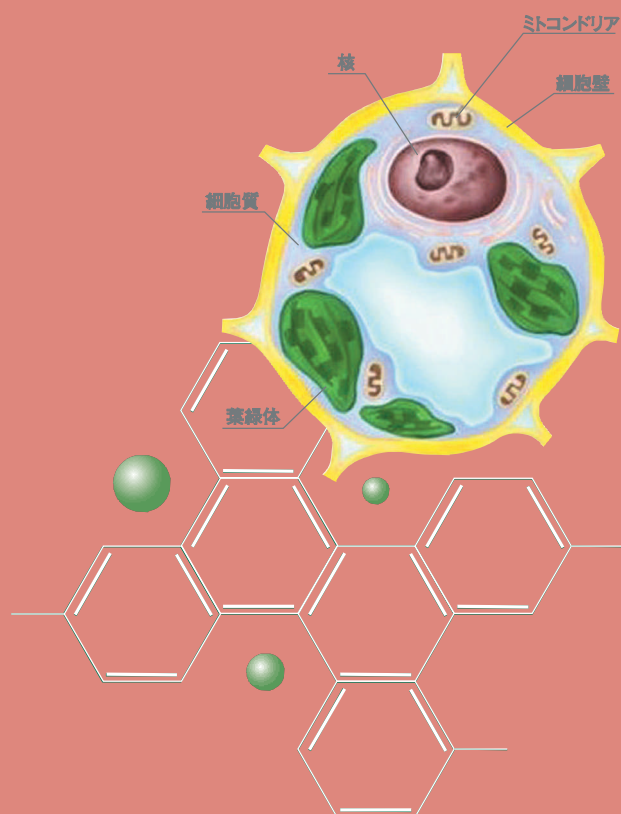


プロジェクト 2

平成17年度～平成19年度 文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業
学術フロンティア推進事業研究成果報告書

高等植物のオルガネラゲノム工学

平成20年3月 京都産業大学



プロジェクト2

「高等植物のオルガネラゲノム工学」

平成17年度～平成19年度私立大学学術研究高度化推進事業

「学術フロンティア推進事業」研究成果報告書

平成20年3月

学校法人 京都産業大学

京都産業大学

工学研究科（生物系）

寺地 徹（京都産業大学工学部教授）

【 目 次 】

◇ 研究成果報告書の発刊にあたって	1
◇ 研究組織	2
◇ 研究成果概要	3
◇ 研究業績	55
◇ 学術論文・著書・総説など	65
◇ 講演要旨等	309

研究成果報告書の発刊にあたって

京都産業大学工学部生物工学科教授
寺地 徹（プロジェクト2 代表）

京都産業大学工学部生物工学科の教員を母体とした研究プロジェクト、「高等植物のオルガネラゲノム工学」が、文部科学省の私立大学学術研究高度化推進事業のひとつである「学術フロンティア推進事業」（学術フロンティア）に選定されてから、3年が経過しました。この研究プロジェクトは、先の私立大学学術研究高度化推進事業（バイオ・ベンチャー研究開発拠点整備事業、平成12-16年度）における同名プロジェクトの発展的な継続課題であり、最初の事業で京都産業大学に整備された閉鎖系温室などの研究設備を有効活用することで、高等植物の細胞が持つオルガネラゲノム、すなわち葉緑体とミトコンドリアのDNAに関連する研究を飛躍的に発展させることをめざしています。とりわけ、これらのプロジェクトには、「オルガネラゲノムの改良により人類の役にたつ植物を育成する」という高邁な目標が掲げられており、葉緑体の形質転換技術を積極的に利用して、様々な遺伝子組換え植物を創出しようとしてきました。

ここでいう葉緑体の形質転換は、プロジェクトの立案当時、日本ではほとんど広まっていなかった技術で、我々も実験系の確立に多大な労力を費やしましたが、幸いこのプロジェクトを始めて2年目に、タバコでは葉緑体の遺伝子組換え植物を非常に効率良く得られるようになりました。これまで、様々な目的のために選択された23種類の異なる遺伝子を、タバコの葉緑体ゲノムに導入することを試み、うち16種類について実際に組換え体（系統）が得られています。これら16種類の葉緑体の遺伝子組換え系統には、予想されたパフォーマンスを発揮しなかったものや、まだ十分に特徴づけがなされていないものも含まれていますが、将来的に他の作物への応用が期待される結果を示す系統が多数見いだされたことは特筆に値すると思います。組換え体を得る効率が改善されたのが1年前であり、興味ある組換え系統の多くは世代更新中で、まだ論文として公表されていないのが残念ではありますが、我々は今回のプロジェクトにおける実験結果が、総じて、前述の目標を実現するための力強い第一歩となったと自負しています。

本報告書では、葉に含まれる鉄分が多く、高濃度の鉄に耐性を示す「フェリチンタバコ」、強光などのストレスで生じる活性酸素に耐性を持つ「活性酸素消去タバコ」の例を紹介します。またこのプロジェクトを契機に活性化した、オルガネラと相互作用する核遺伝子やオルガネラへの導入候補遺伝子の研究など関連分野の研究についても一部紹介いたします。なお、研究内容を広く一般に公開するため、研究成果報告会を平成20年3月15日（土）に開催し、それも含めてプロジェクトに対する外部評価のコメントを大学ホームページへ掲載します。

最後になりましたが、プロジェクト遂行に尽力された関係各位に、プロジェクトを代表して心より感謝申し上げます。

研究組織

京都産業大学・工学部・教授 (プロジェクト2 代表) 寺地 徹
京都産業大学・工学部・教授 山岸 博
京都産業大学・工学部・教授 黒坂 光

学外共同研究者

京都府立大学・人間環境学部・教授 椎名 隆
神戸大学大学院・農学研究科・准教授 森 直樹
ハルビン師範大学・生物学部・遺伝学研究室・教授 郭 長虹

ポストドクター(PD)

京都産業大学・工学部 (平成17年4月～平成18年4月) 中村 直介
(現 Texas A&M Univ., Dept. of Biochem. and Biophys., Postdoctoral Research Associate)
京都産業大学・工学部 (平成19年4月～平成19年5月) 鳥羽 慎也
(現 エスシーワールド株式会社システム応用事業部 研究員)
京都産業大学・工学部 (平成19年4月～平成20年3月) 野添 幹雄

リサーチアシスタント(RA)

京都産業大学・工学研究科・博士課程 (平成17年4月～平成18年9月) 佐伯 明樹
(現 ファルマフロンティア株式会社 研究員)
京都産業大学・工学研究科・博士課程 (平成18年4月～平成20年3月) 安本 景太

嘱託職員

京都産業大学・工学部 (平成17年4月～平成18年9月) 吉田 佳言
(現 岩手生物工学研究センター・COE 技術職員)
京都産業大学・工学部 (平成18年10月～平成20年3月) 大野 香織
京都産業大学・工学部 (平成18年4月～平成20年3月) 富岡 関子
京都産業大学・工学部 (平成19年4月～平成20年3月) 尾崎 昭子

◇ プロジェクト研究成果概要

文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業「学術フロンティア推進事業」

プロジェクト「高等植物のオルガネラゲノム工学」

研究成果報告書

京都産業大学工学部教授

寺地 徹

1. はじめに

Duke 大学の Boynton らが単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の突然変異体 (*atpB* 欠損株) を用いて、「葉緑体の形質転換」が可能であることを初めて世に知らしめてから、今年でちょうど 20 年になる (Boynton et al. 1988)。またそのすぐ後には、高等植物のタバコにおいても葉緑体形質転換の成功例が報告されている (Svab et al. 1990)。それ以来、葉緑体の形質転換は、葉緑体遺伝子の転写・翻訳機構を明らかにする、遺伝子産物の機能を調べるなどといった、葉緑体の遺伝システムに関する基礎研究に用いられ、その有効性が示されてきた。しかしながら、その後 10 年近くの間、葉緑体の形質転換は、その実験の難しさから広く普及するにはいたらず、この実験手法を用いた研究は一部のグループのものにとどまっていた。

今世紀に入り、葉緑体の形質転換に関する優れた総説が書かれ (e. g. Bogorad 2000)、この方法で作られる作物 (葉緑体の遺伝子組換え作物) の有用性が広く認識されるようになった。例えば、葉緑体の遺伝子組換えタバコでは、導入遺伝子が花粉を通じて環境中に拡散する可能性が極めて低い (Svab & Maliga 2007)。このことは、葉緑体の形質転換が、社会的な要請にそった、次世代の遺伝子組換え作物を創出するための効果的な手段であることを示している。また葉緑体ゲノムの高いコピー数のおかげで導入遺伝子の高発現が期待されることは、用途によっては、その組換え作物に大きなアドバンテージを生む。さらにオペロンとして複数の遺伝子を同時に発現させることができること、導入遺伝子にジーンサイレンシングや位置効果が働かず、系統により遺伝子の発現がばらつかないことも葉緑体の遺伝子組換えのメリットである。現在では、葉緑体の遺伝子組換え作物を効率よく作出するための遺伝子工学的な研究、組換え作物の実用化をめざした応用研究などが精力的に行なわれている (e. g. Daniell et al. 2005)。

こうしたなか、我々京都産業大学のグループは、平成 17~19 年度の 3 年間、文科省私立大学学術研究高度化推進事業 (学術フロンティア推進事業) の補助を受け、プロジェクト「高等植物オルガネラのゲノム工学」を実施した。このプロジェクトは、同じく文科省私立大学学術研究高度化推進事業 (バイオベンチャー研究開発拠点事業、平成 12~16 年度) における同名プロジェクトの発展的継続課題であり、これらの研究期間を通じて、タバコなど高等植物の葉緑体の遺伝子組換えに積極的にチャレンジした。

これまで、様々な目的のために選択された23種類の異なる遺伝子をタバコの葉緑体ゲノムに導入することを試み、うち16種類について組換え体（系統）を得ることに成功している。これら16種類の葉緑体の遺伝子組換え系統には、予想されたパフォーマンスを発揮しなかったものや、まだ十分に特徴づけがなされていないものも含まれているが、作物への将来的な応用を大いに期待させる系統が、いくつも見いだされたことは特筆に値する。これらの実験の詳細は、順次論文として公表予定なので、本報告書にすべてを記すことはできないが、我々研究グループは、今回の実験結果が本プロジェクトの究極の目標である「人類の役にたつ組換え作物を作出する」ことを実現するための力強い第一歩となったと自負している。本報告書では、葉に含まれる鉄分が多く、高濃度の鉄に耐性を示す「フェリチンタバコ」及び、強光などのストレスで生じる活性酸素に耐性を持つ「活性酸素消去タバコ」の例を中心に、我々のプロジェクトにおける葉緑体の遺伝子組換えへの取り組みと、それにより得られた成果をまとめる。

2. フェリチンタバコ

2. 1. 研究背景

鉄欠乏は、世界で最も一般的かつ広く認められる栄養障害である。例えば、就学前の児童や妊娠中の女性に限れば、発展途上国では、ほぼすべての人々が、先進国ですら少なくとも 30-40%の人々が、それぞれ慢性的な鉄欠乏の状態にあると推定されている。貧血のすべてが鉄欠乏によるわけではないが、多くの場合、鉄欠乏は貧血をもたらし、鉄欠乏性の貧血に苦しむ人々の数は全世界で 20 億人を超え、全人口の 4 割近くに達しているという報告もある (WHO 2001)。この深刻な栄養障害を改善するため、鉄製剤の配布など様々な試みがなされているが、植物育種の観点からは、可食部に消化吸収できる形で鉄を多く含む作物を作ることが重要であり、そのような作物は人類の鉄欠乏の問題を解決するため大いに寄与すると考えられる。

遺伝子工学的な手法で、鉄分を多く含む作物を作出する試みはこれまでも行われており、一定の成果をあげている (Goto et al. 1999)。その際重要な役割を果たすのが、フェリチンである。フェリチンは動物、植物からバクテリアにいたるまで生物に普遍的に存在するタンパク質で、生体内における鉄貯蔵と代謝のキープレイヤーである。このタンパク質は 24 個のサブユニットから構成された「かご」状の構造をとり、その中に約 4500 個もの鉄原子を安全な形で貯蔵するとされている (<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/ferritin.jpg>)。植物の場合、この遺伝子は核ゲノムにコードされており、その翻訳産物がトランジットペプチドによって葉緑体に運ばれ、主に葉緑体の中で機能することがわかっている。このフェリチンを植物で発現させる研究は、これまでもいくつか行われており、特に Goto らの 1999 年の論文は、イネの胚乳にダイズのフェリチンを強発現させた、いわゆる“フェリチンライス”の作出を報じたもので、コメの鉄含量を野生型と比べ約 2.7 倍も増加させたという画期的なものであった (Goto et al. 1999)。

そこで本研究では、フェリチン遺伝子をタバコの葉緑体ゲノムに導入し、強発現させることで、植物の葉における鉄含量を飛躍的に増加させることを目的とした。また、フェリチン遺伝子の通常の組換え体 (遺伝子が核ゲノムに導入されている) を用いた先行研究の結果から、フェリチンを強発現させることで、植物に鉄耐性、酸化ストレス耐性、さらには病害抵抗性が付与されることが期待される。そこでフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムへ持つ組換えタバコがこれらの性質を示すか、一部ではあるが検討した。なお、タバコを用いた今回の実験は、将来の「薬物」野菜への応用をにらんだ先行研究であり、この研究を発展させて、環境に配慮した新しい遺伝子組換え作物を作出したいと考えている。

2. 2. 材料及び方法

本研究ではまず、ダイズフェリチンの全長 cDNA をタバコの葉緑体で働くタバコ *psbA* プロモーターと *rps16* ターミネーターに連結し、このカセットを葉緑体形質転換ベクター pPRV112A' へクローニングすることで、葉緑体導入用のプラスミドコンストラクトを作製した (図 1)。なおこのベクターは選抜マーカーとして *aadA* 遺伝子を持つので、組換え体をスペクチノマイシンにより選抜することが可能である。

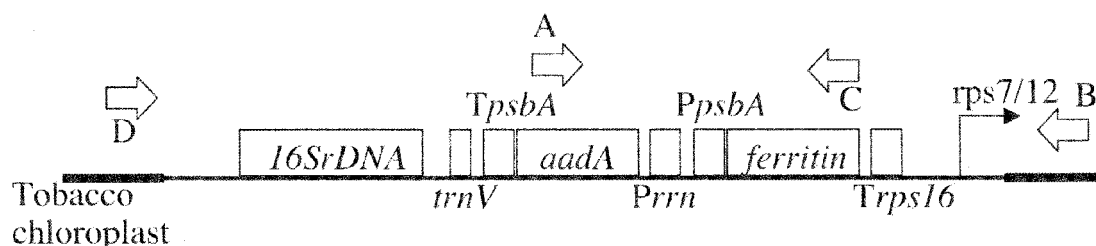


図 1. タバコ葉緑体ゲノムへのフェリチン遺伝子導入に用いたプラスミド

次にこのプラスミドコンストラクトを無菌的に育てたタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) の葉にパーティクルガン (PDS-1000, BioRad) を用いて撃ち込んだ。なおボンバードメント、タバコの培養・再分化の条件などは基本的に Svab & Maliga (1993) の方法によった。

2. 3. 結果及び考察

組換え体の分子的な特徴づけ

上記プラスミドコンストラクトをタバコの葉に合計 78 回撃ち込み、スペクチノマイシン耐性を示す 13 個のシュートを得た。そのうち組換え体と確認されたのは 4 個体であった。以後の実験は、これら 4 個体の組換え体のうち、#3 と #25 の 2 個体由来する後代 (T1 及び T2 世代) を用いて行った。

図 2 に組換え体の DNA を PCR により解析した結果を示す。*aadA* とフェリチン遺伝子が葉緑体ゲノムへ狙い通りに導入されているかを確認するため、*aadA* に特異的なプライマー A と、相同組換え領域の外側に位置するタバコ葉緑体 DNA 特異的なプライマ

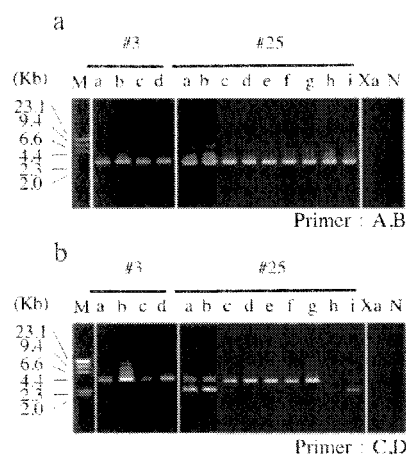


図 2. フェリチンタバコ #3, #25 の後代各個体の PCR による解析増幅に用いたプライマーは図 1 に示されている

一B のペアで PCR を行ったところ、調べたすべての T1 個体で、予想される 3.7kb の大きさの断片が増幅した (図 2a)。また、フェリチン遺伝子に特異的なプライマー C と、B と同様に相同組換え領域の外側に位置するプライマー D のペアによる PCR では、ほとんどの個体で期待される 4.3kb の断片が増幅した (図 2b)。

全 DNA を制限酵素 *Sac* II で消化した後、これをナイロン膜に転写し、Dig 標識したフェリチン遺伝子プローブでハイブリダイゼーションを行ったところ、組換え体にはのみ約 3.8kb の断片が認められた (図 3a)。また遺伝子導入の標的領域を含む葉緑体 DNA プローブを用いたハイブリダイゼーションでは、組換え体には約 3.8kb、野生型には 1.5kb の断片のみがそれぞれ観察され、組換え体には、フェリチン遺伝子を含む組換え型の葉緑体ゲノムがホモプラスミックの状態で存在していることが示された (図 3b)。

導入遺伝子の発現を RNA レベルで解析するため、RT-PCR と Northern 解析を行った。ダイズのフェリチン遺伝子特異的なプライマーを用いた RT-PCR、及び *aadA* 特異的なプライマーを用いた RT-PCR では、いずれの場合も組換え体の反応液に逆転写酵素を加えた実験区にのみ、予想される大きさの DNA 断片が増幅し、逆転写酵素を加えていない実験区、あるいは野生型タバコの実験区には、増幅産物は認められなかった (データ未掲載)。また、葉から調製した全 RNA (5 µg) に対するフェリチン遺伝子プローブを用いた Northern ハイブリダイゼーションでは、組換え体にはのみ、強いシグナルが検出された (図 4)。

組換え体におけるタンパク質の発現解析の結果を図 5 及び 6 に示す。組換え体の葉から調製した 10µg の全タンパク質を SDS/PAGE で分離し、CBB 染色したところ、野生型と比べて組換え体ではバンドパターンが変化しており、組換え体に特異的な約 23kDa のバンドが観察された (図 5)。また、抗フェリチン抗体を用いた Western 解析では、組換え体にはのみ、このバンドに対応するシグナルが認められた (図 6)。

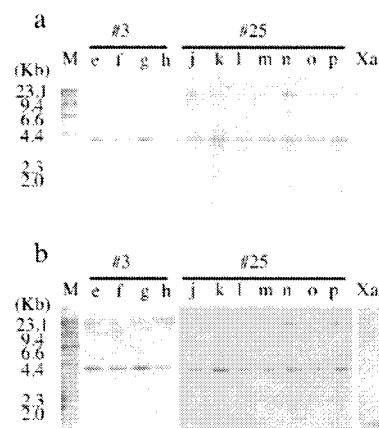


図 3. フェリチンタバコ後代の Southern 解析

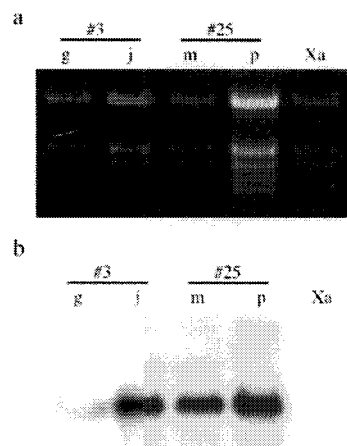


図 4. フェリチンタバコ後代の Northern 解析

導入遺伝子の遺伝様式を調べるため、組換え体の1個体(#3T1-i)と野生型タバコ(Xanthi)との間で正逆交雑を行い、F1個体のスペクチノマイシン耐性を調べた。そ

の結果、野生型タバコを母親にもつF1は、すべてスペクチノマイシンに感受性を示し、白色化した。一方、組換え体を母親にもつF1はすべてスペクチノマイシン耐性を示し、緑色のまま生育を続けた(図7)。

以上、ここまでの結果は、ダイズのフェリチン遺伝子がタバコの葉緑体ゲノムの標的部位に相同組換えを通じて正しく導入され、組換え体では、組換え型の葉緑体ゲノムがホモプラスミックになったことを示す。

また導入遺伝子は転写されており、フェリチンタンパク質が多量に蓄積していることも示された。さらに今回の実験で、フェリチンタバコでは導入遺伝子が細胞質遺伝することも証明された。

組換え体の表現型の解析

図8及び表1に、組換え体の葉における鉄含量を野生型と比較した結果を示す。図8のグラフは京都大学の間藤教授の指導をうけて、共同研究者の1人(郭)が自ら測定した値を示したものであり、表1はICP発光分析装置による測定を島津総合分析試験センターに依頼して得た値である。なお、植物の生育条件は両者で異なり、図8のデータは植木鉢で50日間生育させたタバコに、水のみ(-Ironと表記)、あるいは50mMのFe-EDTAを5日間供給した後(+Iron)に収穫した葉を用いて測定した。野生型のタバコは乾燥重1gあたり、いずれの処理区で

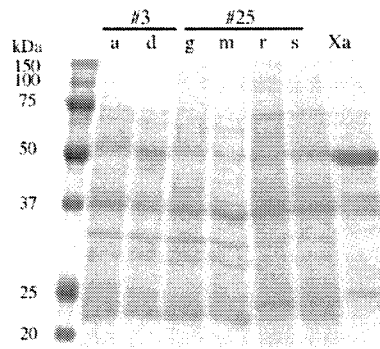


図5. フェリチンタバコ後代から調製したタンパク質のSDS-PAGE分析

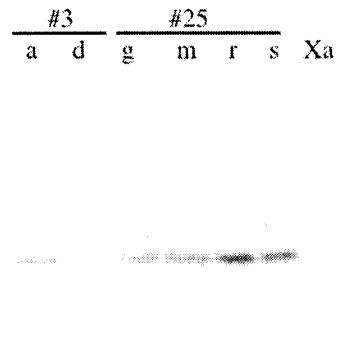


図6. フェリチンタバコ後代から調製したタンパク質のWestern分析

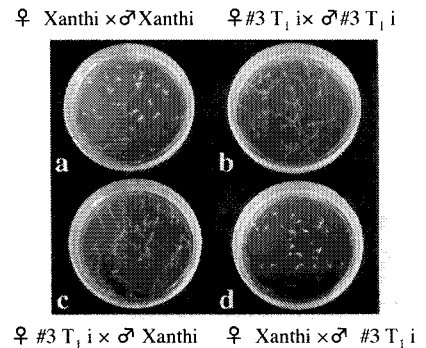


図7. フェリチンタバコと野生型タバコの正逆交雑

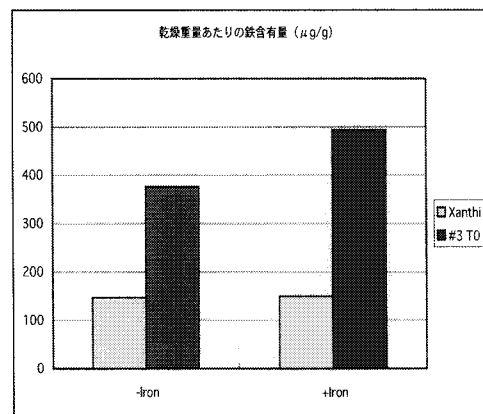


図8. フェリチンタバコと野生型タバコの葉における鉄含有量

もおおよそ 150 μ g の鉄を含んでいたが、組換え体は鉄を供給しない場合は 375 μ g、鉄を供給した場合は 500 μ g

表 1. フェリチンタバコと野生型タバコの葉の鉄含有量

弱の値を示し、フェリチンの導入により葉の鉄含量が増加した。また表 1 の値は MS 培地を含むポットで育てた幼植物から得たが、乾燥重 1g あたり、野生型では 184 μ g、組換え体では 304 μ g となり、ここでも組換え体の葉の鉄含量は野生型に比べて増加していた。

	乾燥前	乾燥後
Xanthi	10	184
#25 T2 Z	13	304

ところで、本研究で得られた組換え体は、発芽直後から全体的に黄緑がかった表現型を示した。この表現型は一見、鉄欠乏の症状のように思われたことから、発芽後 4 週間の幼植物を、鉄含有量を変化させた培地に移植し、同じ条件で 2 週間育て、表現型の変化を観察した (図 9)。

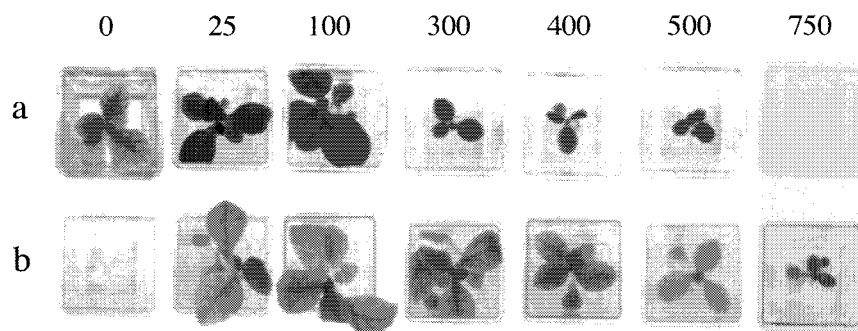
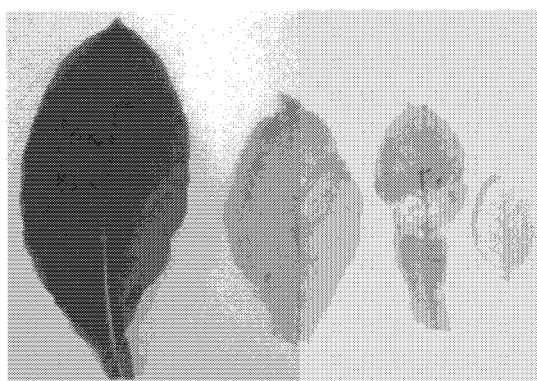


図 9. 培地の鉄濃度の増加に伴う野生型タバコ (a) と組換え体 (b) の生育の変化

その結果、葉の色調は回復しなかったものの、野生型タバコが 750 μ M の鉄含有培地で枯死したのに対し、組換え体は同じ 750 μ M でも生存可能であることが判明した。

なお、興味深いことに、組換え体はさらに成長すると、葉の一部で壊死が起こり、その部分がうす茶色に変色し、やがて透明になり、ついには穴が開いた (図 10)。また組換え体の黄緑色の葉は、野生型のタバコと比べて 2/3 程度の大きさまでしか成長しなかった



(図 10)。DMF 法によってクロロフィル含有

量を測定したところ、組換え体のクロロフィル含量は野生型の約半分まで減少していた (データ未掲載)。

図 10. 野生型タバコ (左) とフェリチンタバコ (右 3 枚) の葉の表現型

2. 4. おわりに

本研究ではダイズのフェリチン遺伝子をタバコの葉緑体ゲノムに初めて導入することに成功した。導入された遺伝子は、期待通り強発現しており、組換え体にはフェリチンの mRNA 及びタンパク質が大量に蓄積していた。また、正逆交雑の結果は、導入遺伝子が後代へ細胞質遺伝することを示し、本研究で得られた組換え体が真の葉緑体の遺伝子組換え体であることを裏づけた。葉緑体内に蓄積したダイズのフェリチンは、その機能を保持していると考えられ、組換え体の葉の鉄含有量を最大で3.3倍増大させ、鉄耐性を向上させた。しかしこの組換え体は、葉のクロロフィル量の低下や細胞の壊死など、予期せぬ表現型を示した。今のところ、これらの表現型が生じる原因はわからないが、先行研究で作出された外来フェリチン遺伝子を核ゲノムに持つ組換えタバコでは、上記表現型は観察されていないことから (Van Wuytswinkel et al. 1998, Goto et al. 1998, Deak et al. 1999)、導入遺伝子の強発現による量的な効果ではないかと考えられる。しかしながら、今回用いたダイズのフェリチン遺伝子は、トランジットペプチド領域を含む完全長の cDNA 配列であり、本来なら葉緑体への移行の際に除去されるタンパク質の N 末にあるこの領域が、タンパク質の機能に何らかの影響を及ぼしている可能性も排除できない。今後、プロモーターの変更などにより発現量の微調整を行う、トランジットペプチド領域を含まないフェリチン cDNA を発現させるなどの実験を行うことで、細胞の壊死の原因 (おそらく活性酸素分子種の影響) を明らかにするヒントが得られるものと思われる。また本実験により、フェリチン遺伝子を葉緑体内で強発現させると葉の鉄含量が高まることが証明された。この遺伝子を用いて、ケール、ホウレンソウなどの「葉物野菜」で葉緑体の遺伝子組換えを行えば、可食部の鉄含量が増えた作物の作出も夢ではない。この方面に向けた、さらなる研究の進展が待たれる。

2. 5. 謝辞

本報告の内容は、郭長虹博士 (現、ハルピン師範大学) の研究成果による。また郭博士の実験を引き継いだ、本学嘱託職員の大野香織さんには、最新のデータを提供していただいた。お二方に深謝の意を表す。なお、フェリチンの cDNA 及び抗体は、電力中央研究所の吉原利一博士、後藤文之博士より譲渡された。両博士に感謝する。さらに、鉄の定量を指導していただいた、京都大学農学研究科の間藤徹教授に感謝の意を表す。

3. 活性酸素消去系酵素遺伝子タバコ

3. 1. 研究背景

植物は強光、乾燥、紫外線などの環境要因、あるいは除草剤、化学物質、大気汚染などの人為的要因によってストレスを受ける。これらのストレスは、植物体内に強い酸化作用を持った活性酸素分子種(以下、ROS と略す)を生じさせる。ROS は生体物質や脂質などと反応し、光合成の障害、葉の脱落、組織の壊死などを引き起こすので、結果としてストレスにより植物の生長は阻害される。植物は動物と異なり、移動によりストレスの原因を回避することができないため、ストレスにより生じる ROS を段階的に無害な水へと変換する回路(アスコルベート・グルタチオンサイクル)を進化の過程で発達させたと考えられる(図11)。

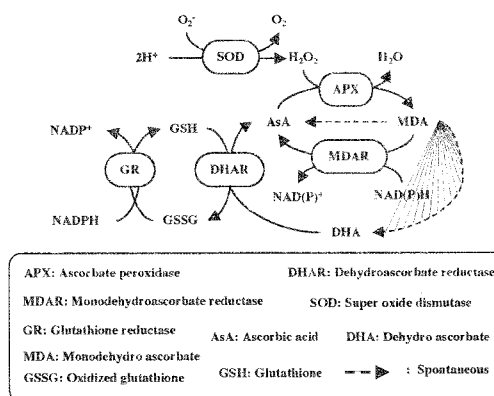


図11. アスコルベート・グルタチオンサイクル

光合成を営む葉緑体は、最も多くの ROS が発生する場でもあり、アスコルベート・グルタチオンサイクルは葉緑体内に存在する。この回路により、葉緑体内で発生したスーパーオキシドはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の働きで還元されて過酸化水素となり、過酸化水素はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)によって還元されて無害な水へと変換される。このときアスコルビン酸は酸化され、モノデヒドロアスコルビン酸(MDA)となるが、MDAはモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(MDAR)、デヒドロアスコルビン酸レダクターゼ(DHAR)、グルタチオンレダクターゼ(GR)の働きによって、もとの状態に戻される(Asada 2000, Asada 2006)。本研究は、この回路で働く酵素に着目し、これらの酵素を葉緑体内で強発現させることにより、ストレスに強い植物を作出することを目的とした。

いくつかの先行研究で、APX、SOD、MDAR、DHAR 及び GR をコードする遺伝子を、それぞれタバコの核ゲノムに導入した形質転換植物はすでに作出されており、これらの組換え体ではメチルピオロゲン処理など、ROS 発生をともなう、ある種のストレスへの耐性が向上したと報告されている(Aono et al. 1993, Gupta et al. 1993, Torsethaugen et al. 1997, Kwon et al. 2003, Badawi et al. 2004, Eltayeb et al. 2007, Lee et al. 2007)。そこで本研究では、核の遺伝子組換えと比べて利点の多い葉緑体の遺伝子組換え技術を利用して、APX、MDAR 及び DHAR をコードする遺伝子(以下 *apx*、*mdar* 及び *dhar* と呼ぶ)を葉

緑体ゲノムに持つ遺伝子組換えタバコ (*Nicotiana tabacum*) を作出し、目的遺伝子の導入、導入遺伝子の転写・翻訳を種々の分子生物学的方法で調べ、組換え体における当該酵素の活性測定とストレス耐性の評価を行った。また本研究では、原核生物型を基本とする葉緑体の遺伝子の構成にならない、活性酸素の消去に関わる複数個の酵素遺伝子で構成された新しい2種類の「オペロン」(apx_dhar 及び mdar_dhar) を人為的に構築し、これらのオペロンをタバコ葉緑体ゲノムへ導入することに成功した。これらの組換え体については、時間の関係で未だストレス耐性の評価を終えていないが、遺伝子を単独で持つ組換え体に比べ活性酸素を消去する効率が高く、ストレス耐性がさらに向上しているものと予測される。本報告書では、これらの育成についても述べる。

3. 2. 材料と方法

3.2.1 遺伝子の単離

a) apx と dhar

タバコのストロマ型の APX 及び DHAR をコードする cDNA クローンは、すでにその構造が明らかになっている (Yoshimura et al. 2002, Chen et al. 2003)。またこれらの cDNA は、当研究室で単離され (辻村、私信)、葉緑体形質転換ベクターである pPRV112A' にクローニングされている (辻村ら 2005)。本研究では、このコンストラクトを用いてタバコの葉緑体形質転換を行った。

b) mdar

タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SR1、以下 SR1) の葉から調製した cDNA を鋳型に、mdar_R1 (5'-CTTGAGTAGAAATACGGGAGATAATC-3') と mdar_5'a

(5'-TCTATTGTCGCGACGTTTC-3') のプライマーペアを用いて、Ex-Taq (Takara) により RT-PCR を行った。PCR は 94°C30 秒の熱変性後、94°C45 秒、55°C45 秒、72°C1 分のサイクルを 30 回繰り返すことで行った。PCR により増幅した 1.8kb の大きさを持つ DNA 断片を精製し、pGEM-T Easy plasmid vector (Promega) にクローニングした。得られた 4 つの cDNA クローンについて、表 2 に示す 7 種類のプライマーを用い、CEQ2000

オートシーケンサー (Beckman Coulter) を使用して、定法により塩基配列を決定した。これらのコンセンサス配列からアミノ酸配列を推定し、トランジットペプチドと思われる領域のすぐ内側及びコード領域内の 3'末端に制限酵素サイト

表2. mdar cDNAクローンのシーケンシングに用いたプライマー

プライマー	塩基列 (5'→3')	位置 ¹⁾	一致 ²⁾
M13 -47	CGCCAGGGTTTCCCAAGTCACGAC		
pBS II CR	TGACCATGATTACGCCAAGC		
mdar_5Rfirst	ATCAGGAGTTGCCTCTCAC	390-409	95.0%
mdar_R2	AACCACGTCAAATGGATGACAGC	947-970	95.6%
mdar_F2	AGCTCTGCATTTGTGACCAAAGAGC	571-594	100.0%
mdar_estR	CTCCATTGGAGATGTTGCAGC	1535-1556	90.5%
mdar_F3	GTATAGAGACAGACACGGTC	903-922	100.0%

1) mdarの最初のATGのAを1とする。(トランジットペプチドを含む)
2) プライマーと遺伝子の塩基配列の相同性

を含む2つのプライマーを設計した(表3)。

このプライマーペアを用い、コンセンサス配列と同じアミノ酸配列をもつクローン(pGEM_mdar #7)を鋳型としてKOD⁺(Toyobo)によりmdarのコード領域をPCRにより増幅した。なお、PCRの条件は、94°C

表3. mdarの増幅に用いたプライマー

プライマー ¹⁾	配列 ²⁾ (5'→3')
NcoI_mdar_F	CTTCCATGGCTAATGAGAATCGAGAG
SphI_mdar_R	AACGCATGCTTCAGTCTATAAGGAAG

1) トランジットペプチドを除くコード領域を増幅するプライマー
2) 赤字のイタリックは制限酵素サイトを示す

3分の変性後、94°C15秒、55°C30秒、68°C1分45秒を20サイクルに設定した。増幅した1.3kbのDNA断片をゲルから回収し、Nco IとSph Iで消化した後、これを中間ベクターpPT(pGEM-T EasyのマルチクローニングサイトにタバコのpsbAのプロモーター及びrps16のターミネーターを導入したベクター)のマルチクローニングサイトに挿入し、pPT_mdarを構築した。pPT_mdarをApa Iで消化し、KOD(Toyobo)を用いてDNAの両末端を平滑化した後、これをSal Iで消化した。これら一連の処理で調製したmdarの発現カセットをpPRV112A'のSma I/Sal Iサイトにクローニングし、葉緑体の形質転換に使用するコンストラクト(pPRV112A'_mdar)を得た。

3.2.2 オペロンの作製

a) apx_dhar

タバコ葉緑体のRuBisCO大サブユニット遺伝子(rbcL)のリボソーム結合部位(5'-AGTTGTAGGGAGGGATCC-3'、以下RBS)(Staub & Maliga 1995)及び制限酵素Sph Iサイトを含むプライマーを設計した。表4にPCRに用いたプライマーと塩基配列を示す。

pPT_dharを鋳型に、94°C3分の変性後、KOD⁺を用いて94°C15秒、55°C30秒、68°C1分の反応を20サイクル行う条件でPCRを行い、RBSを付加したdhar断片を増幅した。ゲル回収により調製した増幅断片及びpPT_apxをそれぞれSph Iで消化した後、両者をライゲーションハイ(Toyobo)で結合し、pPT_apx_dharを得た。これから発現カセットを、pPRV112A'_mdarの構築と同様の手順でpPRV112A'にクローニングし、pPRV112A'_apx_dharを得た。

表4. オペロンの作製に用いたプライマー

プライマー	配列 ¹⁾²⁾ (5'→3')
SphI_rbs_dhar	AAGCATGCAGTTGTAGGGAGGGATCCATG GCTGTTGAAATCTGTGCAAG
pBS_SK_R	GTTGTGTGGAATTGTGAGCG

1) 赤字のイタリックは制限酵素サイトを示す
2) 赤字はリボソーム結合部位を示す

b) mdar_dhar

pPT_mdarに、RBSを付加したdharを結合し、pPT_mdar_dharを構築した。また、pPT_mdar_dharからpPRV112A'_mdar_dharを構築した。なおプラスミドの構築は、上記a)と同じ方法で行った。

3.2.3 タバコ葉緑体の形質転換

MS 培地を含むプラントボックスで、無菌的に約 1 ヶ月間成育させたタバコ (SR1) を葉緑体の形質転換に使用した。MS- I ~IV (V は除く) 及び α -ナフチル酢酸 (0.1mg/L)、6-ベンジルアミノプリン (1mg/L)、チアミン塩酸 (1mg/L) を含むシャーレ上の培地の上に濾紙を置き、タバコの葉をクリーンベンチ内で切り出して、葉の裏面が上になるように濾紙上に静置した。カミソリの刃で葉脈を切断して、葉の全体が培地に密着するようにし、25°C の植物育成用のインキュベーターで一晩静置した。60mg/mL に調製した金粒子 (ϕ 1.0mm もしくは ϕ 0.6mm) の懸濁液 50 μ L を、10 μ g の葉緑体形質転換用ベクター DNA、10 μ L の塩化カルシウム (2.5M)、20 μ L のスペルミジン (0.1M) とともに、4°C で 30 分間ボルテックス攪拌して、金粒子に DNA を吸着させた。DNA が吸着した金粒子をエタノールで洗浄し、塩を除去した後、30 μ L のエタノールに再懸濁した。PDS-1000/He (Bio-Rad) を用いて、パーティクルボンバードメントを行った。金粒子が ϕ 1.0mm のときには 1100 psi、 ϕ 0.6mm のときには 1300 psi のラプチャーディスクをそれぞれ使用した。装置の最上段に DNA サンプルを置き、撃ち込まれる葉の位置は、金粒子が ϕ 1.0mm のときには装置の下から 2 段目、 ϕ 0.6mm のときには下から 3 段目とした。1 回の実験で 6 ショット実施した (i. e. タバコの葉 6 枚分に相当)。金粒子が撃ち込まれた葉を植物用インキュベーター (25°C) に置き、約 48 時間後に葉を剃刀で細かく (5mm 角程度) 切り分け、スペクチノマイシン (500mg/L) を含む選抜培地に葉の表面が下向きになるように静置した。25°C の植物用インキュベーター (明期: 16 時間、暗期: 8 時間) で約 3~6 週間の選抜を行った。なお、パーティクルボンバードメントに用いた装置及び器具は、すべて Bio-Rad 社製のものであり、これらを装置に付属のマニュアルに従って使用した (Daniell et al. 2001)。

3.2.4 PCR による導入遺伝子の有無の確認

選抜培地上に静置した葉切片から出現したシュートをプラントボックスへ移植し、これを幼植物へと育てた。植物が適当な大きさになったとき、葉から DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を使用し、全 DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型に 20 μ L の反応液量で rTaq DNA polymerase (Toyobo) を用いて種々のプライマーペアによる PCR を行い、目的遺伝子が葉緑体ゲノムの標的部位に導入されているか調べた。PCR に用いたプライマーペアは、pPRV112A' が持つ葉緑体ゲノムとの相同領域の外側に位置する、葉緑体 DNA 配列に特異的なもの (T/low : 5'-CCTCATACGGCTCCTCGTTC-3') と導入遺伝子に特異的なもの、及び選抜マーカー *aadA* に特異的なもの (aadA2R :

5'-CTTCGGCGATAACCGCTTCACGAG-3')と導入遺伝子特異的なものの2種類である。PCRの条件は、94°C3分の変性後、変性94°C30秒、アニーリング55°C30秒、伸長反応72°C2分のサイクルを30回繰り返すものであり、導入遺伝子ごとにプライマーの組合せを換えた。この実験に使用したPCRプライマー及びその塩基配列を表5にまとめた。

表5. 導入遺伝子の増幅に用いたプライマー

T/lowとの組合せ			
導入遺伝子	プライマー	配列(5'→3')	増幅断片サイズ
<i>apx</i>	apxR3	GATTGGCTGGAGAAGTTTCAGTG	約1.7kb
<i>mdar</i>	mdarR3	CCTATATAGCCACCACCAAC	約2.1kb
<i>dhar</i>	dharR2	CAATAACATCAGAATCAGGGATC	約1.8kb
<i>apx_dhar</i>	apxR3	GATTGGCTGGAGAAGTTTCAGTG	約1.7kb
<i>mdar_dhar</i>	mdarR3	CCTATATAGCCACCACCAAC	約2.1kb

aadAR2との組合せ			
導入遺伝子	プライマー	配列(5'→3')	増幅断片サイズ
<i>apx</i>	apxF2	CGCCGCGTCTGATTCTGATC	約1.6kb
<i>mdar</i>	mdarF3	GTATAGAGACAGACACGGTC	約1.2kb
<i>dhar</i>	dharF2	CTAGTGACGGTACTGAGCAG	約1.0kb
<i>apx_dhar</i>	dharF2	CTAGTGACGGTACTGAGCAG	約1.0kb
<i>mdar_dhar</i>	dharF2	CTAGTGACGGTACTGAGCAG	約1.0kb

3.2.5 Southern 解析

上記のPCRにより、目的遺伝子が葉緑体ゲノムへ導入されていることが確認された個体については、組換え体ゲノムがホモプラスミックであるか、あるいはヘテロプラスミックであるかを確認するため、Southern解析を行った。育成したタバコの葉からDNeasy plant mini kit (QIAGEN) を使用して全DNA抽出し、その2μgを*Sac*IIで消化した後、0.8%のアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後、DNAをナイロン膜(Biodyne Plus, Pall)に転写した。プローブを調製するため、導入遺伝子を含むpPTコンストラクト、あるいは野生型タバコの全DNAを鋳型にPCRを行ない、導入遺伝子あるいはタバコの葉緑体ゲノムの標的部位を含むDNA断片を増幅した。

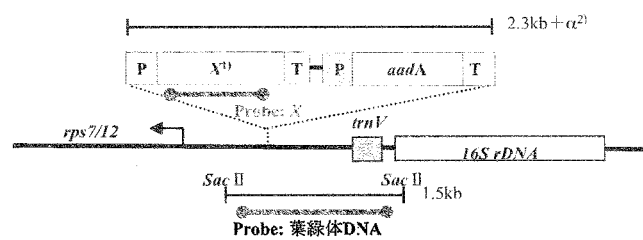


図12. Southern解析に用いたプローブ
 1) X: *apx*, *mdar*, *dhar*, *apx_dhar*, *mdar_dhar*
 2) a: 導入遺伝子のサイズ (表6)

増幅DNA断片をゲルから回収し、これらをDIG labeling kit (Roche)のランダムヘキサマーを用いて標識し、ハイブリダイゼーションのプローブとした(図12、表6)。なお、ハイブリダイゼーションは68°Cで一晩行ない、NBT/BICPを用いた発色法によりシグナルを検出した。ハイブリダイゼーション、ポストハイブリダイゼーション及びシ

グナルの検出反応は、すべてマニュアル (Dig application manual for filter hybridization、Roche) 記載の方法によった。

3.2.6 RT-PCR

発芽後 4 ヶ月の葉緑体形質転換体の T₁ 世代及び野生型タバコ (SR1) の葉より、RNeasy plant mini kit (QIAGEN) を用いて、添付プロトコールに従い、全 RNA を抽出した。残存 DNA を DNase I 処理により取り除いた後、この全 RNA 2.4µg を鋳型に、ランダムヘキサマーを用いて、逆転写酵素 Superscript II (Invitrogen) により cDNA を合成した (条件は添付プロトコールに従った)。この cDNA を鋳型に、導入遺伝子特異的なプライマーペアで PCR を行った (表 7)。

表 6. 導入遺伝子/オペロンのサイズ

遺伝子/オペロン	サイズ(bp)
<i>apx</i>	888
<i>mdar</i>	1330
<i>dhar</i>	636
<i>apx_dhar</i>	1575
<i>mdar_dhar</i>	2075

表 7. 3 種遺伝子の RT-PCR に用いたプライマー

遺伝子	プライマー	記列 (5'→3')	増幅サイズ
<i>apx</i>	apx_Trps16R	CGTCGCATGCAGAACTAAAAG	845bp
	apxF2	CGCCGCGTCTGATTCTGATC	
<i>mdar</i>	mdar_Trps16R	GTCGCATGCTTCAGTCTATAAG	870bp
	mdarF4	TCATTAATTTCCTCACTGGGG	
<i>dhar</i>	dhar_Trps16R	GTCGCATGCTAACTTCCTGCG	350bp
	dharF2	CTAGTGACGGTACTGAGCAG	

3.2.7 Northern 解析

上記方法により調製した全 RNA 3µg を、1.25% のアガロースゲル (5% のホルムアルデヒドを含む) を用いて電気泳動した後、ナイロン膜に転写した。3.2.5 で使用したのと同じ DNA プローブを用いて、50 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行ない (DIG Easy Hyb、Roche)、LumigenPPD (WAKO) を用いた発光法によりシグナルを検出した。ハイブリダイゼーション、ポストハイブリダイゼーション及びシグナルの検出反応は、すべてマニュアル (Dig application manual for filter hybridization、Roche) に記載された方法で行った。

3.2.8 タンパク質抽出

液体窒素で凍結させたタバコの葉 (1g) を乳鉢乳棒で粉砕し、タンパク質抽出バッファー 1ml を加えて、すりつぶした。抽出物を 14,000 rpm、15 分間、4°C で遠心し、上清を回収して、SDS-PAGE/Western 解析、Native-PAGE/活性染色、及び酵素活性測定などの実験に用いた。タンパク質の定量は BSA をスタンダードに、プロテインアッセイキット (Bio-Rad) を使用して行った。タンパク質の抽出に用いたバッファーの組成を表 8 に示す。

3.2.9 SDS-PAGE 及び Western 解析

抽出したタンパク質を 2 枚のポリアクリルアミドゲル (APX と MDAR は 12.5%、DHAR は 15%) を使用して同時に電気泳動し、1 枚は CBB 染色 (Bio Safe、Bio-Rad)、もう 1 枚は転写装置 (トランスプロット SD、Bio-Rad) を用いて、1 時間 5V の電圧をかけ、ニトロセルロース膜 (Hybond-ECL、Amersham Biosciences) に転写した。Western 解析

のブロッキングは 5% のスキムミルクを含む TBS-T 溶液で行った。APX を検出するため、ホウレンソウ葉緑体由来のアスコルビン酸ペルオキシダーゼに対する一次抗体 (IS Japan) を 50ng/mL の濃度で反応させた。ペルオキシダーゼを結合させた二次抗体 (抗マウス IgG、AP Biotech) は 5000 倍に希釈して使用した。MDAR の検出には、キュウリのペルオキシソーム型のモノデヒドロアスコルビン酸レダクターゼの一次抗体 (京都府立大学の佐野先生より分譲) を 1000 倍に希釈して用いた。ペルオキシダーゼを結合させた二次抗体 (抗ラビット IgG、WAKO) は 5000 倍希釈で使用した。上記いずれの場合も、検出には Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いた。また、検出の感度が低いときにかぎり、Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を使用した。

表 8. タンパク質抽出液

酵素	実験	抽出液
APX	SDS-PAGE	100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)
	活性染色	5mM アスコルビン酸 1mM EDTA
MDAR	SDS-PAGE	50mM HEPES-KOH (pH 7.6)
	活性測定	
DHAR	SDS-PAGE	50mM Tris-HCl (pH 7.4)
	活性染色	100mM NaCl 2mM EDTA 1mM MgCl ₂

3.2.10 活性染色

a) APX 活性染色

SDS を含まない 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、50 μ g のタンパク質試料をゲル 1 枚あたり 15mA の条件で、80 分間、低温室で電気泳動した。活性染色の方法は文献 (Mittler & Zilinskas 1993) に従い、最終的にゲルを NBT と TEMED により染色した。

b) DHAR 活性染色

50 μ g のタンパク質試料を、1% のアガロースゲル用いて、電気泳動装置を冷却しながら 100V で 70 分間泳動した。電気泳動用の緩衝液には 190mM グリシンを含む、25mM Tris-HCl (pH 8.3) を使用した。電気泳動後のゲルを DHAR の基質を含む 100mM のリン酸ナトリウム緩衝液 (2mM デヒドロアスコルビン酸、4mM 還元型グルタチオン) に室温で 15 分間浸した。その後、ゲルを蒸留水で洗浄し、染色液に浸して 20 分間、暗

所に静置した (Paciolla et al. 2001)。

3.2.11 酵素活性の測定

a) MDAR の活性測定

MDAR の活性測定は、吸光度計 U-3310 (日立) を使用して、室温で行った。まず MDAR の基質となるモノデヒドロアスコルビン酸 (MDA) の発生量を調節するため、反応液に加える市販のキュウリのアスコルビン酸オキシダーゼ (Toyobo) (1mg/mL、溶媒は 50mM HEPES-KOH pH7.6) の量 (3 μ L~5 μ L) を以下の方法で決定した。全反応液 1mL (50mM HEPES-KOH pH7.6、2.5mM アスコルビン酸) に適当量のアスコルビン酸オキシダーゼを加え、360nm の吸光度の経時変化を測定した。この方法では、吸光度が 0.01 上昇すると 3mM の MDA が発生していると考えられ、0.01 以上では MDA 同士の反応で、逆に MDA が減少するとされる。そこで吸光度を 0.01 上昇させるアスコルビン酸オキシダーゼの量を測定の都度求めた。

MDAR の活性測定は以下の方法によった。すなわち、反応液 1mL (50mM HEPES-KOH pH7.6、2.5mM アスコルビン酸、0.1mM NADH) に 10 μ L の試料 (i. e. タンパク質抽出液) を加え、吸光度が安定するのをしばらく待ってから、吸光度計のゼロ点補正を行った。上記実験であらかじめ適当量を決定したアスコルビン酸オキシダーゼを反応液に添加し、よく攪拌した後、すぐに 340nm ($\epsilon_{340}=6.2\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) の吸光度の減少を経時的に測定することで、MDAR による反応液中の NADH の減少速度を決定した。なお、反応液に加えるタンパク質量は、吸光度の減少速度に応じて希釈により調節し、MDAR の活性を以下の計算式で算出した。

$$(1 \text{ 分間当りの NADH の減少速度} \div 6.2\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times \text{反応液量} \times \text{タンパク質抽出液量}$$
$$= (\Delta A_{340}\text{min}^{-1} \div 6.2\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 1\text{mL}/1000\text{mL} \times 1000\mu\text{L}/10\mu\text{L}$$

unit = $\mu\text{molNADHmin}^{-1}$ に換算後、タンパク質 1mg あたりの活性を算出。

3.2.12 ストレス耐性の検定

a) メチルビオロゲン (パラコート) 処理

24 穴のマイクロタイタープレート (Iwaki) にメチルビオロゲン水溶液の希釈系列 (0 μ M、0.2 μ M、0.4 μ M、0.6 μ M、0.8 μ M、1.0 μ M、いずれも 0.1% の Tween20 を含む) を 1.5ml ずつ分注した。葉脈を含まないように切り抜いた直径 1cm のリーフディスクを希釈系列に浸し、プレートを植物用インキュベーター内で 62 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光の連続照射下、25 $^{\circ}$ C で 40 時間、静置した。

b) 亜硫酸ナトリウム処理

上記 a) のメチルビオロゲン水溶液の希釈系列を、亜硫酸ナトリウムの希釈系列 (0mM、10mM、20mM、30mM、40mM、50mM、それぞれ 0.1% の Tween20 を含む) に換え、同じ方法でリーフディスクを処理した。

c) 強光処理

発芽後 2 週間の幼植物をプラントボックスに移植し、 $350\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (明期 16 時間、暗期 8 時間) の光を照射して、植物用インキュベーターで 2 週間、 25°C で育成した。

d) クロロフィル含量の測定

ストレス耐性を定量化するため、a) と同様の方法で調製したリーフディスクを、3 種類の水溶液 (0.1% Tween20、0.1% Tween20 + 0.5mM メチルビオロゲン、及び 0.1% Tween20 + 20mM 亜硫酸ナトリウム) それぞれに浸し、 $62\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を連続照射して、 25°C で 40 時間、静置した。その後、1 枚のリーフディスクを 1ml の N,N-ジメチルホルムアミドに浸し、遮光した状態で、低温 (5°C) で一晩以上静置した。この N,N-ジメチルホルムアミドに溶出されたクロロフィルの吸光度を 647nm、664nm、750nm の 3 つの波長で測定し、以下の計算式 (Porra 1988) を用いてクロロフィル含量を算出した。

$$\text{クロロフィル a } (\mu\text{g/mL}) = 12 \times A_{664} - 3.11 \times A_{647}$$

$$\text{クロロフィル b } (\mu\text{g/mL}) = 20.78 \times A_{647} - 4.88 \times A_{664}$$

$$\text{クロロフィル a+b } (\mu\text{g/mL}) = 7.12 \times (A_{664} - A_{750}) + 17.67 \times (A_{647} - A_{750})$$

ストレスを与えたリーフディスクの残存クロロフィル量の割合はコントロール溶液 (0.1% Tween20) に浸したリーフディスクの残存クロロフィル量との相対値で示した。

3.2.13 正逆交雑

葉緑体の形質転換体 (*apx*、*mdar*) の T_1 世代と野生型タバコ (SR1) を用いて正逆交雑を行い、それぞれの組合せで F_1 種子を得た。得られた F_1 種子を 500mg/L のスペクチノマイシンを含む MS 培地に無菌的に播種した。

3.2.14 pPRV112A'_*apx* の *apx* の転写方向の変更 (*apx_re*)

pPRV112A'_*apx* のプロモーター (*PpsbA*) とターミネーター (*Trps16*) の外側に位置する 4 種類のプライマーを設計した (表 9、図 13)。なお、これらのプライマーには、それぞれ制限酵素サイトが導入されている。1 組のプライマーペアで pPRV112A'_*apx* のインサート部分を PCR 増幅し (図 13、青)、もう 1 組のプライマーペア (図 13、赤) でベクターの骨格部分を PCR 増幅した。両方の増幅産物を制限酵素で消化した後、ライゲーション反応で結合させ、*apx_re* を得た。

表9. *apx_re*の作製に用いたプライマー

プライマー	配列 ¹⁾ (5'→3')
Nhe1 F out2	TTGCTAGCGAGCTCGAATTGGCCGCTCTAG
Xba1 R out2	AA7CTAGATGTCAGGCATGCAAGCTGGCCGC
Nhe1_F_insert2	AAGCTAGCGGCAGTTGACAATTGGTGGCGG
Xba1_R_insert2	GATCTAGACCAATTCGAGCTCGGTACCCCG

1) 赤字のイタリックは制限酵素サイトを示す

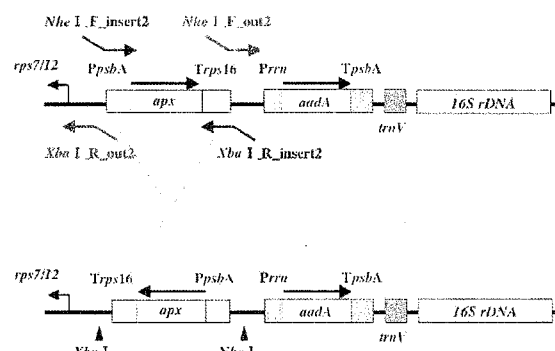


図13. *apx_re*の作製に用いたプライマー

3. 3. 結果

3.3.1 MDAR 遺伝子の単離

単離した4つの *mdar* の cDNA クローンをシークエンシングした結果、これらはいずれも490個のアミノ酸をコードする1,470bpの open reading frame を含んでいた。cDNA から推定されるアミノ酸配列を Web (<http://wolfsort.org/>) 上の WoLF PSORT プログラムにより解析し、タンパク質の細胞内局在部位を予測したところ、本実験により単離された cDNA は、葉緑体局在型の MDAR をコードしているものと予測された。このアミノ酸配列をホウレンソウ、トマト、シロイヌナズナ、イネの MDAR のアミノ酸配列と比較したところ、N末端側の55アミノ酸の保存性が低く、この部分が MDAR を葉緑体へ運ぶトランジットペプチド領域に相当すると考えられた。また、トランジットペプチド領域を除いたアミノ酸配列を上記 WoLF PSORT プログラムで再び解析すると、葉緑体への局在は予測されなくなった。本研究では、*mdar* の cDNA の56番目のコドンから、終止コドン(491番目)までに相当する塩基配列の5'端に、開始コドン(ATG)を付加したDNA断片を pPT へクローニングし、葉緑体内で働く *mdar* として用いた。

3.3.2 パーティクルボンバードメント

本研究では、*apx*、*mdar* 及び *dhar* の各遺伝子を持つ葉緑体形質転換ベクター (pPRV112'_*apx*、pPRV112'_*mdar*、pPRV112'_*mdar*)、及び *apx_dhar*、*mdar_dhar* の各オペロンを持つ葉緑体形質転換ベクター (pPRV112'_*apx_dhar*、pPRV112'_*mdar_dhar*) を、パーティクルボンバードメント法により、タバコの葉に撃ち込んだ。その際、DNA をコーティングする金粒子の大きさ、撃つ圧力、葉までの距離を変えて、葉緑体の形質転換体の出現効率を比較した。実験の結果を表10にまとめた。

表 10. ボンバードメント実験のまとめ

遺伝子	ショット数	シュート数	組換え体数	効率 ¹⁾
<i>apx</i>	90	10	2	2%
<i>apx_re</i>	12	7	4	33%
<i>mdar</i>	36	7	2	6%
<i>dhar</i>	166	20	0	0%
	12	3	2	17%
<i>apx_dhar</i>	138	13	0	0%
	42	15	3	7%
<i>mdar_dhar</i>	36	2	0	0%
	36	27	5	14%
合計	568	104	17	

1) 組換え体数÷ショット数

2) ∴ の行は金粒子φ0.6μmを用いて行った実験結果

3.3.3 APX

a) 導入遺伝子の増幅

プライマーT/low と *apxR3* の組合せ、及びプライマー*aadAR2* と *apxF2* の組合せで PCR を行ったところ、それぞれに予想される 1.7kb 及び 1.6kb の大きさの PCR 断片が 3 個体に観察された (図 5)。

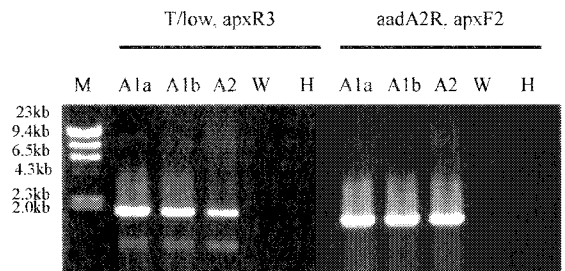


図14. PCRによる導入遺伝子 (*apx*) の増幅
A1a, A1b, A2は組換え体を示す。なお、A1とA2は独立したシュートに由来し、aとbは一つのシュートを切り分けた別個体に由来する。
M: マーカー (λ HindIII), W: 野生型タバコ (SR1), H: H₂O

b) Southern 解析

標的部位を含む葉緑体 DNA 断片をプローブとして行ったハイブリダイゼーションでは、組換え体 A1a 及び A1b の T₀ 世代、及び両者の T₁ 世代に、タバコの野生型 (SR1) と同じ 1.5kb のバンドが検出された。一方、組換え体 A2 の T₀ 世代及び T₁ 世代では、このバンドはわずかに確認される程度であった。*apx* の遺伝子プローブを用いて行ったハイブリダイゼーションでは、すべての組換え体にシグナルが検出された (図 15)。

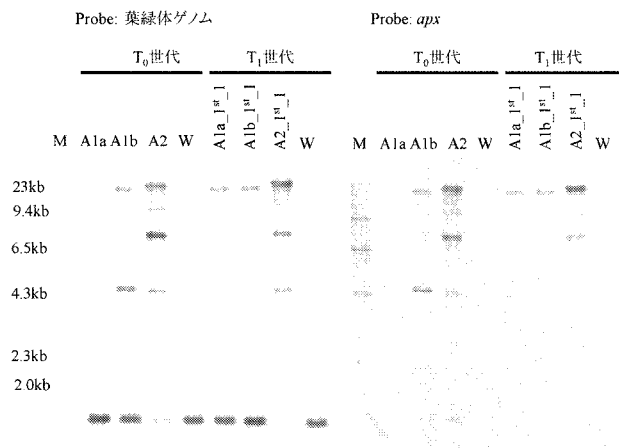


図 15. Southern 解析 (APX)
 A1a, A1b, A2の説明は図14参照。1stはT₁世代を表わす。
 M: マーカー(λ /HindIII)
 W: 野生型タバコ(SR1)

c) RT-PCR

導入遺伝子特異的なプライマーペアによる RT-PCR では、T₁ 世代の組換え体すべてに予想されるサイズ (0.9kb) のバンドが増幅した (図 16)。

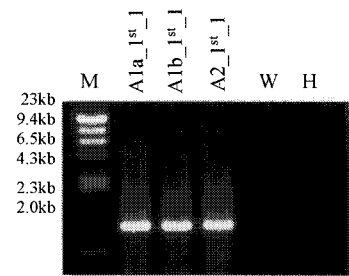


図16. RT-PCR (APX)
 A1a, A1b, A2は図14参照。
 M: マーカー(λ /HindIII), W: 野生型タバコ(SR1), H: H₂O

d) Northern 解析

apx 遺伝子をプローブとする Northern 解析では、調べた T₁ 世代の組換え体すべてに、予想されるサイズ (約 1.3kb) のバンドが検出された (図 17)。またこの遺伝子プローブは約 2.6kb の RNA にも弱くハイブリダイズした。同じメンブレンを用いて *aadA* 遺伝子プローブによるハイブリダイゼーションを行った結果、約 2.6kb のバンドが検出された (データ未掲載)。

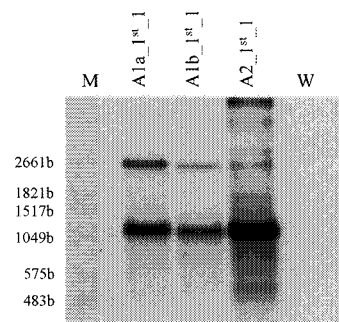


図 1 7 . Northern解析 (APX)
 A1a, A1b, A2は図5, 6参照。
 M: マーカー
 W: 野生型タバコ(SR1)

e) SDS-PAGE 及び Western 解析

組換え体 T₁ 世代及び野生型タバコから調製したタンパク質の SDS-PAGE 後の CBB 染色では、組換え体にも約 33kDa のバンドが観察された (図 18-A)。これと同様のゲルを用いた Western 解析では、この 33kDa のバンドの位置に抗体が結合し、ECL の発光シグナルが検出された (図 18-B)。

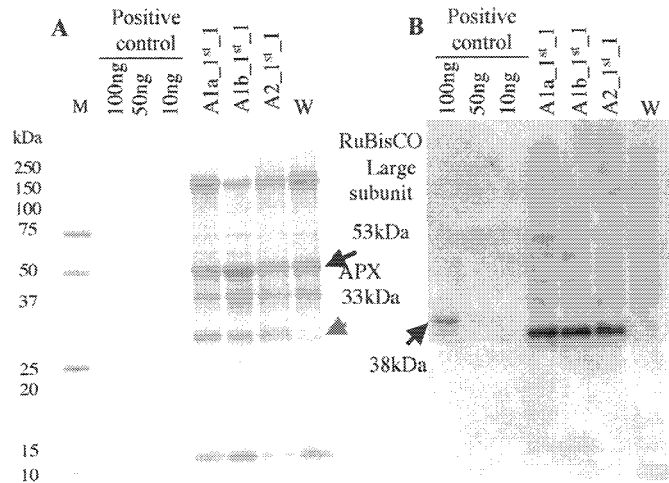


図18. SDS-PAGEおよびWestern解析 (APX)

A1a, A1b, A2は図14参照。

Positive controlには、大腸菌で発現させた apx をHisタグで精製した融合タンパク質を用いた。M: 分子サイズマーカー, W: 野生型タバコ (SR1)

f) 活性染色

前述のタンパク質を Native-PAGE により分離して、APX の活性染色を行ったところ、組換え体のタンパク質を泳動したレーンには非常に高い活性が観察された。一方、野生型タバコのタンパク質の泳動レーンには、APX 活性を表す染色されていない部分が、わずかに観察されたのみであった (図 19)。

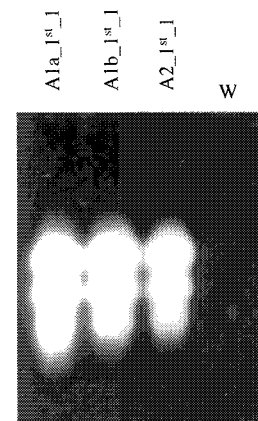


図19. APXの活性染色
A1a, A1b, A2は図14参照。
W: 野生型タバコ (SR1)

3.3.4. MDAR

a) 導入遺伝子の増幅

プライマーT/low と *mdarR3* の組合せ、及びプライマー と *mdarF3* の組合せでPCRを行ったところ、独立した2つのシュートに由来する4個体で、それぞれ予想される2.1kb及び1.2kbの大きさの断片が増幅した(図20)。

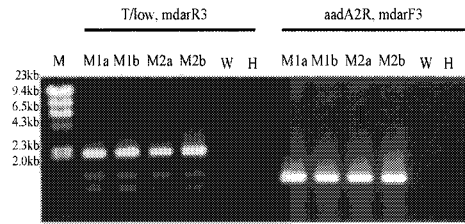


図20. PCRによる*mdar*遺伝子の増幅
M1a, M1b, M2a, M2bは組換え体を示す。
M1とM2は独立したシュートに由来し、aとbは一つのシュートを切り分けた別個体。
M: マーカー(λ /HindIII), W: 野生型タバコ(SR1), H: H₂O

b) Southern 解析

葉緑体 DNA プロブを用いて行ったT₀世代のSouthern解析では、組換え体M2aに野生型と同じ1.5kbのバンドが確認された。また、組換え体M2bにも、このバンドがわずかに検出されたが、組換え体M1a及びM1bには、このバンドは全く検出されなかった。T₁世代では、T₀世代でわずかに検出されたM2bの野生型のバンドが消失した。一方、個体M2a_1st_1には、野生型のバンドがはっきり認められた。*mdar* 遺伝子プロブを用いたSouthern解析では、野生型を除く全ての個体にハイブリダイゼーションシグナルが認められた(図21)。

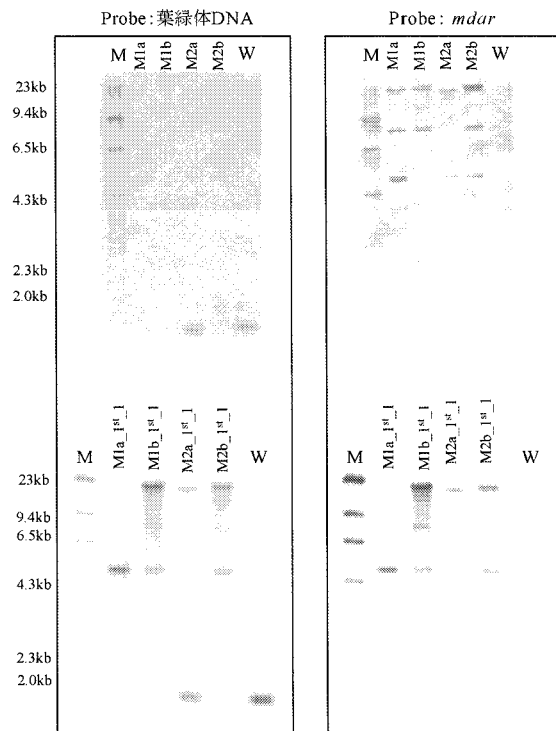


図21. Southern解析(MDAR)
M1a, M1b, M2a, M2bは図20参照。1stはT₁世代を表わす。
M: マーカー(λ /HindIII), W: 野生型タバコ(SR1)

c) RT-PCR

mdar 特異的なプライマーを用いたRT-PCRでは、すべての組換え体に予想されるサイズ(0.9kb)のバンドが増幅した(図22)。

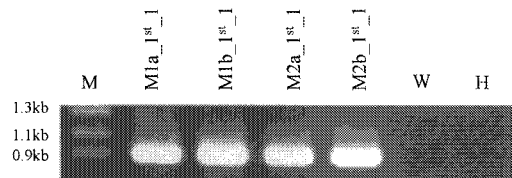


図22. RT-PCR(MDAR)
M1a, M1b, M2a, M2bは図20参照。
M: マーカー(ϕ x/HaeIII), W: 野生型タバコ(SR1), H: H₂O

d) Northern 解析

mdar 遺伝子をプローブに用いた Northern 解析では、野生型を除くすべての個体にハイブリダイゼーションシグナルが観察された (図 23)。このプローブは予想されるサイズ (約 1.5kb) の RNA の他、約 2.8kb の RNA にもハイブリダイズした。同じメンブレンを用いて *aadA* 遺伝子プローブによるハイブリダイゼーションを行った結果、約 2.8kb の RNA にハイブリダイズした (データ未掲載)。

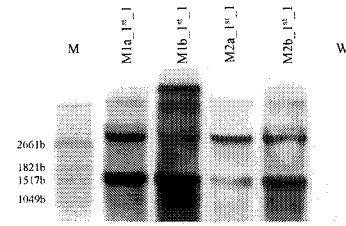


図23. Northern解析 (MDAR)
M1a, M1b, M2a, M2bは図20参照。
M: マーカー, W: 野生型タバコ (SR1)

e) SDS-PAGE 及び Western 解析

野生型タバコ及び組換え体 2 系統 (M1a 及び M2b) の T₁ 世代のそれぞれ 3 個体からタンパク質を調製した後、SDS-PAGE で分離して、CBB 染色による泳動パターンを観察したが、野生型と組換え体の間に顕著な違いは観察されなかった。また、今回用いた抗 MDAR 抗体は、RuBisCO 大サブユニットと非特異的な結合を示すことが判明し、Western 解析で MDAR だけを検出することはできなかった (図 24)。

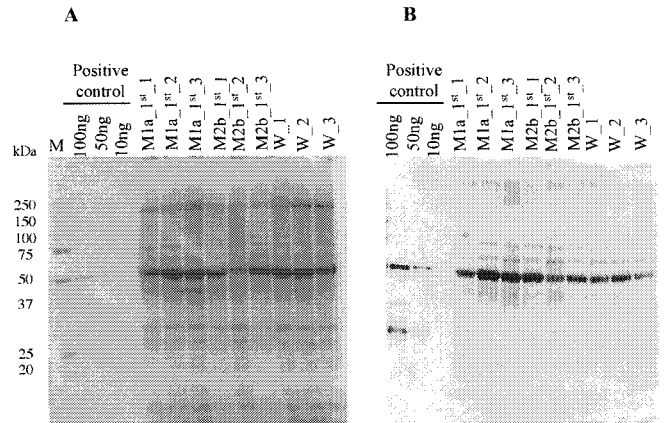


図24. SDS-PAGEおよびWestern解析 (MDAR)
M1a, M1b, M2a, M2bは図20参照。
Positive controlには、大腸菌で発現させた*mdar*をHisタグで精製した融合タンパク質を用いた。
M: 分子サイズマーカー, W: 野生型タバコ (SR1)

f) MDAR の活性

MDAR の遺伝子を導入した組換えタバコの MDAR 活性は、野生型タバコに比べ平均して約 11 倍高かった。M2b_1st_2 以外の組換え体 5 個体の MDAR 活性はほぼ同じ値を示し、M2b_1st_2 だけが他の組換え体より約 30%高い活性を示した (図 25)。

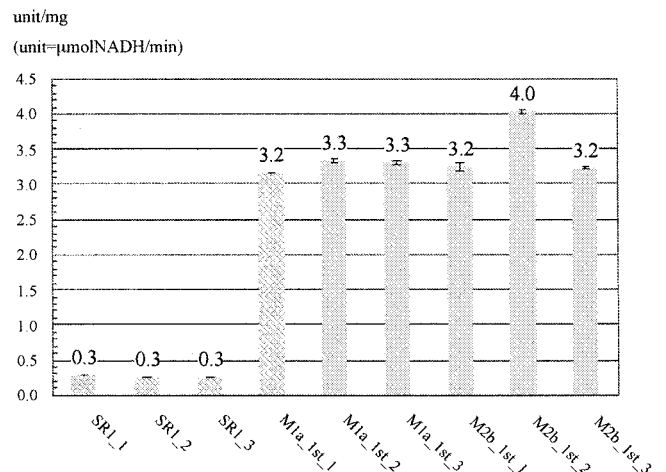


図25. 組換え体及び野生型タバコのMDAR活性
M1a, M1b, M2a, M2bは図20参照。SR1: 野生型タバコ (SR1)

3.3.5 DHAR

a) 導入遺伝子の増幅

プライマーT/low と dharR2 の組合せ、及びプライマーaadAR2 と dharF2 の組合せでPCRを行ったところ、独立に得られた2個体(D1, D2)で、予想される大きさの断片(1.8kb 及び1.0kb)が増幅した(図26)。

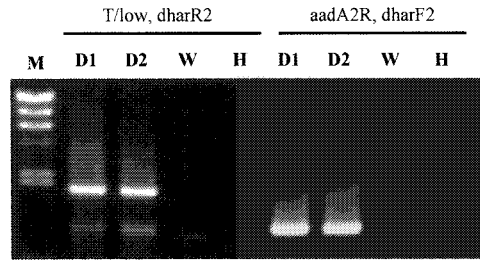


図26. PCRによる導入遺伝子 (*dhar*) の増幅
D1, D2は独立したシュートに由来する組換え体。
M: マーカー(λ HindIII), W: 野生型タバコ(SR1), H: H₂O

b) Southern 解析

葉緑体 DNA 断片をプローブとする Southern 解析では、D1 と D2 の T₀ 世代から調製した DNA の 4.3kb の位置にハイブリダイゼーションのシグナルが観察された。一方、これらの個体に野生型と同じサイズ(1.5kb)のバンドは認められなかった。D1 の T₁ 世代の Southern 解析でも上記と同じ結果となった。dhar プローブを用いて行った Southern 解析では、調べた T₀、T₁ 世代の組換え体のすべてに、4.3kb のハイブリダイゼーションシグナルが観察された(図27)。

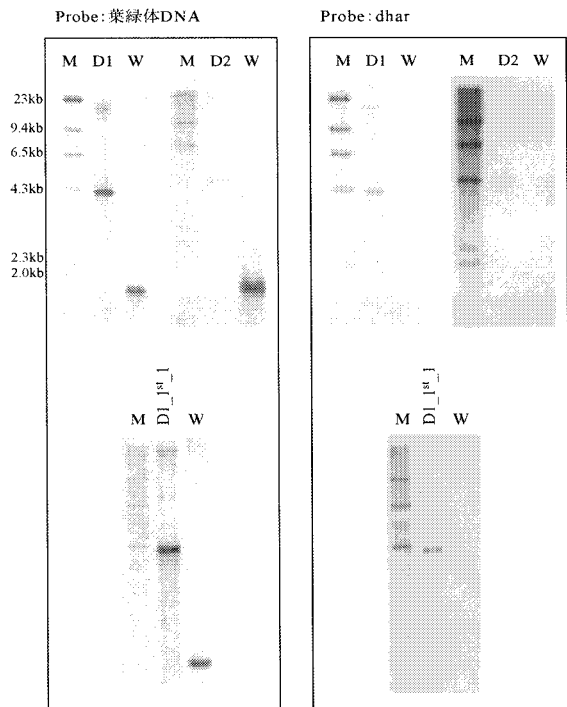


図27. Southern解析 (DHAR)
M: マーカー(λ HindIII)
D1, D2は図26を参照。1stは T₁ 世代を示す。
D2のデータはT₀世代のみ。W: 野生型タバコ(SR1)

c) RT-PCR

dhar に特異的なプライマーを用いた RT-PCR では、組換え体 (D1 の T₁ 世代) に、予想されるサイズ (350bp) のバンドが増幅した(図28)。

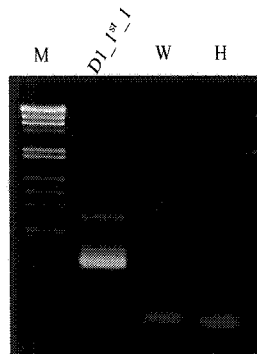


図28. RT-PCR (DHAR)
D1は図26を参照。
M: マーカー(λ HindIII), W: 野生型タバコ(SR1), H: H₂O

d) Northern 解析

dhar 遺伝子をプローブとする Northern 解析では、組換え体 (D1 の T₁ 世代) にのみ、ハイブリダイゼーションシグナルが観察された (図 29)。このプローブは予想されるサイズ (900bp) の RNA にハイブリダイズしたが、他のサイズ (約 2.5kb) の RNA にもハイブリダイズした。同じメンブレンを用いて *aadA* 遺伝子プローブによるハイブリダイゼーションを行った結果、約 2.5kb のバンドにハイブリダイズした (データ未掲載)。

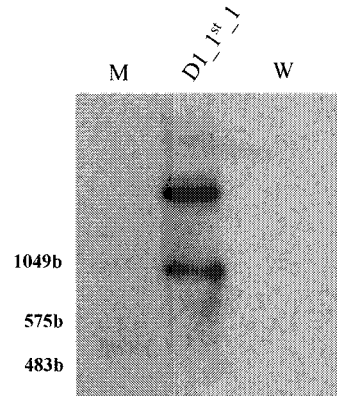


図29. Northern解析 (DHAR)
D1は図26を参照。
M: マーカー, W: 野生型タバコ (SR1)

e) SDS-PAGE

組換え体及び野生型タバコから調製したタンパク質の SDS-PAGE 後の CBB 染色では、組換え体にも、約 26kDa のバンドが観察された (図 30)。

f) 活性染色

前述のタンパク質をアガロースゲルにより分離して、DHAR の活性染色を行ったところ、組換え体及び野生型タバコともに、ゲルの中央に DHAR 活性を表す濃青色のバンドが認められた。一方、組換え体のタンパク質の泳動レーンには、原点に近い、より陽極側の部分に、野生型タバコにはない、広く濃いバンドが観察された (図 31)。

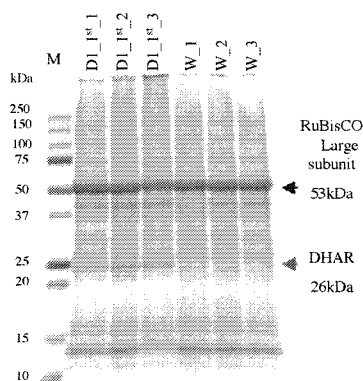


図30. SDS-PAGE (DHAR)
D1は図26を参照。
M: 分子サイズ マーカー, W: 野生型タバコ (SR1)

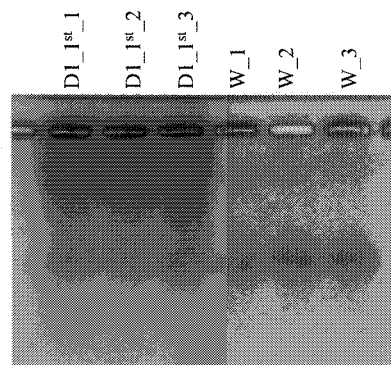


図31. DHARの活性染色
D1は図26を参照。
W: 野生型タバコ (SR1)

3.3.6 オペロン

a) 導入遺伝子の増幅

1) *apx_dhar*

プライマーT/low と *apxR3* の組合せ、及びプライマー*aadAR2* と *dharF2* の組合せでPCRを行ったところ、独立に得られた3個体(AD1, AD2, AD3)に、予想される大きさの増幅断片(1.7kb 及び 1.0kb) が得られた(図 32-A)。

2) *mdar_dhar*

プライマーT/low と *mdarR3* の組合せ、及びプライマー*aadAR2* と *dharF2* の組合せでPCRを行ったところ、独立に得られた5個体(MD1~MD5)に予想される大きさの増幅断片(2.0kb 及び 1.0kb) が得られた(図 32-B)。

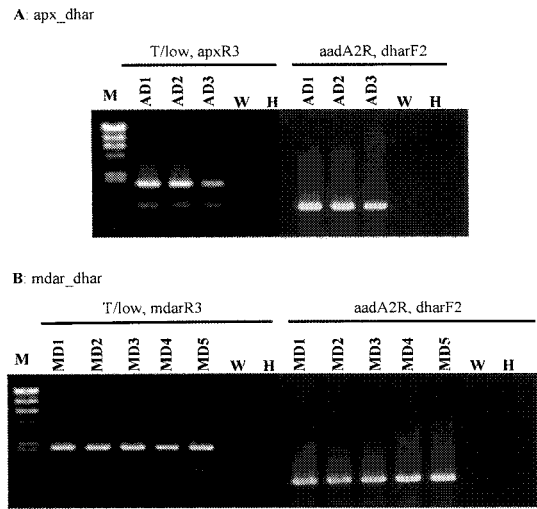


図32. PCRによる導入遺伝子(オペロン)の増幅
AD: *apx_dhar*を導入した組換え体。
MD: *mdar_dhar*を導入した組換え体。
なお、数字はそれぞれ独立に得られたシュートを示す。
M: マーカー(λ HindIII), W: 野生型タバコ(SR1), H: H₂O

b) Southern 解析

1) *apx_dhar*

葉緑体 DNA 断片をプローブとする Southern 解析では、組換え体及び野生型タバコのいずれにも 1.5kb のバンドが観察され、さらに組換え体では 5.4kb のバンドも確認された。*apx* 及び *dhar* の遺伝子をプローブとするハイブリダイゼーションでは、野生型を除くすべての個体に 5.4kb のハイブリダイゼーションシグナルが検出された(図 33-A)。

2) *mdar_dhar*

葉緑体 DNA 断片をプローブとする Southern 解析では、5個体の組換え体すべてに 5.8kb のバンドが確認されたが、野生型タバコと同じ 1.5kb のバンドは観察されなかった。*mdar* 及び *dhar* の遺伝子プローブを用いたハイブリダイゼーションでは、野生型を除くすべての個体にシグナルが検出された(図 33-B)。

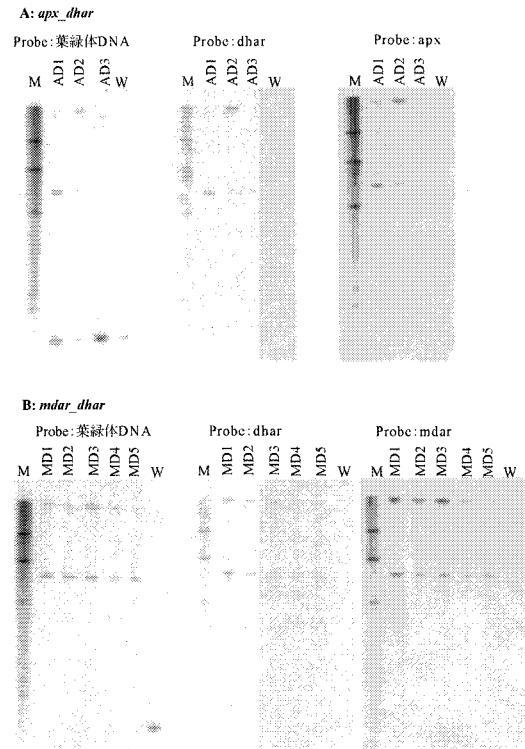


図33. Southern解析(オペロン)
ADとMDは図32参照。
M: マーカー(λ HindIII), W: 野生型タバコ(SR1)

3.3.7 ストレス処理

a) メチルピオロゲン処理

野生型タバコのリーフディスクは、0.2 μ Mの濃度のメチルピオロゲン処理により緑色がほとんど退色した。一方、APX及びMDARを葉緑体で強発現している組換え体のリーフディスクは、この濃度の処理では緑色のままであった。組換え体間の比較では、MDARのリーフディスクのほうが、メチルピオロゲンの濃度が高くなるにつれて退色している面積が大きくなった（図34）。

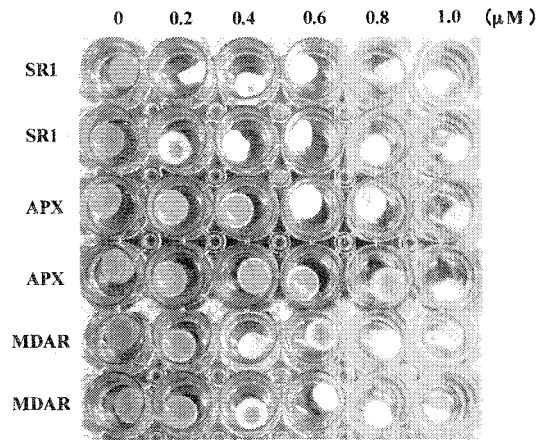


図34 メチルピオロゲン処理
SR1: 野生型タバコ (SR1)
APX: *apx*を導入した組換え体 (A2_2nd)
MDAR: *mdar*を導入した組換え体 (M1a_1st)

b) 亜硫酸ナトリウム処理

野生型タバコと APX 及び MDAR を強発現させたタバコの間で退色の様子は違いは観察されなかった（図35）。

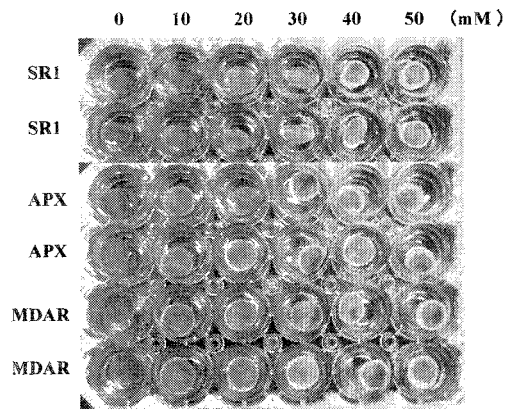


図35. 亜硫酸ナトリウム処理
SR1: 野生型タバコ (SR1)
APX: *apx*を導入した組換え体 (A2_2nd)
MDAR: *mdar*を導入した組換え体 (M1a_1st)

c) 強光処理

この処理により、野生型タバコの葉は黄色に変化した。一方、MDARを強発現したタバコでは、葉の色に何の変化も観察されなかった（図36）。

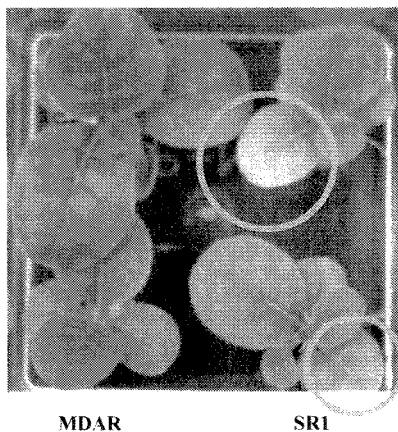


図36. 強光処理
SR1: 野生型タバコ (SR1)
MDAR: *mdar*を導入した組換え体 (M1a_1st)

d) クロロフィル残存量

メチルビオロゲン処理をしたリーフディスクのクロロフィル残存量は、APX を強発現させた組換え体は野生型タバコと比べて 68 倍、MDAR を強発現させた組換え体は 47 倍であった (図 37-A)。一方、亜硫酸ナトリウム処理をしたリーフディスクのクロロフィル残存量には違いが認められなかった (図 37-B)。

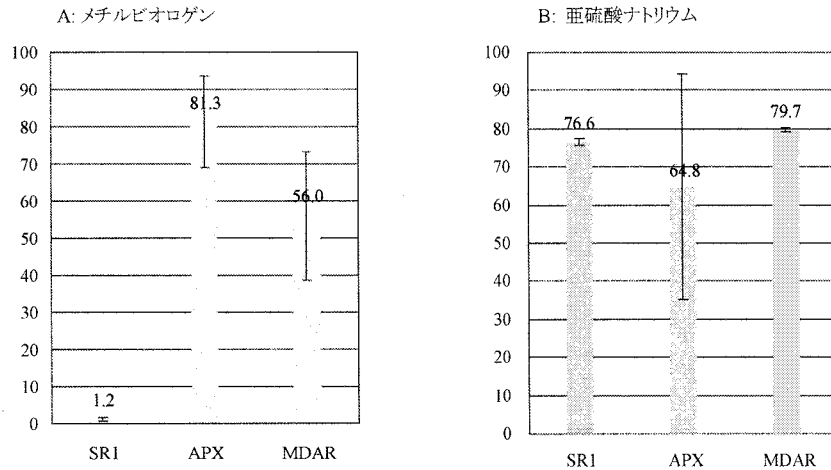
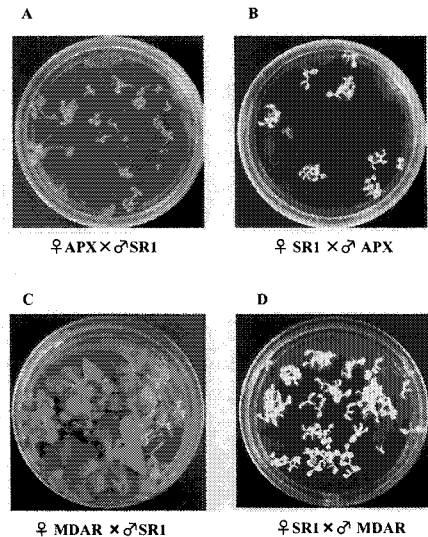


図37. クロロフィル残存量
 SR1: 野生型タバコ (SR1)
 APX: *apx*を導入した組換え体 (A2_2nd)
 MDAR: *mdar*を導入した組換え体 (M1a_1st)

3.3.8 正逆交雑

組換え体を雌親にして野生型タバコの花粉を受粉させ、結実させた種をスペクチノマイシン入りの MS 培地に播種すると、発芽した植物はすべて耐性を示し、子葉は緑色のままだった (図 38-A, C)。一方、野生型タバコを雌親に、組換え体の花粉を交配した子孫では、植物はすべてスペクチノマイシン感受性を示し、子葉が白色化した (図 38-B, D)。



500mg/L Spectinomycin を含むMS培地

図38. 組換え体と野生型タバコの正逆交雑
 SR1: 野生型タバコ, APX: *apx*を導入した組換え体,
 MDAR: *mdar*を導入した組換え体, ♂: 雄親, ♀: 雌親

3. 4. 考察

3.4.1 タバコの葉緑体形質転換

本研究では、様々なプラスミドコンストラクトをタバコの葉緑体に導入するため、合計 568 回のパーティクルボンバートメントを実施した (表 10)。その際、形質転換体を得る効率を上げるため、いくつかの条件を検討したが、表 10 に示すように、金粒子の大きさを 1.0 μm から 0.6 μm に変更した前後で効率が大幅に違った。すなわち、金粒子を小さいものに変更し、それを補うために発射の圧力を強くして、打つ距離を縮めたところ良好な結果が得られ、結果的に形質転換体を得る効率が約 14 倍も上がった。金粒子が小さくなったことで、粒子がより葉緑体内に入りやすくなったのではないかと考えている。興味深いことに、ボンバートメントの条件を変更後、緑色のシュートが観察される時期が 1 週間、早くなった。すなわち以前の条件では、シュートが形成されるまでに、早いもので 1 ヶ月間、遅いもので 2 ヶ月間かかっていた。しかし条件を変更した後は、早いものは 3 週間でシュートを形成するようになった。これは金粒子の大きさを小さくすることにより、細胞へのダメージが軽減され、その結果シュートの形成する時期が早まったのではないかと考える。

3.4.2. APX

アスコルベート・グルタチオンサイクルで APX はアスコルビン酸を電子の供与体とし、 H_2O_2 を H_2O に変換する。高等植物では APX に 5 つのアイソザイムが存在することが知られている。すなわち、細胞質型 (cAPX)、マイクロボディ型 (mAPX)、ミトコンドリア型 (mitAPX)、葉緑体のチラコイド型 (tAPX) 及びストロマ型 (sAPX) である。cAPX はホモダイマーで働くが、葉緑体型 (chlAPX、tAPX と sAPX の総称) はモノマーで働くという違いがある (Shigeoka et al. 2002)。さらに APX は、アスコルビン酸の欠乏した条件下では不安定であるが、特に chlAPX と mitAPX は、他の 2 つの APX と比べ不安定であるという報告がある (Chen & Asada 1989)。それゆえ、葉緑体内で sAPX を強発現させることは、活性酸素の消去に有効であり、これにより植物のストレス耐性が上がると考えた。核に cAPX の遺伝子を導入し、葉緑体で発現させた組換えタバコが、塩、乾燥、及び酸化ストレスに対して強くなったという報告がある (Torsethaugen et al. 1997, Badawi et al. 2004)。本研究で作出した、APX を葉緑体で強発現する組換えタバコは、メチルビオロゲンや強光下での酸化ストレス耐性が高まっていた。しかしながらこの組換えタバコに、上記以外のストレス (NaCl、PEG、 Na_2SO_4 、低温) を与えた実験では、野性型タバコと比べ顕著なストレス耐性の向上は観察されなかった (未掲載データ)。このことより、sAPX を葉緑体で強発現させると、いろいろなストレスのうちでも特に

光合成に関わるものに耐性を示すのではないかと考えている。今後、この組換え体が他のストレスや複合的ストレスに耐性を示すかを詳細に調べていく必要がある。

興味深いことに、APX を強発現させた組換え体は、葉に細かいモザイク模様（図 39）が生じた。この表現型は京都産業大学のインキュベーターや閉鎖系温室で育成すると必ず現れるが、京都府立大学の施設で育成したものには観察できなかった。ただし、京都府立大の施設でも、15℃の低温で育成した個体の葉にはモザイク模様が観察できた（森田、私信）。このモザイク状の葉から調製したリーフディスクは、野生型タバコから調製したものと比較して、メチルピオロゲンに対する耐性が強まっていた。

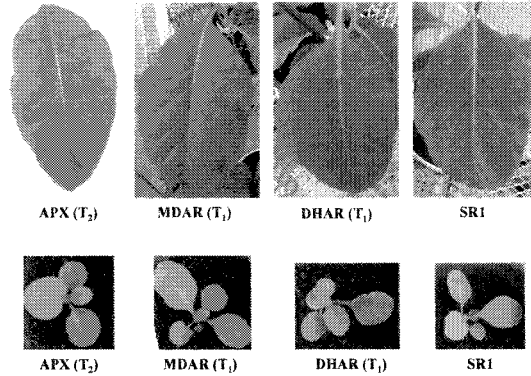


図 39. 形質転換タバコ及び野生型タバコ
 APX: *apx*を導入した組換え体(A2_2nd)
 MDAR: *mdar*を導入した組換え体(M1a_1st)
 DHAR: *dhar*を導入した組換え体(D1_1st)
 SR1: 野生型タバコ(SR1)

一方、同じ組換え系統に由来しても、斑入りを示さない葉は、野生型タバコのものとはほとんど耐性に差がなかった（データ未掲載）。モザイク模様を示す原因は、まだ明らかではないが、モザイク模様の程度と APX 活性の強さ、あるいはストレス耐性には正の相関があるかもしれない。*aadA* と逆方向に *apx* を導入した葉緑体形質転換体の作出にも成功しているので（表 10）、この組換え体も含めて、モザイク模様と APX 活性の関係を調査する必要がある。

3.4.3 MDAR

植物では MDAR は細胞質、葉緑体及びミトコンドリアに局在していることがわかっている（Hossain et al. 1984, Hossain & Asada 1985, Obara et al. 2002）。MDAR は葉緑体のストロマに可溶性酵素として存在しており、以下の 2 つの役割を担っている。すなわち 1 つ目は、APX により酸化されたアスコルビン酸（MDA）をもとの状態に還元する働き、2 つ目は基質である MDA が欠乏状態のとき、光還元で生じた 2 つの酸素をスーパーオキシドにする働きである（Miyake et al. 1998）。MDAR 遺伝子を核ゲノムに導入し、その産物を細胞質で強発現させた組換えタバコがすでに作出されており、このタバコはオゾン、塩、ポリエチレングリコールに対する耐性が向上したとの報告がある（Eltayeb et al. 2007）。本研究では MDAR を葉緑体内で強発現させることで、アスコルビン酸のリサイクル効率を向上させ、それにより組換え体へストレス耐性を付与することを狙った。実際、本研究で作出した MDAR を強発現する葉緑体の遺伝子組換えタバコは、野生型タバコと比べ、メチルピオロゲン処理及び強光によるストレスに対して耐性を示し

た。今後、他のストレスについても詳細に調べていく必要がある。

MDAR を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコは、M2b_1st_2 にのみ、モザイク模様の葉が観察されたが、他の個体の表現型は野生型と違いはなかった。モザイク模様を示す個体の MDAR 活性は他の個体のものより若干高かった。葉にモザイク状の模様が生じる原因は、APX を強発現する葉緑体の遺伝子組換えタバコの場合と同様に、まだわかっていない。

3.4.4 DHAR

APX によって酸化されたアスコルビン酸 (MDA) は自発的にアスコルビン酸やデヒドロアスコルビン酸 (DHA) に不均化される。このとき生じた DHA をもとのアスコルビン酸に還元する酵素が DHAR である。DHAR は DHA をアスコルビン酸に還元するとき、還元型グルタチオン (GSH) を酸化型グルタチオン (GSSG) に変換する (Nakano & Asada 1981, Hossain & Asada 1984, Shimaoka et al. 2000, Shimaoka et al. 2003)。ヒト由来の DHAR を細胞質で発現させた組換えタバコは、メチルビオロゲン、 H_2O_2 、低温、NaCl に耐性を示したと報告がある (Kwon et al. 2003)。MDAR の場合と同様、DHAR を葉緑体内で強発現させることで、アスコルビン酸のリサイクルが効率よくなり、結果的にストレス耐性が向上するのではないかと予測されるが、本報告書作成の時点では、まだデータが得られていない。

3.4.5 ストレス耐性

除草剤の有効成分であるメチルビオロゲンは、光化学系 I から電子を奪うことで自らが還元される。奪い取った電子を酸素に渡すことによって、スーパーオキシドの発生を促進させる。スーパーオキシドは SOD によって H_2O_2 になり、APX がこれを H_2O に還元し、同時にアスコルビン酸を酸化する。アスコルビン酸が枯渇すると、APX の反応が進まなくなり、蓄積した H_2O_2 などにより細胞が損傷する。APX、MDAR を強発現する組換え体、及び野生型タバコのリーフディスクをメチルビオロゲンで処理したところ、APX を強発現する組換え体が一番強い耐性を示した。この結果から、APX がアスコルベート・グルタチオンサイクルの律速になっていると推測される。しかし MDAR を強発現した組換え体も、野生型と比べ、メチルビオロゲンに対する耐性が上がっていた。APX を中心としたオペロンを作製し、これを強発現させた葉緑体形質転換体は、さらに効率よく H_2O_2 を処理することが可能だと考える。

本研究で、apx_dhar、mdar_dhar の両オペロンをタバコ葉緑体に導入することに初めて成功した (表 10、図 32、33)。今後、これらの組換え体の特徴づけを進めるとともに、

上記とは異なる遺伝子の組合せや、3つ以上の遺伝子を繋げたオペロンの作製に取り組みたい。本研究では、「強光ストレス」を $350\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光照射で行っている。真夏の直射日光は約 $2000\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ にもなることが知られており、光の強さは今回の実験に用いた条件の約5倍以上にも達する。このことから自然な条件下で植物が強光ストレスを受けているのは明らかであり、今回作出した組換えタバコの成育が自然条件下で向上するか興味もたれる。将来、これらの遺伝子を他の作物の葉緑体ゲノムに導入し、ストレスに強い作物を作出したい。

3. 5. おわりに

本研究では、*apx*、*mdar* 及び *dhar* の各遺伝子、*apx_dhar* 及び *mdar_dhar* の各オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出に初めて成功した。また、既存のコンストラクトを利用して新たに *apx_re* を構築し、そのコンストラクトをタバコに導入することにも成功した (表 10)。さらにいくつかの組換え体については、導入遺伝子が正しく転写・翻訳されているか、また翻訳産物の活性はどうかなどを種々の分子学的・生化学的方法で調べた。作出された時期が違うので、組換え体のすべてに十分なデータが揃っているわけではないが、上記コンストラクトの各々について実験の進行段階を表 11 にまとめた。*apx*、*mdar* 及び *dhar* を持つ組換え体については、T₁ または T₂ まで世代が更新され、十分な種子が得られている (図 40)。これらの系統の子

孫を用いて、強発現させた酵素の活性を調べると、野生型タバコと比べ、いずれも非常に高い活性を持つことがわかった。また、APX、MDAR を強発現する組換え体については、予想通り野生型タバコと比べてメチルピオロゲン耐性が上昇していた。さらに MDAR については、強光にも耐性を示すことが証明され、当初の目的であるストレス耐性を持つ植物の育成は、一部達成できたと考えている。現時点で、DHAR を強発現する組換え体のストレス耐性の評価はまだ行っていないが、APX、MDAR の場合と同様にストレス耐性を持つことが期待される。今後、オペロンを持つ組換え体の世代を進めるとともに、これら組換え体におけるストレス耐性を詳細に比較し、どのようなコンストラクトが、ストレス耐性植物の育成に最も適しているか検討したい。

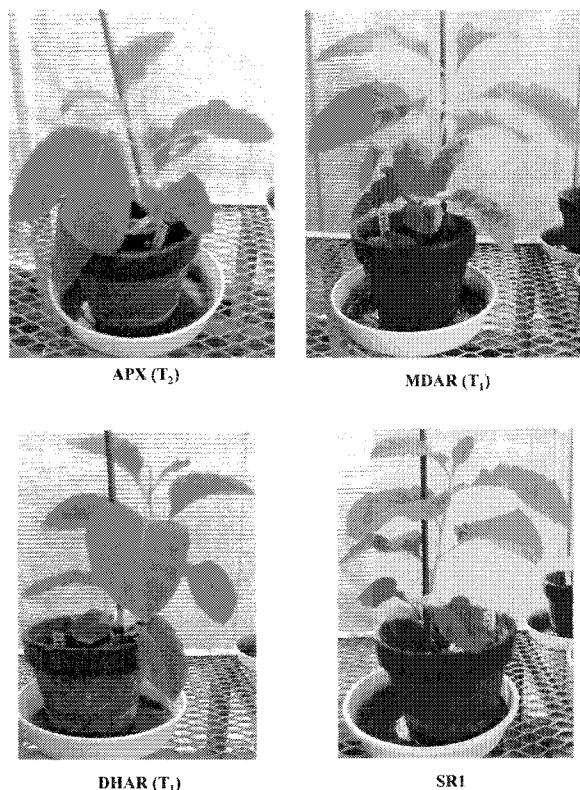


図40. 発芽16週間後の形質転換タバコ及び野生型タバコ
APX: *apx*を導入した組換え体(A2_2nd)
MDAR: *mdar*を導入した組換え体(M1a_1st)
DHAR: *dhar*を導入した組換え体(DI_1st)
SR1: 野生型タバコ(SR1)

表 1 1. 個々の組換え体における実験の実施状況

遺伝子	葉緑体形質 転換用コン ストラクト	葉緑体形質 転換	葉緑体形質 転換体	PCR	Southern
<i>apx</i>	+ ²⁾	+	+	+	+
<i>mdar</i>	+	+	+	+	+
<i>dhar</i>	+ ²⁾	+	+	+	+
<i>apx_dhar</i>	+	+	+	+	+
<i>mdar_dhar</i>	+	+	+	+	+
<i>apx_re</i>	+	+	+	+	-

遺伝子	T ₁ 世代	RT-PCR	Northern	SDS-PAGE	Western
<i>apx</i>	+	+	+	+	+
<i>mdar</i>	+	+	+	+	+
<i>dhar</i>	+	+	+	+	-
<i>apx_dhar</i>	-	-	-	-	-
<i>mdar_dhar</i>	-	-	-	-	-
<i>apx_re</i>	-	-	-	-	-

遺伝子	活性染色	活性測定	ストレス耐性 の評価	正逆交雑
<i>apx</i>	+	-	+	+
<i>mdar</i>	-	+	+	+
<i>dhar</i>	+	-	+	-
<i>apx_dhar</i>	-	-	-	-
<i>mdar_dhar</i>	-	-	-	-
<i>apx_re</i>	-	-	-	-

1) +はすでに実施、-はまだ実施していないことを表す。

2) 辻村ら 2005

3. 6. 謝辞

本報告書 3 章の内容は、京都産業大学生物工学研究科、林清音の修士論文による。APX に関する実験に協力いただいた、京都府立大大学院農学研究科 森田 重人博士、MDAR の抗体の提供及び活性測定方法の指導を仰いだ京都府立大学大学院農学研究科 佐野 智博士、実験を進めるにあたり協力いただいた、京都産業大学特定研究員 (PD) 野添 幹雄博士に心からの感謝の意を表す。

4. 参考文献

- Aono M, Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo N (1993) Enhanced Tolerance to Photooxidative Stress of Transgenic *Nicotiana tabacum* with High Chloroplastic Glutathione Reductase Activity. *Plant Cell Physiol* 34: 129-135
- Asada K (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1419-31
- Asada K (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141: 391-6
- Badawi GH, Kawano N, Yamauchi Y, Shimada E, Sasaki R, Kubo A, Tanaka K (2004) Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiol Plant* 121: 231-238
- Bogorad L (2000) Engineering chloroplasts: an alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products. *Trends Biotechnol* 18: 257-63
- Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240: 1534-8
- Chen GX, Asada K (1989) Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Differences in Their Enzymatic and Molecular Properties. *Plant Cell Physiol* 30: 987-998
- Chen Z, Gallie DR (2006) Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol* 142: 775-87
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3525-3530
- Creissen G, Reynolds H, Xue Y, Mullineaux P (1995) Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* 8: 167-75
- Daniell H, Kumar S, Dufourmantel N (2005) Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends Biotechnol* 23: 238-45
- Daniell H, Muthukumar B, Lee SB (2001) Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection. *Curr Genet* 39: 109-16

- Deak M, Horvath GV, Davletova S, Torok K, Sass L, Vass I, Barna B, Kiraly Z, Dudits D (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nat Biotechnol* 17: 192-6
- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225: 1255-64
- Goto F, Yoshihara T, Masuda T, Takaiwa F (2001) Genetic improvement of iron content and stress adaptation in plants using ferritin gene. *Biotechnol Genet Eng Rev* 18: 351-71
- Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F (1999) Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat Biotechnol* 17: 282-6
- Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1629-33
- Hossain MA, Asada K (1984) Purification of Dehydroascorbate Reductase from Spinach and Its Characterization as a Thiol Enzyme. *Plant Cell Physiol* 25: 85-92
- Hossain MA, Asada K (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J Biol Chem* 260: 12920-6
- Hossain MA, Nakano y, Asada K (1984) Mnodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant Cell Physiol* 25: 385-395
- Kwon SY, Choi SM, Ahn YO, Lee HS, Lee HB, Park YM, Kwak SS (2003) Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol* 160: 347-53
- Lee YP, Kim SH, Bang JW, Lee HS, Kwak SS, Kwon SY (2007) Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Rep* 26: 591-8
- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem* 212: 540-6
- Miyake C, Schreiber U, Hormann H, Sano S, Asada K (1998) The FAD-Enzyme Monodehydroascorbate Radical Reductase Mediates Photoproduction of Superoxide Radicals in Spinach Thylakoid Membranes. *Plant Cell Physiol* 39: 821-829

- Miyake C, Shinzaki Y, Nishioka M, Horiguchi S, Tomizawa K (2006) Photoinactivation of ascorbate peroxidase in isolated tobacco chloroplasts: *Galdieria partita* APX maintains the electron flux through the water-water cycle in transplastomic tobacco plants. *Plant Cell Physiol* 47: 200-10
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22: 867-880
- Obara K, Sumi K, Fukuda H (2002) The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of Arabidopsis putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 43: 697-705
- Paciolla C, De Tullio MC, Chiappetta A, Innocenti AM, Bitonti MB, Liso R, Arrigoni O (2001) Short- and long-term effects of dehydroascorbate in *Lupinus albus* and *Allium cepa* roots. *Plant Cell Physiol* 42: 857-63
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-94
- Sano S, Tao S, Endo Y, Inaba T, Hossain MA, Miyake C, Matsuo M, Aoki H, Asada K, Saito K (2005) Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 762-72
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53: 1305-19
- Shimaoka T, Miyake C, Yokota A (2003) Mechanism of the reaction catalyzed by dehydroascorbate reductase from spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* 270: 921-8
- Shimaoka T, Yokota A, Miyake C (2000) Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol* 41: 1110-8
- Staub JM, Maliga P (1995) Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids. *Plant J* 7: 845-8
- Svab Z, Maliga P (2007) Exceptional transmission of plastids and mitochondria from the transplastomic pollen parent and its impact on transgene containment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7003-8
- Torsethaugen G, Pitcher LH, Zilinskas BA, Pell EJ (1997) Overproduction of Ascorbate Peroxidase in the Tobacco Chloroplast Does Not Provide Protection against Ozone. *Plant Physiol* 114: 529-537

- Van Wuytswinkel O, Vansuyt G, Grignon N, Fourcroy P, Briat JF (1999) Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant J* 17: 93-7
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* 123: 223-34
- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2002) Identification of a cis element for tissue-specific alternative splicing of chloroplast ascorbate peroxidase pre-mRNA in higher plants. *J Biol Chem* 277: 40623-32

タバコとペチュニアの細胞質雑種作出にむけたプロトプラスト培養系の確立

京都産業大学工学部生物工学科

山岸 博

1. はじめに

葉緑体の遺伝子組換えは、核の遺伝子組換えと比較して多くの利点を有する。このため近年各種の作物で葉緑体の形質転換が盛んに試みられるようになった。しかし、現実には、この方法で効果的に形質転換体が作出されている植物はタバコに限られている。他にシロイヌナズナ、ジャガイモ、トマト、ナタネ、ペチュニア、ダイズ、ニンジン、レタス等での成功例が報告されているが、それらの植物での再現性は現在のところ低い状態にある。葉緑体の遺伝子組換えを実用的な技術として利用するためには、上記のようなタバコ以外の有用作物での安定的かつ効率的な形質転換体の作出技術の開発が必要である。しかし、そのためには各作物それぞれに多くの課題を検討する必要がある、開発までに長期間を要する。このような葉緑体の遺伝子組換え技術の直接的な適用に代る方法として、すでに得られているタバコの形質転換体と他の植物との細胞融合の利用が考えられる。

一般に植物における細胞融合においては、体細胞雑種植物の葉緑体ゲノムは、融合に用いた2種の植物のうちどちらか一方のタイプに固定する。したがって、葉緑体の遺伝子組換えを施した植物と野生型の植物の間で細胞融合を行い、細胞融合後のプロトプラスト培養の過程で、形質転換した葉緑体を持つ細胞を選抜することができれば、遺伝子組換えを起こした葉緑体のみを持つ雑種植物を得ることができる。特にタバコが属するナス科の植物には、ジャガイモ、トマト、ナス、トウガラシ、ペチュニアなど、世界的に広く利用される、多くの有用作物が含まれている一方で、これら作物とタバコの間では交雑による雑種の獲得は不可能である。このため、葉緑体形質転換タバコとこれらのナス科作物との間で細胞融合を行うことは、形質転換体の利用を実用作物に拡大する上で重要な意義を持つ。

これらのことを背景として、タバコおよびペチュニアについて、細胞融合の前提となるプロトプラスト培養とそこからの植物体再分化系の確立を図った。またその過程で、本プロジェクトによって作出されたタバコの形質転換体からプロトプラストを単離し、植物体再分化に至る過程で、形質転換細胞を選抜するための諸条件を明らかにした。さらに、タバコのプロトプラストを不活化し、効率的に細胞雑種を得るために、タバコ細胞に対する紫外線照射の条件を検討した。

2. 材料および方法

植物材料には、タバコの系統‘SR-1’およびペチュニアの品種‘テルスター’を用いた。また‘SR-1’の葉緑体に、活性酸素消去系の3つの酵素（グルタチオンリダクターゼ、アスコル

ビン酸パーオキシダーゼ、モノアスコルビン酸リダクターゼ) の遺伝子 (それぞれ *gr*, *apx*, *mdar* と記す) を導入した形質転換体を供試した。これらのタバコおよびペチュニアを無菌的に育苗し、本葉からプロトプラストを単離した。

プロトプラストの単離には、セルラーゼを 1%、ペクトリアーゼを 0.1% 含み、マンニトールを 0.5M 添加した酵素液を使用した。酵素処理によって得られたプロトプラストを遠心分離によって洗浄した後、無菌的に培養した。

培養には、表-1 に示した初期培地を使用した。初期培地中で暗黒条件において 2 週間培養した後、1 週間ごとに追加培地 (表-1) を添加しつつ、徐々に光の強さをあげながら、16 時間日長下で約 1 ヶ月間培養した。これらの液体培地においてプロトプラストからのコロニー形成を図った後、表-1 に示したカルス化培地に移植してカルスの増殖を促した。同培地中で直径約 2 mm 以上に発達したカルスを、さらに再分化培地に移植して、カルスからのシュート形成を誘導した。培養開始から 100 日目を基準として、カルスからのシュート形成を観察し、再分化培地に移植したカルスの数に対するシュート形成カルスの数の割合を再分化率 (%) とした。

表-1 ペチュニアおよびタバコのプロトプラスト培養系に用いた培地の組成

種類	基本培地	植物ホルモン	シュークロース	アガー
初期培地	8 P	2,4-D;1mg/ℓ BAP;0.5mg/ℓ NAA;0.1mg/ℓ	0.4M	0
追加培地	8 P	0	0.4M	0
カルス化培地	MS	2,4-D;0.25mg/ℓ BAP;0.125mg/ℓ NAA;0.025mg/ℓ	0.1M	0.5%
再分化培地	MS	BAP;0.5mg/ℓ ゼアチン;0.1mg/ℓ IAA;0.1mg/ℓ	0.5%	0.5%

なお、これら培養の全期間において、スペクチノマイシンを含まない培地とスペクチノマイシンを 500mg/ℓ 含む培地を用意し、両培地でのプロトプラストからのカルス形成および再分化を比較した。また最終的に細胞融合によってペチュニアの核ゲノムとタバコの葉緑体ゲノムを組み合わせ持つ体細胞雑種を獲得するために、タバコのプロトプラストへの紫外線照射時間の長さの効果を調査した。さらに、タバコの形質転換体から得られたプロトプラストについては、培養初期から強光照明下において、プロトプラストの分裂を観察し、強光ストレスに対する反応を調査した。

3. 結果および考察

本実験で設定した一連の培養条件によって、ペチュニア、タバコとも効率的なプロトプラスト培養系が得られた。ペチュニアの‘テルスター’、タバコの‘SR-1’ともに50%以上の高い再分化率を示した(表-2、表-3)。一方、スペクチノマイシンを500mg/l添加した培地で培養したところ、ペチュニアの‘テルスター’では暗黒条件下では細胞分裂が認められたものの、照明下に移行するにつれて細胞の増殖を停止し、カルス化培地上でのカルスの増殖は全く起こらなかった(表-2)。またタバコの‘SR-1’は照明下でもカルスの増殖は起こるものの、再分化培地に移植してもカルスが緑化せず、シュートの形成は全く認められなかった(表-3)。このように野生型個体から得られたプロトプラストからの再分化は、ペチュニア、タバコのいずれにおいてもスペクチノマイシンで完全におさえられた。次に、‘SR-1’のプロトプラストにクリーンベンチ内で紫外線を照射したところ、10分間の照射ではカルスの増殖が認められ、またカルスからの再分化も確認されたが、20分以上の処理ではカルスの増殖が全く認められなかった(表-3)。このことから、細胞質雑種の作出のためには、タバコのプロトプラストに10-20分間紫外線を照射することが有効であることが明らかになった。

表-2 ペチュニア‘テルスター’におけるプロトプラスト由来カルスからの再分化

条件 ^a	カルス数	再分化カルス数	再分化率(%)
抗生剤なし	660	359	54.4
抗生剤あり	0	0	—

a 抗生剤あり；すべての培地にスペクチノマイシンを500mg/l含む。

表-3 タバコ‘SR-1’におけるプロトプラスト由来カルスからの再分化

条件 ^a	カルス数	再分化カルス数	再分化率(%)
抗生剤なし (UV0分)	220	122	55.5
〃 (UV10分)	120	56	46.6
〃 (UV20分)	0	0	—
〃 (UV30分)	0	0	—
〃 (照明)	0	0	—
抗生剤あり (UV0分)	120	0	0
〃 (UV10分)	120	0	0
〃 (UV20分)	0	0	—
〃 (UV30分)	0	0	—

a 抗生剤あり；すべての培地にスペクチノマイシンを500mg/l含む。

上記のペチュニアおよびタバコの野生型と同様に、タバコの形質転換体から得られたプロト

プラストにおいても効率的な再分化が認められた。すなわち、3系統の組換え体のいずれにおいても、スペクチノマイシンの有無に関係なく、再分化が観察され、特に‘gr’においては100%またはそれに近い極めて高い再分化率が得られた(表-4)。このようにスペクチノマイシンを含む培地で再分化が認められたことは、葉緑体の形質転換の際に選抜マーカーとして用いた*aadA* 遺伝子が、プロトプラスト培養系においてもマーカーとして有効であることを示している。

さらに興味深いことに、3系統の組換え体から得られたプロトプラストは、いずれも培養初期から照明下において培養しても、細胞の分裂と増殖を起し、最終的に非常に高率の植物体再分化を示した(表-4)。このことは、野生型の‘SR-1’においては同じ条件でカルスが全く得られなかったこと(表-3)と極めて対照的である。このように形質転換体のプロトプラストが強光下で正常に分裂したことは、導入した活性酸素消去系の酵素の遺伝子がタバコのプロトプラストにおいて活性を有して、強光ストレス耐性を付与している可能性を示唆する。さらにまた、この事実は、これらの形質転換体を用いた細胞融合において、強光条件を融合細胞の選抜に用いることが可能であることを示している。

表-4 葉緑体形質転換タバコにおけるプロトプラスト由来カルスからの再分化

系統 ^a	条件 ^b	カルス数	再分化カルス数	再分化率 (%)
<i>mdar</i>	抗生剤なし	200	75	37.5
	抗生剤あり (UV0 分)	600	249	41.5
	抗生剤あり (UV10 分)	200	49	24.5
	抗生剤あり (UV20 分)	0	0	—
	抗生剤あり (照明)	200	170	85.0
<i>apx</i>	抗生剤あり	100	23	23.0
	抗生剤あり (照明)	100	78	78.0
<i>gr</i>	抗生剤あり	100	9	99.0
	抗生剤あり (UV10 分)	100	86	86.0
	抗生剤あり (照明)	100	100	100.0

a *mdar*, *apx*, *gr* はそれぞれ葉緑体にこれらの遺伝子を持つタバコの形質転換体。

b 抗生剤あり ; すべての培地にスペクチノマイシンを 500mg/l 含む。

4. おわりに

本研究は、現在までのところタバコだけに限られている葉緑体の形質転換技術の成果を、他の作物に適用するための方法として細胞融合を用いることの可能性を検討したものである。対象としたタバコ、ペチュニアのいずれにおいても効率的なプロトプラスト培養系が確立し、かつ形質転換体から得られた細胞の選抜も容易であった。現在、開発された培養系と選抜法を用いて、実際にタバコとペチュニアの細胞融合を行っている。この方法はさらに、タバコと同

じナス科に属し、重要な食用作物であるジャガイモやトマトに適用することも可能であろう。今後さらにそのような可能性についても検討する必要がある。

なお、本研究の遂行にあたっては、尾崎昭子さん、重野麻子さん、才本佳苗さん、森田智菜美さんの貢献が大きい。ここに記して謝意を表す。

5.参考文献

- 1) Mariga, P. et al. (1982) *Mol. Gen. Genet.* 185: 211-215.
- 2) Clark, E. M. et al. (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199: 440-445.
- 3) Clark, E. et al. (1986) *Theor. Appl. Genet.* 72: 748-755.
- 4) Glimelius, K., and H. T. Bonnet (1986) *Theor. Appl. Genet.* 72: 794-798.
- 5) Svab, Z. et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 14: 197-205.
- 6) Sidorov, V. A. et al. (1999) *Plant J.* 19: 209-216.
- 7) Ruf, S. et al. (2001) *Nat. Biotechnol.* 19: 870-875.
- 8) Zubko, M. et al. (2004) *Transgenic Res.* 13: 523-530.
- 9) Nugent G. D. et al. (2005) *Plant Cell Rep.* 24: 341-349.
- 10) Kuchuk, N. et al. (2006) *Theor. Apple. Genet.* 113: 519-527.

