列が見出された (Fig. 4-4)。

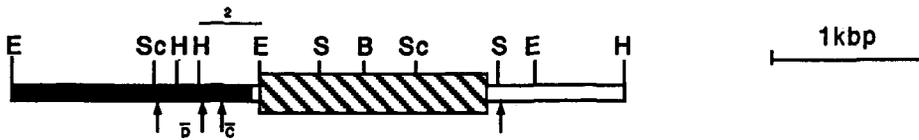
2. CMS 系統における *atp A* の構造

CMS 系統における *atp A* 領域の構造を明らかにするために、エンドウ由来の *atp A* 遺伝子プローブを用いて RFLP 分析を試みた。Hind III 分解物に対するハイブリダイゼーション像を調べてみると S 型 CMS 系統では 2.7 kbp、S 型とは異型 (S-2, S-3, S-4 型) の CMS 系統ではいずれも 6.0 kbp の Hind III 断片にハイブリダイゼーションシグナルが検出された (Fig. 4-1)。正常系統では、先に述べたように 3.7 kbp の Hind III 断片に *atp A* が含まれ

TK81-0 *atpA* gene (*NatpA*)



TK81-MS *atpA* gene (*SatpA*)



I-12 CMS(2) *atpA* gene (*S-2atpA*)



***atpA* pseudocopy
(TK81-0, TK81-MS, I-12CMS(2))**

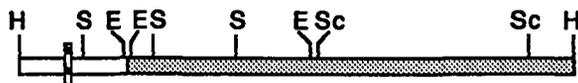


Fig. 4-2 Organization of the *atpA* genes from male-fertile (cvTK81-0) and CMS (cv TK81-MS and I-12CMS(2)) lines, and the pseudocopy aligned with their regions of homology. The hatched box represents the coding sequence and its homology in the pseudocopy. TK81-MS *atpA* (*SatpA*) diverges from the *NatpA* 47 bp nucleotides 5' to the start codon (black box); the I-12 CMS(2) *atpA* (*S-2atpA*) diverges from the *NatpA* 393 nucleotides 3' to the stop codon (stippled box). Synthetic oligonucleotides A, B, C and D were used for primer extension analysis, and are complementary to the sense DNA strand. The location and extent of the three probe DNAs (for Southern and Northern blot analysis in Figs. 4-5, 4-8) and the RNA probe (for the RNase protection assay in Fig. 4-6) is indicated over the map. Vertical arrows denote the approximate position of the 5' and 3' termini of *atpA* transcript. Restriction sites are B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; Sc, SacI; and S, SmaI.

る。S型CMS系統としてTK81-MS, また異型CMS系統としてS-2型CMS細胞質を有するI-12CMS(2)を選んで上記の多型断片をクローン化し, *atpA* 領域の塩基配列を決定した(これ以降, TK81-0由来の*atpA*を*NatpA*, TK81-MS由来の*atpA*を*SatpA*, I-12CMS(2)由来の*atpA*を*S-2atpA*と省略)。Fig. 4-3に示すようにコード域についてはいずれも*NatpA*と同一の塩基配列である。しかし隣接域には構造変異がみられ, *NatpA*と*SatpA*との間では開始コドンから数えて47bpより上流の部分は全く相同性を失う。他方,

*S-2atpA*に関しては終止コドンの3'下流393bpからの塩基配列が*NatpA*と異なっていた(Figs. 4-2, 4-3)。

3. 転写分析

*SatpA*および*S-2atpA*は5'または3'隣接域で構造変異を生じており, これらの変異が同遺伝子の転写に影響を及ぼすことが当然予想される。TK81-0, I-12 61L, TK81-MSおよびI-12CMS(2)の4系統よりmtRNAを調製し, *NatpA* ORFの半分を占める720bp EcoRI-BamHI断片(ブ

1,8,3 2	GGGATGAAGCTCTTCAGCAGGGCTTTCTGACGGATGCCTACTATGATGTGATGTTATGTGGCACTCATAGTTGGGGATGCGAGGAGCTCC TCTAAATGTCTATGGCCCTTTATTAATATTAGTITTTTACTTTGGTTTTAGTTCCTTGATCTGCGAGCAGGTCTCGCGTTCATATTGATCT	-91 -91
1,8,3 2	TGAATTTCGTGGATCTAATCAACTATCTTGATCTGGGGGGATCTATCAGCAGGGCACTTCCTCCCTAAAGCTCTATCTATTCTATTTTTGAATC CCTAGGGGATGCGGCTTGTAGGGGTTAGTGGCTCACTCATCGCTATCGGCAGCGGCATTCCTCCCTAAAGCTCTATCTATTCTATTTTTGAATC	-1 -1
1,2,8,3	ATGGAATCTCTCCAGAGCTGGGAACCTAACGAATCTATTAGAAAGTAGAATTACCAACCTTTTACACGAATTTTCAAGTGGATGAGATC M E F S P R A A E L T N L L E S R I T N F Y T N F Q V D E I	90
1,2,8,3	GGTGGAGTGGTCTCAGTTGGAGATGGGATTCACGCTGTTTATGGATTGAACGAGATTCACGCTGGGGAAATGGTGGAAATTCGCCAGCGGT G R V V S V G D G I A R V Y G L N E I Q A G E M V E F A S G	180
1,2,8,3	GTGAAAGGAATAGCCCTTAAATCTTGAGAATGAGAATGTAGGGATGTTGTCTTTGGTAGTATACCGCTATTAAAGAGGGAGATCTGTGCT V K G I A L N L E N E N V G I V V F G S D T A I K E G D L V	270
1,2,8,3	AAGCGCACTGGATCTATTGTGGATGTTCTCGGGAAAGGCTATGCTAGGGCGTGTGGTGGACGGTGGGAGTACCTATTGATGCAAGA K R T G S I V D V P A G K A M L G R V V D A L G V C P I D G R	360
1,2,8,3	GGGGCTCTAAGDCTACGAGCGTGAAGTGTGCAAGTGAAGGCCCGGGATTATGAAAGTAAATCTGTGCAAGGCGCTATGCAAAOC G A L S D H E R R E V E V K A P G I I E R K S V H E P M Q T	450
1,2,8,3	GGGTAAAGGCGGTAGATAGCGTGGTTCCTATAGCCGCTGGTCAACGAGAACCTTATAATCGGGACGCAAAACGGGAAAAACAGCTATT G L K A V D S L V P I G R G Q R E L I I G D R Q T G K T A I	540
1,2,8,3	GCTATCGATACCATATTAAACCAAAAGCAACTGAACTCAAAGGCCACCTCTGAGAGTGGAGACATTGTATTGTGTCTATGTAGCGGTTGGA A I D T I L N Q K Q L N S K A T S E S E T L Y C V Y V A V G	630
1,2,8,3	CAGAAAGTTCAACTGTGGCACAATAGTTCAAATCTTTCAGAAAGGAAAGTCTTGGAAATATCCATCTGTAGCAGCCACCGCTTGG Q K R S T V A Q L V Q I L S E A N A L E Y S I L V A A T A S	720
1,2,8,3	GATCCTGCTCTCTCAATTTCTGGCCCATATTCTGGGTGTGCTATGGGAGAATATTCGCGCATATGGAATGCACGCATTAAATAATC D P A P L Q F L A P Y S G C A M G E Y F R D N G M H A L I I	810
1,2,8,3	TATGATGATCTTAGTAAACAGCGGCTGGCATATCGCAAAATGTCATTATTGTTAAGCGGACCCAGCGGTTGGGCTTTCCGAGGGGAC Y D M L S K Q A V A Y R Q M S L L L R R P P G R F G G D	900
1,2,8,3	GTITTTCTATTACATCCCGTCTCTAGAAAGAGCGCTAAACGATCGACCAGACAGCGCAGGTAGCTTGACCCCGCTACCGCTCATT V F Y L H S R L L L E R A A K R S D Q T G A G S L T A L P V I	990
1,2,8,3	GAAACACAAGCTGGAGAGCTATCGGCTATATCCACCAATGTGATCTCCATTACTGATGGACAATCTGTTGGAAACAGAGCTCTTT E T Q A G D V S A Y I P T N V I S I T D G Q I C L E T E L F	1080
1,2,8,3	TATCGCGAATTAGACCTGCTATTAACGTCGCTTATCTGTGTCAGTGGGTGGGCTGCGGCTCAGTGTAAAGACTATGAAACAAGTCTGC Y R G I R P A I N V G L S V S R V G S A A Q L K A M K Q V C	1170
1,2,8,3	GGTAGTCCAAACTGGAATGGCACAATATCGGAAGTGGCCGCTTTGCTCAATTTGGGTCAGACCTTGATCTGGGACTCAGGCATTA G S P K L E L A Q Y R E V A A F A Q F G S D L D A A T Q A L	1260
1,2,8,3	CTCAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTACCGAACAACCAATATGCACCCTTCCAAATGAAAAACAATTTCTAGTCAATTAAGCA L N R P L E V A R P K Q P Q Y A P L P I E K T L V I Y A	1350
1,2,8,3	GCTGTCAATGGATTCTGTGATCGAATGCCACTAGATAAAATTTCTCAATATGAGCGAACCATTCCAAATAGTGTAAAACCAGAATTATA A V N G F C D R M P L D K I S Q Y E R T I P N S V K P E L L	1440
1,2,8,3	CAATCCCTTAAAGGGGGGTTAACTAACGAAAAAAGATGGAAGTATGCTTCTTAAAGAAATGGGCTTTGAATTACTAATCTTCTTAA Q S L K G G L T N E K K M E L D S F L K E C A L N Y *	1530
1,2,8,3	CTTTCTATTTATATGAGATTAGATGTAATTAAGAATAAAGGCTAATATCTTGGCGAAAGGGGGAGGGTGGCGAGACCGGGGCAACGG GGTCTTCCCATCATGATGACTAAAGGGAAAGTCCGCTCGGAGATATTGGTTGGAATCCAATTCATCATCCAGTTCATAAGGCGCTTCATT	1620
1,2,8,3	CAATAGAAGTTTAGGATGGACTATCACTAATAGACGGATGGGATGTTTGCACAAAGTGTCTATATAGCAAGGACTCTTAAACTATA	1710
1,2,8,3	TATATCCTATAGAATAGGACTCGACCAAAAGGCTCAGCGAAGAGAACTGAATTCAAATCTCAGTGAAGACGGTTATTAGCGGCTCTC	1800
1,2,8,3	AGTAAGGAGTGTGAACAAGTTAAGGAAGACTCAACCTAATCTACTCGCGAGTCTTTTGCATCCATGGCGGAATGCTTAAAGCGGA AGTAAGGAGTGTGAACAAGTCTAGTTTTAGGAATAGGAATCTTTTAGGAAGCGACAAGACCTCTTCTTCTTGGGACTCCTCTCTAG	1890 1980 1980

Fig. 4-3 Nucleotide and derived amino acid sequences of *Natp A*(1), *Satp A*(2) and *S-2atp A*(3) genes. *Natp A* sequence is aligned with *Satp A* and *S-2atp A* sequences. Numbering of nucleotides is from the predicted translation start of *atp A*. Three editing events (marked with arrowhead) were found in the coding region, all being C to U transitions. The 5' and 3' primers used for RT-PCR amplification are overlined. The putative ribosomal binding site is boxed. Vertical arrows indicate the points of sequence divergence. Horizontal arrows denote the location of inverted repeats which could form stems necessary for a putative stem/loop structure.

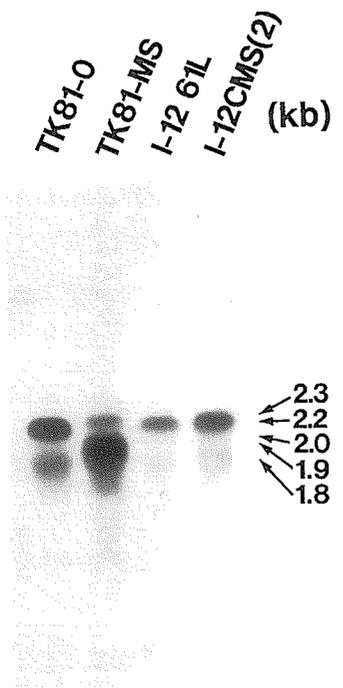


Fig. 4-5 Northern blot analysis of the *atp A* locus from the TK81-0, TK81-MS (S cytoplasm), I-12 61L and I-12CMS(2) (S-2 cytoplasm). MtRNA was electrophoresed in 1% agarose-formamide gel, transferred onto a Nylon membrane filter, and hybridized with the sugar beet *atp A* probe (720 bp EcoR I-BamH I fragment; probe 1 shown in Fig. 4-2). Sizes of transcripts are indicated in kb.

ロープ1, Fig. 4-2)をプローブに用いてノーザンブロット分析を行った(Fig. 4-5)。正常系統のTK81-0では2.2 kbと1.8 kbの2種の転写産物が検出されたのに対して、S型CMS系統のTK81-MSおよびI-12CMS(R)の*atp A* mRNAは2.3, 2.0, 1.9 kbの3種であった。

このような転写パターンの相違が生じた機構を明らかにするため、RNaseプロテクション分析とプライマー伸長法によりmRNAの5', 3'両末端を決定した。まず、3'末端配列と相補的なRNAプローブ(500 bp Sau3AI-EcoRI; Fig. 4-2)を作成し、mtRNAと分子雑種を形成させた後、RNase AおよびT1で1本鎖RNAを分解した。Fig. 4-6より

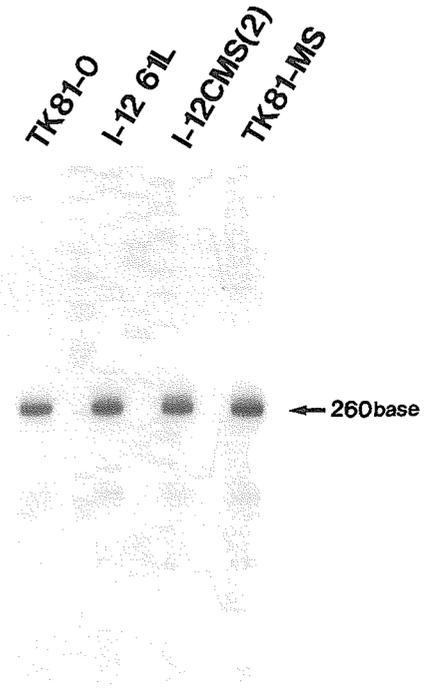


Fig. 4-6 RNase protection assay of *atp A* transcript. Continuously labeled Sau3AI-EcoRI antisense riboprobe (approximately 500 base shown in Fig. 4-2) was hybridized with TK81-0, I-12 61L, TK81-MS and I-12CMS (2) mtRNAs, followed by treatment with RNase A and T1.

