



|                     |                                                                                   |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 野生ビートより見出された細胞質雄性不稔性の機構解明                                                         |
| Author(s)           | 小野寺, 康之                                                                           |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                             |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                            |
| Dissertation Number | 甲第4149号                                                                           |
| Issue Date          | 1997-03-25                                                                        |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.11501/3122307">https://doi.org/10.11501/3122307</a>   |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/32783">https://hdl.handle.net/2115/32783</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                   |
| File Information    | 4149.pdf                                                                          |



# 野生ビートより見出された細胞質雄性不稔性の機構解明

農学専攻 博士後期課程

小野寺 康之

## 目次

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| 第1章 緒論                            | 3   |
| 第2章 S-2型およびS-3型CMSにおける花粉稔性回復の遺伝機構 | 6   |
| 第3章 S-3型ミトコンドリアゲノムの構造解析           | 14  |
| 第4章 S-3型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の発現  | 32  |
| 第5章 テンサイ雄性不稔細胞質にみられる多型の成因         | 90  |
| 第6章 総合論議                          | 130 |
| 摘要                                | 136 |
| 引用文献                              | 143 |
| 謝辞                                | 155 |

## 第1章 緒論

ミトコンドリアはエネルギー変換機能を担う細胞質オルガネラであり、代謝基質の酸化反応で得られるエネルギーを使ってATPを合成する。このオルガネラは細胞核ゲノムとは独立したDNAを持ち、独自の遺伝情報発現システムを備えている。ヒト、ウシ、ウニ等、動物のミトコンドリアDNA(mtDNA)は約16kbの環状分子で、遺伝子がほぼ隙間無く並び、非常にコンパクトな構造を呈するのに対し、高等植物のミトコンドリアゲノムはサイズが200~2400kbと大きく、しかもゲノムサイズや遺伝子構成は植物種によって著しい差が認められる<sup>1)</sup>。また、ミトコンドリアの呼吸がシアン化合物によって阻害されることはよく知られているが、高等植物のミトコンドリアにおいては、哺乳動物で認められている電子伝達系のシアン感受性主経路に加えてシアン耐性の第二の酵素系（代替経路）が見出された<sup>2)</sup>。ミトコンドリアは真核細胞に広く存在するオルガネラであるが、種々の生物のミトコンドリアの研究が進むにつれて、それぞれに特徴的なミトコンドリア像が浮かび上がってきた<sup>2)</sup>。

ヒトを中心とする動物の研究分野では、ミトコンドリアが老化<sup>2)</sup>、疾病<sup>2)</sup>、発生<sup>3)</sup>、アポトーシス等<sup>4)</sup>の生命現象に重要な役割を演じていることが認識され、ミトコンドリア機能の新たな側面に注目が集まりつつある。一方、高等植物におけるミトコンドリア遺伝学の分野でも、葉緑体ゲノムからミトコンドリアゲノムへの遺伝子移行<sup>5)</sup>、RNAエディティング<sup>6)</sup>、トランススプライシング<sup>7)</sup>、tRNA分子種の細胞質からミトコンドリアへの輸送<sup>6)</sup>、細胞質雄性不稔性<sup>8)</sup>など興味深い現象の発見が相次いだ。

細胞質雄性不稔性(CMS)は、雌性器官および栄養器官には何の障害も現れず葯又は花粉が特異的に退化する遺伝形質である。この形質はヘテローシス育種を進める上で重要な農業形質であるため、盛んに研究されてきた。LaserとLerstenの総説<sup>9)</sup>によれば、CMSは高等植物において広く見出されており、報告された植物種は140を越える。これまでに、多くの植物においてCMS株と正常株間の葉緑体およびミトコンドリアゲノムの分子構造について比較がなされた。その結果、CMS株と正常株

間で葉緑体DNAの分子構造はほとんど異ならないのに対し、mtDNAの分子構造は著しく異なっている場合が多い<sup>10)</sup>。このような事実からCMSはミトコンドリアゲノム変異によるミトコンドリア機能不全に起因すると考えられている。

CMSは稔性回復核遺伝子(*Rf*と呼ばれる)によりその発現が特異的に抑えられるので、核とミトコンドリア両ゲノム間の相互作用の機構を解析する上でも興味深い。加えて、その相互作用のおよぶ時期と器官は花粉発育時の葯組織のみに限定されており、遺伝子の組織特異的な発現制御という観点からも注目される。しかも、CMSの発現機構は植物種間で一様とは云い難い。トウモロコシでは由来の異なる多数のCMSが発見されており、これらは*Rf*遺伝子との相互作用の特異性に基づいてT型、S型およびC型の3種の基本CMS群に分類された<sup>10)</sup>。

各CMS群は花粉不稔の細胞組織学的機序も互いに相違している。例えば、S型CMS株の葯（絹糸）はほぼ正常に抽出し、花粉は成熟直前に退化する。T型CMS株の葯（絹糸）は抽出せず、小孢子は四分子期の後に退化する<sup>8) 11)</sup>。また、タバコ属の種間交配によって生じたCMS株では雄蕊の形態異常に起因する雄性不稔性が報告されている<sup>8) 12)</sup>。例えば*repanda*型CMS株では葯が柱頭状組織に被われ、花糸が短くなる。一方、*undulata*型CMS株では花弁状の花糸をもつ雄蕊の先端が柱頭状組織に被われる<sup>1) 7)</sup>。雄性不稔に至る過程は植物種間ではもとより、同一種内においても異なり、CMSの発現機序が多様性に富むことを強く示唆している。このように、CMSの多様な形質発現はミトコンドリアゲノムに生じ得る変異の多様性の反映と考えられよう。従って、多様なCMSの機構を丹念に解析し、さらにその多様性を生み出してきたミトコンドリアゲノムの進化機構を明らかにすることは、CMS利用の細胞質育種をさらに発展させる上で重要な知見を与えるものと期待される。またCMS発現の機構解析は育種的な意義のみにとどまらず、雄性配偶体の分化・発育にかかわる遺伝子ネットワークの全容解明にも寄与するところが少なくないと考えられる。

テンサイ(*Beta vulgaris*)のCMSは、Owen<sup>13)</sup>によって品種「US201」集団中より最初に発見された。一方、米国グレートウエスタン社のR.K.Oldemeyer博士は、

トルコ、パキスタンおよび中国東北部を原産とする野生ビートより、CMS植物を発見した。同氏らは、これらのCMS株に対して、テンサイ自殖系統I-12-61-Lを反復親とする戻し交雑を行い、near-isogenic のI-12CMSシリーズを育成した。さらに、I-12CMSシリーズについては、その後ミトコンドリアにおける小環状DNAの構成比較および高分子量(HMW)DNAに関する制限酵素分析が行われ、I-12CMSシリーズの細胞質が、Owenにより見出されたS型とは異型のS-2型（トルコ原産）およびS-3型（パキスタン原産）に分類されることが報告された<sup>14) 15)</sup>。

本研究ではまず、テンサイS型、S-2型およびS-3型CMSを供試し、交雑実験により雄性不稔細胞質とRf遺伝子の相互作用に支配される花粉稔性回復の遺伝様式を調査して、各株間におけるCMS発現機構の多様性を検証した。その結果を第2章に記述した。ついで、交雑実験を通じてS型CMSとは異なる雄性不稔機構が働いている可能性が示唆されたS-3型CMS株のミトコンドリアゲノムについて物理・遺伝子地図の作製を行った。その結果を第3章に記す。さらに正常(N)型ミトコンドリアゲノムとの比較に基づいて構造変異域を同定し、花粉の特異的退化をもたらすミトコンドリア遺伝子の検索と特徴づけを試みた。得られた結果を第4章に述べた。また、CMS発現機構の多様性の成因を明らかにすることを目的に、3種のテンサイCMS株（S型、S-2型、S-3型）間におけるミトコンドリアのゲノム構造と遺伝子構成の比較解析を行った。次いでこのデータをもとに*B. vulgaris*自然繁殖集団と祖先型野生種(*Beta maritima*)集団からN型、S型、S-2型およびS-3型ミトコンドリアゲノムに対応する祖先型ゲノムおよび中間型ゲノムの検索を試みた。その結果を第5章にまとめた。

## 第2章 S-2型およびS-3型CMSにおける花粉稔性回復の遺伝機構

### 緒言

テンサイのCMS細胞質には育種に優先的に用いられているS型細胞質（Owen細胞質）の他に、野生ビートに由来するCMS細胞質が存在する。野生ビート由来の細胞質はmtDNAの制限酵素断片長多型性や小環状 mtDNA分子種の構成の差異に基づき、S-2型およびS-3型に分類されており<sup>14) 15)</sup>、CMS発現機構の多様性を解析する上で興味深い。

本実験では、これら由来を異にするCMS株を供試し、細胞核コードの*Rf*遺伝子との相互作用パターンを分析し、得られたデータを基にS型、S-2型およびS-3型雄性不稔細胞質を遺伝学的に特徴づけることを試みた。さらに、S-3CMSに関してはF<sub>2</sub>やBC<sub>1</sub>集団における稔性回復型の分離を調べ、関与する*Rf*遺伝子の数と作用性に検討を加えた。

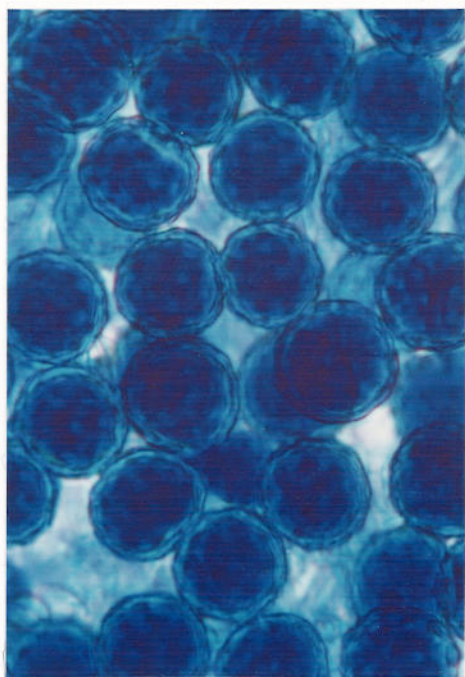
### 材料および方法

供試材料を表2-1に示す。I-12CMS(2)とI-12CMS(3)の有する雄性不稔細胞質はそれぞれトルコおよびパキスタンを原産とする野生ビートに由来する。また、I-12CMS(R)はS型細胞質をもつCMS系統である。これらの3系統は共通の維持花粉親I-12-61-Lとの戻し交雑が少なくとも10世代以上に亘って重ねられており、核遺伝子型がほぼ同一となったnear-isogenic系統である。検定交配の花粉親としては農林水産省北海道農業試験場で育成された自殖系統T2n-16-58-51-0を用いた。この系統はS型CMS株に対する維持花粉親である。

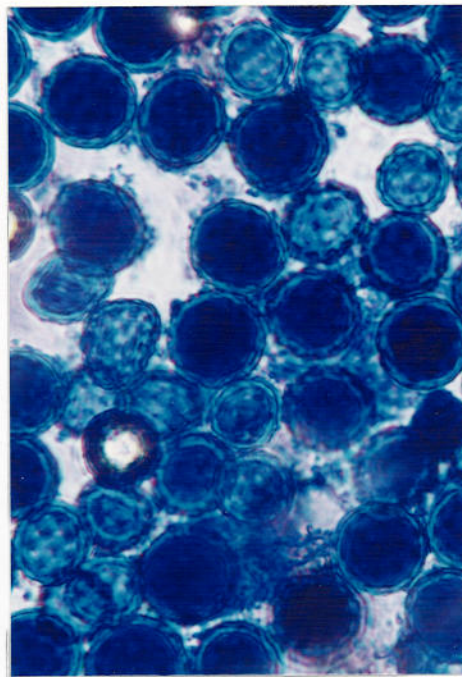
F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>およびBC<sub>1</sub>集団の花粉稔性の調査に当たっては、葯の肉眼観察とコットンブルー染色による花粉の顕微鏡観察を併用し稔性を判定した。雄性不稔型は図2-1に示した基準に従い、正常型、半不稔a型(S.S.a)、半不稔b型(S.S.b)および完全不稔型(C.S.)の4タイプに分類した。

表2-1 実験に用いたテンサイ系統

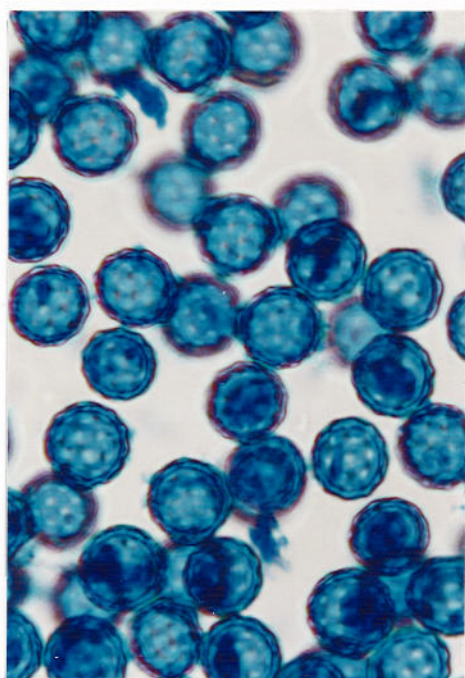
| 系統             | 花粉稔性 | 細胞質型 | 由来                                             |
|----------------|------|------|------------------------------------------------|
| I-12-61-L      | 可稔   | N    | グレードウェスタン社で育成された自殖系統                           |
| I-12CMS(R)     | 不稔   | S    | 米国品種「GW359」集団から発見されたS型CMS細胞質（Owen細胞質）を有する      |
| I-12CMS(2)     | 不稔   | S-2  | トルコ原産野生ビートに由来する雄性不稔細胞質を有する                     |
| I-12CMS(3)     | 不稔   | S-3  | パキスタン原産野生ビートに由来する雄性不稔細胞質を有する                   |
| T2n-16-58-51-O | 可稔   | N    | 農林水産省北海道農業試験場で育成されたS型CMSに対する維持花粉親系統、自家受粉遺伝子を持つ |



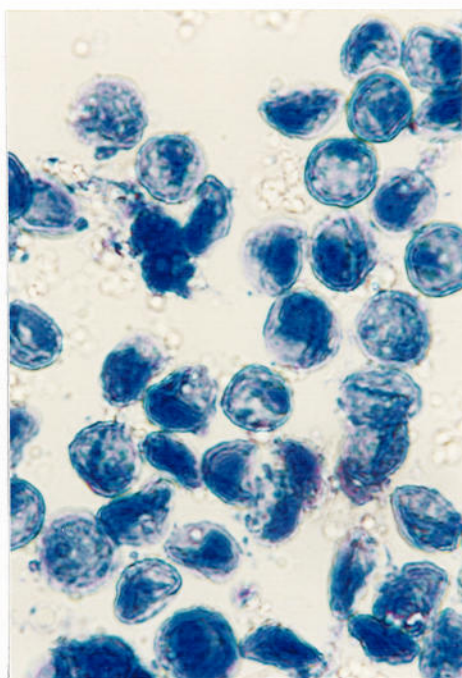
N



S.S.a



S.S.b



C.S.

## 図2-1 雄性不稔型の分類

テンサイの花粉粒をコットンブルーで染色した後、顕微鏡観察を行い花粉稔性を次の4型に分類した。

N：球形で内容物の充実した花粉粒が全体の50～100%を占める。

S.S.a：球形で内容物の充実した花粉粒が全体の10～50%を占める。

S.S.b：全ての花粉が球形を呈するものの、内容物に乏しい。

C.S.：花粉膜の発育が不十分で、内容物の乏しい不定形の花粉粒のみが観察される。

## 結果および考察

### (1) 検定交配による細胞質型同定

S型細胞質の下では花粉稔性の回復には2対の補足遺伝子(*Rf1*, *Rf2*)が作用を現すことが知られている<sup>13) 16)</sup>。I-12CMS(2)やI-12CMS(3)の有するS-2型、S-3型雄性不稔細胞質がともにS型とは異なり、そのため稔性回復に要求する*Rf*の種類も既知の*Rf1*や*Rf2*とは相違するなら、S型CMSに対する維持花粉親がI-12CMS(2)やI-12CMS(3)に対して維持花粉親としての機能を発揮しない場合も当然予想される。本実験ではS型CMSに対する維持花粉親系統T2n-16-58-51-Oより、任意に3個体を選んで花粉親に配し、I-12CMS(2)、I-12CMS(3)およびI-12CMS(R)由来の完全不稔型植物との間で検定交配を試みた。

表2-2に示すようにI-12CMS(R)を母本とした3種の交配組み合わせのF<sub>1</sub>植物は全て完全不稔を発現し、T2n-16-58-51-Oが*Rf1*、*Rf2*の両遺伝子座に関して劣性ホモ型(*Nrf1rf1rf2rf2*)であることが確かめられた。これに対して、S-2型細胞質を有するI-12CMS(2)を母本に用いた場合には、C.S.型に加えて、S.S.b型の占める割合は78~100%に及んでおり、従ってT2n-16-58-51-OのS-2型細胞質に対する*Rf*の遺伝子型は劣性ホモ型とは考え難い。また、S-3型細胞質を有するI-12CMS(3)にT2n-16-58-51-O由来の3個体の花粉を交配して得た次代にはN型やS.S.a型といった稔性回復型個体の分離が認められ、その頻度が53~96%に達した。このデータはT2n-16-58-51-OがS-3型細胞質に対する稔性回復遺伝子を優性ホモ型又はヘテロ接合型で有していることを強く示唆するものである。

### (2) S-3型雄性不稔細胞質に作用する稔性回復遺伝子

S-3型細胞質に働く*Rf*遺伝子の対数や作用機構を明らかにするため、上記の検定交配組み合わせI-12-CMS(3):1 X T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>に生じた稔性回復型植物の花粉をI-12-CMS(3)に交配し、BC<sub>1</sub>代を育成して雄性不稔型の分離様式を調べ

表2-2 S型 (I-12CMS(R))、S-2型 (I-12CMS(2)) および S-3型CMS系統 (I-12CMS(3))

とT2n-16-51-58-Oとの交配F<sub>1</sub>における雄性不稔型の分離様式

| 交配組合せ        |                  | 世代             | 雄性不稔型 |       |       |      | 供試<br>個体数 | 均一性検定    |      |        |
|--------------|------------------|----------------|-------|-------|-------|------|-----------|----------|------|--------|
| 母本           | 花粉親              |                | N     | S.S.a | S.S.b | C.S. |           | $\chi^2$ | d.f. | P      |
| I-12CMS(R):1 | T2n-16-58-51-O:A | F <sub>1</sub> | 0     | 0     | 0     | 34   | 34        | 191.36   | 6    | <0.001 |
| I-12CMS(2):1 | do               | F <sub>1</sub> | 0     | 0     | 30    | 8    | 38        |          |      |        |
| I-12CMS(3):1 | do               | F <sub>1</sub> | 29    | 20    | 1     | 1    | 51        |          |      |        |
| I-12CMS(R):2 | T2n-16-58-51-O:B | F <sub>1</sub> | 0     | 0     | 0     | 89   | 89        | 241.32   | 6    | <0.001 |
| I-12CMS(2):2 | do               | F <sub>1</sub> | 0     | 0     | 57    | 5    | 62        |          |      |        |
| I-12CMS(3):2 | do               | F <sub>1</sub> | 2     | 20    | 15    | 4    | 41        |          |      |        |
| I-12CMS(R):3 | T2n-16-58-51-O:C | F <sub>1</sub> | 0     | 0     | 0     | 19   | 19        | 144.86   | 6    | <0.001 |
| I-12CMS(2):3 | do               | F <sub>1</sub> | 0     | 0     | 55    | 0    | 55        |          |      |        |
| I-12CMS(3):3 | do               | F <sub>1</sub> | 10    | 9     | 4     | 6    | 29        |          |      |        |

た。その結果、BC1では $N+S.S.a : S.S.b : C.S. = 1 : 1 : 2$ の比に適合する分離が生じた(表2-3)。これは、分離遺伝子が2対で一方の座の劣性アレーレ(*rfa*と仮称)が他方の優性アレーレ(*Rfb*と仮称)に対して上位に働く場合の理論比である。すなわち、花粉親に供したI-12-CMS(3) X T2n-16-58-51-Oの $F_1$ は*Rfa*, *Rfb*をヘテロ接合型で有し、I-12-CMS(3)が劣性ホモ型で有していると想定される。

この遺伝子仮説が正しければ、I-12-CMS(3):1 X T2n-16-58-51-O:Aの $F_1$ 植物の自殖による $F_2$ では $N+S.S.a : S.S.b : C.S. = 9 : 3 : 4$ の比に適合する分離が期待される。得られたデータによれば、S.S.b型が期待値よりも過剰に生じ9:3:4に対する適合度は良くなかった。期待される理論比に適合する分離は得られなかったが、稔性回復型および部分不稔個体(NおよびS.S.a, S.S.b)を併せて1階級とし、完全不稔型との分離として検定したところ、理論比(3:1)によく適合した。 $F_2$ でS.S.b型が過剰に生じた原因については検定交配を行い解析する必要があるが、恐らく環境要因や変異遺伝子等の遺伝的要因の影響と考えられよう。

S型CMSに対する2対の*Rf*遺伝子(*Rf1*, *Rf2*)間には上位性は認められず、またS型CMSに対する維持花粉親はS-2型CMSやS-3型CMSに対する維持花粉親として作用しないことが立証された。従って、野生ビートに由来するS-3型CMSにおいては*Rf1*, *Rf2*とは種類や作用機構の異なる*Rfa*, *Rfb*遺伝子が稔性回復に働いており、S型およびS-3型CMSの発現機構も互いに異なる可能性が充分考えられよう。今後は各*Rf*遺伝子の連鎖分析や同座性検定を進めるとともに、各CMS細胞質と*Rf*との相互作用の特異性を精査することが必要であろう。また、S-2型CMSに対しては効果的な*Rf*が未だに見つかっていない。広汎な材料を用いて、*Rf*の探索を行い、本実験同様の解析を通じてS-2型CMSの稔性回復機構を解明することが次の課題となる。

トウモロコシではテキサス(T)型細胞質雄性不稔性を用いた $F_1$ 雑種が、ゴマ葉枯れ病菌のTレース(*Bipolaris maydis* race T)に罹病性となったため、CMSの使用を中止せざるを得なくなった<sup>11)</sup>。したがって、単一細胞質に依存したハイブリッド育種に伴う遺伝的脆弱性を防ぐ意味から、CMSの育種的利用にあたり複数の細胞質の

表2-3 I-12CMS(3):1とT2n-16-58-51-O: Aとの交配組み合わせのF<sub>2</sub>およびBC<sub>1</sub>における雄性不稔性の分離様式

交配組み合わせ : [I-12CMS(3):1 X T2n-16-58-51-O: A] BC<sub>1</sub>

| ファミリー | 雄性不稔型         |               |                                  | 供試<br>個体数 | 適合性検定       |  |
|-------|---------------|---------------|----------------------------------|-----------|-------------|--|
|       | N+S.S.a       | S.S.b         | C.S.                             |           | 1:1:2*      |  |
|       | <i>RfaRfb</i> | <i>Rfarfb</i> | <i>rfaRfb</i> ,<br><i>rfarfb</i> |           |             |  |
| #1    | 11            | 12            | 21                               | 44        | 0.90<P<0.99 |  |
| #2    | 5             | 7             | 14                               | 26        | 0.70<P<0.90 |  |

\*: N+S.S.a : S.S.b : C.S. = 1 : 1 : 2

交配組み合わせ : [I-12CMS(3):1 X T2n-16-58-51-O: A] F<sub>2</sub>

| ファミリー | 雄性不稔型         |               |                                  | 供試<br>個体数 | 適合性検定        |             |
|-------|---------------|---------------|----------------------------------|-----------|--------------|-------------|
|       | N+S.S.a       | S.S.b         | C.S.                             |           | 9:3:4**      |             |
|       | <i>RfaRfb</i> | <i>Rfarfb</i> | <i>rfaRfb</i> ,<br><i>rfarfb</i> |           | 3:1***       |             |
| #3    | 18            | 39            | 31                               | 88        | P<0.001      | 0.01<P<0.05 |
| #4    | 16            | 17            | 11                               | 44        | 0.001<P<0.01 | P=1.00      |

\*\* : N+S.S.a : S.S.b : C.S. = 9 : 3 : 4    \*\*\* : N+SSa+SSb : CS = 3 : 1

混合利用の重要性が指摘されている<sup>17)</sup>。この点からも、野生ビートに由来するCMSは興味深い。

### 第3章 S-3型ミトコンドリアゲノムの構造解析

#### 緒言

ミトコンドリアゲノムの多型に基づいて分類された、テンサイのS型、S-2型およびS-3型CMSにおいては、前章で述べた交雑実験により互いに稔性回復の遺伝機構も異なることが明らかとなった。特に、S型CMSに対する*Rf1*、*Rf2*とは異なる独自の*Rf*との応答が示唆されたS-3型CMSは関与するミトコンドリア遺伝子座をはじめ、その発現機構がS型CMSとは異なる可能性が高い。従って、S-3型CMSは新型細胞質を利用したテンサイハイブリッド育種という観点からも注目される。

本章では、S-3型CMSの発現機構解明の基礎としてS-3型細胞質から単離したmtDNAの物理・遺伝子地図の作製を試みた。

#### 材料および方法

##### (1)mtDNAの調製

S-3型雄性不稔細胞質を有するI-12CMS(3)を供試した。mtDNAをMikami et al.<sup>18)</sup>の方法に従って、肥大根より抽出した。200~300gの試料に氷冷した300mlの緩衝液A(50mM Tris-HCl pH8.0, 25mM EDTA, 0.44M ショ糖, 0.1% BSA, 5mM 2-メルカプトエタノール)を加えて磨碎し、濾液を10分間、3000 rpm, 4℃ (水平ローター 半径107mm)で遠心した。上清を20分間、15000rpm (定角ローター 半径107mm)で遠心して得た粗ミトコンドリア沈殿を緩衝液Aに再懸濁し、遠心後上清にMgCl<sub>2</sub> (終濃度10mM)を加えて、DNase処理を行った。次にDNaseを緩衝液B(10mM TES pH7.2, 0.6M ショ糖, 20mM EDTA)で洗い、TE (50mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA)に懸濁し、20%ザルコシルとプロテアーゼKを加えた。その後、フェノール処理とCsCl-EtBr平衡密度勾配遠心を行って、精製mtDNAを分画した。

## (2)ミトコンドリアゲノミックライブラリーの構築

精製mtDNAをMbolで部分分解 (37°C、5分、0.0625unit/ $\mu$ g) した。部分分解産物のうちの16~23kbp断片画分をショ糖密度勾配遠心により回収し、ファージベクター  $\lambda$ -DASH (STRATAGENE)のBamHIサイトに連結した。得られたコンカテマー (鎖状体) をGIGAPACK GOLD(STRATAGENE)でパッケージングした。次いで、得られたオーバーラッピングクローンライブラリー ( $1.8 \times 10^5$  pfu) から任意の384個のクローンを選抜し、96穴マイクロテストプレートに移したものをスクリーニングに用いた。

## (3) $\lambda$ DNAの調製

$\lambda$  ファージからのDNA抽出はliquid culture法<sup>19)</sup>に準拠した。 $\lambda$  ファージとP2 392終夜培養液を混合し、15mlのNZY液体培地中で37°C、10~12時間振盪培養した。クロロホルム (終濃度40  $\mu$ l/ml) を加えて、さらに15分間振盪した後、3000rpm、4°C (水平ローター 半径107mm) の遠心操作により得られた上清にDNase処理を行った。PEG(終濃度 10%) 及びNaCl(終濃度 2M)を加え、1時間氷冷した後、3500rpm、4°C (水平ローター 半径107mm) で10分間遠心した。沈殿をSM緩衝液 (0.58% NaCl, 0.36% MgCl<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 50mM Tris-HCl pH7.5, 0.01% ゼラチン) に懸濁し、1/2容のクロロホルムと混合し、室温で8000rpm (定角ローター 半径35mm) 、5分間遠心した。得られた上清に5mMEDTA と0.1% SDSを加えて、68°Cで5分間処理した後、フェノール処理とLiCl沈殿を行い最終的にTE緩衝液に懸濁した。

## (4)プローブの調製

100~250ngのDNA断片を熱変性させて1本鎖にした後、ランダムプライマー法<sup>20)</sup>により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTPを取こませ、再び熱変性を行い、プローブとした。

#### (5) プラークハイブリダイゼーション

λ クローンは、プラークを形成したプレートからナイロンメンブレンフィルター BIODYNE(PALL)にトランスファーし、0.5M NaOHで変性させ、中和、洗浄処理を施した後に固定した。次いで  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$  で標識したプローブとの間で分子雑種を形成させた後、フィルターを 2xSSC、0.1%SDS、さらに 0.2xSSC と 0.1%SDS との混合液で洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

#### (6) サザンハイブリダイゼーション

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、0.5M NaOH/1.5N NaClで変性させ、アルカリブロットティングによりナイロンメンブレンフィルターに固定した。ハイブリダイゼーションは(5)と同様の手法を用いた。

#### (7) λ クローンからのサブクローニング

プラスミドベクター (pUC118/119, Bluescript IISK<sup>+</sup>/KS<sup>+</sup>) のマルチクローニングサイトを適当な制限酵素で切断し、5'末端をアルカリフォスファターゼで脱リン酸化した。制限酵素で完全分解したλ DNA (約250 ng) をプラスミドベクター (約250 ng) に連結した後、エレクトロポレーション (2.5kV, 25 μF, 200 Ω) により、大腸菌JM109株へ導入した。さらにアンピシリン (10 μg/ml)、イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトピレノシド、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラキシド (25 μg/ml) を含む2xTY培地中に加えて、37℃で16時間培養しコロニーを形成させ、白色の組み換え体を選抜した。

### 結果

#### (1) 物理地図

S-3型(系統 I-12CMS(3))ミトコンドリアゲノムの物理地図を作成するためにファージベクター λ-DASHを用いてmtDNAに関するオーバーラッピングクローンラ

ライブラリーの構築を試みた。この操作では、ライブラリーから葉緑体および核ゲノム由来のDNAが挿入されたクローンの混入を排除することが重要である。そのため、まず高等植物ミトコンドリアゲノムに固有の11種の遺伝子プロンプ（表3-1）、23個のN型 mtDNAクローン（図3-1）およびS型 mtDNAクローン（*coxII* 遺伝子<sup>21)</sup>の上流域に相当する2.4kbp *Bam*HI-*Xho*I断片：*ScoxII5'*）の合計35個のクローンをプロンプに用いて、S-3型mtDNAクローンの選抜を行った。

陽性クローンを調べてみると、複数のプロンプに対してハイブリダイズするクローンが頻繁に見出された。例えば、S-3型mtDNAクローンNo.362 は2種のN型 mtDNAサブ断片240(N)SI-4および368(N)Xb-4と分子雑種を形成する。また、別のクローンNo.280は368(N)Xb-4と*coxIII* 遺伝子プロンプに対してハイブリダイズした。両クローンについて*Xho*I、*Sal*Iおよび*Xba*Iの切断点をマッピングしたところ、ゲノム上では図3-2に示すような位置関係のオーバーラッピングクローンであることが判明した。

同様の方法を用いて、得られた全ての陽性クローンについてゲノム上の位置関係を決定した結果、これらのクローンが基本的に3種のコンティグを形成することが判った（図3-2）。すなわち、図3-2に示すように169kbpに亘るコンティグA、139kbpのコンティグB及び90kbpのコンティグCである。

次に、コンティグA、B、Cの末端に位置するS-3型mtDNAクローンNo.254、No.426、No.460、No.214のそれぞれに由来するサブ断片254(3)SIxh1.4、426(3)Xb1.1、460(3)SI1.2、214(3)SIxh1.4（図3-2）をプロンプに用いてコンティグA、B、Cをつなぐクローンをライブラリーから選抜することにより、物理地図の完成を図った。

その結果、図3-2および図3-3に示すように、コンティグAの末端aに関してはコンティグBの末端dへ続くクローンファミリー（No.344など9種）とコンティグCの末端fへつながるクローンファミリー（No.429など7種）が同定され、この領域でウォーキングの枝分かれの起こる(branching point)ことが示された。また、コンティグCの

表3-1 マッピング実験に用いたミトコンドリア遺伝子プローブ

| 遺伝子                                          | 植物種            | 文献 |
|----------------------------------------------|----------------|----|
| シトクローム酸化酵素サブユニット                             |                |    |
| <i>coxI</i> *                                | テンサイ(系統TK81-O) | 21 |
| <i>coxII</i> *                               | テンサイ(TK81-O)   | 21 |
| <i>coxIII</i> *                              | マツヨイグサ         | 32 |
| アポシトクローム                                     |                |    |
| <i>cob</i> *                                 | コムギ            | 33 |
| F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP合成酵素サブユニット |                |    |
| <i>atpA</i> *                                | エンドウ           | 34 |
| <i>atp6</i> *                                | マツヨイグサ         | 35 |
| <i>atp9</i> *                                | エンドウ           | 36 |
| NADH脱水素酵素サブユニット                              |                |    |
| <i>nad1</i> (exon A)*                        | コムギ            | 25 |
| <i>nad1</i> (exon B)-exon C                  | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad1</i> (exon D)                         | コムギ            | 25 |
| <i>mat.r-nad1</i> (exon E)                   | コムギ            | 25 |
| <i>nad2</i> (exon A)-exon B                  | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad2</i> (exon C)-exon D-exon E           | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad3</i>                                  | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad4</i> (exon A)-exon B                  | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad4L</i>                                 | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad5</i> (exon A)-exon B                  | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad5</i> (exon C)                         | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad5</i> (exon D)-exon E                  | マツヨイグサ         | 37 |
| <i>nad6</i>                                  | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>nad9</i> *                                | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| リボソーム                                        |                |    |
| <i>rrn18</i> *                               | エンドウ           | 38 |
| <i>rrn26</i> *                               | エンドウ           | 38 |
| <i>rps13</i>                                 | マツヨイグサ         | 26 |
| 機能未同定のORF                                    |                |    |
| <i>orf25</i>                                 | テンサイ(TK81-O)   | 22 |
| <i>orfB</i>                                  | テンサイ(TK81-O)   | 22 |

\* S-3型 mtDNAクローンのスクリーニングに供試した。

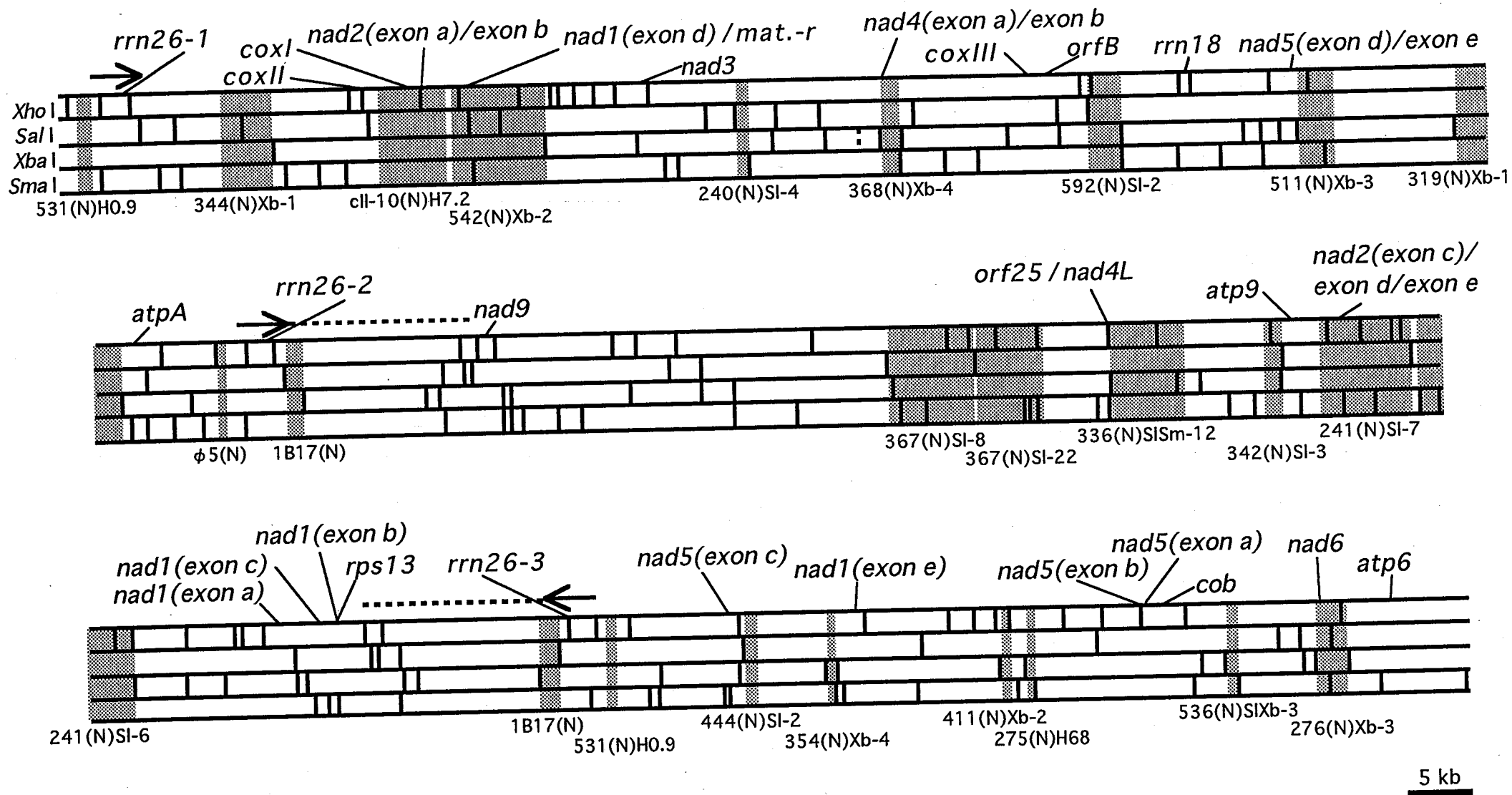


図3-1 S-3型mtDNAクローンの選抜に用いた23個の正常(N)型mtDNAクローン  
23個の正常(N)型mtDNAクローンがカバーするN型ミトコンドリアマスター染色体<sup>22)23)</sup>上の領域(網かけ)を図示した。

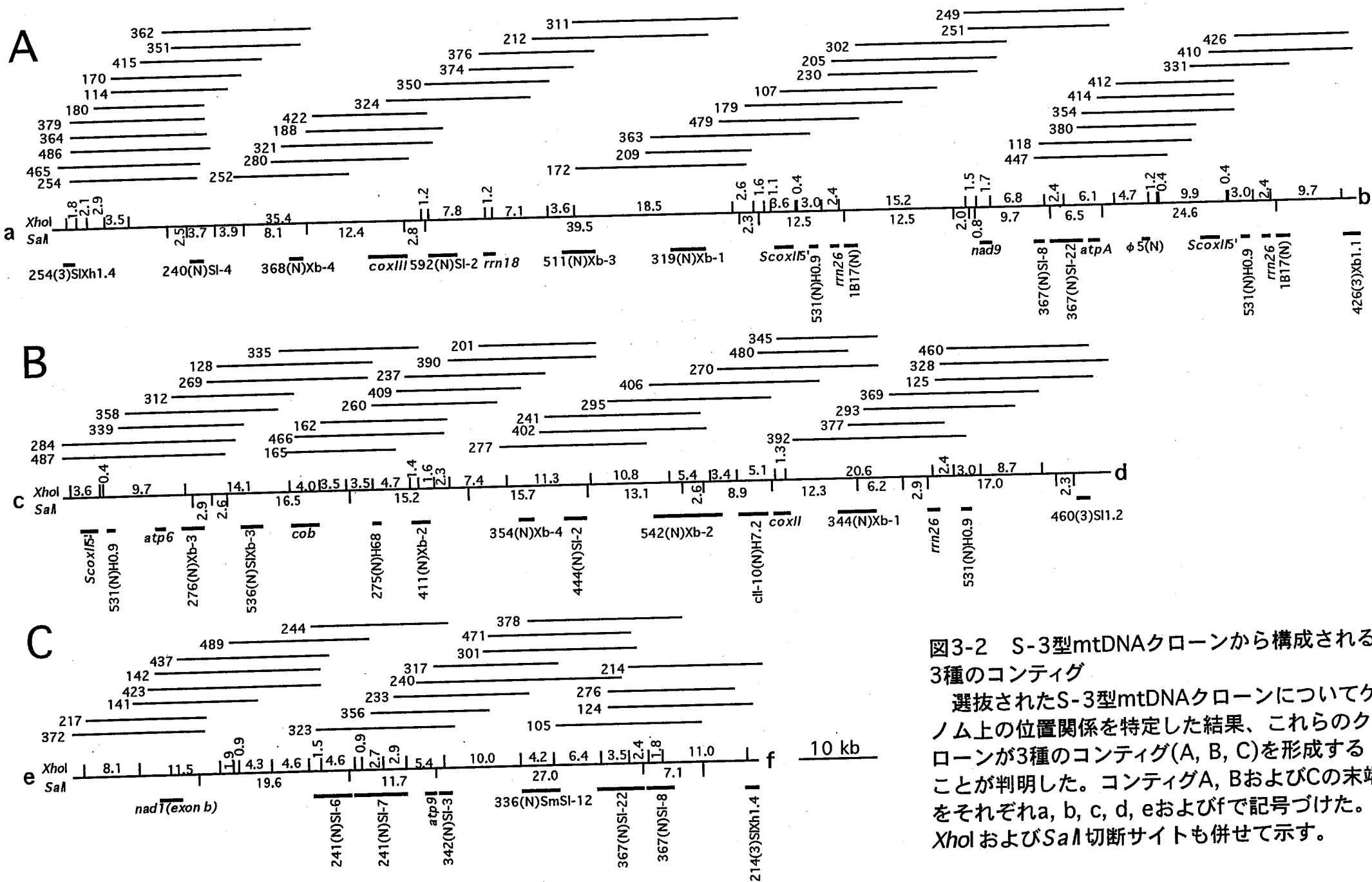


図3-2 S-3型mtDNAクローンから構成される3種のコンティグ

選抜されたS-3型mtDNAクローンについてゲノム上の位置関係を特定した結果、これらのクローンが3種のコンティグ(A, B, C)を形成することが判明した。コンティグA, BおよびCの末端をそれぞれa, b, c, d, eおよびfで記号づけた。XhoIおよびSalI切断サイトも併せて示す。

末端eを含むS-3型mtDNAクローンNo.372およびNo.217は426(3)Xb1.1とハイブリダイズしたのでコンティグAの末端bとコンティグCの末端eは互いにオーバーラップすると理解される(図3-3)。コンティグBの末端cは制限酵素切断点地図から判断して、コンティグAの中央に位置する*Scox115*領域(図3-2)へ続くと考えてよい。

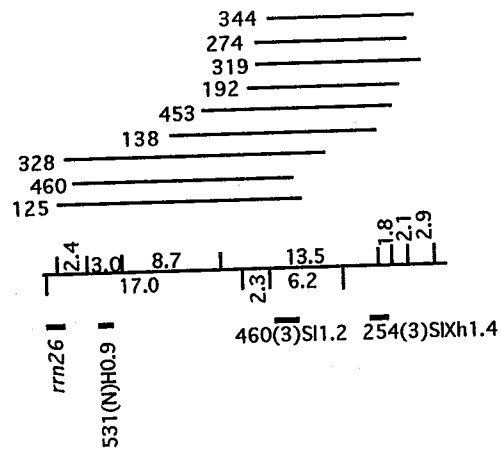
以上のデータに基づくなら、S-3型ミトコンドリアゲノムはコンティグA、Cに相当する領域により構成される環状染色体(274kbp)ならびにコンティグAの末端aから中央部の*Scox115*域に至る配列とコンティグBに相当する領域により構成される環状染色体(234kbp)を含むと考えられる。ただし、コンティグAの末端aから*Scox115*'域に至る103kbp配列を反復配列と仮定するなら、全長508kbpの環状マスター染色体を想定することも可能である(図3-4)。図3-5には環状マスター分子を線状化して示した。

## (2) 遺伝子構成

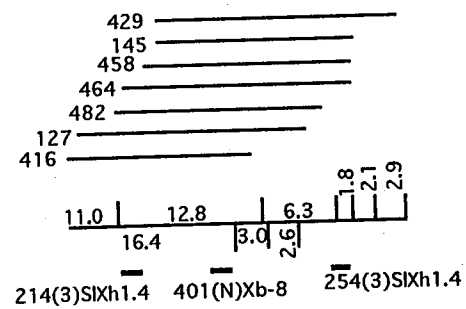
テンサイのN型、S型およびS-2型mtDNAについては既に*Xho*I、*Sal*I、*Xba*Iおよび*Sma*Iの4種の制限酵素による切断サイトが決定されている<sup>22) 23) 24) 25)</sup>ので、S-3型mtDNAに関しても同じ4酵素による切断サイトをマッピングした。それぞれの切断箇所は88(*Xho*I)、48(*Sal*I)、77(*Xba*I)および78(*Sma*I)であった。

S-3型 mtDNAクローンのスクリーニングに用いた11種のミトコンドリア遺伝子プローブに加え、*cox*I、*rps*13など10種のミトコンドリア遺伝子クローンもアイソトープで標識し、サザンブロット分析に供試して合計21種のミトコンドリア遺伝子の位置を決めた(図3-5)。*nad*1、*nad*2、*nad*4および*nad*5は4~5個のエキソンより構成される分断遺伝子である。その内*nad*4を除く3遺伝子に関してはエキソンがマスター染色体上で遠く離れてマッピングされた(図3-4、図3-5)。恐らく機能を備えた転写産物が作られる際には、コムギ<sup>25)</sup>やマツヨイグサ<sup>26)</sup>などで指摘されているようにシススプライシングに加えて、トランススプライシングが介在しているのであろう。また、*orf*B-*cox*III、*orf*25-*nad*4L、*rps*13-*nad*1(exon b)-*nad*1

1



2



3

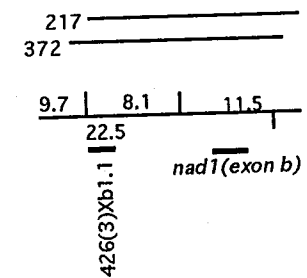


図3-3 S-3型 mtDNAクローンに関する3種のコンティグをつなぐクローン群

- 1 : コンティグA末端aとコンティグB末端dをつなぐクローン群
- 2 : コンティグA末端aとコンティグC末端fをつなぐクローン群
- 3 : コンティグC末端eとコンティグA末端bをつなぐクローン群

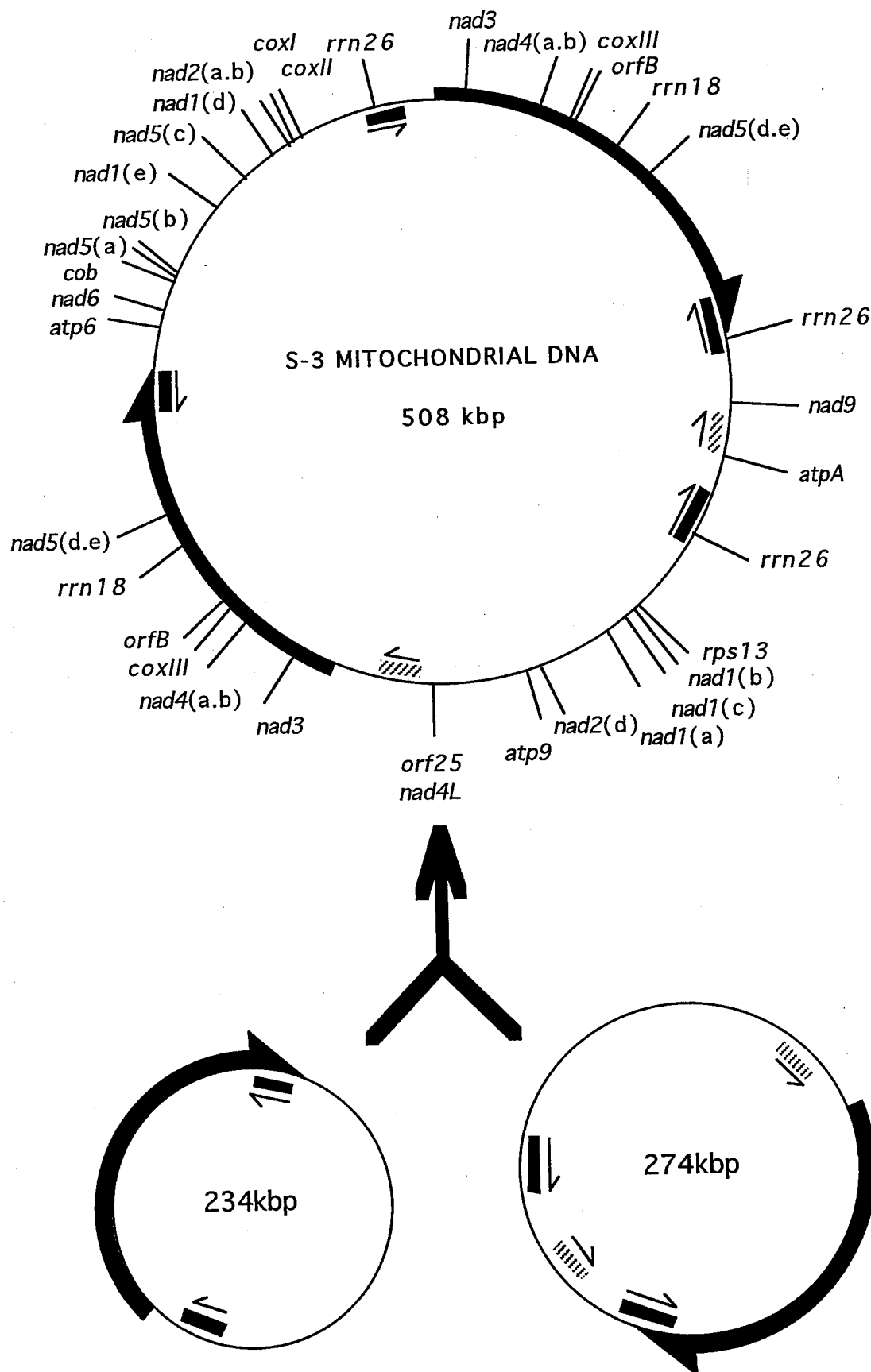


図3-4 S-3型ミトコンドリアゲノムとして想定された508kbpの環状マスター分子

環状マスター分子に20種のミトコンドリア遺伝子および2組の反復配列 (repeat1および repeat2) をマッピングした。repeat1および repeat2をそれぞれ黒塗りの四角形と斜線模様の四角形で示した。それぞれの四角形の上には反復配列の方向を矢印で示す。太い矢印は103kbpの直列反復配列を示す。