カイラン葉緑体ゲノムへのカロチノイド合成遺伝子群を 導入するためのターゲティングベクターの構築

京都産業大学工学部生物工学科

黒坂 光

目 次

1. 要約
2. はじめに
3. 材料及び方法
 - 3.1. 既存プラスミドのインサートの確認
 - 3.1.1. crtB in pBluescript, crtE in pBluescript, crtY in pBluescript
 - 3.1.2. crtI in pKSU211R
 - 3.1.3. crtI-crtB in pKSU211R
 - 3.2. crtE, crtB, crtI, crtY遺伝子の調製
 - 3.3. 新規ターゲティングベクターの構築
 - 3.3.1. crtI-crtE-crtB in pKSU211R
 - 3.3.2. crtI-crtE-crtY-crtB in pBluescript
 - 3.4. カイランへの導入
crtI in pKSU211R, crtI-crtB in pKSU211Rのカイランへの導入
4. 結果と考察
 - 4.1. 既存プラスミドのインサートの確認
 - 4.1.1. crtB in pBluescript, crtE in pBluescript, crtY in pBluescript
 - 4.1.2. crtI in pKSU211R, crtI-crtB in pKSU211R
 - 4.2. 新規ターゲティングベクターの構築と遺伝子導入
 - 4.2.1. crtI-crtE-crtB in pKSU211R
 - 4.2.2. crtY-crtE-crtY-crtB in pBluescript

1. 要約

我々の研究室では、文部科学省の私立大学学術研究高度化推進事業のバイオベンチャープロジェクトへの取り組みとして、高等植物の葉緑体ゲノムを改変することにより有用物質を産生する遺伝子組換え植物、あるいは農薬耐性や耐病虫性などの形質を付与した植物体などの育成を目的として研究を行っている。本稿では、平成17年度に発行した前回の報告書以降の新た

な取り組みについて記述する。

今日までのオルガネラゲノムをターゲットとした遺伝子組換え植物の作成において、タバコを用いた葉緑体ゲノム形質転換系はほぼ確立されているが、組換え植物の応用をねらいとする新たな取り組みとして本研究では、食用のキャベツ（カイラン）を用いて葉緑体ゲノム形質転換系の確立を試みた。導入遺伝子としては、カロテノイド生合成に関与する遺伝子群を選定し、 β -carotene等のカロチノイドを豊富に含む組換えキャベツ（カイラン）を作成することを目的とした。我々はまず、*Pantoea ananatis*由来のカロテノイド生合成に関与する4種類の酵素遺伝子crtB, crtE, crtI, crtYのcDNAをクローニングした。次にカイランに遺伝子を導入するために設計したターゲティングベクターであるpKSU211RにこれらのcDNAをサブクローニングし、それを用いて植物体へパーティクルガンにより遺伝子導入、選抜、育苗した。また、これら4つのcDNAをpBluescriptベクターに組込み、それを用いて大腸菌を形質転換させ、大腸菌内でカロテノイドの産生を試みた。crtE-crtI-crtBを導入した大腸菌のコロニーはlycopeneに由来する赤色を呈し、さらにcrtY-crtE-crtI-crtBの4つの酵素遺伝子全てを導入した大腸菌コロニーは β -caroteneに由来する黄色を呈したことから、大腸菌においてそれぞれ目的の物質を産生していることを確認した。

2. はじめに

植物をターゲットとした遺伝子組換え技術の発展はめざましく、有用な形質を獲得した様々な組換え植物が作成されてきた。しかしながら、これまでに作られた遺伝子組換え体は核ゲノムを標的とするものが主流であった。一方近年、葉緑体ゲノムへの外来遺伝子導入の試みも、タバコを中心としてなされてきた。葉緑体などの色素体を標的とする形質転換は核の形質転換と比べて、相同組換えを介して目的の部位に外来遺伝子を導入することができるため、ジーン・サイレンシングやポジション・イフェクトといった影響がない、葉緑体内で発現したタンパク質は葉緑体内に留まり、細胞質等に存在する蛋白質分解系の酵素から隔離されるのでタンパク質の大量の発現が期待できる。また葉緑体が母性遺伝するため、外来遺伝子の花粉を通じた汚染を防ぐことができる等の多くの利点を持つ。しかしながら色素体の組換え技術は、いまだ発展途上でありいくつかの改善すべき点がある。特に、育種学的な応用を図る場合、適用可能な植物種がタバコなどの特定の植物に限定されるという大きな問題点がある。そこで本研究では、食用キャベツの一種であるカイランを用いて形質転換体の作成を試みた。その際、導入遺伝子として、カロテン類合成にかかわる遺伝子群を選定し、カロテノイド産生性のパントエア属細菌パントエア・アナナティス (*Pantoea ananatis*) から、関連遺伝子cDNAをクローニングした。図1に示したように、カロテノイド生合成経

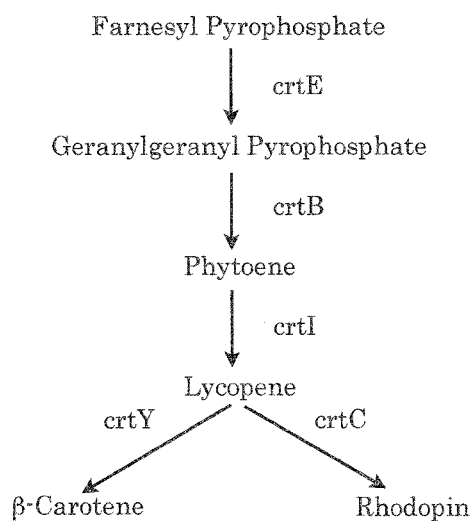


図1

路は, farnesyl pyrophosphate (FPP)を前駆物質とし, FPPにcrtE, crtB, crtI, crtYが順次作用することで, まずgeranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)が, 次にphytoene, lycopeneを経て β -carotene (β -カロテン) が合成される. β -カロテンは体内で代謝されてビタミンAに変換される. 我々はカロテノイド生合成に関わるこの4つの遺伝子をクローニングし, それらを含むターゲティングベクターを構築して, カイラン葉緑体ゲノム形質転換体の作成を試みた. これらの遺伝子は細菌由来であるため, 原核生物型の転写・翻訳系を有する葉緑体中でも, それらの産物が活性を持ち, その組換え体がカロテノイドを多く含む商品価値の高いものになることが期待できる. カイランにおいてもこの生合成経路の遺伝子は発現しているが, β -カロテンの合成量は多くない. その理由として, この合成経路の中間体であるGGPPは, β -カロチンだけでなく, フィトクロムやジベレリンなどの物質の前駆体でもあるため, β -カロチンの合成が活発でないことが考えられた. したがってカイランにcrtBを導入することでphytoene, lycopene, β -carotene合成経路を活性化することが期待できる. 本研究では β -カロチン生合成に関与する遺伝子群を, 単独, あるいはオペロンとして導入した.

3. 材料及び方法

3.1. 既存プラスミドのインサートの確認

3.1.1. crtY in pBluescript, crtE in pBluescript, crtB in pBluescript

crtB, crtE, crtY cDNAを含むプラスミドをそれぞれXho I, Sal I, Sma Iで消化した. その制限酵素消化産物をアガロースゲル電気泳動して, crtY, crtE, crtBの全長cDNAを含むことを確認した.

3.1.2. crtI in pKSU211R

カイラン葉緑体ゲノムのターゲティングベクターであるpKSU211RにcrtI cDNAが挿入されているプラスミドについても, Cla I を用い3.1.1と同様の方法で挿入cDNAを確認した. また次の3種のプライマーを用いてPCRを行い, 正しいインサートを含むことを確認した. ① プロモーターPrnの上流にあるApa I, BamH I部位間にアニールするプライマーのApa I-BamH I (F)と, ターミネーターTrbcLの下流にアニールするプライマーのTrbcL-R(R) ② crtIの上流にあるCla I部位の配列から, crtIの開始コドンから20塩基下流の配列にアニールするプライマーのCla-crtI-U(F)と, crtIの終始コドンとその20塩基下流までのCla I部位を含む配列にアニールするプライマーのcrtI-Cla-L(R) ③ Forward, Reverseプライマーとも②よりも内側に設計され, Cla I部位を持たないプライマーの組み合わせ, crtI-F(F)とcrtI-R(R)

いずれも, 98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 2分で35サイクル反応させた.

3.1.3. crtI-crtB in pKSU211R

Cla IおよびSma Iで制限酵素消化し, 目的の大きさのインサートが含まれることを確認した.

3.2. crtB, crtE, crtI, crtY全長cDNAの調製

pBluescript II SK(+)に含まれるcrtY, crtE, crtB全長cDNAを, プラスミドをそ

それぞれXho I, Sal I, Sma Iを用いて制限酵素消化することで切り出した。消化物をアガロースゲル電気泳動にて分離後、それぞれのcDNAに相当するバンドをゲルから精製した。pKSU211RにサブクローニングされたcrtIに関しては、プラスミドをCla Iで消化して、同様に全長cDNAを調製した。

3.3. 新規ターゲティングベクターの構築

3.3.1. crtI-crtE-crtB in pKSU211R

葉緑体内でポリシストロニックに遺伝子発現させる目的で、crtIとcrtBを連結して、pKSU211R中にクローニングした。その産物であるcrtI-crtB in pKSU211RをSal Iで制限酵素消化した。反応後に1.2%のアガロースゲルで電気泳動し、消化産物である鎖状プラスミドをゲルから精製した。得られた鎖状プラスミド末端を脱リン酸化した後、その鎖状プラスミドに、3.2で調製したcrtE cDNA断片をライゲーションし、crtI-crtE-crtBの配列を含むターゲティングベクターを作製した。その反応産物を用いて、大腸菌DH5 α を形質転換した後に、コロニーPCRにより目的のインサートを持つプラスミドを単離した。

3.3.2. crtY-crtE-crtI-crtB in pBluescript

カロテノイド合成系遺伝子群の産物が活性をもつかどうかを調べるために、pBluescriptベクターにcrtB, crtE, crtI, crtY 全長cDNAを挿入し、大腸菌内での発現させた。まずcrtE in pBluescriptをSma Iで制限酵素処理して得られた鎖状DNAを電気泳動後、ゲルから精製し、SAP処理した。この鎖状DNAと3.2で調製したcrtBをLigation High DNA ligaseを用いてライゲーションし、その産物を用いて大腸菌DH5 α を形質転換した。コロニーPCRにより目的のプラスミドをもつ大腸菌を選別した。得られたプラスミドに、さらにcrtI, crtYを同様の方法で順次連結し、4種類の全長cDNAが挿入された crtY-crtE-crtI-crtB in pBluescript を得た。

3.4. カイランへの導入

crtI in pKSU211R, crtI-crtB in pKSU211Rをカイランへ導入した。パーティクルガン法を用いてcrtI in pKSU211R, crtI-crtB in pKSU211Rをカイランの茎に遺伝子導入し、2日後に選抜培地に移し、芽がでてから育苗培地に移した。

4. 結果と考察

4.1. 既存プラスミドに含まれるインサートの確認

4.1.1. crtB in pBluescript, crtE in pBluescript, crtY in pBluescript

我々はカイランの葉緑体組換え植物を作成する目的で、*Pantoea ananatis*よりカロチノイド合成に関わる4つの酵素群、crtE, crtB, crtI, crtYの全長cDNAをPCRにより得た。そのうちのcrtB, crtE, crtYの3種についてはpBluescriptへのサブクローニングを終えている。crtY, crtE, crtBの全長cDNAを含むpBluescriptをそれぞれXho I, Sal I, Sma Iを用いて制限酵素消化を行いイン

サートを切り出し、アガロースゲル電気泳動によりそのサイズを確認したところ、それぞれ目的通りの1176bp, 936bp, 956bpに相当する大きさのインサートを含むことが分かった(図2)。さらに、DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定してインサートを確認した。

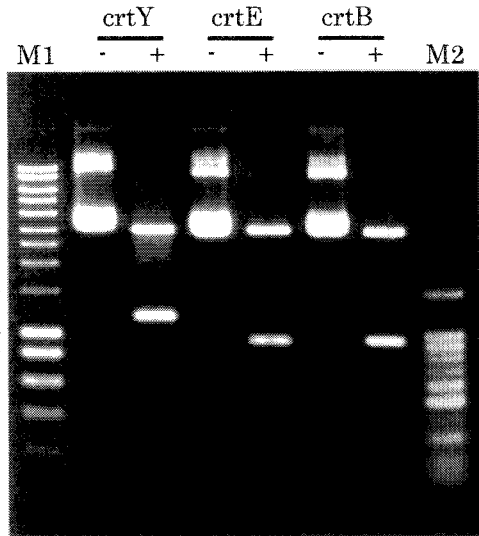


図2

4.1.2. crtI in pKSU211R, crtI-crtB in pKSU211R

pKSU211Rはカイラン葉緑体を目的とした遺伝子組換え植物作成のために構築されたターゲティングベクターである。我々はcrtI単独、およびcrtIとcrtBを連結したオペロン単位をpKSU211Rに組込んだプラスミドを調製した。crtI、およびcrtI-crtBを含むプラスミドをそれぞれCla I、およびCla IとSma Iで制限酵素で消化

し、その産物をアガロースゲルで電気泳動してインサートのサイズを調べた。crtI in pKSU211Rでは1503bp付近に、crtI-crtB in pKSU211Rでは、Cla I消化ではcrtIが切り出され1503bpのバンドを、Sma I消化ではcrtBが切り出され956bpのバンドを生じるが、消化産物をアガロースゲル電気泳

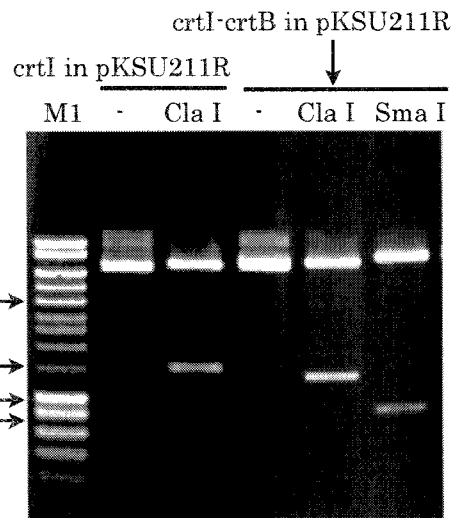


図3

動したところ、いずれもほぼ予想通りのサイズのバンドが得られた(図3)。

それぞれのプラスミドについて、さらに塩基配列も決定してインサートを確認した。

4.2. 新規ターゲティングベクターの構築と遺伝子導入

4.2.1. crtI-crtE-crtB in pKSU211R

既存のcrtI-crtB in pKSUR211Rを用いて、カロチノイド合成系の3つの酵素cDNAをタンデムに連結したターゲティングベクターを構築した。3.3.1に記

したように, crtI-crtB in pKSUR211RをSal Iで消化し, crtBとcrtI間で切断された鎖状プラスミドを作製し, そこに3.2で調製したcrtE cDNAを挿入した. ライシオン反応の産物を用いて形質転換した大腸菌の中から5クローンを選抜し, それらからプラスミドを調製し電気泳動した. crtI-crtE-crtB in pKSU211R

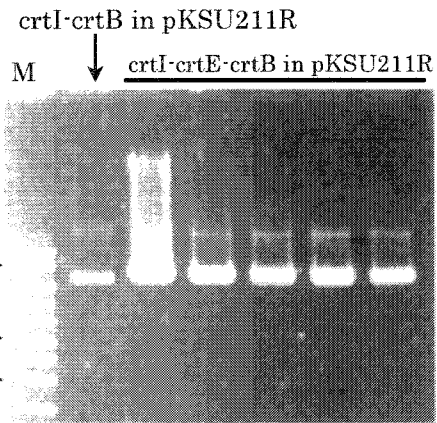


図4
ターゲティングベクター (5クローン)

をcrtI-crtB in pKSU211Rと比較したところ (図4), 3つの遺伝子を含むオペロン単位を持つ crtI-crtE-crtB in pKSU211Rは936bpのcrtEを余計に含むため, いずれも crtI-crtB in pKSU211Rよりも高分子領域に泳動された. また, 結果は示していないが, crtI-crtE-crtB in pKSU211Rを制限酵素消化することで, crtI (1503bp), crtB (956bp), およびcrtE (936bp) が切り出されることをアガロースゲル電気泳動により確認している.

4.2.2. crtY-crtE-crtI-crtB in pBluescript

pKSU211Rにクローニングしたターゲティングベクターを用いて植物体を形質転換するに先立って, クローニングしたカロチノイド合成系の酵素群が葉緑体のような原核生物の転写・翻訳系において活性を持った形で合成されるのかどうかを, 大腸菌で発現させることにより調べた. それぞれの酵素cDNAはpBluescriptcrtにクローニングする際にプラスミドに含まれるlacZ遺伝子と読み枠を合わせて連結した. 図5はcrtE cDNA, およびcrtEとcrtBのcDNAを含むpBluescriptをアガロースゲル電気泳動したときの結果であるが, 電気泳動の

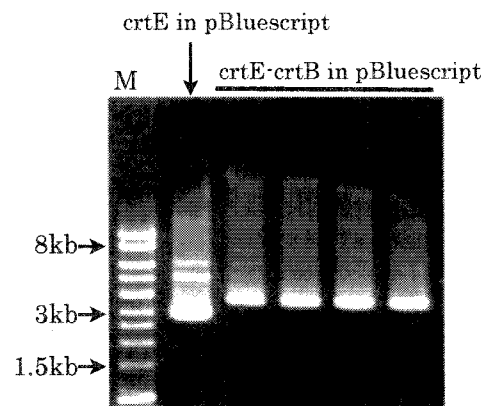


図5

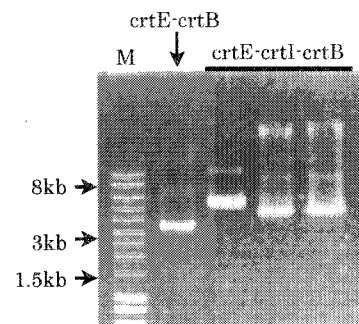


図6

パターンからねらい通りcrtB cDNAがクローニングされていることがわかる。

次にcrtE-crtB in pBluescriptを制限酵素消化し、crtIを挿入した。図6はこの反応産物で形質転換して得られた3つの大腸菌クローンよりプラスミドを単離して電気泳動したときの結果である。このようにいずれもcrtE-crtB in Bluescriptよりも大きなサイズのプラスミドが得られたが、右2つのプラスミドに比べて、一番左のプラスミドはサイズが大きく、crtIが2つもしくはそれ以上挿入された可能性がある。それ以外の2つは塩基配列の解析から、目的通りにcrtIを1つ含むプラスミドであることがわかった。crtIを1つだけ含むプラスミドを用いて、それを制限消化しさらにcrtYを挿入した。大腸菌を形質添加

した後に選択した6つのコロニーから得られたプラスミドのサイズを電気泳動で調べた。図7のように大きさの異なるいくつかのプラスミドが得られたが、③、⑤、⑥はもとのcrtE-crtI-crtB in Bluescriptと同じサイズであった。分子量から、④はcrtYを1つ、①と②はcrtYを2つ以上含むプラスミドであると考えられた。最終的には塩基配列の解析から、④がcrtYを1つだけ含む目的のプラスミドcrtY-crtE-crtI-crtB in pBluescriptであることがわかった。

このようにして得たプラスミドをプレート上で生育させコロニーの様子を観察した。図8の左は、crtE-crtBを含むプラスミドで形質転換した大腸菌のコロニーである。この大腸菌では、導入した遺伝子の産物が活性を持っていれば、farnesyl pyrophosphateを基質としてphytoeneが産生される。phytoeneは無色のカロチノイドであるため見かけは通常の大腸菌コロニーと同じになるはずである。中央はcrtE-crtI-crtBを含む大腸菌であるが、これらの遺伝子産物が機能的であれば、赤色のlycopeneを、右側はcrtY-crtE-crtI-crtBを持つものであるがこれらが全て作用すれば橙色の β -caroteneが合成されるはずである。図8の結果から明らかなように、いずれのコロニーも期待通りの色を呈しており、今回クローニングした4種類の遺伝子はいずれも機能的であり、大腸菌内で活性を持って発現することがわかった。この結果はこれら4種類のカロチノイド合成系の酵素群は、原核生物型の転写・翻訳系を持

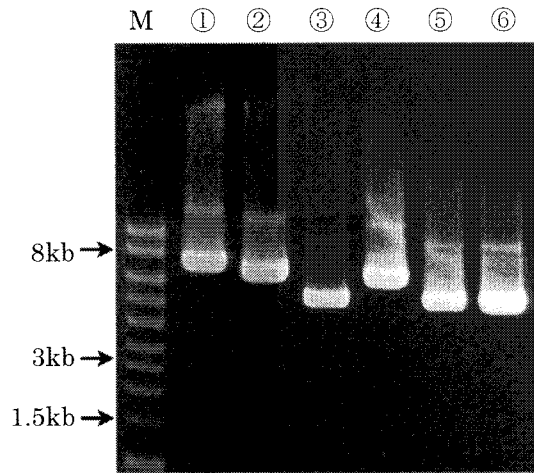


図7

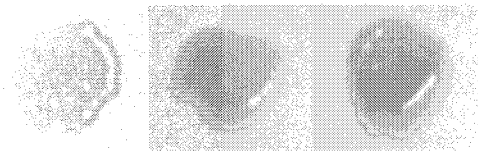


図8

た大腸菌のコロニーである。この大腸菌では、導入した遺伝子の産物が活性を持っていれば、farnesyl pyrophosphateを基質としてphytoeneが産生される。phytoeneは無色のカロチノイドであるため見かけは通常の大腸菌コロニーと同じになるはずである。中央はcrtE-crtI-crtBを含む大腸菌であるが、これらの遺伝子産物が機能的であれば、赤色のlycopeneを、右側はcrtY-crtE-crtI-crtBを持つものであるがこれらが全て作用すれば橙色の β -caroteneが合成されるはずである。図8の結果から明らかなように、いずれのコロニーも期待通りの色を呈しており、今回クローニングした4種類の遺伝子はいずれも機能的であり、大腸菌内で活性を持って発現することがわかった。この結果はこれら4種類のカロチノイド合成系の酵素群は、原核生物型の転写・翻訳系を持

つ葉緑体においても、潜在的に機能を持ちうることを示すものである。

4.2.3. カイランへの遺伝子導入

上記のようにpKSU221Rにカロチノイド合成系の遺伝子を組込んだ数種類のコンストラクトを得ている。それぞれのコンストラクトについて遺伝子導入する予定であるが、塩基配列の確認等が完了したcrtl in pKSU211Rとcrtl-crtB in pKSU211Rをパーティクルガン法を用いてカイランの茎に遺伝子導入した。導入後、2日後に選抜培地に移し、芽がでてから育苗培地に移した。葉緑体への遺伝子の導入は、RT-PCRにより行っているが、現時点では少数ではあるが芽の段階では遺伝子導入された個体を組換え体を得ることができても、それを個体レベルに生育するには至っていない。カイランの安定した再分化系の構築なども含めて検討の余地があるものと思われる。

◇ 研 究 業 績

研究業績

《雑誌論文》

学内研究者

- Yamagishi, H., Nakagawa, S., Kinoshita, D., Ishibashi, A. and Yamashita Y. (2008) Somatic Hybrids between *Arabidopsis thaliana* and Cabbage (*Brassica oleracea* L.) with all Chromosomes Derived from *A. thaliana* and Low Levels of Fertile Seed. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 77 (In press)
- 山岸 博 (2007) ハマダイコンにおける細胞質の分化および稔性回復遺伝子の分布. 京都産業大学先端科学技術研究所所報 6:41-49.
- 堀川明彦, 寺地 徹 (2007) 細胞質置換コムギをモデルとした核とミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究 2. 京都産業大学総合学術研究所所報 5: 23-28.
- 黒坂 光, 鳥羽慎也 (2007) 神経発生におけるポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能. 京都産業大学総合学術研究所所報 5: 101-105.
- 山岸 博, 石橋篤志, 川口晋吾 (2006) *Brassica* 属作物における葉緑体の塩基配列の種間および種内変異. 京都産業大学先端科学技術研究所所報 5:1-10.
- 山岸 博 (2006) 栽培、野生ダイコンにおける系統分化とオグラ型雄性不稔細胞質の起源. 育種学研究 8 : 107-112.
- 黒坂 光 (2006) 神経特異的ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能解析. 京都産業大学総合学術研究所所報 4: 17-22.
- 堀川明彦, 寺地 徹 (2006) 細胞質置換コムギをモデルとした核とミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究 1. 京都産業大学総合学術研究所所報 4: 23-29.
- 寺地 徹 (2005) 細胞質置換コムギの育成-究極のオルガネラゲノム工学. 蛋白質 核酸 酵素 50: 1808-1812.
- Guo, C-H., and Terachi, T. (2005) Variations in a hotspot region of chloroplast DNAs among common wheat and *Aegilops* revealed by nucleotide sequence analysis. Genes Genet. Syst. 80(4): 277-285.
- Ogihara, Y., Yamazaki, Y., Murai, K., Kanno, A., Terachi, T., Shiina, T., Miyashita, N., Nasuda, S., Nakamura, C., Mori, N., Takumi, S., Murata, M., Futo, S. and Tsunewaki, K. (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. Nucleic Acids Res. 33 (19): 6235-6250.
- Imai, T. and Terachi, T. (2005) Cloning and structural analysis of wheat cDNAs encoding *Ndr* protein kinase homolog by data mining of the EST database KOMUGI. Breeding Science 55(2): 207-212.
- 山岸 博 (2005) *Arabidopsis thaliana* とキャベツの体細胞雑種の作出およびそれらのゲノム構造 京都産業大学先端科学技術研究所所報 4:15-19.
- Ishikawa, R., Toki, N., Imai, K., Sato, Y. I., Yamagishi, H., Shimamoo, Y., Ueno, K., Morishima, H. and Sato, T. (2005) Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity. Genetic Res. and Crop Evol. 52: 395-403.

黒坂 光 (2005) 神経変性疾患とムチン型糖鎖付加反応. 京都産業大学総合学術研究所所報 3: 15-18.

寺地 徹 (2005) TAC ベクターとプロテオーム解析を用いたダイコンの稔性回復遺伝子のクローニング. 京都産業大学総合学術研究所所報 3: 19-24.

学外共同研究者

Nomura, H., Komori, T., Komori, M., Nakahira Y. and Shiina, T. (2007) Evidence for chloroplast control of external Ca²⁺-induced cytosolic Ca²⁺ transients and stomatal closure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press)

野添幹雄・八木祐介・椎名 隆 (2007) 葉緑体シグマ因子の機能分担と進化 植物色素体の多様な機能を支える仕組み. 化学と生物 45: 300-303.

Khan, MS., Hameed, W., Nozoe, M. and Shiina T. (2007) Disruption of the psbA gene by the copy correction mechanism reveals that the expression of plastid-encoded genes is regulated by photosynthesis activity. J Plant Res. 120: 421-430.

山下博史・椎名 隆 (2006) 接触傾性運動— 食虫植物の捕虫メカニズム—. プラントミメティックス NTS 出版

Ishii, T., Arimura, S., Ikeda, N., Kamijima, O. and Mori, N. (2006) Mitochondrial microsatellite variability in common wheat and its ancestral species. Genes and Genetic Systems 81: 211-214.

Ohta, S., Mori, N., Özkan, H. and Iwasaki, R. (2006) A brief report on a collection by a field survey of wild wheat relatives in southern Turkey in 2005. In: A preliminary report of 'Fukui Prefectural University Agro-Ecological Exploration in Southwest Eurasia in 2005 (FASWE05)'. No.1. Turkey and Greece, edited by S. Ohta and H. Özkan, pp1-27.

Iwasaki, R., Özkan, H., Mori, N. and Ohta, S. (2006) Morphological variation and geographical distribution of *Aegilops umbellulata* in southern Turkey revealed by the field researches from 2003 to 2005. In: A preliminary report of 'Fukui Prefectural University Agro-Ecological Exploration in Southwest Eurasia in 2005 (FASWE05)'. No.1. Turkey and Greece, edited by S. Ohta and H. Özkan, pp28-37.

Ohta, S., Iwasaki, R., Mori, N. and Özkan, H. (2006) Geographical distribution of two varieties of *Aegilops neglecta* and *Ae. columnaris* in southern Turkey revealed by the field researches from 2003 to 2005. In: A preliminary report of 'Fukui Prefectural University Agro-Ecological Exploration in Southwest Eurasia in 2005 (FASWE05)'. No.1. Turkey and Greece, edited by S. Ohta and H. Özkan, pp38-43.

Iwasaki, R., Özkan, H., Mori, N. and Ohta, S. (2006) Morphological variation and geographical distribution of *Secale* species collected in southern Turkey in 2004 and 2005. In: A preliminary report of 'Fukui Prefectural University Agro-Ecological Exploration in Southwest Eurasia in 2005

- (FASWE05)'. No.1. Turkey and Greece, edited by S. Ohta and H. Özkan, pp44-55.
- Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2005) A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J.* 42: 133-144.
- Shiina, T., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y. and Khan, MS (2005) Plastid RNA polymerases, promoters and transcription regulators in higher plants. *Int. Rev. Cytology* 244: 1-68.
- Toyoshima, Y., Onda, Y., Shiina, T. and Nakahira, Y. (2005) Plastid transcription in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 59-81.
- Gahdhi, H. T., Vales, M. I., Watson, C. J., Mallory-Smith, C. A., Mori, N., Rehman, M., Zemetra, R. S. and Reira-Lizarazu, O. (2005) Chloroplast and nuclear microsatellite analysis of *Aegilops cylindrica*. *Theor. Appl. Genet.* 111: 561-572.
- Matsuoka, Y., Mori, N. and Kawahara, T. (2005) Genealogical use of chloroplast DNA variation for intraspecific studies of *Aegilops tauschii* Coss. *Theor. Appl. Genet.* 111: 265-271.
- 中平洋一・椎名 隆 (2005) 葉緑体の秘めたるパワー. *蛋白質 核酸 酵素* 50: 1918-1920.
- Nozoe, M., Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Tsubokura, Y., Kato, K., Shinmyo, A., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2005) Characterization of a plastid sigma factor AtSIG5 responsible for psbD light-responsive transcription. In "Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives" pp731-733.
- Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Nakahira, Y. and Shiina, T. (2005) A nuclear-encoded sigma factor, AtSig6, plays a key role in early chloroplast development in cotyledons. In "Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives" pp733-735.
- Umeda, T., Nakahira, Y., Takeba, G. and Shiina, T. (2005) The plastid targeted GTP-binding protein, AtOBG1 is essential for embryo development in Arabidopsis. In "Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives" pp680-682.

《図書》

朝倉史明・荻原保成・寺地 徹・中村千春・宮下直彦・村田 稔・持田恵一 (印刷中)
基礎生物学テキストシリーズ「遺伝学」(第11章、13章分担執筆) 化学同人

学会発表

- 1) 山岸 博・山下陽子 京都府在来のダイコン品種‘佐波賀’の起源 日本育種学会第 113 回講演会 2008 年 3 月
- 2) 寺地 徹・林 清音 デヒドロアスコルビン酸還元酵素 (DHAR) 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ遺伝子組換えタバコの作出 日本育種学会第 113 回講演会 2008 年 3 月
- 3) 安本景太・富岡関子・松本欣剛・寺地 徹・山岸 博 ハマダイコンにおける未知稔性回復遺伝子に連鎖する DNA マーカーの開発 日本育種学会第 113 回講演会 2008 年 3 月
- 4) 重野麻子・森田智菜美・林 清音・山岸 博 ペチュニアおよび葉緑体形質転換タバコのプロトプラスト培養による植物体再分化 日本育種学会第 113 回講演会 2008 年 3 月
- 5) 松本欣剛・安本景太・寺地 徹・山岸 博 稔性回復遺伝子に連鎖する DNA マーカーのハマダイコン集団への適用 日本育種学会第 113 回講演会 2008 年 3 月
- 6) 谷口和也・中西健太・上村達矢・堀川明彦・寺地 徹 細胞質置換コムギにみられるミトコンドリア *cox* 遺伝子群の構造変異とそれに伴う遺伝子発現変動の解析 日本育種学会第 113 回講演会 2008 年 3 月
- 7) Terachi, T. Transplastomic tobacco plants as models for improving agronomic characters of leafy vegetables International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering (China), p.20, December, 2007
- 8) Chang-Hong, Guo. Qiu-yi, Cai. Li-na, Xu. Ohno, K. and Terachi, T. Expression of soybean ferritin in tobacco chloroplast genome result in increased iron content International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering (China), p.22, December, 2007
- 9) Nozoe, M. Suguchi, A. Hayashi, S. and Terachi, T. Transplastomic tobacco plants expressing the glutathione reductase, showing the resisitance to oxidative stress International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering (China), p.25, December, 2007
- 10) Hayashi, S. Tujimura, M. and Terachi, T. Characterization of transplastomic tobacco plants with the genes encoding for the ROS-scavenging enzymes International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering (China), p.27, December, 2007
- 11) Chang-Hong, Guo. Dian-si, Yu. Wen-yan, Mao. Rong-wei, Guan. and Terachi, T. Enhanced formaldehyde resistance by overexpression of formaldehyde-fixing enzyme gene in tobacco chloroplast genome International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering (China), p.55, December, 2007
- 12) 中村直介・田原聖明・西村和真・八賀康祐・三宅 歩・伊藤信行・黒坂 光 ゼブラフィッシュにおける脳特異的 GalNAc 転移酵素の発現、及び機能解析 第 30 回日本分子生物学会年会 第 80 回日本生化学会大会 2007 年 12 月
- 13) 鳥羽慎也・高田慎一・佐藤達典・中村直介・黒坂 光 胚性腫瘍細胞を用いた脳特異的 UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase の機能解析 第 30 回日本分子生物

学会年会 第80回日本生化学会大会 2007年12月

- 14) 山岸 博・山下陽子 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種におけるゲノム構造および種子稔性 園芸学会平成19年度秋季大会、p.179、2007年9月
- 15) 堀川明彦、谷口和也、上村達矢、寺地 徹、コムギ及びエギロブス植物のミトコンドリアorf260 遺伝子の分子的解析、日本育種学会第112回講演会、p.54、2007年9月
- 16) 大野香織、郭 長虹、寺地 徹、ダイズのフェリチン全長 cDNA を葉緑体で強発現するタバコの遺伝子発現の変化と新たなフェリチン組換え体の作出、日本育種学会第112回講演会、p.159、2007年9月
- 17) 橋本絢子、野添幹雄、郭長虹、大迫敬義、尾崎昭子、黒坂 光、山岸 博、寺地 徹、葉緑体の遺伝子組換えタバコによる有用タンパク質の大量生産の試み1. ヒルジン、日本育種学会第112回講演会、p.160、2007年9月
- 18) 野添幹雄、須口麻美、林 清音、寺地 徹、グルタチオンレクターゼを大量発現する葉緑体形質転換タバコの作出、日本育種学会第112回講演会、p.161、2007年9月
- 19) 林 清音、佐野 智、寺地 徹、モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (MDAR) 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ遺伝子組換えタバコの特徴づけ、日本育種学会第112回講演会、p.162、2007年9月
- 20) 松本欣剛、安本景太、山岸 博、稔性回復遺伝子を持つハマダイコンにおける *orf687* の Genotyping、日本育種学会第112回講演会、p.214、2007年9月
- 21) 安本景太、富岡関子、松本欣剛、寺地 徹、山岸 博、野生ダイコンにおける道の稔性回復遺伝子の遺伝様式および稔性回復機構、日本育種学会第112回講演会、p.215、2007年9月
- 22) 山岸 博、安本景太、松本欣剛、西川由美、ダイコン属野生種におけるオグラ型細胞質に対する稔性回復遺伝子の分布および変異、日本育種学会第112回講演会、p.216、2007年9月
- 23) Nakamura, N., Tawara, M., Nishimura, K., Hachiga, K., Miyake, A., Itoh, N. and Kurosaka A. Developmental roles of brain-specific polypeptide GalNAc-transferases in zebrafish. 19th International Symposium on Glycoconjugates (Cairns, Australia.) July, 2007.
- 24) Toba, S., Nakamura, N., Nishimura, K., Satoh, T. and Kurosaka A. Roles of brain-specific UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in neural development of embryonal carcinoma cells. 19th International Symposium on Glycoconjugates (Cairns, Australia.) July, 2007.
- 25) Yasumoto, K., Terachi, T. and Yamagishi, H. Structural and sequence variations among the fertility restorer genes for Ogura male-sterility in the wild and cultivated radishes. International Congress on Plant Mitochondrial Biology (Nara, Japan), p.05, 2007
- 26) Horikawa, A., Nakanishi, K., Taniguchi, K., Matsuzaki, J. and Terachi, T. Molecular analyses of alloplasmic lines of common wheat having *Aegilops mutica* cytoplasm. International Congress on Plant Mitochondrial Biology (Nara, Japan), p.47, 2007
- 27) 中西健太、谷口和也、堀川明彦、寺地 徹、雄性不稔を示す *Aegilops mutica* 細胞質置換コ

- ムギに存在する伸長型ミトコンドリア ATP9 の発現解析、日本育種学会第 111 回講演会、p. 46、2007 年 3 月
- 28) 安本景太、寺地 徹、山岸 博、*orf687* を持たないハマダイコンによるオグラ型細胞質に対する花粉稔性回復効果、日本育種学会第 111 回講演、p. 47、2007 年 3 月
- 29) 大山口暁、吉見麻衣子、富岡関子、山岸 博、寺地 徹、オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子のハツカダイコン品種・系統内における変異、日本育種学会第 111 回講演会、p. 48、2007 年 3 月
- 30) 西川由美、俣野宏明、安本景太、山岸 博、ダイコンの胚軸培養による茎葉再分化の品種内差異、日本育種学会第 111 回講演会、p. 97、2007 年 3 月
- 31) 大野香織、郭 長虹、寺地 徹、フェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つタバコ形質転換体の後代の特徴づけ、日本育種学会第 111 回講演会、p. 123、2007 年 3 月
- 32) 山岸 博、松本欣剛、安本景太、ハマダイコンにおける花粉稔性回復遺伝子の分布および変異、日本育種学会第 111 回講演会、p. 132、2007 年 3 月
- 33) 橋本絢子、郭 長虹、大迫敬義、尾崎昭子、黒坂光、山岸 博、寺地 徹、ヒルジン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ形質転換タバコ後代の特徴づけ、日本育種学会第 111 回講演会、p. 256、2007 年 3 月
- 34) 林 清音、辻村真衣、須口麻美、寺地 徹、活性酸素消去系酵素遺伝子を葉緑体ゲノムにもつタバコの特徴づけ、日本育種学会第 111 回講演会、p. 257、2007 年 3 月
- 35) Yang, S. J., Terachi, T. and Yamagishi, H. Inhibition of flavonoid biosynthesis in *Raphanus sativas* having the Ogura male-sterile cytoplasm. 27th International Horticultural Congress (Seoul, Korea) August, 2006
- 36) 北條雅也、浅尾浩史、野村哲郎、山岸 博、奈良県在来ツケナ‘マナ’の類縁関係、園芸学会平成 18 年度秋季大会、p. 514、2006 年 9 月
- 37) 安本景太、寺地 徹、山岸 博、野生ダイコンにおけるオグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 *orf687* の分布、日本育種学会第 110 回講演会、p. 67、2006 年 9 月
- 38) 吉見麻衣子、富岡関子、吉田佳言、山岸 博、寺地 徹、オグラ型雄性不稔に対するハツカダイコン稔性回復遺伝子座のゲノム構造と変異. II. PPR メンバー間のリアレンジメント、日本育種学会第 110 回講演、p. 68、2006 年 9 月
- 39) 堀川明彦、川浦香奈子、荻原保成、寺地 徹、コムギ 22K マイクロアレイを用いた *Aegilops mutica* 細胞質置換コムギにおけるミトコンドリアレトログレード制御の解析、日本育種学会第 110 回講演会、p. 74、2006 年 9 月
- 40) 林 清音、辻村真衣、寺地 徹、アスコルビン酸パーオキシダーゼ遺伝子 (*apx*) を葉緑体に持つ組換えタバコの作出と特徴づけ、日本育種学会第 110 回講演会、p. 147、2006 年 9 月
- 41) 橋本絢子、寺地 徹、ニンジン (*Daucus carota* L.) の色素体形質転換に関する基礎研究. I. 色素体ゲノムの解析とベクター構築、日本育種学会第 110 回講演会、p. 148、2006 年 9 月

- 42) 石橋篤志、尾崎昭子、山岸 博、日本のダイコンの起源と分化. XIV. 葉緑体塩基配列の品種内変異、日本育種学会第 110 回講演会、p. 248、2006 年 9 月
- 43) 山岸 博、日本のダイコンの起源と分化. XV. 結論、日本育種学会第 110 回講演会、p. 249、2006 年 9 月
- 44) Terachi, T., Yasumoto, K. and Yoshimi, M. Production of transgenic tobacco lines which overexpresses a fertility restorer gene for Ogura male-sterility from the radish. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto, Japan) June, 2006
- 45) Toba, S., Nakamura, N., Oki, S., Hirai, M., Mikami, T., Konishi, M., Itoh, N. and Kurosaka A. Expression and functional characterization of brain-specific UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto, Japan) June, 2006
- 46) Nakamura, N., Tawara, M., Toba, S., Wakahara, T., Miyake, A., Itoh, N. and Kurosaka A. The developmental role of brain-specific novel polypeptide GalNAc-transferases in zebrafish hindbrain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto, Japan) June, 2006
- 47) Aki Saeki, A., Tenno, M., Fujishima, K. and Kurosaka, A. Study on lectin-activity of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Kyoto, Japan) June, 2006.
- 48) 山岸 博、ダイコン属植物の系統分化に関する遺伝・育種学的研究、日本育種学会第 109 回講演会、p. 2-3、2006 年 3 月
- 49) 堀川明彦、寺地 徹、パンコムギ mtDNA の全塩基配列情報に基づく *Aegilops mutica* ミトコンドリアゲノムの構造解析、日本育種学会第 109 回講演会、p. 28、2006 年 3 月
- 50) 吉見麻衣子、田口 孝、吉田佳言、瀬野未也子、安本景太、山岸 博、寺地 徹、オグラ型雄性不稔に対するハツカダイコンの稔性回復遺伝子座のゲノム構造と変異、日本育種学会第 109 回講演会、p. 29、2006 年 3 月
- 51) 梁 修静、寺地 徹、山岸 博、ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔にはフラボノイド合成系遺伝子の発現が関与する、日本育種学会第 109 回講演会、p. 30、2006 年 3 月
- 52) 安本景太、寺地 徹、山岸 博、オグラ型細胞質雄性不稔に対するハマダイコン型稔性回復遺伝子の *Brassica* 属野菜への導入、日本育種学会第 109 回講演会、p. 226、2006 年 3 月
- 53) 山岸 博、尾崎昭子、山下陽子、日本のダイコンの起源と分化. XIII. ハマダイコンにおけるミトコンドリア *cox I* 領域の構造の集団間、集団内変異、日本育種学会第 109 回講演会、p. 248、2006 年 3 月
- 54) 石橋篤志、山岸 博、ミトコンドリアの *cox I* 領域の塩基配列多型を用いたハツカダイコンおよび日本のダイコンにおける品種分類、日本育種学会第 109 回講演会、p. 249、2006 年 3 月

月

- 55) 堀川明彦、梶川 光、松崎 準、寺地 徹、細胞質置換コムギを用いた *Aegilops mutica* のミトコンドリアゲノムの構造解析、第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月
- 56) 安本景太、藤井重昂、吉見麻衣子、山岸 博、寺地 徹、PPR タンパク質をコードするダイコン稔性回復遺伝子の分子遺伝学的研究、第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年 12 月
- 57) 梁 修静、寺地 徹、山岸 博、ダイコンにおけるオグラ型細胞質雄性不稔の発現に関わる遺伝子の網羅的探索、園芸学会平成 17 年度秋季大会、p. 638、2005 年 10 月
- 58) 山岸 博、木下大輔、山下陽子、キャベツとシロイヌナズナの体細胞雑種におけるオルガネラゲノムの構造、園芸学会平成 17 年度秋季大会、p. 644、2005 年 10 月
- 59) 西塚順子、山岸 博、寺地 徹、ダイコンのファイトレメディエーション関連遺伝子の単離. II. GSH1 及び GS 遺伝子、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 103、2005 年 8 月
- 60) 辻村真衣、林清音、橋本絢子、西塚順子、寺地 徹、タバコの活性酸素消去系酵素遺伝子の単離と葉緑体形質転換ベクターの構築、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 104、2005 年 8 月
- 61) 吉見麻衣子、安本景太、山岸 博、寺地 徹、オグラ型雄性不稔に対するハツカダイコン稔性回復遺伝子の構造変異、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 115、2005 年 8 月
- 62) 安本景太、吉見麻衣子、寺地 徹、山岸 博、オグラ型雄性不稔に対する‘園紅’型稔性回復遺伝子の分布、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 116、2005 年 8 月
- 63) 築山祐司、井上國世、奥本 裕、寺地 徹、田中千尋、中崎鉄也、谷坂隆俊、イネ PR-3 キチナーゼ遺伝子のいもち病感染特異的発現を制御する転写調節因子の解析、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 133、2005 年 8 月
- 64) 堀川明彦、平野了也、寺地 徹、コムギ・エギロプス属内で生じたミトコンドリア rpl5 遺伝子の核ゲノムへの移行、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 144、2005 年 8 月
- 65) 石橋篤志、山岸 博、日本のダイコンの起源と分化. XII. ミトコンドリアの *atp6* 領域におけるハツカダイコンと日本のダイコンの塩基配列変異、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 306、2005 年 8 月
- 66) 尾崎昭子、石橋篤志、山岸 博、日本のダイコンの起源と分化. XI. ダイコン属植物の葉緑体における *trnL* から *psbG* に至る領域の塩基配列多型、日本育種学会第 107・108 回講演会 p. 307、2005 年 8 月
- 67) 山岸 博、飯田崇申、石橋篤志、尾崎昭子、シーケンスに基づく葉緑体ゲノムの PCR-RFLP による栽培ダイコンの起源の推定、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 308、2005 年 8 月
- 68) 山岸 博、川口晋吾、石橋篤志、*Brassica* 属作物における葉緑体の *trnF/ndhJ* 遺伝子間領域の塩基配列に関する種間・種内変異、日本育種学会第 107・108 回講演会、p. 349、2005 年 8 月
- 69) 西塚順子、寺地 徹、タバコ葉緑体ゲノムのフィトキレーチン (PC) 合成酵素及び人口 PC

- 遺伝子導入の試み、日本植物細胞分子生物学会、p.71、2005年8月
- 70) 吉見麻衣子、寺地 徹、稔性回復遺伝子として機能するダイコンの新規 PPR タンパク質を持つ組換えタバコの作出、日本植物細胞分子生物学会、p.163、2005年8月
- 71) 辻村真衣、林 清音、橋本絢子、西塚順子、寺地 徹、タバコ葉緑体ゲノムへの活性酸素消去系酵素遺伝子導入の試み、日本植物細胞分子生物学会、p.182、2005年8月
- 72) Nishizuka, J. and Terachi, T. Isolation of radish genes involved in phytochelatin synthesis and their possible use in phytoremediation via transplastomic technology. XVII International Botanical Congress (Vienna, Austria) June, 2005

◇ 学術論文・著書・総説など

Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome

Yasunari Ogihara, Yukiko Yamazaki¹, Koji Murai², Akira Kanno³, Toru Terachi⁴, Takashi Shiina, Naohiko Miyashita⁵, Shuhei Nasuda⁵, Chiharu Nakamura⁶, Naoki Mori⁶, Shigeo Takumi⁶, Minoru Murata⁷, Satoshi Futo⁸ and Koichiro Tsunewaki^{5,*}

Faculty of Agriculture, Kyoto Prefecture University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8522, Japan, ¹National Institute of Genetics, Misima 411-8540, Japan, ²Faculty of Bioscience and Biotechnology, Fukui Prefectural University, Matsuoka, Fukui 910-1195, Japan, ³Faculty of Life Sciences, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan, ⁴Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Kita-ku, Kyoto 603-8047, Japan, ⁵Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan, ⁶Faculty of Agriculture, Kobe University, Nada-ku, Kobe 675-0013, Japan, ⁷Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan and ⁸FASMAC Co. Ltd, Atsugi, Kanagawa 243-0041, Japan

Received July 7, 2005; Revised September 5, 2005; Accepted October 7, 2005

DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AP008982

ABSTRACT

The application of a new gene-based strategy for sequencing the wheat mitochondrial genome shows its structure to be a 452 528 bp circular molecule, and provides nucleotide-level evidence of intramolecular recombination. Single, reciprocal and double recombinant products, and the nucleotide sequences of the repeats that mediate their formation have been identified. The genome has 55 genes with exons, including 35 protein-coding, 3 rRNA and 17 tRNA genes. Nucleotide sequences of seven wheat genes have been determined here for the first time. Nine genes have an exon–intron structure. Gene amplification responsible for the production of multicopy mitochondrial genes, in general, is species-specific, suggesting the recent origin of these genes. About 16, 17, 15, 3.0 and 0.2% of wheat mitochondrial DNA (mtDNA) may be of genic (including introns), open reading frame, repetitive sequence, chloroplast and retro-element origin, respectively. The gene order of the wheat mitochondrial gene map shows little synteny to the rice and maize maps, indicative that thorough gene shuffling occurred during speciation. Almost all unique mtDNA sequences of wheat, as compared with rice and maize mtDNAs, are redundant DNA. Features of the gene-based strategy are

discussed, and a mechanistic model of mitochondrial gene amplification is proposed.

INTRODUCTION

The mitochondrial genome is important in plant development, as well as in productivity (1–3), and extensive studies have been done on its functions (4). Although the complete nucleotide sequence has been determined for seven land plant species (5–11), the genomic makeup is not well understood (11–13) because of the multipartite structure of the genome (14–16). With a new gene-based strategy for sequencing the wheat mitochondrial genome, we obtained a number of recombinant molecules, analyses of which for the first time have provided proof, at the nucleotide sequence level, of the mechanism that produces multipartite molecules in the mitochondrial genome. Moreover, we demonstrate by gene map comparison that thorough gene shuffling occurred during the speciation of three cereals (wheat, rice and maize), leading to remarkable changes in their mitochondrial genome structures, as previously shown by the restriction fragment mapping of maize mitochondrial DNA (mtDNAs) (17) and by MultiPipMaker analysis of several sequenced plant mitochondrial genomes (10). Based on this information, we propose a new method for quantifying genome-wide molecular changes in mitochondrial genomes, which result in ontogenetic as well as phylogenetic variability of the cereal mitochondrial genomes.

*To whom correspondence should be addressed at 6-14-10 Kasugadai, Nishi-ku, Kobe, Hyogo 651-2276, Japan. Tel/Fax: +81 078 961 4085; Email: ktsunewa@kais.kyoto-u.ac.jp

In the wheat complex, *Triticum* (wheat) and *Aegilops* (goat grass), inter- as well as intra-specific molecular diversity of both the chloroplast and the mitochondrial genomes were studied in order to clarify the phylogenetic relationships of various taxa of the complex, including the origin of wheat (18,19). Diversity among plasmons of their phenotypic effects on various wheat characters also was investigated [for review see (20)]. However, we have not studied the functional relationships between molecular variation and differential phenotypic effects. We determined recently the complete nucleotide sequence and gene content of the wheat chloroplast genome (21). Here we report those of the mitochondrial genome. The information obtained provides a basis for future studies on the linkage of molecular diversity and phenotypic variability in the wheat complex.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The common wheat, *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring, was the source of the mtDNA studied here, that was obtained from mitochondria of 14-day-old etiolated seedlings (22) and was purified before use (23).

MtDNA library construction and clone sequencing

An mtDNA library was constructed by the SuperCos1 *in vitro* packaging method (Stratagene, LaJolla) from partially digested wheat mtDNA with *Sau3AI*. From this library, 232 clones were randomly selected and dot-blotted with 32 mitochondrial genes as probes (24). All probe genes, except *rps13*, hybridized with 7 or more clones, from which 23 clones were

selected to cover 31 probe genes and were sequenced by the shotgun method. Sequenced fragments were aligned using BLASTn (25) to determine the entire sequence of each clone.

Sequence assembly and gene analysis

Alignment of the 23 clones gave two linear molecules of ~350 and 76 kb. Two additional clones, #194 and #204, whose ends hybridized to one end each of the two linear molecules, were selected and sequenced. Phrap (http://www.genome.washington.edu/UWGC/analysis_tools/phrap.htm), BLASTn and blast2sequences programs were used for the primary assembly of all the clones. Manual fine tuning was done to generate the final master circle (MC). Repeat sequences were analyzed by in-house script, window size 8 bp, and represented as a dot-plot image. Open reading frames (ORFs) were identified by a Genome Gambler (Xanagen Co.) and ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). tRNA genes were searched for by tRNAscan-SE (26). The annotated rice and maize mitochondrial genes, BA000029 and AY506529, respectively, as well as individual wheat mitochondrial genes submitted to the DNA databank, were compared with our sequence data to annotate all the genes. Sequences homologous to known cereal transposable elements were searched for, referring to the TIGR grass transposable elements database after Clifton *et al.* (10).

Gene nomenclature and nucleotide position

The nomenclature of Clifton *et al.* (10) for maize mitochondrial genes was adopted, except for the designation of exons, for which *ex-1* to *ex-5* of a given gene are indicated by *a* to *e*, affixed to its gene symbol. Positions of a forward-strand

Table 1. Wheat mtDNA clones sequenced, showing their size, type, marker genes used and genes other than probe genes identified by sequencing

Clone	Size (bp)	Type ^a	Probe genes used ^b	Additional genes found by sequencing ^c
#1	37 129	R(S)	<i>nad1a</i> , <i>nad7</i> , <i>rrn5/18</i>	<i>mtb</i> , <i>trnM</i> , <i>trnP</i> , <i>trnS</i>
#5	33 266	I	<i>ccmFC</i> , <i>rrn26(p)</i>	<i>trnK</i> , <i>trnQ</i>
#6	38 445	I	<i>nad4</i> , <i>nad5de</i>	<i>trnP</i>
#24	35 670	R(D)	<i>cob</i> , <i>rps7</i> , <i>rrn5/18</i> , <i>rrn26</i>	<i>trnF</i> , <i>trnM</i> , <i>trnM</i> , <i>trnS</i>
#27	15 896	R(S)	<i>nad1a</i>	<i>ccmFC</i>
#31	35 843	R(S)	<i>cox2</i> , <i>nad3</i> , <i>nad9</i> , <i>nad2cde</i> , <i>rps12</i>	<i>orf173</i> , <i>orf349</i> , <i>rps2</i> , <i>trnD</i> , <i>trnS</i> , <i>trnY</i>
#39	16 661	I	<i>cox2</i> , <i>nad2cde</i> , <i>nad9</i> , <i>atp4</i>	<i>orf349</i> , <i>rps2</i> , <i>trnD</i> , <i>trnY</i>
#51	34 696	R(S)	<i>rps7</i> , <i>rrn5/18</i> , <i>rrn26</i>	<i>trnF</i> , <i>trnM</i> , <i>trnS</i>
#63	35 769	I	<i>cox1</i> , <i>rrn26</i>	<i>trnK</i> , <i>trnQ</i>
#66	36 206	I	<i>nad7</i>	<i>nad4L</i> , <i>rps19(p)</i> , <i>trnD</i> , <i>trnM</i> , <i>trnL</i> , <i>trnK</i> , <i>trnM</i> , <i>trnN</i> , <i>trnS</i>
#74	34 458	I	<i>nad1a</i> , <i>nad1d</i> , <i>nad5ab</i> , <i>nad6</i> , <i>rrn5/18</i>	<i>rpl2(p)</i> , <i>rps4</i> , <i>trnM</i> , <i>trnP</i>
#75	35 217	R(S)	<i>atp6</i> , <i>nad1bc</i> , <i>nad5de</i>	<i>ccmFCa</i> , <i>orf194</i> , <i>orf359</i> , <i>rps13</i> , <i>rpl16</i> , <i>rps1</i> , <i>rps3</i> , <i>trnC</i>
#92	37 038	I	<i>atp6</i> , <i>cox3</i> , <i>matR</i> , <i>nad1bc</i> , <i>nad1e</i> , <i>nad5c</i> , <i>nad7</i>	<i>rpl5</i> , <i>rps13</i> , <i>trnE</i>
#94	27 319	R(S)	<i>nad1d</i> , <i>nad6</i> , <i>rrn26</i>	<i>rpl2(p)</i> , <i>rps4</i> , <i>trnK</i> , <i>trnQ</i>
#96	44 184	R(S)	<i>atp6</i> , <i>cob</i> , <i>cox3</i> , <i>rrn5/18</i>	<i>ccmFN</i> , <i>trnE</i> , <i>trnM</i>
#102	37 709	I	<i>atp6</i> , <i>nad5de</i>	<i>ccmFCa</i> , <i>ccmFCb</i> , <i>orf194</i> , <i>orf359</i> , <i>rpl16</i> , <i>rps3</i> , <i>trnC</i> , <i>trnP</i>
#110	39 360	I	<i>atp6</i> , <i>cob</i> , <i>ccmFN</i> , <i>rrn5/18</i> , <i>rps1</i>	<i>trnM</i>
#126	34 832	I	<i>cob</i> , <i>cox1</i> , <i>cox2</i> , <i>atp8</i>	<i>trnD</i>
#146	36 595	I	<i>cob</i> , <i>matR</i> , <i>nad1e</i> , <i>nad5c</i> , <i>ccmFN</i> , <i>rrn5/18</i> , <i>rps1</i>	<i>rpl5</i> , <i>trnM</i>
#160	36 135	I	<i>nad2ab</i> , <i>nad2cde</i> , <i>nad9</i> , <i>atp4</i>	<i>ccmB</i> , <i>orf349</i> , <i>trnK</i> , <i>trnQ</i> , <i>trnY</i>
#162	38 872	R(S)	<i>atp1</i> , <i>atp6</i> , <i>atp9</i> , <i>nad1bc</i>	<i>ccmFCa</i> , <i>ccmFCb</i> , <i>orf194</i> , <i>orf359</i> , <i>rps13</i> , <i>rpl16</i> , <i>rps3</i> , <i>trnC</i>
#190	39 803	I	<i>cox2</i> , <i>nad3</i> , <i>atp8</i> , <i>rps12</i>	<i>mtb</i> , <i>trnS</i>
#194	38 416	I	(None)	<i>atp1</i> , <i>nad4L</i> , <i>rps19(p)</i> , <i>trnD</i> , <i>trnM</i> , <i>trnL</i> , <i>trnK</i> , <i>trnM</i> , <i>trnN</i> , <i>trnW</i>
#204	34 585	I	<i>rps7</i> , <i>rrn26</i>	<i>trnF</i> , <i>trnS</i>
#224	38 351	R(D)	<i>cob</i> , <i>cox3</i> , <i>nad1a</i> , <i>rrn5/18</i>	<i>mtb</i> , <i>rpl5</i> , <i>trnM</i> , <i>trnP</i>
Total	872 455		(Average size = 34 898 bp)	

^aI: intact clone; R(S): single-recombinant clone; S(D): double recombinant clone.

^bUnderlined: probe genes not detected by sequencing.

^c(p): partial gene.

nucleotide in the MC molecule and in a gene or repeat sequence, respectively, are shown as the 'MC coordinate' and 'gene or repeat coordinate'.

RESULTS

Sequencing of individual clones and their alignment

Twenty-five wheat mtDNA clones were sequenced (Table 1). Their sizes ranged from 27 to 44 kb, except for two (#27 and #39) ~16 kb in size. The average size was 34 898 bp, and the total size was 872 455 bp. Alignment showed a single 452 528 bp MC molecule (Figure 1). Fifteen clones occupied single locations in the genome ('intact clone'), while the remaining 10 were split into two or three segments located in different parts of the genome, tentatively called the 'recombinant clone'. Quetier *et al.* (15) estimated size of the wheat mitochondrial genome to be ~430 kb, based on its *SalI* restriction map. Their estimate is very close to the size, 452 528 bp, determined by the present sequencing work.

Intra-molecular recombination and site of recombination

Of the 10 recombinant clones, 8 were split into two segments. The other two (#24 and #224) were cleaved into three segments. Without exception, there was a pair of direct repeats

(DRs) or inverted repeats (IRs) at the split site (Figure 1). All the recombinant clones carried a completely or nearly identical copy of the same repeat at the recombination site (details in the next paragraph). DRs connected split fragments head-to-tail, whereas IRs connected them head-to-head or tail-to-tail. These facts indicate that the split clones were produced by intra-molecular recombination between the relevant repeats. In sum, nine repeat pairs, R1 to R9, were responsible for the production of all of the recombinant clones (Table 2). The production of clones #24 and #51 was mediated by the same R7 repeats, whereas #75 (#162 as well) and #96 were reciprocal products of recombination of R8 repeats (Figure 2A). Two clones, #24 and #224, were double recombinants (Figure 2B and C). The former was produced by recombination between two DR pairs, R3 and R7, and the latter recombination between two IR pairs, R2 and R6. Seven additional repeats, R10 to R16, larger than 100 bp were present in the genome (Table 2). Three repeats, R1, R7 and R10, shared a 1634 bp sequence in common, containing a part of *rrn26*. Similarly, three other repeats, R2, R3 and R4, shared a 4430 bp common sequence that carried *trnfM*, *rrn18* and *rrn5*. In addition, small repeats of 30–100 bp in size were detected in a dot-matrix image, of which 35 were the direct and 38 were the inverted types. All those repeats are shown in Figure 3, in which R1 to R16 are marked by arrows. We need to search for whether all of them serve as

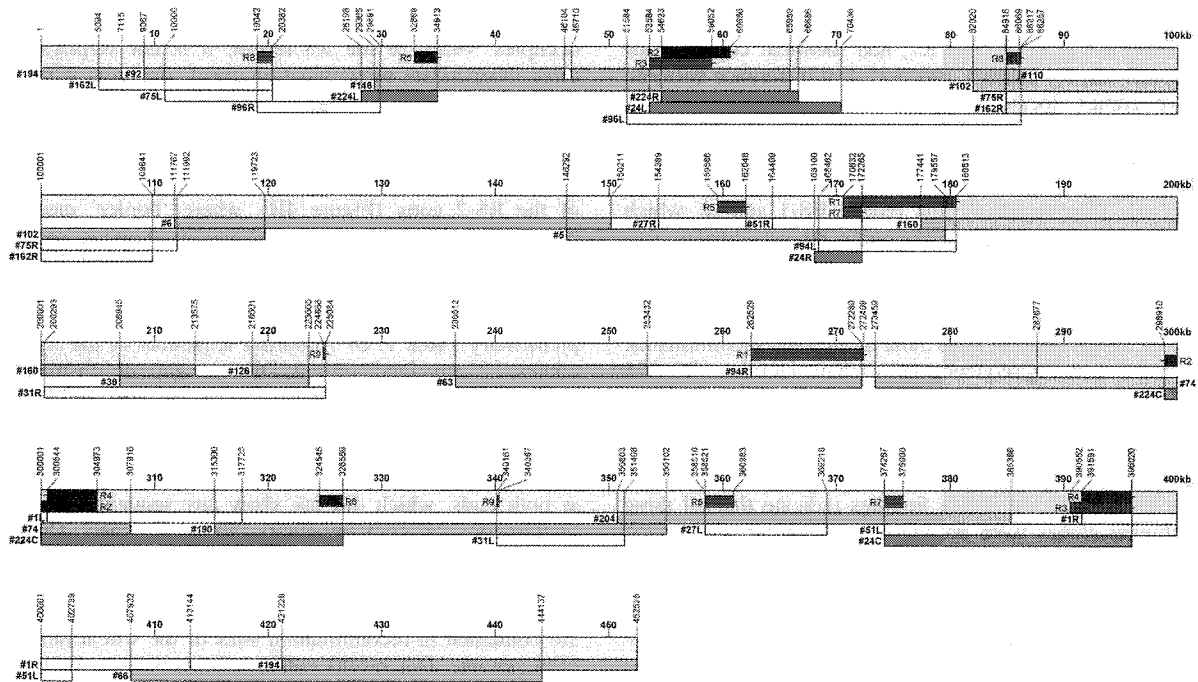


Figure 1. Alignment of 25 mtDNA clones in the 452 528 bp MC molecule of the wheat mitochondrial genome. Broad, light-green bar shows the MC molecule cleaved between MC coordinates 452 528 and 1. Numbers on the MC molecule show the MC coordinates of the ends of all the clones, their segments and repeat sequences. Rectangle with projection in the broad bar: R1–R9 repeat pairs involved in recombinant clone formation. DRs are dark green, IRs dark brown. The projection shows the direction of each repeat copy. Slender bar: individual clones; light blue, yellow and orange represent intact, single recombinant and double recombinant clones, respectively. L, C or R affixed to clone numbers: Left, central and right segments of a recombinant clone. Note that L and R segments of a single-recombinant clone have the same repeat copy at the end connecting two segments; head-to-tail for DRs, and head-to-head or tail-to-tail for IRs. The double-recombinant clone has a copy of one repeat pair at one end each of its L and C segments and a copy of another repeat pair at the other end of C and at one end of R that, respectively, connect the L and C segments and the C and R segments by recombination.

Table 2. Repeats involved in intra-molecular recombination, and other repeats larger than 100 bp found in the wheat mitochondrial genome

No.	Type ^a	Size (bp)	Gene in repeats ^b	MC coordinates ^c			Difference between copies	Recombinant clone/fragment
				Copy-1	Copy-2	Copy-3		
R1	DR	9882	<i>rrn26(p)-trnQ-trnK</i>	170 632–180 513	262 529–272 409	—	copy-2 1bp def.	#94R/L
R2	IR	6064	<i>rrn5-rrn18-trnfM</i>	54 623–60 686	304 973–298 910	—	1bp mismatch	#224C/R
R3	DR	5469	<i>rrn5-rrn18-trnfM</i>	53 584–59 052	390 552–396 020	—	identical	#24C/L
R4	IR	4430	<i>rrn5-rrn18-trnfM</i>	304 973–300 544	391 591–396 020	—	1bp mismatch	#1L/R
R5	DR	2463	No gene	159 586–162 048	358 521–360 983	—	identical	#271/R
R6	IR	2045	No gene	32 869–34 913	326 589–324 545	—	identical	#224C/L
R7	DR	1634	<i>rrn26(p)</i>	170 632–172 265	262 529–264 162	374 267–375 900	identical	#24C/R; #51L/R ^e
R8	DR	1341	<i>atp6</i>	19 042–20 382	84 918–86 257	—	copy-2 1bp def. +7 bp mismatch	#75L/R; #96L/R; #162L/R
R9	DR	197	No gene	224 888–225 084 ^d	340 161–340 357	—	1 bp mismatch	#31L/R
R10	DR	7035	<i>rrn26</i>	257 128–264 162	368 866–375 900	—	identical	None
R11	DR	493	<i>atp8</i>	233 393–233 885	338 884–339 376	—	5 bp mismatch	None
R12	DR	385	<i>trnK</i>	178 466–178 850	270 362–270 746	442 527–442 911	copy-3 1 bp dif.	None
R13	DR	207	No gene	63 737–63 943	233 154–233 360	—	1 bp mismatch	None
R14	DR	190	<i>trnP</i>	117 643–117 832	305 046–305 235	—	4 bp mismatch	None
R15	DR	186	<i>trnD</i>	222 071–222 256	429 332–429 517	—	identical	None
R16	DR	104	No gene	20 239–20 342	86 115–86 218	197 109–197 212	identical	None

^aDR and IR: direct and inverted repeats.^b*rrn26(p)*: partial 422 bp sequence of *rrn26*.^cBoldface: IR copy.^dIncluded in *cox2a*.^eBoth recombinations occurred between copy-1 and -3.

recombination sites or not, although our results showed that a repeat pair as small as 197 bp in size (= R9) mediated recombination.

We tried to identify the recombination site in each repeat pair. Four, R3, R5, R6 and R7, had identical copies. Four others, R1, R2, R4 and R9, had only 1 nt difference between the two copies, located at the extreme end of the repeat (Table 2). Identification of the recombination site therefore was informative only for repeat pair R8, which was involved in the production of three recombinant clones; #75, #96 and #162 (Figure 4). Two copies of this repeat, R8-1 and -2, which carried *atp6-1* and *atp6-2* at the same R8 coordinates, 91–1251, had 8 nt differences; one at R8 coordinate 6, the others between coordinates 1301 and 1316 (Figure 4A). Nucleotide sequences of the two R8 copies and their 5'- and 3'-flanking segments were compared with those of the three recombinants. As for the 5'-flanking sequence and sixth nucleotide of R8, #75 and #162 were the same as the R8-1 copy, whereas #96 was the same as R8-2. As for the 3'-flanking sequence and seven variable nucleotides at R8 coordinates 1301–1316, #75 and #162 were the same as the R8-2 copy, whereas #96 was identical to the R8-1 copy. These findings indicate that all three recombinant clones were produced by recombination in the same 1294 bp segment of the R8 repeat (Figure 4A). Previously, Bonen and Bird (27) sequenced wheat mtDNA segments flanking *atp6*, and found that there are two molecular forms at both the 5' ('downstream' in their designation) and 3' ('upstream') borders of the gene. Their nucleotide sequences were in complete agreement with ours, except for a 1 bp deletion in our R8-2 copy between MC coordinates 86217 and 86218. Their sequences 3 and 2 correspond to the 5' and 3' borders of the R8-1 copy, and the sequences 4 and 1 to the 5' and 3' borders of the R8-2 copy (Figure 4B). They located a 6 bp insertion in sequence 3, extending the homologous region between sequences 3 and 4 by 22 bp downstream (toward the 5' end), which was confirmed by our

findings. The sequence comparison (Figure 4B) indicated that the three recombinant clones were produced by recombination in the same 1291 bp segment (3 bp smaller, comparing with the alignment in Figure 4A). Because this segment occupies ~95% of the R8 repeat, it is not surprising that three independent recombination events occurred within this segment.

Bonen and Bird (27) also reported the presence of short DRs in three of the above four sequences, corresponding to the present 5' and 3' borders of the R8-1 copy and the 5' border of the R8-2 copy (Figure 4B), where 'border' means the boundary between a repeat end and its flanking sequence. We examined 60 bp sequences around the 5' and 3' borders (30 bp on both sides of each border) of all repeats shown in Table 2. The complete border sequences are given in Supplementary Table 1. Of 70 border sequences of the 35 repeat copies, 22 contained straight, DRs (no gap, no mismatch) of 3–7 bp while additional 24 possessed aberrant 4–10 bp DRs, having a mismatched nucleotide or a few nucleotides intervening between the repeats, and the remaining 24 did not have short DRs (Table 3). Fourteen repeats had short DRs at both ends, which did not show any sequence similarity, homologous or complementary, to each other. Thus, we conclude that the majority of the repeat ends are associated with short DRs, although their functional role is unknown.

Stern and Palmer (28) indicated that *rrn18* and *rrn26* often are contained in recombination sites of the wheat mitochondrial genome. Our results confirmed this because 6 of the 12 recombination events detected are mediated by repeat pairs containing those genes (Table 2).

Genes and the genetic map of the wheat mitochondrial genome

In all, 55 genes and their exons were identified (Table 4) and mapped on the MC molecule (Figure 5). All the protein-

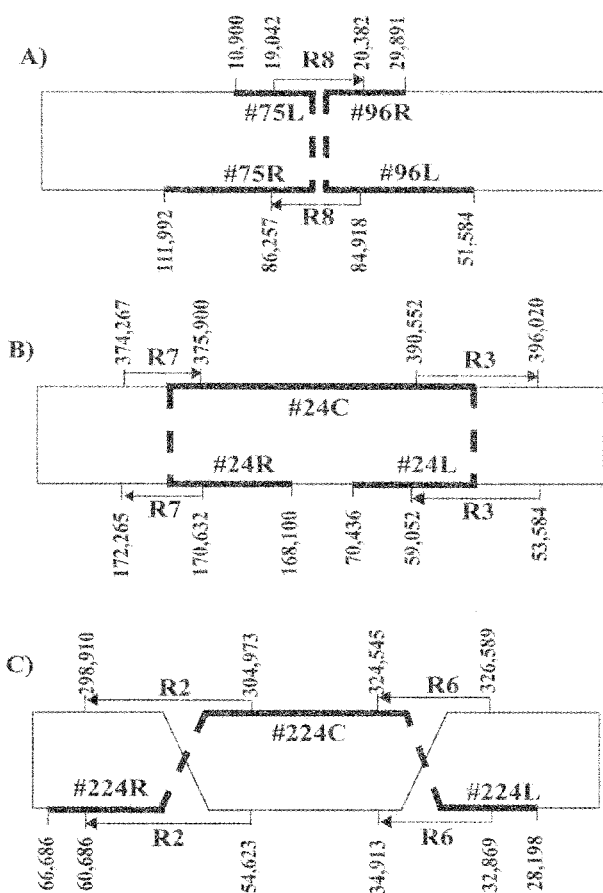


Figure 2. Origins of four recombinant clones obtained by recombination mediated by different repeat pairs. Rectangle: MC molecule. Arrows: DR or IR pairs. Broken line: fusion of separate segments by recombination. Thick and thin lines: cloned DNA segment and remaining part of the recombinant molecule not included in the clone. Numbers on MC molecules: MC coordinates at the ends of repeats and the cloned molecule. *Note:* DRs should be drawn in the same direction by folding the MC molecule with a 180° twist. This was omitted to simplify the figure. (A) Clones #75 and #96 as reciprocal products of R8-mediated recombination. They are part of two subgenomic molecules; (B) clone #24 is the product of double recombination at two DR pairs, R3 and R7; (C) clone #224 is the product of double recombination at two IR pairs, R2 and R6.

rRNA- and tRNA-coding genes known for wheat (24), rice (8) and maize (10) were present, i.e. 9 Complex I genes, 1 Complex III gene, 3 Complex IV genes, 5 Complex V genes, 4 cytochrome c biogenesis genes, 11 ribosomal protein genes, 2 other protein-coding genes, 3 rRNA genes and 17 tRNA genes. Nucleotide sequences of seven wheat genes, *rpl16*, *rps3*, *rps4*, *mtb*, *trnA*, *trnI* and *trnM*, were determined here for the first time. Three genes, *rpl2-p*, *rps19-p*, and *rrn26-p* (the third *rrn26* copy), were truncated. The first two are functional in rice but missing in maize (10). Nine genes, *nad1*, *nad2*, *nad4*, *nad5*, *nad7*, *cox2*, *ccmFC*, *rps3* and *trnA* (chloroplast origin), had the exon-intron structure. The chloroplast counterpart of *trnA* also has an intron (21). All exons of *nad4* (exons *a-d*), *nad7* (*a-e*), *cox2* (*a,b*), *ccmC* (*a,b*), *rps3* (*a,b*) and *trnA* (*5'*-,*3'*-*ex*) were *cis*-spliced, whereas some exons

of *nad1*, *nad2* and *nad5*, were *trans*-spliced (the slash indicating *trans*-spliced exons) as follows: *nad1a/nad1b,c/nad1d/nad1e*; *nad2a,b/nad2c-e*; and *nad5a,b/nad5c/nad5d,e*.

Ten genes were present in multi-copy: *atp6*, *atp8*, *rrn26*, *trnD* and *trnP* were duplicated and *rrn5*, *rrn18*, *trnfM*, *trnK* and *trnQ* triplicated. In addition, three *trnS* genes were found, but they greatly differed each other in nucleotide sequence and therefore were considered different genes, confirming the results of two previous works (29,30).

Restriction fragment analyses of wheat mtDNA revealed the presence of seven molecular forms of the *rrn18-rrn5* cluster (31,32). We identified three copies, Copy-1, -2 and -3, of a three-gene cluster, *trnfM-rrn18-rrn5*, in the MC molecule, all of which were included in three repeats, R2, R3 and R4 (Table 2). Figure 6 illustrates the production of two recombinant forms of this gene cluster from recombination between Copy-1 and -2 (pathway [A]) and Copy-2 and -3 (pathway [B]). Because recombination also occurs between Copy-1 and -3, six recombinants are expected altogether. We obtained three of them, which were produced by recombination between Copy-1 and -2 (#1L/R), Copy-1 and -3 (#224C/R) and Copy-2 and -3 (#24C/L) (Table 2). None of their reciprocal products was obtained, probably as a matter of chance owing to the small number of the clones examined, because the fourth recombinant molecule is reported by Lejeune *et al.* (32). As for *rrn26*, two molecular forms of its 5' end, and three forms of the 3' end had been predicted previously (15,32). This prediction was verified by the present findings confirming two complete and one partial copy (422 bp 3' end) of *rrn26*.

Two copies of *atp8* had five mismatched nucleotide pairs scattered within the 471 bp gene region. Sequence analyses of recombinant molecules supposedly produced by recombination between the R11 repeats containing this gene (Table 2) might be useful in specifying recombination site(s) within the repeat.

In addition to those genes, 179 ORFs larger than 300 bp were found (Supplementary Table 2). Their total size amounted to 75 465 bp, occupying ~16.7% of the entire genome. This number greatly exceeds the 121 ORFs of comparable size reported for maize (10), in spite of the fact that the wheat mitochondrial genome is much smaller than the maize genome. Functional analysis of those ORFs will be an important problem in the future mitochondrial genomics.

MtDNA sequences homologous to ctDNA

Homology search using the blast2sequence program revealed that the wheat mitochondrial genome has 55 sequences homologous (mostly with 80% or higher homology on the nucleotide basis) to the corresponding sequences of the wheat chloroplast genome (Table 5). Exceptions were nine sequences question-marked in the last column of Table 5, which were mosaic of highly conserved and variable sequences, showing segmental differentiation of the sequences. Sizes of individual sequences vary between 27 bp for the smallest and 4239 bp for the largest. The total size, 26 264 bp, corresponds to 5.80% of the entire genome.

Of the above 55 wheat mtDNA sequences, 8 carried native (not chloroplast-derived) mitochondrial genes, *atp1*, *rrn18-1*, -2, -3, *rrn26-1*, -2, -*p* and *trnM*, whose total size amounted to

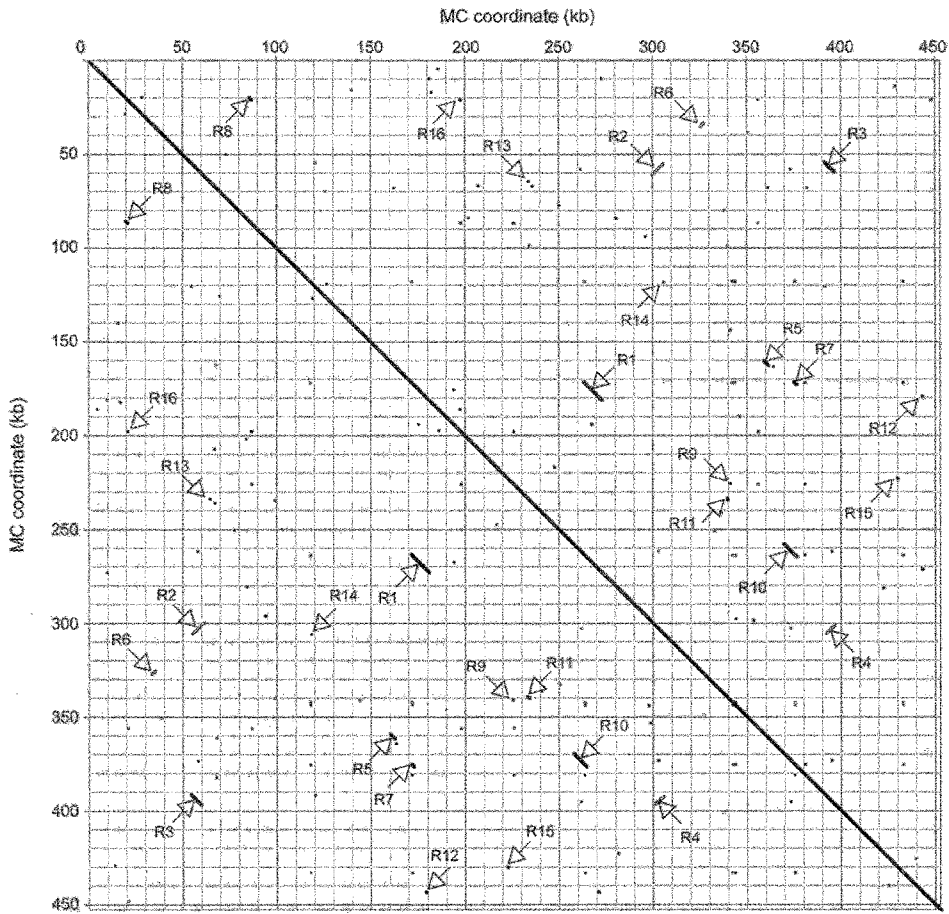


Figure 3. Dot matrix of the MC molecule of wheat mitochondrial genome, showing direct (blue) and inverted (orange) repeat pairs of larger than 30 bp. Sixteen repeat pairs, R1–R16, of larger than 100 bp are marked by arrows (Table 2).

12 809 bp. They showed homology to the ctDNA sequences carrying the corresponding chloroplast genes, *atpA*, *rrn16*, *rrn23* and *trnM* (marked by circles in Table 5). Each of the gene pairs, *atp1/atpA*, *rrn18/rrn16*, *rrn26/rrn23* and *mt-trnM/ct-trnM*, is assumed to have originated from a common prokaryotic gene, being homoeologous to each other (evidence will be reported elsewhere). The total size of the mtDNA sequences of real chloroplast origin therefore was estimated as 13 455 bp; 2.97% of the wheat mitochondrial genome, compared with 22 593 bp (6.3%) and 25 281 bp (4.4%) reported, respectively, for rice and maize (8,10). Thus, both the total size and proportion of the chloroplast-derived sequences relative to the entire genome were smallest in wheat, comparing with rice and maize.

Gene shuffling in the cereal mitochondrial genome

We compared mitochondrial gene maps of wheat, rice (8) and maize (10), excluding tRNA genes, pseudogenes and ORFs (Figure 7). Five exons of *nad7*, *nad7a* to *e*, showed a common arrangement in the three cereals. This gene was used to mark the common map origin, and the arrangement of *nad7a* to *nad7e* to mark the common map direction. A syntenic

gene/exon arrangement, then, should appear as a row of genes/exons parallel to either diagonal line. Only a few gene/exon clusters of the three cereals showed synteny. One 5-gene cluster, *ccmFN-rps1-matR-nad1e-nad5c*, and five 2-gene clusters, *rps13-nad1bc*, *rrn18-rrn5*, *rps3-rpl16*, *nad9-nad2cde* and *nad3-rps12*, showed synteny. The third and fourth ones are shown as 3-gene clusters in Figure 7, because maize has an extra copy of both *rps3a* and *nad2de* and, for this, *rps3a* and *rps3bcd*, and *nad2c* and *nad2de* were shown separately. Similarly, *nad4abc* and *nad4d* were shown as a 2-gene cluster because rice has two extra copies of *nad4d*. In addition, three 2-gene clusters, *rps19(p)-nad4L*, *ccmB-nad2ab* and *nad5ab-rpl2(p)*, of wheat and rice conserved synteny, and two 2-gene clusters (*cox1-rrn26* and *nad6-rps4*) of wheat and maize preserved synteny. No synteny was detected for any other gene combinations, indicative that frequent gene shuffling occurred during cereal speciation, resulting in remarkable structural differences in the cereal's mitochondrial genomes. Fauron *et al.* (17) showed by the physical map comparison that mitochondrial genome restructuring has taken place between three maize cytotypes, and Clifton *et al.* (10) demonstrated by MultiPipMaker analysis that little sequence similarity exists between mitochondrial genomes of six plant

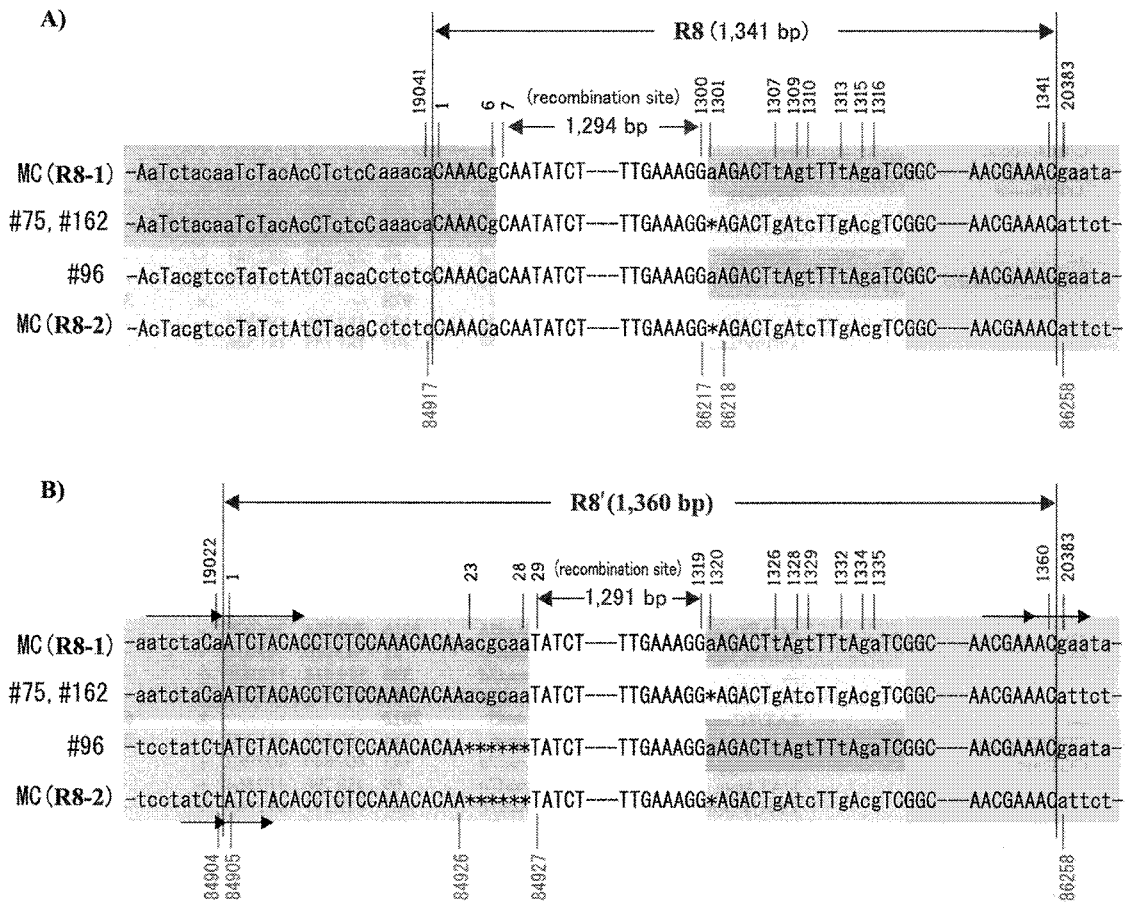


Figure 4. (A and B) Recombination site in R8 repeats which produced the three recombinant clones, #75, #96 and #162. Nucleotide sequences in pink, light green and yellow backgrounds, respectively, are sequences homologous to an R8 copy (R8-1) and its flanking regions, sequences homologous to the other R8 copy (R8-2) and its flanking regions, and the recombination site sequence. In this figure, the forward strands are shown, which are antisense relative to the *atp6*-coding sequence. Numbers outside and inside the R8 or R8' repeat: MC coordinates of the nucleotides flanked respectively by two R8 copies and the R8 or R8' coordinates of the variable nucleotides between them. Capital and lower case letter: Consensus and unique nucleotide between two R8 copies and their flanking regions. Asterisk: deficient nucleotide.

species. Those results agree with ours of the above cereal gene map comparison.

DISCUSSION

Features of the gene-based strategy for sequencing plant mitochondrial genomes

Two principal strategies have been used to sequence plant mitochondrial genomes; the physical map-based (5,7-9), and the genome shotgun strategies (6,10,11). We used a new gene-based strategy for wheat, facilitated by the fact that many wheat mitochondrial genes are available as probes (24) for selecting wheat mtDNA clones for sequencing. Use of this strategy gave a complete picture of the wheat mitochondrial genome by sequencing the 872.5 kb mtDNA, less than twice the genome size, 452 528 bp. Comparative values for the genome shotgun strategy are ~4, 8 and >20 times for *Arabidopsis*, tobacco and maize (6,11,10), indicating apparent high genome sequencing efficiency of the gene-based strategy.

However, application of this strategy requires construction of a cosmid mtDNA library and selection of mtDNA clones covering known mitochondrial genes by dot hybridization. The overall efficiency of the gene-based strategy, compared with that of the genome shotgun strategy, is not clear.

The advantage of the gene-based, compared with the physical map-based strategy, is that no physical map construction is required. This is difficult with some plants because of the multipartite structure of the mitochondrial genome. Based on the physical map of the mitochondrial genome of a common wheat cultivar, Capitole (15), Lejeune and Quetier [cited from (24)] constructed the first gene map of the wheat mitochondrial genome, to which 36 genes were allocated. Their map completely matches ours for five local gene maps: (i) *rrn18/rrn5-cob-atp6-nad5de-nad4abcd-nad2ab-orf25* (= *atp4*)-*nad2cde-nad9-cox2ab-cox1-rrn26*, (ii) *rps7-rrn18/rrn5-nad7abcde-atp1-atp9-nad1bc-rps13-atp6-cox3*, (iii) *nad1a-rrn18/rrn5-nad5ab-nad1d-nad6-rrn26*, (iv) *nad3-rps12-orf156* (= *atp8*) and (v) *matR-nad1e-nad5c*. The arrangement of these five gene groups within the genome,

Table 3. Short DRs found in the 5'- and 3'-borders of 16 repeats, R1–R16, in the wheat mitochondrial genome

Repeat	5'-Border	3'-Border
R1-1	—	TGGt/gg
R1-2	C/CCC+cccc	—
R2-1	—	AA/Aaaa
R2-2	AGGTAgg/t	AA/Gaag
R3-1	TTT/TCT+++ttttct	—
R3-2	CCC/T++ccct	—
R4-1	—	AA/Gaag
R4-2	ACATA+++acata/	—
R5-1	ACCTAa/ccta	—
R5-2	CCTA+/ccta	—
R6-1	GCAA/gcaa	ATTTTC+++att/tc
R6-2	CAAc/aa	CTTGC/ATC+++cttgcttc
R7-1	AT/CCCacccc	TATTTCA+u/atttaa
R7-2	C/CCC+cccc	TATTTCA+u/atttaa
R7-3	C/CCC+cccc	—
R8'-1	ATCTACA/atctaca	ACGAAac/gaa
R8'-2	ATCT/atct	—
R9-1	—	—
R9-2	—	—
R10-1	TGCTTTCTTC+++tctttcttc	TATTTCA+u/atttaa
R10-2	/TCTTTCTtcttct	—
R11-1	TCA/tca	AAG/Aaaga
R11-2	—	AAATAAG/+aaaaaag
R12-1	—	AGATCaga/tc
R12-2	—	AGATCaga/tc
R12-3	A/GTagt	—
R13-1	—	—
R13-2	—	TAT/TC-tattc
R14-1	GCGTgc/ggt	—
R14-2	GGT/ggt	AGGCagg/c
R15-1	AAGA/aaga	T/ATAtata
R15-2	GAAGA+g/aaga	TTTCTT/ttctt
R16-1	/AATAGCA+++aatagca	GAAA [*] Gga/a [*] g
R16-2	/AATAGCA+++aatagca	/GA [*] CTgatc
R16-3	/AATAGCA+++aatagca	GAAA [*] Gga/a [*] g

Slash, border; plus, intervening nucleotide between short repeat sequences; asterisk, deficient nucleotide; capital and lower-case letters, short DR sequences; underlined, mismatched nucleotide; sequences of R8'-1 and -2, first identified by Bonen and Bird (27), and confirmed here.

however, differ both in order and direction. Their order in Lejeune and Quetier's map is that shown above, whereas in our map it is (i)–(iii, reverted)–(iv, reverted)–(ii)–(v, reverted). Whether this discrepancy is due to the different mtDNA sources, or to problems in the physical map they relied upon, needs to be clarified.

The gene-based strategy for complete mitochondrial genome sequencing can not achieve its goal by itself if the genome contains large gene-free region(s) of >35 kb (average insert size of the vector) when Cosmid mtDNA clones are used in sequencing. To cover such regions of the genome, we need to perform sequencing of some additional clones which do not carry any probe genes. In fact, it was necessary for us to sequence a probe gene-free clone, #194, to complete sequencing the wheat mitochondrial genome. The MC molecule obtained successfully integrated all sequenced mtDNAs in it without leaving any pieces out.

Blast search on the sequence homology between the present wheat and previously reported rice and maize mitochondrial genomes (8,10) provided supporting evidence that the present MC molecule represents the wheat mitochondrial genome. The rice and maize mitochondrial genomes were divided into successive 30 kb sections (sizes of the end sections

Table 4. Genes in the wheat mitochondrial genome

Gene ^a	Size (bp)	MC coordinates		Strand ^b	No. of amino acids	Previous accession no. ^c
		From	To			
I. Complex I genes						
<i>nad1a</i>	386	306 345	306 730	+	—	X57968
<i>nad1b</i>	82	17 602	17 683	—	—	X57967
<i>nad1c</i>	192	15 988	16 179	—	—	X57967
<i>nad1d</i>	59	282 283	282 341	—	—	X57966
<i>nad1e</i>	259	43 394	43 652	—	—	X57965
nad1	978	—	—	×	325	—
<i>nad2a</i>	153	182 361	182 513	—	—	Y14433
<i>nad2b</i>	392	181 155	181 546	—	—	Y14433
<i>nad2c</i>	161	210 083	210 243	—	—	Y14434
<i>nad2d</i>	573	207 093	207 665	—	—	Y14434
<i>nad2e</i>	188	205 502	205 689	—	—	Y14434
nad2	1467	—	—	—	488	—
<i>nad3</i>	357	341 099	341 455	—	118	X59153
<i>nad4a</i>	461	135 541	136 001	+	—	X57164
<i>nad4b</i>	515	137 026	137 540	+	—	X57164
<i>nad4c</i>	423	140 981	141 403	+	—	X57164
<i>nad4d</i>	89	143 059	143 147	+	—	X57164
nad4	1488	—	—	+	495	—
<i>nad4L</i>	303	421 629	421 931	—	100	AJ295996
<i>nad5a</i>	231	295 842	296 072	—	—	M74157
<i>nad5b</i>	1216	293 764	294 979	—	—	M74157
<i>nad5c</i>	21	43 010	43 030	—	—	M74158
<i>nad5d</i>	395	111 614	112 008	+	—	M74159
<i>nad5e</i>	150	112 942	113 091	+	—	M74159
nad5	2013	—	—	×	670	—
<i>nad6</i>	744	280 549	281 292	—	247	X62100
<i>nad7a</i>	143	409 840	409 982	+	—	X75036
<i>nad7b</i>	69	410 796	410 864	+	—	X75036
<i>nad7c</i>	467	412 177	412 643	+	—	X75036
<i>nad7d</i>	244	413 642	413 885	+	—	X75036
<i>nad7e</i>	262	415 585	415 846	+	—	X75036
nad7	1185	—	—	+	394	—
<i>nad9</i>	864	211 710	212 573	—	287	X69720
II. Complex III & IV genes						
<i>cob</i>	1197	63 122	64 318	—	398	X02352
<i>cox1</i>	1575	245 285	246 859	+	524	Y00417
<i>cox2a</i>	390	224 812	225 201	—	—	X01108
<i>cox2b</i>	393	223 200	223 592	—	—	X01108
cox2	783	—	—	—	260	—
<i>cox3</i>	798	28 053	28 850	—	265	X15944
III. Complex V genes						
<i>atp1</i>	1530	6832	8361	+	509	X15918
<i>atp4</i>	579	196 584	197 162	—	192	X54311
<i>atp6-1</i>	1161	19 132	20 292	—	386	M24084
<i>atp6-2</i>	1161	85 008	86 168	—	386	M24084
<i>atp8-1</i>	471	338 884	339 354	—	156	X59153
<i>atp8-2</i>	471	233 393	233 863	—	156	X59153
<i>atp9</i>	243	8824	9066	+	80	X15919
IV. Cytochrome c biogenesis genes						
<i>ccmB</i>	621	185 578	186 198	—	206	AF082025
<i>ccmC</i>	723	156 957	157 679	+	240	X79609
<i>ccmFCa</i>	755	99 514	100 268	+	—	AY500223
<i>ccmFCb</i>	559	101 280	101 838	+	—	AY500223
ccmFC	1314	—	—	+	437	—
<i>ccmFN</i>	1770	50 112	51 881	—	589	X69205
V. Ribosomal protein genes						
<i>rpl2-p</i>	169	283 450	283 618	—	56+1/3	AJ295995
<i>rpl5</i>	570	29 778	30 347	—	189	AJ535507
<i>rpl16</i>	558	90 168	90 725	—	185	New
<i>rps1</i>	525	49 341	49 865	—	174	X69205
<i>rps2</i>	1083	215 091	216 173	+	360	Y13920
<i>rps3a</i>	74	93 925	93 998	—	—	New
<i>rps3b</i>	1612	90 574	92 185	—	—	New
rps3	1686	—	—	—	561	—
<i>rps4</i>	1074	273 586	274 659	—	357	New
<i>rps7</i>	447	379 580	380 026	—	148	X67242

Table 4. continued

Gene ^a	Size (bp)	MC coordinates		Strand ^b	No. of amino acids	Previous accession no. ^c
		From	To			
<i>rps12</i>	378	340 677	341 054	—	125	X59153
<i>rps13</i>	351	18 628	18 978	—	116	Y00520
<i>rps19-p</i>	198	422 830	423 027	—	66	AF295996
VI. Other protein coding genes						
<i>matR</i>	2037	44 172	46 208	—	678	X57965
<i>mttB</i>	816	314 992	315 807	+	271	New
VII. rRNA genes						
<i>rrn5-1</i>	122	302 949	303 070	+	—	Z14078
<i>rrn5-2</i>	122	393 494	393 615	—	—	Z14078
<i>rrn5-3</i>	122	56 526	56 647	—	—	Z14078
<i>rrn18-1</i>	1955	300 880	302 834	+	—	Z14078
<i>rrn18-2</i>	1955	393 730	395 684	—	—	Z14078
<i>rrn18-3</i>	1955	56 762	58 716	—	—	Z14078
<i>rrn26-1</i>	3467	371 222	374 688	—	—	Z11889
<i>rrn26-2</i>	3467	259 484	262 950	—	—	Z11889
<i>rrn26-p</i>	422	170 632	171 053	—	—	Z11889
VIII. tRNA genes						
<i>trnA 5'-ex*</i>	38	74 738	74 775	+	—	New
<i>trnA 3'-ex*</i>	35	75 581	75 615	+	—	New
trnA*	73	—	—	+	—	—
<i>trnC*</i>	71	97 420	97 490	+	—	X15119
<i>trnD-1</i>	74	429 341	429 414	—	—	X15379
<i>trnD-2</i>	74	222 080	222 153	—	—	X15379
<i>trnE</i>	72	27 050	27 121	—	—	X14698
<i>trnF*</i>	73	382 956	383 028	—	—	X15118
<i>trnFM-1</i>	74	300 805	300 878	+	—	Z14078
<i>trnFM-2</i>	74	395 686	395 759	—	—	Z14078
<i>trnFM-3</i>	74	58 718	58 791	—	—	Z14078
<i>trnI</i>	74	430 118	430 191	—	—	New
<i>trnK-1</i>	73	270 536	270 608	+	—	X15236
<i>trnK-2</i>	73	442 701	442 773	+	—	X15236
<i>trnK-3</i>	73	178 640	178 712	+	—	X15236
<i>trnM</i>	73	436 154	436 226	—	—	New
<i>trnN*</i>	72	428 634	428 705	—	—	X15379
<i>trnP-1</i>	75	305 095	305 169	+	—	Z14078
<i>trnP-2</i>	75	117 692	117 766	+	—	Z14078
<i>trnQ-1</i>	72	266 806	266 877	+	—	X15140
<i>trnQ-2</i>	72	174 909	174 980	+	—	X15140
<i>trnQ-3</i>	72	193 282	193 353	+	—	X06902
<i>trnS-1</i>	88	341 968	342 055	—	—	X13245
<i>trnS-2</i>	87	408 505	408 591	+	—	X15118
<i>trnS-3*</i>	87	383 444	383 530	—	—	X15118
<i>trnW*</i>	74	445 613	445 686	+	—	X05602
<i>trnY</i>	83	210 880	210 962	—	—	Y14434

^aBoldface, sum of all exons; lower-case letters, exons of a protein-coding gene; hyphenated, copies of the same gene; asterisk: probable chloroplast origin.

^bPlus and minus, coded by the forward and reverse strand; ×, *trans*-spliced gene.

^cNew, gene or exon whose nucleotide sequence is first reported for wheat.

were somewhat different), and sequences homologous to wheat mtDNA were investigated for each section (Table 6). All the sections contained homologous sequences of ~3 kb or larger (up to 15 kb) to wheat mtDNA. MtDNA sequences conserved between wheat and rice, and between wheat and maize were distributed all over the rice and maize genomes, with no large conserved sequence-free regions (larger than 10 kb; detailed data omitted) in the genomes. This fact indicates that rice and maize mitochondrial genomic sequences are well represented in the wheat MC molecule.

The most essential feature of the present gene-based strategy is that it facilitated the recovery of recombinant molecules. Restriction fragment mapping of plant mtDNA shows a multipartite structure of the mitochondrial genome, consisting

of isomeric as well as subgenomic molecules produced by intra-molecular recombination (12,14–17,33). None of the previous works on complete sequencing of flowering plant mitochondrial genomes, by use of either the genome shotgun or physical map-based strategies, has recovered recombinant molecules. This is why recombination events have not been analyzed at the nucleotide sequence level. By virtue of the gene-based strategy, we obtained 10 recombinant clones among 25 examined, determined their nucleotide sequences, and identified repeat sequences responsible for their formation.

Structural features of the wheat mitochondrial genome

The wheat mitochondrial genome was assumed to be a 452 528 bp MC molecule (Figure 1), that was ~92 and 79% the size of the rice and maize mitochondrial genomes, and possessed all the protein-, rRNA- and tRNA-coding genes known to be present in rice and maize (8,10). These facts indicate that wheat has the most compact mitochondrial genome among the three cereals.

Multicopy mitochondrial genes were compared between wheat, rice and maize (Table 7). Gene amplification in general was species-specific. All of the multicopy wheat genes were located in the repeated sequences (Table 2). With the exceptions of *atp8* and *trnQ*, multicopies of all the wheat genes had identical nucleotide sequences. As for *trnQ*, two copies were identical, whereas the third copy differed from them by a single nucleotide. These facts suggest their recent amplification, comparing with the divergence time of three cereals. One alternative possibility is copy correction through homologous recombination, which is known to occur in the case of chloroplast IRs (34).

To account for the observed species-specific gene amplification, a mechanistic model can be proposed. Recombination between the same repeat sequences in two subgenomic molecules produced by recombination between different repeat pairs will give rise to an aberrant MC molecule having a duplicate segment. Figure 6 illustrates an example, using a simplified MC molecule, in which only three copies (Copy-1, -2 and -3) of the *trnFM-rrn18-rrn5* cluster and two repeat pairs, R5 and R6, are shown. Recombination between the R6 sequences in two subgenomic molecules, II and III, which are produced in pathways [B] and [C], gives a new MC molecule with an extra copy of the *trnFM-rrn18-rrn5* cluster and R5 repeat together with their flanking regions. The size of the duplication corresponds to the sum of two segments, one between the recombination breakpoints in Copy-2 and one R5 copy, and the other between those in Copy-3 and the other R5 copy.

Search for transposable element sequences in the wheat mitochondrial genome revealed presence of five sequences, three of which were different partial sequences of the wheat Sabrina retrotransposon, and two others were a part of a rice Tos-14 retrotransposon and wheat Tar1 retrotransposon. Total size of the five sequences was 805 bp, being ~0.2% of the mitochondrial genome. Comparable figures for rice and maize were 20 sequences (total size 7003 bp, 14.3% of the genome) and 4 sequences (total size 641 bp, 0.1% of the genome), respectively (8,10). In this respect, wheat mitochondrial genome is similar to maize than to rice mitochondrial genome.

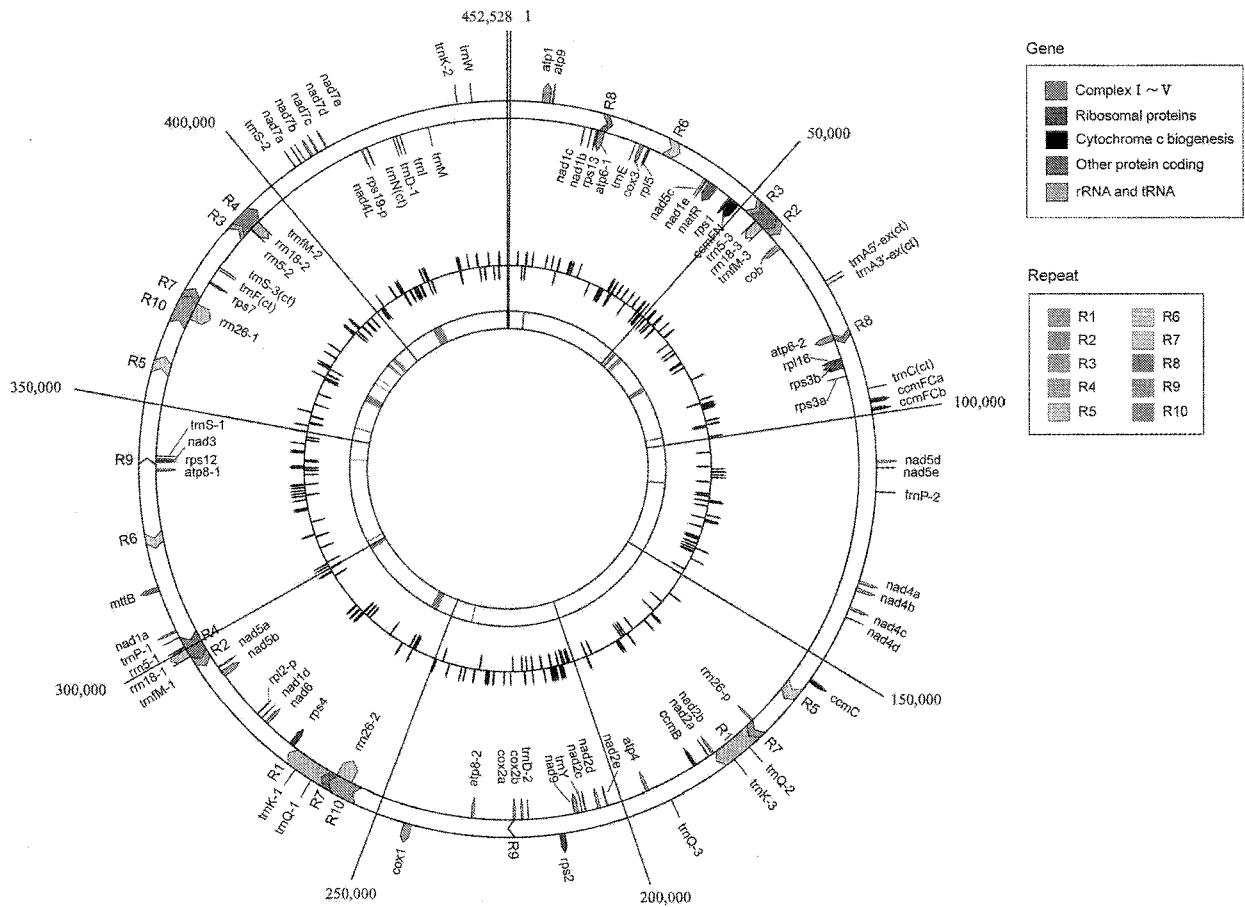


Figure 5. Genetic map of the wheat mitochondrial genome showing the location of all the genes and their exons in the outer-most circle, of ORFs larger than 300 bp in the central circle, and of chloroplast-derived DNA segments in the inner-most circle. The broad, outer-most circle represents the MC molecule, in which the nine repeat pairs, R1–R9, that mediate production of all the recombinant clones and an additional 7035 bp repeat pair, R10, are shown. Genes and exons coded by the forward and reverse DNA strands are shown outside and inside the MC molecule, respectively.

It is important to know what kinds of sequences were involved in the observed mitochondrial genome differentiation. For this purpose, the MC coordinates of all unique wheat sequences larger than 100 bp, comparing with both the rice and maize mtDNA sequences were enumerated (Supplementary Table 3). In total, 227 unique sequences distributed throughout the genome were identified. Comparison between their positions and those of all mitochondrial genes in the genome indicated that almost all unique sequences corresponded to intergenic spaces. The exceptions were nine sequences carrying partial sequence of a gene. Of those, six sequences carried 3–97 bp of the highly variable 3' end of the sense strand of *cob*, *nad6*, *rpl2-p*, *rrn5-1*, *rrn5-2* and *rrn5-3*. Two sequences contained a 324 bp segment of *atp6-1* and -2, that is located in the 3'-terminal region of these genes. The last sequence carried a 28 bp 5' end of *nad9*, that is variable among the three cereals. These facts taken together demonstrate that the mtDNA sequences diversified in the three cereals are mostly redundant DNAs.

In a summary, the wheat mtDNA sequences were partitioned into six categories, genic (including introns), ORF, repetitive, chloroplast-derived, retro-element and unique

sequences (Table 8). This partition was not orthogonal, because some sequences were enumerated in more than one category. Sizes of the genic, ORF, repetitive, chloroplast-derived and unique sequences were obtained from the data presented in Table 4, Supplementary Table 2, Table 2, Table 5 and Supplementary Table 3, respectively.

Structural dynamics of the mitochondrial genome in ontogeny

Arrieta-Montiel *et al.* (35) reported on the structural dynamics of the common bean mitochondrial genome, which was revealed by studying a single mtDNA segment carrying the *cms*-associated *pvs-orf239* sequence. Using the gene-based strategy, we isolated 10 recombinant mtDNA molecules, and determined the repeat sequences responsible for their production. Many other repeat pairs also were characterized (Table 2 and Figure 3), which are potential sites for additional recombination. Based on the entire wheat mitochondrial genome sequence (DNA Database accession no. AP008982) and the map positions of all repeat pairs larger than 100 bp (Table 2), we may prepare DNA primers for the sequences

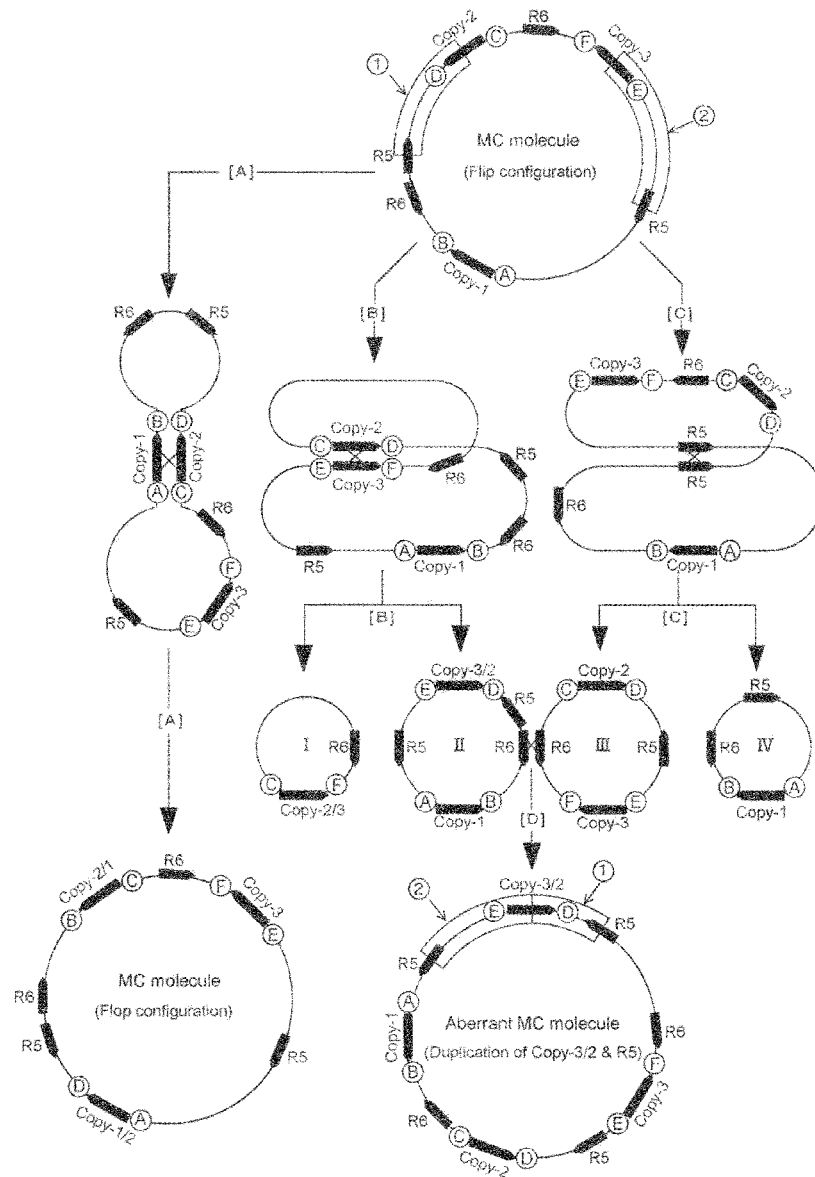


Figure 6. Production of various molecular forms from the MC molecule by intra-molecular recombination between different repeat pairs. Copy-1, -2 and -3 are three copies of the *rnfM-rnl8-rnl5* gene cluster. Copy-2 and -3 are inverted relative to Copy-1. R5 and R6 represent a DR and an IR pair, respectively. A/B, C/D and E/F are PCR primer pairs to mark the 5'- and 3'-flanking regions of Copy-1, -2 and -3, respectively. [A]: production of an isomer (flip form) of the MC molecule (flip form) by recombination between an IR pair, Copy-1 and -2. [B] and [C]: production of two complementary subgenomic molecules by recombination between a DR pair, Copy-2 and -3, and two R5 copies, respectively. [D]: production of an aberrant MC molecule having extra copies of the three-gene cluster (Copy-3/2) and R5 repeat by recombination between R6 repeats in two subgenomic molecules, II and III.

flanking both ends of those repeats. Their use in long-range PCR will allow efficient screening of recombinant molecules produced by recombination between the marked repeat pairs and quantification of isomeric as well as subgenomic molecules, as proved by Sugiyama *et al.* (11) in tobacco. They also demonstrated that long-range PCR works for a distance as long as 23 kb between two primers, which is sufficient to cover all repeats present in the wheat mitochondrial genome (Table 2). The same method may also facilitate finding the difference in recombinational activity among various repeat pairs as well as

the equality or inequality of the reciprocal recombination products.