明らかなようにTK81-0, TK81-MSのいずれにおいても260 baseのRNAバンドが検出され、終止コドンから約110 bp下流の位置が転写物の3'末端に相当することが判明した。また、3'末端部には2組の逆位反復配列が配置され、ステムループが2個連なる2次構造を描くことができる(Fig. 4-3)。これは、マツヨイグサの*atp A*や*cox II*⁶⁸⁾あるいはイネの*cox III*⁶⁹⁾の事例に酷似している。

一方、*Natp A* mRNAの5'端を決めるため、ATG開始コドンの上流の配列をもとに2つのアンチセンスプライマー [Fig. 4-2; プライマーA (-65から-94, 5'-ATAGTTGATTAGATCCAGCAAATTCAGGAG-3'), プライマーB (-478から-507, 5'-GAAGAAAGACTTGTTCGGAAATCACCGGTTG-3')]を用意し、プライマー伸長法を試みた。Fig. 4-7に示すように-573, -557, -556, -206, -159の5箇所を5'端を同定した。

3' 末端のマッピングの結果と考え合せれば、ノーザンブロット分析で検出された 2.2 kb 転写物の 5' 端は -573, -557, -556 に対応し、1.8 kb 転写物の 5' 端は -206 と -159 に対応するとみてよい。次に、*Satp A* についても 2 つのアンチセンスプライマー [Fig. 4-2; プライマー C (-174 から -203, 5'-ATTTAGAATGTTAATAAAGTAGTCACTCTC-3'), プライマー D (-407 から -499, 5'-TCGAAAGAATGAAGCCTAACCCGAATGAGA-3')] を合成して転写物の 5' 端を同定した結果、2.3 kb mRNA の 5' 端は -642, 2.0 kb mRNA の 5' 端は -368 と -364, また 1.9 kb mRNA の 5' 端は -238, -237, -236 および -234 にそれぞれ相当することが判明した (Fig. 4-7)。なお、*Natp A* の -573 近傍や *Satp A* の -642 近傍はダイズのミトコンドリア遺伝子の転写開始点に見いだされた 19 塩基のコンセンサス配列 (5'-AAATnnCRTAAGAGAAGAAAG-3') と高い相同性を示し、転写開始点の可能性が高い⁷⁰⁾。

Fig. 4-5 には異型 CMS 系統である I-12CMS(2) の *atp A* 転写物についてのハイブリダイゼーションパターンも併せて示した。これらの転写パターンは、いずれも、同じ核遺伝子型を有する維持花粉親 I-12 61L の *atp A* の転写パターンと同一であった。従って、*S-2atp A* の 3' 隣接域に見いだされた構造変異は転写パターンに目立った影響を及ぼしていないと結論してよい。ただ、TK81-0 と I-12 61L は共に同じ細胞質を有するにもかかわらず、転写パターンが異なっており、核遺伝子型による影響と考えられた (Fig. 4-5)。

4. *atp A* の偽遺伝子

Satp A および *S-2atp A* 遺伝子が如何なる機構によって生じたかを知るため、それぞれに特異的な配列を切り出してプローブとし、テンサイの 7 系統 (TK81-0, I-12 61L, TK81-MS, I-12CMS(R), I-12CMS(2), I-12CMS(3) および I-12CMS(7)) より抽出した mtDNA の Hind III 分解物に対するサザンブロット分析を行った。*Satp A* に特異的な領域 (406 bp Hind III-EcoR I 断片; プローブ 2, Fig. 4-2) をプローブに用いた場合、相補バンドは、いずれの系統においても全く検出されなかった。*B. maritima* や *B. trigyna* 等の近縁野生種を供試しても相同域は見当らず、また、データベースの検索に

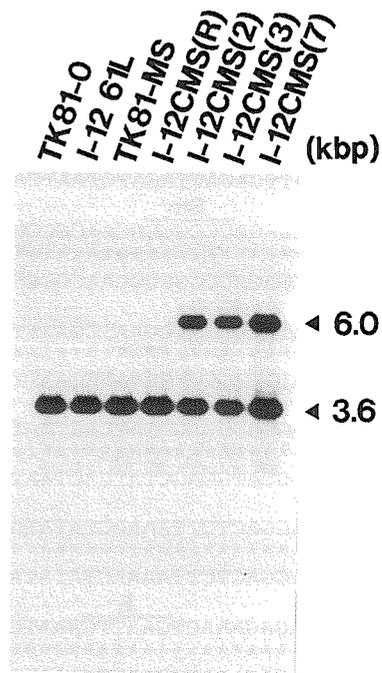


Fig. 4-8 Southern blot analysis of mtDNAs from the normal and CMS lines. MtDNA was digested with Hind III and electrophoresed in 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a Nylon membrane filter and hybridized with radiolabeled *S-2atp A*-specific probe (1700 bp EcoR I-Hind III fragment; probe 3 shown in Fig. 4-2). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

よっても似通った配列は発見できなかったので、*Satp A* の 5' 隣接域の由来は不明である。これに対して、*S-2atp A* 遺伝子の進化機構に関しては注目すべきデータを得た。すなわち、*S-2atp A* に特異的な 3' 隣接域 (1700 bp EcoR I-Hind III 断片; プローブ 3, Fig. 4-2) をプローブに用いて RFLP 分析を試みたところ、ここに供試した 7 系統においては共通して 3.6 kbp Hind III 断片にハイブリダイゼーションシグナルが検出された (Fig. 4-8)。TK81-0 のミトコンドリアゲノムから 3.6 kbp Hind III 断片をクローン化し、制限酵素切断地図を作成したところ、*S-2atp A* 下流域と同じ構造であることが示唆された (Fig. 4-2)。塩基配列を決めた結果、TK81-0 の 3.6 kbp Hind III 断片中には、*Natp A* ORF 3' 端 (11 bp) から 3' 隣接域にかけての 406 bp 配列が反復して含まれることが判明した

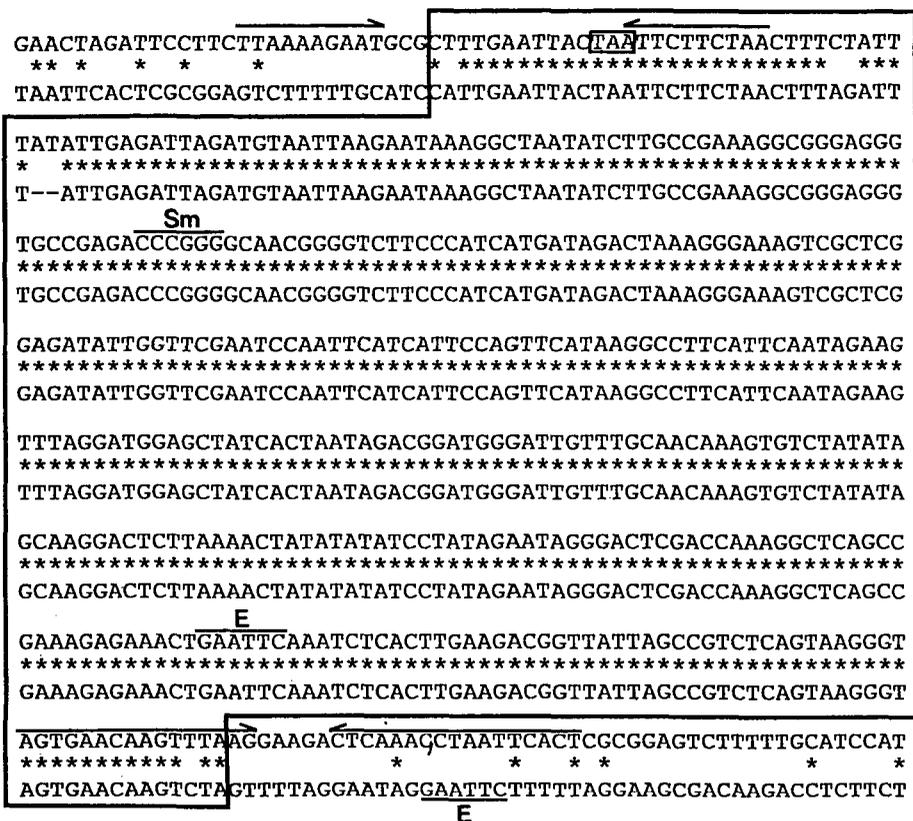


Fig. 4-9 Nucleotide sequence comparison of the *Natp A* gene (top line) and pseudocopy (bottom line). Only the 3' end and the adjacent flanking region of *Natp A* (nucleotides 1480-1959) and the corresponding sequence of pseudocopy are shown. Asterisks indicate homologous nucleotides. A 406 bp homology region is boxed. Horizontal arrows denote the imperfect inverted repeat sequence. The location of the TAA stop codon and Sma I (Sm) and EcoRI (E) recognition sites are also presented.

(Fig. 4-9)。さらに、I-12CMS(2)は、ここで見出された *atp A* 偽遺伝子と *S-2atp A* 遺伝子間で相同性のある長い 3' 隣接域を共有することが期待された。λ バクテリオファージで構築した I-12CMS(2) mtDNA のクローンライブラリーから *S-2atp A* 3' 隣接域プローブに対する陽性クローンを複数個選出し、制限酵素切断地図を作った。Fig. 4-10 に示すように反復配列の長さは約 6.5 kbp と推定される。また、反復配列を挟む両隣接域の塩基配列が異なる 4 種のクローンが全て得られたことから、この反復配列を介した分子内または分子間組換えが実際に起こっているとみてよい。

一方、別の *atp A* 偽遺伝子と考えられる配列がフダンソウのミトコンドリアゲノム中にも発見された。*B. vulgaris* の亜種であるテーブルビート (ssp.

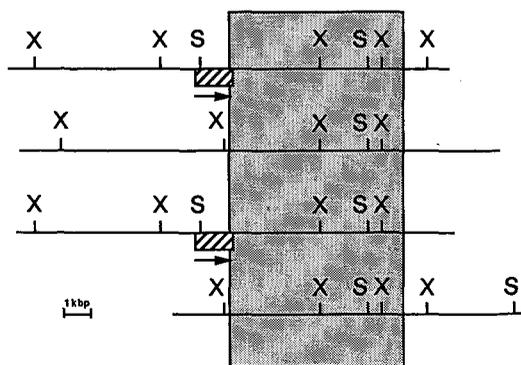


Fig. 4-10 Restriction maps of the four different genomic environments of the 6.5 kbp repeat in I-12CMS(2) (*S-2* cytoplasm) mtDNA. The hatched box represents *atp A* coding region, while the stippled region shows the 6.5 kbp repeat. The polarity of transcription is indicated by horizontal arrow. Restriction sites are S, Sal I; and X, Xho I.

esculenta), 飼料ビート (*ssp. rapa*) およびフダンソウ (*ssp. cicla*) より計 26 品種 (Table 3-1) を選んで, total DNA を抽出し, Hind III で分解後エンドウ *atp A* プロブとの間で RFLP 分析を行った (Fig. 4-11)。テーブルビートと飼料ビートの供試品種では, いずれもテンサイ (TK-81-0) と同じ 3.7 kbp Hind III 断片にハイブリダイズしたのに対し, フダンソウにおいては① 3.7 kbp Hind III 断片にシグナルが検出される品種 (Swiss chard, Hirakuki seiyo ohbakyona の 2 品種) ② I-12CMS(2) 等と同様 6.0 kbp Hind III 断片にシグナルが検出される品種 (YS-1 等 8 品種) に加え, ③ 6.0 kbp と 5.4 kbp の 2 つの Hind III 断片に *atp A* 相同配列を

含む品種 (Miyazaki zairai 等 5 品種) が見出された (Table 4-2)。③のグループの品種にみられる *atp A* の構造変異を調べるため, Miyazaki zairai フダンソウの成葉から mtDNA を抽出し, 6.0 kbp および 5.4 kbp の 2 つの Hind III 断片をクローン化して, 制限酵素切断地図を作成した。Fig. 4-12 にまとめたように 6.0 kbp Hind III 断片は *S-2atp A* 領域と同一の構造を示すのに対して, 5.4 kbp Hind III 断片は *atp A* の 5' 隣接域からコード域中の Sac I サイトにかけて *S-2atp A* と制限酵素サイトを共有するが, 3' 隣接域には異なる制限酵素サイトが見いだされ, 構造変異の起こっていることが示唆された。実際, 構造変異域を含むと予想される Sac I-BamH I 領域 (450 bp) について, 塩基配列を決定し

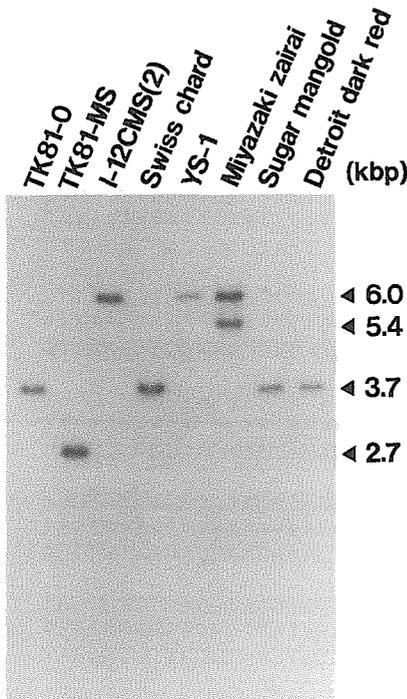


Fig. 4-11 Southern blot analysis of total DNAs from the *B. vulgaris* strains. The DNA sources are ; Sugar beet (TK81-0, TK81-MS, I-12CMS(2)), Spinach beet (Swiss chard, YS-1, Miyazaki zairai), Fodder beet (Sugar mangold) and Table beet (Detroit dark red). Total DNA was digested with Hind III and electrophoresed in 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a Nylon membrane filter and hybridized with radiolabeled pea *atp A* probe (see Table 2-2). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

Table 4-2. Hind III fragment length polymorphisms detected in *B. vulgaris ssp. cicla* mitochondrial genomes. The DNA bound to a Nylon membrane filter was hybridized with the sugar beet *atp A* probe (720 bp EcoR I-BamH I fragment; probe 1 shown in Fig. 4-2). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp

<i>B. vulgaris</i> subspecies	Name of variety	Hind III fragment size (kbp)
<i>saccharifera</i> (sugar beet)	TK81-0	3.7
	TK81-MS	2.7
	I-12CMS(2)	6.0
	I-12CMS(3)	6.0
	I-12CMS(7)	6.0
<i>cicla</i> (spinach beet)	Swiss chard	3.7
	Hirakuki seiyo ohbakyona	3.7
	Miyazaki zairai	6.0, 5.4
	NS-1	6.0, 5.4
	MD-1	6.0, 5.4
	YS-2	6.0, 5.4
	Natsuna	6.0, 5.4
	KM-1	6.0
	YS-1.	6.0
	Sc-1	6.0
Akane kyona	6.0	
Shirokuki seiyo ohbakyona	6.0	
Shirokuki hudanna	6.0	
Nihon hudansou	6.0	
Seiyo hudansou	6.0	

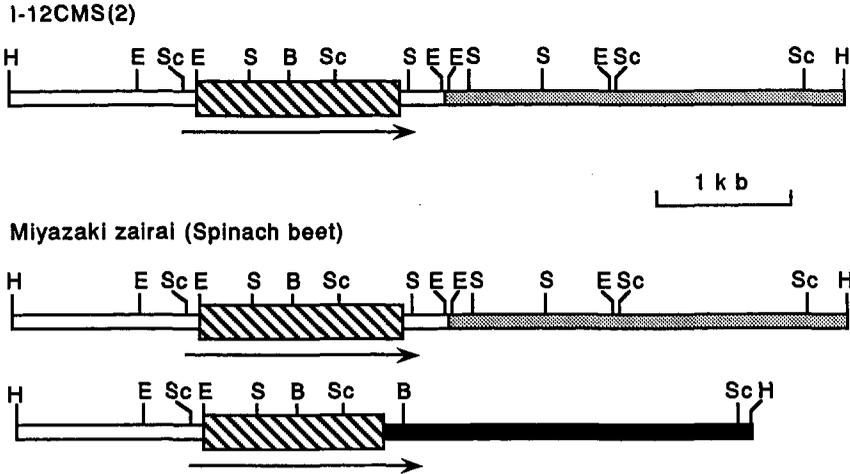


Fig. 4-12 Organization of *atp A* gene and pseudo-*atp A* copy isolated from a spinach beet line, Miyazaki zairai. The hatched box represents the coding sequence and its homologous pseudocopy. Pseudo *atp A* copy diverges from *S-2atp A* 1455 nucleotides 3' to the start codon (black box). Restriction sites are B, BamH I; E, EcoR I; H, Hind III; Sc, Sac I; and S, Sma I.