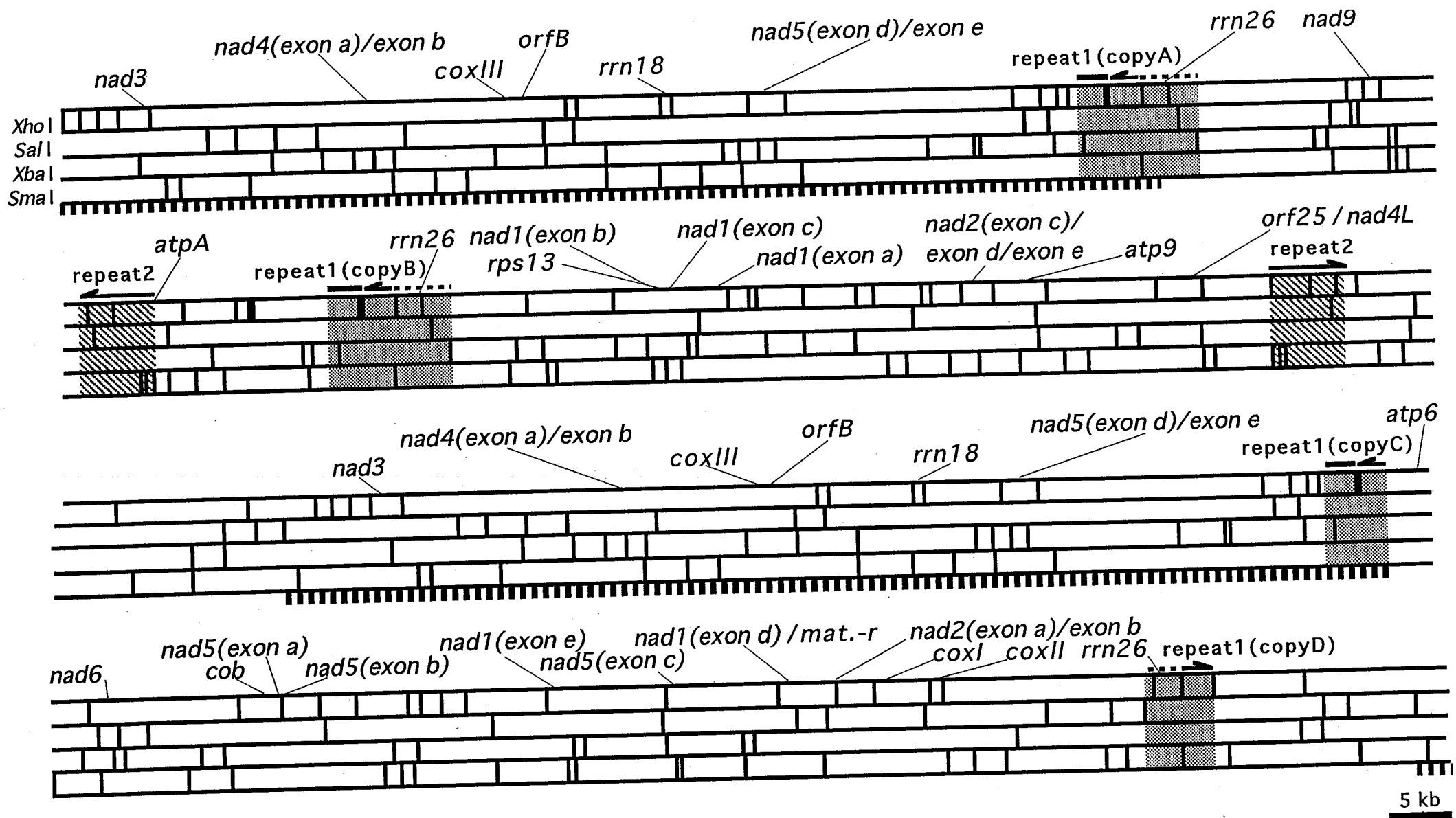


図3-5 S-3型ミトコンドリアゲノムの物理・遺伝子地図

S-3型ミトコンドリアゲノムとして想定された508kbpの環状DNA分子を線状化して表し、これに制限酵素 *XhoI*, *SalI*, *XbaI* および *SmaI* による切断点と20種のミトコンドリア遺伝子をマッピングした。2組の反復配列 (repeat1および repeat2) の位置と方向を矢印で示す。反復配列に隣接して、repeat1copyA、BおよびCの間で相同な領域を太線で、repeat1copyA、BおよびDの間で相同な領域を破線でそれぞれ示した。太い点線は103kbpの直列反復配列を示す。

(exon c)の3種の密接な連鎖関係は、テンサイN型株を含む多くの植物種<sup>22) 23) 28) 29)</sup>

<sup>30) 31)</sup> におけると同様に、S-3型mtDNAでも保存されていることが明らかとなった  
(図3-4、図3-5)。

### (3)反復配列

本研究に供試した34個のプロープの多く(28個)は、物理地図上の一箇所の塩基配列にのみハイブリダイズしたが、一方、複数の領域の配列(arrangement)に対してハイブリダイズするプロープも見出された。これは反復配列の存在を示唆している。例えば、図3-2に示すように、N型mtDNAサブ断片531(N)H0.9はコンティグAとコンティグBにおける4箇所の領域にハイブリダイズしたので、これらの領域は反復配列(repeat 1と名付ける)を構成すると考えてよい。

repeat 1およびその周辺配列に関して詳細な物理地図を作成した結果、repeat 1はマスター分子上に4コピー存在し、そのうちの3コピー(repeat 1 copyA,B,C :図3-5)は直列に配置されていることが判った。repeat 1 copyA とcopyCは103kbpの直列反復配列の末端に位置する。またrepeat 1 copyDはこの反復配列ファミリーの他のメンバーとは逆方向に配置されていた。repeat 1のマッピングデータに基づけば、図3-6の矢印で示した3kbpの領域が全コピーに共通した配列である。repeat 1 copyA,BおよびCの間では3kbp共通配列に続く2.8kbpの領域(図3-6では太線で示す)も相同である。さらにcopyA,B,Dにおいては、2.8kbp領域とは反対側の3kbp共通配列隣接域に相同配列(3.5~5.0kbp、図3-6で破線で示す)が伸びており、その中に*rrn26*遺伝子座が含まれている。

repeat 1ファミリーの全コピーが分子内組み換えを担う反復配列であれば、組み換えの結果repeat 1を挟む12(3x4)通りのarrangementsがミトコンドリアゲノム内に混在することが想定される(図3-6)。このようなarrangementsの一部を含むクローン群(図3-7)が見出されたので、repeat 1を介した相同組み換えが実際に生じているのであろう。さらに、N型mtDNAサブ断片367(N)SI-8および367(N)SI-

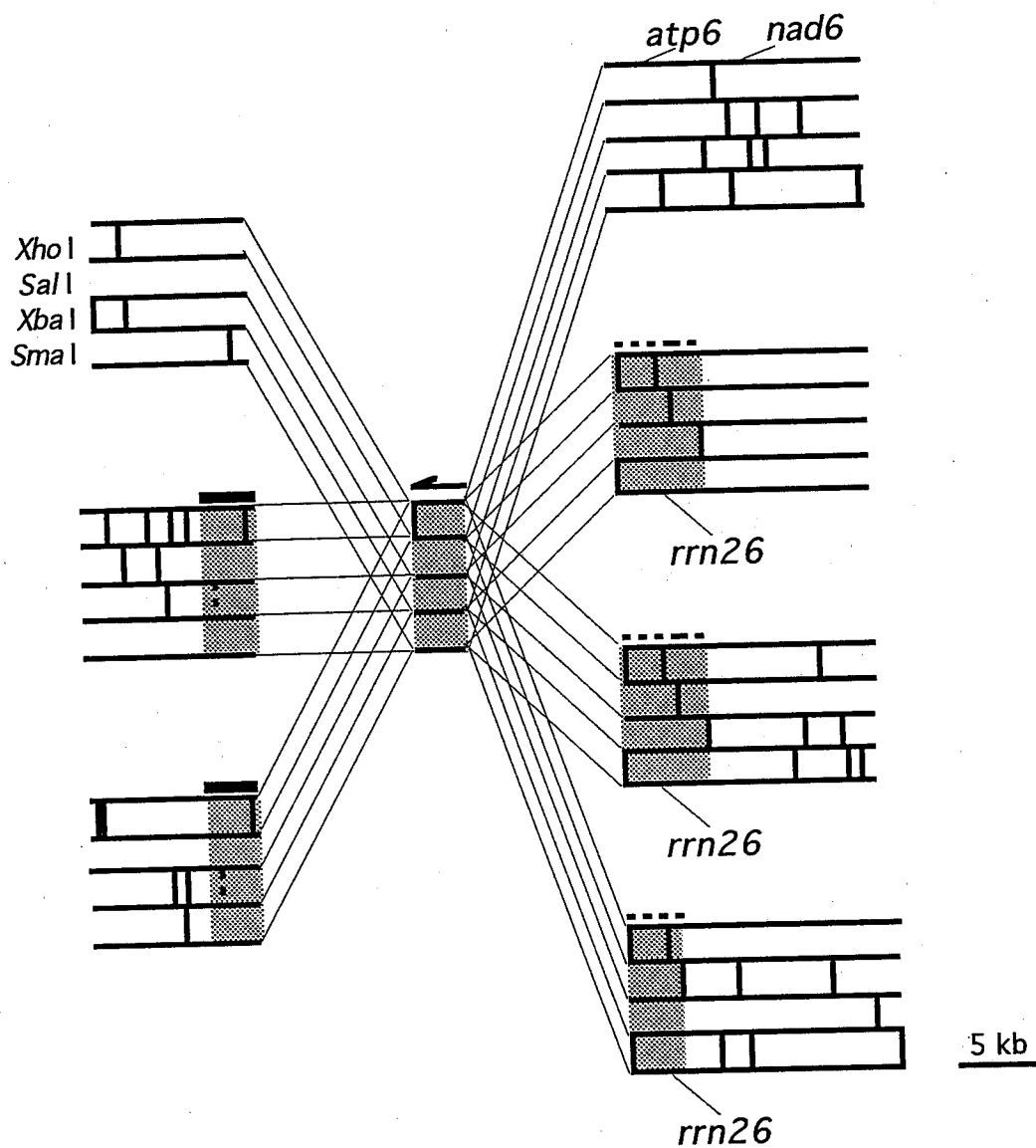


図3-6 repeat1を含む領域の物理地図  
 repeat1 (矢印) の組換えによって生じうる12種のarrangementsのうち、5種のarrangementsを含むS-3型mtDNAクローンが同定されている。

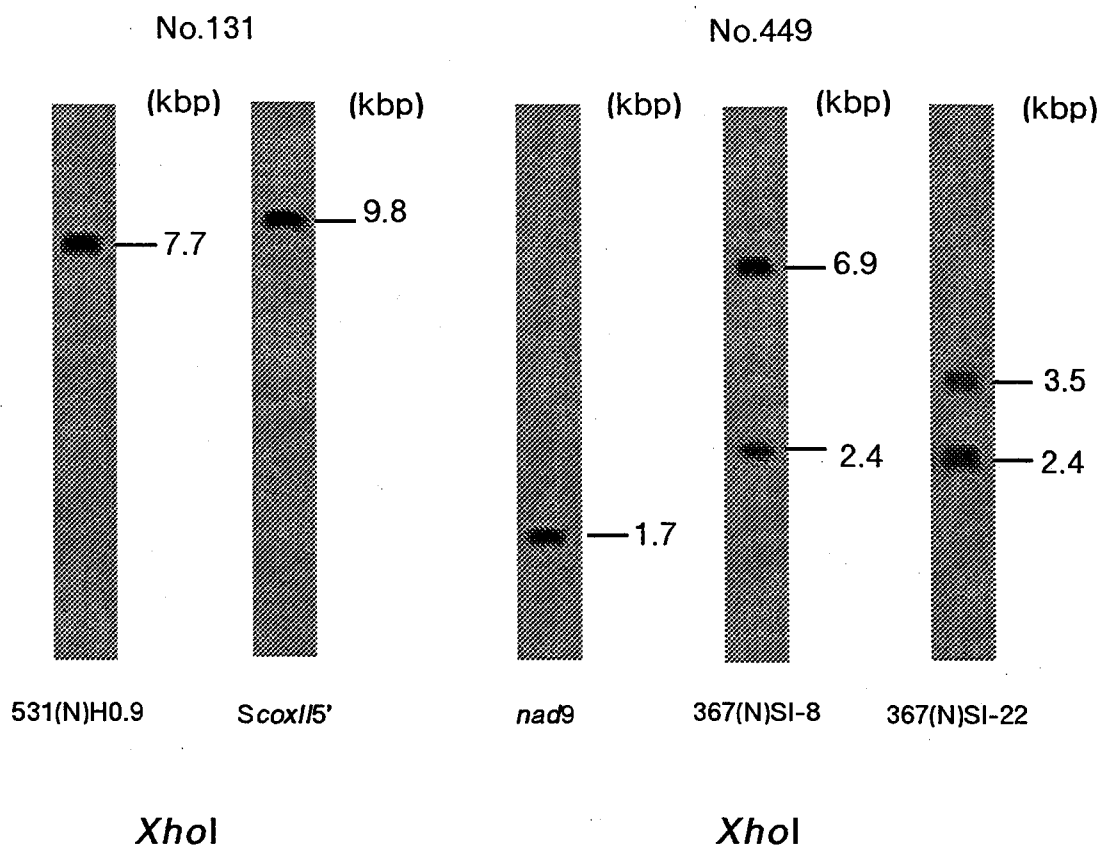
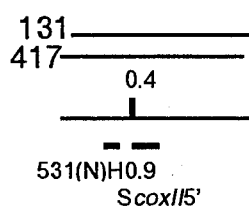
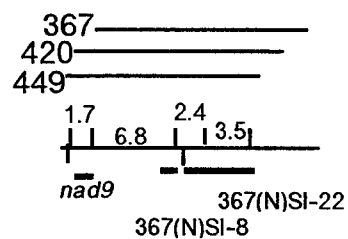


図 3-7 1: repeat1 copyB および copyC 間の組換えにより生じうる arrangement を含むクローン群  
 2: repeat2 を介した組換えにより生じうる arrangement を含むクローン群

22は、図3-2で示したコンティグAとコンティグCにそれぞれ1箇所ずつ含まれる塩基配列と分子雑種を形成した。従って、repeat 1とは別の反復配列(repeat 2と名付ける)の存在が予想される(図3-2)。詳細なマッピングの結果によれば、repeat 2 (5.7kbp)はマスター分子上に2コピー含まれており、その方向は逆向きである(図3-4、図3-5)。repeat 2の相同組み換えにより生じうる産物として、図3-8に示した4(2x2)種類のarrangementsが考えられるが、その内の3種のクローン群が得られた(図3-7)。

## 考察

高等植物のミトコンドリアゲノムのサイズは200kb (アブラナ科植物)<sup>39)</sup>から2400kb (マスキメロン)<sup>40)</sup>まで広汎な変異が認められるが、いずれのミトコンドリアゲノムも哺乳動物や菌類に較べるとサイズが大きい。一般的に、高等植物のmtDNAを制限酵素処理し、ゲル電気泳動による切断像を観察した場合、それぞれの制限酵素断片の化学量比を反映するバンドのエチジウムブロマイド蛍光の強度は、バンド間で著しく変異に富み、植物ミトコンドリアゲノムが不均一な分子種により構成されていることがわかる。従って、単離されたmtDNAに対して制限酵素分析やサザンブロット分析のみに依存した構造解析を適用するのは難しく、オーバーラッピングライブラリーを用いたゲノムウォーキングの手法が好んで採用されてきた<sup>41)</sup>。

テンサイmtDNAに関しても、他の高等植物種と同様にミトコンドリアゲノムが大きく、不均一なDNA分子種から構成されていることが示唆された<sup>14)15)</sup>。本研究においてもオーバーラッピングライブラリーを構築した上でサザンハイブリダイゼーションとウォーキングを併用し、野生ビート由来のS-3型mtDNAの物理・遺伝子地図の作製を試みた。その結果、S-3型ミトコンドリアゲノムが103kbpの配列を互いに共有する2種の環状DNA分子(274kbpおよび234kbp)によって構成されることが想定された。これまでに、カブ、ヒマワリ、イネなど10種を越える高等植物の

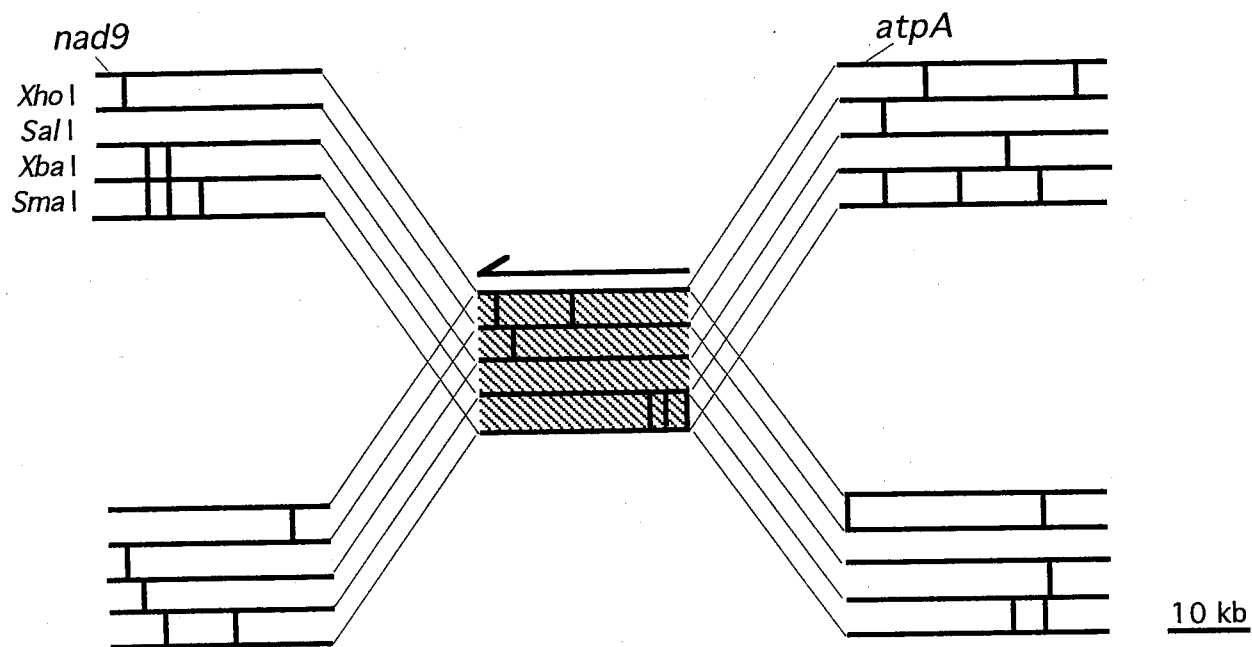


図3-8 repeat2を含む領域の物理地図  
 repeat1 (矢印) の組換えによって生じうる4種のarrangementうち  
 3種のarrangementを含むS-3型mtDNAクローンが同定されている。

mtDNAの物理地図が作成された<sup>42)</sup>が、ほとんどの場合塩基配列の全てを一通り備えた1種類の環状DNA分子（マスターサークル）から構成されるミトコンドリアゲノムが仮定されている。

一方、Folkerts and Hanson<sup>43)</sup>はペチュニアCMS株(系統3688)の mtDNAの物理地図を作製し、このCMS株のミトコンドリアゲノムが130kbpの配列を共有する396kbpと407kbpの環状DNA分子("near-mastercircle")によって構成されるとするモデルを提唱した。現在までに、複数の"near-mastercircle"によりミトコンドリアゲノムが構成されていることが示唆された植物種としては、ペチュニアCMS株に続いてイネ正常株<sup>44)</sup>およびテンサイS-2型CMS株<sup>24)</sup>とS-3型CMS株（本研究）が挙げられる。なお、テンサイS-3型ミトコンドリアゲノムにおいて274kbpおよび234kbpの"near-mastercircle"間で相同組み換えが起こることを仮定すれば、103kbpの直列反復配列を有する508kbpマスターサークルを想定することも可能である（図3-4参照）。

高等植物 mtDNAの物理地図は16～45kbpのクローン化DNA断片をオーバーラップさせながら再構築する過程を経て作製されるため、想定されるマスターサークルが実際にミトコンドリアに含まれるゲノム構造をそのまま反映しているとは必ずしも限らない。実際に、電子顕微鏡観察<sup>45)</sup>やパルスフィールド電気泳動による解析<sup>46)</sup>からは、200kbpを越えるマスターサークルの存在を示すデータが得られていないのが現状である。しかしながら、マスターサークルに含まれる反復配列を介して生み出されるサブゲノムのサイズが電子顕微鏡で観察されたmtDNAのサイズの分布とよく一致しているといった報告<sup>47)</sup>もある。また、マスターサークル仮説は、反復配列ファミリーを含み、これを介した組換え産物としてheterogeneousな分子種コレクションから構成されるという、高等植物ミトコンドリアゲノムの特徴を単純化して説明できる優れたモデルとして、広く受け入れられている。従って、本論文の第4章と第5章においてはS-3型ミトコンドリアゲノムとして想定されたマスターサークルの構造に基づいて、遺伝子の構造・発現解析およびミトコンドリアゲノムの分化機

構の解析を進めた。

シロガラシの事例<sup>40)</sup>を除けば、物理地図が作成された高等植物のミトコンドリアゲノムからは高頻度相同組み換えを担う反復配列が例外なしに見出されてきた<sup>42)</sup>。本研究では、テンサイS-3型ミトコンドリアゲノム中に、2種の反復配列ファミリーrepeat1(3kbp)およびrepeat2(5.7kbp)が見付けられた。マスター染色体上にrepeat 1は4コピー、repeat 2は2コピー存在しており、高頻度相同組み換えの担架体として機能していれば、repeat 1に関しては12通り、repeat 2については4通りのarrangementsが組み換え産物として生じるはずである。しかし、現在までのところ、repeat 1については3種のarrangementsに対応するクローンが得られているに過ぎない。ペチュニア、トウモロコシおよびハツカダイコンにおいては組み換えを伴わない反復配列も見出されている<sup>30) 48) 49)</sup>。それ故、repeat 1とrepeat 2が実際に高頻度の組み換えを担っているか否かは、生じうるすべてのarrangementsに対応するクローンを選抜して確認しなければならない。repeat1の全ての組み換え産物を識別するには最低18kbpの断片をクローン化する必要があり、コスミドベクターで新たにライブラリーを構築してクローンを効率的に選抜するのが適切といえよう。

## 第4章 S-3型ミトコンドリアゲノムに見出された変異遺伝子の発現

### 緒言

前章で述べたように、S-3型 mtDNAの物理・遺伝子地図を完成した。この地図はS-3型CMSの関与遺伝子を同定する上で有益である。本章では、先づS-3型ゲノムの地図と正常型 mtDNAの物理・遺伝子地図<sup>22) 23)</sup>を比較解析することにより、S-3型ゲノムに固有の構造変異域の特定を試みた。その結果、12箇所の変異域（9箇所の再編成と3箇所の制限酵素切断点変異域）を見出した。これらの変異域については更に塩基配列決定による遺伝子検索と転写・翻訳レベルでの発現解析を行った。

### 材料および方法

#### (1)供試材料

S-3型CMS株I-12-CMS(3)、S型CMS株I-12-CMS(R)、S-3型細胞質を有する稔性回復型F<sub>1</sub>植物(I-12-CMS(3):1 X T2n-16-58-51-O:A)およびN型細胞質を有するTK81-OならびにI-12-61Lを供試した。

#### (2)mtRNAの調製

mtRNAの調製はHansen and Marcker<sup>50)</sup>の手法に従った。200~300gの葉に氷冷した300mlの緩衝液C（0.3M マンニトール、50mM Tris-HCl pH8.0, 3mM EDTA, 0.1% BSA, 1.0% PVP, 9mM 2-メルカプトエタノール）を加えて磨碎し濾液を10分間、3500 rpm, 4℃（水平ローター 半径107mm）で遠心した。上清を20分間、15000rpm（定角ローター 半径107mm）で遠心して得た粗ミトコンドリア沈殿を12mlの緩衝液D（7M 塩酸グアニジン、25mM クエン酸ナトリウム、98mM 2-メルカプトエタノール、0.01% ギャラクソシル）に懸濁し、塩化セシウムを加えた後（終濃度 50% W/V）、塩化セシウム溶液（5.7M CsCl, 0.1M EDTA）に重層した。次に23000rpm（日立SPR28SAローター）, 20℃で24時間遠心し

mtRNAを沈降させた。さらにフェノール処理を行い精製mtRNA標品を得た。

### (3)ノーザンハイブリダイゼーション

精製mtRNA (10~20  $\mu$ g)をアガロース変性ゲル(1.2~1.5% アガロース, 20mM MOPS-NaOH pH7.0, 0.66Mホルムアルデヒド)を用いた電気泳動により分画した後、ナイロンメンブレンフィルター(Hybond-N, Amersham社)にトランスファーした。次いで [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-dCTPで標識したプローブとの間で分子雑種を形成させた後、フィルターを2xSSC、0.1%SDSで洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。

### (4)塩基配列決定法

シーケンス反応は、Thermo Sequenase 蛍光シーケンサー用サイクルシーケンシングキット (Amersham社) を使い、そのプロトコールに従って行った。得られた反応液をLI-COR社のオートシーケンサー(LI-COR4000)を用いて解析し、塩基配列の決定を行った。また、塩基配列の解析と検索には、GENETYXプログラム (ソフトウェア開発KK) を使用した。

### (5)プライマー伸長法

プライマー伸長法はSambrook et al.<sup>19)</sup>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27nt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( $10^4 \sim 10^5$  cpm)を5  $\mu$ 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、40mM PIPES pH8.0、0.4mM NaCl)中で85℃、10分間加熱後、30℃で一晩アニーリング反応を行い、エタノール沈殿した。沈殿物をRT反応液(50mM Tris-HCl pH8.3、50mM KCl、4mM DTT、8mM MgCl<sub>2</sub>、0.8mM dNTP、50  $\mu$ g/ml アクチノマイシンD、1U/ $\mu$ l RNaseインヒビター)に溶解し、AMV逆転写酵素を加えて、45℃で1時間反応させ、cDNAを合成した。0.5M EDTA(pH8.0)でcDNA合成反応を停止させた

後、RNase Aで37℃、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、目的の領域を含むプラスミドクローンとアニーリングしてシーケンス反応を行い、反応物とcDNAをともに6%アクリルアミドゲルで電気泳動し、RNAの5'末端を決定した。

#### (6)RT-PCR法

Singer-Sam et al.<sup>51)</sup>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  $\mu$ gのmtRNAをPCR反応混合液(10mM Tris-HCl pH8.3、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.01%(W/V)ゼラチン、200  $\mu$ M dNTPs、1  $\mu$ Mプライマー)に溶解し、AMV逆転写酵素とTaqIポリメラーゼをそれぞれ1  $\mu$ l 加え、サーマルサイクラー中で50℃、8分間保温後95℃、1分 → 55℃、2分 → 72℃、2分30秒の反応を20~30サイクル継続することによりcDNAの合成と増幅を行った。

#### (7)ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングはSambrook et al.<sup>19)</sup>の方法に従った。すなわち、アクリルアミドゲルで分画したタンパク質をメンブレン(Hybond-C, Amersham社)へエレクトロブロッティング法を用いてトランスファーした。このメンブレンに対してブロッキングを行った後に、一次抗体ならびにペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させた。次いで、ECL検出システム (Amersham社) を用いて、メンブレン上の目的抗原をフィルムに検出した。

### 結果

#### (1) N型とS-3型mtDNAの構造比較

S-3型ミトコンドリアゲノムのマスター染色体の全域を網羅する33個の整列クローンをプローブに用いてRFLP分析を行い、S-3型 (I-12-CMS(3)) およびN型

(TK-81-0) ミトコンドリアゲノム間の構造比較を試みた。RFLP分析の一例を図4-1に示す。S-3型mtDNAクローンNo.395をプローブに用い、S-3型およびN型mtDNAのXhoI、SalIあるいはXbaI分解物との間でサザンブロット分析を行った。その結果、両mtDNA間では11.3kbp、5.4kbpのXhoI断片、15.7kbpと2.6kbpのSalI断片ならびに8.0kbpと7.4kbpのXbaI断片に共通してハイブリダイゼーションシグナルが現われた。これらの共通断片に対応する領域に関しては両ゲノム間で保存されているとみてよい。これに対し、S-3型特異的に見出された10.8kbp XhoI断片やN型でのみ見出された2.8kbpおよび10.0kbp XhoI断片のような固有断片は保存域に隣接する変異域に当たると考えられる。そこで、これらの制限酵素断片を両ゲノムの物理地図と対応づけ、両ゲノムの構造変異サイトを特定した(図4-1)。

同様のRFLP分析をゲノム全域について行った。その結果、S-3型とN型mtDNAの間で塩基配列が一続きのまま保存されている領域（ハツカダイコンの事例<sup>28)</sup>に倣いリンケージ群と称す）が8箇所、見出された（図4-2）。最も長いリンケージ群Fは88.5kbpにおよぶ。リンケージ群Aを起点に両ゲノムを比較した場合、少なくとも3領域（リンケージ群B,G,H）が逆位を起こし、リンケージ群の配置も異なっている。また、両細胞質のmtDNAは反復配列の構成によっても特徴づけられる。

リンケージ群A(76.7kbp)はS-3型mtDNAにおいて重複しており、103kbp直列反復配列の大部分を占める（85%）。さらにS-3型mtDNAにおいてはリンケージ群Fに含まれる領域Cも重複し、repeat 2ファミリーを形成している。repeat 1ファミリーについては反復配列のコア部分(約2kbp)はN・S-3両型mtDNAに共通して存在するが、それに続く相同配列の長さは両ゲノム間で異なる。また、repeat 1ファミリーのメンバーはN型では3コピー存在するのに対し、S-3型ゲノムにおいては4コピー含まれている。一方、RFLP分析からは対応域を特定し得ない配列も見い出された。S-3型では8箇所（約90kbp）、N型では2箇所（12kbp）がこれに相当し、いずれも各ゲノム固有の配列を含む可能性が高い（図4-2）。

以上のようにS-3、N両ミトコンドリアゲノム間では広範なゲノム再編成が認め

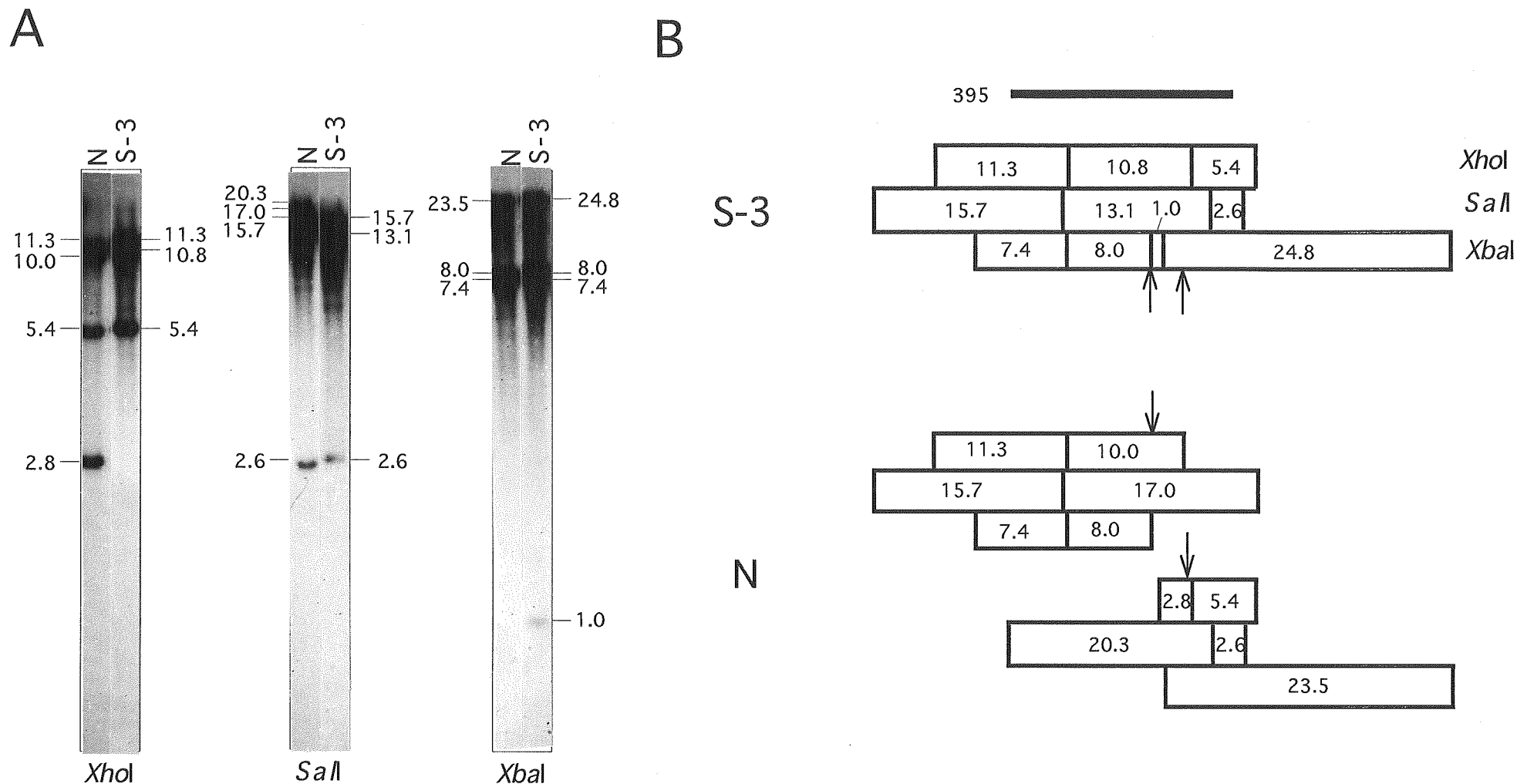
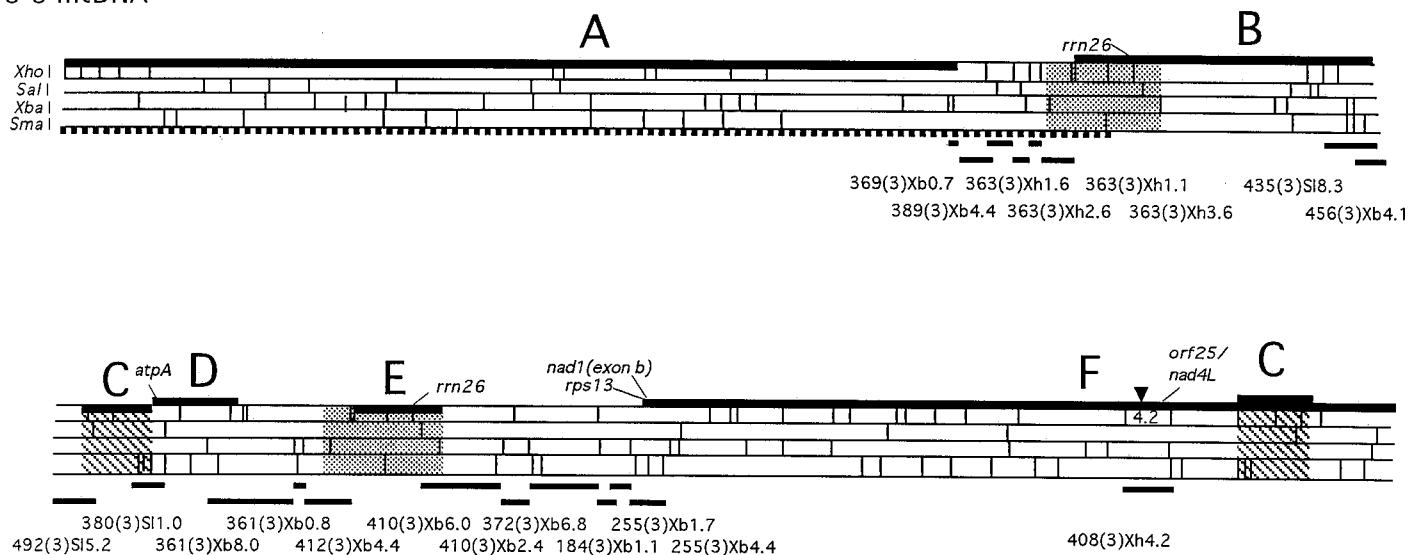
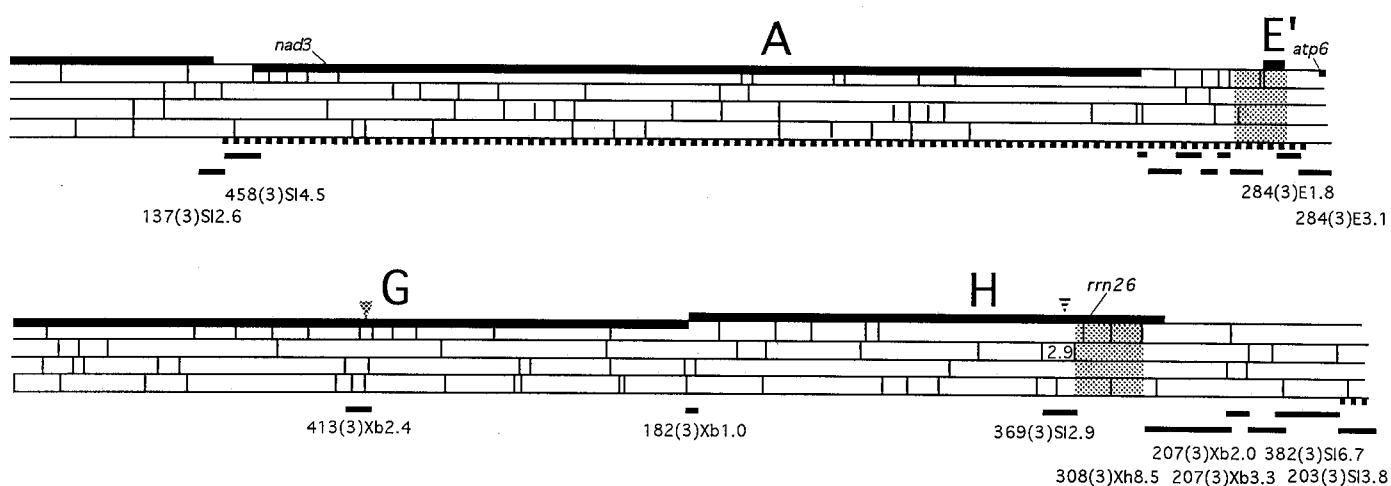


図4-1 RFLPパターンに基づくN型およびS-3型mtDNA間の構造比較解析の一例

A N型(TK81-O) および S-3型(I-12CMS(3)) mtDNAの *XhoI*、*SalI* および *XbaI* 分解産物に対して、S-3型mtDNAクローン No.395をハイブリダイズさせた。その結果、両 mtDNA間では共有断片に加えて、各ゲノム型固有断片にもハイブリダイゼーションシグナルが見出された。

B Aで検出されたDNA断片のゲノム上の位置を特定し、両ゲノム間の構造保存域と変異サイト(矢印)を推定した。

# S-3 mtDNA



## N mtDNA

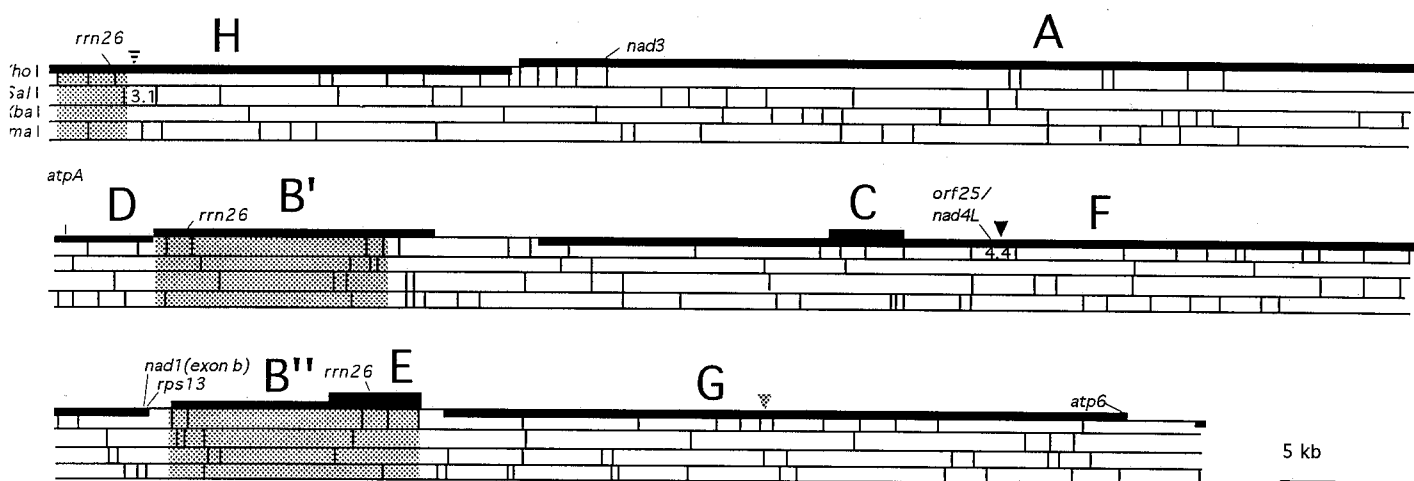


図4-2 N型<sup>22/23</sup>およびS-3型mtDNAの構造比較

両 mtDNA間では塩基配列が一続きのまま保存されている領域（リンケージ群）が8箇所(A~H) 見出された。▽ は *SmaI* 切断点の獲得／欠如変異域、≡ および ▼ は挿入／欠失変異域を示す。S-3 mtゲノムにおいて見出された構造変異域をカバーする32個のクローンを図示した。反復配列を地図上で網かけおよび斜線模様の領域として表す。

られたが、反面、個々のリンケージ群内の分子構造は互いに保存されている。リンケージ群A、B、D、F、G、Hを合計すると共有配列のサイズは312.8kbpに達する。この領域に関して両ゲノム間で変異が見出されたのは3箇所にすぎない。すなわち、リンケージ群Fの*orf25/nad4L*近傍とリンケージ群Hの*rrn26*近傍の2箇所において検出された0.2kbpの挿入／欠失変異ならびに、リンケージ群Gの中央部における*SmaI* サイト変異である（図4-2）。

## (2) S-3型ミトコンドリアゲノムに見出された構造変異域の転写

S-3型ミトコンドリアゲノムから見出された構造変異が転写に影響を及ぼしているか否かを明らかにするため、ノーザンブロット分析を行った。プローブに用いたDNAは再編成に基づく9箇所の構造変異域および3箇所の制限酵素切断点変異域（図4-2）に相当する32個のS-3型 mtDNAサブクローン（図4-2）である。I-12-61-L（N型）およびI-12-CMS(3)（S-3型）の葉より調製したmtRNAに対して、前述の32個のプローブをハイブリダイズさせた。なお、I-12-61-LとTK-81-0が同一の正常型ミトコンドリアゲノムを有することは詳細なサザンブロット分析を通じて確認している（小野寺ら、未発表）。

ノーザン解析の例を図4-3に示す。ゲノミッククローン363(3)Xh1.1をプローブに用いた場合、I-12-61-L mtRNAについては転写物が検出されず、他方I-12-CMS(3) mtRNAに関しては1.2kbと1.0kbのシグナルが得られた。プローブによっては207(3)Xb2.0のように両系統間で同一の転写パターンが認められるものや、389(3)Xb4.4のようにハイブリダイゼーションシグナルが検出されない事例も見出された。ノーザンブロット解析によるデータをまとめて示したのが表4-1である。この表から明らかなように9種のS-3型 mtDNAサブクローンをプローブに用いた時に、系統I-12-61-LとI-12-CMS(3)の間で異なる転写パターンが検出された。そのうち、クローン363(3)Xh1.1と363(3)Xh3.6、361(3)Xb0.8と412(3)Xb4.4、255(3)Xb1.7と255(3)Xb4.4ならびに284(3)E1.8と284(3)E3.1に相当する領域

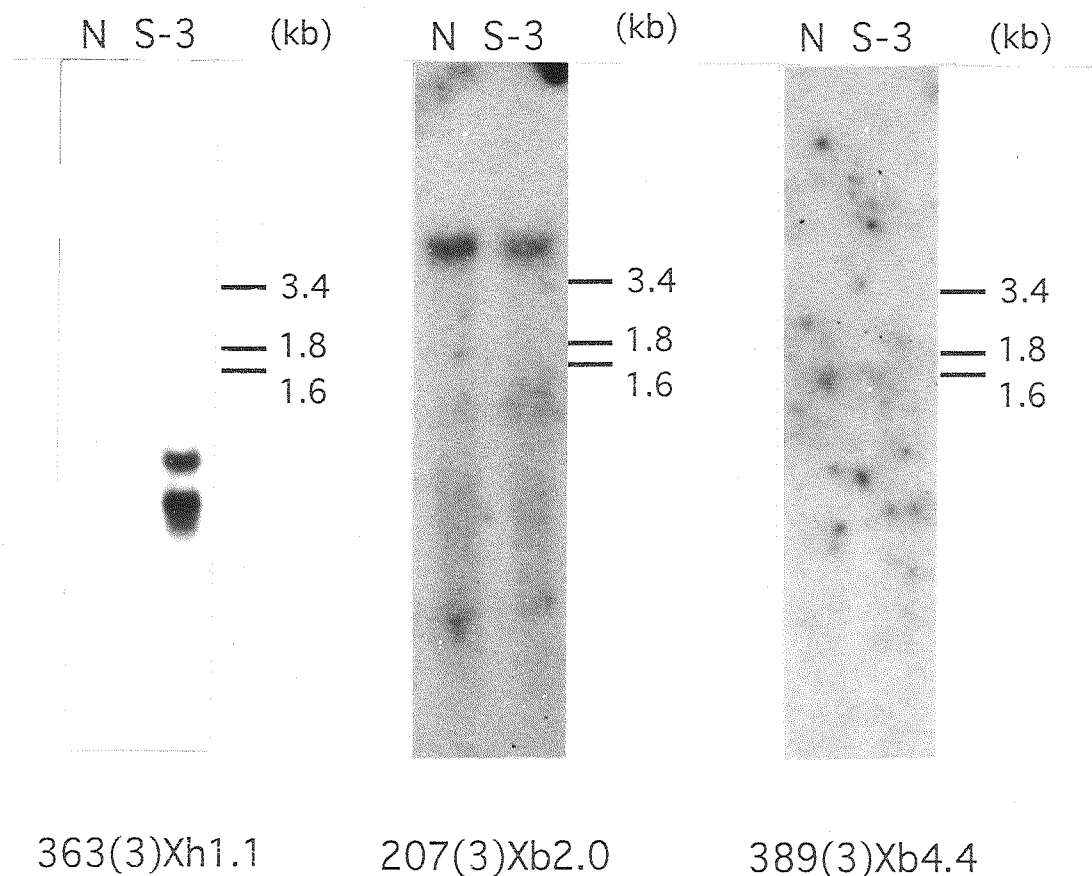


図4-3 S-3型ミトコンドリアゲノムの構造変異域に関するノーザンブロット解析の一例

S-3型ミトコンドリアゲノミッククローン（図4-2参照）をプローブとして用いて、系統I-12-61LおよびI-12CMS(3)の成葉より調製したmtRNAに対してノーザンブロット分析を行った。