The methodological details for such studies are as follows: recombination between an IR pair will produce an isomer (flip form) of the MC molecule (flip form; Figure 6, pathway [A]). This event is detected by long-range PCR using four primer pairs, A/B, C/D, A/D and C/B. If either the A/B or C/D primer pair gives an amplified product in PCR, the template clone is regarded as the original MC molecule, whereas if either the A/D or C/B pair gives an amplified product, the template clone

Table 5. Wheat mtDNA sequences showing homology to ctDNA sequences

MtDNA sequence MC coordinates ^a	Size (bp)	Mt gene located ^b	Homologous ctDNA sequence		Ct gene located ^b	Nucleotide sequence homology (%) ^c
			CtDNA coordinates	Size (bp)		
O 995–1157	163	No	62 057–62 218	162	<i>psbE</i> *	92.0
7309–7889	581	<i>atp1</i> *	35 143–35 696	554	<i>atpA</i> * (copy-3)	?
53 841–54 950	1110	No	36 037–34 918	1120	<i>atpA</i> # (copy-4)	97.2
55 179–55 205	27	No	48 098–48 072	27	<i>trnF</i> *	100.0
O 56 769–58 700	1932	<i>rrn18-3</i>	92 532–91 061	1472	<i>rrn16</i> (copy-1)	?
74 171–76 003	1833	No	93 226–95 059	1834	<i>trnL 3'-ex, trnA, rrn23</i> *	99.8
79 301–79 405	105	No	63 441–63 336	106	<i>petL</i>	95.3
97 417–97 542	126	<i>trnC</i>	18 754–18 628	127	<i>trnC</i>	91.3
97 779–97 861	83	No	18 367–18 282	86	No	81.4
98 764–99 133	370	No	77 395–77 024	372	<i>rpl14</i> #	81.6
99 254–99 373	120	No	76 833–76 715	119	<i>rps8</i> *	86.7
117 697–117 760	64	<i>trnP-2</i> #	64 131–64 069	63	<i>trnP</i> #	82.8
119 524–120 020	497	No	35 542–36 072	531	<i>atpA</i> * (copy-5)	?
146 989–147 055	67	No	109 596–109 526	71	<i>ndhG</i> *	84.5
154 459–154 512	54	No	84 016–83 963	54	No	98.1
157 714–157 745	32	<i>trnI-p</i>	82 976–82 945	32	<i>trnI</i> *	96.9
162 458–162 515	58	No	34 309–34 366	58	<i>atpF 3'-ex</i> *	96.6
O 170 827–170 895	69	<i>rrn26-p</i> *	95 063–94 995	69	<i>rrn23</i> * (copy-3)	79.7
174 918–174 971	54	<i>trnQ-2</i> #	6749–6696	54	<i>trnQ</i> *	83.3
242 709–243 106	398	No	110 973–111 387	415	<i>ndhA 3'-ex</i> #	?
249 838–249 890	53	No	51 175–51 225	51	<i>trnV 3'-ex</i> *	88.7
O 259 648–262 792	3145	<i>rrn26-2</i>	97 615–94 995	2 621	<i>rrn23</i> (copy-1)	?
266 815–266 868	54	<i>trnQ-1</i> #	6749–6696	54	<i>trnQ</i> *	83.3
294 426–294 490	65	<i>nad5b</i> *	102 531–102 595	65	<i>ndhF</i> *	81.5
O 300 896–302 827	1932	<i>rrn18-1</i>	91 061–92 532	1472	<i>rrn16</i> (copy-2)	?
304 391–304 417	27	No	48 072–48 098	27	<i>trnF</i> *	100.0
304 646–304 973	328	No	34 918–35 245	328	<i>atpA</i> * (copy-1)	95.7
305 100–305 163	64	<i>trnP-1</i> #	64 131–64 069	63	<i>trnP</i> #	82.8
316 034–316 102	69	No	21 268–21 343	76	<i>rpoB</i> *	86.8
324 416–324 550	135	No	75 643–75 509	135	<i>rps11</i> *	94.1
343 407–343 573	167	No	111 572–111 403	170	No	88.4
349 029–349 064	36	No	33 284–33 319	36	<i>atpF 5'-ex</i> *	91.7
358 076–358 521	446	No	41 098–40 653	446	<i>psaA</i> *	99.8
O 371 386–374 530	3145	<i>rrn26-1</i>	97 615–94 995	2621	<i>rrn23</i> (copy-2)	?
378 941–379 028	88	No	44 149–44 062	88	No	94.3
379 044–379 150	107	No	44 039–43 932	108	No	88.0
380 703–380 885	183	No	68 074–68 256	183	<i>clpP</i> *	95.6
382 951–383 089	139	<i>trnF</i>	48 133–47 995	139	<i>trnF</i>	94.2
383 203–383 278	76	No	47 851–47 776	76	No	82.9
383 342–383 422	81	No	47 702–47 621	82	<i>trnL 3'-ex</i>	91.5
383 409–383 603	195	<i>trnS</i>	45 160–44 967	194	<i>trnS</i>	90.8
388 154–388 182	29	No	34 485–34 513	29	<i>atpF 3'-ex</i>	100.0
390 809–391 918	1 110	No	36 037–34 918	1120	<i>atpA</i> * (copy-2)	97.2
392 147–392 173	27	No	48 098–48 072	27	<i>trnF</i> *	100.0
O 393 737–395 668	1932	<i>rrn18-2</i>	92 532–91 061	1472	<i>rrn16</i> (copy-3)	?
400 525–400 556	32	No	49 041–49 072	32	<i>ndhI</i> *	96.9
408 510–408 585	76	<i>trnS-2</i> #	11 655–11 579	77	<i>trnS</i> #	80.5
417 240–421 478	4239	No	89 049–84 780	4270	<i>ndhB, rps7, rps12 ex-2, -3</i>	?
421 513–421 558	46	No	84 756–84 711	46	No	97.8
428 633–428 718	86	<i>trnN</i>	98 896–98 811	86	<i>trnN</i>	98.8
O 436 153–436 225	73	<i>trnM</i>	52 107–52 035	73	<i>trnM</i>	94.5
445 372–445 416	45	No	64 290–64 246	45	No	88.9
445 455–445 488	34	No	64 084–64 051	34	<i>trnP</i> *	100.0
445 609–445 690	82	<i>trnW</i>	63 927–63 846	82	<i>trnW</i>	96.3
452 168–452 356	189	No	61 844–62 032	189	<i>psbF</i> *, <i>psbE</i> *	88.4
Total	26 264	—	—	—	—	—
Total excluding O-marked sequences: 13 455 bp						

CtDNA sequences present in one IR_A, IR_B, are shown, omitting those in the other copy (IR_A'), because of the same gene set present in two copies. Total size of 26 264 bp is 14 bp smaller than the sum of all the segments because a 14 bp sequence overlaps between two segments of the mtDNA coordinates 383 342–383 422 and 383 409–383 603.

^aO: native mtDNA sequence.

^b# and asterisk: genes, of which a large portion and only a small portion are located in the respective DNA sequences. Gene in boldface: complete or nearly complete gene sequence included in the respective DNA sequences. No: no gene present.

^c?: undetermined because of segmental differentiation of the sequence within the gene.

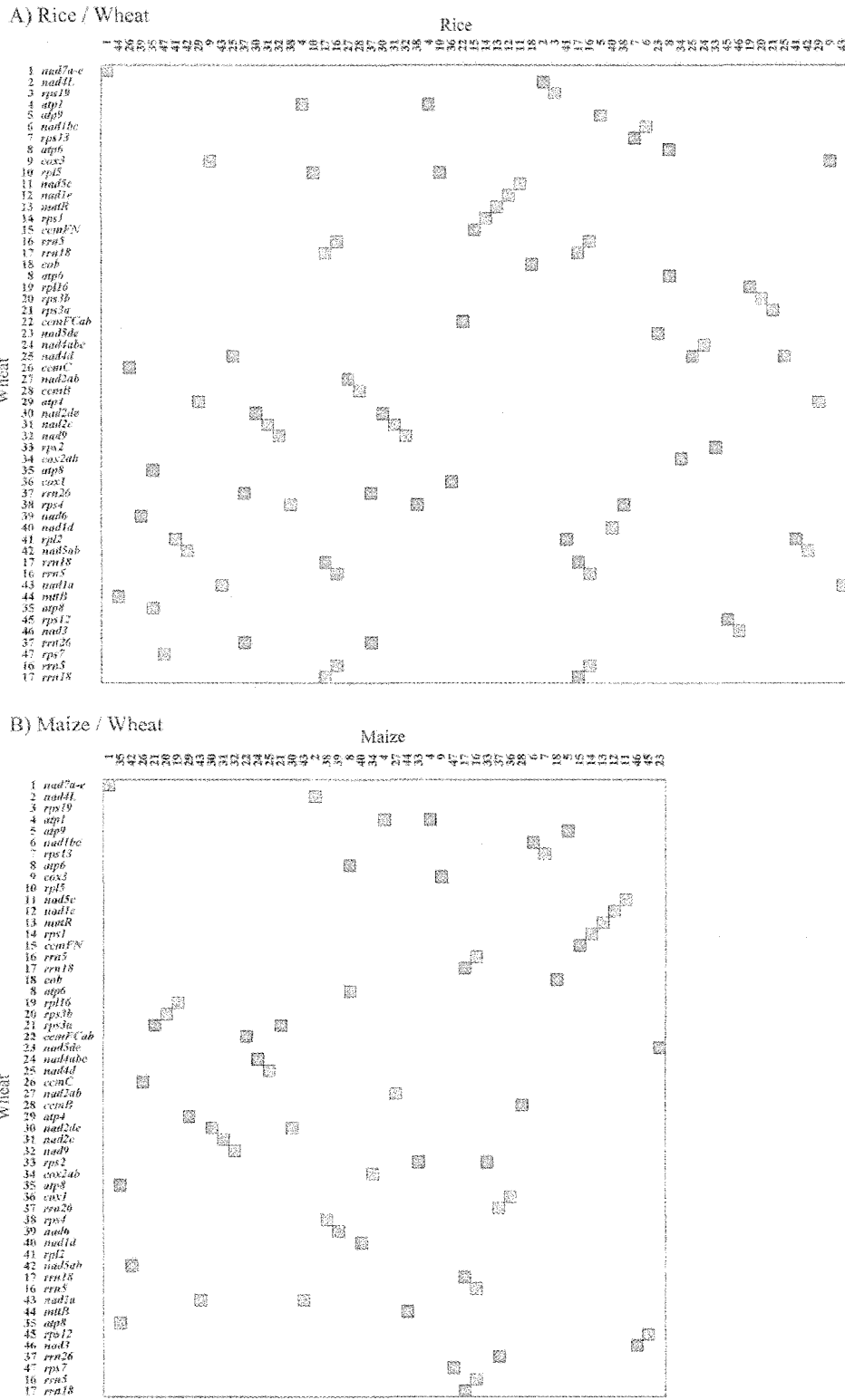


Figure 7. Correlation of gene order between the mitochondrial gene maps of wheat and rice (A) and wheat and maize (B). All the protein- and rRNA-coding genes and the former's *trans*-spliced exons are arranged from top to bottom for wheat, and from left to right for rice and maize, based on their order in the respective gene maps. Genes of rice and maize are indicated by code numbers given to the corresponding wheat genes in the left margin of figures. Duplicate genes carry the same number.

Table 6. Rice and maize mtDNA sequences homologous to wheat mtDNA in different sections of the genome

Rice mtDNA			Maize mtDNA		
Genome section ^a	Section size (bp)	Homologous section (bp) ^b	Genome section ^a	Section size (bp)	Homologous section (bp) ^b
1	30 000	12 778	1	30 000	6 518
2	30 000	7 676	2	30 000	12 814
3	30 000	15 569	3	30 000	12 460
4	30 000	13 001	4	30 000	12 185
5	30 000	5 465	5	30 000	10 010
6	30 000	10 057	6	30 000	6 241
7	30 000	10 989	7	30 000	7 782
8	30 000	12 804	8	30 000	4 308
9	30 000	8 527	9	30 000	14 730
10	30 000	6 881	10	30 000	9 739
11	30 000	14 898	11	30 000	11 500
12	30 000	10 985	12	30 000	8 014
13	30 000	13 182	13	30 000	4 667
14	30 000	11 009	14	30 000	5 216
15	30 000	11 748	15	30 000	7 642
16	40 520	8 112	16	30 000	2 842
Total	490 520	173 691	17	30 000	5 079
			18	30 000	4 233
			19	29 630	6 776
			Total	569 630	152 756

^aRice and maize mitochondrial genomes are divided into successive 30 kb sections, the last one being the remaining part of the respective genome.

^bTotal size of wheat mtDNA sequences of larger than 30 bp which are homologous to the rice or maize mtDNA sequences.

Table 7. Copy numbers of mitochondrial genes that differ in number in wheat, rice and maize: gene fragments, pseudogenes and chloroplast-derived genes are excluded

Gene	Wheat	Rice ^a	Maize ^a
(1) Protein-coding gene			
<i>atp1</i>	1	2	2
<i>atp4</i>	1	2	1
<i>atp6</i>	2	1	1
<i>atp8</i>	2	1	1
<i>cox3</i>	1	2	1
<i>nad1a</i>	1	2	2
<i>nad2c</i>	1	2	1
<i>nad2d, e</i>	1	2	2
<i>nad4d</i>	1	3	1
<i>nad5a,b</i>	1	2	1
<i>nad9</i>	1	2	1
<i>rpl2</i>	0	3	0
<i>rpl5</i>	1	2	0
<i>rps2</i>	1	1	2
<i>rps3a</i>	1	1	2
<i>rps7</i>	1	1	1
(2) RNA gene			
<i>rrn5</i>	3	2	1
<i>rrn18</i>	3	2	1
<i>rrn26</i>	2	2	1
<i>trnD</i>	2	1	2
<i>trnE</i>	1	1	2
<i>trnFM</i>	3	1	1
<i>trnI</i>	1	1	2
<i>trnK</i>	3	1	1
<i>trnM</i>	1	1	0
<i>trnN</i>	0	1	1
<i>trnP</i>	2	1	2
<i>trnQ</i>	3	1	1

^aAfter Notsu *et al.* (8) for rice and Clifton *et al.* (10) for maize.

is regarded as the flop configuration of MC, so far as the marked IR is concerned. The ratio of the latter to the former clones in number gives the molar ratio of the recombinant to the non-recombinant clones. Similarly, recombination between a DR pair will produce two subgenomic molecules (Figure 6, pathway [B]), whose production is detected by successful DNA amplification by use of the C/F or E/D primer pair. Quantification of the subgenomic molecules over the non-recombinants is achieved in the same way as described above. Such studies targeted to different repeat pairs enumerated in Table 2, using Cosmid clones of wheat mtDNA extracted from different organs or different ages of the plant as the template, will disclose structural dynamics of the mitochondrial genome in plant development.

Evolutionary change in the mitochondrial genome structures of cereals

The chloroplast genomes of rice, maize and wheat have identical gene arrangements (36,37,21), evidence of the structure's evolutionary stability. In contrast, the mitochondrial genome structure differs markedly in the three cereals (Figure 7) although the kinds of genes present essentially are the same [(8,10), present findings]. We showed that a variety of mtDNA molecules are produced in somatic tissues by intra-molecular recombination mediated by different repeat pairs. The structural differences of several mitochondrial genes in wheat and rice are suspected to be caused by short repeat pairs (data to be published elsewhere). We postulate that the same mechanism operates in germ cell lines, creating structural diversity in the mitochondrial genomes of different plant phylogenies.

Another possible factor for high phylogenetic variability of the mitochondrial genome, compared with the chloroplast genome, is high DNA redundancy in the former than in the latter genome. The ratio of the genic sequences, including all exons and *cis*-introns, and excluding the sequences of chloroplast origin and pseudogenes, to the total mitochondrial genome size is 18.0% for rice (8), 11.7% for maize (10) and 15.9% for wheat (Table 8). Comparable values for the chloroplast genome are 58.8% for rice (36) and 60.4% for wheat (21), indicative of the presence of a much larger amount of redundant DNAs in the mitochondrial than in the chloroplast genome.

The MC molecule may represent the intact wheat mitochondrial genome

All previous works on complete sequencing of flowering plant mitochondrial genomes are based upon the MC molecule hypothesis (6–11). Because of the multipartite structure of the genome and the lack of direct electron-microscopic evidence, however, the existence of the MC molecule is still a matter of debate (11–13). After Andre *et al.* (12), we suspected reality of the MC molecule in wheat and upon this suspicion we adopted the gene-based sequencing strategy. It turns out, however, that analysis of the 10 recombinant clones obtained has given support to the existence of the MC molecule.

If we consider the MC molecule to be a flip configuration of the genome, then recombination between either of the three IR pairs (Table 2) will produce its flop (= isomeric) molecule, as shown in the pathway [A] of Figure 6, whereas recombination between either of the DR pairs produces two complementary,

Table 8. Classification of wheat mtDNA sequences into different categories

Category	No. sequences	Total size (bp)	Proportion (%)	Source
Entire genome	—	452 528	100.0	Figure 1
Genic, including introns	76	71 848	15.9	Table 4
ORFs (larger than 300 bp), including those in repeats	179	75 465	16.7	Supplementary Table 2
Repetitive (repeat sequences larger than 100 bp)	26	68 960	15.2	Table 2
Chloroplast origin	47	13 455	3.0	Table 5
Retro elements	5	805	0.2	Text
Unique (larger than 100 bp), comparing with rice and maize	277	257 762	57.0	Supplementary Table 3

Classification of the sequences is not orthogonal, because some sequences are enumerated in more than one category.

Table 9. Expected and actual products of recombination when the mitochondrial genome has alternative configurations

Alternative genome configuration	Case Configuration	Recombination site ^a	Type of affected repeat ^b			Expected product of recombination at the affected repeats ^c	Actual recombinant produced (clone obtained) ^d
			Repeat Before recombination	Repeat After recombination	Repeat After recombination		
1	Flop configuration at R2	R2 (IR)	R5	DR	IR	Double-flop configuration at R2 and R5	Subgenomic molecule (#27)
2	Flop configuration at R2	R2 (IR)	R7	DR	IR	Double-flop configuration at R2 and R7	Subgenomic molecule (#24*)
3	Flop configuration at R4	R4 (IR)	R6	IR	DR	Subgenomic molecules	Flop configuration at R6 (#224*)
4	Flop configuration at R6	R6 (IR)	R4	IR	DR	Subgenomic molecules	Flop configuration at R4 (#1)
5	Subgenomic molecules	R1 (DR)	R9	DR	Separated	Present MC configuration	Subgenomic molecule (#31)
6	Subgenomic molecules	R3 (DR)	R3	DR	Separated	Present MC configuration	Subgenomic molecule (#75, #96, #162)
7	Subgenomic molecules	R7 (DR)	R4	IR	Separated	Double-flop configuration at R7 and R4	Flop configuration at R4 (#1)
8	Subgenomic molecules	R5 (DR)	R2	IR	Separated	Double flop configuration at R2 and R5	Flop config. at R2 (#224*)

^aRepeat mediating recombination that results in respective genome configuration. DR and IR, direct and inverted repeats.

^bOne of several repeat pairs, of which type is changed by altered genome configuration. Separated, two repeat sequences are separated to different subgenomic molecules.

^cThe present MC molecule is considered as the flop configuration of the genome. Single- or double-flop configuration is caused by single or double recombination at the indicated repeats.

^dAsterisk: double recombinant clone.

subgenomic molecules (pathways [B] and [C] in Figure 6), where 'complementary' means that a complete gene set is shared by two or more molecules (15). The origin of eight recombinant clones can be explained by a single recombination event, while the remaining two double-recombination events occurred in the MC molecule. However, if the genome were in any other configuration, most of the recombinant clones obtained could not have been produced by simple recombination events (Table 9). Consider the following: if the genome existed in the flop configuration of MC (Table 9, Case 1–4), then recombination between any pair of the present DRs should produce double-flop configurations of the genome (Case 1 and 2), and recombination between IRs should produce two subgenomic molecules (Case 3 and 4). Similarly, if the genome consisted of two subgenomic molecules (Case 5–8), recombination between the repeat sequences in two separated molecules should produce the MC molecule (Case 5 and 6), or its double-flop configuration (Case 7 and 8). In all eight postulated cases, the expected recombination products do not match the ones we actually obtained. This fact supports the hypothesis that the MC molecule serves as the basic wheat mitochondrial genome structure.

A possible alternative is that the wheat mitochondrial genome contains all kinds of isomeric as well as subgenomic molecules (13). Lonsdale *et al.* (16) and Fauron *et al.* (17) showed that 5–14 subgenomic molecules are produced from the MC molecule of sugar beet and maize by intra-molecular recombination. In our study we prepared wheat mtDNA from 2-week-old seedlings. Now, if a seedling consists of

~10⁶ cells, it means that 19 successive cell divisions, on the average, occurred before DNA extraction. We do not know how many replication origins exist in the wheat mitochondrial MC molecule. An electron-microscopic study of mtDNA replication in *Chenopodium* indicates only a few, if not just one, origins in its mtDNA (38). Considering this fact, together with information on the single replication origin of bacterial chromosomes, it is hard to believe that all kinds of subgenomic molecules have replication origins necessary for their maintenance through many cell cycles. This is further support for the presence of the MC molecule.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank L. Bonen for her generous gift of the mitochondrial gene probes used in our clone selection, C.-H. Guo and T. Ochiai for technical help, Jeffrey D. Palmer for critical comments on our manuscript, and Val Woodward for valuable advice on improving the manuscript regarding its context and language. This work was supported by a Grant-in-Aid (No. 12309008, 2000–2002) from the Japan Society for the Promotion of Sciences, and research grants from the Iijima Memorial Foundation for the Promotion of Food Science and Technology (2003 and 2004) and the Nisshin Seifun Foundation (2001 and 2004). Funding to pay the Open Access

publication charges for this article was provided by the Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Japan.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Dewey, R.E., Timothy, D.H. and Levings, C.S., III (1987) A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**, 5374–5378.
- Miller, R.J. and Koepp, D.E. (1971) Southern corn leaf blight: susceptible and resistant mitochondria. *Science*, **173**, 67–69.
- Sciuella, L. and Palmer, J.D. (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. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 3787–3799.
- Cooper, G.M. (2000) *The Cell—A Molecular Approach*, 2nd edn. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland.
- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takekura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T. et al. (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**, 1–7.
- Unsel, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. and Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366 924 nucleotides. *Nature Genet.*, **15**, 57–62.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchoda, N., Estiati, A. and Mikami, T. (2000) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA^{Cys}(GCA). *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2571–2576.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Nakazono, M., Hirai, A. and Kadowaki, K. (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genomics*, **268**, 434–445.
- Handa, H. (2003) The complete nucleotide sequence and RNA editing content of the mitochondrial genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapeseed and *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 5907–5916.
- Clifton, S.W., Minx, P., Fauron, C.M., Gibson, M., Allen, J.O., Sun, H., Thompson, M., Barbazuk, W.B., Kanuganti, S., Tayloe, C. et al. (2004) Sequence and comparative analysis of the maize NB mitochondrial genome. *Plant Physiol.*, **136**, 3486–3503.
- Sugiyama, Y., Watase, Y., Nagase, M., Makita, N., Yagura, S., Hirai, A. and Sugiura, M. (2005) The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. *Mol. Genet. Genomics*, **272**, 603–615.
- Andre, C., Levy, A. and Walbot, V. (1992) SamII repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends Genet.*, **8**, 128–132.
- Bendich, A.J. (1993) Reaching for the ring: the study of mitochondrial genome structure. *Curr. Genet.*, **24**, 279–290.
- Palmer, J.D. and Shields, C.R. (1984) Tripartite structure of the *Brassica campestris* mitochondrial genome. *Nature*, **307**, 437–440.
- Quetier, F., Lejeune, B., Delorme, S., Falconet, D. and Jubier, M.F. (1985) Molecular form and function of the wheat mitochondrial genome. In Van Vloten-Doting, L., Groot, G.S.P. and Hall, T.C. (eds), *Molecular Form and Function of the Plant Genome*. Plenum Press, NY, pp. 413–420.
- Lonsdale, D.M., Brear, T., Hodge, T.P., Melville, S.E. and Rottmann, W.H. (1988) The plant mitochondrial genome: homologous recombination as a mechanism for generating heterogeneity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **319**, 149–163.
- Fauron, C., Casper, M., Gao, Y. and Moore, B. (1995) The maize mitochondrial genome: dynamic, yet functional. *Trends Genet.*, **11**, 228–235.
- Ogihara, Y. and Tsunewaki, K. (1988) Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.*, **76**, 321–332.
- Wang, G.-Z., Matsuoka, Y. and Tsunewaki, K. (2000) Evolutionary features of chondriome divergence in *Triticum* (wheat) and *Aegilops* shown by RFLP analysis of mitochondrial DNAs. *Theor. Appl. Genet.*, **100**, 221–231.
- Tsunewaki, K. (1996) Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. In Jauhar, P.P. (ed.), *Methods of Genome Analysis in Plants*. CRC Press, NY, pp. 271–299.
- Ogihara, Y., Isono, K., Kojima, T., Endo, A., Hanaoka, M., Shiina, T., Terachi, T., Utsugi, S., Murata, M., Mori, N. et al. (2000) Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) chloroplast genome: complete sequence and contig clones. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **18**, 243–253.
- Bonen, L. and Gray, M.W. (1980) Organization and expression of the mitochondrial genome of plants. I. The genes for wheat mitochondrial ribosomal and transfer RNA: evidence for an unusual arrangement. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 319–335.
- Kolodner, R. and Tewari, K.K. (1975) The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants. *Biochim. Biophys. Acta.*, **402**, 372–390.
- Bonen, L. (1995) The wheat mitochondrial genome. In Levings, C.S., III and Vasil, I.K. (eds), *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*. Kluwer Academic Publ., Netherlands, pp. 345–364.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403–410.
- Lowe, T.M. and Eddy, S.R. (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 955–964.
- Bonen, L. and Bird, S. (1988) Sequence analysis of the wheat mitochondrial *atp6* gene reveals a fused upstream reading frame and markedly divergent N-termini among plant ATP6 proteins. *Gene*, **73**, 47–56.
- Stern, D.B. and Palmer, J.D. (1984) Recombination sequences in plant mitochondrial genomes: diversity and homologies to known mitochondrial genes. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6141–6157.
- Joyce, P.B.M., Spencer, D.F., Bonen, L. and Gray, M.W. (1988) Genes for tRNA-Asp, tRNA-Pro, tRNA-Tyr and two tRNAs-Scr in wheat mitochondrial DNA. *Plant Mol. Biol.*, **10**, 251–262.
- Joyce, P.B.M. and Gray, M.W. (1989) Chloroplast-like transfer RNA genes expressed in wheat mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5461–5476.
- Falconet, D., Lejeune, B., Quetier, F. and Gray, M.W. (1984) Evidence for homologous recombination between repeated sequences containing 18S and 5S ribosomal RNA genes in wheat mitochondrial DNA. *EMBO J.*, **3**, 297–302.
- Lejeune, B., Delorme, S., Delcher, E. and Quetier, E. (1987) Recombination in wheat mitochondrial DNA: occurrence of nine different genomic contexts for the 18S–5S genes. *Plant Physiol. Biochem.*, **25**, 227–233.
- Fauron, C. 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.
- Goulding, S.E., Olmstead, R.G., Morden, C.W. and Wolfe, K.H. (1996) Ebb and flow of the chloroplast inverted repeat. *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 195–206.
- Arrieta-Montiel, M., Lyznik, A., Woloszynska, M., Janska, H., Tohme, J. and Mackenzie, S. (2001) Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean. *Genetics*, **158**, 851–864.
- Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C.-R., Meng, B.-Y. et al. (1989) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 185–194.
- Maier, R.M., Neckermann, K., Igloi, G.L. and Kossel, H. (1995) Complete sequence of the maize chloroplast genome: gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.*, **251**, 614–628.
- Backert, S., Dörfel, P., Lurz, R. and Börner, T. (1996) Rolling-circle replication of mitochondrial DNA in the higher plant *Chenopodium album* (L.). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6285–6294.

**Variations in a hotspot region of chloroplast DNAs among
common wheat and *Aegilops* revealed by nucleotide
sequence analysis**

Chang-Hong Guo and Toru Terachi

*Laboratory of Genetics, Faculty of Biology, Harbin Normal University, 50 Hexing Road,
Nangang District, Harbin, Heilongjiang 150080, P. R. China*

*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University,
Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan*

Reprinted from Genes & Genetic Systems, Vol. 80, No.4: 277-285

August 2005

Variations in a hotspot region of chloroplast DNAs among common wheat and *Aegilops* revealed by nucleotide sequence analysis

Chang-Hong Guo¹ and Toru Terachi^{2,*}

¹Laboratory of Genetics, Faculty of Biology, Harbin Normal University, 50 Hexing Road, Nangang District, Harbin, Heilongjiang 150080, P. R. China

²Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

(Received 29 July 2005, accepted 12 September 2005)

The second largest *Bam*HI fragment (B2) of the chloroplast DNA in *Triticum* (wheat) and *Aegilops* contains a highly variable region (a hotspot), resulting in four types of B2 of different size, i.e. B2l (10.5kb), B2m (10.2kb), B2 (9.6kb) and B2s (9.4kb). In order to gain a better understanding of the molecular nature of the variations in length and explain unexpected identity among B2 of *Ae. ovata*, *Ae. speltoides* and common wheat (*T. aestivum*), the nucleotide sequence between a stop codon of *rbcL* and a *Hind*III site in *cemA* in the hotspot was determined for *Ae. ovata*, *Ae. speltoides*, *Ae. caudata* and *Ae. mutica*. The total number of nucleotides in the region was 2808, 2810, 3302, and 3594 bp, for *Ae. speltoides*, *Ae. ovata*, *Ae. caudata* and *Ae. mutica*, respectively, and the sequences were compared with the corresponding ones of *Ae. crassa* 4x, *T. aestivum* and *Ae. squarrosa*. Compared with the largest B2l fragment of *Ae. mutica*, a 791bp and a 793 bp deletion were found in *Ae. speltoides* and *Ae. ovata*, respectively, and the possible site of deletion in the two species is the same as that of *T. aestivum*. However, a deleted segment in *Ae. ovata* is 2 bp longer than that of *Ae. speltoides* (and *T. aestivum*), demonstrating that recurrent deletions had occurred in the chloroplast genomes of both species. Comparison of the sequences from *Ae. caudata* and *Ae. crassa* 4x with that of *Ae. mutica* revealed a 289 bp and a 61 bp deletion at the same site in *Ae. caudata* and *Ae. crassa* 4x, respectively. Sequence comparison using wild *Aegilops* plants showed that the large length variations in a hotspot are fixed to each species. A considerable number of polymorphisms are observed in a loop in the 3' of *rbcL*. The study reveals the relative importance of the large and small indels and minute inversions to account for variations in the chloroplast genomes among closely related species.

Key words: Wheat, *Aegilops*, Chloroplast DNA, hotspot region, length variation

INTRODUCTION

Genetic variations among chloroplast genomes of wheat (*Triticum*) and its close relatives (*Aegilops*) have been studied extensively for more than two decades (e.g. Vedel et al. 1978, Ogihara and Tsunewaki 1982, Bowman et al. 1983, Tsunewaki and Ogihara 1983, Ogihara and Tsunewaki 1988, Miyashita et al. 1994, Wang et al. 1997). This is partly because wheat is one of the most important crops in the world, and partly because wheat evolution with allopolyploidy provides an attractive model

to study the maternal lineages and the process of crop establishment. The complete nucleotide sequencing of the chloroplast DNA molecule of a common wheat, *T. aestivum* cv. Chinese Spring (Ogihara et al. 2002) provides an immense step toward more understanding of this subject. Through these studies, inter- and intraspecific variations among chloroplast genomes of the two genera, as well as the molecular nature of the chloroplast DNA, has been clarified, and our knowledge on the picture of the maternal lineage of allopolyploid species in *Triticum* and *Aegilops* has been expanded. However, some problems remain; including the apparent identity of a particular chloroplast fragment (the second largest *Bam*HI fragment, 'B2' hereafter) observed among *Ae. ovata*, *Ae.*

Edited by Yoshio Sano

* Corresponding author. E-mail: terachi@cc.kyoto-su.ac.jp

speltooides and *T. aestivum*. The 'B2' fragment (Fig. 1) contains an otherwise highly diverged region, 'hotspot', between the genes *rbcl* and *petA* in the wheat chloroplast genome, and *Bam*HI digestion of chloroplast DNAs from various *Triticum* and *Aegilops* species yields four types of fragment differing in size, i.e. B2l (10.5kb), B2m (10.2kb), B2 (9.6kb) and B2s (9.4kb) (Ogihara et al. 1988). Many of the diploid species in the genera, such as *Ae. mutica*, *Ae. bicornis*, *Ae. sharonensis*, *T. monococcum* and *Ae. comosa*, contain the B2l fragment, whereas *Ae. caudata*, *Ae. speltooides* and *Ae. squarrosa* harbor the smaller fragments B2m, B2 and B2s, respectively. Restriction fragment pattern analysis revealed that most of the polyploid species in the genera exhibit an identical 'B2' to their possible maternal diploid ancestor, whereas *Ae. ovata* contains a B2 fragment (9.6kb) similar in size to that of *Ae. speltooides* and polyploid wheats. *Ae. ovata* is a tetraploid species in the section Polyeides, and contains a UM^o nuclear genome. The origin of the B2 in *Ae. ovata*, therefore, can not be traced back to that of *Ae. speltooides* (S genome diploid) which is classified to the section Sitopsis.

In previous studies, we have made comparative sequence analyses among B2l, B2 and B2s fragments of *Ae. crassa* 4x, *T. aestivum* and *Ae. squarrosa*, respectively (Ogihara et al. 1991, Ogihara et al. 1992), revealing the nature of length mutations in the hotspot of the chloroplast genome of *Triticum* and *Aegilops*. With these studies, we proposed the hypothesis that a pair of direct repeats mediates a deletion of chloroplast sequence via intra-molecular recombination. Here we present the nucleotide sequences of the corresponding region of *Ae. ovata* and *Ae. speltooides*, as well as *Ae. caudata* and *Ae. mutica*, in order to gain a better understanding of the molecular nature of the variations in length in the chloroplast genomes of the genera. We also investigated whether observed length variations are fixed to the corresponding species or not, by using multiple samples for each species.

Since previous cytogenetic and molecular genetic studies definitely show that *Ae. speltooides* is the most likely candidate for the donor of both the B genome and plasmon to *T. aestivum* (Sarkar and Stebbins 1956, Riley et al. 1958, Ogihara and Tsunewaki 1988, Dvorak and Zhang 1990, Miyashita et al. 1994, Sasanuma et al. 1996, Wang et al. 1997), a sequence comparison among B2 fragments of the four species may provide new insight into the origin of the chloroplast genome of *T. aestivum*, and clarify why *Ae. ovata* harbors a similar B2 to *T. aestivum*. In addition, the present sequence analysis on the other 'B2' fragments will reveal how B2m in *Ae. caudata* was created at the molecular level.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials Table 1 shows eu- and alloplasmic

lines of common wheat used as the sources of chloroplast DNAs. The table also lists wild *Aegilops* accessions of which intraspecific variations, or polymorphisms, were surveyed. Total DNA was isolated from four *Ae. caudata*, six *Ae. squarrosa*, six *Ae. mutica*, six *Ae. speltooides* and five *Ae. ovata* plants, and used as the template for a polymerase chain reaction (PCR). Total DNA was also isolated from two alloplasmic lines of common wheat, C14 and C19 (Table 1).

DNA manipulation Chloroplast DNAs were isolated from young seedlings of alloplasmic lines of common wheat (J02, C04, C13, C17, C31 and C35, in Table 1) by standard methods (Ogihara and Tsunewaki 1982). The

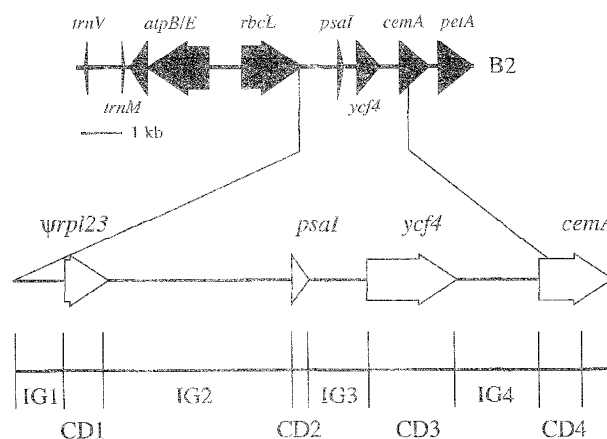


Fig. 1. Gene organization of the second largest *Bam*HI fragment (B2) of wheat chloroplast DNA. Genes and gene products (in parentheses) are as follows; *trnV* (tRNA-Val(UAC)), *trnM* (tRNA-Met(CAU)), *atpB/E* (ATPase beta and epsilon subunits), *rbcl* (Rubisco large subunit), *psaI* (PSI small peptide), *ycf4* (unknown protein), *cemA* (envelope membrane protein), and *petA* (cytochrome f). A pseudogene for ribosomal protein L23 is marked as $\psi rpl23$. The partition of a sequenced region is shown in an enlarged map. The position, size and direction of the gene are shown by black and white arrows.

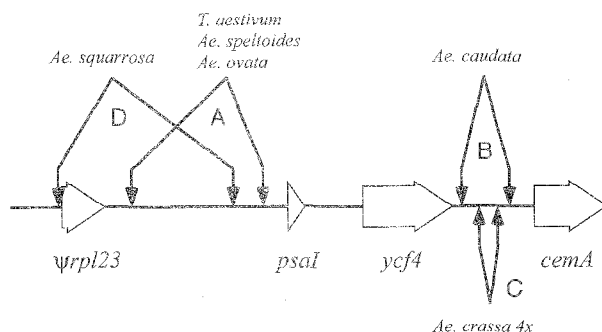


Fig. 2. The location of a pair of short direct repeats producing the large length variation in *Triticum* and *Aegilops* species. The relative position of each repeat (see text) is indicated by vertical arrows in the longest B2l fragment of *Ae. mutica*. The large length variations are marked as A-D.

Table 1. Eu- and alloplasmic lines of common wheat and *Aegilops* plants used as the sources of DNA

a. Alloplasmic lines of common wheat					
Code	Cytoplasm donor			Nuclear donor ¹⁾	Note ²⁾
	Species	Section	Type of B2		
J02	<i>Ae. caudata</i>	Cylindropyrum	B2m	Cmp	a
C04	<i>Ae. squarrosa</i>	Vertebrata	B2s	CS	b
C19	"	"	"	"	c
C13	<i>Ae. mutica</i>	Amblyopyrum	B2l	"	a
C14	"	"	"	"	c
C17	<i>Ae. speltoides</i>	Sitopsis	B2	"	a
C31	<i>Ae. ovata</i>	Polyeides	"	"	a
C35	<i>Ae. crassa</i> fx	Vertebrata	B2l	"	b
b. Euplasmic lines					
Abbr.	Species	Section or group	Subspecies or variety	Origin	Accession number ³⁾
cdt-a	<i>Ae. caudata</i>	Cylindropyrum	Polyathera	Iraq	KU-5482
cdt-b	"	"	—	—	KU-5851
cdt-c	"	"	Polyathera	Turkey	KU-5852
cdt-d	"	"	Typica	"	KU-5864
sqr-a	<i>Ae. squarrosa</i>	Vertebrata	Typica	—	20-2
sqr-b	"	"	Strangulata	Iran	20-9
sqr-c	"	"	Typica	Pakistan	KU-2002
sqr-d	"	"	"	Afghanistan	KU-2013
sqr-e	"	"	"	—	1556
sqr-f	"	"	Strangulata	—	1557
mtc-a	<i>Ae. mutica</i>	Amblyopyrum	—	Turkey	KU-12003
mtc-b	"	"	—	"	KU-12004
mtc-c	"	"	—	"	KU-12005
mtc-d	"	"	—	"	KU-12006
mtc-e	"	"	—	"	KU-12007
mtc-f	"	"	—	"	KU-12011
spl-a	<i>Ae. speltoides</i>	Sitopsis	Typica	Turkey	KU-2228B
spl-b	"	"	"	"	KU-2229A
spl-c	"	"	"	"	KU-2231C
spl-d	"	"	"	"	KU-2238
spl-e	"	"	"	"	KU-2239
spl-f	"	"	"	"	KU-2241B
ovt-a	<i>Ae. ovata</i>	Polyeides	Vulgaris	Jordan	KU-6006
ovt-b	"	"	"	Syria	KU-6014
ovt-c	"	"	"	Turkey	KU-6031
ovt-d	"	"	"	Greece	KU-6067
ovt-e	"	"	"	Italy	KU-6070
CS	<i>T. aestivum</i>	Dinkel	Chinese Spring	—	CS

¹⁾ Cmp: *Triticum compactum* cv. No. 44, CS: *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring.²⁾ a: Nucleotide sequence was determined in this report, b: The sequences were obtained from Ogihara et al. (1991), but minor corrections were made by re-sequencing the problematic regions. c: A PCR fragment instead of cloned chloroplast fragment was used for the analysis.³⁾ For the accessions with KU number, more information is available at the data base Komugi (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp>) funded by National BioResource Project.

second largest *Bam*HI fragments, originally cloned into a *Bam*HI site of a plasmid vector, pBR322 or pUC119, were used as a starting material for the sequencing study. A *Hind*III/*Pst*I fragment in each of the B2 fragments was sub-cloned into a *Hind*III/*Pst*I site of pUC119, and both strands of a cloned fragment were sequenced by the cycle sequencing procedures described below. As for the two alloplasmic lines (C19 and C14) and wild accessions, total DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. For these samples, the chloroplast fragment containing the regions between *rbcL* and *cemA* was amplified by PCR with the primers, B2/F (5'-TGAGTGTCTACGTGCTG-GAC-3') and B2/R (5'-CAAGCGAAGGAGATAGACGG-3'). The amplification was performed in a GeneAmp system 9600 (Perkin Elmer) under the following conditions; 30 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing (60°C, 1 min) and extension (72°C, 3 min), followed by an extension (72°C, 10 min). PCR products were purified with a Suprec-02 filter (Takara Shuzo), and subjected to direct sequencing with a series of primers based on the corresponding chloroplast sequences of *T. aestivum* and *Ae. crassa* 4x (DDBJ accession nos. X62117 and X62118). Information on the sequencing primers is available upon

request. The nucleotide sequence was determined by cycle sequencing procedures using a Thermo Sequenase kit (Amersham) with an ALF express autosequencer, or using a dye terminator cycle sequencing with quick start kit (Beckman Coulter) and a CEQ2000 autosequencer. The sequence data were analyzed with the software GeneWorks and MacVector (Oxford Molecular Group). The nucleotide sequences are deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers AB180925 to AB180928.

RESULTS

Overall structure of a hotspot region in the chloroplast genomes of *Triticum* and *Aegilops* Using a cloned fragment of chloroplast DNAs from alloplasmic lines, complete nucleotide sequences of a hotspot region in *Ae. speltoides* (C17), *Ae. ovata* (C31), *Ae. caudata* (J02) and *Ae. mutica* (C13) were determined. In this paper, the sequence from immediately after a stop codon of the gene *rbcL* to a *Hind*III site in the gene *cemA* was analyzed in detail (Fig. 1). The total number of nucleotides in this region was 2808, 2810, 3302, and 3594 bp, for *Ae. speltoides*, *Ae. ovata*, *Ae. caudata* and *Ae. mutica*, respec-

Table 2. Nucleotide substitutions in the intergenic (IG) and coding (CD) regions of a hot spot in the chloroplast genomes of *Triticum* and *Aegilops*

Species	IG1 (307) ¹⁾		CD1 <i>ψrpl23</i>			IG2 (1088)				
	70 ²⁾		175	196	207	262	469	694	852	864
<i>Ae. caudata</i>	C	T	G	A	C	C	A	T	T	G
<i>Ae. squarrosa</i>	C	C	- ³⁾	-	-	-	-	-	T	A
<i>Ae. speltoides</i>	A	C	G	G	T	-	-	-	-	-
<i>Ae. mutica</i>	C	C	G	G	C	T	C	C	T	G
<i>Ae. ovata</i>	C	C	G	G	C	-	-	-	-	-
<i>Ae. crassa</i> 4x	C	C	G	G	C	T	C	T	G	G
<i>T. aestivum</i>	A	C	A	G	C	-	-	-	-	-

Species	CD3 <i>ycf4(558)</i>			IG4 (475)								
	255	264	478	18	55	132	211	302	304	349	353	468
<i>Ae. caudata</i>	T	A	A	G	-	-	-	-	-	T	G	A
<i>Ae. squarrosa</i>	G	A	C	G	G	G	T	T	C	C	T	G
<i>Ae. speltoides</i>	G	A	A	G	G	A	C	T	A	T	G	A
<i>Ae. mutica</i>	T	A	A	G	A	G	C	A	A	T	G	A
<i>Ae. ovata</i>	G	G	A	G	A	G	C	A	A	T	G	A
<i>Ae. crassa</i> 4x	G	A	A	A	G	G	-	T	A	T	G	A
<i>T. aestivum</i>	G	A	A	G	G	G	C	T	A	T	G	A

¹⁾ Numbers in parentheses indicate the total number of bases in the longest sequence.

²⁾ The numbering starts from the first base in each region.

³⁾ - denotes a missing base due to large length variations in the corresponding region.

tively. As expected from the data on *T. aestivum* (DDBJ accession no. AB042240, coordinate 56344–59150), three chloroplast genes, *psaI*, *ycf4*, and *cemA*, are present in this region with a pseudogene, *ψrpl23*. For convenience's sake, the sequence is divided into four intergenic (IG1-IG4) and four coding (CD1-CD4) regions (Fig. 1).

The overall A+T content of this region is slightly higher than that for the entire chloroplast genome of *T. aestivum* (61.7%), ranging from 67.7% for both *Ae. speltoides* and *Ae. ovata* to 66.6% for *Ae. caudata*. The A+T content varied depending on the region; CD3 (coding region for *ycf4*) gave the lowest value (60.1%), whereas IG1 (intergenic region between *rbcL* and *ψrpl23*) showed the highest (78.1%). In general, the A+T content of the intergenic regions (71.8% on average) is higher than that of coding regions (64.8%), as already reported for *T. aestivum* and

two other *Aegilops* species (Ogihara et al. 1992). When the nucleotide sequences of the four *Aegilops* species were compared with those of *T. aestivum* (2807 bp, obtained from DDBJ accession no. AB042240), *Ae. crassa* 4x (3540 bp, DDBJ accession no. X62118 with minor corrections) and *Ae. squarrosa* (2565 bp, DDBJ accession no. X62119 with minor corrections), different types of mutations, including base substitutions, insertions/deletions (indels) and inversions, were detected as described below. Nucleotide sequences of the coding region of *psaI* (CD2) and *cemA* (CD4) are identical with each other among the seven species compared.

Large length variations found in the intergenic regions of a hotspot Relatively large (61bp–793bp) length variations were detected in three (IG1, IG2 and

Table 3. Insertions/deletions found in the intergenic regions of a hot spot of chloroplast genomes from seven *Triticum* and *Aegilops* species

Species	IG1					
	22–26	138–141 ¹⁾	245	264	293	
<i>Ae. caudata</i>	–AGAAG ²⁾	CT				+ATGATC
<i>Ae. squarrosa</i>	–AGAAG	TTTTCT		+AATAAAAT		Δ295–
<i>Ae. speltoides</i>		AGAA				
<i>Ae. mutica</i>	–AGAAG	AGAAA				+ATGATC
<i>Ae. ovata</i>	–AGAAG	AGAAAAA	+GTATA			+ATGATC
<i>Ae. crassa</i> 4x	–AGAAG	TTCT		+AATAAAAT		+ATGATC
<i>T. aestivum</i>		TTCT				

Species	IG2						
		157	159	160	232	943	982–986
<i>Ae. caudata</i>				–T	–T	+T	
<i>Ae. squarrosa</i>	Δ–764						
<i>Ae. speltoides</i>			Δ159–943				
<i>Ae. mutica</i>							
<i>Ae. ovata</i>		Δ157–943					–CAATA
<i>Ae. crassa</i> 4x				–T			
<i>T. aestivum</i>			Δ159–943				

Species	IG3		IG4			
	110		42	176	178	238
<i>Ae. caudata</i>			Δ42–369			
<i>Ae. squarrosa</i>	+A					
<i>Ae. speltoides</i>						+T
<i>Ae. mutica</i>						
<i>Ae. ovata</i>					+T	
<i>Ae. crassa</i> 4x				Δ176–236		
<i>T. aestivum</i>						

¹⁾ A region forming a loop in the 3' of the gene *rbcL* (see Table 4 for detail).

²⁾ – and + denote a deletion and an insertion of the sequence relative to *T. aestivum* (IG1, IG3 and IG4) or *Ae. mutica* (IG2).

Table 4. Inter- and intraspecific variations of the nucleotide sequence found in the loop of a stem-loop in the 3' *rbcL*. Varied sequences are indicated by boldface letters

Species	Accession	Sequence	Type
<i>Ae. caudata</i>	C02, cdt-a, -b, -c, -d	TCGGCTCAATCTTTTTTT-----CTAAAAAAGATTGAGCCGA	1
<i>Ae. squarrosa</i>	C04, C19, sqr-a, -c, -d	TCGGCTCAATCTTTTTTT--TTTCTAAAAAAGATTGAGCCGA	2
	sqr-e	TCGGCTCAATCTTTTTTT AGAAAA -----AAAAAAGATTGAGCCGA	3
	sqr-b, sqr-f	TCGGCTCAATCTTTTTTT--TTTCTAAAAAAGATTGAGCCGA	4
<i>Ae. mutica</i>	mtc-a,-d	TCGGCTCAATCTTTTTTT--TTTCTAAAAAAGATTGAGCCGA	4
	C13, C14, mtc-b, -c, -e	TCGGCTCAATCTTTTTTT AGAAA -----AAAAAAGATTGAGCCGA	5
	mtc-f	TCGGCTCAATCTTTTTTT TTTTCT AAAAAAGATTGAGCCGA	6
<i>Ae. speltoides</i>	spl-b, -c	TCGGCTCAATCTTTTTTT-----TTCTAAAAAAGATTGAGCCGA	7
	C17, spl-a, -d, -e, -f	TCGGCTCAATCTTTTTT TAAGA -----AAAAAAGATTGAGCCGA	8
<i>Ae. ovata</i>	ovt-b, -d, -e	TCGGCTCAATCTTTTTTT--TTTCTAAAAAAGATTGAGCCGA	2
	ovt-c	TCGGCTCAATCTTTTTT AGAAAA -----AAAAAAGATTGAGCCGA	3
	C31, ovt-a	TCGGCTCAATCTTTTTT AGAAAA -----AAAAAAGATTGAGCCGA	9
<i>Ae. crassa</i> 4x C35		TCGGCTCAATCTTTTTTT-----TTCTAAAAAAGATTGAGCCGA	7
<i>T. aestivum</i>	CS	TCGGCTCAATCTTTTTTT-----TTCTAAAAAAGATTGAGCCGA	7

IG4) of four intergenic regions among the seven chloroplast sequences. Compared with the largest B2l fragment of *Ae. mutica*, a 791bp and a 793 bp deletion were found in the IG2 of *Ae. speltoides* and *Ae. ovata*, respectively (Fig. 2, marked as A). The possible deletion site is exactly the same as that of *T. aestivum*, where a pair of direct repeats, "CAT₇" was found, relative to the B2l of *Ae. crassa* 4x. The sequence correspond to "sequence A" in Ogihara et al. (1988). However, a deleted segment in *Ae. ovata* is 2 bp longer than that of *T. aestivum* and *Ae. speltoides*, since the remaining sequence at the site is 2 bp shorter in *Ae. ovata* than *T. aestivum* and *Ae. speltoides*.

Similarly, comparison of the IG4 sequence (between the *ycf4* and *cemA* genes) from *Ae. caudata* with the corresponding sequence of *Ae. mutica* revealed a 289 bp deletion in *Ae. caudata* (Fig. 2, marked as B). At this site, a pair of direct repeats, "A₄GAAGAA", was present in *Ae. mutica* and in the other five species. Furthermore, a 61 bp deletion (Table 3, Δ176-236), relative to all species except *Ae. caudata*, was detected in the IG4 of *Ae. crassa* 4x (Fig. 2, marked as C). A pair of direct repeats, "T₉AT", was found at the site of this deletion.

Interspecific variations and polymorphisms Table 2 summarizes a total of 22 base substitutions found in both intergenic and coding regions of a hotspot in the chloroplast genome. Three base substitutions were observed in each of CD1 (*ψrpl23*) and CD3 (*ycf4*), whereas two, five and nine were detected in IG1, IG2 and IG4, respectively. Table 3 shows all small indels observed in

the regions analyzed. Apart from the variations in the 3' of the gene *rbcL* (to be described separately), a total of 11 small indels were observed only in the intergenic regions. Five of the 11 indels were 5-8 nucleotides long, and they were concentrated in IG1 and IG2. Among these five indels, four occurred at short direct repeats, and the remaining one at an inverted repeat.

In order to check whether the large length variations are specific to the species or not, further sequence analysis was conducted by using multiple samples of wild *Aegilops* plants (Table 1). Only the sequences relevant to the large length variations and to the 3' *rbcL* were determined for all plants with the selected sequencing primers. The sequence analysis of the deletion borders showed that all large length variations found in the alloplasmic lines of common wheat with *Ae. speltoides*, *Ae. ovata* and *Ae. caudata* cytoplasm are fixed to the corresponding species (data not shown). The results also revealed that a considerable number of polymorphisms are present in a loop of a stem-loop structure of the 3' of the gene *rbcL* (Table 4). In contrast, the sequence adjacent to the loop, including a pair of 17 bp inverted repeats (i.e. a stem), was monomorphic and highly conserved in all the accessions.

DISCUSSION

Recurrent deletions occurring at the same site resulted in the similar B2 fragments of *Ae. ovata* and *Ae. speltoides* Analysis of the restriction frag-

ment patterns of chloroplast DNAs revealed unexpected identity among the B2 fragment (9.6 kb) of *Ae. ovata* and *Ae. speltooides* (and polyploid wheats including *T. aestivum*). Since the diploid *Ae. speltooides* is classified into the section Sitopsis, it is difficult to consider *Ae. speltooides* as a maternal ancestor of the tetraploid *Ae. ovata* which belongs to the section Polyeides. This observation prompted us to study why B2 is shared among these species. The data presented here clearly demonstrated that an independent deletion which had occurred at the same site in the chloroplast genome of *Ae. ovata* and *Ae. speltooides* resulted in a B2 fragment of the same size. The conclusion is evidenced by a "footprint" which remains at the site of a possible deletion in the two species; they differ from each other by two bases, i.e. "CAT₁₀" in *Ae. speltooides* (and *T. aestivum*), whereas "CAT₈" in *Ae. ovata*. Recently, Ogihara and Ohsawa (2002) investigated various length mutations in the chloroplast genomes of *Triticum* and *Aegilops* species, mainly using alloplasmic lines of common wheat, and proposed as a possible molecular mechanism for the deletion, illegitimate recombination mediated by short direct repeats. The reported deletion in *Ae. ovata* (Del 4, in their paper) is 2 bases shorter than that found by us. The reason of this incongruity is not clear, but a fact that the six accessions of wild *Ae. ovata* have a completely identical deletion ($\Delta 157-943$, Table 3) at this site to that of an alloplasmic line (C31) supports our sequence data. Although the same conclusion can be drawn for the target sequence in *Ae. ovata*, it should be emphasized that occurrence of the deletion in wild *Ae. ovata* was first proved in this report, showing a possibility that the deletion can be used as a molecular marker for distinguishing *Ae. ovata* from other related species in the section Polyeides.

The present study also showed that the size and position of a large deletion in *Ae. speltooides* ($\Delta 159-943$, Table 3) is completely identical to that of *T. aestivum*. The fact that all wild *Ae. speltooides* analyzed here also possess an identical deletion to this indicates that the origin of B2 of *T. aestivum* can be traced back to that of *Ae. speltooides*. This result strongly supports the previous conclusions that *Ae. speltooides* is a donor species of a chloroplast genome to common wheat (Ogihara and Tsunewaki 1988, Miyashita et al. 1994, Wang et al. 1997). The fact that the other *Aegilops* species in the Sitopsis (e.g. *Ae. bicornis*) have B2l (not B2) fragment also supports this conclusion, though further work is needed to reveal the nature of B2l in Sitopsis at the sequence level.

Compared with the B2l fragment of *Ae. mutica*, a 61 bp deletion ($\Delta 176-236$) was found in the IG4 of *Ae. crassa* 4x. The 61 bp deletion had not been studied in detail in previous studies, but it appeared that the deletion occurred in the same region as that of *Ae. caudata*, i.e. Del6 in Ogihara and Ohsawa (2002). The results suggest that more variations will be disclosed among other

B2l fragments by sequencing, although they could not be discriminated from each other by the previous studies using the restriction fragment patterns. The B2l of *Ae. mutica*, the longest fragment sequenced so far, therefore carries four pairs of short direct repeats, "CAT₈", "ATTAT", "A₄GAAGAAT" and "T₈AT", and each repeat which was present in the prototype sequence contributed to a deletion, resulting in B2, B2s, B2m and *Ae. crassa*'s B2l, respectively (Fig. 2). Our previous model proposing that the direct repeats mediate a deletion of the chloroplast sequence via intra-molecular recombination (Ogihara et al. 1988) can be applied in all cases.

Other interspecific variations and polymorphisms found in the hotspot region of chloroplast genome

Four base substitutions were observed among *ycf4* genes from seven *Triticum* and *Aegilops* species. The A/G transition in *Ae. ovata* (+264) is synonymous, but the G/T transversion in *Ae. caudata* and *Ae. mutica* (+255) and A/C transversion in *Ae. squarrosa* (+478) are non-synonymous. With these changes, the deduced amino acids in YCF4 should be changed from Leu to Phe (at position 85) in *Ae. caudata* and *Ae. mutica* and from Lys to Gln (at position 160) in *Ae. squarrosa*. The *ycf4* gene is required for assembly and/or stable accumulation of the PSI complex (Boudreau et al. 1997). Further studies are required to see if these amino acid changes affect the function of these polypeptide in the PSI complex or not.

Apart from the relatively large deletions described above and those occurring in the stem-loop of 3' *rbcl*, a total of 11 indels are found in the intergenic regions of a hotspot of the seven chloroplast genomes. Five of the 11 indels are multi-nucleotide indels (5–8 bases long), and four of them occurred in IG1. IG1 includes the region where the terminator sequence for the gene *rbcl* is located, and the region is quite A+T rich (78.1%). The region also contains various short tandem and inverted repeats, suggesting that the sequence composition itself is the source of variations. The correlation between the sequence composition and the fidelity of chloroplast DNA polymerase (Gaikwad et al. 2002) is worthy of further study. Including the multi-nucleotide indels, more than half of the variations in the intergenic regions were caused by small indels. Morton and Clegg (1993) have already pointed out that RFLP data derived from noncoding regions of the chloroplast genome should be used with caution in studies of intraspecific or intrageneric relationships. Close examination of the sequence, however, shows that some indels seem to be informative for the phylogenetic inference. For example, an insertion of "AGAAG" and a deletion of "ATGATC" in IG1 are shared by *Ae. speltooides* and *T. aestivum*. This may provide further evidence of the origin of the chloroplast genome of *T. aestivum*. Similarly, an insertion of "AATAAAT" in IG1, which is shared by *Ae. squarrosa* and *Ae. crassa* 4x, may

represent a common history of their chloroplast genomes, since both species contain the nuclear genome D. More systematic studies on the pattern and frequency of indels, especially in the context of comparing the evolutionary rate with a simple base substitution, will help to include this type of variation of chloroplast genomes in the phylogenetic study of closely related species.

In this study, polymorphisms in the chloroplast genome were surveyed by direct sequencing, but data were available only for the limited regions. Nevertheless, a considerable number of polymorphisms are detectable in the sequence for a loop in the 3' region of the gene *rbcL* (Table 4). The sequence is highly polymorphic; three types were found in each of *Ae. mutica*, *Ae. squarrosa* and *Ae. ovata*, and two types in *Ae. speltooides*, and a total of nine types were found in the samples. Close examination of the sequence shows the variations can be easily explained by an inversion of a loop sequence followed by a change in the number of mononucleotide repeats (Table 4). In general, the stem-loop of a chloroplast gene is a processing signal of the RNA 3'-end, and determines mRNA stability (Rott et al. 1998). Because it is difficult to imagine that the stability of *rbcL* mRNA differs considerably within or between closely related species, the data suggest that the sequence in a stem is more important for function than that in a loop. There are 75 protein-coding genes in the wheat chloroplast genome (Ogihara et al. 2002) and the stem-loop structure is frequently found in the 3' of the genes. We propose that a minute inversion in a loop sequence is one of the mechanisms producing polymorphisms in the chloroplast genome.

Historically, inter- and intraspecific variations of the chloroplast genomes in *Triticum* and *Aegilops* have been studied using restriction fragment patterns. In this study, we determined the nucleotide sequence to reveal the nature of variations in a hotspot region of the chloroplast genome. The study reveals that the variations resulted not only from a simple base substitution but also from large and small indels and minute inversions. Further sequencing with many more *Aegilops* plants will reveal the nature of the chloroplast genome's evolution between and within closely related species.

This work was supported in part by the Foundation for Bio-venture Research Center, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan. The authors thank Drs. N. T. Miyashita and T. Kawahara, Kyoto University, and Dr. S. Ohta, Fukui Prefectural University, for providing seeds (or total DNA in some cases) of *Aegilops* accessions. The authors also appreciate Dr. K. Tsunewaki for encouragement throughout the work.

REFERENCES

- Boudreau, E., Takahashi, Y., Lemieux, C., Turmel, M., and Rochaix, J. D. (1997) The chloroplast *ycf3* and *ycf4* open reading frames of *Chlamydomonas reinhardtii* are required for the accumulation of the photosystem I. *EMBO J.* **16**, 6095–6104.
- Bowman, C. M., Bonnard, G., and Dyer, T. A. (1983) Chloroplast DNA variation between species of *Triticum* and *Aegilops*. Location of the variation on the chloroplast genome and its relevance to the inheritance and classification of the cytoplasm. *Theor. Appl. Genet.* **65**, 249–262.
- Dvorak, J., and Zhang, H. (1990) Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9640–9644.
- Gaikwad, A., Hop, D. V., and Mukherjee, S. K. (2002) A 70-kDa chloroplast DNA polymerase from pea (*Pisum sativum*) that shows high processivity and displays moderate fidelity. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 45–56.
- Miyashita, N. T., Mori, N., and Tsunewaki, K. (1994) Molecular variation in chloroplast DNA regions in ancestral species of wheat. *Genetics* **137**, 883–889.
- Morton, B. R., and Clegg, M. T. (1993) A chloroplast DNA mutational hotspot and gene conversion in a noncoding region near *rbcL* in the grass family (Poaceae). *Curr. Genet.* **24**, 357–365.
- Ogihara, Y., Isono, K., Kojima, T., Endo, A., Hanaoka, M., Shiina, T., Terachi, T., Utsugi, S., Murata, M., Mori, N., Takumi, S., Ikee, K., Gojobori, T., Murai, R., Murai, K., Matsuoka, Y., Ohnishi, Y., Tajiri, H., and Tsunewaki, K. (2002) Structural features of a wheat plastome as revealed by complete sequencing of chloroplast DNA. *Mol. Genet. Genomics* **266**, 740–746.
- Ogihara, Y., and Ohsawa, T. (2002) Molecular analysis of the complete set of length mutations found in the plastomes of *Triticum-Aegilops* species. *Genome* **45**, 956–962.
- Ogihara, Y., Terachi, T., and Sasakuma, T. (1988) Intramolecular recombination of chloroplast genome mediated by short direct-repeat sequences in wheat species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8573–8577.
- Ogihara, Y., Terachi, T., and Sasakuma, T. (1991) Molecular analysis of the hot spot region related to length mutations in wheat chloroplast DNAs. I. Nucleotide divergence of genes and intergenic spacer regions located in the hot spot region. *Genetics* **129**, 873–884.
- Ogihara, Y., Terachi, T., and Sasakuma, T. (1992) Structural analysis of length mutations in a hot-spot region of wheat chloroplast DNAs. *Curr. Genet.* **22**, 251–258.
- Ogihara, Y., and Tsunewaki, K. (1982) Molecular basis of the genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. I. Diversity of the chloroplast genome and its lineage revealed by the restriction pattern of ct-DNAs. *Jpn. J. Genet.* **57**, 371–396.
- Ogihara, Y., and Tsunewaki, K. (1988) Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.* **76**, 321–332.
- Riley, R., Unrau, J., and Chapman, V. (1958) Evidence on the origin of the B genome of wheat. *J. Hered.* **49**, 91–98.
- Rott, R., Liveanu, V., Drager, R. G., Stern, D. B., and Schuster, G. (1998) The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol. Biol.* **36**, 307–314.
- Sarkar, P., and Stebbins, G. L. (1956) Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am. J. Bot.* **43**, 297–304.
- Sasanuma, T., Miyashita, N. T., and Tsunewaki, K. (1996) Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear

- DNA. 3. Intra- and interspecific variations of five *Aegilops* sitopsis species. *Theor. Appl. Genet.* **92**, 928–934.
- Tsunewaki, K., and Ogihara, Y. (1983) The molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops* species. II. On the origin of polyploid wheat cytoplasms as suggested by chloroplast DNA restriction fragment patterns. *Genetics* **104**, 155–171.
- Vedel, F., Quetier, F., Dosba, F., and Doussinault, G. (1978) Study of wheat phylogeny by *EcoRI* analysis of chloroplastic and mitochondrial DNAs. *Plant Sci. Lett.* **13**, 97–102.
- Wang, G. Z., Miyashita, N. T., and Tsunewaki, K. (1997) Plasmid analyses of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR-single-strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14570–14577.

蛋白質核酸酵素

PNE
PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

細胞質置換コムギの育成

究極のオルガネラゲノム工学

寺地 徹

細胞質置換系統とは、連続戻し交雑により育成された植物で、花粉親の細胞質（プラズモン）が細胞質を提供する親のものに置き換わった植物のことをいう。コムギ-エギロプス属植物では、これまで多数の細胞質置換系統が育成されており、そのなかには雄性不稔、半数体誘発、出穂遅延など、興味深い表現型を示すものがある。これらの細胞質置換系統は、自然界がもつプラズモンの多様性を反映するばかりでなく、自然界に存在しないプラズモンと核ゲノムの組合せをもつことから、両者の相互作用を総合的に考察する、貴重な実験材料を提供する。

▶▶ KEY WORDS : 連続戻し交雑 コムギ-エギロプス属 *Ae. mutica* *cox1* 遺伝子

■はじめに■

オシロイバナの斑入りの遺伝を例に挙げるまでもなく、植物細胞が核以外の部分、すなわち「細胞質」に、何らかの遺伝情報をもつことは古くから知られていた。また、多くの場合、この細胞質の遺伝情報（プラズモン）は、メンデルの遺伝様式に従わず、母性遺伝することもわかってきた。現在ではプラズモンが葉緑体とミトコンドリア、それぞれに存在するDNA分子（ゲノム）の総和であることは自明であり、本増刊号でもこれら両オルガネラゲノムの構造や遺伝子の構成、遺伝子の発現や制御に関して多くのページが割かれている。ゲノム解析を中心とした最近のオルガネラDNAの研究は、上記事項に関する知見を飛躍的に増大させた。しかしながら、葉緑体はともかく、ミトコンドリアの個々の遺伝子については、現在でも十分な機能解析が行われているとはいえない。一般に、遺伝子の機能を深く理解するためには、適当な変異体をスクリーニングし、それを研究に活用する必要がある。しかし高等植物におけるミトコンドリアの変異体は、雄性不稔とその復帰変異体を除けば意外と少なく^{*)}、これが遺伝子の機能解析を滞らせている理由の一つである。また、高等植物では、ミトコンドリアの形質転換系がまったく開発されていないことも、遺伝子の機能解析が進まない理由の一つであろう。周知のようにタバコなど一部の植物では、相同組換えを利用して外来遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入することが可能となっている¹⁾。形質転換系の確立は、任意の遺伝子に対して人

為的に変異を起こさせることが可能であることを意味しており、この技術によって葉緑体遺伝子の機能解析は新たな局面を迎えている。

では、変異体が容易に得られない状況下で、植物のミトコンドリア遺伝子の機能をより深く研究するためにはどのようなアプローチが可能であろうか。筆者は「細胞質置換系統」が変異体に代わるきわめて優れた実験材料になると考えている。細胞質置換系統とは、古典的な育種技術である連続戻し交雑により、長い年月をかけて育成された植物のことで、花粉親からみればそのプラズモンがそっくりそのまま、細胞質提供親のものに置き換わった植物である（図1）。見方を変えれば、葉緑体とミトコンドリアをベクター代わりに、細胞質提供親の両オルガネラゲノムを花粉親へまるごと持ち込んだものともいえよう。連続戻し交雑における細胞質提供親は、花粉親と交雑可能で子孫が得られるものであれば、たとえ種が違って構わないので、育成されたさまざまな細胞質置換系統は、自然界がもつプラズモンの多様性を反映することになる。また、細胞質置換系統は、自然界には存在しないプラズモンと核ゲノムの組合せをもつことから、両者の相互作用を考えるうえでも貴重な実験材料を提供する。本稿では、コムギ属 (*Triticum*) とその近縁野生種であるエギロプス属 (*Aegilops*) 植物を用いて育成された細胞質置換コムギを例に、細胞質置換系統とミトコンドリア遺伝子研究の関連について述べる。

Toru Terachi, 京都産業大学工学部生物工学科 E-mail: terachi@cc.kyoto-su.ac.jp
Production of alloplasmic wheats: The ultimate way of organelle genome engineering

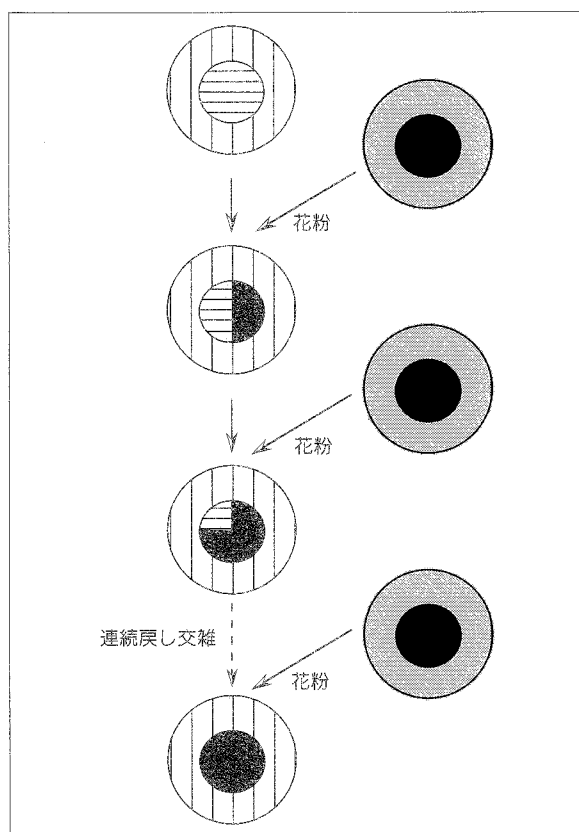


図1 連続戻し交雑による細胞質置換系統の育成

メンデルの遺伝法則に従う核とは異なり、葉緑体およびミトコンドリアを含む細胞質は母性遺伝する。すなわち1回の交雑で得られる子孫の細胞質は、母方のみから伝達されるが、核の遺伝情報は花粉親、細胞質提供親の両方から伝達され、その半分ずつを受け継ぐ。したがって、 n 回の連続戻し交雑の結果得られる子孫は、花粉親から伝達された核を $(2^n - 1) / 2^n$ の割合でもつことになる(10回の連続戻し交雑で得られる子孫は、花粉親の核を99.9%もっている)。

I. 細胞質置換系統の育成

高等植物における細胞質置換の研究は歴史が古く、メンデルの遺伝法則の再発見者の一人として有名な Correns にまでさかのぼる(常脇, 私信)。彼は雌雄同株であるアザミの一種 (*Cirsium oleaceum*) に、雄花のみをつける近縁種 (*C. canum*) の花粉を交雑して F_1 をつくり、

さらにその F_1 に *C. canum* を6世代連続戻し交雑することで、*C. oleaceum* のプラズモンと *C. canum* の核ゲノムを併せ持つ、最初の細胞質置換系統を育成した(ちなみにこの系統は雄性不稔性を示した)。その後、Michaelis が2種のアカバナ (*Epilobium hirsutum*, *E. luteum*) の間で相反交雑を行い、 F_1 ならびにその後の連続戻し交雑後代における表現型の観察から、プラズモンと核ゲノムの親和性には特異性があることを認めている²⁾。コムギにおける細胞質置換の研究は、木原により始められた³⁾。木原はコムギ属と近縁なエギロプス属の一種である *Ae. caudata* に、6倍性のパンコムギの一品種 Tve を交配して雑種をつくり、さらにその雑種に Tve の戻し交雑を13回繰り返して最初の細胞質置換コムギを育成した。興味深いことにこのコムギは、生育や雌性稔性は正常であったが、花粉不稔や、まれに雄しべの雌しべ化という異常な表現型を示した。また10%程度の無胚種子が生じたとも報告されている。この研究以後、深澤による *Ae. ovata* 細胞質をもつコムギの育成⁴⁾、Wilson と Ross によるチモフェービコムギ (*T. timopheevi*) の細胞質をもつ雄性不稔コムギの作出⁵⁾ など、内外の多くの研究者がコムギの細胞質置換に取り組むことになる。なかでも常脇はコムギの細胞質置換の研究を精力的に行い、多数の系統を育成した⁶⁾。彼はコムギ属ならびにエギロプス属のすべての節、種を含む46種類の植物を細胞質提供親に、Chinese Spring や農林26号などのパンコムギ (*T. aestivum*) の8品種・系統と皮性のスペルタコムギ (*T. spelta*) など6倍性コムギ4種の合計5種12系統を花粉親にそれぞれ用い、これらすべての組合せ (46×12) にあたる合計552種類という膨大な数の細胞質置換コムギを作出している^{*2)}。そしてこれらすべての細胞質置換コムギについて、冬季の斑入り、春先の生育力、出穂日、草丈、穂数、桿長、乾物重、自殖種子稔性、花粉稔性、交雑種子稔性、種子発芽率など合計21の形質を調査し、46種類のプラズモンと12種類の6倍性コムギの核ゲノムとの相互作用で現れる表現型の変化を体系的にまとめた。個々の形質の詳細は原著論文に譲るが^{6,7)}、この研究により、異種のプラズモンは植物の諸形質に対して、核ゲノムとの相互作用により、ある場合にはポジティブに、

*1 嫌気呼吸で生育できる出芽酵母などとは違い、高等植物のミトコンドリア遺伝子の欠損は、発育ステージのどこかで致死性をもたらすと思われていたが、タバコで複合体 I (*nad7* 遺伝子) の欠失変異体が発見されている。またトウモロコシでは、いくつかの NCS (non-chloromosomal stripe) 変異体が単離され、詳細に研究されている。

*2 戻し交雑を10回以上行ったものは、全552系統のうち532系統(96.4%)に及ぶ。

別の場合にはネガティブにはたらくことがはっきりと示された。異種プラズモンの影響でとくに目立つのは、自殖種子稔性に対する影響で、多くのプラズモンがいずれかの核ゲノムのもとで花粉不稔を生じ、その結果、多くの系統で自殖種子稔性の低下が観察された。花粉親として用いたパンコムギのプラズモンも含め、両属植物の47種類のプラズモンは、表現型の違いにより22のタイプに分類されるが、そのうちいずれかの核ゲノムで完全な雄性不稔を示すものは17タイプに達する。一方、同じ雄性不稔でも、日長感受性雄性不稔とよばれる、ユニークな表現型を示す系統(たとえば*Ae. crassa*細胞質をもつ農林26号)がある⁸⁾。この系統では、15時間以上の長日条件下でのみ、雄しべが雌しべ化するホメオティックな変異を生じ、それにより雄性不稔になっている。ほかに、卵細胞が単為発生して生じる半数体と助細胞と雄核が受精して生じる2倍体からなる $n/2n$ 双子を誘発する系統(*Ae. kotschy*細胞質をもつSalmon)⁹⁾、穂の出る時期が遅れる系統など、プラズモンの影響は多岐にわたった。このように細胞質置換コムギでは、生物学的研究のみならず、雄性不稔、半数体誘発など実際の育種にも役に立ちそうな表現型が多数観察されており、分子レベルでオルガネラゲノムの研究を進める格好の題材を提供している。さらにコムギ-エギロプス属植物では、オルガネラDNAの制限酵素分析¹⁰⁾やサザン法によるRFLP分析¹¹⁾、SSCP¹²⁾やマイクロサテライトの解析¹³⁾など、プラズモンの遺伝的関係が幅広く研究されている。細胞質置換コムギは、プラズモンの表現型の違いを進化的な事実を踏まえて考察できる、貴重な材料であるといえよう。

II. *Ae. mutica*の細胞質をもつ細胞質置換コムギ

上記のように、コムギ-エギロプス属植物では、細胞質置換コムギを用いた研究により、プラズモンが植物の表現型にどのような影響を与えるか、体系的に調査されてきた。コムギに対して興味ある表現型の変化をもたらす多くのプラズモンのなかで、筆者らは*Ae. mutica*のプラズモンに注目している。*Ae. mutica*はトルコ、シリアなど中東地域に生育する2倍性の野生種である(図2)。*Ae. mutica*のプラズモンは、当初、米国ノースダコタ大学のMaanとブルガリア国コムギヒマワリ研究所の

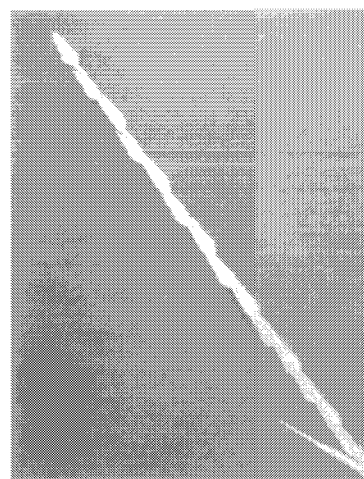


図2 *Aegilops mutica*の穂

*Aegilops mutica*は*Aegilops*属*Amblyopyrum*節に属する唯一の種で、他の多くの*Aegilops*種とは異なり、他殖性である($2n=14$)。穂は長く、線状で、小花数は多い。

Panayotovの2人により独立に6倍性パンコムギへ導入され、後に常脇によって12種類の6倍性コムギの遺伝的背景へと移された。この2つのプラズモンはもともと同一種に由来したにもかかわらず、細胞質置換コムギの表現型へ与える影響に顕著な違いが認められ、たとえば、Maanにより最初に導入されたプラズモン(以後T型とよぶ)は、細胞質置換コムギの出穂を花粉親のパンコムギに比べて11.6日(12核の平均値)遅らせるが、Panayotovのプラズモン(以後T²型とよぶ)は出穂時期にほとんど影響を与えない。またT型プラズモンをもつコムギの稔性は、3種類の核との組合せを除いて正常であるが、T²型プラズモンは、調べた12種類のコムギすべてに対し強い雄性不稔をひき起こす。以前の研究で、両系統の葉緑体DNAの制限酵素切断パターンを比較したところまったく違いが認められなかったことから、これらの系統は同じ葉緑体ゲノムをもつと考えられた¹⁴⁾。一方、同様の方法でミトコンドリアDNAを分析したところ、約15%の断片に違いが認められたので、両プラズモンの表現型の違いは、ミトコンドリアゲノムの構成の違いに起因すると結論された¹⁵⁾。筆者らは、上記表現型に関与するミトコンドリアの原因遺伝子を明らかにするため、DNA、RNAおよび蛋白質レベルにおける各種実験を行っている。これまでのミトコンドリア遺伝子プローブを用いたサザン解析では、両系統間で、*atp1*、*cox1*、*rrn18+5*の3つの遺伝子領域に、コピー数の違い

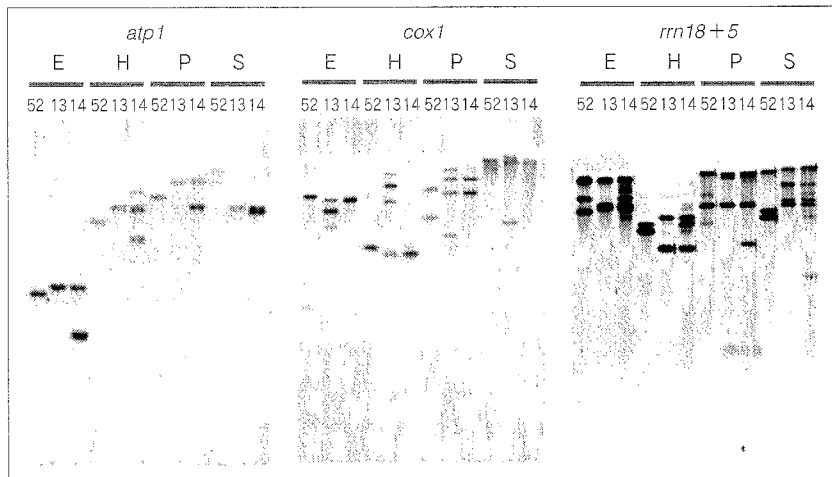


図3 ミトコンドリア遺伝子プローブを用いたザザンハイブリダイゼーション

花粉親であるパンコムギ (52) ならびに *Ae. mutica* の T 型および T² 型プラスモンをもつ細胞質置換コムギ (13, 14) からミトコンドリア DNA を調製し、制限酵素 *EcoR* I (E), *Hind* III (H), *Pst* I (P) および *Sal* I (S) で完全消化した。これまで合計 26 種のミトコンドリア遺伝子プローブによるハイブリダイゼーションを行ったところ、*atp1*, *cox1*, および *rrn18+5* の 3 つの遺伝子領域で、コピー数の違いを伴う顕著な構造変異が認められた。

を伴う顕著な構造変異が存在することがわかった (図 3)。また、これら 3 遺伝子領域の塩基配列を決定し、T 型と T² 型間で構造を比較したところ、T² 型では *atp1* 遺伝子下流の *atp9* 遺伝子内に、また T 型では *cox1* 遺伝子内に、それぞれ分岐した配列が見つかり、結果としてそれぞれの系統に特有な新しいオープンリーディングフレーム (*orf*) が生じていることがわかった (図 4)。また、*Ae. mutica* の *cox1* 遺伝子の上流には、パンコムギにはない *orf260* 遺伝子が存在すること (図 4b)、T² 型の *rrn18+5* 遺伝子領域には、3' 部分が他の配列と置き換わった組換え型 *rrn18* 遺伝子が存在することも示された (図 4c)。この 3 つの変異領域に存在する遺伝子の転写産物を、開花前の植物の葉および穂から調製した全 RNA を用いてノーザン解析したところ、*atp1*, *rrn18+5* 両遺伝子の発現パターンに違いは見い出されなかった (図 5)。しかし *cox1* 遺伝子については、細胞質置換コムギとパンコムギの間で発現パターンに顕著な差が認められ、細胞質置換コムギの *cox1* 転写産物の蓄積量がいずれも著しく低下していることがわかった (図 5)。このことについて、細胞質置換コムギの *orf260* 遺伝子の発現パターンは *cox1* 遺伝子の発現パターンとよく似ていたことから、細胞質置換コムギでは *orf260* 遺伝子プロモーターが共転写される *cox1* 遺伝子の発現を抑制している可能性が考えられている。現時点で、T 型と T² 型間で違いを示す転写産物の特定はできてはおらず、また、細胞質置換コムギで観察された *cox1* 転写産物の蓄積量低下が、表現型とどのように結びつくかわからない。しかし *cox1* の変異体は、いまだいかなる植物種でも見つかっていないこと、*cox1* とともに複合体 IV を構成する *cox2* の場合、

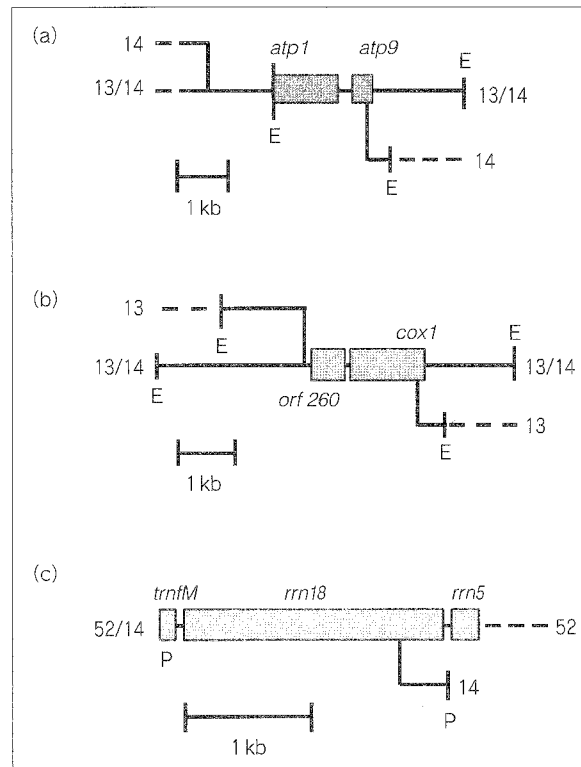


図4 ミトコンドリア *atp1*, *cox1*, *rrn18+5* 遺伝子領域にみられる分岐構造

Ae. mutica の T² 型プラスモンをもつ細胞質置換コムギ (14) は *atp9* および *rrn18* 遺伝子内に ((a), (c)) T 型プラスモンをもつ細胞質置換コムギ (13) は *cox1* 遺伝子内に (b)、それぞれ分岐した配列をもつ。またこれらの細胞質置換コムギは、*cox1* 遺伝子の上流に、パンコムギにはない *orf260* をもっている。この *orf260* は *T. timopheevi* 細胞質をもつコムギの雄性不稔原因遺伝子とされる *orf256* と高い相同性を有している (b)。

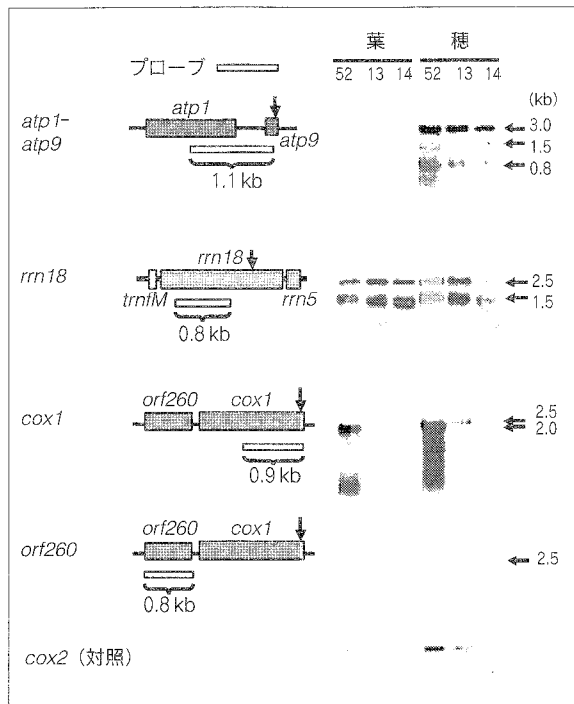


図5 ミトコンドリア *atp1*, *cox1*, *rrn18+5* 遺伝子領域の発現解析

パンコムギ (52) ならびに *Ae. mutica* の T 型および T² 型プラスモンをもつ細胞質置換コムギ (13, 14) から全 RNA を調製し、DNA 断片をプローブにノーザン解析を行った。各系統間で *atp1/atp9*, *rrn18* 両遺伝子の発現パターンに違いはないが、*cox1* 遺伝子の発現量は細胞質置換系統で著しく低下していた。またその発現パターンは、*orf260* 遺伝子とよく似ていることから、細胞質置換系統では *orf260* 遺伝子のプロモーターが共転写される *cox1* 遺伝子の発現を抑制している可能性が考えられる。

トウモロコシで独立に見出されたプロモーターおよび 5' 領域の欠失変異体は、いずれもシビアな NCS 表現型を示すことなどから、細胞質置換コムギで複合体 IV の機能が変化しているか否かをさらに検討する価値は十分にあると考えている。

■おわりに■

以上、コムギの細胞質置換を例に、細胞質置換系統とミトコンドリアゲノム研究の関連を述べた。一般に、雄性不稔以外のミトコンドリアの変異体では、NCS における表現型で代表されるように、変異型のミトコンドリアをもつ細胞と野生型のミトコンドリアをもつ細胞が別のセクターを形成し、植物全体に変異型のミトコンドリアが広がるホモプラスミックな状態にはならない。これに対して、細胞質置換系統では、異種のミトコンドリア

が植物全体に行き渡り、花粉親のものと同様に置き換わっているという特徴がある。近年、著しい進歩をみせている葉緑体の形質転換技術ですら、ゲノム全体を他種のものに置き換えることは不可能であるし、ましてや植物ミトコンドリアのように形質転換系が開発されていない状況下では、ゲノム全体はおろか、遺伝子の変異体を自由に得られるようになるのもまだ先の話である。その意味で、連続戻し交雑による細胞質置換は、古典的ではあるが、実は究極のオルガネラゲノムの改変方法であったといえよう。近年、人々の興味は、単一の遺伝子のはたらきから、遺伝子間、ゲノム間の相互作用へと移っている。日長感性を示すホメオティック変異や、半数体誘発、出穂の遅延など、ユニークな表現型が観察される細胞質置換コムギは、個々の原因遺伝子のみならず、オルガネラゲノムと核ゲノムの相互作用を総合的に考察する格好の材料を、今後もわれわれに提供してくれるものと思われる。

本稿執筆の機会を与えていただいた中村千春教授 (神戸大学)、未発表データを引用させていただいた松崎 準氏 (現 和研薬株式会社)、堀川明彦氏 (京都産業大学工学研究科)、作図をお願いした吉田佳言氏に感謝いたします。最後に、細胞質置換コムギの魅力を進んで示してくださった常協恒一郎先生に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Maliga, P. : *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 164-172 (2002)
- 2) Michaelis, H. : *Adv. Genet.*, 6, 288-401 (1954)
- 3) Kihara, H. : *Cytologia*, 16, 177-193 (1951)
- 4) Fukasawa, H. : *Jpn. J. Bot.*, 17, 55-91 (1959)
- 5) Wilson, J. A., Ross, W. M. : *WIS*, 14, 29 (1962)
- 6) Tsunewaki, K., Wang, G. Z., Matsuoka, Y. : *Genes Genet. Syst.*, 71, 293-311 (1996)
- 7) Tsunewaki, K., Wang, G. Z., Matsuoka, Y. : *Genes Genet. Syst.*, 77, 409-427 (2002)
- 8) Murai, K., Takumi, S., Koga, H., Ogihara, Y. : *Plant J.*, 29, 169-181 (2002)
- 9) Kobayashi, M., Tsunewaki, K. : *J. Hered.*, 71, 9-14 (1980)
- 10) Ogihara, Y., Tsunewaki, K. : *Theor. Appl. Genet.*, 76, 321-332 (1988)
- 11) Wang, G. Z., Matsuoka, Y., Tsunewaki, K. : *Theor. Appl. Genet.*, 100, 221-231 (2000)
- 12) Wang, G. Z., Miyashita, N. T., Tsunewaki, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14570-14577 (1997)
- 13) Hirose, S., Takumi, S., Ishii, T., Kawahara, T., Nakamura, C., Mori, N. : *Genes Genet. Syst.*, 79, 271-282 (2004)
- 14) Terachi, T., Ogihara, Y., Tsunewaki, K. : *Genetics*, 108, 681-695 (1984)
- 15) Terachi, T., Tsunewaki, K. : *Theor. Appl. Genet.*, 73, 175-181 (1986)

Cloning and Structural Analysis of Wheat cDNAs Encoding *Ndr* Protein Kinase Homolog by Data Mining of the EST Database KOMUGI

Takehiro Imai and Toru Terachi

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita, Kyoto 603-8555, Japan

Reprinted from

Breeding Science Vol. 55, No. 2 (2005)

Cloning and Structural Analysis of Wheat cDNAs Encoding *Ndr* Protein Kinase Homolog by Data Mining of the EST Database KOMUGI

Takehiro Imai and Toru Terachi*

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita, Kyoto 603-8555, Japan

In order to gain a better understanding of the nature of nuclear *dbf*-related (*Ndr*) protein kinase homologs in monocots, three cDNA clones were isolated from common wheat (*Triticum aestivum*) by data mining of expressed sequence tag (EST) databases, and their primary structure was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE), and nucleotide sequencing. Deduced amino acid sequences of the cDNA clones contained all 12 highly conserved subdomains of the eukaryotic Ser/Thr protein kinase, including the ATP-binding site (in subdomain I-II) and the Ser/Thr protein kinase active-site (in subdomain VI). The sequences also contained an insert of 56 amino acids between subdomains VII and VIII, and three conserved Ser/Thr residues, being characteristic of the *Ndr* family of eukaryotic protein kinases. A sequence comparison among cDNAs from wheat and those from ancestral diploid species (*T. boeoticum*, *Aegilops speltoides* and *Ae. squarrosa*) revealed that at least three homeologous genes were expressed in hexaploid wheat. The results confirmed the usefulness of current EST databases including KOMUGI for gene cloning of wheat, since the use of specific primers designed with information about EST sequences has considerably facilitated the cloning of rare cDNAs such as *Ndr*.

Key Words: wheat, homeologous genes, *Ndr*, protein kinase, AGC group, EST.

Introduction

Although common wheat (*Triticum aestivum*) is one of the world's most important crops, molecular cloning and functional analysis of wheat genes have been hampered by the large genome size, polyploidy, and a lack of molecular tools such as ESTs, ordered genomic clones, and gene-tagged lines. In addition, due to the difficulty in obtaining transformants, wheat is not a suitable material for molecular studies. However, the recent development of wheat EST databases such as KOMUGI (<http://shigen.lab.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp>) has dramatically changed the situation; presently, the number of EST sequences deposited in databases has grown to a point where it is comparable to that of ESTs for the model plant *Arabidopsis thaliana*, and now wheat can be considered to be a primary source for gene cloning.

We have recently cloned and characterized three cDNAs encoding novel protein kinases in the 'AGC' group from radish, to gain a better understanding of the nature of plant protein kinases in the group (Imai *et al.* 2003). Based on the sequence and structural similarity, we concluded that the protein kinases are plant homologs of the fungal *cot1*-like (Yarden *et al.* 1992) and animal *Ndr* protein kinases (Millward *et al.* 1995) (hence we designated the radish genes

as *RsNdrs*). The results also showed that *RsNdrs* consist of a small multi-gene family in radish. However, no information is available about the *Ndr* family of protein kinases in monocots. The main purpose of the present study was to examine for the first time the gene encoding *Ndr* protein kinase in monocots. *Ndr* is a conserved and widely expressed nuclear protein kinase, first isolated and sequenced in humans, *D. melanogaster* and *C. elegans* (Millward *et al.* 1995). Although an entire signal transduction cascade in which *Ndr* is involved has not yet been elucidated, *Ndr* is considered to be important for the regulation of cell growth, cell division and cell morphology (Millward *et al.* 1999, Tamaskovic *et al.* 2003). In the present study, three cDNA clones encoding a Ser/Thr protein kinase which is homologous to *Ndr*, were isolated by data mining of the wheat EST database KOMUGI, and the primary structure of these cDNAs was determined by RT-PCR and the 5'-RACE method. The results showed the presence of at least three homeologous genes in common wheat, each of which was expressed in young seedlings. The usefulness of the current wheat EST databases for gene cloning was also examined.

Materials and Methods

Data mining and primary RT-PCR

The database KOMUGI, developed within the framework of the National BioResource Project in Japan, and the GenBank database were searched using the sequence of a radish *Ndr1* cDNA (DDBJ accession no. AB105045) as an

Communicated by N. Tomooka

Received October 4, 2004. Accepted November 24, 2004.

*Corresponding author (e-mail: terachi@cc.kyoto-su.ac.jp)

electronic probe, and 19 homologous EST sequences were selected. Figure 1 shows the selected EST sequences and their alignment into a contig for the construction of a hypothetical cDNA sequence. Although some heterogeneity was present among the sequences, the existence of several conserved regions allowed us to synthesize a primer pair, F01 (=5'-GGTGCTATCATGTATGAAATGC-3') and R01 (=5'-TTGTAATACACATGCTCGTCAG-3'), to be used in the initial RT-PCR to amplify the last half (~1 kb) of a hypothetical cDNA (Fig. 1). Total RNA was isolated from young seedlings of the wheat cv. Chinese Spring, using an RNeasy plant mini-kit (Qiagen), and RT-PCR was performed. The RT-PCR products of an expected size (ca. 0.95 kb) were cloned into a plasmid vector, pGEM-T Easy (Promega), and their nucleotide sequences were determined using either an ALFexpress (AP Biotech) or a CEQ2000 (Beckman coulter) DNA sequencer.

5'-RACE and sequence analysis of full-length cDNAs

Since few EST clones were located in the predicted 5'-region of the cDNA (Fig. 1), RACE was performed with the primers 5'RACE1 (=5'-TGCAGGTCGACATTGAACC-3') and 5'RACE2 (=5'-GCATTTTCATACATGATAGCACC-3') designed from the DNA sequences of the initial RT-PCR products. A primer, 5'UTR1 (=5'-GGTATTGACCGCTTCA GAGC-3'), which is specific to the 5'-end of cDNA, was de-

signed from the consensus sequence of the RACE products. Putative full-length cDNAs were then amplified in wheat by RT-PCR using 5'UTR1 and another primer, 3'UTR1 (=5'-TTCAATTGTAATACACATGCTCG-3'), whose sequence was taken from a consensus sequence of distal EST clones. Complete nucleotide sequences of the putative full-length cDNAs were determined after cloning of the RT-PCR products into a plasmid vector as previously described. The sequences of a full-length cDNA for *Ndr* were also determined for the ancestral diploid species, i.e. *T. boeoticum*, *Ae. speltooides* and *Ae. squarrosa*, by cloning of the RT-PCR products. The cDNA sequences were deposited in the DDBJ database under accession nos. AB179753-AB179755 and AB180739-AB180741. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the cDNAs were analyzed using the software GeneWorks (Oxford Molecular Group), Clustal W at Genomenet (<http://clustalw.genome.jp/>), PAUP* version 4.0 (Swofford 2002), and the BLAST program at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Results and Discussion

Primary structure of cDNAs encoding putative wheat *Ndr*

A single fragment of expected size (~2 kb) was amplified by RT-PCR with the primer pair 5'UTR1 and 3'UTR1 (Fig. 2a). The size of this fragment was similar to that of a

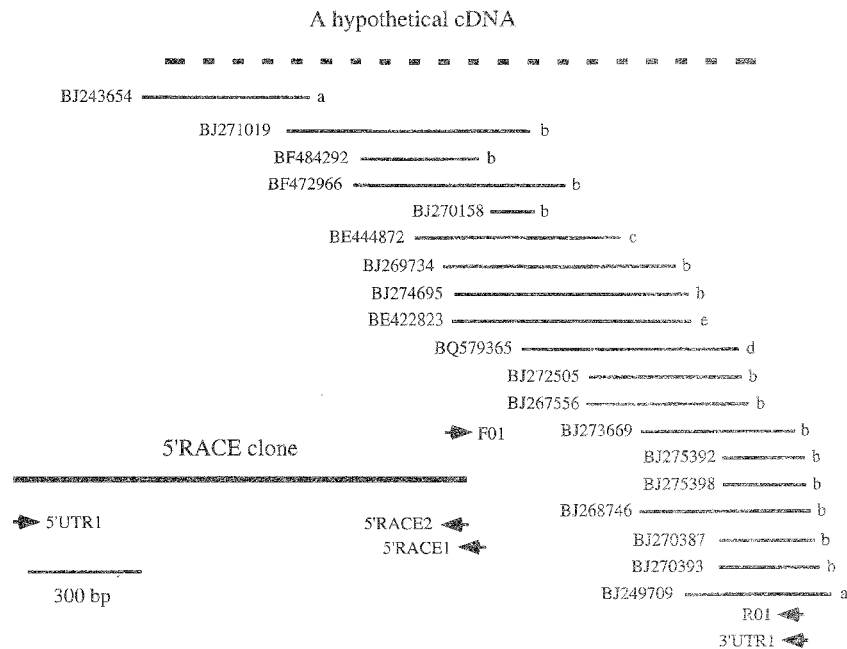


Fig. 1. Alignment of EST sequences selected from the databases KOMUGI (lines with the prefix BJ, followed by a six-digit number) and GenBank (others). cDNA libraries from which each EST clone was isolated are indicated as follows; a, spike at flowering time; b, pistil at heading time; c, etiolated seedling root; d, dormant embryo; e, endosperm. A hypothetical cDNA and the region covered by a 5'-RACE clone are denoted by a dotted and a bold line, respectively. Arrowheads indicate the position and the direction of the primers used for RT-PCR and RACE.

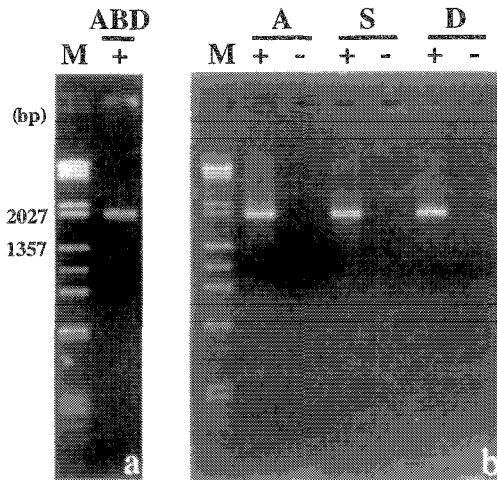


Fig. 2. A full-length cDNA fragment amplified by RT-PCR. Total RNA was prepared from wheat (a) and three diploid species (b). Letters above the lane indicate nuclear genome formulae of each species, i.e. ABD, A, S and D for *Triticum aestivum*, *T. boeoticum*, *Aegilops speltoides* and *Ae. squarrosa*, respectively. + and - denote the presence and absence of the reverse transcriptase in the reaction. PCR was performed in a System 2400 programmable incubator (PE Biosystems) using ExTaq DNA polymerase (TaKaRa) under the following conditions: initial denaturation (94°C, 3 min), 30 cycles of denaturation (94°C, 30 sec), annealing (55°C, 30 sec) and extension (72°C, 1 min). M: Mixture of the λ HindIII and ϕ X174 HaeIII digests used as molecular size standards.

hypothetical cDNA obtained by the assembly of EST sequences. Three clones with a putative full-length cDNA were selected and their complete nucleotide sequences were determined. Two of the clones (1-7 and 1-9) contained an RT-PCR product with 2094 bp. The remaining clone (2-3) contained a 2093 bp product (Fig. 3). All three clones contained a single ORF with 1674 bp encoding a protein with 557 amino acids and a calculated molecular mass of 64 kDa. Although the overall DNA sequences for the three clones were quite similar, three, 15 (14 synonymous and one non-synonymous) and seven nucleotide differences were observed in the 5'-UTR and 3'-UTR coding regions, respectively (Table 1). Three insertions/deletions were also found in the 3'-UTR region of the cDNAs. The deduced amino acid sequences of the three cDNA clones were nearly identical, only one amino acid difference (Gly vs. Ser, at position 539) was present between clone 2-3 and the others (Table 1). The deduced amino acid sequences of the three clones contained all 12 highly conserved subdomains of the eukaryotic Ser/Thr protein kinase (Hanks and Hunter 1995), including the ATP-binding site (in subdomain I-II) and Ser/Thr protein kinase active-site (in subdomain VI) (Fig. 3). The sequences also contained an insert of 56 amino acids between subdomains VII and VIII, and three conserved Ser/Thr residues (Fig. 3), being characteristic of the *Ndr* family of eukaryotic protein kinases (Tamaskovic *et al.* 2003).

Relationship of wheat *Ndrs* among plant protein kinases

In order to determine the relationship of the wheat *Ndrs* among plant protein kinases, a phylogenetic analysis was carried out using the deduced amino acid sequences. Since more than 1,000 genes may encode an eukaryotic protein kinase in *Arabidopsis* (Wang *et al.* 2003), and the 'protein kinases' consist of highly diverse families of proteins that differ in structure and function, a limited comparison was made for this purpose. Using the BLAST program, closely related sequences, including eight hypothetical protein kinases in *Arabidopsis*, and putative protein kinases in tobacco (NTPKTL7), ice plant (MCPRTKINA) and spinach (SOPRTKINA) (GenBank accession nos. X71057, Z30329 and Z30330, respectively) as well as radish *RsNdrs*, were selected from the databases. Some plant protein kinases which had been classified into the 'AGC group' were also included in the analysis, as well as AK1 (GenBank accession no. NM120569) (Harper *et al.* 1993) which belongs to the calcium-dependent protein kinase (CDPK). The latter was used as an outgroup. Figure 4 shows a tree for the phylogenetic relationships among the selected plant protein kinases. The tree indicated that the deduced amino acid sequences of wheat *Ndrs* formed a cluster with the aforementioned putative protein kinases, and that they could be clearly distinguished from those of other 'AGC' protein kinases such as PVPK1 (Lawton *et al.* 1989). It is interesting to note that the wheat *Ndr* sequences were more similar to some *Arabidopsis* sequences (e.g., At2g20470) than those of *RsNdr1* and its *Arabidopsis* homolog At5g09890, though the *RsNdr1* sequence was used for selecting wheat ESTs from the database. In *Arabidopsis*, probably eight genes encode protein kinases homologous to *Ndr*. The presence of a small multi-gene family for *Ndr* is also expected in other plant species. The three different cDNA clones characterized in this report should be considered to be the products of homeologous genes in hexaploid wheat (see section 'three cDNAs are derived from homeologous genes in the A, B and D genomes of wheat'). Therefore, other members of a *Ndr* family are likely to be found in wheat with the accumulation of more data.

Three cDNAs are derived from homeologous genes in the A, B and D genomes of wheat

Wheat is a hexaploid species consisting of A, B and D genomes, and 14 out of 15 nucleotide differences in the coding region of the cDNAs are synonymous. This observation prompted us to determine whether each of the three cDNAs was derived from homeologous genes of wheat. RT-PCR was performed with total RNA isolated from the ancestral diploid species, i.e. *T. boeoticum*, *Ae. speltoides* and *Ae. squarrosa* containing the A, S and D genomes, respectively, and the corresponding cDNAs were cloned after PCR (Fig. 2b). Table 2 summarizes the nucleotide differences among each of the wheat cDNA clones and each of the cDNA clones isolated from the ancestral species, while Figure 5 depicts a tree showing the relationship among the

<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	agtatgacacgcttcagagcttagagctcccttggcgttgaggcgtctggttgatggctcaataataacgctctctggtcttggagatgatgcattgtagacacaag	MIG GAT TCC GCG AAA	123
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9g.....a.....a.....	123
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	H D S A R	123
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	actt tgg tyt cag ang ttc cag cgg ogg gag aag toc ang acc cog cgg gts cct gcc acc gmt geg ang gnt ocd gkg ang ocd ccc gtc gag gac ocd	222
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9c.....	222
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	S W F Q K F Q P R D K S K S P A V P A S H G K D P G K P P V D D A	222
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	oct tct agc ggg acc aag cng ang gtc gct gog gca aaa cng tgc att gag aac cnc tnc aag act cng atg gag toc ttg caa gat ags aaa gag aeg	321
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	321
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	P S S A T K Q K V A A A K Q Y Z B N H Y K T O N K S L Q D R K E R	321
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	ccg tgg atg ctg gng ags aaa tta cng gat gct gaa gtt oct gca gaa gag cng aac aac att cta aaa cgt ttg gag aaa aag gng act gaa tyt atg	420
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	420
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	R W M L E R K L Q D A E V P A E E Q N N I L K H L E K K E S D B Y H	420
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	oct ttg caa aga cnc aag atg cgg gtt gaa gat tyt gaa ctt ttg aca att ttt cca mgt ggt tca ttt gta tgc gty gct gtt ttt ags gag aag acc	519
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	519
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	R L Q R H K M G V E D F E L L T I L C R C A F D E E V S L C A W R T	519
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	tct aag act gca tpe tca arg ana aac ctt pag aaa tct gaa atg ctt gtt agg gdc cng gtc gaa cnc gtc aag gcc gaa aga aac ctc ctt gca gaa	618
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	618
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	S K S V Y A H K K L K K S E M L R E G Q V E H V K A E R N L L A E	618
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	gtc gat agt ggg tgc ata gta ang ctt tgc tgc tct ttt caa gat gmt gng ttc ttg ttt ctc atc atg gag tnc gtt ggt ggt gac atg atg act	717
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	717
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	V D S A Y I V K L Y Y S F Q D D E F L Y L I M E Y L P G G D M N T	717
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	ttg ctc atg cgc aag gnc act cts aca gaa gat gaa gcc aaa ttt tnc atc gct gaa act gta cta gca ata gng tcc att cac aag cac ant tnc att	816
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	816
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	L L M R K D T L T E D R A K F V I A E T V L A F E S F H K H N I	816
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	ccg ags gmt atc aag cca gat aag tta tta gmt ctc atp gct cnc ttg ang ctt tct gac ttt gca ttg tgc aaa cct ttg gnt agc atp att tyt	915
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	915
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	H E D K E E D N L L L D L S G H L K L S D F G E C K P L P S S N F	915
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	cca aat ttg aag gca cgg gac tnt aca cct gca aaa ggt gct aaa cct tta ccc gmt aag acc agt gca tta act aac tct tct gca cgg aag ggt acc	1014
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1014
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	P N L N E P D Y T P G K G A K P L P D N T S R L T N S S A P K R T	1014
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	cag cng gng cng ctg tca cat tgg caa aag aac cgt cgg atg ttg gog tnt tct aca gtt ggt act cct gat tnc att cct cca gag gtt cta ttg ang	1113
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1113
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	Q Q E Q L S H W Q K N R R M L A Y S T Y G T P D Y I A P E V L L K	1113
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	aaa gca tnt gca atg gag tnt gac tgg tgc ctt ggt gct atc atg tnt gaa atg cta gtt ggt tnt ccc cca ttt tnt tgg gng gat cca atg tca	1212
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1212
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	K G Y G H E C D W N S L G A L M Y E H L V G Y P F Y S E D P M S	1212
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	acc tgc aga aag att gtc aac tgg aca mgt cac cts aaa ttt cct gca gaa gca aag ctt tct tct gaa act aag gnt cik atp agc aaa ctt ctc tnt	1311
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1311
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	T C R K I V N W R S H L K F P E E A K L S S E T K D L I S K L L C	1311
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	aat gtt cng cag aga ctt gca aca aaa gca gcc cgt gaa ata aaa gca cat aca tgg ttt aca ggt gtc cta tgg gaa ang ttg tnt cng atg aaa cgt	1410
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1410
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	N V E Q R L G J F K G A H E I K A H T W P E G V Q W E K L Y Q M R A	1410
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	gct ttc mta cca gaa gtt amt ggc gag ttg gnt act cng aac ttt gag aaa ttt gag gng act gca cca gaa gty cng gtt tca ttt aag cgg ggt cca	1509
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1509
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	A P I P E V N G E L D T Q N P E K F E E T G A Q V Q S S S K A G P	1509
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	tgg aga aag ttg ctt cca tcc ang gnt gca aat ttt gtt gca tnc acc tnc ang aac ttt gaa att gtt aat gac gat gaa gtt gcc ggg atp gcc gag	1608
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1608
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	W R K M L P S K D A N F V G Y L Y K N F E I V H D D E V A G I A E	1608
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	ctg aag aaa ang agt tcc aaa tca aaa cgg cca acc atc aag aca ttg ttt gng agc atg gmt gaa gat gaa oct gtc cag gcc agt ttc tta amt atg	1707
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1707
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	L K K K S S K S K R P T I K T L F E S M D E D E P V H G S G F L N M	1707
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	ttg ccc cat aag gag gca gaa cct ttt tct cac tca agc gcc cca cca gaa gaa tnc gaa ctt gcr cgt aat tag gatggggttttaaaagtaaacacaga	1813
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1813
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	L P H K E G Q P S S H S S A P P E O Y Q P R R E	1813
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	aaagtaaaagagagaaa.....cbgttgocctttggcttgggtttaccccgctccagcttttggtaacttaaccgctgtctcttttttgatgtgttataaaacaaatccaccctgtotocaa	1943
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	1944
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	1942
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	aaagcatgtgtttgatgttagcagtgatgocctttggcttggctttgctcagcttctggcgtttcccccgtattactgctacagcstaagtgataactgtttaccagcttgacga	2074
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	2074
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	2073
<i>WheatNdr1</i> /no.1-7	gcacgtgttttacaattgaa	2094
<i>WheatNdr1</i> /no.1-9	2094
<i>WheatNdr1</i> /no.2-3	2093

Fig. 3. cDNA (upper) and deduced amino acid (lower, one letter code) sequences of wheat *Ndrs*. Nucleotides of clones 1-9 and 2-3 identical with those of clone 1-7 are denoted by dots (.). A different amino acid in clone 2-3 is indicated by a one letter code after the slash (/). Gaps are represented by dashes. Conserved catalytic subdomains are denoted using bold underlines with Roman numerals. The three Ser/Thr residues conserved in *Ndrs* are circled. The ATP-binding site and Ser/Thr protein kinase active-site are denoted by shaded and obliquely striped boxes, respectively. The primers used for the amplification of a full-length cDNA are indicated by two underlines.

Table 1. Location of the nucleotide differences among three cDNA clones of wheat¹⁾

Clone	5'UTR			Coding region										
	-40	-32	-26	102	144	420	501	648	663	708	819	828	1104	1155
1-7	c	g	g	C	T	T	C	C	T	T	C	C	A	A
1-9	g	a	a	G	C	C	T	A	A	A	T	T	A	G
2-3	c	g	g	C	T	T	C	C	A	T	T	T	G	G

Clone	Coding region						3'UTR							
	1443	1449	1515	1585	1689	1728	1729	1806	1817	1823	1892	1916	1949	1952
1-7	A	C	T	A	a	a	—	c	a	c	t	c	t	t
1-9	G	G	C	A	a	a	a	t	a	t	t	c	—	t
2-3	A	G	T	G	g	—	—	t	c	t	g	t	t	c

¹⁾ A nonsynonymous substitution is indicated by a boldface letter, whereas a deletion is denoted by a hyphen.