Sac I
 GAGCTCTTTTATCGCGGAATTAGACCTGCTATTAACGTCGGCTTATCTGTCAGTCGCGTC

 GAGCTCTTTTATCGCGGAATTAGACCTGCTATTAACGTCGGCTTATCTGTCAGTCGCGTC

 GGGTCTGCCGCTCAGTTGAAAGCTATGAAACAAGTCTGCGGTAGTCCAAAACCTGGAATTG

 GGGTCTGCCGCTCAGTTGAAAGCTATGAAACAAGTCTGCGGTAGTCCAAAACCTGGAATTG

 GCACAATATCGCGAAGTGGCCGCCTTTGCTCAATTTGGGTGAGACCTTGATGCTGCGACT

 GCACAATATCGCGAAGTGGCCGCCTTTGCTCAATTTGGGTGAGACCTTGATGCTGCGACT

 CAGGCATTACTCAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTACCGAAAACAACCACAATATGCA

 CAGGCATTACTCAATAGAGGTGCAAGGCTTACAGAAGTACCGAAAACAACCACAATATGCA

 CCACTTCCAATTGAAAAACAAATTCTAGTCATTTACGCAGCTGTCAATGGATTCTGTGAT

 CCACTTCCAATTGAAAAACAAATTCTAGTCATTTACGCAGCTGTCAATGGATTCTGTGAT

 CGAATGCCACTAGATAAAATTTCTCAATATGAGCGAACCATTCCAAATAGTGATAAACCA
 ***** *
 CGAATGCCACTAGATAAAATTTCTCAATATGAGCGAACCATTCCAAATAGTGATAAACAA

 GAATTATTACAATCCCTTAAGGGGGGTTAACTAACGAAAAAAGATGGAAGTACTGATTC
 ***** ** * * *
 GAATTATTACAATCCCTTAAGGGAATCATAAGTCATATCGTTTCTACTTTTTCGAAAAAC

 TTCTTAAAGAATGCGCTTTGAATTACTAATTCCTTCTAACTTTCTATTATATGAGATT
 * * * * *
 CCGTCTTCGGGTATCTAGGCATGGTTATGCCAGGATCC
BamH I

Fig. 4-13 Nucleotide sequence comparison of the *Natp A* gene (top line) and the pseudo-*atp A* copy of the spinach beet, Miyazaki zairai (bottom line). Asterisks indicate homologous nucleotides. The TAA stop codon and Sac I and BamH I recognition sites are also presented.

たところ, *atp A* の TAA 終止コドンの 52 bp 上流の部位より構造変異を起こしていることが判明し, 偽遺伝子化している可能性が高い (Fig. 4-13)。

考 察

塩基配列分析を通じて, TK81-0 と TK81-MS から単離した *atp A* 遺伝子 (*Natp A*, *Satp A*) は互いに開始コドンのわずか 47 bp 上流から分子構造を異にすることが判った。また, S-2 型 CMS 系統である I-12CMS(2) 由来の *atp A* 遺伝子 (*S-2atp A*) 座は *Natp A* 座と比較した場合, 終止コドンの 3' 下流 393 bp から構造変異を起こしている。ノーザンプロット分析によれば TK81-0 と TK81-MS との転写パターンは著しく異なるが, 転写産物の 5', 3' 両末端をプライマー伸長法と RNase プロテクション分析法で同定した結果, ここにみられた *atp A* 転写パターンの相違は転写調節に関わる 5' 上流

域の塩基配列の相違に起因すると結論できた。ただ, 今回分析した RNA 標品は肥大根または成葉より調製したものであり, CMS の発現との関連性を解析するには葯組織由来の RNA 標品の研究や, ATP 合成酵素タンパク質の特徴づけが今後必要であろう。一方, S 型とは異型の S-2 型 CMS 系統においては, その維持花粉親 (I-12 61L) と同じ *atp A* 転写パターンが得られた。それ故, 3' 隣接域に生じた構造変異が転写に影響を及ぼしている可能性は極めて低い。また, 同じ細胞質を有しているにもかかわらず, TK81-0 と I-12 61L の両系統間では *atp A* 転写パターンの相違が見出された。これは核遺伝子型がミトコンドリア遺伝子の転写に影響することを示すデータと考えてよい。同様の知見は, トウモロコシの *cox II* 遺伝子⁷¹⁾ やハツカダイコンの *atp A* 遺伝子⁶⁰⁾ でも報告されており, 核と細胞質遺伝子の相互作用を研究する上で興味深い。

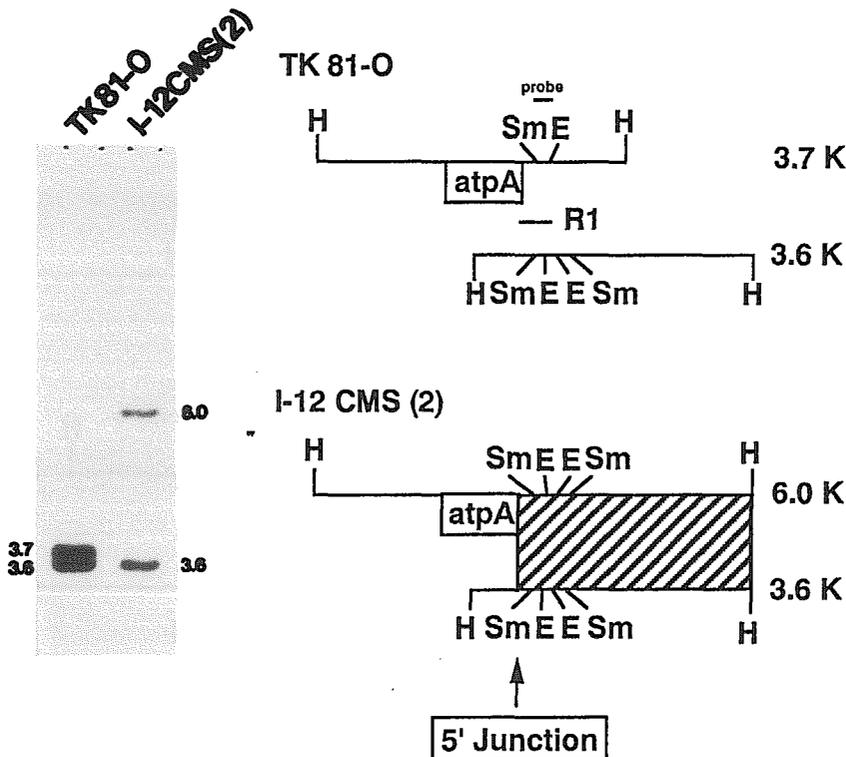


Fig. 4-14 Organization of the *atp A* 3' flanking regions in TK81-0 and I-12CMS(2) (S-2 cytoplasm) mtDNAs. The 3.7 kbp Hind III clone (TK81-0) was found to contain a homology with 5' terminus of the 6.5 kbp repeat (R1). (Left) Southern blot analysis of mtDNA. DNA was digested with Hind III, and hybridized with 3' flanking region of *atp A* (250 bp Sma I-EcoRI; shown in right panel). (Right) Restriction maps of the four Hind III clones. Open boxes indicate *atp A* coding region. Restriction sites are E, EcoRI; H, Hind III; and Sm, Sma I.

Satp A 遺伝子を特徴づける 5' 隣接域の変異の成因は明らかではないが、その一方で、*S-2atp A* 構造変異の成因については示唆に富むデータを得た。S-2 型 CMS 系統のミトコンドリアゲノムは、機能を備えた *S-2atp A* 遺伝子を 1 コピー有すると同時に *atp A* 3' 末端域およびその隣接域の相同配列をゲノムの別の場所にも含む。サザンブロット分析によれば、*atp A* コード域の C 末端に始まる約 6.5 kbp の領域がゲノム内に反復して存在する。これに対して、正常系統では、*S-2atp A* 下流相同配列は 1 コピーのみである。SMALL et al.⁷²⁾ は、サブリモン分子を介した反復配列の形成がミトコンドリアゲノムの進化に重要な役割を演じている可能性を指摘した。この仮説の要点は、①祖先型ゲノムには 2 組の短い反復配列 (R1, R2) が直列に配置されている。

②祖先型ゲノムでは R1 と R2 をそれぞれ介した組換えがごく稀に起こり、組換え体のサブゲノム分子がサブリモン分子として産み出される。③サブリモン分子の組換えの結果、祖先型ゲノムにおいて R1 と R2 に挟まれている領域の重複したマスター染色体が新たに誕生するというものである。仮に正常 (TK81-0) 型のミトコンドリアゲノムが S-2 型 (I-12CMS(2)) ゲノムの祖先型で、サブリモン分子を介した組換え産物として S-2 型ゲノムの 6.5 kbp 反復配列が形成されたとすれば、6.5 kbp 反復配列の両末端と相同性のある短い反復配列が正常型にそれぞれ含まれていることになる。結果の項に述べた様に、TK81-0 mtDNA における 6.5 kbp 配列の 5' 境界域について詳細な解析を行ったところ (Fig. 4-14), 406 bp の反復配列を見出した (Fig.

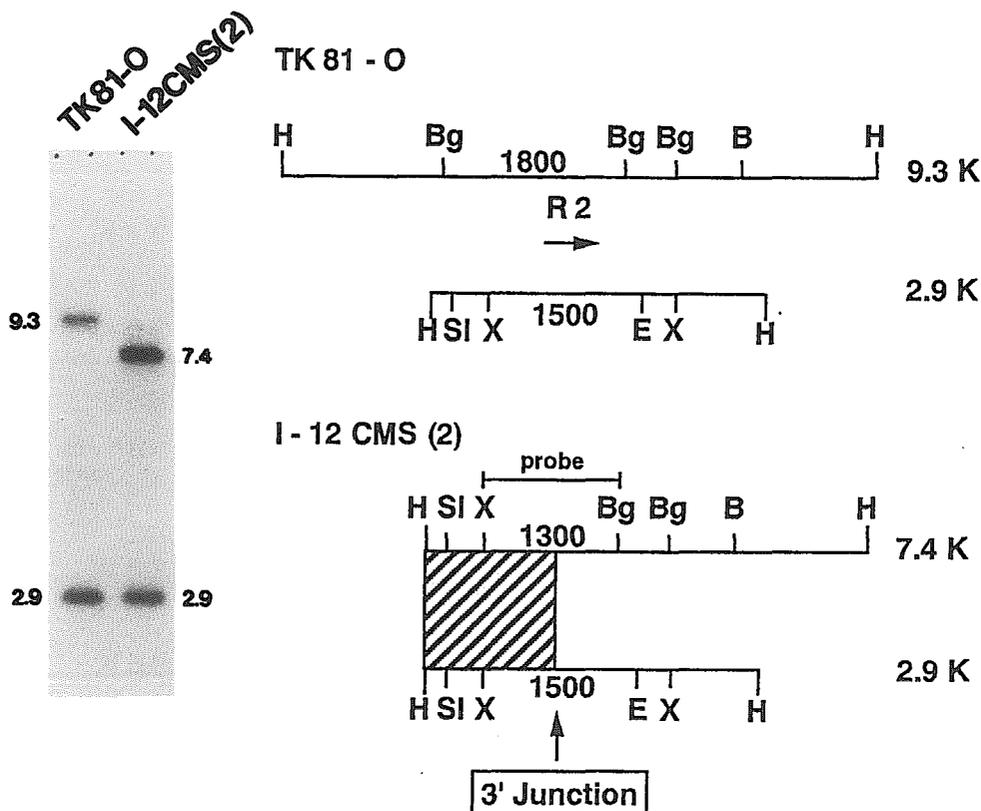


Fig. 4-15 Organization of the *atp A* 3' flanking regions in TK81-0 and I-12CMS(2) (S-2 cytoplasm) mtDNAs. The 9.3 kbp Hind III clone (TK81-0) was found to contain a homology with 3' terminus of the 6.5 kbp repeat (R2). (Left) Southern blot analysis of mtDNA. DNA was digested with Hind III, and hybridized with 3' flanking region of *S-2atp A* (1300 bp XhoI-Bgl II; shown in right panel). (Right) Restriction maps of the four Hind III clones. The hatched region indicates the 6.5 kbp repeat in I-12CMS(2). Restriction sites are B, BamHI; Bg, Bgl II; E, EcoRI; H, Hind III; and SI, Sal I; and X, Xho I.