ゲノミッククローン363(3)Xh1.1：系統間で異なるバンドパターンを検出

ゲノミッククローン207(3)Xb2.0：系統間で同一なバンドパターンを検出

ゲノミッククローン389(3)Xb4.4：シグナルを検出しない

表4-1 S-3型ミトコンドリアゲノムの構造変異域に関するノーザンブロット分析のサマリー

I-12-61L(N)およびI-12CMS(3)(S-3)の成葉より調製したmtRNAに対してノーザンブロット分析を行った。

| プローブ                        |     | 転写物のサイズ(kb) |     |     |     |     |     |     |
|-----------------------------|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| (1)系統間で転写パターンが異なる場合         |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 363(3)Xh1.1                 | N   |             |     |     | -   | -   |     |     |
|                             | S-3 |             |     |     | 1.0 | 1.2 |     |     |
| 363(3)Xh3.6                 | N   |             |     |     | -   | -   |     |     |
|                             | S-3 |             |     |     | 1.0 | 1.2 |     |     |
| 361(3)Xb0.8                 | N   |             |     |     | -   |     |     |     |
|                             | S-3 |             |     |     | 1.8 |     |     |     |
| 412(3)Xb4.4                 | N   |             |     |     | -   |     |     |     |
|                             | S-3 |             |     |     | 1.7 | 1.8 |     |     |
| 410(3)Xb2.4                 | N   | -           | -   | -   | -   |     | 4.1 |     |
|                             | S-3 | 0.8         | 1.1 | 1.3 | 2.2 |     | 4.1 |     |
| 255(3)Xb1.7                 | N   | 0.8         | 1.0 | 1.1 | 1.4 | 3.8 | -   |     |
|                             | S-3 | 0.8         | 1.0 | 1.1 | 1.4 | 3.8 | 6.4 |     |
| 255(3)Xb4.4                 | N   | 0.8         | 1.0 | 1.3 | 1.5 | 1.8 | 2.1 | -   |
|                             | S-3 | 0.8         | 1.0 | 1.3 | 1.5 | 1.8 | 2.1 | 2.4 |
| 284(3)E1.8                  | N   |             |     |     |     | -   |     |     |
|                             | S-3 |             |     |     |     | 2.2 |     |     |
| 284(3)E3.1                  | N   |             |     | 1.0 | -   | -   |     |     |
|                             | S-3 |             |     | -   | 1.6 | 2.2 |     |     |
| (2)系統間で転写パターンの差の検出されない場合    |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 389(3)Xb0.7                 |     | 0.8         |     |     |     |     |     |     |
| 363(3)Xh2.6                 |     | 0.7         | 1.3 | 2.1 | 4.0 |     |     |     |
| 363(3)Xh1.6                 |     | 0.9         | 3.4 |     |     |     |     |     |
| 435(3)SI8.3                 |     | 1.1         | 1.5 | 1.8 | 2.8 |     |     |     |
| 492(3)SI5.2                 |     | 1.7         | 2.4 |     |     |     |     |     |
| 380(3)SI1.0                 |     | 1.9         | 2.4 |     |     |     |     |     |
| 410(3)Xb6.0                 |     | 1.7         | 2.6 |     |     |     |     |     |
| 184(3)Xb1.1                 |     | 1.1         | 1.7 | 2.7 |     |     |     |     |
| 137(3)SI2.6                 |     | 1.0         | 1.3 | 2.1 | 4.1 |     |     |     |
| 458(3)SI4.5                 |     | 0.7         | 0.8 | 1.0 | 1.2 | 2.1 | 2.8 | 3.6 |
| 369(3)SI2.9                 |     | 0.8         | 0.9 | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.4 | 3.3 |
| 408(3)Xh4.2                 |     | 0.9         | 1.8 |     |     |     |     |     |
| 182(3)Xb1.0                 |     | 1.2         | 1.8 |     |     |     |     |     |
| 207(3)Xb2.0                 |     | 3.7         |     |     |     |     |     |     |
| 203(3)SI3.8                 |     | 1.7         |     |     |     |     |     |     |
| (3)ハイブリダイゼーションシグナルの検出されない場合 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 389(3)Xb4.4                 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 456(3)Xb4.1                 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 361(3)Xb8.0                 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 372(3)Xb6.8                 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 413(3)Xb2.4                 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 308(3)Xh8.5                 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 207(3)Xb3.3                 |     |             |     |     |     |     |     |     |
| 382(3)SI6.2                 |     |             |     |     |     |     |     |     |

はそれぞれS-3型ゲノム上で隣接している。従って、以上の4領域と410(3)Xb2.4がカバーする領域を併せた5領域が、S-3型CMS株に固有の転写パターンをもたらす構造変異域であり、これら5領域に変異ミトコンドリア遺伝子の含まれる可能性が示唆される。一方、N型、S-3型両系統共に転写物を検出しなかったプローブは8種、同一の転写パターンが検出されたプローブは15種を数えた（表4-1、図4-3）。

### (3) S-3型CMS株に固有の転写パターンをもたらす構造変異域の構造と発現

N型ゲノムとの構造比較を通じて見出されたS-3型ゲノムの構造変異域のうち、S-3型株固有の転写パターンが検出された5領域のそれぞれについて塩基配列を決め、併せて発現解析を試みた。

#### i) *orf129*

##### § 塩基配列

S-3型 mtDNAサブクローン363(3)Xh1.1および363(3)Xh3.6はS-3型マスター染色体上の2箇所、すなわちrepeat 1ファミリーのcopyA、copyCの一部と隣接域(4.7kb)をカバーする（図4-2、図4-4）。プローブを細分しノーザンブロット分析を繰り返した結果、転写は図4-4に示した363(3)Xh1.1および363(3)BXh1.0にカバーされる領域（以下 363(3)2.2SEQ）に限定されることが判った。363(3)2.2SEQの塩基配列を決めた結果、この領域は全長2242bpであった（図4-5）。

EMBLおよびGen Bankのデータベースを利用して、363(3)2.2SEQと既知の塩基配列との間で相同性検索を試みた結果、テンサイS型CMS株から見出された*coxII*遺伝子(*ScoxII*)の5'隣接配列<sup>21)</sup>との相同性が示唆された。そこでS型株TK81-MSを試し、あらためて*ScoxII*の上流1.1kb領域に関してクローニングを行い塩基配列を決定したのち、再び363(3)2.2SEQとの相同性を調べた。その結果、363(3)2.2SEQにおける1142bpの配列と、*ScoxII*遺伝子座のうち開始コドンを中心(0)にして-1138から+4に至る配列との間に極めて高い相同性が見出された。変異箇所は

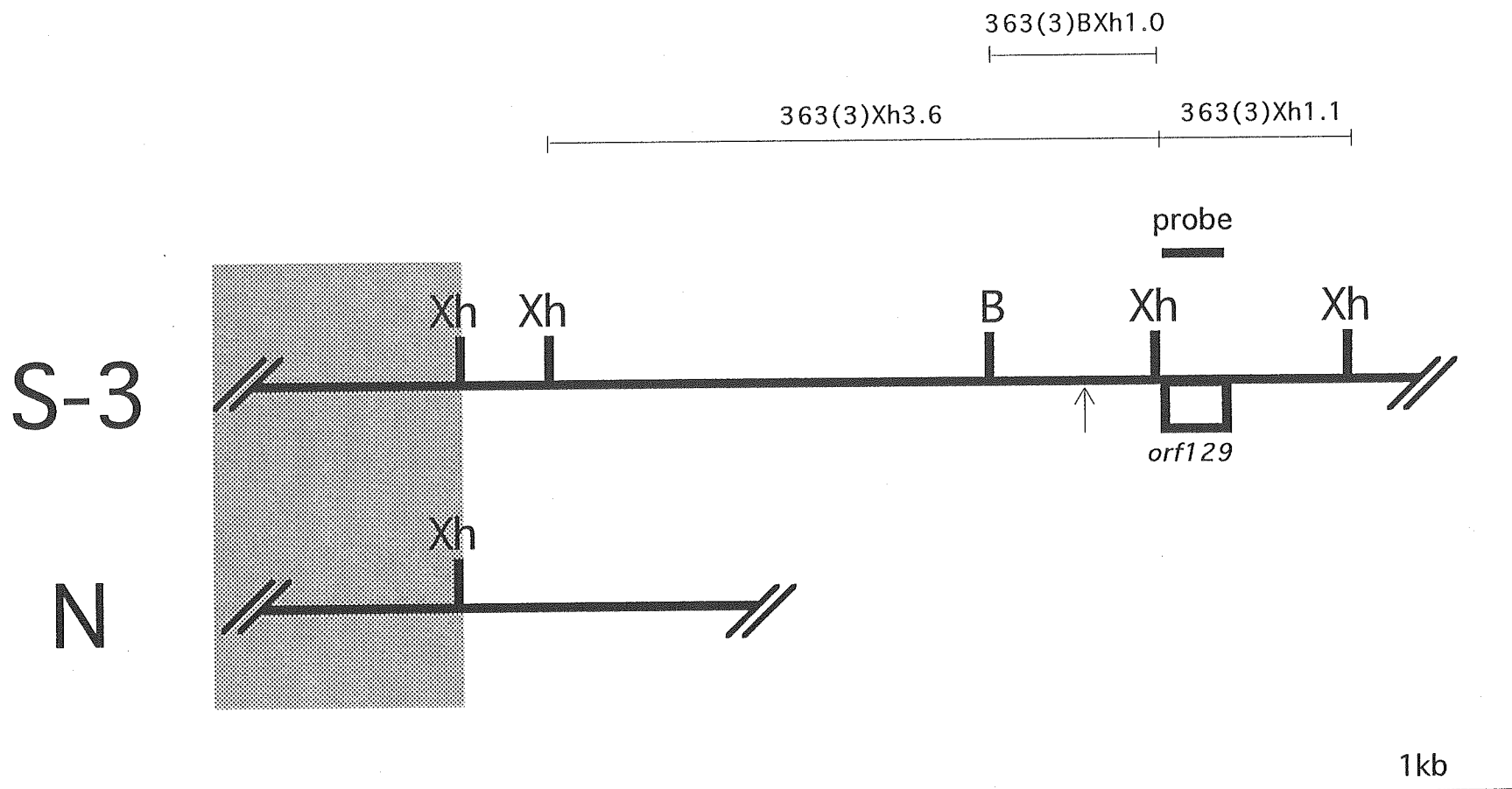


図4-4 *orf129*を含む領域の物理地図

S-3型 mtDNAクローン363(3)Xh3.6、363(3)BXh1.0および363(3)Xh1.1にカバーされるS-3型ゲノム領域のXhoI(Xh)およびBamHI(B)切断点地図(S-3)。クローン363(3)BXh1.0および363(3)Xh1.1の塩基配列を決定した結果、129コドンから成るORF(*orf129*)が見出された。*orf129*の転写物の5'末端を矢印で示す。ノーザンブロット分析でプローブとして用いた領域(probe)も図示した。また、比較としてN型ゲノム相同域の物理地図(N)も図示し、N型およびS-3型ゲノム間で構造が保存されている領域を網かけした。

```

S  GGATCCCGCAAACGGAGACATGAACCAAGCAGGAAGAGGAATTGGAGCAGCTCTTTGCCT -1079
*****
S-3 GGATCCCGCAAACGGAGACATGAACCAAGCAGGAAGAGGAATTGGAGCAGCTCTTTGCCT 60

S  TATGTTATGATCTCATAACACCGAAAGATTAGACCCTTTTTTTTCCTTTCTTTCAGGATG -1019
*****
S-3 TATGTTATGATCTCATAACACCGAAAGATTAGACCCTTTTTTTTCCTTTCTTTCAGGATG 120

S  AAAACACAGGGCAGGAGGGTATAGAAAGTCCTCTATATGCCGTCCATAGTCCATCGACGC -959
*****
S-3 AAAACACAGGGCAGGAGGGTATAGAAAGTCCTCTATATGCCGTCCATAGTCCATCGACGC 180

S  CTCGTAGTACCACTTACAGTACTCGCAGAGTGATTGAGTCCAAGATTTTAACTCAATCTT -899
*****
S-3 CTCGTAGTACCACTTACAGTACTCGCAGAGTGATTGAGTCCAAGATTTTAACTCAATCTT 240

S  CTCAACGAGGAAAGAAGCATCGTCGTCGAGCTGGCGAGAGAAATCCTCTATAAGTCTCTC -839
*****
S-3 CTCAACGAGGAAAGAAGCATCGTCGTCGAGCTGGCGAGAGAAATCCTCTATAAGTCTCTC 300

S  TACGTAACCCCAATCGGGCTTACAGCTCTCAACTAACATCATACCAATCTTATAACAGCT -779
*****
S-3 TACGTAACCCCAATCGGGCTTACAGCTCTCAACTAACATCATACCAATCTTATAACAGCT 360

S  TACCAGAAAACCCTCTGGAACCTAACCAGACTGAGAAAGGCATAGGACGGATACCACC -719
*****
S-3 TACCAGAAAACCCTCTGGAACCTAACCAGACTGAGAAAGGCATAGGACGGATACCACC 420

S  TGGAGAGAGGGCGACAAGAATGTGCCGAAACCCGTGACGATTGTAATTTGGGTAAATGTT -659
*****
S-3 TGGAGAGAGGGCGACAAGAATGTGCCGAAACCCGTGACGATTGTAATTTGGGTAAATGTT 480

S  ACAAGGCTTACAGGAAGACCTCCTAACCCCTCTTAATCTCAGAGAAGTCTGAATGTTATT -599
*****
S-3 ACAAGGCTTACAGGAAGACCTCCTAACCCCTCTTAATCTCAGAGAAGTCTGAATGTTATT 540

S  ACACCCTATTTGCTTTGCTTCATCACCGGCATTTTAAAGCCACAGCGAACCAAGCTGACC -539
*****
S-3 ACACCCTATTTGCTTTGCTTCATCACCGGCATTTTAAAGCCACAGCGAACCAAGCTGACC 600

S  TACCTCTATCACTAAACTCTACCCTGGGCTCTTTTACCTCTAAAAAGATATTTTCGTAAGA -479
*****
S-3 TACCTCTATCACTAAACTCTACCCTGGGCTCTTTTACCTCTAAAAAGAGATTTTCGTAAGA 660
                                     ↑

S  AAAGAAAGTGCTTTTTCTAGGGTAGATGAAAGGAATGCGGAAAGGCTATCCGAGTTCAC -419
*****
S-3 AAAGAAAGTGCTTTTTCTAGGGTAGATGAAAGGAATGCGGAAAGGCTATCCGAGTTCAC 720

S  AGGCGTAGTTGCGTGTACTTCATTTCAATTGAAATTGAGTTCGTTACCGCACCGTGGGTAG -359
*****
S-3 AGGCGTAGTTGCGTGTACTTCATTTCAATTGAAATTGAGTTCGTTACCGCACCGTGGGTAG 780

S  AAGATCCTTCTCTTTCTCTGTGAAGATAGGCTGTGCTTTGCATGTCAAGTGCGAAATTGG -299
*****
S-3 AAGATCCTTCTCTTTCTCTGTGAAGATAGGCTGTGCTTTGCATGTCAAGTGCGAAATTGG 840

```

図4-5 *orf129*の塩基配列

363(3)2.2SEQ(S-3)および363(3)2.2SEQと相同性が見出されたテンサイS型CMS-*coxII*遺伝子(*ScoxII*)<sup>21)</sup>5'隣接域(S)の塩基配列を並列して示す。*orf129*がコードするアミノ酸を塩基配列の下に示す。SD様配列を四角で囲った。下線を引いた配列および網かけした配列はそれぞれテンサイN型<sup>21)</sup>およびベチュニアの*coxII*遺伝子<sup>52)</sup>5'隣接域との相同配列である。プライマー伸長分析に用いたアンチセンスプライマーは点線で示す配列をもとに設計した。矢印は*orf129*および*ScoxII*転写物の5'末端の位置を示す。

S ATCGAAAAATTGCGTATGATATGAAAGGTTTATGGTCTATCTAAGACTCTCTTTGATATC -239  
 \*\*\*\*\*

S-3 ATCGAAAAATTGCGTATGATATGAAAGGTTTATGGTCTATCTAAGACTCTCTTTGATATC 900

S AATCACTAACTAAAGAAAGTAAATTTGAAAAATCATAAGATAAGAGAAGAAAGAAGAG -179  
 \*\*\*\*\*

S-3 AATCACTAACTAAAGAAAGTAAATTTGAAAAATCATAAGATAAGAGAAGAAAGAAGAG 960

S TATCTTTCGTTGTAGCCATAGAAGACTCGACCCAAGCAATTCTTATGCCCAAACTCCCA -119  
 \*\*\*\*\*

S-3 TATCTTTCGTTGTAGCCATAGAAGACTCGACCCAAGCAATTCTTATGCCCAAACTCCCA 1020

S TGTTTTCCGGATCATTGGTTAAGAACCAACCGGCAATTTATGTCTTCCTGAATTGGGAGA -59  
 \*\*\*\*\*

S-3 TGTTTTCCGGATCATTGGTTAAGAACCAACCGGCAATTTATGTCTTCCTGAATTGGGAGA 1080

ScxII→ M

S GCAAGAATCAGTCTTTCTTCATTTCTCGAGAGAGCGGAGCAGTCAAGAATGAACCAAAT 2  
 \*\*\*\*\*

S-3 GCAAGAATCAGTCTTTCTTCATTTCTCGAGAGAGCAGAGCAGTCAAGAATGAACCAAAT 1140  
 orf129→ M

I V R.....

S GATTGTTCTGA.....  
 \*\*

S-3 GAATCCTTATATTCTGCAGTTTTTGGCCGACATGGCCACAGCAATTTTAACGATTGCAGG 1200  
 N P Y I L Q F L A D M A T A I L T I A G

S-3 AGTTGCATATCTACCACTTATTGTGTTAATTGTATTTAGGGCCGGCGCCTTCGAGGGTT 1260  
 V A Y L P L I V L I V F R A G G L R G L

S-3 AAATGAAGAGAATGCAAGCGAAAGACTCTTAGACCTTTGTTGTGATACGCTGAAGGAACA 1320  
 N E E N A S E R L L D L C C D T L K E Q

S-3 GATCAAAAACAAAATTGAAGAGTTACTCCAGGTTTATTATAATAATTCTGTACCTTTGCC 1380  
 I K N K I E E L L Q V Y Y N N S V P L P

S-3 GTCTGGTCGGAGGATTCAAGACGCAGCAGCCTTCCTCCATCAGGATTCAGAATCCTTGA 1440  
 S G R R I Q D A A A F L H Q D S E S L E

S-3 ACAACTGCTAATGATTTTGAAAAATATGACCGAATTGGGCGTTCAAAGTCAAGAATTTTT 1500  
 Q L L M I L K N M T E L G V Q S Q E F L

S-3 ACAAGTTTTACTCTATCTCTCACAGTGAAGATAGATGGAGTCTTTGCACTACAATGGATT 1560  
 Q V L L Y L S Q

S-3 TGGCGGGAGTACTTCTTTATTATAAGCGAGGACCGCCTTTTATGTTACTCGTCGTTTGGC 1620

S-3 TTGAATCTCGTTCCTTAGGAGGCTCGCAAGTTTTTAAGAAGTTACATTGGAAAAAGGCT 1680

S-3 CCTCCCCGAACATGCCTTCGGTGAAGGTGGGGTTCGTCATAAGAACGAGGCCGCTCTT 1740

S-3 TGGGCGGGGAAAGGGAAGTGGGTCCCTTTTCGCTTTATTTAGTTTAGGTCGATCAGAAGG 1800

S-3 CGCTGGAAGTCTGTTGTTGCACAGTTGATAATCGGATATAAGCGGATAGCTAATCCCTCTT 1860

S-3 TCAACGAGAGTTGCGGACCCTCTCTTACTTACTCTTAGTGCTGTGCGAGCCTCGGTTTCA 1920

S-3 TTTCTTCTTCTAAGGCAGCTAGCTAGGCCTCTTGAGAGCTCAGGATTGGACGGAACCTT 1980

S-3 ACGGTTGGACTATCGAACAGCTGTTGGTGGGGAATAATCTCCTTTCCCTTGATTGCTGCG 2040

S-3 GGCCTTCATTGCCGAACTGGACTGGCTAGGATCACTAGAGGGGACAGACTACCAGGACT 2100

S-3 AGTCCGCTTCCCAATAGGAAGAGCAAACAGCAACTATTAGTTCAGCTTTCCGGGCTCTCA 2160

S-3 TAACAGCCCTGGTTTGAGCATCTCCCTAGCCTACCTACTTTTCAAGGTCAAGTCTAATA 2220

S-3 GAGTAGAGGCAATCCACTCGAG 2242

-23および-490の2箇所のみに限定されている（図4-5）。また、363(3)2.2SEQの一部（1090～1142および1113～1140）の配列はテンサイ正常型*coxII*遺伝子<sup>21)</sup>およびペチュニアの*coxII*遺伝子<sup>52)</sup>の5'隣接配列と高い相同性（それぞれ94%および100%）を示すことも判明した。

363(3)2.2SEQの塩基配列決定を通じて得られた重要な知見は、1043から1525の位置にかけて読み取り枠が存在することである。この読み取り枠にはin frameのメチオニンコドンが、4個見出される。転写開始および翻訳開始等に関わる因子がテンサイ*ScoxII*と同じかあるいは酷似していると仮定した場合には、1139の位置に翻訳開始コドンが存在し分子量14528のタンパク質をコードするORF（*orf129*と命名）を組むことが出来る（図4-5）。

## § 転写

*orf129*の転写物を確認するため、ノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。完全不稔を示すI-12CMS(3)（遺伝子型：S-3 *rfa rfa rfb rfb*）ならびにS-3型細胞質を有する稔性回復型F1株I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:A（遺伝子型：S-3 *Rfa rfa Rfb rfb*）の葉および花蕾からmtRNAを調製し、フィルターへトランスファーした。ノーザンブロットにはI-12-61-L（N型）とI-12CMS(R)（S型）の葉より抽出したmtRNAも対照として含めた。図4-4に示した*orf129*コード域に相当するDNA断片をプローブに用いてノーザンブロットとハイブリダイズさせたところ、I-12-61-LおよびI-12CMS(R)のmtRNAからはシグナルが検出されなかったのに対して、I-12CMS(3) mtRNAから特異的に1.2kbおよび1.0kbの転写産物が検出された（図4-6）。従って、*orf129*はミトコンドリア内で実際に転写されていると考えてよい。なお、I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:A F<sub>1</sub>のmtRNAからも同一のハイブリダイゼーション像が得られており、稔性回復核遺伝子は*orf129*の転写には影響を及ぼさないようである（図4-6）。

つぎに、*orf129* mRNAと*ScoxII* mRNAの5'末端の位置を比較するために、

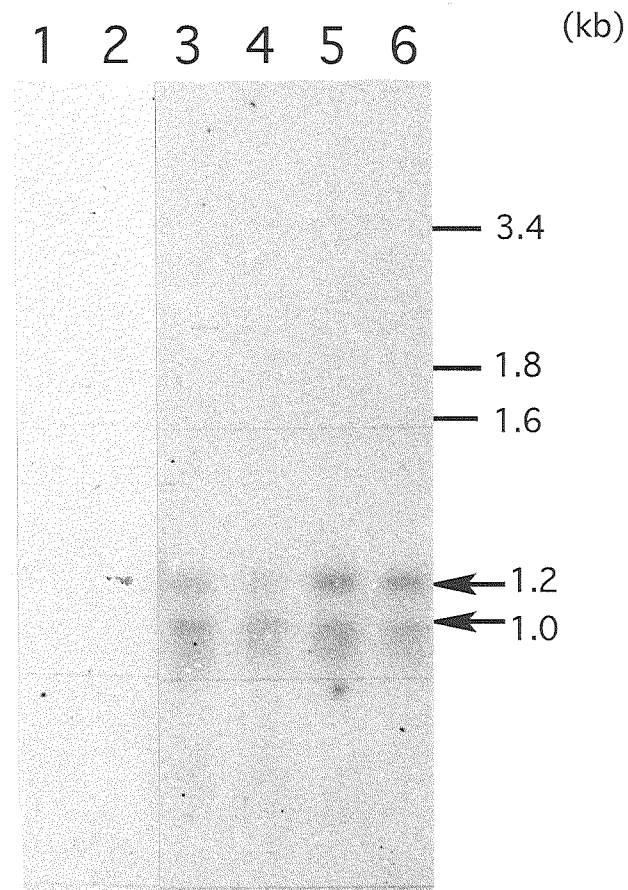


図4-6 *orf129*に関するノーザンブロット分析

*orf129*コード域（図4-4）をプローブに用いてノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。RNA調製に供試した遺伝子型と器官は次の通りである。

1: I-12-61L（成葉） 2: I-12CMS(R)（成葉）

3: I-12CMS(3)（成葉） 4: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（成葉）

5: I-12CMS(3)（花蕾） 6: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（花蕾）

*orf129*と*Scox11*の共有する上流配列をもとに設計したアンチセンスプライマーA (5'-GAAATGAAGTACACGCAACTACGCCTG-3')(図4-5)を用いて、I-12CMS(3) およびI-12CMS(R)の葉より抽出したmtRNAに対してプライマー伸長分析を行った。その結果、*orf129*、*Scox11*両転写物について複数の5'末端が見出されたが、そのサイトは両転写産物間で共通し、最も上流の5'末端は翻訳開始コドンより数えて484bp目に位置していた(図4-7)。なお、その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出された19塩基のコンセンサス配列<sup>53)</sup>と高い相同性を示し、*orf129*と*Scox11*の転写開始点である可能性が高い。

## § 翻訳

図4-8に示すように*orf129*のコードするポリペプチドはN末端が特に疎水性に富む。N末端側を除いた73アミノ酸残基のポリペプチド(図4-8)をコードする発現ベクターを構築した。この発現ベクターを導入した大腸菌から抽出したtruncated formのORF129タンパク質をウサギに免疫し、ORF129タンパク質に対するポリクローナル抗体(以下 ORF129抗体と呼ぶ)を作製した。

I-12-61-L、I-12CMS(R)、I-12CMS(3)ならびにI-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>(遺伝子型:S-3 *Rfa rfa Rfb rfb*)の花蕾より抽出したミトコンドリアタンパク質画分に対して、ORF129抗体を用いたウェスタンブロット分析を行った。その結果、I-12CMS(3)のレーンにおいてほぼ予想通りの14.2kDaのタンパク質バンドが特異的に検出され、*orf129*メッセージがタンパク質に翻訳されていることが証明された(図4-9)。なお、I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>植物のミトコンドリア画分からも14.2kDaのタンパク質が検出され、その蓄積量もI-12CMS(3)の場合と差が認められなかった(図4-9)。*orf129*の翻訳に対する稔性回復遺伝子の影響はないとみなしてよい。

## ii)*orf145/orf170*

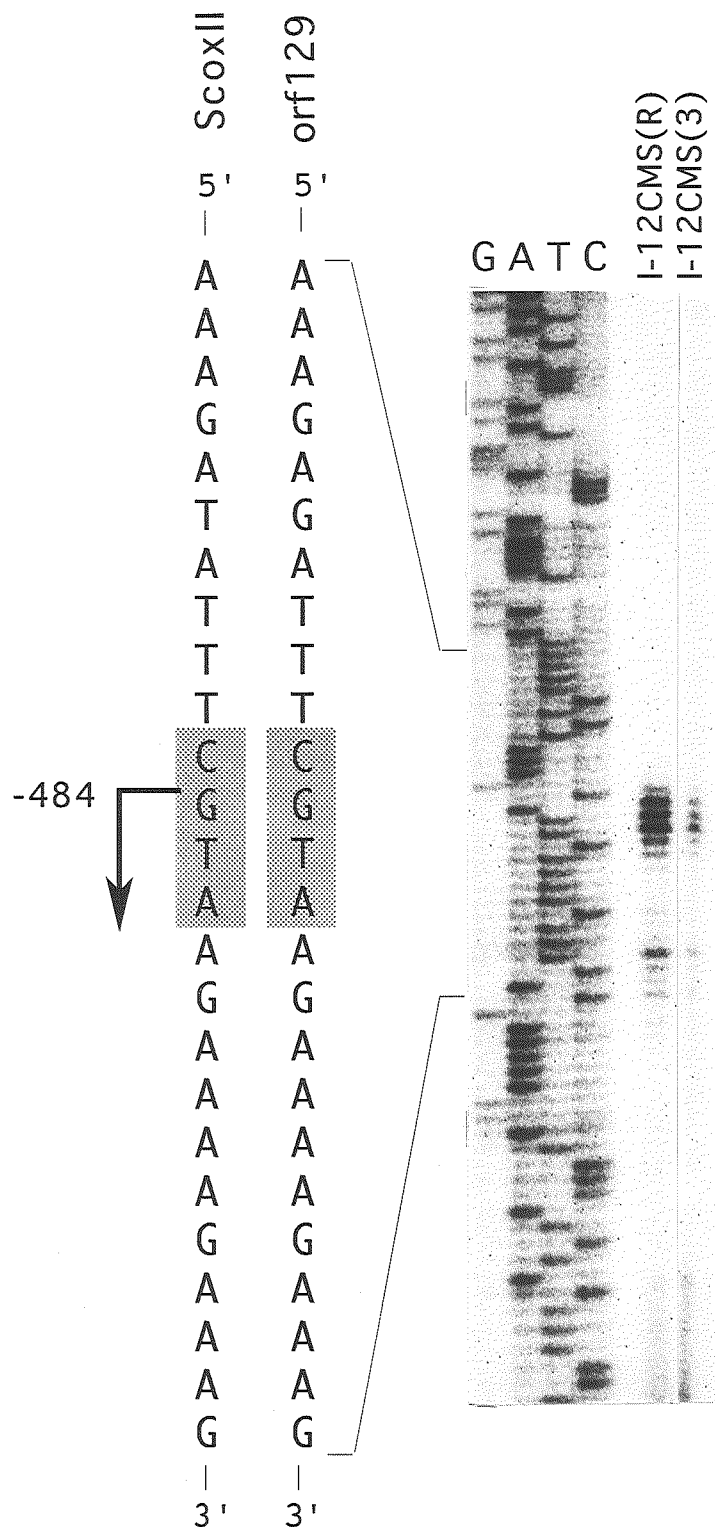


図4-7 *orf129*およびテンサイS型CMS-*coxII*(*ScoxII*)転写物の5'末端の決定

プライマー伸長法を用いて、*orf129*および*ScoxII*の転写物5'末端のマッピングを行った結果、いずれも翻訳開始コドンから数えて上流484ntの位置が同定された。使用したプライマーは図4-5に示した。転写物5'末端の近傍から植物ミトコンドリアプロモーター間で保存されているCRTA配列<sup>73)</sup>が見出された(網かけ)。

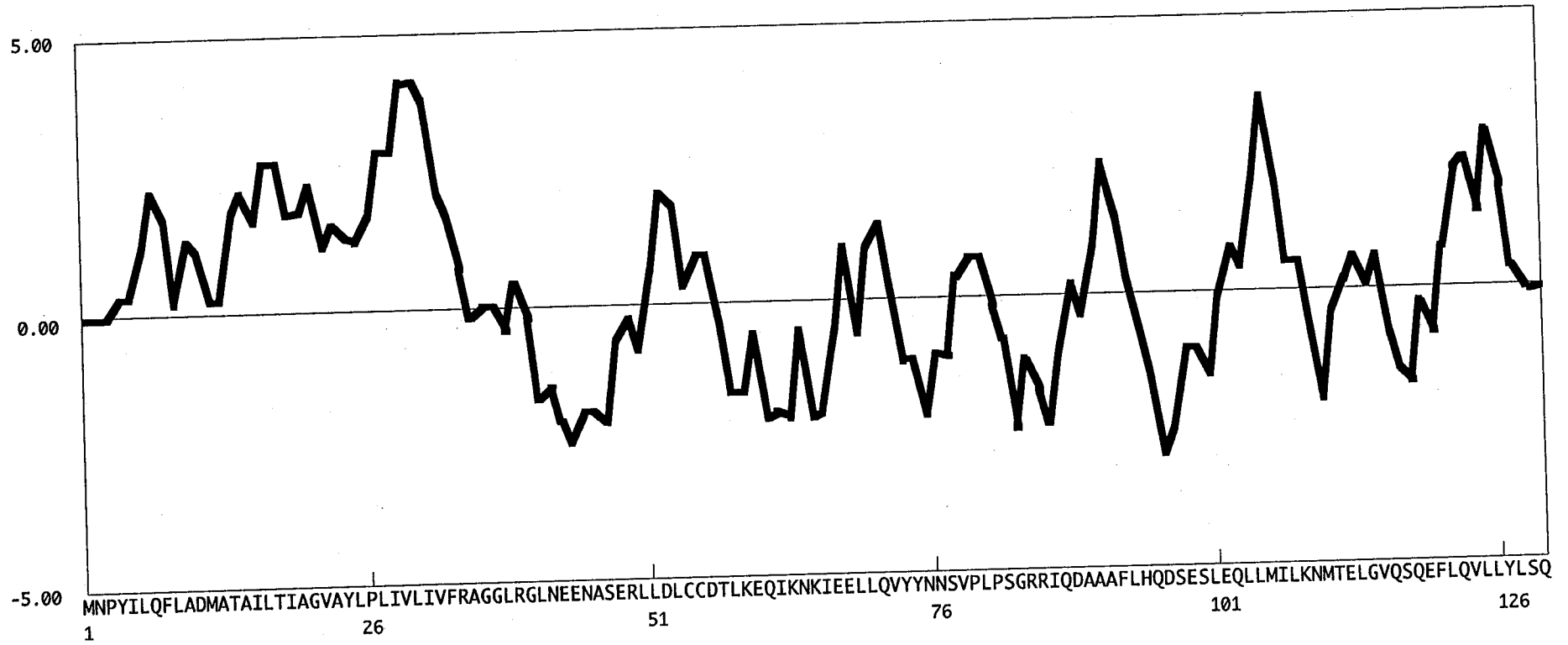


図4-8 ORF129タンパク質のハイドロパシー  
 アミノ酸配列の親水性（縦軸-方向）・疎水性値（縦軸+方向）の平均値の算出にはKyte & Doolittle<sup>74)</sup>のパラメーターを使用した。

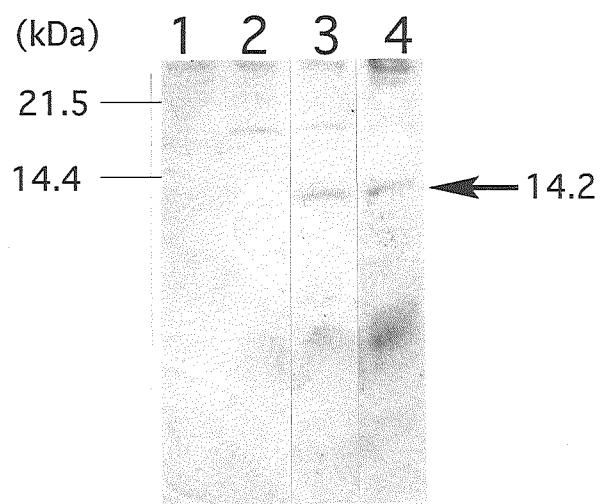


図4-9 ORF129タンパク質に関するウェスタンブロット分析  
 ORF129抗体を用いて、下記の遺伝子型の花蕾より調製したミ  
 トコンドリア画分に対してウェスタンブロット分析を行った。  
 1: I-12-61L 2: I-12CMS(R)  
 3: I-12CMS(3)  
 4: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub> (稔性回復型)

## § 塩基配列

S-3型 mtDNAサブクローン361(3)Xb0.8および412(3)Xb4.4はS-3型マスター染色体上のrepeat 1 copyBの一部と隣接域(5.2kb)をカバーする(図4-2、図4-10)。さらに詳細なノーザンブロット分析によれば、転写は図4-10に示すように、361(3)B2.3と361(3)Xb0.8にカバーされる領域(以下 361(3)3.0SEQ)に限定されており、塩基配列の決定を通じてこの領域は全長3014bpであることが判明した(図4-11)。

361(3)3.0SEQについてORFの検索を試みたところ、145コドン(*orf145*)および170コドン(*orf170*)をそれぞれコードし得る2種のORFを見出した。両者は357bpのスペーサーを隔てて同一鎖上に配置されている。今回決定した塩基配列(図4-11)に関して、ライブラリーに登録されている全遺伝子との相同性の比較を行った結果、*orf145*コード域内の約80bp(以下n6FSと称す)がカブの*nad6*遺伝子の上流域<sup>54)</sup>およびイネのtRNA-Ile偽遺伝子の下流域<sup>55)</sup>との有意な相同性を示した(図4-11)。さらに*orf170*の下流隣接域の約20bp(以下n1FSと称す)はペチュニアおよびソラマメの*nad1*遺伝子エキソンeの下流域<sup>56) 57)</sup>、並びにダイコンの*atp9*遺伝子の下流域<sup>58)</sup>と類似することが判明した(図4-11)。

## § 転写

*orf145*と*orf170*の転写産物を確認するために、ノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。完全不稔を示すI-12CMS(3)ならびにS-3型細胞質を有する稔性回復型F<sub>1</sub>植物[I-12CMS(3) x T2n-16-58-51-O:A]の葉と花蕾からmtRNAを調製し、フィルターへトランスファーした。ノーザンブロットにはI-12-61L(N型)、I-12CMS(R)(S型)の葉より抽出したmtRNAも対照として含めた。

*orf145*と*orf170*のコード域に相当するDNA断片(図4-10)をプローブに用いてノーザンブロットとハイブリダイズさせたところ、I-12CMS(3)に特異的な転写産物が検出された(図4-12)。図4-12より明らかなように*orf145*と*orf170*から

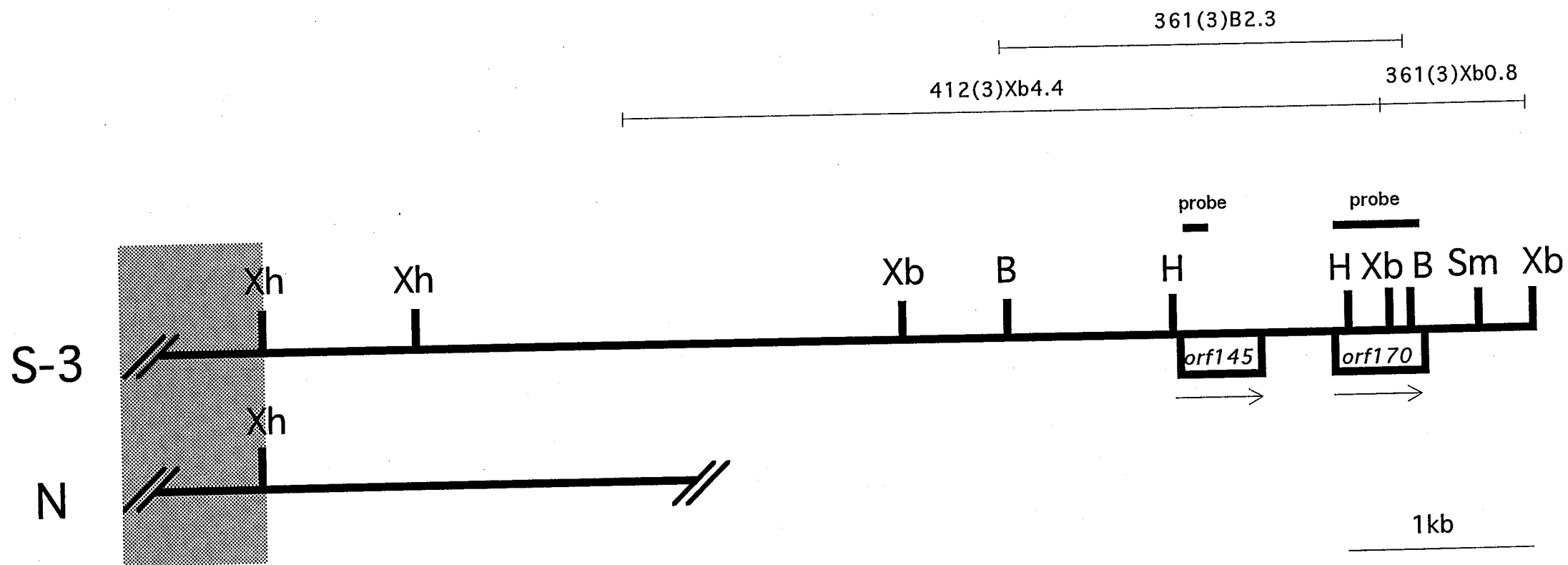


図4-10 *orf145*と*orf170*を含む領域の物理地図

S-3型 mtDNAクローン412(3)Xb4.4、361(3)Xb0.8および361(3)B2.3によってカバーされるS-3型ゲノムの領域を細線で示す。クローン412(3)Xb0.8および361(3)B2.3の塩基配列を決定した結果、2種のORF (*orf145*および*orf170*) が見いだされた。ノーザンブロット分析にプローブとして用いた断片の対応域を物理地図上に示した。また、比較としてN型ゲノム相同域の物理地図(N)も図示し、N型およびS-3型ゲノム間で構造が保存されている領域を網かけした。

Xb:XbaI, B:BamHI, H: HindIII, Sm: SmaI



GTTCACAATCTAGTCATTTTTGGTTTACTTCTTCTCTTTTTTCATTTTTGGTTTAGTCTC 1560  
S S Q S S H F W F T S S L F H F W V

←P4

TATTCACCAAAAAGAAAAATAAAATAAAATATTGGGTACAAGCCTTTTTTATTTTTTTTA 1620  
CGTGTGCTGGTCTTTTTTGCGGGAGTCTTTTGTTTTGTTTTACGATTTTCTTTTTTCC 1680  
TTTTTATTTTTTTTTCTTTTTTTTTGGGGCTTGGGTGTTCTACCCCAGGCTCTTCCGGC 1740  
ATCTCCGTCAGCAGGTTCCGATTCCGATTCCGATTGCTGGCTTTAAGAAATTATGATCC 1800  
ACCGGCGCATTCAAGGCCAAGCGCCGGTCTAATTCGCCAATTGGTGGATCGATTGGAAA 1860

P5→

TGAGAGTTTAGAGGAGGAAGAGCCCCTTCCCGCTAATAACCTTACACTTAATGGCCTTCC 1920  
orf170→

TATGAACGGTAGTCTTGAGCACTATCGGGCCTTGAATGTGGGAGTCGAGCAGGACCTGAT 1980  
M N G S L E H Y R A L N V G V E Q D L I

←P2

TGCTCGTATTCGCGTGCTAGAAAATAGAATGCTTCCGGGGATTCCCCCTCAACTAACTGA 2040  
A R I R V L E N R M L P G I P P Q L T D

CGGGGAATACGAAGCTTTGGTCAAATCTTTTCTCGATCACTCCCTCTCAATTCGGCATT 2100  
G E Y E A L V K S F L D H S L S I R H Y

TGAATCAACCCCTAAATACTGAACGTTTTGATCTCAACGTCCTGGAACGAAAAGCCGATT 2160  
E S T L N T E R F D L N V L E R K A D L

GGTAGAGGGACTCTGGAGGATTTTGATTAACGAGCCGAGTGAGCGTTTTCTAGAGATTT 2220  
V E G L W R I L I N E P S E R F L E I L

GAAGCAAACCTCATTGAACGAAGGTCAGATTAAAGAGAACGCTCTTGACTTCATTGAAGA 2280  
K Q T S L N E G Q I K E N A L D F I E D

CTTTTTGCAAAGGTTCTCTCTTTCCGATCCCCGTTCAAATTTTGATAGAAGGATTTGTGA 2340  
F L Q R F S L S D P R S N F D R R I C E

GTCCATGCTAAATCTTGGAACGATGACCTTAATCAACGCGGAATCAATCATTACTCTA 2400  
S M L N S W N D D L N Q R A N Q S L L Y

←P6

TTCCGAATTTCTTGACTATTACTCAATACATTAATGGGGCCTATTGAGTAATGGGAAGCG 2460  
S E F L D Y Y S I H

(n1FS)

GGCTACTCCCCGAAAATGCCAATATTGGTGGGGATTCCAATTCATTCTTACACCAAGAAT 2520  
TGACGAGCAGATTCTTTTTCTATTTGGCTATAAGGACTGCTTACAGAGTTAGATGAATAG 2580  
TAAGGCTTATGTCGAAACCGACTCCTTTCTTCACTCGAAAAGGGGAGACCTGTTCTCTA 2640  
AGTCAGTGGCCGGCTTCGATACTGCTTTCTTTACCTTCCCCGGGCTAGGAAGTCTATTCC 2700  
CAGCTATTCTGCCGGATTCTATAAACCTGGGATTTTTTATTAAACATCAATTTCCCTTCC 2760  
AAAAGCATAGCTTTAGCTATTACAACCCTAAGCCTACGATCTAAAGTTTCATTTTGCATG 2820  
CGCATATAGATGAAAAATCTGTGATTGGGATTTCTTTTCTTTCCCTTCATACGACGGAGA 2880  
TGCAAAGTGAAAAAGTTCTTTTTCATATAGCTGTGAAATCAGTTCATTTCTTTTTCAGCCCT 2940  
AACAAGCTCTTTCAAATGAGAAAAGGTTATCTCATATAGCTGACAAATGATAGATTG 3000  
TTGAACCTATCTAGA 3014

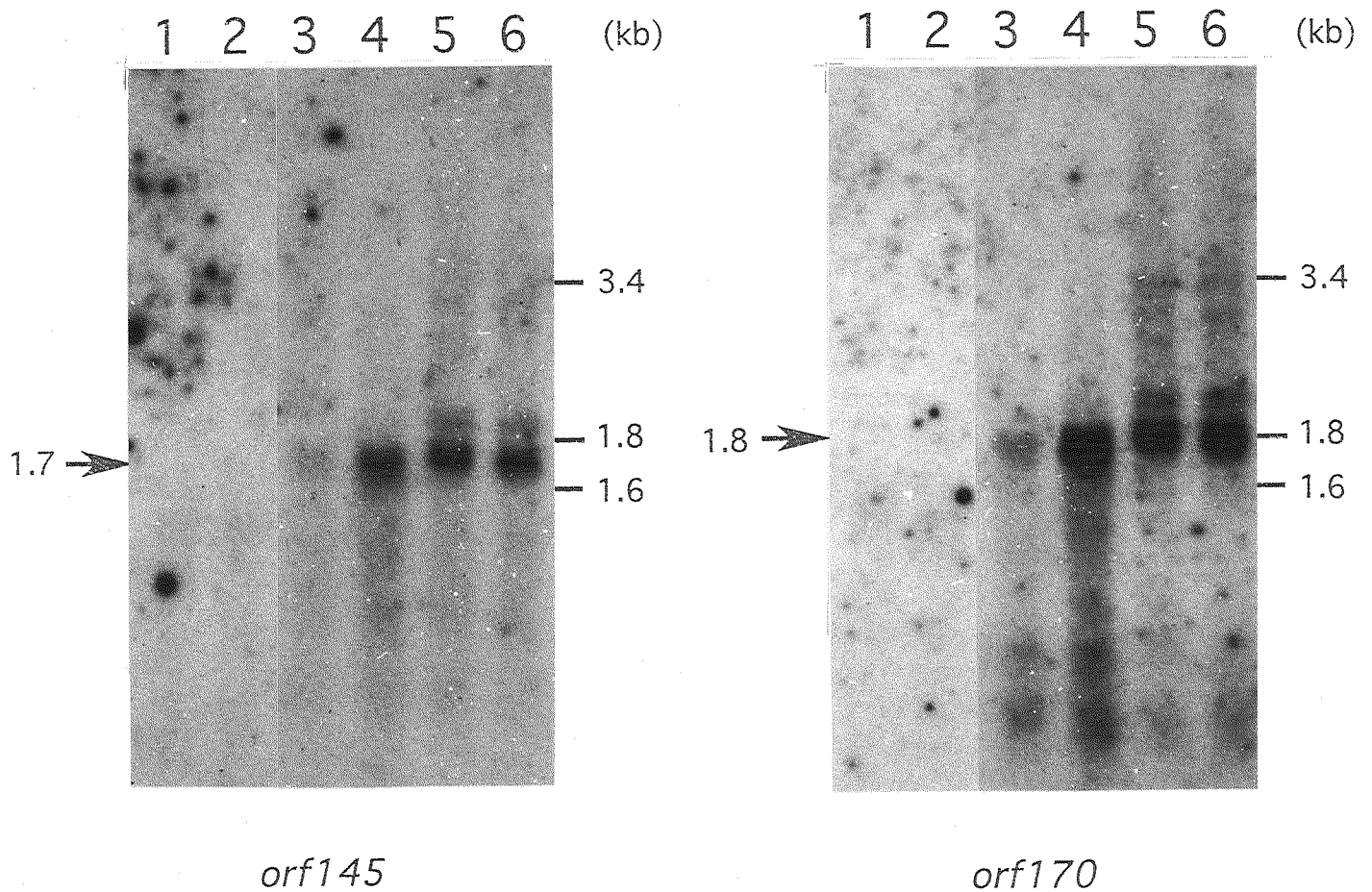


図4-12 *orf145*および*orf170*に関するノーザンブロット分析

*orf145*および*orf170*コード域をプローブ（図4-10）に用いてノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。RNA調製に供試した遺伝子型と器官は次の通りである。

- 1: I-12-61L（成葉） 2: I-12CMS(R)（成葉）  
 3: I-12CMS(3)（成葉） 4: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（成葉）  
 5: I-12CMS(3)（花蕾） 6: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（花蕾）

それぞれ1.8kb(*orf145*: 図4-12)および1.7kb(*orf170*: 図4-12)のmRNAが転写されている。両ORFは同一鎖上にコードされ、357bpしか隔たっていないので共転写されている可能性が考えられる。しかしながら、357bpスペーサーを挟むように設計したプライマーP1(5'-GAGAAACTTGGACCTCTCCGC-3')-P2(5'-GCGAATACGAGCAATCAGGTC-3') (図4-11) を用いRT-PCR実験を試みたが、予想したcDNAの増幅産物は検出されず、両ORFの共転写を示唆する結果は得られなかった。なお、I-12CMS(3) x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>についても同一のハイブリダイゼーション像が得られたので、稔性回復核遺伝子は両ORFの転写パターンには影響を及ぼさないとみなしてよい (図4-12)。

### § RNAエディティング

これまでに同定されている植物ミトコンドリア遺伝子の大多数においては転写後にエディティングが起こる<sup>6)</sup>。そこで、*orf145*と*orf170*のmRNAに関してもエディティングの有無を調べた。*orf145*および*orf170*のcDNAの増幅に当たっては、それぞれプライマーP3(5'-TATGAAGCTCTTACTCCGATCT-3')-P4(5'-TTTTGGTGAATAGAGACTAAACC-3') (図4-11) およびプライマーP5(5'-CACTTAATGGCCTTCCTATGA-3')-P6(5'-TAGGCCCCATTAATGTATTGAGTAA-3') (図4-11) の組合わせを用いた。11種の独立したcDNAクローンを選んで塩基配列を決め、ゲノミックDNAの塩基配列と比較した。

*orf170*座においてはエディティングサイトが見出されなかった。これに対して、*orf145*では11種のcDNAクローンのうち5クローンで共通した1箇所のエディティングサイトが見出された (図4-11)。すなわち読み取り枠の251番目のシトシン残基 (ゲノミックDNA) がウラシル残基 (mtRNA) へ置換され、コードするアミノ酸もセリンからロイシンへ変化することが判明した。このエディティングサイトは前述のカブ*nad6*遺伝子の上流域およびイネtRNA-Ile偽遺伝子の下流域との相同配列