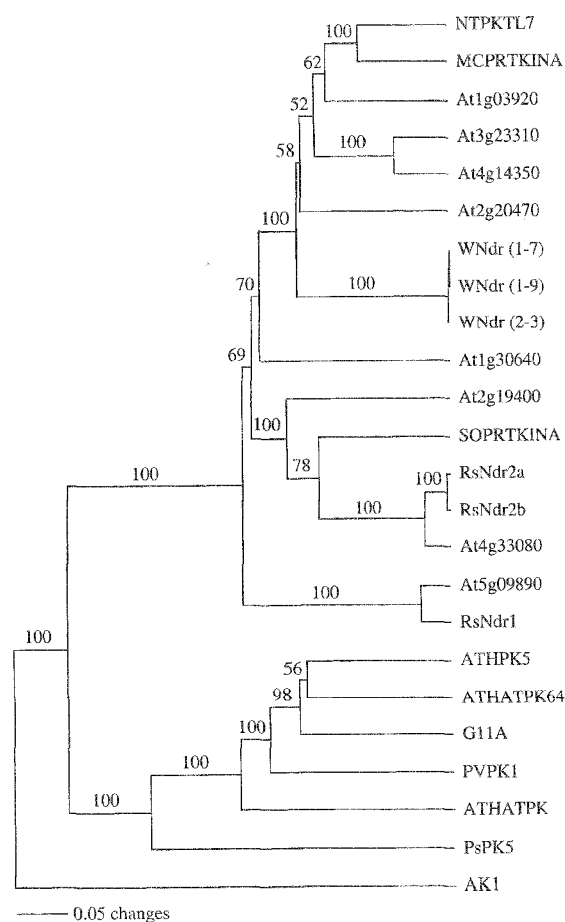


Fig. 4. Tree showing the relative relationship of wheat *Ndrs* among selected plant protein kinases in the AGC group. The bootstrap percentage of each clade after 1000 replications is indicated above the branch. The source of the protein kinases not referred to in the text is as follows; ATHPK5 (Hayashida *et al.* 1993) (DDBJ accession no. D10909), ATHATPK64 (Mizoguchi *et al.* 1992) (DDBJ accession no. D10937), G11A (Lawton *et al.* 1989) (GenBank accession no. J04556), ATHATPK (Hayashida *et al.* 1992) (DDBJ accession no. D10910) and PsPK5 (Lin *et al.* 1991) (GenBank accession no. M92989).

six cDNA clones. The data indicated that clones 2-3, 1-9 and 1-7 from wheat were similar to those of *T. boeoticum*, *Ae. speloides* and *Ae. squarrosa*, respectively, suggesting that they are homeologous genes in the A, B and D genomes of wheat, respectively. Analysis using nulli-tetra-somic lines of common wheat will provide further evidence for this assumption. Since all the homeologous *Ndrs* were expressed in wheat, functional differentiation among the three genes requires further studies.

EST databases as an essential source for the cloning of wheat genes

The wheat genome (16,000 Mb) is much larger than the genome of the model plant *Arabidopsis* (125 Mb) or another important crop, rice (430 Mb), for which the genome sequence has been determined almost completely. Although a wheat genome project such as IGROW (Gill 2003) has been proposed, the task is extremely challenging and will take a long time. Among the current activities undertaken to construct the infrastructure for the molecular study of wheat, the development of several EST databases is one of the most successful, and has already provided useful information for the cloning of wheat genes. When we started the present study, the number of EST sequences deposited in KOMUGI was 116,232, being comparable to or exceeding that of *Arabidopsis* and rice. The number of ESTs deposited in public databases is 555,472 and still increasing.

In the present study, the complete cDNA sequence of *Ndr* was revealed in monocots. Our previous study showed that the level of mRNA for *Ndr* was very low in radish leaves (data not shown), and a low level of mRNA accumulation is also expected for wheat seedlings. The absence of EST in a cDNA library from seedlings supports this assumption, though the high sensitivity of the RT-PCR method enabled us to obtain a cDNA fragment from total RNA prepared from seedlings. Specific, not degenerate, primers designed with information about EST sequences, has considerably facilitated the cloning of rare cDNAs such as *Ndr*. It should be noted that 13 out of 19 EST clones were derived from a cDNA library constructed with the RNA from a pistil at heading time (Fig. 1), suggesting the existence of a specific

Table 2. Pairwise nucleotide differences between cDNA clones¹⁾

Clone ²⁾	1-9	spl	2-3	btc	sqr	1-7
1-9	—	0.00721	0.00866	0.00818	0.00866	0.00866
spl	15	—	0.00915	0.00867	0.00915	0.00817
2-3	18	19	—	0.00431	0.01012	0.00672
btc	17	18	9	—	0.00915	0.00817
sqr	18	19	21	19	—	0.00335
1-7	18	17	14	17	7	—

¹⁾ The numbers below a diagonal indicate the absolute base differences between cDNAs, whereas those above a diagonal show the distance estimated by Kimura's 2-parameter method.

²⁾ 1-7, 1-9 and 2-3 denote the cDNA clones isolated from wheat, whereas spl, btc and sqr represent those from *Ae. speltoides*, *T. boeoticum* and *Ae. squarrosa*, respectively.

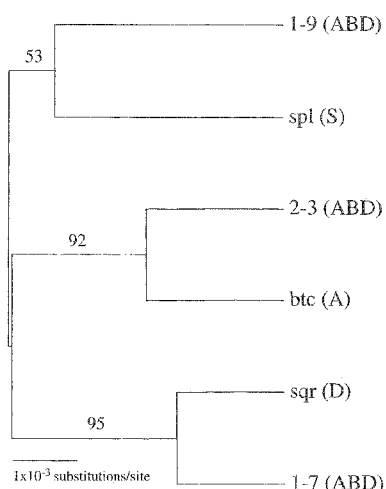


Fig. 5. Tree showing the relative relationship among six *Ndr* cDNAs. 1-7, 1-9 and 2-3 denote the cDNA clones isolated from wheat, whereas btc, spl and sqr indicate those isolated from *T. boeoticum*, *Ae. speltoides* and *Ae. squarrosa*, respectively. The bootstrap percentage of each clade after 1000 replications is indicated above the branch. Letters in the parentheses indicate the nuclear genome formulae of the species from which cDNA clones were isolated.

pattern of *Ndr* expression. Due to the availability of sequence information, it will be easy to search for other *Ndr* homologs in wheat and other monocots including rice and maize. More studies on *Ndr* at the protein level will provide further insight into the possible important functions of this protein kinase in *planta*.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Foundation for Bio-venture Research Center, from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and was carried out using the resources constructed under the National BioResource Project (NBRP)/KOMUGI, Japan.

Literature Cited

- Gill, B. (2003) Update on IGROW (International Genome Research on Wheat). *Ann. Wheat Newsl.* 49: 14.
- Hanks, S.K. and T. Hunter (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J.* 9: 576–596.
- Harper, J.F., B.M. Binder and M.R. Sussman (1993) Calcium and lipid regulation of an *Arabidopsis* protein kinase expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 32: 3282–3290.
- Hayashida, N., T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (1992) Characterization of a gene that encodes a homologue of protein kinase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 121: 325–330.
- Hayashida, N., T. Mizoguchi and K. Shinozaki (1993) Cloning and characterization of a plant gene encoding a protein kinase. *Gene* 124: 251–255.
- Imai, T., K. Kurosaka and T. Terachi (2003) Study on the family of novel Ser/Thr protein kinases from radish (*R. sativus*) and *A. thaliana*. *Proc 7th Int. Congress Plant Mol. Biol.*: 246.
- Lawton, M.A., R.T. Yamamoto, S.K. Hanks and C.J. Lamb (1989) Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3140–3144.
- Lin, X., X.H. Feng and J.C. Watson (1991) Differential accumulation of transcripts encoding protein kinase homologs in greening pea seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6951–6955.
- Millward, T., P. Cron and B.A. Hemmings (1995) Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine (threonine) protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5022–5026.
- Millward, T.A., D. Hess and B.A. Hemmings (1999) *Ndr* protein kinase is regulated by phosphorylation on two conserved sequence motifs. *J. Biol. Chem.* 274: 33847–33850.
- Mizoguchi, T., N. Hayashida, K. Yamaguchi-Shinozaki, H. Harada and K. Shinozaki (1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding a protein kinase homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 18: 809–812.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamaskovic, R., S.J. Bichsel and B.A. Hemmings (2003) NDR family of AGC kinases—essential regulators of the cell cycle and morphogenesis. *FEBS Lett.* 546: 73–80.
- Wang, D., J.F. Harper and M. Gribskov (2003) Systematic trans-genomic comparison of protein kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol.* 132: 2152–2165.
- Yarden, O., M. Plamann, D.J. Ebbale and C. Yanofsky (1992) *cot-1*, a gene required for hyphal elongation in *Neurospora crassa*, encodes a protein kinase. *EMBO J.* 11: 2159–2166.

**Somatic Hybrids between *Arabidopsis thaliana* and Cabbage (*Brassica oleracea* L.)
with all Chromosomes Derived from *A. thaliana* and Low Levels of Fertile Seed.**

**Hiroshi Yamagishi* , Shinya Nakagawa, Daisuke Kinoshita, Atsushi Ishibashi and
Yoko Yamashita**

*Department of Biotechnology, Kyoto Sangyo University, Kamigamo, Kyoto 603-8555,
Japan*

*Corresponding author (E-mail: hiyamagi@cc.kyoto-su.ac.jp)

Abstract

We obtained somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana*, 'Columbia', and a cabbage variety, 'Chusei Succession' (*Brassica oleracea* L.), in addition to our previous success using the cabbage variety 'Fujiwase'. All the hybrids of the two combinations possessed the chloroplast genome of cabbage, while the mitochondrial genome was recombined. PCR primers specific to each of the five chromosomes of *A. thaliana* were designed and used to analyze the hybrids. It was found that the hybrids had all five chromosomes of *A. thaliana*. The somatic hybrids between 'Columbia' and 'Chusei Succession' flowered and showed extremely low pollen fertility, producing no seeds by spontaneous self-fertilization. Whereas, seeds were obtained by crosses between the somatic hybrids and three cultivars of *B. oleracea*. The seeds could be useful materials for the transfer of genes of *A. thaliana* to cabbage and for establishment of cabbage lines with novel mitochondrial genomes.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Brassica oleracea* (cabbage), chromosomes, seed fertility, somatic hybrids

Introduction

Arabidopsis thaliana has been utilized worldwide as the model plant in plant genetics and molecular biology. Especially after the accomplishment of the genome sequencing projects (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), the genome information of *A. thaliana* accelerated comparative genomics for genetic mapping and the identification of various useful genes in related species (Lan et al., 2000; Sillito et al. 2000). Whereas, attempts to use the genes clarified in the *A. thaliana* genome for breeding of crop plants are restricted in spite of the fact that *A. thaliana* is a member of family Brassicaceae to which a lot of useful crops belong. One main reason is that *A. thaliana* can not be cross-hybridized with any crops. The only method to obtain the hybrids between *A. thaliana* and crop plants is cell fusion.

Gleba and Hoffmann (1980) had the first success in producing Arabidobrassica, somatic hybrids between *A. thaliana* and *B. campestris*, but the hybrids neither established as plants nor produced progenies. Though a few groups reported asymmetric somatic hybrids thereafter (Bauer-Weston et al. 1993; O' Neill and Mathias, 1995; Siemens and Sacristán, 1995), most of them failed to obtain offsprings from them. The single exception was the hybrids between UV-irradiated *A. thaliana* and non-treated *B. napus* produced by Forsberg et al. (1998 a, b). Because the hybrids produced seeds by back-crosses with *B. napus*, the progenies were selected for resistance to *Leptoshaeria maculans* to use for the breeding of *B. napus* (Bohman et al. 2002). One reason for the scarcity of research work on cell fusion using *A. thaliana* is that the protoplast culture and regeneration of plants were much more difficult in *A. thaliana* than in other plants. Another reason is that *A. thaliana* belongs to a different tribe (*Sisymbrieae*) from *Brassicaceae*, which contains many kinds of crops cultivated around the world, even though they are in the same family.

However, an efficient protoplast culture system for *A. thaliana* was established (Yamagishi

et al. 2002), by which more than a 50% shoot regeneration rate was achieved. Using this system, we produced successfully somatic hybrids with *B. napus* (Yamagishi et al. 2002), *R. sativus* (Yamagishi and Glimelius, 2003), and *B. oleracea* (Yamagishi and Nakagawa, 2004). Among them, the hybrids with *R. sativus* and *B. oleracea* were the first reports of these combinations. Furthermore, though UV treatment was used with *B. napus* to obtain asymmetric hybrids in the cell fusion with *B. napus* (Yamagishi et al. 2002) for the purpose of overcoming the phylogenetic remoteness, somatic hybrids were produced without such a treatment in the two latter combinations (Yamagishi and Glimelius, 2003; Yamagishi and Nakagawa, 2004).

In the previous paper we reported somatic hybrids between ‘Columbia’ (*A. thaliana*) and cabbage variety ‘Fujiwase’ (*B. oleracea*) (Yamagishi and Nakagawa, 2004). Though the hybrids are growing in a glasshouse, they have not flowered yet, and progenies have not been obtained. Thus, in order to increase the hybrid materials, somatic hybrids using another cultivar of cabbage ‘Chusei Succession’ were produced. The hybrids are expected to be useful as breeding materials for cabbage by introducing genes from *A. thaliana*. DNA markers for each of the five chromosomes of *A. thaliana* were designed and the presence of them in the hybrids was investigated by PCR. Furthermore, because the hybrids of ‘Columbia’ and ‘Chusei Succession’ flowered, the flower morphology and pollen fertility were observed. The hybrids were crossed with *B. oleracea* as pollen parents, and the seed fertility was examined.

Materials and Methods

Plant materials for cell fusion and the regeneration of somatic hybrids.

The ecotype ‘Columbia’ of *A. thaliana* and the cabbage variety ‘Chusei Succession’ (Nihon Nosan, Japan) were used for cell fusion. Both the parental species were cultured aseptically

and protoplasts were isolated from hypocotyls and leaves of 2-week-old seedlings of *A. thaliana*, whereas the true leaves were used for protoplast isolation in the cabbage. The enzymes, isolation procedure, and cell fusion treatment were as described in the previous paper (Yamagishi and Nakagawa, 2004). The fused protoplasts were cultured under the same media and culture conditions as mentioned in Yamagishi and Nakagawa (2004).

Investigations of the genome structure of the somatic hybrids.

Because various kinds of PCR primers to detect the chloroplast and mitochondrial genomes were designed and utilized previously (Yamagishi and Glimelius 2003, Yamagishi and Nakagawa, 2004), we applied them also to the somatic hybrids obtained here. For the chloroplast genome, two intergenic regions of *trnF* and *ndhJ*, and *trnH* and *psbA* were studied. While, PCR patterns were investigated in *atp1* and *coxI* regions for the mitochondrial genome. On the other hand, for the nucleus genome, only polymorphisms in the *Tpi* gene were examined previously by PCR (Yamagishi and Nakagawa 2004), and it was not clarified whether the hybrids had all five chromosomes of *A. thaliana*. Thus, DNA markers specific to each of the five *A. thaliana* chromosomes were designed. The chromosomes, gene names deposited in the databases (EMBL etc.), and the sequences of the primers for the PCRs are shown in Table 1. Using these primers, the PCR patterns of the hybrids were compared with those of the parents.

*Cross hybridization of the somatic hybrids with *B. oleracea**

The somatic hybrids of ‘Columbia’ and ‘Fujiwase’ continued vegetative growth and did not flowered. On the other hand, somatic hybrids of ‘Columbia’ and ‘Chusei Succession’ were propagated by meristem culture, and the hybrid plants grew to flowering stage. Thus, the flower morphology and pollen fertility of the latter hybrids were observed. The pollen

fertility was determined by counting the pollen stained with acetocarmine using a microscope. For the each plant, more than 500 pollens were observed. Thereafter, the hybrid plants were crossed with three cultivars of *B. oleracea*, 'Fujiwase' (Cabbage; *B. oleracea* var. *capitata*), 'Kairan' (*B. oleracea* var. *alboglabra*), and 'Purple Bird' (Kohlrabi; *B. oleracea* var. *gongylodes*). In the crosses, *B. oleracea* plants were used as the pollen parents. The number of seeds were counted after maturation.

Results

Regeneration of somatic hybrids between 'Columbia' and 'Chusei Succession'

After the fusion treatment of the protoplasts isolated from 'Columbia' and 'Chusei Succession', the protoplasts were cultured in modified 8P medium and the colonies were transferred to the medium for callus development. After proliferation on the medium, 127 calli were transplanted onto the regeneration medium. Thirty-three calli differentiated to form shoots, but most were judged to be the shoots of *A. thaliana* from observation of their morphology because the shoots showed bolting soon after regeneration, which is the typical feature of *A. thaliana* different from that of the cabbage. While nine shoots had the morphological traits of the somatic hybrid, only the two of them developed roots and were established as somatic hybrid plants (Table 2). The number of hybrid plants was the same as our previous report in which 'Fujiwase' was used as the fusion parent (Yamagishi and Nakagawa 2004), but the efficiency of shoot regeneration and hybrid plant establishment was improved.

Presence of the five chromosomes of A. thaliana in the somatic hybrids.

As mentioned previously, we had developed PCR markers for various sites in the chloroplast and mitochondrial genomes (Yamagishi and Nakagawa, 2004), and these markers

were tested in the somatic hybrids. The somatic hybrids showed the identical characteristics to those of the hybrids between 'Columbia' and 'Fujiwase'. Namely, the two somatic hybrid plants of 'Columbia' and 'Chusei Succession' possessed only the chloroplast genome derived from the cabbage parent, while they had hybrid traits in the mitochondrial genome. The PCR patterns of the hybrids and their parents are shown in Table 3 and Fig. 1.

By PCRs with the primers designed for genes specific to each of the five chromosomes of *A. thaliana*, DNA fragments with the expected molecular sizes were clearly amplified from 'Columbia'. Whereas, DNA fragment pattern of the cabbage parents either had different fragment sizes or produced no amplification (Table 3). In the former case, the DNA marker was expected to work as a codominant marker, whereas in the latter it may function as the dominant marker (Table 3). All the somatic hybrids of the two combinations using 'Fujiwase' and 'Chusei Succession' produced DNA fragments identical to 'Columbia' (Table 3). The results indicated that the somatic hybrids contain the whole genome of *A. thaliana*. Interestingly, a difference in the DNA amplification between the two cabbage parents was observed in the two DNA markers. For example, in PCR for the gene MZN1.16 in chromosome five, 'Fujiwase' produced a DNA fragment of a different size to 'Columbia'. However, 'Chusei Succession' failed to amplify any fragment. The differences between the parental varieties were exactly reflected in the PCR patterns of the hybrids (Table 3, Fig. 1).

Flower morphology and pollen and seed fertility of the somatic hybrids between 'Columbia' and 'Chusei Succession'.

Since the somatic hybrids between 'Columbia' and 'Chusei Succession' flowered in the greenhouse, their flower morphology and pollen fertility were observed. The flower size was quite different between the parental species (Table 4), and the two hybrid plants had petal sizes that resembled cabbage more closely than *A. thaliana*. On the other hand, the hybrid

possessed white petals like *A. thaliana* (Fig. 2). Though the flower morphology was intermediate between the two parents, pollen fertility was drastically lower than the two parental species (Table 4). Whereas both the parental species showed the pollen fertility levels higher than 90%, those of the somatic hybrids were below 10%. This fact meant that the hybrids were practically male sterile.

The somatic hybrids were crossed with three varieties of *B. oleracea* (Table 5). Except for the combination of 'A+S-1' and 'Kairan', at least one seed was obtained by the pollinations. The seed fertility expressed by the proportion of the seed number to the number of flowers pollinated ranged from 0% to 1.67%. As a whole, cabbage parent 'Fujiwase' provided slightly higher seed fertility than 'Kairan' or 'Kohlrabi' (Table5).

Discussion

Following the first success in somatic hybridization between *A. thaliana* and cabbage (Yamagishi and Nakagawa, 2004), this second report used another variety of cabbage. Cabbage is one of the most important vegetables in the world, having the oldest history of cultivation (Chiang et al., 1993). Because of this, breeding work on cabbage has been conducted on a range of traits and by various breeding methods. Not only intra-specific crosses but interspecific and intergeneric hybridizations have been applied for the genetic improvement of this vegetable. Recently, somatic cell fusion, especially to obtain intergeneric hybrids, was attempted with *Moricandia arvensis* and *Raphanus sativus* (Kameya et al., 1989; Motegi et al., 2003; Toriyama et al., 1987). This report is another example of intergeneric and intertribal somatic hybridization. The somatic hybrids are useful materials for genetic improvement of cabbage and other kinds of vegetables belonging to *B. oleracea*. In another aspect, the somatic hybrids are also useful for genetic and molecular studies on the effects of nuclear and organellar genes on various traits of cabbage, because *A. thaliana* is a

model plant for genetics and molecular biology and whose genome has been completely sequenced (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

By assessment of the somatic hybrids with DNA markers specific to each chromosomes of *A. thaliana*, it was found that all the four hybrid plants of the two combinations contain all five *A. thaliana* chromosomes. Because of the phylogenetic remoteness of *A. thaliana* and *Brassica* species, the previous experiments sought to obtain asymmetric hybrids rather than symmetric ones (O' Neill and Mathias, 1995; Siemens and Sacristán, 1995). As a result, there have not been any investigations in which all the chromosomes of *A. thaliana* were observed in somatic hybrids except the report by us with the combination of *A. thaliana* and *R. sativus* (Yamagishi and Glimelius, 2003). This is another example of somatic hybrids with all the chromosomes of *A. thaliana*. We did not examine the presence of the chromosomes of *B. oleracea* and we do not know whether the hybrids are symmetric or not. However, the hybrids possessed DNA bands of the same size as those of cabbage, when the cabbage parents had a unique fragment. Thus, it was suggested that the somatic hybrids also contain cabbage chromosomes in which the counterpart genes of *A. thaliana* are present. Furthermore, progenies of the hybrids will possess the whole chromosome set of cabbage after recurrent back-crosses with cabbage. By this method, we will obtain progenies that have part of the genome of *A. thaliana* in addition to the complete genome of cabbage. We have obtained the first back-crossing generation, which is the basic material to establish such chromosome addition lines by the back-crosses undertaken hereafter.

While seeds were obtained from the crosses of the somatic hybrids with cabbage etc., the hybrids generally showed low seed fertility with *B. oleracea*. The poor seed fertility could be derived either from low female fertility of the hybrids or from the remote crosses between the hybrids and *B. oleracea*, or both. Observation of the changes in seed fertility and the genome structure along with the continuous back-crosses with cabbage will help to clarify the

genetic mechanisms affecting the seed fertility.

The most interesting trait of the hybrids from the view point of plant breeding is the male sterility. The frequencies of pollen stained with acetocarmine were around 5%, but the hybrids did not produce any seeds at all by spontaneous self-fertilization (Data not shown). Thus, the hybrid plants were estimated to be practically male sterile, even though the pollen function for fertilization was not examined strictly. Furthermore, the genetic causes of the low pollen-fertility are uncertain at present similarly to the low seed fertility. However, it could be noteworthy that all the somatic hybrids with the two combinations were recombinants or hybrids for the mitochondrial genome (Table 3, Fig. 1). It is well known that mitochondrial genes, especially chimeric one, cause male sterility in various plants (Hanson and Bentolila, 2004). Therefore, recombination in the mitochondrial genomes between *A. thaliana* and cabbages may have induced the male-sterility. Because the cytoplasmic male-sterility used in *Brassica* is restricted to that of Ogura so far, the new mitochondrial genome produced by cell fusion could provide us with a new male-sterile cytoplasm for F₁ hybrid breeding, which is highly effective in *Brassica* and *Raphanus*. On the other hand, the hybrids obtained by us contain solely the chloroplast genome of cabbage. This means that after the accomplishment of the back-crosses with cabbage, we could establish cabbage plants with a recombined mitochondrial genome together with the nuclear and chloroplast genomes of cabbage. If male-sterility is kept in such plants, they could be important materials for F₁ hybrid breeding of cabbage and other *B. oleracea* vegetables.

In conclusion, we obtained the new somatic hybrids between *A. thaliana* and cabbage ('Chusei Succession'). Since the hybrids flowered, they were pollinated with three cultivars of *B. oleracea* and produced the seeds though the hybrids were practically male sterile. The progenies of the hybrids by the back-crosses with cabbage could be useful materials for breeding of cabbage, especially for the cytoplasmic male-sterility.

Literature Cited

- Bauer-Weston, B., W. Keller, J. Webb and S. Gleddie. 1993. Production and characterization of asymmetric somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 150-158.
- Bohman, S., M. Wang and C. Dixelius. 2002. *Arabidopsis thaliana*-derived resistance against *Leptosphaeria maculans* in a *Brassica napus* genomic background. *Theor. Appl. Genet.* 105: 498-504.
- Chiang, M. S., C. Chong, B. S. Landry and R. Crête. 1993. Cabbage. PP 113-155. In: G. Kalloo and B. O. Bergh (eds.), *Genetic improvement of vegetable crops*. Pergamon Press. Oxford.
- Forsbeg, J., C. Dixelius, U. Lagercrantz and K. Glimelius. 1998a. UV-dose dependent DNA elimination in asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 137: 65-76.
- Forsbeg, J., U. Lagercrantz and K. Glimelius. 1998b. Comparison of UV-light, X-ray and restriction enzyme treatment as tools in production of asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1178-1185.
- Gleba, Y. Y. and F. Hoffmann. 1980. "Arabidobrassica". a novel plant obtained by protoplast fusion. *Planta* 149: 112-117.
- Hanson, M. R. and S. Bentolila. 2004. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16: s154-s169.
- Kameya, T., H. Hanzaki, S. Toki and T. Abe. 1989. Transfer of radish (*Raphanus sativus* L.) chloroplast into cabbage (*Brassica oleracea* L.) by protoplast fusion. *Jap. J. Genet.* 64: 27-34.
- Lan, T-H., T. A. Delmonte, K. P. Reischmann, S. Kowalski, J. McFerson, S. Kresovich and A.

- H. Paterson. 2000. EST-enriched comparative map of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* 10: 776-788.
- Motegi, T., I. S. Nou, J. Zhou, A. Kanno, T. Kameya and Y. Hirata. 2003. Obtaining an ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish (fertile). *Euphytica.* 129: 319-323.
- O'Neill, C. M. and R. J. Mathias. 1995. Somatic fusion for the transfer of agronomically important traits into *Arabidopsis thaliana* from *Brassica* spp. Proc. 9th Int. Rapeseed Cong: 1100-1112.
- Siemens, J. and M. D. Sacristán. 1995. Production and characterization of somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Sci.* 111: 95-106.
- Sillito, D., I. A. Parkin, R. Mayerhofer, D. J. Lydiate and A. G. Good. 2000. *Arabidopsis thaliana*: a source of candidate disease-resistance gene for *Brassica napus*. *Genome.* 43: 452-460.
- The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Toriyama, K., K. Hinata and T. Kameya. 1987. Production of somatic hybrid plants, 'Brassicomoricaandia', through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *B. oleracea*. *Plant Sci.* 48: 123-128.
- Yamagishi, H., M. Landgren, J. Forsberg and K. Glimelius. 2002. Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor. Appl. Genet.* 104: 959-964.
- Yamagishi, H and K. Glimelius. 2003. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*). *Plant Cell Rep.* 22: 52-58.
- Yamagishi, H. and S. Nakagawa. 2004. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73: 319-323.

Figure legends

Fig. 1 PCR patterns of somatic hybrids of *A. thaliana* and cabbage for the chloroplast, mitochondrial, and nuclear genomes. (A): Inter-genic region of *trnF* and *ndhJ* of chloroplast. (B): *Atp1* gene of mitochondria. (C), (D): Nuclear genes present in chromosome I (C; F17F8.14) and chromosome V (D; MZN1.16)

A; *A. thaliana* ('Columbia'), F; Cabbage ('Fujiwase')

S; Cabbage ('Chusei Succession'), A+F; Somatic hybrids of 'Columbia' and 'Fujiwase',

A+S; Somatic hybrids of 'Columbia' and 'Chusei Succession'

M; Molecular weight marker (ϕ X174/*Hae III*digest)

Fig. 2 Flower morphology of somatic hybrid (Center) between *A. thaliana* (Left) and 'Chusei Succession' (Right).

Table 1. PCR primers and their sequences used to detect the five chromosomes of *A. thaliana*.

Chromosome	Gene name	Primer	Sequence (5'→3')
I	F10A5.13	F ₁	GGAGGAGAAATCCAAGTCAAG
		R ₂	CTGTGTTCTGCAAGCTTGT
I	F17F8.14	F ₂	GCTCAGCAACCATATCATGC
		R ₁	CAAGCCTACTCTCTGAGATCC
II	F16P2	F ₁	TGGATTCTCTCGTTGAATCCG
		R ₂	GTCGAGCAATGCATTTTCCCT
II	T20F21	F ₁	GGAACAAAGCAGAGTTCAACG
		R ₂	CCATTGAGTTATATGCCCCG
III	F15B8.130	F ₂	ACATACAACACCTGATGGACGT
		R ₁	CTGTTCCATTAGATCGTCGAG
III	MXC7.10	F ₁	CCAACACTGTCACGAAGAAG
		R ₂	AAGCTCATAACTGACACCTC
IV	F18A5.110	F ₁	TGAAAGGGCTTCCTGGTATG
		R ₂	GTACCATCATCTGTCTGGAAC
IV	T12G13	F ₁	GGATATGCAGGCATGTACATC
		R ₂	GCTATGAGAAGACGGCAATG
V	MZN1.16	F ₁	AAGCGATGGCTGCTTATAAGG
		R ₂	TCACTTACACTATCGCTGACTC
V	MQD19.17	F ₁	GATAGCTCTGAGACTCACTTAG
		R ₂	TGGTAAAACCCACACCATGA

Table 2. Development of calli, shoots, and hybrid plants by culture after cell fusion treatment.

Developmental stages of culture	Number	%
Calli transplanted to the regeneration medium	127	100
Calli with regenerated shoots	33	26.0
Hybrid shoots regenerated	9	7.1
Hybrid plants established	2	1.6

Table 3. PCR patterns of somatic hybrids between *A. thaliana* and cabbage for DNA markers in the nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes^z.

Genome	Site ^y	Parents ^x			A+F ^x		A+S ^x	
		A	F	S	1	2	1	2
Chloroplast	<i>trnF/ndhJ</i>	S	L	L	L	L	L	L
	<i>trnH/psbA</i>	L	S	S	S	S	S	S
Mitochondria	<i>atp1</i>	S	L	L	S+L	S+L	S+L	S+L
	<i>coxI</i> (5')	—	+	+	+	+	+	+
	<i>coxI</i> (3')	+	—	—	+	+	+	+
Nucleus	I F10A5.13	+	—	—	+	+	+	+
	I F17F8.14	+	—	—	+	+	+	+
	II F16P2	L	S	S	L+S	L+S	L+S	L+S
	II T20F21	+	—	—	+	+	+	+
	III F15B8.130	L	S	S	L+S	L+S	L+S	L+S
	III MXC7.10	+	—	—	+	+	+	+
	IV F18A5.110	S	L	L	S+L	S+L	S+L	S+L
	IV T12G13	S	—	L	S	S	S+L	S+L
	V MZN1.16	L	S	—	L+S	L+S	L	L
	V MQD19.17	+	—	—	+	+	+	+

z. The PCR pattern was classified into + (presence) or — (absence) of the DNA fragment, and L (large) or S (small) DNA size.

y. The numbers for the nuclear genes (I~V) indicate the chromosomes where the genes are present.

x. A, F, S, A+F, A+S: See Figure 1.

Table 4. Flower size and pollen fertility of the somatic hybrids between *A. thaliana* ('Columbia') and cabbage ('Chusei-Succession').

Hybrids and parental species	Petal length (mm)	Petal width (mm)	Pollen fertility (%)
A+S-1	8.6	5.4	4.0
A+S-2	8.8	5.9	6.5
<i>A. thaliana</i> ('Columbia')	1.2	0.8	93.1
<i>B. oleracea</i> ('Fujiwase')	10.8	8.4	94.8

Table 5. Seed fertility of crosses between the somatic hybrids and *B. oleracea*.

Hybrids as female parents	Pollen parents	No. of flowers pollinated (A)	No. of seeds (B)	B/A (%)
A+S-1	Fujiwase	119	1	0.84
A+S-2	Fujiwase	60	1	1.67
A+S-1	Kairan	148	0	0
A+S-2	Kairan	313	3	0.96
A+S-1	Kohlrabi	1671	9	0.54
A+S-2	Kohlrabi	469	3	0.64

Fig. 1

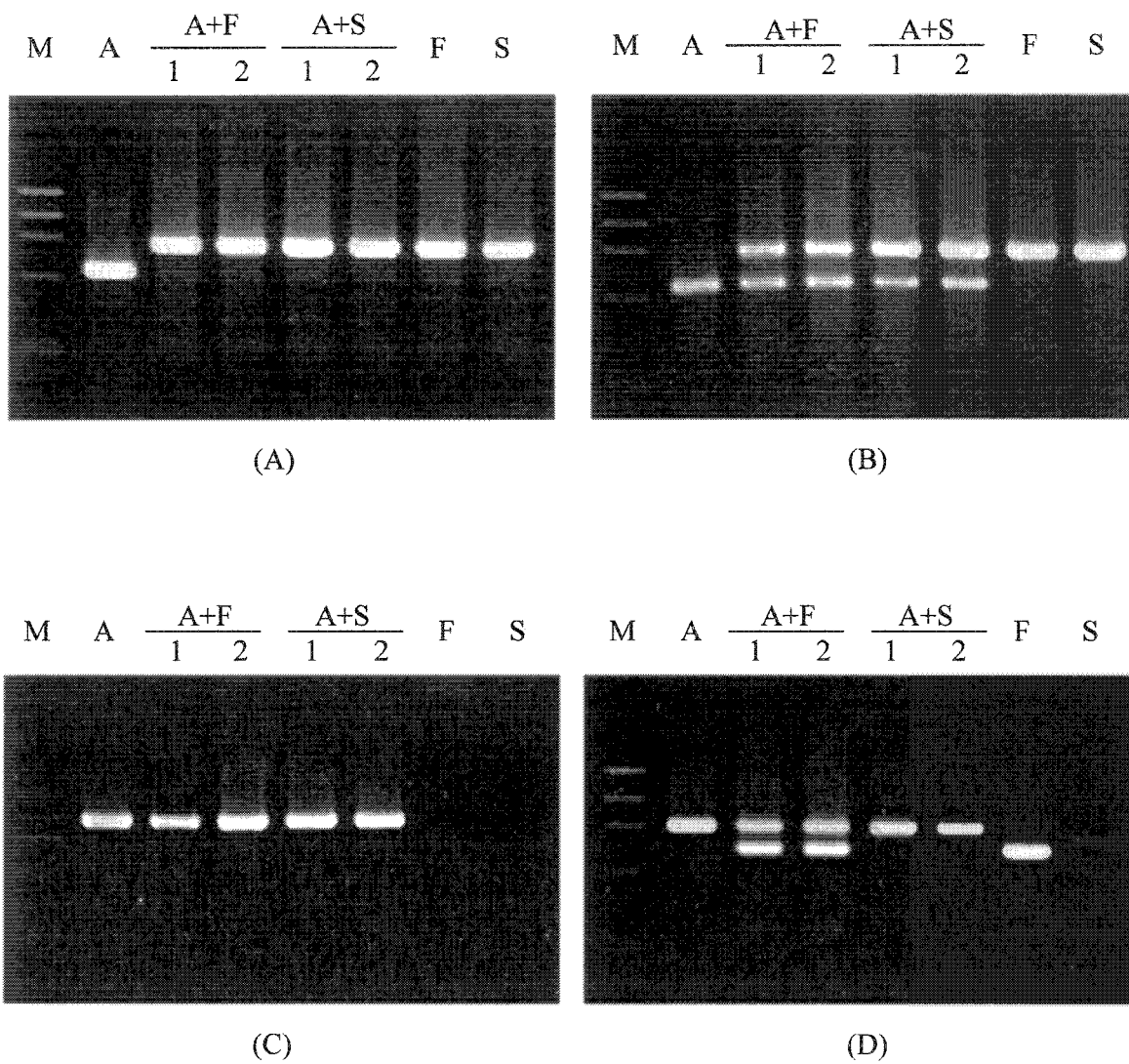
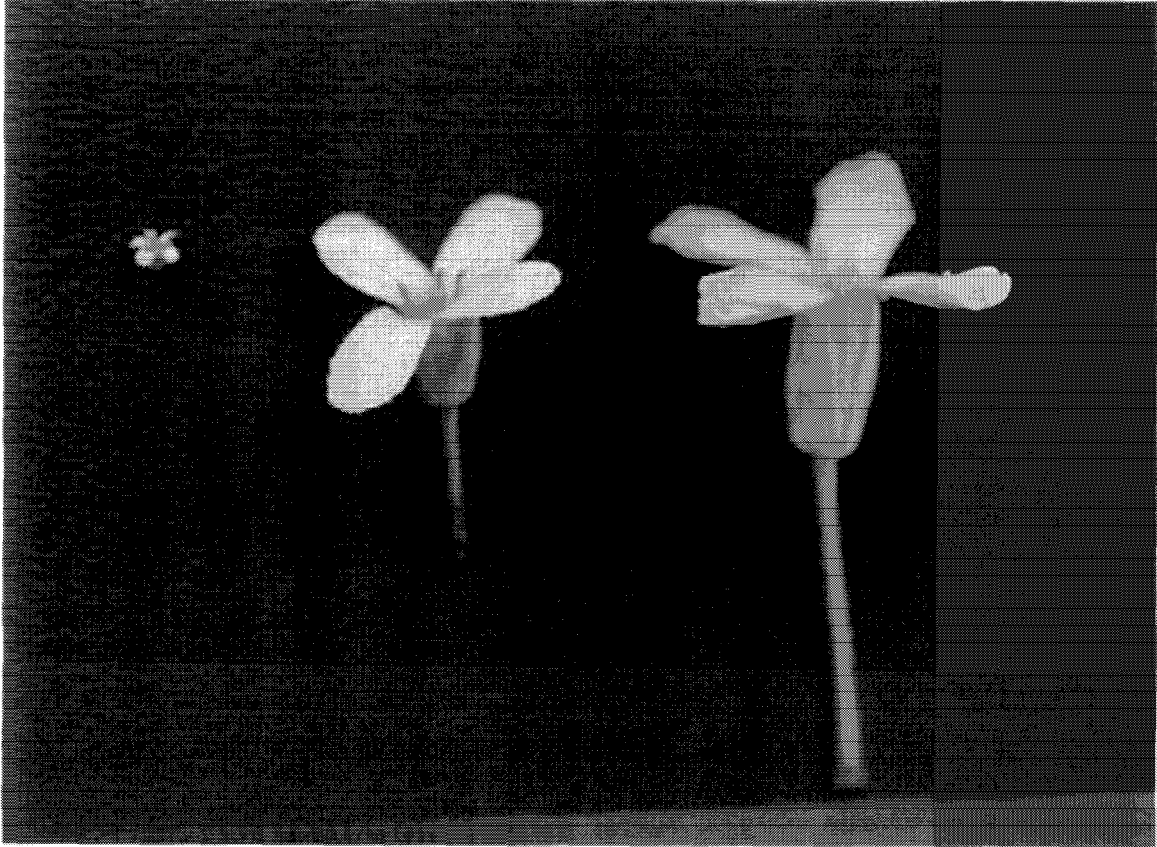


Fig. 2



和文摘要

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種におけるシロイヌナズナ全染色体の
保有および体細胞雑種の種子稔性

山岸 博・中川信也・木下大輔・石橋篤志・山下陽子

京都産業大学工学部

シロイヌナズナとキャベツの品種‘中生サクセション’との間で2個体の体細胞雑種を作出した。これらと、以前に‘富士早生’を用いて作出した体細胞雑種についてオルガネラゲノムの構成を調べたところ、すべての体細胞雑種がキャベツ由来の葉緑体ゲノムと雑種化したミトコンドリアゲノムを持っていた。一方、核ゲノムについては、シロイヌナズナの5つの染色体に特異的なDNAマーカーを用いてPCRを行った。その結果、体細胞雑種はシロイヌナズナのすべての染色体を保有していた。‘中生サクセション’を用いた体細胞雑種の花粉稔性は極めて低かったが、キャベツ、カイラン、コールラビーとの交雑によって種子が得られた。これらの交雑種子は、今後キャベツ類への戻し交雑により、雄性不稔性等の特性を具備するキャベツ類を育成するための育種素材としての利用が期待される。

特集記事

栽培, 野生ダイコンにおける系統分化とオグラ型雄性不稔細胞質の起源

山岸 博

京都産業大学工学部, 京都市, 〒603-8555

Phylogeny of wild and cultivated *Raphanus* and the origin of Ogura male-sterile cytoplasm

Hiroshi Yamagishi

Fac. of Engineering, Kyoto Sangyo Univ., Kyoto 603-8555, Japan

キーワード

Raphanus, 系統分化, オグラ型細胞質, ダイコン, ハマダイコン, ミトコンドリアゲノム

はじめに

約 4000 年前のエジプトのピラミッドの壁に刻まれていることに示されるように, ダイコンの栽培の歴史は極めて古い (Crisp 1995). この世界的な栽培の歴史を反映して, 各地に多様なタイプのダイコンの品種が成立した. その中には, 若いサヤを食用とするサヤトリダイコンや種子から油をとるアブラダイコンなどが含まれる. また根を食用とする品種においても, 根の形や色ならびに農業生態的特性に関して非常に高い多様性が生まれた. 日本においてもダイコンは古い歴史とともに, 野菜の中で最大の生産量を維持してきた (熊澤 1956). その用途は根の生食, 煮食にとどまらず, 漬物や切り干など保存食としての利用や, 芽生えの「かいわれ」ダイコンとしての利用など, 日本人の食生活に密着して多彩に発達してきた. この過程で全国各地に地域特有の在来品種が生み出される一方で, 全国的な周年供給を可能とする作型とそれに対応した品種が開発されてきた.

栽培ダイコンの起源に関しては, 単一の野生種に由来するとする説と 2 種の野生種間の交雑に由来するとする説があり (Yamane *et al.* 2005), 現在まで不明のままである. また *Raphanus* 属には 6 種の野生種があるとされるが, それらは相互に交雑が可能であり, 研究者によってはそれらを一種に包含する場合もある (北村 1958). さらに栽培ダイコンの起源地からは伝播の東端に位置する日本における, ダイコンの多様な品種分化の遺伝的背景については, 今日まで十分な解明がなされていない.

一方我国のダイコンで雄性不稔性細胞質が発見され (Ogura 1968), 発見者にちなんでオグラ型細胞質と呼ばれている. 発見当時, オグラ型細胞質の有用性は日本ではさほど注目されなかった. しかしこの細胞質はヨー

ロッパに導入され, ダイコンの F₁ 育種に利用されるとともに (Bonnet 1977), オグラ型細胞質とそれに対する稔性回復遺伝子が属間交雑によって *Brassica* 属作物に導入された (Heyn 1976). このオグラ型細胞質を用いた *Brassica* 属作物の F₁ 育種体系の確立にはいくつかの困難が伴ったが, それらが細胞融合の利用などによって 1 つ 1 つ克服され (Pelletier *et al.* 1983), この雄性不稔性の実用的な利用体系が確立されるに至った (この過程については本誌における酒井・今村 (2003) の総説で解説されている.). これら実用化に向けた研究の中で, オグラ型雄性不稔性の原因遺伝子であるミトコンドリアの *orf138* が同定される (Bonhomme *et al.* 1991) 一方で, この細胞質に対する稔性回復遺伝子も単離される (Brown *et al.* 2003, Koizuka *et al.* 2003) という, 顕著な分子遺伝学的成果が得られた. ここに至ってようやく最近, 我国のダイコンや *Brassica* 属野菜の F₁ 育種にオグラ型細胞質を利用する動きが本格化してきている. しかしながら, 小倉氏によって発見されたこの細胞質が, いかなる植物に起源し, どのようなダイコンに分布するかについては不問に付されてきた.

このように, 古い時代におけるダイコンの栽培化, 世界各地特に我国における栽培品種の多様な分化, ならびにオグラ型雄性不稔の出現を誘起したダイコンにおける細胞質の分化の過程は, いずれも依然十分に解明されていない. これらの問題を遺伝・育種学的見地から解明することは, ダイコンと人類の間の相互進化の関係を明らかにするという意義を持つ. それはまたダイコンのみならず, 作物の育種における遺伝的多様性の利用に関する指針を与えるものと期待される. このような視点から本稿においては, まずオグラ型細胞質の起源と分布について述べ, さらにハマダイコンの起源, 栽培ダイコンの起源と日本のダイコンの成立等, 栽培, 野生ダイコンの進化について現在までに得られた知見を紹介する.

オグラ型細胞質の起源と分布

細胞質雄性不稔性は非常に多くの種類の植物で発見され、F₁ 育種に利用されているが、実際の雄性不稔性に至る原因遺伝子は植物種によって異なる (Mackenzie 2005)。オグラ型雄性不稔の原因遺伝子として同定されたミトコンドリアの *orf138* も、他の生物では相同性のある遺伝子がまったく発見されておらず (Bonhomme *et al.* 1992)、またこの遺伝子の発現機構もいまだ解明されていない。こうした中で、この遺伝子のアブラナ科植物における分布を明らかにし、その起源を推定するために、*orf138* の有無を幅広く検索した。検索の結果、この遺伝子は栽培ダイコンにおいてはごく一部の例外を除いて存在しないのに対して、我国をはじめとする東アジアに自生する野生ダイコン (我国では‘ハマダイコン’と総称されている) に、40% 以上の高い割合で広く分布することが明らかになった (Yamagishi and Terachi 1994a, 1996)。さらに *Raphanus* 属の野生種である *R. raphanistrum* および *R. maritimus* にも存在する一方で、*Raphanus* 属以外のアブラナ科野生種には、この遺伝子は観察されなかった (Yamagishi and Terachi 1997, 2003)。このことは、オグラ型細胞質は *Raphanus* 属植物が成立した後、野生種における細胞質の分化によって生まれたものであることを示している。

しかしながら、*orf138* を持つ野生ダイコンにおいては、雄性不稔個体は現実にはめったに観察されない。そこで、*orf138* 遺伝子の分布を検索した結果にもとづき、実際にハマダイコンや *R. raphanistrum* を細胞質親として交雑を行い、雄性不稔個体の出現の有無を調査した。その結果、2 種類の野生ダイコンのいずれを用いても栽培ダイコンとの間に雑種が形成され、その後代に雄性不稔個体が出現した (Yamagishi *et al.* 1993, Yamagishi and Terachi 1994b, 1997)。このため小倉氏によるオグラ型雄性不稔細胞質の発見の経緯については、鹿児島県に自生するハマダイコンと栽培ダイコンの間で生殖的な接触が起こって両者の雑種が生じ、その後代に雄性不稔個体が出現して発見されたものと推定された。

この *orf138* 遺伝子について、これを持つ栽培、野生ダイコン 143 個体の塩基配列をすべて決定した (Yamagishi and Terachi 2001)。その結果 *orf138* 内に 6 か所の塩基置換と 1 か所の挿入/欠失 (39 bp) が存在し、それらによって、栽培、野生ダイコンの *orf138* は 9 タイプに分類された (図 1)。このうち *R. raphanistrum* には 2 タイプ、ハマダイコンには 8 タイプまた栽培ダイコンには 5 タイプが存在した。ハマダイコンにおいて最も高頻度に認められ、かつ他のタイプとの塩基配列変異の関係から *orf138* の祖先型と考えられるタイプ (図 1 の B タイプ) は、*R. raphanistrum* にも多く観察された。こうした事実から、*orf138* は *Raphanus* 属野生種に起源し、それがハマダイコンに伝播して、ハマダイコンにおいて遺伝子内の変異を蓄積したものと考えられる。稔性回復遺伝子の存在下で

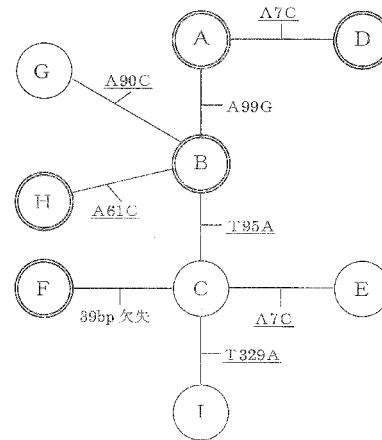


図 1. オグラ型雄性不稔遺伝子 *orf138* における塩基配列変異の相互関係 (Yamagishi and Terachi 2001 を改訂) 円内のアルファベットは *orf138* のタイプを表す。タイプ間の塩基置換のうち、非同義置換には下線を施した。また二重の円で示したタイプは雄性不稔を発現することが今までに確認されている。

は *orf138* における突然変異は自然選択上中立であるが、同遺伝子内の変異がハマダイコンで特異的に蓄積した進化上のメカニズムは興味深い。

ハマダイコンに存在する 8 タイプのうちいくつかは、我国の栽培ダイコンのごく一部の品種に共通してみられる。このうち池谷 (1986) によって東北地方の在来品種‘小瀬菜’で発見された雄性不稔細胞質で、その原因遺伝子が *orf125* と名付けられたタイプ (Iwabuchi *et al.* 1999) は、山形県、青森県等のハマダイコンの集団にも存在した (図 1 の D タイプ)。これと後述する‘小瀬菜’における細胞質の著しい品種内多型は、この品種の起源を推定する重要な手がかりとなる。一方、台湾の栽培ダイコンに集中して分布し、実際に F₁ 育種に利用されているタイプ (図 1 の H タイプ) は、野生ダイコンには見出されていない。このタイプの分布を台湾をはじめとする中国南部の野生ダイコンにおいて検索することは興味ある課題である。

今までの観察から、発見された 9 タイプの *orf138* のうち、5 タイプは実際に雄性不稔を引き起こすことが明らかになっている (図 1)。残りの 4 タイプにおける雄性不稔性の発現とそれに対する非同義置換の影響については現在解析を進めている。しかしそれ以上に、他の生物に全く見出されていない *orf138* 遺伝子がどのような進化上の要因によって *Raphanus* 属植物のミトコンドリアに生じたのか、またどのようなメカニズムによってダイコンをはじめとするアブラナ科植物に雄性不稔を誘起するのかなど、この細胞質をめぐる根本的な問題が今後解明されなくてはならない。

実際の雄性不稔の発現の有無は、上記ミトコンドリアの *orf138* 遺伝子と核内の稔性回復遺伝子 (以下 Rf と略

記する)の相互作用で決まる。そこで各種ダイコンにおけるRfの有無を大規模な交配実験によって調査した(Yamagishi 1998)。その結果*R. raphanistrum*とハマダイコンにはRfが広く分布するのに対して、大部分が正常型の細胞質である栽培ダイコンにおいては、Rfを持つ品種と持たない品種が約半数ずつ存在した。このうちRfを持つものはヨーロッパのハツカダイコンと中国のダイコンに多く見られ、日本の栽培品種でRfを持つものは少数に限られていた。Koizuka *et al.* (2003)によって単離されたRf (*orf687*)はこのうち中国ダイコンが持つものであり、それがPPRモチーフを持つタンパク質の遺伝子であることが明らかになっている。PPRモチーフタンパク質はオルガネラのmRNAのプロセッシングや翻訳制御に関与する機能を持つ(Small and Peeters 2000)。現在PPRタンパク質に関する研究は急速に進展しており、その構造や具体的な働きも明らかになりつつある(Lurin *et al.* 2004)。著者らは*R. raphanistrum*、ハマダイコン、ハツカダイコンに存在するRfについても、*orf687*との塩基配列の比較や遺伝子の周辺の構造の比較を進めている。この解析が進めば、*Raphanus*属植物においてミトコンドリアゲノムに*orf138*が誕生したこととどのように対応して、核に*orf687*を始めとするRfが生まれたか、またそれがどうしてハツカダイコンなど正常型細胞質の栽培種に伝達されたか、さらには*orf138*内の塩基配列変異とRfの変異との間に何らかの対応関係があるのかなど、核ゲノムとミトコンドリアゲノムの相互関係における進化の様相が明らかになることが期待される(Hanson and Bentolila 2004)。そのためにはBudar (1998)が指摘するように分子遺伝学と集団遺伝学との協働が必要であろう。ところでオグラ型雄性不稔に対するRfは現在までのところ*Raphanus*属以外では発見されていないが、今村ら(2006)は*B. rapa*の核内にこれとは別の、インゲンにおける稔性回復(He *et al.* 1995)と類似したメカニズムで稔性を回復する遺伝子が存在することを発見した。この回復遺伝子をさらに詳細に解析することは、アブラナ科植物のミトコンドリアにおける*orf138*の消長を知る上で有効かもしれない。

ハマダイコンの起源

我国およびアジア大陸東部の海岸域には、*R. raphanistrum*とも栽培ダイコンとも形態的に異なる野生ダイコンが分布している。我国ではこの野生ダイコンは‘ハマダイコン’と総称されているが、このハマダイコンの起源については2つの考え方があった。1つはMakino (1909)に代表される「栽培ダイコンが逸出し野生化した植物である。」とする説であり、もう1つは青葉(1989)の「大陸から古い時代に渡来した野生ダイコンの後代」とする説である。上記のオグラ型細胞質とそれに対する稔性回復遺伝子(Rf)の分布は、ハマダイコンの起源についての考察に指針を与える。すなわちハマダイコンにおいては

オグラ型雄性不稔細胞質とRfが広く分布するのに対して、我国の栽培ダイコンの大部分はオグラ型細胞質もRfも持たない。またヨーロッパ、中国の栽培ダイコンに視野を広げても、核内にRfを有する品種はあるものの、オグラ型細胞質は台湾に集中してみられる以外は、ほとんどすべての品種が持っていない。このことから我国の栽培ダイコンに限らず、栽培ダイコンが逸出して野生化したものがハマダイコンであるとする考えは成立しない。逆に一部の系統にオグラ型細胞質を持つものがあり、かつ広く稔性回復遺伝子が分布する野生種*R. raphanistrum*の子孫がハマダイコンであると考えるのが合理的である。

このハマダイコンの起源を別の視点から推定するために、オグラ型、正常型を問わずミトコンドリアに存在し、オグラ型では雄性不稔の原因遺伝子*orf138*と共転写される*orfB*遺伝子について塩基配列を調査した。その結果、この遺伝子内にオグラ型と正常型への塩基配列の分化に加えて、正常型内に2つのタイプの塩基配列が存在することが判明した(Terachi *et al.* 2001)。そこで、この3つのタイプの*orfB*の品種、集団内分布を栽培ダイコンおよびハマダイコンで解析したところ、栽培品種の多くは1つのタイプで固定しているのに対して、ハマダイコンの集団内には2つないしは3つのタイプが観察され、特に大半の集団が3つのタイプすべてを含んでいた(Yamagishi 2004)。このような細胞質における品種・集団内多型の大きさの顕著な差は、ハマダイコンが栽培ダイコンの逸出、野生化によって生じたものではないことを示すもう1つの証拠である。

なお我国の栽培ダイコンには、この領域に関して2つのタイプを含む品種が散見され、さらに東北地方の在来品種‘小瀬菜’は3つのタイプすべてを含む著しい品種内多型を示した。この‘小瀬菜’の細胞質の品種内多型性は、ミトコンドリアの*atp6*の3'領域における構造についても観察されている(図2; Yamagishi and Sasaki 2004)。既述のように‘小瀬菜’には*orf138*の欠失型である*orf125*を持つ個体が高頻度で存在するが、この型はハマダイコンにも見出される。これらの事実は‘小瀬菜’がハマダイコンを祖先として成立した栽培品種であることを示している(山岸 2003)。一方、京都府舞鶴市の在来品種で‘佐波賀’という品種がある。この品種の細胞質について現在まで調べた範囲では、全個体が*orf138*を持つことが明らかになった。しかしこれらの個体はいずれも正常な花粉を形成していた。すなわち‘佐波賀’は、ハマダイコンが示す雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子を共に持つという特性をそのまま受けついでおり、ハマダイコンが栽培化されたもう1つの例として挙げられる。我国各地の在来品種を丹念に調査して行けば、‘小瀬菜’などの例のように、我国においてハマダイコンが栽培化された品種がさらに発見される可能性がある。ハマダイコンは我国の栽培ダイコンに対する遺伝的変異の供給源の1つである。

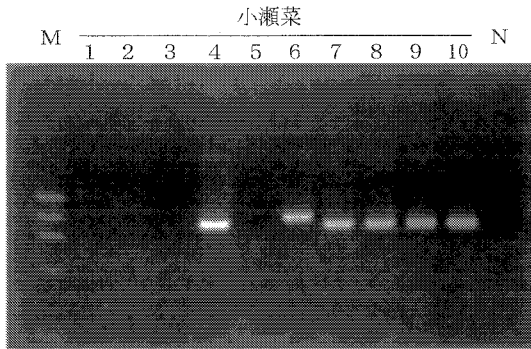


図2. ミトコンドリア *atp6* の3'領域に観察される「小瀬菜」細胞質の品種内多型
「正常型」細胞質に特異的なプライマーによるPCRによって、DNA増幅断片の有無の変異とともに、増幅DNAのサイズについても品種内変異が認められる。M：分子量マーカー（ ϕ x174-Hae III digest），N：ネガティブコントロール

栽培ダイコンの多元性と日本のダイコンの成立

栽培、野生ダイコンにおける「正常型」細胞質の分化がミトコンドリアの *orfB* 遺伝子領域で明らかになったが、これと同様の「正常型」における分化は、サザン解析により *R. raphanistrum* の種内変異として以前に観察されていた (Yamagishi and Terachi 1997)。このため、栽培、野生ダイコンにおけるミトコンドリアゲノムの構造変異をより広範囲に解析し明らかにするために、正常型細胞質において *orfB* から約3kbpのところに隣接する *cox I* 遺伝子と、両細胞質に共通する *orfB* を含めたミトコンドリアゲノムの構造の解析を行った (Yamagishi and Terachi 2003)。解析の結果、*R. raphanistrum* の種内に5タイプの細胞質が存在すること、およびそのうち4タイプは *R. maritimus* にも共通して存在することが明らかになった。これら2つの野生種はともに種内に細胞質の変異を保有し、種間での細胞質の分化は起こっていないと考えられた。一方、栽培種を同様に観察すると、ヨーロッパのハツカダイコンおよび中国のダイコンが互いに異なるタイプに集中して見出されるのに対して、日本のダイコンには、中国北部などのダイコンと同一のタイプと日本のダイコンに独特のタイプの2つの主要なタイプが見出された。このように地域によって栽培ダイコンの細胞質のタイプが異なる特徴を持つことは、栽培ダイコンが多元的に成立したことを示している。すなわち分化した細胞質を持つ野生ダイコンが、世界のいくつかの地域で独立に栽培化されたことを示している。このことは、ヨーロッパと東アジアの間で、栽培ダイコンの形態的特性や農業生態的特性が大きく異なることの、最も根本的な原因であると考えられる。このような野生種における細胞質の豊富な分化とそこからの栽培種の多元的な成立

は、葉緑体の塩基配列変異の解析によっても裏づけられている (山岸ら 2005)。

日本の栽培ダイコンは2つのタイプに大別されるが、そのうち一方は中国北部および朝鮮半島の栽培ダイコンと同一のタイプであるのに対して、もう1つの主要なタイプは中国大陸には多く見出されていない。今日の日本のダイコン栽培における主要品種群は「みの早生」、「宮重」、「練馬」の3大群であるとされるが (芦澤 1982)、これら3大群のうち「宮重」、「練馬」は後者のタイプに含まれ、さらに「聖護院」、「二年子・時無」群等これらに次ぐ主要品種もこのタイプである。これに対して中国北部などのダイコンと共通するもう一方のタイプには、主要品種群のうち「みの早生」が含まれるが、それ以外は、すべて地方の在来品種で占められている。このことから我国の主要栽培ダイコンの成立について、以下のような二重構造を想定することができる。つまり中国北部から伝播した品種群は、現在、各地の在来品種として残存しているのに対して、これとは別の細胞質を持つダイコンが日本に伝えられ、それらが近年の主要品種として全国的に栽培されるようになったと考えられる。

このような我国の栽培植物の二重構造はオオムギヤカブでも認められていることである (渋谷・岡村 1955, 青葉 1961, 高橋 1965, 安田 1978)。しかし、これらの作物が「東北日本」対「西南日本」という画然とした分布域の差を示すのに対して、ダイコンの場合は「全国的主要品種」対「地方在来品種」という分かれ方を示す点が独特である。その一方で栽培品種の中には、2つの主要タイプのいずれかに固定したものの他に、品種内にこれら2つのタイプの個体を含むものが散見されている。これらは主要タイプ間の意識的な交雑によって、我国独特の新しいダイコン品種が育成された結果ではないかと考えられる。

以上の、ダイコン属野生種および栽培種のミトコンドリアゲノムの解析による系統分化の研究結果をもとに、栽培ダイコンの進化と伝播について概観する。ユーラシア大陸で多元的に成立した栽培ダイコンは、世界各地で特有の品種を生み出した。日本へは主に2つの細胞質のタイプが伝来し、我国の栽培ダイコンの二重構造を基本的に形成するとともに、両タイプ間の交雑により新しい品種が作り出された。その一方で、同じくユーラシア大陸で分布を拡大した野生種が東アジア地域に適応することによって、ハマダイコンが成立し、その一部が我国で栽培化されて今日の在来品種の一部となった。我国の栽培ダイコンが示す多様性は、こうしたダイコンと日本人の間の複雑な相互関係の結果として進化してきたものと考えられる。アブラナ科作物の育種において全世界で最も広く利用されているオグラ型雄性不稔性は、この相互関係の一幕でハマダイコンと日本の栽培ダイコンの生殖的な接触が起こることによって生まれたものである。このような栽培ダイコンと野生ダイコンの接触は、現在で

も日本の各地で起こっている可能性がある。しかし、それによって生じる遺伝的変異を栽培品種に取り入れたり、ハマダイコンを育種素材として活用することによって、栽培ダイコンの多様性をさらに高めようとする意識と能力が、現在と将来の我々に備わっているかどうかは注意深く考える必要がある。

謝辞

本研究の素地は西 貞夫博士をはじめとする野菜試験場育種部（当時）の先輩、同僚の方々との議論の中で形成された。京都産業大学においては米澤勝衛、寺地徹、野村哲郎教授のサポートと御協力により本研究を遂行することができた。また実際の実験にあたっては、実験補助員の方々の御助力および大学院生、学生の明るさに日々励まされた。なお本研究においては、国内外の研究機関および個人が収集・保存されている栽培、野生ダイコンの品種、系統を快く分譲していただき実験に供した。これらの方々への御協力に心より御礼申し上げる。

引用文献

- 青葉 高 (1961) 本邦蔬菜在来品種の分類と地理的分布に関する研究。(第3報) 中部地方北西部のカブ在来品種の類縁関係と地理的分布。園芸学会雑誌 30: 318-324.
- 青葉 高 (1989) わが国の野生ダイコンの変異と系譜。農耕の技術 12: 94-114.
- 芦澤正和 (1982) ダイコン, “野菜園芸ハンドブック” 西貞夫監修, 養賢堂, 東京, 739-763.
- Bonhomme, S., F. Budar, M. Ferault and G. Pelletier (1991) A 2.5 kb *Nco*I fragment of Ogura radish mitochondrial DNA is correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. *Curr. Genet.* 19: 121-127.
- Bonhomme, S., F. Budar, D. Lancelin, I. Small, M.-C. Defrance and G. Pelletier (1992) Sequence and transcript analysis of the *Nco*2.5 Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica* cybrids. *Mol. Gen. Genet.* 235: 340-348.
- Bonnet, A. (1977) Breeding in France of a radish F_1 hybrid obtained by use of cytoplasmic male sterility. *Eucarpia Cruciferae Newslett.* 2: 5.
- Brown, G.G., N. Formanova, H. Jin, R. Wargachuk, C. Dendy, P. Patil, M. Laforest, J. Zhang, W.Y. Cheung and B.S. Landry (2003) The radish *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.* 35: 262-272.
- Budar, F. (1998) What can we learn about the interactions between the nuclear and mitochondrial genomes by studying cytoplasmic male sterilities? In “Plant mitochondria: From gene to function” Møller, I.M., P. Gardestrom, K. Glimelius and E. Glaser (eds.), Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, 49-55.
- Crisp, D. (1995) Radish. In “Evolution of crop plants”, Smartt, J. and N.W. Simmonds (eds.), Longman Scientific & Technical, Harlow, UK, 86-88.
- Hanson, M.R. and S. Bentolila (2004) Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 16: S154-S169.
- He, S., A. Lyznik and S. Mackenzie (1995) Pollen fertility restoration by nuclear gene *F_r* in CMS bean: nuclear-directed alteration of a mitochondrial population. *Genetics* 139: 955-962.
- Heyn, F.W. (1976) Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. *Eucarpia Cruciferae Newslett.* 1: 15-16.
- 池谷保緒 (1986) 小瀬菜ダイコンの一系統に見られた細胞質雄性不稔個体の多量発現。育種 36 (別2): 106-107.
- 今村 順・川合麻紀子・大島雅夫・酒井隆子 (2006) cms 原因遺伝子 *orf125* のコピー数減少を伴うコセナ CMS ナタネの雄性回復。育種学研究 8 (別1): 115.
- Iwabuchi, M., N. Koizuka, H. Fujimoto, T. Sakai and J. Imamura (1999) Identification and expression of the Kosena radish (*Raphanus sativus* cv. Kosena) homologue of the Ogura radish CMS-associated gene *orf138*. *Plant. Mol. Biol.* 39: 183-188.
- 北村四郎 (1958) ダイコンの品種とその変遷, “日本のダイコン” 西山市三 (編) 日本学術振興会, 東京, 1-19.
- Koizuka, N., R. Imai, H. Fujimoto, T. Hayakawa, Y. Kimura, J. Kohno-Murase, T. Sakai, S. Kawasaki and J. Imamura (2003) Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, *orf687*, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J.* 34: 407-415.
- 熊澤三郎 (1956) “総合蔬菜園芸名論” 養賢堂, 東京.
- Lurin, C., C. Anders, S. Aubourg, M. Bollaoui, F. Bitton, C. Bruyere, M. Caboche, C. Debast, J. Gualberto, B. Hoffmann, A. Lecharny, M.L. Ret, M.L. Martin-Magniere, H. Mircau, N. Peeters, J.P. Renou, B. Szurek, L. Taconnat and I. Small (2004) Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16: 2089-2103.
- Mackenzie, S.A. (2005) The influence of mitochondrial genetics on crop breeding strategies. In “Plant Breeding Reviews, Vol. 25” Janic J. (ed.), John Wiley & Sons, Inc. New York, 115-138.
- Makino, T. (1909) Observation on the flora of Japan. *Bot. Mag.* 23: 59-75.
- Ogura, H. (1968) Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special references to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mcm. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* 6: 39-78.
- Pelletier, G., C. Primard, F. Vedci, P. Chetrit, R. Remy, P. Rousselle and M. Renard (1983) Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 191: 244-250.
- 酒井隆子・今村 順 (2003) ナタネ (*Brassica napus* L.) F_1 育種: F_1 種子採種体系の現状と問題点。育種学研究 5: 93-102.
- 渋谷 茂・岡村和政 (1955) *Brassica* 属種子の形態的特性に就いて。園芸学会雑誌 24: 195-198.
- Small, I.D. and N. Peeters (2000) The PPR motif—a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25: 46-47.
- 高橋隆平 (1965) 大麦品種の遺伝的分化と地理的分布。育種学最近の進歩 6: 18-32.
- Terachi, T., K. Yamaguchi and H. Yamagishi (2001) Sequence analysis on the mitochondrial *orfB* locus in normal and Ogura male-sterile cytoplasm from wild and cultivated radishes. *Curr. Genet.* 40: 276-281.
- Yamagishi, H. (1998) Distribution and allelism of restorer genes for

- Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes. *Genes Genet. Syst.* 73: 79–83.
- 山岸 博 (2003) ミトコンドリアの遺伝子が示す '小瀬菜' ダイコンの起源. *農業および園芸* 78: 1056–1059.
- Yamagishi, H. (2004) Assessment of cytoplasmic polymorphisms by PCR-RFLP of the mitochondrial *orfB* region in wild and cultivated radishes (*Raphanus*). *Plant Breeding* 123: 141–144.
- 山岸 博・飯田崇申・石橋篤志・尾崎昭子 (2005) シークエンスに基づく葉緑体ゲノムの PCR-RFLP による栽培ダイコンの起源の推定. *育種学研究* 7 (別 1・2): 308.
- Yamagishi, H. and J. Sasaki (2004) Differentiation of the cytoplasm of Japanese cultivated radishes (*Raphanus sativus*) into four types in the 3' region of mitochondrial *atp6*. *Breed. Sci.* 54: 189–195.
- Yamagishi, H., T. Terachi, Y. Fujita and H. Fukuya (1993) Induction of male sterility in hybrids between Japanese wild and cultivated radishes (*Raphanus sativus* L.) *Jpn. J. Breed.* 43: 635–639.
- Yamagishi, H. and T. Terachi (1994a) Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. I. The origin and distribution of Ogura male-sterile cytoplasm in Japanese wild radishes (*Raphanus sativus* L.) revealed by PCR-aided assay of their mitochondrial DNAs. *Theor. Appl. Genet.* 87: 996–1000.
- Yamagishi, H. and T. Terachi (1994b) Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. II. The origin of Ogura male sterile cytoplasm inferred from the segregation pattern of male sterility in the F_1 progeny of wild and cultivated radishes (*Raphanus sativus* L.) *Euphytica* 80: 201–206.
- Yamagishi, H. and T. Terachi (1996) Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. III. Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93: 325–332.
- Yamagishi, H. and T. Terachi (1997) Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. IV. Ogura-type cytoplasm found in the wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Plant Breeding* 116: 323–329.
- Yamagishi, H. and T. Terachi (2001) Intra- and inter-specific variations in the mitochondrial gene *orf138* of Ogura-type male-sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum*. *Theor. Appl. Genet.* 103: 725–732.
- Yamagishi, H. and T. Terachi (2003) Multiple origins of cultivated radishes as evidenced by a comparison of the structural variations in mitochondrial DNA of *Raphanus*. *Genome* 46: 89–94.
- Yamane, K., N. Lü and O. Ohnishi (2005) Chloroplast DNA variations of cultivated radish and its wild relatives. *Plant Sci.* 168: 627–634.
- 安田昭三 (1978) 栽培オオムギの分化. *育種学最近の進歩* 19: 32–43.

Origin of weedy rice grown in Bhutan and the force of genetic diversity

R. Ishikawa¹, N. Toki¹, K. Imai¹, Y.I. Sato², H. Yamagishi³, Y. Shimamoto^{4,8},
K. Ueno⁵, H. Morishima⁶ and T. Sato^{7,*}

¹Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, Hirosaki 036-8561, Japan; ²Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Shizuoka 422-8529, Japan; ³Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555, Japan; ⁴Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan; ⁵Faculty of Bio-industry, Tokyo University of Agriculture, Abashiri, 099-2493, Japan; ⁶Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture, Atsugi, 243-0034 Japan; ⁷Graduate School of Life Science, Tohoku University, Sendai 980-8577, Japan; ⁸Current address: Faculty of Bio-industry, Tokyo University of Agriculture, Abashiri, 099-2493, Japan; * Author for correspondence (e-mail: tadashi@ige.tohoku.ac.jp; fax: +81-22-217-5689)

Received 2 December 2002; accepted in revised form 9 August 2003

Key words: Adaptability, Non-coding cpDNA, Nuclear genotype, *Oryza sativa* L., Plastid genotype, Rice

Abstract

In Bhutan, weedy rice (*Oryza sativa* L.) was grown together with cultivated rice on terraced paddy fields lower than 2620 m above sea level. Seeds of cultivars and weedy strains were collected at 22 collection sites located from 1000 to 2620 m above sea level. Cultivars with round seeds were frequently found in fields higher than 2250 m, and those with slender seeds in fields lower than 1630 m. All cultivars and weedy strains were divided into *indica* or *japonica* types by isozyme (multi-locus) and morpho-physiological (multi-character) analyses. *Japonica* cultivars predominated in highland; *Indica* cultivars predominated in lowland. Plastid type was confirmed by the length polymorphism for the ORF100 region. The *japonica* cultivars carried non-deletion type ORF100. The *indica* cultivars carried deletion type ORF100. In contrast, weedy strains showed discrepancy in the combination of the nuclear and cytoplasm types. An intermediate type was found in weedy strains for isozyme genotypes. A recombinant type, which has *indica* genotypes for isozyme analysis with *japonica* cytoplasm, and vice versa, was frequently found in weedy strains. These findings suggested that weedy strains would be generated by natural hybridization between *indica* and *japonica*. Further, they might fail to recombine their prior genotypes sets for isozyme and cytoplasm. Morpho-physiological characters did not show such a tendency. Morpho-physiological analysis of highland plants, in particular, showed *indica* cultivars and weedy strains with *japonica* cytoplasm. Hypervariable nuclear microsatellite analysis was then used to compare cultivars and weedy strains. Identical alleles were shared between *indica* and *japonica*, and also between cultivars and weedy strains. This suggested that there was gene-flow resulting from natural hybridization.

Introduction

Asian cultivated forms mainly show two types, referred to as subspecies *indica* and *japonica* (Kato et al. 1928; Oka 1953). *Indica* strains are predominantly distributed in countries in South

to South-East Asia. In contrast, *japonica* strains are cultivated in insular regions, mountain areas, and northern countries (Sato et al. 1986; Sato 1991; Sano and Morishima 1992). *Oryza rufipogon*, is regarded as the ancestral origin of both types of the cultivated forms in Asia. The two types reveal

distinct characters in all traits except for cultivated traits. In general, they are cultivated in separate fields, though on the Himalayan foot hills and South-Asian mountain areas they are cultivated in closely located fields (Sano and Morishima 1992; Ishikawa et al. 2002a). In these areas, heterozygotes and intermediate types on isozyme analysis were frequently found. Weedy strains were detected in Bhutan in such fields. It is suggested that weedy forms have been generated by the following three processes, (1) parallel evolution independent of wild and cultivated forms, (2) hybrids between wild and cultivated forms in natural hybridization, and (3) abandoned or escaped cultivated forms (Baker 1974; de Wet and Harlan 1975). In a previous study of rice weedy forms, at least the latter two possibilities were confirmed by Suh et al. (1997). In contrast, there was no wild form in Bhutan.

In a recent study, certain Japanese cultivars revealed a rearrangement of the nuclear-cytoplasmic constitution. It was suggested that they originated from a particular ecotype in India. This suggests that natural hybridization is widespread, resulting in the generation of weedy forms and particular ecotypes. In this paper, we used molecular markers in addition to morpho-physiological markers to clarify the origin of weedy forms in Bhutan and the mechanism that generates bio-diversity in rice plants.

Materials and methods

Plant materials

In a field exploration of Bhutan done in 1989, the seeds of local rice cultivars were collected and the altitude at which they were collected was recorded (Figure 1). In the same paddy fields, the seeds of plants differing in plant height, hull color, hull size, and maturation from cultivars were also collected as weedy strains. In total, the ORF100 region and isozyme genotypes were examined with 31 cultivars and 68 weedy strains.

Morphological and physiological character combinations

Some strains carrying enough seeds were examined for other characters. In total, 31 cultivars and 68

weedy strains were examined. Apiculus hair length was measured by using a microscope. Ten apiculus hairs on three hulls were averaged. Length and width of 10 hulls were measured for each cultivar. Each length was averaged and the ratio of hull length to width was calculated as L/W ratio. Hulls were soaked in 1.5% phenol solution for 3 h and dried. Cultivars whose hulls turned black were scored as positive for phenol reaction (Ph^+). Cultivars of the alternative type that showed unchanged color of hulls were scored as negative for phenol reaction (Ph^-). A Ph gene on chromosome 4 regulates this character. Ten seedlings at the third leaf stage were soaked in 1.5% $KClO_3$ to measure their resistance. Resistance was exhibited as percent rate of surviving plants.

Isozymes

Genotypes were examined for the nine loci *Acp1*, *Amp2*, *Amp3*, *Cat1*, *Est2*, *Pgd*, *Pgi1*, *Pgi2*, and *Pox2*, in order to classify them into *indica* or *japonica*. Seeds were germinated at 30 °C in the dark. Crude extracts of 3-day-old seedlings were used for isozyme analysis described by Sano and Morishima (1992). Based on the discriminate scores, plants were classified into *indica* or *japonica* types. Plants with D scores from 0.0 to 0.4 were *indica* type, and those from 0.6 to 1.0 were *japonica* type.

PCR and DNA sequencing

Total genomic DNA was isolated by the CTAB method from leaf tissues (100 mg). A deletion in ORF100 region of 31 cultivars and 68 weedy type strains was checked by PCR reactions. Genotypes of plastid DNA were characterized by PCR amplification using a primer set, #3 (AGTCCACTCAGCCATCT) and #4 (CTCGGCCATCATTTTCTTCTTTAG) which amplifies the ORF100 region in rice plastid DNA (Kanno et al. 1993). The PCR cycle comprised pre-heat (3 min, 94 °C), 40 rounds amplification (10 s, 95 °C; 30 s, 55 °C; 1 min, 72 °C), and post-heat (5 min, 72 °C). Most *indica* cultivars possess a 69 bp deletion in this region, while most *japonica* cultivars do not. This region has been considered to be an effective marker for *indica-japonica* differentiation (Chen et al. 1993). After PCR amplification, the products were electrophoresed in 1.5% agarose

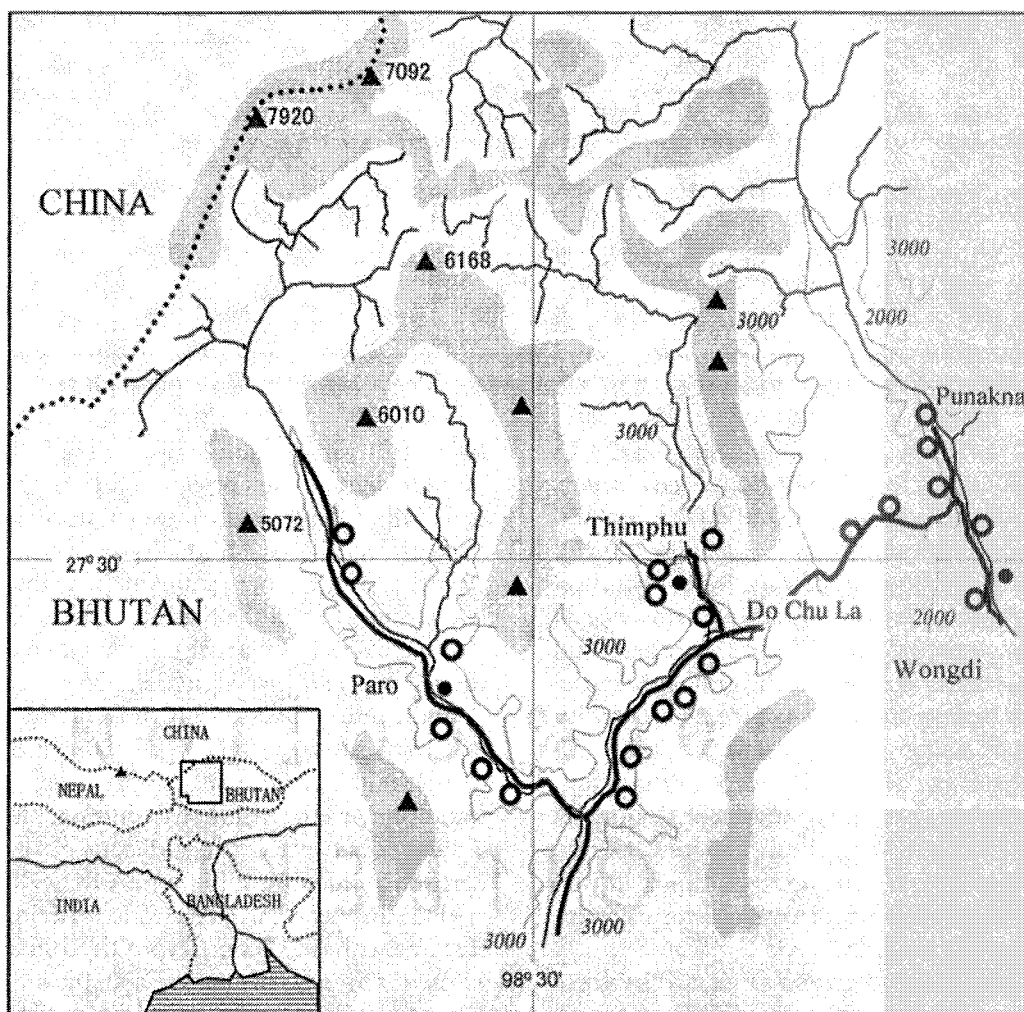


Figure 1. Collection sites of cultivated and weedy rice in Bhutan. O: Collection site, —: road, —: river, ●●●●: contour border.

gel. Takara *Taq* DNA polymerase (Takara Co., Tokyo, Japan) was used with the company's supplied reaction buffer, 0.2 mM dNTPs, and 5 mM $MgCl_2$. High Mg concentration inhibited amplification of additional bands for unknown reasons.

Rice microsatellite

At each location sampling was restricted to a maximum of 10 strains of cultivar-weedy type and plastid type. Hypervariable rice microsatellite marker, RM1, was used to examine the population structure. Forward primer; gcaaaacacaatgcaaaa and reverse primer; gcgttggttgacctgac, recommended by gramene (<http://www.gramene.org/microsat/>), was used to amplify the target site. PCR products were electrophoresed by 8% polyacrylamide gel

with $1\times$ TBE buffer at 120 V for 1 h. Other RM markers were used to confirm the population structure with silver-staining methods to distinguish minor differences. RM7 (chromosome 3), RM21 (chromosome 11), and RM314 (chromosome 6) were chosen for the purpose. Based on the basic protocol of the supplier (Promega Co.), sequencing gels were used with the silver-staining methods.

Results

Variation of morpho-physiological characters

Hull width and length showed an extremely large variation. Hull length of cultivars ranged from 7 to 10.2 mm (average \pm standard deviation;

Table 1. Nuclear–cytoplasmic combinations found in Bhutan.

Type	Altitude(m)	Isozyme-Jap ^a		Isozyme-M ^a		Isozyme-Ind ^a	
		ND ^b	D ^b	ND ^b	D ^b	ND ^b	D ^b
Cultivar	2200–2620	24	0	0	0	0	0
	1200–1630	3	0	0	0	0	4
Weedy	2200–2620	48	1	0	0	1	0
	1200–1630	3	0	2	2	5	6
Total		78	1	2	2	6	10

^aIsozyme-Jap, Isozyme-M, and Isozyme-Ind indicate that these strains are classified as *japonica*, intermediate, and *indica*, respectively.

8.24 ± 0.70, $n = 31$), and hull width from 2.4 to 3.8 mm (3.07 ± 0.32). Hull length of weedy strains ranged from 6.9 to 8.9 mm (SD, 7.81 ± 0.41, $n = 68$), hull width from 2.5 to 4.0 mm (SD, 3.09 ± 0.25). There was no significant difference in the variation between cultivars and weedy strains. This means that a mixture of plants carrying different hull shapes was observed at each collection site. Variation of hull width tends to be consistent with altitude. Cultivars showed $r = 0.6111^{**}$ ($df = 29$, $0.01 > p$) as a correlation between altitude and width. Narrow grains were found more frequently in lowland (1250–1630 m) than highland (2250–2620 m) areas. In contrast, weedy strains showed $r = 0.11$ ($df = 66$, $0.1 < p$). No significant correlation was found in weedy strains.

Cultivars and weedy strains showing a Ph^- were frequently found in lowland areas. $KClO_3$ -sensitive cultivars and weedy strains were also frequently found in lowland areas, but a few weedy strains from highlands showed sensitivity to the $KClO_3$ treatment. The apiculus hair length of cultivar type ranged from 0.18 to 0.71 mm and that of weedy strains ranged from 0.31 to 0.48 mm. The variation in apiculus hair length did not show any significant trend between lowland and highland strains.

Multi-locus analysis for isozymes and cytoplasmic genotypes

Multi-locus analyses for isozymes were diagnosed to distinguish *indica* and *japonica*. Length polymorphism of amplicon for ORF100 region were also used to distinguish *indica* and *japonica* plastid types. The combined data for 31 cultivars and 68 weedy strains were summarized in Table 1. The

indica cultivars predominated in the lowlands and the *japonica* cultivars predominated in the highland area. All of them revealed well-suited combination of these markers. Although the *japonica* weedy strains were also predominant in highland areas, two strains carried the opposite type of cytoplasm. One *japonica* cultivar discriminated by isozymes carried the *indica*-specific deletion type ORF100. Similarly, the *indica* cultivar carried the non-deletion (*japonica*) type ORF100. Such nuclear–cytoplasmic substituted strains were frequently found in lowland fields. In addition, the intermediate type between *indica* and *japonica* showed both deletion and non-deletion types of ORF100 region.

Half the *indica* weedy strains discriminated by isozymes carried *japonica* type ORF100. Five of the 11 *indica* weedy strains carried the non-deletion type ORF100 in lowland fields. One weedy strains in the highlands carried *japonica* type ORF100. PS-ID sequence was also determined using different materials, which can tell us the cytoplasmic origin. These sequences did not suggest that cytoplasm of weedy strains originated from that of wild strains (data not shown).

Comparison of multi-locus and multi-character analysis

Next we examined multi-character analysis by morpho-physiological traits in order to know the relation between various characters. The data were then combined with multi-locus analysis by isozymes and plastid types as shown in Tables 2 and 3.

Five cultivars discriminated as *japonica* by multi-locus analysis were discriminated as *indica* by the multi-character analysis (Table 2). Only one cultivation highland carrying *indica* cytoplasm was seen

Table 2. Frequency distributions of *D* and *Z* scores for cultivars.

Altitude(m)/ Z-score ^b	Isozyme-Jap ^a		Isozyme-M ^a		Isozyme-Ind ^a	
	J	I	J	I	J	I
2250–2620						
ND ^c	19	5	0	0	0	0
D ^c	0	0	0	0	0	0
1200–1630						
ND ^c	2	1	0	0	0	0
D ^c	0	0	0	0	0	4
Total	21	6	0	0	0	4

^aIsozyme-Jap, Isozyme-M, and Isozyme-Ind indicate that these strains are classified as *japonica*, intermediate, and *indica*, respectively.

^bJ and I indicate that these strains are classified as *japonica* and *indica*, respectively.

^cND and D mean non-deletion and deletion type ORF100, respectively.

Table 3. Frequency distributions of *D* and *Z* scores for weedy strains.

Altitude(m)/ Z-score ^b	Isozyme-Jap ^a		Isozyme-M ^a		Isozyme-Ind ^a	
	J	I	J	I	J	I
2250–2620						
ND ^c	40	9	0	0	0	0
D ^c	1	0	0	0	0	0
1200–1630						
ND ^c	2	2	0	1	1	4
D ^c	0	0	0	2	0	6
Total	43	11	0	3	1	10

^aIsozyme-Jap, Isozyme-M, and Isozyme-Ind indicate that these strains are classified as *japonica*, intermediate, and *indica*, respectively.

^bJ and I indicate that these strains are classified as *japonica* and *indica*, respectively.

^cND and D mean non-deletion and deletion type ORF100, respectively.

to belong to the same category by the multi-character analysis. Weedy strains also revealed such discrepancy (Table 3). Nine (18%) of the 49 weedy strains carrying *japonica* cytoplasm were discriminated as *indica* from highland. Two weedy strains carrying *japonica* cytoplasm were discriminated as *indica* type by the multi-character analysis. All intermediate strains were discriminated as *indica*, although they carried either non-deletion or deletion cytoplasm. One *indica* strain discriminated by the multi-locus analysis was discriminated as *japonica* by the multi-character analysis and carried

japonica cytoplasm. Overall much discrepancy was found in both cultivars and weedy strains.

Gene-flow

All cultivars and weedy strains from lowland and the five groups carrying various combinations of multi-loci and multi-characters were examined for their genotypes for RM1 locus (Figure 2). Sample size in each location, cultivar-weedy type, and plastid type, were restricted to a maximum of strains. Five allelic types were detected in both cultivars and weedy strains for RM1. The same allele predominated in both highland cultivars and weedy strains, as shown in Table 3. In contrast, higher genetic diversity was found in lowland cultivars. The same tendency was observed in each SSRs. Each predominated allele in RM1, RM7, RM21, and RM314 could be seen in all locations and types of rice plants (Tables 4–7). Some cultivars and weedy strains with deletion type cytoplasm also carried the same predominant allele in each SSR.

Discussion

Crops are often accompanied by weedy forms, which are genetically related (de Wet and Harlan 1975). There are several categories of weedy strains; (1) those from wild colonizing plants through selection toward adaptation to continuous habitat disturbance, along with the evolution of domestication, (2) those derived from hybrids between wild and cultivated races, (3) those from abandoned domestication through selection toward a less intimate association with man. Such weedy forms found around cultivated fields were thought to play some role in the genetic diversity of cultivated forms (Harlan 1965).

In rice, weedy forms are defined as plants resembling the cultivars but slightly different from the cultivars and with a high degree of seed shattering and other characters (Arashi 1974; Heu 1988; Oka 1988; Tang and Morishima 1988; Suh and Ha 1994). Such weedy rice has been found in rice fields, especially where different ecotypes or subspecies are cultivated nearby. Recently, such weedy rice plants are frequently found. Because they inhibit rice harvest. They are assumed to have spread to tropical and temperate areas through propagation

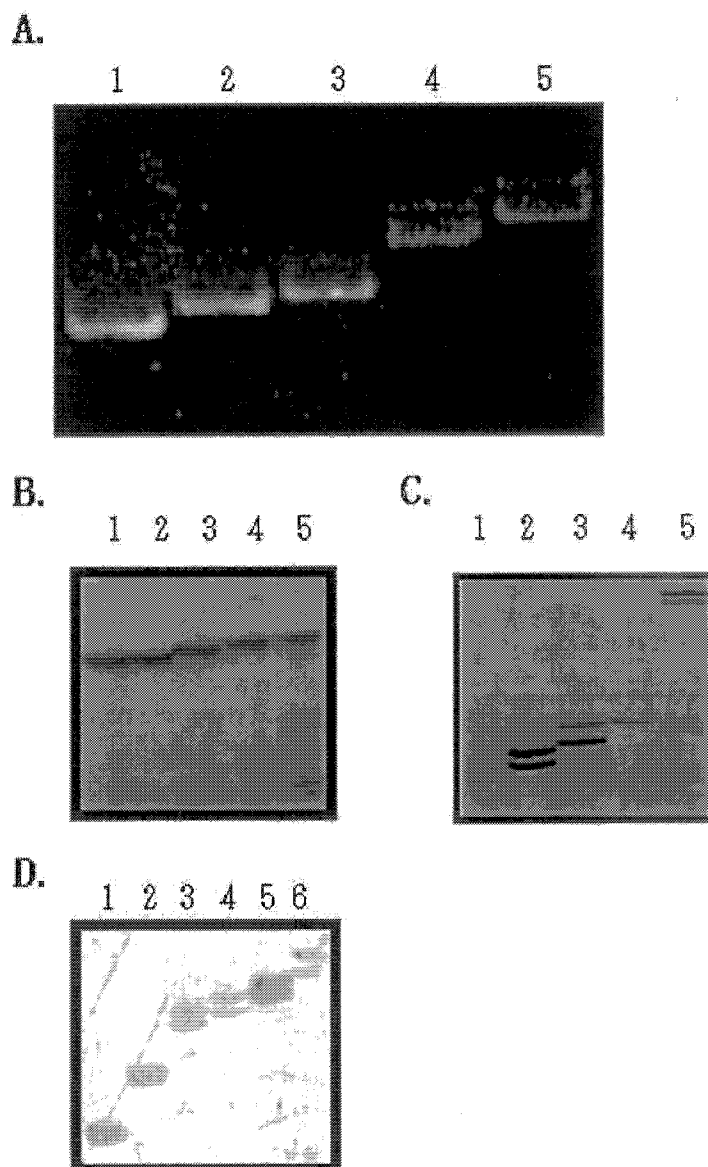


Figure 2. Allelic polymorphisms found in rice microsatellite markers. (A) RM1, (B) RM7, (C) RM21, (D) RM314. Lane definitions corresponding to allelic numbers.

by direct seeding and by mechanical means (Oka 1988; Diarra et al. 1994; Suh and Ha 1994; Catala-Fornier 1995).

Thus, what are the probable mechanisms that generate the weedy rice? One of the above three processes to generate weedy rice forms was confirmed when a particular isozyme allele was found specific to a wild relative in weedy rice (Suh et al. 1997). However, weedy strains were also found in USA where there has been no wild relative. In such a case, old cultivars were thought to have reverted

to a weedy form. Weedy strains that have appeared in Bhutan were totally different from landraces. Furthermore, there has been no wild relative. In this report, we proposed another process to generate a weedy form, which has resulted from hybridization between discrete types of cultivars.

In the previous paper (Ishikawa et al. 2002a), we reported heterozygotes in Laos where primitive cultivars were cocultivated in single fields. Also strains intermediate between *indica* and *japonica* could be seen. These data suggested that there

Table 4. Distribution of RM1 alleles in cultivars and weedy strains.

Location	Type	ORF100*	Total plants	RM1				
				1	2	3	4	5
Highland	Cultivar	ND	10	0	0	10	0	0
		D	0	0	0	0	0	0
	Weedy	ND	10	0	1	9	0	0
		D	0	0	0	0	0	0
Lowland	Cultivar	ND	3	0	1	1	0	1
		D	4	1	1	2	0	0
	Weedy	ND	9	0	1	3	3	3
		D	8	0	1	5	0	2

*ND and D mean non-deletion and deletion type ORF100, respectively.

Table 5. Distribution of RM7 alleles in cultivars and weedy strains.

Location	Type	ORF100*	Total plants	RM7							
				0	1	2	3	4	5	1/3	
Highland	Cultivar	ND	10	0	1	0	8	1	0	0	
		D	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Weedy	ND	10	1	1	1	8	0	0	1	
		D	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lowland	Cultivar	ND	3	0	2	0	1	0	0	0	
		D	4	0	2	0	0	0	2	0	
	Weedy	ND	10	0	5	0	3	0	2	0	
		D	8	0	5	1	0	1	1	0	

*ND and D mean non-deletion and deletion type ORF100, respectively.

were many cases of hybridization between these discrete types of cultivars. These hybridizations generated partial sterile plants and different combinations of various characters. Such progeny would become the source of weedy strains.

Further evidence was found in Japan. Nuclear and cytoplasm genotypes enabled us to find a particular cultivar form carrying a different set of nuclear and cytoplasm types (Ishikawa et al. 2002b). A particular lowland cultivar in Japan was classified as *japonica* type by multi-locus analysis for isozymes, but carried *indica* cytoplasm. In another case, *indica* cultivars in Japan were found to carry *japonica* cytoplasm (Ishikawa et al. 2002b). Based on the unique isozyme allele and the historical record, the origin of *indica* cultivars was concluded to be India. The cultivars were found to belong to the Aus ecotype in the Bengal district

Table 6. Distribution of RM21 alleles in cultivars and weedy strains.

Location	Type	ORF100*	Total plants	RM21						
				0	1	2	3	4	5	2/3
Highland	Cultivar	ND	10	0	1	8	1	0	0	0
		D	0	0	0	0	0	0	0	0
	Weedy	ND	10	0	0	8	2	0	0	0
		D	0	0	0	0	0	0	0	0
Lowland	Cultivar	ND	3	0	0	2	0	0	1	0
		D	4	0	0	0	4	0	0	0
	Weedy	ND	10	0	1	4	2	0	3	0
		D	8	1	0	1	3	1	1	1

*ND and D mean non-deletion and deletion type ORF100, respectively.

Table 7. Distribution of RM314 alleles in cultivars and weedy strains.

Location	Type	ORF100*	Total plants	RM314					
				1	2	3	4	5	6
Highland	Cultivar	ND	10	0	0	1	0	9	0
		D	0	0	0	0	0	0	0
	Weedy	ND	10	0	0	0	1	9	0
		D	0	0	0	0	0	0	0
Lowland	Cultivar	ND	3	0	0	1	0	2	0
		D	4	1	0	0	0	3	0
	Weedy	ND	10	0	1	1	0	7	1
		D	8	0	1	0	0	7	0

*ND and D mean non-deletion and deletion type ORF100, respectively.

fitted to summer cultivation before the possible heavy flood occurred in the Ganges. Based on the genetic characters, it was concluded that out-crossing between *indica* and *japonica* cultivars near the Bengal region might generate the ancestral cultivars.

Bhutan is adjacent to the Bengal district where Aus cultivars are grown. Weedy strains were frequently found in field surveys. Thus, we examined their nuclear-cytoplasmic genetic components to investigate the origin of these weedy strains. Isozyme genotypes have been known to be consistent with altitudinal cline in Himalayan hilly areas by multi-locus analysis for isozymes (Sano and Morishima 1992). Also in Bhutan, the *indica-japonica* classification discriminated by multi-locus analysis well fitted the altitudinal cline. No *indica* cultivars could be collected in Thimphu

valley located at higher than 2250 m above sea level. In lowland fields where *indica* cultivars prefer to grow, genetic diversity was higher than that in highland areas. Although *indica-japonica* cultivars coexisted, *indica* predominated in lowland. Such tendency was distinct in a weedy population. Further, so-called intermediate and recombinant types can be seen as a weedy form. It would be rare to find such intermediate or recombinant cultivars as a domesticated form. Multi-character analysis for morpho-physiological traits showed more discrepancy between *indica* and *japonica* than altitudinal cline. It implies that such character combinations used for the multi-character analysis were rearranged somehow, but not so much in isozyme genotypes. It may result from the segregation after natural hybridization between alternative types for such character combination.

Sano and Morishima (1992) also reported that isozyme genotypes were well correlated to the altitudinal cline, but morpho-physiological characters were not. It is easily estimated that there is tight linkage disequilibrium between particular isozyme loci and traits, which is necessary to adapt to the altitudinal cline and for domestication, but not isozyme loci and morphological and physiological characters. The above hypothesis is supported by QTL analysis. Some isozyme loci were more closely linked to loci related to domestication, but morpho-physiological characters were not (Cai and Morishima 2002).

Cross-hybridization between *indica* and *japonica* led to collapse of gene-combinations to maintain domesticated traits following segregation. It was also suggested that such loci participating in domestication would be different between *indica* and *japonica*. Once segregation happened, a large number of segregates could keep domesticated traits, but a small number of those could not. Only segregates keep the domesticated traits, should their isozyme genotypes closely fit either *indica* or *japonica*.

Then, why are there two types of cultivars such as *indica-japonica* in *O. sativa* Wild rice (*O. rufipogon*) is known as the direct origin of the cultivated form. This species was grown from South China to South-East Asian countries. Isozyme loci reveal that wild rice consists of primitive *indica-japonica* types (Morishima and Gadrinab 1987). Thus, some scientists proposed

di-phylogenetic origins of distinctive cultivated forms such as *indica-japonica*. Based on this idea, *indica-japonica* type cultivars should produce different combinations of QTLs for domestication. Then, once *indica-japonica* cultivars are out-crossed, the progeny plants must breakdown gene-combination for their domestication. Weedy strains in Bhutan may be such descendants, which could not reassemble the QTLs of their parental strains properly. Some cultivars would be the progeny that succeeded in reassembling proper components. These kinds of cultivars would explain the source of genetic diversity found in South and South-East Asian countries. The idea of such a generation of bio-diversity will open the way to clarify rice evolution when we accumulate nuclear-cytoplasm genetic information.

Another aspect of these generations in bio-diversity, is that the recent introduction of modern varieties into local fields will lead to awful contamination of modern genetic components by the genetic background of local landraces. Even in Japan, direct seeding accelerates such awful contamination. Rice breeders must take care of their cultivation systems and bio-diversity of cultivars in single fields.

References

- Arashi K. 1974. Some Thoughts on Red Rice in Japan, Nihon akamai Ko, Yuzankaku, Tokyo, 295 pp.
- Baker H.G. 1974. The evolution of weeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5: 1-24.
- Cai W. and Morishima H. 2002. QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1217-1228.
- Catala-Former M. 1995. Chemical and cultural practices for red rice control in rice fields in Ebro Delta (Spain). *Crop. Prod.* 14: 405-408.
- Chen W.B., Nakamura I., Sato Y.I. and Nakai H. 1993. Distribution of deletion type in cpDNA of cultivated and wild rice. *Jpn. J. Genet.* 68: 597-603.
- Diarra A., Smith R.J. and Talbert R.E. 1994. Growth and morphological characteristics of red rice (*Oryza sativa*) biotypes. *Weed Sci.* 33: 310-314.
- Harlan 1965. The possible role of weed races in the evolution of cultivated plants. *Euphytica* 14: 173-176.
- Hsu M.H. 1988. Weed rice "Sharei" showing closer cross-affinity to Japonica type. *Rice Genet. Newslett.* 5: 72-74.
- Ishikawa R., Sato Y.-I., Tang L. and Nakamura I. 2002a. Different maternal origins of Japanese lowland and upland rice populations. *Theor. Appl. Genet.* 104: 976-980.

- Ishikawa R., Nakamura I., Nishihara T., Kikuchi M., Senda M., Akada S., Harada T. and Niizeki M. 2002b. Origin of cytoplasm substituted rice cultivars found in Japan. *Theor. Appl. Genet.* 105: 608–613.
- Kanno A., Watanabe N., Nakamura I. and Hirai A. 1993. Variations in chloroplast DNA from rice (*Oryza sativa*): Differences between deletions mediated by short direct-repeat sequences within a single species. *Theor. Appl. Genet.* 86: 579–584.
- Kato S., Kosaka H. and Hara S. 1928. On the affinity of rice varieties as shown by the fertility of rice plants. *Centr. Agric. Inst. Kyushu Imp. Univ.* 2: 241–276.
- Morishima H. and Gadrinab L.U. 1987. Are the Asian common wild rice differentiated into *indicana japonica* types? In: Hsieh S.C. (ed.), *Crop Exploration and Utilization of Genetic Resources*, Taichung District Agricultural Improvement Station, Changhua (Taiwan), pp. 11–20.
- Oka H.I. 1953. Variations in various characters and character combination among rice varieties. *Jpn. J. Breed.* 3: 33–43. (Japanese with English abstract)
- Oka H. 1988. *Weedy form of rice. Origin of Cultivated Rice.* Elsevier Japan Sci Press, Amsterdam, Tokyo, pp. 107–114.
- Sano R. and Morishima H. 1992. *Indica-japonica* differentiation of rice cultivars viewed from the Himalayan hilly areas. *Theor. Appl. Genet.* 84: 266–274.
- Sato Y.I., Chitorakon S. and Morishima H. 1986. The *indica-japonica* differentiation of rice cultivars in Thailand and its neighboring countries. In: Napompethh B. and Subhadrabandhu S. (eds), *New Frontiers in Breeding Researches, Proceedings of the 5th International Congress SABRAO*, Kasetsart University, Bangkok, pp. 185–193.
- Sato Y.I. 1991. Variation in spikelet shape of the *indica* and *japonica* rice cultivars in Asian origin. *Jpn. J. Breed.* 41: 121–134. (Japanese with English abstract).
- Suh H.S. and Ha W.G. 1994. Characters variation of Korean weedy rice. *Rice Genet. Newslett.* 11: 69–79.
- Suh H.S., Sato Y.I. and Morishima H. 1997. Genetic characterization of weedy rice (*Oryza sativa* L.) based on morphophysiology, isozymes and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 316–321.
- Tang L. and Morishima H. 1988. Characteristics of weed rice strains. *Rice Genet. Newslett.* 5: 70–72.
- de Wet J.M.J. and Harlan J.R. 1975. Weeds and domesticates; evolution in man-made habitats. *Econ. Bot.* 29: 99–107.

Function of conserved aromatic residues in the Gal/GalNAc-glycosyltransferase motif of UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 1

Mari Tenno¹, Aki Saeki¹, Åke P. Elhammer² and Akira Kurosaka¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Japan

² AureoGen Biosciences, Inc., Kalamazoo, MI, USA

Keywords

aromatic residue; kinetic analysis;
N-acetylgalactosaminyltransferase;
O-glycosylation; site-directed mutagenesis

Correspondence

A. Kurosaka, Department of Biotechnology,
Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo
University, Kamigamo-motoyama,
Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan
Fax: +81 75 705 1914
Tel: +81 75 705 1894
E-mail: kurosaka@cc.kyoto-su.ac.jp

(Received 8 August 2007, revised 25 Sep-
tember 2007, accepted 2 October 2007)

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06124.x

UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (GalNAc transferases), which initiate mucin-type O-glycan biosynthesis, have broad acceptor substrate specificities, and it is still unclear how they recognize peptides with different sequences. To increase our understanding of the catalytic mechanism of GalNAc-T1, one of the most ubiquitous isozymes, we studied the effect of substituting six conserved aromatic residues in the highly conserved Gal/GalNAc-glycosyltransferase motif with leucine on the catalytic properties of the enzyme. Our results indicate that substitutions of Trp302 and Phe325 have little impact on enzyme function and that substitutions of Phe303 and Tyr309 could be made with only limited impact on the interaction(s) with donor and/or acceptor substrates. By contrast, Trp328 and Trp316 are essential residues for enzyme functions, as substitution with leucine, at either site, led to complete inactivation of the enzymes. The roles of these tryptophan residues were further analyzed by evaluating the impact of substitutions with additional amino acids. All evaluated substitutions at Trp328 resulted in enzymes that were completely inactive, suggesting that the invariant Trp328 is essential for enzymatic activity. Trp316 mutant enzymes with nonaromatic replacements were again completely inactive, whereas two mutant enzymes containing a different aromatic amino acid, at position 316, showed low catalytic activity. Somewhat surprisingly, a kinetic analysis revealed that these two amino acid substitutions had a moderate impact on the enzyme's affinity for the donor substrate. By contrast, the drastically reduced affinity of the Trp316 mutant enzymes for the acceptor substrates suggests that Trp316 is important for this interaction.

Mucin-type O-glycosylation of proteins is an important post-translational modification in cells. The initial biosynthetic step in this process is catalyzed by a large family of UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (EC 2.4.1.41) (GalNAc transferases) that transfer GalNAc from UDP-GalNAc to serine/threonine residues on proteins [1–3]. To date, 15 members of the mammalian GalNAc transferase family have been identified, and all these enzymes have

common structural features: an *N*-terminal cytoplasmic tail, followed by a transmembrane region, a stem region, a putative catalytic domain, and a C-terminal lectin domain that consists of three tandem (QXW)₃ repeats (Fig. 1A) [4–21]. In the catalytic domain, there are two subdomains, the glycosyltransferase 1 (GT1) motif and the Gal/GalNAc-glycosyltransferase (Gal/GalNAc-T) motif, both of which are highly conserved sequences in the GalNAc transferase enzyme family,

Abbreviations

Gal/GalNAc-T, Gal/GalNAc-glycosyltransferase; GalNAc transferase, UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase; GT1, glycosyltransferase 1.

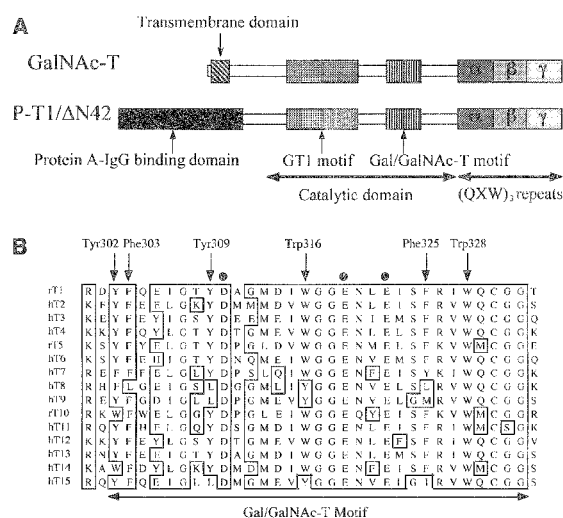


Fig. 1. Schematic representation of GalNAc-T1 and P-T1/ΔN42, and sequence comparison of the Gal/GalNAc-T motif among isozymes. (A) Schematic representation of GalNAc-T1 and P-T1/ΔN42. (B) Amino acid alignment of the Gal/GalNAc-T motif. Identical amino acids are boxed. Closed circles indicate acidic residues previously shown to be essential for the activity of GalNAc-T1. rT1, rat GalNAc-T1; hT2, human GalNAc-T2; hT3, human GalNAc-T3; hT4, human GalNAc-T4; rT5, rat GalNAc-T5; hT6, human GalNAc-T6; hT7, human GalNAc-T7; hT8 human GalNAc-T8; hT9, human GalNAc-T9; rT10, rat GalNAc-T10; hT11, human GalNAc-T11; hT12, human GalNAc-T12; hT13, human GalNAc-T13; hT14, human GalNAc-T14; hT15, human GalNAc-T15.

and thus are proposed to be important for catalytic function [22].

GalNAc transferases are unique among glycosyltransferases in that they transfer a monosaccharide to polypeptide acceptors with significant variations in the sequence. A considerable amount of work has been done to elucidate the acceptor substrate specificity of the GalNAc transferases [1]. These studies, however, have not identified any consensus sequences to date, but instead have shown that the enzymes have a wide substrate specificity, with each isozyme having partly overlapping but distinct specificities. Moreover, attempts, most of which have included site-directed mutagenesis, have been made to reveal the structural features essential for acceptor substrate recognition [8,22–26]. A recent crystallographic study of GalNAc-T1 successfully demonstrated the overall structure of the enzyme and its interactions with a manganese ion, thereby substantiating the catalytic roles proposed for some amino acid residues identified in mutational studies [27]. However, although a computational model structure of the enzyme

complexed with substrates was presented, the reported crystal structure did not include the sugar donor or the peptide acceptor substrates [27]. Thus, the specific location of the acceptor substrate-binding sites of this isozyme remains to be elucidated. More recently, X-ray crystal structures of GalNAc-T2 and GalNAc-T10 were determined [28,29]. These studies showed that the relative orientations of the catalytic and lectin domains are different between the two isoforms, suggesting the possibility of each isozyme having a distinct mechanism for substrate peptide recognition.

To elucidate the catalytic properties of GalNAc-T1, we previously investigated the function of the GT1 motif and the C-terminal lectin domain in this enzyme, and we identified amino acid residues in both domains that were important for the binding to UDP-GalNAc and the glycopeptide-glycosylating (follow-up) activity, respectively [8,22–26]. To obtain further information on the structure–function relationships of GalNAc-T1, we examined the function of the Gal/GalNAc-T motif. The importance of this motif for catalytic function has been demonstrated with the β 4-galactosyltransferases. Certain aromatic residues in the Gal/GalNAc-T motif, in this closely related family of enzymes, are essential for substrate binding [30], and some of these residues are also involved in catalysis-related conformational changes of the enzymes [31]. It has been reported that the Gal/GalNAc-T motif in GalNAc-T1 contains carboxyl groups essential for the enzymatic activity [22]. However, the specific function of this motif in catalysis is not clearly understood for any GalNAc transferase. As in the β 4-galactosyltransferases, the Gal/GalNAc-T motif in the GalNAc transferases contains several conserved aromatic residues. Although these residues are different from those conserved in β 4 galactosyltransferases, this nonetheless suggests that these residues may play important roles in the enzymatic function of the GalNAc transferases. In this study, we have investigated the role of the conserved aromatic amino acid residues in the Gal/GalNAc-T motif of GalNAc-T1, using site-directed mutagenesis, together with kinetic analysis of the resulting mutant enzymes. Our results suggest that some of the aromatic residues in the Gal/GalNAc-T domain are involved in interactions with both the sugar donor and the polypeptide acceptor substrates. In particular, the invariant residue Trp328 was found to be essential for enzymatic activity. Moreover, we have identified Trp316 as a residue important in the interaction with the acceptor polypeptide.

Results

Mutagenesis of the conserved aromatic residues in the Gal/GalNAc-T motif

An amino acid sequence alignment of the mammalian GalNAc transferase isozymes (Fig. 1B) shows that the Gal/GalNAc-T motifs contain six highly conserved aromatic amino acid residues: Tyr302, Phe303, Tyr309, Trp316, Phe325 and Trp328 in GalNAc-T1. Of the six residues, only Trp328 is strictly conserved in all GalNAc transferases cloned to date. The other five positions, although highly conserved, contain substitutions in some of the isozymes. However, the substitutions are, in most cases, quite conservative; that is, a specific aromatic amino acid is substituted by another aromatic residue, such as phenylalanine, tryptophan, or tyrosine. This suggests that aromatic residues at these sites are of functional importance.

In order to evaluate the role of the conserved aromatic residues in the Gal/GalNAc-T motif, we carried out site-directed mutagenesis analysis on recombinant rat GalNAc-T1. The recombinant enzyme was constructed by deleting the cytoplasmic tail and the transmembrane region from the rat isozyme and by fusing an insulin signal sequence and a protein A IgG-binding domain to the resulting N-terminus of the truncated sequence (Fig. 1A). The recombinant GalNAc-T1 thus prepared was expressed in COS7 cells, and the secreted fusion protein (P-T1/ Δ N42), which lacks the 42 N-terminal amino acid residues of the native enzyme, was purified from the culture medium on IgG–Sepharose. As reported previously, P-T1/ Δ N42 is fully active and has kinetic properties essentially identical to those of full-length GalNAc-T1 [24].

In the first set of experiments, we prepared mutant enzymes with single amino acid substitutions such that each of the six conserved aromatic residues in the Gal/GalNAc-T motif of P-T1/ Δ N42 was replaced by a leucine residue. Although leucine does not contain an aromatic ring, it is as hydrophobic as the aromatic amino acids, thereby making it possible to evaluate the specific functional role of the aromatic side chains. Native P-T1/ Δ N42 and the single-point P-T1/ Δ N42 mutants were expressed in COS7 cells, and the secreted fusion proteins were recovered from culture medium. The amount of secreted fusion protein was determined by western blotting, and the enzymatic activities of the mutant enzymes were assayed using apomucin, which is an efficient substrate for GalNAc-T1 [32], as acceptor. The measured enzyme activities were corrected for the level of recombinant protein and expressed relative to that of P-T1/ Δ N42.

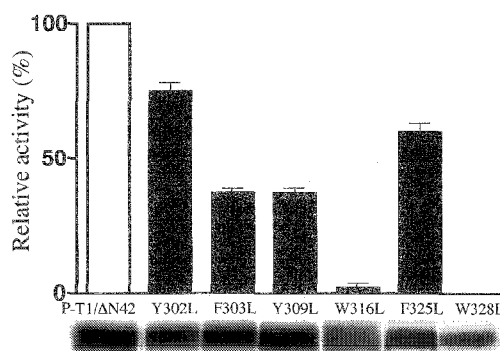


Fig. 2. Expression and enzymatic activity of GalNAc-T1 mutant enzymes. The P-T1/ Δ N42 and mutant P-T1/ Δ N42 enzymes were expressed in COS7 cells, and the secreted recombinant proteins were recovered from the medium on IgG–Sepharose, as described under Experimental procedures. The amount of secreted protein was determined by densitometric scanning of western blots (lower panel). The enzymatic activity secreted into the medium was determined using apomucin as acceptor, corrected for the amount of mutant enzyme in the medium, and expressed relative to that of the wild-type P-T1/ Δ N42 enzyme. The solid bars show the percentage enzyme activity relative to that of P-T1/ Δ N42 (white bar). Data are means \pm SD of three separate experiments.

Figure 2 shows that the expression levels of all six leucine mutant enzymes were roughly comparable to that of P-T1/ Δ N42, although F325L and W328L exhibited somewhat lower expression. By contrast, the enzymatic activities of all the mutant enzymes differed significantly. The activities of the mutants, W316L and W328L, were decreased almost to background levels, suggesting a critical importance of these residues for enzyme function, whereas the other four mutants, Y302L, F303L, Y309L, and F325L, exhibited more moderately reduced activities, to levels that were 40–80% of that of the parent enzyme.

Kinetic analysis of leucine mutant enzymes

In order to evaluate the catalytic roles of the aromatic residues in the Gal/GalNAc-T motif, we first investigated the kinetic properties of the four leucine mutant enzymes that were moderately affected by the mutations (Fig. 2). First, the K_m values for the donor substrate, UDP-GalNAc, were determined (Table 1). The affinity of F303L and Y309L was most significantly affected, with an approximately three-fold increase in the K_m values. On the other hand, less significant changes were observed for the mutant enzymes, Y302L and F325L, which retained more than 60% of the parent P-T1/ Δ N42 activity levels (Fig. 2). The affinities of the mutant enzymes for the

Table 1. Kinetic analysis of the leucine mutant enzymes. K_m values for UDP-GalNAc and apomucin were determined as described in Experimental procedures. Values represent averages of three separate reactions.

Mutant	UDP-GalNAc		Apomucin	
	$K_m \pm$ SD (mM)	Fold change	$K_m \pm$ SD (mg·mL ⁻¹)	Fold change
P-T1/ Δ N42	5.1 \pm 0.8	1.0	4.7 \pm 0.1	1.0
Y302L	5.2 \pm 0.1	1.0	5.0 \pm 0.2	1.0
F303L	14.2 \pm 1.1	2.8	13.6 \pm 1.9	2.8
Y309L	16.0 \pm 0.3	3.2	7.1 \pm 0.4	1.5
F325L	6.2 \pm 0.6	1.2	6.7 \pm 1.7	1.4

acceptor substrate, apomucin, were also investigated (Table 1). Only F303L was significantly affected, with an approximately three-fold increase in the K_m for the acceptor. Insignificant or merely modest changes in the apomucin K_m values were observed for the other mutants. Taken together, these results suggest that Phe303 may have a function in the interaction with both UDP-GalNAc and apomucin, whereas Tyr309 appears to be predominantly involved in the interaction with UDP-GalNAc.