4-9)。

一方、6.5 kbp 配列の 3' 境界域を含む Xho I-Bgl II (1300 bp) 断片 (Fig. 4-15) をプローブに用いて、TK81-0 mtDNA の Hind III 分解物との間でサザンブロット分析を行った。その結果、3' 境界域との相同配列を含む 9.3 kbp Hind III 断片を検出した。塩基配列分析によれば、共通配列は Fig. 4-16 に示すように 7 bp であった。イネの *atp 6* でもわずか 7 bp の反復配列が関与したと考えられる組換えが報告されており⁴⁸⁾、6.5 kbp 配列の 3' 境界域に配置された 7 bp の反復配列も進化の過程で、ごくまれに生じる組換えの担荷体になり得ると推定される。

さらに R1 と R2 による組換え産物がサブリモン分子として存在するか否かを調べるため、R1 配列の一部を成す 250 bp Sma I-EcoRI 断片をプローブに用いてサザンブロット分析を試みた。その結果、Fig. 4-17 に示すように 6.0 kbp と 1.3 kbp に相当する位置に化学量比の極めて低いハイブリダイゼーションバンドを検出し、サブリモン分子の存在する可能性が示唆された。従って、正常型の祖先型ミトコンドリアゲノムにおいて、サブリモンを介した 6.5 kbp 領域の重複が生じ、その過程で 406 bp 反復配列を組換えサイトとする相同組換えにより *S-2atp A* 遺伝子が生じた可能性も充分に考えられ

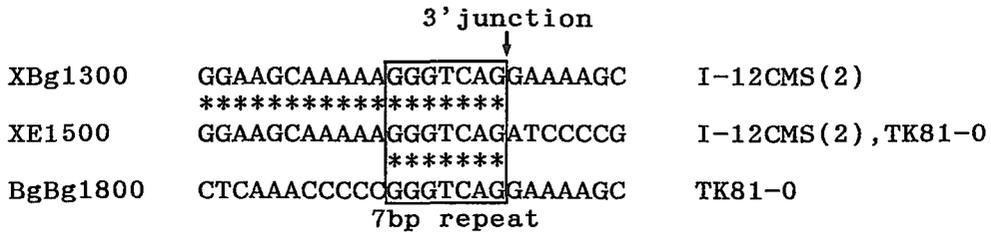


Fig. 4-16 Sequence alignment of the homologous portions of 1300 bp Xho I-Bgl II subclone (XBg1300) from I-12CMS(2) (S-2 cytoplasm), 1500 bp Xho I-EcoRI subclones (XE 1500) from I-12CMS(2) and TK81-0, and 1800 bp Bgl II subclone (BgBg 1800) from TK81-0. The 7 bp sequence common to all three sequences is boxed.

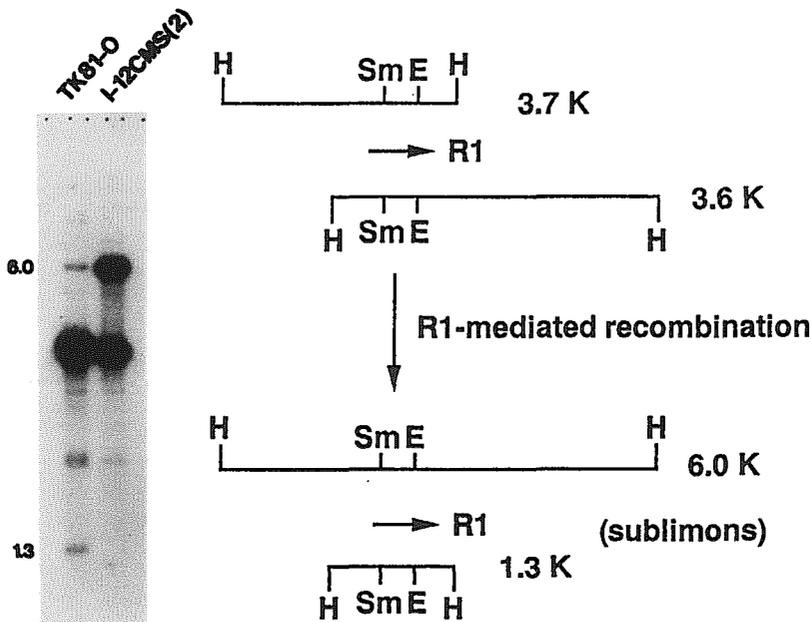


Fig. 4-17 Detection of Hind III fragments corresponding to the predicted products of recombination across the R1 repeats. TK81-0 and I-12CMS(2) (S-2 cytoplasm) mtDNAs were digested with Hind III and hybridized with the 250 bp Sma I-EcoRI fragment. Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

よう。また、フダンソウの中には *atp A* のコード域の 3' 側で構造変異を起こしている *atp A* 配列も見出された。今後、この様な *atp A* 偽遺伝子が如何なる機構により生じたかを考察するために、反復配列の同定とサブリモン分子のクローン化および構造解析を進め、テンサイにおける *atp A* 遺伝子の進化について調べる必要がある。

第5章 *atp 6* 遺伝子の構造と発現

緒言

atp 6 遺伝子は ATP 合成酵素複合体 F_0 ドメインのサブユニット 6 をコードするミトコンドリア遺伝子である。植物ではトウモロコシの *atp 6* 遺伝子の構造が最初に決定された⁷³⁾。興味深いことに、この遺伝子のコード域内に含まれる 122 bp 配列がトウモロコシ *cox II* の近傍に見つかり、さらに 5' 上流域はトウモロコシ T 型 CMS 系統より単離されたキメラ遺伝子 *T-urf 13* の上流に反復して存在する。またダイズからは 2 コピーの *atp 6* 遺伝子がクローン化されたが、読み取り枠の 5' 端にはそれぞれ *cox II* あるいは *atp 9* 遺伝子との短い相同配列が見出された⁷⁴⁾。*atp 6* 遺伝子と mtDNA 再編成との密接な関連性を示唆するデータは他の植物種でも得られている。特に *atp 6* 遺伝子を含む遺伝子変異が CMS の発現に関連していることが、トウモロコシ T 型および C 型 CMS 系統^{8,47)}をはじめ、ハツカダイコン¹⁰⁾、イネ⁴⁸⁾ およびナタネ^{12,75)} CMS 系統で報告されており、CMS の分子機構を考察する上で注目される。本章ではテンサイの正常系統と S 型および S-2 型 CMS 系統より *atp 6* 遺伝子を単離し、その分子構造と転写機構を比較解析した。

材料および方法

テンサイの正常系統 (TK81-0, I-12 61L) および 5 種の CMS 系統 (TK81-MS, I-12CMS(R), I-12CMS(2), I-12CMS(3), I-12CMS(7)) の計 7 系統の肥大根より第 2 章に述べた方法で mtDNA, mtRNA を調製し、実験に供試した。DNA および RNA 解析法は第 2 章、第 3 章に詳述した。

結果

1. 塩基配列

第 2 章に述べたようにマツヨイグサ *atp 6* プロー

ブ (Table 2-2) を用いてテンサイ正常系統 (TK81-0) の mtDNA の EcoRI 分解物との間でサザンハイブリダイゼーションを行うと 4.2 kbp 断片との間で分子雑種が形成される (Fig. 5-1, Table 2-3)。この断片をクローン化し、塩基配列を決定した。Figs. 5-2, 5-3 に示すように、750 bp からなる *atp 6* が同定された。テンサイ *atp 6* はこれまでに報告された *atp 6* の内でサイズが最も小さい。テンサイ *atp 6* とタバコ *atp 6* 対応域⁷⁶⁾ をヌクレオチドレベルで比較した場合 95.2% という高い相同性を示した。また、開始コドンから数えて、14 bp 上流には、5'-TCCATTCT-3' という SD 様配列が存在するが、これはテンサイ *atp A* の上流に見いだされた SD 様配列 (5'-TCTATTCT-3') (Fig. 4-3) と酷似している。

2. CMS 系統における *atp 6* の構造

Fig. 5-1 に示すように、マツヨイグサ *atp 6* プローブは S, S-2, S-3 および S-4 型 CMS 系統よ

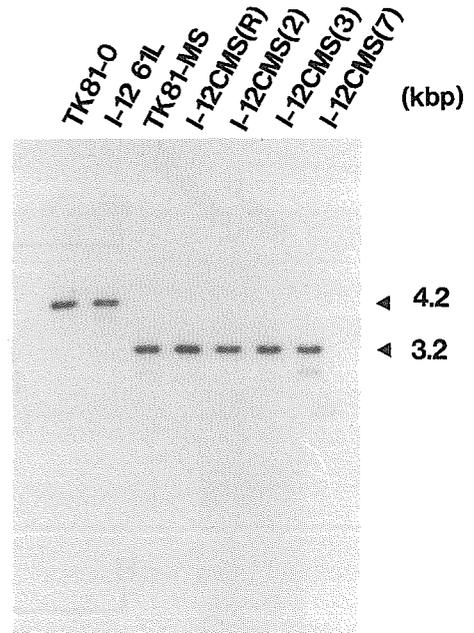


Fig. 5-1 Southern blot analysis of mtDNAs from the normal and CMS lines. MtDNA was digested with EcoRI and electrophoresed in 0.8% agarose gel. The DNA was transferred onto a Nylon membrane filter and hybridized with radiolabeled *Oenothera atp 6* probe (see Table 2-2). Sizes of the hybridized fragments are indicated in kbp.

り抽出した mtDNA の 3.2 kbp EcoRI 断片とハイブリダイズする。CMS 系統における *atp 6* 遺伝子を解析するため、3.2 kbp EcoRI 断片とこれのオーバーラッピング Pst I 断片を S 型 CMS 系統 (TK81-MS) および S-2 型 CMS 系統 (I-12CMS (2)) よりクローン化し、分析を行った (これ以降、TK81-0 由来の *atp 6* を *Natp 6*, TK81-MS 由来の *atp 6* を *Satp 6* ならびに I-12CMS(2) の *atp 6* を *S-2atp 6* と省略)。制限酵素切断地図を比較すれば、3' 下流域についてはいずれも *Natp 6* と構造が等しいと推定されるのに対して、5' 上流域では *Satp 6* および *S-2atp 6* ともにコード減に近接した部位で構造変異が起きていることが示唆された (Fig. 5-2)。塩基配列分析の結果をまとめて Fig. 5-3 に示す。コード域に関しては *Satp 6* の 435 番目の塩基が C に置換 (*Natp 6* の対応位置は T) し、また *S-2atp 6* の 210 番目が G に変化 (*Natp 6* の対応位置は T) していたが、いずれの塩基置換もコドンの 3 文字目に生じており、アミノ酸配列の変化はもたらさない。それに対して、5' 上流域では、*Satp 6* も *S-2atp 6* も共に開始コドンの上流 41 bp からの構造が異なっている。

型 CMS 系統においては *atp 6* 遺伝子の上流に 525 bp の ORF (*Sorf 1*) が存在し、*atp 6* と共転写されるという。本実験では S-2 型 CMS 系統について *atp 6* 上流域の塩基配列を決定し、ORF の検索を試みた。S 型 CMS 系統の *atp 6* 上流域 (XUE and THOMAS 私信) と比較すると、塩基置換や数 bp の欠失がみられ、*Sorf 1* に当たる読み取り枠を組むことは難しい。その代り、他のアミノ酸をコードする ORF (*S-2orf* と命名) が同定された (Fig. 5-2)。*Sorf 1* と比較した場合、塩基配列では 86%、アミノ酸配列で 54% の相同性が示された。ちなみに、*Sorf 1* と *S-2orf* の両者について翻訳産物の hydrophathy を解析してみると、いずれも疎水性の領域が繰り返して現れており、膜に貫通して存在するタンパク質の特性を備えている。このような特性は、トウモロコシ T 型 CMS 系統の *T-urf 13⁷⁾*、ハツカダイコン CMS 系統の *orf 105¹⁰⁾* およびナタネ CMS 系統の *orf 224¹²⁾* 等の翻訳産物にも見出されている。なお S 型 CMS 系統の *Sorf 1* 上流域と S-2 型 CMS 系統の *S-2orf* 上流域について制限酵素切断地図を比較したところ、少なくとも *atp 6* の上流約 1.3 kbp からの構造が互いに著しく異なることが判明した (Fig. 5-2)。

3. CMS 型 *atp 6* の上流に見出された ORF

XUE and THOMAS (私信) によれば、テンサイ S

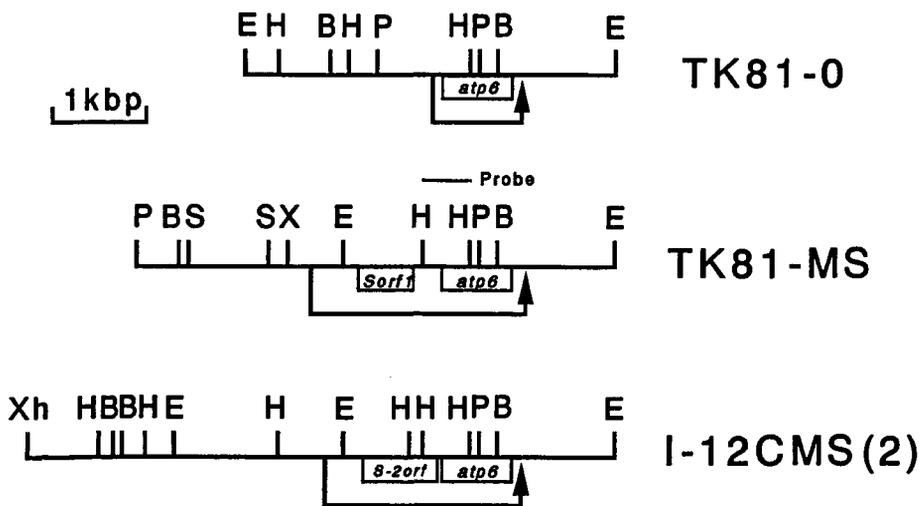


Fig. 5-2 Restriction maps of the mtDNA regions containing *atp 6* gene from TK81-0, TK81-MS (S cytoplasm) and I-12CMS(2) (S-2 cytoplasm). The open boxes show ORFs. The transcribed sequences are also indicated by arrow. The location and extent of the probe DNA for Northern blot analysis in Fig. 5-4 is indicated over the map. Restriction sites are B, Bgl II; H, Hind III; P, Pst I; S, Sma I; X, Xba I; and Xh, Xho I.