中に含まれている（図4-11）。

### iii) *orf100/orf169*

#### § 塩基配列

S-3型 mtDNAサブクローン410(3)Xb2.4のカバーする領域（以下 410(3) 2.4SEQ）はS-3型マスター分子上でrepeat 1 copyBと*rps13*遺伝子に挟まれている（図4-2、図4-13）。410(3)2.4SEQの塩基配列を決定し、ORFの検索を試みたところ、互いにオーバーラップしている2個のORF（*orf100*および*orf169*）が見出された（図4-14）。EMBLおよびGen Bankのデータベースを利用して、410(3) 2.4SEQと既知の塩基配列の間で相同性を検索したが、*orf100*および*orf169*と有意な相同性を示す配列は見当たらなかった。ただ、*orf100*の上流に位置する115bpの配列（図4-14）はソラマメ<sup>59)</sup>、マツヨイグサ<sup>60)</sup>、シロイヌナズナ<sup>61)</sup>のミトコンドリアゲノムにおける*rps14*遺伝子と*cob*遺伝子間のスペーサー配列と相同性を示した。またこの相同配列にはコムギの*coxIII*<sup>62)</sup>および*orf25*の上流配列<sup>63)</sup>と類似する46bpと23bpの配列も含まれている（図4-14）。

#### § 転写

*orf100*および*orf169*のコード域（probeA：図4-13）をプローブに用いて、I-12CMS(3)の葉と花蕾から抽出したmtRNAに対するノーザンブロット分析を行った。しかし、シグナルは全く検出されず、恐らく、両ORFは全く転写されないか、あるいは転写されているとしても、蓄積量が微量でノーザンブロットによって検出できないと考えられる。従って、先にクローン410(3)Xb2.4をプローブに用いて検出されたI-12CMS(3)に特異的なmtRNAは（表4-1参照）、*orf100*および*orf169*のコード域とは異なる領域の転写産物と推定される。実際に、図4-13に示した410(3)2.4SEQのうち両ORFを含まない配列（probeB：図4-13）をプローブに用いた場合にはI-12CMS(3)に特異的なシグナルを検出できた。よって、2.2kb、1.3kb、

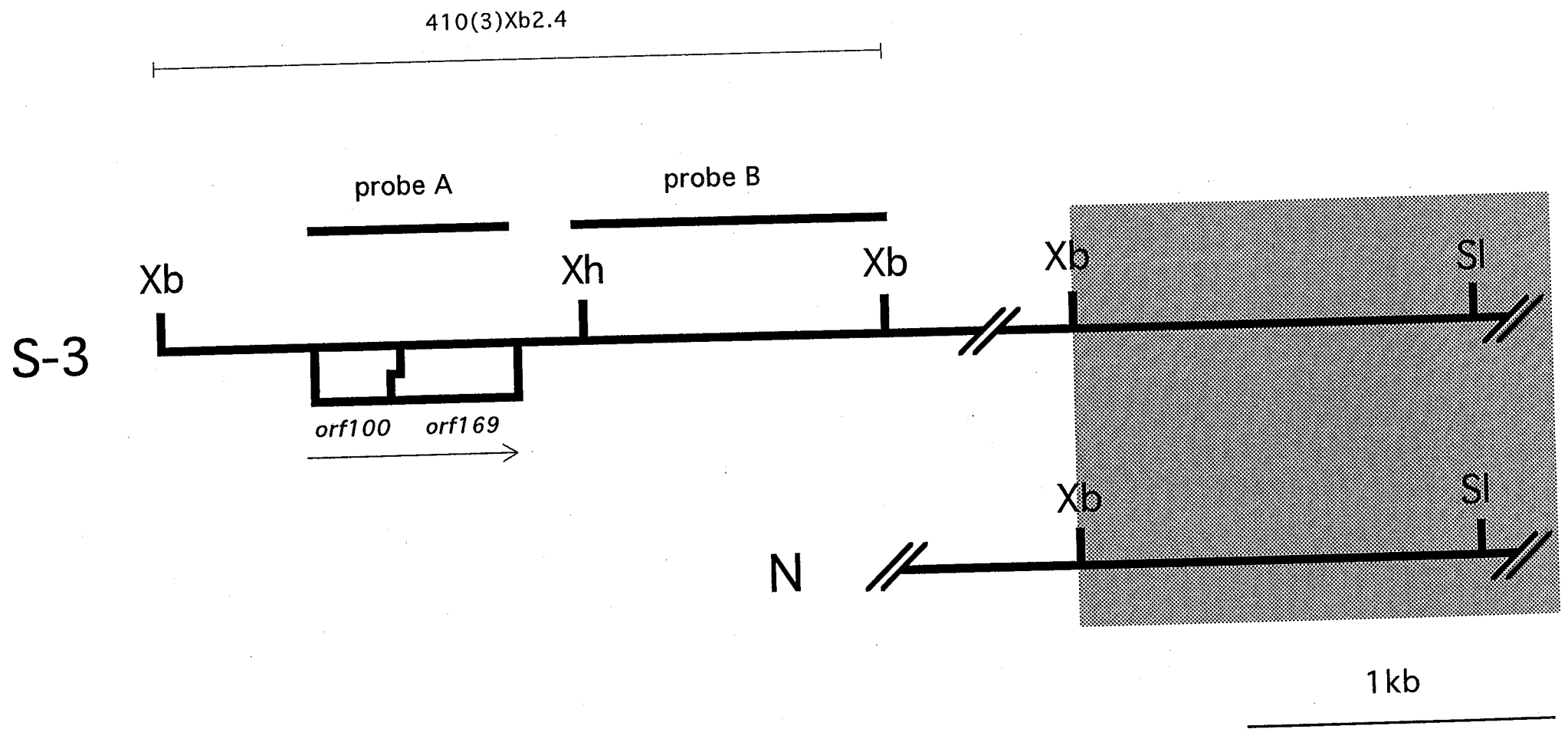


図4-13 *orf100*および*orf169*を含む領域の物理地図

S-3型ゲノミッククローン410(3)Xb2.4の塩基配列を決定した結果、ORF(*orf100*および*orf169*)が見出された。ノーザンブロット分析にプローブとして用いた断片の対応域を物理地図上に示した。また、比較としてN型ゲノム相同域の物理地図(N)も図示し、N型およびS-3型ゲノム間で構造が保存されている領域を網かけした。

Xb: XbaI, Sl: SalI

TCTAGATTCTGAAAGTAGCATAAAGAAGAAGAAAAGAAAAGTAGCAAAACTCGTAAT 60  
 TCATAATAGAAATCTCGTAAGAGAAGAAGGAAGAAAAGCTAAGCTGTCCTGAGTCTATCT 120  
 TTCTTTTTTATGGGCTAATTATCTTAATGAAAGCCCGCAGAAGGGCCAAAGCACAACAAG 180  
 CCCACCTATTAACAAGCCCAAGCCCATGCAAGAAGGCCCGGGAAGGATCGACCGCTAT 240  
 TTTTAGAATATCGTAAGTGGTGATCTTCCTCGTTGGATCACCGGAGCGCCGGAGTGCAGA 300  
GGTTTTTCCCATCATTGAAGTCAGAGTGTGGGACTGAGCCTTCCGAATGAGAAAGACAAG 360  
AAAGTGCTTTGTTTCGTTGGAAAAACCAACGCAAATACAAATCTCAAATTGACTTTCTAA 420  
 AACCTACTTCTATAGAAAAAAGAGGTTGGTTGTGTTTGGATGAGATAGAAAAAAGCTAAG 480

AGATGACTCTCCTCATTCAAGTAGGCTGCGGCCTTCTTCTCCCATATTTGTTTGGTGACC 540  
*orf100*→M T L L I Q V G C G L L L P Y L F G D  
 TGTTCCCTTCTTTGTTCTTTATGGTTATAGCAGGTGTTTCTTTACTGGTACTTTGTTTGA 600  
 L F P S L F F M V I A G V S L L V L C L  
 TTCGACCGTCGTGTAAGAAATACTCAAGTTTAGTATTCTACATCCTTATCGTACTAGGTT 660  
 I R P S C K K Y S S L V F Y I L I V L G  
 CTGTGTACATTCAACTAATGAAAATATGTTTTCTTCTATCATAGGGCTAGTCTTACCAG 720  
 S V Y I Q L M K I C F S S I I G L V L P  
*orf169*→M F F F Y H R A S L T R  
 GGCTCCTCTTCGGAGCCATGATTCTGGGTTCACTTTCGGGGCAGAAATGGGTTCTTTTC 780  
 G L L F G A M I L G S L S G Q K W V L F  
 A P L R S H D S G F T F G A E M G S L S  
 AATGATCCCTCACAATGTGGAAGCCGGGCACCATCAAGGTGCAGCAGCGGACGAAAACGC 840  
 Q  
 M I P H N V E A G H H Q G A A A D E N A  
 CCCGGTCGCACCCATTTTGGGGGGGTACCCATACCCCGACGACCATTATATCGGGGGAGA 900  
 P V A P I L G G Y P Y P D D H Y I G G E  
 ATGTGTGTTAGACATAAAGCGACGCCTTTTGTCTAACATAGATTTCCCACTTCTGAACA 960  
 C V L D I K R R L L S N I D F P T S E Q  
 GCATTGGTTGGCCCATATTGATGCCAGAGATCGTTTTGAGGTCAAAGCCTTAATTATTGA 1020  
 H W L A H I D A R D R F E V K A L I I D  
 TAAAATGTCTCAATTAGACCTATTAGGAAAGTGGAATGAGCACGGAGCGAAAGCACTAAC 1080  
 K M S Q L D L L G K W N E H G A K A L T  
 TACCAATACAACATCTACAGGAGAACGAAGTTTAGAAAACCTGTACATTAGTAAATTTTC 1140  
 T N T T S T G E R S L E N L Y I S K F S  
 GATTAGCAGCCTACCGGGTATCAATGAATTCAGCCTAATCAGTATATGTCGATAACCTAC 1200  
 I S S L P G I N E F S L I S I C R  
 CGTCATATCTAAAGAAAGGAATTCTGCCTATTTGATTGCTAGCTTAGTCTTATACCTA 1260  
 TTTAGATTAGCTACCTTGCTAAAAGAAATGAATTAACCCTTGCTTAATATGTGAATGC 1320  
 TCCCTTTCCTAATAAGTTTTCTGACAACCTTCTAATTGTACTGGTTTTAATCGCTGGTTT 1380  
 ATATCCACCGGTTTTAACC GAATTCATCCAGGGCGATACTTGCTCGAGCAAGAGAGGAAA 1440  
 GGTTTTATTACCATATGTCATCGATAGGGACAAGGGCTACTTCAATTCTTTAAATGCC 1500  
 TTTAGCTATGCCTTGAGGAAGATTGAGATATCCTTTAAAGGGGGGCTTACTTGAGACGGT 1560  
 TTAAAGAGCATTATTGAATGGGAAATGAGGTGGCTCAGAAGAGACCGGGATATGAGGAG 1620  
 AAAGCAGCCGGCTCTTAGCTTCGTAGATTATGGTATATATGATATACTTTTTGCTTAAGC 1680  
 TAGGTTTTACATGAATTGGAGGTTAGCTAGCTTCAAAGCACGGATTTCTCATATCTCGAT 1740  
 TCTGTTGCTTCATAATAGGAAGGCATAAACCTTGATCATTGAATGATCCCTTTCAAAG 1800

図4-14 *orf100*および*orf169*の塩基配列

412(3)3.0SEQから2種のORF(*orf100*および*orf169*)が見出された。*orf100*および*orf169*がコードするアミノ酸を塩基配列の下に示す。*orf100*の3'末端32ヌクレオチドと*orf169*の5'末端32ヌクレオチドは互いにオーバーラップしている。細線を引いた配列はソラマメ<sup>59)</sup>、マツヨイグサ<sup>60)</sup>、シロイヌナズナ<sup>61)</sup>の*rps14*遺伝子と*cob*遺伝子間のスペーサー配列と相同性を示す配列である。二重線および太線を引いた配列はそれぞれコムギの*coxIII*<sup>62)</sup>および*orf25*の上流配列<sup>63)</sup>と相同性が認められた。

TATATGTCTCTGCTCATGCTTCATATTGAGATTTGCTAGCTTAATAGGTTATACAATTTA 1860  
TTCATTCTGCCTGGCAATTAATAGTCTATTAGCAGCCTTAAAGTGAATCTGATTCTCGGT 1920  
AAAGGAAATATCTTAAGAGAAGAAAGCTGAGTCTAGGTTTCATTTAATCTTGTATTCTAA 1980  
GCTTGAGCAACAAGGCGACGGAGCCAATGAGCACCTCAGTAGCGCTCCGAAACGGGGCCG 2000  
AGGAGCCGGTAAACCAGTGCGTTTGAGTGAAGGTTGCGGATATGAGATGGATGAAACCGA 2040  
GCTAGAAACAAGTACGGGGATTACAAGGGTATAATAATACACCTAACCAAGAGGAAGATC 2100  
AAAACCCTGCAAAGATATCAGAAGAATTGTTGTGGCATCAAAGACTGGGACATGCTCCTA 2160  
TGTCTAAAATCAGGAAGATACCAGAATTGAGTGTTCTGCATCAACATACTGCAGAGGTAT 2220  
GTATCACATGCCCTAGGGCAAAGATGACAAAAGTTGAGTACAAGAGAAGTATGTCAAGGG 2280  
CAAAGGAAATCTTTGACTTGATACATTTGGACATATGGGGGCCATACAAGGTGATGACAA 2400  
GAACTCACTGCAGGTATTTTCATGACCATTGTAGATGACTATTCTAGA 2447

☒4-14

1.1kb、0.8kb（表4-1参照）のS-3型固有転写物はこの領域に由来すると考えられる。しかし、probeBにカバーされるS-3型ゲノム領域には機能し得る配列および他のミトコンドリア遺伝子との相同配列は含まれていない。

#### iv) *orf187/rps13*

##### § 塩基配列

S-3型 mtDNAサブクローン255(3)Xb1.7および255(3)Xb4.4はS-3型ゲノム上の*rps13*遺伝子および*nad1*遺伝子エキソンbを含む領域をカバーしている（図4-2、図4-15）。これら2種のS-3型 mtDNAクローンと*rps13*遺伝子および*nad1*遺伝子エキソンbを含むN型 mtDNAクローン（202(N)）<sup>22) 23)</sup>との間で制限酵素サイトを比較したところ、*rps13*遺伝子上流の構造が互いに異なることが判明した（図4-2、図4-15）。

255(3)Xb1.7と255(3)XbP 1.7によってカバーされる*rps13*遺伝子（以下S-3型ゲノム上の*rps13*遺伝子をS-3*rps13*と呼ぶ）のコード域および上流域（255(3)3.3SEQ）の塩基配列を決定した（図4-16）。ついで、正常型ゲノム上の*rps13*遺伝子座の塩基配列と比較した結果、*rps13*遺伝子のATG開始コドンの5'側54bp目より上流の部分は全く相同性がみられず、ゲノム再編成が生じていることが明らかとなった。S-3*rps13*遺伝子上流配列に関して既知の配列との相同性検索を行ったところ、この領域には*coxII*<sup>21)</sup>、*rps7*<sup>64) 65)</sup>および*mat-r*遺伝子<sup>57)</sup>のコード域の一部、ならびにテンサイ*orfB*遺伝子<sup>66)</sup>の5'隣接域と5'コード域の一部との相同配列（それぞれ31bp、81bp、70bp、234bp）が直列に配置されていることが判明した（図4-16）。

S-3*rps13*遺伝子上流配列に関して、ORFの検索を試みた。100個以上のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードし得るORFとして*orf187*が見出された。*orf187*はS-3*rps13*遺伝子の開始コドンより数えて70bp上流に位置する（図4-16）。*orf187*の上流には*orfB*と5'隣接域およびコード域の5'側が相同なキメラの

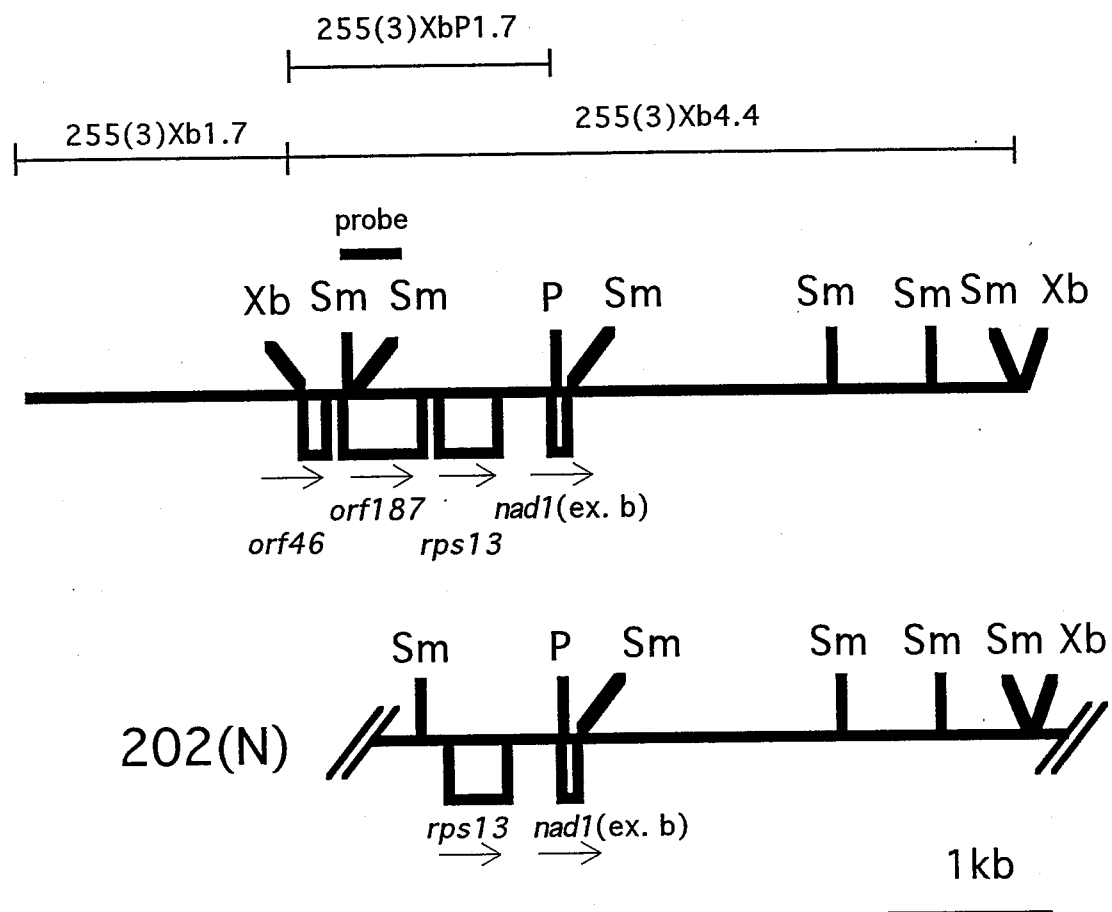


図4-15 *orf187*と*rps13*遺伝子を含む領域の物理地図

S-3型 mtDNAクローン255(3)Xb4.4とN型ゲノミッククローン202(N)<sup>22)23)</sup>との構造比較から、S-3型ゲノムの*rps13*遺伝子上流域の構造が変異していることが判明した。S-3型ゲノミッククローン255(3)Xb1.7および255(3)XbP1.7の塩基配列を決定した結果、2種のORF(*orf46*および*orf187*)が見出された。ノーザンブロット分析にプローブとして用いた断片の対応域を物理地図上に示した。

Xb: XbaI, P: PstI, S: SmaI



S-3 CCCATTTTGTCCATCTATACGCCGTCCGTATCAAACCTACGGTTGAGTAATAAATTTTATT 1800  
S H F V H L Y A V R I K L R L S N K F Y

S-3 TTTTTTTTAAATTGCTCATCCTACTATCTAGCTGCATTTTGTGTTCTATTTTAAACAAT 1860  
F F F

S-3 TCTTGCATACGTTTCTGGTCCCCGAGCTACTATGCAGTGTTGTTGTTTATAATACTATGC 1920  
orf187→M

S-3 TCCCCGGGGAGGCGCCCTCGCCTAGCAGTTCCCTGCCGGCAAGCGGGGAGTTTTGGGGGC 1980  
L P G E A P S P S S S L P A S G E F W G

S-3 AAGCCCTTCCCCCGGGTGGGTCGAGCAATTGGCTCCGGCTGAAGCCGAACAATTGGCTC 2040  
Q A P S P G W V E Q L A P A E A E Q L A

S-3 CGGCTGAAGCCGAACAATTGGCTCCGGCTGAAGCCGAACAATTGGCTGCCCCCGCGGCTG 2100  
P A E A E Q L A P A E A E Q L A A P A A

S-3 CCCCCGTGGACGGCCCTCAGCTGGAGGAGCCCTATCCCTATGCCGATGACCAAGTCATTG 2160  
A P V D G P Q L E E P Y P Y A D D Q V I

S-3 GTGGAGATAGCGTAGGGGGGTTCAAAGACGTCTTCTTGAAAGACACCCCCCTTTCCCC 2220  
G G D S V G G V Q R R L L E R H P P F P

S-3 CTTCAGAGGTCATTGACCTCTGTGCGCATCGAAGCACAAGATCTCATGGAGGTCAAAGCAG 2280  
P S E V I D L C R I E A Q D L M E V K A

S-3 CCATCATTAACAAAATGGCCTCCTGGGATCAAGGCGGGGATTGGATGGGCAGCGGGGCC 2340  
A I I N K M A S W D Q G G D W M G S G A

S-3 GCGCTCTGGACAACCCCCGCTCCGCTACAGGAGAAGACTCCCTTGAGAATCTCTATAAGA 2400  
R A L D N P R S A T G E D S L E N L Y K

S-3 TTCTTGAGGATCTGAAGGAGACCGGCCACTGTGCGAGTCCTTCTCCAAACTCCAGAATA 2460  
I L E D L K E T G P L S E S F S K L Q N

S-3 AGGTGCGTAGACTTCCTTAGAAAATCAGGGAGTAGACAGGCCATTTATGATTCCAGCCTA 2520  
K V R R L P ↑

S-3 GAAGACTAGTTAAAGGAAGGATCAAGAATGTCATATATTTTCAGGAGCTAGATTAGTTGAC 2580  
rps13→ M S Y I S G A R L V D

S-3 GATAACAAGTAAAAATTGCCTCAACAAAAATTGATGGAATTGGACCTAAAAAAGCCATT 2640  
D K Q V K I A S T K I D G I G P K K A I

S-3 CAGGTTTGTATCGATTAGGTATCAGTGATAACATTAAGATAAAAGAGTTAACTAAATAT 2700  
Q V C Y R L G I S D N I K I K E L T K Y

S-3 CAGATCGACCAAATTGAACAAATGATAGGTCAAGATCATGTTGTTTCATTGGGAATTGAAG 2760  
Q I D Q I E Q M I G Q D H V V H W E L K

S-3 AGGGGAGAACGAGCAGACATCGAACGATTAATTTCTATTTCTTGTTATCGTGGAATTCGT 2820  
R G E R A D I E R L I S I S C Y R G I R

S-3 CATCAAGATGGATTGCCCTTACGCGGTCAACGAACTCATACTAATGCTAGGACTTGTCGT 2880  
H Q D G L P L R G Q R T H T N A R T C R

S-3 AAGAAAATTCGGAATGAAAGAAGTCTACCGGAAGCCCTTGGTACTTGTCTGATCAATCA 2940  
K K I R K

|     |                                                              |      |
|-----|--------------------------------------------------------------|------|
| S-3 | TACTGATAGCTTCAATAGTTCACTGAATTTTGTTCGGGTTTGGTCAGGAGGGACAAA    | 3000 |
| S-3 | AAAGAGATGCTTCCATCAGTCAAAAGCGGATACCGTCCCCCATGCTCTTACGGTTCGCT  | 3060 |
| S-3 | TACCGAGGAATAGAAAGGTAGGACCTGGGGCCTCCGCAAGTTTGGTTGGGGTATAGAGCC | 3120 |
| S-3 | GTAAGCGCGGTGGGGGTGACAGAGGACGTGCTCGTACGGTTCATAGAAGGATATGATCAA | 3180 |
| S-3 | CTCGTTGATTTTGGGAACTTTCCTCCTCTATATTCGAAATATGCCTTTCTAGGAGCAT   | 3240 |
|     | <i>nad1</i> exon b → S K Y A F L G A                         |      |
| S-3 | TACGATCTGCAG...                                              | 3252 |
|     | L R S A ....                                                 |      |

图4-16

ORF(*orf46*)を組むことが出来る(図4-16)。

#### § 転写

*orf187*の転写産物を確認するために、ノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。完全不稔を示すI-12CMS(3)ならびにS-3型細胞質を有する稔性回復型F<sub>1</sub>植物[I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:A]の葉と花蕾からmtRNAを調製し、フィルターへトランスファーした。ノーザンブロットにはI-12-61L(N型)の葉より抽出したmtRNAも対照として含めた。

*orf187*のコード域に相当するDNA断片(図4-15)をプローブに用いてノーザンブロットとハイブリダイズさせたところ、I-12CMS(3)mtRNAに特異的な転写産物が検出され(図4-17)、*orf187*が実際にミトコンドリア内で転写されていることが明かとなった。なお、I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>についても同一のハイブリダイゼーション像が得られたので、稔性回復核遺伝子は*orf187*の転写パターンには影響を及ぼさないとみなしてよい(図4-17)。

#### § 翻訳

ORF187ポリペプチドのうち、C末端側の183アミノ酸残基をコードする発現ベクターを構築した。この発現ベクターを導入した大腸菌からtruncated formのORF187タンパク質を調製してウサギに免疫し、ORF187タンパク質に対するポリクローナル抗体(ORF187抗体)を作製した。I-12-61-L、I-12CMS(R)、I-12CMS(3)ならびにI-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>の花蕾より抽出したミトコンドリアタンパク質画分に対して、ORF187抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った。また、テンサイ由来の挿入配列を含まない発現ベクター(pT7-7)ならびにコード域全長を組み込んだ発現ベクター(pT7-7-187)がそれぞれ導入された大腸菌の全タンパク質を対照として供試した。

図4-18に示すように、いずれのテンサイ系統より抽出したミトコンドリアタンパ

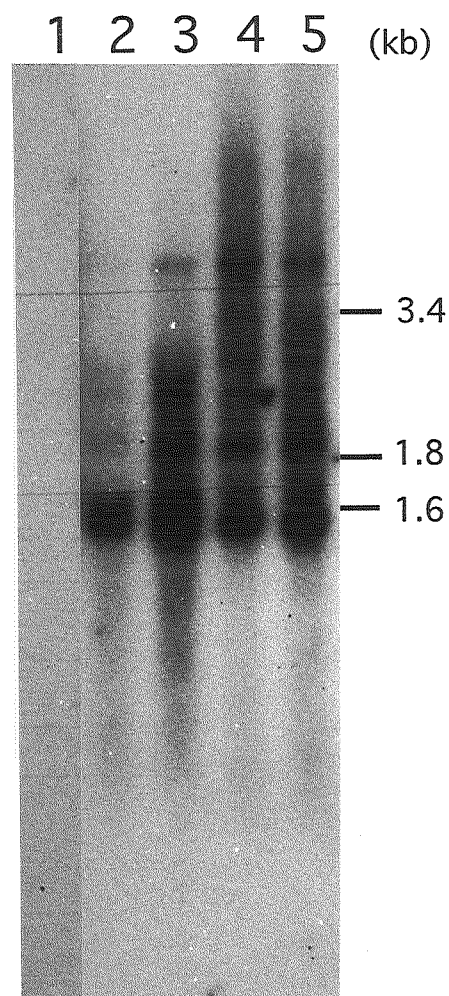


図4-17 *orf187*に関するノーザンブロット分析

*orf187*コード域をプローブ（図4-15）に用いてノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。RNA調製に供試した遺伝子型と器官は次の通りである

1: I-12-61L（成葉）

2: I-12CMS(3)（成葉） 3: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（成葉）

4: I-12CMS(3)（花蕾） 5: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（花蕾）

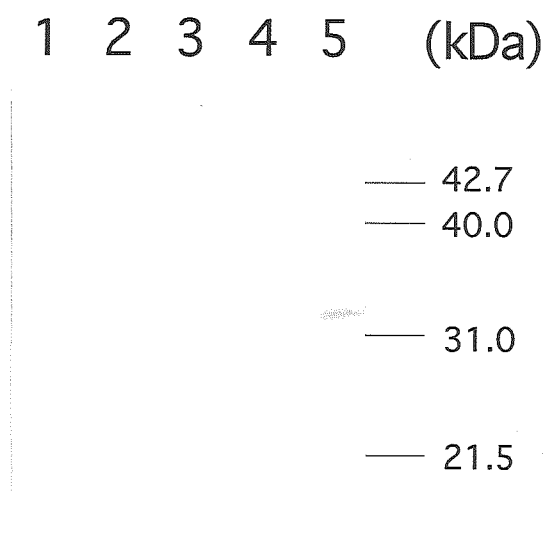


図4-18 ORF187タンパク質に関するウェスタンプロット分析

ORF187抗体を用いて、下記遺伝子型の花蕾より調製したミトコンドリア画分に対してウェスタンプロット分析を行った。レーン4および5に泳動した大腸菌の全タンパク質は対照の試料である。

1: I-12-61L

2: I-12CMS(3) 3: I-12CMS(3):1xT2n-16-58-51-O:AのF1 (稔性回復型)

4: 発現ベクターpT7-7が導入された大腸菌の全タンパク質

5: 発現ベクターpT7-7-187が導入された大腸菌の全タンパク質

ク質画分においてもシグナルは検出されず、pT7-7-187が導入された大腸菌のタンパク質からのみシグナルが検出された。本研究に用いたORF187抗体は大腸菌で発現させたtruncated formのORF187をウエスタンブロット上で検出しており、抗体の力価が低いことが原因でミトコンドリアに含まれるORF187が検出されなかったとは考え難い。また、同様の条件でATP6抗体およびCOXI抗体を用いたウエスタンブロット分析を行ったところ、テンサイのミトコンドリア画分からatp6およびcoxIの翻訳産物が検出されている（本研究、山本ら、データ未発表）。従って、S-3型細胞質系統においてorf187は翻訳されないか、あるいは翻訳されたとしてもORF187の蓄積量は他のミトコンドリア遺伝子産物と比較して極めて低く、ウエスタンブロット分析では検出されないであろう（図4-18）。

orf187の上流にはorfBの5'隣接域（116bp）とコード域（61bp）を共有するorf46が配置されている（図4-16）。orfBのコードタンパク質の機能は未同定であるがテンサイ<sup>66)</sup>をはじめハツカダイコン<sup>67)</sup>、ナタネ<sup>68)</sup>、ヒマワリ<sup>69)</sup>等多くの植物種にコードされており、普遍的ミトコンドリア遺伝子と考えられる。従ってS-3型CMS株ではorf46とorfBの間で翻訳過程において競合が生じ、orfBの発現量が低下する可能性も考慮する必要があるだろう。しかし、I-12-61-LとI-12CMS(3)の間でウエスタンブロット法によりORFBタンパク質の蓄積量を比較したが目立った差は認められなかった。今後はorf46に関しても、転写・翻訳レベルでの発現解析を行いCMSとの関連性を調査する必要があるだろう。

#### iv) atp6

##### § 塩基配列

クローン284(3)E1.8および284(3)E3.1はS-3型ゲノム上のatp6遺伝子(S-3atp6)を含む4.9kbpの領域をカバーしている（図4-2、図4-19）。サブクローンをを用いたノーザンブロット分析を繰り返すことにより、転写はmtDNAクローン284(3)E0.6と284(3)EPs1.8によりカバーされる領域(284(3)2.4SEQ)に限定されるこ

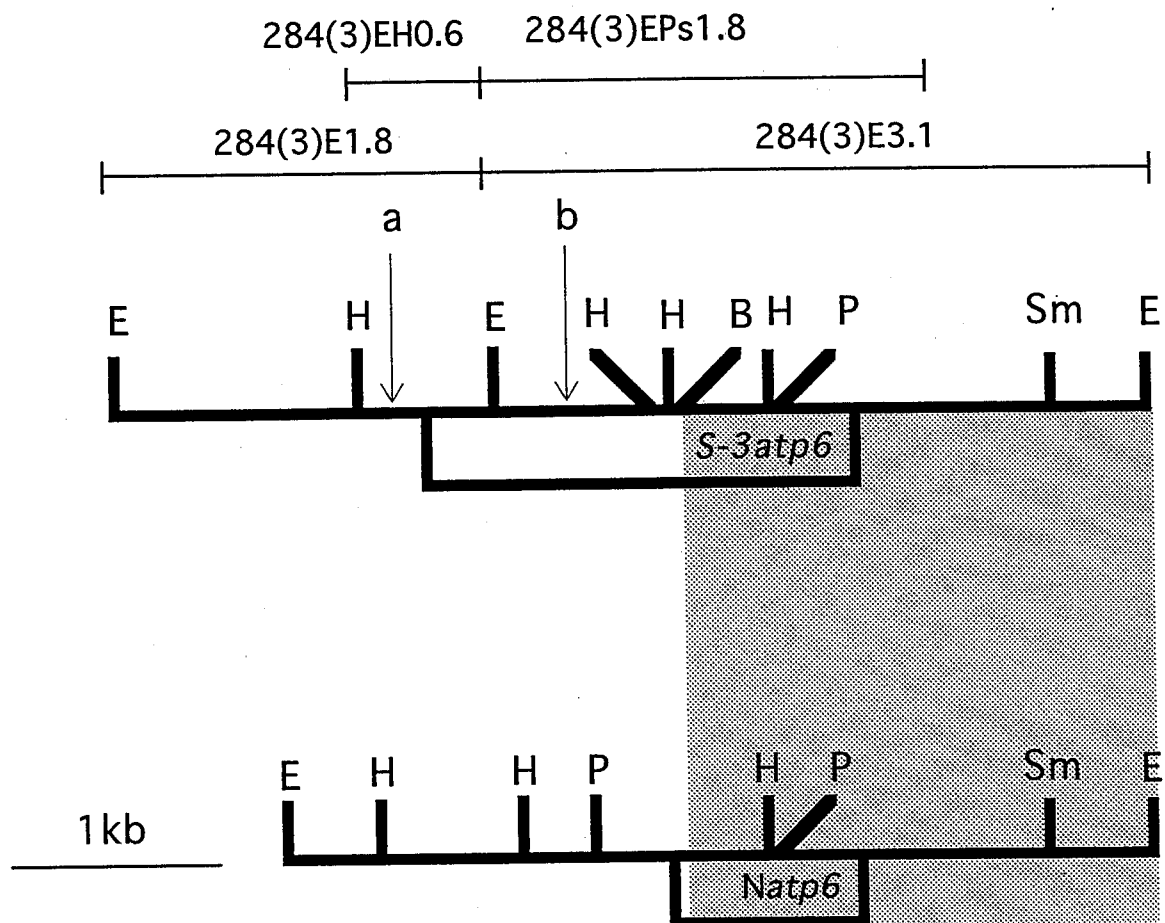


図4-19 S-3型ゲノムおよびN型ゲノムにおける *atp6* 遺伝子座の物理地図

クローン284(3)E1.8および284(3)E3.1にカバーにされるS-3型ゲノム領域には *atp6* 遺伝子(*S-3atp6*)が存在する。RNAエディティングにより創り出される *atp6* ORFを図示した。網かけの領域は両遺伝子座間で構造が保存されている。矢印aは *S-3atp6* 転写物の最も上流に位置する5'末端、矢印bは稔性回復株で特異的に検出される転写物の5'末端をそれぞれ示した。

E: *EcoRI*, H: *HindIII*, P: *PstI*, B: *BamHI*, Sm: *SmaI*

とが判った（図4-19）。284(3)2.4SEQの塩基配列を決定し、読み取り枠の検索を試みた。その結果、S-3atp6に相当する読み取り枠が見出された。284(3)2.4SEQ末端のHindIIIサイトからEcoRIサイトの方向へ数えて、340の位置に最初のメチオニンコドンが存在するが、仮にこれを翻訳開始コドンと想定すれば652アミノ酸残基をコードするORFを組むことが出来る（図4-20）。

次にS-3atp6ORFと正常株由来のatp6遺伝子(Natp6)に相当する読み取り枠を比較した結果、S-3atp6ORFにおける369番目のコドン（Natp6では9番目のコドン）より上流の配列は互いに相同性が全く認められないのに対し、これより下流の配列に関しては相同である。しかし不思議なことに、Natp6における9番目のコドンより上流の配列からはin frameのATG開始コドンは見出されていない（図4-20）。この点についてはエディティングの項であらためて論ずる。

S-3atp6上流域について既知の塩基配列との間で相同性を検索した結果、S-3atp6に相当するORFの開始コドンより数えて30bp上流に存在する77bpの配列（図4-20）がテンサイatpA遺伝子上流配列（非コード域）と有意な相同性を示した<sup>70)</sup>。また、その上流にはNicotiana sylvestrisのnad7遺伝子のイントロン<sup>71)</sup>と類似した37bpの配列も見出された（図4-20）。

## § RNAエディティング

前述のように、Natp6ではS-3atp6ORFとの相同性が失われる上流域からはin frameのメチオニンを指定するコドン（開始コドン）が見出されていない（図4-20）。しかし、コムギnad1遺伝子座<sup>25)</sup>のように、転写後のRNAエディティングによってATG開始コドンが形成される事例も知られている。従って、テンサイNatp6についても、RNAエディティングによって開始コドンが生まれ、Natp6ORFが創り出される可能性が十分に考えられよう。この可能性を検証する目的で、Natp6ORFの全域を挟むプライマーP7（5'-TGATCTAGAAGCGGA ACTACA-3'）およびP8（5'-AAGTCTAGACTTAAGCATAAATACCTCGC-3'）（図4-20）を合成し、Natp6

S-3 AAGCTTGTTCACCTTTCTATAAATTGCTGCTTTTGCTTCTAGCTAGTTCAAGTGGATAAG 60

S-3 ATGGCTGCGCTCCAGCTCACTCCTGACTCTTAAAAAGGGAGGATTACGGGTTTCAATAG 120

S-3 ATAATATCGTAAGTAAGAAAGAACGTTTTCACTAATTACTTTTCATAGAGAGAGACCCTCC 180

↑  
(a)

←P9

S-3 CCACCCCAGTATAATGTCCTCTCGAAAATCGGATACCTTTTCGTTTTTCATTTCTCCCAT 240

S-3 TCTTTCTTGGTTGGATCAACCCAACCGGTGATTTCCGACATTCCGACAAGTCTTTCTTCA 300

S-3 TTTTGTAGCGGACAGCAGAAAGAAAAAGATAAATTTTGATGATGACTCATTGGAAGAAG 360

S-3atp6 → \* I L M M T H W K K

S-3 GAGATAACTGCTTTGGCAAACAGATAATTACTAATGTCCTCGACCTACACGGCGAGTC 420

E I T A L A N Q I I T N V P R P T R R V

S-3 TTATTCGGAAGTGGCGTGCTGTTACCTCTTTGAGGTCGGGAGACACGGGCTGTTGTTT 480

L F G L G V L F T L F E V G R H G L L F

S-3 GAAACGGAATTATTCTACAAGCCCTCTTTGGCATAGGAACAGCGGCTTCTATTTTGT 540

E T E I I L Q A L F G I G T A A S I L F

S-3 TTTTGTAAATTCGACCCGAGAGCACTTTCTCTATACATTTCTACTAACGATTTATTTG 600

F C N F R T R E H F L Y T F L L T I Y L

N .....AAGCTTAGCCGTTATAGAGTCAAATTCTCTCTTTTCGCAGCCTAGGGAAGAAG

S-3 GCTTTATTCTTCTAAAGAGGGCTTTCCCTTTTGGGAATTCGCCTTTTGGCTATATTG 660

A L F F L K R A F P L L E F A F L A I L

N GAAGCGAGTCAGAAAAAGCGCTAACTAGAATTATTAAGTGGCTTAGTGTGCTCCTTTACG

S-3 ATCTTTTCGTTTGCTTCTTCTCTAAATGGACGATTACGGCATTGCTAGAGAACTGT 720

I F S V C F F P K N G R L R H S L E N C

N CCCTTAGAAGTTCAAGTAAGTGAGTAGAACTACCTTCATGAGTCTTTACGAGGGAAGAG

S-3 TCTTTTATTTTCTACTCCTTTGGGGGAGTTACCGGCTTTTGGAGACTCCGTGGCAGCAA 780

S F I F L L L W G S Y R L L E T P W H E

図4-20 S-3atp6遺伝子の塩基配列

284(3)1.9SEQ(S-3)からatp6遺伝子(S-3atp6)に相当する読み取り枠が見出された。284(3)1.9SEQおよび正常型ゲノムのatp6遺伝子(Natp6)座の塩基配列を並列して示した。S-3atp6ORFおよびNatp6ORFがコードするアミノ酸を塩基配列と並列させて示した。

RNAエディティングによりウラシル残基に変換されるシトシン残基の上に線を引いた。さらにRNAエディティングにより変換されたコドンが指定するアミノ酸も示した。Natp6遺伝子に対するcDNAの増幅に用いたプライマー(P7およびP8)は四角で囲った配列をもとに設計した。

単線および二重線を引いた配列は*Nicotiana sylvestris*のnad7遺伝子<sup>71)</sup>のイントロンおよびテンサイatpA遺伝子上流配列(非コード域)<sup>70)</sup>と有意な相同性を示した。

プライマー伸長分析に用いたアンチセンスプライマー(P9およびP10)は四角で囲った配列をもとに設計した。矢印(a)はアンチセンスプライマーP9を用いて、I-12CMS(3)より調製したmtRNAに対してプライマー伸長分析を行った結果、マッピングされたS-3atp6転写物の5'末端の位置である。矢印(b)はアンチセンスプライマーP10を用いて、I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF1植物より調製したmtRNAに対してプライマー伸長分析を行った結果、マッピングされたS-3atp6転写物の5'末端の位置である。

N AAGGCGCTAAAGCAAGTACTAAAGGAAGCAGGCTAATAAAAGAATAACTTAGCAGGAATC  
S-3 TGGCCACTCTATGTTTGTGGTCTCTTAATGTTATTACGCTTCTTCAAGCGCTGGTCCAT 840  
W P L Y V C G L L M L F T L L Q A L V H

N CCTCTAATCTTTTAGAGCTCTTTTCGGACTGGGAGAGCTGCTACATCCCGACAGGGAAAGC  
S-3 CGAAAGGACGAAGGGGTGCGCAAGTTTATTCTGCCGGCTACCTTCCTAATTTTAATGAGT 900  
R K D E G V G K F I L P A T F L I L M S

N TACATAGGTAGCGTCCATCTGCAGTCCTAACTATAGTTGAAGCGAAGGATTCTGGCTTATG  
S-3 GCCCTCGTGCTCCTTGGGCTTCACTCAGGGGCGATTATAATCTACCGGAAAAGCGGCC 960  
A L V L L G L H S G A I H N L P E K A A

N AAAGAATCAGCTCTTCTTTGACCTAGCCCCATACTTGTATCCAAGTAAGTAAATAGAAAT  
S-3 CTAACGGGCGCGCAGTCTTAATAATCTTTAGCCAAGCGGCCGCGAGTCCACAAGGGAG 1020  
L T G A A V L I I F S Q A A A E S T R E

N TACCTTACTTATTCAAGTAAGTAAGTCAATTGCATTGCCTTACTCTAACAAGAAAGAGGG  
S-3 CGGTGGCTTGCAATTGGGGCGTATCTCATGTGTATCCCGTGATACTATATATCCTAGGA 1080  
R W L A I G A Y L M C I P C I L Y I L G  
↑  
(b)

N AACTGATTCTCAGATTTCCAGGGTTAATGGGCGAGTCAGGGGAGGTTTAATCAGAATAA  
S-3 GGGGCCACGGATTGGCCCTATTCTGACAACAAATCCGCCTTTTTTTTTTTTATCCTCGGC 1140  
G A T D W P L F V Q Q I R L F F F I L G

N GAGTTAGCGGGGATAGACCAAAGGAATGGATTAAATATAGTTAGTAGAAATGGAACCTC  
←P10  
S-3 CTAGTATTCGGTTTTTTTGGGTTGTTACTTATGAGGACGTAAAAGAGCAGAAGGATCTG 1200  
L V F G F F W V V T Y E D V K E Q K D L

N GAATGCAAGTTCTGAGGGAGAAGACAGGAAGGAAGTTTCATTTTGCTTTGTCAGCAAACC  
S-3 CTCCCGATCCTATCTGCGATCTTCTCCACTTTGGCGTCGGCGAGGTGTGGCCCCGGCGTC 1260  
L P I L S A I F S T L A S A R C G P G V

N AGTAGCAATCCGCTTAAAAGCCAGTAGCACGATAGTACTTCCTCGGTCCTTGAGAAGTCC  
S-3 TGGGTAAAAGAGTGGCTCGGCGCCTTTTCTTACCATTGGGGCGTATTTTTTATTTGAG 1320  
W V K E W L G A F S F T I G A Y F L F E

N TTTAGGAGCACTTTTTTCATCCAAGTAGAAATTGAATAAGAGAAGAAAGCAATGCCCAA  
S-3 AAGGTAGGCTACCGCAAAGATACCCTTCAAGAAACGTCCCGTACTTGGGAAGCTTGTTTT 1380  
K V G Y R K D T L Q E T S R T W E A W F

N GACTCCCATGCCTTTCTTGGTCGGACCAACCCAACCGGTGATTTCCGACAAGTCTTTCTT  
S-3 TGCTTTTTTGCTGTTCTTTCTTTGGTGTGCACTTAGTTTTTTTCATGCATCACCCGCC 1440  
C F F A V L S F G V A L S F F H A S P A

N P7→ Natp6→ \* K V F I T I T M  
S-3 CATTTTGTAGCAAGAAGCGGAAGTACAGGGATGAAATGAAAAGTGTTTATTACGATTACG 1500  
CCAGGGGTCGGAAGTGAAGCTTTTCACGATGCGATTAATCCAGCAGCGGGACGG  
P G V G T E S E A F H D A I N P A A G R

N P N S P L E O F S I L P L I P M K I G N  
S-3 CCCAACAGCCCACTTGAGCAATTTTCCATTCTCCATTGATTCTATGAAAATAGGAAAC 1560  
\*\*\*\*\* \*\*  
ATCCCCAGCCCGCTAGAGCAATTTTCCATTCTCCATTGATTCTATGAAAATAGGAAAC  
I P S P L E Q F S I L P L I P M K I G N

S-3&N TTGTATTTCTCATTACAAAT<sup>¯</sup>CATCTTTGTTTATGCTGCTAACTCTCAGTTTGGTCCTA 1620  
 L Y F S F T N P S L F M L L T L S L V L  
 S

S-3&N CTTCTGCTTCATTTTGTACTAAAAAGGGAGGAGGAAACT<sup>¯</sup>CAGTACCAAATGTTTGGCAA 1680  
 L L L H F V T K K G G G N S V P N V W Q  
 L

S-3&N TCCTTGGTAGAGCTTATTTATGATTTCTGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGGTGGT 1740  
 S L V E L I Y D F V L N L V N E Q I G G

S-3&N CTTTCCGGAAATGTGAAACAAAAGTTTTCCCTTGCATCTTGGTCACTTTTACTTTTTTG 1800  
 L S G N V K Q K F F P C I L V T F T F L  
 T (N)

S-3&N TTATTT<sup>¯</sup>CGTAATCTCCAGGGTATGATACCTATAGCTTTACAGTTACAAGTCATTTTCTC 1860  
 L F R N L Q G M I P Y S F T V T S H F L  
 C

S-3&N ATTACTTTGGGTCTTTTCATTTTCCATTTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGA 1920  
 I T L G L S F S I F I G I T I V G F Q R

S-3&N AATGGGCTTCATTTTTTAAGCTTCT<sup>¯</sup>CATTACCTGCAGGAGTCCCGCTGCCGTTAGCACCT 1980  
 N G L H F L S F S L P A G V P L P L A P  
 L

S-3&N TTTT<sup>¯</sup>TAGTACTCCTTGAGCTAATC<sup>¯</sup>CT<sup>¯</sup>CATTGTTTTCGCGCATTAAGCT<sup>¯</sup>CAGGAATACGT 2040  
 F L V L L E L I P H C F R A L S S G I R  
 S Y L

S-3&N TTATTTGCTAATATGATGGCCGGTCATAGTT<sup>¯</sup>CAGTAAAGATTTTAAGTGGGTTCGCTTGG 2100  
 L F A N M M A G H S S V K I L S G F A W  
 L

S-3&N ACTATGCTATGTATGAATGATCTTTTATATTTTCATAGGAGATCTTGGTCCTTTATTTATA 2160  
 T M L C M N D L L Y F I G D L G P L F I

S-3&N GTTCTTGCATTAACCGGTCTTGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCT<sup>¯</sup>CATGTTTTTACG 2220  
 V L A L T G L E L G V A I L Q A H V F T  
 Y

S-3&N ATCTTAATCTGTATTTACTTGAATGATGCTA<sup>¯</sup>CAAATCTCCAT<sup>¯</sup>CAAATCTTTTTTCTTT 2280  
 I L I C I Y L N D A T N L H Q N S F F F  
 I \*

S-3&N TTATTAGAATTTTATAATTGAACAAAAGCGAGGTATTTATGCTTAAGTCATCGCTTCAA 2340  
 L L E F L \* ←P8

S-3&N ATCCAATAAGGGATCAGACCCCTCCTCGTGTTCAAACCTAGTCATTAATGGTCGGCTTAAT 2400

S-3&N TGGTATCCTTTCTGGTATGCCGCTCCGCTGCAAGGAGCGAGAAAACAAATAGGTCTGTGG 2460

を鋳型とするRT-PCR産物を得た。これをプラスミドでクローン化した上で、12種のcDNAクローンを任意に選んで塩基配列を決め、ゲノミックDNAの塩基配列と比較した。図4-20に示すようにNatp6 mRNA上にシトシン残基がウラシル残基に置換されるエディティングサイトが12箇所見出された。いずれのエディティングもアミノ酸の変化を伴う。