Mutagenesis of Trp316 and Trp328 in the Gal/GalNAc-T motif

To further evaluate the impact of amino acid substitutions at positions 316 and 328, we prepared several additional mutants. We first generated three mutants with mutations at position 328: W328Y, W328F, and W328A. These were all completely inactive. Moreover, the expression levels of the mutant proteins depended on the substituting amino acid (Fig. 3A). Substitution with alanine seriously affected the expression levels of the resulting mutant enzyme, indicating that the protein may be folded incorrectly. By contrast, the expression levels of the W328Y and W328F mutants were not seriously affected. Nonetheless, the complete loss of activity of all the position 328 mutants indicates that a tryptophan at this position is essential for the activity of GalNAc-T1. The results are consistent with Trp328 being strictly conserved among all known isozymes, and suggest that this residue has a crucial function that is common to all members of the enzyme family.

Similarly, four mutants, W316Y, W316F, W316A, and W316H, were generated by mutations at position 316 (Fig. 3B). Of these, W316Y and W316F, in which tryptophan was replaced by the aromatic amino acids tyrosine and phenylalanine, respectively, retained significant enzymatic activity (approximately

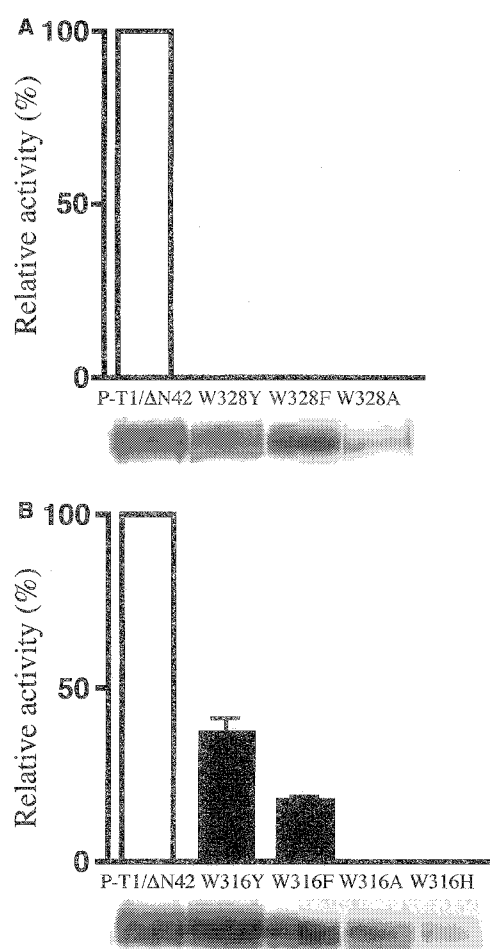


Fig. 3. Expression and enzymatic activity of enzymes mutated at Trp316 and Trp328. Quantification of P-T1/ Δ N42 and mutant P-T1/ Δ N42 was carried out as described in the legend to Fig. 2. The solid bars show the percentage enzyme activity relative to that of P-T1/ Δ N42 (white bar). (A) and (B) show the activity of enzymes with mutations at Trp328 and Trp316, respectively. Data are means \pm SD of three separate experiments.

40% and 20% of the activity of native P-T1/ Δ N42, respectively). The preference for tryptophan and tyrosine over phenylalanine may suggest a requirement for a polar aromatic residue at this site, as tryptophan and tyrosine are significantly more polar than phenylalanine because of the nitrogen of the tryptophan indole ring and the tyrosine hydroxyl group [33]. W316H, which contains a polar imidazole group but no aromatic ring structure, was completely inactive. Moreover, W316A was inactive, probably due to the loss of the aromatic ring and/or the polar functionality provided by tryptophan and tyrosine.

Consequently, an amino acid with large aromatic side chain appears to be essential at position 316, and an aromatic residue with a polar functional group appears to be most favorable.

Kinetic analysis of the Trp316 mutant enzymes

To investigate the role of Trp316 in the catalytic function of the enzyme, we carried out a kinetic evaluation of the W316Y and W316F mutant enzymes (Table 2). Both mutants exhibited modestly decreased affinity for UDP-GalNAc. By contrast, their affinity for apomucin was affected more significantly, and the reduced affinity for apomucin correlated well with the reduced activity (Fig. 3B and Table 2); W316F, which had lower activity than W316Y, exhibited a drastic reduction in affinity for apomucin, with a 9.1-fold increase in K_m . This indicates that Trp316 has a significant function in the interaction with the acceptor substrate. Moreover, a polar group at this position appears to be required for efficient interaction with the acceptor, as demonstrated by the low affinity of W316F.

To further evaluate the acceptor-binding affinity of the W316Y and W316F mutants, glycosylation of two synthetic peptides, PPDAATAAPL and GVVPTVVPG, both of which are efficient acceptors of GalNAc-T1 [1,23], was performed. The two mutant enzymes showed drastically reduced activities with both peptides (Fig. 4). Interestingly, kinetic analysis showed that the impact was approximately four times more pronounced with PPDAATAAPL than with GVVPTVVPG (Table 3). The data also indicate that most of this activity can primarily be ascribed to reduced affinity of the mutant enzymes for the acceptors (Table 3), because the affinity for UDP-GalNAc was only moderately reduced in the mutant enzymes (Table 2). These results suggest that Trp316 in GalNAc-T1 plays an important and, at least in some cases, discriminating role in the interaction with acceptor substrates.

Table 2. Kinetic analysis of the Trp316 mutant enzymes. K_m values for UDP-GalNAc and apomucin were determined as described in Experimental procedures. Values represent averages of three separate reactions.

Mutant	UDP-GalNAc		Apomucin	
	$K_m \pm$ SD (mM)	Fold change	$K_m \pm$ SD (mg·mL ⁻¹)	Fold change
P-T1/ΔN42	5.1 ± 0.8	1.0	4.7 ± 0.1	1.0
W316Y	9.0 ± 0.1	1.8	17.4 ± 3.6	3.6
W316F	9.1 ± 0.7	1.8	43.9 ± 3.8	9.1

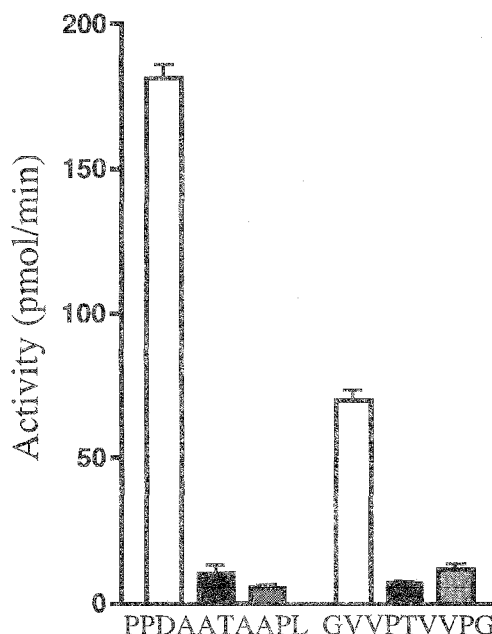


Fig. 4. Enzyme activity of P-T1/ΔN42 and Trp316 mutant P-T1/ΔN42 determined using synthetic peptides. White, solid, and gray bars indicate the enzyme activity of P-T1/ΔN42, W316Y, and W316F, respectively. Data are means ± SD of three separate experiments.

Table 3. Affinity of the Trp316 mutant enzymes for acceptor peptides. K_m values for synthetic peptides with a single acceptor site (underlined) were determined as described in Experimental procedures. Values represent averages of three separate reactions.

Mutant	PPDAATAAPL		GVVPTVVPG	
	$K_m \pm$ SD (mM)	Fold change	$K_m \pm$ SD (mM)	Fold change
P-T1/ΔN42	0.35 ± 0.05	1.0	1.74 ± 0.3	1.0
W316Y	13.5 ± 0.7	38.5	16.0 ± 0.3	9.2
W316F	15.6 ± 0.6	44.6	17.6 ± 0.5	10.1

Discussion

In this study we have demonstrated that the Gal/GalNAc-T motif is involved in binding to both the sugar donor and acceptor peptide substrates, using a combination of site-directed mutagenesis and kinetic analysis. We have also identified some of the conserved aromatic residues in the motif as being important for enzyme function. The overall impact of the mutations introduced in this work was dependent on the specific positions of the mutated aromatic residues (Fig. 2, and Tables 1 and 2).

Mutations at Tyr302 and Phe325 revealed that conservative substitutions could be made at these sites

without affecting substrate binding. On the other hand, the mutations at Phe303 and Tyr309 indicated that the former residue might interact with both the donor and acceptor substrates, and the latter with the donor substrate. However, the effects of mutations at these positions were rather modest when compared to those of the tryptophans at positions 316 and 328. It appears likely that the mutations at Phe303 and Tyr309, which are located near the putative substrate-binding site [27], could bring about local conformational changes that affect the substrate binding.

In contrast, mutation of Trp328 has a drastic effect on enzyme activity. All evaluated substitutions at this position (W328L, W328A, W328Y, and W328F) resulted in complete inactivation of the enzyme, irrespective of the expression levels of the mutant proteins (Figs 2 and 3). This indicates the absolute requirement for the tryptophan at position 328 for correct enzyme function. The fact that Trp328 is strictly conserved among all known isozymes also supports this conclusion. In the clarified three-dimensional structure of GalNAc-T1, the invariant Trp328 is located at a site opposite to the active site of the enzyme, where it forms a patch with other invariant residues [27]. This location suggests that the tryptophan at position 328 is less likely to be directly involved in catalysis. Nevertheless, it is apparently crucial for enzyme function and may instead play a role in the correct positioning of the substrate(s) and/or enzyme folding and stability.

The effects of mutations at position 316 were dependent on the type of substituted amino acid. Substitutions with leucine, alanine or histidine resulted in a complete loss of enzymatic activity, whereas substitutions with a different aromatic residue, such as tyrosine or phenylalanine, generated mutant enzymes with reduced but significantly retained activity (W316Y and W316F) (Figs 2 and 3). These results, together with the dramatically decreased affinity of the mutant enzymes for the acceptor substrates (Fig. 4 and Table 3), suggest that a polar aromatic residue is required at this position and that Trp316 has an important function in interacting with acceptor peptides during the glycosylation reaction.

As the GalNAc transferases, in general, are capable of utilizing a variety of peptide sequences as acceptor substrates, it appears likely that they contain a repertoire of amino acid residues at the substrate-binding site (subsite) that can interact with these molecules [1,34,35]. Conceivably, multiple combinations of the interactions between substrates and the substrate-binding sites on the enzyme could occur, and the specific ensemble of substrate–substrate-binding site combina-

tions formed for an individual acceptor would determine its affinity for the enzyme. This notion is supported by crystallography data for GalNAc-T2, which demonstrated several interactions between an acceptor peptide and amino acid residues in a catalytic pocket [28]. Nonetheless, the results presented in this article suggest that Trp316 is a subsite with a key function in the interaction(s) between the enzyme and the acceptor substrate(s). Interestingly, although the binding of all evaluated acceptors was affected by the mutation of Trp316, there was a clear difference in the extent of the effect between the different acceptors. Notably, whereas the K_m for GVVPTVVPG increased about 10-fold, the increase in K_m for PPDAATAAPL, at approximately 40-fold, was more pronounced. This is consistent with the observation discussed above that several amino acids are involved in acceptor binding, and indicates a differential importance of individual amino acids involved in substrate binding for different acceptor peptides (Fig. 4, and Table 3).

It has been reported that some aromatic residues in the Gal/GalNAc-T motif in β 4-galactosyltransferases are also important for enzyme function. Apparently, Trp312 in β 4-galactosyltransferase 1, which corresponds to Trp316 in GalNAc-T1, is an essential residue, as mutation of this amino acid to glycine abrogates the enzyme activity [30]. Possible involvement of two other aromatic residues, Tyr309 and Trp310 in acceptor substrate binding was also reported [30]. Although these two aromatic residues are not conserved in the GalNAc transferases, their close proximity to Trp312 suggests that the segment in the Gal/GalNAc-T motif containing these residues has an important role in acceptor substrate binding. Moreover, the recent crystallographic studies on β 4-galactosyltransferases, GalNAc-T2, and GalNAc-T10, suggest an important role of the tryptophan residues corresponding to that at position 316 in GalNAc-T1 [28,29,31]. It was reported in these studies that the corresponding tryptophan residues are located in a small, mobile loop structure in the absence of substrates. Upon the binding of substrates to the enzymes, these tryptophan residues move to the catalytic pocket and interact with both the donor and the acceptor substrates. It should be noted that, in the crystal of GalNAc-T1, no electron density corresponding to a putative loop (residues 347–358) and the side chain of Trp316 is observed in the absence of substrates [27], indicating that they are part of a mobile, flexible structure on the enzyme molecule. These observations together with the results from our kinetic study (Tables 2 and 3), suggest that, in the absence of substrates, Trp316 and the loop may be in a flexible conformation, and that the binding of substrates may

cause conformational changes that enhance substrate interactions.

We report the involvement of the aromatic residues in the Gal/GalNAc-T motif of GalNAc-T1 in the interactions with both UDP-GalNAc and acceptor peptides. Our present and previous studies demonstrate the roles of the GalNAc-T1 domain structures in catalysis [23–25]. However, important characteristics of the enzyme are not clear. In particular, questions remain about how the enzyme binds to acceptor substrates with different sequences. Further investigation of this will require generation of additional mutant enzymes and continued kinetic analysis. In addition, the crystallization of GalNAc-T1, and possibly of some mutant enzymes, in complex with both substrates, will probably help to clarify remaining issues regarding the substrate recognition of this enzyme.

Experimental procedures

Site-directed mutagenesis of soluble recombinant rat GalNAc-T1

Rat GalNAc-T1 cDNA was obtained as outlined by Hagen *et al.* [36]. The plasmid, pInsProAΔN42, containing a cDNA for soluble, tagged rat GalNAc-T1, was prepared by deleting the coding sequence for the cytoplasmic tail and the transmembrane domain from full-length GalNAc-T1 cDNA and by fusing a cDNA for an insulin signal sequence and a protein A IgG-binding domain to the resulting 5'-end of the truncated GalNAc-T1 sequence, as described previously [24]. Site-directed mutagenesis on pInsProAΔN42 was performed [24] using the primers listed below. Nucleotides altered to introduce mutations in the GalNAc-T1 sequence are underlined: Y302L, ATTTCCTGAAAGAGATCTCT; F303L, ATTTCTGAAAGTAATCTCT; Y309L, TTCCAGCATCAGCTGTCCA; W316Y, TTCTCCTCCATAAATATCCA; W316F, TTCTCCTCCGAAAATATCCA; W316L, TTCTCCTCCGAAATATCCA; W316A, TTCTCCTCCGCAATATCCA; W316H, TTCTCCTCCGTGAATATCCA; F325L, CTGC CAAATCCTAAGGGAAA; W328L, CACACTGCAGAA TCCTAAAAG; W328A, CACACTGCGCAATCCTAAAAG; W328Y, CTGATAAATCCTAAAAGGAAA; and W328F, CTGGAAAATCCTAAAAGGAAA. The nucleotide sequences of the cloned mutant enzymes were verified by DNA sequencing using ALFEXPRESS II (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Expression of P-T1/ΔN42 and mutant P-T1/ΔN42 in COS7 cells

The fusion protein P-T1/ΔN42, containing a protein A IgG-binding domain at the N-terminus, and rat GalNAc-T1

lacking the N-terminal 42 amino acid residues were expressed in COS7 cells and purified from the conditioned medium as described previously [24]. SDS/PAGE and western blotting of the recombinant molecules were carried out as described previously [24]. The protein bands on the immunoblots were scanned and quantified linearly regarding the chemiluminescence response using a Luminoimage Analyzer LAS-1000 PLUS (Fujifilm, Tokyo, Japan). The activities of P-T1/ΔN42 and mutant P-T1/ΔN42 were determined as described below, and the activity levels were corrected for the enzyme protein concentration in the medium.

GalNAc transferase assay

GalNAc transferase assays using deglycosylated bovine submaxillary mucin (apomucin), prepared according to the method of Hagopian & Eylar [37], and synthetic peptide acceptors, were carried out as described in [24] and [23], respectively. Kinetic analysis of parent P-T1/ΔN42 and the P-T1/ΔN42 mutants was also carried out as described previously [24]. The K_m for UDP-GalNAc was obtained by varying the concentration of UDP-GalNAc from 1.5 to 43.5 μM in the presence of 1.88 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of apomucin. To determine the K_m for apomucin and peptides, the GalNAc transferase activity was assayed in the presence of 7.5 μM UDP-GalNAc, and 0.625–8.75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of apomucin, or 0.05–30 mM acceptor peptide, respectively. Kinetic parameters were obtained using a Lineweaver–Burk plot.

Acknowledgements

This work was in part supported by the Protein 3000 Project, Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science, and the Foundation for Bio-venture Research Center from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

References

- 1 Elhammer ÅP, Kézdy FJ & Kurosaka A (1999) The acceptor specificity of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycoconj J* **16**, 171–180.
- 2 Marth JD (1996) Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* **6**, 701–705.
- 3 Clausen H & Bennett EP (1996) A family of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology* **6**, 635–646.
- 4 Homa FL, Hollander T, Lehman DJ, Thomsen DR & Elhammer ÅP (1993) Isolation and expression of a

- cDNA clone encoding a bovine UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J Biol Chem* **268**, 12609–12616.
- 5 White T, Bennett EP, Takio K, Sørensen T, Bonding N & Clausen H (1995) Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J Biol Chem* **270**, 24156–24165.
 - 6 Bennett EP, Hassan H & Clausen H (1996) cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T3. *J Biol Chem* **271**, 17006–17012.
 - 7 Hagen FK, Ten Hagen KG, Beres TM, Balys MM, VanWuyckhuysse BC & Tabak LA (1997) cDNA cloning and expression of a novel UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *J Biol Chem* **272**, 13843–13848.
 - 8 Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Merckx G, van Kessel AG *et al.* (1998) Cloning of a human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. *J Biol Chem* **273**, 30472–30481.
 - 9 Ten Hagen KG, Hagen FK, Balys MM, Beres TM, Van Wuyckhuysse B & Tabak LA (1998) Cloning and expression of a novel, tissue specifically expressed member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family. *J Biol Chem* **273**, 27749–27754.
 - 10 Ten Hagen KG, Tetaert D, Hagen FK, Richet C, Beres TM, Gagnon J, Balys MM, VanWuyckhuysse B, Bedi GS, Degand P *et al.* (1999) Characterization of a UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that displays glycopeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *J Biol Chem* **274**, 27867–27874.
 - 11 Bennett EP, Hassan H, Hollingsworth MA, Akisawa N, Ikematsu Y, Merckx G, van Kessel AG, Olofsson S & Clausen H (1999) Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6 – evidence for genetic but not functional redundancy. *J Biol Chem* **274**, 25362–25370.
 - 12 Bennett EP, Hassan H, Hollingsworth MA & Clausen H (1999) A novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T7, with specificity for partial GalNAc-glycosylated acceptor substrates. *FEBS Lett* **460**, 226–230.
 - 13 White KE, Lorenz B, Evans WE, Meitinger T, Strom TM & Econs MJ (2000) Molecular cloning of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T8, and analysis as a candidate autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene. *Gene* **246**, 347–356.
 - 14 Toba S, Tenno M, Konishi M, Mikami T, Itoh N & Kurosaka A (2000) Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9). *Biochim Biophys Acta* **1493**, 264–268.
 - 15 Ten Hagen KG, Bedi GS, Tetaert D, Kingsley PD, Hagen FK, Balys MM, Beres TM, Degand P & Tabak LA (2001) Cloning and characterization of a ninth member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, ppGalNTase-T9. *J Biol Chem* **276**, 17395–17404.
 - 16 Cheng L, Tachibana K, Zhang Y, Guo J, Kahori Tachibana K, Kamcyama A, Wang H, Hiruma T, Iwasaki H, Togayachi A *et al.* (2002) Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, GalNAc-T10. *FEBS Lett* **531**, 115–121.
 - 17 Schwientek T, Bennett EP, Flores C, Thacker J, Hollmann M, Reis CA, Behrens J, Mandel U, Keck B, Schafer MA *et al.* (2002) Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals. One subfamily composed of 1(2)35 Aa is essential in *Drosophila*. *J Biol Chem* **277**, 22623–22638.
 - 18 Guo JM, Zhang Y, Cheng L, Iwasaki H, Wang H, Kubota T, Tachibana K & Narimatsu H (2002) Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T12. *FEBS Lett* **524**, 211–218.
 - 19 Zhang Y, Iwasaki H, Wang H, Kudo T, Kaika TB, Hennes T, Kubota T, Cheng L, Inaba N, Gotoh M *et al.* (2003) Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc α -serine/threonine antigen. *J Biol Chem* **278**, 573–584.
 - 20 Wang H, Tachibana K, Zhang Y, Iwasaki H, Kameyama A, Cheng L, Guo J, Hiruma T, Togayachi A, Kudo T *et al.* (2003) Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T14. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 738–744.
 - 21 Cheng L, Tachibana K, Iwasaki H, Kameyama A, Zhang Y, Kubota T, Hiruma T, Tachibana K, Kudo T, Guo JM *et al.* (2004) Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, GalNAc-T15. *FEBS Lett* **566**, 17–24.
 - 22 Hagen FK, Hazes B, de Raffo R, SaD & Tabak LA (1999) Structure–function analysis of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase – essential residues lie in a predicted active site cleft resembling a lactose repressor fold. *J Biol Chem* **274**, 6797–6803.

- 23 Tenno M, Saeki A, Kézdy FJ, Elhammer ÁP & Kurosaka A (2002) The lectin domain of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1) is involved in O-glycosylation of a polypeptide with multiple acceptor sites. *J Biol Chem* **277**, 47088–47096.
- 24 Tenno M, Toba S, Kézdy FJ, Elhammer ÁP & Kurosaka A (2002) Identification of two cysteine residues involved in the binding of UDP-GalNAc to UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1). *Eur J Biochem* **269**, 4308–4316.
- 25 Tenno M, Kézdy FJ, Elhammer ÁP & Kurosaka A (2002) Function of the lectin domain of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 755–759.
- 26 Hassan H, Reis CA, Bennett EP, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J & Clausen H (2000) The lectin domain of UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T4 directs its glycopeptide specificities. *J Biol Chem* **275**, 38197–38205.
- 27 Fritz TA, Hurley JH, Trinh LB, Shiloach J & Tabak LA (2004) The beginnings of mucin biosynthesis: the crystal structure of UDP-GalNAc:polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase-T1. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 15307–15312.
- 28 Fritz TA, Raman J & Tabak LA (2006) Dynamic association between the catalytic and lectin domains of human UDP-GalNAc:polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase-2. *J Biol Chem* **281**, 8613–8619.
- 29 Kubota T, Shiba T, Sugioka S, Furukawa S, Sawaki H, Kato R, Wakatsuki S & Narimatsu H (2006) Structural basis of carbohydrate transfer activity by human UDP-GalNAc:polypeptide α -N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T10. *J Mol Biol* **359**, 708–727.
- 30 Aoki D, Appert HE, Johnson D, Wong SS & Fukuda MN (1990) Analysis of the substrate binding sites of human galactosyltransferase by protein engineering. *EMBO J* **9**, 3171–3178.
- 31 Ramasamy V, Ramakrishnan B, Boeggeman E & Qasba PK (2003) The role of tryptophan 314 in the conformational changes of β 1,4-galactosyltransferase-I. *J Mol Biol* **331**, 1065–1076.
- 32 Elhammer A & Kornfeld S (1986) Purification and characterization of UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase from bovine colostrum and murine lymphoma BW5147 cells. *J Biol Chem* **261**, 5249–5255.
- 33 Kyte J & Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105–132.
- 34 Kirnarsky L, Nomoto M, Ikematsu Y, Hassan H, Bennett EP, Cerny RL, Clausen H, Hollingsworth MA & Sherman S (1998) Structural analysis of peptide substrates for mucin-type O-glycosylation. *Biochemistry* **37**, 12811–12817.
- 35 Elhammer ÁP, Poorman RA, Brown E, Maggiora LL, Hoogerheide JG & Kézdy FJ (1993) The specificity of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase as inferred from a database of *in vivo* substrates and from the *in vitro* glycosylation of proteins and peptides. *J Biol Chem* **268**, 10029–10038.
- 36 Hagen FK, Gregoire CA & Tabak LA (1995) Cloning and sequence homology of a rat UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *Glycoconj J* **12**, 901–909.
- 37 Hagopian A & Eylar EH (1968) Glycoprotein biosynthesis: studies on the receptor specificity of the polypeptidyl:N-acetylgalactosaminyltransferase from bovine submaxillary glands. *Arch Biochem Biophys* **128**, 422–433.

Cloning and Expression of a Brain-Specific Putative UDP-GalNAc: Polypeptide *N*-Acetylgalactosaminyltransferase Gene

Naosuke NAKAMURA,^{a,1)} Shinya TOBA,^{a,1)} Mitsuharu HIRAI,^a Shinichi MORISHITA,^a Tadahisa MIKAMI,^c Morichika KONISHI,^d Nobuyuki ITOH,^d and Akira KUROSAKA^{*,a,b}

^a Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University; ^b Institute for Comprehensive Research, Kyoto Sangyo University; Kamigamo-motoyama, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan; ^c Department of Biochemistry, Kobe Pharmaceutical University; Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan; and ^d Department of Genetic Biochemistry, Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences; Yoshida-shimoadachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.

Received November 16, 2004; accepted December 14, 2004; published online December 21, 2004

We isolated a rat cDNA clone and its human orthologue, which are most homologous to UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 9, by homology-based PCR from brain. Nucleotide sequence analysis of these putative GalNAc-transferases (designated pt-GalNAc-T) showed that they contained structural features characteristic of the GalNAc-transferase family. It was also found that human *pt-GalNAc-T* was identical to the gene *WBSCR17*, which is reported to be in the critical region of patients with Williams-Beuren Syndrome, a neurodevelopmental disorder, and to be predominantly expressed in brain and heart. In order to investigate the expression of pt-GalNAc-T in brain in more detail, we first examined that of human pt-GalNAc-T by Northern blot analysis and found the expression of the 5.0-kb mRNA to be most abundant in cerebral cortex with somewhat less abundant in cerebellum. The expression of rat pt-GalNAc-T was investigated more extensively. The brain-specific expression of 2.0-kb and 5.0-kb transcripts was demonstrated by Northern blot analysis. *In situ* hybridization in the adult brain revealed high levels of expression in cerebellum, hippocampus, thalamus, and cerebral cortex. Moreover, observation at high magnification revealed the expression to be associated with neurons, but not with glial cells. Analysis of the rat embryos also demonstrated that rat pt-GalNAc-T was expressed in the nervous system, including in the diencephalons, cerebellar primordium, and dorsal root ganglion. However, recombinant human pt-GalNAc-T, which was expressed in insect cells, did not glycosylate several peptides derived from mammalian mucins, suggesting that it may have a strict substrate specificity. The brain-specific expression of pt-GalNAc-T suggested its involvement in brain development, through *O*-glycosylation of proteins in the neurons.

Key words *N*-acetylgalactosaminyltransferase; mucin; *O*-glycosylation; brain; *in situ* hybridization; Williams-Beuren syndrome

Mucin-type *O*-glycosylation is one of the most important post-translational modifications of proteins in the cell, and a UDP-GalNAc: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-transferase) catalyzes the initial step in the biosynthesis of mucin-type oligosaccharide by transferring GalNAc from UDP-GalNAc to a hydroxyl amino acid on a polypeptide acceptor.^{2,3)} This enzyme is biochemically important because it determines the number and positions of *O*-linked sugar chains in a protein. Recent studies on the molecular cloning of GalNAc-transferases revealed a large gene family, with 15 isozyme genes cloned to date.^{4–18)} The large number of isozymes in the family suggests that *O*-glycosylation in the cell is regulated through distinctive sets of isozymes expressed in each tissue. Of the GalNAc-transferase family, GalNAc-T9, previously isolated by us, is particularly interesting in that it is specifically expressed in the brain.¹²⁾ Although several proteins in the brain are reported to carry mucin-type carbohydrate chains, the involvement of brain-specific isozymes *in vivo* *O*-glycosylation has not been reported.

Here, we report the cloning of a brain-specific putative GalNAc-transferase (*pt-GalNAc-T*) gene from human and rat that is most homologous to *GalNAc-T9*. We also found that human *pt-GalNAc-T* is identical to the gene, *WBSCR17*, located in the critical region of patients with WBS,¹⁹⁾ which is characterized by a neurodevelopmental disorder caused by a haploinsufficiency of multiple genes in this region.²⁰⁾ Although *WBSCR17* is most abundantly expressed in brain,

with a significant amount also present in heart,¹⁹⁾ the expression of its mRNA in the brain still remains to be investigated in detail. Also its gene product has not been biochemically characterized. We, therefore, examined the expression of *pt-GalNAc-T* in the brain by conducting Northern blot and *in situ* hybridization analyses, and assayed the transferase activity of the recombinant *pt-GalNAc-T*.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of the Putative GalNAc-Transferase from Human and Rat Homology-based PCR, in combination with 5'- and 3'-RACE, was carried out using the human *GalNAc-T9* sequence, obtaining the full-length rat *pt-GalNAc-T* from brain. Based on the nucleotide sequence found in the NCBI database, a full-length human *pt-GalNAc-T* cDNA was amplified by PCR. Both rat and human cDNAs were cloned into *pGEM-T easy* vector.

Construction of a Recombinant Baculovirus A cDNA fragment for a baculovirus polyhedrin promoter and a signal sequence for the insect secretory protein, glycoprotein67, was isolated by digesting the plasmid vector *pAcGP67* (PharMingen) with *EcoRV* and *BamHI*. Synthetic sense and antisense oligonucleotides coding for the FLAG and 6xHis tags were 5'-phosphorylated and incubated together at 60 °C for 2 min to obtain a duplex. *pFastBac™1*, a transfer vector for the Bac-to-Bac system (Invitrogen), was digested with *AccI* and blunt-ended with Blunting High (TOYOBO), and

* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kurosaka@cc.kyoto-su.ac.jp

the product was digested with *Sac*I. All cDNA fragments thus obtained were mixed together and ligated by T4 ligase (Promega), obtaining *pFastFHGP67* that codes for the GP67 secretion signal and the FLAG/His tags. Human *pt-GalNAc-T* cDNA deleted of the sequence for the cytosolic domain and the transmembrane region was prepared as outlined previously,²¹ and inserted into the *Not*I and *Xba*I sites of *pFastFHGP67*. The isolated clone was used for transformation of the host strain *E. coli* DH10BacTM. The amplification of recombinant baculoviruses and expression of the recombinant *pt-GalNAc-T* were carried out according to the instructions described in the manual of the Bac-to-Bac[®] Baculovirus expression system (Invitrogen).

Assay for Transferase Activity Three days after the transfection of High Five cells with the recombinant baculoviruses, the conditioned medium was recovered, dialyzed, and mixed with Ni-NTA agarose. After incubation overnight, recombinant *pt-GalNAc-T* was eluted with 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2), containing 100 mM NaCl and 500 mM imidazole. The enzyme activity was determined as described previously.²¹

Northern Blot Analysis For the analysis of the human clone, human brain Multiple Tissue Northern blot II (Clontech) was hybridized with a digoxigenin-labeled probe of human *pt-GalNAc-T*, and detected as previously described.¹² For the analysis of the rat clone, five micrograms of rat total RNA (Origene) was electrophoresed on a 1% agarose gel. RNA was, then, transferred to a positively charged nylon membrane (Roche), and hybridized with a digoxigenin-la-

beled rat probe.

In Situ Hybridization Sagittal sections of Wistar rat embryos (E19.5) were hybridized with ³⁵S-cRNA antisense probe as described previously.²²

RESULTS

In order to clone genes for the GalNAc-transferase family, homology-based PCR, in combination with 5'- and 3'-RACE, using the nucleotide sequence of human *GalNAc-T9*, was carried out, and a full-length cDNA clone was obtained from rat brain. Among the cloned GalNAc-transferases, this clone was most homologous to GalNAc-T9 with 77% amino acid similarity. We, then, cloned its human orthologue by PCR using the nucleotide sequence obtained in the database search. The amino acid sequence of the human clone obtained was 98% homologous to that of the rat clone. These clones were referred to as the putative GalNAc-transferases (designated *pt-GalNAc-T*), since they had structural features conserved in the GalNAc-transferase family, though their transferase activity has not been detected yet as described below.

Figure 1 shows the predicted amino acid sequences of human and rat *pt-GalNAc-Ts* in comparison with human *GalNAc-T9*. They contained an open reading frame encoding a type II membrane protein consisting of 598 amino acid residues with a 7-amino acid N-terminal cytoplasmic domain, a 20-amino acid transmembrane domain, a 92-amino acid stem region, and a 479-amino acid putative catalytic re-

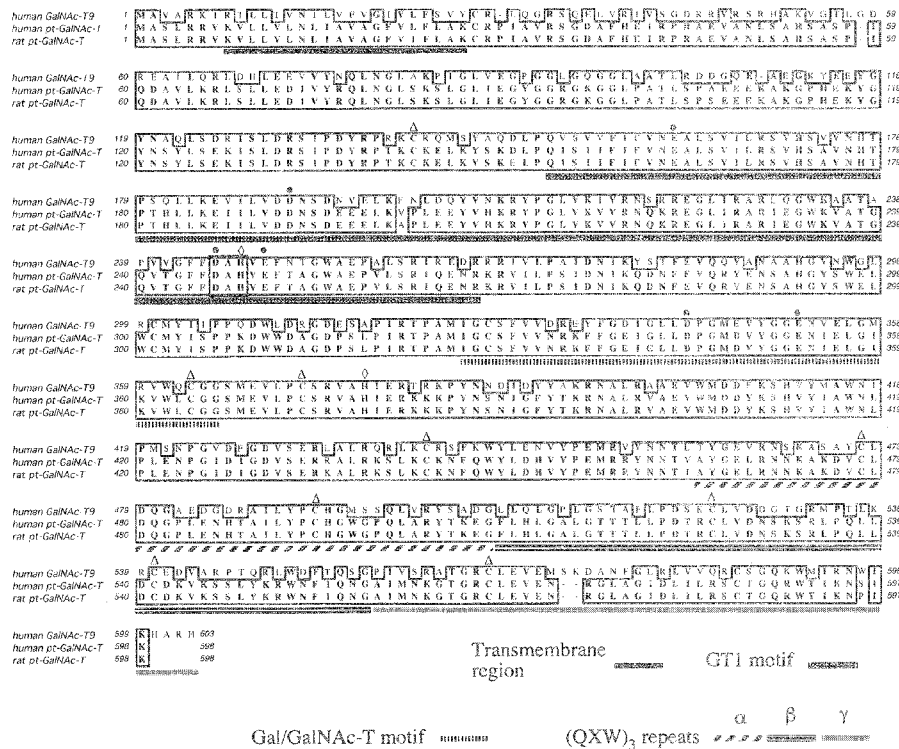


Fig. 1. Amino Acid Alignment of Rat and Human *pt-GalNAc-T*, and Human *GalNAc-T9*

The alignment was performed using the pairwise and multiple Clustal W (1.4) method in MacVector. The parameters for the alignment were: slow alignment, open gap penalty=10, extend gap penalty=0.05, matrix=blosum 30, dclay divergence=10%, and no hydrophobic gap penalty. The DXH sequence in the glycosyltransferase 1 motif is outlined. Conserved acidic, histidine, and cysteine residues are indicated by ●, ◇, and △, respectively.

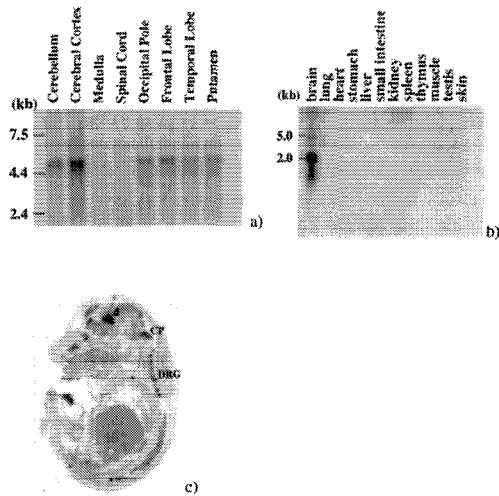


Fig. 2. Expression of Human and Rat pt-GalNAc-T (a) Northern blot analysis of human pt-GalNAc-T. (b) Northern blot analysis of rat pt-GalNAc-T. (c) *In situ* hybridization analysis of pt-GalNAc-T in the rat embryo of E19.5. d, diencephalon; CP, cerebellar primordium; DRG, dorsal root ganglion.

gion. They had several characteristics commonly found in the GalNAc-transferase family: 1) a glycosyltransferase 1 (GT1) motif, a conserved sequence commonly found in glycosyltransferases,²³ 2) a DXH sequence in the GT1 motif, a putative binding site for a sugar donor and/or a metal ion,²⁴ 3) a Gal/GalNAc-T motif consisting of about 40 amino acid residues,²³ 4) conserved acidic, histidine, and cysteine residues,^{23,25,26} and 5) (QXW)₃ repeats, a C-terminal lectin-like domain.²⁷

We, then, investigated the expression of pt-GalNAc-T. First, the expression of human pt-GalNAc-T in the brain was examined by Northern blot analysis. Figure 2a shows that it was strongest in cerebral cortex. The level of expression in cerebellum, occipital pole, frontal lobe, temporal lobe, and putamen was moderate. This is in contrast with human GalNAc-T9, which is expressed most abundantly in cerebellum, and to a lesser extent in cerebral cortex.¹²

The mRNA expression of rat pt-GalNAc-T was also investigated in adult rats. Figure 2b shows that two distinct transcripts of rat pt-GalNAc-T (a major 2.0-kb transcript and minor 5.0-kb transcript) were exclusively expressed in the brain. It should be noted that a significant amount of human orthologue mRNA is found in the heart as well.¹⁹ It may be possible that more sensitive methods such as RT-PCR may detect a small amount expression of rat pt-GalNAc-T in the heart, although Northern blot analysis did not reveal any transcripts. To examine the mRNA expression in rat embryos, sagittal sections of E19.5 embryos were analyzed (Fig. 2c). A strong discrete hybridization signal was detected in the diencephalon (thalamus), cerebellar primordium, and dorsal root ganglion. This demonstrates that the expression of rat pt-GalNAc-T mRNA in rat embryos as well as adult rats was confined to the nervous system. Rat pt-GalNAc-T expression was, therefore, initiated at least by the late embryonic stage, and the rat brain may require continuous pt-GalNAc-T expression in the embryonic and adult stages.

To examine the mRNA expression in the rat brain in more

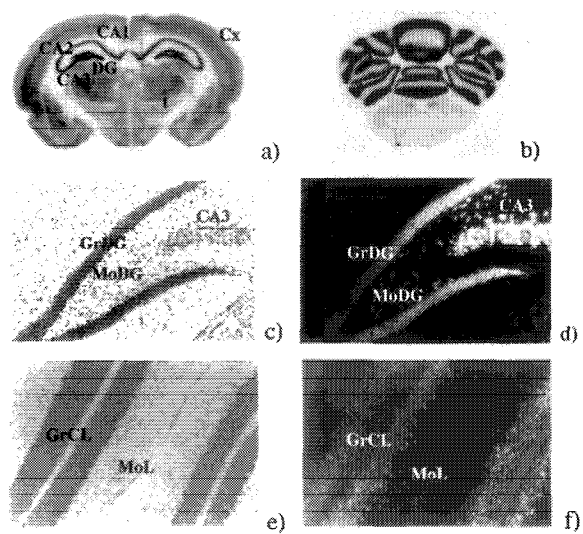


Fig. 3. *In Situ* Hybridization of Rat pt-GalNAc-T

Rat brain coronal sections were hybridized with ³⁵S-cRNA antisense rat pt-GalNAc-T probe. (a) Adult cerebral cortex, (b) adult cerebellum. (c) and (d) Hippocampus (×25); (e) and (f) cerebellum (×25). (c) and (e) Light field images, and (d) and (f) dark field images. Cx, cerebral cortex; CA1, CA1 region of hippocampus; CA2, CA2 region of hippocampus; CA3, CA3 region of hippocampus; DG, dentate gyrus; t, thalamus; GrDG, granular layer of dentate gyrus; MoDG, molecular layer of dentate gyrus; GrCL, granular cell layer; MoL, molecular layer.

detail, coronal sections of the adult brain were analyzed by *in situ* hybridization with a ³⁵S-labeled antisense or sense cRNA probe. Rat pt-GalNAc-T was preferentially expressed in CA1, CA2, and CA3 in the hippocampus, intermediate layers of the cerebral cortex, and thalamus (Fig. 3a). It was also strongly expressed in the cerebellum (Fig. 3b). We, then, examined microautoradiographic images of rat brain sections subjected to *in situ* hybridization. In these sections, cells in the tissues were located by Nissl staining. Strong expression of rat pt-GalNAc-T mRNA was observed in CA3 and the granular layer of the dentate gyrus in the hippocampus (Figs. 3c, d), and the granule cell layer in the cerebellum (Figs. 3e, f). Figure 4 shows high magnification images of the *in situ* hybridization sections. With Nissl staining of brain sections, glial cells appeared as small intensely stained (dark) cells. In contrast, neurons were generally larger and less intensely stained (lighter) owing to their volume.²⁸ Analysis of the sections clearly revealed that the grains of the hybridized antisense probe were exclusively associated with neurons (Figs. 4a, b). These observations demonstrated that rat pt-GalNAc-T was expressed in neurons, but not in glial cells, in certain regions of the brain.

Finally we assayed the catalytic activity of human pt-GalNAc-T. For this, a truncated pt-GalNAc-T, which lacks the cytoplasmic tail and transmembrane region, but has FLAG and 6xHis tags at the N-terminus, was expressed in insect cells. The recombinant proteins in the culture medium were recovered and purified with Ni²⁺-agarose, and then assayed for the activity. Recombinant pt-GalNAc-T, however, did not glycosylate peptides derived from mammalian mucins, such as MUC1a (AHGVTSAPDTR), MUC5AC (GTTDPVPVPTTG), and MUC7 (TTAAPPTPSAG), while recombinant rat GalNAc-T1 did (data not shown). Judging

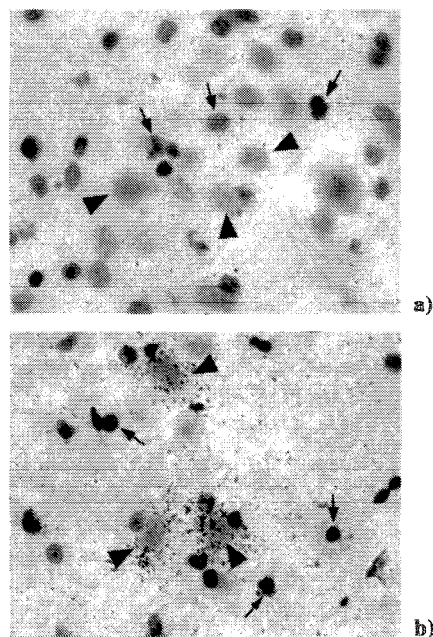


Fig. 4. High Magnification ($\times 40$) of *in Situ* Hybridization of Rat *pt-GalNAc-T* in Hippocampus

Arrowheads and arrows indicate neurons and glial cells, respectively. (a) Sense probe; (b) antisense probe.

from its restricted distribution in neurons, *pt-GalNAc-T* may not glycosylate typical mucin-type molecules, but catalyze brain-specific *O*-glycosylation.

DISCUSSION

We cloned cDNAs from human and rat, which are most homologous to *GalNAc-T9*. These clones (*pt-GalNAc-Ts*) contained the structural features characteristic of *GalNAc-transferases*. Hence, it is expected that they encode active *GalNAc-transferases*, but they did not exhibit biochemical transferase activity when assayed using peptides with typical mucin polypeptide sequences. The failure to detect the catalytic activity of *pt-GalNAc-T* may result from several causes. First of all, *pt-GalNAc-T* may be a member of so-called follow-up type isozymes, which requires partial glycosylation of the acceptors in order to recognize them as substrates. In fact, prior glycosylation of the acceptor peptides was reported to be a prerequisite for glycosylation by *GalNAc-T4*, *-T7*, and *-T10*.^{7,10,13} Secondly, the transmembrane region of *pt-GalNAc-T* may be involved in the activity. Expression of the recombinant soluble molecules, therefore, may have generated inactive enzymes. Thirdly, *pt-GalNAc-T* may belong to other glycosyltransferase families involved in the transfer of different monosaccharides. It is, however, unlikely that *pt-GalNAc-T* catalyzes reactions other than *GalNAc* transfer, since it has motif structures of *GalNAc-transferase* families, exhibiting very high homology (77%) to *GalNAc-T9*. Finally, judging from their restricted expression in the brain, *pt-GalNAc-T* may have a narrow substrate specificity for catalyzing brain-specific glycosylation. Peptides containing typical mucin-like sequences may not func-

tion as acceptors.

In fact, there are several examples of *O*-glycosylated glycoproteins in the brain. Tenascin-R is a brain glycoprotein with a disialylated core-1 structure, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3(\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GalNAc}$, as a major carbohydrate chain, and is expressed in the spinal cord, cerebellum, hippocampus, and olfactory bulb, colocalizing with rat *pt-GalNAc-T* except in the olfactory bulb.^{29,30} Chromogranin A (CgA) is also found in the brain and spinal cord, as well as in the endocrine and immune systems.³¹ *In situ* hybridization of CgA mRNA in rat brain sections revealed the expression to be strongest in the pyramidal cell layer of the hippocampus and the subiculum,³¹ where rat *pt-GalNAc-T* is abundantly expressed as well. β -Amyloid precursor protein (APP) is another example of an *O*-glycosylated protein in the brain.³² Both CgA and APP are known to accumulate in extracellular β -amyloid plaques in Alzheimer's disease.^{31,33} CgA is also reported to accumulate in patients with Parkinson's disease and Pick's disease.^{34–36} *O*-Glycosylation of α -synuclein is reported as well.³⁷ α -Synuclein is a major component of intracellular fibrillary aggregates and implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease.³⁸ Aberrant *O*-glycosylation may cause the conformational change in α -synuclein, resulting in the deposition of abnormal filaments. Although the relationship of *pt-GalNAc-T* with these pathological conditions is not clear, it is possible that the deposition of these proteins in the brain is related to altered *O*-glycosylation. Some of these glycoproteins colocalize with *pt-GalNAc-T* in the brain, thus raising the possibility that they might be endogenous substrates of *pt-GalNAc-T*. Studies using synthetic peptides derived from the potential *O*-glycosylation sites of these glycoproteins are in progress.

Human *pt-GalNAc-T* was found to be located in the WBS critical region, and defined as *WBSCR17*.¹⁹ There are several genes in this region, and concomitant deletion of several *WBSCR* genes, not a single gene, is possibly involved in the pathogenesis of WBS.^{20,39} It is also reported that in WBS patients, the brain is significantly smaller, and the cerebellum is enlarged relative to the cerebrum.⁴⁰ The strong expression of both rat and human *pt-GalNAc-Ts* in these regions, together with the continual expression of the rat clone throughout the embryo and adult brain, suggests essential roles in the normal development of the brain. Therefore, the deletion of *pt-GalNAc-T* together with other *WBSCR* genes may be related to the developmental disorder found in WBS.

Acknowledgments This work was in part supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science, and the Foundation for Bioventure Research Center from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

REFERENCES

- 1) These authors contributed equally to this manuscript. The nucleotide sequence presented in this paper will appear in the DDBJ, EMBL and GenBank Nucleotide Sequence Databases under accession number AB040671.
- 2) Elhammer A. P., Kézdy F. J., Kurosaka, A., *Glycoconj. J.*, **16**, 171–180 (1999).
- 3) Clausen H., Bennett E. P., *Glycobiology*, **6**, 635–646 (1996).
- 4) Homa F. L., Hollander T., Lehman D. J., Thomsen D. R., Elhammer A.

- P., *J. Biol. Chem.*, **268**, 12609—12616 (1993).
- 5) White T., Bennett E. P., Takio K., Sorensen T., Bonding N., Clausen H., *J. Biol. Chem.*, **270**, 24156—24165 (1995).
 - 6) Bennett E. P., Hassan H., Clausen H., *J. Biol. Chem.*, **271**, 17006—17012 (1996).
 - 7) Hagen F. K., TenHagen K. G., Beres T. M., Balys M. M., VanWuyckhuysse B. C., Tabak L. A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 13843—13848 (1997).
 - 8) TenHagen K. G., Hagen F. K., Balys M. M., Beres T. M., VanWuyckhuysse B., Tabak L. A., *J. Biol. Chem.*, **273**, 27749—27754 (1998).
 - 9) Bennett E. P., Hassan H., Mandel U., Hollingsworth M. A., Akisawa N., Ikematsu Y., Merckx G., vanKessel A. G., Olofsson S., Clausen H., *J. Biol. Chem.*, **274**, 25362—25370 (1999).
 - 10) TenHagen K. G., Tetaert D., Hagen F. K., Richet C., Beres T. M., Gagnon J., Balys M. M., VanWuyckhuysse B., Bedi G. S., Degand P., Tabak L. A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 27867—27874 (1999).
 - 11) White K. E., Lorenz B., Evans W. E., McIntinger T., Strom T. M., Econs M. J., *Gene*, **246**, 347—356 (2000).
 - 12) Toba S., Tenno M., Konishi M., Mikami T., Itoh N., Kurosaka A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1493**, 264—268 (2000).
 - 13) Hagen K. G., Bedi G. S., Tetaert D., Kingsley P. D., Hagen F. K., Balys M. M., Beres T. M., Degand P., Tabak L. A., *J. Biol. Chem.*, **276**, 17395—17404 (2001).
 - 14) Schwientek T., Bennett E. P., Flores C., Thacker J., Holmann M., Reis C. A., Behrens J., Mandel U., Kreck B., Schafer M. A., Haselmann K., Zubarev R., Roepstorff P., Burchell J. M., Taylor-Papadimitriou J., Hollingsworth M. A., Clausen H., *J. Biol. Chem.*, **277**, 22623—22638 (2002).
 - 15) Guo J. M., Zhang Y., Cheng L., Iwasaki H., Wang H., Kubota T., Tachibana K., Narimatsu H., *FEBS Lett.*, **524**, 211—218 (2002).
 - 16) Zhang Y., Iwasaki H., Wang H., Kudo T., Kalka T. B., Hennet T., Kubota T., Cheng L., Inaba N., Gotoh M., Togayachi A., Guo J., Hisatomi H., Nakajima K., Nishihara S., Nakamura M., Marth J. D., Narimatsu H., *J. Biol. Chem.*, **278**, 573—584 (2003).
 - 17) Wang H., Tachibana K., Zhang Y., Iwasaki H., Kameyama A., Cheng L., Guo J., Hiruma T., Togayachi A., Kudo T., Kikuchi N., Narimatsu H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 738—744 (2003).
 - 18) Cheng L., Tachibana K., Iwasaki H., Kameyama A., Zhang Y., Kubota T., Hiruma T., Kudo T., Guo J. M., Narimatsu H., *FEBS Lett.*, **566**, 17—24 (2004).
 - 19) Merla G., Ucla C., Guipponi M., Raymond A., *Hum. Genet.*, **110**, 429—438 (2002).
 - 20) Tassabehji M., *Hum. Mol. Genet.*, **12**, R229—237 (2003).
 - 21) Tenno M., Sacki A., Kézdy F. J., Elhammer Å. P., Kurosaka A., *J. Biol. Chem.*, **277**, 47088—47096 (2002).
 - 22) Yamasaki M., Miyake A., Tagashira S., Itoh N., *J. Biol. Chem.*, **271**, 15918—15921 (1996).
 - 23) Hagen F. K., Hazes B., Raffo R., deSa D., Tabak L. A., *J. Biol. Chem.*, **274**, 6797—6803 (1999).
 - 24) Wiggins C. A., Munro S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 7945—7950 (1998).
 - 25) Wragg S., Hagen F. K., Tabak L. A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 16947—16954 (1995).
 - 26) Tenno M., Toba S., Kézdy F. J., Elhammer Å. P., Kurosaka A., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4308—4316 (2002).
 - 27) Hazes B., *Protein Sci.*, **5**, 1490—1501 (1996).
 - 28) Gerfen C. R., *Methods Neurosci.*, **1**, 79—97 (1989).
 - 29) Zamze S., Harvey D. J., Pesheva P., Matú T. S., Schachner M., Dwck R. A., Wing D. R., *Glycobiology*, **9**, 823—831 (1999).
 - 30) Pesheva P., Spiess E., Schachner M., *J. Cell. Biol.*, **109**, 1765—1778 (1989).
 - 31) Winkler H., Fischer-Colbric R., *Neuroscience*, **49**, 497—528 (1992).
 - 32) Palmert M. R., Podlisny M. B., Witker D. S., Oltersdorf T., Younkin L. H., Selkoe D. J., Younkin S. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 6338—6342 (1989).
 - 33) Haass C., Selkoe D. J., *Cell*, **75**, 1039—1042 (1993).
 - 34) Weiler R., Lassmann H., Fischer P., Jellinger K., Winkler H., *FEBS Lett.*, **263**, 337—339 (1990).
 - 35) Taupenot L., Ciesielski-Treska J., Ulrich G., Chasserot-Golaz S., Aunis D., Bader M. F., *Neuroscience*, **72**, 377—389 (1996).
 - 36) Yasuhara O., Kawamata T., Aimi Y., McGeer E. G., McGeer P. L., *Neurosci. Lett.*, **170**, 13—16 (1994).
 - 37) Shimura H., Schlossmacher M. G., Hattori N., Froesch M. P., Trockenbacher A., Schneider R., Mizuno Y., Kosik K. S., Selkoe D. J., *Science*, **293**, 263—269 (2001).
 - 38) Polymeropoulos M. H., Lavedan C., Leroy E., Ide S. E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E. S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W. G., Lazzarini A. M., Duvoisin R. C., Di Iorio G., Golbe L. I., Nussbaum R. L., *Science*, **276**, 2045—2047 (1997).
 - 39) Ewart A. K., Morris C. A., Atkinson D., Jir W., Sternes K., Spallone P., Stock A. D., Leppert M., Keating M. T., *Nat. Genet.*, **5**, 11—16 (1993).
 - 40) Jones W., Hesselink J., Courchesne E., Duncan T., Matsuda K., Bellugi U., *Dev. Med. Child. Neurol.*, **44**, 688—694 (2002).

京 都 産 業 大 学

総合学術研究所所報 第5号 (抜刷)

平 成 19 年 7 月 発 行

細胞質置換コムギをモデルとした核と
ミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究

堀 川 明 彦
寺 地 徹

京 都 産 業 大 学
総 合 学 術 研 究 所

細胞質置換コムギをモデルとした核と ミトコンドリアゲノムの相互作用に関する研究

堀川明彦¹
寺地徹

1. はじめに

高等植物が正常に生育するためには、核及びオルガネラ遺伝子の調和のとれた発現が必要である。オルガネラで機能するタンパク質のほとんどが核の遺伝子産物であることに加え、例えば、葉緑体の遺伝子の転写制御が核ゲノムにコードされているシグマ因子によって行われるなど、核ゲノムにコードされた遺伝子によるオルガネラの制御、換言すれば、核からオルガネラへの情報伝達はよく研究されており、すでに様々な事実が明らかになっている。一方、細胞内のオルガネラを取り巻く環境に何らかの変化が生じた場合、ある特定の核遺伝子の発現が変動することが知られている。これはオルガネラから核へ向かう情報伝達の経路が存在することを示すものであり、このような遺伝子発現制御をレトログレード制御と呼ぶ。ミトコンドリアのレトログレード制御については動物や酵母を用いた研究が先行しているが、近年、高等植物でもストレス条件下や生育段階に応じた、ミトコンドリアから核への情報伝達の事例が報告されてきている。

さて、コムギ属に近縁な野生植物であるエギロプス属植物の細胞質ゲノムを、連続戻し交雑によりパンコムギの核に導入すると、雄性不稔をはじめとする様々な表現型の変化が観察される。その中で、*Ae. mutica* の細胞質ゲノムはパンコムギに与える表現型の変化に基づき、出穂遅延を引き起こす T 型と、細胞質雄性不稔を引き起こす T² 型の 2 種に分類される。これまでの研究結果から、T 型と T² 型におけるオルガネラゲノムの違いはミトコンドリアゲノムの分子構成の違いによることが示されており、本プロジェクトは、両細胞質の表現型の原因となるミトコンドリア遺伝子の特定を目的としている。昨年度の報告では、網羅的サザン解析によるミトコンドリアのゲノム構造比較の結果を示した。その中で我々は、*atp1-9*, *cox1*, *rrn18+5* の 3 つの遺伝子領域に系統特異的な変異遺伝子が存在することを明らかにし、これらを原因遺伝子の有力な候補と考え詳細な解析を進めていることを示した。一方、コムギの細胞質置換系統におけるミトコンドリアのレトログレード制御、すなわちパンコムギのミトコンドリアゲノムが *Ae. mutica* のものに置き換わることにより、核遺伝子の発現がどのように変化するかについては、全く調査されていなかった。そこで今年度は、コムギ 22K マイクロアレイを用いて、*Ae. mutica* 細胞質置換系統にみられる核遺伝子の発現変動を網羅的に調査した。以下その

¹ 京都産業大学工学部嘱託職員

結果を報告する。

2. 材料及び方法

2.1. 植物材料

本研究に用いた植物材料を表1に示す。普通系パンコムギ Chinese Spring (以下 C52 系統) と、Chinese Spring の核に *Ae. mutica* の T 型細胞質を導入した系統 (以下 C13 系統)、同じく Chinese Spring の核に T² 型細胞質を導入した系統 (以下 C14 系統) を実験材料として用いた。なお C13 系統は、C52 系統並びに C14 系統と比べて出穂遅延を示し、C14 系統は雄性不稔を示すことがわかっている。

表1 実験に用いた植物材料

Alloplasmic and euplasmic lines of common wheat

Code	Plasma type ¹⁾	Nuclear genome ²⁾	Cytoplasm donor		
			Group or Section	Species	Ploidy
C13	T	CS	Amblyopyrum	<i>Ae. mutica</i>	2 x
C14	T ²	"	"	"	2 x
C52	B	"	Dinkel	<i>T. aestivum</i>	6 x

¹⁾ After Tsunewaki (1996)

²⁾ *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring

2.2. 実験方法

穂孕み期から出穂期にあたる各系統の穂から全 RNA を単離し、コントロールとして用いる C52 系統の RNA を Cy3 で、また比較する C13 及び C14 系統の RNA を Cy5 で、それぞれ標識して cRNA を合成した。今回の実験にはコムギ EST データベースを基に作成された、スポット数 21939 のマイクロアレイを用いた。C52 と C13、C52 と C14 系統の標識 cRNA をそれぞれ競合的にハイブリダイズさせ、シグナル強度を測定後、厳しい基準で変動した遺伝子リストを作成した。なお、マイクロアレイの操作は北海道システムサイエンスに委託して行い、その他の分子生物学的実験は定法により行った。

3. 結果及び考察

3.1. *Ae. mutica* 細胞質置換コムギの遺伝子発現プロファイリング

マイクロアレイを用いたハイブリダイゼーション実験において、C13、C14 系統で発現量が 2 倍以上変化した遺伝子数を表 2 に示す。C52 系統と比較して、2 倍以上発現が変動した遺伝子は C13 系統ではアレイにスポットされている遺伝子全体の 1.5%、C14 系統では 5.4% となり、C13 系統と比較して C14 系統で、より多くの遺伝子の発現が変動していることが明らかとなった。C52 系統と比較して、C13 及び C14 系統で発現量に差が見られた上位 10 遺伝子を表 3 に示す。発現変動を示した遺

表 2 細胞質置換系統で発現量に差が見られた遺伝子数

	Up-regulated genes				Down-regulated genes				Differentially expressed genes (%)
	2-3	3-5	>5	Total	2-3	3-5	>5	Total	
C52 vs. C13	114	46	38	198	68	21	38	127	1.5
C52 vs. C14	347	190	148	685	291	132	73	496	5.4

表 3 細胞質置換系統で発現量に差が見られた上位 10 遺伝子

Fold change	Probe name	Description (BLASTx search result)	Fold change	Probe name	Description (BLASTx search result)
C13 up-regulated			C14 up-regulated		
44	w2525	matR	79	w9393	17 kDa class I small heat shock protein
32	rwhf5p10	No hits found	77	w2656	putative 22.0 kDa class IV heat shock protein
25	w13328_2	Serine/threonine-protein kinase	54	w2525	matR
24	w2825	No hits found	50	w446	Helix-turn-helix family protein, expressed
23	whf10o05	No hits found	45	w9951	putative heat shock protein, hsp40
21	rwh31n06	expressed protein	42	w2200	Hsp70 protein
19	w1783	Glycosyl hydrolase family 1 protein	41	w7940	putative 16.9 kDa class I heat shock protein
19	w12692	expansin EXPB4 cell wall protein	37	w2559	expressed protein
17	w1947	No hits found	34	w571	putative heat shock protein, hsp40
17	w12955	Pectinesterase family protein	34	w2515	No hits found
C13 down-regulated			C14 down-regulated		
72	w11073	heat shock protein HSP26	19	w14735	putative RAFTIN1 protein
54	w2656	putative 22.0 kDa class IV heat shock protein precursor	15	rwhh2j05	putative cytochrome P450
33	w12683	putative 16.9 kDa class I heat shock protein	12	w4563	S-locus receptor-like kinase RLK14
29	w13	small heat shock protein HSP17.8	11	whf1370	putative protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
28	w3609	Chain D, Crystal Structure And Assembly Of An Eukaryotic Small Heat Shock Protein	10	w10075	No hits found
28	w5660	putative 16.9 kDa class I heat shock protein	10	w10133	expressed protein
25	w8442	heat shock protein 16.9.	10	rwhh26i19	cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylase-like protein
24	w2625	putative 16.9 kDa class I heat shock protein	9	w5495	subtilase family protein
21	w2404	dnaK protein, expressed	9	w14068	putative serine protease
20	w1872	dnaK protein, expressed	9	w4643	NAD dependent epimerase/

伝子の中から対応する EST クローンをランダムに選抜し、リアルタイム RT-PCR により mRNA の定量を行ったところ、マイクロアレイと同様の発現変動が認められ、データの信頼性を確認することができた。C13 系統では、ミトコンドリアゲノムにコードされている *matR* 遺伝子が最も高い発現上昇を示し、発現低下を示した上位遺伝子のほとんどがストレスタンパク質をコードするものであった。一方 C14 系統では、多くのストレスタンパク質遺伝子の発現が上昇し、さらに C13 系統同様、ミト

コンドリア *matR* 遺伝子の発現も著しく上昇していた。また C14 系統では, BURP ドメインをコードする *RAFTIN* 様遺伝子の発現が最も低下していた(19 倍の発現変動を示した)。

図 1 は, C52 系統と比較して, C13 系統で 4 倍以上, また C14 系統で 5 倍以上の発現変動を示した遺伝子を機能に基づき分類したものである。C13 系統で発現が上昇した遺伝子には, 代謝, 生合成に関わる遺伝子や組織, 器官の発達, シグナル伝達に関わる遺伝子などが含まれており, 発現が低下した遺伝子には, ストレスタンパク質が多く認められた。中でも興味深いのは, コムギの花成調節遺伝子である *FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子の発現が大きく低下していたことで(4.7 倍の発現変動), これが C13 系統の出穂遅延の直接的な原因である可能性が考えられる。今後, *FT* 遺伝子を取り巻く他の花成調節遺伝子の発現について調査を行いたい。

一方, C14 系統で発現が上昇した遺伝子の多くは, ストレスタンパク質をコードするものであ

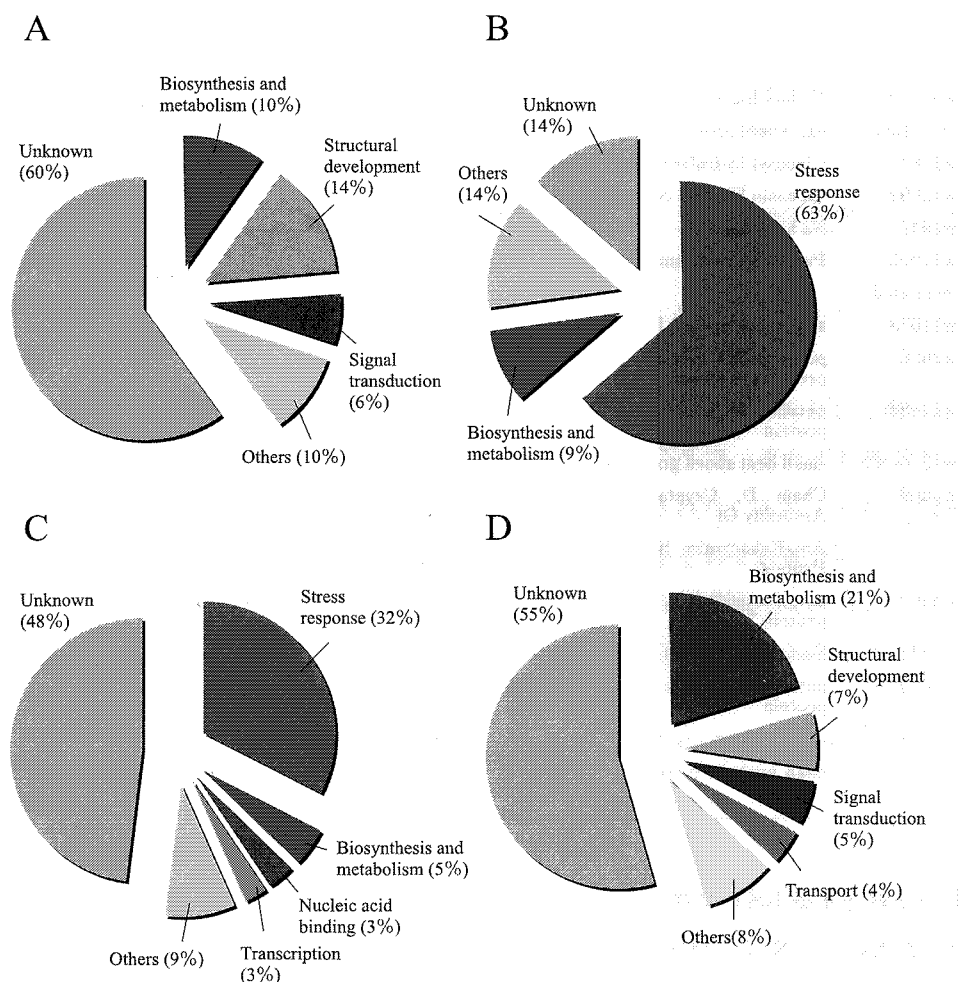


図 1 発現変動を示した遺伝子の機能に基づく分類
 A: C13 up-regulated; B: C13 down-regulated
 C: C14 up-regulated; D: C14 down-regulated

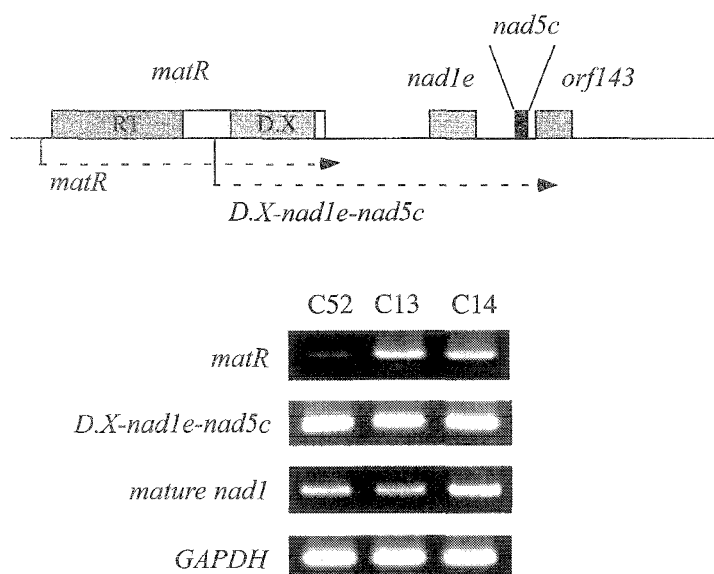


図2 細胞質置換系統における *matR* 遺伝子の発現

た。また発現が低下した遺伝子には、代謝、生合成関連、器官の発達やシグナル伝達、物質輸送などに関連するものがあり、C13系統と比較して様々な遺伝子の発現量低下が認められた。これら代謝、生合成関連の遺伝子の中には、脂質代謝やアントシアニン生合成に関わる遺伝子が含まれており、葯特異的な遺伝子である *RAFTIN* 遺伝子や、*RAFTIN* と同様に BURP ドメインをコードする遺伝子の発現が著しく低下していたことも特徴的であった。なおこの *RAFTIN* は、イネやコムギの花粉発達初期段階で、タペート細胞から脂質などの物質を花粉小細胞へ運搬するために必須な遺伝子と考えられている。したがって C14 系統では花粉壁を構成するために必要な物質が十分に供給されないまま、未成熟な花粉が発達している可能性が考えられる。BURP ドメインをコードする遺伝子はいくつかの植物から単離されているが、発現パターンは様々であり、本質的な機能は同定されていない。今回、*RAFTIN* 以外にも、BURP ドメインを持ち C14 系統で著しい発現低下を示した遺伝子が同定された。これらの遺伝子の機能についても今後解析を進めていく予定である。

3.2. 細胞質置換系統におけるミトコンドリア *matR* 遺伝子の発現上昇

今回のマイクロアレイ実験で、ミトコンドリアゲノムにコードされている *matR* 遺伝子の発現が、C13、C14 両系統で著しく上昇していることが明らかになった。この *matR* 遺伝子は、高等植物のミトコンドリアゲノムのグループ2イントロン内に高度に保存されており、RNA スプライシングに関与する遺伝子と考えられている。ではなぜこの遺伝子の発現が細胞質置換系統で上昇したのか、非常に興味を持たれた。そこでまず、リアルタイム PCR による *matR* 遺伝子コピー数の定量を行った。その結果、アンプリコンの増幅パターンに大きな差は認められず、発現量の差は *matR* 遺伝子コピー数の差に起因するものではないとの結論を得た(データ未掲載)。

ところで、この *matR* 遺伝子のコード領域は、RT ドメインと D.X ドメインにより構成される。また遺伝子コード領域内にもプロモーターが存在し、この領域から 2 種類の転写産物 (*matR*, *D.X-nad1e-nad5c*) が生じるとされる。そこで 2 種の転写産物それぞれをターゲットとした RT-PCR を行ったところ、*matR* 転写産物でのみパンコムギと細胞質置換系統間で発現量に違いが認められた (図 2)。パンコムギと細胞質置換系統で、*matR* 遺伝子 5' 側プロモーター領域の塩基配列に違いは見出されないので (データ未掲載)、今回の結果から、なぜ RT 及び D. X 両ドメインを持つ *matR* 転写産物のみ、細胞質置換系統で発現が上昇しているのかはわからなかった。これも今後の研究課題である。

4. おわりに

今回初めて、マイクロアレイ解析を細胞質置換系統に適用することで、C13 及び C14 系統の表現型変化に関わると思われる核遺伝子をいくつかスクリーニングすることができた。今後は器官や生育ステージ別に発現パターンを調査する必要がある。また二次元電気泳動によるプロテオーム解析の手法を用いながら、RNA 及びタンパク質レベルで表現型変化に関わる遺伝子を同定していきたい。

5. 謝辞

本実験の遂行には、谷口和也氏 (本学工学研究科生物工学専攻修士 1 年)、中西健太氏 (同上) の協力を得た。ここに深謝の意を表す。また本研究で用いたコムギ EST マイクロアレイは一部 NBRP の資金により作製された。NBRP、及びマイクロアレイの分譲を受けた荻原保成教授、川浦香奈子博士 (横浜市立大学木原生物学研究所) に感謝する。

京都産業大学
総合学術研究所報

第4号(抜刷)

平成18年7月発行

細胞質置換コムギをモデルとした核とミトコンドリアゲノムの
相互作用に関する研究

堀川 明彦
寺地 徹

京都産業大学
総合学術研究所

細胞質置換コムギをモデルとした核とミトコンドリア ゲノムの相互作用に関する研究

堀川明彦¹
寺地徹

1. はじめに

連続戻し交雑法により育成された植物のことを、細胞質置換系統とよぶ。連続戻し交雑法は古典的な育種技術であり、この方法で育成された細胞質置換系統は、メンデルの遺伝法則の再発見者の1人として有名なコレンス (C. Correns) により、最初に植物細胞質の遺伝学的研究に用いられた。有性生殖をする高等植物では、核ゲノム (染色体) に存在する遺伝情報は両親から半分ずつ次代へ伝えられる。一方、細胞質は、多くの場合母性遺伝するので、そこに存在する遺伝情報 (細胞質ゲノム、プラズモン) も母方のみから子孫へ伝えられる。したがって何回もの連続戻し交雑を経て育成された細胞質置換系統では、花粉親からみて、細胞質が最初の交配に用いた母親 (細胞質提供親) のものに置き換えられた状態になっており、細胞質置換系統と花粉親とを比較することで、細胞質の遺伝的特性をそのまま表現型に反映させることができる。このことから細胞質置換系統は、植物の細胞質ゲノムの特性を研究するための格好の材料として利用されてきた。

コムギにおいても、コムギ (*Triticum*) 属とその近縁野生種であるエギロプス (*Aegilops*) 属植物の細胞質をパンコムギに導入した細胞質置換系統が、多数育成されており、両属植物のプラズモンが植物の表現型にどのような影響を与えるのか、体系的に調査されている¹⁾。これらプラズモンの研究は、両属植物の系統進化の解明に貴重な情報を提供してきた。また異種プラズモンによるパンコムギの表現型の変化には、雄性不稔や半数体誘発など実際の育種にも役に立ちそうな特性が多数観察されたことから、実用化を目指した研究の題材としても興味を持たれている。その中で我々は *Ae. mutica* の細胞質に注目した。*Ae. mutica* は、トルコ、シリアなど中東地域に生育する2倍性の野生種で、他の多くの *Aegilops* 種とは異なり他殖性である。この植物のプラズモンは、米国とブルガリアの研究者により、それぞれ独立にパンコムギに導入されたが、もともと同じ種に由来するにもかかわらず、最初の交雑に用いた個体間でパンコムギに与える表現型に大きな違いがみとめられ、出穂遅延を生じる T 型と細胞質雄性不稔を引き起こす T² 型の2つに分類されるに至った。以前に行われたオルガネラ DNA の制限酵素分析では、T 型と T² 型の表現型の違いはミトコンドリア DNA 分子の構成の違いによることが示唆されているが、その機構の詳細は未だ解明されていない²⁾。そこで本プロジェクトでは、パ

¹ 京都産業大学工学部嘱託職員

ンコムギに表現型の変化をもたらす *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムの原因遺伝子の探索を目的に、種々の分子生物学的実験を行う。今年度はその第一歩として、網羅的サザン解析によるゲノム構造の比較、構造変異を示す遺伝子の塩基配列レベルの解析とノーザン解析による遺伝子発現の調査を行った。以下その結果を報告する。

2. 材料及び方法

2.1. 植物材料

本研究に用いた植物材料を表1に示す。普通系パンコムギ (*T. aestivum*) の1品種 Chinese Spring (以下 C52 系統) と、Chinese Spring の核に *Ae. mutica* の T 型細胞質を導入した系統 (以下 C13 系統)、同じく Chinese Spring の核に T² 型細胞質を導入した系統 (以下 C14 系統) を実験材料として用いた。なお、C13 系統は C52 系統、C14 系統と比べて出穂が遅延すること、C14 系統は雄性不稔を示すことが知られている。

2.2. 実験方法

実験方法の詳細は論文に譲るが、サザン解析は以下の方法で行った。すなわち C52, C13, C14 各系統から調製した全 DNA 約 10 µg を制限酵素 *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SalI* により完全消化し、これらをアガロースゲル電気泳動した後、ナイロンメンブレンに転写した。PCR により得たパンコムギミトコンドリアの各種遺伝子断片をプローブに用いて、サザンハイブリダイゼーションを行い、Dig システムの発光系によりシグナルを検出した。またノーザン解析には、開花前の植物の葉及び穂から調製した全 RNA を使用した。これらの実験を含め、クローニング、シーケンシングなどの分子生物学的実験は、一般的な方法によった。

3. 結果及び考察

3.1. パンコムギミトコンドリア遺伝子プローブを用いた網羅的サザン解析

昨年、パンコムギ (*T. aestivum* cv. Chinese Spring) のミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定さ

表1 実験に用いた植物材料

a) Alloplasmic and euplasmic lines of common wheat

Code	Plasma type ¹⁾	Nuclear genotype ²⁾	Cytoplasm donor		
			Group or Section	Species	Ploidy
C13	T	CS	Amblyopyrum	<i>Ae. mutica</i>	2×
C14	T ²	"	"	"	2×
C52	B	"	Dinkel	<i>T. aestivum</i>	6×

¹⁾ After Tsunewaki (1996)

²⁾ *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring

れ、このゲノムは全長 452,528 bp の環状 DNA 分子であること、その中に 35 個のタンパク質をコードする遺伝子、3 種の rRNA 遺伝子、17 個の tRNA 遺伝子が含まれていることが明らかとなった³⁾。この情報をもとに、今ではパンコムギと、C13、C14 系統のミトコンドリアゲノムの間にもどのような構造の違いが存在するのか、より詳細に調べることが可能となっている。そこで本研究ではまず、パンコムギのミトコンドリアゲノムに存在するタンパク質をコードする遺伝子の、ほぼすべてを網羅したプローブによるサザン解析を行い、系統間のミトコンドリアゲノムの構造をより広範囲に比較した。図 1 に、28 種類の遺伝子プローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す。また表 2 に、各遺伝子プローブを用いて得られたシグナルから求めた、系統間で同じサイズを示す制限断片のパーセンテージを掲げる。得られた結果をまとめると、C13、C14 系統のミトコンドリアゲノムには、リファレンスとした C52 系統も含めて 3 系統すべてに共通な遺伝子領域、C13、C14 系統間で共通であるが C52 系統とは異なる領域、C13 と C14 系統間で構造の異なる領域が存在することが示された。例えば *nad1* 遺伝子などでは、C13 と C14 系統間、また C52 と C13、C14 系統間のいずれにおいても表中で 100% と表記されている。したがってこの遺伝子を含むゲノム領域は、3 系統すべてにわたって共通であると推測される。一方で、*atp1*、*cox1*、*rrn18+5* 遺伝子領域では、C52 と C13、C14 系統間だけではなく、C13 と C14 の系統間にも遺伝子コピー数の違いを示唆する顕著なハイブリダイゼーションシグナルの違いが認められた（データ未掲載）。そこで、本研究ではこの 3 遺伝子領域に注目し、その全体的な構造と塩基配列を各系統間で比較した。

3.2. *atp1*、*cox1*、*rrn18+5* 遺伝子領域のシーケンシング

図 2 に、各遺伝子領域の構造の模式図を示す。*atp1*、*cox1*、*rrn18+5* 遺伝子領域の塩基配列の決定により、次のような事実が明らかになった。1) C14 系統の *atp1* 遺伝子下流の *atp9* 遺伝子、C13 系統の *cox1* 遺伝子内にはそれぞれ配列の分岐点があり、分岐点を持つ系統では、それぞれ他系統には無い組換え型のオープンリーディングフレーム (*orf*) を組むことができる。2) *Ae. mutica* の *cox1* 遺伝子の上流には、パンコムギには無い *orf260* 遺伝子が存在する（なお、これは C13、C14 系統に共通して認められる）。3) C14 系統の *rrn18+5* 遺伝子領域には、3' 部分が他の配列と置き換わった異常な *rrn18* 遺伝子が存在する。

一般に、細胞質雄性不稔を示す植物のミトコンドリアゲノム上には、既知のミトコンドリア遺伝子配列を部分的に含む、特異的なキメラ遺伝子が存在する。さらに、トウモロコシの NCS 突然変異体の生育異常は、ミトコンドリア遺伝子の欠損、またはキメラ遺伝子による正常型遺伝子の転写阻害が原因と考えられており、ミトコンドリア遺伝子の構造変異と雄性不稔以外の異常な表現型との関連が示唆されている。したがってこの 3 遺伝子領域の構造変異により生じた新たな *orf* は、雄性不稔及び出穂遅延を引き起こす原因遺伝子の有力な候補と考えられた。

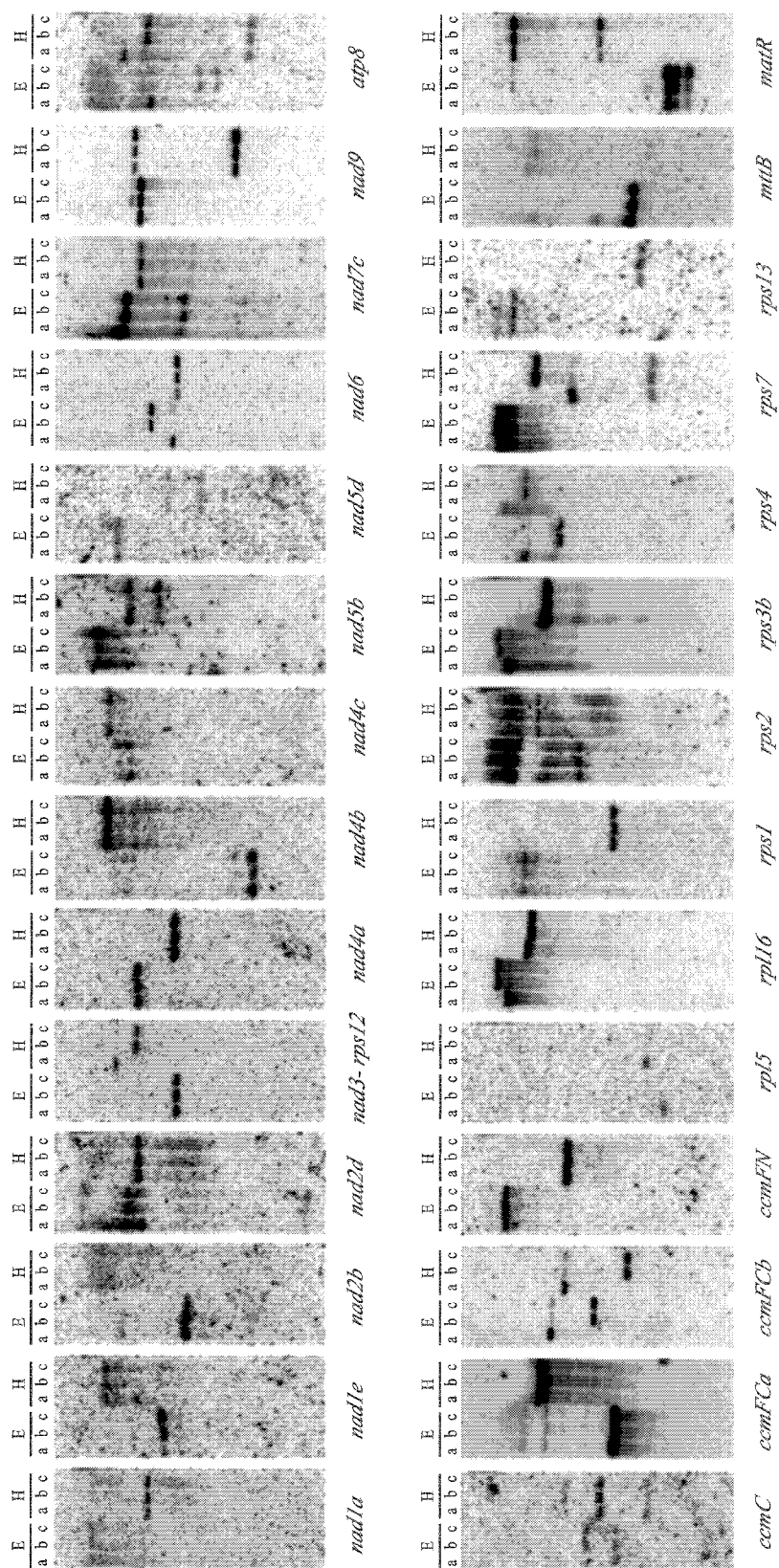


図1 ミトコンドリア遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション
 EはEcoRI, HはHindIIIサイトを, aはC52, bはC13, cはC14系統を示す。

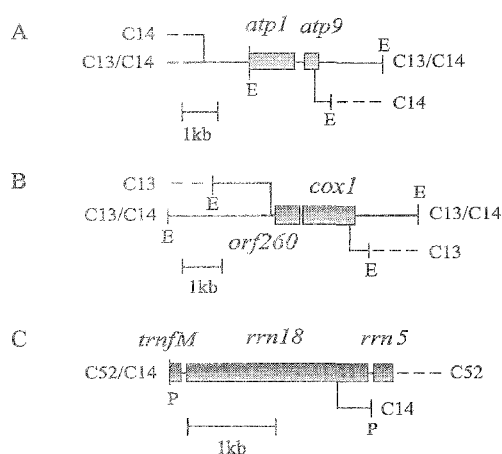


図2 *atp1*, *cox1*, *rrn18+5* 遺伝子領域の構造
Aは*atp1*, Bは*cox1*, Cは*rrn18+5* 遺伝子領域を, EとPはそれぞれ *EcoRI*, *PstI* サイトを示す。

3.3. 変異遺伝子領域のノーザン解析

前述のサザン解析とシーケンシングの結果, *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムにはパンコムギには無い4種類のキメラ遺伝子が存在することが初めて明らかになった。これらの変異領域に存在する各遺伝子の発現を調査するため, 各系統から調製した全RNAを用いノーザン解析を行った(図3)。その結果, *atp1* および *rrn18* 遺伝子では, ハイブリダイゼーションシグナルに違いは見出されず, 両遺伝子領域に存在するキメラ遺伝子は発現していないこと, キメラ遺伝子の存在が正常型遺伝子の発現パターンに影響を与えていないことが示された。一方, *cox1* 遺伝子に関しては, 細胞質置換系統で, パンコムギと比べ mRNA の蓄積量が著しく低下していることがわかった。 *orf260* 遺伝子の発現パターンとの比較より, 細

表2 各種ミトコンドリア遺伝子プローブを用いたサザン解析の結果

Probe	Common fragments (%)		Probe	Common fragments (%)	
	C13 vs. C14	C52 vs. (C13, C14)		C13 vs. C14	C52 vs. (C13, C14)
<i>nad1a</i>	100	100	<i>atp6</i>	100	31
<i>nad1e</i>	100	100	<i>atp8</i>	100	25
<i>nad2b</i>	100	100	<i>ccmC</i>	100	80
<i>nad2d</i>	100	50	<i>ccmFCa</i>	100	100
<i>nad3-rps12</i>	100	50	<i>ccmFCb</i>	100	0
<i>nad4a</i>	100	100	<i>ccmFN</i>	100	100
<i>nad4b</i>	100	100	<i>rpl5*</i>	-	-
<i>nad4c</i>	100	100	<i>rpl16</i>	100	0
<i>nad5b</i>	100	100	<i>rps1</i>	100	100
<i>nad5d</i>	100	100	<i>rps2</i>	100	100
<i>nad6</i>	100	50	<i>rps3b</i>	100	0
<i>nad7c</i>	100	100	<i>rps4</i>	100	0
<i>nad9</i>	100	100	<i>rps7</i>	100	25
<i>cob</i>	100	25	<i>rps13</i>	100	100
<i>cox1</i>	55	0	<i>matR</i>	100	100
<i>cox2</i>	80	90	<i>mttB</i>	100	0
<i>cox3</i>	100	0	<i>rrn18-rrn5</i>	46	25
<i>atp1-atp9</i>	67	0	<i>rrn26</i>	100	70
<i>atp4</i>	100	0			

* C13, C14系統ではシグナルが検出されず, *Ae. mutica* では *rpl5* 遺伝子は核ゲノムへ移行していると推測される。

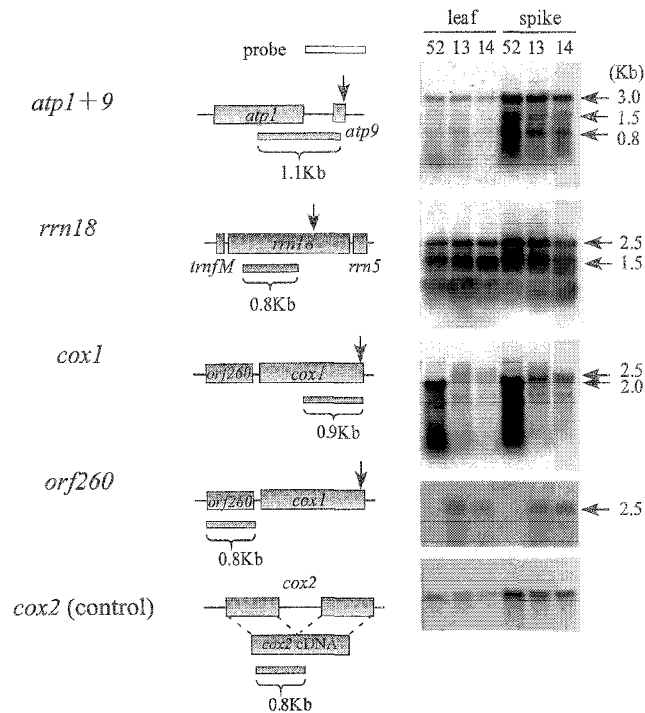


図3 変異遺伝子領域のノーザンハイブリダイゼーション

矢印は遺伝子内の分岐点を，52はC52，13はC13，14はC14系統を示す。

胞質置換系統では *cox1* 遺伝子上流に存在する *orf260* 遺伝子のプロモーターが，すぐ下流に存在する *cox1* 遺伝子の発現を抑制している可能性が考えられる。ただしこの現象は，C13，C14の両系統ともに生じていたので，それぞれの系統の表現型とどのように結びつくのか，現段階ではわからない。今後は，*cox1* 遺伝子のタンパク質レベルでの比較，また複合体IV (*cox1* 遺伝子の翻訳産物がサブユニットの一部を構成する)の活性の検討などを行い，*cox1* 遺伝子と表現型との関連を考えていく予定である。

なお，C13，C14両系統の *cox1* 遺伝子上流に発見された *orf260* 遺伝子は，パンコムギに雄性不稔性を付与することで知られる *T. timopheevi* 細胞質のミトコンドリアの原因遺伝子，*orf256* のホモログである。*orf260* 遺伝子の転写産物は雄性可稔のC13，雄性不稔のC14両系統の両方に観察されたが，翻訳産物の有無はまだ調べられていない。また *orf256* のホモログは，*Ae. mutica* だけではなく，他のいくつかのコムギ・エギロプス属植物にも存在するが，*T. timopheevi* もしくは *Ae. speltoides* 細胞質を持つ雄性不稔コムギの *orf256* を除けば，いずれも転写されない，もしくは転写はされるが翻訳されないことが知られており，コムギにおける *orf256/260* 遺伝子と雄性不稔形質との密接な関係が示唆される⁴⁾。したがって，何らかの理由で雄性不稔を示すC14系統にのみ *orf260* 遺伝子の翻訳産物が存在する可能性がある。今後，ウエスタン解析などタンパク質レベルの研究が必要と考えている。

4. おわりに

以上, *Ae. mutica* 細胞質を持つ細胞質置換系統 (コムギ) を材料に用いた, *Ae. mutica* とパンコムギのミトコンドリアの比較ゲノム解析の一端を報告した。*Ae. mutica* は希少な野生植物であり, この植物自体から大量のミトコンドリアや mtDNA を調製することは, 事実上不可能である。細胞質置換系統が育成されて初めて, この植物のミトコンドリアゲノムのユニークな特性が顕在化したことはもとより, もしこれらの細胞質置換系統が無ければ, *Ae. mutica* のミトコンドリアの研究を効率よく進めることは困難であろう。植物オルガネラ研究における細胞質置換系統の有効性を改めて提唱したい。現在, ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) の助けを借りて, 雄性不稔を示す C14 系統の増殖を図っている。この系統の種子増殖を終える次年度には, プロテオミクスのアプローチも可能になるものと期待している。

5. 謝辞

本報告の結果は, 堀川明彦氏 (本学嘱託職員, 工学研究科生物工学専攻平成 18 年修了), 松崎準氏 (和研薬, 工学研究科生物工学専攻平成 16 年修了) の修士論文の結果を含む。本研究で用いた細胞質置換系統を最初に提供していただいた常脇恒一郎博士, その後, 植物育成の場を提供していただいている NBRP に感謝の意を表す。

参考文献

- 1) Tsunewaki K, Wang GZ, Matsuoka Y (1996) Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*. 1. Production of alloplasmic common wheats and their fertilities. *Genes Genet Syst.* 71: 293–311
- 2) Terachi T, Tsunewaki K. (1986) The molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops*. 5. Mitochondrial genome diversity among *Aegilops* species having identical chloroplast genomes. *Theor. Appl. Genet.* 73: 175–181
- 3) Ogihara Y, Yamazaki Y, Murai K, Kanno A, Terachi T, Shiina T, Miyashita N, Nasuda S, Nakamura C, Mori N, Takumi S, Murata M, Futo S, Tsunewaki K (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 33: 6235–6250
- 4) Hedgcoth C, el-Shehawi AM, Wei P, Clarkson M, Tamalis D (2002) A chimeric open reading frame associated with cytoplasmic male sterility in alloplasmic wheat with *Triticum timopheevi* mitochondria is present in several *Triticum* and *Aegilops* species, barley, and rye. *Curr Genet* 41: 357–365

京 都 産 業 大 学

先端科学技術研究所所報 第6号 (抜刷)

平 成 19 年 7 月 発 行

ハマダイコンにおける細胞質の分化および稔性回復遺伝子の分布

山 岸 博

京 都 産 業 大 学
先端科学技術研究所

ハマダイコンにおける細胞質の分化および稔性回復遺伝子の分布

山 岸 博
京都産業大学工学部生物工学科

Abstract

Cytoplasmic male sterility and pollen fertility restoration ability against it are crucial characteristics for F_1 hybrid breedings of various important crops. In this report I examined the distribution of the mitochondrial gene (*orf138*) inducing the Ogura male sterility and the restorer gene in Japanese and Korean wild radishes.

DNA was isolated individually from 259 radish plants collected in 15 Japanese and two Korean populations. By the PCR with the DNA, the presence of *orf138* was detected. For the plants having the *orf138*, pollen fertility was observed and the plants showing normal fertility were judged to have the restorer gene. On the other hand, the plants with normal cytoplasm were crossed as the pollen parent with the Ogura male-sterile variety, 'MS - Gensuke'. Based on the observation of the pollen fertility of the hybrids, presence of the restorer gene and the genotype were determined for each pollen parent.

While 39% of the wild radishes possessed the *orf138*, most of them (97%) showed normal pollen fertility and were judged to contain the restorer gene. Among the radishes with the normal cytoplasm, 16% lacked the restorer gene, whereas 34% were estimated as homozygotes for the gene. There was no correlation between the frequency of *orf138* and that of the plants with fertility restorer gene in the populations. The origin of the restorer gene and mechanisms keeping its high frequency in wild radish populations should be clarified further.

1. はじめに

植物の品種改良の長い歴史の中で、前世紀に開発された F_1 育種法は、農業生産に極めて大きく貢献した。たとえばアメリカのトウモロコシ生産量は20世紀後半の50年間で2.46t/ha (1948-1952年) から8.60t/ha (2000年) へと約3.5倍に増加したが¹⁾、この主たる要因は F_1 育種の普及にある。このような F_1 育種による増収効果は、トウモロコシにとどまらず、イネ、ナタネ、ヒマワリ、テンサイ、トマト、タマネギ、キャベツなど極めて多数の農作物で認められているところである。

F₁育種を確実にかつ効率的に実施するためには、種子親系統の自殖を防ぎ、両親間の交雑を確実に起こす操作が必須である。そのために最も広く利用されている形質が細胞質雄性不稔性である。細胞質雄性不稔は、ミトコンドリアの遺伝子の働きによって、葯における花粉の形成が不可能になる一方で、雌性器官の受精能力は正常のままであるという現象で、現在までに200種を超える植物で観察されている。それらのうちダイコンで発見されたオグラ型細胞質雄性不稔性は、ダイコンだけでなく同じアブラナ科の*Brassica*属作物にも導入されて、ナタネ、キャベツ、ハクサイなど多くの重要な作物でF₁育種に用いられている。このオグラ型雄性不稔性の遺伝的来歴は長い間不明確であった。しかし著者らの一連の研究によって、オグラ型雄性不稔性の原因遺伝子(ミトコンドリアの*orf138*)は、ダイコン属の野生種(*Raphanus raphanistrum*)で生じ、それが日本のハマダイコンに伝播したものである事が解明された²⁻⁴⁾。

細胞質雄性不稔性はF₁育種において確実なF₁種子の採種をもたらすものである。しかしながら、子実を利用する作物においてこの性質を利用する場合には、F₁採種のためのもう一方の親である花粉親に稔性回復遺伝子を保有させる必要がある。さもなければ、F₁品種は旺盛な栄養生長を示すものの、全個体が雄性不稔となり、子実生産は全く期待できないことになる。このため、多くのアブラナ科作物のうちでも、特に油料作物として世界的に重要なナタネ(*B. napus*)などでこの性質を利用するためには、同時に稔性回復遺伝子を用いることが必要となる。ところが現在まで、オグラ型雄性不稔性に対する稔性回復遺伝子は、それが必要とされる*Brassica*属作物では発見されていない。

著者はオグラ型雄性不稔性に対する稔性回復遺伝子の分布を、広く栽培・野生ダイコンで調査した。その結果、この遺伝子が*R. raphanistrum*およびハマダイコンの両野生ダイコンならびにヨーロッパおよび中国の栽培ダイコンに観察される一方で、日本の栽培ダイコンではほとんど認められないことを明らかにした⁵⁾。このような異なる種類の栽培、野生ダイコンに存在する稔性回復遺伝子の互いの異同、およびそれらのダイコンにおける細胞質の分化と稔性回復遺伝子の有無の間の対応関係を明らかにすることは、この遺伝子の実用的利用の見地からも、また野生植物における生殖生態学の視点からも非常に興味を持たれる。

そこで本研究では、我国および韓国で収集されたハマダイコンについて、まず大規模に細胞質の分化を調査した。次に、それらの花粉稔性を観察するとともに、交雑実験を行うことにより稔性回復遺伝子の有無を明らかにした。それらの結果にもとづき、ハマダイコンの集団におけるミトコンドリアの雄性不稔遺伝子(*orf138*)と、核の稔性回復遺伝子の分布の対応関係を解明しようとした。

2. 材料および方法

我国で収集されたハマダイコン15集団および韓国のハマダイコン2集団を用いた(表—1)。

表-1 ハマダイコンにおける *orf138* の分布と花粉稔性

集 団	調査個体数	<i>orf138</i> を 持つ個体数	可稔個体数
西表島	8	1	8
残波岬	8	5	8
栗 田	21	0	21
奈多浜	10	2	10
室 戸	19	9	19
今 宿	12	2	12
千 歳	18	12	18
伊良湖	18	0	18
串本野	16	14	14
仁 摩	19	3	19
温海温泉	16	14	16
間 島	15	1	15
美浜町	18	5	18
福 江	13	1	13
長 門	15	2	15
城 山	14	12	13
表 善	19	18	19
計	259	101 (39.0%)	256 (98.8%)

各集団について表-1に示した数の個体を栽培し、各個体からDNAを単離した。単離したDNAを用いて、オグラ型雄性不稔性の原因遺伝子であるミトコンドリアの*orf138*を増幅するPCRを行い³⁾、各個体における*orf138*の有無を明らかにした。その後、調査個体が開花した時点で各個体における花粉形成の有無を調査した。上記のPCRによって*orf138*の存在が示され、かつ開花時の調査により花粉の形成が観察された個体は、稔性回復遺伝子を持つと判定した。一方*orf138*を持ちかつ花粉不稔性を示す個体は、稔性回復遺伝子を持たないと判定した。

次にPCRによって*orf138*を持たないことが示された正常型細胞質の個体については、オグラ型雄性不稔性の‘MS源助’との交雑を行った。すなわち‘MS源助’を母本として、これにハマダイコンの各個体の花粉を授粉することによって、雑種種子を得た。得られた雑種種子を播種して、開花まで育てた。‘MS源助’とハマダイコンの個体間の各組合せごとに雑種個体における花粉形成の有無を調査し、各組合せが可稔個体で固定しているか、不稔個体で固定しているかあるいは可稔個体と不稔個体が分離するかを識別した。これによって、交雑に用いた正常型細胞質のハマダイコンが稔性回復遺伝子を持つか否か、および稔性回復遺伝子に関する遺伝子型がホモかヘテロかを推定した。

3. 結果および考察

3.1 ハマダイコンにおける *orf138* の分布と雄性不稔性

PCRの結果明らかになった、ミトコンドリアの雄性不稔性原因遺伝子 *orf138* の分布を表-1 に示した。調査した17集団のうち、*orf138* を持つ個体が全く観察されなかった集団は2集団（‘栗田’、‘伊良湖’）にとどまり、他の15集団にはすべて *orf138* を持つ個体が含まれていた。集団中の *orf138* を持つ個体の頻度は様々であったが、特に‘串木野’（鹿児島県）、‘温海温泉’（山形県）および‘城山’と‘表善’（いずれも韓国）の集団では80%以上の個体が *orf138* を持っていた。*orf138* を持つ個体の頻度と各集団の地理的な位置との間には、特定の傾向は見出せず、調査したハマダイコン全体では、39%にあたる101個体が *orf138* を有していた。

一方、これら101個体のうち、実際に雄性不稔性を示した個体は、‘串木野’の2個体と‘城山’の1個体の計3個体だけであった。この不稔個体の割合は調査個体全体のわずか1.2%であり、他の個体はすべて正常な花粉形成を示した。このうち *orf138* を持ちながら、可稔性を示した98個体は、いずれも稔性回復遺伝子を持つと判定された。

3.2 正常型細胞質のハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の分布

次に、*orf138* を持たない正常型細胞質のハマダイコン個体を花粉親として、オグラ型雄性不稔性の‘MS源助’との交雑を行った。交雑の結果、花粉稔性の調査が可能なF₁が5個体以上得られた交雑組合せの数は、全体で106組合せとなった（表-2）。ハマダイコンの集団の中では‘温海温泉’の個体を用いた交雑で、必要な数のF₁が得られなかった以外は、すべての集団で1～16の組合せのF₁が獲得された（表-2）。

得られたF₁の花粉稔性を調査し、雄性不稔性の分離の有無を明らかにすることで、花粉親に用いたハマダイコンの稔性回復遺伝子に関する遺伝子型を以下のように推定した。すなわち、

- a) F₁の5個体以上がすべて可稔である組合せでは、親のハマダイコンは、稔性回復遺伝子をホモに持つ。
- b) F₁の中で可稔個体と不稔個体が分離する組合せでは、親のハマダイコンは稔性回復遺伝子をヘテロに持つ。
- c) F₁の5個体以上がすべて不稔である組合せでは、親のハマダイコンは稔性回復遺伝子を持たない。

このような基準で推定した、正常型細胞質のハマダイコンの稔性回復遺伝子に関する遺伝子型を表-3にまとめた。調査16集団のすべてで稔性回復遺伝子を持つ個体が観察された。特に、集団中のすべての個体が正常型細胞質を持っていた2集団（‘栗田’、‘伊良湖’）においても、それぞれ75%、87.5%と大半の個体が稔性回復遺伝子を有していた。さらに、*orf138* を持つ個体を含む14集団のうち‘残波岬’、‘今宿’、‘千歳’、‘串木野’、‘間島’、‘福江’、‘長門’およ

表-2 ハマダイコンにおける正常型細胞質の個体を用いた‘MS源助’との交配数

集 団	調査個体数	正常型個体数	交配個体数
西表島	8	7	7
残波岬	8	3	2
栗 田	21	21	12
奈多浜	10	8	7
室 戸	19	10	9
今 宿	12	10	10
千 歳	18	6	3
伊良湖	18	18	16
串木野	16	2	1
仁 摩	19	16	12
温海温泉	16	2	0
間 島	15	14	5
美浜町	18	13	10
福 江	13	12	5
長 門	15	13	5
城 山	14	2	1
表 善	19	1	1
計	259	158	106

び‘表善’の8集団では、全個体が稔性回復遺伝子を持っていた。そうした中で‘室戸’のハマダイコンは、調査9個体中5個体で稔性回復遺伝子が認められず、他の集団と比較して、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合が著しく低かった。

調査したハマダイコン全体でみると、調査個体の84%に稔性回復遺伝子が存在し、かつ全体の50%の個体が稔性回復遺伝子をヘテロに持つことが明らかになった(表-3)。これに対して、稔性回復遺伝子を持たない、遺伝子型が劣性ホモの個体の割合は全体で16%で、稔性回復遺伝子をホモに持つ個体の割合(34%)の約半分となった。一方、この稔性回復遺伝子を持たない個体の割合は、*orf138*を持ちながら稔性回復遺伝子を持たない個体の割合と比較して、明らかに増加していた(表-4)。

オグラ型細胞質を持つ個体では、稔性回復遺伝子がない場合、その個体の雄性不稔化に直結する。これは、その個体における種子稔性の低下につながり、適応度を著しく下げる。このため、*orf138*を持つ個体では稔性回復遺伝子を持つ方向に自然選択が働き、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合が極めて高くなると考えられる。これに対して、正常型細胞質の個体においては、稔性回復遺伝子の有無はその個体の適応度に全く影響を与えない。このことが、正常型細胞質のハマダイコンにおいて、*orf138*を持つハマダイコンと比較して、稔性回復遺伝子を持たない個体が増加した理由と考えられる(表-5)。しかしその一方で、正常型のハマダイコンにお

表-3 正常型細胞質のハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の遺伝子型

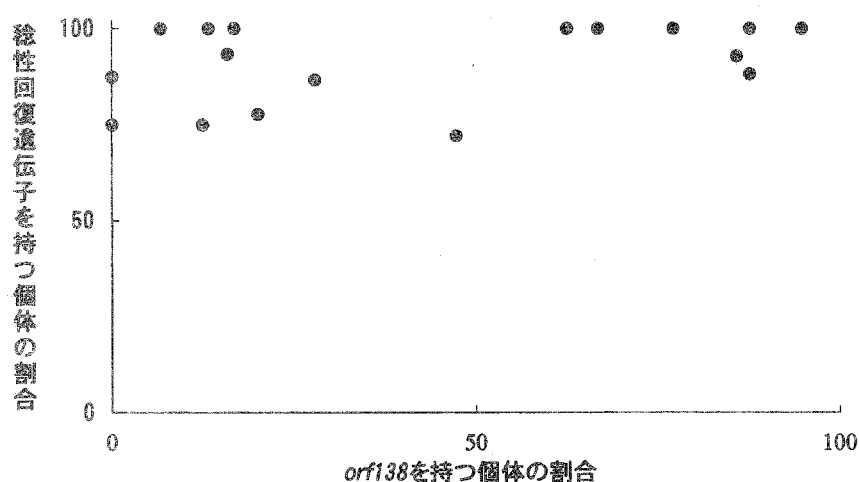
集 団	交配個体数	遺伝子型別個体数		
		Rfホモ	ヘテロ	rfホモ
西表島	7	1	4	2
残波岬	2	2	0	0
栗 田	12	1	8	3
奈多浜	7	3	2	2
室 戸	9	0	4	5
今 宿	10	8	2	0
千 歳	3	3	0	0
伊良湖	16	6	8	2
串木野	1	0	1	0
仁 摩	12	5	6	1
間 島	5	2	3	0
美浜町	10	1	7	2
福 江	5	2	3	0
長 門	5	1	4	0
城 山	1	0	1	0
表 善	1	1	0	0
計	106	36 (34.0%)	53 (50.0%)	17 (16.0%)

表-4 ハマダイコンにおける細胞質の分化と稔性回復遺伝子の分布

集 団	orf138を持つ個体		正常型細胞質を持つ個体		計 (C)	(A) + (B) / (C) %
	Rfを持つ (A)	Rfを 持たない	Rfを持つ (B)	Rfを 持たない		
西表島	1	0	5	2	8	75.0
残波岬	5	0	2	0	7	100
栗 田	0	0	9	3	12	75.0
奈多浜	2	0	5	2	9	77.8
室 戸	9	0	4	5	18	72.2
今 宿	2	0	10	0	12	100
千 歳	12	0	3	0	15	100
伊良湖	0	0	14	2	16	87.5
串木野	12	2	1	0	17	88.2
仁 摩	3	0	11	1	15	93.3
温海温泉	14	0	1	0	15	100
間 島	1	0	5	0	6	100
美浜町	5	0	8	2	15	86.7
福 江	1	0	5	0	6	100
長 門	2	0	5	0	7	100
城 山	11	1	1	0	14	92.9
表 善	18	0	1	0	19	100
計	98	3	90	17	211	

表-5 ハマダイコンにおける細胞質のタイプと稔性回復遺伝子の有無の関係

ミトコンドリア の <i>orf138</i>	稔性回復遺伝子		計
	あり	なし	
あり	101	3	104
なし	89	17	106
計	190	20	210

図-1 ハマダイコンの集団における *orf138* を持つ個体と稔性回復遺伝子を持つ個体の割合の関係

いても、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合は80%を越え、かつこの遺伝子をホモに持つ個体の割合が劣性ホモ個体の割合の2倍以上となっていた（表-3）。これは、ハマダイコンの集団において、*orf138* を持つ個体に極めて高い頻度で存在する稔性回復遺伝子が正常型細胞質の個体に、交雑を通して移入していることを示唆しているものと考えられる。

3.3 ハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の頻度

上記2項で述べた稔性回復遺伝子の分布に関する観察結果を、*orf138* を持つ個体と正常型細胞質の個体とでとりまとめた結果を表-4に示した。その上で、各集団について、稔性回復遺伝子を持つ個体の割合を算出した（表-4）。ハマダイコンの集団における稔性回復遺伝子を持つ個体の割合は、すべて70%以上であり、かつ全個体が稔性回復遺伝子を持つ集団が半数近く認められた。さらに、集団中の *orf138* を持つ個体の割合と稔性回復遺伝子を持つ個体の割合との関係をみると（図-1）、前者が0%から95%まで、後者が72%から100%まで変動する中で、両者の間には相関は観察されなかった。このことは、ハマダイコンの集団においては、オグラ型雄性不稔細胞質を持つ個体の割合に関係なく、稔性回復遺伝子を持つ個体が極めて高

い割合で存在することを明確に示している。

著者の過去の解析において、栽培ダイコンのうち、日本の品種では稔性回復遺伝子を持つものはほとんど存在せず、中国のダイコンおよびハツカダイコンに稔性回復遺伝子を持つものが散見されている⁵⁾。これら栽培ダイコンとハマダイコンの大きい相違は、栽培ダイコンは大部分が正常型の細胞質を持つのに対してハマダイコンでは40%前後の個体が雄性不稔細胞質を持つことである(表-1参照)。このような細胞質の分化の差のみが、ハマダイコンにおいて特異的に稔性回復遺伝子を持つ個体が多いことの原因であろうか。今後、ハマダイコンの持つ稔性回復遺伝子の由来の解明とあわせて、稔性回復遺伝子を持つ個体が高い割合で存在することのメカニズムをさらに詳しく解明する必要がある。

4. まとめ

1) 細胞質雄性不稔性とそれに対する稔性回復遺伝子は植物の育種において極めて有用な特性である。本研究では、我国および韓国に自生するハマダイコンにおける雄性不稔細胞質と稔性回復遺伝子の分布を解明した。

2) 日本のハマダイコン15集団、韓国のハマダイコン2集団について、各個体よりDNAを単離し、雄性不稔性の原因遺伝子であるミトコンドリアの*orf138*の有無を、PCRによって調査した。次に*orf138*を持つ個体の花粉稔性を調べて、これらの個体が稔性回復遺伝子を持つかどうかを判定した。その一方で、*orf138*を持たない正常型細胞質の個体の花粉を雄性不稔性の系統‘MS源助’に交雑して雑種個体を得た。これら雑種個体の花粉稔性の分離の調査に基づき、交雑に用いた花粉親のハマダイコンが稔性回復遺伝子を持つかどうかを判定した。

3) 調査したハマダイコンのうち39% (101個体) は*orf138*を持っていたが、そのうち98個体は可稔であり、稔性回復遺伝子を持つと判断された。

4) 正常型細胞質を持つハマダイコンにおいては、84%の個体が、稔性回復遺伝子を持っていた。また同遺伝子をヘテロに持つ個体が全体の50%を占めた。

5) 正常型細胞質の個体における稔性回復遺伝子を持たない個体の割合(16%)は、*orf138*を持つ個体におけるそれより高かった。その一方で、ハマダイコンの集団においては、*orf138*を持つ個体の頻度に関係なく、稔性回復遺伝子を持つ個体が高い割合で見出された。

6) このようにハマダイコンにおいては稔性回復遺伝子が高い頻度で認められるが、その由来と分化については今後さらに詳しく解析する必要がある。

引用文献

- 1) 山田 実 (2005) 農業および園芸 80 : 87-90.

- 2) Yamagishi, H. and T. Terachi (1994) *Theor. Appl. Genet.* 87 : 996-1000.
- 3) Yamagishi, H. and T. Terachi (1996) *Theor. Appl. Genet.* 93 : 325-332.
- 4) Yamagishi, H. and T. Terachi (1997) *Plant Breed.* 116 : 323-329.
- 5) Yamagishi, H. (1998) *Genes Genet. Syst.* 73 : 79-83.

京 都 産 業 大 学

先端科学技術研究所所報 第5号 (抜刷)

平 成 18 年 7 月 発 行

*Brassica*属作物における葉緑体の塩基配列の
種間および種内変異

山	岸		博
石	橋	篤	志
川	口	晋	吾

京 都 産 業 大 学
先端科学技術研究所

Brassica 属作物における葉緑体の塩基配列の種間および種内変異

山 岸 博

京都産業大学工学部生物工学科

石 橋 篤 志

京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻

川 口 晋 吾

京都産業大学工学部生物工学科

Abstract

In order to analyse the inter- and intraspecific variations of chloroplast genome in *Brassica* crops, DNA sequences of about 2000bp in the region ranging from *trnL* to *psbG* of chloroplast were determined. Twenty varieties or lines belonging to *B. rapa*, *B. nigra* and *B. oleracea* were used, and total DNA was isolated from young leaves of the individual seedlings. The DNA sequences were determined directly with the CEQ2000XL Auto-sequencer. Sequence variations including nucleotide substitutions and insertion/deletions were observed and the degree of differentiations were evaluated among the plants.

Compared with the regions within the genes (*trnL*, *trnF* and *ndhJ*), much larger variations were found in inter-genic sites, such as *trnL/trnF* and *trnF/ndhJ*. Especially, the latter site contained not only interspecific but also intraspecific nucleotide sequence variations. While the variation between *B. rapa* and *B. oleracea* was rather small, *B. nigra* possessed far larger differences with both of *B. rapa* and *B. oleracea*. In *B. rapa*, which shows large morphological variations in the species, being used as vegetables, oil seed rape and fodders, differentiations among the varieties were found. It is considered that the variations in *B. rapa* would be useful for the detailed phylogenetic studies of this species and the amphidiploid ones, *B. juncea* and *B. napus*, originated from the hybridization between *B. rapa* and *B. nigra* or *B. oleracea*.