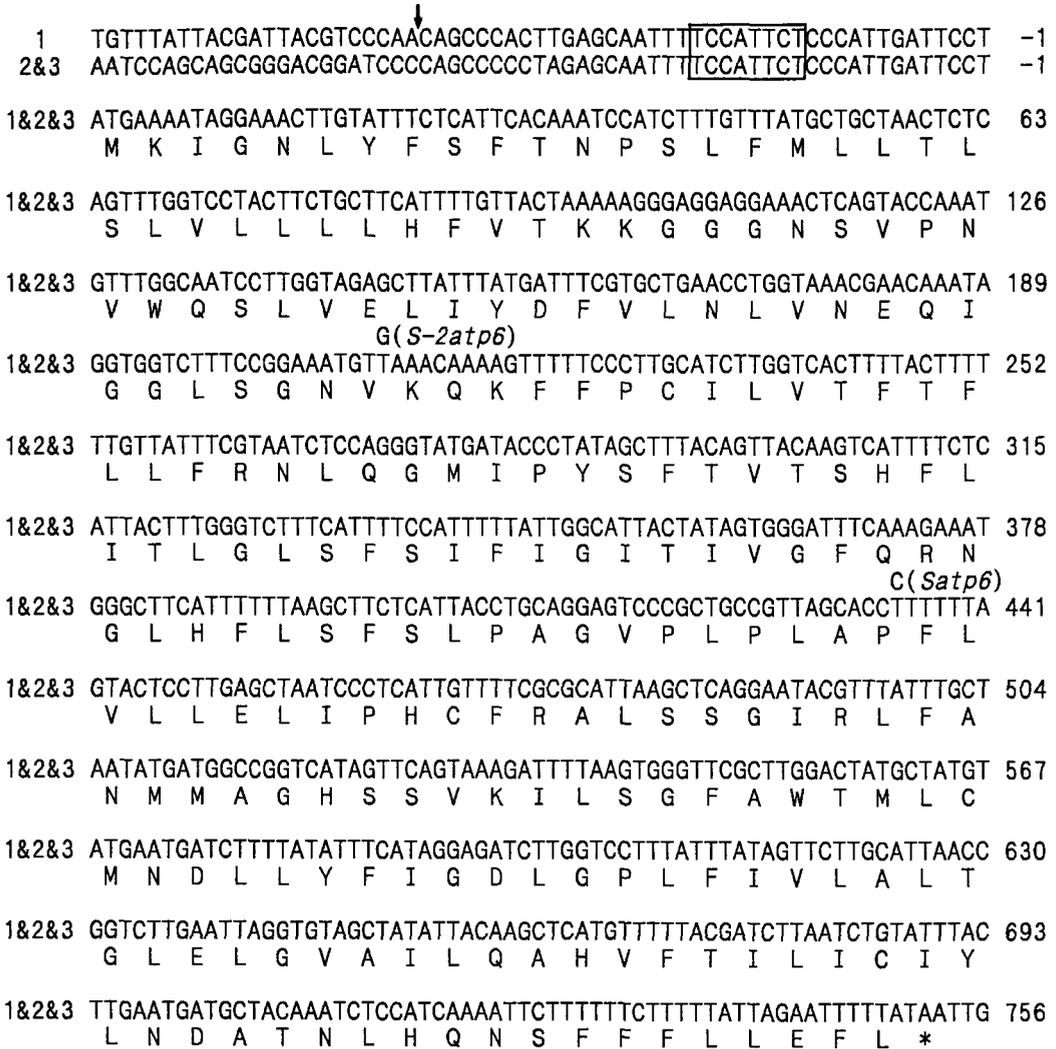


Fig. 5-3 Nucleotide and derived amino acid sequences of *Natp 6*(1), *Satp 6*(2) and *S-2atp 6*(3) genes. *Natp 6* sequence is aligned with *Satp 6* and *S-2atp 6* sequences. Numbering of nucleotides is from the predicted translation start of *atp 6*. The predicted amino acid sequences are translated according to the universal code. The putative ribosome binding site is boxed. Vertical arrow indicates the point of sequence divergence. Nucleotides found in *Satp 6* and *S-2atp 6* which differ from those in *Natp 6* are indicated above *Natp 6* sequence.

4. 転写分析

今回、構造決定した3種の*atp 6*についてその転写パターンを比較した。TK81-0, I-12 61L, TK81-MS, I-12CMS(R), I-12CMS(2), I-12CMS(3)およびI-12CMS(7)の肥大根より調製したmtRNAをナイロンメンブランフィルターにトランスファーし、ノーザンブロット分析を行った。用いたプローブは、*Satp 6*クローン中の*atp 6*コード域を含む450 bp Hind III断片 (Fig. 5-2)で

ある。Fig. 5-4に示すように正常系統(TK81-0, I-12 61L)で0.95 kb, S型CMS系統(TK81-MS, I-12CMS(R))で2.3 kb, 異型CMS系統(I-12CMS(2), I-12CMS(3), I-12CMS(7))では2.2 kbに相当する主要転写産物が検出された。

考 察

正常系統とS型およびS-2型CMS系統より単離した*atp 6*の構造比較を行った。制限酵素切断地

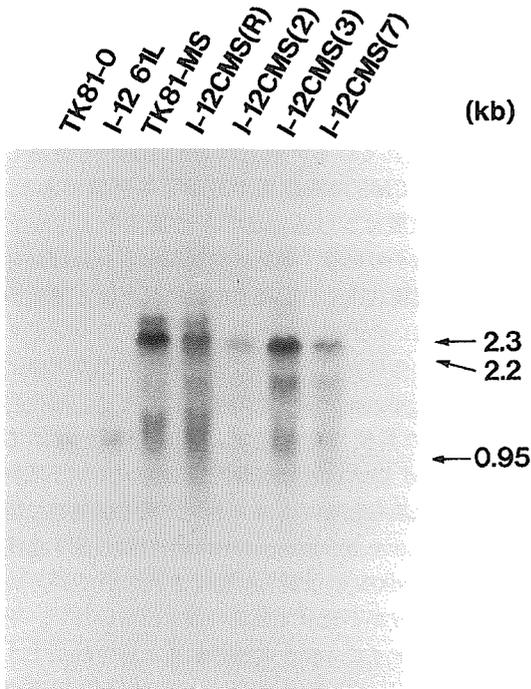


Fig. 5-4 Northern blot analysis of the *atp 6* locus from the normal and CMS lines. MtRNA was electrophoresed in 1% agarose-formamide gel, transferred onto a Nylon membrane filter, and hybridized with the sugar beet *atp 6* probe (450 bp Hind III fragment shown in Fig. 5-2). Sizes of transcripts are indicated in kb.

図に基づけば、3' 隣接域の構造は互いに共通と考えられる。これに対して、5' 隣接域には多型がみられた。*Satp 6* と *S-2atp 6* はいずれも *Natp 6* と比べた場合、コード域に近接した部位で構造変異を起こしており XUE and THOMAS のデータ (私信) に従えば、*Satp 6* の上流には *Sorf 1* が存在すると予想される。他方、*S-2atp 6* の上流には *Sorf 1* とは構造を異にする *S-2orf* を今回見出した。このことは *atp 6* 上流域の ORF が CMS 発現と関係あるとすれば、CMS の生起機構が S 型と S-2 型で異なることを示唆する。しかも、*Satp 6* と *S-2atp 6* 間でも開始コドンの上流 1.3 kbp から大きな再編成を生じている可能性が高い。

XUE and THOMAS (私信) によれば、テンサイ *atp 6* 転写物の 3' 端は正常系統および S 型 CMS 系統ともに *atp 6* の下流 100-200 bp の範囲内にマッピングされるという。さらに XUE らは、S 型 CMS

系統では *atp 6* が 5' 上流に存在する *Sorf 1* と共転写されることも見出した。これは今回行ったノーザンプロット分析でも確かめられ、*Natp 6* と *Satp 6* の転写開始点は全く異なるとみてよい。また、S-2 型 CMS 系統の *atp 6* の 5' 上流域に見出された *S-2orf* についても *atp 6* と共転写されているようである。*Sorf 1* と *S-2orf* は予備的に行ったサザンプロット分析に基づく限り、正常系統のミトコンドリアゲノムには含まれておらず、CMS 発現との関連性に興味もたれる。CMS 系統において *atp 6* の上流に ORF が密接に連鎖し、共転写されているという事例がハツカダイコン¹⁰⁾ やナタネ^{12,75)} の CMS 系統でも報告されている。ただ、これらの ORF 間に塩基配列の目立った相同性は見られず、またその機能も不明のままである。今後、さらに詳しい転写解析や翻訳物レベルの解析を行い、テンサイにおける CMS 発現との関連を調べる必要がある。

第 6 章 総合論議

高等植物のミトコンドリアゲノムには、rRNA 遺伝子、tRNA 遺伝子、リボソームタンパク質サブユニット遺伝子、 F_1F_0 -ATP 合成酵素サブユニット α 、6 および 9 遺伝子、シトクロム酸化酵素サブユニット I、II および III 遺伝子、シトクロムアポタンパク質 b 遺伝子、NADH 脱水素酵素サブユニット 1、2、3、4 および 5 遺伝子等がコードされている⁷⁸⁾。いずれの遺伝子も呼吸代謝に必要不可欠であり、これらの遺伝子に生ずる突然変異の多くは致死的と予想される。従って、高等植物では嫌気条件下でも生存可能な酵母とは異なり、ミトコンドリア遺伝子の突然変異体が得られにくい。その点で CMS はトウモロコシの NCS (non-chromosomal stripe) 突然変異⁷⁹⁾ や胡麻葉枯病感受性変異⁸⁰⁾ とともに数少ない、非致死性のミトコンドリア遺伝子突然変異とすることができる。CMS 植物のミトコンドリアからは、しばしば多様な突然変異遺伝子が発見される。これらの変異遺伝子は、①転写調節領域の塩基配列が別の配列と置き換わった遺伝子 (トウモロコシの C 型 CMS 系統の *cox II*, *atp 6*, *atp 9*⁴⁷⁾、②既知のミトコンドリア遺伝子コード域を含む組換えの結果、生じたキメラ遺伝子 (トウモロコシ T 型 CMS 系統の *T-urf 13*⁸⁾；ペチュニア CMS 系統の *S-pcf*⁹⁾；ソルガム CMS 系統の *cox I*¹⁾；ナタネ CMS 系統の *orf 224*¹²⁾、③遺伝子隣接

域に起こった複雑な再編成により生み出された新たな ORF (ハツカダイコン CMS 系統の *orf* 105¹⁰⁾; ヒマワリ CMS 系統の *orf* H522⁶²⁾ に大別することができる。いずれの変異遺伝子にも共通しているのは変異の成因が塩基置換によるものではなく主として組換えに基づく点である。これは塩基置換変異の集積によって進化してきたとされる動物ミトコンドリアゲノムとは対照的といつてよい。

本研究ではテンサイ CMS の分子機構解明の基礎として、9 種のミトコンドリア遺伝子の構造を正常系統と CMS 系統間で比較した。その結果、*cox II*, *atp A* および *atp 6* の 3 種のミトコンドリア遺伝子座において、ゲノム再編成の産物と推定される突然変異を見出した。例えば、*cox II* の場合、S 型 CMS 系統から 5' 隣接域の再編成により転写調節領域の変化した *Scox II*-1 ならびにコード域 3' 端から構造変異を起こしたキメラ遺伝子 *Scox II*-2 が同定された。転写調節域に組換えが起こり、これが転写パターンにも影響を及ぼしている変異遺伝子は *atp A* や *atp 6* 遺伝子座にも見いだされた。特に *atp 6* においては、XUE and THOMAS (私信) のデータも参考にすれば *Satp 6*, *S-2atp 6* の 5' 上流域には新たな ORF が形成され、*Satp 6*, *S-2atp 6* と共転写されており、*atp 6* 単独で転写される *Natp 6* 座と著しく異なることが判った。これは、トウモロコシ T 型 CMS 系統における *T-urf 13* と *orf 25*⁶¹⁾、ハツカダイコン CMS 系統の *orf 105* と *atp 6*¹⁰⁾、ヒマワリ CMS 系統の *atp A* と *orf* H522⁶²⁾ あるいはベチュニア CMS 系統における *S-pcf* と *ndh 3*, *rps 12*⁶²⁾ のように CMS 関連遺伝子が近くに位置するミトコンドリア遺伝子と同じ転写単位を構成している事例と酷似する。このように本研究では、テンサイ CMS の発現に関与する可能性のあるミトコンドリア遺伝子を *cox II*, *atp A*, *atp 6* の 3 種に絞った上で解析を進めた。

CMS 遺伝子は稔性回復核遺伝子と共存した場合、その転写パターンが変化することも充分に考えられる。著者は S 型細胞質を有する稔性回復系統より mtRNA を抽出し、*cox II*, *atp A*, および *atp 6* 遺伝子プローブとの間でノーザンブロット分析を試みた。予備実験の結果によれば、稔性回復核遺伝子は、いずれのミトコンドリア遺伝子の転写にも影響を及ぼさないようである。ただ、稔性回復遺伝子は翻訳レベルで作用する可能性も充分考えられるの

で、*in vitro* 翻訳実験やウェスタンブロット分析を活用し、タンパク質レベルでの詳細な解析を行う必要があるであろう。トウモロコシやベチュニアでの研究を含めて、CMS 機作を解明するには、次のような問題点が残されている。例えば HANSON⁴⁾ も指摘したように、CMS は葯組織で発現する形質であり、当然、葯組織における mtDNA の構造やミトコンドリア遺伝子の転写・翻訳機構が調べられねばならないが、実験技術上の困難さゆえにほとんど解析が進んでいないのが現状である。また、ミトコンドリア遺伝子の突然変異と花粉退化現象との因果関係については、ミトコンドリア内膜を介して進む酸化リン酸化の共役反応の障害にその原因を求める FORDE and LEAVER の仮説⁶³⁾ あるいは CMS 系統に特異的にみられるミトコンドリア電子伝達第二経路 (alternative oxidase pathway) の活性低下に注目した HANSON の仮説⁴⁾ が提起されているが、いずれも裏付けが不十分で仮説の域を出ていない。その上、テンサイの *atp 6* の解析結果に示されたように、植物ミトコンドリアゲノムには機能不明の ORF が少なからず含まれていると予想される。従って、CMS コード遺伝子の同定には、一方でミトコンドリアゲノムの全一次構造の決定が急務であると共に、ミトコンドリアを標的とする形質転換など新しい解析手法の開発が望まれる。

一方、本研究を通じてミトコンドリアゲノムの突然変異遺伝子の生起機構や進化を考察する上で、示唆的なデータが得られた。S 型細胞質を特徴づける *Scox II* の 5' 隣接域をめぐる解析結果はその好例といえる。第 3 章に詳述した如く、*Scox II* 5' 隣接域との相同配列が野生種である *B. maritima* (SP581103-0), *B. adanensis* (Egypt), *B. trigyna* (SP753012-0) の各系統にも見出された (4.6 kbp Hind III 断片, Fig. 3-7)。この配列は S-3, S-4 型の両細胞質にも共通して含まれていたが、S-3, S-4 型の両ゲノムはこれに加えて、さらに 1 コピー (6.3 kbp Hind III 断片, Fig. 3-7) の *Scox II* 5' 隣接域相同配列を有する。他方、S-2 型細胞質からは S-3 や S-4 型と共通の 6.3 kbp Hind III 断片に含まれる相同配列のみが見いだされた。しかも 6.3 kbp Hind III 断片中の *Scox II* 5' 隣接相同配列の末端は *Scox II* の ATG 開始コドンの位置にあり、そのため S-2 型ゲノム中の *cox II* (*Ncox II* 遺伝子と構造が等しい) との間で 52 bp に亘る配列が