エディティングの中で特に注目されるのはNatp6ORFの5番目のコドンがトレオニン（ゲノミック：ACG）からメチオニン（cDNA：ATG）に変換される現象であり、恐らくこのメチオニンコドンが翻訳開始暗号に相当すると想像される（図4-20）。また、Natp6ORFの261番目のコドンはゲノムにおいてはグルタミン(CAA)をコードするがエディティングにより終止コドン(TAA)に変換されることが判った（図4-20）。したがって、N型ミトコンドリアではRNAエディティングによってatp6遺伝子として257コドンをコードするORF(Natp6ORF)が創り出されることになる。また、ゲノミックシーケンスから推定されたS-3atp6に相当するORFに関しても390番目のコドンより下流の配列で、Natp6と同様のRNAエディティングが起ると仮定すればS-3atp6として641コドンをコードするORF(S-3atp6ORF)を想定することが可能である。

## § 転写

atp6遺伝子の転写を調べるためノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。完全不稔を示すI-12CMS(3)ならびにS-3型細胞質を有する稔性回復型のF<sub>1</sub>植物[I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:A]の葉と花蕾からmtRNAを調製し、フィルターへトランスファーした。ノーザンプロットにはI-12-61L (N型) の葉より抽出したmtRNAも対照として含めた。atp6遺伝子のコード域を含むDNA断片 (284(3) E3.1: 図4-19) をプローブに用いてノーザンプロットとハイブリダイズさせたところ、I-12-61Lからは1.0kbの転写物が検出されたのに対して、I-12CMS(3)からは2.2kb、1.6kbの転写産物が検出された（図4-21）。なお、稔性回復型F<sub>1</sub>植物I-

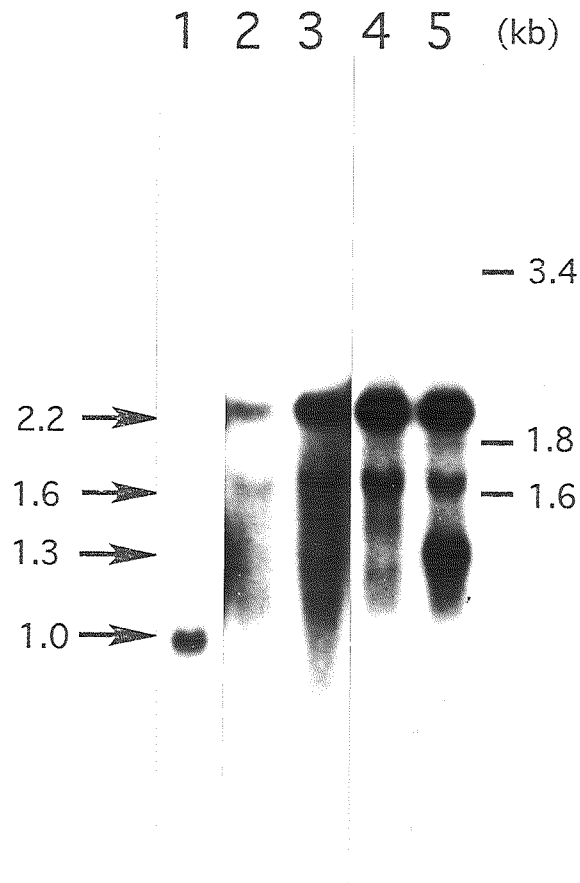


図4-21 *atp6*に関するノーザンブロット分析

クローン284(3)E3.1（図4-19参照）をプローブに用いてノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。mtRNA調製の抽出に用いた遺伝子型と器官は次の通りである。

1: I-12-61L（成葉）

2: I-12CMS(3)（成葉） 3: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（成葉）

4: I-12CMS(3)（花蕾） 5: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>（稔性回復型）（花蕾）

12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:Aの花蕾より抽出したmtRNAに関しては、2.2kb、1.6kbの転写産物に加えて1.3kbの転写産物が見出された（図4-21）。

次に、S-3atp6およびNatp6間で転写パターンに差の生じた機構を明らかにするために、S-3atp6転写物の5'末端の決定を試みた。まず、アンチセンスプライマーP9（5'-GGGAGAAATGAAAACGAAAAGGTATCC-3'）（図4-20）を用い、I-12CMS(3)の葉より調製したmtRNAに対してプライマー伸長分析を行った。その結果、S-3atp6ORFの翻訳開始コドンより数えて218bp上流の位置に5'末端がマッピングされた（図4-20、図4-22）。ノーザンブロット分析によれば-218よりも上流の配列では転写が起きていないようである。従って、この-218の位置がS-3atp6の転写開始点である可能性が高い。因みに、-218の近傍配列（5'-TAATATCGTAAGTAAGAAAG-3'）はダイズのマイトコンドリア遺伝子の転写開始点に見出された19塩基のコンセンサス配列（5'-AAATnnCRTAAGAGAAGAAAG-3'）<sup>53)</sup>と高い相同性を示した。Xue et al.<sup>72)</sup>により、テンサイNatp6遺伝子の転写産物の5'末端がマッピングされたが、S-3atp6メッセージの5'末端の構造とは明らかに異なっている。S-3atp6とNatp6の下流域は塩基配列が相同である（図4-20）ことから両遺伝子の転写パターンに認められた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づけられる。

続いて、稔性回復型を示すF<sub>1</sub>植物[I-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:A]の花蕾において特異的に検出された1.3kbの転写産物の5'末端のマッピングを試みた。S-3atp6の塩基配列を基に設計されたアンチセンスプライマーP10（5'-AAAAACCGAATACTAGGCCGAGGATAA-3'）（図4-20）を用いて、I-12CMS(3)およびI-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>の花蕾より調製したmtRNAに対してプライマー伸長分析を行った。その結果、I-12CMS(3) x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>植物に特異的な転写産物の5'末端はS-3atp6ORFの開始コドンより数えて726bp下流の位置にマッピングされた（図4-20、図4-22）。

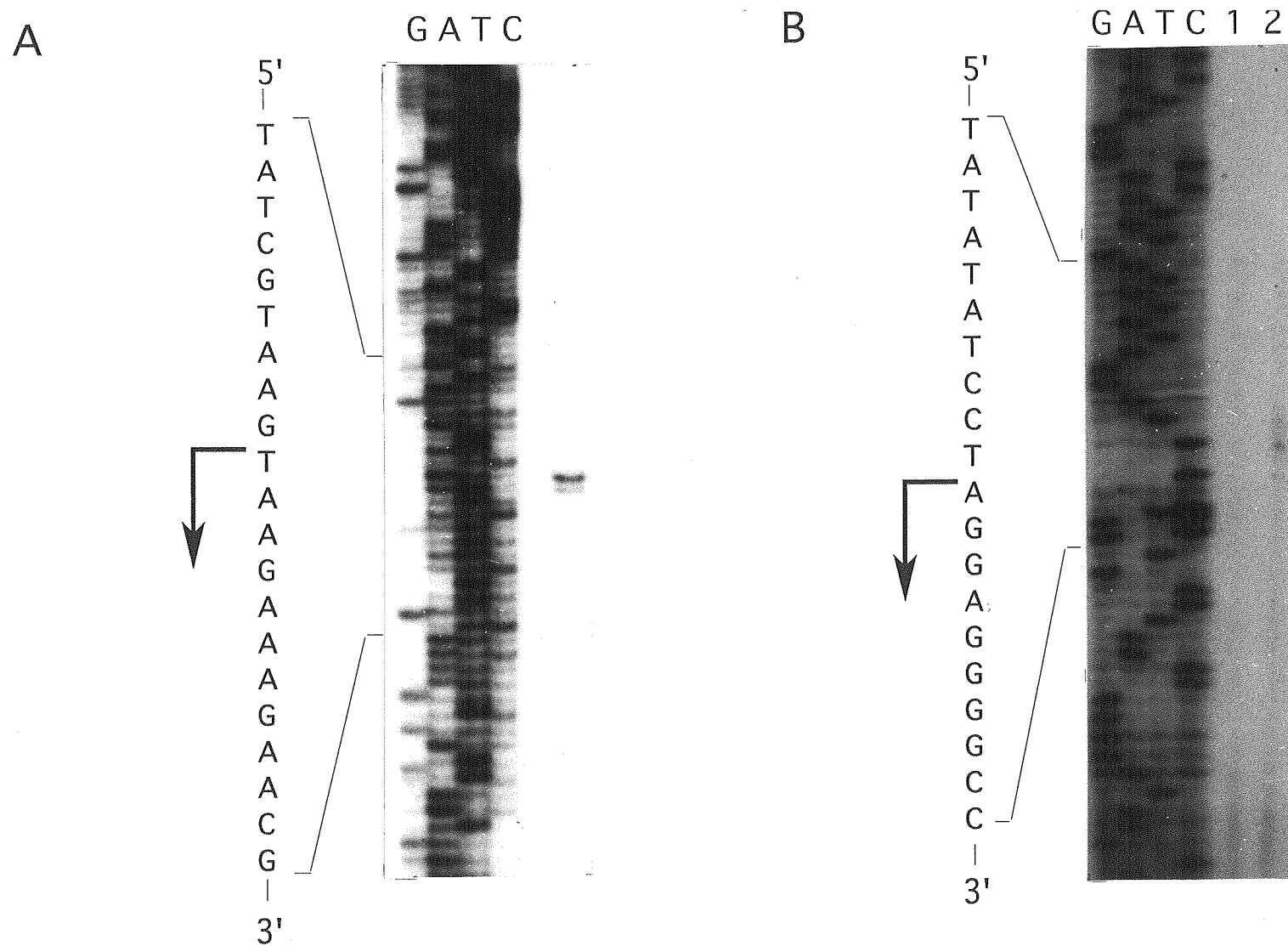


図4-22 *atp6*遺伝子転写産物の5'末端の決定

A : アンチセンスプライマーP9 (図4-20) を用い、I-12CMS(3)の葉より抽出したmtRNAに対してプライマー伸長分析を行った結果、S-3*atp6*ORFの開始コドンより数えて211bp上流の位置にS-3 *atp6*遺伝子転写産物の5'末端がマッピングされた。

B : アンチセンスプライマーP10 (図4-20) を用いて、I-12CMS(3) (レーン1) およびI-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub> (レーン2) の花蕾より抽出したmtRNAに対してプライマー伸長分析を行った結果、S-3 *atp6*ORFの開始コドンより数えて792bp下流の位置にI-12CMS(3):1 x T2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub>植物に特異的なS-3*atp6*遺伝子転写産物の5'末端がマッピングされた。

## § 翻訳

I-12-61-L、I-12CMS(3)ならびにI-12CMS(3)xT2n-16-58-51-OのF<sub>1</sub> (遺伝子型: S-3 *Rfa rfa Rfb rfb*) の花蕾よりミトコンドリアタンパク質を抽出し、抗ATP6抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った。その結果、いずれの遺伝子型においても23kDaの位置にシグナルが検出された(図4-23)。シグナルの強さを指標とする発現量にも遺伝子型による差は認められず(図4-23)、稔性回復核遺伝子のatp6遺伝子の翻訳に対する影響はないとみなしてよい。

## 考察

### (1) ゲノム再編成

S-3型とN型との間でミトコンドリアゲノムのマスター染色体を比較した結果、それぞれ少なくとも8箇所の再編成域が見い出された。このような複雑な再編成はハツカダイコン<sup>28)</sup>やトウモロコシ<sup>75)</sup>、ペチュニア<sup>43)</sup>における正常型と雄性不稔型ミトコンドリアゲノムの間でも報告されている。一方、制限酵素サイトの獲得／欠如変異は低頻度であり、従って、テンサイにおいても他植物種と同様にミトコンドリアゲノムの多様性が主として再編成を通じてもたらされたことが理解されよう。

Andre<sup>76)</sup>の総説によれば一般に高等植物のミトコンドリアゲノムには7bpから450bp程度の短い反復配列が含まれており、これらの反復配列を介した相同組換えの産物として生じたDNA分子がミトコンドリアゲノム再編成の過程で重要な役割を果たす可能性が指摘されている。また、Andreはこの様な短い反復配列の起源をミトコンドリアmRNAの逆転写産物に求める仮説を提唱しており、実際にタバコ、ダイコン、ペチュニアおよびマツヨイグサではミトコンドリア遺伝子近傍の配列が種を越えた反復配列ファミリーを形成しているようである。本研究においても、テンサイS-3型ゲノムの構造変異域からミトコンドリア遺伝子の隣接域やコード域との相同性を示す短い配列がいくつか同定された(図4-5、図4-11、図4-14、図4-16、図4-20)。予備的に行ったサザンハイブリダイゼーション実験によれば、

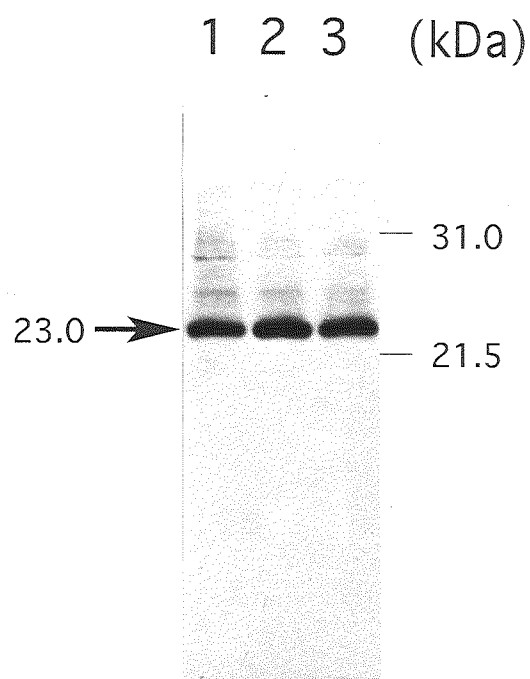


図4-23 ATP6タンパク質に関するウェスタンプロット分析

ATP6抗体を用いて、下記に示す遺伝子型の花蕾より調製したミトコンドリア画分に対してウェスタンプロット分析を行った。

1: I-12-61L 2: I-12CMS(3)

3: I-12CMS(3):1 xT2n-16-58-51-O:AのF<sub>1</sub> (稔性回復型)

*orf170*の3'隣接域に見出されたn1FS (図4-11) はS-3型ミトコンドリアゲノム中に少なくとも3コピー存在し、またN型、S型およびS-2型ゲノムにも含まれているようである。また、*orf129*の5'隣接域にはペチュニアおよびテンサイ正常型*coxII*遺伝子5'隣接域との相同配列(COXFS)が見付かり、さらに*orf46*上流域からは*orfB*遺伝子との相同配列(ORFFS)が見出されたが、これらの相同配列はいずれもテンサイN型ミトコンドリアゲノム上で反復配列を形成していることが報告された<sup>23)</sup>。

Senda et al.<sup>70)</sup>はテンサイS型株を特徴づける*ScoxII*遺伝子の誕生にCOXFS配列を介した*orf129*遺伝子と正常型*coxII*遺伝子間の相同組換えが重要な役割を演じた可能性を指摘している。本実験でS-3型ゲノムの構造変異域より見出された短い反復配列ファミリーのメンバーがS-3型ゲノムの分化やS-3型ゲノムに見出された変異型遺伝子および固有ORFの生成に関与している可能性も十分に考えられよう。

## (2) S-3型CMSの機構

S-3型ミトコンドリアゲノムより変異型*atp6*遺伝子ならびにデータベースに登録されていない5種の固有ORF (*orf100/orf169*、*orf46/orf187*、*orf129*) が見出された。なお、これらの固有ORFはテンサイN型ミトコンドリアゲノムには含まれていないことがサザンブロット分析から判っている。

*orf100/orf169* : 固有転写物が検出された領域中に、*orf100*および*orf169*の互いにオーバーラップする2箇のORFを同定した。しかし、*orf100/orf169*コード配列のみを含む断片をプローブとして用いたノーザンブロット分析から両ORFは葉および花蕾のミトコンドリア内では転写されていないことが示された。従って、両ORFは少なくとも葉と花蕾のミトコンドリアでは機能を発揮せず、CMS発現には関与しないと考えられる。

クローン410(3)Xb2.4を細分したクローン (probeB : *orf100/orf169*コード配列を含まない : 図4-13) をプローブとして用いたノーザンブロット分析ではS-3型株にのみ固有の転写物のみが検出される。クローン410(3)Xb1.0にカバーされるS-

3型ゲノム領域には機能遺伝子としての条件を満たすORFは含まれていない。恐らく、この領域にはプロモーター配列だけが存在し、そのため転写は起こるものの翻訳には至らないと想像される。従って、このS-3型固有転写物についてもCMS発現に關与している可能性は極めて低い。

*orf46/orf187* : N型とS-3型ミトコンドリアゲノム間では、*rps13*遺伝子の開始コドンの上流54bpの位置に再編成サイトが見出された。この再編成サイトと*rps13*の開始コドンに挟まれる54bp配列からは高等植物のミトコンドリア遺伝子のプロモーター間で保存されているCRTA配列<sup>73)</sup>は見出されていない。従って、N型およびS-3型ゲノムでは*rps13*に関する転写開始配列やその他の転写調節配列が開始コドンに対する-54bp目より更に上流の領域に存在する可能性が高い。

S-3型ゲノムの*rps13*上流域から*orf46*および*orf187*が見出された。両ORFは、(1)生存に不可欠なミトコンドリア遺伝子（この場合は*rps13-nad1* exon b）と密接に連鎖しており、さらに(2)*orf46*に関しては普遍的なミトコンドリア遺伝子*orfB*との融合遺伝子である点で、これまでに他の植物種でCMSとの関連性が指摘されているミトコンドリア遺伝子<sup>78) 79) 80) 81)</sup>と類似しており、興味深い。しかし、*orf187*はミトコンドリア内で転写されているものの、ミトコンドリア中でORF187タンパク質の蓄積を示すデータはウェスタンブロット分析からは得られなかった。トウモロコシ<sup>82)</sup>、ペチュニア<sup>83)</sup>、ヒマワリ<sup>84)</sup>およびハツカダイコン<sup>85)</sup>のCMS株から同定されたCMS関与ミトコンドリア遺伝子の翻訳産物は、いずれも免疫学的に蓄積が検出されている。仮にS-3型ミトコンドリア中にORF187タンパク質が含まれていたとしても、免疫学的な検出限界に達しない程度に微量であり、ミトコンドリア機能に影響を与えるとは考え難い。

*orf187*と*rps13*は70bpのスペーサー配列を介して連鎖している。*rps13*の発現が*orf187*との密接な連鎖関係によって左右される可能性が考えられる。RT-PCR実験からは両遺伝子の共転写されていることを示すデータは得られなかったが、*rps13*遺伝子に関しては、あらためてN・S-3両株間で転写・翻訳レベルの比較解析

を行い、CMS発現との関連性を検証すべきであろう。

*orf145/orf170* : *orf145/orf170*はS-3型ゲノムのrepeat1 copyBと*atpA*遺伝子の間に位置し、両者共にミトコンドリア内で転写されている。また、*orf145* mRNAに関してはエディティングが起きている。これまでに同定された植物ミトコンドリア遺伝子の大多数においてはエディティングを受けている<sup>6)</sup>。両ORFのコードタンパク質は未同定であるが、少なくとも*orf145*については機能を備えた遺伝子の可能性が高い。*orf145/orf170*に関する翻訳レベルの解析を進め、CMS発現との関連性を明らかにするのが次の研究課題である。

*orf129* : *orf129*はS-3型ミトコンドリアゲノムのrepeat1 copyAおよびcopyCの隣接域に見出された。*orf129*は、テンサイS型CMS株の*coxII*(*ScoxII*)と翻訳開始コドンより上流の配列を共有する。このようなキメラ構造を有する点で、*orf129*は他の植物種で同定されたCMS関与遺伝子と類似することが指摘できる。*orf129*、*ScoxII*の転写開始点は共通しており、従って、両遺伝子は転写開始にかかわるシス・トランス因子も共有している可能性も高い。Kennell et al.<sup>86)</sup>によれば、トウモロコシT型CMS関与ミトコンドリア遺伝子*T-urf13*は*atp6*と、プロモーターやプロセシングサイトを共有している。同様の特徴はペチュニアCMS関与遺伝子*pcf*と*atp9*の間にも見出された<sup>79)</sup>。また、マツヨイグサのミトコンドリアは*coxI*と*coxIII*の2遺伝子がプロモーターを共有しているという<sup>32)</sup>。この様に、高等植物のミトコンドリアゲノムにおいては遺伝子の発現調節に関わる配列の重複と組換えを通じて、新たな遺伝子が創り出されるようである。恐らく、トウモロコシやペチュニアの例が示すように、一部のCMS関連遺伝子もこうしたプロセスを経て誕生したのであろう。

*T-urf13*遺伝子や*pcf*遺伝子と共通の特徴を備えたテンサイ*orf129*のコード配列はS-3型ミトコンドリアゲノムにしか存在せず、その転写物もS-3型CMS株においてのみ検出される。さらに、ORF129抗体を用いたウェスタンブロット分析を通じて、*orf129*の翻訳産物を確認することができた。ORF129はS-3型CMS株に固有の

ミトコンドリアタンパク質として、S-3型CMSの発現機構を解析する上で極めて興味深い。予備的に行った実験では、ORF129はミトコンドリアの膜およびマトリックスの両画分にほぼ等量ずつ含まれていることが示唆された。因みに、ペチュニアのCMS関与遺伝子*pcf*の翻訳産物もミトコンドリア内で膜およびマトリックスの両方に分布している<sup>83)</sup>。今後は、S-3型CMS株の薬における*orf129*遺伝子の詳細な発現解析やミトコンドリア活性の生化学的定量を通じて、ORF129タンパク質の機能推定およびS-3型CMSとORF129の関連性を調査していく予定である。

S-3*atp6* : *atp6*遺伝子に関しては、N型、S-3型両株間で明瞭に異なる転写パターンが検出された。また、S-3型ゲノムの*atp6*座上流から再編成に基づくN型ゲノムとの構造変異が見出された。さらにS-3*atp6*mRNAおよび*Natp6*mRNAの転写産物5'末端のマッピングデータの比較に加え<sup>72)</sup>、S-3*atp6*、*Natp6*の下流域が相同である(図4-19)ことより、N型株とS-3型株間に検出された転写パターンの差異は、*atp6*の転写調節に関わる5'上流域の塩基配列の相違に起因すると結論づけられる。

高等植物種および酵母の*atp6*に関するcDNAまたはゲノムの塩基配列を基にATP6のアミノ酸配列を推定すると、これらのATP6は互いに相同性の高い252アミノ酸残基のコア領域と相同性の低い9~389アミノ酸からなるN-extension領域によって構成されているのが判る(図4-24)。テンサイのS-3*atp6*と*Natp6*では、コードするポリペプチドの差異はN-extension領域に限定されている。ATP6のN-extension領域の機能は未だ明らかにされていない。N-extension領域のアミノ酸配列は近縁植物種間で相同性がみられる事例もあるが、植物種全体を通じての共通性は見出されていない(図4-24)。また、アラビドプシスにおける正常株のミトコンドリアには*atp6*遺伝子が2コピー含まれており、この*atp6*遺伝子は互いに異なるN-extension領域を備えている<sup>87)</sup>。酵母<sup>88)</sup>およびハツカダイコン<sup>89)</sup>では*atp6*翻訳産物はプロセッシングを受けて、コア領域が成熟型ATP6として蓄積されることが証明されている。また本実験において、N型株およびS-3型株には23kDaの成熟型ATP6に

|         |      |     |             | 252a.a.                 |
|---------|------|-----|-------------|-------------------------|
|         |      |     | N-extension | コア領域                    |
| B.v.(N) | cDNA | 5   |             | MITPNSPL.....LH*        |
| P.p.    | cDNA | 145 | M-----      | TSPPNPPTVPSPL.....LH*   |
| O.b.    | cDNA | 29  |             | M--HFWADTMSSHSP.....LH* |
| S.b.    | cDNA | 127 | M-----      | WERTGELLIPSPL.....LH*   |
| Z.m.    | cDNA | 24  |             | M-IPGGGGPVTESP.....LH*  |
| B.n.    | cDNA | 9   |             | MNQIGLVAQSP.....LH*     |
| S.c.    | DNA  | 10  |             | MFNLLNTYITSPL.....LH*   |

図4-24 高等植物と酵母の*atp6*遺伝子に関するcDNAおよびゲノムの塩基配列から推定されるATP6タンパク質のアミノ酸配列

B.v.(N) : *Beta vulgaris* TK81-O、P.p. : *Petunia parodi*<sup>93)</sup>、

O.b. : *Oenothera berteriana*<sup>94)</sup>、S.b. : *Sorghum bicolor*<sup>95)</sup>、

Z.m. : *Zea mays*<sup>96)</sup>、B.n. : *Brassica napus*<sup>97)</sup>、

S.c. : *Saccharomyces cerevisiae*<sup>98)</sup>

相当するポリペプチドが同程度蓄積していることが示された。以上のデータに基づきS-3atp6はCMSとの関連性はないと結論づけた。

### (3) 稔性回復核遺伝子の作用

S-3型CMS株とS-3型細胞質を有する稔性回復型F<sub>1</sub>株を供試し、S-3型固有ORFやS-3atp6の発現に及ぼすRf遺伝子の作用を解析した。S-3atp6に関しては両株間で転写パターンに差異が見出された。しかし、両株間では同じサイズのATP6タンパク質がほぼ等量ずつ蓄積しており、転写パターンの差異は翻訳レベルの発現には反映しない。S-3型稔性回復型F<sub>1</sub>株に固有の1.3kbのatp6 mRNAのN-extension領域にはin frameのメチオニンコдонは見出されておらず、この転写物は翻訳されない可能性が高い。今後はS-3型稔性回復型F<sub>1</sub>株の後代における雄性不稔型とS-3atp6の転写パターンとの相関関係を調査して、両株間で見出されたS-3atp6転写パターンの差異がRfによるものか否かを検証する必要がある。

一方、S-3型株から見出された5種の固有ORFの転写パターンに対するRfの作用は見出されなかった。また、orf129の翻訳に及ぼすRfの作用も検出されなかった。ヒマワリにおいてはCMS発現に与ると考えられるミトコンドリア遺伝子orf522の転写産物の不安定化ならびに翻訳産物の減少が、稔性回復核遺伝子によって薬特異的に引き起こされることが報告された<sup>84)</sup>。ハツカダイコンの雄性不稔型ミトコンドリアゲノムから見出されたorf138についても、その翻訳産物の減少が稔性回復核遺伝子によって葉と花芽で引き起こされるという<sup>85)</sup>。これに対して、テンサイS-3型CMSでは固有ミトコンドリア遺伝子と稔性回復遺伝子(Rfa, Rfb)との相互作用が転写や翻訳で明確には現れていない。ただ、RfaおよびRfbの作用がごく限られた組織におけるCMS関与ミトコンドリア遺伝子の発現調節にしか及ばない場合には、本実験のような葉および花蕾を対象とした解析からはRfa、Rfbの作用が検出できない可能性も十分に考えられる。従って、組織切片を用いたin situハイブリダイゼーションや免疫染色を通じて調査することが次の課題となる。

#### (4) *Natp6*におけるRNAエディティング

本実験では*Natp6* mRNAのN-extension領域にエディティングが生じ、翻訳開始コドンが創り出されることを明らかにした。つまり、*Natp6* mRNAのN-extension領域は5アミノ酸をコードすることになる。また、*Natp6* mRNAに見出された11箇所のエディティングサイトは、他の高等植物の*atp6* mRNAにも含まれている（図4-25）。エディティングの結果、テンサイATP6タンパク質のアミノ酸配列の保存性は明らかに高まる（図4-25）。

ATP6のアミノ酸配列の比較（図4-26）に基づけば、高等植物の*atp6*はゲノム上でコア領域とN-extension領域に加え、相同性の低い0～35アミノ酸をコードするC-extension領域により構成されていると考えられる。テンサイ*Natp6* mRNAは、翻訳開始コドンより数えて258番目のコドンはエディティングにより終止コドンに変換される（図4-26）。従って、ゲノムの塩基配列より推定された、*Natp6*のC-extension領域はアミノ酸をコードしないことが判った。S-3*atp6*のコア領域とC-extension領域の塩基配列は*Natp6*と相同であり、*Natp6* mRNAにおけると同様のエディティング反応がS-3*atp6* mRNAでも起こる可能性が高い。恐らく、S-3*atp6*のコア領域とC-extension領域に合計11箇所のエディティングサイトが含まれるのだろう。

*Natp6*のN-extension領域は既知配列との相同性が全く見られないから、この領域に見出されたエディティングサイトを標的とするエディティングは、テンサイN型細胞質に固有の現象といってよい。ペチュニアにおいては、*nad3* mRNAのエディティングの効率に影響を及ぼす核遺伝子の存在が示唆された<sup>90)</sup>。しかし、これまでに植物ミトコンドリアのエディティング反応に関わるガイドRNAやトランス因子は同定されていない。一方、エディティング反応にはエディティングサイトの5'隣接配列（シス配列）が関わっているとの指摘もある<sup>91)</sup>。葉緑体においてもC→Uエディティングが見出されているが、この現象の生起にはエディティングされる塩基を含む

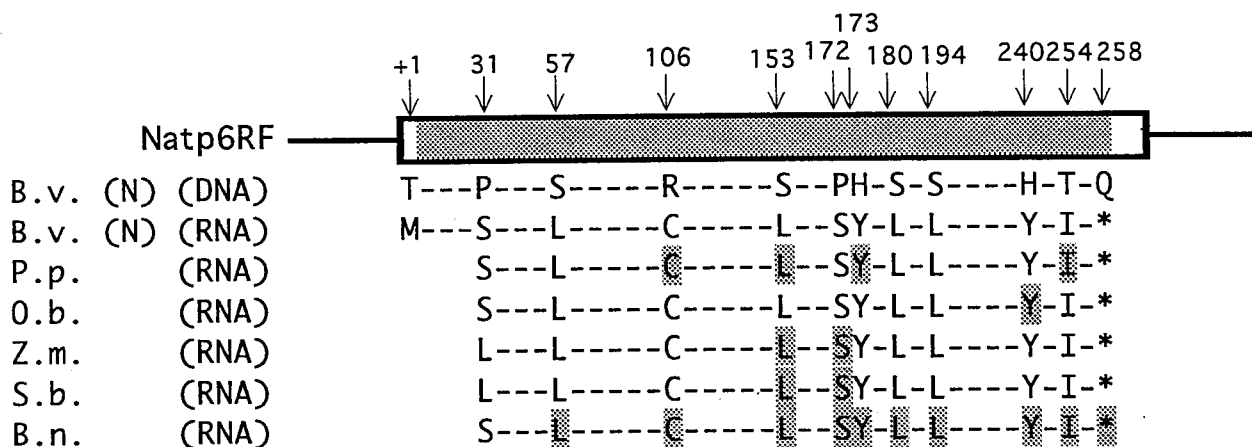


図4-25 高等植物の*atp6* mRNAから推定されるATP6タンパク質のアミノ酸配列

ゲノムにコードされるアミノ酸は網掛けで示した

B.v.(N) : *Beta vulgaris* TK81-O、P.p. : *Petunia parodi*<sup>93)</sup>、

O.b. : *Oenothera berteriana*<sup>94)</sup>、S.b. : *Sorghum bicolor*<sup>95)</sup>、

Z.m. : *Zea mays*<sup>96)</sup>、B.n. : *Brassica napus*<sup>97)</sup>

|           |      |         | 252a.a.               |                            |             |
|-----------|------|---------|-----------------------|----------------------------|-------------|
|           |      |         | N-extension           | コア領域                       | C-Extension |
| B.v.(N)   | cDNA | 5       |                       | MITPNSPL.....LH*           | 0           |
| B.v.(N)   | DNA  | 9       |                       | *KVFITITPNSPL.....LH-*     | 11          |
| B.v.(S-3) | DNA  | 389-153 | MM-----M---M---M----- | AINPAAGRIPSPL.....LH-*     | 11          |
| P.p.      | DNA  | 145     | M-----                | TSPNPPTVPSPL.....LH-*      | 13          |
| O.b.      | DNA  | 29      |                       | M--HFWADTMSSHSP.....LH---- | 35          |
| S.b.      | DNA  | 127     | M-----                | WERTGELLIPSPL.....LH-*     | 3           |
| Z.m.      | DNA  | 24      |                       | M-IPGGGPPVTESPL.....LH--*  | 15          |
| B.n.      | DNA  | 9       |                       | MNQIGLVAQSPL.....LH*       | 0           |

図4-26 ゲノムの塩基配列から推定される植物*atp6*遺伝子の翻訳産物のアミノ酸配列。

比較としてテンサイNatp6のcDNA配列より推定されるアミノ酸配列も示した。

B.v.(N) : *Beta vulgaris* TK81-O、B.v.(S-3) : *Beta vulgaris* I-12-CMS(3)、P.p. : *Petunia parodi*<sup>93)</sup>、

O.b. : *Oenothera berteriana*<sup>94)</sup>、S.b. : *Sorghum bicolor*<sup>95)</sup>、

Z.m. : *Zea mays*<sup>96)</sup>、B.n. : *Brassica napus*<sup>97)</sup>

22ヌクレオチドの隣接配列が必要であり、また個々のエディティング現象にはそれぞれに固有のシス・トランス因子が介在しているようである<sup>92)</sup>。従って、Natp6のN-extension領域におけるエディティングサイトを標的とする独自のトランス因子の存在する可能性は十分に考えられよう。また、著者はテンサイ近縁野生種*Beta maritima*45系統のatp6遺伝子の構造を調査した。その結果、30系統がNatp6を有し、残りの15系統はS-3atp6ともNatp6とも異なる構造のatp6遺伝子を備えていることが明らかとなった。このように多様な構造のatp6遺伝子を解析することにより、エディティングの進化を解明することも魅力的な研究課題といえる。

## 第5章 テンサイ雄性不稔細胞質に見られる多型の成因解析

### 緒言

雄性不稔細胞質の多型はトウモロコシ<sup>99)</sup>、イネ<sup>100)</sup>およびソルガム<sup>101)</sup>等において知られている。特に、トウモロコシでは40種以上の由来を異にする雄性不稔細胞質が発見されており、これらは*Rf*遺伝子との相互関係の特異性に基づいて、T型、S型およびC型の3基本群に分類されている<sup>10)</sup>。T型トウモロコシのミトコンドリアゲノムから見出された雄性不稔関連遺伝子*T-urf13*は、C型やS型CMS株のmtDNAには含まれておらず、CMSの発現機構は異型細胞質間で異なるようである。同様の可能性はテンサイの異型CMSについても指摘できる。

テンサイではS型CMS株とS-3型CMS株では、それぞれ独自の*Rf*遺伝子が花粉稔性の回復に働くことが示された。さらに正常型細胞質に加えてS型、S-2型およびS-3型雄性不稔細胞質ミトコンドリアゲノムの物理・遺伝子地図の作製が完了した(22)、23)、24)、本研究)。これら3種の雄性不稔細胞質はCMS発現機構の多様性や雄性不稔細胞質の分化機構を解析する上で興味深い材料といえる。

本章では、まず3種のテンサイCMSの発現機構に差異をもたらすミトコンドリアゲノム領域を特定することを目的として、S-3型とS型ならびにS-3型とS-2型ミトコンドリアゲノム間における構造比較を試みた。ついで、3種のミトコンドリアゲノムの生起・分化過程を研究するために、*Beta vulgaris*の野生生態型やテンサイの祖先型野生種である*Beta maritima*を供試して、mtDNAのRFLP分析を行い、正常型、S型、S-2型およびS-3型の分化系譜の中間に位置するゲノムや直接の祖先型ゲノムの検索を試みた。

### 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)および3種のCMS系統(TK81-MS, I-12-CMS(2), I-12-CMS(3))に加えて、*Beta vulgaris*の野生生態型(52系統)や

テンサイの祖先型野生種である*Beta maritima* (77系統)、*Beta orientaris* (2系統)、*Beta adanensis* (1系統)、*Beta macrocarpa* (1系統)を用いた(表5-1)。

## (2) 全DNAの抽出

約7gの成葉を液体窒素中で粉末状にし、20mlのCTAB抽出液(2%(W/V) CTAB、1.4M NaCl、0.2%(V/V)2-メルカプトエタノール、20mM EDTA、100mM Tris-HCl pH8.0)を加え、30分間、60℃で保温した後、放冷した。その後、等量のクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)溶液を加えて、3000rpm(水平ローター半径107mm)で10分間遠心し、上層を回収した。さらに、イソプロパノール沈殿によりDNAを回収した後、TE緩衝液に溶解し、CsCl-EtBr平衡密度勾配遠心により精製DNAを分画した。

## (3) 核酸およびタンパク質の解析法

第3章および第4章に詳述した。

## 結果

### (1) S-3型とS型 mtDNAの構造比較

S-3型 mtDNAクローンライブラリーを用いたRFLP分析と制限酵素切断点の分布の比較を通じて、S-3型株とS型株間でミトコンドリアゲノムの構造比較を行った。その結果、少なくとも15個のリンケージ群が同定された(図5-1)。最長のリンケージ群Bは36.2kbpである。リンケージ群Aを起点に両ゲノムを比較した場合、少なくとも8領域(リンケージ群B,C,D,F,J,K,M,N)が逆位を起こし、リンケージ群の配列も異なっている。ただ、本実験では、両ゲノム間でリンケージ群GおよびHについての相対的な方向を決めることはできなかった。リンケージ群内部の分子構造は両ゲノムの間で保存性が高いが、リンケージ群A及びMにおいてそれぞれ1.2kbp、

表5-1 供試材料

| 種                    | 系統          | 原產地      | 種                    | 系統           | 原產地            |
|----------------------|-------------|----------|----------------------|--------------|----------------|
| <i>Beta vulgaris</i> | BETA 20/86  | Germany  | <i>Beta maritima</i> | BETA 245/88  |                |
|                      | BETA 21/91  |          |                      | BETA 243/88  |                |
|                      | BETA 21/91  |          |                      | 753931       |                |
|                      | BETA 29/82  |          |                      | 753932       |                |
|                      | BETA 30/89  |          |                      | 7539662      |                |
|                      | BETA 31/78  |          |                      | 753994       |                |
|                      | BETA 31/81  |          |                      |              | AM4195-213     |
|                      | BETA 32/89  | Schweden |                      | AM4197-215   |                |
|                      | BETA 32/89  |          |                      | AM4200-218   | Netherland     |
|                      | BETA 35/85  |          |                      | AM4201-219   | Turkey         |
|                      | BETA 35/85  | Tunesia  |                      | AM4206-212   | Israel         |
|                      | BETA 37/76  | Tunesia  |                      | AM4215-224   |                |
|                      | BETA 37/76  |          |                      | AM4223-230   | Greece         |
|                      | BETA 39/82  |          |                      | AM4247-295   | Spain          |
|                      | BETA 42/88  |          |                      | AM4259-281   | India          |
|                      | BETA 54/88  |          |                      | FR4-31       | France         |
|                      | BETA 57/89  |          |                      | FR5-36       | France         |
|                      | BETA 67/77  |          |                      | FR6-41       | France         |
|                      | BETA 72/82  |          |                      | PI504186-119 | Italy          |
|                      | BETA 75/86  |          |                      | PI504271-148 | France         |
|                      | BETA 77/86  |          |                      | PI504285-305 | France         |
|                      | BETA 78/90  |          |                      | PI518298-201 | United Kingdom |
|                      | BETA 86/81  |          |                      | PI518369-311 | United Kingdom |
|                      | BETA 87/78  |          |                      | PI518390-313 | Ireland        |
|                      | BETA 98/80  |          |                      | PI518407-315 | Ireland        |
|                      | BETA 109/88 |          |                      | PI546510-328 | Greece         |
|                      | BETA 111/85 | Holand   |                      | PI546521-331 | Greece         |
|                      | BETA 114/87 | America  |                      | PI546524-333 | Italy          |
|                      | BETA 114/87 |          |                      | PI546530-337 | Italy          |
|                      | BETA 133/87 |          |                      | PI546532-339 | Greece         |
|                      | BETA 142/81 |          |                      | BGRC48810-MF | Tunisia        |
|                      | BETA 142/86 |          |                      | BGRC48810-MS | Tunisia        |
|                      | BETA 154/82 |          |                      | BGRC57705-MF |                |
|                      | BETA 179/73 | China    |                      | BGRC57705-MS |                |
|                      | BETA 182/77 | Bulgaria |                      | BGRC57713-MS | Portugal       |
|                      | BETA 184/82 |          |                      | BGRC57715-MF | Portugal       |
|                      | BETA 184/82 | CSSR     |                      | BGRC57715-MS | Portugal       |
|                      | BETA 188/84 |          |                      | BGRC58265-MF | Turkey         |
|                      | BETA 190/85 |          |                      | BGRC58265-MS | Turkey         |
|                      | BETA 191/83 | France   |                      | 28901        | Italy          |
|                      | BETA 192/92 |          |                      | 32396        | Greece         |
|                      | BETA 242/88 |          |                      | 32655        | Greece         |
|                      | BETA 81/88  |          |                      | 35279        | France         |
| BETA 244/88          |             | 35289    | Turkey               |              |                |

表5-1 供試材料

| 種                      | 系統             | 原產地           |
|------------------------|----------------|---------------|
| <i>Beta maritima</i>   | 36478          | Greece        |
|                        | 36536          | Greece        |
|                        | 48810          | Tunisia       |
|                        | 49844          | Unknown       |
|                        | 49847          | Unknown       |
|                        | 54722          | Spain         |
|                        | 54791          | Spain         |
|                        | 54841          | Ireland       |
|                        | 54842          | Portugal      |
|                        | 56743          | Greece        |
|                        | 56773          | Italy         |
|                        | 56776          | Spain         |
|                        | 57713          | Portugal      |
|                        | 57715          | Portugal      |
|                        | 57712          | Portugal      |
|                        | 57718          | Portugal      |
|                        | 61206          | Turkey        |
|                        | BETA12/82      | Portugal      |
|                        | BETA(29)17/85  | France        |
|                        | BEAT148/89     | N.Wales       |
|                        | BETA156/86     | Belgium       |
|                        | BETA164/92     | Italy         |
|                        | BETA(29)227/85 | Belgium       |
|                        | BETA248/90     | Spain         |
|                        | BETA(29)251/90 | Greece        |
|                        | BETA8/80       |               |
|                        | BETA12/79      |               |
|                        | BETA(8)17/85   |               |
|                        | BETA(8)18/82   |               |
|                        | BETA(29)18/82  |               |
|                        | BETA19/88      |               |
|                        | BETA140/83     |               |
|                        | BETA145/85     |               |
|                        | BETA(8)227/85  |               |
|                        | BETA(8)251/90  |               |
|                        | BETA255/90     |               |
|                        | BETA280/91     |               |
|                        | BETA285/92     |               |
|                        | BETA286/92     |               |
| <i>Beta orientaris</i> | 56777          |               |
|                        | 56779          | India         |
| <i>Beta adanensis</i>  |                | Egypt         |
| <i>Beta macrocarpa</i> |                | Canary Island |

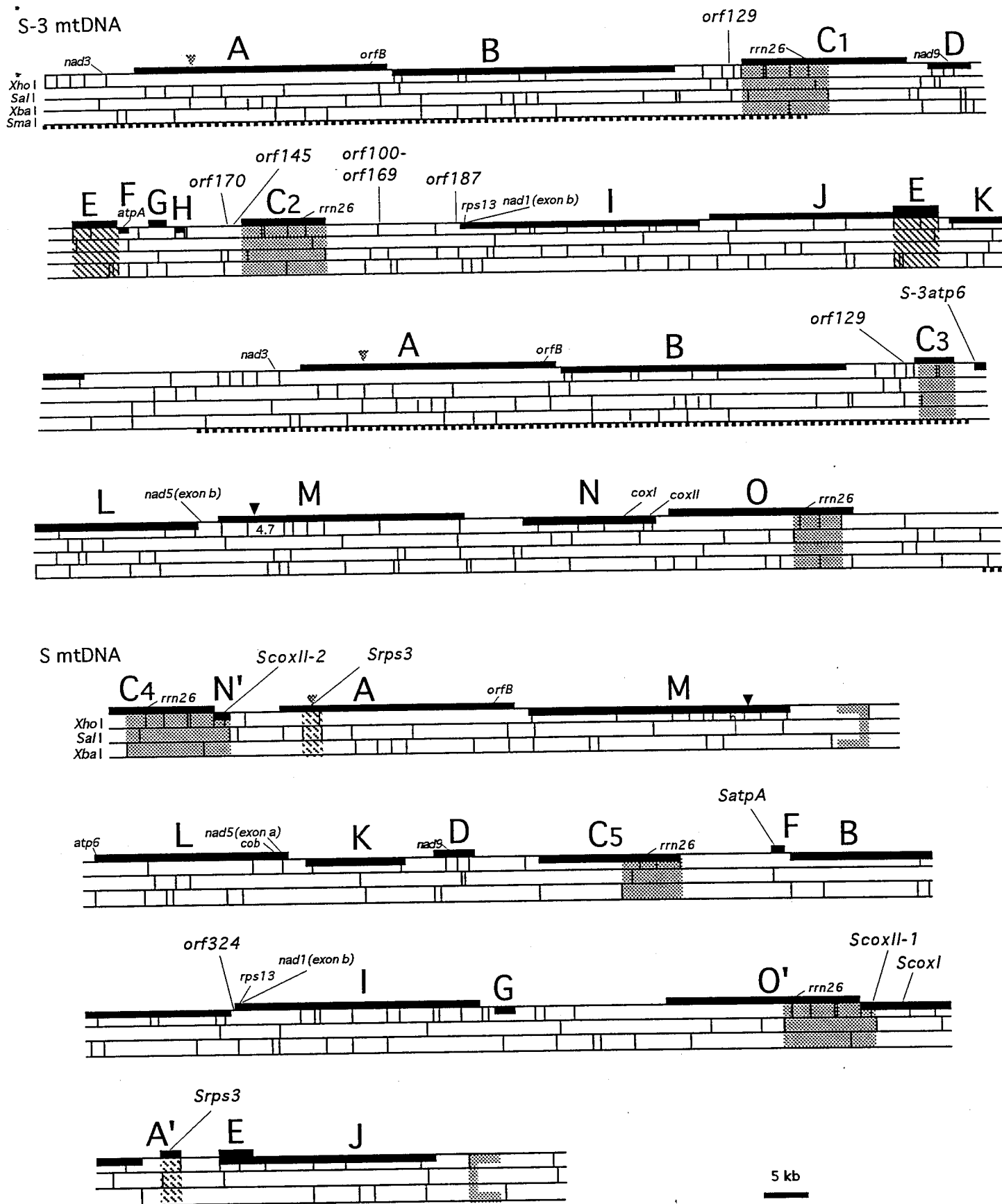


図5-1 S-3型およびS型<sup>23)</sup> mtDNA間の物理地図

S-3型とS型 mtDNA間の構造比較によって、15個のリンケージ群が同定された。▼および ▼は挿入／欠失変異を示す。両ゲノムで見出された変異型遺伝子 (S-3型: orf129, orf169/orf100, orf46/orf187, S-3atp6, S型: ScoxI, ScoxII, SatpA, Srps3, Satp6, orf324) の位置も図示した。反復配列を地図上で網かけおよび斜線模様領域として表す。

1.4kbpの挿入／欠失変異が見出された（図5-1）。また、RFLP分析からは対応域を  
同定し得ない配列も多く見出された（図5-1）。

S-3型、S型mtDNAは反復配列の種類や構成によっても特徴付けられる（図5-  
1）。S-3mtDNAにおいては、リンケージ群A,Bが100kbp直列反復配列に含まれて  
いるので、重複して存在することになる。S-3mtDNAのリンケージ群Jに含まれる  
領域Eも重複し、repeat2を構成している。他方、S型mtDNAではリンケージ群Aに  
含まれる2.2kbp領域に重複が見出される。また、repeat1はS-3型、S型両mtDNA  
に共通して存在するが、そのサイズやコピー数（S-3型においては4コピー、S型で  
は3コピー）が相違している。

## (2)S-3型ゲノム固有配列

RFLP分析を通じて、S-3型、S-2型両mtDNAは、ゲノムの大部分に亘って互い  
に構造が保存されていることが判った（図5-2）。103kbp直列反復配列および  
repeat 1、repeat 2は両ゲノムに共有されている。図5-2に示すように、構造差が  
見出されたのは、S-3型mtDNAにおけるrepeat1copyBの近接域のみであった。次  
に、この領域に関して、*EcoRI*,*BamHI*,*HindIII*の切断点をマッピングし構造比較を  
行った（図5-2）。その結果、S-3型mtDNAのorf170座およびorf145座を含む  
13kbpの塩基配列(S-3 extra sequence: S-3ES)が、S-2型mtDNAには見当たら  
ないことが判明した。

つぎにS-3ESを細分し、プラスミドにつないだサブクローン361(3)Xb4.2、361  
(3)Xb0.8、orf145CDSおよびR1dsを作製した（図5-2）。サブクローン361(3)  
Xb0.8およびorf145CDSは、それぞれorf170およびorf145のコード配列を含む。  
これらのサブクローンをプローブに用いてN型、S型、S-2型およびS-3型 mtDNA  
に対するサザンブロット分析を行った。図5-3に示すようにサブクローン361(3)  
Xb4.2、361(3)Xb0.8およびorf145CDSはS-3型 mtDNAと分子雑種を形成し、シ  
グナルのサイズも、期待通り8.3kbp（*XhoI*分解物）、0.8kbp（*XbaI*分解物）およ