1. はじめに

アブラナ科の植物とりわけ*Brassica*属植物には、世界的に広く栽培されて人類の食生活上重要な役割を果たしている作物が多数含まれている。*Brassica*属の作物は2倍体種とそれらの中で生じた種間雑種に由来する複2倍体種とからなっているが、そのうち2倍体種には、表1に

示す3種が存在する。さらに、これら3種の間のすべての組合せによって複2倍体種が生じ、そのいずれもが作物として利用されている。また2倍体作物種とりわけA、C両ゲノム種においては、種内で多様な特性と用途を持つ作物が分化している（表1）。

表1. *Brassica* 属に含まれる作物種およびそれらの種内における分化

種	ゲノム	2n	作物（用途）
<i>B. rapa</i>	A	10	Toria（油料）、Sarson（油料）、ハクサイ（野菜）、ツケナ（野菜）、カブ（野菜、飼料）、ナタネ（油料）
<i>B. nigra</i>	B	8	クロガラシ（香辛料、油料）
<i>B. oleracea</i>	C	9	キャベツ（野菜）、ブロッコリー（野菜）、カリフラワー（野菜）、コールラビー（野菜）、メキャベツ（野菜）、ケール（野菜）、カイラン（野菜）
<i>B. juncea</i>	AB	36	カラシナ（油料、野菜）、タカナ（野菜）
<i>B. napus</i>	AC	38	西洋ナタネ（油料）、ルタバガ（野菜、飼料）
<i>B. carinata</i>	BC	34	アピシニアガラシ（油料、香辛料、野菜）

このような *Brassica* 属内の種分化と種内変異ならびに複2倍体種の存在は、古くからこれらの作物間の系統分化に関する興味を呼んでいた。今日までの様々な方向からの研究によって、複2倍体種のうち *B. juncea* (ABゲノム) はAゲノムを細胞質提供親として、また *B. carinata* (BCゲノム) はBゲノム種を細胞質提供親として成立したことが明らかになっている。さらに、3種の2倍体種のうち、*B. rapa* と *B. oleracea* は互いに類似した細胞質ゲノム（葉緑体およびミトコンドリアゲノム）を持つものに対して、*B. nigra* はこれら両種とは異なる細胞質ゲノムを持つことが明らかになっている¹⁻³⁾。一方、*B. rapa* および *B. oleracea* の種内には上記のように多様な形態的変異が存在しているが、これら両種における細胞質ゲノムの種内分化については現在まで全く解析がなされていない。したがって、たとえばABゲノムの *B. juncea* がAゲノム種のうちどのような植物を母本として成立したか等、複2倍体種の起源についての詳細な解明は不可能な状態にある。このような細胞質ゲノムの種内変異の分析には、葉緑体ゲノムの塩基配列を調査することが有効である⁴⁻⁶⁾。

そこで、本研究においては *Brassica* 属の2倍体種3種における葉緑体ゲノムの分化を明らかにすることを目的として、3種に属する多数の品種・系統を用いて、葉緑体の *trnL* (UAA) から *psbG* に至る約2,000bpの領域の塩基配列を決定した。その結果、A、B、C3ゲノム種間の塩基配列変異が明らかになるとともに、各ゲノムにおける種内変異の存在も認められた。これらのことから、*Brassica* 属作物の細胞質の分化を総合的かつ詳細に解明するための足がかりが得られた。

2. 材料及び方法

2. 1 植物材料

表2に示した*Brassica*属の2倍体種3種に属する20品種・系統を用いた。これらのうち表中にTで示した‘Torja’, ‘Sarson’ および*B. nigra*の3系統は東北大学より、またSで示した‘温海カブ’などの5品種は生物資源研（農業研究機構）より分譲を受けたものであり、その他は著者らが独自に収集したか、または市販種子を購入したものである。

これらの品種・系統の種子を温室内で播種し、生育した幼苗の本葉からTotal DNAを単離した。得られたDNAを用いて、各個体の葉緑体における塩基配列を決定した。

表2. *Brassica*属葉緑体の塩基配列の解析に用いた材料

種	系統・品種 ^a
<i>B. rapa</i> (A)	Toria-504 (T)、Sarson C-665 (T) 温海カブ (S)、金町小カブ (S)、切葉天王寺カブ (S)、 山カブ (S)、野生カブ (S) 丸葉壬生菜、ハクサイ ‘野崎2号’、開田カブ、スダキナ
<i>B. nigra</i> (B)	Ni-108 (T)、Ni-110 (T)、Ni-135 (T)
<i>B. oleracea</i> (C)	キャベツ ‘富士早生’、カリフラワー ‘野崎早生’、カイラン、ブロッコリー ‘ドシコ’、ケール ‘青汁用ケール’、野生ケール ‘O-169’

a (T) は東北大学より、(S) は生物資源研より導入したことを示す。

2. 2 葉緑体の塩基配列の解析

各個体について得られたDNAを鋳型として、図1に示した葉緑体のArabidopsis thalianaで明らかにされている葉緑体の塩基配列¹⁾を参考にした。各個体について得られた塩基配列に基づき、調査領域における塩基配列変異の数を、塩基置換と挿入/欠失に分類していくつかの領域ごとにまとめるとともに、塩基配列変異の種間および種内変異の存在とその大きさを評価した。

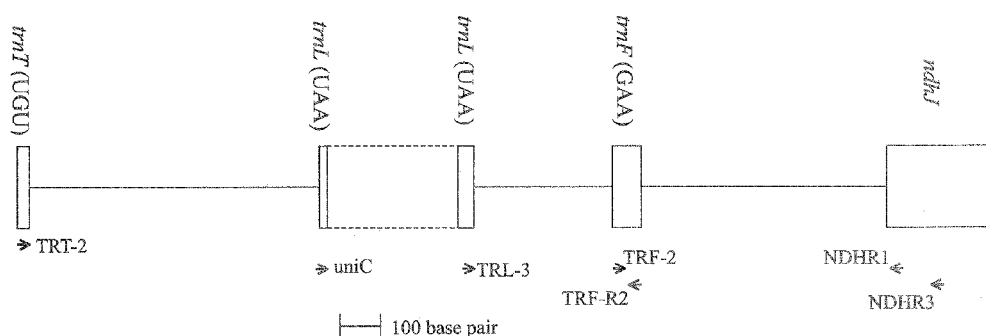


図1. *Brassica* 属作物における葉緑体の塩基配列変異の解析に用いた領域

3. 結果および考察

3. 1 調査領域における構造の変異

調査領域のうち、*trnF* (GAA) と *ndhJ* の遺伝子間領域においては、両遺伝子内のプライマーを用いたPCRによって、供試品種・系統間でPCR産物のサイズの差が検出された (図2)。検出されたサイズの差には種間変異のみでなく種内変異も観察された。すなわち、*B. rapa* (Aゲノム種) においては、'Torja-504'、'丸葉壬生菜' および '野崎2号' が同一のサイズを示すのに対して、'Sarson C-665' は、これらより大きい増幅断片を有していた。また *B. oleracea* (Cゲノム種) においては多くの品種で *B. rapa* より小さいサイズのPCR産物が認められた中で、'青汁用ケール' のみが *B. rapa* と同様のサイズのDNA増幅を示した。さらに *B. nigra* (Bゲノム種) の2系統のうち、'Ni-110' が *B. oleracea* よりさらに小さいサイズの増幅断片を生じる一方で、'Ni-135' は *B. rapa* と同様の大きさのPCR産物を持っていた。なお、図2の結果より、これら *Brassica* 属植物のこの領域における塩基配列は、いずれも *Arabidopsis* より大きいサイズであることが認められた。

このように、*Brassica* 属作物においてPCRレベルで検出されるDNAサイズの差が存在することは、これら植物の葉緑体における *trnF* と *ndhJ* の遺伝子間領域に、数10bp以上の挿入/欠失によると考えられる構造変異が存在することを示していると推定された。しかも、その変異が種間で観察されたのみでなく、3種のいずれにおいても種内の個体間で観察されたことは、この領域に豊富な塩基配列変異が蓄積されている可能性があることを示唆しているものと判断された。一方これに対して、*trnL* から *trnF* に至る領域においては、このようなPCRで検出できる顕著な塩基配列数の差は存在しなかった。

そこで、3種のうち供試個体数の少なかった *B. nigra* について、調査系統と系統内の個体数をふやして同領域のPCRを行った。その結果 (図3)、'Ni-112'、'Ni-108' および 'Ni-138' はいずれも全個体が 'Ni-110' と同一のサイズのPCR産物を持っていたのに対して、'Ni-135'

は調査した4個体すべてがこれより大きいサイズのDNAの増幅を示した。このことから*B. nigra*は種の特徴としては、*trnF/ndhJ*領域において*B. oleracea*よりもさらに塩基配列数が少ないものの、その中で‘Ni-135’のみが何らかの理由で*B. rapa*と同様のサイズのPCR産物を生じたものと考えられた。

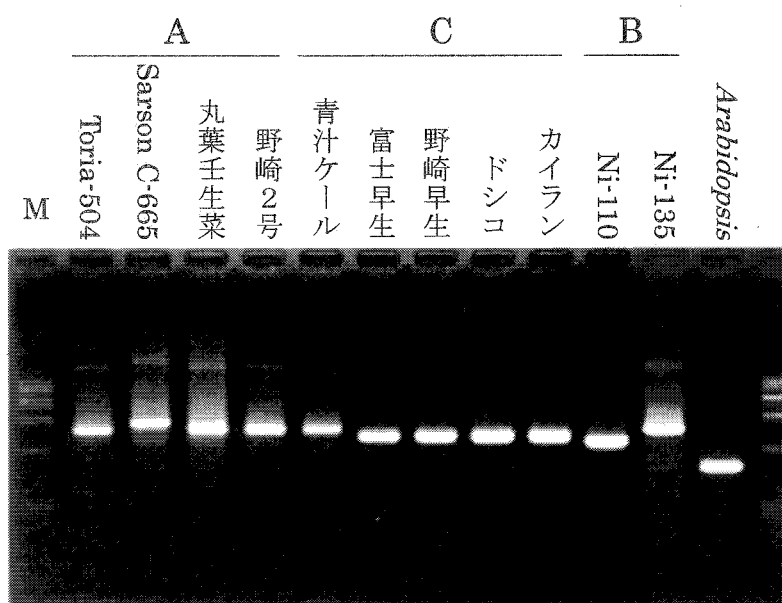


図2. 葉緑体の*trnF*と*ndhJ*の遺伝子間領域におけるPCR産物のサイズの差

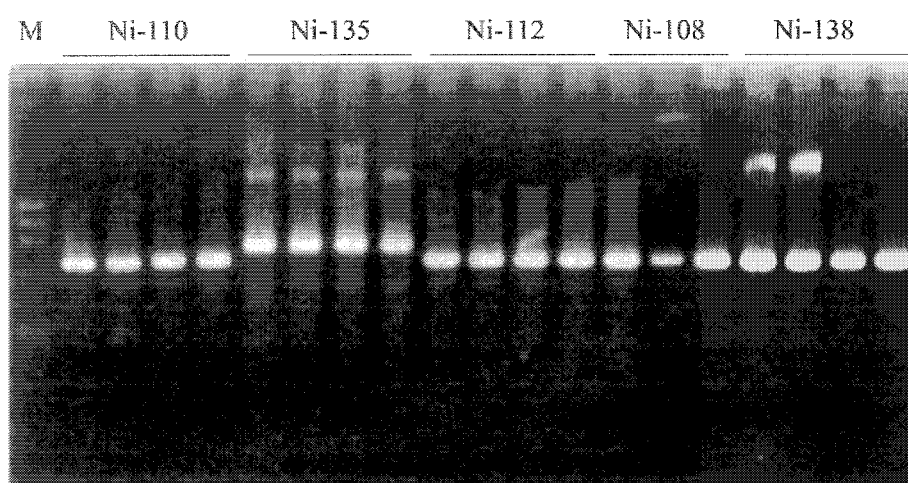


図3. *B. nigra*における*trnF/ndhJ*遺伝子間領域のサイズの系統間差

3. 2 葉緑体の遺伝子内および遺伝子間領域における塩基配列変異

本研究において塩基配列を調査した葉緑体ゲノムには、3個の遺伝子 (*trnL*, *trnF*, *ndhJ*) および3か所の遺伝子間領域 (*trnL/trnF*, *trnF/ndhJ*, *ndhJ/psbG*) が含まれている。さらに *trnL* においては、遺伝子内にエキソンとイントロンが存在することが知られている。そこで供試した個体間における塩基配列変異の分布をこれらの領域に分けて調査し、各領域における変異の大きさを比較した。

その結果 (表3)、それぞれ35bpおよび50bpからなる *trnL* のエキソンおよび *trnF* (74bp) の遺伝子内領域においては、個体間の変異は観察されず、すべての個体の塩基配列が完全に一致した。一方、*ndhJ* の遺伝子内では、*B. nigra* の2個体 ('Ni-108', 'Ni-110') と他のすべての個体との間で、1塩基の置換が観察された以外は、塩基配列変異が存在しなかった。これと比較して、遺伝子間領域および *trnL* のイントロンでは塩基配列変異の存在が示された。しかしながらそれらの変異の程度は領域によって異なっていた。すなわち、*ndhJ/psbG* 間では2個の塩基置換が観察されたのみであったのに対して、*trnL/trnF* 間および *trnF/ndhJ* 間では、塩基置換および挿入/欠失の変異が共に存在した。とりわけ後者の領域では、調査個体間に22か所の塩基置換と12か所の挿入/欠失が認められ、*Brassica* 属植物においてこの領域が特に塩基配列変異に富むことが示された。このように遺伝子間領域における塩基配列変異の大きさには、領域間で差が認められたが、全体として明らかに遺伝子内に比較して大きい変異が観察された。こうした傾向は従来他の植物種で知られている結果と一致した⁸⁻⁹⁾。

表3. 葉緑体の *trnL* から *psbG* に至る領域における塩基配列変異の数

領域	サイズ (bp)	塩基置換	挿入/欠失	合計
<i>trnL</i> 5' エキソン	35	0	0	0
<i>trnL</i> イントロン	312,313	7	1	8
<i>trnL</i> 3' エキソン	50	0	0	0
<i>trnL/trnF</i>	343,344	13	1	14
<i>trnF</i>	74	0	0	0
<i>trnF/ndhJ</i>	588~729	22	12	33
<i>ndhJ</i>	477	1	0	1
<i>ndhJ/psbG</i>	103	2	0	2

3. 3 葉緑体における塩基配列の種間および種内変異

各個体について決定した *trnL* から *psbG* に至る領域の塩基配列から、調査個体は5つのハプロタイプに分類された (表4)。また表5には、これらハプロタイプ間の変異の数を示した。

表4. 葉緑体の塩基配列に基づく供試個体の分類

タイプ	代表品種・系統 (ゲノム)	品種・系統 (ゲノム)
1	Ni-108 (B)	Ni-110 (B)
2	開田カブ (A)	Toria-504 (A)、金町小カブ (A)、山カブ (A)、切葉天王寺カブ (A)、野生カブ (A)、丸葉壬生菜 (A)、野崎2号 (A)、スグキナ (A)、Ni-135 (B)、青汁用ケール (C)
3	温海カブ (A)	
4	Sarson C-665 (A)	
5	富士早生 (C)	野崎早生 (C)、カイラン (C)、ドシコ (C)、O-169 (C)

表5. 葉緑体の *trnL*/*psbG* 領域におけるタイプ間の塩基置換 (左) と挿入/欠失 (右)

	開田カブ	温海カブ	Sarson	富士早生
Ni-108	40-13	40-14	43-13	40-13
開田カブ		0-1	3-3	2-3
温海カブ			3-3	2-3
Sarson C-665				5-4

このうちタイプ1には *B. nigra* の2系統が含まれ、タイプ2には *B. rapa* の多くの品種・系統に加えて、'Ni-135' (*B. nigra*) と '青汁用ケール' (*B. oleracea*) が含まれていた。さらにタイプ3および4は、それぞれ *B. rapa* の '温海カブ' および 'Sarson C-665' のみで構成されていた。残りのもう1つのタイプ5には '青汁用ケール' を除くすべての *B. oleracea* の品種・系統が含まれた。このように、基本的には *B. nigra* がタイプ1、*B. rapa* がタイプ2、また *B. oleracea* がタイプ5に分類され、*Brassica* 属の3種の2倍体作物種間で葉緑体塩基配列の種間変異が明瞭に存在した。このうち、*B. nigra* の属するタイプは、他のタイプとの間で極めて多くの変異を有しており、同種が *Brassica* 属の他の2種とは大きく異なる細胞質を持つことが裏づけられた (表5)。

しかしながら、このような種間変異に合致しない品種・系統が、*B. nigra* と *B. oleracea* にそれぞれ1つ存在した。表4から明らかなようにこれら2品種・系統の塩基配列は、*B. rapa* の大部分の品種が含まれるタイプ2の塩基配列と完全に一致した。このうち *B. nigra* の 'Ni-135' は東北大学で保存されている系統である。また '青汁用ケール' はタキイ種苗から市販されているケールの1品種である。前述のように *B. nigra* と *B. rapa* の間では、後者を細胞質親とする複2倍体種の *B. juncea* が成立している。このことから推定すると、'Ni-135' は *B. nigra* ではな

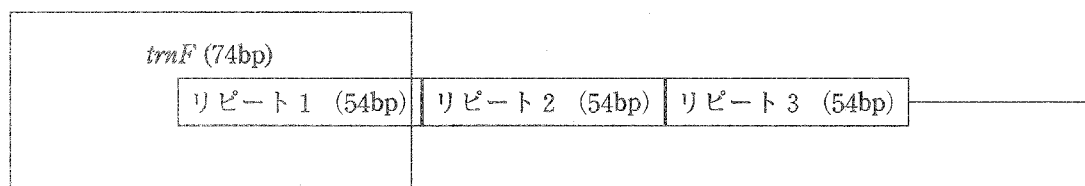
く、*B. rapa*に由来する葉緑体を持つ*B. juncea*の1系統ではないかという可能性が生じる。この点については同系統の収集の経緯にまでさかのぼって調査する必要があると考えられる。同様に‘青汁用ケール’は*B. oleracea*に属するケールの1品種でありながら、*B. rapa*の細胞質を持つと判断される。これが事実であれば、同品種は*B. rapa*と*B. oleracea*の間の種間雑種に由来しながらも、育種によって形態的にはケールと同様の特性を示すに至ったものと考えられる。この品種がどのような育種的操作によって成立したのかについては興味を持たれる。

以上のように種間変異が認められる一方で、*B. rapa*においては‘Sarson C-665’と‘温海カブ’が、‘開田カブ’を代表とする他の多くの品種・系統とは異なる独自の塩基配列を有していた。表5には、塩基配列の5つのタイプ間の変異数を塩基置換と挿入/欠失に分けて示したが、‘Sarson C-665’は‘開田カブ’などとは3つの塩基置換と3つの挿入/欠失の計6か所の変異を有するのに対して、‘温海カブ’と‘開田カブ’など多数の品種・系統との間には1か所の挿入/欠失変異が認められるのみであった。この変異が存在するのは、表6に示したように*trnF*と*ndhJ*の遺伝子間領域のうち、シトシン (C) が繰り返して存在する Simple Sequence Repeat (SSR) 領域である。この領域において‘温海カブ’は他のタイプに比べて1つ多くのCを有していた。このようなSSR領域における塩基配列の種内変異は他の植物でも観察され、種内分化の解析に利用されており^{10,11)}、今後*B. rapa*における種内変異の調査に活用することができるかもしれない。

表6. *trnF/ndhJ* 遺伝子間領域におけるSSR変異

系統・品種	塩基配列
Ni-108	TT-ACCCTCC CC CC-AT
開田カブ	TTAACCC-CC CC CC-AT
温海カブ	TTAACCC-CC CC CCCCAT
Sarson C-665	TTAACCC-CC CC C--AT
富士早生	TTAACCC-CC CC ---AT

他方、‘Sarson C-665’が他の*B. rapa*の品種・系統との間で示す変異のうち、図4に示す*trnF*遺伝子とその3'領域における繰り返し配列の数に関する変異が注目された。すなわち、この領域に存在する54bpの塩基配列が、‘Sarson C-665’では3回反復されるのに対して、他の*B. rapa*での繰り返しは2回であり、さらに*B. nigra*および*B. oleracea*においては、1個しか存在しない。このような遺伝子内と遺伝子間にまたがる比較的長い塩基配列の繰り返し数に関する変異の原因は現在のところ不明である。しかし、塩基配列の決定によって、図2に示されたようなPCRレベルで検出される遺伝子内領域の構造変異の主な原因が明らかにされたことは、このような変異の成因を探る上で有効になるものと考えられる。



リピートの数	植物
3	Sarson C-665
2	その他のAゲノム
1	Bゲノム、Cゲノム

図4. *trnF*とその3'領域における繰り返し配列の数に関する変異

*B. rapa*のうち‘Sarson’は主として南アジアで栽培される油料用の作物であり、他の*B. rapa*との間で必ずしも交雑和合性が高くないとされている。また‘温海カブ’は山形県の温海町の山間で焼畑によって栽培されるカブで、非常に古い栽培の歴史を持っていると考えられている。この点で我国で栽培されている他のカブやツケナ類と比較して、我国への伝来の時期や経路が大きく異なる可能性が指摘されている¹²⁾。今回明らかにされた*B. rapa*の種内でのSSR変異の存在は、こうした我国のカブ、ツケナ類における系統分化を探るための指標となり得る。また、今回の結果を含めて、さらに*B. rapa*における葉緑体ゲノムの種内変異が明らかになれば、*B. rapa*を細胞質親として成立し、アジアの広い地域で野菜および油料作物として栽培されている*B. juncea*の起源を、今までよりはるかに詳細に明らかにする可能性が生じる。これらの点については今後さらに検討したい。

4. まとめ

1. *Brassica*属のA, B, C 3ゲノム種の植物20個体について、葉緑体の*trnL*から*psbG*に至る約2kbpの領域の塩基配列を決定した。
2. 調査領域には、豊富な塩基配列変異が存在したが、その多くは*B. nigra* (Bゲノム) に特有なもので、A・Cゲノム間の変異は小さく、*Brassica*属植物の細胞質の種間変異に関する従来の説が裏づけられた。
3. Bゲノム及びCゲノムとして導入・供試した各1品種・系統(‘Ni-135’, ‘青汁用ケール’)が、Aゲノムの大多数の個体と同一の配列を示し、それらの来歴に興味を持たれた。
4. Aゲノム内ではSarsonが他と異なる塩基配列を示し、また‘温海カブ’に特有なSSR変異が検出された。一方Cゲノムでは、上記の1品種を除き、塩基配列変異は観察されなかった。

引用文献

- 1) Uchimiya, H. and Wildman, S. G. (1978) *J. Heredity* 69 : 299-303.
- 2) Warwick, S. I. and Black, L. D. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 82 : 81-92.
- 3) Yanagino, T., Takahata, Y. and Hinata, K. (1987) *Japan. J. Genet.* 62 : 119-125.
- 4) Ennos, R. A. (1994) *Heredity* 72 : 250-259.
- 5) Kanno, A and Hirai, A. (1993) *Curr. Genet.* 23 : 166-174.
- 6) Ohsako, T. and Ohnishi, O. (2000) *J. Botany* 87 : 573-582.
- 7) Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamitu, E. and Tabata, S. (1999) *DNA Res.* 6 : 283-290.
- 8) Curtis, S. E. and Clegg, M. T. (1984) *Mol. Biol. Evol.* 1 : 291-301.
- 9) Xu, D. H., Abe, J., Kanazawa, A. and Gai, J. Y. (2001) *Theor. Appl. Genet.* 102 : 683-688.
- 10) Bryan, G. J., McNicoll, J., Ramsay, G., Meyer, R. C. and De Jong, W. S. (1999) *Theor. Appl. Genet.* 99 : 859-867.
- 11) Provan, J., Powell, W. and Hollingsworth, P. M. (2001) *Trends in Ecology & Evolution* 16 : 142-147.
- 12) 青葉 高 (1981) 野菜—在来品種の系譜—. 法政大学出版局. PP.332.

Arabidopsis thaliana とキャベツの体細胞雑種の作出及び それらのゲノム構造

山 岸 博

京都産業大学工学部生物工学科

Abstract

Somatic hybrids were produced in the combinations of *A. thaliana* and two varieties of cabbage ('Fujiwase' and 'Chusei-Succession'). Protoplasts isolated from aseptically grown seedlings of the two parental species were fused under polyethylene glycol(PEG). The protoplasts were cultured in modified 8P liquid medium, and the micro-calli were transferred to callus development medium. After the transplanting of calli onto regeneration medium, shoots were regenerated with the frequencies of 12.4% (*A. thaliana* + 'Fujiwase') and 26.0% (*A. thaliana* + 'Chusei-Succession').

Morphological observation and molecular studies demonstrated that the somatic hybrids were produced in both the combinations. The somatic hybrids between *A. thaliana* and 'Fujiwase' showed hybridity in the nucleus and the mitochondrial genomes, while those between *A. thaliana* and 'Chusei-Succession' possessed hybrid characteristics in the mitochondria. In contrast, all the hybrids contained only cabbage genome for chloroplasts. The hybrids are expected to be useful materials for breeding of cabbage.

1. はじめに

高等植物の中で最初にゲノム解析が完了した *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) は、植物の分子遺伝学におけるモデル植物として極めて有益である。同植物で明らかにされた遺伝子機能は、ただちに比較ゲノム科学によって他種の植物でも検索され、類似した遺伝子の単離に結びつく。これによって、有用植物での育種操作が従来に比較してはるかに効率化されることになる。一方、シロイヌナズナで終了したゲノム解析は、核ゲノムのみでなく、ミトコンドリアおよび葉緑体の両オルガネラゲノムに及ぶ¹⁾³⁾が、このことは、この植物のゲノム情報の別の利用法にも結びつく。植物における核、ミトコンドリア、葉緑体の3ゲノムの間では、植物進化の過程でゲノム上の遺伝子の相互の移行が起こっており、また各ゲノム上の遺伝子の発現に関して、互いに抑制又は促進しあうメカニズムが発達してきた。このようなゲノム間の相互作用を理解する上で、完了したゲノム解析の情報は極めて有用である。

植物の2つのオルガネラゲノムには、育種上重要な形質に関与する遺伝子が多く存在し、それらの機能を更に向上させることは、今後の農業生産に極めて重要な意味を持つが、そのため

の1つの方法として細胞融合法が上げられる。細胞融合によれば、現在まで自然界には存在しない全く新しいオルガネラゲノムの組合せを持つ植物を作出することができる。その際細胞融合の材料としてシロイヌナズナを用いることは、上記のようなゲノム情報の利用という点から大きい意義を持つ。

シロイヌナズナは、世界的に重要な作物を多く含むアブラナ科に属するが、近年までシロイヌナズナを用いた細胞融合は極めて困難であった。著者は最近、シロイヌナズナと西洋タネ⁴⁾、シロイヌナズナとダイコン⁵⁾の組合せで効率的に体細胞雑種を得ることに成功した。更に今回世界で最初にシロイヌナズナとキャベツとの間で細胞融合に成功したので、その結果および体細胞雑種のゲノム構造について報告する。

2. 材料及び方法

2.1 植物材料

シロイヌナズナの系統‘Columbia’およびキャベツの品種‘富士早生’と‘中生サクセッション’を供試した。これらの植物の種子を滅菌した後、シロイヌナズナの種子は直径9 cmのシャーレ中の、またキャベツの種子はプラントボックス内の、いずれもMurashige and Skoog培地⁶⁾に播種した。幼苗が生育した後、シロイヌナズナについては胚軸部で刈りとり、胚軸、子葉及び本葉を細断してプロトプラスト単離の材料とした。またキャベツにおいては十分に展開した本葉を細断して、プロトプラスト単離の材料とした。

2.2 酵素処理および細胞融合

両種植物とも酵素処理前にCPW液⁷⁾に浸漬した後、セルラーゼオノヅカRSを1%、ペクトリアーゼY-23を0.1%含む酵素液を処理してプロトプラストを単離した。酵素処理は、28°Cで60回/分の往復振とうによって1~2時間行い、その過程でプロトプラストの単離状況を観察して、処理を終了した。

単離されたプロトプラストは遠心分離によって洗浄⁸⁾した後、細胞密度を 1×10^6 /mlに調整し、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて融合処理を行った。融合処理はForsbergら⁹⁾の方法に従った。

2.3 プロトプラストの培養と植物体の再分化

融合処理したプロトプラストは修正8P培地¹⁰⁾を用いて培養した。培養の手順はYamagishiら⁴⁾と同様である。液体培地上で発達したコロニーをカルス増殖培地に移植した後、同培地上で直径2 mm以上のサイズに達したカルスを、更に再分化培地に移植した。再分化培地上で得られたシュートは、発根を促した上で、順化して植物体にまで育てた。

2.4 体細胞雑種のゲノム構造の解析

細胞融合後の培養によって植物体にまで生育した個体について、形態的観察によって雑種性を判定すると共に、各個体の葉より DNA を単離して、PCR によりシロイヌナズナ及びキャベツの遺伝子の有無を判定した。PCR による DNA の解析にあたっては、核内の遺伝子についてはシロイヌナズナにおける *Tpi* 遺伝子のシークエンス¹¹⁾ を参考にし、またミトコンドリアと葉緑体の遺伝子については先述のゲノム情報^{2,3)} を利用した。

3. 結果及び考察

3.1 融合処理後の培養による植物体の再分化

細胞融合処理後の培養によってシロイヌナズナと‘富士早生’の組合せでは507個の、‘中生サクセッション’との組合せでは127個のカルスが得られた。それらのカルスからのシュートの再分化率は12.4%及び26.0%であった。再分化シュートの形態を培地上で観察したところ、シロイヌナズナと‘富士早生’の組合せでは大部分のシュートが培養中に抽苔・開花に至り、シロイヌナズナと同じ特性を示した。その結果、それ以外の2個体に雑種の形態的特性が認められた。これに対して、シロイヌナズナと‘中生サクセッション’の組合せではシロイヌナズナと同様の特性を示すシュートは2個に留まり、少なくとも9個体以上が雑種の特性を有していた(表1)。

このようにカルスからの再分化率ならびに再分化シュートにおける雑種の割合は、用いたキャベツの品種により異なったが、形態的観察によれば、いずれの組合せにおいても、シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種が得られたと推定される。このことは後述するゲノム解析によって確かめられた。従来、この組合せでは雑種作出の報告がなく、本研究がその最初の成功例である。キャベツは世界的に広く利用される重要野菜の1つであるが、本実験で得られた雑種は、キャベツの育種においてシロイヌナズナの持つ有用遺伝子を利用することを可能にする貴重な素材となるものと考えられる。

表1 シロイヌナズナとキャベツとの細胞融合による植物体の再分化

	富士早生	中生サクセッション
移植カルス	507 (100%)	127 (100%)
再分化シュート	63 (12.4%)	33 (26%)
雑種シュート	2 (0.4%)	>9 ^a (>7.1%)

a 形態的観察に基づく

3.2 体細胞雑種のゲノム構造の解析

得られた体細胞雑種のうち、シロイヌナズナと‘富士早生’の雑種のゲノム構造を表2に、またシロイヌナズナと‘中生サクセッション’の雑種のそれを表3に示した。表2から明らかのように、シロイヌナズナと‘富士早生’の雑種は2個体とも核ゲノムの遺伝子 (*Tpi*) については両親の遺伝子を併せ持っていた。これに対して、葉緑体ゲノムにおいては調査した5領域すべてでキャベツと同一のゲノム構造を示した。更にミトコンドリアに関しては、調査した遺伝子によって、雑種型 (*atp 1*), シロイヌナズナ型 (*orfB*, *cox I (3')*) およびキャベツ型 (*cox I (5')*) となり、全体として複雑な構造を呈していた。一方、シロイヌナズナと‘中生サクセッション’の組合せで、現在までにゲノム構造が調べられた2個体は、いずれも核の遺伝子と葉緑体の遺伝子についてはキャベツ型の構造を持っていた。これに対してミトコンドリアに関しては、調査する領域によって、両親の遺伝子を異なるパターンで有していた (表3)。こ

表2 シロイヌナズナと‘富士早生’の体細胞雑種のゲノム構造^a

ゲノム	遺伝子	シロイヌナズナ	富士早生	雑種	
				No.2	No.11
核	<i>Tpi</i>	S	L	S + L	S + L
葉緑体	<i>trnH/psbA</i>	L	S	S	S
	<i>trnT/psbD</i>	L	S	S	S
	<i>trnF/ndhJ</i>	S	L	L	L
	<i>petG/trnP</i>	S	L	L	L
	<i>ndhE/ndhG</i>	+	-	-	-
ミトコンドリア	<i>atp 1</i>	S	L	S + L	S + L
	<i>orfB</i>	L	S	L	L
	<i>cox I (5')</i>	-	+	+	+
	<i>cox I (3')</i>	+	-	+	+

a S; 小サイズのPCR産物, L; 大サイズのPCR産物, +; PCR産物が認められる, -; PCR産物が認められない。

表3 シロイヌナズナと‘中生サクセッション’の体細胞雑種のゲノム構造^a

ゲノム	遺伝子	シロイヌナズナ	中生サクセッション	雑種	
				No.1	No.2
核	<i>Tpi</i>	S	L	L	L
葉緑体	<i>trnF/ndhJ</i>	S	L	L	L
ミトコンドリア	<i>atp 1</i>	S	L	S + L	S + L
	<i>orfB</i>	L	S	S	S
	<i>cox I (5')</i>	-	+	+	+
	<i>cox I (3')</i>	+	-	+	+

a 表中の記号は表2と同じである。

の組合せにおいては、今後生育を待って調査が必要な個体がある半面、特に核ゲノムと葉緑体ゲノムにおいては調査領域が少ないため、今後規模を拡大して解析する必要がある。

以上のゲノム構造の解析の結果は、シロイヌナズナとキャベツとの組合せにおいて、核、葉緑体、ミトコンドリアのゲノム構成に関して多様な雑種が作出される可能性を示している。そうした中で、両組合せに共通している点は、葉緑体の構造がシロイヌナズナではなく、キャベツのものと同じになること、およびミトコンドリアに関しては極めて複雑な構造をとり得ることである。今後これらの体細胞雑種個体の生育上の特性ならびに形態的特性を解析することにより、ゲノム構造の差異及びゲノム間の相互作用と遺伝子機能との間の関係が解明されるものと期待される。

4. ま と め

シロイヌナズナとキャベツの2品種との間で世界で最初に体細胞雑種を得た。得られた雑種の出現頻度は、用いたキャベツの品種によって異なったが、いずれの組合せにおいても、ゲノム構造の分子遺伝学的解析によって、雑種性が認められた。その結果、2つの組合せのうち一方では、核ゲノムの雑種化が認められたのに対して、もう一方ではキャベツ由来の核遺伝子のみを持っていた。また両組合せの雑種とも、葉緑体の遺伝子についてはもっぱらキャベツのものを受けついでいた。更にミトコンドリアのゲノム構造は両親の遺伝子を様々な形で組合せて持つ複雑なものであった。今後これら雑種の特徴を更に調査し、核、ミトコンドリア、葉緑体のゲノム間の相互作用を明らかにしたい。

参 考 文 献

- 1) The Arabidopsis Genome Initiative (2002) *Nature* **408**: 796–815.
- 2) Unseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P. and Brennick, A. (1997) *Nature Genet.* **15**: 57–61.
- 3) Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamitu, E. and Tabata, S. (1999) *DNA Res.* **6**: 283–290.
- 4) Yamagishi, H., Landgren, M., Forsberg, J., and Glimelius, K. (2002) *Theor. Appl. Genet.* **104**: 959–964.
- 5) Yamagishi, H. and Glimelius, K. (2003) *Plant Cell Rep.* **22**: 52–58.
- 6) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
- 7) Banks, M. S. and Evans, P. K. (1976) *Plant Sci. Lett.* **7**: 409–416.
- 8) Nishio, T., Yamagishi, H. and Takayanagi, K. (1987) *Japan. J. Breed.* **37**: 22–28.
- 9) Forsberg, J., Landgren, M. and Glimelius, K. (1994) *Plant Sci.* **95**: 213–223.
- 10) Kao, K. N. and Michayluk, M. R. (1975) *Planta* **126**: 105–110.

京 都 産 業 大 学

総合学術研究所所報 第5号 (抜刷)

平 成 19 年 7 月 発 行

神経発生におけるポリペプチド
N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能

黒 坂 光
鳥 羽 慎 也

京 都 産 業 大 学
総 合 学 術 研 究 所

神経発生におけるポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素の機能

黒坂 光
鳥羽 慎也

1. はじめに

我々は神経発生におけるムチン型糖鎖の役割について研究を行っている。ムチン型糖鎖は主にゴルジ体において、多くの糖転移酵素の連続的な作用により1つずつ糖が付加されて、糖鎖が合成される (Elhammer, Kezdy, *et al.*, 1999)。これらの糖転移酵素において、UDP-N-アセチルガラクトサミン：ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 (以降 N-アセチルガラクトサミン転移酵素と略) は、糖鎖合成の開始反応を触媒する酵素である。したがって、この酵素はポリペプチド鎖上の糖鎖の数と位置を決定する重要な役割を果たしている。ほ乳類のゲノムの塩基配列の解析から、N-アセチルガラクトサミン転移酵素は 20 種類以上の多くのアイソザイムからなることが報告されている。これらは組織分布および基質特異性などにおいて、互いに重複するものの特有の性質を持つことが知られている (Young, Holcomb, *et al.*, 2003)。このことから、それぞれの組織におけるムチン型糖鎖の発現様式は、各組織におけるアイソザイムの発現パターンによって決まると考えられる。以前に我々は、神経細胞にのみ特異的に発現するアイソザイム GalNAc-T9 をクローニングした (Toba, Tenno, *et al.*, 2000)。またその後、GalNAc-T9 と高い相同性を持つ新規遺伝子もクローニングした (Nakamura, Toba, *et al.*, 2005)。この新規遺伝子も、GalNAc-T9 と同様、神経系に特徴的な発現パターンを示した。我々はこの遺伝子産物を昆虫細胞中で発現させ、その酵素活性を測定したところ、ムチン様の合成ペプチドに対して弱いながらも糖を転移する活性を見いだしたので、この遺伝子を GalNAc-T16 と命名した。このように神経系に GalNAc-T9 や-T16 の様なアイソザイムが局在していることから、神経系に特有のムチン型糖鎖が存在し、神経系に特有の機能を付与している可能性が考えられる。本研究では、神経細胞への分化能を持つマウス胚性細胞株 P19 細胞を用いて、神経発生における N-アセチルガラクトサミン転移酵素、およびそれが合成するムチン型糖鎖の役割について調べた。

2. マウス胚性細胞株 P19 細胞の神経分化における N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現

マウス胚性細胞株 P19 細胞は、多分化能を有する細胞であり、培地に添加する試薬により、異なる細胞へと分化することが知られている。この細胞にレチノイン酸を添加すると神経細胞へと分化する (Jones-Villeneuve, McBurney, *et al.*, 1982; Jones-Villeneuve, Rudnicki, *et al.*, 1983)。神経細胞に分化させるにはまず、P19 細胞にレチノイン酸を添加して 2 日間培養する。この細胞をトリプシン処

理し、ペトリ皿にてレチノイン酸存在下でさらに2日間培養すると、細胞はペトリ皿の中で凝集塊を形成する。この凝集塊の形成は、P19細胞の神経細胞への分化に不可欠な過程である。次に、この細胞凝集塊をトリプシン消化して分散し、培養皿に戻してレチノイン酸非存在下で2~4日培養すると、細胞は神経細胞へと分化し、神経突起を形成するなどの特徴的な形態を示すようになる。我々はまず、この神経発生における N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現様式を調べた(図1)。レチノイン酸未添加、凝集塊形成、および最終神経分化2日目、4日目におけるそれぞれのアイソザイムの発現を RT-PCR で調べた。その結果、神経系に特異的な3つのアイソザイム、すなわち GalNAc-T9, -T13, -T16、およびそれに加えて GalNAc-T14 の発現は、神経特異的なマーカーである MAP2 と同様の発現パターンを示しており、神経発生に伴い発現していることがわかった。その他のアイソザイムは GalNAc-T2 を除いて、いずれも細胞の分化の状態と発現レベルは無関係であった。GalNAc-T2 については、発生のどの段階においても発現は認められなかった。

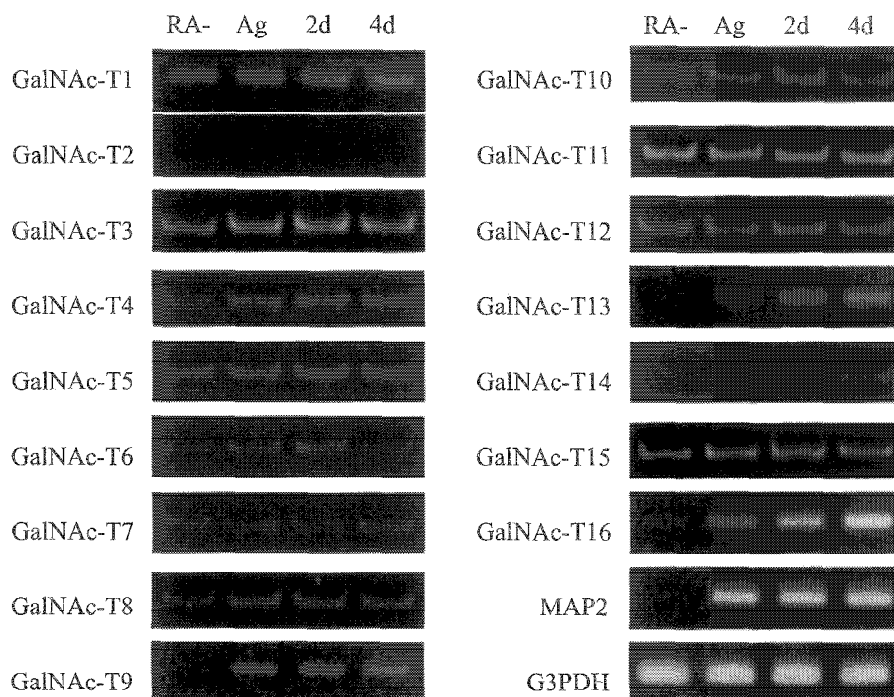


図1 P19細胞の神経分化とN-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現

3. N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現抑制

P19細胞の神経発生と N-アセチルガラクトサミン転移酵素の関連を調べるために、RNAi法を用いて、GalNAc-T1, -T9, -T13, -T16のそれぞれのアイソザイムの発現を抑制した。P19細胞に各アイソザイムに対するアンチセンス RNA を発現させるためのプラスミドをトランスフェクションし、プラスミドを安定に保有する細胞を得た。図2ではそれぞれの細胞において、標的となるアイソザイムの発現が抑制されているかどうかを RT-PCR 法により調べた。図2aでは、レチノイン酸添加後

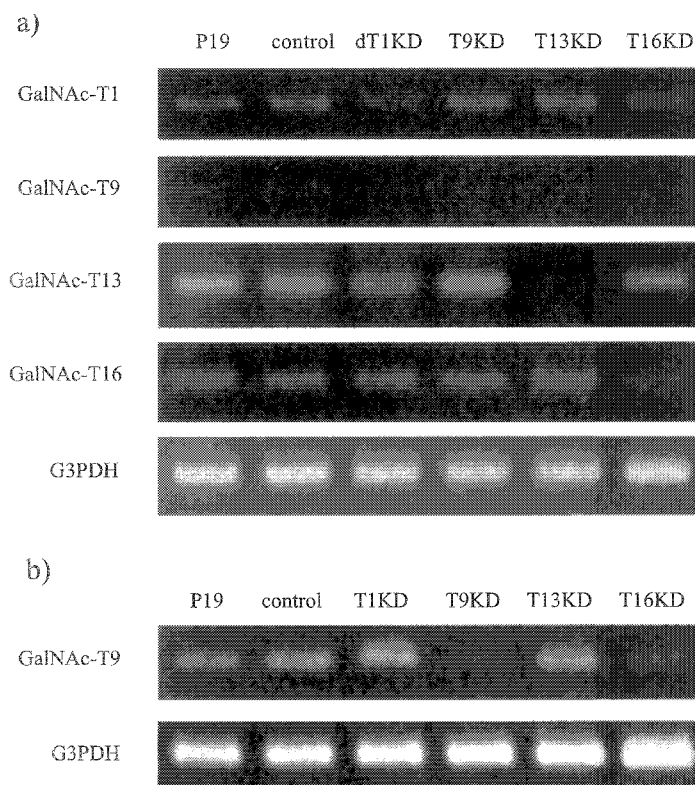


図2 N-アセチルガラクトサミン転移酵素の発現抑制

2日目の細胞から抽出したRNAから調製したcDNAを用いてPCRを行った。GalNAc-T1, -T13, -T16においては、それぞれ特異的に発現が抑制されていることがわかる。しかしながらGalNAc-T9については、レチノイン酸添加2日目では、酵素の発現が誘導されておらず、すべての細胞においてバンドを検出することができなかった。

そこで、GalNAc-T9については、凝集塊を形成した細胞からRNAを抽出してRT-PCRを行った(図2b)。その結果、GalNAc-T9の発現を抑制した細胞(T9KD)において顕著な発現抑制が見られた。またこのとき、GalNAc-T16のノックダウン細胞においても、GalNAc-T9の発現が抑制されている。GalNAc-T16の発現を抑制した細胞においては、細胞は後述するようにアポトーシスをおこし、神経発生しない。そのためT16KD細胞では、神経発生に伴い増加するGalNAc-T9の発現が見られなかったものと思われる。

4. GalNAc-T16とアポトーシス

P19細胞で上記4つのアイソザイムの発現を抑制したところ、GalNAc-T1, -T9, -T13の3つのアイソザイムについては、大きな変化は見られず正常な神経発生が見られた。ところがGalNAc-T16の発現を抑制した細胞(T16KD)においては、レチノイン酸を加えて神経誘導を開始すると、ほとんどの細胞が培養皿から遊離し始めた。培養皿に接着していた一部の細胞をペトリ皿に移して培養しても、

細胞はもはや凝集塊を形成することができず、その後の神経分化も見られなかった。

我々は、レチノイン酸添加後に、T16KD 細胞がアポトーシスを起こした可能性を考えて、細胞膜上でのホスファチジルセリンのトランスロケーションを調べた。一般に、アポトーシスを起こした細胞では細胞膜の非対称性が失われる。ホスファチジルセリンは通常は膜の細胞質側に多く存在するが、アポトーシスの初期の段階で、細胞の外側の膜にトランスロケーションされる (Koopman, Reutelingsperger, *et al.*, 1994)。ホスファチジルセリンのトランスロケーションは、ホスファチジルセリンに対して高い親和性を持つアネキシン V (AnV) の細胞表面への結合により調べることができる。また、死細胞を選択的に染色するヨウ化プロピジウム (PI) を用いて細胞を同時に染色することにより、AnV⁻PI⁻の正常細胞、AnV⁺PI⁻の初期アポトーシス細胞、AnV⁺PI⁺の後期アポトーシスおよびネクローシス細胞の割合がわかる。図 3 は AnV と PI で二重染色した細胞を FACS で分離したときの結果である。この結果から、T16KD では顕著に AnV⁺PI⁻の初期アポトーシス細胞の割合が増加していることがわかった。

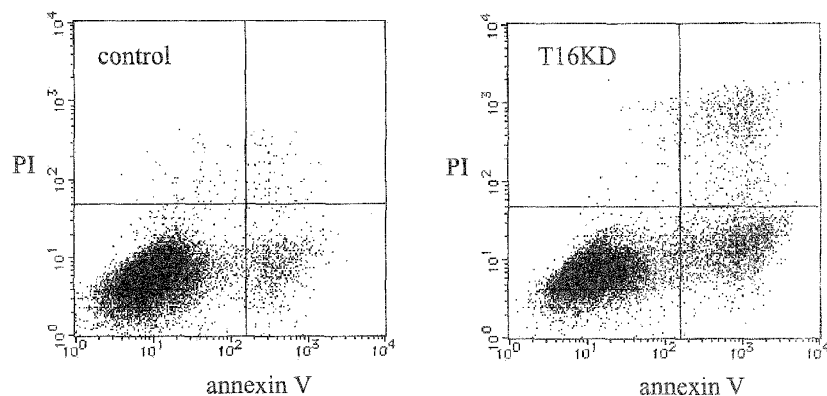


図 3 GalNAc-T16 の発現抑制とアポトーシス

5. 最後に

N-アセチルガラクトサミン転移酵素には多くのアイソザイムが存在することから、ムチン型糖鎖はそれぞれの組織で特有の糖鎖が合成され、重要な機能を担っていると考えられている。しかし、アイソザイムの発現分布や基質特異性が重複していることなどが原因となって、それぞれのアイソザイムの機能は、まだほとんど解明されていない。このような状況をふまえて、我々は神経系におけるムチン型糖鎖の役割を、神経特異的な N-アセチルガラクトサミン転移酵素アイソザイムの機能解析を通じて明らかにすることを研究の目的としている。

本研究において、我々は神経細胞への分化能を持つ P19 細胞を用いて、神経系特異的なアイソザイムの機能解析を試みた。その結果、GalNAc-T16 が神経発生およびアポトーシスに関連して重要な働きをしていることを見いだした。P19 細胞においては、少なくとも GalNAc-T16 が発現していることが、レチノイン酸処理による神経分化には不可欠であることがわかった。我々は、GalNAc-T16

の発現抑制により、P19 細胞がアポトーシスに導かれることについての分子的な基盤を明らかにする予定である。また、同時に神経発生に関わる分子群の発現変動も解析中である。これらの解析を通じて、神経系におけるムチン型糖鎖の発生における機能およびアポトーシスとの関連が明らかになると思われる。

6. 引用文献

- Elhammer, A. P., Kezdy, F. J. and Kurosaka, A. (1999) The acceptor specificity of UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycoconj. J.*, **16**, 171-180.
- Jones-Villeneuve, E. M., McBurney, M. W., Rogers, K. A. and Kalnins, V. I. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J. Cell Biol.*, **94**, 253-262.
- Jones-Villeneuve, E. M., Rudnicki, M. A., Harris, J. F. and McBurney, M. W. (1983) Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 2271-2279.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T. and van Oers, M. H. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-1420.
- Nakamura, N., Toba, S., Hirai, M., Morishita, S., Mikami, T., Konishi, M., Itoh, N. and Kurosaka, A. (2005) Cloning and expression of a brain-specific putative UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase gene. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 429-433.
- Toba, S., Tenno, M., Konishi, M., Mikami, T., Itoh, N. and Kurosaka, A. (2000) Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9). *Biochim. Biophys. Acta*, **1493**, 264-268.
- Young, W. W., Jr., Holcomb, D. R., Ten Hagen, K. G. and Tabak, L. A. (2003) Expression of UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isoforms in murine tissues determined by real-time PCR : a new view of a large family. *Glycobiology*, **13**, 549-557.

京都産業大学
総合学術研究所報

第4号(抜刷)
平成18年7月発行

神経特異的ポリペプチドN-アセチルガラクトサミン
転移酵素の機能解析

黒坂 光

京都産業大学
総合学術研究所

神経特異的ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン 転移酵素の機能解析

黒坂 光

神経変性疾患においては、細胞内で合成されたタンパク質に折りたたみ異常が生じ、普段は分子の内部に存在する疎水性の領域がタンパク質分子表面に露出するようになって、分子間の疎水的な相互作用が生じる。その相互作用はタンパク質分子の凝集を導き、やがては水に不溶性の凝集塊の形成をまねき、細胞死を引き起こすと考えられている。アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルトヤコブ病などの神経変性疾患においては、それぞれ β -アミロイド、 α -シヌクレイン、プリオンなどが凝集タンパク質として同定されている。パーキンソン病においては、異常凝集した α -シヌクレインにおいてムチン型糖鎖の存在が認められたため、タンパク質への異常な糖鎖付加が引き金となって、折りたたみ異常を引き起こす可能性が指摘されている。

近年、我々はパーキンソン病における α -シヌクレインへの糖鎖付加反応に注目し、*in vitro*における α -シヌクレインへのムチン型糖鎖付加反応を解析した。その結果、特定のポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素（以後 GalNAc 転移酵素と略）アイソザイムが α -シヌクレインに N-アセチルガラクトサミン残基を転移する活性を有することを見いだした。GalNAc 転移酵素は 20 種類以上の多くのアイソザイムからなることが知られている。これらのアイソザイムは、広い組織分布を持つものと比較的限定した組織に発現するものの 2 つに大別することができる。我々は以前に神経細胞にのみ特異的に発現するアイソザイム GalNAc-T9 のクローニングに成功した。また近年、GalNAc-T9 と同一性の高いもう一つの遺伝子のクローニングにも成功した。この遺伝子も GalNAc-T9 と同様に神経系にのみ発現していることを Northern blotting, *in situ* hybridization により示した。この遺伝子をクローニングした時点では、その翻訳産物の酵素活性を検出できていなかったため、その遺伝子を putative GalNAc-T (pt-GalNAc-T) と命名した。その後、我々はパーキンソン病における神経系での α -シヌクレインへのムチン型糖鎖付加反応、さらには神経系特異的な GalNAc 転移酵素アイソザイムの存在などから、神経系に特有のムチン型糖鎖の付加反応が神経系の機能に関連している可能性を考え、これらの GalNAc 転移酵素と神経分化との関連を調べたので報告する。

1. pt-GalNAc-T の酵素活性

前述のとおり、pt-GalNAc-T は神経系に特異的に発現しており、その翻訳産物は GalNAc-T9 とアミノ酸レベルで 76% の同一性を持つ。我々は以前、ウシ顎下腺ムチンから調製したアポムチンを基質と

して、COS7 細胞で発現させた pt-GalNAc-T を用いて酵素活性を測定したが、活性を検出することができなかった。そこで、我々は昆虫細胞を用いて pt-GalNAc-T の発現系を確立し、より多くの発現酵素を用いて酵素活性を測定することにした。基質には典型的なムチン様配列を持つ MUC5AC (SPVPTTSTTS), MUC1 (PAPGSTAPPK), MUC2 (ITTTTTPLPT), MUC7 (SATTPAPPSS) などのペプチドを用いた。pt-GalNAc-T は他の GalNAc-T1 などのアイソザイムと比べると、活性は非常に低かったもののいくつかのペプチドに対して糖転移活性を示した。実験用いたペプチドの中では MUC7 由来のペプチドに対して最も効率よく糖を転移した (図 1)。この結果から pt-GalNAc-T が酵素活性を持つことが確認できたので、以後これを GalNAc-T16 とよぶことにする。

2. マウス胚性細胞株 P19 細胞の神経分化と GalNAc 転移酵素

マウス胚性細胞株 P19 細胞は、高濃度のレチノイン酸を添加した条件で培養すると神経細胞に分化することが知られている。図 2 の (a) は未処理の P19 細胞である。この細胞をトリプシン処理し、ペトリ皿に移す際に、レチノイン酸を加えて培養すると、細胞はペトリ皿の中で凝集塊を形成する (b)。この凝集塊の形成が、その後の神経細胞への分化に必須のプロセスであることが知られている。細胞を 2 日間ペトリ皿で培養した後に、トリプシンで処理し、再度培養皿に戻して培養する。これ以降は、レチノイン酸を除去して培養するが、細胞はレチノイン酸がなくても分化を開始し (c)、4 日後には神経突起を形成しているのがわかる (d)。

次に、細胞の分化と GalNAc 転移酵素の発現の関係を RT-PCR 法により調べた (図 3)。まず、細胞の分化の状態を神経系特異的なマーカーである微小管関連タンパク質の一つである MAP2 遺伝子の発現により調べた。この遺伝子はレチノイン酸の刺激後、神経細胞への分化に伴い発現していることが確認された。

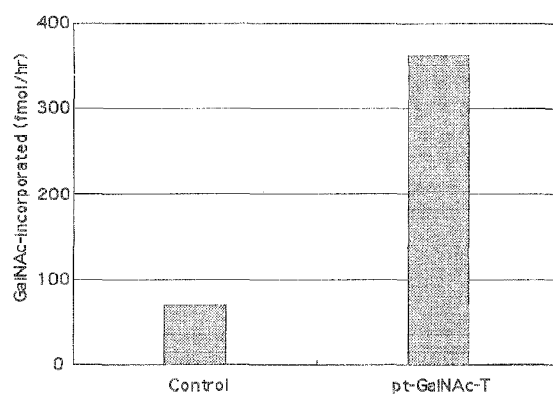


図 1 pt-GalNAc-T の酵素活性

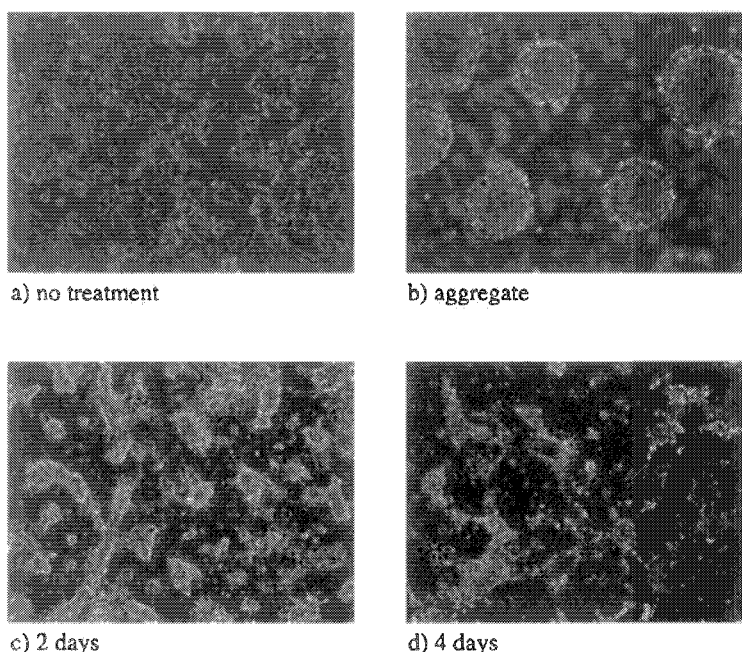


図2 P19細胞の分化

- a) 未処理
- b) レチノイン酸添加, ペトリ皿で培養
- c) レチノイン酸除去, 培養皿で培養, 2日目
- d) 4日目

GalNAc 転移酵素については4種類のアイソザイムの発現を調べた。GalNAc-T1は発現量も高く、幅広い組織発現様式を持つアイソザイムである。このアイソザイムは、レチノイン酸未処理の細胞においても、細胞の分化とは無関係に発現していた。それに対して、Northern blotting などにより神経系特異的とされてきたその他の3種のアイソザイム GalNAc-T9, GalNAc-T13, GalNAc-T16は、いずれも分化を開始した細胞の凝集塊形成以降に強く発現しており、P19においてもこれらのアイソザイムが神経系特異的に発現していることが明らかとなった。

次に、神経発生における神経特異的なアイソザイムの機能を解析する目的で、これらのアイソザイムの発現をRNA干渉により抑制した。GalNAc-T1, -T9, -T13, -T16のそれぞれのアイソザイムの発現を抑制したところ、いずれのアイソザイムにおいてもレチノイン酸未処理の細胞では変化は見られなかった。図4では、レチノイン酸で分化誘導後、細胞塊を形成させ、培養皿に播種して4日後の細胞の様子を示した。GalNAc-T1は分化の有無にかかわらず発現するアイソザイムであるが、細胞を分化させてもまったく変化は見られなかった。一般にGalNAc転移酵素アイソザイムはそれぞれ特有の特徴を有するものの、互いに重複した基質特異性と組織分布を持つことが知られている。したがって、GalNAc-T1の発現を抑制したときに、他のアイソザイムがその働きを補完したために細胞に影響が見られなかったのかも知れない。事実、GalNAc-T1のノックアウトマウスにおいても大きな表現型の変

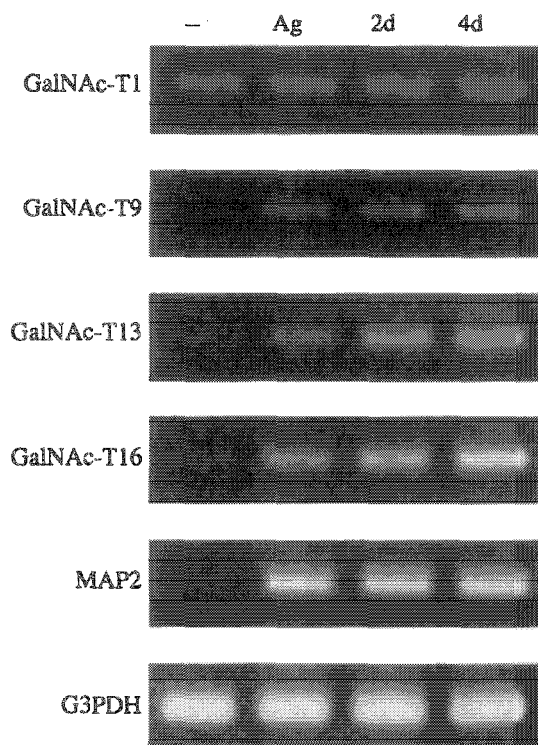


図3 RT-PCR

— ; 未処理

Ag ; レチノイン酸添加, ペトリ皿で培養

2d ; レチノイン酸除去, 培養皿で培養, 2日目

4d ; 4日目

化は認められていない。GalNAc-T13についても、GalNAc-T1と比べると若干の細胞数の現象が認められたものの、T1と同様に遺伝子ノックダウンによる影響はほとんど見られなかった。このアイソザイムについても、ノックアウトマウスが作製されているが、やはりほとんど表現型に変化は見られていない。これらのアイソザイムに対し、GalNAc-T9と-T16については大きな変化が見られ、その変化は-T16において特に顕著であった。いずれのアイソザイムもレチノイン酸を添加してペトリ皿で細胞の凝集塊を形成させると、多くの細胞がペトリ皿との接着性を失い浮遊した。特にGalNAc-T16においてはほとんどの細胞が浮遊し、viabilityを失った。ペトリ皿に接着した一部の細胞をそのまま培養を続けても、図4のように神経突起を形成することはできなかった。このように、GalNAc-T16 (GalNAc-T9)はGalNAc-T13と同様に神経系特異的なアイソザイムであるが、それらの発現を抑制したときの細胞に与える影響は大きく異なり、GalNAc-T16を発現抑制したときのみ細胞分化の抑制が見られた。

GalNAc-T16の発現を抑制したときに見られる現象とアポトーシスの関係を調べた。図5はそれぞ

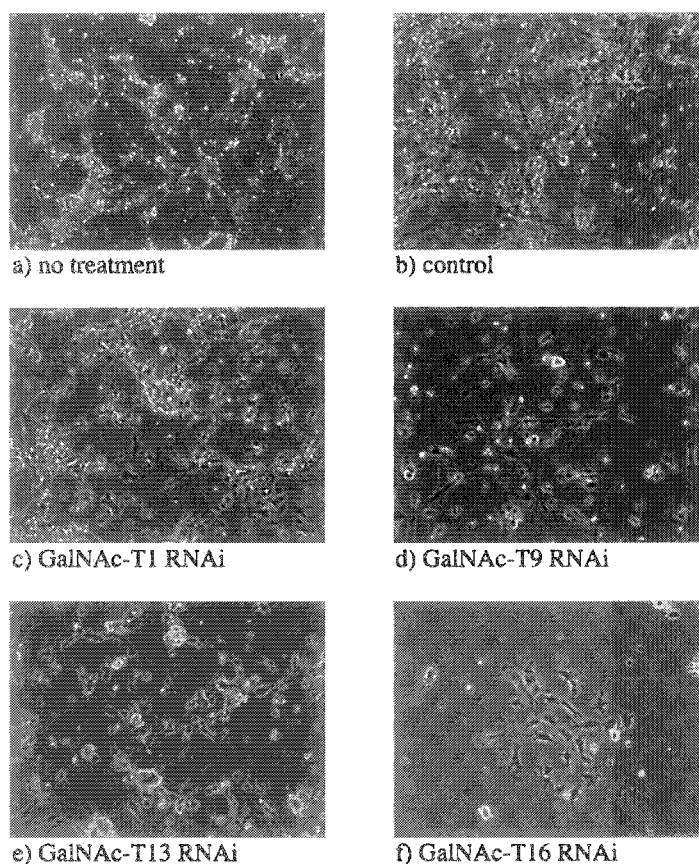
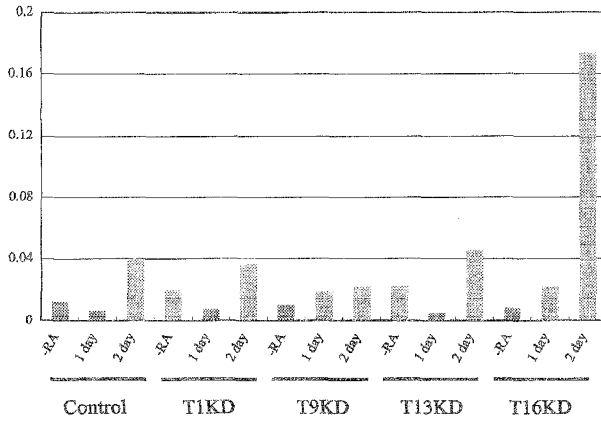
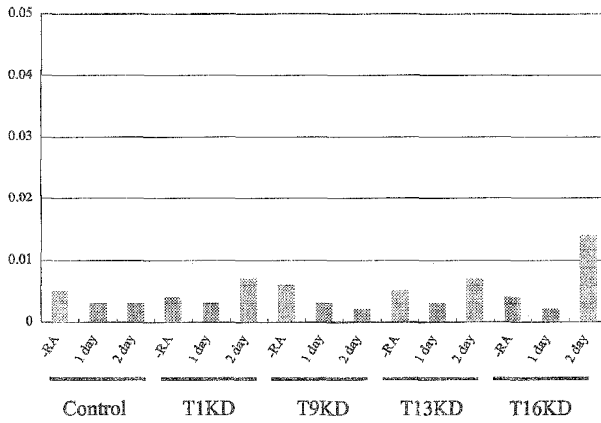


図4 RNAiによるGalNAc転移酵素の発現抑制
control; コントロールベクターを用いた

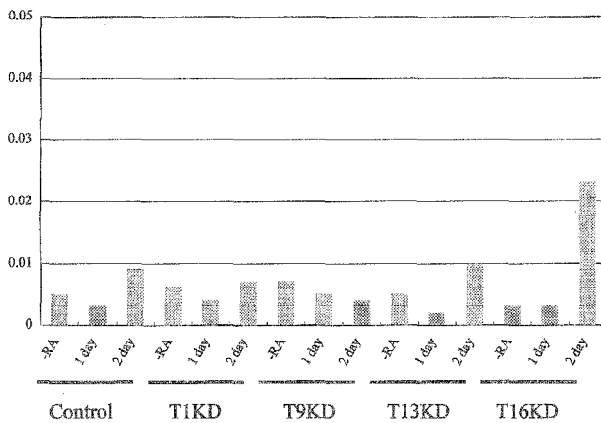
れのアイツザイムの発現を抑制したときに、レチノイン酸による分化誘導後1日目、2日目のカスパーゼの発現誘導を調べたものである。細胞内では、様々な要因が引き金となってアポトーシスを引き起こすことが知られている。アポトーシスにはいくつかの経路があり、それぞれが複雑に調節されたネットワークを構成している。そのネットワークではカスパーゼとよばれるプロテアーゼが順番に活性化される過程を含んでいる。どのカスパーゼが活性化されるかはネットワークによって異なるが、いずれのネットワークでも最終的にカスパーゼ3が活性化されアポトーシスを実行する。我々は、カスパーゼ3, 1, 8の活性を調べたところ、やはりGalNAc-T16において特に顕著なカスパーゼ活性の上昇が見られた。レチノイン酸添加後2日目には高いカスパーゼ3の発現上昇を検出した。また、カスパーゼ1, 3においてもGalNAc-T16で最も高い発現を認めた。



a) Caspase 3



b) Caspase 1



c) Caspase 8

図5 RNAi 処理した細胞のカスパーゼ活性

-RA ; レチノイン酸未処理

1 day ; レチノイン酸処理 1 日後

2 day ; レチノイン酸処理 2 日後

3. まとめ

我々は神経特異的に発現するアイソザイムの機能解析を行った。我々が以前にクローニングした神経特異的なGalNAc-T9と相同性の高いGalNAc-T16の酵素活性を初めて検出することに成功した。しかしながら、典型的なムチン様の配列を用いた実験では、GalNAc-T16の活性は非常に低いものであった。GalNAc-T16が神経系特異的な発現様式を持つことから、GalNAc-T16は典型的なムチン様ペプチドではなく、神経特異的なタンパク質への糖鎖付加反応を触媒している可能性が考えられた。また、GalNAc転移酵素アイソザイムの発現抑制実験においても、GalNAc-T16の発現を抑制したときに、最も顕著な神経分化の抑制が観察された。我々はゼブラフィッシュを用いた遺伝子発現抑制実験においても同様に、GalNAc-T16の発現を抑制したときに後脳発生の異常を観察している。また、本実験では細胞分化が抑制されるばかりでなく、細胞のアポトーシスが誘導されることも明らかとなった。今後は、P19細胞およびゼブラフィッシュのそれぞれにおけるGalNAc-T16の機能解析並びに*in vivo*の基質の同定を行う予定である。

京 都 産 業 大 学

総合学術研究所 所報 第3号 (抜刷)

平 成 17 年 7 月 発 行

神経変性疾患とムチン型糖鎖付加反応

黒 坂 光

京 都 産 業 大 学
総 合 学 術 研 究 所

神経変性疾患とムチン型糖鎖付加反応

黒 坂 光

1. はじめに

近年、神経変性疾患に共通する発症基盤として、細胞内で合成されたタンパク質の立体構造の異常が指摘されている。たとえば、パーキンソン病においては、 α -シヌクレインの立体構造がランダムコイル型から β -シート型へと変化することで分子が凝集して不溶性の繊維を形成し、やがて細胞死が起こることが知られている。同じような現象が、アルツハイマー病やクロイツフェルト・ヤコブ病においても見られ、それぞれ、 β -アミロイドタンパク質とプリオンの凝集が観察されている。

生体内のタンパク質が機能を獲得するには、タンパク質が適切な翻訳後修飾反応を受け、正しく折りたたまれる必要がある。タンパク質への糖鎖付加反応は真核細胞における重要な翻訳後修飾反応の一つであり、付加された糖鎖はタンパク質の立体構造を安定化させ、また細胞間や分子間の認識反応に直接関与することが知られている。筆者は、特にムチン型糖鎖の働きに注目し、その生合成開始反応を触媒する酵素である、UDP-N-アセチルガラクトサミン：ポリペプチドN-アセチルガラクトサミン転移酵素（以後、GalNAc 転移酵素と略する）遺伝子のクローニングとその機能解析を行ってきた。GalNAc 転移酵素は大きな遺伝子ファミリーを形成することが知られているが、筆者らは神経細胞に特異的に発現するGalNAc 転移酵素アイソザイム、GalNAc-T9のクローニングに成功している(1)。さらに、GalNAc-T9と非常に高い相同性を持つ遺伝子 putative GalNAc-T (pt-GalNAc-T と略)も単離した(2)。pt-GalNAc-Tも神経系に特有の発現様式を持つ。また、我々は最近、pt-GalNAc-Tがムチン様の一次構造を持つペプチドに対してGalNAc 転移活性を持つことも明らかにしている（未発表）。前述のように、神経変性疾患においてタンパク質の立体構造異常が分子凝集に密接に関連しているため、神経細胞内における糖付加反応の異常が神経変性に関係する可能性が考えられる。実際、パーキンソン病において凝集した α -シヌクレインがムチン型糖鎖を持つとの報告がなされている(3)。このような観点に基づき、筆者は、神経系におけるムチン型糖鎖の役割を解明するため、i) α -シヌクレインへのムチン型糖鎖付加反応の解析、ii) 培養神経細胞における神経特異的GalNAc 転移酵素の発現様式の解析、iii) ゼブラフィッシュにおける神経特異的GalNAc 転移酵素のノックダウンの3つの実験を行った。

2. 結 果

1) α -シヌクレインへの糖付加反応の解析

昨年度の総合学術研究所所報に記したように、 α -シヌクレインを基質として4種類のアイソザイ

ムを用いて酵素活性を測定したところ、GalNAc-T1 と GalNAc-T13 の 2 種類のアイズザイムが糖転移活性を示した。昨年度に比べ、基質および酵素濃度を高め、さらに反応時間を調節することにより、表 1 のように、より正確に酵素活性を求めることができた。特に、神経特異的な GalNAc-T13 が α -シヌクレインを基質としたことは神経変性疾患の病因と関連して注目される。GalNAc-T1 は神経を含め多くの組織で ubiquitous に発現しているアイズザイムであるが、GalNAc-T13 とアミノ酸レベルで 85% もの高い相同性を持ち、GalNAc-T13 とほぼ同じレベルの高い活性を示した。神経細胞内において、GalNAc-T1 と T13 は協同的に α -シヌクレインに糖付加している可能性も考えられた。

表 1 α -シヌクレインへの糖付加反応

アイズザイム	活性 (nmol/h/mmol α -シヌクレイン)
GalNAc-T1	1
GalNAc-T9	ND
GalNAc-T13	53
pt-GalNAc-T	ND

ND: not detected.

2) 培養神経細胞における神経特異的 GalNAc 転移酵素の発現様式の解析

GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T は神経に特異的に発現していることが、*in situ* hybridization により明らかにされている。したがって、これらのアイズザイムは神経系に特異的な糖付加反応を触媒していると考えられているが、神経細胞内の基質の同定などの生化学的な特徴はまだ十分理解されていない。そこで、培養細胞を用いてこれらのアイズザイムの性質を解明する目的で、5 種類の神経系の培養細胞におけるこれらのアイズザイムの発現様式を RT-PCR により調べた。

それぞれの細胞から全 RNA を抽出し、oligo-d(T) をプライマーとして cDNA を作製した。その cDNA を鋳型にして、GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T に特異的な組合わせのプライマーを使って PCR を行った。PCR の結果の 1 例を図 1 に示した。Neuro2A を用いたこの実験では、GalNAc-T9、pt-GalNAc-T のどちらにおいても目的の大きさの DNA 断片の増幅が見られた。これらの結果をとりまとめたところ、表 2 のように GalNAc-T9 は pt-GalNAc-T より多くの細胞で発現していることがわかった。*in situ* hybridization においても特徴的な発現様式をもつ pt-GalNAc-T の発現は培養細胞においても限局されており、神経系に特徴的な反応を触媒することが期待される。また、予備的な実験ではあるが、神経細胞をツニカマイシンで処理してストレスを与えたところ、ある種の細胞では pt-GalNAc-T の発現が高くなった。



図1 Neuro2A 細胞における神経特異的アイソザイムの発現

M；分子量マーカー，G；G3PDH, T9；GalNAc-T9, PT；pt-GalNAc-T

表 2 神経特異的アイソザイムの発現

	Neuro2A	NB41A3	IMR-32	SK-N-SH	PFSK-1
GalNAc-T9	+	-	+	+	+
pt-GalNAc-T	+	-	+	-	-

+, 特異的断片の増幅あり；-, 増幅なし。

3) ゼブラフィッシュにおける神経特異的 GalNAc 転移酵素のノックダウン

GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T の役割を調べるために、モデル生物の 1 種であるゼブラフィッシュを用いて、これらの遺伝子のノックダウン実験を行った。ゼブラフィッシュは、そのゲノムの配列がおおむね解明されている。また脊椎動物であるために、哺乳生物と遺伝子の相同性が高いという特徴を持っている。実際、筆者らはほ乳類の GalNAc-T と pt-GalNAc-T の塩基配列を元にして、ゼブラフィッシュの相同遺伝子をクローニングすることに成功した。また、胚が透明であるため、発生の過程の観察が容易であるとともに、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた遺伝子ノックダウンの系が確立しているという利点を持つ。

筆者らはまず、*in situ* hybridizaion により GalNAc-T と pt-GalNAc-T がゼブラフィッシュにおいても神経特異的に発現していることを見いだした。つぎに、それぞれの塩基配列からアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、それらをゼブラフィッシュの初期胚に注入し神経発生を観察した。

GalNAc-T9 遺伝子の発現を抑制したときには、受精後24時間胚でわずかではあるものの眼の発生遅延が観察され、また後脳の形態に乱れが生じた。また、終脳の形にも影響が見られた。さらに2日後では、眼の影響は顕著となり、脳室の肥大も観察された。

pt-GalNAc-T の場合は、GalNAc-T9 よりも顕著な形態変化が見られた。受精後24時間後には頭部に形態異常が生じた。眼もより小さくなっていた。図2に示したように、受精後36時間胚では、正常胚と比べて眼の小ささがより顕著となり、頭部の形態異常もはっきりしている。さらに色素細胞の発

遅延などの顕著な表現型の違いを示した。

これらの結果より、GalNAc-T9 と pt-GalNAc-T はゼブラフィッシュの神経発生において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。これらの遺伝子が神経系特異的に発現していることから、神経系に特異的な糖鎖付加反応が存在することが考えられる。

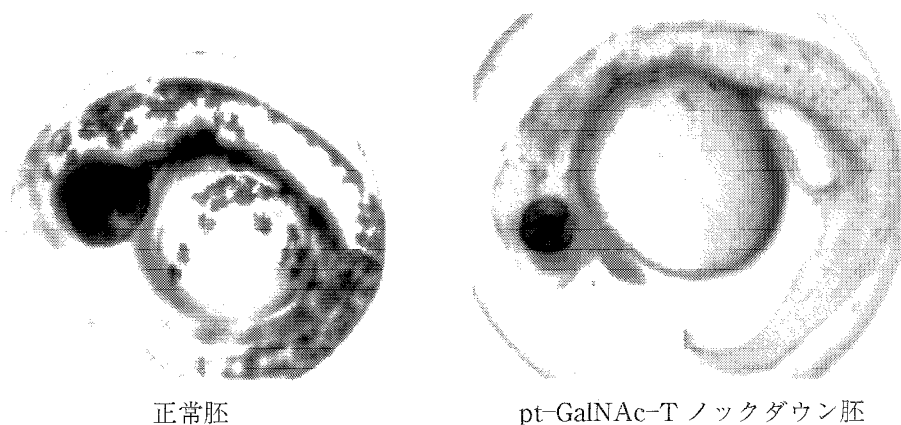


図2 遺伝子ノックダウン実験の36時間胚での比較

3. おわりに

これらの3種の実験を通じてGalNAc-T9 と pt-GalNAc-T が神経系において重要な働きをしていることが考えられた。今後は、神経細胞における内在性の基質の同定、および培養細胞を用いた遺伝子ノックダウン実験により、これらの酵素の働きを調べていく。さらに、遺伝子ノックダウン実験においては、糖鎖構造の変化も同時に調べる必要があると思われる。

参考文献

1. Toba, S., Tenno, M., Konishi, M., Mikami, T., Itoh, N., and Kurosaka, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 264-268
2. Nakamura, N., Toba, S., Hirai, M., Morishita, S., Mikami, T., Konishi, M., Itoh, N., and Kurosaka, A. (2005) *Biol. Pharm. Bull.* 28, 429-433
3. Shimura, H., Schlossmacher, M. G., Hattori, N., Frosch, M. P., Trockenbacher, A., Schneider, R., Mizuno, Y., Kosik, K. S., and Selkoe, D. J. (2001) *Science* 293, 263-269

京 都 産 業 大 学

総合学術研究所 所報 第2号 (抜刷)

平 成 16 年 8 月 発 行

神経特異的ムチン型糖鎖付加機構と
神経変性疾患との関連

黒 坂 光

京 都 産 業 大 学
総 合 学 術 研 究 所

神経特異的ムチン型糖鎖付加機構と 神経変性疾患との関連

黒坂 光

1. 神経変性疾患とムチン型糖鎖付加

近年、神経変性疾患の発症基盤として、細胞内で合成されたタンパク質の立体構造の異常（ミスフォールディング）が注目されている。一般的に、可溶性タンパク質は球状の高次構造を持つ。球状分子においては、疎水性アミノ酸残基は分子の内部に存在する一方、親水性アミノ酸残基は分子表面にあり、水和して分子の可溶化を促進している。しかしながら、分子のミスフォールディングにともない、内部にあった疎水性残基が分子の表面に露出するようになる。このような変性分子同士は互いに疎水性相互作用を介して凝集する。このようにして出来た凝集塊は水に不溶であり、それらが細胞内に異常蓄積するとやがて細胞死を引き起こす。特に分裂能を持たない神経細胞においては、タンパク質の異常蓄積による細胞死が神経変性疾患の原因となる。アルツハイマー病におけるプリオン、パーキンソン病の α -シヌクレインなどが神経変性疾患の原因タンパク質としてよく知られている。

タンパク質が正しい立体構造を形成し、それを維持するには翻訳後に種々の化学修飾反応を受ける必要がある。特にタンパク質への糖鎖の付加は、タンパク質分子の立体構造の維持のみならず、分子間の認識等に重要な役割を果たしている。筆者は、糖鎖の中でも GalNAc α 1 \rightarrow Ser (or Thr) の糖—タンパク質の結合様式を持つムチン型糖鎖の神経細胞における役割、特に神経変性疾患との関連に注目している。近年、前述した神経変性疾患の原因タンパク質とムチン型糖鎖の関連が指摘されている。プリオンへの GalNAc の付加は、タンパク質の二次構造をコイル構造から β -シートへ変化させる。異常蓄積したタンパク質が β -シート構造を多く持つことから、ムチン型糖鎖の付加がタンパク質の立体構造に与える影響が注目されている。また後述するように、 α -シヌクレインにおいても異常凝集にムチン型糖鎖の付加反応が関連しているとの報告もある。

ムチン型糖鎖の付加反応の第一段階は、UDP-GalNAc:ポリペプチドN-アセチルガラクトサミン転移酵素（以後 GalNAc 転移酵素と記載）により触媒される（図1）。すなわち、この酵素はタンパク質分子上のムチン型糖鎖の数と位置を決定する重要な役割を果たしている。近年の遺伝子クローニングの結果より、GalNAc 転移酵素は大きな遺伝子ファミリーを形成していることが明らかとなった。

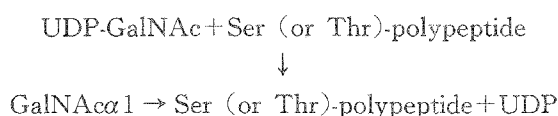


図1 GalNAc 転移酵素が触媒する反応

現在まで、ヒトでは14種類のアイソザイム遺伝子のクローニングが完了している。そのうち、筆者らがクローニングした GalNAc-T9 は、脳特異的に発現するアイソザイムである。また、成松らにより単離された GalNAc-T13 も脳に多く発現することが知られている。さらに GalNAc-T9 と相同性の高い新規クローン（未発表であるが、ここでは GalNAc-T15 とよぶことにする。）も、脳特異的な発現様式を持つ。本論ではこれらの脳特異的アイソザイムとパーキンソン病の原因タンパク質の α -シヌクレインとの関連について報告する。

2. α -シヌクレインへの糖鎖付加反応

α -シヌクレインは常染色体優性遺伝形式を呈する家族性パーキンソン病の原因遺伝子産物である。 α -シヌクレインはパーキンソン病の病理的特徴である Lewy 小体の主要構成タンパク質の1つである。病変部位において、異常凝集した α -シヌクレインの蓄積が見られるが、その原因は明らかではない。しかしながら、近年 Lewy 小体から単離した α -シヌクレインが、ムチン型糖鎖の修飾を受けていることが報告されたことから、糖鎖付加によるフォールディング異常が、 α -シヌクレインの異常蓄積の引き金となっている可能性が指摘されている。そこで筆者らは、我々がクローニングした神経特異的なアイソザイムを含む、4種類のアイソザイムを用いて α -シヌクレインへの糖鎖付加活性を測定した。

酵素反応に用いる α -シヌクレインは、Qiagen 社の発現システムを用いて大腸菌で合成させた。このシステムでは、 α -シヌクレインの C-末端に 6XHis タグを持った組換えタンパク質が合成される。発現ベクター *pQE60* に α -シヌクレインの cDNA を組込んだ。組換え *pQE60* をクローニングして、それを大腸菌株 M15 にトランスフェクトした。大腸菌の培養液に IPTG を加えて、 α -シヌクレインの合成を誘導した。その後、大腸菌を溶菌し、可溶性画分と不溶性画分とに分けた。それぞれの画分を SDS-PAGE で解析した（図2）。IPTG 添加1時間後には顕著な α -シヌクレインの発現誘導が起こるが、本実験では添加4時間後に大腸菌を回収した。また、誘導された α -シヌクレインは可溶性画分に回収された。発現効率は非常に高く、可溶性画分では α -シヌクレインは最も含量の高いタンパク質であった。

次に α -シヌクレインの精製を試みた。精製には α -シヌクレインの C 末端に付加した 6XHis タグを利用した。 α -シヌクレインを発現した大腸菌の可溶性画分を Ni-アガロースカラムを使って精製した。カラムから溶出された画分では、可溶性画分に存在した夾雑タンパク質が除去されていた。こ

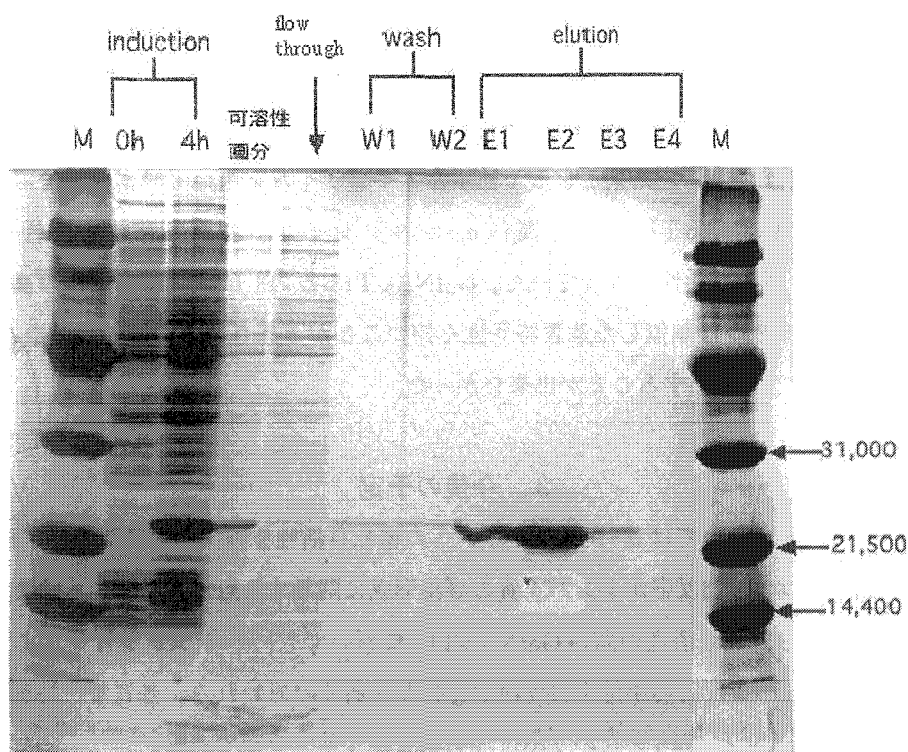


図2 α -シヌクレインの発現と精製

0.1mM IPTG で誘導し、4 時間後に大腸菌を回収した。大腸菌を溶菌し、可溶性画分を調整した。その画分を Ni-アガロースを用いて精製した。カラムの素通り画分、洗浄画分 (W1、W2)、溶出画分 (E1、E2、E3、E4) に分けて SDS-PAGE で分析した。

表1 α -シヌクレインへの糖付加反応

約 30,000dpm の UDP-[^3H]GalNAc を用いて 37°C で10時間反応させた。

アイソザイム	活性 (dpm)
GalNAc-T1	120
GalNAc-T9	ND
GalNAc-T13	440
GalNAc-T15	ND

のようにして精製した α -シヌクレインを酵素反応に用いた。

酵素原としては、脳特異的なアイソザイムである GalNAc-T9、-T15 および脳で比較的強く発現している GalNAc-T13 を用いた。さらに最も多くの組織で発現しており、典型的なムチン型糖タンパク質への糖鎖付加反応に関与すると考えられている GalNAc-T1 も用いた。これらのアイソザイムを

コードする cDNA をほ乳類の発現ベクターである *pcDNA3.1* に組み込み、組換え GalNAc 転移酵素を COS7 細胞で発現させた。GalNAc 転移酵素は分子の N 末端に付加したタグ（プロテイン A の IgG 結合ドメイン）を利用して、IgG-Sepahrose を用いて精製した。

以上のように精製した α -シヌクレインと 4 種類のアイズザイムを用いて酵素活性を測定した。表 1 に示したように、GalNAc-T13 が最も高い α -シヌクレインへ糖を転移する活性を示した。GalNAc-T1 も弱いながらも活性を持っていた。GalNAc-T13 と -T1 は非常に相同性の高いアイズザイムであるため、この 2 つは類似した基質特異性を持つことが予想される。脳特異的な GalNAc-T9 と -T15 に関しては活性を検出することが出来なかった。

3. 今後の予定

GalNAc-T13 と -T1 については α -シヌクレインへの糖転移活性を検出した。これは、 α -シヌクレインへのムチン型糖鎖の付加反応がタンパク質の凝集形成に関与する可能性を示すものであり注目に値する。しかしながら、最も活性の高い GalNAc-T13 においても、 α -シヌクレインの約 2% が糖鎖付加されたにすぎず、酵素反応の条件を再検討する必要があると思われる。基質量、酵素量などの諸条件を整え、GalNAc-T9 と -T15 を含めて糖付加実験を繰り返す予定である。

GalNAc-T9 と -T15 に関しては、脳以外での発現が全く認められず、神経変性疾患との関連のみならず、脳の発生や働きに関わっている可能性がある。これらのアイズザイムについてはモデル生物での遺伝子のノックダウンを含めて機能を解析していく。

Evidence for chloroplast control of external Ca^{2+} -induced cytosolic Ca^{2+} transients and stomatal closure

Hironari Nomura, Teiko Komori, Maki Kobori, Yoichi Nakahira and Takashi Shiina*

Graduate School of Human and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto 606-8522, Japan

Received xx xxxx 2077; revised xx xxxx 2077; accepted xx xxxx 2077.

*For correspondence (fax +81 75 703 5449; e-mail shiina@kpu.ac.jp).

Summary

The role of guard cell chloroplasts in stomatal function is controversial. It is usually assumed that stomatal closure is preceded by a transient increase in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) in the guard cells. Here, we provide the evidence that chloroplasts play a critical role in the generation of extracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$)-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients and stomatal closure in *Arabidopsis*. CAS (Ca^{2+} sensing receptor) is a plant-specific putative Ca^{2+} -binding protein that was originally proposed to be a plasma membrane-localized external Ca^{2+} sensor. In the present study, we characterized the intracellular localization of CAS in *Arabidopsis* with a combination of techniques, including (i) *in vivo* localization of green fluorescent protein (GFP) fused gene expression, (ii) subcellular fractionation and fractional analysis of CAS with Western blots, and (iii) database analysis of thylakoid membrane proteomes. Each technique produced consistent results. CAS was localized mainly to chloroplasts. It is an integral thylakoid membrane protein, and the N-terminus acidic Ca^{2+} -binding region is likely exposed to the stromal side of the membrane. The phenotype of T-DNA insertion CAS knockout mutants and cDNA mutant-complemented plants revealed that CAS is essential for stomatal closure induced by external Ca^{2+} . In contrast, overexpression of CAS promoted stomatal closure in the absence of externally applied Ca^{2+} . Furthermore, using the transgenic aequorin system, we showed that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients were significantly reduced in CAS knockout mutants. Our results suggest that thylakoid membrane-localized CAS is essential for $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients and stomatal closure.

Keywords: chloroplasts, stomatal movement, calcium signaling, CAS, extracellular Ca^{2+} .

Introduction

Stomata control the exchange of gases and H_2O between a plant and the atmosphere. In most species, stomatal guard cells contain well-developed chloroplasts, while typical epidermal cells have poorly differentiated plastids. It is usually assumed that guard cell chloroplasts have an important role in stomatal opening and closing through photosynthetic production of ATP, reductants, osmotically active sugars, and accumulation and degradation of starch (Melis and Zeiger, 1982; Talbot and Zeiger, 1993; Tallman and Zeiger, 1988; Tominaga *et al.*, 2001). However, the role of guard cell chloroplasts in signal transduction pathways is not clear.

In plant cells, Ca^{2+} has a key role as a second messenger in intracellular signal transduction in a range of events, including phytochrome action, hormone responses; various stress responses, plant-microbe interactions, tip growth,

and stomatal movement. The complexity of cellular signals related cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) is well illustrated in stomatal guard cells. ABA (McAinsh *et al.*, 1990; Schroeder and Hagiwara, 1990), reactive oxygen species (ROS; McAinsh *et al.*, 1996; Pei *et al.*, 2000), low temperature (Allen *et al.*, 2000), and external Ca^{2+} (Allen *et al.*, 1999, 2000) produce high-frequency $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscillations in *Arabidopsis* guard cells that are mediated by two sources: Ca^{2+} influx from extracellular space and intracellular Ca^{2+} mobilization during signaling. Vacuoles and endoplasmic reticulum are the most prominent intracellular sinks for Ca^{2+} in most plant cells. Although chloroplasts contain high concentrations (i.e. 4–23 mM) of total Ca^{2+} (Brand and Becker, 1984; Evans *et al.*, 1991), it is not clear that they have the capacity to sequester Ca^{2+} or are involved in the generation of Ca^{2+} signals in guard cells.

	T P J	3 3 9 0	B	Dispatch: 26.12.07	Journal: TPJ	CE: Bharathy
	Journal Name	Manuscript No.		Author Received:	No. of pages: 11	PE: Aswini

Recently, molecular genetic studies have suggested that chloroplasts may be involved in the generation of cytosolic Ca^{2+} signals in plant cells. A putative thylakoid membrane-localized Ca^{2+} carrier protein, PPF1, may regulate flowering time by modulating the Ca^{2+} storage capacity of chloroplasts (Li *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). It was also proposed that chloroplast-localized CASTOR and POLLUX, homologues of the *Methanobacterium thermoautotrophicum* Ca^{2+} -gated K^+ channel are involved in a Ca^{2+} spiking response in Rhizobium-legume symbiosis (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005). Furthermore, Sai and Johnson (2002) demonstrated that the dark-induced large increase of stromal Ca^{2+} levels precedes the generation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients in tobacco leaf cells. These results suggest that chloroplasts act as intracellular Ca^{2+} stores that release Ca^{2+} in response to various stimuli and play a crucial role in the generation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients.

CAS (Ca^{2+} sensing receptor) encodes a novel, plant-specific 42 kDa Ca^{2+} -binding protein that contains a single predicted transmembrane domain (Han *et al.*, 2003). The N-terminus has a low-affinity/high-capacity Ca^{2+} binding site, and the C-terminus contains a rhodanese-like domain, which is probably involved in protein-protein interactions. CAS was originally identified as a Ca^{2+} -sensor protein located in the plasma membrane. However, CAS is predicted to be localized in chloroplasts, but not in plasma membrane by a number of subcellular localization prediction programs. Furthermore, we recently found that CAS had been identified in various proteomes of chloroplast thylakoid membranes, but not in plasma membrane or stroma proteomes (Friso *et al.*, 2004; Peltier *et al.*, 2004). In the present study, we re-examined the intracellular location of CAS, using subcellular fractionation, protein gel blots, and *in vivo* localization using green fluorescent protein (GFP) fusions. Our results demonstrate that CAS protein is localized primarily in chloroplast membranes. T-DNA insertion CAS knockout mutants were impaired in extracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$)-induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients and subsequent stomatal closure. In contrast, CAS overexpression promoted stomatal closure in the absence of externally applied Ca^{2+} . The results provide the evidence that chloroplasts have a critical role in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase and subsequent stomatal closure in *Arabidopsis*.

Results

CAS is essential for $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure

To understand the role of CAS in stomatal movement, we examined CAS knockout and CAS overexpressing phenotypes. Firstly, we isolated two CAS T-DNA insertion mutant alleles, SALK_070416 (*cas-1*) and 665G12 (*cas-2*; Figure 1a). Homozygous individuals were identified by PCR analysis (Figure S1). Sequencing the T-DNA flanking region showed

that the insertions were localized 224 bp (*cas-1*) and 857 bp (*cas-2*) downstream from the ATG start codon. Although both T-DNA insertions were located in introns, Northern (Figure 1b) and Western (Figure 1c) blots showed that CAS expression was undetected in the 2 mutant lines. The progeny of *cas-1* and *cas-2* homozygous individuals grow normally under standard conditions.

Elevating external Ca^{2+} induces stomatal closure in several plants, including *Commelina communis* (McAinsh *et al.*, 1995) and *Arabidopsis* (Allen *et al.*, 1999). As shown in Figure 1(d), 2 mM CaCl_2 -induced stomatal closure within 2 h in wild-type *Arabidopsis*. On the other hand, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure was completely impaired in *cas-1* (Figure 1d) and *cas-2* (Figure S3) mutant alleles. This is consistent with a previous report that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure was inhibited in CAS antisense transgenic plants (Han *et al.*, 2003). To confirm that the CAS-deficient phenotype is caused by a disruption of the CAS gene, we introduced CAS cDNA driven by a cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter in *cas-1* mutants. Expression of CAS mRNA at wild type levels (CAS/*cas-1* #5) restored $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure in *cas-1* mutant plants to the levels of wild-type plants (Figure 1d; Figure S2a). Moreover, slight overexpression of CAS partially promoted stomatal closure in *cas-1* mutants (Figure S3). Thus, we concluded that CAS is essential for $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure. On the other hand, ABA- and dark-induced stomatal closure and light-induced stomatal opening was not suppressed in *cas-1* and *cas-2* mutant lines (Figure S4), suggesting that the molecular machinery involved in stomatal movement was not impaired by CAS inactivation.

To further test the role of CAS in stomatal movement, we generated transgenic *Arabidopsis* plants that overexpressed CAS (designated CASox) under the control of a CaMV 35S promoter. A comparison of CAS expression in seedlings showed that CASox #4 and #11 expressed the highest levels of CAS (Figure S2b). Expression of CAS protein was ~10 times greater in CASox #4 plants compared with wild-type plants (Figure 1c). Interestingly, CAS overexpression promoted stomatal closure in the absence of external Ca^{2+} (Figure 1d). The stomatal opening was apparently dependent on CAS expression levels (Figure S3). On the other hand, stomata in CASox #4 and #11 leaves closed normally in response to external Ca^{2+} treatment (Figure 1d; Figure S3). Taken together, these results demonstrate that CAS is essential for $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure in *Arabidopsis*.

CAS is localized primarily to chloroplast membranes

In a previous paper, Han *et al.* (2003) reported that CAS targets plasma membranes. However, we recently found that CAS had been identified in various proteomes of chloroplast thylakoid membranes (Friso *et al.*, 2004; Peltier *et al.*,

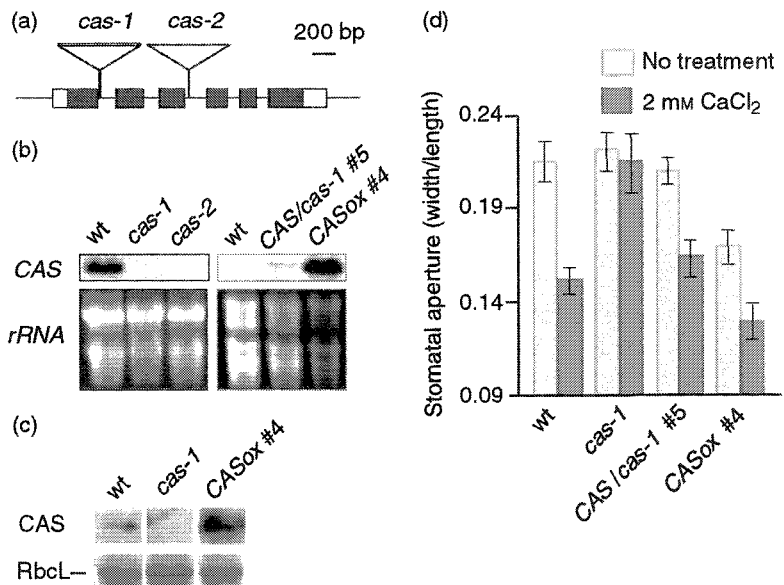
Figure 1. CAS and $[Ca^{2+}]_{ext}$ -induced stomatal closure.

(a) Schematic representation of the CAS gene and the positions of the T-DNA insertions in the *cas-1* and *cas-2* alleles. Black boxes represent exons, gray boxes represent untranslated regions.

(b) Northern blot analysis of CAS transcripts in mutant and wild-type plants. Total RNA was isolated from 3-week-old whole *Arabidopsis* plants and was hybridized with a digoxigenin-DNA probe. The lower row shows ethidium bromide stained rRNA.

(c) Western blot analysis of 3-week-old plants from the CAS knockout mutant (*cas-1*) and the CAS overexpressing (CASox#4) lines. Ten micrograms total protein was loaded in each lane. Rubisco was stained with CBB as a loading control. The molecular mass of the predicted mature protein is 34 kDa.

(d) $[Ca^{2+}]_{ext}$ -induced stomatal closure in mutant plants. The stomatal aperture was calculated as a ratio of pore width/guard cell length. Guard cell lengths of 20–26 μ m were used in the experiments. Data are mean \pm SEM of 50 stomata from five replicates.



2004). This prompted us to examine the subcellular localization of CAS in detail. Our results revealed that the N-terminus of CAS exhibits features typical of chloroplast transit peptides, as indicated by several subcellular localization prediction programs, including TARGETP, ChloroP, PSORT, Predotar and iPSORT. To determine whether the CAS protein is localized to chloroplasts, we examined the intracellular localization of CAS-GFP fusion proteins. First, 70 N-terminal amino acid residues containing the predicted transit peptide were fused to the GFP protein and expressed transiently in *Arabidopsis* protoplasts. Confocal microscopy revealed co-localization of GFP fluorescence with chlorophyll autofluorescence in chloroplasts (Figure 2a), suggesting that the N-terminal sequence of CAS acts as a chloroplast transit peptide. Furthermore, we observed that GFP-tagged full-length CAS was predominantly localized to chloroplasts (Figure 2b). GFP fluorescence was detected in the central region of the chloroplasts, but not in the stromules or periphery of the chloroplasts (data not shown), suggesting that CAS-GFP fusion is localized to inner thylakoid membranes. Since GFP fluorescence did not disappear after disruption of protoplasts by osmotic shock, CAS is unlikely a stroma-localized soluble protein (data not shown). On the other hand, GFP fused syntaxin SYP132 (plasma membrane marker) was localized exclusively to plasma membrane (Figure 2e). Additionally, the localization of GFP-Sec22 (endoplasmic reticulum marker) fusion proteins was apparently different from that of CAS-GFP fusions (Figure 2d). GFP fluorescence was detected mainly in the cytoplasm in control GFP-expressing cells (Figure 2c). To confirm the localization of CAS-GFP in chloroplasts, we generated transgenic *Arabidopsis* plants that constitutively expressed CAS-GFP

under control of a CaMV 35S promoter. GFP fluorescence was detected exclusively in chloroplasts in all types of leaf cells, including mesophyll, epidermal, and guard cells (Figure 3), and in non-photosynthetic plastids in flower petals and roots (data not shown). On the other hand, no GFP fluorescence was detected in the plasma membranes of any cell.

We next examined subcellular localization of CAS protein by cell fractionation and Western blotting. In crude protein extracts from wild-type plants, rabbit anti-*Arabidopsis* CAS polyclonal antiserum detected a 34-kDa protein, corresponding to the predicted size of the mature CAS protein, but slightly the 42 kDa CAS precursor protein, suggesting that the CAS precursor is imported into chloroplasts and processed to mature protein (Figure 4a). Furthermore, we isolated chloroplast thylakoid membrane (S6k)- and cytoplasmic microsomal (S100k)-containing fractions and analyzed them in Western blots. The plasma membrane marker H⁺-ATPase was detected in microsomal fraction but not in the chloroplast fraction (Figure 4b). In contrast, CAS was detected exclusively in the chloroplast membrane fraction, as was an integral protein of the chloroplast thylakoid membrane, CP43. CAS signal was not detected in the plasma membrane fraction. To further determine the localization of CAS in chloroplasts, we isolated intact chloroplasts from spinach and fractionated them into soluble, envelope and thylakoid fractions. Each fraction was obtained with little cross-contamination, as determined by western analysis of specific marker proteins. We used GS2, Toc75 and CP43 as the stromal, outer envelope and the thylakoid membrane markers, respectively (Figure 4c). CAS was exclusively detected in the thylakoid fraction, but not in the envelope

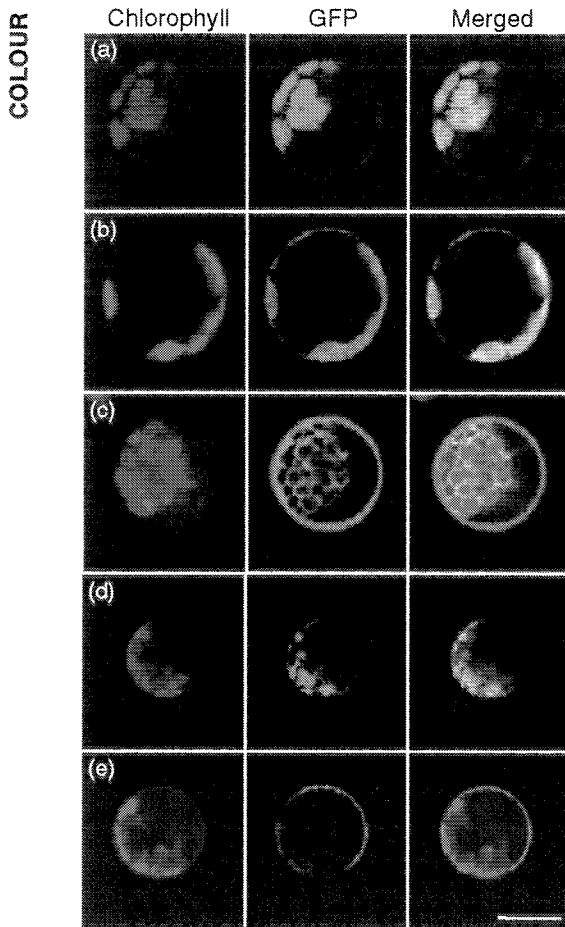


Figure 2. Subcellular localization of CAS in *Arabidopsis* protoplasts. Confocal images of *Arabidopsis* protoplasts transfected with *35S-traCAS-GFP* (a) and *35S-CAS-GFP* (b), *35S-GFP* (c), *35S-GFP-Sec22* (d), and *35S-GFP-SYP132* (e) plasmids are shown. Scale bars represent 20 μm .

and stroma fractions. Furthermore, CAS was also detected in the chloroplast membrane fraction from *Arabidopsis* (Figure S5). The results clearly demonstrated that CAS is localized mainly to chloroplast thylakoid membranes and is not associated with plasma membranes.

To further describe the topology of CAS protein in the thylakoid membrane, isolated thylakoids were treated with thermolysin or trypsin. This treatment is expected to digest proteins exposed to the stromal side of the thylakoid membrane. The protease treated thylakoids were analyzed by western blot using N-terminal specific anti-CAS antibody. CAS was degraded by proteases in a concentration dependent manner (Figure 5a), suggesting that the CAS N-terminus is exposed to the stromal side of the thylakoid membrane. In contrast, the thylakoid lumen peripheral protein, PsbP, was not affected by protease treatments,

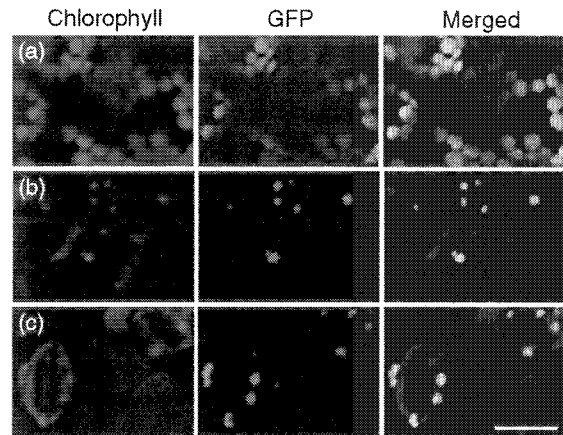


Figure 3. Confocal images of 3-week-old transgenic *Arabidopsis* plants expressing CAS-GFP fusion proteins. Chlorophyll, GFP and merged images from mesophyll (a), epidermal (b), and guard (c) cells are shown. Scale bars represent 10 μm .

indicating that thylakoids remained sealed and retained their correct sidedness (Figure 5c). It has been shown that EGFP fluorescence could not be detected in the photosynthetically active thylakoid lumen due to its acidic pH (Marques *et al.*, 2004), suggesting that GFP fused to the C-terminus of CAS may also be exposed to the stromal side. However, we could not determine the location of the CAS C terminus immunologically, since our C-terminal-specific antibody could not detect CAS proteins in plants. Furthermore, we treated thylakoid membranes with high salt (1 M NaCl), alkaline (0.1 M Na_2CO_3), denaturing (4 M urea) or non-ionic detergent (1% Triton X-100) solutions (Figure 5b). PsbP was released from the membranes after treatment with NaCl and Na_2CO_3 (Figure 5c), but membrane-associated CAS resisted high salt alkaline and denaturing treatment, suggesting that CAS is an integral membrane protein.

Chloroplast-localized CAS mediates cytoplasmic Ca^{2+} signaling

We were interested in knowing how chloroplasts regulate $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure. It has been shown that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced stomatal closure is usually preceded by a transient elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. To examine the involvement of chloroplast-localized CAS in the generation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients, we generated several wild-type or *cas-1* mutant plants *Arabidopsis* lines that expressed the apoaquorin gene under the control of the CaMV 35S promoter. Wild-type and *cas-1* mutants that expressed the same amount of apoaquorin protein were selected for further evaluation (Figure 6a). As shown in Figure 6(b), 10 mM CaCl_2 induced transient $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation within 2 min, after which the signal gradually declined. The initial $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$

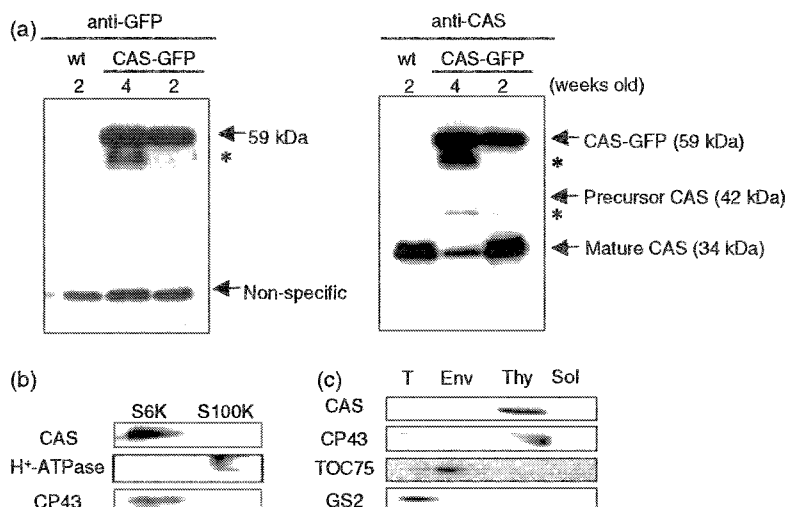


Figure 4. Subcellular and suborganellar fractionation and Western blot analysis of CAS in the fractions.

(a) Detection of CAS-GFP fusion proteins in transgenic *Arabidopsis*. Total proteins ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ lane) isolated from *Arabidopsis* wild type and CAS-GFP transgenic plants were electrophoresed on 10% SDS-PAGE and detected with anti-GFP (1:500 dilution) or anti-CAS (1:3000 dilution) antibodies. Asterisks indicate possible degradation products.

(b) Chloroplast and microsomes fractions were prepared as described in Materials and Methods. Protein was resolved on an 8% SDS-PAGE ($10 \mu\text{g protein lane}^{-1}$) and immunologically detected with the indicated antibodies.

(c) Western blot analysis of chloroplast fractions. The spinach chloroplast total lysates (T) were fractionated into envelop (Env), thylakoid (Thy) and soluble (Sol) fractions. Fractions were resolved on a 10% SDS-PAGE and detected with the indicated antibodies. Ten micrograms protein of T, Env and Thy fractions, and 2 μg protein of Sol fraction were loaded.

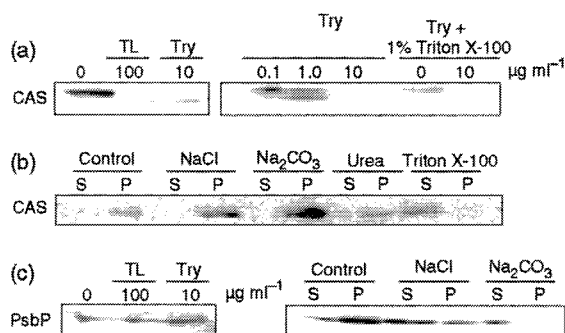


Figure 5. Association of CAS with chloroplast thylakoid membranes.

(a) Thylakoid membrane ($0.1 \text{ mg chlorophyll ml}^{-1}$) was suspended in an isolation buffer containing thermolysin (TL), trypsin (Try), or no protease. Upper numbers indicate the protease concentration. Thylakoid membrane was separated by 12% SDS-PAGE and proteins were detected with anti-CAS (a) or anti-PsbP (c) antibodies.

(b) Thylakoid membrane ($0.1 \text{ mg chlorophyll ml}^{-1}$) was suspended in an isolation buffer containing 1 M NaCl, 0.1 M Na_2CO_3 , 4 M urea, 1% Triton X-100 or no treatment (control). Protein was separated into membrane (P) and supernatant (S) fractions by centrifuging. Thylakoid membrane protein was detected with anti-CAS (b) or anti-PsbP (c) antibodies.

elevation was significantly reduced in *cas-1* mutant plants. The integrated amount of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) over 500 sec ($3.74 \pm 0.69 \mu\text{M}$; $n = 10$) in wild-type plants was greatly reduced in *cas-1* mutant plants ($1.15 \pm 0.36 \mu\text{M}$; $n = 5$; Figure 6c). These results, together with the previous finding that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced

high-frequency $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ oscillations were not detected in guard cells in *CAS* antisense plants (Han *et al.*, 2003), led us to conclude that chloroplast-localized *CAS* is involved in the generation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation in *Arabidopsis*.

CAS protein accumulation is tissue specific and regulated during senescence

We examined *CAS* protein levels during plant development and senescence with Western blot. *CAS* protein was detected in rosette leaves, cauline leaves, stems, and flowers, but not in roots (Figure 7a), suggesting that *CAS* is up-regulated with chloroplast development. To determine whether tissue-specific and developmental expression of *CAS* protein is controlled at the level of transcription, we histochemically examined the localization of *CAS* promoter-driven beta-glucuronidase (GUS) expression in transgenic *Arabidopsis*. In 2-week-old plants, GUS was detected in rosette leaves and sepals, but not in roots (Figure 7b-d). The results suggest that tissue-specific *CAS* protein accumulation is regulated at the level of transcription. On the other hand, high levels of GUS and low levels of *CAS* were detected in 1-week old cotyledons (Figure 7a,b), suggesting that post-transcriptional regulation has a role in *CAS* gene expression in cotyledons. Furthermore, we found that *CAS* declined to very low levels in rosette and cauline leaves in

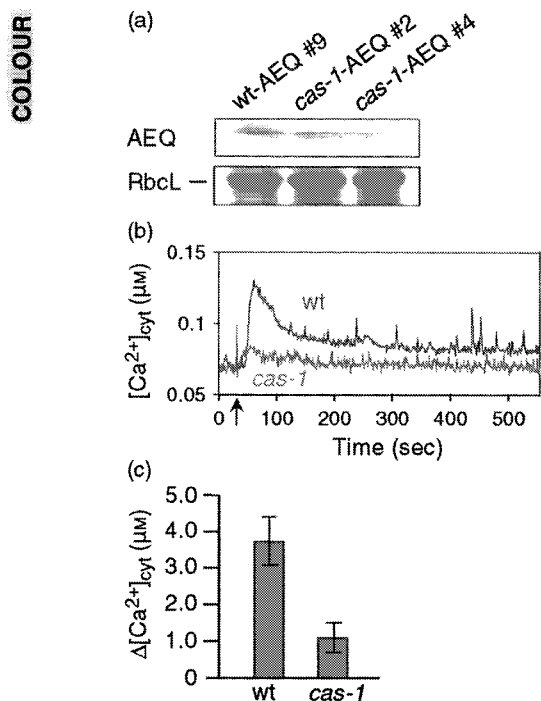


Figure 6. CAS and $[Ca^{2+}]_{ext}$ -induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase. (a) Western blot analysis of apoaequorin in transgenic plants. Twenty micrograms of total extracted protein/lane was separated by 12% SDS-PAGE. The transgenic aequorin protein (24 kDa) was detected with anti-AEQ antibody. Rubisco was stained with CBB to confirm equal loading of the proteins. (b) $[Ca^{2+}]_{ext}$ -induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase in transgenic *Arabidopsis* expressing the apoaequorin gene in wild-type and *cas-1* mutant plants. Detached leaves were used for measurements. $[Ca^{2+}]_{ext}$ -induced $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increase resulted from the addition of 10 mM $CaCl_2$ (arrow) to the external medium. A significant increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ was observed in half of the plants examined (wild-type, 10/18; *cas-1*, 5/11). (c) Time-integrated increase in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ for the first 500 sec of the Ca^{2+} transient was plotted for wild-type ($n = 10$) and *cas-1* ($n = 5$) plants. Data are mean \pm SEM of relative values. The similar result was obtained by another two individual experiments.

6-week-old plants. The decrease in CAS coincided with the disappearance of GS2, which is known to be quickly degraded during senescence (Kamachi *et al.*, 1991). Thus, CAS, like GS2, is downregulated quickly and specifically during leaf senescence. Finally, to examine cell-specific CAS promoter activity, we analyzed transgenic plants expressing CAS promoter-GFP gene fusion. GFP fluorescence was detected in the palisade, mesophyll, epidermal, and guard cells in leaves (Figure 7e,f). It is likely that CAS is expressed in all types of leaf cells and may also have a role in chloroplast function in mesophyll and epidermal cells.

Since CAS is localized to chloroplast membranes, we examined the effects of CAS gene disruption and overexpression on chlorophyll and photosystem II (PSII) activity. We found that suppression and overexpression of CAS protein did not result in significant decreases or increases in

chlorophyll or the chlorophyll *a/b* ratio (Table 1). Thus, it is unlikely that CAS is directly involved in photosynthesis activity. However, it should be noted that non-photochemical quenching (NPQ) values were slightly, but significantly increased and decreased in the CAS knockout and overexpressing mutants, respectively.

Discussion

CAS is localized primarily to chloroplast membranes

CAS was originally identified as a novel Ca^{2+} -binding protein involved in extracellular Ca^{2+} sensing and was shown to be associated with plasma membranes (Han *et al.*, 2003). The results of the present study, however, demonstrate that CAS is mainly localized to chloroplast thylakoid membranes. First, we showed that CAS-GFP fusions were localized to chloroplasts, most likely at thylakoid membranes in transiently transformed protoplasts and transgenic *Arabidopsis*. In transgenic plants, no GFP fluorescence was detected on the cell surface, suggesting that the fusion proteins were not localized to plasma membranes (Figure 3). On the other hand, it was previously shown that CAS-GFP fusion protein was localized to the plasma membranes of onion epidermal (Han *et al.*, 2003) and HEK 293 cells (Tang *et al.*, 2007). We repeated the experiment and found no evidence that CAS-GFP fusion is targeted to the plasma membrane of onion epidermal cells. GFP fluorescence was localized in plastid-like dotted organelles apparently different from the plasma membrane in onion cells (Figure S6). Second, CAS protein was detected in chloroplast membranes, but not in the microsomal fraction that contained plasma membranes (Figure 4b). Third, subfractionation of intact chloroplasts revealed that CAS protein was detected in the thylakoid membrane fraction of chloroplasts. Finally, CAS has been identified in various proteomes of chloroplast thylakoid membrane, but not in plasma membrane or stroma proteomes (Friso *et al.*, 2004; Peltier *et al.*, 2004; Tsunoyama *et al.* unpublished data). Based on those findings, we concluded that CAS is localized mainly to chloroplast thylakoid membranes. Interestingly, the distribution of CAS suggests that it is an integral thylakoid membrane protein, and the N-terminus of CAS, which contains the Ca^{2+} -binding domain, appears to be exposed to the stromal side of the thylakoid membrane (Figure 5a). Furthermore, CAS expression coincides with chloroplast development (Figure 7a), suggesting a role for CAS in chloroplasts.