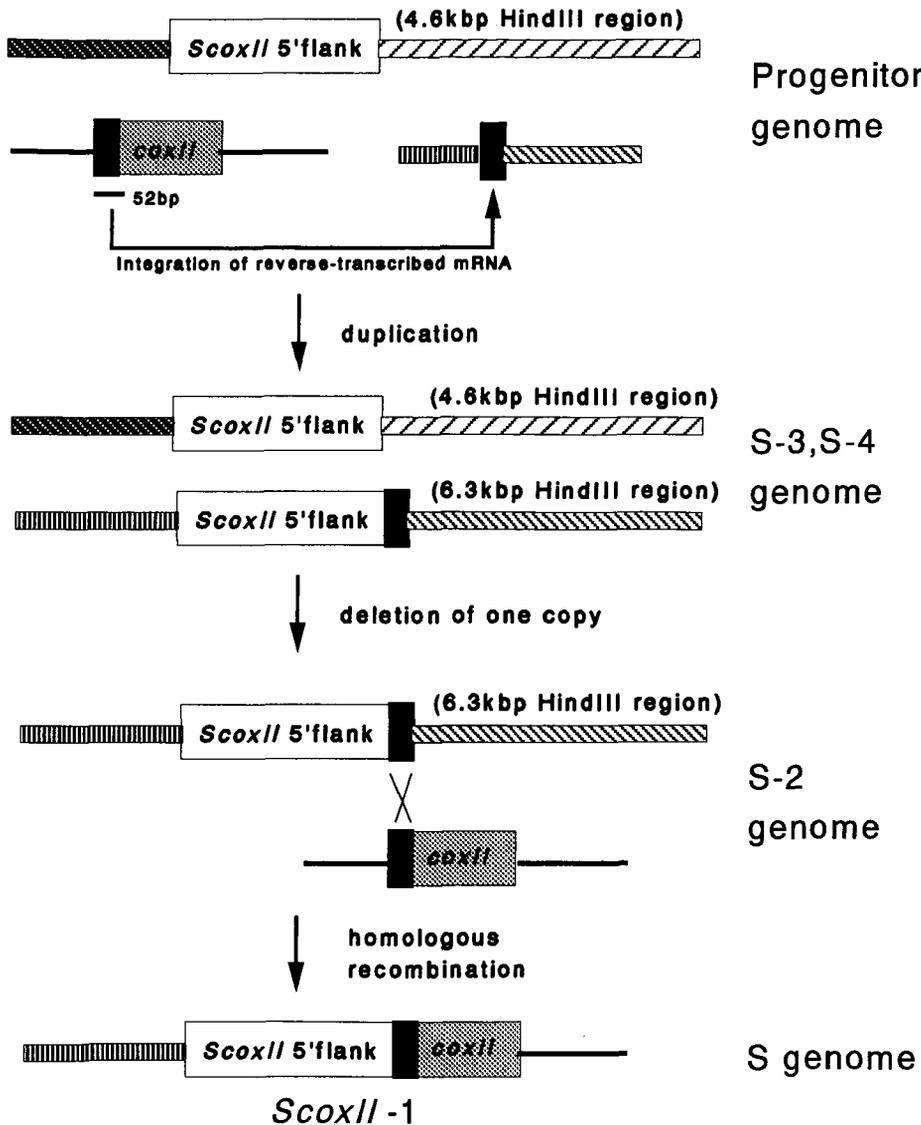


Fig. 6-1 Model for the generation of *Scox II*-1 gene. The open box represents *Scox II* 5' flank sequence, while the stippled box shows the *cox II* coding region. The black box indicates the 52 bp homology sequence. The explanation is based upon the data shown in Figs. 3-7 and 3-8.

共有される (Fig. 3-8)。以上の結果をもとにすれば、次のような *Scox II* 誕生のシナリオ (Fig. 6-1) を描くことができよう。すなわちテンサイ祖先型のミトコンドリアゲノムにおいて、まず、*Scox II* 5' 隣接域相同配列の重複が起こり、その重複コピーが、偶然 52 bp 配列に隣接して配置された (S-3, S-4 型ゲノム) と考えられる。その後、例えば loop out 型分子内組換え等により、4.6 kbp Hind III 断片域が失われ (S-2 型ゲノム)、さらに S-2 型 *cox II*

と *Scox II* 5' 隣接域の間で 52 bp 反復配列を介した組換えが起こった結果、*Scox II*-1 が生じた (S 型ゲノム) というのが概要である。

最近、ANDRÉ et al.⁸⁴⁾ は植物ミトコンドリアゲノム中にしばしば発見される短い反復配列の起源とその進化的意義に関して注目すべき考察を加えている。その論考によれば、短い反復配列はミトコンドリア遺伝子 mRNA のプロセッシング産物が逆転写を受け、ゲノムに挿入されることによって生じた

推定される。反復配列の長さは通例、6~689 bp と短いのでこれを介した相同組換えの頻度は極めて低いと想像されるが、進化の長い過程には、こうした稀な相同組換えの起こる機会もあったに違いない。短い反復配列に基づく組換えの結果、塩基配列の多様な配置換え (shuffling) が生じ、これがサブリモン分子に集積してミトコンドリアゲノム進化の原動力となったとする ANDRÉ et al. の論考は一考に値する。テンサイにおいては、*cox II* 5' 隣接域の 52 bp 反復配列に加えて、*S-2atp A* 3' 隣接域の 406 bp 配列もミトコンドリアゲノム内に重複して存在し、相同組換えを担い得ることが示された (Fig. 4-14)。52 bp 配列および 406 bp 配列も遺伝子の転写領域内に含まれている可能性が高く、逆転写産物に由来したことも十分に考えられる。また、それぞれの反復配列間で相同性を調べると 52 bp 配列に関しては 1 個の塩基置換、406 bp 配列については 4 個の塩基置換が見出され、組換え頻度が低いために反復配列間のコピー修正機構が十分に働かなかったことがうかがわれる。Fig. 6-1 に示した *cox II* 遺伝子の進化モデルに基づけば、ここに供試した 4 種の CMS 細胞質は互いに別個の系譜をたどって分化してきたとみるよりもむしろ、S-3 型、S-4 型群と S-2 型がまず分岐し、次いで S-2 型から S 型が分岐したと考える方が妥当のようである。もちろん CMS 細胞質の分化過程の全容を解明するには、今後ミトコンドリアゲノム全体についての詳細な構造比較を行わねばならない。ただ興味深いことに、2000 年を越える栽培の歴史を持つフダンソウの中には、正常細胞質の外に S-3、S-4 型細胞質やその祖先型と推定されるような細胞質を有する遺伝子型も見いだされた。BOUTIN et al.⁸⁵⁾ および SAUMITOU-LAPRADE et al.⁸⁶⁾ によればフランス大西洋岸に自生する *B. maritima* 集団中には正常株ならびに S とは異型の細胞質を有する CMS 株が混在しているという。このような材料を多数供試し、その mtDNA を調査することによって CMS 細胞質の成立過程が解明されるものと期待される。

摘 要

1. 本研究では、テンサイの細胞質雄性不稔性 (CMS) の分子的機構を明らかにするため、正常系統 (TK81-0, I-12 61L), S 型 CMS 系統 (TK81-MS, I-12CMS(R)) および S 型とは異型の S-2,

S-3, S-4 型 CMS 系統 (I-12CMS(2), (3) および (7)) についてミトコンドリア遺伝子の構造と発現に関する比較解析を行った。

2. 正常型および 4 種の CMS 型 mtDNA を BamHI, EcoRI あるいは Hind III で完全分解し、9 種のミトコンドリア遺伝子 (*cox I*, *cox II*, *cox III*, *cob*, *atp A*, *atp 6*, *atp 9*, *rrn 26*, *rrn 18*) をプローブに用いてサザンブロット分析を行った。その結果、*cox I* と *rrn 18* を除く 7 種のプローブを用いた場合に多型が検出された。

3. 多型の検出された 7 種のミトコンドリア遺伝子のうち、*rrn 26* に関しては、ノーザンブロット分析によって正常および CMS 系統ともに同一の転写パターンを示し、CMS との関連は少ないと考えられた。また、*atp 9*, *cox III*, *cob* の 3 遺伝子をプローブとした場合には、S 型 CMS 系統のみを特徴づける RFLP 像が検出されたが、正常系統 (TK81-0) と S 型 CMS 系統 (TK81-MS) より多型断片をクローン化し、制限酵素切断地図を作成したところ、いずれの遺伝子においてもタンパク質コード域から、かなり離れた部位に構造変異の起きていることがわかり、これらの変異が遺伝子発現に影響を及ぼす可能性は少ないと推察される。これに対して、*cox II*, *atp A* および *atp 6* の 3 遺伝子については、CMS 系統でコード領域に近接した部位に構造変異の起きていることが見出されたので、これらの遺伝子に関しては、さらに塩基配列と転写分析を試みた。

4. 正常型 mtDNA の *cox II* (*Ncox II*) は単一コピーであり、1463 bp のイントロンによって、5' エキソン (382 bp) と 3' エキソン (398 bp) に分断されている。これに対して S 型 mtDNA からは、*cox II* クロームが 2 種類 (*Scox II-1*, *Scox II-2*) 得られた。塩基配列分析の結果、これらの *Scox II-1* および *Scox II-2* は *Ncox II* と比べて、開始コドンの 5' 上流 50 bp からの塩基配列が相同性を全く失っていることが判明した。この領域は転写調節にかかわると考えられるが、事実、*Ncox II* の転写物は 1.3 kb であるのに対して、S 型ミトコンドリアからは 1.6 kb のメジャー転写物と 2 種のマイナー産物が得られた。一方、*Scox II-2* においては、3' エキソン内に組換えが起こり、その結果 ORF が 3' 側に 101 コ

ドン分伸長していることがわかった。

5. *Scox II-1* は S-2 型 (I-12CMS(2)) タイプの祖先型ミトコンドリアゲノムにおいて *cox II* 遺伝子と *Scox II-1* の 5' 上流相同域の間で 52 bp の相同配列を介した組換えが起こることによって生じた可能性が高い。また *Scox II-2* は *Scox II-1* 座に生じたゲノム再編成 (flip-flop 型組換え, または塩基配列の重複・転移) の産物と推定される。

6. 正常系統 (TK81-0) の *atp A* 遺伝子 (*Natp A*) は 1518 bp から成り, コード域内に 3 箇所の C→U エディティングを見出したが, いずれも, プロリンからロイシンへのアミノ酸変換をもたらす修飾であった。

7. S 型 (TK81-MS) および S-2 型 CMS (I-12CMS(2)) 系統より *atp A* 遺伝子をクローン化し, 構造を決めた (*Satp A*, *S-2atp A* と省略)。いずれの *atp A* もコード域の塩基配列は *Natp A* と同一であった。しかし, *Natp A* と *Satp A* 間では開始コドンから数え, わずか 47 bp 上流より構造変異が生じている。他方, *S-2atp A* については, 5' 上流域の構造は, *Natp A* と変わらないものの, 3' 隣接域 (終止コドンの下流 393 bp) に組換えが見出された。また, ノーザンプロット分析の結果によれば *S-2atp A* における 3' 隣接域の構造変異は転写パターンには影響を及ぼさない。それに対して, *Satp A* は *Natp A* と異なる転写物が得られ, RNase プロテクション分析とプライマー伸長法によって, mRNA の 5' および 3' 末端を同定したところ, 5' 隣接域の構造変異が転写に直接影響していることが判明した。

8. *S-2atp A* を特徴づける 3' 隣接域が正常系統 (TK81-0) および S 型 CMS 系統 (TK81-MS) の mtDNA に存在し, その上, S-2 型 CMS 系統の mtDNA 中では反復していることが明らかとなった。これらの配列は *Natp A* と 406 bp の配列を共有する。したがって, 祖先型ゲノムにおいて, この 406 bp 配列を介した相同組換えにより, *S-2atp A* 構造の生じた可能性が示唆される。

9. 正常系統 (TK81-0) の mtDNA よりクローン化した *atp 6* 遺伝子 (*Natp 6*) は 750 bp から成り, 0.95 kb の mRNA が転写されている。これに対し

て, S 型 (TK81-MS) および S-2 型 CMS 系統 (I-12CMS(2)) ではそれぞれ 2.3 kb ならびに 2.2 kb の *atp 6* 転写物が検出された。これは, TK81-MS *Satp 6* (*Satp 6*) と I-12CMS(2) *atp 6* (*S-2atp 6*) において共に開始コドンの上流 41 bp から構造変異が生じ, *Satp 6* の上流に *Sorf 1* が, また *S-2atp 6* の上流には *S-2orf* が配置され, これらの ORF が下流の *atp 6* と共転写されるためとみられた。*Sorf 1* と *S-2orf* の塩基配列の相同性は 86% 程度であるが, アミノ酸配列から推定して, 共にミトコンドリア内膜を貫通して存在するタンパク質をコードし得ることが示された。

謝 辞

本研究の遂行と取りまとめに終始懇切なる御指導を賜った北海道大学農学部教授木下俊郎博士に心より感謝の意を表す。また, 本論文において御校閲の労をとられた北海道大学農学部教授島本義也博士に厚くお礼を申し上げる。北海道大学農学部教授三上哲夫博士には本論文の完成に至るまで暖かい御指導と多大な御援助を頂いた。衷心より謝辞を表す。研究の遂行に当たり, 貴重な材料を分譲して頂いた名古屋大学農学部教授中村研三博士, 東京大学農学部教授平井篤志博士, 植物工学研究所今村順博士, 北海道農業試験場増谷哲雄博士ならびに北海道大学農学部助手阿部純博士の各位に謹んで謝意を表したい。北海道大学遺伝子実験施設長杉本和則博士ならびに前施設長谷藤茂行博士には同施設の利用に際し, 快く受け入れて頂いた。北海道大学農学部助教森宏一博士, 同大学農学部助手高牟礼逸朗博士, 同大学理学部講師中島登博士, 同大学遺伝子実験施設助教高木信夫博士, 同施設助手吉田郁也博士, 同施設技官木村宏博士, 名古屋大学遺伝子実験施設教授杉浦昌弘博士, 弘前大学農学部助教原田竹雄博士ならびに宮崎大学農学部助手貴島祐治博士には多くの御助言と御指導を頂いた。北海道大学農学部事務官室井玲子女史, 同大学遺伝子実験施設事務官齊藤厚子女史, 同大学農学部金沢俊成博士ならびに同大学農学部助手高橋肇博士には多くの激励の御言葉と御協力を頂いた。北海道大学付属農場技官島山明氏には栽培管理について御指導を頂いた。