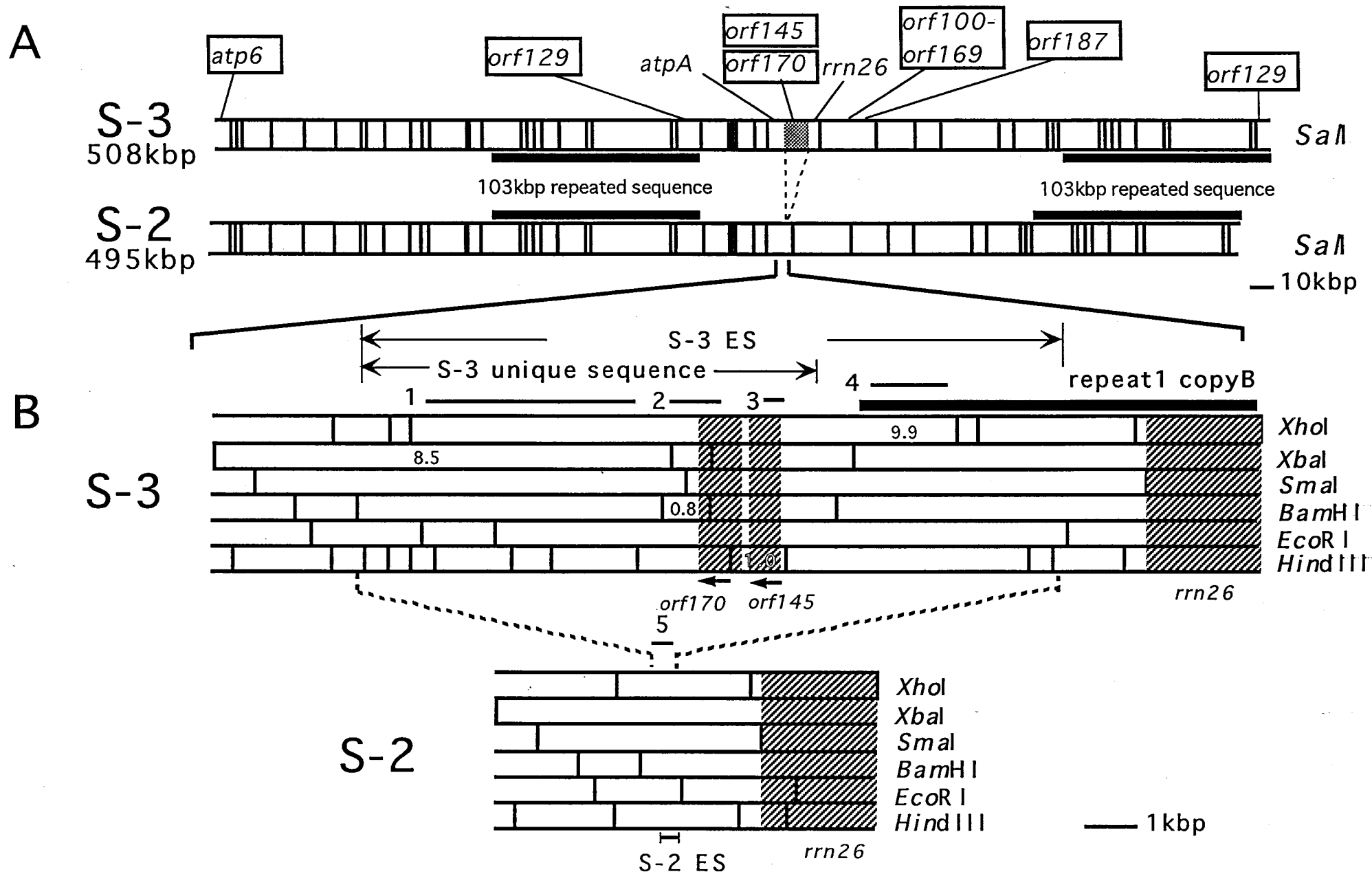


図5-2 A. S-2型<sup>24)</sup>およびS-3型 mtDNAの物理地図：S-2型およびS-3型 mtDNAの構造比較を行った結果、両 mtDNAはほぼ全域に亘って構造が互いに保存されており、変異は *atpA*と*rrn26* 遺伝子に挟まれた領域に限定されていた。*atpA*、*rrn26*遺伝子ならびに8種のORFの位置を示す。 B. S-2型およびS-3型 mtDNAの構造変異域の詳細な物理地図：両mtDNA間の変異域を比較すると、S-3型 mtDNAにおけるrepeat1 copyBの一部およびorf145およびorf170を含む13kbの領域(S-3ES)がS-2型mtDNAの対応域には含まれていないことが判った。物理地図上にはサザンプロット分析にプローブとして用いたDNA断片も図示した。1：361(3)Xb4.2、2：361(3)Xb0.8、3：orf145CDS、4：R1ds、5：pS-2ES

び1.0kbp (*Hind*III分解物)であった。また、これらのクローンはN型やS-2型 mtDNAに対してはハイブリダイズせず、プローブに用いた配列がS-3型ゲノムに固有であることが明らかとなった。S型mtDNAと361(3)Xb0.8およびorf145CDSはハイブリダイズしなかったのに対して、361(3)Xb4.2はS型 mtDNAとの間で分子雑種を形成した(図5-3)。ただ、S型ミトコンドリアゲノムにおけるサブクローン 361(3)Xb4.2との相同域は未同定である。

サブクローンR1dsをプローブに用いてS-3型mtDNAの*Xho*I分解産物とハイブリダイゼーションを行ったところ、図5-2の物理地図から予想される9.9kbp断片に加え、3.6kbp断片にもシグナルが現われた(図5-3)。すなわち、サブクローンR1dsはrepeat1 copyBの隣接域に相当することから、repeat1 copyAおよびC隣接域に当たる3.6kbp *Xho*I断片がシグナルとして検出されたと考えられる(図3-5参照)。S型およびS-2型 mtDNAからも3.6kbp断片が検出されたので、両ゲノムにも repeat1 copyAおよびC隣接配列が含まれているとみなしてよい。一方、N型ミトコンドリアゲノムにはこの配列は含まれていないようである。以上の結果から、S-3ESのうち図5-2に示す9kbpの領域はN型やS-2型ミトコンドリアゲノムには含まれない特異的な配列であり、かつorf145およびorf170はS-3型ゲノムに固有のORFであることが判明した。

S-2型、S-3型両ミトコンドリアゲノムの分化機構を明らかにすることを目的として、両ゲノム間の構造変異域について塩基配列レベルでの構造比較を試みた。S-3型ミトコンドリアゲノムの構造変異域を含むmtDNAクローン412(3)B5.7、361(3)B0.9、361(3)B2.3、361(3)H5.0および361(3)XhE1.6(図5-4)とS-2型ミトコンドリアゲノムの変異サイトに相当するmtDNAクローン(271(2)EB0.8 図5-4)の塩基配列を比較した(図5-5)。その結果、両ゲノム間の塩基配列の相同性が失われる境界(divergence point)が見出された(図5-5)。S-2、S-3両ゲノム上ではこのdivergence pointによって、互いに相同性のない13093bpのS-3 ES配列および561bpの配列(S-2 ES配列と呼ぶ)が挟まれている(図5-5)。なお、こ

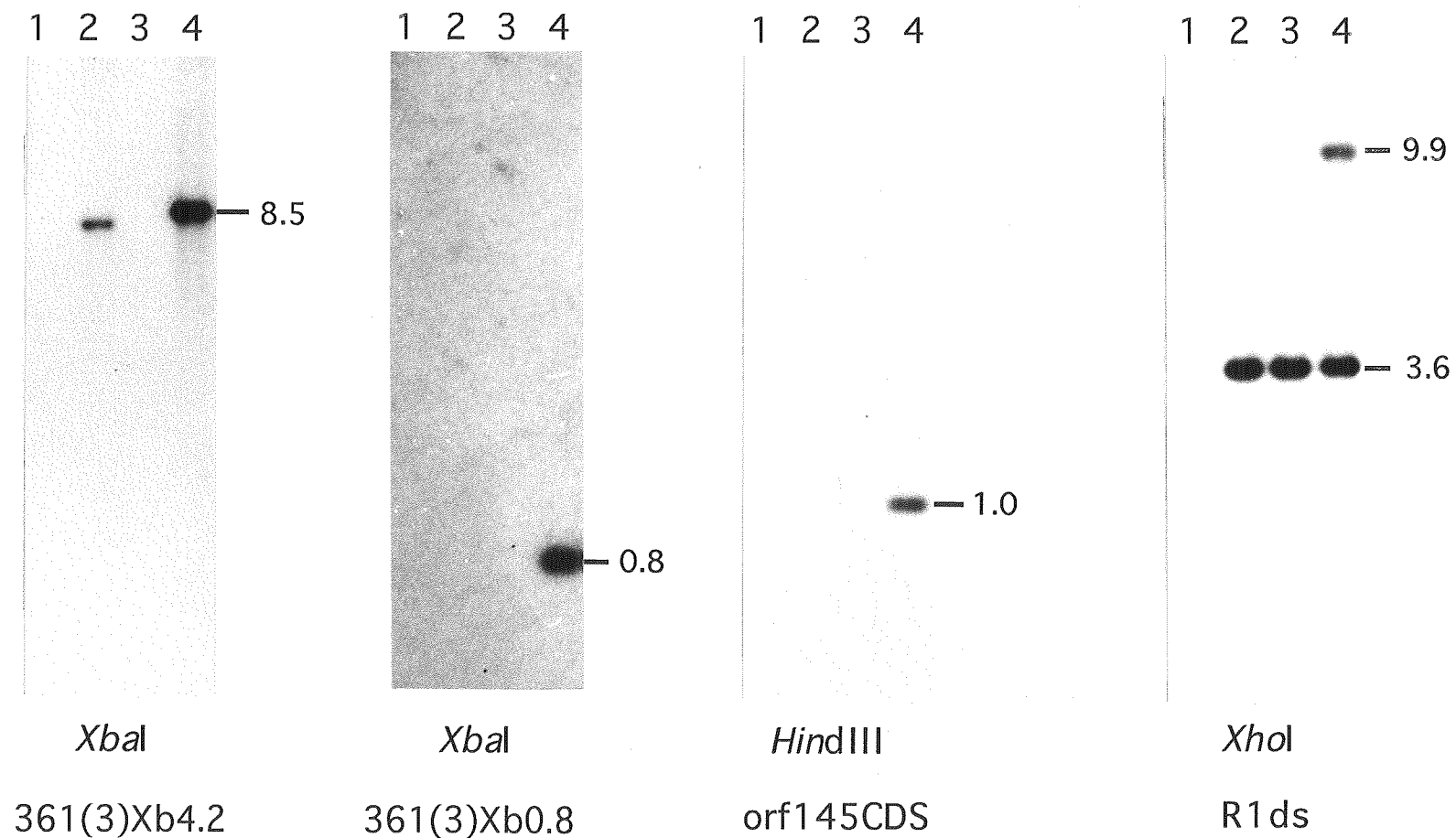


図5-3 S-3ESに関するサザンブロット分析

図5-2に示したクローン361(3)Xb4.2、361(3)Xb0.8、orf145CDSおよびR1dsをプローブに用いてサザンハイブリダイゼーション実験を行った。mtDNAを調製した遺伝子型は次の通りである

1: TK81-O 2: TK81-MS 3: I-12CMS(2) 4: I-12CMS(3)

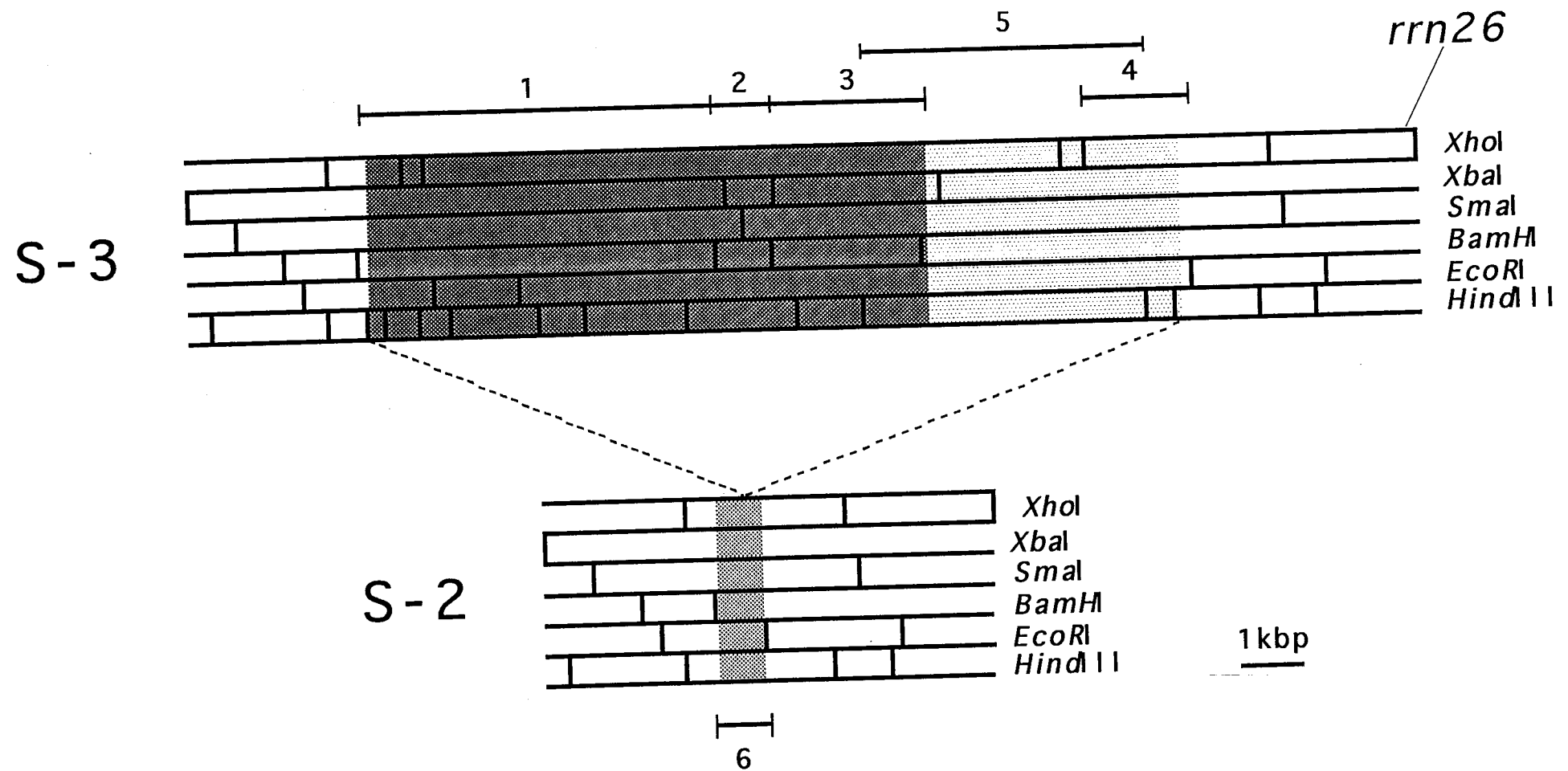


図5-4 S-2型、S-3型ミトコンドリアゲノム構造変異域の物理地図

図中の網がけした領域に関して1～6で示した断片をサブクローン化し、それぞれ1 : 412(3)B5.7、2 : 361(3)B0.9、3 : 361(3)B2.3、4 : 361(3)XhE1.6、5 : 361(3)H5.0、6 : 271(2)EB0.8と名付けた。1～6に示したサブクローンの塩基配列を決定した。

S-3 GGATCCCACCAAGGAAGACTTGAAAGCCTTCTTCCCGAAACACCGATACGTTGCATGCTT 60  
 \*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*  
 S-2 GGATCCCACCAAAGAAGACTTGAAAGCCTTCTTCCCGAAACACCAATACGTTGCATGCTG 60  
 P11→ ↑

S-3 TGTATTTGTAATAGTACGAACTAACTATATAAGCTTATGCTCTGGGCTCTGAGAACAGTC 120  
 S-2 CTGCCACTTCTTCAGACCAGCCTTCCTTCCATCCTTACTCTTTTTCTTATTTATAAACCT 120

S-3 ACGCCTCCTCTCTTCTTAGCCCTTTTGGGACATGAATAGCTCTTTAATCCCTGCATAAAT 180  
 S-2 TCCCTTGCTTCCTTTCGCACCTCGTCATAGCCCTGAAAAGCTCACTCGGAGTTCTAGTTA 180

S-3 GAAATATCCAGTTGAATAATAAATGTAGCTAATCCTCTTCTTTGTTTTTGATTGTACGAA 240  
 S-2 GAGAATGGGATATGATTCACTACTTGCTACTGCTCCATGGGAGTCCTTCCTCGGGAGAT 240

S-3 AGCTTCTTCAAGCTGTAGGTTTATGGAAGTGAAGTGAAGTTCTTTAAACCG 300  
 S-2 CGAAGAAGGTATACTATTAGACAAGGATCATTCTGAAATTCACAAATAAATGAATGGGA 300

S-3 GCTAGCTCGTTAAGGAAGTAGGTAGGAAGAGAAGAAAGGTAAGAAGTATTAGTAAAGGGT 360  
 S-2 ACTTTGAAGCAAGTTGATCCTAGAAGACTAACCTCGTAGCTCACTTAGATCAATCAGTTC 360

S-3 CGTTAGACTCAAGCCGATAC 380.....12681 TTATTAAGCTAACCTATCG 12700  
 S-2 AAGCATTACAAACCCACCTTCCTTCTGTGTTCAAGGACGGAGACTCTTCTCAAATAAG 420

S-3 CATACTTCCTTGCTTGGTTGTCGTTTAATCAGAAGCATCGAATGAAAGGTTCTTTCCAAG 12765  
 S-2 AGGGGACTGCTTCATTGCTATTCTCATTATGTTGATGATCTGCTAATTGCCGGAACAA 480

S-3 ACCATCTGCTATTGAATCAGCTAAAATAGAGATCTATCAGCTGCTCTTCTGAATAAGCT 12825  
 S-2 CCAGCAAGAGATTGAGAACCTGAAAACCTCTTGTCAAAAACAGGAAGATGAAGGATT 540

S-3 AATAAGGTAGGTGATAGGCAAAGTCTTTCGCACCCTTGACTAATAATAAGAAGCTTTGTT 12885  
 S-2 AGGTAAACTGAGGTTTGGGTTAGAAGTTGATCACTCTGAATCTGGGATTTTATATCTCA 600

S-3 CTCTCTTTTCCTTGATGTCATGAGTTTGGTTGAAGAAACCTTGGATTGATCAGAACTGA 12945  
 \*\*\* \* \*\*\*\*\*  
 S-2 GAAGAAGCTAGATGTGATTGATGAGTTTGGTTGAAGAAACCTTGGATTGATCAGAACTGA 660  
 ↑

S-3 TGCAAAGGAGAGTCTCTGTAAGAAGGACCAAAGCGCACAAGCAAGACTGAAATAACCTAC13005  
 \*\*\*\*\*  
 S-2 TGCAAAGGAGAGTCTCTGTAAGAAGGACCAAAGCGCACAAGCAAGACTGAAATAACCTAC 720

S-3 TTCTTCTTGCCAGTCATAACAACCAGAACGGGTTAGCCTTCGTTTGCGGCAGGCAAAGTG 13065  
 \*\*\*\*\*  
 S-2 TTCTTCTTGCCAGTCATAACAACCAGAACGGGTTAGCCTTCGTTTGCGGCAGGCAAAGTG 780

S-3 CAAAGTCAAAAGTCATAATGGTGAATTC 13093  
 \*\*\*\*\*  
 S-2 CAAAGTCAAAAGTCATAATGGTGAATTC 808  
 ←P12

図5-5 S-3型およびS-2型ミトコンドリアゲノムにおける構造変異域の塩基配列

S-3型ゲノムの構造変異サイト(S-3)およびS-2型ゲノムの変異域(S-2)の塩基配列を比較した。その結果、両ゲノムの↑で示した2箇所にdivergence pointが見出された。divergence pointはそれぞれATGCTT(/G)TG配列(下線)およびATGAGTTTG配列(下線)と隣接している。S-3型およびS-2型ゲノムのdivergence pointの間には、それぞれ、互いに相同性のない13093bpのS-3ES配列と561bpのS-2ES配列が含まれている。S-2ES配列中の144bp(BpPMYIII; 網掛け)と、ペチュニア(*Petunia hybrida*)ミトコンドリアゲノムのpPMYIII配列の一部との間に高い相同性が見出された。S-2ES配列を増幅するPCR実験に用いたプライマーは四角で囲った配列を基に設計した。

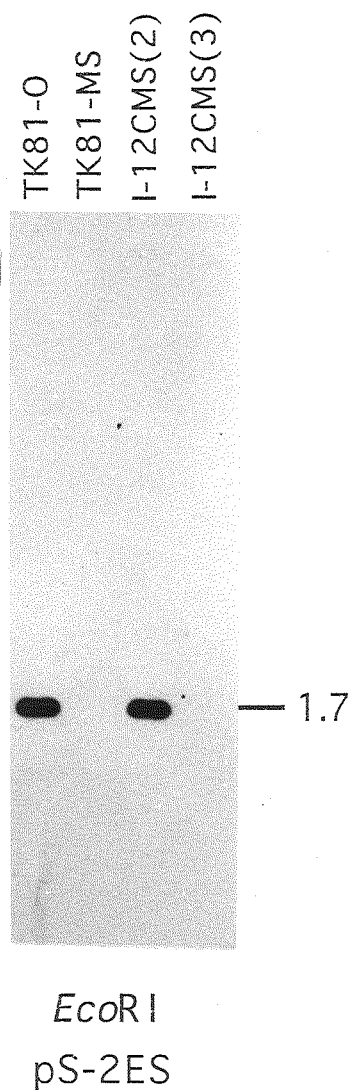
のdivergence pointは相同なATGCTTTG配列およびATGAGTTTG配列に隣接している(図5-5)。

*orf145*と*orf170*のコード域を除くS-3ESについてEMBLおよびGenBankに登録されているDNA配列との相同性を検索したところ、*atp9*遺伝子コード域と相同性(94.4%)を示す52bpの配列が見出された。次にS-2ESに関しても同様の相同性検索を試みた結果、ペチュニア(*Petunia hybrida*)のミトコンドリアゲノムのpPMYIII配列<sup>102)</sup>の一部と相同な144bp(BpPMYIIIと呼ぶ)が見付かった(図5-5)。pPMYIII配列は、ペチュニアのミトコンドリア染色体の複製開始点を同定する研究の過程で見出された配列であるが、テンサイの144bpのBpPMYIII配列と複製開始との関連性は不明である。サザンブロット分析および物理地図の比較から、S-2ESおよびBpPMYIIIはS-2型およびN型ミトコンドリアマスター染色体上で単一コピー配列として存在し、いずれも*atpA*と*rrn26*遺伝子に挟まれていることがわかった(図5-6A)。BpPMYIII配列が、高等植物種に広く分布しているのか否かを調べるため、BpPMYIII配列をプローブに用いて、イネ(品種 キタアケ)、ペチュニア、ホウレンソウ(品種 トウショウ)、より調製した全DNAに対するサザンブロット分析を行ったが、いずれの植物種においてもシグナルは検出されなかった(図5-6B)。

### (3) サプリモン

S-2型およびS-3型両ミトコンドリアゲノムの分化を考察する上で、S-2型やS-3型ゲノムにはそれぞれS-3ESとS-2ESを含む分子種が低化学量比で存在し(サプリモン)、これら分子の化学量比の変動が進化の過程で起こることにより、S-3型およびS-2型ゲノムが分化したというモデルが考えられよう。このモデルの妥当性を検証するために以下の実験を試みた。N型、S型、S-2型およびS-3型 mtDNA(各1.5  $\mu$ g)のEcoRI分解物をフィルターへトランスファーした。このサザンブロットに対して<sup>32</sup>Pで標識したS-2ESを含む断片をハイブリダイズさせた後、3日間X線フィルムに感光させた。その結果、N型およびS-2型mtDNAのレーンでは1.7kb-EcoRI断

A



B

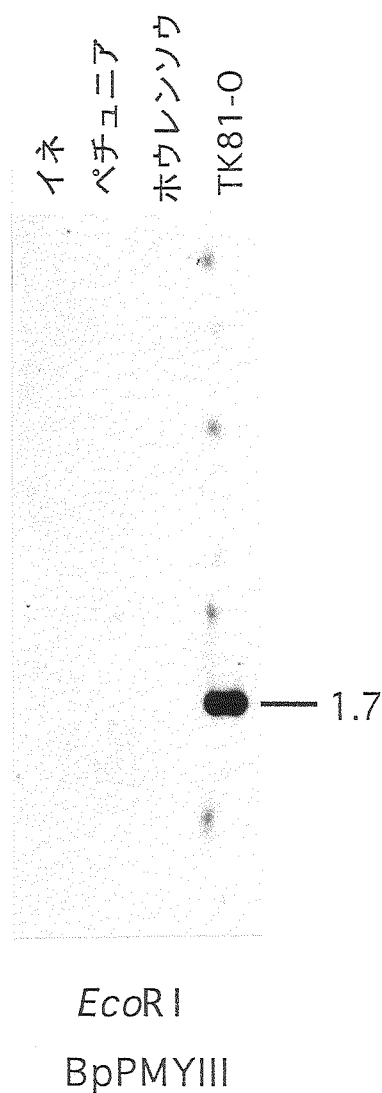
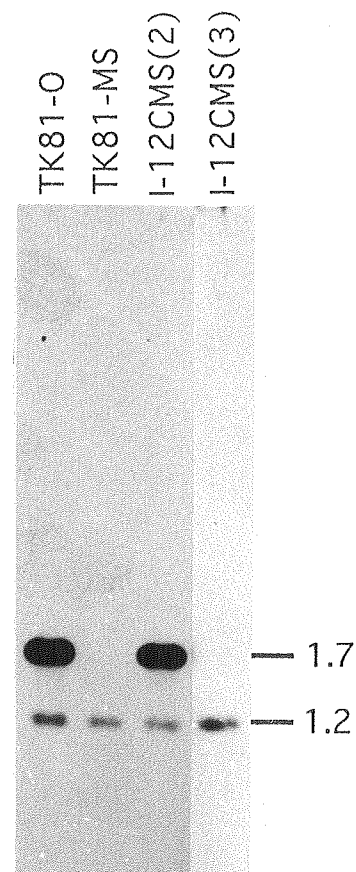


図5-6 S-2ES配列に関するサザンブロット分析

A TK81-O、TK81-MS、I-12CMS(2)およびI-12CMS(3)より抽出したmtDNAの*EcoRI*分解物をフィルターにトランスファーした。このサザンブロットに対して、 $^{32}\text{P}$ で標識したS-2ESを配列を含む断片（図5-2、図5-5参照）をハイブリダイズさせた。

B イネ、ペチュニア、ホウレンソウおよびテンサイ（TK81-O）より抽出した全DNAの*EcoRI*分解物に対して、 $^{32}\text{P}$ で標識したBpPMYIII配列を含む断片（図5-5参照）をハイブリダイズさせた。

A



B

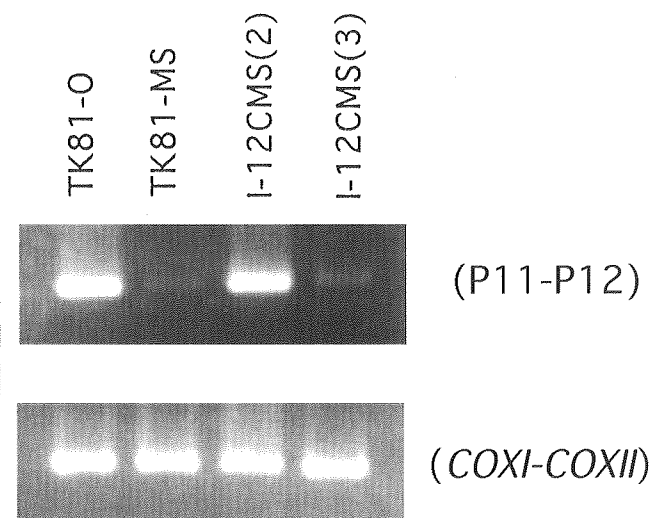


図5-7 S-2ES配列を含むサブリモン分子種の検出

A TK81-O、TK81-MS、I-12CMS(2)およびI-12CMS(3)より抽出した mtDNAの *EcoRI*分解物をフィルターにトランスファーした。このサザンブロットに対して、 $^{32}\text{P}$ で標識したS-2ES配列を含む断片（図5-2、図5-5参照）をハイブリダイズさせ、X線フィルムに3日間感光させた。その結果、1.7kbpの強いシグナルのバンドに加えて、1.2kbpのシグナルの弱いバンドが全レーンにおいて検出された。

B S-2型マスター分子上のS-2ES配列を挟むように設計された1組のプライマーP10(5'-GAAGCTTGCCTTCT-3')とP11(5'-TATGACTTTTGACTTTG-3')を用いて、N型、S型、S-2型およびS-3型 mtDNAを鋳型とするPCR実験を行ったところ、S-2ESを含む 1.2kbpのDNA断片が全ての mtDNAから増幅された。対照区としてテンサイミトコンドリアゲノムの*coxI-coxII*スペーサー領域の増幅実験を行った。

片が強いシグナルのバンドとして検出された(図5-7A)。ミトコンドリア染色体の物理地図に基づけば1.7kb-*EcoRI*断片はN型およびS-2型マスター染色体に座乗するS-2ESとその隣接域(S-2EScopy1)に相当することが判る。さらに、供試した4遺伝子型のmtDNAにおいては、共通して1.2kb-*EcoRI*断片が弱いシグナルのバンドとして検出された(図5-7A)。この1.2kb-*HindIII*断片にも恐らくS-2ESが含まれており、S-2EScopy1とはarrangementの異なる、S-2ESを含む分子(S-2EScopy2)がN型、S型、S-2型およびS-3型ゲノムに低化学量比で存在している可能性が示唆された。

前述のサブリモンモデルをさらに確かめるために、S-2型マスター染色体上のS-2ES配列(図5-5)を挟むように設計された1組のプライマーP10(5'-GAAGCTTGCCTTCT-3')とP11(5'-TATGACTTTTGACTTTG-3')を用いて、N型、S型、S-2型およびS-3型 mtDNAを鋳型とするPCR実験を行ったところ、遺伝子型を問わず、784bpのDNA断片が増幅された。増幅産物の一部について塩基配列を決めた結果、これらの産物はS-2ESを含むことが確かめられた。更に、増幅産物の量はN型、S型、S-2型およびS-3型ゲノムに実際に含まれるS-2ES配列の化学量比をほぼ忠実に反映しているようである(図5-7B)。

#### (4) 異型雄性不稔細胞質を特徴づける固有ミトコンドリア遺伝子

S-2型とS-3型ミトコンドリアゲノムの構造比較から、S-2型ゲノムにも *orf145* および *orf170* をのぞく5種のS-3型固有ORF(*orf129*、*orf169/orf100*、*orf46/orf187*)ならびに変異型 *atp6* 遺伝子が保存されている可能性が示唆された。一方、Senda et al.<sup>21) 70)</sup>、千田<sup>77)</sup>およびKubo et al.<sup>66)</sup>、長野<sup>103)</sup>により、テンサイS型ゲノムには4種の変異型ミトコンドリア遺伝子;*ScoxI*、*ScoxII*、*Satp6*および*SatpA*ならびに固有ORF*orf324*がコードされていることが報告された。S-3型ゲノムとS型ゲノム間では、これらの変異型遺伝子や固有ORFは共有されていないが、共通して*atp6*遺伝子座の変異が認められる。また、*orf46/orf187* (S-3型ゲノ

ム) と *orf324* (S型ゲノム) はともに *rps13* 遺伝子のすぐ上流に位置している。

本実験では、まず翻訳産物の確認された *orf129* の構造と発現に関して、S-2型およびS-3型ゲノム間で比較解析を試みた。次いで、*orf46/orf187* (S-3型ゲノム) と *orf324* (S型ゲノム) 間の構造比較ならびに、N型、S型、S-2型およびS-3型ゲノム由来の *atp6* 遺伝子座の構造解析を行った。

#### i) *orf129*

S-2型ゲノム由来の *orf129* 座乗領域について塩基配列を決め (図5-8)、S-3型ゲノムの *orf129* 座 (S-3 *orf129*) と比較した。期待どおり、S-2型ゲノムからも *orf129* に相当する ORF (S-2 *orf129*) が見出され、コード域と3'隣接域の配列はS-3 *orf129* の配列と区別できなかった。一方、上流域には変異が認められた。すなわち、S-3 *orf129* の開始コドンより490bp上流に位置するグアニン残基がS-2 *orf129* ではチミン残基に置き換わっている (図5-8)。

S-2型CMS株、S-3型CMS株、S-2型半不稔b型株 (S.S.b) ならびにS-3型稔性回復株 (N) の花蕾より抽出したmtRNAをフィルターヘトランスファーし、*orf129* コード域をプローブに用いたノーザンブロット分析を行った。供試した全ての個体において共通して1.2kb、1.0kbの *orf129* 転写産物が検出された。対照実験として、同一のフィルターに対して *atp9* コード配列をリハイブリダイゼーションした。次いで、*atp9* のシグナル強度を基準にして、*orf129* のシグナル強度を比較したところ、S-2型細胞質系統における *orf129* の転写産物の蓄積量が明らかにS-3型細胞質系統よりも多いことが判明した (図5-9A)。なお、*Rf* の遺伝子型を異にするS-2型CMS株とS-2型半不稔b型株の間、ならびにS-3型CMS株とS-3型稔性回復株 (N) の間では転写パターンや転写産物の蓄積量に顕著な差は見出されなかった (図5-9A)。

S-2 *orf129* についてプライマー伸長分析を試みた結果、S-3 *orf129* と同様に転写産物5'末端が開始コドンより484bp上流の位置にマッピングされた (図5-8)。前述の両 *orf129* 上流域から見出された変異サイトは、mRNA5'端の6bp上流に存在

1&2 GGATCCCGCAAACGGAGACATGAACCAAGCAGGAAGAGGAATTGGAGCAGCTCTTTGCCT 60  
1&2 TATGTTATGATCTCATAACACCGAAAGATTAGACCCTTTTTTTTCTTTCTTTCAGGATG 120  
1&2 AAAACACAGGGCAGGAGGGTATAGAAAGTCCTCTATATGCCGTCCATAGTCCATCGACGC 180  
1&2 CTCGTAGTACCACTTACAGTACTCGCAGAGTGATTGAGTCCAAGATTTTAACTCAATCTT 240  
1&2 CTCAACGAGGAAAGAAGCATCGTCGTCGAGCTGGCGAGAGAAATCCTCTATAAGTCTCTC 300  
1&2 TACGTAACCCCAATCGGGCTTACAGCTCTCAACTAACATCATACCAATCTTATAACAGCT 360  
1&2 TACCAGAAAACCTCTGGAAAACCTAACCAGACTGAGAAAGGCATAGGACGGATACCACC 420  
1&2 TGGAGAGAGGGCGACAAGAATGTGCCGAAACCCGTGACGATTGTAATTTGGGTAAATGTT 480  
1&2 ACAAGGCTTACAGGAAGACCTCCTAACCCCTCTTAATCTCAGAGAAGTCTGAATGTTATT 540  
1&2 ACACCCTATTTGCTTTGCTTCATCACCGGCATTTTAAAGCCACAGCGAACCAAGCTGACC 600  
1 TACCTCTATCACTAAACTCTACCCTGGGCTCTTTTACCTCTAAAAAGATATTTTCGTAAGA 660  
\*\*\*\*\*  
2 TACCTCTATCACTAAACTCTACCCTGGGCTCTTTTACCTCTAAAAAGAGATTTTCGTAAGA 660  
↑  
1&2 AAAGAAAGTGCTTTTCTAGGGTAGATGAAAGGAATGCGGAAAGGCTATCCGAGTTCAC 720  
1&2 AGGCGTAGTTGCGTGTACTTTCATTTCATTGAAATTGAGTTCGTTACCGCACCGTGGGTAG 780  
1&2 AAGATCCTTCTCTTCTCTGTGAAGATAGGCTGTGCTTTCATGTCAAGTGCGAAATTGG 840  
1&2 ATCGAAAAATTGCGTATGATATGAAAGTTTATGGTCTATCTAAGACTCTCTTTGATATC 900  
1&2 AATCACTAAACTAAAGAAAGTAAATTTGAAAAATCATAAGATAAGAGAAGAAAGAAGAG 960  
1&2 TATCTTTCGTTGTAGCCATAGAAGACTCGACCCAAGCAATTCTTATGCCCAAACTCCCA 1020  
1&2 TGTTTTCCGGATCATTGGTTAAGAACCAACCGGCAATTTATGTCTTCCTGAATTGGGAGA 1080  
1&2 GCAAGAATCAGTCTTCTTTCATTTCTCGAGAGAGCAGAGCAGTCAAAGAATGAACCAAAT 1140  
orf129→ M  
1&2 GAATCCTTATATTCTGCAGTTTTTGGCCGACATGGCCACAGCAATTTTAACGATTGCAGG 1200  
N P Y I L Q F L A D M A T A I L T I A G  
1&2 AGTTGCATATCTACCACTTATTGTGTTAATTGTATTTAGGGCCGGCGGCCTTCGAGGGTT 1260  
V A Y L P L I V L I V F R A G G L R G L  
1&2 AAATGAAGAGAATGCAAGCGAAAGACTCTTAGACCTTTGTTGTGATACGCTGAAGGAACA 1320  
N E E N A S E R L L D L C C D T L K E Q  
1&2 GATCAAAAACAAAATTGAAGAGTTACTCCAGGTTTATTATAATAATTCTGTACCTTTGCC 1380  
I K N K I E E L L Q V Y Y N N S V P L P  
1&2 GTCTGGTCGGAGGATTCAAGACGCAGCAGCCTTCCTCCATCAGGATTCAGAATCCTTGA 1440  
S G R R I Q D A A A F L H Q D S E S L E

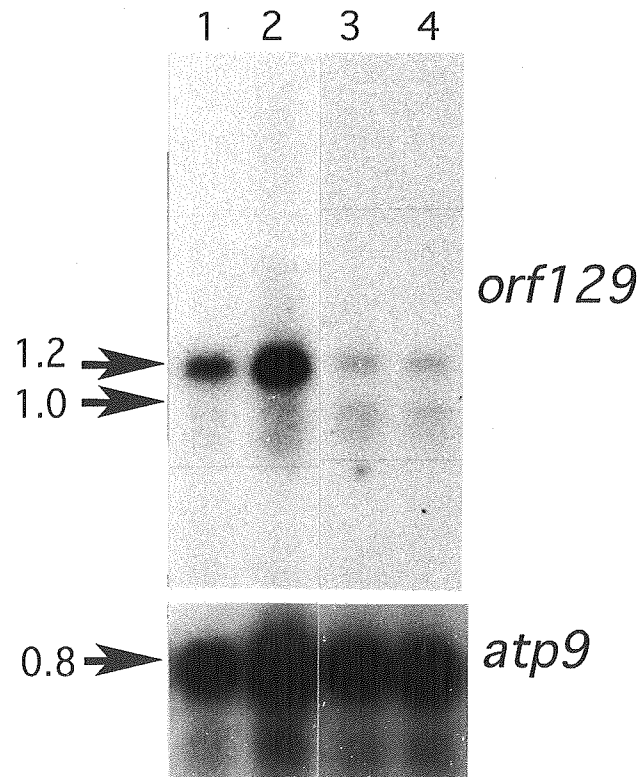
図5-8 S-2型ゲノム(1)およびS-3型ゲノム上(2)のorf129の塩基配列

orf129がコードするアミノ酸を塩基配列の下に示す。プライマー伸長分析に用いたアンチセンスプライマーは点線で示す配列をもとに設計した。矢印はorf129の転写物の5'末端の位置を示す。

1&2 ACAACTGCTAATGATTTTGAAAAATATGACCGAATTGGGCGTTCAAAGTCAAGAATTTT 1500  
 Q L L M I L K N M T E L G V Q S Q E F L  
 1&2 ACAAGTTTTACTCTATCTCTCACAGTGAAGATAGATGGAGTCTTTGCACTACAATGGATT 1560  
 Q V L L Y L S Q  
 1&2 TGGCGGGAGTACTTCTTTATTATAAGCGAGGACCGCCTTTTATGTTACTCGTCGTTTGGC 1620  
 1&2 TTGAATCTCGTTCCTTAGGAGGCTCGCAAGTTTTTAAGAAGTTACATTGGAAAAAAGGCT 1680  
 1&2 CCTCCCCGAACATGCCTTCGGTGAAGGTGGGGGTCGTCAATAAGAACGAGGCCCGCTCTT 1740  
 1&2 TGGGCGGGGAAAGGGAAGTGGGTCCCTTTCGCTTTATTTTCAAGTTTAGGTCGATCAGAAGG 1800  
 1&2 CGCTGGAAGTGTGTTGCACAGTTGATAATCGGATATAAGCGGATAGCTAATCCCTCTT 1860  
 1&2 TCAACGAGAGTTGCGGACCTCTCTTACTTACTCTTAGTGCTGTGCGAGCCTCGGTTTCA 1920  
 1&2 TTTCTTCTTCTAAGGCAGCTAGCTAGGCCTCTTGAGAGCTCAGGATTGGACGGAACCCTT 1980  
 1&2 ACGGTTGGACTATCGAACAGCTGTTGGTGGGGAATAATCTCCTTTCCTTGATTGCTGCG 2040  
 1&2 GGCCTTCATTGCCGAAACTGGACTGGCTAGGATCACTAGAGGGGACAGACTACCAGGACT 2100  
 1&2 AGTCCGCTTCCCAATAGGAAGAGCAAACAGCAACTATTAGTTCAGCTTTCGGGGCTCTCA 2160  
 1&2 TAACAGCCCTGGTTTGAGCATCTCCCTAGCCTACCTACTTTCAGAAGGTCAAGTCTAATA 2220  
 1&2 GAGTAGAGGCAATCCACTCGAG 2242

图5-8

A



B

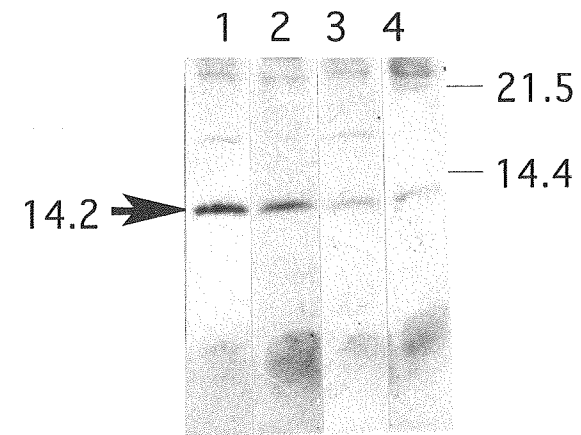


図5-9 *ORF129*の発現解析

#### A *orf129*に関するノーザンブロット分析

*orf129*コード配列をプローブに用いてノーザンハイブリダイゼーション実験を行った。対照として、同一のフィルターに対して、 $^{32}$ Pで標識した*atp9*コード配列をリハイブリダイズさせた。

- 1: I-12CMS(2) (完全不稔型) (花蕾)
- 2: I-12CMS(2)xT2n-16-58-51-OのF<sub>1</sub> (半不稔b型) (花蕾)
- 3: I-12CMS(3) (完全不稔型) (花蕾)
- 4: I-12CMS(3)xT2n-16-58-51-OのF<sub>1</sub> (稔性回復型) (花蕾)

#### B *ORF129*タンパク質に関するウェスタンブロット分析

抗*ORF129*抗体を用いて、下記に示す系統の花蕾より調製したミトコンドリア画分に対してウェスタンブロット分析を行った。

- 1: I-12CMS(2) (完全不稔型) (花蕾)
- 2: I-12CMS(2)xT2n-16-58-51-OのF<sub>1</sub> (半不稔b型) (花蕾)
- 3: I-12CMS(3) (完全不稔型) (花蕾)
- 4: I-12CMS(3)xT2n-16-58-51-OのF<sub>1</sub> (稔性回復型) (花蕾)

する。

S-2型CMS株、S-3型CMS株、S-2型半不稔b型株(S.S.b)ならびにS-3型稔性回復株(N)の花蕾より抽出したミトコンドリアタンパク質画分に対して、抗ORF129抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った。図5-9Bに示すように、供試した全ての個体において共通して14.2kDaのタンパク質が検出された。しかも興味深いことに転写産物と同様、S-2型細胞質系統におけるORF129の蓄積量がS-3型細胞質系統よりも多いことが判明した。なお、S-2型CMS株とS-2型半不稔b型株の間、およびS-3型CMS株とS-3型稔性回復株(N)の間ではORF129の蓄積量に顕著な差は見出されなかった(図5-9B)。

#### ii) *orf46/orf187*および*orf324*

Kubo et al<sup>66)</sup>によればN型ゲノムとS型ゲノム間では、*rps13*遺伝子の開始コドンから数えて54bpより上流の領域は互いに相同性が見出されず、S型ゲノムの*rps13*遺伝子上流域には*orf324*が含まれている。さらに、*orf324*とN型ゲノムの*orfB*は5'コード域ならびに5'上流域の構造が互いに一致する(図5-10)。

今回、S型ゲノムとS-3型ゲノムにおける*rps13*遺伝子上流配列を比較した結果、相同配列の末端は*orf324*座の上流(開始コドンより数えて5bp)に位置することが判明した。この相同領域は塩基置換および挿入/欠失変異が散在しているため、前章で詳述したようにS-3型ミトコンドリアゲノムでは*orf46*と*orf187*の2箇のORFが同定された。

#### iii) *atp6*

S-2型ゲノムの*atp6*遺伝子の塩基配列を決定した結果、641コドンをコードするORFが見出され、S-2*atp6*と名付けた(図5-11)。Natp6、Satp6(久保ら、未発表データ)、S-2*atp6*およびS-3*atp6*遺伝子間で塩基配列の比較を行った。その結果、4種の*atp6*遺伝子間では著しく相同性の高いコア領域(252コドン)が見付か

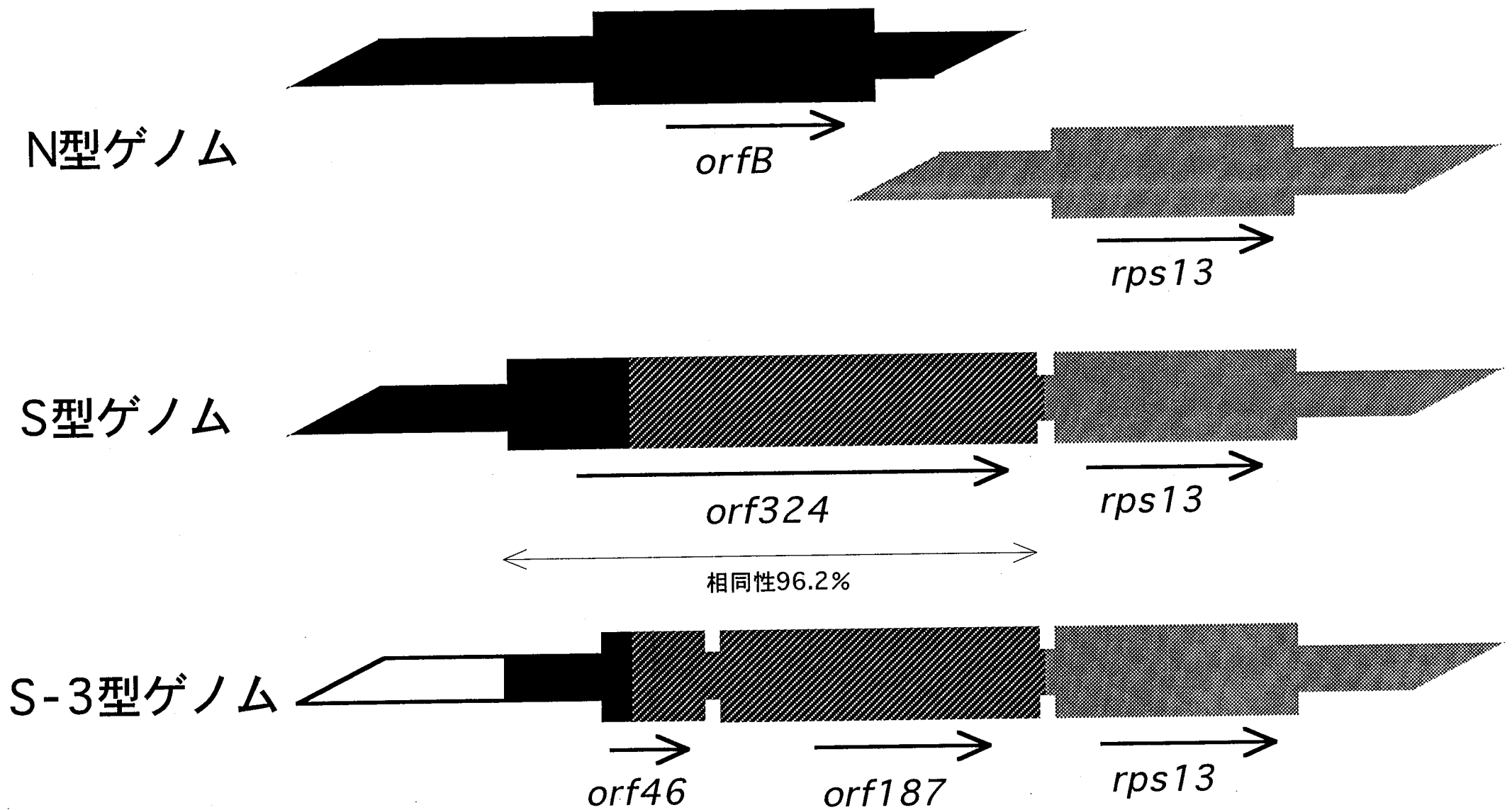


図5-10 N型<sup>22) 23)</sup>、S型<sup>23)</sup>およびS-3型ミトコンドリアゲノムの*rps13*遺伝子上流域の構成  
相同域を同じ模様で示す。

AAGCTTGTTTCAACTTTCTATAAATTGCTGCTTTTGCTTCTAGCTAGTTTCAGTGGATAAG 60  
ATGGCTGCGCTCCAGCTCACTCCTGACTCTTAAAAAGGGAGGATTACGGGTTTCAATAG 120  
ATAATATCGTAAGTAAGAAAGAACGTTTTCTACTAATTACTTTTCATAGAGAGAGACCCTCC 180  
CCACCCCAAGTATAATGTCCTCTCGAAAATCGGATACCTTTTCGTTTTTCATTTCTCCCAT 240  
TCTTTCTTGGTTGGATCAACCCAACCGGTGATTTCCGACAAGTCTTTCTTCATTTTTGAG 300  
CGGACAGCAGAAAGAAAAAAGAAAAAATTTGATGATGACTCATTGGAAGAAGGAGATAAC 360  
M M T H W K K E I T