CAS plays a critical role in the regulation of stomatal movement

Guard cells contain chloroplasts that are smaller and have less granal stacking than mesophyll cell chloroplasts. It has been proposed that guard cell chloroplasts are

Figure 7. Developmental expression of CAS in *Arabidopsis*.

(a) Western blot analysis of CAS accumulation during plant development and senescence. Total protein extracts isolated from wild-type *Arabidopsis* were separated by 10% SDS-PAGE (10 µg protein lane⁻¹) and detected with CAS and GS2 antibodies. Ro, root; St, stem; Fl, flower; Cau, cauline; Co, cotyledon; Rose, rosette. Numbers indicate weeks after sowing. Rubisco protein was stained with CBB.

(b–d) Histochemical localization of beta-glucuronidase (GUS) activity in transgenic *CAS promoter-GUS* plants.

(b) 7-day-old seedling, (c) above-ground section of a 2-week-old plant, (d) flower. Scale bars represent 5 mm.

(e, f) Green fluorescent protein (GFP) in the transgenic *CAS promoter-GFP* plants.

(e) Mesophyll and (f) epidermal tissues of a 3-week-old plant. Scale bars represent 10 µm.

LOW RESOLUTION COLOUR FIG

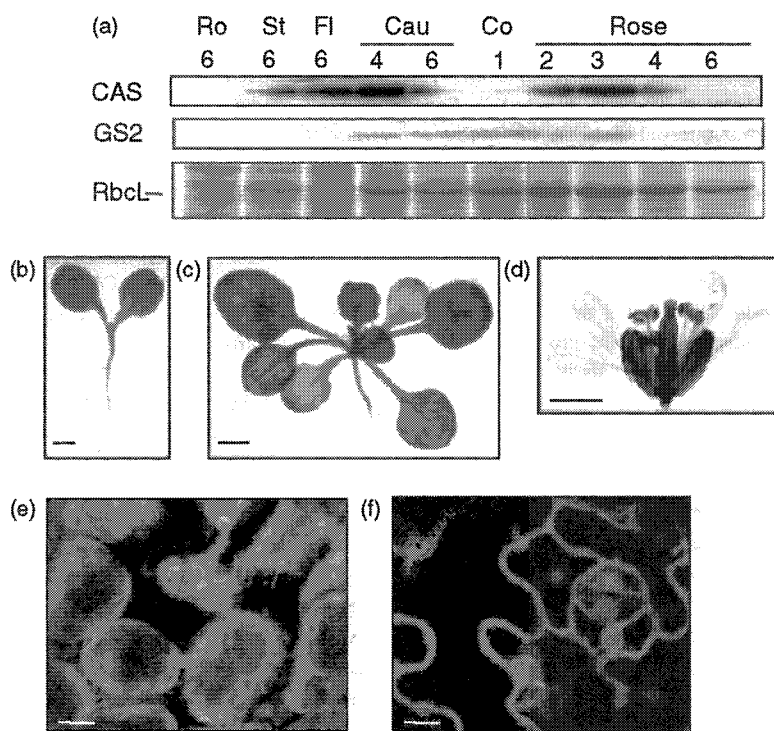


Table 1 Chlorophyll content and chlorophyll fluorescence of wild-type, *cas-1* and *CASox* plants

	Chl <i>a</i> + <i>b</i>	Chl <i>a/b</i>	Fv/Fm	ϕ_{PSII}	NPQ	1-qP
Wild-type	2.55 ± 0.25	2.68 ± 0.11	0.78 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.12 ± 0.02
<i>cas-1</i>	2.59 ± 0.05	2.79 ± 0.03	0.80 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.12 ± 0.01
<i>CASox</i>	2.90 ± 0.16	2.65 ± 0.01	0.78 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.10 ± 0.01

Chl *a* + *b*, chlorophyll *a* and *b* contents in plant leaves (mg g⁻¹ fresh weight); Chl *a/b*, chlorophyll *a/b* relate; Fv/Fm, maximum quantum yield of PSII; ϕ_{PSII} , effective quantum yield of PSII; NPQ, non-photochemical quenching; 1-qP, fraction of Q_A present in the reduced state. Data are mean values ± SEM of six separate experiments.

photosynthetically active, provide the ATP required for H⁺ pumping in the plasma membrane and stomatal opening, and produce sugars by photosynthetic carbon assimilation. Furthermore, guard cell chloroplasts accumulate starch in the dark and hydrolyze starch in the light to synthesize malate, the major osmoticum in guard cells (Melis and Zeiger, 1982; Talbot and Zeiger, 1993; Tailman and Zeiger, 1988; Tominaga *et al.*, 2001). However, the role of guard cell chloroplasts in signal transduction pathways is not clear. In the present study, we demonstrated that disrupting the *CAS* gene impaired stomatal closure induced by [Ca²⁺]_{ext} elevation (Figure 1d). Complementation experiments with a *CAS* cDNA clone confirmed that chloroplast-localized *CAS* has a role in regulating stomatal movement. In contrast, *CAS* overexpression promoted stomatal closure in the absence of externally applied Ca²⁺ (Figure 1d; Figure S3). Taken together, the results suggest

that chloroplast-localized *CAS* is essential for [Ca²⁺]_{ext}-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. Our results provide the evidence that chloroplasts play a crucial role in the regulation of stomatal movement.

It is unlikely that [Ca²⁺]_{ext}-induced stomatal closure was impaired in *CAS* knockout mutants due to defects in photosynthesis activity and/or decreased production of ATP, since maximum PSII efficiency was not affected in *CAS* mutants (Table 1), and plant growth was not significantly impaired by knockout or overexpression of *CAS*. Rather, *CAS* may be involved in the regulation of stomatal responses, namely environmental sensing or intracellular signal transduction. We consider here three possible roles for chloroplast-localized *CAS* in signal transduction pathways leading to stomatal closure in guard cells. First, thylakoid membrane-associated *CAS* may be involved in the transduction of blue light signals received by zeaxanthin

in chloroplasts (Talbot *et al.*, 2003). However, light-dependent stomatal movement was normal in *CAS* knockout mutants, indicating that *CAS* is not involved in light-induced stomatal movement (Figure S4). Second, several studies have suggested that ROS are produced by various stimuli, such as ABA, salicylic acid, and fungal elicitor, and function as second messengers in regulating stomatal closure (Lee *et al.*, 1999; Mori *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2001). Chloroplasts are major producers of ROS during photosynthesis. Thus, we investigated the effects of external CaCl_2 on the production of ROS in chloroplasts in *cas-1* plants. ROS-sensitive fluorescent probes revealed that ROS was produced in chloroplasts by $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ stimulation in wild-type and *cas-1* plants, suggesting that *CAS* is not directly involved in the production of ROS (data not shown).

CAS is essential for $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation

Thirdly, we further investigated a role for *CAS* in intracellular Ca^{2+} mobilization. It has been shown that external Ca^{2+} triggers a transient increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ that leads to stomatal closure. The rise in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was proposed to be caused by Ca^{2+} influx across the plasma membrane and Ca^{2+} release from internal stores (Sathyanarayanan and Pooviah, 2004). Previous studies on the role of plant organelles in cytosolic Ca^{2+} signals have focused on the endoplasmic reticulum and the vacuole. However, the role of chloroplasts in the generation of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ transients has been underappreciated. In the present study, we demonstrated that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase was significantly impaired in *CAS* knockout mutants (Figure 6b,c). That result is consistent with a previous report that $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was abolished in guard cells of *CAS* antisense plants (Han *et al.*, 2003). Based on our finding that *CAS* is localized mainly in chloroplast thylakoid membranes, we propose that chloroplast-localized *CAS* plays a critical role in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ elevation in *Arabidopsis*.

Although chloroplasts contain high concentrations (4–23 mM) of total Ca^{2+} (Portis and Heldt, 1976), stroma free Ca^{2+} concentration is maintained at sub- μM (Johnson *et al.*, 2006). Thus, it has been assumed that most of the Ca^{2+} is sequestered at unidentified binding sites within the chloroplast stroma or thylakoid lumen, as discussed by Sai and Johnson (2002). However, the identity of the relevant Ca^{2+} store in the stroma is not known. Interestingly, the distribution of *CAS* suggests that it is an integral thylakoid membrane protein, and the N-terminus of *CAS*, which contains the Ca^{2+} -binding domain, appears to be exposed to the stromal side of the thylakoid membrane (Figure 5a). Thus, *CAS* may act as a Ca^{2+} store that is involved in sequestering stromal Ca^{2+} . On the other hand, thylakoid membranes are capable of accumulating Ca^{2+} and reducing stromal Ca^{2+} levels (Ettinger *et al.*, 1999). Alternatively, *CAS* may act as a Ca^{2+} transporter in chloroplast thylakoid membranes. *CAS*

conferred $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increases to transfected human embryonic kidney (HEK293) cells (Tang *et al.*, 2007), suggesting that *CAS* is involved in extracellular Ca^{2+} sensing or Ca^{2+} transport across the membrane. In conclusion, we speculate that extracellular Ca^{2+} may activate cell signal transduction pathways that eventually lead to the release of Ca^{2+} from chloroplasts and subsequent stomatal closure, although the molecular mechanism underlying this action remains largely unknown. Interestingly it has been proposed that *CAS* may be involved in inositol 1,4,5-triphosphate signaling (Tang *et al.*, 2007).

As shown in Figure 7(e,f), *CAS* is expressed in all types of leaf cells and may also have a role in chloroplast function in mesophyll and epidermal cells. Thus, *CAS* may also be involved in the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increases in non-stomatal leaf cells. It has been shown that extracellular Ca^{2+} affects various cellular functions in plant cells. Especially it is reported that extracellular Ca^{2+} prevents Na^+ toxicity and maintains intracellular K^+ homeostasis in both leaf and root cells (Shabala *et al.*, 2006). Addressing the molecular nature of the *CAS* function will be critical to understanding the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ -induced cell signaling in plant cells.

Several lines of evidence suggest that chloroplasts contain other proteins involved in cytosolic Ca^{2+} signaling. PPF1 is a putative Ca^{2+} -carrier protein in thylakoid membranes and may influence Ca^{2+} storage capacities in chloroplasts (Wang *et al.*, 2003). It was demonstrated that PPF1 is involved in the regulation of flowering time and programmed cell death in apical meristem cells (Li *et al.*, 2004). Recently, Imaizumi-Anraku *et al.* (2005) demonstrated that *CASTOR* and *POLLUX* act as Ca^{2+} -permeable channels in chloroplasts and regulate the cytosolic Ca^{2+} spiking response in *Rhizobium*-legume symbiosis. These findings suggest that chloroplasts may be involved in the generation of cytosolic Ca^{2+} signals in various plant cells. Further molecular analyses of chloroplast-localized Ca^{2+} signal-related proteins, including *CAS*, will provide novel insights into the role of chloroplasts in cytosolic Ca^{2+} signaling and regulation in a variety of basic cellular processes, including stress responses, flowering, cell proliferation, cell differentiation, plant-microbe interactions, and stomatal movement.

Ca²⁺ signals in chloroplasts

Ca^{2+} may have various roles in chloroplast function, including assembly of the PSII/oxygen-evolving complex, repair of PSII reaction centers, stromal enzyme activities, protein translocation (Chigri *et al.*, 2006) and plastid division (Aldridge and Møller, 2005). Each of those processes may be regulated by fluctuations in stromal Ca^{2+} concentration. When plants are transferred from light to darkness, chloroplasts have large transient increases in stromal Ca^{2+} levels (Sai and Johnson, 2002). Furthermore, our preliminary

results suggest that superoxide induces a transient increase in stromal Ca^{2+} levels (Komori *et al.*, unpublished data). The possible roles of CAS in the generation of stromal Ca^{2+} signals are under investigation.

Experimental procedures

Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia were germinated and grown on MS medium containing 0.8 % (w/v) agar and 1 % (w/v) sucrose at 22°C with 80–100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ illumination for a daily 16 h light period. The T-DNA insertion lines (SALK_070416, 665G12) were ordered from the Arabidopsis Biological Resource Center and GABI-Kat, respectively. The presence, nature, and location of the T-DNA insertions were confirmed by PCR and sequencing. The consequence of T-DNA insertion on the expression of the affected gene was checked by northern and western blot analyses. Col was used as the control after confirmation of phenotype.

Plant transformation constructs and plant transformations

CAS and GFP fusion genes were constructed as follows. First-strand cDNA was synthesized from total RNA prepared from Arabidopsis seedlings using AMV reverse transcriptase (TaKaRa). cDNA was amplified by PCR using *KOD-plus*-DNA polymerase (TOYOBO) according to the manufacturer's protocol. Transient expression vectors were constructed using the GFP reporter plasmid 35S::sGFP(S65T). The PCR fragment containing 70 N-terminal amino-acids of CAS (35S-*tra*CAS-GFP) or full length CAS (35S-CAS-GFP) was ligated in frame into the 35S::sGFP(S65T) plasmid. Transient expression of the GFP fusion proteins in Arabidopsis protoplasts was performed as previously described (Kovtun *et al.*, 2000).

To generate transgenic plants, the binary vector pBI121 was used for transformation. To obtain CAS or CAS-GFP overexpression constructs under the control of CaMV 35S promoter, the GUS gene in the binary vector was replaced with the CAS or CAS-GFP fusion genes described above. CAS promoter-GUS expression plasmid was constructed as follows. The 1500 bp CAS promoter fragment was fused to a promoterless GUS gene of pBI121 binary vector to give a CAS promoter-GUS construct. Subsequently, GUS gene was replaced to GFP(S65T) gene to generate CAS promoter-GFP construct. The resulting constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* and used to transform the wild-type (Col-0) or *cas-1* plants by flower dipping (Clough and Bent, 1998). Kanamycin-resistant T1 transformants were then selected and used for further analyses. Furthermore, transgenic Arabidopsis plants that express apoaequorin specifically in cytosol were obtained by transforming wild-type (Col-0) and *cas-1* mutant plants with an aequorin expression vector pMAQ2 (Harada *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 1991) via *A. tumefaciens*.

Subcellular fractionation

Cell membranes were prepared as previously described (Lu and Hrabak, 2002) with some modifications. Three-week-old, plate-grown Arabidopsis plants were homogenized with a mortar and pestle in 2 ml of homogenization buffer [50 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM EGTA; 330 mM sorbitol; 1% polyvinylpyr-

olidon K-30; 1% ascorbic acid; 1 mM dithiothreitol; protease inhibitor cocktail (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan)] per gram tissue. Homogenates were filtered through two layers of Miracloth and centrifuged at 6000 g for 10 min at 4°C. Pellets (chloroplast fraction) were resuspended in 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5; 2 mM $MgCl_2$; 5 mM EGTA, and 13.7% sucrose. The supernatant was centrifuged at 100 000 g for 60 min at 4°C. The pellets (microsome fraction) were resuspended in 1 ml resuspension buffer 10 g⁻¹ wet weight of starting materials.

Intact chloroplasts were isolated from 3- to 4-week-old plate-grown Arabidopsis leaves and spinach leaves using a Percoll two-step gradient, as previously described (Napier and Barnes, 1995). Subsequently, Arabidopsis intact chloroplasts were lysed and separated into supernatant (soluble) and pellet (membrane) fractions. For fractionation of chloroplasts, intact chloroplasts from Spinach were lysed in a hypotonic buffer and were loaded onto a sucrose step gradient of 0.93 and 0.6 M sucrose, centrifuged at 70 000 g for 1 h at 4°C. Soluble, envelope and thylakoid fractions were retrieved from the supernatant, the 0.6/1 M sucrose interface, and the pellet, respectively. Proteins in the soluble fraction were concentrated by acetone precipitation. The envelope fraction was pelleted by centrifugation at 150 000 g for 1 h at 4°C. Thylakoid fraction was washed by centrifugation at 7000 g for 5 min at 4°C. All procedures were performed at 4°C.

Thylakoid membrane isolation and protease treatment

Three-week-old plate-grown Arabidopsis leaves were homogenized for 30 sec in a waring blender with isolation buffer (50 mM Tricine-KOH, pH 7.5; 350 mM sucrose, 2 mM $MgCl_2$; 10 mM NaCl). Homogenates were filtered through two layers of Miracloth and centrifuged at 5000 g for 3 min at 4°C. The thylakoid membrane pellets were resuspended in isolation buffer and washed twice with same buffer. Protease treatment was performed as previously described (Karnauchov *et al.*, 1997) with slight modification. Thylakoid membrane (0.1 mg chlorophyll ml⁻¹) was suspended in an isolation buffer containing thermolysin (TL), trypsin (Try), or no protease, and incubated on ice for 30 min. Proteolysis was stopped by the addition of the protease inhibitor cocktail (Nakarai Tesque). Membrane association experiments were performed as previously described (Karnauchov *et al.*, 1997). Thylakoid membrane (0.1 mg chlorophyll ml⁻¹) was suspended in an isolation buffer containing 1 M NaCl, 0.1 M Na_2CO_3 , 4 M Urea, 1% Triton X-100 or no treatment (Control) and incubated on ice for 30 min. Protein was separated into membrane (P) and supernatant (S) fractions by centrifuging at 15 000 g for 30 min at 4°C. All procedures were performed at 4°C.

Antibodies and Western blotting

The DNA encoding 182 N-terminal amino-acids of CAS was amplified by PCR and inserted into the expression vector pET-16b, which generates histidine-tagged fusion protein in *E. coli*. The CAS N-terminal fragment was overexpressed in *E. coli*, purified and used to immunize a rabbit. Polyclonal antisera were used in Western blotting experiments. Total protein extracts were prepared from various Arabidopsis tissues as described previously (Martinez-Garcia *et al.*, 1999). Electrophoresed proteins resolved by SDS-PAGE were electrophoretically transferred to polyvinylpyrrolidone (immobilon; Millipore) membrane. The membranes were subsequently probed with antibodies. The Western blots were developed with the enhanced chemiluminescence (ECL) kit.

Cytosolic Ca²⁺ measurement

Detached rosette leaves from 3-week-old, plate-grown *Arabidopsis* were floated on MS liquid medium, containing 50 μM CaCl₂ and 2.5 μM coelenterazine, overnight in the dark. Aequorin luminescence before and after injection of a Ca²⁺ solution was recorded with a Lumi Counter 2500 (Microtec, Chiba, Japan). To confirm the sufficient generation of active aequorin in transgenic plants, the amount of activated aequorin remaining in the cells was determined by the addition of an equal amount of 2 M CaCl₂ in 20% ethanol at the conclusion of the experiment. Aequorin luminescence calibration was performed as previously described (Knight *et al.*, 1996).

Measurements of chlorophyll fluorescence

A PAM-2000 fluorometer (Walz) was used to measure modulated chlorophyll fluorescence. The Maximal quantum yield of PSII photochemistry (F_v/F_m), the quantum yield of PSII-mediated electron transport (ϕ_{PSII}), the extent of non-photochemical energy dissipation (NPQ), and fraction of Q_A present in the reduced state (1-qP) were measured as previously described (Havaux and Kloppstech, 2001).

Stomatal aperture measurement

Stomatal aperture measurements were performed as previously described (Pei *et al.*, 1997) with modifications. Rosette leaves from 3- to 4-week-old plate-grown plants were detached and floated on the incubation buffer (10 mM MES-KOH, pH 6.15; 10 mM KCl; 50 μM CaCl₂) for 2 h in 80–100 μmol m⁻² sec⁻¹ light. After 2 h, extracellular Ca²⁺ concentration was increased to 2 mM, and the leaves were incubated for an additional 2 h. After the incubation period, epidermal strips of the leaves were observed by microscopy. Stomatal apertures were also measured in rosette leaves from soil-grown, *Arabidopsis* plants, and similar results were obtained (data not shown).

Acknowledgements

We thank the Salk Institute and GABI-Kat for providing *Arabidopsis* insertion mutants. We thank Dr T. Furuichi of Nagoya University for helpful discussion and donating AEQ antibody, and Dr M. Isobe and Dr M. Kuse of Nagoya University for coelenterazine, Dr K. Okada of NIBB for the pMAQ2 binary vector and Dr MH Sato of Kyoto Prefectural University for the 35S-GFP-Sec22 and 35S-GFP-SYP132 plasmids. We also thank Dr Y. Kashino of University of Hyogo, Dr M. Nakai of Osaka University, Drs F. Sato and K. Ifuku of Kyoto University, and Dr Y. Kasahara of National Agricultural Research Center for the Hokkaido Region for donating spinach CP43 antibody, pea Toc75 antibody, spinach PsbP antibody, and *Oryza sativa* plasma membrane H⁺-ATPase antibody, respectively. We thank Dr G. Takeba, Dr MS Khan and Mrs Y. Ishizaki for their helpful discussions. This work was supported partly by the New Energy and Industrial Technology Development Organization (the Green Biotechnology Program), and by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (Nos. 18570048 and 19039030 to T.S.).

Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article online:

Figure S1. Characterization of the CAS insertional mutants.

Figure S2. RT-PCR analysis of CAS mRNA abundance in *CAS/cas-1* complement.

Figure S3. [Ca²⁺]_{ext}-induced stomatal closure in other *CAS/cas-1* and *CASox* plants.

Figure S4. Stomatal movements in *cas-1*.

Figure S5. Suborganelle localization of CAS.

Figure S6. Transient expression of GFP in onion epidermal cells.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>.

Please note: Blackwell publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Aldridge, C. and Møller, S.G. (2005) The plastid division protein AtMinD1 is a Ca²⁺-ATPase stimulated by AtMinE1. *J. Biol. Chem.* **280**, 31673–31678.
- Allen, G.J., Kuchitsu, K., Chu, S.P., Murata, Y. and Schroeder, J.I. (1999) *Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cell. *Plant Cell*, **11**, 1785–1798.
- Allen, G.J., Chu, S.P., Schumacher, K. *et al.* (2000) Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant. *Science*, **289**, 2338–2342.
- Brand, J.J. and Becker, D.W. (1984) Evidence for direct roles of calcium in photosynthesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **16**, 239–249.
- Chigri, F., Hörmann, F., Stamp, A., Stammers, D.K., Böltner, B., Soll, J. and Voithknecht, U.C. (2006) Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 16051–16056.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.
- Ettinger, W.F., Clear, A.M., Fanning, K.J. and Peck, M.L. (1999) Identification of a Ca²⁺/H⁺ antiport in the plant chloroplast thylakoid membrane. *Plant Physiol.* **119**, 1379–1385.
- Evans, D.E., Briars, S.A. and Williams, L.E. (1991) Active calcium transport by plant cell membranes. *J. Exp. Bot.* **42**, 285–303.
- Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A.J., Peltier, J.B., Rudella, A., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2004) In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database. *Plant Cell*, **16**, 478–499.
- Han, S., Tang, R., Anderson, L.K., Woerner, T.E. and Pei, Z.M. (2003) A cell surface receptor mediates extracellular Ca²⁺ sensing in guard cells. *Nature*, **425**, 196–200.
- Harada, A., Sakai, T. and Okada, K. (2003) phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca²⁺ differently in *Arabidopsis* leaves. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 8583–8588.
- Havaux, M. and Kloppstech, K. (2001) The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in *Arabidopsis npq* and *tt* mutants. *Planta*, **213**, 953–966.
- Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M. *et al.* (2005) Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature*, **433**, 527–531.
- Johnson, C.H., Shingles, R. and Ettinger, W.F. (2006) Regulation and role of calcium fluxes in the chloroplast. In *The Structure and Function of Plastids* (Wise, R.R. and Hooper, J.K., eds). Heidelberg: Springer, pp. 403–416.

- Kamachi, K., Yamaya, T., Mae, T. and Ojima, K. (1991) A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* **96**, 411–417.
- Karnauchov, I., Herrmann, R.G. and Klösgen, R.B. (1997) Transmembrane topology of Rieske Fe/S protein of the cytochrome b6/f complex from spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* **408**, 206–210.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. and Trewavas, A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitor on cytoplasmic calcium. *Nature*, **352**, 524–526.
- Knight, H., Trewavas, A.J. and Knight, M.R. (1996) Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *Plant Cell*, **8**, 489–503.
- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G. and Sheen, J. (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **97**, 2940–2945.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.S., Oh, K.Y., Schroeder Taylor, A.T., Low, P.S. and Lee, Y. (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of Tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.* **121**, 147–152.
- Li, J., Wang, D.Y., Li, Q., Xu, Y.J., Cui, K.M. and Zhu, Y.X. (2004) PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea and transgenic Arabidopsis plants possibly by delaying cytosolic Ca^{2+} elevation. *Cell Calcium*, **35**, 71–77.
- Lu, S.X. and Hrabak, E.M. (2002) An Arabidopsis calcium-dependent protein kinase is associated with the endoplasmic reticulum. *Plant Physiol.* **128**, 1008–1021.
- Marques, J.P., Schattat, M.H., Hause, G., Dudeck, I. and Klösgen, R.B. (2004) *In vivo* transport of folded EGFP by the pH/TAT-dependent pathway in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **55**, 1697–1706.
- Martinez-Garcia, J.F., Monte, E. and Quail, P.H. (1999) A simple, rapid and quantitative method for preparing Arabidopsis protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J.* **20**, 251–257.
- McAinsh, M.R., Brownlee, C. and Hetherington, A.M. (1990) ABA induced elevation of guard cell cytosolic calcium precedes stomatal closure in *Commelina communis*. *Nature*, **343**, 186–188.
- McAinsh, M.R., Webb, A.A.R., Taylor, J.E. and Hetherington, A.M. (1995) Stimulus-induced oscillations in guard cell cytosolic free calcium. *Plant Cell*, **7**, 1207–1219.
- McAinsh, M.R., Clayton, H., Mansfield, T.A. and Hetherington, A.M. (1996) Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol.* **111**, 1031–1042.
- Melis, A. and Zeiger, E. (1982) Chlorophyll a fluorescence transients in mesophyll and guard cells. Modulation of guard cell phosphorylation by CO_2 . *Plant Physiol.* **69**, 642–647.
- Mori, I.C., Pinontoan, R., Kawano, T. and Muto, S. (2001) Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1383–1388.
- Murata, Y., Pei, Z.M., Mori, I.C. and Schroeder, J.I. (2001) Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell*, **13**, 2513–2523.
- Napier, J.A. and Barnes, S.A. (1995) The isolation of intact chloroplasts. *Methods Mol. Biol.* **49**, 355–360.
- Pei, Z.M., Kuchitsu, K., Ward, J.M., Schwarz, M. and Schroeder, J.I. (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in Arabidopsis wild-type and *abi1* and *abi2* mutants. *Plant Cell*, **9**, 409–423.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J.I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells. *Nature*, **406**, 731–734.
- Peltier, J.B., Ytterberg, A.J., Sun, Q. and van Wijk, K.J. (2004) New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* **279**, 49367–49383.
- Portis, A.R. and Heldt, H.W. (1976) Light-dependent changes of the Mg^{2+} concentration in the stroma in relation to the Mg^{2+} dependency of CO_2 fixation in intact chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 434–436.
- Sai, J. and Johnson, C.H. (2002) Dark-stimulated calcium ion fluxes in the chloroplast stroma and cytosol. *Plant Cell*, **14**, 1279–1291.
- Sathyanarayanan, P. and Poovaiah, B. (2004) Decoding Ca^{2+} signals in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**, 1–11.
- Schroeder, J.I. and Hagihara, S. (1990) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 9305–9309.
- Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T.A., Smith, S.J., Miller, A.J., Davies, J.M. and Newman, I.A. (2006) Extracellular Ca^{2+} ameliorates NaCl-induced K^+ loss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K^+ -permeable channels. *Plant Physiol.* **141**, 1653–1665.
- Talbott, L.D. and Zeiger, E. (1993) Sugar and organic acid accumulation in guard cells of *Vicia faba* in response to red and blue light. *Plant Physiol.* **102**, 1163–1169.
- Talbott, L.D., Shmayevich, I.J., Chung, Y., Hammad, J.W. and Zeiger, E. (2003) Blue light and phytochrome-mediated stomatal opening in the *npq1* and *phot1 phot2* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**, 1522–1529.
- Tallman, G. and Zeiger, E. (1988) Light quality and osmoregulation in *Vicia* guard cells. Evidence for involvement of three metabolic pathways. *Plant Physiol.* **88**, 887–895.
- Tang, R.H., Han, S., Zheng, H., Cook, C.W., Choi, C.S., Woerner, T.E., Jackson, R.B. and Pei, Z.M. (2007) Coupling diurnal cytosolic Ca^{2+} oscillations to the CAS-IP₃ pathway in *Arabidopsis*. *Science*, **315**, 1423–1426.
- Tominaga, M., Kinoshita, T. and Shimazaki, K. (2001) Guard-cell chloroplasts provide ATP required for H^+ pumping in the plasma membrane and stomatal opening. *Plant Cell Physiol.* **42**, 795–802.
- Wang, D., Xu, Y., Li, Q., Hao, X., Cui, K., Sun, F. and Zhu, Y. (2003) Transgenic expression of a putative calcium transporter affects the time of *Arabidopsis* flowering. *Plant J.* **33**, 285–292.

Disruption of the *psbA* gene by the copy correction mechanism reveals that the expression of plastid-encoded genes is regulated by photosynthesis activity

Muhammad Sarwar Khan · Waqar Hameed ·
Mikio Nozoe · Takashi Shiina

Received: 21 September 2006 / Accepted: 2 February 2007 / Published online: 11 April 2007
© The Botanical Society of Japan and Springer 2007

Abstract The functional analysis of genes encoded by the chloroplast genome of tobacco by reverse genetics is routine. Nevertheless, for a small number of genes their deletion generates heteroplasmic genotypes, complicating their analysis. There is thus the need for additional strategies to develop deletion mutants for these genes. We have developed a homologous copy correction-based strategy for deleting/mutating genes encoded on the chloroplast genome. This system was used to produce *psbA* knockouts. The resulting plants are homoplasmic and lack photosystem II (PSII) activity. Further, the deletion mutants exhibit a distinct phenotype; young leaves are green, whereas older leaves are bleached, irrespective of light conditions. This suggests that senescence is promoted by the absence of *psbA*. Analysis of the transcript levels indicates that NEP (nuclear-encoded plastid RNA polymerase)-dependent plastid genes are up regulated in the *psbA* deletion mutants, whereas the bleached leaves retain plastid-encoded plastid RNA polymerase activity. Hence, the expression of NEP-dependent plastid genes may be regulated by photosynthesis, either directly or indirectly.

Keywords Copy correction mechanism · Homologous recombination · Photosynthesis · Plastid transformation · *psbA* gene and reverse genetics

M. S. Khan (✉) · W. Hameed
National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering
(NIBGE), P. O. Box 577, Jhang Road, Faisalabad, Pakistan
e-mail: sarwarkhan_40@hotmail.com

M. Nozoe · T. Shiina
Laboratory of Applied Biology, Faculty of Human Environment,
Kyoto Prefectural University, Kyoto 606-8502, Japan

Abbreviations

PSII Photosystem II
NEP Nuclear-encoded plastid RNA polymerase
PEP plastid-encoded plastid RNA polymerase
IR Inverted repeat

Introduction

The tobacco plastid genome, although fully sequenced more than 15 years ago (Shinozaki et al. 1986), has kept some secrets, with the functions of several plastid gene yet to be determined. The development of facile methods for making transplastomic tobacco plants (Svab and Maliga 1993; Khan and Maliga 1999) along with the high homologous recombination activity (Svab et al. 1990; Kavanagh et al. 1999) in plastids has paved the way to the application of reverse genetics approaches in functional genomic studies on higher plant plastids (Liestner 2003). Although reverse genetics is a standard approach to assigning clear-cut functions to plastid genes and open reading frames through gene disruption/replacement with a marker gene (Bock and Khan 2004), this strategy can be unsuccessful when the gene product is essential for cell viability, in which case homoplasmic transgenic genotypes cannot be obtained. Therefore, the development of suitable alternate strategies would facilitate studies on the consequences of the deletion under investigation. For example, the CRE-loxP site-specific recombination system was used to effectively delete *clpP* from tobacco plastids (Kuroda and Maliga 2003). Until recently, disruption was possible only in a fraction of the 1000–10,000 plastid genome copies in a cell (Whitney et al. 1999). We report here a

novel strategy that efficiently deletes targeted plastid-encoded gene(s) by exploiting the homologous copy correction mechanism. The mechanism works in chloroplasts to maintain identical DNA sequence in the two repeat regions of plastid DNA (Ohyama et al. 1986; Shinozaki et al. 1986; Svab et al. 1990; Kavanagh et al. 1999).

The great majority of plastid-encoded genes can be grouped into two classes: genetic system and photosynthesis genes. The few remaining genes have functions other than gene expression and photosynthesis and specify, for example, components of certain biosynthetic pathways. These genes are transcribed by at least two distinct RNA polymerases in photosynthetic higher plants: a eubacteria-type multi-subunit RNA polymerase (PEP) and a nuclear-encoded bacteriophage-type RNA polymerase (NEP) (Hedtke et al. 1997; Hess and Börner 1999; Liere and Maliga 2001). PEP is mainly responsible for transcription of photosynthesis-related genes (class I genes) in green tissues, whereas NEP contributes to the transcription of housekeeping genes at an early stage of chloroplast development (reviewed by Liere and Maliga 1999). It has been observed that non-photosynthesis housekeeping genes are transcribed mostly by both PEP and NEP (class II genes), whereas NEP transcribes exclusively class III genes such as *rpoB* and *accD*. In addition, NEP-dependent plastid gene transcripts have been shown to accumulate to high levels in bleached plant leaves generated by PEP inactivation (Allison et al. 1996; De Santis-Macloseek et al. 1999; Kanamaru et al. 2001; Ishizaki et al. 2005), suggesting the presence of a complex regulatory network between PEP and NEP.

In the present study we were able to efficiently delete *psbA* from tobacco plastomes using a new, homologous copy correction-based strategy. The regenerated homoplasmic *psbA* mutants exhibit a distinct phenotype, consisting of green young leaves and bleached older leaves that lack PSII activity, which suggests that absence of PSII activity in deletion mutants promotes senescence of leaves. Furthermore, NEP activity is increased in the *psbA* deletion mutants, although the bleached leaves do retain PEP activity. The expression of NEP-dependent plastid genes may be regulated by photosynthesis, either directly or indirectly.

Material and methods

Plant material and growth conditions

Nicotiana tabacum L. var. Petit Havana, was grown aseptically on 0.7% phyta-agar-solidified MS salts (Murashige and Skoog 1962), pH 5.8, containing 3% sucrose at 27°C under 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (16 h light, 8 h dark).

Fully expanded leaves of plants 4–6 weeks old were used for chloroplast transformation.

Development of *psbA* gene replacement vectors

The chloroplast transformation vector used to delete *psbA* was developed as follows. The flanking sequences were first PCR-amplified (using primers 5'-GAT ATC AAA ACC CGT CCT CAG TTC GGA TTG C-3' and 5'-GAT ATC CAC GAG TTG GAG ATA AGC GGA-3'), and the PCR product was cloned into the TA cloning vector (MBI Fermentas, Italy). The cloned fragment was then restricted with *EcoRV*, which was engineered into both primers (underlined sequences), and the fragment was ligated into pBluescript II (MBI Fermentas) cut with *PvuII*. A *HincII-SmaI* fragment carrying *Clal*, *HindIII*, *EcoRV*, *EcoRI* and *PstI* sites was ligated into the insertion site (*PvuII*) in the tobacco flanking sequences. These sites were then used to clone selection and deletion cassettes. The construct carries *aadA* to select transformation events under the control of the rRNA gene promoter. The promoter and 5'-UTR (untranslated region) of *psbA* were PCR amplified from total cellular DNA of tobacco using primers 5'-AAG CTT ACT AGC ATA TCG AAA TTC T-3' and 5'-GAA TTC CAT ATG AAA ATC TTG GTT-3', and the fragment was cloned into the TA cloning vector (MBI Fermentas). The 3'-UTR of the *psbA* gene was amplified using primers 5'-TCT AGA ATC TAG ATC GTG C-3' and 5'-GAG CTC GGT GAC CCT TGT ATG-3' and cloned downstream of the promoter and 5'-UTR of *psbA*. To construct the *psbA* gene replacement cassette, a yeast gene *ArDH* (arabitol dehydrogenase) was amplified and cloned into the *psbA* cassette, and the resulting plasmid was named pMSK70 (M.S. Khan, unpublished). The *psbA* cassette was cloned downstream of *aadA* to generate the final transformation vector, pMSK71.

Chloroplast transformation and selection of the *psbA* deletion mutants

Chloroplast transformation was carried out following established biolistic technology (Svab and Maliga 1993; Khan and Maliga 1999; Daniell et al. 2002; Bock and Khan 2004). Bombardments of chloroplast transformation vector DNA-coated gold particles (0.6 μm) were carried out using a PDS 1000 helium gun (Bio-Rad, Hercules, Calif.). The fully expanded leaves from plants 4–6 weeks old were used for bombardment. After incubation for 48 h the leaves were chopped into small sections and placed on RMOP medium (Svab and Maliga 1993; Khan and Maliga 1999) containing spectinomycin (500 mg/l). Transgenic shoots were recovered from bleached leaf sections on the spectinomycin medium (Svab et al. 1990; Khan and Maliga

1999) and rooted on MS medium. Both putative transgenic and wild-type plants were maintained under similar growth conditions for analysis.

Genomic analysis of transgenic plants for homologous copy correction event and of *psbA* mutants to determine homoplasmy for deletions

Total cellular DNA from both wild-type and *psbA* plants was isolated using the hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA extraction procedure described by Rogers and Bendich (1985) with modifications. This leaf total DNA was used as the template in PCR reactions performed using a Master Cycler gradient (Eppendorf, Germany). The integration of cassettes into the inverted repeat region was confirmed by PCR analysis of the transgenic lines using primers specific to *aadA* (forward: 5'-GGC TCC GCA GTG GAT GGC GGC CTG-3'; reverse: 5'-GGG CTG ATA CTG GGC CGG CAG G-3') and to flanking sequences (forward: 5'-GAT ATC AAA ACC CGT CCT CAG TTC GGA TTG C-3'; reverse: 5'-GAT ATC CAC GAG TTG GAG ATA AGC GGA-3'). However, the copy correction events between inverted repeats (IR) were verified by Southern blots using flanks as a probe. The homoplasmy for *psbA* deletions was confirmed by PCR using primers specific for *psbA* (5'-ATG ACT GCA ATT TTA GAG AG-3' and 5'-ATC CAT TTG TAG ATG GAG CT-3'). The PCR program consisted of 30 cycles of 95°C for 2 min, 56°C for 2 min and 72°C for 3 min, with a step of 72°C for 10 min. PCR products were analyzed on 0.8% agarose gels following electrophoresis and staining with ethidium bromide.

Chlorophyll fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence was measured using a PAM-2000 chlorophyll fluorescence meter (Walz, Effeltrich, Germany). Plants were dark-adapted for 15 min before measurements. F_0 was excited by a weak measuring light, whereas F_m was determined using a saturating white light pulse at 4000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Transcript analysis of transgenic plants

Total cellular RNA was extracted from the third to fifth bleached leaves of the *psbA* mutant plants using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, Calif.). Total RNA samples (500–1000 ng) were electrophoresed on denaturing 1% agarose gels. After capillary blotting onto Hybond-N nylon membrane (Amersham, UK), the blots were hybridized to DIG-labeled PCR fragments as probes specific for *psbA* (770 bp), *trnE* (460 bp), *psaA* (810 bp), *rbcl* (880 bp), *accD* (810 bp), *psbB* (790 bp), *rpoA*

(850 bp), *ndhB* (700 bp), *trnI* (720 bp) and *clpP* (840 bp) following manufacturer's instructions (DIG Luminescent Detection kit; Roche, Indianapolis, Ind.). We used a 1% agarose gel for all experiments. Hybridization signals were detected using CSPD (Roche, Indianapolis, IN, USA).

Results

Development of transformation vectors exploiting chloroplast homologous copy correction mechanism

The *psbA* gene deletion from the tobacco chloroplast genome was carried out using a vector that targets both the marker *aadA* and *psbA* deletion cassettes into the inverted repeat region. The chloroplast transformation vector was developed by the sequential amplification and cloning of plastome regions from the inverted repeat region, the promoter from the 16 S rRNA operon to control *aadA* gene expression and the *psbA* gene flanking sequences to develop the gene deletion cassette. The deletion cassette carries the *psbA* 5' UTR and *psbA* 3' UTR with *ArDH* replacing the target gene (*psbA*). The *aadA* gene confers resistance to spectinomycin and streptomycin and is used as a non-lethal selectable marker for chloroplast transformation (Svab and Maliga 1993). The deletion cassette that was incorporated into the inverted repeats was designed to replace the *psbA* gene through homologous copy correction (Ohshima et al. 1986; Kavanagh et al. 1999).

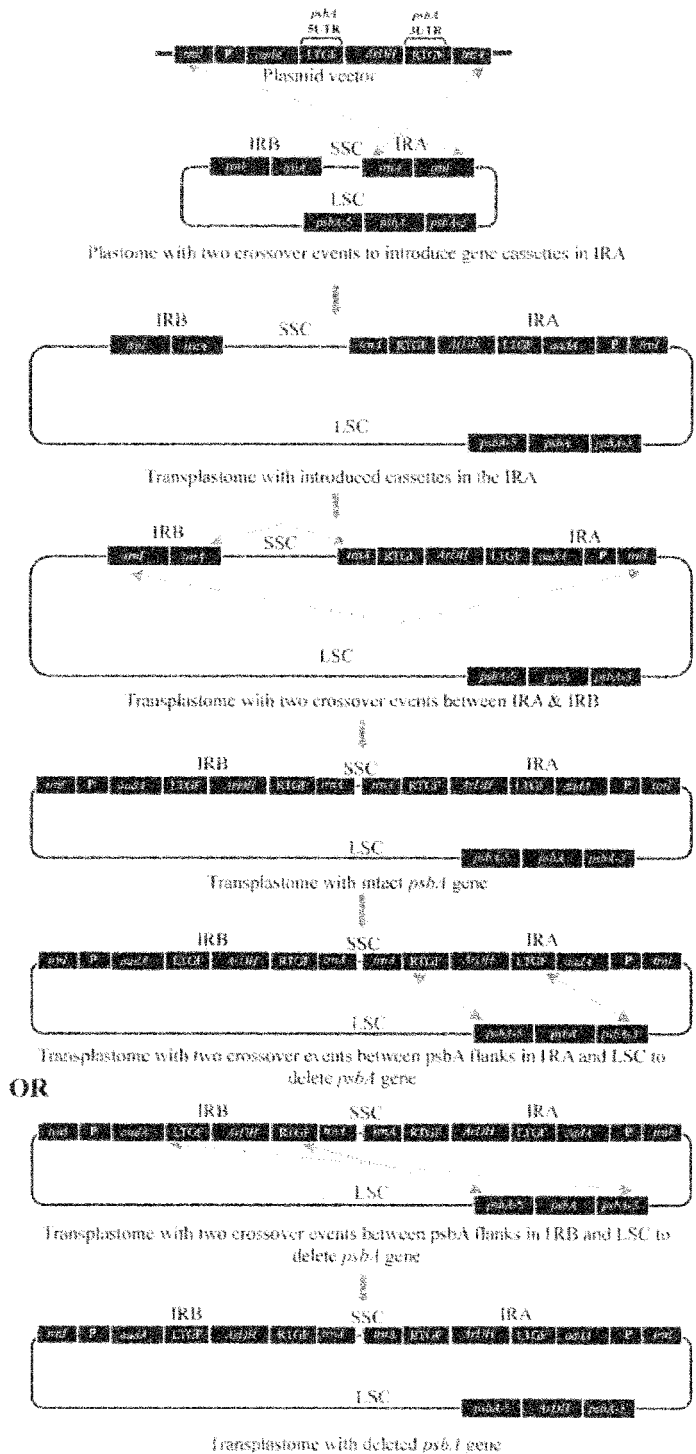
Development of transgenic plants lacking chloroplast-encoded *psbA*

Tobacco leaf sections after bombardment were placed on RMOP medium (Svab and Maliga 1993; Khan and Maliga 1999) containing 500 mg/l spectinomycin. Spectinomycin-resistant shoots recovered on regeneration medium were transferred onto selective maintenance medium. Phenotypically these antibiotic-resistant plants were indistinguishable from wild-type plants which were growing on the same maintenance medium without spectinomycin. To obtain a genetically stable homoplasmic line, leaves of the spectinomycin-resistant plants were subjected to second round of selection and regeneration during which wild-type and transformed plastids and plastid genome copies gradually sorted out, yielding chimeric shoots. These shoots consist of sectors of wild-type (green) and transgenic cells (light green). Small leaf pieces (2 × 2 mm in size) from light-green sectors were placed on regeneration medium, and homoplasmic shoots exhibiting a light-green to bleached phenotype were recovered. These light-green as well as bleached shoots were homoplasmic for the *psbA* deletion. The replacement of the *psbA* gene is the result of

a homologous copy correction mechanism (Fig. 1), a characteristic feature of chloroplasts (Kavanagh et al. 1999). From 20 bombardments, five transplastomic lines

were recovered, of which three plants showed leaf variations, suggesting that gene replacement between the deletion cassette in the inverted repeats and *psbA* gene in

Fig. 1 The copy correction-based experimental strategy employed to functionally analyze *psbA* from the tobacco chloroplast genome. The transformation vector targets both the marker *aadA* and *psbA* gene deletion cassettes into the inverted repeat region via two homologous recombination events in the flanking regions (dashed lines). Target gene deletion occurs in two steps: first, as dual integration due to homologous copy correction between two repeats; second, the *psbA* gene is replaced through homologous copy correction, which occurs spontaneously between homologous sequences flanking the *psbA* gene and the integrated gene in the inverted repeat region. Shown: plasmid vector with marker gene (*aadA*), gene for replacement (*ArDH*) and target gene flanking sequences (*LTGF* Left target gene flank, *RTGF* right target gene flank), plasmid with *psbA* gene, transplastome with intact *psbA*, marker gene, *psbA* gene deletion cassettes and homologous recombination events and transplastome with replaced *psbA*. *LSC* Large single copy, *SSC* small single copy, *IRA*, -B Inverted repeat A, -B



the large single-copy region occurred in 60% of the regenerated plants. A similar ratio of knockouts was observed when different DNA fragments were used to replace *psbA* (data not shown).

The $\Delta psbA$ shoots have a distinct phenotype; the younger leaves are green in color, which gradually bleached out with maturation (Fig. 2). We initially believed that this may be due to the standard light intensities ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); however, this possibility was ruled out when the same phenotype of the $\Delta psbA$ shoots was observed when grown under low light (20 and $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Further, mutant lines maintain their defective phenotype under low light conditions. Nonetheless, it was observed that light promoted leaf senescence of the $\Delta psbA$ plants. The rooted mutant plants grew very slowly under both low and standard light conditions. The $\Delta psbA$ plants were unable to grow photo-autotrophically in pots and were therefore propagated and maintained on MS medium supplemented with 3% sucrose under light intensities of $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Transgenic plants carrying *aadA* expression and *psbA* deletion cassettes were analyzed using the different sets of primers. The spectinomycin-resistant plants were first tested using *aadA*-specific primers and primers for plastid sequences flanking the *aadA* and deletion cassettes for two reasons: first, to identify undesirable spectinomycin-resistant spontaneous mutants since mutations in the plastid 16 S rRNA gene are known to confer spectinomycin and streptomycin resistance in tobacco (Svab et al. 1990; Svab and Maliga 1991); second, to confirm the integration of the deletion cassette along with *aadA* into the inverted repeat region. Two pairs of primers (S19, S20 and A19, A20) were designed for genetic analysis of the transgenic plants namely, TP1, TP2 and TP3. Primers S19 and S20 anneal to the sequences flanking the sites of integration (Fig. 3a), while the A19 and A20 primers anneal to the *aadA* gene (selectable marker gene, Fig. 3). The presence of amplified fragments of 3.0 kb (with primer pair A19 and S20) and 2.3 kb (with primer pair S19 and A20) in lanes TP1, TP2 and TP3 and the absence of fragments from a non-transformed plant (lane U) confirmed that putative transgenic plants carry the *aadA* gene and that the cassettes are integrated into the inverted repeat region of the plastome (Fig. 3b). Further, the transgenic plants were tested for copy correction events between the two repeats using probes containing fragments of the *trnA* and *trnI* genes. Southern blots confirmed both the stable integration of the cassettes into the inverted repeats and homologous copy correction events that took place between the repeats (Fig. 3d). The presence of a single hybridizing fragment of the expected size (6.54 kb) confirms the homoplasmy of the *aadA* expression and the *psbA* gene deletion cassettes in the inverted repeats. In lane $\Delta TP3b$ of Fig. 3b, however, the presence of two fragments indicates the heteroplasmic

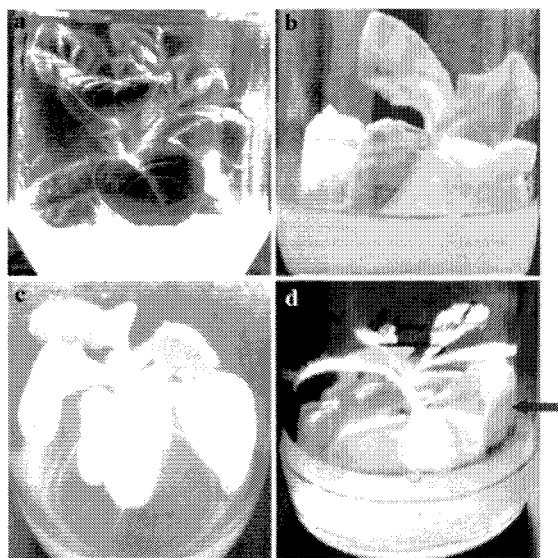


Fig. 2 Phenotype of wild-type and *psbA* knockout plants. **a** Phenotypically green wild-type plant grown under standard light conditions of $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, **b** transgenic plant with light-green sectors on leaves grown under $30 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light, **c** transgenic plant, regenerated from light-green sectors of chimeric shoots, grown under $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light, **d** transgenic plant with senesced leaf grown under $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light

nature of the transgenic plant, showing that the copy correction events are not complete. The presence of a single hybridizing fragment of 6.54 kb suggests that different transgenic genomes, resulting from a single homologous recombination event, if at all generated, were highly unstable. Further, the amplified fragments of 3.0 kb (with primer pair A19 and S20) and 2.3 kb (with primer pair S19 and A20) from $\Delta TP3$ were digested with *PvuII*. This enzyme cuts the wild-type DNA at the *trnI* and *trnA* intergenic region – whereas the site is not present in transgenic plants since the *aadA* expression and the *psbA* gene deletion cassettes were cloned at this site – using *HincII* and *SmaI* enzymes, generating hybrid sequences. However, the site was present in the fragment from wild-type chloroplast DNA using S19 and S20 primers (Fig. 3c). Undigested amplified fragments confirm that the cassettes were integrated into the inverted repeat region by two events of homologous recombination. Nevertheless, the 3.0-kb fragment was digested with *PvuII* enzyme because an additional site for *PvuII* exists in the deletion cassette.

Homoplasmy for gene deletion was confirmed by amplified fragment length polymorphism (AFLP, data not shown) as well as by PCR amplification using primers (S16 and S17) specific for the *psbA* gene. PCR analysis of mutants using *psbA*-specific primers was the preferred approach to confirm the absence of the targeted gene. The

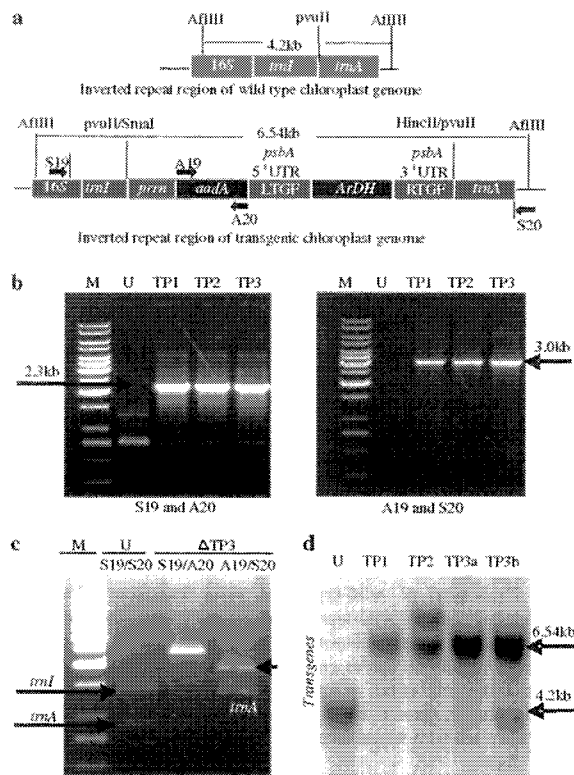


Fig. 3 Confirmation of the integration of the deletion cassette into the inverted repeats and homologous copy correction events, yielding homoplasmy. **a** Maps of the plastid targeting the inverted repeat region from the wild-type and transgenic plant plastid genomes with primers, positions and restriction sites. **b** Gels with PCR-amplified left and right flanking sequence fragments with primer sets S19-A20 and A19-S20, respectively. Results are for transgenic tobacco plants carrying the marker gene (*aadA*) as well as the targeted gene (*psbA*) cassettes to show the first step of the integration of the cassettes into the inverted repeat region. **c** PCR fragments amplified from Δ TP3 using the primer pairs S19 and A20, and A19 and S20 were digested with *PvuII* since the *aadA* expression and the *psbA* gene deletion cassettes were cloned at the site using *HincII* and *SmaI* enzymes, generating hybrid sequences. The hybrid sites (*PvuII/SmaI* and *HincII/PvuII*) flank the *aadA* expression and *psbA* deletion cassettes in the inverted repeat region in the transformed chloroplast DNA; therefore, the amplified fragment is not digestible with *PvuII* in transgenic lines. However, the amplified fragment from wild-type chloroplast DNA using the S19 and S20 primers is digested with *PvuII*. **d** Southern blots confirm the copy correction between two repeats. Genomic DNA from untransformed and transgenic plants (leaves without chimeric sectors) was digested with *AflIII*. Lanes (left to right): 1 Untransformed, 2–5 transgenics probed with the chloroplast DNA flanking sequence (*trnA* and *trnI*). Plants TP1, TP2 and TP3a are homoplasmic for the integration of the cassettes into both repeats as they probed to an expected size fragment of 6.54 kb; however, TP3b is heteroplasmic since it additionally contains a fragment of the size (4.2 kb) corresponding to wild type (U)

amplification of *psbA* from transgenic plants (TP2 and TP3) confirmed the integrity of the *psbA* gene since the sizes (1062 bp) of the amplified PCR products were

comparable to a wild-type plant (Fig. 4b). We also analyzed the transplastomic plants regenerated from light-green sectors for *psbA* gene deletion. The primers amplified a fragment of the expected size 1062 bp from both the wild-type (U) and a phenotypically green transgenic plant with an intact *psbA* gene (TP1), whereas no PCR product was amplified from the mutants (Δ TP3, Fig. 4c). Hence, the absence of the amplified fragment from the Δ TP3 plants confirms homoplasmy for *psbA* gene deletions. Nevertheless, Δ TP2 plants produced a weak band, which probably represents the heteroplasmic state of this mutant line. Disruption of *psbA* as a cotransformation event would be possible by a double crossover across the 5'- and 3'-UTR of the transforming and recipient DNA, rendering the possibility that transgenic plants TP2 and TP3 had copies of *psbA* disrupted at the same time as the original marker molecule inserted into the inverted repeats, with subsequent segregation giving rise to plants more defective in *psbA*. This possibility was ruled out since the replacement of *psbA* with the *ArDH* sequence resulted in chimeric leaf sectors during the second round of selection and regeneration on spectinomycin-containing medium, which were then excised to purify the homoplasmic deletion mutants for *psbA*. Further, the TP2 and TP3 plants did not produce any chimeric sectors on fully expanded leaves grown in jars and pots for seed setting and were phenotypically indistinguishable from wild-type and TP1 plants. Additionally, the amplified PCR product of transgenic plants TP1, TP2 and TP3 was comparable with that of wild-type plants (Fig. 4b), thereby confirming that the TP2 and TP3 plants have intact copies of the *psbA* gene in their plastid genomes.

PSII inactivation in *psbA* gene deletion mutants

We measured PSII activity by monitoring chlorophyll fluorescence at room temperature using pulse-amplitude-modulation (PAM) chlorophyll fluorometry. The minimum fluorescence at open PSII centers (F_0) was determined by exposing dark-adapted leaves (approx. 1 cm in length). The maximum fluorescence at closed PSII centers (F_m) was then measured by illuminating the leaves with a saturation light pulse (800 ms). The maximum quantum yield of PSII-driven photochemistry (F_v/F_m), was calculated as $(F_m - F_0)/F_m$. The F_v/F_m values were in the range of 0.78–0.82 for the wild-type leaves. In contrast, the F_0 value of Δ *psbA* plants was very high compared to that of the wild-type plants (Table 1), and Δ *psbA* plants contained almost no PSII photochemistry. Based on these results we concluded that PSII is completely inactivated by the deletion of *psbA*. Since the light-green leaves started bleaching after few weeks, this demonstrates that a lack of photosynthetic activity promotes leaf senescence in tobacco.

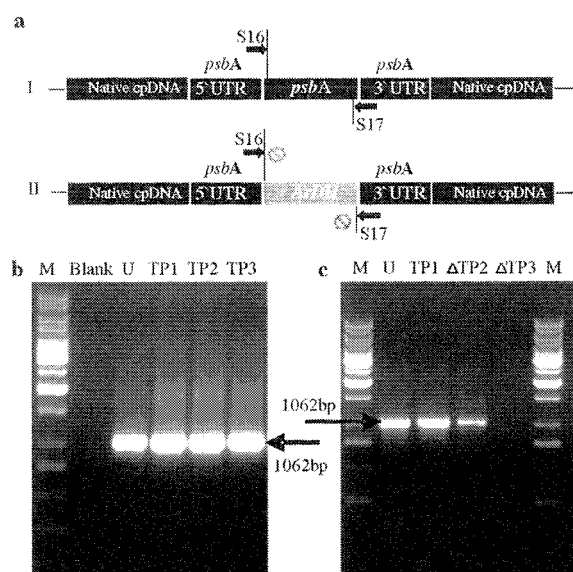


Fig. 4 Homoplasmy of the plastid DNA population in the *psbA*-inactivated transformants. **a** Maps of the *psbA* gene-containing regions from the wild-type, transgenic (with primers S16 and S17 locations on the *psbA* gene) and $\Delta psbA$ plant plastid genomes which will amplify a 1062-bp fragment from the transplastome with intact *psbA* but will not amplify the fragment from the transplastome with the deleted *psbA* gene. **b** PCR amplification of the *psbA* gene using *psbA*-specific primers from wild type (*U*) and transgenic plants (*TP1*, *TP2* and *TP3*). The molecular weight marker (*M*) is a 1-kb DNA ladder (MBI Fermentas). The transgenic plants *TP1*, *TP2* and *TP3* are homoplasmic for *aadA* and the integration of the deletion cassettes into the inverted repeats. The presence of 1062-bp PCR-amplified fragments from wild-type and transgenic plants confirms the integrity of the *psbA* gene in transgenic plants, since PCR products from wild-type and transgenic plants are comparable. **c** Gel electrophoresis of PCR-amplified fragments using *psbA*-specific primers of the wild type (*U*), transgenic (*TP1*) and two *psbA*-deleted transformants (*TP2* and *TP3*). The primers specific to the *psbA* coding region amplify a 1062-bp PCR product from the wild-type and transgenic plant (*TP1*) but not from the $\Delta TP3$ plant, confirming homoplasmy for deletion only in $\Delta TP3$. However, a weak fragment was amplified from the $\Delta TP2$ plant, indicating heteroplasmy

Transcript levels of plastid-encoded genes in the *psbA* deletion mutants

We examined the effects of *psbA* disruption on plastid gene expression by measuring the transcript levels in $\Delta psbA$ plants. As expected, no *psbA* transcript was detected in the bleached leaves of the mutant plants. However, unusual *trnI* transcripts were detected due to the insertion of transgene cassettes between *trnI* and *trnA* in the *rrn* operon (Fig. 5). The *trnI* is co-transcribed with *rrn16*, *trnA*, *rrn 23* and *rrn5* (*rrn* operon) from a PEP-dependent *rrn* P1 promoter in tobacco leaves or a NEP-dependent *rrn* P2 promoter in BY2 cells and PEP-deficient mutants (Sriraman et al. 1998). Since polycistronic RNA first cleaved and then

Table 1 Chlorophyll fluorescence parameters in $\Delta psbA$ plants

Genotype	F_0	F_m	F_v/F_m
Wild type	0.191 ± 0.021	0.973 ± 0.093	0.804 ± 0.013
$\Delta psbA$	0.795 ± 0.130	0.765 ± 0.123	-0.038 ± 0.004

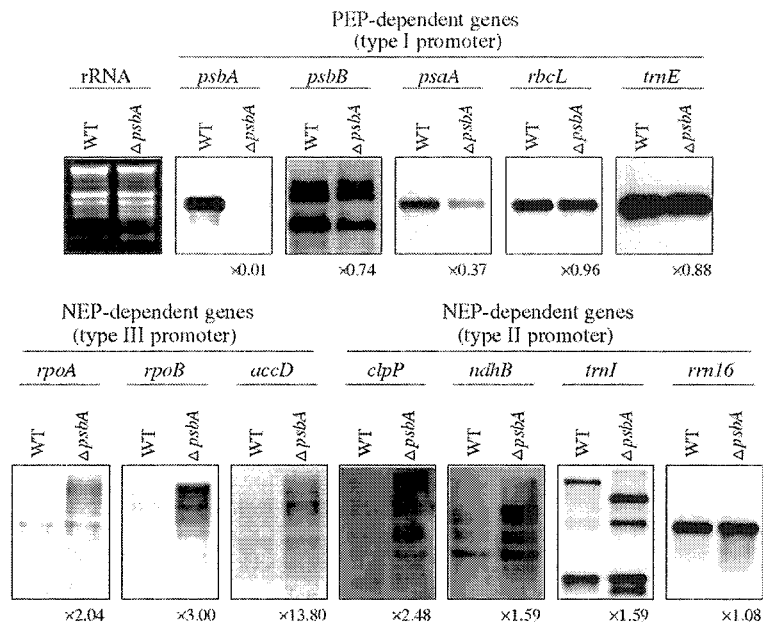
Each value represents the mean \pm SD ($n = 5$)

processed to create mature tRNAs and rRNAs, the insertion of transgene cassettes between *trnI* and *trnA* may have disturbed the post-transcriptional processing and thereby produced unusual *trnI* transcripts. Among the plastid-encoded, eubacteria-type RNA polymerase (PEP)-dependent transcripts examined, the accumulation of *psaA* and *psbB* transcripts encoding PSI and PSII proteins, respectively, was significantly decreased in the *psbA* mutants. Transcript levels of other PEP-dependent genes, including *rbcl* and *trnE*, did not decrease significantly in these mutants, suggesting that functional PEP is present in the bleached leaves of the *psbA* mutants. Higher plant plastids contain a second type of nuclear-encoded phage RNA polymerase, NEP. The NEP-dependent genes examined in this study exhibited multiple transcripts, as shown in previous studies (Allison et al. 1996; Hajdukiewicz et al. 1997; De Santis-Macloseek et al. 1999; Ishizaki et al. 2005). Interestingly, the *psbA* mutants accumulated high levels of transcripts for NEP-dependent genes *accD*, *rpoA*, *rpoB*, *clpP*, *ndhB* and *trnI* in the bleached leaves. Longer *rpoA* transcripts were accumulated to high levels in these *psbA* mutants whereas the accumulation of shorter transcripts was significantly decreased. Nevertheless, the overall accumulation of *rpoA* transcripts in these mutants was increased from that observed in wild-type plants. These results suggest that NEP-dependent transcripts are differentially regulated at transcriptional and/or post-transcriptional levels in the *psbA* mutant plants.

Discussion

Reverse genetics is a standard approach for assigning functions to plastid-encoded genes by disruption/replacement with a marker gene. However, this strategy is not able to delete all copies of chloroplast genes *ycf1*, *ycf2* (Drescher et al. 2000) and *clpP* (Whitney et al. 1999), thereby requiring the development of new strategies. One just suitable alternate strategy is the CRE-loxP site-specific recombination approach, which effectively deletes *clpP* from tobacco (Kuroda and Maliga 2003). However, this approach requires extensive DNA engineering and conventional breeding efforts to import the *cre* enzyme to the chloroplasts in order to remove the targeted gene (s). To delete targeted plastid-encoded genes we have developed a novel strategy that works by exploiting the chloroplast

Fig. 5 Accumulation of transcripts of plastid-encoded genes in wild-type and $\Delta psbA$ tobacco leaves. Total cellular RNA was extracted from the third to fifth bleached leaves of the $psbA$ mutant plants. Total RNA samples (500–1000 ng) were separated by denaturing 1% agarose gel electrophoresis. RNA blots were hybridized to DNA probes of plastid-encoded genes. Minor transcripts in addition to major ones identified by each probe are shown. *Numeric values* indicate a decrease or increase in the transcript accumulation of PEP-dependent genes (Type I promoter) and NEP-dependent genes (Type II and Type III promoters, respectively) in $\Delta psbA$ plants



homologous copy correction mechanism (Kavanagh et al. 1999). Using this approach we have efficiently deleted *psbA* from chloroplasts. Thus, this strategy simplifies the engineering of the final transformation vector compared to standard deletion constructs, thereby providing a high-through-put approach for the systematic deletion of plastid-encoded genes.

In this study, chloroplast transformation was achieved by integrating the *aadA* gene into the inverted repeat region of the plastome via two events of homologous recombination between the plastid DNA fragments. Once the transformation was achieved in these knockout strategies, two additional events of integration occurred: first, dual integration due to homologous copy correction between two repeats and, second, spontaneous replacement of the *psbA* gene by homologous copy correction between sequences flanking the *psbA* gene (5'-UTR and 3'-UTR) and the integrated gene in the inverted repeat region. Nevertheless, during copy correction, homologous crossover events may generate different transgenic plastid genomes using different copies of the same template. However, the development of such transgenic genomes by a single homologous recombination event will be highly unstable, and homologous recombination in the directly repeated region recreates the wild type genome, thereby eliminating the transgene (Ahlert et al. 2003). We have confirmed that the *aadA* expression and *psbA* deletion cassettes were introduced in the inverted repeat region of the chloroplast DNA by two homologous recombination events since hybrid sites (*PvuII/SmaI* and *HincII/PvuII*) were present in the transformed DNA that were not recognized by the

PvuII enzyme in the amplified fragment from the $\Delta TP3$ plant; however, the site was recognized by the enzyme in the amplified fragment from wild-type chloroplast DNA using S19 and S20 primers. The sorting of plastid DNA on regeneration medium yields homoplasmic organelles and then homoplasmic cells (Khan and Maliga 1999). Since the deletion of the targeted gene occurred after the successful development of transplastomic plants, it is therefore expected that essential genes would be completely deleted from the plastid genomes. In this report we demonstrate that the photosynthetically essential *psbA* gene, which encodes a D1 reaction center protein of PSII, is efficiently deleted by exploiting the homologous copy correction mechanism.

Higher plant plastids contain two types of RNA polymerases, PEP and NEP. PEP is mainly responsible for the transcription of photosynthesis-related genes, whereas NEP contributes to the transcription of housekeeping genes at an early stage of chloroplast development (Emanuel et al. 2004; Hricova et al. 2006; Demarsy et al. 2006). We found that PEP-dependent transcripts for photosystem genes, including *psaA* and *psbB*, accumulated at lower levels in the $psbA$ mutants. It is likely that functional PEP is present in the bleached leaves of the $psbA$ mutants, since PEP-dependent *rbcL* and *trnE* transcript levels did not decrease significantly. Thus, it is assumed that the lack of photosystem complexes caused by the *psbA* knockout may have down-regulated the expression of some photosystem genes at either the transcriptional and/or post-transcriptional levels. It should be noted that PEP-dependent transcription of some photosynthesis genes, including *psaA*,

psbA and *psbB*, has been shown to be regulated by the redox state of the chloroplast (Pfamschmidt et al. 1999; Matsuo and Obokata 2002; Pfamschmidt 2003). Furthermore, the bleached leaves of the *psbA* mutants accumulated high levels of transcripts for NEP-dependent genes. High-level accumulation of NEP-dependent gene transcripts has been reported in various bleached plants, including PEP-knockout plants (Allison et al. 1996; De Santis-Macloseek et al. 1999) and plastid sigma factor-deficient mutants (Kanamaru et al. 2001; Ishizaki et al. 2005). Thus, it has been assumed that NEP may play an important role in non-green plastids, in which PEP is present in limited amounts (Hajdukiewicz et al. 1997). It has been suggested recently that the plastid-encoded *trnE* might directly down-regulate the transcriptional activity of NEP and mediate the switch of RNA polymerase usage from NEP to PEP during chloroplast development (Hanaoka et al. 2005). However, *trnE* is unlikely to be involved in the enhanced accumulation of some NEP-dependent transcripts in the *psbA* mutants, since *trnE* transcript levels did not decrease significantly.

In conclusion, taking our result together, we have demonstrated for the first time that NEP-dependent transcript levels are controlled directly or indirectly by the photosynthetic activity of the chloroplasts. In addition to plastid targeting (RpoTp), dual targeting of the RpoT homolog from *Arabidopsis* (RpoTmp) into the plastid and mitochondria has been reported (Kobayashi et al. 2001), although recent evidence demonstrates that the enzyme targets exclusively to mitochondria (Kabeya and Sato 2005; Khan 2005). The RpoTp plays a major role in chloroplast transcription, whereas RpoTmp functions mainly in non-green tissues (Emanuel et al. 2006). Further, the RpoTp has also been shown to be essential for chloroplast biogenesis (Hricova et al. 2006). Detailed analyses of plastid gene expression in the *psbA* mutant plants will provide further insights on the regulation of plastid gene expression by photosynthesis.

Acknowledgments This study was supported by research grants from the Ministry of Science and Technology and from the Pakistan Science Foundation (PSF), Islamabad to MSK and from the Grants-in-Aids (17051025) for scientific research to TS.

References

- Ahlert D, Ruf S, Bock R (2003) Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 23:15730–15735
- Allison LA, Simon LD, Maliga P (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J* 11:2802–2809
- Bock R, Khan MS (2004) Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol* 22:311–318
- Daniell H, Khan MS, Allison L (2002) Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci* 7:84–91
- Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, Buhot L, Lerbs-Mache S (2006) Building-up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol* 142:993–1003
- De Santis-Macloseek G, Kofer W, Bock A, Schoch S, Maier RM, Wanner G, Rudiger W, Koop HU, Herrmann RG (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology biochemistry and ultrastructure. *Plant J* 18:477–489
- Drescher A, Ruf S, Calsa T, Carrer H, Bock R (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* 22:97–104
- Emanuel C, Weihe A, Graner A, Hess WR, Börner T (2004) Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J* 38:460–472
- Emanuel C, von Groll U, Müller M, Börner T, Weihe A (2006) Development- and tissue-specific expression of the RpoT gene family of *Arabidopsis* encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases. *Planta* 223:998–1009. (Published online November 24; doi: 10.1007/s00425-005-0159-y)
- Hanaoka M, Kanamaru K, Fujiwara M, Takahashi H, Tanaka K (2005) Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO Rep* 6:545–550
- Hajdukiewicz PTJ, Allison LA, Maliga P (1997) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J* 16:4041–4048
- Hedtke B, Börner T, Weihe A (1997) Mitochondrial and chloroplast phage type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277:809–811
- Hess WR, Börner T (1999) Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int Rev Cytol* 190:1–59
- Hricova A, Quesada V, Micol JL (2006) The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141:942–956
- Ishizaki Y, Tsunoyama Y, Hatano K, Ando K, Kato K, Shinmyo A, Kobori M, Takeba G, Nakahira Y, Shiina T (2005) A nuclear-encoded sigma factor, *Arabidopsis* SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *Plant J* 42:133–144
- Kabeya Y, Sato N (2005) Unique translation initiation at the second AUG codon determines mitochondrial localization of the phage-type RNA polymerases in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiol* 138:369–382
- Kanamaru K, Nagashima A, Fujiwara M, Shimada H, Shirano Y, Nakabayashi K, Shibata D, Tanaka K, Takahashi H (2001) An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 42:1034–1043
- Kavanagh TA, Thanh ND, Lao NT, McGrath N, Peter SO, Horvath EM, Dix PJ, Medgyesy P (1999) Homologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics* 152:1111–1122
- Khan MS, Maliga P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol* 17:910–915
- Khan MS (2005) Unraveling the complexities of plastid transcription in plants. *Trends Biotechnol* 23:535–538
- Kobayashi Y, Dokiya Y, Sugita M (2001) Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative translation initiation in single transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 289:1106–1113
- Kuroda H, Maliga P (2003) The plastid ctpP1 protease is essential for plant development. *Nature* 425:86–89
- Leister D (2003) Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* 19:47–56

- Liere K, Maliga P (1999) In vitro characterization of the tobacco *rpoB* promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and plant mitochondrial promoters. *EMBO J* 18:249–257
- Liere K, Maliga P (2001) Plastid RNA polymerases in higher plants. In: Aro EM, Andersson B (eds) Regulation of photosynthesis. Kluwer, Dordrecht, pp 22–39
- Matsuo M, Obokata J (2002) Dual roles of photosynthetic electron transport in photosystem I biogenesis: light induction of mRNAs and chromatic regulation at post-mRNA level. *Plant Cell Physiol* 43:1189–1197
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeichi M, Chang Z, Aota S-I, Inokuchi H, Ozeki H (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322:572–574
- Pfannschmidt T (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes photosynthesis control of plastid gene expression. *Trends Plant Sci* 8:33–41
- Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF (1999) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397:625–628
- Rogers SO, Bendich AJ (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* 5:69–76
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N, Chunwongse J, Obokata J, Yamaguchi-Shinozaki K, Ohto C, Torazawa K, Meng BY, Sugita M, Deno H, Kamogashira T, Yamada K, Kusuda J, Takaiwa F, Kato A, Tohdoh N, Shimada H, Sugiura M (1986) The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J* 5:2043–2049
- Sriraman P, Silhavy D, Maliga P (1998) Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiol* 117:1495–1499
- Svab Z, Maliga P (1991) Mutation proximal to the tRNA binding region of the *Nicotiana* plastid 16S rRNA confers resistance to spectinomycin. *Mol Gen Genet* 228:316–319
- Svab Z, Maliga P (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:913–917
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8526–8530
- Whitney SM, Caemmerer SV, Hudson GS, Andrews TJ (1999) Directed mutation of the Rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth. *Plant Physiol* 121:579–588

A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons

Yoko Ishizaki¹, Yuichi Tsunoyama², Kyoko Hatano³, Kohei Ando⁴, Ko Kato⁴, Atsuhiko Shinmyo⁴, Maki Kobori¹, Go Takeba¹, Yoichi Nakahira¹ and Takashi Shiina^{1,*}

¹Faculty of Human Environment, Kyoto Prefectural University, Shimogamo-nakaragi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8522, Japan,

²Radioisotope Research Center, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan,

³Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Yoshida-nihonmatsu-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan, and

⁴Nara Institute of Science and Technology, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

Received 18 August 2004; revised 25 November 2004; accepted 13 December 2004.

*For correspondence (fax +81 75 703 5448; e-mail shiina@kpu.ac.jp).

Summary

Eubacterial-type multi-subunit plastid RNA polymerase (PEP) is responsible for the principal transcription activity in chloroplasts. PEP is composed of plastid-encoded core subunits and one of multiple nuclear-encoded sigma factors that confer promoter specificity on PEP. Thus, the replacement of sigma factors associated with PEP has been assumed to be a major mechanism for the switching of transcription patterns during chloroplast development. The null mutant (*sig6-1*) of plastid sigma factor gene *AtSIG6* exhibited a cotyledon-specific pale green phenotype. Light-dependent chloroplast development was significantly delayed in the *sig6-1* mutant. Genetic complementation of the mutant phenotype by the *AtSIG6* cDNA demonstrated that *AtSIG6* plays a key role in light-dependent chloroplast development. Northern and array-based global analyses for plastid transcripts revealed that the transcript levels of most PEP-dependent genes were greatly reduced in the *sig6-1* mutant, but that the accumulation of nuclear-encoded RNA polymerase (NEP)-dependent transcripts generally increased. As the PEP α subunit and PEP-dependent *trnV* accumulated at normal levels in the *sig6-1* mutant, the *AtSIG6* knockout mutant probably retained functional PEP, and the transcriptional defects are likely to have been directly caused by *AtSIG6* deficiency. Most of the *AtSIG6*-dependent genes are preceded by σ^{70} -type promoters comprised of conserved $-35/-10$ elements. Thus, *AtSIG6* may act as a major general sigma factor in chloroplasts during early plant development. On the other hand, the mutant phenotype was restored in older seedlings. Arabidopsis probably contains another late general sigma factor, the promoter specificity of which widely overlaps with that of *AtSIG6*.

Keywords: sigma factor, RNA polymerase, plastid, transcription, pale green, Arabidopsis.

Introduction

Plastids evolved from a cyanobacterial ancestor and have retained several prokaryotic characteristics in their transcriptional and translational apparatuses. Higher plant plastids contain two types of RNA polymerases: a bacterial-type multi-subunit RNA polymerase (PEP) and a nuclear-encoded bacteriophage-type RNA polymerase (NEP) (Hedtke *et al.*, 1997; Hess and Börner, 1999; Liere and Maliga, 2001). These RNA polymerases are responsible for the transcription of distinct types of plastid genes (Allison *et al.*,

1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Plastid-encoded photosynthesis genes are transcribed exclusively by PEP (class I genes). On the other hand, non-photosynthetic housekeeping genes are mostly transcribed by both PEP and NEP (class II genes), whereas a few genes, such as *rpoB* and *accD*, are transcribed exclusively by NEP (class III genes). The timed expression of photosynthetic genes during plant development is dependent on an increase in PEP transcription activity during chloroplast development (Baumgartner

et al., 1993; Bisanz-Seyer *et al.*, 1989). Thus, PEP likely plays an important role in early plant growth.

PEP originates from ancestral cyanobacteria and consists of a core catalytic complex ($\alpha_2\beta\beta'\beta''$), whose subunits are encoded by plastid genes, and a sigma factor that is presumed to confer promoter specificity to the core complex (Allison, 2000; Liu and Troxler, 1996; Tanaka *et al.*, 1996). Most eubacterial genomes encode several sigma factors, each of them recognizing a set of promoters (Ishihama, 2000). Bacterial sigma factors have been grouped into two families, the σ^{70} and σ^{54} families (Wösten, 1998). The σ^{70} family is further divided into three subgroups, namely the primary sigma factors (group 1), which are essential for cell growth; non-essential primary-like sigma factors (group 2); and so-called alternative sigma factors (group 3), which direct RNA polymerase to initiate transcription at specific promoters in response to environmental signals (Lonetto *et al.*, 1992). Similarly, the ancestor of chloroplasts, cyanobacteria, also contains multiple σ^{70} -type sigma factors that exhibit promoter preference. The chromosome of *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 contains nine sigma factors: one primary sigma factor, four primary-like sigma factors, and four alternative sigma factors (Kaneko *et al.*, 1996).

Multiple sigma factors have also been identified in the plastids of higher plants. In *Arabidopsis*, sigma factor genes form a small gene family consisting of six genes (*AtSIG1–AtSIG6*) (Fujiwara *et al.*, 2000; Hakimi *et al.*, 2000; Isono *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997). All of the plastid sigma factors are related to bacterial groups 1 or 2 sigma factors of the σ^{70} family and contain conserved subdomains, including regions 2.4 and 4.2, that are responsible for promoter sequence recognition (Lonetto *et al.*, 1992). No σ^{54} -like sigma factor has been identified in plants (Allison, 2000). Phylogenetic analysis of plant sigma factors suggests that they may be grouped into several subgroups (Allison, 2000; Fujiwara *et al.*, 2000; Tsunoyama *et al.*, 2004).

Analogous with bacterial transcription regulation, the replacement of plastid sigma factors has been postulated to play a key role in PEP regulation (Allison, 2000). Interestingly, all of the plastid sigma factors are nuclear-encoded and are likely to mediate direct nuclear control on plastid gene expression (Liu and Troxler, 1996; Tanaka *et al.*, 1996). Standard promoters recognized by bacterial primary sigma factors, such as *Escherichia coli* σ^{70} , are characterized by consensus –10 (TATAAT) and –35 (TTGACA) core promoter elements (σ^{70} -type promoter). Most of the PEP-dependent photosynthesis and housekeeping genes (class I and class II) are preceded by σ^{70} -type promoters. Intensive promoter mutation analyses revealed that these promoter elements were essential for transcription initiation by PEP *in vitro* and *in vivo* (reviewed in Hess and Börner, 1999; Liere and Maliga, 2001; Link, 1996; Stern *et al.*, 1997; Sugiyama, 1992). In addition to the standard σ^{70} -type PEP promoters, some PEP promoters exhibit unique promoter architectures, such

as the *psbD* blue light-responsive promoter (*psbD* LRP) which lacks a functional –35 element (Kim *et al.*, 1999; Nakahira *et al.*, 1998; Thum *et al.*, 2001; To *et al.*, 1996). These facts suggest that chloroplasts may contain at least two types of sigma factors. One of these groups would contain general sigma factor(s) responsible for the transcription of many photosynthesis and housekeeping genes. On the other hand, some factor-dependent promoters, such as *psbD* LRP, may be transcribed by PEP holoenzyme-containing specialized sigma factors. We recently found that *AtSIG5* acts as a specialized sigma factor in chloroplasts and is responsible for the light-dependent transcription at the *psbD* LRP (Tsunoyama *et al.*, 2004). However, general sigma factors have not yet been identified in chloroplasts.

We identified a T-DNA-generated mutation in the *AtSIG6* gene of *Arabidopsis*. Inactivation of *AtSIG6* resulted in chlorophyll-deficient cotyledons in young seedlings and reduced the transcription of the majority of PEP-dependent genes preceded by σ^{70} -type promoters. *AtSIG6* likely acts as a general sigma factor in chloroplasts and is probably responsible for the recognition of σ^{70} -type standard PEP promoters in young cotyledons. The present study also suggested the presence of another general sigma factor that functions mainly at a later stage of seedling growth.

Results

T-DNA insertion inactivated *AtSIG6* in the sig6-1 mutant

To date, *AtSIG6* homologs have been found in *Arabidopsis* (AB029916; At2g36990), maize (AF099112) and rice (AB096012) and can probably be classified into a structurally conserved SIG6 group (Allison, 2000; Fujiwara *et al.*, 2000). A detailed comparison of the amino acid sequences of plastid sigma-like factors with *E. coli* σ^{70} suggested that *AtSIG2* and *AtSIG6* are the most similar to the *E. coli* primary sigma factor, σ^{70} (Privat *et al.*, 2003). To analyze the function of *AtSIG6* in plants, we obtained seeds with a T-DNA insertional mutant (Figure 1a) in the *AtSIG6* gene (Garlik 893c09.b.1a.Lb3Fa) from a collection of *Arabidopsis* (Columbia ecotype) T-DNA insertion lines generated by Syngenta. The insertion point of the left and right ends of the T-DNA were mapped by sequencing the PCR products generated by the primer pairs RB3 and *SIG6*-P2 (left end), and LB3 and *SIG6*-P1 (right end). The mutant allele contains a T-DNA insertion in exon 4 of *AtSIG6*, 407 bp downstream of the translation start site, and generates a truncated protein missing the conserved regions 1.2–4.2, which are essential for σ^{70} -type sigma factors (Figure 1a). A DNA gel-blot analysis using a T-DNA-specific probe (phosphinothricin acetyltransferase (bar)-specific probe) indicated that multiple T-DNAs had been inserted at this site, but the exact arrangement and number of the T-DNAs was not determined (data not shown). An RNA gel-blot analysis using an

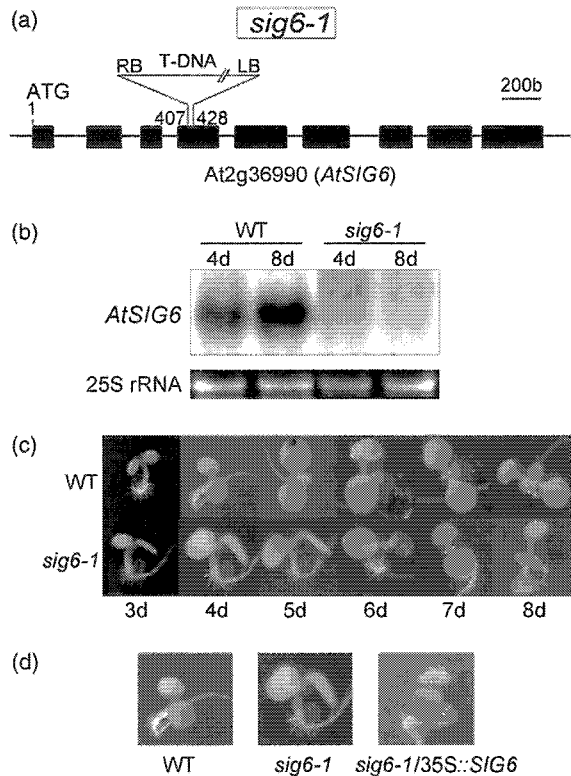


Figure 1. Molecular analysis of the T-DNA insertion in the *AtSIG6* locus. (a) Exons (boxes) and the position of the T-DNA insertion in exon 4 of the *AtSIG6* gene are shown. (b) The analysis of *AtSIG6* transcript levels. Total RNA was isolated from 4- and 8-day-old seedlings and the RNA gel blot (5 μ g) was probed with the 600 bp cDNA fragment for *AtSIG6*. Endogenous *AtSIG6* transcript was barely detected in the *sig6-1* mutant. (c) Phenotype of the *sig6-1* mutant and wild-type plants during early plant development. (d) Phenotype of 4-day-old seedlings of wild-type, *sig6-1* and *sig6-1/35S::SIG6*.

AtSIG6-specific probe demonstrated that *AtSIG6* transcripts were barely detectable in the *sig6-1* mutant (Figure 1b). Thus, we concluded that the T-DNA insertion in the *AtSIG6* gene completely inactivated the gene (null mutant) and named the mutant *sig6-1*. T4 plants generated by self-pollination of homozygous T3 plants were used for further experiments.

Light-dependent chloroplast development was delayed in the *sig6-1* cotyledons

The homozygous *sig6-1* mutant plants had pale green cotyledons with drastically reduced chlorophyll content (<20% of wild-type plants) in 3- or 4-day-old seedlings (Figure 1c). The chlorophyll deficiency was limited to the young cotyledons and was restored to the wild-type level in 8-day-old seedlings. Interestingly, a few newly emerging true leaves

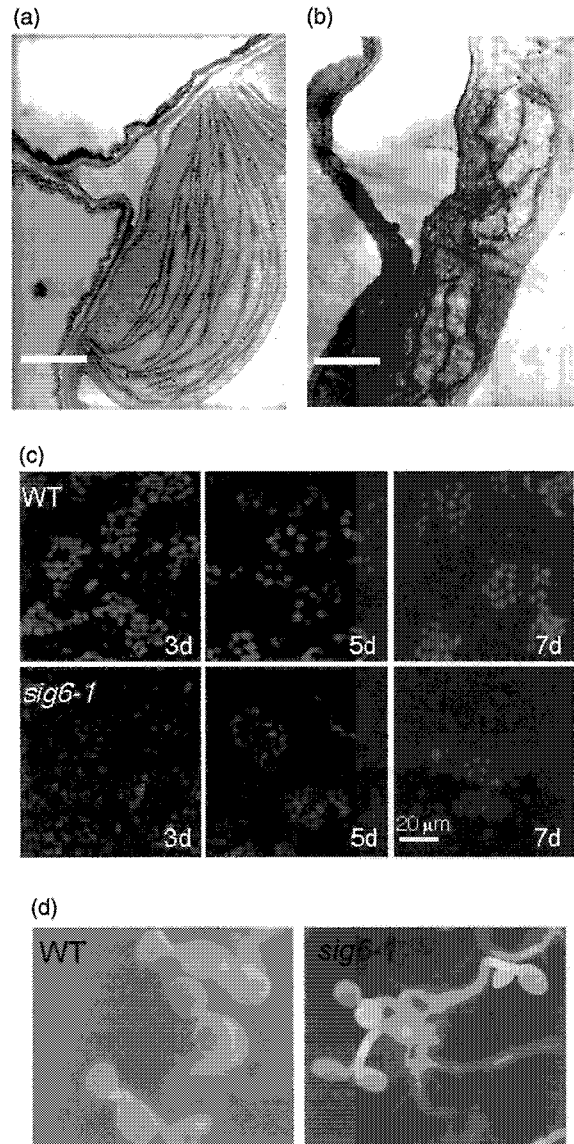


Figure 2. Transmission electron microscopic images of chloroplasts in 4-day-old wild type (a) and *sig6-1* seedlings (b). Bars indicate 1 μ m in each panel. (c) Laser-scanning confocal microscopic analysis of chlorophyll fluorescence in mesophyll cells of cotyledons in light-grown seedlings. (d) Phenotype of greening seedlings that were grown in the dark for 4 days and subsequently illuminated with white light for 24 h.

following the cotyledons also initially showed a chlorophyll-deficient phenotype but turned green within 1 day (data not shown). On the other hand, later true leaves were mostly green and healthy from the beginning of leaf development.

We next performed segregation analyses of the pale green phenotype in the *sig6-1* mutant plants. All progenies of self-pollinated homozygous mutant plants exhibited a

pale green phenotype. Furthermore, progenies obtained from self-pollinated heterozygous (*SIG6/sig6*) seedlings were segregated in a 3.5:1 ratio (i.e. 117 green:33 pale green). These results are the same as those for a characteristic inherited as a single recessive Mendelian trait, supporting the hypothesis that the inactivation of *AtSIG6* caused a pale green phenotype.

We compared electron micrographs of chloroplasts from wild-type and *sig6-1* mutant cotyledons in 4-day-old light-grown seedlings. The mutant cotyledons contained smaller and spongiform plastids with markedly reduced internal thylakoid membranes, compared with wild-type chloroplasts (Figure 2a,b). Confocal microscopy observations of developing chloroplasts revealed that 3-day-old mutant seedlings contained smaller plastids exhibiting weaker chlorophyll fluorescence, compared with wild-type chloroplasts, whereas the chloroplasts in 7-day-old mutant plants were comparable to wild-type chloroplasts in size and chlorophyll fluorescence (Figure 2c).

Dark-grown *sig6-1* seedlings showed a normal etiolated phenotype characterized by long hypocotyls, closed apical hooks and small rudimentary cotyledons. The size and number of etioplasts were indistinguishable between the *sig6-1* and wild-type seedlings (data not shown). After 6 h of exposure to light, the wild-type etiolated seedlings quickly reverted to a normal growth pattern with open apical hooks, and expanded and green cotyledons. However, the light-dependent greening of etiolated seedlings and chloroplast development were markedly retarded in the *sig6-1* mutant (Figure 2d). Of note, the opening of the apical hooks and expansion of the cotyledons proceeded normally in the mutant. It is likely that *AtSIG6* is indispensable for light-dependent transformation of etioplasts to chloroplasts, but not for other photomorphogenic programs. Taken together, we concluded that *AtSIG6* plays a key role in the light-dependent chloroplast development in cotyledons at an early stage of growth in Arabidopsis.

The transcript levels of most PEP-dependent genes were greatly reduced in the *sig6-1* cotyledons

Retardation of chloroplast development might be caused by a defect in plastid gene expression in the *AtSIG6*-deficient mutant. To investigate this possibility, we first measured the global transcript pattern in the mutant using a plastid DNA microarray. The microarray contained duplicates of 257 spots of 500-bp PCR products covering the entire genome of the Arabidopsis chloroplast without overlaps (NAIST microarray consortium). In the control experiment with independently isolated RNAs from 9-day-old wild-type seedlings, almost all of the reliable hybridization signals were within \pm twofold changes (data not shown). In contrast, the hybridization signals varied extensively when 4-day-old wild-type seedlings were compared with 4-day-old *sig6-1* seedlings exhibiting a pale green phenotype. The histogram shown in Figure 3 indicated that decreased signals were seen mostly for class I (green bars) and class II (yellow bars) PEP-dependent genes. The decreased class I genes included *rbcl*, *psbA*, *psbB*, *psbC*, *psbD*, *psbH*, *psbN* and *psbT*, while the decreased class II genes included rRNA genes such as *rrn16*, *rrn23*, *rrn5* and *rrn4.5* (see Table S1). In Arabidopsis, PEP has been reported to be responsible for the majority of transcription activity in rRNA transcription (Sriraman *et al.*, 1998). It should also be noted that no reductions in class III NEP-dependent gene transcripts were seen in the *sig6-1* mutant seedlings. In contrast, increased signals were mostly derived from NEP-dependent class II (yellow bars) and class III (orange bars) genes, including *clpP*, *rps15*, *ndhB*, *ycf1* genes and *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2* genes, respectively, but scarcely from class I genes in the *sig6-1* mutant.

To confirm the array-based expression data, we further examined the effects of *AtSIG6* disruption on plastid transcript pattern during early plant development using Northern analyses (Figure 4). Transcripts of all the

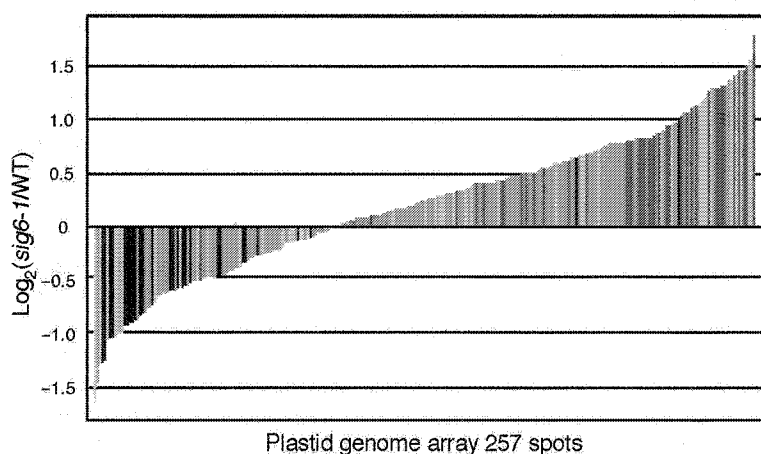


Figure 3. Histogram of average ratios of chloroplast transcripts from the *sig6-1* mutant and wild-type seedlings. Total RNA from 4-day-old mutant and wild-type seedlings was labeled reciprocally with Cy3 and Cy5. The ratio for each spot is the average of two replicates. The green bars represent class I genes, yellow bars represent class II genes, orange bars represent class III genes, and gray bars represent unidentified genes (see Table S1).

PEP-dependent photosynthesis genes examined here had already accumulated in 4-day-old light-grown wild-type seedlings (Figure 4a). The transcript levels increased markedly in 8-day-old seedlings, indicating that the expression of PEP-dependent genes is regulated developmentally during seedling growth. In 4-day-old *sig6-1* seedlings, the steady state transcript levels of PEP-dependent genes, including *psbA*, *rbcL*, *rrn16*, *psaA*, *atpB* and *psbD* decreased drastically, compared with wild-type levels. The reduced accumulation of these transcripts was virtually restored in 8-day-old *sig6-1* seedlings. In contrast, the *sig6-1* seedlings accumulated higher levels of transcripts for NEP-dependent genes, such as *rpoA*, *rpoB*, *clpP*, *accD*, *ycf1* and *ycf2*, in 4(5)-day-old seedlings (Figures 4b and 5a). These results suggested that AtSIG6 may be responsible for the transcription of the

majority of PEP-dependent genes at an early stage of light-dependent chloroplast development in cotyledons.

The blue light-responsive promoter of *psbD* (*psbD* LRP) is a unique PEP promoter that is distinct from standard σ^{70} -type PEP promoters. Primary transcripts (4.5 and 3.7 kb) from the *psbD* LRP were not detectable in 4-day-old wild-type seedlings (Figure 4a), suggesting that a special sigma factor responsible for *psbD* LRP activity, AtSIG5 was absent in young chloroplasts. On the other hand, *psbD* LRP transcripts were detected in 8-day-old seedlings of both wild-type and *sig6-1* plants. AtSIG6 is unlikely to be responsible for *psbD* LRP activity.

Recently, AtSIG2 deficiency was shown to reduce the accumulation of several PEP-dependent tRNAs, such as *trnE*(UUC), *trnD*(GUC), *trnV*(UAC) and *trnM*(CAU), without affecting the transcript levels of most of the PEP-dependent photosynthesis genes (Hanaoka *et al.*, 2003; Kanamaru *et al.*, 2001; Privat *et al.*, 2003). We examined the accumulation of several tRNAs in the *sig6-1* mutant to compare the role of AtSIG6 with that of AtSIG2 in tRNA transcription (Figure 4c). Similarly to the AtSIG2 knockout and anti-sense plants, the expression of the *trnE* operon was diminished in young cotyledons of the *sig6-1* mutant. The accumulation of *trnQ*(UUG) also decreased in *sig6-1* young seedlings. On the other hand, *trnV*(UAC) level did not decrease in the *sig6-1* mutants in contrast to the AtSIG2 knockout mutants, suggesting that AtSIG6 and AtSIG2 recognize different sets of tRNA promoters. Furthermore, this observation strongly supports our assumption that PEP is functional in the *sig6-1* mutant.

Of final note, unprocessed precursor mRNAs for *atpB* and *rrn16* accumulated to a significant degree in the *sig6-1* mutant (Figure 4a). This finding suggests that AtSIG6 inactivation not only affected transcription of PEP-dependent genes, but may also have had an indirect effect on mRNA processing.

The mutant phenotype of the *sig6-1* was complemented by the AtSIG6 cDNA

We performed genetic complementation studies to determine that AtSIG6 was responsible for the mutant phenotype of *sig6-1*. We transformed a homozygous *sig6-1* mutant with full-length AtSIG6 cDNA fused to the cauliflower mosaic virus 35S promoter (*sig6-1/35S::SIG6*) and analyzed the T2 seedlings of seven independent lines. All of the complementation lines exhibited green cotyledons in 4-day-old seedlings (Figure 1d). These results indicate that AtSIG6 disruption is the direct cause of the pale-green cotyledons that were observed in the mutant phenotypes.

We also analyzed the expression of several plastid-encoded genes in a *sig6-1* mutant complemented with AtSIG6 cDNA. As shown in Figure 1(c), AtSIG6 gene expression was not detected in the *sig6-1* mutant. However, Northern blot

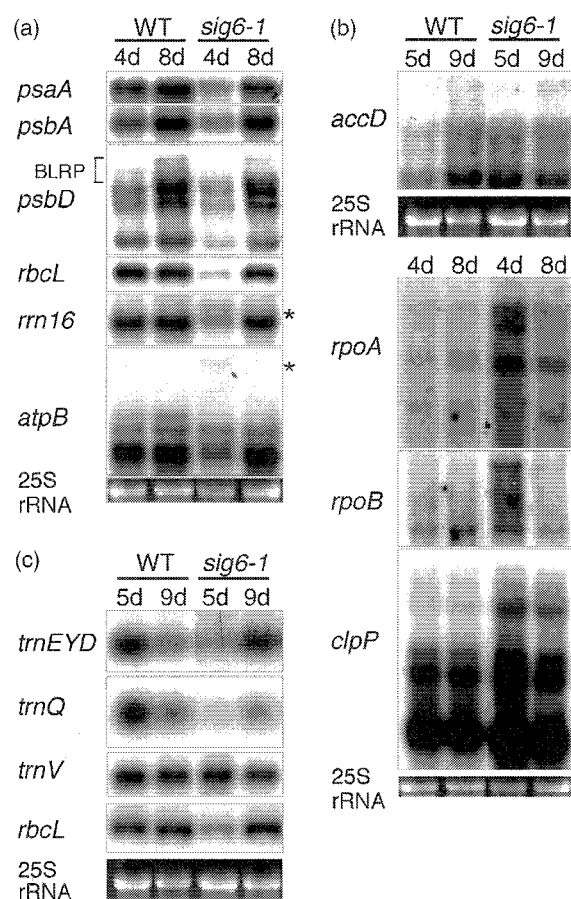


Figure 4. Accumulation of plastid gene transcripts in the *sig6-1* mutant and wild-type seedlings during early plant development. Total RNA was isolated from seedlings grown on MS-agar plate containing sucrose under a 16 h light and 8 h dark cycle. Plants were illuminated with white light for 4 h before sampling. Total RNAs (2–4 μ g) were subjected to RNA gel-blot analysis. (a) Expression of PEP-dependent genes. Asterisks show unprocessed precursor transcripts. (b) Expression of NEP-dependent genes. (c) Expression of tRNAs and *rbcL*.

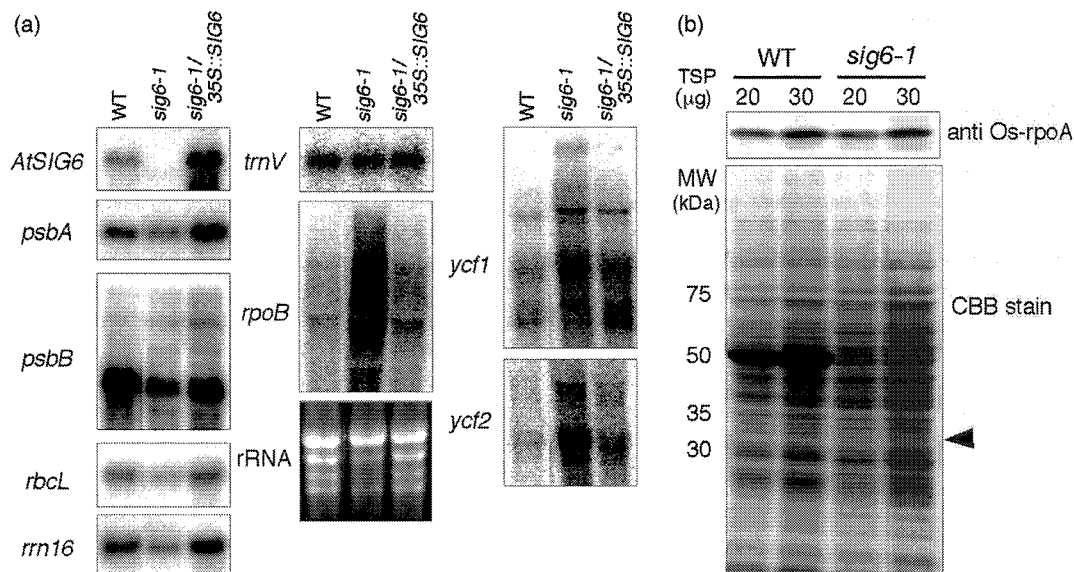


Figure 5. (a) Genetic complementation of the reduced accumulation of PEP dependent transcripts and enhanced accumulation of NEP-dependent transcripts by the *AtSIG6* cDNA. Total RNA was isolated from 4-day-old seedlings of the *sig6-1* mutant, complemented *sig6-1* mutant and wild-type. Plants were grown on MS-ager plate containing sucrose under a 16 h light and 8 h dark cycle, and illuminated with white light for 4 h before sampling. Total RNAs (2–10 µg) were subjected to RNA gel-blot analysis. (b) Immunoblot analysis of α subunit of PEP. Total soluble proteins (20 and 30 µg) extracted from 4-day-old wild-type and *sig6-1* seedlings were hybridized with an antibody against the rice α subunit. CBB-stained gel image is also shown below. Arrowhead indicates the predicted size of PEP α subunit.

analysis revealed a higher level of *AtSIG6* transcripts in the complemented *sig6-1* mutant than in wild-type plants (Figure 5a). Similarly, the reduced accumulation of all examined PEP-dependent transcripts (*psbA*, *psbB*, *rbcl* and *rrn16*) was almost restored in the complemented *sig6-1* mutant. In contrast, the enhanced accumulation of NEP-dependent transcripts, such as *rpoB*, *ycf1* and *ycf2*, was significantly reduced in the complemented *sig6-1* mutant. These results strongly suggest that the *AtSIG6* deficiency was the direct cause of the reduced transcription of most PEP-dependent genes in the *sig6-1* mutant. The accumulation of *trnV*(UAC) was not affected in either the *sig6-1* mutant or the complemented *sig6-1* line that overexpressed *AtSIG6*, suggesting that *AtSIG6* is not involved in *trnV*(UAC) transcription.

PEP is not deficient in 4-day-old sig6-1 mutant seedlings

The reduced accumulation of PEP-dependent transcripts and the enhanced accumulation of NEP-dependent transcripts are characteristics of mutant plants lacking one of the PEP genes. Thus, PEP might be deficient in the *sig6-1* mutant as a result of the reduced translation activity in the chloroplasts caused by the insufficient accumulation of rRNA and tRNA molecules. To exclude this possibility, soluble protein extracts from 4-day-old wild-type and *sig6-1* mutant seedlings were immunoblotted with anti-PEP α subunit antibodies raised against the rice α subunit. As shown in Figure 5(b), the same amount of α subunit protein was detected in both

wild-type and mutant plants. Furthermore, the *AtSIG6* deficiency did not reduce the accumulation of *trnV*(UAC), the expression of which depends on a PEP holoenzyme (Kanamaru *et al.*, 2001; Legen *et al.*, 2002). Taken together, these findings suggest that functional PEP is present in the *sig6-1* mutant seedlings.

Expression of AtSIG6 transcripts is dependent on tissue, light and seedling development

To elucidate the role of *AtSIG6* in chloroplast development during seedling growth, we examined the expression of all Arabidopsis sigma factor genes during early seedling growth. The *AtSIG2*, *AtSIG3*, *AtSIG4* and *AtSIG6* transcripts were detected in 4- or 5-day-old wild-type seedlings (Figure 6a). The accumulation of *AtSIG6* transcripts increased in 8-day-old seedlings, but *AtSIG2*, *AtSIG3* and *AtSIG4* transcript levels were almost constant during seedling growth. In contrast, *AtSIG1* and *AtSIG5* transcripts were barely detected in 4-day-old seedlings and accumulated to a significant degree in 8-day-old seedlings. These results suggest that *AtSIG2*, *AtSIG3*, *AtSIG4* and *AtSIG6* likely function in cotyledons from an early stage of seedling growth, whereas *AtSIG1* and *AtSIG5* may function mainly at a later stage of seedling growth. Next, we examined the tissue specificity of *AtSIG6* expression. *AtSIG6* transcripts were abundantly accumulated in leaves, but not in roots (Figure 6b). Furthermore, the expression of *AtSIG6* transcripts was

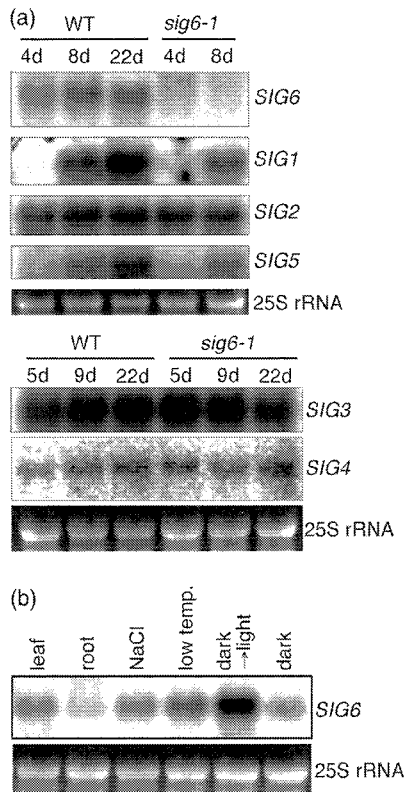


Figure 6. Transcript accumulation for plastid sigma factor genes. Total RNA was isolated from seedlings grown on MS-agar plate containing sucrose under a 16 h light and 8 h dark cycle.

(a) Accumulation of sigma factor genes at an early stage of seedling growth. Plants were illuminated with white light for 4 h before sampling. Total RNAs (5 µg) were subjected to RNA gel-blot analysis.

(b) Leaf-specific and light-induced accumulation of *AtSIG6* transcripts. Three-week-old plants were treated with 300 mM NaCl for 5 h (lane 3) or treated with cold temperature (4°C) for 48 h (lane 4) or dark-adapted for 24 h (lane 6) or illuminated with white light for 3 h after 24 h dark-adaptation (lane 5). Total RNA was isolated from leaves (lane 1, 3, 4, 5 and 6) and roots (lane 2). Total RNAs (5 µg) were subjected to RNA gel-blot analysis.

obviously under light control, but was not induced to a significant degree by salt or cold stresses.

Discussion

AtSIG6 is responsible for the global transcription of PEP-dependent genes in cotyledons during early plant development

Arabidopsis contains six nuclear-encoded sigma-like factors that are expected to confer promoter specificity to the bacteria-type plastid RNA polymerase, PEP. In *E. coli*, most of the standard σ^{70} -type promoters are recognized by a primary sigma factor, σ^{70} , in the exponential stage, whereas alternative sigma factors direct RNA polymerase to specific promoters in response to environmental signals. If a

chloroplast contains a single primary sigma factor that is essential for chloroplast development, as in the case of most eubacteria, deficient mutants are expected to produce an albino phenotype. In this study, we have identified an *AtSIG6* null mutant, *sig6-1* and found that the *sig6-1* mutant exhibited pale green cotyledons containing small and undifferentiated plastids in 4-day-old seedlings. Light-dependent chloroplast development in etiolated seedlings was also significantly delayed in the *sig6-1* mutant. Genetic complementation of the pale green phenotype of the *sig6-1* mutant using *AtSIG6* cDNA demonstrated that *AtSIG6* plays a key role in early light-dependent chloroplast development in cotyledons.

To elucidate the role of *AtSIG6* in plastid gene expression, we compared the global transcript patterns of plastid genes between wild-type and *sig6-1* mutant seedlings using plastid DNA microarray and Northern blot analyses. The expression of many PEP-dependent class-I photosynthesis genes and class-II rDNA genes decreased in the *sig6-1* mutant, whereas increased signals were derived mostly from class-III and some class-II genes that are largely dependent on NEP activity. This transcript pattern is reminiscent of that of PEP-deficient mutants (Allison *et al.*, 1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Furthermore, *AtSIG6* cDNA was able to complement the reduced accumulation of PEP-dependent genes. These evidences strongly suggest that *AtSIG6* is responsible for the recognition of standard PEP promoters and is indispensable for PEP activity in young seedlings. Our results best support the role of *AtSIG6* as a general transcription initiator during early cotyledon development.

On the other hand, *AtSIG6* might be a specialized sigma factor that recognizes a set of unique PEP promoters for essential genes involved in plastid translation, such as rRNAs, tRNAs and ribosomal proteins, and an *AtSIG6* deficiency would result in a reduced translational activity in plastids. In this case, a deficiency of the PEP core would be expected in *AtSIG6* knockout plants because of the reduced translation of plastid-encoded PEP core genes. To exclude this possibility, we immunologically measured the accumulation of PEP α subunit and found that the α subunit did not decrease in the *AtSIG6* knockout plants, compared to that in wild-type plants. In addition, *trnV*(UAC) was actively transcribed in the *sig6-1* mutant. *trnV*(UAC) has been reported to be exclusively transcribed by PEP (Hanaoka *et al.*, 2003; Kanamaru *et al.*, 2001). These data clearly suggest that active PEP is present in the *sig6-1* mutant and that a PEP deficiency is not the primary reason for the reduced transcription of most PEP-dependent genes.

Another possibility is that a reduction in the accumulation of *trnE*, a precursor of ALA biosynthesis, may cause chlorophyll deficiency and indirectly suppress PEP activity or the mRNA stability of PEP-dependent genes in the *AtSIG6*-deficient mutant. However, a reduced accumulation

σ^{70} -type	TTGACA	17nt	TATAAT
<i>rrn16</i>	GCTCGTGGGATTGACCGT	GAGGGGGTAGGGGTAGC	TATATTTCTGGGAG
<i>rbcL</i>	AAGTATTAGGTTGGCGT	TATACATATGAAAGAATA	TACAATAATGATGT
<i>atpB</i>	AAAATCACTCTTGACAG	TAAATATCTGTTGTATA	TGTAATCCTAGAT
<i>psaA</i>	AAAGGGTCCGTTGAGC	ACCCTATGGATATGTCA	TAATAGATCCGAAC
<i>psbA</i>	TTTACATTGGTTGACAT	TGGCTATATAAGTCATGT	TATACTGTTTCATA
<i>psbB</i>	TTAACCCCATTTGCAT	ATTGGTACTTATCGGAT	TAGAATAGATCCGC
<i>psbC</i>	ATCTTTGGGGTTGCTTT	TTTCCAATAAACGTTGGT	TACATTTCTTTATG
<i>psbE</i>	TCAAATTGGCTTGCTGT	GTCAGAAGAAGGATAGC	TATACTGATTCGGT
<i>trnEYD</i>	TTTCATTATAATTGACA	ATTTAAAAAACTGATCA	TACTATGATCATAG
<i>trnQ</i>	TCATTTTGAATTGACA	AACAACCAATAGGAAT	TACTCTTTTAGTAG
<i>ycf6</i>	TCCCTTTTTTTTGACT	CTGCACCAGTGATTCAC	TATTATTAGTGAAC
<i>trnV-UAC</i>	AATATTAATCTTTGACA	AGAAATTATCTACATGA	TAAGATAAGATAAA
<i>psbD LRP</i>	TGGACCTAACCCTCGAAT	CATGACTATATCCACT	TATTCTGATATTCA

Figure 7. Comparison of AtSIG6-dependent promoters in Arabidopsis. -10 and -35 promoter sequences are boxed. AtSIG6-independent *trnV(UAC)* promoter and *psbD LRP* are also shown.

of *trnE* and chlorophyll has also been reported in *AtSIG2* knockout and anti-sense plants, with no effect on the overall abundance of PEP-dependent photosynthesis transcripts (Hanaoka *et al.*, 2003; Kanamaru *et al.*, 2001; Privat *et al.*, 2003). Thus, *trnE* deficiency is unlikely to be responsible for the reduced accumulation of PEP-dependent transcripts. Taken together, we concluded that AtSIG6 likely acts as a general and major sigma factor during early plant development.

AtSIG6 generally recognizes σ^{70} -type PEP promoters

In Figure 7, we aligned the pre-sequences of all PEP-dependent genes whose transcripts decreased in the *sig6-1* mutant. All of the AtSIG6-dependent genes were preceded by typical σ^{70} -type promoters harboring conserved -35/-10 core promoter elements. AtSIG6-dependent promoters include some unique σ^{70} -type promoters, such as *rbcL* (Kim *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 1988; Shiina *et al.*, 1998), *psbA* (Eisermann *et al.*, 1990; Satoh *et al.*, 1999), *psaA* (Cheng *et al.*, 1997) and *rrnP1* (Suzuki *et al.*, 2003), whose activities are regulated by extra promoter cis elements other than -35/-10 elements. This study clearly revealed that AtSIG6 directs PEP to initiate transcription at most of the σ^{70} -type PEP promoters, including these unique promoters. On the other hand, the AtSIG6-independent accumulation of *trnV(UAC)* in the *sig6-1* mutant suggests that other sigma factors are involved in the initiation of transcription at the *trnV(UAC)* promoter, although the *trnV(UAC)* promoter also exhibits typical σ^{70} -type promoter elements. Transcription of *trnV(UAC)* may be preferentially mediated by AtSIG2 (Hanaoka *et al.*, 2003; Kanamaru *et al.*, 2001; Privat *et al.*, 2003).

In contrast, AtSIG6 did not recognize another unique PEP promoter, *psbD LRP*, whose activity is dependent on an upstream AAG box and transcription activator AGFs. AtSIG5 was recently shown to be responsible for the recognition of *psbD LRP* (Tsunoyama *et al.*, 2004). *In vitro* reconstitution

and transcription analyses would provide further insights on the promoter preferences of AtSIG6.

Chloroplasts likely contain another general sigma factor besides AtSIG6

The inactivation of *AtSIG6* produced no obvious phenotype in older cotyledons and true leaves. These observations suggest that Arabidopsis contains another general sigma factor that functions mainly at a later stage of seedling growth but is absent in young cotyledons. Multiple general sigma factors may support active transcription from highly polyploid plastid DNAs during late plant development. One of the candidates for the late general sigma factors would be AtSIG1. *AtSIG1* transcripts were not detected in 4-day-old seedlings and started to accumulate in 8-day-old seedlings, suggesting that AtSIG1 is mainly active at a later stage of seedling growth. Promoter-GUS assay experiments have shown that *AtSIG1* promoter is activated 1 day after *AtSIG2* promoter activation (Kanamaru *et al.*, 1999). Previous *in vitro* experiments demonstrated that recombinant SIG1 proteins could function with the *E. coli* core enzyme and recognized σ^{70} -type promoters including *psbA* and/or *rbcL* promoters, in mustard (Homann and Link, 2003; Kestermann *et al.*, 1998), Arabidopsis (Hakimi *et al.*, 2000; Privat *et al.*, 2003) and maize (Beardslee *et al.*, 2002). Furthermore, all higher plants examined thus far likely contain at least one *SIG1* gene. These facts suggest that the SIG1 protein may play a crucial role as a general sigma factor in mature chloroplasts.