本研究には北海道大学農学部作物育種学講座ならびに遺伝子実験施設の大学院・学生諸氏の御協力に負うところが大きかった。

なお、文部省科学研究費の補助を得、著者は日本学術振興会の特別研究員として本研究を推進することができた。ここに記して御厚志に対する謝辞をしたい。

引用文献

1. LASER, K. D. and LERSTEN, N. R.: Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot. Rev.* 38: 425-454. 1972
2. LEVINGS, C. S. III and PRING, D. R.: Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic male-sterile maize. *Science* 193: 158-160. 1976
3. FORDE, B. G., OLIVER, R. J., and LEAVER, C. J.: Variation in mitochondrial translation products associated with male sterile cytoplasm in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3841-3845. 1978
4. HANSON, M. R.: Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annu. Rev. Genet.* 25: 461-486. 1991
5. PALMER, J. D., and SHIELDS, C. R.: Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature* 307: 437-440. 1984
6. LONSDALE, D. M., HODGE, T. P. and FAURON, C. M. R.: The physical map and organization of the mitochondria genome from fertile cytoplasm of maize. *Nucleic Acids Res.* 12: 9249-9261. 1984
7. WALLACE, D. C., SINGH, G., LOTT, M. T., HODGE, J. A., SCHURR, T. G., LEZZA, A. M. S., ELSAS, L. J. II and NIKOSKELAINEN, E. K.: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's Heredity Optic Neuropathy. *Science* 242: 1427-1430. 1988
8. DEWEY, R. E., TIMOTHY, D. H. and LEVINGS, C. S. III: Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* 44: 439-449. 1986
9. YOUNG, E. G. and HANSON, M. R.: A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50: 41-49. 1987
10. MAKAROFF, C. A., APEL, I. A. and PALMER, J. D.: The *atp 6* coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic male-sterile radish. *J. Biol. Chem.* 264: 11706-11713. 1989
11. BAILEY-SERRES, J., HANSON, D. K., FOX, T. D. and LEAVER, C. J.: Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome *c* oxidase subunit I gene in sorghum. *Cell* 47: 567-576. 1986
12. SINGH, M. and BROWN, G. G.: Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. *Plant Cell* 3: 1349-1362. 1991
13. OWEN, F. V.: Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beet. *J. Agr. Res.* 71: 423-440. 1945
14. POWLING, A.: Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from sugar beet with normal and male-sterile cytoplasm. *Heredity* 49: 117-120. 1982
15. POWLING, A. and ELLIS T. H. N.: Studies on the organelle genomes of sugar beet with male-fertile and male-sterile cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 65: 323-328. 1983
16. MIKAMI, T., SUGIURA, M. and KINOSHITA, T.: Molecular heterogeneity in mitochondrial and chloroplast DNAs from normal and male sterile cytoplasm in sugar beets. *Curr. Genet.* 8: 319-322. 1984
17. MIKAMI, T., SHINOZAKI, K., SUGIURA, M. and KINOSHITA, T.: Characterization of the chloroplast DNA from sugar beet with normal and male sterile cytoplasm. *Jpn. J. Genet.* 10: 695-700. 1984
18. MIKAMI, T., KISHIMA, T., SUGIURA, M. and KINOSHITA, T.: Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 71: 166-171. 1985
19. BOUTRY, M., FABER, A. M., CHARBONNIER, M. and BRIQUET, M.: Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products: Detection of variant polypeptides associated with cytoplasmic male sterility. *Plant Mol. Biol.* 3: 445-452. 1984
20. 木下俊郎, 三上哲夫: テンサイの自然起源雄性不稔性から由来する4種の異型細胞質の同定. *てん菜研究会報* 27: 20-28. 1985
21. WISE, R. P., PRING, D. R. and GENGENBACH, R. G.: Mutation to male fertility and toxin insensitivity in Texas(T)-cytoplasm maize is associated with a frameshift in a mitochondrial open reading frame. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2858-2862. 1987
22. FAURON, C. and HAVLIK, M.: The maize

- mitochondrial genome of the normal type and the cytoplasmic male sterile type T have very different organization. *Curr. Genet.* 15: 149-154. 1989
23. MAKAROFF, C. A. and PALMER, J. D.: Mitochondrial DNA rearrangement and transcriptional alterations in the male sterile cytoplasm of *Ogura* radish. *Mol. Cell. Biol.* 8: 1474-1480. 1988
 24. HANSEN, B. M. and MARCKER, K. A.: DNA sequence and transcription of a DNA minicircle isolated from male-fertile sugar beet mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 12: 4747-4756. 1984
 25. BREARS, T. and LONSDALE, D. M.: The sugar beet mitochondria genome: A complex organization generated by homologous recombination. *Mol. Gen. Genet.* 214: 514-522. 1988
 26. 久保友彦, 三上哲夫, 木下俊郎: テンサイミトコンドリアゲノムの物理地図. *てん菜研究会報* 33: 111-118. 1991
 27. HIESEL, R., SCHOBEL, W., SCHUSTER, W. and BRENNICKE, A.: The cytochrome oxidase subunit I and III genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promoter sequences. *EMBO J.* 6: 29-34. 1987
 28. McCARTY, D. M., HEHMAN, G. L. and HAUSWIRTH, W. W.: Nucleotide sequence of the *Zea mays* mitochondrial cytochrome oxidase subunit III gene. *Nucleic Acids Res.* 16: 9873. 1988
 29. GRABAU, E. A. and GENGEBACH, B. G.: Cytochrome oxidase subunit III gene from soybean mitochondria. *Plant Mol. Biol.* 13: 595-597. 1989
 30. MACFARLANE, J. L., WAHLEITHNER, J. A. and WOLSTENHOLME, D. R.: A gene for cytochrome oxidase subunit III (COXIII) in broad bean mitochondrial DNA: structural features and sequence evolution. *Curr. Genet.* 17: 33-40. 1990
 31. QUAGLIARIELLO, C., SAIARDI, A. and GALLERANI, R.: The cytochrome oxidase subunit III gene in sunflower mitochondria is cotranscribed with an open reading frame observed in higher plants. *Curr. Genet.* 18: 355-363. 1990
 32. GUALBERTO, J. M., DOMON, C., WEIL, J. H. and GRIENENBERGER, J. M.: Structure and transcription of the gene coding for subunit 3 of cytochrome oxidase in wheat mitochondria. *Curr. Genet.* 17: 41-47. 1990
 33. KALEIKAU, E. K., ANDRÉ, C. P. and WALBOT, V.: Sequence of the rice mitochondrial gene for cytochrome oxidase subunit 3. *Nucleic Acids Res.* 18: 371. 1990
 34. DAWSON, A. J., JONES, V. P. and LEAVER, C. J.: The apocytochrome b gene in maize mitochondria does not contain introns and is preceded by a potential ribosome binding site. *EMBO J.* 3: 2107-2113. 1984
 35. BOER, P. H., McINTOSH, J. E., GRAY, M. W. and BONEN, L.: The wheat mitochondrial gene for apocytochrome b: absence of a prokaryotic ribosome binding site. *Nucleic Acids Res.* 13: 2281-2292. 1985
 36. SCHUSTER, W. and BRENNICKE, A.: TAG-termination codon in the apocytochrome b gene from *Oenothera* mitochondria. *Curr. Genet.* 9: 157-163. 1985
 37. KALEIKAU, E. K., ANDRÉ, C. P., DOSHI, B. and WALBOT, V.: Sequence of the rice mitochondrial gene for apocytochrome b. *Nucleic Acids Res.* 18: 372. 1990
 38. XUE, Y., THOMAS, C. M. and DAVIES, D. R.: Nucleotide sequence and transcription of the sugar beet mitochondrial F₀F₁ ATPase subunit 9 gene. *Nucleic Acids Res.* 17: 8857. 1989
 39. FOX, T. D. and LEAVER, C. J.: The *Zea mays* mitochondrial gene coding cytochrome oxidase subunit II has an intervening sequence and does not contain TGA codons. *Cell* 26: 315-323. 1981
 40. HIESEL, R. and BRENNICKE, A.: Cytochrome oxidase II gene in mitochondria of *Oenothera* has no intron. *EMBO J.* 2: 2173-2178. 1983
 41. BONEN, L., BOER, P. H. and GRAY, M. W.: 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. 1984
 42. KAO, T., MOON, E. and WU, R.: Cytochrome oxidase subunit II gene from rice has an insertion sequence within the intron. *Nucleic Acids Res.* 12: 7305-7315. 1984
 43. MOON, E., KAO, T. and WU, R.: Pea cytochrome oxidase subunit II gene has no intron and generates two mRNA transcripts with different 5' termini. *Nucleic Acids Res.* 13: 3195-3212. 1985
 44. GRABAU, E.: Cytochrome oxidase subunit II gene is adjacent to an initiator methionine tRNA in soybean mitochondrial DNA. *Curr. Genet.* 11: 287-293. 1987
 45. PRUITT, K. D. and HANSON, M. R.: Cytochrome oxidase subunit II sequences in *Petunia*

- mitochondria: two intron-containing genes and an intron-less pseudogene associated with cytoplasmic male sterility. *Curr. Genet.* 16: 281-291. 1989
46. LIPPOK, B., BRENNICKE, A. and WISSINGER, B.: The *cox II* gene in carrot mitochondria contains two introns. *Mol. Gen. Genet.* 232: 322-327. 1992
 47. DEWEY, R. E., TIMOTHY, D. H. and LEVINGS, C. S. III: Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize. *Curr. Genet.* 20: 475-482. 1991
 48. KADOWAKI, K., SUZUKI, T. and KAZAMA, S.: A chimeric gene containing the 5' portion of *atp 6* is associated with cytoplasmic male sterility of rice. *Mol. Gen. Genet.* 224: 10-16. 1990
 49. FOLKERTS, O. and HANSON, M. R.: Three copies of a single recombination repeat occur on the 443 kb mastercircle of the *Petunia hybrida* 3704 mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* 17: 7345-7357. 1989
 50. NUGENT, J. M. and PALMER, J. D.: RNA-mediated transfer of the gene *cox II* from mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. *Cell* 66: 473-481. 1991
 51. HENNING, J. and HERMANN, R. G.: Chloroplast ATP synthase of spinach contains nine nonidentical subunit species, six of which are encoded by plastid chromosomes in two operons in a phylogenetically conserved arrangement. *Mol. Gen. Genet.* 203: 117-128. 1986
 52. BONEN, L. and BIRD, S.: Sequence analysis of the wheat mitochondrial *atp 6* gene reveals a fused upstream reading frame and markedly divergent N termini among plant ATP6 proteins. *Gene* 73: 47-56. 1988
 53. SEDEROFF, R. R.: Molecular mechanisms of mitochondrial-genome evolution in higher plants. *Am. Nat.* 130: 30-45. 1987
 54. BRAUN, C. J. and LEVINGS, C. S. III: Nucleotide sequence of the F₁-ATPase alpha-subunit gene from maize mitochondria. *Plant Physiol* 79: 571-577. 1985
 55. ISAAC, P. G., BRENNICKE, A., DUNBAR, S. M. and LEAVER, C. J.: The mitochondrial genome of fertile maize (*Zea mays* L.) contains two copies of the gene encoding the α -subunit of the F₁ ATPase. *Curr. Genet.* 10: 321-328. 1985
 56. SCHUSTER, W. and BRENNICKE, A.: Pseudocopies of the ATPase α -subunit gene in *Oenothera* mitochondria are present on different circular molecules. *Mol. Gen. Genet.* 204: 29-35. 1986
 57. MORIKAMI, A. and NAKAMURA, K.: Structure and expression of pea mitochondrial F₁ ATPase α subunit gene and its pseudogene involved in homologous recombination. *J. Biochem.* 101: 967-976. 1987
 58. CHAUMONT, F., BOUTRY, M., BRIQUET, M. and VASSAROTTI, A.: Sequence of the gene encoding the mitochondrial F₁-ATPase alpha subunit from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Nucleic Acids Res.* 16: 6247. 1988
 59. BÉGU, D., Graves, P. V., LITVAK, S. and ARAYA, A.: Nucleotide sequence of the F₁-ATPase subunit α genes from two lines of wheat. *Nucleic Acids Res.* 17: 9492. 1989
 60. MAKAROFF, C. A., APEL, I. A. and PALMER, J. D.: Characterization of radish mitochondrial *atp A*: influence of nuclear background on transcription of *atp A*-associated sequences and relationship with male sterility. *Plant Mol. Biol.* 15: 735-746. 1990
 61. KÖHLER, R. H., LÖSSL, A. and ZETSCHKE, K.: Nucleotide sequence of the F₁-ATPase subunit α gene of sunflower mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 18: 4588. 1990
 62. KÖHLER, R. H., HORN, R., LÖSSL, A. and ZETSCHKE, K.: Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atp A* gene. *Mol. Gen. Genet.* 227: 369-376. 1991
 63. LAVER, H. K., REYNOLDS, F., MONEGER, F. and LEAVER, C. J.: Mitochondrial genome organization and expression associated with cytoplasmic male sterility in sunflower (*Helianthus annuus*). *The Plant J.* 1: 185-193. 1991
 64. HANSON, M. R., BOESHORE, M. R., MACLEAN, P. E., O'CONNEL, M. A. and NIVISON, H. T.: The isolation of mitochondria and mitochondrial DNA. *Methods Enzymol.* 118: 437-453. 1986
 65. SINGER-SAM, J., ROBINSON, M. O., BELLVE, A. R., SIMON, M. I. and RIGGS, A. D.: Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 18: 1255-1259. 1990
 66. SAMBROOK, K., FRITSCH, E. and MANIATIS, T.: Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989
 67. GRAY, M. W., HANIC-JOYCE, P. J. and COVEL-