TGCTTTGGCACAACAGATAATTACTAATGTCCCTCGACCTACACGGCGAGTCTTATTCGG 420  
A L A Q Q I I T N V P R P T R R V L F G

ACTCGGCGTGCTGTTTCGCCCTCTTTTGGGTCGGGAGACGCGGGCTGTTGTTGTTTGAAC 480  
L G V L F A L F W V G R R G L L L F E T

GAAAATTATTCTACAAGCCCTCTTTGGAATAGGAACAGCGGCTTCTATTTTGTITTTTGTG 540  
K I I L Q A L F G I G T A A S I L F F C

TTATTTCCGCACCCGAGAGCACTTTCTCTATACATTTCTACTAACGATTTATTTGGCTTT 600  
Y F R T R E H F L Y T F L L T I Y L A L

ATTCTTCCTAAAGAGGGCTTTCCCTCTTTTGAATTCGCCTTTTGGCTATATTGATCTT 660  
F F L K R A F P L L E F A F L A I L I F

TTCGTTTTGCTTCTTTCCGAAAATGGACGATTACGGCATTGCTAGAGAACTGTTCTTT 720  
S V C F F P K N G R L R H S L E N C S F

TATTTTACTACTCCTTTGGGGGAGTTACCGGCTTTTGGAGACTCCGTGGCACGAATGGCC 780  
I L L L L W G S Y R L L E T P W H E W P

ACTCTATGTTTGTGGTCTCTTAATGTTATTACGCTTCTTCAAGCGCTGGTCCATCGAAA 840  
L Y V C G L L M L F T L L Q A L V H R K

GGACGAAGGGGTGCGCAAGTTTATTCTGCCGGCTACCTTCCTAATTTTAATGAGTGCCCT 900  
D E G V G K F I L P A T F L I L M S A L

CGTGCTCCTTGGGCTTCACTCGGGGGCGATTACATAATCTGCCGAAAAGGCGGCCCTAAC 960  
V L L G L H S G A I H N L P E K A A L T

GGGCGCCGCAGTCTTAATACTCTTTAGCCTAGCGGCCGCCGAGTCCACACGGGAACGGTG 1020  
G A A V L I L F S L A A A E S T R E R W

GCTTGCATATGGGGCGTATCTCATGTGTATCCCGTGTATACTATATCTCCTAGGAGGGGC 1080  
L A Y G A Y L M C I P C I L Y L L G G A

CACGGATTGGCCCTATTCTGTACAACAAATCGGCTTTTTTTTTTATTATCCTCGTCCTAGT 1140  
T D W P L F V Q Q I G F F F I I L V L V

ATTGTTTTTTTGGGTTGTTACTTATGAGGACGTAAAAGAGCAGAAGAATCTGCTCCCGAT 1200  
F V F W V V T Y E D V K E Q K N L L P I

CCTATCTGCGATCTTCTCCGCTTTGGCGTCGGCGAGGTGTGGCCCCGGCGTCTGGGTAAA 1260  
L S A I F S A L A S A R C G P G V W V K

AGAGTGGCTCGCCGCTTTTCTTTCACCATTCGCGCGTATTTGTTATTTGAGAAGGTAGG 1320  
E W L A A F S F T I A A Y L L F E K V G

CTACCGCAAAGATACCCTTCAAGAAACGTCCCGTACTTGGGAAGCTTGGTTTTGCTTTTT 1380  
Y R K D T L Q E T S R T W E A W F C F F

TGCTGTTCTTTCTTTTGGTGTGCACTTAGTTTTTTTTCATGCATCACCCGCCCCAGGGGT 1440  
A V L S F G V A L S F F H A S P A P G V

図5-11 S-2atp6遺伝子の塩基配列

CGGAACTGAAAGTGAAGCTTTTTCACGATGCGATTAATCCAGCAGCGGGACGGATCCCCAG 1500  
 G T E S E A F H D A I N P A A G R I P S  
 CCCGCTAGAGCAATTTTCCATTCTCCATTGATTCTATGAAAATAGGAACTTGTATTT 1560  
 P L E Q F S I L P L I P M K I G N L Y F  
 CTCATTCACAAATCCATCTTTGTTTATGCTGCTAACTCTCAGTTTGGTCCTACTTCTGCT 1620  
 S F T N P S L F M L L T L S L V L L L L  
 TCATTTTGTACTAAAAAGGGAGGAGGAACTCAGTACCAAATGTTTGGCAATCCTTGGT 1680  
 H F V T K K G G G N S V P N V W Q S L V  
 AGAGCTTATTTATGATTTCTGTGCTGAACCTGGTAAACGAACAAATAGGTGGTCTTTCCGG 1740  
 E L I Y D F V L N L V N E Q I G G L S G  
 AAATGTGAAACAAAAGTTTTTCCCTTGCATCTTGGTCACTTTTACTTTTTTGTATTTTCG 1800  
 N V K Q K F F P C I L V T F T F L L F R  
 TAATCTCCAGGGTATGATACCCTATAGCTTTACAGTTACAAGTCATTTTCTCATTACTTT 1860  
 N L Q G M I P Y S F T V T S H F L I T L  
 GGGTCTTTTCATTTTCCATTTTATTGGCATTACTATAGTGGGATTTCAAAGAAATGGGCT 1920  
 G L S F S I F I G I T I V G F Q R N G L  
 TCATTTTTTAAGCTTCTCATTACCTGCAGGAGTCCCGCTGCCGTTAGCACCTTTTTTAGT 1980  
 H F L S F S L P A G V P L P L A P F L V  
 ACTCCTTGAGCTAATCCCTCATTGTTTTCGCGCATTAAGCTCAGGAATACGTTTATTTGC 2040  
 L L E L I P H C F R A L S S G I R L F A  
 TAATATGATGGCCGGTCATAGTTCAGTAAAGATTTTAAGTGGGTTTCGCTTGGACTATGCT 2100  
 N M M A G H S S V K I L S G F A W T M L  
 ATGTATGAATGATCTTTTATATTTTCATAGGAGATCTTGGTCCTTTATTTATAGTTCTTGC 2160  
 C M N D L L Y F I G D L G P L F I V L A  
 ATTAACCGGTCTTGAATTAGGTGTAGCTATATTACAAGCTCATGTTTTTACGATCTTAAT 2220  
 L T G L E L G V A I L Q A H V F T I L I  
 CTGTATTTACTTGAATGATGCTACAAATCTCCATCAAAATCTTTTTTCTTTTTATTAGA 2280  
 C I Y L N D A T N L H Q N S F F F L  
 ATTTTATAATT 2292

った（図5-12）。コア領域にはコードアミノ酸の変化を伴わない塩基置換が2箇所見出されたにすぎない（図5-12）。*Satp6*、*S-2atp6*および*S-3atp6*のN-extension領域には、in frameのATGコドンが数個含まれている。そのため推定アミノ酸残基数は387（*Satp6*）、389（*S-2atp6*）、389（*S-3atp6*）と計算される。N-extension領域を比較すると、*Satp6*と*S-2atp6*の間で78.8%、*S-2atp6*と*S-3atp6*の間では94.1%と比較的高い相同性（いずれもアミノ酸レベル）を示した（図5-12）。一方、*Natp6*のN-extension領域は5アミノ酸残基をコードするのみで、CMS株の*atp6*遺伝子のN-extension領域と比較して極端に短く、相同性はない。

#### (5) 近縁野生種のミトコンドリアゲノム構造

*B.vulgaris*の野生生態型系統およびBeta属野生種の*B. maritima*、*B. orientaris*、*B. adanensis*、*B. macrocarpa*（以下これらを野生ビートと称す）を供試して、ミトコンドリアゲノムの構造をRFLP分析により推定した。まず、N型、S型、S-2型およびS-3型の各ミトコンドリアゲノムを区別し得るdiagnosticプローブ系として、これら4ゲノムに由来する、mtDNAクローン（合計46種）を用意した（図5-13、図5-14、図5-15）。N型、S型、S-2型およびS-3型マスター分子はこれら46種のmtDNAクローンにより5～10kbp毎にカバーされることになる。次いで、これらのmtDNAクローンをプローブに用いて、TK81-O、TK81-MS、I-12CMS(2)およびI-12CMS(3)ならびに野生ビートより抽出した全DNAに対してサザンブロット実験を行った。野生ビートとテンサイ系統間におけるバンドパターンの異同に基づき、それぞれの野生ビートのミトコンドリアゲノムにおけるN型、S型、S-2型あるいはS-3型ゲノムとの構造保存域の推定を試みた。

その結果、野生ビート集団からN型、S型およびS-3型ゲノムと同一なミトコンドリアゲノムを有すると推定される遺伝子型がそれぞれ1、3および6種見出された。一方、S-2型ゲノムと同一のミトコンドリアゲノムを共有する野生ビートは見出す

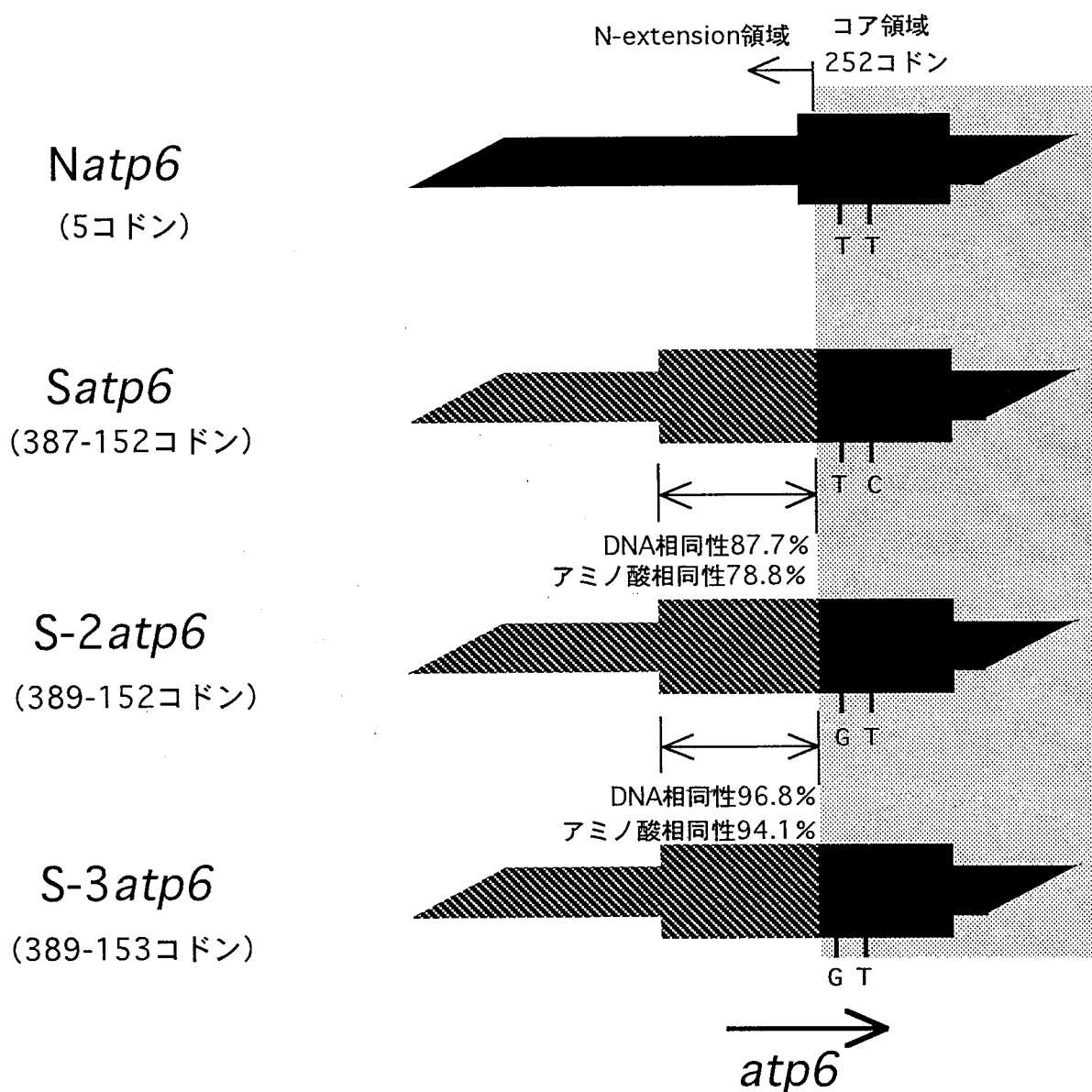


図5-12 N型、S型（久保ら、未発表データ）、S-2型およびS-3型株の *atp6* 遺伝子の構造比較

*Natp6*、*Satp6*、*S-2atp6*、*S-3atp6*の構造保存領域は網をかけた。括弧内にそれぞれの*atp6*遺伝子のN-extension領域のコドンの数を表記した。

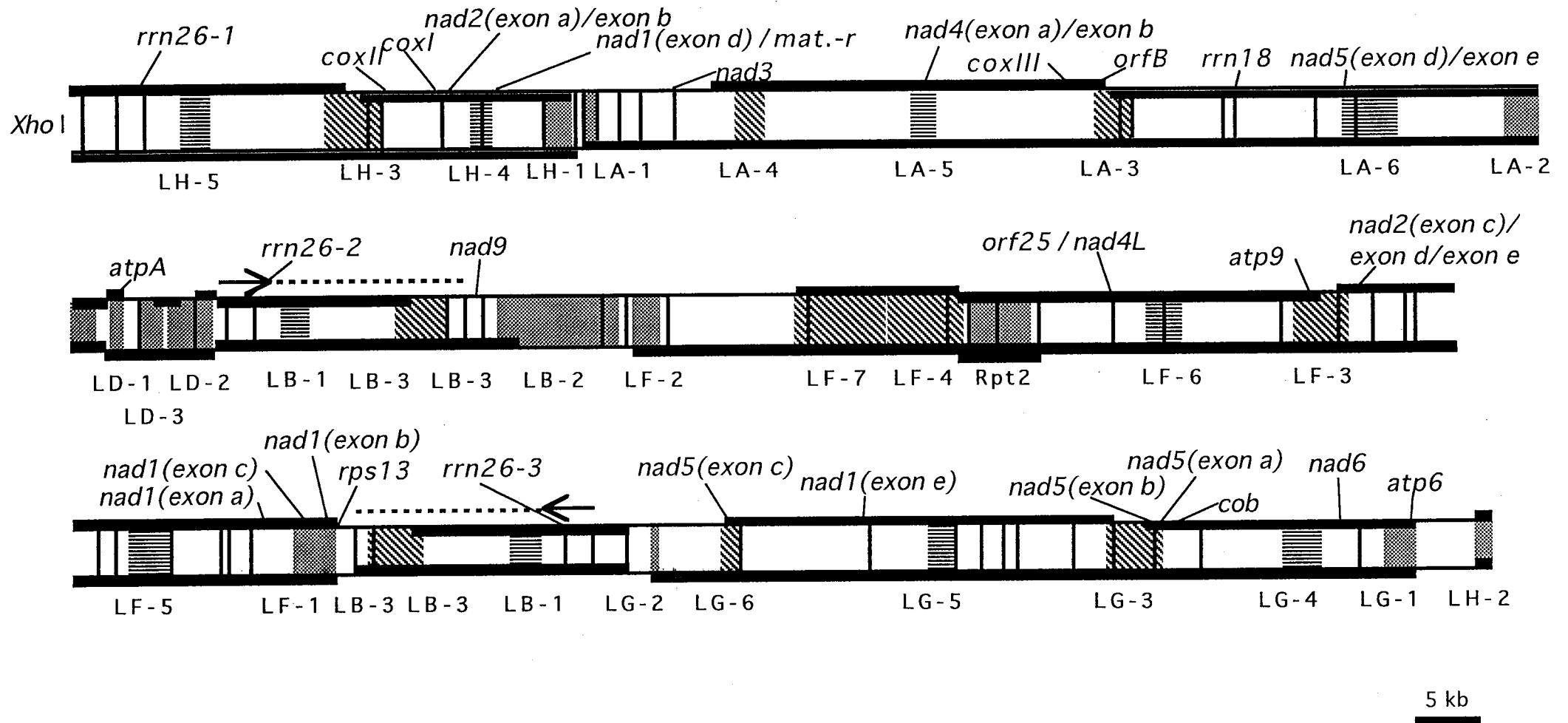


図5-13 プローブクローンの位置

TK81-O(N型)ゲノム物理地図<sup>22) 23)</sup>上に本実験で用いたクローンを示した。上の太線はS型ゲノムに、下の太線はS-3型ゲノムにおいて、それぞれN型と共通して保存される領域を表す。クローンの由来となった断片の所在は斜線等で、名称はその下に示した。

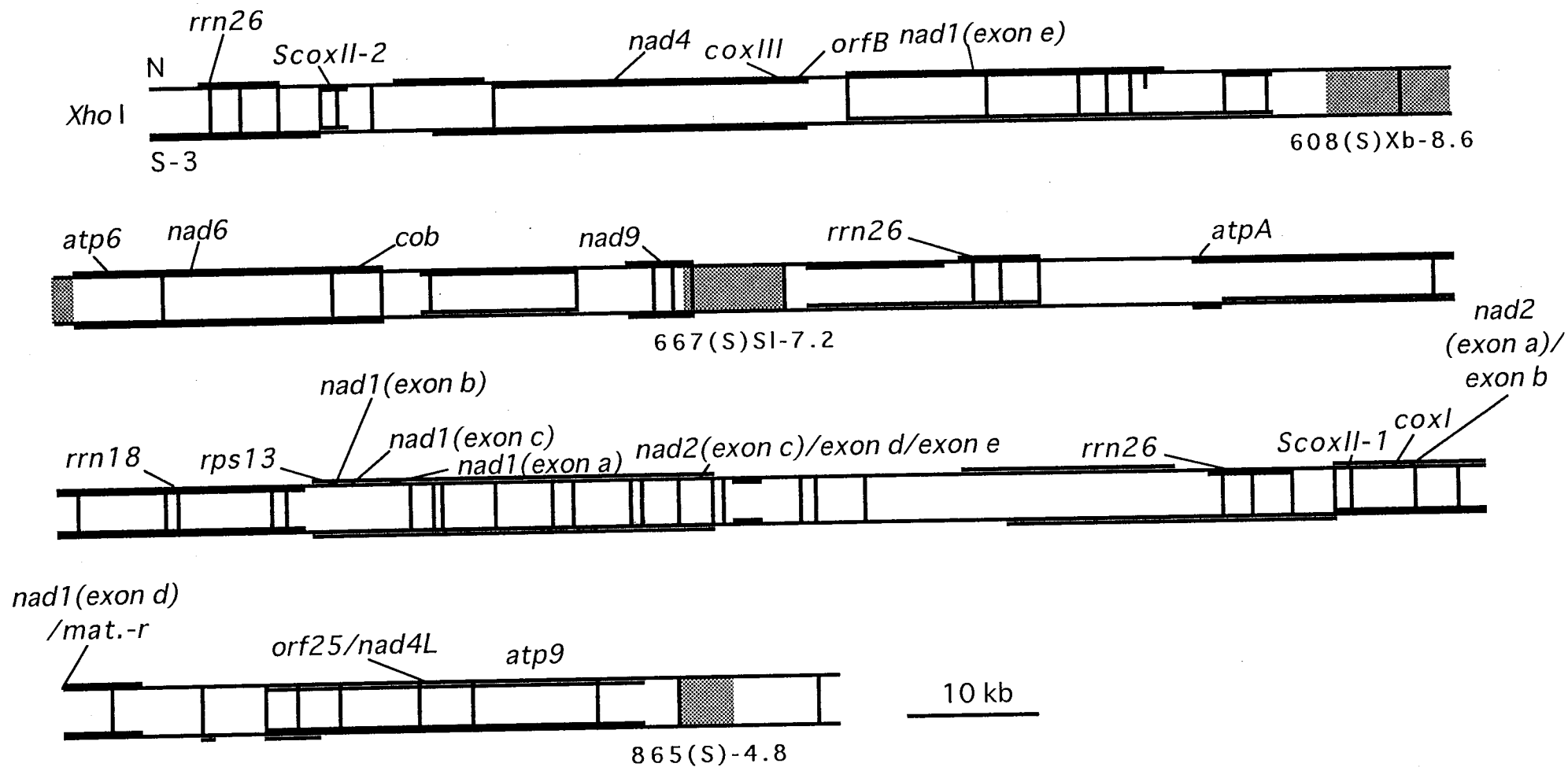


図5-14 S型ゲノム<sup>23)</sup>特異的配列由来のクローンの位置

図はTK81-MS(S型)のミトコンドリアゲノムの物理地図である。上の太線はN型との、下の太線はS-3型とのそれぞれ相同領域を表す。各プローブの由来であるゲノミッククローンの位置は影で表し、名称はその下に示す。

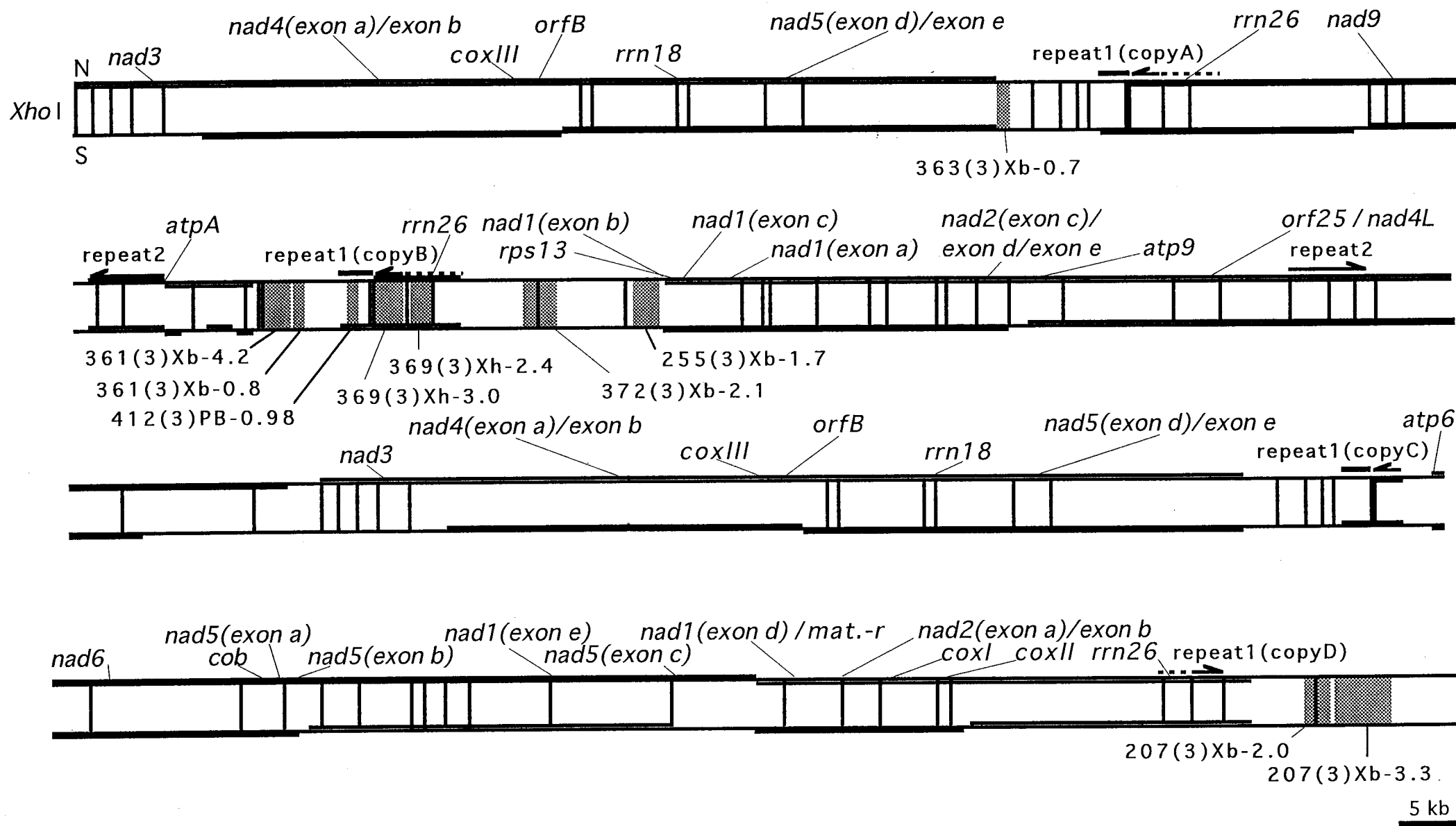


図5-15 S-2/3型、S-3型特異的配列に関するクローン、およびrepeat1に関するクローンの位置

I-12CMS(3)(S-3型)のミトコンドリア物理地図上に、各クローンの位置を影などで、名称はその下にそれぞれ示した。地図上において上の太線はN型との、下の太線はS型との相同領域を示す。

ことができなかった。すなわち、その他の供試野生ビート系統はN型、S型、S-2型およびS-3型 ゲノムとは異なるミトコンドリアゲノムを有する。

これらの新型ミトコンドリアゲノムを、N型、S型およびS-2/S-3型（S-2型およびS-3型ゲノムは変異域が1箇所限定されているので、本項では1ゲノム型として扱う）ゲノムとの部分的相同性の程度に基づいて、4種のグループに分類した。すなわち、図5-16に示すようにほぼ全域に亘ってN型、S型あるいはS-2/S-3型ゲノムとの構造が保存されているミトコンドリアゲノムが見出され、それぞれN型群、S型群およびS-2/S-3型群として分類した。また、N型、S型およびS-2/S-3型との構造保存域をモザイク状に持ち合わせているゲノムも見出され、これらをN,S,S-2/S-3型群、N,S-2/S-3型群、S,S-2/S-3型群として分類した。以上のデータをまとめると、野生ビート131系統から少なくとも64種類のミトコンドリアゲノムが見出されたことになる（表5-2）。

## 考察

雄性不稔細胞質の多型現象はテンサイ以外にもトウモロコシ<sup>99)</sup>、イネ<sup>100)</sup>およびソルガム<sup>101)</sup>等でも見出されているが、由来の異なるCMS 間の類縁関係やCMS発現の機構の違いに注目した研究は必ずしも多くない。まして、異型のCMS株でミトコンドリアゲノム全域に亘る構造比較を行い、構造が異なる領域について塩基配列を決定した研究は著者の知る限りこれまでにない。本実験ではテンサイのN型細胞質株と稔性回復の遺伝機構が互いに異なるS型、S-2型およびS-3型CMS株に注目し、これら4株のミトコンドリアゲノムの構造を比較するとともに、S-2型、S-3型両ゲノム間における唯一の構造変異域の塩基配列を決めた。

### (1)反復配列

供試した4種のミトコンドリアゲノムの共通点として、今回S-3型ミトコンドリアゲノムに見出された2種の反復配列、repeat1およびrepeat2のうち、repeat 1の

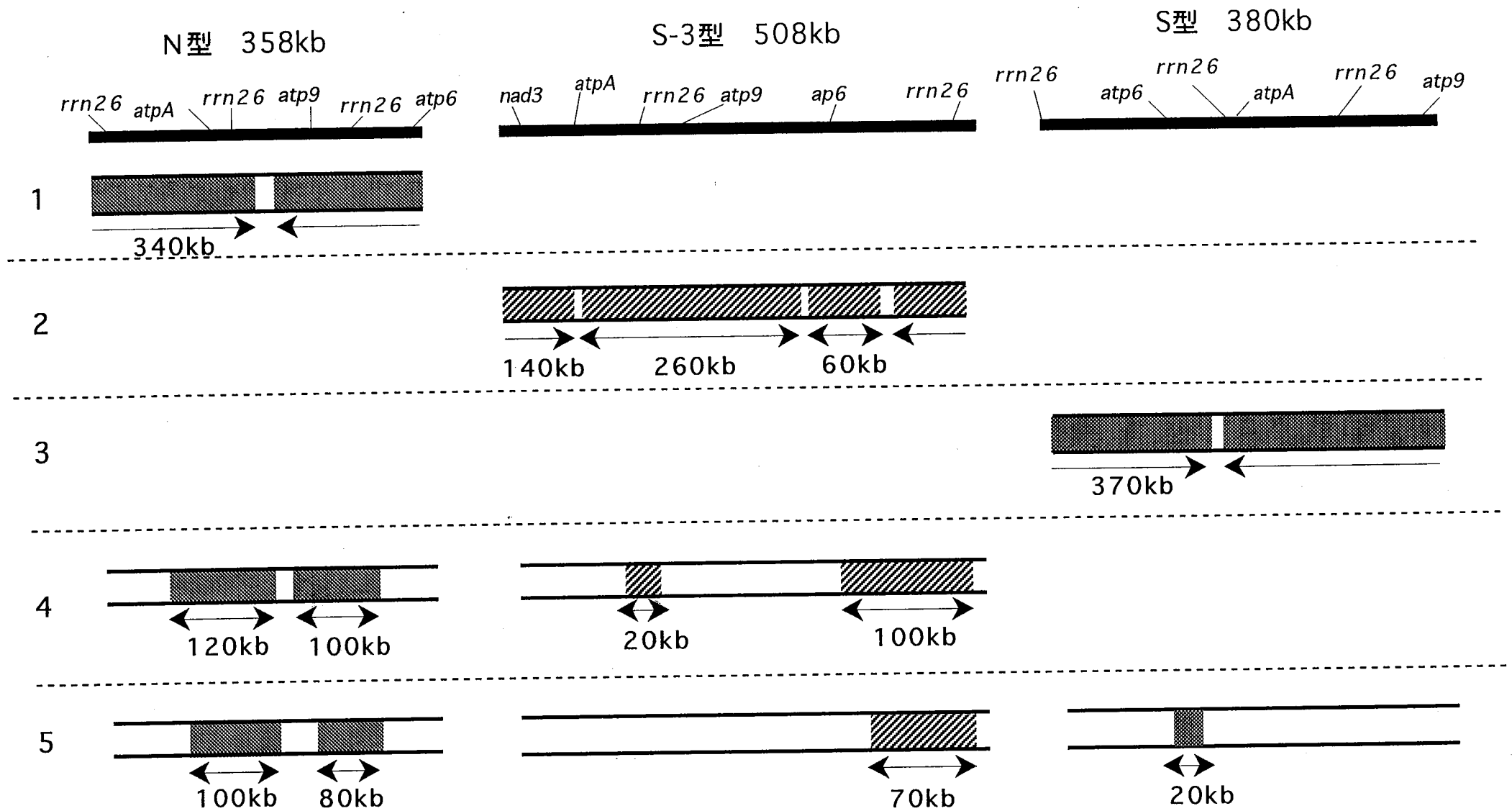


図5-16 野生ビートから見出された新型ミトコンドリアの同定とその分類

44種のテンサイ mtDNAクローンをプローブに用いて、TK81-O、TK81-MS、I-12CMS(2)、I-12CMS(3) (コントロール系統) および野生ビートより抽出した全DNAの制限酵素分解物に対してサザンブロット分析を行った。その結果N型、S型、S-2/3型ゲノムとは異なる新型ゲノムが61種見出された。新型ゲノムをN型、S型、S-2/3型ゲノムとの保存性に基づき分類した。

1(N型群): *B. maritima* BETA156/86のミトコンドリアゲノム: N型ゲノムとほぼ全域に亘って相同である。 2(S-2/3型群): *B. maritima* BGRC 57713-MSのミトコンドリアゲノム: S-2/3型ゲノムとほぼ全域に亘って相同である。 3(S型群): *B. vulgaris* BETA 31/81のミトコンドリアゲノム: S型ゲノムとほぼ全域に亘って相同である。

4(N,S-2/3型群): *B. vulgaris* BETA 29/82のミトコンドリアゲノム: N型およびS-2/3型ゲノムとの構造保存域をモザイク状に併せ持つ。

5(N,S,S-2/3型群): *B. maritima* 35289のミトコンドリアゲノム: N型、S型およびS-2/3型ゲノムとの構造保存域をモザイク状に併せ持つ。

表5-2 野生ビートのミトコンドリアゲノムの分類

野生ビートのミトコンドリアゲノムを既知のN型、S型、S-2型、S-3型ゲノムとの相同性に基づいて4種のグループに分類した（図5-10参照）。数字は見出されたミトコンドリアゲノムの種類数を表す。

| 細胞質型       | <i>B.vulgaris</i> | <i>B.maritima</i> /<br><i>B.orientaris</i> /<br><i>B.adanensis</i> /<br><i>B. macrocarpa</i> | 合計 |
|------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| N          | -                 | 1                                                                                            | 1  |
| S          | 1                 | 1                                                                                            | 1  |
| S-3        | 1                 | 1                                                                                            | 1  |
| N群         | 5                 | 15                                                                                           | 19 |
| S群         | 1                 | 1                                                                                            | 2  |
| S-2/S-3群   | -                 | 6                                                                                            | 6  |
| N,S,S-2/3群 | 1                 | 7                                                                                            | 8  |
| N,S-2/3群   | -                 | 16                                                                                           | 16 |
| S,S-2/3群   | 2                 | 8                                                                                            | 10 |
| 合計         | 11                | 56                                                                                           | 64 |

相同配列がテンサイのN型、S型およびS-2型mtDNAにも含まれており、いずれのゲノムにおいても高頻度組換えを担う反復配列ファミリーを構成している<sup>22) 23) 24)</sup>ことが挙げられる。マスター染色体当たりのコピー数は3(NおよびS型)または4(S-2およびS-3型)であり、NとS型ゲノムの全コピーならびにS-2、S-3両ゲノムの3コピーには*rrn26*遺伝子座が含まれている(図5-17)。

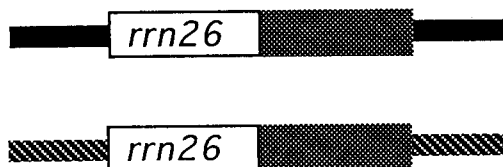
テンサイと共にアカザ科に分類されるホウレンソウ(*Spinacia oleracea*)のミトコンドリアゲノム<sup>104)</sup>も、*rrn26*遺伝子を含む1組の組み換え反復配列(2コピー)を有する(図5-17)。恐らく、*Spinacia*属とBeta属の共通の祖先種ゲノムにおいて*rrn26*遺伝子を含む配列の重複(2コピー化)が起こったのであろう。次いで、Beta属の分岐後にこれらが3コピー化し、さらにS-2、S-3両ミトコンドリアゲノム型の直接の祖先型ゲノムにおいて反復配列の一部についての重複が生じたと想像される。この配列(repeat 1 copyC)には*rrn26*遺伝子座が含まれていない(図5-17)。

repeat2はS-2およびS-3型ゲノムに2コピー見い出されたが、N型とS型ゲノムではrepeat2配列の重複は認められない<sup>22) 23)</sup>。先に、千田<sup>77)</sup>はrepeat2配列の重複に関わったと想像される2組の短い反復配列(406bp, 7bp)がN型ミトコンドリアゲノムに存在し、その組換え産物がN型ミトコンドリアにサブリモン分子として含まれていることを示した。従って、N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repeat2配列の重複が生じた可能性が高く、この祖先型ゲノムとS-2、S-3型ゲノムの系統関係は極めて興味深い研究課題である。

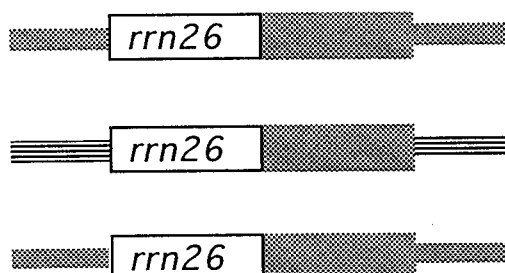
## (2)S-2型、S-3型ミトコンドリアゲノムの分化機構

S-3型株とS型株との間でミトコンドリアゲノムのマスター染色体を比較した結果、少なくとも15箇所の再編成域が見い出された。一方、前章で述べたように、S-3型とN型ミトコンドリアゲノム間では8箇所の再編成域が特定されており、このデータに見る限りS-3型ゲノムはS型ゲノムよりむしろN型ゲノムに近縁と考えられ

ホウレンソウ<sup>104)</sup>  
ミトコンドリアゲノム  
repeat1 2コピー



テンサイN型/S型<sup>22) 23)</sup>  
ミトコンドリアゲノム  
repeat1 3コピー



テンサイS-3型/S-2型  
ミトコンドリアゲノム  
repeat1 4コピー

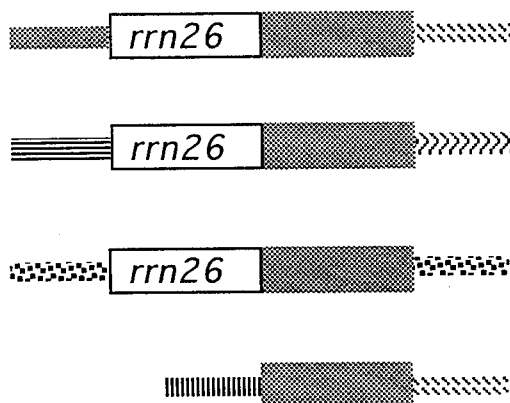


図5-17 ホウレンソウおよびテンサイミトコンドリアゲノムのマスター染色体におけるrepeat1配列のコピー数相同域を同じ模様で示す。

る。染色体全体に亘る再編成は、ハツカダイコン<sup>28)</sup>やトウモロコシ<sup>48)</sup>、ペチュニア<sup>43)</sup>における正常型とCMS型ミトコンドリアゲノムの間でも報告されている。

一方、これとは対照的にテンサイのS-3型とS-2型ゲノム間に見出された構造差はわずか一箇所に過ぎなかった。S-2型、S-3型両ゲノムの変異域にはそれぞれのゲノムに固有の13093bp(S-3ES)配列と561bp(S-2ES)配列が含まれている。興味深いことに、ナタネの正常(cam)型と不稔(pol)型ミトコンドリアゲノム間に見られる構造変異も一箇所に限定されており<sup>105)</sup>、変異域には1kb(cam型)と4.5kb(pol型)の固有配列がそれぞれ含まれている。また、Homme et al.<sup>105)</sup>はハイブリダイゼーション実験を通じて、pol型ゲノム上の4.5kb配列の末端にゲノム再編成サイトとなり得る短い反復配列の存在を示唆した。著者もテンサイS-3ES配列中に*atp9*コード域の相同配列(52bp)、カブの*nad6*遺伝子の上流域の相同配列(80bp)ならびにペチュニアおよびソラマメの*nad1*遺伝子エキソンe下流域の相同配列(20bp)などの、種々の植物ミトコンドリアゲノム上で反復のみられる配列を見出した。このように、テンサイのS-2型とS-3型ゲノム間における構造差や挿入配列の構成についてはアブラナcam型とpol型ゲノム間の比較解析の結果と類似しており、テンサイのS-2型、S-3型両ゲノムの分化機構を考察する上で示唆に富む。

では、テンサイのS-2型とS-3型両ゲノムはそれぞれどのようなプロセスを経て生じたのであろうか？サザンブロット分析によれば、S-2型マスターサークルにはS-3固有配列(S-3ES配列中の9kb)(図5-2、図5-5)が、含まれておらず、他方S-3型マスターサークルにはS-2固有配列(S-2ES)が含まれていないようである。従って、一方のゲノムのマスターサークル内の分子内組換えにより直ちに他方のゲノムが生じたとは考えがたい。

一方、テンサイ近縁野生種の中にはミトコンドリアゲノムにS-3ES配列およびS-2ES配列を共に高い化学量比で含む遺伝子型(例えば、*B. vulgaris* 753932、*B. maritima* AM42223-230など)も見出されたが、これらのミトコンドリアでは両固有配列がマスター染色体上に座乗するものと推定された。

S-3ES配列とS-2ES配列に関しては、さらに次のようなデータも得られた。

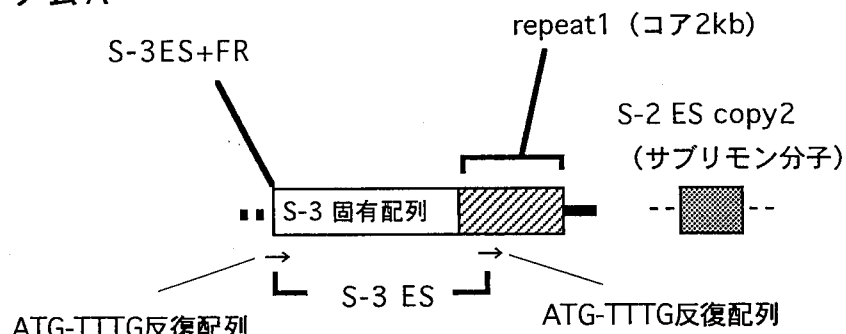
- ①上記近縁野生種のミトコンドリアマスター染色体とテンサイN型、S-2型マスター染色体におけるS-2ES配列隣接域は相同である。
- ②近縁野生種のミトコンドリアマスター染色体とS-3型マスター染色体におけるS-3ES隣接域は相同である。
- ③S-3ES配列とその隣接域(S-3ES+FR)は組換え反復配列repeat1のintactなコピー(コア2kb)を有する。これに対して、S-2ES配列とその隣接域(S-2EScopy1)にもrepeat1配列が存在するが、*Beta*属で高度に保存されている2kbの一部を欠く。従って、S-2EScopy1よりS-3ES+FRが派生する可能性は低く、S-3ES+FRを祖先型と考えるのが妥当である。
- ④検出感度を上げたサザンブロット分析およびPCR実験を通じて、S-2EScopy1とは異なるarrangementに配置されたS-2ES配列がN、S、S-2およびS-3型ミトコンドリアゲノム中に低化学量比で含まれることが示された。

以上のデータをもとに、S-2型、S-3型両ミトコンドリアゲノムの分化のシナリオを次のように考えた。

先ず、S-3ES+FRとS-2EScopy2(サブリモン分子)を含む「祖先型ゲノムA」を想定する(図5-18)。このゲノムにおいて、S-3ES+FRに含まれる直列反復配列ATG-TTTGを介してS-3固有配列とrepeat1(コア2kb)の一部(S-3ES配列)が欠失し”中間体分子”が生じる(「祖先型ゲノムB」の誕生:図5-18)。さらに、組換えの結果”中間体分子”にS-2ESが挿入され(図5-18)、S-2EScopy1が生じることによりマスター染色体にS-3ES+FRとS-2EScopy2を含む遺伝子型(例えば、*B.vulgaris* 753932、*B.maritima* AM42223-230など)のミトコンドリアゲノムが誕生する(図5-18)。これらのゲノムからS-3ES+FRあるいはS-2EScopy2が失われることにより、N型(S-2型)およびS-3型ミトコンドリアゲノムが生ずると考える訳である(図5-18)。

このシナリオの信憑性を検証することを目的として、中間体分子の探索を野生

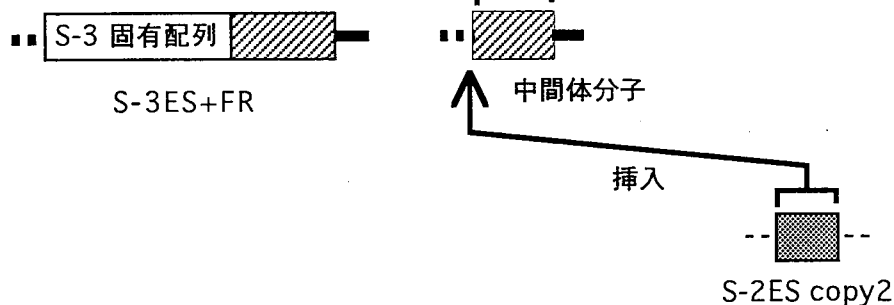
## 祖先型ゲノム A



(1) S-3ES+FRはBeta属で高度に保存されているintactなrepeat1配列 (コア2kb) を有する。

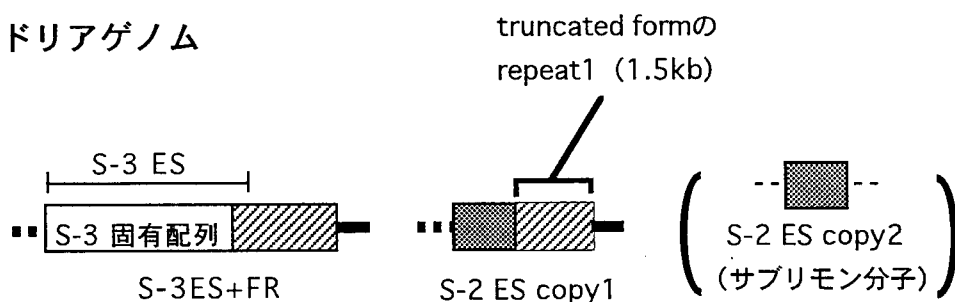
S-3ES+FRから、ATG-TTTG(図5-5)反復配列を介してS-3 固有配列とコア2kbの一部 (S-3 ES配列) が欠失する。その結果、中間体分子が生ずる。

## 祖先型ゲノム B



(2) 中間体分子とS-2 ES copy2の間で組換えが起こる。その結果、中間体分子にS-2ESが挿入され、S-2 ES copy1が誕生する。

## *B.vulgaris* 753932 *B.maritima* AM42223-230 等の ミトコンドリアゲノム



S-3ES+FRの喪失

S-2 ES copy1の喪失

## N型、S-2型ゲノム



## S-3型ゲノム



S-2 ES copy2  
(サブリモン分子)

図5-18 S-2型およびS-3型ミトコンドリアゲノムの分化のシナリオ

ビート対象に試みたが、中間体分子を備えたミトコンドリアゲノムはまだ見出されていないこともつけ加えておく。

### (3) 近縁野生種におけるミトコンドリアゲノムの分化

*B.vulgaris* / *B.maritima* 複合中より、既知のN型、S型、S-2型、S-3型ゲノムとは異なるミトコンドリアゲノムが少なくとも61種見出された(表5-2)。これらの新型ミトコンドリアゲノムの内、34種について、既知ゲノムと構造比較を行った結果、いずれのゲノムにも既知ゲノムの構造が保存された一続きの領域が1~5箇所含まれており、その領域は20kb~370kbに及ぶことが明らかとなった。これらのデータは、*B.vulgaris* / *B.maritima* 複合内のミトコンドリアゲノム多型がいずれも主としてゲノム再編成に起因することを示している。さらに、新たに見出された34種のミトコンドリアゲノムと既知ゲノムの4種、ならびに*B.adanensis*、*B.macrocarpa*のミトコンドリアゲノム(図5-19)の全てを通じて構造が保存されている一続きの配列が14個(A;25kb、B;15kb、C;35kb、D;40kb、E;1.5kb、F;2.5kb、G;1.5kb、H;15kb、I;3kb、J;5kb、K;30kb、L;35kb、M;35kb、N;25kb)見出された(図5-19)。その総和は270kbに達する(図5-19)。従って、*Vulgares* 節植物のミトコンドリアゲノム再編成に重要な役割を果たしてきた配列の多くは、14個の構造保存領域の末端に配置されており、このようなゲノム上の限定された領域で組換えが繰り返されることによって61種にも及ぶミトコンドリアゲノムが産み出されたと考えられる。

Temple et al.<sup>106)</sup>は、ナタネの正常株とCMS株間の体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構造解析を行った。親植物と体細胞雑種11個体のミトコンドリアゲノムの比較により、再編成に起因する変異域が見出された。再編成サイトは正常型ゲノム上の21箇所、CMS型ゲノム上の18箇所に限定されており、これらの領域のいくつかはミトコンドリアゲノム進化における再編成サイトに近接しているという。このように、ミトコンドリアゲノムの再編成をもたらす分子内・分子間組換えが決してラ

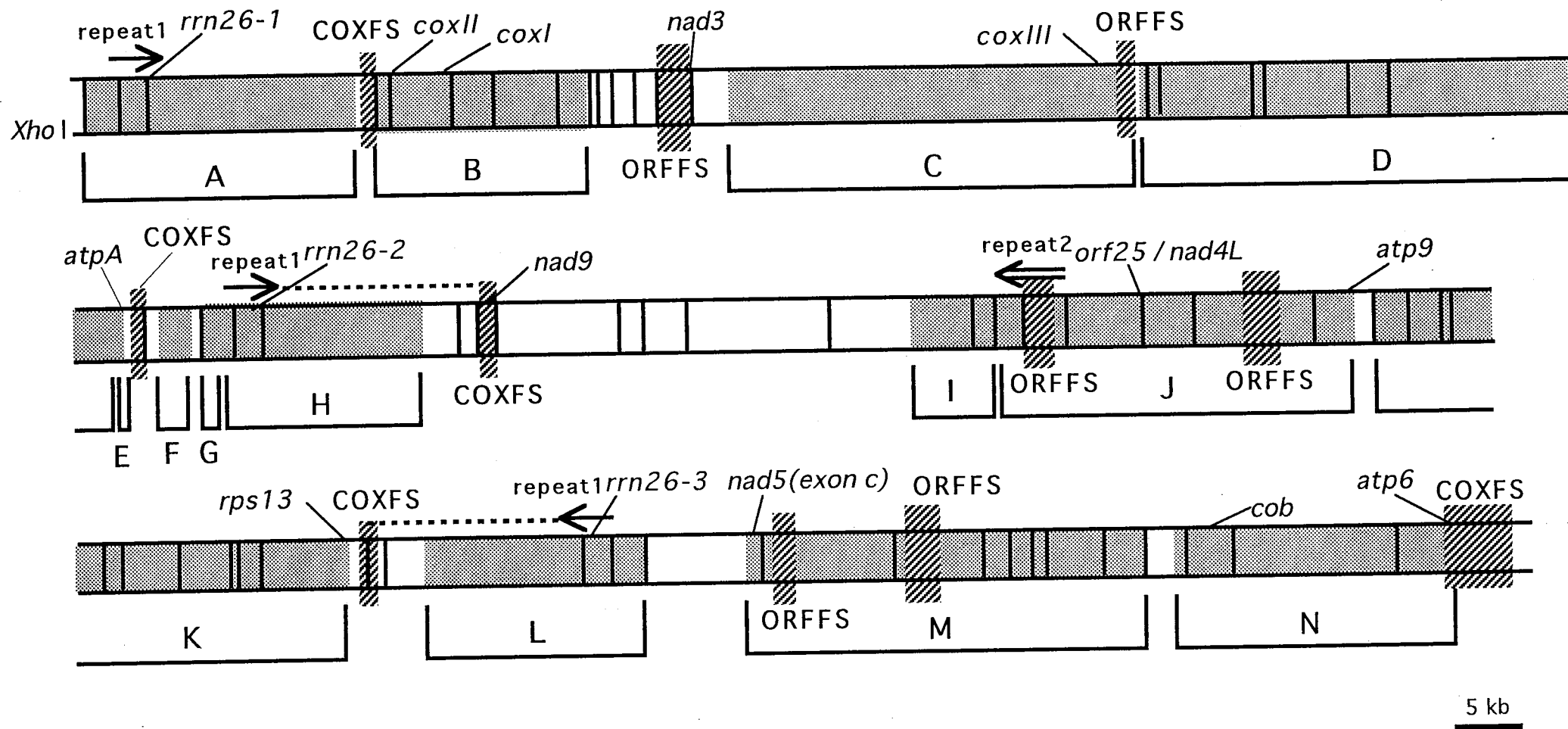


図5-19 *Vulgares*節植物において同定されたから見出された64種のミトコンドリアゲノム間で保存されている構造保存領域 (A-N) をテンサイN型ゲノムの物理地図<sup>22) 23)</sup>上に網をかけて示した。N型ゲノムから見出された短い反復配列 (COXFS, ORFFS)<sup>23)</sup>を斜線で表した。

ンダムに生じるのではなく、ゲノム上の特定領域で起こるのは高等植物に普遍的な現象であることが理解されよう。

Small et al.<sup>107)</sup>の指摘に従えば、ミトコンドリアゲノム再編成には短い反復配列を介した分子内あるいは分子間組換えの産物であるサブリモン分子が重要な役割を担う。一方、久保<sup>23)</sup>はテンサイN型ミトコンドリアゲノム中に、50~100bpと70~180bpの2種の短い反復配列ファミリー(COXFS、ORFFS)を見出した(図5-19)。興味深いことに、COXFS及びORFFSファミリーは、34種のミトコンドリアゲノム間で保存される領域の末端にしばしば見付かった(図5-19)。今後、末端域の塩基配列決定と植物ミトコンドリアにおけるゲノム進化に重要な役割を果たしていると考えられる低化学量比の mtDNAの構造および挙動に注目した解析が必要となろう。

#### (4) 遺伝子の進化

S-3型ミトコンドリアゲノムより見出された7種の固有ORFと変異型遺伝子*atp6*は、*orf145/orf170*を除いてS-2型ミトコンドリアゲノムにも含まれていることが示された。ここでは、*atp6*座と*orf46/orf187*座について考察を加える。

*atp6*: N型、S型、S-2型およびS-3型ゲノムのそれぞれに由来する*atp6*遺伝子は互いに異なるN-extension領域を備えていることが明らかとなった。N-extension領域の多型の成因は、*Natp6*と*Satp6*間、*Natp6*と*S-2atp6*間、*Natp6*と*S-3atp6*の間ではゲノム再編成に求められる。一方、*Satp6*、*S-2atp6*および*S-3atp6*の3遺伝子間のN-extension領域にみられる多型は、塩基置換および挿入／欠失がその成因であった。S型、S-2型、S-3型ゲノムにおける*atp6*-N-extension領域と*coxI-coxII*スペーサー域(西澤ら、データ未発表)の塩基配列を比較した場合、*atp6*-N-extension領域の保存性の方が低いようである。テンサイミトコンドリアゲノムにおいて、*coxI*および*coxII*は1491bpのスペーサー配列を隔てて連鎖しているが、両遺伝子は共転写されていない。*coxI-coxII*スペーサー配列は転写されず、恐らくは機能を持たない領域に由来するのであろう。このような機能を備えて

いない領域と比較して、*atp6*のN-extension領域は進化的保存性が低いようであり、得られたデータはN-extension領域の生物学的意義を考える上で興味深い。因みに、ウェスタンブロット分析を通じて、N型、S型、S-2型、S-3型株のいずれにおいても23kDaの成熟型ATP6タンパク質が同程度蓄積されていることが明らかとなった。N-extension領域の差異に拘わらず、前駆体ATP6タンパク質のプロセッシングは正確に進むのであろう。

*orf46/orf187* : S型およびS-3型ゲノムの*rps13*上流域をN型ゲノムの*rps13*上流域と比較した結果、S*rps13*上流域には*orf324*、S-3*rps13*上流域には*orf46/orf187*が配置されている。サザンブロット分析の結果より、S-2型ミトコンドリアゲノムにもS-3*rps13*の相同配列が含まれていると推定される。*orf324*と*orf46/orf187*のコード域に関しては互いに96.2%の相同性が見出される(図5-10)。S型ゲノムの*orf324*とN型ゲノムにおける*orfB*座は、5'コード域(225bp)と5'上流域(30kb以上)を共有している。一方、S-3型ゲノムの*orf46/orf187*座とN型ゲノムの*orfB*座間の共有配列は、61bpの5'コード配列と175bpの5'隣接域に過ぎない。また、Kubo et al.<sup>22)</sup>によればS*rps13*とS-3*rps13*の上流域に見出されたN型ゲノムとの再編成サイトと*orfB*相同域に挟まれた配列は細胞核に由来する可能性が高い。

これらのデータに基づいて、*orf324*と*orf46/orf187*の誕生のプロセスを次のように推定した。N型、S型、S-2/3型ゲノムに共通の祖先型ゲノムにおいて、まず*rps13*座と細胞核由来の配列および*orfB*座の間で組換えが生じ、*orf324*が誕生した。その後、さらに組換えや点突然変異が繰り返されて*orf46/orf187*が産み出された可能性が考えられよう。後者の組換えには、S-3型ゲノムの*orf46*上流隣接域から見出された*cox11*遺伝子、*rps7*遺伝子および*mat-r*遺伝子のコード域との短い相同配列(それぞれ31bp、81bp、70bp : 図4-16)が重要な役割を演じたのかもしれない。

花粉形成過程は花粉母細胞に始まり、減数分裂と2回の花粉粒内核分裂を経て受精可能な成熟花粉が産み出され完結する。いうまでもなく、花粉母細胞の運命は花粉の細胞分裂のみならず、花粉を取り巻く葯壁組織の発育や代謝活性にも大きく規制される。例えば、通常花粉四分子期以降にタペート細胞に精確に起こる細胞死は、成熟花粉産生に不可欠のプロセスと考えてよい。

また、あたかも減数分裂に同調するかのように、葯壁（特にタペート細胞）のミトコンドリアの分裂が急速に活発化するので、花粉の発育プログラムの進行はミトコンドリアの呼吸能に大きく依存することが容易に理解される。細胞質雄性不稔性は呼吸関連のミトコンドリア遺伝子に起こった非致死性の突然変異に起因する。この影響は栄養細胞には及ばず、タペート細胞の細胞死プログラムの解除や四分子細胞を包むカロース壁消失プロセスの異常など、多様な機構を介して、呼吸能に高度に依存する花粉発育過程においてのみ現れ、花粉退化がもたらされるのだろう。この様に、細胞質雄性不稔性の発現機構は単純一様ではなく、植物種間でまた、同一種内でも由来の異なるCMS株間で相違する可能性が高い。

本研究では、パキスタン原産野生ビートに由来するS-3型雄性不稔細胞質によって引き起こされるCMSの分子機構を明らかにする目的で、N型・S-3型両ミトコンドリアゲノムの構造と発現を比較した。花粉稔性回復の遺伝機構が互いに異なる3種のCMS（米国品種由来のS型、トルコ原産野生ビート由来のS-2型ならびにパキスタン原産野生ビート由来のS-3型）間でもミトコンドリアゲノムの構造と発現を較べ、CMS機序の多様性を解明することを試みた。

まず検定交配実験を通じて、S型CMSおよびS-3型CMSにおいては稔性回復にそれぞれ独自の*Rf*が作用を現すことを確かめた。S型株とS-3型株間ではCMSの発現をもたらすミトコンドリア遺伝子の種類が相違し、そのためこれと相互作用を現す*Rf*遺伝子も種類を異にするというのが交配実験に基づく著者の作業仮説である。この

作業仮説の妥当性を検証するため、N型、S-3型両 mtDNAの構造と発現の比較を行い、S-3型CMSにかかわる塩基配列を調査した。その結果、候補遺伝子として、7種のS-3型ミトコンドリアゲノム固有ORF(*orf129*、*orf145/orf170*、*orf169/orf100*、*orf46/orf187*)および変異型*atp6*遺伝子が特定された。S型CMSの関与ミトコンドリア遺伝子に関しては、先に、Senda et al.<sup>21) 70)</sup>、久保<sup>23)</sup>、Kubo et al.<sup>66)</sup>、長野<sup>103)</sup>によって*ScoxI*、*ScoxII*、*SatpA*、*Srps3*、*Satp6*、*orf324*の6種の候補遺伝子が見出された。S型、S-3型両CMS間で共通性の認められる遺伝子は*rps13*遺伝子上流の固有ORF、*orf324* (S型) および*orf187* (S-3型) ならび*atp6*遺伝子である。*orf324*および*orf187*の翻訳産物はいずれもミトコンドリアには蓄積されないか、あるいは仮に蓄積されていても他のミトコンドリアタンパク質と比較してその蓄積量は極めて少ない(本研究、山本ら、データ未発表)。それ故、両ORFの翻訳産物がCMS発現に関与する可能性は低いとみなしてよい。ただ、S型CMSおよびS-3型CMS株において、*orf324*や*orf187*が近接して配置されることにより、下流の*rps13*の発現が阻害され、雄性不稔性がもたらされる可能性も否定できない。従って、*rps13*の発現解析が今後必要である。一方、両CMS株における*atp6*遺伝子N-extension領域に生じた変異はCMSとは直接的な関連性はないようである。また、*Satp6*とS-3*atp6*の構造差が両CMSにおける花粉稔性回復の遺伝機構の差異をもたらしている可能性も極めて低い。

5章で述べたようにS-2型およびS-3型ミトコンドリアゲノムの構造差は一箇所に限定され、固有ORFおよび変異型遺伝子の構成も大変に似通っている。一方、Hallden et al.<sup>708)</sup>はin organello翻訳実験を通じて、テンサイS-2型CMSおよびS-3型CMS株の根および葉におけるミトコンドリア翻訳産物の電気泳動パターンには差異が見出されないことを報告した。さらに、両CMS株の根および葉におけるミトコンドリアでは、N型株からは検出されない10kDaのタンパク質が産生されていることも明らかにした。また、この10kDaタンパク質以外には両CMS株を特徴づけるようなミトコンドリア翻訳産物は検出されていない。本研究でも両CMS株の葉および

花蕾におけるミトコンドリア画分から14kDaの*orf129*翻訳産物が確認されており加えて、この翻訳物がN型株には存在しないことを明らかにした。Hallden et al.<sup>108)</sup>の実験および本実験においてタンパク質の分画に用いたゲルの組成が異なる点を考慮すれば、Hallden et al.<sup>108)</sup>が見出した両CMS株に固有な10kDaのタンパク質がORF129に相当することも十分に考えられ、S-2、S-3両CMSの発現にORF129が与っている可能性が指摘されよう。今後はその可能性を検証することおよびORF129以外の両CMS株に固有なミトコンドリアタンパク質の有無を明らかにすることを目的として、花蕾や栄養器官のミトコンドリア画分に対してin organello翻訳実験と免疫沈降実験を組み合わせた解析を行うことが必要となる。

一方、検定交配実験を通じてS-2型CMSおよびS-3型CMS株の間においても、花粉稔性回復の遺伝機構は互いに異なることが示唆された。本研究ではS-2、S-3両CMS株間で、互いに異なるN-extension領域を備えた*atp6*遺伝子が同定された。*atp6*遺伝子はCMSの候補遺伝子の一つとして数えられる。しかし、4章および5章で述べた様に*atp6*遺伝子の変異がCMS発現に関与する可能性は低く、両CMSにおける花粉稔性回復の遺伝機構の差異に関与するとは考え難い。

この点で注目されるのは、*orf129*の転写物の蓄積量がS-3株よりS-2株の方が多いというデータである。*orf129*コード配列はS-3型およびS-2型マスターサークルのそれぞれに2コピーずつ含まれている。また、S-2型株およびS-3型株における*orf129* mRNAの5'末端が共通した位置にマッピングされ、その近傍から高等植物のミトコンドリア遺伝子の転写開始点に関するコンセンサス配列(CRTA)<sup>73)</sup>が見出されたことから、この位置が*orf129*の転写開始点であると推定される。*orf129*のプロモーター配列はS-2型マスターサークル上に2コピー含まれ、その下流には必ず*orf129*コード配列が配置されている。一方、S-3型マスターサークル上で*orf129*のプロモーター配列はrepeat1 copyA、copyBおよびcopyCの隣接域に含まれ、3コピー存在する。しかし、S-3型マスターサークルのrepeat1 copyBの隣接域に含まれる*orf129*のプロモーター配列の下流には*orf129*コード配列は存在しない。さ

らに、S-3型およびS-2型ゲノムにおける *orf129* のプロモーター配列は、CRTAコンセンサス配列<sup>73)</sup>の6bp上流に位置する1塩基が互いに異なる。これらのデータから、S-3型およびS-2型ゲノムにおける *orf129* のプロモーター配列の1塩基の差がプロモーター活性に差異を与えているのかもしれない。なお、ORF129タンパク質の蓄積量の差は *orf129* mRNAの蓄積量の差異に起因していると考えられよう。

Hall den et al.<sup>708)</sup>の実験データから示唆されたようにS-2型およびS-3型ミトコンドリアにおける翻訳産物の構成には質的な差異がないとするならば、両CMS株間における花粉稔性回復の遺伝機構の差異と *orf129* の発現量の相違に相関があるか否かは興味深い研究課題である。

予備的なデータではあるが、S-2型細胞質を有する完全不稔個体を母本とし、S-3型細胞質を有する稔性回復型F<sub>1</sub>個体の花粉を交配して得た次代では、S.S.b型植物とC.S.型植物が1:1に分離した(表6-1)。この分離については、次の2通りの解釈が成り立つであろう。すなわち、(1)ここに分離をみたS-2型細胞質に対する *Rf* 遺伝子(*Rfx*)は、S-3型細胞質に相互作用を示す *Rfa*、*Rfb*とは異なり、S-2型CMSにおける稔性回復作用も不完全である。(2)ここに分離している *Rf* はS-3型細胞質に働く *Rfa*、*Rfb*のいずれかと共通の遺伝子であるが、S-2型、S-3型両株に共通のCMSミトコンドリア遺伝子の発現量が両株間で相違するため、S-2型CMSにおける稔性回復作用は不完全となる。

先に述べたように、*orf129* 遺伝子の転写産物と翻訳産物はS-3型株に比べ、S-2型株でより多く(約3~6倍)蓄積されている。仮に、*orf129* がS-2、S-3両CMSに共通の関与ミトコンドリア遺伝子であるとすれば、その発現量の差を反映して、これに応答する *Rfa*、*Rfb*の相互作用パターンが両CMS間で異なり、そのため前述の交配結果が得られたことも首肯されよう。従って、*Rfx*と *Rfa*および *Rfb*の間の同座性検定を行うことが次の課題の一つとなる。

また、S-3型CMS株で固有に転写されていることが明らかとなった、*orf145/orf170*に対しては翻訳レベルの発現解析を行い、S-2型CMSとS-3型CMS

表6-1 S-2型細胞質系統を有する完全不稔個体とS-3型細胞質を有する稔性回復型  
F1個体との交配次代における雄性不稔型の分離様式

[I- 12CMS(2) x T2n- 16- 58- 51- 0] C.S. x [I- 12CMS(3) x T2n- 16- 58- 51- 0] S.S.a

| 雄性不稔型 |       |       |      | 供試個体数 |
|-------|-------|-------|------|-------|
| N     | S.S.a | S.S.b | C.S. |       |
| 0     | 0     | 84    | 78   | 162   |

における花粉稔性回復の遺伝機構の差異との関連性を調査することも必要であろう。

## 摘要

(1) 野生ビート由来の雄性不稔細胞質 (S-2型、S-3型) によって引き起こされる CMSの機構を調査し、テンサイ育種に利用されているS型細胞質 (Owen細胞質) 雄性不稔と比較した。この結果を基に、CMS発現機構の多様性について考察を加えた。

(2) S型CMSに対する維持花粉親系統T2n-16-58-51-Oを花粉親に配し、S型CMS系統 (I-12-CMS(R))、S-2型CMS系統 (I-12-CMS(2)) およびS-3型CMS系統 (I-12-CMS(3)) との間で検定交配を行った。I-12-CMS(R)を母本とした組み合わせのF1植物は全て完全不稔型を発現し、T2n-16-58-51-OはS型CMSに対する*Rf*の遺伝子型が劣性ホモ型であることが示された。これに対して、I-12-CMS(2)やI-12-CMS(3)を母本にした場合には、翌代に稔性回復型や半不稔型個体が高頻度で分離し、T2n-16-58-51-OがS-3型CMSやS-2型CMSに対する稔性回復遺伝子(*Rf*)を優性ホモ型またはヘテロ接合型で有している可能性が示唆された。

(3) S-3型CMSに働く*Rf*遺伝子の対数および作用機構を明らかにするため、I-12-CMS(3) X T2n-16-58-51-OのF1に生じた稔性回復型植物の花粉をI-12-CMS(3)に交配したBC1代の雄性不稔型の分離様式を調べた。稔性回復型 : 半不稔型 : 完全不稔型 = 1 : 1 : 2の比に適合する分離が生じた。従って、S-3型CMSでは稔性回復に2対の基本遺伝子が作用を現し、一方の座の劣性アレーレ(*rfa*)が他座の優性アレーレ(*Rfb*)に対して上位に働くことが推定された。ここに仮定された*Rfa*、*Rfb*遺伝子はS型細胞質の下で、花粉稔性の回復に働く2対の補足遺伝子(*Rf1*, *Rf2*)とは種類や作用機構が異なると考えられる。

(4) S-3型CMS細胞質のミトコンドリアゲノムの構造解析を試みた。mtDNAに関

するオーバーラッピングクローンライブラリーを構築した上でサザンハイブリダイゼーションとゲノムウォーキング法を併用して、S-3型 mtDNAの物理・遺伝子地図の作製を行った。その結果、S-3型ミトコンドリアゲノムが103kbpの配列を互いに共有する2種の環状DNA分子(274kbpおよび234kbp)により構成されることが想定された。仮にこの103kbp配列を介した相同組み換えが起これば、508kbpの環状マスター染色体が生み出されることになる。

(5) 20種のミトコンドリア遺伝子をS-3型マスター染色体上にマッピングした。*nad1*、*nad2*および*nad5*遺伝子はいずれも分断遺伝子であり、しかも成熟mRNAの生合成にはトランスプライシング機構が介在している可能性が示された。また、他の植物種において、保存されている*orfB-coxIII*、*orf25-nad4L*ならびに*rps13-nad1(exon b)-nad1(exon c)*遺伝子座間の密接な連鎖関係が、S-3型 mtDNAにおいても見出された。

(6) S-3型ゲノムのマスター染色体上に2組の反復配列(repeat 1, repeat 2)が見出された。repeat 1はマスター分子上に4コピー存在し、そのうちの3コピーが直列に配置され、残りの1コピーは他のメンバーとは逆方向に配置されている。repeat 2は2コピー含まれており、その方向は逆向きである。

(7) S-3型CMSの発現に関わるミトコンドリアゲノム変異の同定を目的として、正常(N)型とS-2型およびS-3型mtDNAの構造比較を試みた。S-3型とN型mtDNA(久保 1994)間の比較分析を通じて8個のリンケージ群が同定され、S-3型 mtDNAの構造変異は主としてリンケージ群の複雑な配置換え(再編成)に起因することが確かめられた。N型、S-3型両ゲノムの多型域を細分してサブクローニングし、これらをプローブに用いてN型およびS-3型細胞質系統(I-12-61LおよびI-12CMS(3))の成葉より調製したmtRNAに対するノーザンブロット分析を行った。

その結果、転写パターンに差異をもたらすS-3型ゲノム上の構造変異域が5領域見出された。これら5領域の塩基配列を決定した結果、7種の固有なORF(*orf129*, *orf145-orf170*, *orf169-orf100*, *orf46-orf187*)および変異型*atp6*遺伝子が、これらの領域に含まれていることが判明した。

(8) *orf129*はテンサイS型株の*coxII*遺伝子と5'隣接域および開始コドンを共有しているが、*orf129*コード域との相同配列はデータベースには登録されていない。また、テンサイの正常型やS型CMS株のミトコンドリアゲノムにも*orf129*の相同遺伝子は見当たらず、S-3型株のみで固有に発現していることが判った。プライマー伸長分析により*orf129*と*ScoxII*転写物の5'末端を決めた。転写産物の5'末端はいずれも開始コドンより数えて484bp上流に位置している。なお、その近傍はダイズミトコンドリア遺伝子の転写開始点に見出された19塩基のコンセンサス配列と高い相同性を示し、*orf129*と*ScoxII*の転写開始点である可能性が示唆された。ORF129抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、ほぼ期待通りの14.2kDaタンパク質がS-3型CMS株 (I-12-CMS(3)) のミトコンドリア画分から特異的に検出された。なお、稔性回復型F1植物 (I-12CMS(3)xT2n-16-58-51-0) のミトコンドリア画分において14.2kDaタンパク質が検出され、その発現量もI-12CMS(3)タンパク質と差が認められず、*Rfa Rfb*の*orf129*の翻訳に対する影響はないとみなしてよい。

(9) *orf145-orf170*は357bpを隔てて直列に配置されている。N型、S型およびS-3型株より抽出したmtRNAに対して、*orf145*と*orf170*のコード域をプローブに用いたノーザンブロット分析を行ったところ、S-3型株においてのみ特異的に転写産物が検出された。なお、稔性回復型F1植物 (I-12CMS(3)xT2n-16-58-51-0) についても同一のハイブリダイゼーション像が得られたので、稔性回復核遺伝子は両ORFの転写パターンには影響を及ぼさないとみなされる。

*orf145*と*orf170*のmRNAに関してエディティングの有無を調べるために、両ORFのcDNAに関して塩基配列の決定を試みた。*orf170*座においてはエディティングサイトが見出されなかった。これに対して、*orf145*の11種のcDNAクローンのうち5クローンで1箇所のエディティングサイトが見出された。すなわち読み取り枠の251番目のシトシン残基がウラシル残基へ置換され、コードするアミノ酸も変化する(Ser → Leu)ことが判った。

(10) 互いにオーバーラップしている2個のORFとして、*orf169*および*orf100*が見出された。*orf100*および*orf169*のコード域をプローブに用いてI-12CMS(3)の葉および花蕾から抽出したmtRNAに対し、ノーザンブロット分析を行ったがシグナルは全く検出されなかった。恐らく、両ORFは転写されていないか、転写されてもその産物は蓄積されていないと考えられる。

(11) S-3型ゲノムの*rps13*上流に*orf46*および*orf187*を見つけた。*orf46*は*orfB*との融合遺伝子である。ノーザンブロット分析により、S-3型株において特異的に*orf187*転写産物を検出した。稔性回復型F1植物 (I-12CMS(3)×T2n-16-58-51-0) についても同一のハイブリダイゼーション像が得られたので、*Rf*遺伝子は*orf187*の転写パターンには影響を及ぼさないとみなしてよい。ウェスタンブロット分析から、S-3型細胞質系統において*orf187*は翻訳されないか、あるいはORF187タンパク質はミトコンドリアの中では不安定でありほとんど蓄積していないかの何れかであることが判明した。

(12) 高等植物*atp6*コード域は、進化的保存性が低いN-extension領域と保存性が高いコア領域から構成される。テンサイN型ゲノムコードの*Natp6*のゲノミックシーケンスに、コア領域より上流のN-extension領域にはin frameの開始コドンが見出されず、RNAエディティングによってN-extension領域に開始コドンが創り出

されることが判明した。Natp6には合計12箇所のエディティングサイトが存在し、そのうちの一つは終止コドンを創り出す。

(13) S-3型株における $atp6$ 遺伝子(S-3 $atp6$ )の塩基配列を決め、Natp6と比較した。その結果、両 $atp6$ はN-extension領域の構造が互いに異なることが明らかとなった。転写産物5'末端のマッピングデータ(Xue et al)に加え、S-3 $atp6$ 、Natp6下流域が互いに相同であることからNatp6とS-3 $atp6$ の転写パターンの差異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づけた。ウェスタンブロット分析の結果は、N型株およびS-3型株に23kDaの成熟型ATP6に相当するポリペプチドが同程度蓄積していることを示す。S-3型CMS株とS-3型細胞質を有する稔性回復型F1株間では $atp6$ の転写パターンに差異が見出された。しかし、両株間では成熟型ATP6が同程度蓄積しており、転写パターンの差異は翻訳レベルの発現に与える影響は反映されていないようである。以上の結果より、S-3型CMSの発現にかかわる候補遺伝子を $orf145/orf170$ 、 $orf129$ に絞り込んだ。

(14) S-3型とS型との間でミトコンドリアゲノムのマスター染色体を比較した結果、少なくとも15箇所の再編成域が見い出された。これとは対照的にS-3型とS-2型ゲノム間で見出された構造差はわずか一箇所に過ぎなかった。S-2型とS-3型ゲノムそれぞれの変異域から互いに相同性のない13093bp(S-3ES)配列と561bp(S-2ES)配列が同定された。S-3ESのうち9kbpの領域はN型およびS-2型ゲノムに存在しない、S-3型ゲノム固有の配列であり、この領域に $orf145$ および $orf170$ が座を占める。

(15) S-2型ゲノムからも $orf129$ (S-2 $orf129$ )が見出され、コード域および3'隣接域の配列はS-3型ゲノムの $orf129$ (S-3 $orf129$ )との間で高いホモロジーを示した。一方、上流域を比較したところ、S-3 $orf129$ の開始コドンより490bp上流に位

置するグアニン残基がS-2型ゲノムではチミン残基に変異していた。なお、*orf129*の転写産物および翻訳産物の蓄積量はS-2型株の方がS-3型株より多い。

(16) S-2型ゲノムの*atp6*遺伝子(S-2*atp6*)の塩基配列を決定した。Natp6、*Satp6*、S-2*atp6*およびS-3*atp6*遺伝子間で塩基配列の比較を行った。結果、4種の*atp6*遺伝子間ではコア領域の相同性は高く、アミノ酸変異を伴わない塩基置換が2箇所見出されたにすぎない。*Satp6*、S-2*atp6*およびS-3*atp6*のN-extension領域の比較を通じて、*Satp6*とS-2*atp6*の間では78.8%、S-2*atp6*とS-3*atp6*の間では94.1%という比較的高い相同性が示された。一方、Natp6のN-extension領域は5アミノ酸をコードすることが推定されており、不稔株由来の*atp6*遺伝子のN-extension領域と比べ、極端に短く相同性もない。なお、S型、S-2型、S-3型株のいずれにおいても23kDaの成熟型ATP6タンパク質が同程度蓄積されていた。

(17) S型株とS-3型株間ではCMSの発現をもたらすミトコンドリア遺伝子の種類が相違し、そのためこれと相互作用を現す*Rf*遺伝子も種類を異にするというのが交配実験に基づく著者の作業仮説である。S型、S-3型両CMS間で共通点の認められる候補遺伝子は*rps13*遺伝子上流の固有ORF、*orf324* (S型) および*orf187* (S-3型) ならび*atp6*遺伝子である。*orf324*および*orf187*の翻訳産物はいずれもミトコンドリアには蓄積されないか、あるいは仮に蓄積されていても他のミトコンドリアタンパク質と比較してその蓄積量は極めて少ない(山本ら、データ未発表)。それ故、両ORFの翻訳産物がCMS発現に関与する可能性は低いとみなしてよい。両CMS株における*atp6*遺伝子は変異がN-extension領域に限定されており、CMSとは直接的な関連性はないようである。また、*Satp6*とS-3*atp6*の構造差が両CMSにおける花粉稔性回復の遺伝機構の差異をもたらしている可能性も極めて低い。

(18) N型、S型、S-2型、S-3型ミトコンドリアゲノムのクローンをプローブに用い

たRFLP分析により、*B.vulgaris*51系統及び*B.maritima*85系統のミトコンドリアゲノムの構造の推定した。その結果、*B.vulgaris* /*B.maritima* 複合中に既知ゲノムとは異なるゲノムが少なくとも61種類見出された。これらの新たに同定されたミトコンドリアゲノムを既知ゲノムとの相同性に基づいて4群に分類した。N型、S型およびS-2(S-3)型ゲノムとの間でほぼ全域に亘り構造が保存されているミトコンドリアゲノムが見出され、それぞれN群、S群およびS-2/S-3群グループとして分類した。また、N型、S型およびS-2(S-3)型との構造保存域をモザイク状に併せ持つゲノムも見付かった。これらをN/S/S-2.3中間型、S/S-2.3中間型およびN/S-2.3中間型として分類した。これらの遺伝子型ゲノムは雄性不稔細胞質の分化機構を解明する上で利用価値が高い。

## 引用文献

- 1)Lonsdale, D.M. and J.M. Grienenberger (1992) The mitochondrial genome of plants. In: Cell Organelles (ed. Herrmann RG) Springer-Verlag 183-218
- 2)中澤 透、浅見 行一 (1995) ミトコンドリア UP BIOLOGY 東京大学出版会
- 3)Kbayashi S, Akimura R, Okada M (1993) Presence of mitochondrial large ribosomal RNA outside mitochondrial in germ plasm of *Drosophila melanogaster*. Science 260:1521-1524
- 4)Liu X, Kim CN, Young J, Jemmerson R, Wang X (1996) Induction of apoptotic Program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell 86:147-157
- 5)Wolstenholme DR and Fauron CMR (1995) Mitochondrial organization. In : The Molecular Biology of Plant Mitochondria (eds. Levings CS III and Vasil IK) Kluwer Academic Publishers 1-60
- 6)Drouard LM, Dietrich A, Greenenberger JM (1995) Mitochondrial transfer RNA and RNA editing. In: The Molecular Biology of Plant Mitochondria (eds. Levings CS III and Vasil IK) Kluwer Academic Publishers 93-130
- 7)Rapp WD and Stern DB (1995) Mitochondrial transcription and translation. In: The Molecular Biology of Plant Mitochondria (eds. Levings CS III and Vasil IK) Kluwer Academic Publishers 185-206
- 8)Braun CJ, Brown GG, Levings CS III (1992) Cytoplasmic male sterility In: Cell Organelles (ed. Herrmann RG) Springer-Verlag 219-248
- 9)Laser KD and Lersten NR (1972) Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot.Rev. 38 :425-454

- 10) Newton KJ (1988) Plant mitochondrial genomes: Organization, expression and variation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39:503-532
- 11) Ward GC (1995) The Texas male-sterile cytoplasm of maize. In: *The Molecular Biology of Plant Mitochondria* (eds. Levings CS III and Vasil IK) Kluwer Academic Publishers 433-460
- 12) Hakansson G, Kofer W, Glimelius K (1993) Mitochondrial effects of nuclear and mitochondrial restoration of CMS in *Nicotiana*. In: *Plant Mitochondria* (eds. Brennicke A and Kuck U) 385-392 VCH
- 13) Owen FV (1945) Cytoplasmically inherited male-sterility in sugar beet. *J. Agr. Res.* 71: 423-440
- 14) Mikami T, Kishima Y, Sugiura M, Kinoshita T (1985) Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 71:166-177
- 15) Mikami T, Hrada T, Kinoshita T (1986) Heterogeneity of circular mitochondrial DNA molecules from sugar beet with normal and male sterile cytoplasm. *Curr. Gent.* 10:695-700
- 16) 三上 哲夫 (1982) テンサイにおける人為誘発の細胞質雄性不稔性に関する研究 北海道大学農学部邦文紀要 第十三巻 第二号
- 17) Duvic DN and Noble SW (1987) Current and future use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. In: *Walden, D.W. ed. Maize Breeding and Genetics*, John Wiley & Sons, New York. 265-277
- 18) Mikami T, Sugiura M, Kinoshita T (1984) Molecular heterogeneity in mitochondrial and chloroplast DNAs from normal and male sterile cytoplasm in sugar beets. *Curr. Genet.* 8:319-322
- 19) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

- 20)Feinberg AP and Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, Anal.Biochem.,132:6-3
- 21)Senda M, Harada T, Mikami T, Sugiura M, Kinoshita T (1991) Genomic organization and sequence analysis of the cytochrome oxidase subunit II gene from normal and male-sterile mitochondria in sugar beet. Curr.Genet.,19:175-181
- 22)Kubo T, Satoh Y, Muro T, Kinoshita T, Mikami T (1995) Physical and gene organization of mitochondrial DNA from the fertile cytoplasm of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Curr Genet 28: 235-41
- 23)久保 友彦 1994年 テンサイ雄性不稔細胞質におけるミトコンドリアゲノム再編成に関する研究、北大博士論文 pp.130
- 24)江部 成彦 1993年 テンサイS-2型細胞質雄性不稔系統におけるミトコンドリアゲノムの構造に関する研究 北大修士論文 pp.47
- 25)Chapdelaine Y, Bonen L (1991) The wheat mitochondrial gene for subunit 1 of the NADH dehydrogenase complex:a trans-splicing model for this gene-in-pieces. Cell 65:465-472
- 26)Wissinger B, Schuster W, Brennicke A (1991) Trans-splicing in *Oenothera* mitochondria:*nad1* mRNAs edited in exon and trans-splicing group II intron sequences. Cell 65:473-482
- 27)Yamato K, Ogura Y, Kanegae T, Ymada Y, Ohyama K (1992) Mitochondrial genome structure of rice suspension culture from cytoplasmic male-sterile line(A-58CMS):appraisal of the master circle. Theor. Appl. Genet. 83:279-288
- 28)Makaroff CA and Palmer JD (1988) Mitochondrial DNA rearrangements and transcriptional alterations in the male-sterile cytoplasmic of Ogura Radish, Mol.Cell.Biol. 8, 4:1474-1480

- 29) Siculella L and Palmer JD (1988) Physical and gene organization of mitochondrial DNA in fertile and male sterile sunflower. CMS-associated alterations in structure and transcription of the *atpA* gene. Nucl. Acids Res. 16, 9:3787-3799
- 30) Folkerts O and Hanson MR (1989) Three copies of a single recombination repeat occur on the 443 kb master circle of the *Petunia hybrida* 3704 mitochondrial genome. Nucl. Acids Res. 17:7345-7357
- 31) Brandt P, Sunkel S, Unseld M, Brennicke A, Knoop V (1992) The *nad4L* gene is encoded between exon c of *nad5* and *orf25* in the *Arabidopsis* mitochondrial genome. Mol. Gen. Genet. 236:33-38
- 32) Hiesel R, Schobel W, Schuster W, Brennicke A (1987) The cytochrome oxidase subunit I and subunit III genes in *Oenothera* mitochondria are transcribed from identical promoter sequences. EMBO J. 6:29-34
- 33) Boer PH, McIntosh JE, Gray MW, Bonen L (1985) The wheat mitochondrial gene for apocytochrome b: Absence of a prokaryotic ribosome binding site. Nucl. Acids Res. 13:2281-2292
- 34) Morikami A, Nakamura K (1987) Structure and expression of pea mitochondrial F<sub>1</sub>ATPase  $\alpha$ -subunit gene and its pseudogene involved in homologous recombination. J. Biochem. 101:967-976
- 35) Schuster W and Brennicke A (1987) Nucleotide sequence of the *Oenothera* ATPase subunit 6 gene. Nucleic Acids Res. 15 (21), 9092
- 36) Morikami A and Nakamura K (1987) The Pea mitochondrial ATPase subunit 9 gene is located upstream of the ATPase  $\alpha$ -subunit gene. Nucl. Acids Res. 15:4692
- 37) Knoop V, Schuster W, Wissinger B, Brennicke A (1991) Trans splicing integrates an exon of 22 nucleotides into the *nad5* mRNA in higher plant mitochondria. EMBO J. 10 (11), 3483-3493
- 38) Morikami A and Nakamura K (1982) (unpublished)

- 39)Palmer JD, Herbon LA (1987) Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr Genet* 11: 565-70
- 40)Ward BL, Anderson RS, Bendich AJ (1981) The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (*Cucurbitaceae*) *Cell*,25:793-803
- 41)河野 重行 1995 植物ミトコンドリアのダイナミズム、植物の分子細胞生物学、細胞工学別冊 秀潤社 15-22
- 42)中園 幹生、平井 篤志 1992. 高等植物のミトコンドリアゲノム ゲノム構造とその再編成、蛋白質 核酸 酵素、共立出版社 37 : 1091-1098
- 43)Folkerts O and Hanson MR (1991) The male sterile-associated *pcf* gene and the normal *atp9-1* gene in petunia are located on different mitochondrial DNA molecules. *Genetics* 129: 885-895
- 44)Iwahashi M, Nakazono M, Kanno A, Sugino K, Ishibashi T, Hirai A (1992) Genetic and physical maps and a clone bank of mitochondrial DNA from rice. *Theor.Appl.Genet.* 84:275-279
- 45)Bendich AJ (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. *Curr.Genet.* 24:279-290
- 46)Levy AA, Andre CP, Walbot V (1991) Analysis of a 120-kilobase mitochondrial chromosome in maize. *Genetics* 128: 417-24
- 47)Lonsdale DM, Brears T, Hodge PT (1988) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B319, 149-163
- 48)Fauron CM, Havlik RM, Brettell RIS (1990) The mitochondrial genome organization of a maize fertile *cmsT* revertant line is generated through recombination between two sets of repeats. *Genetics* 124:423-428
- 49)Makaroff CA, Ingrid JA, Palmer JD (1991) The role of *coxI*-associated repeated sequences in plant mitochondrial DNA rearrangements and radish cytoplasmic male sterility. *Curr.Genet.* 19: 183-190

- 50)Hansen BM and Marcker KA (1984) DNA sequence and transcription of a DNA minicircle isolated from male-fertile sugar beet mitochondria. Nucl.Acids Res. 12:4747-4756
- 51)Singer-Sam J, Robinson MO, Bellve AR, Simon MI, Riggs AD (1990) 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: 1255-9
- 52) Pruitt KD and Hanson MR (1989) 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 (4): 281-291
- 53)Brown GG, Auchincloss AH, Covello PS, Gray MW, Menassa R, Singh M (1991) Characterization of transcription initiation sites on the soybean mitochondrial genome allows identification of a transcription-associated sequence motif. Mol Gen Genet 228: 345-55
- 54)Nugent JM and Palmer JD (1993) Characterization of the Brassica campestris mitochondrial gene for subunit six of NADH dehydrogenase: *nad6* is present in the mitochondrion of a wide range of flowering plants. Curr. Genet. 23:148-153
- 55)Nakazono M and Hirai A (1993) Identification of the entire set of transferred chloroplast DNA sequences in the mitochondrial genome of rice Mol. Gen. Genet. 236:341-346
- 56)Conklin PL, Wilson RK, Hanson MR (1991) Multiple trans-splicing events are required to produce a mature *nad1* transcript in a plant mitochondrion Genes Dev. 5:1407-1415
- 57)Wahleithner JA, Acfarlane JL, Wolstenholme DR (1990) A sequence encoding a maturase-related protein in a group II intron of a plant mitochondrial *nad1* gene Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:548-552
- 58)Albaum M, Abel WO (1992) Sequence and expression of two

mitochondrial *atp9* genes from the male sterility inducing raphanus cytoplasm tokumasu Unpublished.

59)Wahleithner JA and Wolstenholme DR (1988) Ribosomal protein S14 genes in broad bean mitochondrial DNA Nucleic Acids Res. 16 (14B), 6897-6913

60)Schuster W, Unseld M, Wissinger B, Brennicke A (1990) Ribosomal protein S14 transcripts are edited in *Oenothera* mitochondria Nucleic Acids Res. 18 (2): 229-233

61)Brandt P, Unseld M, Eckert-Ossenkopp U, Brennicke A (1993) An *rps14* pseudogene is transcribed and edited in *Arabidopsis* mitochondria. Curr. Genet. 24 (4), 330-336

62)Gualberto JM, Domon C, Weil JH, Grienemberger JM (1990) Structure and transcription of the gene coding for subunit 3 of cytochrome oxidase in wheat mitochondria. Curr. Genet. 17 (1), 41-47

63)Bonen L, Bird S, Belanger L (1990) Characterization of the wheat mitochondrial *orf25* gene. Plant Mol. Biol. 15 (5), 793-795

64) Oda K, Yamato K, Ohta E, Nakamura Y, Takemura M, Nozato N, Kohchi T, Ogura Y, Kanegae T, Akashi K, Ohyama K (1992) Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. A primitive form of plant mitochondrial genome J. Mol. Biol. 223 (1), 1-7

65) Zhuo D and Bonen L (1993) Characterization of the S7 ribosomal protein gene in wheat mitochondria Mol. Gen. Genet. 236 (2-3), 395-401

66) Kubo T and Mikami T (1996) A duplicated sequence in sugarbeet mitochondrial transcripts is differentially edited: analysis of *orfB* and its derivative *orf324* mRNAs. Biochim. Biophys. Acta 1307 (3), 259-262

67)Krishnasamy S, Makaroff CA (1993) Characterization of the radish

mitochondrial *orfB* locus: possible relationship with male sterility in Ogura radish. Curr Genet 24: 156- 63

68)Handa H, Gualberto JM, Grienenberger JM (1995) Characterization of the mitochondrial *orfB* gene and its derivative, *orf224*, a chimeric open reading frame specific to one mitochondrial genome of the "Polima" male-sterile cytoplasm in rapeseed Brassica. Curr Genet 28: 546- 52

69)Quagliariello C, Saiardi A, Gallerani R (1990) The cytochrome oxidase subunit III gene in sunflower mitochondria is cotranscribed with an open reading frame conserved in higher plants. Curr Genet 18: 355- 63

70)Senda M, Mikami T, Kinoshita T (1993) The sugar beet mitochondrial gene for the ATPase alpha-subunit: sequence, transcription and rearrangements in cytoplasmic male-sterile plants. Curr Genet 24: 164- 70

71)Pla M, Mathieu C, De Paepe R, Chetrit P, Vedel F (1995) Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad7* gene results in lack of the NAD7 polypeptide in a *Nicotiana sylvestris* CMS mutant. Mol Gen Genet 248: 79- 88

72)Xue Y, Collin S, Davies DR, Thomas CM (1994) Differential screening of mitochondrial cDNA libraries from male-fertile and cytoplasmic male-sterile sugar-beet reveals genome rearrangements at *atp6* and *atpA* loci. Plant Mol Biol 25: 91- 103

73)Grey MW, Pamela J, Hanic-Joyce, Covello PS (1992) Transcription, processing and editing in plant mitochondria, Ann.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol. 43: 145- 175

74)Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol 157:105- 132

75)Fauron CMR and Havlik M (1989) The maize mitochondrial genome of the normal type and the cytoplasmic male sterile type T have very different organization. Curr.Genet. 15:149- 154

- 76) Andre C, Lewey A, Walbot V (1992) Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes T.J.G. 8:128-132
- 77) 千田 峰生 1993年 テンサイの細胞質雄性不稔系統におけるミトコンドリア遺伝子突然変異に関する研究 北大博士論文 pp.136
- 78) Dewey RE, Levings CS III, Timothy DH (1986) Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. Cell 44 (3), 439-449
- 79) Young EG, Hanson MR (1987) A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. Cell 50: 41-9
- 80) Kohler RH, Horn R, Lossi A, Zetsche K (1991) Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. Mol. Gen. Genet. 227 (3), 369-376
- 81) Stahl R, Sun S, L'Homme Y, Ketela T, Brown GG (1994) RNA editing of transcripts of a chimeric mitochondrial gene associated with cytoplasmic male-sterility in Brassica. Nucleic Acids Res. 22 (11), 2109-2113
- 82) Dewey RE, Timothy DH, Levings CS III (1987) A unique mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5374-5378
- 83) Nivison HT, Hanson MR (1989) Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in petunia. Plant Cell 1: 1121-30
- 84) Moneger F, Smart CJ, Leaver CJ (1994) Nuclear restoration of cytoplasmic male sterility in sunflower is associated with the tissue-specific regulation of a novel mitochondrial gene. EMBO J. 13:8-17

- 85) Krishnasamy S, Makaroff CA (1994) Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. *Plant Mol Biol* 26: 935-46
- 86) Kennell JC and Pring DR (1989) Initiation and processing of *atp6*, *T-urf13* and *ORF221* transcripts from mitochondria of cytoplasm maize. *Mol. Gen. Genet* 216: 16-24
- 87) Marienfeld J, Unseld M, Brandt P, Brennicke A: Genomic recombination of mitochondrial *atp6* gene in *Arabidopsis thaliana* at the protein processing site creates two different presequences. *DNA Reserch*
- 88) Michon T, Galante M, Velours J (1988) NH<sub>2</sub>-terminal sequence of the isolated yeast ATP synthase subunit 6 reveals post-translational cleavage. *Eur J Biochem* 172: 621-5
- 89) Krishnasamy S, Grant RA, Makaroff CA (1994) Subunit 6 of the Fo-ATP synthase complex from cytoplasmic male-sterile radish: RNA editing and NH<sub>2</sub>-terminal protein sequencing. *Plant Mol Biol* 24: 129-41 (1994)
- 90) Lu B, Hanson MR (1992) A single nuclear gene specifies the abundance and extent of RNA editing of a plant mitochondrial transcript. *Nucleic Acids Res* 20: 5699-703
- 91) Kumar R, Levings CS III (1993) RNA editing of a chimeric maize mitochondrial gene transcript is sequence specific. *Curr Genet* 23:154-9
- 92) Chaudhuri S and Maliga P (1996) Sequence directing C to U editing of the plastid *psbL* mRNA are located within a 22 nucleotide segment spanning the editing site. *EMBO j* 15:5958-5964
- 93) Lu B and Hanson MR (1994) A single homogeneous form of ATP6 protein accumulates in petunia mitochondria despite the presence of differentially edited *atp6* transcripts. *Plant Cell* 6 (12), 1955-1968

- 94)Schuster W and Brennicke A (1987) Nucleotide sequence of the *Oenothera* ATPase subunit 6 gene. *Nucleic Acids Res* 15 (21), 9092
- 95)Kempken F, Mullen JA, Pring DR, Tang HV (1991) RNA editing of sorghum mitochondrial *atp6* transcripts changes 15 amino acids and generates a carboxy-terminus identical to yeast. *Curr. Genet.* 20 (5), 417-422
- 96)Dewey RE, Levings CS III, Timothy DH (1985) Nucleotide sequence of ATPase subunit 6 gene of maize mitochondria *Plant Physiol.* 79: 914-919
- 97)Handa H. and Nakajima K (1992) Different organization and altered transcription of the mitochondrial *atp6* gene in the male-sterile cytoplasm of rapeseed (*Brassica napus* L.) *Curr. Genet.* 21 (2): 153-159
- 98)John UP and Nagley P (1987) Sequence of the mitochondrial *oli2* gene coding for subunit 6 of the mitochondrial ATPase complex in different strains of *Saccharomyces* *Nucleic Acids Res.* 15 (1): 366
- 99)Levings CS III and Dewey RE (1988) *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B319: 177-185
- 100)Bailey-Serres J, Hanson DK, Fox TD, Leaver CJ (1986) Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome c oxidase subunit I gene in sorghum. *Cell* 47: 567-76
- 101)Kadowaki K, Osumi T, Nemoto H, Harada K, Shinjo C (1988) Mitochondrial DNA polymorphism in male-sterile cytoplasm of rice. *Theor. Appl. Genet.* 75:234-236
- 102)de Haas JM, Hille J, Kors F, van der Meer B, Kool AJ, Folkerts O, Nijkamp HJ (1991) Two potential *Petunia hybrida* mitochondrial DNA replication origins show structural and in vitro functional homology with the animal mitochondrial DNA heavy and light strand replication origins *Curr. Genet.* 20 (6): 503-513
- 103)長野 宏則 1996 テンサイミトコンドリア遺伝子rps13の構造と発現に関

104) Stern DB and Palmer JD (1986) Tripartite mitochondrial genome of spinach: physical gene mapping, and location of transposed chloroplast DNA sequences. Nucl. Acids Res., 14, 14: 5651-5666

105) L'Homme Y and Brown GG (1993) Organizational differences between cytoplasmic male sterile and male fertile Brassica mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus. Nucl. Acids Res., 21, 8: 1903-1909

106) Temple M, Makaroff CA, Mutschler MA, Earle ED (1992) Novel mitochondrial genomes in Brassica napus somatic hybrids. Curr Genet 22: 243-9

107) Small I, Suffolk R, Leaver CJ (1989) Evolution of plant mitochondrial genomes via substoichiometric intermediates. Cell 58: 69-76

108) Hallden C, Linn C, Moller IM (1992) Variation in mitochondrial translation product in fertile and cytoplasmic male-sterile sugar beets. Theor. Appl. Genet. 85: 139-145

## 謝辞

本研究の遂行と取りまとめに終始懇切丁寧なる御指導を賜った北海道大学農学部教授三上哲夫博士に心より感謝の意を表する。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ならびに同大学農学部教授佐野芳雄博士に厚くお礼を申し上げる。北海道大学農学部名誉教授木下俊郎博士、同大学農学部助教授森宏一博士、同大学農学部助手高牟禮逸郎博士ならびに同大学農学部講師貴島祐治博士には御援助、励ましの御言葉を頂き厚く御礼申し上げる。さらに本実験の遂行にあたっては弘前大学遺伝子実験施設助手千田峰生博士、北海道大学農学部助手久保友彦博士ならびに北海道農業試験場江部成彦氏に懇切丁寧なる御指導と多大な御助言を頂いた。また、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頂いた。

本実験の大部分は、北海道大学遺伝子実験施設で行われた。同施設施設長高木信夫教授ならびに職員の方々に厚くお礼を申し上げる。

本研究は荻原直人（元北海道大学農学部）、長沢進一（現ホクレン）、井上匡人（現トキタ種苗）、山本将之（現北海道大学農学部）、西澤さつき（現北海道大学農学部）、山下志功（現北海道大学農学部）、坂井友幸（現北海道大学農学部）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援助を得、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としたい。