- LO, P.S.: Transcription, processing and editing in plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 145-175. 1992
68. SCHUSTER, W., HIESEL, R., ISAAC, P. G., LEAVER, C. J. and BRENNICKE, A.: Transcript termini of messenger RNAs in higher plant mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 14: 5943-5954. 1986
69. LIU, A. W., NARAYANAN, K. K., ANDRÉ, C. P., KALEIKAU, E. K. and WALBOT, V.: Co-transcription of *orf 25* and *cox III* in rice mitochondria. *Curr. Genet.* 21: 507-513. 1992
70. BROWN, G. G., AUCHINCLOSS, A. H., COVELLO, P. S., GRAY, M. W., MENASSA, R. and SINGH, M.: Characterization of transcription initiation sites on the soybean mitochondrial genome allows identification of a transcription-associated sequence motif. *Mol. Gen. Genet.* 228: 345-355. 1991
71. COOPER, P., BUTLER, E. and NEWTON, K. J.: Identification of a maize nuclear gene which influences the size and number of *cox 2* transcripts in mitochondria of perennial teosintes. *Genetics* 126: 461-467. 1990
72. SMALL, I., SUFFOLK, R. and LEAVER, C. J.: Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates. *Cell* 58: 69-76. 1989
73. DEWEY, R. E., LEVINGS, C. S. III and TIMOTHY, D. H.: Nucleotide sequence of ATPase subunit 6 gene of maize mitochondria. *Plant Physiol.* 79: 914-919. 1985
74. GRABAU, E., HAVLIK, M. and GESTELAND, R.: Chimeric organization of two genes for the soybean mitochondrial ATPase subunit 6. *Curr. Genet.* 13: 83-89. 1988
75. HANDA, H. and NAKAJIMA, K.: Different organization and altered transcription of the mitochondrial *atp 6* gene in the male-sterile cytoplasm of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Curr. Genet.* 21: 153-159. 1992
76. BLAND, M. M., LEVINGS, C. S. III and MATZINGER, D. F.: The ATPase subunit 6 gene of tobacco mitochondria contains an unusual sequence. *Curr. Genet.* 12: 475-481. 1987
77. DEWEY, R. E., TIMOTHY, D. H. and LEVINGS, C. S. III: A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5374-5378. 1987
78. NEWTON, K. J.: Plant mitochondrial genomes: organization, expression and variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 503-532. 1988
79. NEWTON, K. J., KNUDSEN, C., GABAY-LAUGHNAN, S. and LAUGHNAN, J.: An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell* 2: 107-113. 1990
80. LEAVER, C. J. and GRAY, M. W.: Mitochondrial genome organization in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 373-402. 1982
81. KENNEL, J. C. and PRING, D. R.: Initiation and processing of *atp 6*, *T-wf 13*, and *ORF 221* transcripts from mitochondria of T cytoplasm maize. *Mol. Gen. Genet.* 216: 16-24. 1989
82. RASMUSSEN, J. and HANSON, M. R.: A NADH dehydrogenase subunit gene is co-transcribed with abnormal *Petunia* mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility. *Mol. Gen. Genet.* 215: 332-336. 1989
83. FORDE, B. G. and LEAVER, C. J.: Mitochondrial genome expression in maize: possible involvement of variant mitochondrial polypeptides in cytoplasmic male sterility. In *The Plant Genome* (eds. Davies, D. R. & D. A. Hopwood) 131-146, Norwich. John Innes Char. 1979
84. ANDRÉ, C., LEVY, A. and WALBOT, V.: Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends in Genet.* 8: 128-132. 1992
85. BOUTIN, V., PANNENBECKER, G., ECKE, W., SCHEWE, G., SAUMITOU-LAPRADE, P., JEAN, R., VERNET, Ph and MICHAELIS, G.: Cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in a natural population of *Beta maritima*: general and molecular aspects. *Theor. Appl. Genet.* 73: 625-629. 1987
86. SAUMITOU-LAPRADE, P., PANNENBECKER, G., BOUTIN-STADLER, V., MICHAELIS, G. and VERNET, P.: Plastid DNA diversity in natural populations of *Beta maritima* showing additional variation in sexual phenotype and mitochondrial DNA. *Theor. Appl. Genet.* 81: 533-536. 1991

Summary

Cytoplasmic male sterility (CMS) is characterized by a failure to produce functional pollen and has been reported in over 140 different plant species (LASER and LERSTEN 1972). This trait enables the plant breeder to produce F₁ hybrid varieties without time-consuming emasculation and under conditions of controlled pollination. The CMS genotype is inherited *via* the maternal line and a range of evidence now exists implicating the mitochondrial genome as the location of the CMS determinant(s) in several species (HANSON 1991). The first CMS-correlated loci were identified in maize T-CMS and *Petunia* CMS lines. In these cases, CMS is associated with mitochondrial DNA (mtDNA) rearrangements, which result in expression of chimeric genes (e.g. maize *T-urf 13* and *Petunia S-pcf*) whose protein products are thought to interfere with normal pollen development (DEWEY *et al.* 1986; YOUNG and HANSON 1987). Even though genes believed to cause CMS in both maize and *Petunia* have been identified, the molecular mechanisms of CMS remain undefined. It is also evident that mutations of different mitochondrial genes can cause CMS.

In sugar beet (*Beta vulgaris* L.), cytoplasmic male sterility was first discovered and studied by OWEN in the 1940s (OWEN 1945). This type of CMS, called S or OWEN CMS, is currently the only cytoplasm that is being utilized exclusively in sugar beet breeding programs. Molecular studies have shown that the OWEN CMS cytoplasm differs from the male fertile (N) cytoplasm with respect to the number of minicircular DNA species present in the mitochondria (POWLING 1982, MIKAMI *et al.* 1984) and *in-organello* translation products of mitochondria (BOUTRY *et al.* 1984). A survey of mitochondrial genomes from OLDEMEYER's collection, derived from wild beets and constructed in an isogenic nuclear background, revealed three new forms of CMS genomes (designated S-2, S-3 and S-4) characterized by their DNA digestion patterns (MIKAMI *et al.* 1985). However, little is known about the causal mechanism of the CMS trait in sugar beet.

The author has studied the organization and expression of the mitochondrial genes from CMS cytoplasm of sugar beet, and compared them with those of normal genotype to identify alterations that might be involved in cytoplasmic male sterility. The results are presented in this article.

I. Organization of mitochondrial genes in CMS sugar beet

In order to determine structural changes in the sugar beet mitochondrial genomes, which may be causally related to the CMS trait, the author has carried out Southern hybridization analysis with heterologous mitochondrial gene probes. Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were found among the mtDNAs of normal (cv TK81-0 and I-12 61L) and CMS (TK81-MS, I-12CMS(R), I-12CMS(2), I-12CMS(3) and I-12CMS(7)) lines that were hybridized with the *cox II*, *cox III*, *cob*, *atp A*, *atp 6*, *atp 9* and *rrn 26* probes; no polymorphisms were detected when these DNAs were probed with the *cox I* and *rrn 18* sequences.

The polymorphic restriction fragments were cloned into plasmid vector pUC 119 for fine mapping. Interestingly, rearrangement endpoints were mapped in close proximity to the genes, *cox II*, *atp A* and *atp 6*. These three genes were also shown to exhibit altered transcript patterns in CMS genotypes compared with normal plants. Therefore, the three genes seemed worthy of further characterization to examine the effect of DNA rearrangements of gene expression and CMS.

II. Rearrangements and transcriptional alterations in *cox II* gene

The *cox II* gene encodes a polypeptide of complex IV (cytochrome oxidase) which is located in the inner mitochondrial membrane. The author has isolated and sequenced the *cox II* gene (named *Ncox II*) from mitochondria of male fertile sugar beet. This gene was found to be located 1491 bp upstream from the *cox I* gene on the same DNA strand and to have a 1463 bp intron which split the coding sequence into two exons (382 and 398 bp). A plasmid clone containing the *Ncox II* 3' exon was used as a hybridization probe against mtDNAs from normal and CMS genotypes. Hybridization analysis suggests a difference in the copy number and genome organization of the *cox II* gene between both cytoplasm: a single copy of the gene in N cytoplasm and two copies in CMS.

The two copies of the *cox II* gene from CMS genome have been isolated and sequenced. These two genes were designated *Scox II-1* and *Scox II-2*, respectively, and they were found to diverge completely from the *Ncox II* gene 50 bp 5' to the presumed start codon. This change in the 5' flanking region probably results in a difference in the promoter region for the *Scox II-1* and *Scox II-2*

genes compared with the *Ncox II* gene. Based on Northern blot analysis and RNase protection assay, this rearrangement proves to significantly alter the *cox II* transcriptional pattern in CMS.

Moreover, the *Scox II-1* and *Scox II-2* sequences could be readily discriminated from each other by the 3' end and the immediately adjacent flanking sequences of the gene: the 3' divergence led to a 101 codon extension of the *Scox II-2* ORF. The physical map of CMS sugar beet mtDNA (BREARS and LONSDALE 1988) demonstrates the *cox II* locus to reside adjacent to a member of the 1 kbp inverted repeat sequence, across which recombination occurs. If the recombination repeat is entirely included in the *Scox II-1* ORF, a repeat-mediated "flip-flop" inversion could cause the *Scox II-1* coding region to be fused in-frame to a small ORF (hypothetical ORF) immediately adjacent to another member of the inverted repeat. This fusion could extend the *Scox II-1* ORF with an additional 101 codon, thus creating *Scox II-2*. However, we can not eliminate the possibility that the truncated *cox II* copy may be generated by a duplication of the usual *cox II* gene and a subsequent integration event in the same genome (FOLKERTS and HANSON 1989). Interestingly, the *Scox II-1* 5' flanking sequences were also found to be present in S-2, S-3 and S-4 CMS mtDNAs. These sequences contain a stretch of 52 nucleotides identical to the *Ncox II* (and *cox II* from the S-2 genome) 5' flank, suggesting that the 52 bp repeated sequence may be implicated in recombination events, generating the *Scox II-1* locus.

III. Rearrangements and transcriptional alterations in *atp A* gene

In fungal and animal cells, all five subunits of the F_1 -ATPase are encoded in the nuclear genome (NEWTON 1988). This situation contrasts with that in higher plants where the alpha subunit of F_1 -ATPase is encoded by the mitochondrial gene. Here the author has isolated mitochondrial *atp A* gene from the male-fertile sugar beet (cv TK 81-0) by heterologous hybridization using *atp A* probe from pea. The gene is 1518 bp long and encodes polypeptides of 506 amino acids. The nucleotide sequence shares 94.6% homology with the pea *atp A*. To investigate whether RNA editing occurs in the sugar beet *atp A* locus, the complete region of the gene was amplified by RT-PCR, and subsequently sequenced. The *atp A* mRNA sequence was found to be modified by three C-to-U RNA editing

events, all of which alter the encoded protein sequences.

In order to examine the genome organization of the *atp A* locus in CMS sugar beet, *atp A* containing clones were isolated from the Owen CMS (TK81-MS) and the S-2 CMS (I-12CMS(2)) cytoplasms respectively. The sequences of *atp A* coding region from TK81-MS and I-12CMS(2) are identical to each other and the corresponding TK81-0 sequence. However, the TK81-0 and TK81-MS loci diverge completely 47 bp upstream of the ATG initiation codon indicating that a rearrangement occurred at or after nucleotide -46. On the other hand, the point of divergence between the TK81-0 and I-12CMS(2) *atp A* genes was found to occur after 393 bp 3' to the TAA stop codon.

These results raise the question whether or not the genome rearrangements may affect the transcription of the *atp A* gene. Primer extension experiments and RNase protection assays were carried out to identify the 5' and 3' transcript termini of the *atp A* genes from the TK81-0, TK81-MS and I-12CMS(2). The data indicate that the 5' rearrangement results in different 5' transcript termini (and different transcript patterns) for the TK81-0 and TK81-MS *atp A* genes; the 3' rearrangement was shown to have no significant effect on the *atp A* transcript patterns. The present investigations also show the 3' flanking sequence of I-12CMS(2) *atp A* to be present elsewhere in the mitochondrial genomes of TK81-0, TK81-MS and I-12CMS(2). This 3' flanking region shares a common sequence of 406 nucleotides with the TK81-0 *atp A* gene. One can thus postulate that the 406 bp homology region was implicated in the homologous recombination events, leading to the generation of I-12CMS(2) *atp A* arrangement in the progenitor genomes.

IV. Rearrangements and transcriptional alterations in *atp 6* gene

Sequences of the *atp 6* (F_6 -ATPase subunit 6) gene seem unusual in that they have been found in conjunction with mtDNA rearrangements in CMS plants. This is best exemplified in CMS-T maize where a portion of the *atp 6* 5' flanking sequences is located adjacent to the CMS-associated chimeric gene, *T-urf 13* (DEWEY *et al.* 1986). In this study, the *Oenothera atp 6* probe was used to screen mtDNA clone libraries from TK81-0, TK81-MS and I-12CMS(2), and as a result, the *atp 6* harboring clones were obtained from the three genotypes

respectively.

Each clone was found to contain an open reading frame of 750 bp which was subsequently identified as mitochondrial *atp 6* by searching the EMBL data base. The sugar beet *atp 6* encodes a protein of 250 amino acids, the shortest plant ATP 6 polypeptide reported so far. Sequence comparison of the TK81-0, TK81-MS and I-12CMS(2) *atp 6* genes shows the coding regions to be virtually identical (one nucleotide difference). Moreover, the sequences 3' to the three genes indicate identical restriction patterns for approximately 1.5 kbp with the enzymes, Bgl II and EcoRI. However, the TK81-MS and I-12CMS(2) *atp 6* loci can be distinguished from each other and from the TK81-0 locus, by their 5' flanking sequences. XUE and THOMAS (personal communication) have identified an open reading frame (named *Sorf 1*) capable of encoding a hydrophobic polypeptide of 20 kDa, which is co-transcribed with the *atp 6* gene in the Owen CMS genotype. This was confirmed by the present investigation. Additionally, the author found that the sequence divergence between I-12CMS(2) and TK81-0 *atp 6* genes begins at position -41 5' to the ATG start codon. This rearrangement resulted in the creation of a new open

reading frame (named *S-2orf*) which is co-transcribed with the I-12CMS(2) *atp 6*. *S-2orf* shares 86% homology with *Sorf 1* in terms of nucleotide sequence. It remains to be seen whether *S-2orf* and *Sorf 1* transcripts are translated. Further experiments, including those designed to detect the *S-2orf* and *Sorf 1* polypeptide, are required to establish whether these two genes are expressed *in vitro* and their role, if any, in the inheritance of CMS in sugar beet.

The present investigation indicates the correlation of the altered transcript patterns in *cox II*, *atp A* and *atp 6* loci with the expression of CMS in sugarbeet. While considerable progress has been made in understanding CMS, many intriguing questions remain about the cause of pollen abortion, the regulation of events that produce the mitochondrial alterations associated with CMS, and the mechanism of fertility restoration. It is also relevant to emphasize that none of the detailed molecular analysis of CMS has been done on the affected anther during microsporogenesis. The development of a successful transformation system for mitochondria will open new avenues to understanding the molecular basis of CMS.