AtSIG2-knockout plants also exhibited a pale green phenotype (Shirano *et al.*, 2000). As chlorophyll deficiency was observed in both young and mature mutant plants, AtSIG2 is likely indispensable for chloroplast transcription in all stages of plant development. Array-based global analysis of plastid transcript revealed that *AtSIG2* and *AtSIG6*-deficient mutants showed different transcript profiles of entire

chloroplast genome (Nagashima *et al.*, 2004a). AtSIG2 inactivation resulted in the reduced accumulation of several plastid-encoded tRNAs, including *trnV*(UAC), and increased accumulation of NEP-dependent transcripts, but did not affect the transcript levels of most of the PEP-dependent photosynthesis genes (Hanaoka *et al.*, 2003; Kanamaru *et al.*, 2001; Nagashima *et al.*, 2004a). Moreover, the accumulation of *psbA* mRNA was also reduced in developing cotyledons in the AtSIG2 anti-sense mutants (Privat *et al.*, 2003). These data suggested that AtSIG2 preferentially initiates transcription at several tRNA promoters including *trnE*(UUC) promoter, and possibly *psbA* promoter, but less efficiently recognizes other standard PEP promoters. The AtSIG2-dependent promoters are similar to σ^{70} -type promoters and are characterized by a conserved AT-rich pentanucleotide element in the spacer region (Hanaoka *et al.*, 2003). However, we cannot exclude the possibility that AtSIG2 is able to initiate transcription at broad σ^{70} -type promoters, as hybrid proteins of *E. coli* σ^{70} with C-terminal fragments of AtSIG2 containing regions 1.2–4.2 could complement *E. coli* *rpoD* mutants (Hakimi *et al.*, 2000). This fact suggested that AtSIG2 is able to initiate transcription at broad σ^{70} -type promoters in *E. coli*. However, AtSIG2 deficiency did not reduce the accumulation of most of the PEP-dependent photosynthesis genes. This discrepancy might be explained by complementary expression of other sigma factors in the AtSIG2-deficient mutant seedlings. Enhanced accumulation of plastid sigma factor transcripts including AtSIG6 was observed in the AtSIG2 knockout mutant (Nagashima *et al.*, 2004a). Furthermore, the expression of AtSIG3 protein was enhanced in the AtSIG2 anti-sense mutant (Privat *et al.*, 2003). These data suggested that AtSIG2 deficiency might be complemented by an increased accumulation of AtSIG6 and/or other plastid general sigma factors in the AtSIG2-deficient mutants. AtSIG2 knockout plants exhibited a pale green phenotype in all stages of plant development, whereas chlorophyll deficiency was recovered in mature leaves in AtSIG2 anti-sense plants (Privat *et al.*, 2003). It has been proposed that AtSIG2-dependent expression of *trnE*(UUC) may play important roles in biosynthesis of chlorophyll and photosynthesis proteins (Hanaoka *et al.*, 2003; Kanamaru *et al.*, 2001). In AtSIG2 anti-sense plants, AtSIG6 and/or other general sigma factors may backup the expression of *trnE*(UUC) in mature leaves. To characterize the redundant functions of AtSIG6 and AtSIG2 in detail, a crossing between *sig6-1* and *sig2* mutant lines is now under investigation.

On the other hand, we recently demonstrated that AtSIG5 is a unique plastid sigma factor that specifically recognizes a non- σ^{70} -type *psbD* LRP (Tsunoyama *et al.*, 2004). In conclusion, Arabidopsis chloroplasts likely contain several general sigma factors, including AtSIG6, that are responsible for the recognition of σ^{70} -type PEP promoters and at least one specialized sigma factor, AtSIG5, that mediates blue light

(Tsunoyama *et al.*, 2002, 2004) and other stress signaling (Nagashima *et al.*, 2004b) and activates transcription at *psbD* LRP. To specify the promoter preference of each sigma factor *in vivo*, complementation experiments using the *sig6-1* mutant with each plastid σ factor cDNA are now underway.

Multiple sigma factors may be involved in the developmental regulation of PEP

This study suggested that AtSIG6 might be a major general sigma factor during early cotyledon development, whereas other late general sigma factors likely play a role in older cotyledons and mature leaves. In mustard, rifampicin-sensitive B-type PEP is dominant in etioplasts and in immature chloroplasts during greening, whereas rifampicin-resistant A-type enzyme is associated with several accessory proteins and is present in mature chloroplasts (Pfannschmidt and Link, 1994, 1997). Similarly, in wheat seedlings, the light-independent base-type PEP is converted to the tip-type PEP, whose activity is dependent on light during chloroplast development (Sato *et al.*, 1999). The tip-type PEP in mature chloroplasts recognizes an extended -10 promoter of the *psbA* gene, but not the base-type PEP. Taking into account the possible roles of AtSIG6 during early plant development, the AtSIG6 homolog may be a major sigma factor in mustard B-type PEP and/or wheat base-type PEP. The maize AtSIG6 homolog protein ZmSIG3 was expressed preferentially in the leaf base and roots, suggesting a possible role in immature chloroplasts (Lahiri and Allison, 2000). The conserved region 2.5 was involved in the recognition of the extended -10 promoter in σ^{70} (Kumar *et al.*, 1993). Interestingly, AtSIG1 and AtSIG2 contain two highly conserved amino acid residues in region 2.5, Glu-458 and His-455, but AtSIG6 does not. Furthermore, mustard sigma factors SaSIG1 (AtSIG1 homolog) and SaSIG2 (AtSIG2 homolog) were recently shown to have an affinity for the *psbA* extended -10 promoter *in vitro* (Homann and Link, 2003). Whether AtSIG6 is capable of initiating transcription from extended -10 promoters remains to be analyzed.

An unidentified regulatory network may coordinate chloroplast transcription and mRNA processing

In contrast to most PEP-dependent transcripts, NEP-dependent transcripts increased in the *sig6-1* mutant. Furthermore, AtSIG6 inactivation resulted in the accumulation of precursor RNAs for *atpB* and *rnn16*, suggesting an unusual RNA processing activity in this mutant. Similar unusual NEP-dependent mRNA accumulations and RNA processing have been reported in various mutant plants lacking one of the PEP genes (Allison *et al.*, 1996; De Santis-Maclossek *et al.*, 1999; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Krause *et al.*, 2000; Legen *et al.*, 2002) and in a virescent mutant in rice (Kusumi *et al.*, 1997). Chloroplasts probably have a complex

regulatory mechanism that coordinates PEP and NEP transcription activities and RNA processing. Comparison of the chloroplast transcription patterns between the *AtSIG2* and *AtSIG6*-deficient mutants suggested that PEP inactivation is not primarily responsible for the enhanced NEP activity. Further analyses of plastid transcripts and NEP expression in the *sig6-1* seedlings may shed light on the signaling network regulating NEP and PEP activities.

Experimental procedures

Plant materials and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia was used as a control in all experiments described here. The *sig6-1* mutant *Arabidopsis* ecotype Columbia was identified in a collection of T-DNA insertion lines generated by Syngenta. Surface sterilized seeds were sown on 0.5x Murashige and Skoog (MS) medium containing 1% sucrose and placed at 4°C for 2 or 5 days followed by germination under long day conditions (16 h light, 8 h dark) at 22°C. Light intensity was 40–70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ unless otherwise specified. Seedlings were then transferred to Jiffy-7 (Sakata Seed Co., Yokohama, Japan) and grown under the same conditions. For greening experiments, dark-grown 4-day-old seedlings were transferred to 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ white light. For RNA analysis, seedlings were grown synchronously on 0.5x MS plates under the standard condition. To test the effects of various stresses on *AtSIG6* mRNA expression, 3-week-old plants were treated with the following stress conditions. NaCl: plants were transferred to 0.5x MS plates containing 300 mM NaCl and kept on the plates for 5 h; cold temperature: plants were kept at 4°C for 2 days. Plants were also dark adapted for 24 h (dark) and re-illuminated with 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ white light for 3 h (light). Photon fluence rates were measured using a quantum photometer (LI-250; Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA).

Identification of the T-DNA insertion allele of the *AtSIG6* gene

To identify plants containing a T-DNA insertion, PCR was carried out using *AtSIG6*-specific primers *SIG6-P1* (5'-AGCGGATCTTCATTATCAGCCCC-3') and *LB3* (5'-TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC-3'). The insertion site was confirmed by sequencing the amplified fragment. Identified lines were homozygous for the T-DNA insertion. The mutant allele was named *sig6-1*. All experiments described here were performed with T4 generation plants. The copy number of the insertion allele was determined by restriction digestion with *XhoI*, *HindIII* or *EcoRV* followed by DNA gel-blot analysis.

Complementation of the *sig6-1* mutant

The *AtSIG6* full-length cDNA was amplified from *Arabidopsis* cDNA using the primer pair *SF-SalI* (5'-AATGTCGACATGGAAGCTACGAGGAAGTGGTTTCT-3') and *SF-NotI* (5'-AAAGCGCCGCCTAGACAAGCAAATCAGCATAAGCA-3'). The resulting fragment was ligated into the transient expression vector pS65T (Isono *et al.*, 1997) to obtain pS65TSIG6, which is under the transcriptional control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter and has omega sequences for efficient translation. The *SIG6* cassette P35S Ω ::*SIG6*::Tnos was inserted into the *EcoRI*-*HindIII* site of the plant expression vector pBI121, then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain

C-58. The floral-buds of *sig6-1* mutant plants were transformed according to Clough and Bent (1998). The transformants were selected on 0.5x MS 1% sucrose plates containing 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin. Successful complementation was confirmed by chlorophyll accumulation in cotyledons.

Northern blot analysis

Total RNAs were extracted from seedlings of *Arabidopsis* by RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Total RNA samples (10 or 4 μg) were separated by denaturing agarose gel electrophoresis. After capillary blotting onto Hybond-N nylon membrane, RNA gel blots were hybridized to the randomly primed DNA probes encoding *psbA*, *psbD*, *psaA*, *rbcl*, *rrn16*, *atpB*, *rpoA*, *rpoB*, *clpP*, *accD*, *trnQ*(UUG), *trnV*(UAC), and *trnEYD* operons. cDNA fragments [1030–1509 of *AtSIG1* (AB019942), 1048–1719 of *AtSIG2* (AB019943), 1049–1716 of *AtSIG3* (AB019944), 739–1260 of *AtSIG4* (AB021119), 1096–1554 of *AtSIG5* (AB021120), and 1158–1644 of *AtSIG6* (AB029916)] were also used as probes for Northern analyses. Final wash conditions were 0.2x SSC, 0.1% SDS at 65°C for 30 min. Radioactive signals were detected by autoradiography or using BAS 1800 (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Microarray analysis

DNA microarrays were constructed by NAIST array consortium. A total of 257 spots of 500 bp PCR fragments were subcloned into plasmid vectors and DNA microarrays were generated using these plasmid DNAs. Standard PCR was carried out for all clones using universal vector primers (M13 forward/reverse). Purified PCR products were spotted in duplicate onto glass slides. Twenty micrograms of the total cellular RNA were labeled with Cy3 and Cy5 using Cyscribe First-Strand cDNA Labeling Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Hybridization was carried out in Microarray hybridization buffer (Amersham Biosciences) at 65°C for 12 h. After washing microarrays were scanned and analyzed using accompanied software.

Immunoblotting

Total soluble proteins were prepared by homogenization of tissue in a standard extraction buffer. Following a brief centrifugation protein concentration was determined using the Bradford assay. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane (ATTO, Tokyo, Japan). Membranes were blocked with non-fat dried milk and incubated with polyclonal anti-rice *SIG1* antibody (diluted 1:10 000). Signal detection was carried out by ECL-Plus using manufacturer-supplied protocols (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ, USA).

Quantification of chlorophyll content

Whole seedlings (10–20) grown on agar medium were collected in Eppen tubes. Extraction with 1 ml 80% (v/v) acetone–water was carried out after measuring fresh weight. Quantification of chlorophyll content was performed with triplicates.

Transmission electron microscopy

Cotyledons were fixed with 5% glutaraldehyde and post-fixed with 1% osmium tetroxide. The samples were stained with uranyl

acetate, dehydrated, and then embedded in Spurr's resin. Ultrathin sections were observed by transmission electron microscopy.

Confocal microscopy

Chlorophyll imaging was carried out using a confocal laser-scanning microscope (μ Radiance; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Chlorophyll was excited with the 568 nm line. Fluorescence images were collected through red channel.

Acknowledgements

We thank the Torrey Mesa Research Institute (San Diego, CA, USA) and Syngenta for providing the sequence-indexed Arabidopsis T-DNA insertion mutants. We also thank Dr Y. Tozawa for the generous gift of an antibody. We thank Dr Y. Izozumi for providing us the facilities of the Radioisotope Research Center. This work was performed as one of the technology development projects of the 'Green Biotechnology Program' supported by NEDO (New Energy and Industrial Technology Development Organization). This work was also supported by Grants-in-Aids for Scientific Research to T.S. (14540598) and for young scientists to Y.N. (200203019) and the Foundation for Bio-venture Research Center from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology. Y.N. is a Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science.

Supplementary Material

The following material is available from <http://www.blackwellpublishing.com/products/journals/suppmat/TPJ/TPJ2362/TPJ2362sm.htm>

Table S1. Data set of microarray analysis.

References

- Allison, L.A. (2000) The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, **82**, 537–548.
- Allison, L.A., Simon, L.D. and Maliga, P. (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.* **15**, 2802–2809.
- Baumgartner, B.J., Rapp, J.C. and Mullet, J.E. (1993) Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development. *Plant Physiol.* **101**, 781–791.
- Beardslee, T.A., Roy-Chowdhury, S., Jaiswal, P., Buhot, L. and Lerbs-Mache, S. (2002) A nucleus-encoded maize protein with sigma factor activity accumulates in mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* **31**, 199–209.
- Bisanz-Seyer, C., Li, Y.-F., Seyer, P. and Mache, R. (1989) The components of the plastid ribosome are not accumulated synchronously during the early development of spinach plants. *Plant Mol. Biol.* **12**, 201–211.
- Cheng, M.C., Wu, S.P., Chen, L.F.O. and Chen, S.C.G. (1997) Identification and characterization of a spinach chloroplast DNA-binding protein that interacts specifically with the plastid *psaA-psaB-rps14* promoter region. *Planta*, **203**, 373–380.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.
- De Santis-Maclossek, G., Kofer, W., Bock, A., Schoch, S., Maier, R.M., Wanner, G., Rüdiger, W., Koop, H.U. and Herrmann, R.G.

- (1999) Targeted disruption of the RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *Plant J.* **18**, 477–489.
- Eisermann, A., Tiller, K. and Link, G. (1990) In vitro transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard (*Sinapis alba*) indicate differential usage of the *psbA* promoter. *EMBO J.* **9**, 3981–3987.
- Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2000) Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **481**, 47–52.
- Hajdukiewicz, P.T.J., Allison, L.A. and Maliga, P. (1997) Transcription by two distinct RNA polymerases is a general regulatory mechanism of plastid gene expression in higher plants. *EMBO J.* **16**, 4041–4048.
- Hakimi, M.-A., Privat, I., Valay, J.-G. and Lerbs-Mache, S. (2000) Evolutionary conservation of C-terminal domains of primary sigma70-type transcription factors between plants and bacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 9215–9221.
- Hanaoka, M., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2003) Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **31**, 7090–7098.
- Hedtke, B., Börner, T. and Weihe, A. (1997) Mitochondrial and chloroplast phage type RNA polymerases in Arabidopsis. *Science*, **277**, 809–811.
- Hess, W.R. and Börner, T. (1999) Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **190**, 1–59.
- Homann, A. and Link, G. (2003) DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1288–1300.
- Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 499–518.
- Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokota, A. and Kobayashi, H. (1997) Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domain sigma 70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 14948–14953.
- Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K. and Takahashi, H. (1999) Plastidic RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **40**, 832–842.
- Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K. and Takahashi, H. (2001) An Arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1034–1043.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H. et al. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. II Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109–136.
- Kestermann, M., Neukirchen, S., Kloppstech, K. and Link, G. (1998) Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Res.* **26**, 2747–2753.
- Kim, M., Thum, K.E., Morishige, D.T. and Mullet, J.E. (1999) Detailed architecture of the barley chloroplast *psbD-psbC* blue light-responsive promoter. *J. Biol. Chem.* **274**, 4684–4692.
- Kim, J.W., Park, J.K., Kim, B.H., Lee, J.S. and Sim, W.S. (2002) Molecular analysis of the accumulation of the transcripts of the

- large subunit gene of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by light. *Mol. Cells*, **14**, 281–287.
- Krause, K., Maier, R.M., Kofer, W., Krupinska, K. and Hermann, R.G. (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **263**, 1022–1030.
- Kumar, A., Malloch, R.A., Fujita, N., Smillie, D.A., Ishihama, A. and Hayward, R.S. (1993) The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an 'extended minus 10' promoter. *J. Mol. Biol.* **232**, 406–418.
- Kusumi, K., Mizutani, A., Nishimura, M. and Iba, K. (1997) A virus-competent gene *VI* determines the expression timing of plastid genes for transcription/translation apparatus during early leaf development in rice. *Plant J.* **12**, 1241–1250.
- Lahiri, S.D. and Allison, L.A. (2000) Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. *Plant Physiol.* **123**, 883–894.
- Lam, E., Hanley-Bowdoin, L. and Chua, N.H. (1988) Characterization of a chloroplast sequence-specific DNA binding factor. *J. Biol. Chem.* **263**, 8288–8293.
- Legen, L., Kemp, S., Krause, K., Profanter, B., Herrmann, R.G. and Rainer, R.M. (2002) Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *Plant J.* **31**, 171–188.
- Liere, K. and Maliga, P. (2001) Plastid RNA polymerases in higher plants. In *Regulation of Photosynthesis* (Aro, E.-M. and Anderson, B., eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 22–39.
- Link, G. (1996) Green life: control of chloroplast gene transcription. *Bioessays*, **18**, 465–471.
- Liu, B. and Troxler, R.F. (1996) Molecular characterization of a positively photoregulated nuclear gene for a chloroplast RNA polymerase σ factor in *Cyanidium caldarium*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 3313–3318.
- Lonetto, M., Grivskov, M. and Gross, C.A. (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**, 3843–3849.
- Nagashima, A., Hanaoka, M., Motohashi, R., Seki, M., Shinozaki, K., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2004a) DNA microarray analysis of plastid gene expression in an *Arabidopsis* mutant deficient in a plastid transcription factor, SIG2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 694–704.
- Nagashima, A., Hanaoka, M., Shikanai, T., Fujiwara, M., Kanamaru, K., Takahashi, H. and Tanaka, K. (2004b) The multiple-stress responsive plastid sigma factor, SIG5, directs activation of the *psbD* blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 357–368.
- Nakahira, Y., Baba, K., Yoneda, A., Shiina, T. and Toyoshima, Y. (1998) Circadian clock-regulated transcription of the *psbD* light-responsive promoter (*psbD* LRP) in wheat chloroplasts. *Plant Physiol.* **118**, 1079–1088.
- Pfannschmidt, T. and Link, G. (1994) Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol. Biol.* **25**, 69–81.
- Pfannschmidt, T. and Link, G. (1997) The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 35–44.
- Privat, I., Hakimi, M.-A., Buhot, L., Favory, J.-J. and Lerbs-Mache, S. (2003) Characterization of *Arabidopsis* plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol. Biol.* **51**, 385–399.
- Satoh, J., Baba, K., Nakahira, Y., Shiina, T. and Toyoshima, Y. (1999) Developmental stage-specific multi-subunit RNA polymerases (PEP) in wheat. *Plant J.* **18**, 407–415.
- Shiina, T., Allison, L. and Maliga, P. (1998) *rbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell*, **10**, 1713–1722.
- Shirano, Y., Shimada, H., Kanamaru, K. et al. (2000) Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor Sigma B. *FEBS Lett.* **485**, 178–182.
- Sriraman, P., Silhavy, D. and Maliga, P. (1998) Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiol.* **117**, 1495–1499.
- Stern, D.B., Higgs, D.C. and Yang, J. (1997) Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **2**, 308–315.
- Sugiura, M. (1992) The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* **19**, 149–168.
- Suzuki, J.Y., Sriraman, P., Svab, Z. and Maliga, P. (2003) Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell*, **15**, 195–205.
- Tanaka, K., Oikawa, K., Ohta, N., Kuroiwa, T. and Takahashi, H. (1996) Nuclear encoding of a chloroplast RNA polymerase sigma subunit in a red alga. *Science*, **272**, 1932–1935.
- Tanaka, K., Tozawa, Y., Mochizuki, N., Shinozaki, K., Nagatani, A., Wakasa, K. and Takahashi, H. (1997) Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett.* **413**, 309–313.
- Thum, K.E., Kim, M., Morishige, D.T., Eibl, C., Koop, H.-U. and Mullet, J.E. (2001) Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **47**, 353–366.
- To, K., Cheng, M., Suen, D., Mon, D., Chen, L.O. and Chen, S.G. (1996) Characterization of the light-responsive promoter of rice chloroplast *psbD-C* operon and the sequence-specific DNA binding factor. *Plant Cell Physiol.* **37**, 660–666.
- Tsunoyama, Y., Morikawa, K., Shiina, T. and Toyoshima, Y. (2002) Blue light specific and differential expression of a plastid σ factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **25958**, 1–4.
- Tsunoyama, Y., Ishizaki, Y., Morikawa, K., Kobori, M., Nakahira, Y., Takeba, G., Toyoshima, Y. and Shiina, T. (2004) Blue light-induced transcription of plastid-encoded *psbD* gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 3304–3309.
- Wösten, M.M.S.M. (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 127–150.

Plastid Transcription in Higher Plants

Yoshinori Toyoshima and Yayoi Onda

Nano-biotechnology Research Center and Department of Biosciences, School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, 2-1, Gakuen, Sanda, Hyogo 669-1331, Japan

Takashi Shiina and Yoichi Nakahira

Faculty of Human Environment, Kyoto Prefectural University, Shimogamo-nakaragi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8522, Japan

Referee: Professor Henry Daniell, Department of Molecular Biology and Microbiology, University of Central Florida, Orlando, FL 32816, USA

The plastid genome is transcribed by nucleus-encoded (NEP) and plastid encoded (PEP) RNA polymerases. NEP transcribes housekeeping genes as well as genes coding for PEP core subunits and its activity is replaced by PEP in chloroplasts resulting in differential expression of genes in a developmental context. PEP is a prokaryotic-type enzyme in which nuclear-encoded σ factors function as promoter recognition subunit. A phylogenetic analysis for σ factors identified so far in plants shows that plant σ factors are members of bacterial σ^{70} family and divided into six groups, Sig1 through Sig6, which are integrated into four clusters consisting of Sig1 and Sig4, Sig2 and Sig3, Sig5 and Sig6. All plastid σ factors recognize bacterial σ^{70} -type promoters, but they differ in promoter preference and the tissue-, developmental stage- and environmental-dependent expression. Sig5 is distinct from the other σ factors in its structure, function, and expression in response to light and stress. A promoter of the *psbD* operon, *psbD* blue light responsive promoter (*psbDBLRP*) is a typical example that is under the control of a combination of various signals arising in the nucleus and plastids in response to the tissue specific and developmental stage- and environment-dependent cues. *psbDBLRP* is recognized only by Sig5, which is expressed by a cryptochrome-mediated blue light signal and signals responding to stress conditions. The activity of *psbDBLRP* is also under the control of circadian clock. Furthermore, it may be regulated by redox signals generated by photosynthetic electron transport in the chloroplast presumably through the change of the binding affinity of a nuclear encoded transcription factor for the enhancer element located upstream of the core promoter region of the *psbD* operon.

Keywords plastid-encoded-plastid RNA polymerase, nuclear-encoded-plastid RNA polymerase, sigma factors, plastid transcription factors, redox signal, circadian control

Address correspondence to Yoshinori Toyoshima, Nano-biotechnology Research Center and Department of Bioscience, School of Science and Technology, Kwansai Gakuin University, 2-1, Gakuen, Sanda, Hyogo 669-1331, Japan. E-mail: ytoyoshima@ksc.kwansei.ac.jp

I. INTRODUCTION

The chloroplast genome in plants has ca. 40 photosynthesis-related genes and ca. 60 housekeeping genes essential for protein synthesis (Palmer, 1991; Sugiura, 1992). Since most plastid-localized protein complexes consist of not only plastid-encoded subunit proteins but also nuclear-encoded proteins their expression must be regulated coordinately between plastid and nuclear genetic systems. Consistent with the need for intercompartmental cross-talk, expression of plastid-encoded genes is regulated by a number of nuclear-encoded proteins targeted to the plastid. Furthermore there is increasing evidence that information also flows in the opposite direction, from plastid to nucleus (Jarvis, 2001; Rodermel, 2001) and a few different signals have been identified that originate in the plastid and control the nuclear gene expression (Strand *et al.*, 2003; Surpin *et al.*, 2002; Pfannschmidt, 2003). Transcription initiation is one of the major control points of gene expression in most organisms. For a long time, however, it was considered that transcription plays only a limited role in the regulation of plastid gene expression, since the earlier studies on the plastid gene expression in higher plants had demonstrated that etioplasts contain already an almost full complement of mRNAs of the plastid genes (Deng and Gruissem, 1987; Klein and Mullet, 1987; Westhoff and Herrmann, 1988) and for many genes only minor changes in the transcription activity are detectable between dark-adapted and light-illuminated seedlings in run-on transcription experiments (Deng and Gruissem, 1987). Conversely, post-transcriptional regulation has been known to play important roles in controlling the plastid gene expression in various plants. Recently, however, evidence showing the importance of regulation at transcription level for plastid gene expression has increased and various studies on developmental regulation, light induction, stress induction, circadian control and tissue- and cell type-specific induction of plastid gene transcription has been conducted in various plants (reviewed by

Allison, 2000). Presently elucidation of molecular events supporting the plastid transcription responding to various signals has been one of the principal focuses of plastid gene expression research.

Transcription in higher plant plastids is directed by at least two types of RNA polymerases that are distinguished by the location of the genes for their catalytic cores: one of which is plastid-encoded (plastid-encoded plastid RNA polymerase, or PEP) and the other is nuclear-encoded (nuclear-encoded plastid RNA polymerase, or NEP). Differential expression and usage of NEP and PEP (NEP to PEP cascade) are primarily involved in the regulation of plastid transcription in the early stage of plant development (section II). Although the genes of PEP core enzyme are encoded in plastid DNA, multiple genes of σ subunits of PEP, which are crucial for recognition of eubacterial-type promoters by the PEP, are present on the nuclear DNA. Each of multiple σ factors is differently expressed under the control of the nuclear genome in response to developmental and environmental cues, and plays a role to transcribe a different set of plastid genes presumably by recognizing a slight difference in promoter sequence of each gene or operon (section III). The genes of every plastid trans-acting-factors identified so far are also encoded in the nuclear DNA rather than the plastid DNA (section IV). Thus all transcription regulators involving σ subunits of PEP and transacting factors as well as NEP are encoded in nuclear DNA and their expression is under nucleus control. Consequently plant plastids have lost their autonomy for the transcription of their own genes. Plastid transcription, however, is also regulated by signals originating in the plastid through modifications, such as phosphorylation/dphosphorylation, of the transcription regulators and/or the catalytic core of RNA polymerases. Redox signals generated by photosynthetic electron transport, but not via specific photoreceptors are most important for this type of regulation (section V). It is likely that the regulation of transcription regulators at the level of gene expression in the nuclear (cytoplasm) and modification of the resulting proteins in the plastid triggered by redox signals cooperatively control the plastid gene transcription. A typical example is observed in the *psbD* blue light responsive promoter which is a promoter of the *psbD* operon and is activated by the cooperation of two distinct light signals, one acting in the nucleus and the other in the chloroplast. It is worthwhile to note the possible existence of more complex signal transduction pathways in which redox signals originating in the plastid control the expression of plastid transcription regulators including σ factors and transacting factors. In addition to the developmental and environmental signals, a circadian-clock controls the transcription of photosynthesis-related genes encoded in both nuclear and plastid DNAs (section VI). In the circadian control of plastid-gene transcription, circadian expression of σ factors plays a crucial role. Thus, transcription of plastid genes is under the control of the dynamic regulation in response to a multitude of signals through complex signaling networks composed of various components located in the nucleus and cytoplasm as well as in

plastids. Extensive work has already determined some proteins that act as signal-mediating molecules and models have been proposed for the action of the proteins in a given step of signal transduction network regulating the plastid transcription. Recent developments have been reviewed by Stern *et al.* (1997), Maliga (1998), Hess and Börner (1999), Allison (2000), Liere and Maliga (2001), Link (2001), and Pfannschmidt (2003). This review will summarize more recent progress in the plastid transcription of higher plants and particular attention is paid to the recent works on roles of σ factors, including structural aspects of their promoter preferences and their expression in response to developmental and environmental signals.

II. TWO TYPES OF RNA POLYMERASES RESPONSIBLE FOR THE TRANSCRIPTION IN HIGHER PLANT PLASTIDS

Plastids evolved from ancestral cyanobacteria that probably contained about 4,000 genes. During evolution of plastids, endosymbionts lost most of their genes or the genes were relocated to the nuclear-genome. In higher plants, plastid genome retains a small number of genes (100 to 120 genes in higher plants) that are mainly implicated in photosynthesis and gene expression. The striking characteristic of the plastid transcription system is the presence of two types of RNA polymerases, plastid-encoded and nuclear-encoded RNA polymerases called PEP and NEP (Figure 1), respectively, although in most eubacterial cells only one type of RNA polymerase is functioning.

Plastids retain eubacterial multisubunit RNA polymerase (PEP) that originated from the endosymbionts. PEP is present in all types of plastids including chloroplasts in higher plants and primitive red algae, non-photosynthetic plastids in parasitic plants and plastid-like organelle in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* (Wilson *et al.*, 1998), suggesting that PEP plays an essential role in plastid transcription. The subunit composition of PEP in plastid is basically identical with that in eubacteria. The core subunits (α , β , β' and β'') are encoded in the plastid *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* and *rpoC2* genes, respectively (Hu and Bogorad, 1990). Like cyanobacteria, β' subunit of PEP is divided into two parts corresponding to the N-terminal domain (β^1) and C-terminal domain (β^2) that are encoded by *rpoC1* and *rpoC2*, respectively. The plastid *rpo*, *rpoC1* and *rpoC2* genes are encoded in one operon (*rpoB* operon), whereas *rpoA* is a part of the ribosomal protein operon. Such organization of plastid *rpo* genes is consistent with those in cyanobacteria (Kaneko *et al.*, 1996a, 1996b), suggesting that plastids and cyanobacteria share a common ancestor. On the other hand, the plastid genome does not contain genes corresponding to σ factors that are responsible for the promoter-specific binding and transcription specificity in eubacterial RNA polymerases. Plastid σ factors are encoded in the nuclear genome, expressed in the cytosol and transported into plastids. This organization of PEP subunit led to the attractive concept that nuclear-encoded σ factors participate in the nuclear control of plastid transcription (see section III).

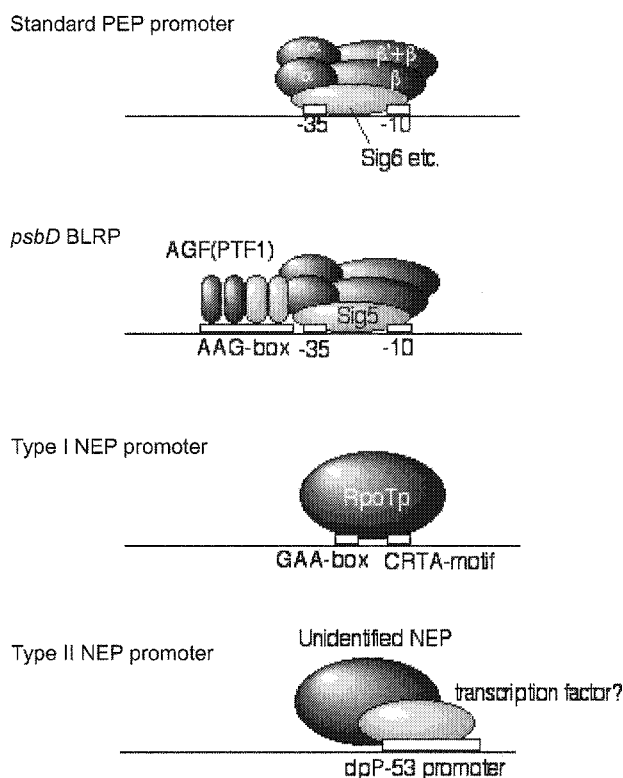


FIG. 1. Schematic models of plastid transcription complexes. Transcription initiation sites are indicated by horizontal arrows. Promoter cis elements are boxed. Standard PEP promoters are reminiscent of bacterial σ^{70} -type promoters comprising of -35 and -10 core promoter elements. General sigma factors, such as SIG6 recruit the PEP holoenzyme ($\alpha_2\beta\beta'\beta''\omega$) to the standard PEP promoters and initiate transcription. On the other hand, the AAG-box, a conserved sequence directly upstream of the putative -35 element, is responsible for enhanced transcription from the *psbD*BLRP. The AAG-box is recognized by sequence specific DNA binding proteins named AGF that interact with the AAG-box in a light-independent manner. One of the AGF is a helix-loop-helix type DNA binding protein, PTF1 that specifically binds to an ACC repeat in the AAG-box. The -35 element of the *psbD*BLRP is a pseudo element and the *psbD*BLRP activity is dependent on the AAG-box and -10 element. This unique factor-dependent promoter is specifically recognized by specialized sigma factor, SIG5. Blue light-dependent and stress-induced transcription from the *psbD*BLRP is likely mediated by SIG5.

NEP is similar to single subunit T3/T7 phage RNA polymerases. Standard NEP promoters, Type Ia are composed of ~ 15 -bp sequences containing YRTA motif just upstream of the transcription initiation site. A subtype promoter of type Ia (type Ib NEP promoter) is dependent on an additional GAA-box upstream of the YRTA motif for transcription initiation. It is not clear whether NEP requires additional transcription initiation factors. On the other hand, type II NEP promoter locates downstream of the transcription initiation site ($+5 \sim +25$). It is presumed that unidentified transcription factor(s) may assist the transcription initiation by NEP at the type II promoter.

It remains unknown why *rpo* genes for PEP core subunits were retained in most plastid genomes during plastid evolution, whereas σ factor genes were transferred to the nucleus. It is unlikely that core subunits of PEP is necessary to be synthesized in plastids to form a proper protein folding, because the

rpoA gene is absent in the plastid genome of several mosses and immigrated into nucleus (Sugiura *et al.*, 2003). In contrast, neither *Arabidopsis* nor tobacco nuclear genomes contain any functional copy of plastid-encoded *rpo* genes (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Serino and Maliga, 1998).

E. coli σ^{70} -type promoters, consisting of -35 and -10 consensus elements are present upstream of many plastid-encoded genes and these promoter elements are essential for initiation of transcription (reviewed by Igloi and Kossel, 1992; Hess and Börner, 1999; Liere and Maliga, 2001). These promoters are probably recognized by PEP (see section III). Conversely, several plastid genes are not preceded by σ^{70} -type promoters. Furthermore, transcription of gene subsets is detected in some plants that lack functional PEP, such as the non-photosynthetic parasitic plant *Epiphagus* (Morden *et al.*, 1991), the plastid ribosome deficient mutant of barley (Hess *et al.*, 1993), the iojap mutant of maize (Han *et al.*, 1992) and the plants treated with PEP-specific inhibitors (Kapoor *et al.*, 1997). Deletion of the *rpoA* gene by directed plastid transformation could not silence the plastid transcription (Allison *et al.*, 1996). These facts suggest the existence of a second type of plastid RNA polymerase presumably encoded in the nuclear genome (NEP).

Genome analysis of *Arabidopsis* suggested that the nuclear genome did not encode another PEP-like plastid RNA polymerase (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Furthermore, NEP is insensitive to tagetin and rifampicin that are potent inhibitors of bacterial RNA polymerase (Kapoor *et al.*, 1997; Liere and Maliga, 1999; Bligny *et al.*, 2000). Knock-out of *rpo* genes encoding PEP core subunits resulted in a severe decrease in photosynthesis gene transcripts, but the accumulation of transcripts at a high level (Allison *et al.*, 1996). Based on these findings, plastid genes have been classified into three subgroups (Hajdukiewicz *et al.*, 1997), PEP-dependent photosynthesis genes (class I genes), a few NEP-dependent genes including *rpoB* operon and *accD* (class III genes) and other non-photosynthesis genes that are transcribed by both RNA polymerases (class II genes). Most class I genes are preceded by σ^{70} -type promoters (PEP promoters), suggesting that PEP is responsible for transcription of class I genes. Whereas precise mapping of the 5'-ends of class II and III gene transcripts revealed that the promoter sequences just upstream of the transcription initiation sites are well conserved along with mitochondrial and T3/T7 phage type promoters (NEP promoters) (Allison *et al.*, 1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997). Both PEP and NEP promoters are mapped in a sequence upstream of the class II genes. It was predicted from these findings that NEP is a phage-type RNA polymerase. In fact, a single-subunit 110-kD RNA polymerase has been identified as a candidate for NEP in spinach (Lerbs-Mache, 1993). This RNA polymerase can initiate transcription from the T7 promoter in vitro, but not from the *rbcl* promoter that is a typical σ^{70} -type PEP promoter. In 1997, two phage-type RNA polymerase genes were cloned in *Chenopodium album* (Weihe *et al.*, 1997) and *Arabidopsis* (Hedtke *et al.*, 1997). The third phage-type RNA polymerase was also cloned in *Arabidopsis*

(Hedtke *et al.*, 2000). Subsequently, multiple phage type RNA polymerase genes have been identified in various plants, including tobacco (Kobayashi *et al.*, 2001; Hedtke *et al.*, 2002), maize (Chang *et al.*, 1999) and *Physcomitrella patens* (Richter *et al.*, 2002; Kabeya *et al.*, 2002).

In *Arabidopsis*, phage-type RNA polymerase genes were designated *RpoT;1*, *RpoT;2* and *RpoT;3*, and their sub-cellular localization has been characterized. *RpoT;1* is shown to be imported into mitochondria and represents a mitochondrial RNA polymerase (*RpoTm*), whereas *RpoT;3* exclusively targets chloroplasts (Hedtke *et al.*, 1997) and supposedly acts as a nuclear-encoded plastid RNA polymerase (*RpoTp*). However, linkage of *RpoTp* (*RpoT;3*) and NEP is not evident. Recently, it was demonstrated that overexpression of *RpoTp* in tobacco resulted in enhanced transcription at the NEP promoters, providing direct evidence that *RpoTp* is a catalytic subunit of NEP (Liere *et al.*, 2004). Interestingly, the third phage-type RNA polymerase (*RpoT;2*) that targets both chloroplasts and mitochondria has been identified in *Arabidopsis* (Hedtke *et al.*, 2000) and tobacco (Kobayashi *et al.*, 2001). The mutation in *RpoT;2* affected the light-induced transcription of several chloroplast genes and resulted in a retardation of chloroplast development, suggesting that *RpoT;2* plays an important role in plastid gene expression at early phase of plant development (Baba *et al.*, 2004). Promoter sharing between *RpoTp* and *RpoT;2* remains to be investigated.

In higher plants, photosynthetically competent chloroplasts differentiate from immature proplastids in meristem cells during leaf development. Photosynthesis genes are actively transcribed in chloroplasts but not in proplastids or amyloplasts. Transcription activity of NEP-dependent housekeeping genes is high early in chloroplast development prior to that of photosynthesis genes (Baumgartner *et al.*, 1993). NEP may be primarily responsible for transcription of some structural genes and genes for apparatus of gene expression including PEP core subunits in non-green tissues, but is largely replaced by PEP in chloroplasts to build apparatus for photosynthesis. This NEP cascade model well explains the developmentally timed expression of plastid-encoded genes (Hajdukiewicz *et al.*, 1997).

NEP has been assumed to evolve by a gene duplication of mitochondrial RNA polymerase. Unlike higher plants, however, PEP is fully responsible for transcription in *Chlamydomonas* chloroplasts, which lack NEP (Lilly *et al.*, 2002). NEP may have evolved to function in proplastids and amyloplasts in non-photosynthetic tissues of higher plants. A moss *Physcomitrella patens* also encodes two phage-type RNA polymerases that target mitochondria and chloroplasts (Richter *et al.*, 2002). However, consensus NEP promoters in plants (see below) are not conserved in the moss plastid genome (Kabeya *et al.*, 2002). It is under debate whether moss plastids contain a phage-type NEP.

NEP promoters have been mapped in front of *rpoB* operon, *rps15*, *rpl16*, *rrn16*, *atpB* operon, *atp1* and several tRNA genes. Sequence alignment revealed that most NEP promoters share a 10 nucleotide consensus overlapping the transcription ini-

tiation site (Allison *et al.*, 1996; Hajdukiewicz *et al.*, 1997; Hübschmann and Börner, 1998). These consensus type NEP promoters are reminiscent of mitochondrial and T3/T7 phage promoters and are distinct from σ^{70} -type PEP promoters. Systematic dissection of the *rpoB* promoter demonstrated that the consensus-type NEP promoter consists of a 15-nucleotide sequence (-14 ~ +1) just upstream of the transcription initiation site (Liere and Maliga, 1999). This segment contains the CRT motif that is essential for promoter function. This promoter core motif is conserved in most of the consensus-type NEP promoters and also mitochondria promoters (reviewed by Liere and Maliga, 2001).

On the other hand, non-consensus-type NEP promoters are present upstream of *clpP* in tobacco (Sriraman *et al.*, 1998a), rRNA operon in spinach (Iratni *et al.*, 1997) and *atpB* in tobacco (Xie and Allison, 2002). Unlike consensus-type NEP promoters, the *clpP-53* promoter is strongly expressed in mature chloroplasts. Its activity requires downstream a sequence (-5 to +25) that is conserved in liverworts and higher plants (Sriraman *et al.*, 1998a). Transcription of some tRNA is also dependent on the internal promoter regions. The spinach tRNA genes *trnR1*, *trnS1*, *trnS* and *trnQ* (Gruissem *et al.*, 1986; Neuhaus, 1989; Neuhaus *et al.*, 1990) and mustard *trnH* (Nickelsen and Link, 1990) contain internal sequence elements. The internal sequence of the spinach *trnS* gene (Wu *et al.*, 1997) resembles blocks A and B of RNAP III-transcribed nuclear tRNA genes (Galli *et al.*, 1981), suggesting that RNAP III-like enzyme functions in plastids for the transcription of some plastid tRNA genes with non-consensus-type NEP promoters. Multiple promoters have been mapped upstream of rRNA operon (*Prrn*) in plastids. In addition to a σ^{70} -type PEP promoter (P1) conserved in *Prrn* of maize, pea, and tobacco, *Prrn* in tobacco has a second promoter (P2) recognized by NEP which is inactive in mature chloroplasts and functions in BY2 tissue culture cell (Vera and Sugiura, 1995). In spinach and *Arabidopsis*, a non-consensus-type NEP promoter, *Pc* promoter overlaps between the -10 and -35 hexamers of P1 (Iratni *et al.*, 1997). *Pc* promoter sequences are different from both PEP and consensus-type NEP promoter sequences. Thus, a second NEP activity or transcription activation factors may be involved in the initiation of transcription at these non-consensus promoters.

III. SIGMA FACTORS OF PEP IN HIGHER PLANTS

A. Current Entries of Plastid Sigma Factors

As mentioned in section II, PEP has a subunit composition almost identical to that of eubacterial RNA polymerase (RNAP) composed of a core enzyme (α_2 , β , β' , ω) and a σ factor (Igloi and Kossel, 1992). In eubacteria, promoter-specific transcription initiation is conferred by contact of conserved amino acids in the sequences of exchangeable σ factors with two specific hexamers of a consensus DNA sequence, the Pribnow box (-10 element), centered at about -10 with respect to the start site (+1), and the -35 element (reviewed in Gross *et al.*, 1998). Several

different σ factors are usually encoded in a bacterial genome and each of them recognizes a unique set of promoters. Eubacterial σ factors are grouped into two families, the σ^{70} and σ^{54} families on the basis of structural and functional similarities (Wösten, 1998). The σ^{70} family is further classified into three groups (Lonetto *et al.*, 1992). Group 1 σ factors consist of principal σ factors that are responsible for transcription of housekeeping genes during exponential growth phase and essential for cell viability. Members of group 2 have a structure similar to the members of group 1, but are not essential for cell viability. Group 3 includes alternative types, structurally different from groups 1 and 2 that are involved in the transcription of specific regulons expressed under stress conditions.

Gene families with sequence similarity to the gene encoding *E. coli* σ^{70} were identified in photosynthetic bacteria (Brahamasha and Haselkorn, 1991; Brahamasha and Haselkorn, 1992; Tanaka *et al.*, 1992; Kaneko *et al.*, 1996a; Kaneko *et al.*, 1996b). The photosynthetic bacteria, cyanobacteria that perform oxygenic photosynthesis are thought to be the ancestor of chloroplasts. The chromosome in the cyanobacterium *Synechosystis* sp. strain PCC6803 contains nine σ factor homolog genes, all of which belong to the σ^{70} family rather than σ^{54} family (Kaneko *et al.*, 1996a).

The catalytic core of PEP enzyme in plants also assembles with one of proteins identified as functional equivalent of a bacterial σ factor. In early studies searching for PEP promoter recognition subunits, three proteins that interact with *E. coli* core RNA polymerase to generate a holoenzyme with binding specificity for PEP promoters were purified from chloroplasts and etioplasts of mustard and named sigma-like factors, SLF67, SLF52, and SLF29, with indication of their molecular weights (Tiller *et al.*, 1991; Tiller and Link, 1993a). SLFs were detected immunologically in chloroplast RNA preparations of maize, rice, *Chlamydomonas* and *Cyanidium* (Troxler *et al.*, 1994). Considering the endosymbiotic origin of plastids, one might expect to find open reading frames with sequence similarity to the cyanobacterial σ encoding genes on plastid DNA. However, extensive sequence analysis of several plastid genomes failed to reveal the plastid homologs of the cyanobacterial σ encoding genes, suggesting that the plastid σ factors might be nuclear-encoded (reviewed in Igloi and Kossel, 1992). Direct evidence for this was obtained by the cloning of cDNA sequences of sigma-like factors from a red alga, *Cyanisium caldarium* (Liu and Troxler, 1996; Tanaka *et al.*, 1996; Oikawa *et al.*, 1998) and by confirming that the gene products function as σ factors when combined with the core enzyme of *E. coli* RNA polymerase (Tanaka *et al.*, 1996; Oikawa *et al.*, 1998). Plastid σ factor genes in higher plants were first identified from *Arabidopsis* by screening of EST databases to search for coding regions with sequence similarity to the rpoD box peptide in nuclear genomes (Tanaka *et al.*, 1997; Isono *et al.*, 1997) and six different σ factors have been reported in *Arabidopsis* (Tanaka *et al.*, 1997; Isono *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 2000). A number of analogous factors have been screened in various plants (reviewed by Allison, 2000).

Phylogenetic tree (Figure 2) was constructed by analyzing the predicted protein sequences of σ factors identified in plants together with those in cyanobacteria *Synechococcus* PCC7942, red algae *Cyanidium caldarium* and unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D (Matsuzaki *et al.*, 2004) and two typical σ factors in *E. coli*. Plant σ factors are clearly divided into four clusters, labeled I, II, III and IV. Cluster I is subdivided into Sig1 and Sig4 groups. All plant species examined contained at least one *Sig1* gene. There were two homologs for *Sig1* in maize (AF058708, AF058709) and two in tobacco (AB023571, AB023572). Transcripts for *Arabidopsis Sig1* (*AtSig1*) are among the most abundant of the six *Arabidopsis* σ factors, whereas those of *Sig4* are less abundant in *Arabidopsis* (Kanamaru *et al.*, 1999; Tsunoyana *et al.*, 2004). Cluster II is subdivided into Sig2 and Sig3 groups. *Sig2* gene has been identified in many plants. There were two homologs for *Sig2* in maize (AF099110, AF099111) and rice (AB095094, AB095095). In *Arabidopsis* leaves under light conditions, its transcripts were more abundant than those of *Sig3* (Tsunoyana *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2004). *Arabidopsis* mutant with a T-DNA insertion in the second exon coding region of *Sig2* were isolated from a pool of T-DNA insertion lines (Shirano *et al.*, 2000; Kanamaru *et al.*, 2001). In the *Sig2* mutant, normal etioplasts were developed under dark conditions but the small chloroplasts with poor thylakoid membranes and unstacked lamellar were developed under light conditions, suggesting that the *Sig2* gene is essential for normal photomorphogenesis of chloroplasts (see below for details). *Sig2* anti-sense *Arabidopsis* plants had a phenotype somewhat different from that of the *Sig2* knock-out plants in that the chlorophyll deficiency was limited to cotyledons (Privat *et al.*, 2003). Efficient recovery of the wild-type phenotype in later developmental stages may be supported by partial take-over of *Sig2* function by one of the other six σ factors, presumably Sig3. *AtSig6* homologs detected in various angiosperms including maize and rice are grouped in a cluster (Cluster III in Figure 2).

Recently an *Arabidopsis* plant with a T-DNA generated mutation in the *Sig6* gene was isolated (Ishizaki, Tsunoyama, Hatano, Kobori, Takeba, Nakahira and Shiina, unpublished). In dark-grown conditions, the mutant plant showed a normal etioplast phenotype. When grown in the light, the cotyledons of the mutant in an early developing stage (three to four days old) contained smaller plastids than the wild-type with poorly developed thylakoid membranes that were not stacked up and markedly reduced chlorophyll content. However, these peculiar phenotypes under light conditions disappeared during seedling growth. Eight-day-old mutant plants contained almost normal chloroplasts that were not different from those in wild type plants. This finding suggests that *AtSig6* functions in the light dependent chloroplast development in cotyledons at an early growth stage in *Arabidopsis*. Multiple cDNA clones show close similarity to *AtSig5* sequences in various higher plants including tomato, clover, barley, and rice. Phylogenetic analyses revealed that *AtSig5* homologs form their own branch, which is far from

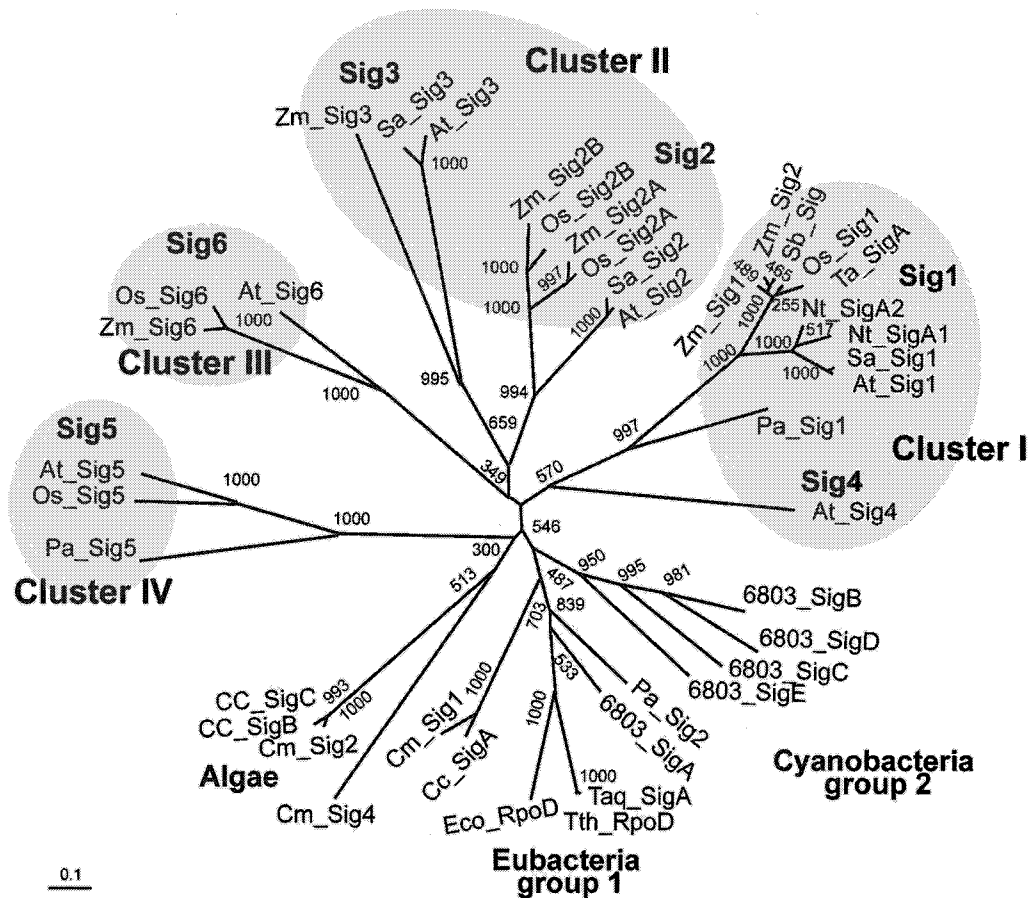


FIG. 2. Phylogenetic analysis of σ factors from eubacteria and plants. The tree was constructed from the conserved amino acid sequences of region 2.1 to C-terminus, using the CLUSTAL-W (version 1.8). Numbers at nodes indicate bootstrap values from 1000 bootstrap resamplings. The scale bar represents 0.1 substitutions per amino acid position. Full names of species and their accession numbers are as follows: At, *Arabidopsis thaliana* (At.Sig1, AB019942; At.Sig2, AB019943; At.Sig3, AB019944; At.Sig4, AB021119; At.Sig5, AB021120; At.Sig6, AB029916); Sa, *Sinapis alba* (Sa.Sig1, Y15899; Sa.Sig2, AJ276656; Sa.Sig3, AJ276657); Nt, *Nicotiana tabacum* (Nt.SigA1, AB023571; Nt.SigA2, AB023572); Os, *Oryza sativa* (Os.Sig1, AB005290; Os.Sig2A, AB095094; Os.Sig2B, AB095095; Os.Sig5, AB096071; Os.Sig6, AB096012); Zm, *Zea mays* (Zm.Sig1, AF058708; Zm.Sig2, AF058709; Zm.Sig2A, AF099110; Zm.Sig2B, AF099111; Zm.Sig3, AY091464; Zm.Sig6, AF099112); Sb, *Sorghum bicolor* (Sb.Sig, Y14276); Ta, *Triticum aestivum* (Ta.SigA, AJ132658); Cc, *Cyanidium caldarium* (Cc.SigA, D83179; Cc.SigB, AB006798; Cc.SigC, AB006799); Cm, *Cyanidioschyzon merolae* (Cm.Sig1, AP006493; Cm.Sig2, AP006499; Cm.Sig4, AP006495); Pa, *Physcomitrella patens* (Pa.Sig1, Pa.Sig2, and Pa.Sig5, Aoki *et al.*, Nagoya univ., unpublished data); 6803, *Synechocystis* sp. PCC 6803 (6803.SigA, D90916; 6803.SigB, D63999; 6803.SigC, D64002; 6803.SigD, D90908; 6803.SigE, D90908; 6803.SigF, D90916); Eco, *Escherichia coli* K12 W3110, (Eco.RpoD, AB024709); Tth, *Thermus thermophilus* HB27 (Tth.RpoD, AB017014); Taq, *Thermus aquaticus* (Taq.SigA, AF291720).

all other groups (Cluster IV in Figure 2) and intron sites of AtSig5 are distinct among plastid σ factor genes in *Arabidopsis* (Fujiwara *et al.*, 2000). One of the first isolated AtSig5 mutants with T-DNA insertion at exon 2 (designated as sig5-2 in original paper) was reported to exhibit an embryonic lethal phenotype, indicating that AtSig5 is an essential σ factor that plays a role in plant reproduction (Yao *et al.*, 2003). However, homozygous sig5-2 plants with complete disruption of Sig5 isolated by other groups had no visible phenotype under normal growth conditions, but were more sensitive to various stresses than wild type plants (Nagashima *et al.*, 2004). Sig5 has been shown to directly control a unique plastid promoter known as the psbD blue light responsive promoter (psbDBLRP) (Tsunoyana *et al.*, 2004; Nagashima *et al.*, 2004). This is a subject of subsection B.

B. The Roles of σ Factors in Regulation of Plastid Gene Transcription

1. Differential Promoter Preference of σ Factors

One of the current subjects of plastid σ factor research is the role of the structurally similar multiple σ factors in the regulation of plastid gene transcription. In general, the bacterial genome encodes multiple structurally diverse σ factors and the heterogeneity of σ factors is responsible for transcriptional activation of different sets of genes in response to environmental cues (Ishihama, 2000). In analogy with bacteria, it has been presumed that despite the similarity in structure, each plastid σ factor may recognize a specific set of promoters. Replacement of the σ factor in holoenzyme may be the major mechanism for switching the transcription pattern of plastids in response

to developmental and environmental signals (Liu and Troxler, 1996; Tan and Troxler, 1999). Direct evidence showing differential usage of σ factors to be involved in regulation of plastid transcription were recently provided by analyzing transcription behavior of plastid genes in T-DNA insertional mutants of *Arabidopsis* with reduced expression of Sig2 or Sig5. An *Arabidopsis* recessive pale-green mutant in which T-DNA is inserted in Sig2, had an insufficient amount of photosynthesis-related proteins as well as chlorophyll, but had a normal amount of mRNAs for their structural genes. This mutant, however, had a severely reduced level of transcripts of *trnE-UUC*, *trnV-UAC* and *trnM-CAU* but more transcripts of other genes including *trnG-GCC*, *trnW-CCA*, *rpoC1*, and *rrn16* than the wild-type, suggesting that Sig2 preferentially recognizes promoters for a set of transfer RNA genes, although well conserved -35-like and -10-like sequences were present upstream of all these genes (Kanamaru *et al.*, 2001; Hanaoka *et al.*, 2003). On the other hand, an *Arabidopsis* mutant with a T-DNA insertion 22 bp upstream of the Sig5 stop codon resulted in reduced Sig5 expression and in selective loss of primary transcripts from the *psbD* blue light responsive promoter (*psbDBLRP*) (Tsunoyana *et al.*, 2004). The

Arabidopsis sig5-2 mutant in which the T-DNA insertion is located in the amino terminal side of the conserved region 1.2, also lacked the transcription initiation activity of *psbD* BLRP (Nagashima *et al.*, 2004). Besides the reverse genetic approach, the data obtained by transient overexpression of σ factors in protoplasts from *Arabidopsis* leaves indicate overlapping and distinct roles of σ factors in plastid gene expression. Sig5 overproduction in dark-adapted protoplasts strongly enhanced the activities of *psbDBLRP* and the *psbA* promoter, but not so much for other promoters, whereas overproduction of Sig2 enhanced the transcription of the *psbA* gene and *trnE* operon, but not that of the *psbD* gene in agreement with the results obtained by reverse genetics (Figure 3) (Tsunoyana *et al.*, 2004; Tsunoyama, Shiina and Toyoshima, unpublished). DNA binding characteristics of three σ factors, Sig1, Sig2 and Sig3 from mustard to core promoter of several plastid genes in the presence of *E. coli* core RANP were assessed by competition electrophoretic mobility shift assay (Tiller *et al.*, 1991; Tiller and Link, 1993a; Kestermann *et al.*, 1998; Homann and Link, 2003). These assays also provided evidence for promoter selectivity by three mustard σ factors, each of which preferentially bound to the

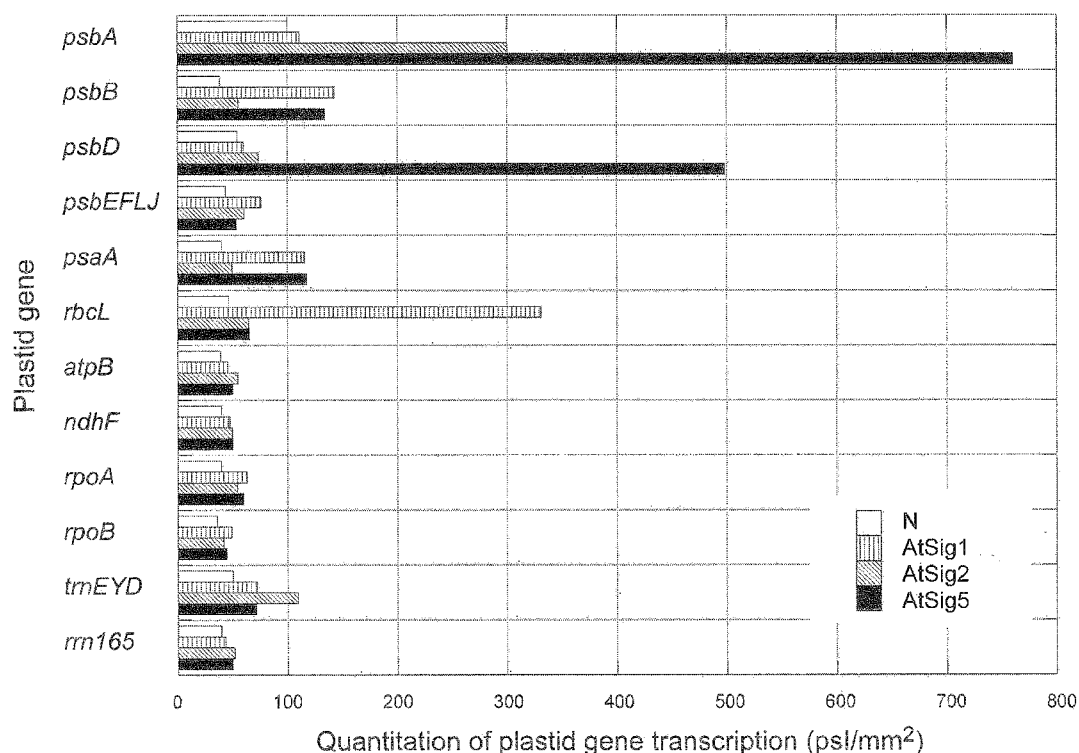


FIG. 3. Effects of AtSig1, AtSig2 or AtSig5-overexpression on plastid gene transcription in *Arabidopsis* protoplasts. α - 32 P-labeled run-on transcripts derived from the lysates of protoplasts transiently transformed to overexpress AtSig1, AtSig2, or AtSig5 were hybridized to dot blots containing DNA fragments specific for nine plastid-encoded genes and two operons. The amount of radioactivity hybridized was quantified (Tsunoyama *et al.*, 2004; Tsunoyama, Shiina and Toyoshima, unpublished). The examined plastid genes, *psbA*, *psbB*, *psbD*, *psbEFLJ*, *psaA*, *rbcL*, *atpB*, *ndhF*, *rpoA*, *rpoB*, *tmEYD* and *rm165* encode D1, CP47, D2 and small subunit proteins of PSII, P700 apoprotein A1 of PSI, the large subunit of Rubisco, β -subunit of ATPase, a subunit of NADH dehydrogenase, α -, and β -subunits of PEP, a set of transfer RNAs, and 16S ribosomal RNA. Each value represents the transcription activity of genes relative to that of *psbA* in nontransformed protoplast lysates (%). The data represent mean values of three to five independent experiments.

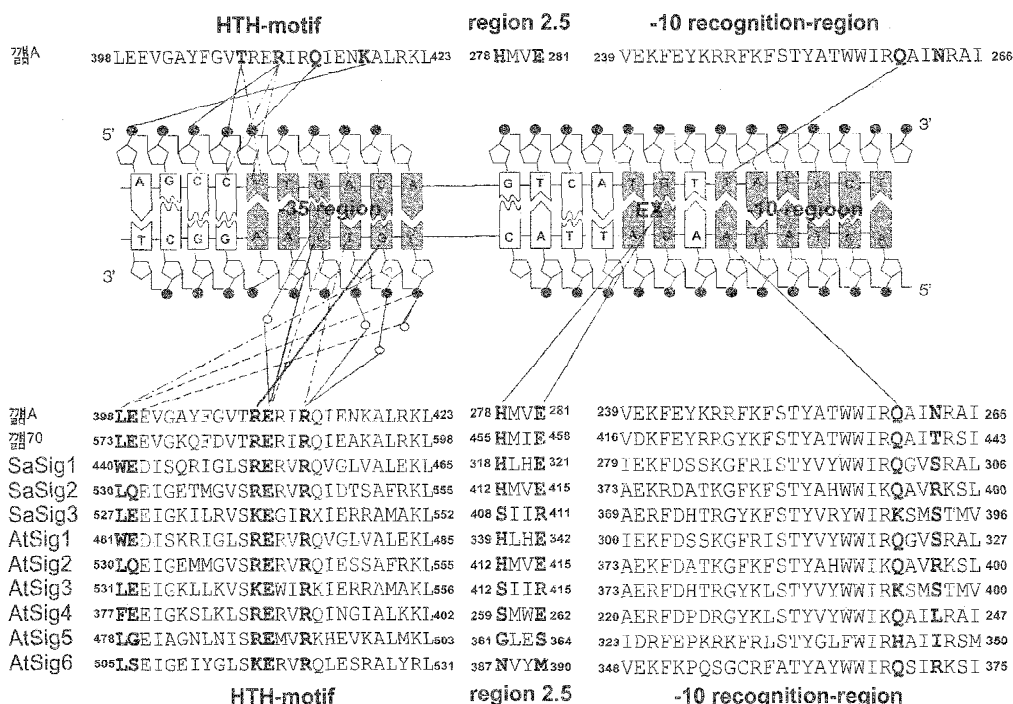


FIG. 4. Amino acid residues of σ subunit of *Thermus aquaticus* RNA polymerase, σ^A , involved in promoter binding and sequence alignments with σ^{70} and AtSig and SaSig factors. The regions of σ^A revealed by structural analyses to be contact sites for the -35-element (HTH-motif), -10 element (region 2.5) and the extended -10 element (region 2.5) are aligned with σ^{70} , AtSig and three SaSig factors. The upper in double strand DNA (the core promoter region) is the nontemplate strand and the lower is the template strand. Connecting solid lines indicate hydrogen bond or salt bridges. The thick solid line indicates two hydrogen bonds from the same residue. The dash-dot lines indicate potential van der Waal's contact. The dash lines denote main chain -NH contacts. The filled circles and open circles indicate phosphate groups and water molecules, respectively.

psbA promoter compared with *trnQ*, *rbsL* or *rps16*, but preference of Sig3 to *psbA* promoter was much stronger than that of the other two σ factors.

The crystal structures of eubacterium *Thermus aquaticus* RNA polymerase holoenzyme ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma_A$) and of its complex with a fork-junction promoter DNA fragment were determined at 4.0 and 6.5 Å, respectively (Murakami *et al.*, 2002a, 2002b). The structure of the bacterial RNA polymerase might provide some information on the molecular basis with regard to promoter selectivity of multiple plastid σ factors (Figure 4). Members of eubacterial σ^{70} group 1 σ factor including most of the plastid σ factors as well as σ_A , contain four conserved regions, 1 through 4 (Helmann and Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992). Region 2 is the most highly conserved portion and is further divided into five subdomains 2.1 through 2.5. Among them 2.4 contacts the -10 element and 2.5 interacts with the 'extended -10' motif, TGn, found in some eubacterial promoters (Barne *et al.*, 1997). Region 4 is also highly conserved, and is divided into 4.1 and 4.2. Genetic analyses suggest that residues of the recognition helix in the 4.2 helix-turn-helix motif bind the -35 element (Lonetto *et al.*, 1998; reviewed by Gross *et al.*, 1998). The amino acid sequences are compared in 2.4,

2.5 and 4.2 among Sig1 through Sig6 of *Arabidopsis* (AtSig1 through AtSig 6), Sig1 through Sig3 of mustard (SaSig1 through SaSig3), *E. coli* σ^{70} and *Taq* σ_A . Within region 2 of *Taq* σ_A , four distinct determinants were suggested to directly interact with promoter DNA from structure studies for *Taq* RNAP (Murakami *et al.*, 2002a). In 2.5, two residues [H278 and Q281 of *Taq* σ^A (*Taq*H278 and *Taq*Q281), corresponding to H455 and Q458 of *E. coli* σ^{70} (*Ec*H278 and *Ec*Q281)] are involved in recognition of the extended -10 element. Both residues are exposed on the surface of the 2.5 α -helix, facing the major groove of the extended -10 DNA. These two amino acids are conserved in Sig1 and Sig2 of both plants, but not in other σ factors, suggesting that Sig1 and Sig2, but not others could recognize the extended -10 element existing in some plastid promoters. In 2.4, two residues (*Taq*Q260 and *Taq*N263 corresponding to *Ec*Q437 and *Ec*T440, respectively) are exposed, facing the major groove of the DNA near -12. *Taq*Q260 (*Ec*Q437) is within reach of the -12 bases and seems to interact with the nontemplate strand T or template strand A. *Taq*Q260 is conserved in SaSig1, SaSig2, AtSig1, AtSig2, AtSig4 and AtSig6, but is altered in SaSig3 and AtSig5 to K and in AtSig5 to H. The T to A mutation of mustard *psbA* promoter at the -10 position (the first base in

–10 element corresponding to –12 in *E. coli* σ^{70} promoter) resulted in severe reduction of binding affinity of SaSigA, but interestingly substitution of H for SaSig1Q300 (corresponding to *Taq*Q260) suppressed the effect of the promoter mutation at the –10 position (Homann and Link, 2003), suggesting implication of this residue in base-specific interaction with the –10 element. This residue, however, is altered to H in Sig5 in various plants including AtSig5 that strongly recognize *Arabidopsis* *psbA* promoter and *psbD* BLRP, both of which contain T at the first position of the –10 element, indicating the preferential pairing of a special base within the –10 element and a special residue in 2.4 variable for all multiple σ factors.

As expected from genetic analyses of region 4 residues, the structure data for the σ_A subunit of *TaqA* RNAP complexed with the –35 element DNA fragment indicate that protein interaction with the –35 element occurs exclusively through side chains emanating from the helix-turn-helix motif recognition helix in 4.2 (Campbell *et al.*, 2002). The protein anchors itself on the DNA through interactions with the phosphate backbone on the nontemplate strand from –35 to –38 and the template strand from –31' to –33' and with some specific bases. *TaqR409* in 4.2 (corresponding to *EcR584*), which is universally conserved in bacterial group 1 σ factors interacts with the CG base pair at –31 (the fifth position in –35 element) by donating two hydrogen bonds to the O6 and N7 acceptors of –31G on the nontemplate strand, explaining the suppressive effect of *TaqR409/C* (*EcR584/C*) substitution on expression from wild-type *lac* promoter (Siegele *et al.*, 1989). Although *TaqR409* is well conserved among plastid σ factors including AtSig1, AtSig2, SaSig1 and SaSig2, the CG base pair at the fifth position in the –35 element is not conserved in PEP promoter. Furthermore, the CG \rightarrow AT substitution at this position in mustard *psbA* promoter hardly affects the binding affinity of SaSig1 to the promoter (Homann and Link, 2003). These facts indicate that R corresponding to *TaqR409*, which is crucial for base-specific interaction with the –35 element in σ^{70} -type bacteria is well conserved in plastid σ factors, but it is not important for base-specific interaction with the –35 element in plastids. On the other hand, the GC \rightarrow AT substitution at –32 in mustard *psbA* promoter (the third position in –35 element) resulted in a drastic decrease in the binding affinity of the three SaSigs and *E. coli* σ^{70} to the promoter, but substitution of H for SaSig1R455 (corresponding to *TaqR413*) suppressed the effect of the promoter mutation at the –32 position (Homann and Link, 2003), suggesting an implication of this residue in the base-specific interaction with the –35 element. Genetic analyses of *E. coli* σ^{70} also suggests that *EcR588* (*TaqR413*) shows a base-specific interaction with the GC pair at –33 (–32 in mustard *psbA* promoter) (Gardella *et al.*, 1989). However, the crystal structure does not support the inference from these genetic analyses regarding base recognition by specific residues, because *TaqR413* (*EcR588*) makes water-mediated interactions with the phosphate backbone at –32 and –33 of nontemplate strand. *TaqE410* (*EcE585*), which is universally conserved among group1 σ factors including plastid

σ factors in turn interacts directly with N4 of C at –33. *TaqR413* (*EcR588*) appears to be a key in positioning another universally conserved residue, *TaqE410* (*EcE585*) and the effects of substitution at *TaqR413* (*EcR588*) results from effects on *TaqE410* (*EcE585*) (Campbell *et al.*, 2002). In addition to the key interactions of *TaqR409* (*EcR584*) and *TaqE410* (*EcR585*) in the 4.2 region of *Taq* σ_A , *TaqQ414* (*EcQ589*) and *TaqR411* (*EcR586*) also interact with specific bases in the –35 element as shown in Figure 4. The base-specific interactions between the non-conserved residues in region 4.2 and the non-conserved bases in –35 element may be involved in promoter discrimination of multiple plastid σ factors.

2. Differential Expression of Plastid Sig Genes

Tissue- and developmental stage-dependent expression. Tissue- and developmental stage-dependent expression of *Sig* genes was examined in *Arabidopsis*, wheat, and maize (reviewed by Allison, 2000). In *Arabidopsis*, Northern hybridization analyses indicated that mRNAs of six *Sig* genes preferentially accumulate in green tissues rather than root tissues and transcript levels are enhanced by light (Tanaka *et al.*, 1997; Yao and Allison, 1998; Fujiwara *et al.*, 2000; Shiina *et al.*, unpublished). In transgenic *Arabidopsis* containing AtSig1 promoter- and AtSig2 promoter-*uidA* (encoding GUS) fusion, the measurement of GUS expression revealed that *Sig1* and *Sig2* were similarly activated in green tissues, including cotyledons, hypocotyls, leaves, and siliques, but not in roots, seeds, or flowers (Kanamaru *et al.*, 1999). The same transgenic lines together with the lines containing AtSig5 promoter-*uidA* were also examined for the expression of the three AtSig promoters at various developmental stages (Kanamaru *et al.*, 1999; Kanamaru *et al.*, 2001). During the first 3 d after germination, strong GUS staining was observed in the cotyledons of all the plants containing AtSig5 promoter-*uidA*. However, GUS activity in the cotyledons had disappeared by day 4 and appeared again after at day 7. The first true leaves also showed a similar periodicity of the AtSig5 expression. Such rhythmic activation of AtSig5 promoter was also observed for the AtSig1 and AtSig2 promoters in developing leaves of *Arabidopsis* and for *TasigA* in mature leaves of wheat (Morikawa *et al.*, 1999) although the periodicity of the rhythm in the *TasigA* in mature leaves was 24 hr (see section VI for details), while that of the AtSig promoters during leaf development was 48 hr. The rhythm of the AtSig with the long periodicity may be a transient phenomena appearing in the early developmental stage. Alternatively, it might be a step of the process establishing circadian control for the σ factor expression during leaf development.

In contrast to the similar expression patterns observed for the *Arabidopsis* σ factors, ZmSig1 and ZmSig3 of maize exhibit discrete accumulation patterns. By using antibodies raised against the unique domain in each ZmSig, expression of ZmSig3 was found in non-green tissues such as roots, etiolated seedlings, and the basal portions of light-grown seedling leaves. In contrast, expression of ZmSig1 was restricted to green seedling leaves (Lahiri and Allison, 2000). Since the monocotyledonous

cereals, such as wheat and maize, exhibit a linear pattern of leaf development with the youngest cells at the leaf base and the most mature cells at the leaf tip (Leech, 1984), leaf tissues representing the different stages of cell maturation are obtained by slicing the developing leaf into consecutive sections from the leaf base to the tip. *In vitro* transcription in the extracts prepared from chloroplasts in various developmental zones of wheat leaves demonstrated that in the leaf tip, the *psbA* promoter and *psbD*BLRP activities were induced by light, whereas *psbC*, *psbE* and *16S* rRNA promoters were almost silent irrespective of light conditions (Satoh *et al.*, 1999). In the basal portion, all PEP promoters studied functioned in the dark as well as in the light, except for *psbD*BLRP. These experiments suggest that at least two types of PEP exist in the seedling leaves: a tip-type that is light activated and a base-type whose activity is independent of light. Both PEP types absolutely required an intact -10 element. However, it was discovered that the tip-type PEP in the illuminated leaf tip could initiate transcription from the -35 -disrupted *psbA* promoter as long as an extended -10 was preserved, while the -35 element was essential for transcription of *psbA* by the base-type PEP (Satoh *et al.* 1999). In mustard, rifampicin-sensitive PEP (B form) was converted to a more complex rifampicin-resistant form (A form) during light-induced chloroplast development (Pfannschmid and Link, 1994, 1997). This type of modification in PEP may not explain the differences between the tip-type and base-type PEPs, because rifampicin hardly affects the transcription from the *psbA* promoter in both extracts independent of light or dark, suggesting that both tip- and base-types are of the A form rather than B form. The different promoter recognition properties of the tip-type and base-type PEPs are probably caused by their assembly with different σ factors. This model is entirely consistent with the observation that σ factors are differentially distributed in the developing maize leaf (Lahiri and Allison, 2000). Immunoblots of proteins from several different sections above the leaf base revealed that ZmSig1 is expressed in regions containing mature chloroplasts (>4 cm). By contrast, ZmSig3 expression in leaves was restricted to the basal region (<2 cm). These results give strong evidence for the presence of a developmental plastid σ cascade in plants.

Blue Light- and Stress-Responsive Expression of SIG5. Besides its uniqueness in structure and function, the expression of *Sig5* in response to light and stress is distinct from the other σ factors. Transcription of *AtSig5* is strongly induced by blue light, but hardly induced by red light in dark-adapted *Arabidopsis* seedlings (Tsunoyana *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2004). Although all plastid σ factors examined for various plant leaves are light-dependently transcribed (Isono *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Tozawa *et al.*, 1998; Lahiri *et al.*, 1999; Tsunoyana *et al.*, 2002), the transcription of the other five *AtSig* genes is induced by red light as well as blue light (Figure 5A). So far, two types of blue-light photoreceptors have been identified: cryptochrome 1, 2 and 3 and phototropin 1 and 2 (reviewed by Lin, 2002a; 2002b; Kleine *et al.*, 2003). The blue light-specific induction

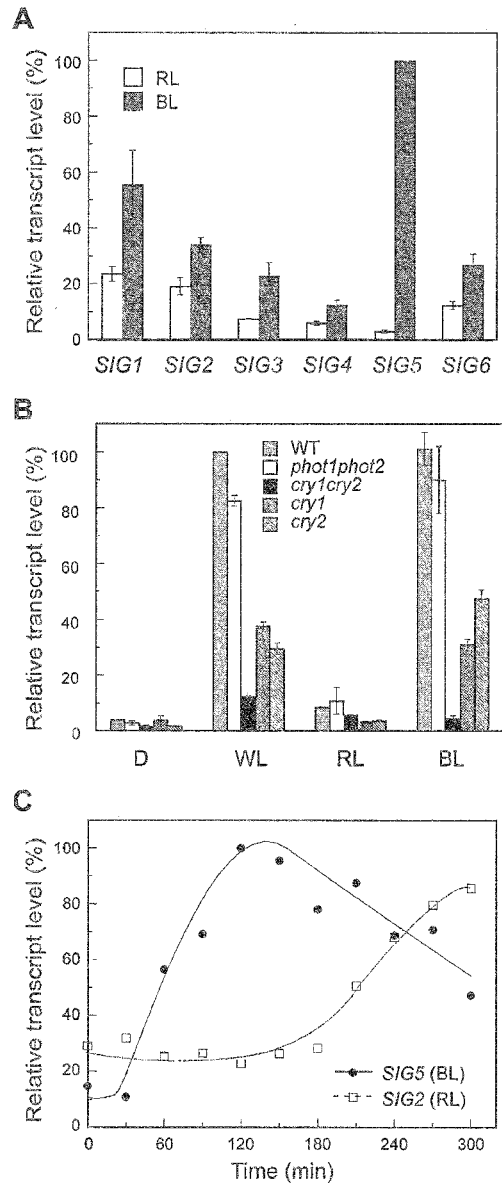


FIG. 5. Effect of blue and red lights on transcript accumulation of σ factors in *Arabidopsis*. A: 4-week-old wild-type plants were dark-adapted for 24 h, and subsequently exposed to blue light (470 nm, closed bar) or red light (660 nm, open bar) at the fluence of $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ each for 90 min. The levels of *SIG1-6* transcripts were determined by quantitative PCR with the gene-specific primers. B: Each 4-week-old *Arabidopsis* of the wild-type (WT), the phototropin double mutant (*phot1phot2*), the cryptochrome double mutant (*cry1cry2*), the cryptochrome single mutants (*cry1* and *cry2*) was exposed to darkness (D), and subsequently illuminated for 90 min with white light (WL, $15 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), red light (RL, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) or blue light (BL, $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). *SIG5* transcript levels were determined by quantitative PCR. C: Dark-adapted of the 4-week-old wild-type plants were illuminated for the indicated times with blue light ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) or red light ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), for kinetic analyses of accumulation of *SIG5* (●, solid line) or *SIG2* (□, dot line) transcripts, respectively, by quantitative PCR. Each value was normalized to that of *ACT2*, and converted to a percentage of the highest transcript level. The data are shown as mean values with standard deviation of three independent measurements (panels A and B).

of *Sig5* is absent in the cryptochrome 1 and cryptochrome 2 double mutant (*cry1cry2*), but is retained in phototropin 1 and phototropin 2 double mutant (*phot1phot2*), indicating that it is mediated by cryptochromes 1 and 2 rather than cryptochrome 3, phototropin 1 and phototropin2 (Figure 5B) (Mochizuki *et al.*, 2004). A Ser/Thr protein phosphatase (AtPP7) may be involved in the cryptochrome-dependent blue light signaling pathway to activate *Sig5* transcription (Moller *et al.*, 2003). The blue light-induced accumulation of *Sig5* transcript requires threshold fluence of $5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ and about 30 min induction time. On the other hand, the accumulation of other five σ factor transcripts induced by red light in dark-adapted plants arises more slowly; for example, *Sig2* transcript accumulation starts to increase after an induction time of 180 min by red light at a higher fluence of $50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 5C).

Although the transcription of *Sig5* is induced by blue light in dark-adapted *Arabidopsis* seedlings, it is also induced by exposure to various stress conditions, such as strong light ($1,000 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), low temperature, high salt, and high osmotic conditions in the seedlings grown under normal conditions ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). The transcript accumulation of the other σ factors is hardly affected by these stress conditions (Nagashima *et al.*, 2004). Since osmotic stress-induced accumulation of *Sig5* mRNA occurs in the absence of light, it appears that transcriptional changes caused by the blue light signal and stresses are independent. These facts strongly indicate that *Sig5* is a special σ factor which regulates plastid gene expression in response to environmental signals and stresses at the transcriptional level, although further study is required to find a signaling pathway involved in the stress-dependent *Sig5* induction.

The rate of transcription of photosynthetic genes declines during plastid development to mature chloroplasts, with exceptions of the *psbA* and *psbD* genes, which respectively encode D1 and D2 proteins composing the core part of the photosystem II reaction center, respectively (Klein and Mullet, 1990; Baumgartner *et al.*, 1993; DuBell and Mullet, 1995). D1 and D2 are relatively unstable and susceptible to photo-induced degradation under high light conditions (Mattoo *et al.*, 1989; Christopher and Mullet, 1994). To maintain high rates of D1 and D2 synthesis, the plants increase the transcription of *psbA* and *psbD* in response to light (Mullet and Klein, 1987; Gamble and Mullet, 1988). Transcription of *psbA* from a single transcription initiation site is at least partly regulated by photosynthetic light via the redox state of the plastoquinone pool (Pfannschmidt *et al.*, 1999) (see section V) and the corresponding mRNA is highly stable (Klein and Mullet, 1987; Klaff and Gruijsem, 1991; Rapp *et al.*, 1992), whereas the *psbD* transcription is regulated by a different mechanism (Gamble and Mullet, 1989) and the mRNA is unstable. In the light, the *psbD* transcription is activated from 190, 550, and 950 nucleotides upstream from the *psbD* translation start codon in barley (Hoffer and Christopher, 1997). The transcripts from -190 and -550 positions are readily activated by light with a relatively shorter induction time with a profile similar to the *16S rRNA*, the *rbcL* and *psbA* mRNAs,

whereas the third transcript from the -950 position, which becomes dominant under strong light is delayed in time (Hoffer and Christopher, 1997). The transcription from the -950 position is under the control of a special light-responsive promoter *psbDBLRP*.

The role and property of the *psbDBLRP* that is activated primarily by strong blue light mediated by cryptochrome 1 and cryptochrome 2 (Thum *et al.*, 2001) have been an important subject of chloroplast transcription research (Christopher *et al.*, 1992, 1994; Wada *et al.*, 1994; Allison and Maliga, 1995; Hoffer and Christopher, 1997; Satoh *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999b). This promoter is a σ^{70} -type promoter with an unusual structure, which is highly conserved in dicotyledonous and monocotyledonous plants (Hoffer and Christopher, 1997; Yao and Allison, 1998; Christopher *et al.*, 1992; Allison and Maliga, 1995; Kim and Mullet, 1995; To *et al.*, 1996; Nakahira *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999b), but is not conserved in mosses (Ohyama *et al.*, 1986; Sugiura *et al.*, 2003) and algae (Kowallik *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 2003). Most plastid promoters recognized by PEP contain a variant of the -10 (TataaT) and -35 (TTGaca) consensus hexa-nucleotide sequences of canonical σ^{70} -type *E. coli* promoters which are spaced by 17 to 19 nucleotides. In *psbDBLRP*, however, a -35 like sequence and -10 element are spaced only by 15 nucleotides (Christopher *et al.*, 1992; Wada *et al.*, 1994; Allison and Maliga, 1995; Kim and Mullet, 1995; To *et al.*, 1996; Hoffer and Christopher, 1997) and destruction of the -35 like sequence does not affect the transcription from this promoter in wheat (Nakahira *et al.*, 1998), barley (Kim *et al.*, 1999b) and tobacco (Thum *et al.*, 2001) *in vitro* and *in vivo*. Instead, two well-conserved upstream cis elements, termed the PGT and AAG boxes are located between nucleotides -71 to -100 and -36 to -64 of the transcription initiation site, respectively (reviewed by Liere and Maliga, 2001; Allison and Maliga, 1995; Kim and Mullet, 1995; Kim *et al.*, 1999b) and the existence of several proteins interacting with these boxes has been reported. Deletion of a DNA segment containing the AAG-box sequence reduced the level of transcript from *psbDBLRP* 30-fold (Allison and Maliga, 1995). An AAG box binding protein acting as a transcription activator was cloned in *Arabidopsis* and named plastid transcription factor 1 (PTF1) (Baba *et al.*, 2001), but it did not act as a light-switching factor (see section IV). Deletion of a part of the PGX box which is the binding site for a PGT-binding factor (PGTF) reduced the mRNA levels five-fold *in vivo* in tobacco grown several days in cycling light conditions (Allison and Maliga, 1995). Interestingly, PGTF binding activity to PGT box is regulated by an ADP-dependent kinase (Kim *et al.*, 1999a) so as to be inhibited by ADP. Based on these results, a model was proposed that transcriptional activation of the *psbDBLRP* in the light is mediated by PGTF bound to the PGT site (Kim *et al.*, 1999a; reviewed by Maliga, 2001). Phosphorylation of PGTF results in loss of its affinity for the PGT element in darkness in parallel with the rise in ADP level in chloroplasts.

The severe reduction of *in vitro* transcription activity by complete deletion of the sequence upstream of -36 position

involving both AAG and PGT boxes (*psbDBLRP*−36) was also observed in wheat (Nakahira *et al.*, 1998). However, the *psbDBLRP*−36 construct still retained weak blue light-dependent transcription consistent with the results *in vivo* (Allison and Maliga, 1995). Further, deletion of the PTG elements that greatly reduces mRNA levels in tobacco grown under cycling light conditions has only a small effect on reactivation of the *psbD* transcription by white light *in vivo* in the same plants placed in darkness. These facts suggest that the PGT-box plays an important role in regulating the transcription from *psbDBLRP*, but that other events may be involved in the activation of *psbDBLRP* by high-fluence blue light.

Among the six plastid σ factors in *Arabidopsis*, *psbDBLRP* is recognized only by SIG5 (Tsunoyama *et al.*, 2004) which is specifically expressed under blue light via a cryptochrome-dependent signaling pathway in which a Ser/Thr protein phosphatase is involved (Mochizuki *et al.*, 2004; Moller *et al.*, 2003). This blue light-dependent behavior of the *Sig5* expression is very similar to that of the activation of *psbDBLRP*. Cryptochromes are involved in the activation of *psbDBLRP* by blue light (Thum *et al.*, 2001). Extrplastidic Ser/Thr protein phosphatase is required for the *in vitro* transcription from *psbDBLRP*, while a protein kinase represses it in the dark (Christopher *et al.*, 1997). These facts indicate that *Sig5* is the nuclear-encoded key factor mediating the blue light signal from cytoplasm/nuclei to chloroplasts to activate the *psbDBLRP*. However, the strength of monochromatic blue light required for activating the transcription of *SIG5* is $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ which is lower than that for *psbDBLRP* by one order of magnitude (Tsunoyama *et al.*, 2002). It has been a common understanding that *psbDBLRP* requires a high fluence blue light or UV-A such as $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ to be activated. Precise analyses of the effect of the light intensity and quality required for activation of the *psbDBLRP* revealed that $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ red light fully activates the *psbDBLRP* only when the plants were simultaneously illuminated with $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ blue light (Tsunoyama *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2004). This cooperative effect of weak blue light and strong red light on the activation of *psbDBLRP* indicates that the blue light requirement to activate *psbDBLRP* is attributable to the induction of *Sig5* transcription through cryptochrome signaling pathway, but in addition to the *SIG5* expression, a high-fluence light, which is not restricted to blue light, is necessary for the activation of *psbDBLRP*. Thus these two independent light signals cooperatively regulate the activation of *psbDBLRP* in a nucleus-chloroplast interdependent manner. It appears that stress signals can substitute for blue light signal in the activation of *Sig5* transcription (Nagashima *et al.*, 2004). Although the origin of the high fluence light requirement in the activation of *psbDBLRP* remains unknown, it may be related to the inner-chloroplast transduction of photosynthetic redox signals generated by photosynthetic electron flows (discussed in section V). PGTF is a candidate, which might mediate a photosynthetic redox signal to the enhancement of the *psbDBLRP* activity. Photosynthetic electron flow generated by high fluence light acts as to inhibit an

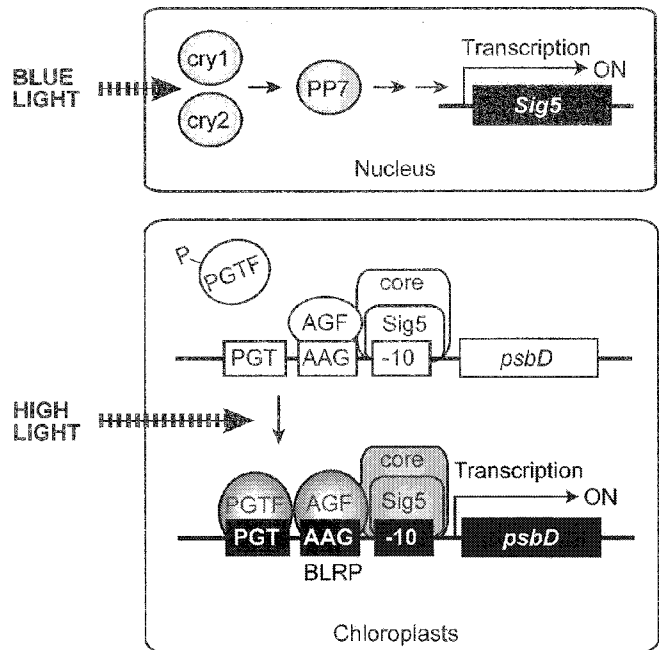


FIG. 6. A model for the *psbDBLRP* activation by the cooperation of two independent light signals, blue light and high fluence light, in *Arabidopsis*. The *psbDBLRP* activation requires the −10 element and the two upstream *cis*-elements, PGT box and AAG box. The −10 element of the *psbDBLRP* is recognized by *Sig5*, whose transcription is induced specifically by blue light through the cryptochrome-mediated signalling pathway in the nucleus. AGF (AAG-box binding protein factor) recognizes AAG box constitutively, while PGTF (PGT-box binding protein factor) shows no binding affinity to PGT box in the dark due to its ADP-dependent phosphorylation. High fluence of light transforms PGTF from the phosphorylated form to the dephosphorylated one with binding affinity to PGT, ultimately activating the *psbDBLRP*.

ADP-dependent kinase resulting in conversion of PGTF from its phosphorylated form in darkness to dephosphorylated form which is favorable for PGTF to bind to PGT box. PGTF bound to the PGT site might act as an activator to assist the transcription from *psbDBLRP* by the *Sig5* assembled PEP with the help of PTF1 bound to the AAG box. A model for the actions of *Sig5* and PGTF in two independent light signaling pathways regulating the *psbDBLRP* is shown in Figure 6, although the involvement of PGTF in the high light signaling pathway is speculative.

IV. TRANSCRIPTION REGULATORS IN PLASTIDS

The cyanobacterium *Anabena sp.* strain PCC7120 is estimated to contain 118 genes encoding putative transcription regulators that are involved in the developmental and environmental regulation of gene transcription (Ohmori *et al.*, 2001). Most of these transcription regulators were lost during plastid evolution and in higher plants the plastid genome retains no transcription regulators, including σ factors and DNA-binding proteins. This means that plastid transcription is largely under the control of nuclear-encoded transcription regulators. This section describes

the transcription regulators in plastids that have been cloned, identified, or well characterized.

A. PEP Transcription Factors

1. *rbcl* Promoter-Specific Factors

Like bacteria, transcription of some genes requires DNA-binding proteins or transcription factors. The first identified plastid transcription factor was a CDF1 (chloroplast DNA binding factor 1) that interacts with the upstream sequences of *rbcl* promoter and regulates cell-type specific gene expression in maize (Lam and Bresnick, 1998). However, CDF1 unlikely functions in tobacco, since the *rbcl* core promoter is sufficient for full promoter activity and light-dependent transcription (Shiina *et al.*, 1998). Another DNA-binding protein, *rbcl* promoter binding protein (RLBP) specifically binds to the *rbcl* core promoter region in a light-dependent manner in tobacco (Kim *et al.*, 2002). RLBP may be involved in the light-dependent transcription of *rbcl* gene encoding the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphatase.

2. *psbD*BLRP-Specific Factors

The chloroplast contains several proteins that bind to the PGT and AAG boxes located upstream ~70 bp sequences of *psbD*BLRP, which is recognized only by Sig5 in *Arabidopsis*. The PGT and AAG boxes are well conserved in higher plants and deletion of AAG box resulted in a severe reduction of *psbD*BLRP activity *in vitro* (Kim and Mullet, 1995; To *et al.*, 1996; Satoh *et al.*, 1997) and *in vivo* (Allison and Maliga, 1995; Kim *et al.*, 2002). An AAG box-binding protein, PTF1, was cloned in *Arabidopsis* (Baba *et al.*, 2001). PTF1 is a nuclear-encoded basic helix-loop-helix DNA-binding protein and binds specifically to the ACC repeats in the AAG box. Inactivation of PTF1 decreased the *psbD*BLRP activity and caused an insufficient chlorophyll accumulation, suggesting that PTF1 is involved in the *psbD*BLRP activity. However, the T-DNA insertion into the *ptf1* gene did not eliminate the light-dependent behavior of *psbD*BLRP and the expression of PTF1 was not regulated by light, suggesting that PTF1 acts as a transcription activator, but does not mediate light signaling from cytoplasm to chloroplasts. The molecular aspect of PTF1 interaction with PEP core subunits and/or AtSig5 remains to be characterized. Another protein which interacts with PGT box, PGTF has never been cloned, but it appears to play a direct role in the light-dependent activation of *psbD*BLRP as discussed above.

3. *psaA* Promoter-Specific Factor

The *psaA* operon consists of *psaA* and *psaB*, encoding PSI reaction center core proteins and *rps14* encoding ribosomal protein CS14. Transcription of *psaA* operon is regulated by a redox state in chloroplasts (Pfannschmidt *et al.*, 1999). The *psaA* operon is transcribed from *psaA*-179 promoter in spinach that is recognized by PEP. Chloroplasts contain *psaA* promoter-specific DNA binding proteins that interact with upstream (region U;

–51 to –19) and downstream (region D: +64 to +83) of the transcription initiation site (Chen *et al.*, 1993). Dimeric 31 kDa proteins specifically bind to the region D that is well conserved in higher plants (Cheng *et al.*, 1997). Roles of *psaA* promoter-binding proteins in the transcriptional regulation remain to be characterized.

4. *rRNA* Transcription Factors

Multiple promoters exist upstream of the chloroplast *rRNA* operon consisting of genes for 16S, 23S and 5S rRNAs. In tobacco, pea, and maize, the *rRNA* operon is transcribed from a σ^{70} -type P1 promoter that comprises well-conserved –35 and –10 promoter elements (Vera and Sugiura, 1995; Sriraman *et al.*, 1998b). The P1 promoter-dependent gene is actively transcribed by PEP in mature leaves. In non-photosynthetic BY2 cells and PEP-deficient mutants, P1 promoter is silent, whereas the *rRNA* operon is actively transcribed from another NEP-dependent promoter P2 that is present 48 bp downstream of the P1 promoter (Vera and Sugiura, 1995; Allison *et al.*, 1996). It is likely that the P2 promoter compensates the silence of P1 promoter to support protein synthesis in plastids in non-photosynthetic cells lacking PEP. Recently, the tobacco P1 promoter was systematically dissected *in vivo* and *in vitro* (Suzuki *et al.*, 2003). A hexameric sequence (GTGGGA) upstream of the –35 element is essential for the P1 activity, whereas the –10 element is not important. The essential upstream sequence termed the *rRNA* operon upstream regulator (RUA) is conserved in various higher plants including rice, maize, spinach, carrot, *Arabidopsis*, and soybean, but not in pea. It is speculated that PEP may directly interact with the RUA or an RUA-binding transcription factor to initiate transcription at the P1 promoter in tobacco.

The promoter usage of the *rRNA* operon is not common in spinach, mustard, *Arabidopsis*, and tobacco. In mustard and spinach, the *rRNA* operon is exclusively transcribed from the third promoter Pc that is located upstream of the P1 promoter and the P1 promoter is silent (Baeza *et al.*, 1991; Iratni *et al.*, 1997; Pfannschmidt and Link, 1997), while both P1 and Pc promoters are active in *Arabidopsis* leaves (Sriraman *et al.*, 1998b). Despite the difference in promoter usage among plants, the *rRNA* promoter sequences are highly conserved in these plants. The spinach *rRNA* 5' fragment initiates transcription exclusively at the P1 promoter in tobacco plastids, but not the Pc promoter. Presumably, spinach chloroplasts lack a P1-specific activating factor that is required for the recruitment of PEP to the P1 promoter. The RUA-binding protein is a candidate for the P1-specific activating factor. Conversely, tobacco chloroplasts likely lack a specific factor involved in Pc activity, suggesting that NEP functions are also regulated by specific transcription factors.

B. NEP Transcription Factors

A catalytic core of NEP (RpoTp) is highly similar to that of phage T3/T7 monomeric RNA polymerases. Like mitochondrial RNA polymerase, the initiation of transcription of some NEP

promoters may depend on promoter-specific transcription factors. A candidate for NEP transcription factor is CDF2. Spinach chloroplasts have two types of NEP activity, NEP-1 and NEP-2 (Bligny *et al.*, 2000). CDF2 has been suggested to act as an initiation factor for NEP-2 and recruits NEP-2 to the Pc promoter. Moreover, association of CDF2 with PEP represses transcription initiation at P1 *rRNA* promoter. NEP-2 activity is regulated by a development-dependent manner and high in young plants to support active protein synthesis in developing chloroplasts. CDF2 seems to play a very important role in the developmental regulation of *rRNA* transcription in spinach. Furthermore, it should be noted that NEP-2 is different from the standard phage-type NEP (NEP-1) in several points and may represent a third type of RNA polymerase in plastids. The cloning of NEP-2 and CDF2 genes will shed light on the regulation of *rRNA* transcription in plastids. Ribosomal protein L4 (RLP4) may play an important role in the regulation of chloroplast gene transcription, since RLP4 is associated with a NEP 110 kDa catalytic subunit (Trifa *et al.*, 1998).

C. Nucleoid Proteins

Plastid nucleoids, protein-DNA complexes, are associated with the inner envelop membrane in immature chloroplasts but with the thylakoid membranes in mature chloroplasts. Several nucleoid-binding proteins have been identified in chloroplasts (reviewed by Sato *et al.*, 2003). Nucleoid proteins may be involved in transcription regulation of plastid-encoded genes. The PEND protein is a 130 kDa DNA binding protein localized in the inner membrane of developing pea chloroplasts (Sato *et al.*, 1993). The PEND protein is a homodimer of 70 kDa PEND polypeptides that harbor N-terminal basic region, leucine zipper-like domain termed cbZIP domain and hydrophobic membrane binding domains (Sato *et al.*, 1998; Sato and Ohta, 2001). The cbZIP domain is likely involved in dimerization of PEND polypeptides and sequence-specific binding to a canonical sequence, TAAGAAGT that is present in various parts of the chloroplast DNA. The PEND protein may be involved in the anchoring of nucleoids to the envelop membrane at an early stage of chloroplast development and/or transcriptional regulation. The MFP1 is another nucleoid protein that harbors the C-terminal coiled-coil DNA-binding domain and N-terminal putative transmembrane domain (Jeong *et al.*, 2003). MFP1 is associated with thylakoid membranes in mature chloroplasts and binds nonselectively to chloroplast DNA fragments. MFP1 is supposed to anchor nucleoids to thylakoid membranes in mature chloroplasts (Jeong *et al.*, 2003). Furthermore, DNA-binding activity of MFP1 is regulated by phosphorylation mediated by CK2 that is a component of the plastid transcription complex, suggesting the involvement of MFP1 in the photosynthetic regulation of plastid gene transcription (Jeong *et al.*, 2004). Sulfide reductase (SiR) is also abundant in chloroplast nucleoids (Sekine *et al.*, 2002). Interestingly, addition of SiR enhanced compaction of isolated nucleoids and concurrently suppressed the *in vitro*

transcription activity of the nucleoids. It is likely that SiR is involved in DNA compaction and regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids. CND41 is another abundant protein in the nucleoid that was isolated from non-photosynthetic plastids in tobacco BY2 cells (Nakano *et al.*, 1997). CND 41 has an asparagine protease domain and may be involved in the proteolysis of Rubisco large subunit protein (Murakami *et al.*, 2000).

V. REDOX CONTROL OF PLASTID TRANSCRIPTION

Under stress conditions, such as strong light, low temperature, and an over-excitation of the photosynthetic apparatus, resulting photo inhibition of the electron transport causes the destruction of D1 and D2 proteins of the photosystem II (PSII) (Aro *et al.*, 1993). To avoid this stress, several quenching processes dissipate excess energy as heat. At the same time, turnover of D1 and D2 proteins in the PSII reaction center takes place very rapidly to repair the damaged reaction center. By contrast, under weaker light conditions, plants overcome an inefficient electron flow caused by imbalanced excitations between the photosystem I (PSI) and PSII by the state-transitions occurring within several minutes and/or by adjustment of the stoichiometry of photosystems occurring in hours or days, respectively (Allen and Pfannschmidt, 2000; Haldrup *et al.*, 2001). Formation of a functional multi-subunit complex such as PSI and PSII in plastids involves multiple steps, starting with the transcription of a gene or operon and ending with the assembly of the produced protein into a complex. Most of these steps, particularly in gene expression processes, are highly regulated, both in the nucleus and in the chloroplasts. Many reports show that the redox states of plastoquinone, the cytochrome *b₆f* complex, and electron flow-dependent compounds, such as thioredoxin, glutathione and reactive oxygen species, affect chloroplast gene expression at the levels of transcription (Pearson *et al.*, 1993) splicing, transcript stability, ribosome loading, and translation initiation and elongation (reviewed by Pfannschmidt, 2003). This section focuses on the two types of signals that reflect the photosynthetic redox reactions to the transcriptional control of the photosynthesis-related genes encoded in the plastid: a PQ pool-priming signal and a dithiol signal mediated by thioredoxin and glutathione. Finally we briefly discuss the regulation of plastid related nuclear-gene expression through redox signals in chloroplasts.

A. PQ Redox-Priming Signal as a Regulator of Transcription in Chloroplasts

PSI and PSII are preferentially excited by light at 650 nm (light 1) and light at 560 nm (light 2), respectively. The dominant excitation of PSII by light 2 causes the reduction of the plastoquinone (PQ) in the PQ pool to the plastoquinol (PQH₂), while the dominant excitation of PSI by light 1 causes the oxidation of the PQH₂. Exposure to light 1 or light 2 changes the transcription activities of *psbA* and *psaAB* in the opposite way: *psbA* transcription is elevated by exposure to light 1, while *psaAB* transcription decreases upon exposure to light 1 but increases upon

exposure to light 2 (Pfannschmidt *et al.*, 1999). The PQ pool reduction by light 2 is experimentally mimicked by the application of DBMIB, an inhibitor to block electron flow from the PQ pool to *cyt b₆f*, and conversely the PQ pool oxidation by light 1 is mimicked by DCMU, an inhibitor to block electron flow from PSII to the PQ pool. The treatment of isolated chloroplasts with DBMIB increases *psaAB* transcription activity, while that with DCMU decreases it (Pfannschmidt *et al.*, 1999), being consistent with the above-mentioned changes in *psaAB* transcription activity which are caused by the light 2–driven reduction and the light 1–driven oxidation. These experiments suggest that a change in the redox state of the PQ pool generated from an imbalance of excitation energy distribution between PSII and PSI acts as a signal to adjust the relative number of PSII and PSI in favor of a rate-limiting one through control of their gene expression.

The effect of the redox signal on the photosynthesis-related gene expression has also been studied in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 using lights with different wavelengths. A shift from PSI-absorbed light to PSII-absorbed light increases the transcript level of *psaE* encoding the subunit PsaE of PSI, while the reverse light shift increases the transcript level of *psbA* encoding the D1 protein of PSII but decreases that of *psaE* (Alfonso *et al.*, 2000; Bissati and Kirilovsky, 2001). Contrary to the case in higher plants, the treatment with the inhibitors, both DCMU and DBMIB, induces the enhancement of the mRNA levels of both *psbA* and *psaE* under light conditions (Bissati and Kirilovsky, 2001). This experiment suggests that in *Synechocystis* sp. PCC6803, the redox signal originating from a compound located between the PQ pool and PSI rather than the PQ pool (supposedly *cyt b₆f*) affects the expression of PSI and PSII genes in the opposite way (Alfonso *et al.*, 1999; Bissati and Kirilovsky, 2001). In the signal transduction system which links changes of the redox state to the activation of the photosynthesis- and photopigment-related gene expression in *Synechocystis* sp. PCC6803, a bacterial two-component system consisting of a sensor histidine kinase RppB and a response regulator RppA has been supposed to be involved, although the precise mechanism remains to be revealed (Li and Sherman, 2000). This type of two-component system has not been identified in the chloroplast signal transduction system yet.

B. Modification of PEP Controlled by Thiol Redox State

Two different forms of PEP, A and B, have been isolated from chloroplasts and non-photosynthetic plastids, such as etioplasts, respectively, of mustard (*Sinapis alba*) (Eisermann *et al.*, 1990; Pfannschmidt and Link, 1994, 1997; reviewed in Link, 2001). These two types of PEPs are distinct in the biochemical properties: the B type has a subunit structure similar to a simple eubacteria-type RNA polymerase, while the A type, a major RNA polymerase in chloroplasts, is assembled with at least 15 subunits (Pfannschmidt *et al.*, 2000). Unlike the B-type, the A-type is resistant against rifampicin. Furthermore, these B-

and A-type PEPs are different in the binding affinity of σ factor for core enzyme: in the B-PEP σ factor binds to the core enzyme more strongly than in the A-PEP (Tiller *et al.*, 1991; Tiller and Link, 1993b). The difference in the binding affinity between B- and A-type PEPs is attributed to the reversible phosphorylation/dephosphorylation of the PEP components. The *in vitro* reconstitution assay has shown that the interaction between core and σ factor becomes tight when both of them from chloroplasts (A-type) are phosphorylated by the kinase from bovine heart, implying that phosphorylation alters PEP from the A-type to the B-type in the binding behavior of core and σ factor (Tiller and Link, 1993b). Conversely, when PEP from etioplasts (B-type) is treated with calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP), the holo-PEP complex dissociates, implying that dephosphorylation alters PEP from the B-type to the A-type in its binding behavior (Tiller and Link, 1993b).

A Ser/Thr-type plastid transcription kinase (PTK), recently cloned (Ogrzewalla *et al.*, 2002), has been identified as one of the PEP-associated accessory proteins in *Sinapis alba* (Baginsky *et al.*, 1997). PTK phosphorylates the PEP core enzyme and/or σ subunit ATP-dependently to inactivate PEP (Baginsky *et al.*, 1997, 1999; Ogrzewalla *et al.*, 2002). PTK activity is regulated not only by the phosphorylation state of PTK itself but also by the thiol redox state of glutathione in *Sinapis alba* (Baginsky *et al.*, 1997, 1999; reviewed in Link, 2001). In chloroplasts under high irradiance, phosphorylated active PTK is downregulated by an increase in GSH to GSSG ratio of the glutathione molecule, resulting in an increase in the dephosphorylated active PEP (Baginsky *et al.*, 1999; Baena-González *et al.*, 2001; Ogrzewalla *et al.*, 2002). In darkness, PTK is activated by an increase in GSSG to GSH ratio, resulting in an increase in the phosphorylated inactive form of PEP (Baginsky *et al.*, 1999; Baena-González *et al.*, 2001; Ogrzewalla *et al.*, 2002). This is consistent with the fact that in the light, the non-phosphorylated σ factor, which weakly binds to the non-phosphorylated core, is easily released from the initiation complex, allowing the efficient elongation. By contrast, in the dark, the phosphorylated σ factor and core enzyme form a tight complex with DNA template, interfering with the subsequent release of σ subunit (Tiller and Link, 1993b).

C. Regulation of Plastid-Related Nuclear Gene Expression Through Redox Signals in Chloroplasts

The expression of nuclear-encoded plastid components is controlled by a number of signals, such as tetrapyrroles and sugar signaling (reviewed in Surpin *et al.*, 2002; Pfannschmidt, 2003). The chloroplast redox signals are also implicated indirectly in regulating the expression of various nuclear-encoded genes. The promoters of nuclear genes encoding PSI subunits, *psaD* and *psaF*, are activated in response to a reduction signal generated by light 1 to light 2 shift, which is inhibited by DCMU treatment in *Sinapis alba* (Pfannschmidt *et al.*, 2001). Such a light quality-dependent regulation of nuclear-encoded *psaD*

and *psaF* achieves the PS stoichiometry adjustment cooperating with the redox-regulated synthesis of chloroplast genes, such as *psaA* and *psaB* (Pfannschmidt *et al.*, 1999). The nuclear genes for chlorophyll-binding proteins of the light-harvesting complex are also regulated by the redox state of the PQ pool in unicellular algae (Escoubas *et al.*, 1995; Maxwell *et al.*, 1995). In addition to the nuclear-encoded PSI and PSII genes, the transcription and mRNA stability of ferredoxin (Fd) gene are controlled by photosynthetic electron transport (Petracek *et al.*, 1997, 1998), and the transcription of the nitrate reductase (NR) gene is regulated by the redox signal generated on the reducing side of PSI (Sherameti *et al.*, 2002).

Recently it has been reported that the expression of σ factor proteins is regulated by redox signaling in cyanobacteria (Imamura *et al.*, 2003). In *Synechocystis* PCC 6803, nine genes for σ factor, *sigA* to *sigI*, have been identified. Among them, expression of *sigD* and *sigB* seems to be under the control of the redox state. The reduction of an unknown component located upstream of the PQ pool (corresponding to the light condition) induces SigD protein expression, while the oxidation of another unknown component located downstream of the PQ pool (corresponding to the dark condition) induces SigB protein expression (Imamura *et al.*, 2003). This suggests a possibility that the redox state in chloroplasts affects the expression of some σ factors in the nucleus in higher plants. If this is the case also in higher plants, σ factor plays a key role in fine-tuning the plastid-gene expression in response to the changing light conditions through a putative chloroplast-to-nucleus signal transduction pathway.

The signaling-transduction pathway from the thylakoid membranes to the cytoplasm still remains unclear. As one of the potential candidates, it has been proposed that photosynthesis-derived H_2O_2 , a membrane-permeable component, transmits the redox signal from chloroplasts to nucleus passing through the envelope membrane of chloroplasts, and eventually activating a cytosolic mitogen-activated protein kinase cascade (Kovtun *et al.*, 2000).

VI. CIRCADIAN-REGULATED TRANSCRIPTION IN CHLOROPLASTS

Circadian clocks, which continue to oscillate with a period of about 24 h under constant conditions, are biological timing processes ubiquitously observed in organisms from cyanobacteria to higher plants and mammals (Dunlap, 1999). The endogenous clock synchronizes various biological activities to adapt them to the daily changes in the external environment, such as light and temperature. In plants, photosynthetic activity is one of the representative phenomena under clock control (Sweeney, 1987) and it is partially regulated during gene expression (Harmer *et al.*, 2000). In addition, the circadian regulation of photosynthesis-related genes is widespread not only in the nucleus, but also in the chloroplast. In this section, we review circadian transcription in chloroplast genomes in algae and higher plants, and discuss

the possible molecular mechanisms involved in generating transcriptional rhythm in chloroplasts.

The first report of the clock-regulated gene expression in the chloroplast was the diurnal oscillation in mRNA abundance for elongation factor Tu (*tufA*) in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Hwang *et al.*, 1996). This robust oscillation is primarily regulated at a transcriptional level. Furthermore, run-on transcription experiments for the other chloroplast-encoded genes have revealed that transcription of most plastid-encoded genes is under a clock control (Hwang *et al.*, 1996).

As a possible mechanism involved in the global regulation of plastid transcription in *Chlamydomonas*, it has been proposed that DNA topology is controlled by a clock. Indeed, changes in DNA topology were demonstrated to affect chloroplast transcription *in vitro* (Stirdivant *et al.*, 1985). Furthermore, in *Chlamydomonas*, the endogenous fluctuation of DNA superhelicity in plastid nucleoids was shown to correlate with the circadian change in transcription rate (Salvador *et al.*, 1998). A similar regulation mechanism has been proposed in cyanobacteria. The majority of genes of cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 exhibit circadian oscillations in transcription (Liu *et al.*, 1995). In the circadian system, it is likely that a clock gene product KaiC primarily coordinates genome-wide transcription, through KaiC-dependent changes in the condensation and/or supercoiling status of *Synechococcus* chromosomes (Mori *et al.*, 2002; Nakahira *et al.*, 2004).

In chloroplasts of higher plants, *psbDBLRP* is the first promoter whose activity was found to be under control of a circadian clock (Nakahira *et al.*, 1998). The transcript level derived from the *psbDBLRP* is also under control of a circadian clock in several higher plants including rice (Chen *et al.*, 1995), wheat (Nakahira *et al.*, 1998), barley (Thum *et al.*, 2001), and tobacco (Thum *et al.*, 2001). These lines of evidence together with the fact that nucleotide sequences of the *psbDBLRP* are highly conserved in monocots and dicots and black pine (Christopher *et al.*, 1992; Hoffer and Christopher, 1997) strongly suggest that the transcription activity of the *psbDBLRP* is commonly regulated by a circadian clock in chloroplasts in higher plants. The transcript level of *psbA* was also shown to exhibit a minor diurnal fluctuation that is probably due to much higher stability of the *psbA* mRNA compared with the transcript of *psbDBLRP* (Nakahira *et al.*, 1998). No apparent evidence has been provided to support circadian expression of other plastid-encoded transcripts except *psbD* and *psbA*. In *Arabidopsis*, however, an enhancer trap experiment revealed that about one-third of the promoters for nuclear-encoded genes displayed circadian-regulated transcription (Michael and McClung, 2003), which was much higher than estimates (2 to 6 percent of nuclear genome) based on microarray analyses of steady-state mRNA abundance (Harmer *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001). This may be explained by the fact that mRNA abundance could not strictly reflect the transcriptional activity when the transcript is stable. Since the previous survey of circadian expression of plastid-encoded genes was restricted to only a few relatively abundant transcripts (Piechulla,

1993), it seems to be worthwhile to re-examine the circadian-regulated plastid transcription in higher plants. A comprehensive analysis of transcriptional activity, not transcript abundance of the overall plastid genes may lead to the discovery of novel clock-controlled genes.

Previously it was demonstrated that an unusual PEP core promoter structure of *psbDBL*RP, lacking a typical -35 confers circadian- and light-regulated transcription upon the promoter (Nakahira *et al.*, 1998). This suggests that *Sig5*, which can recognize the unusual core promoter is under the control of a circadian clock and light. In cyanobacteria, sigma factors work as molecular mediators to convey circadian information to downstream gene expressions (Tsinoremas *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 2002). As described above, the unique sigma factor SIG5 is essential for light-dependent transcription of *psbDBL*RP in *Arabidopsis* (Tsunoyama *et al.*, 2004). SIG5 may also convey the information from the circadian oscillator in the nucleus to the *psbDBL*RP in plastids. Indeed, it has been reported that the expression of *Sig1* shows a circadian rhythm in wheat (Morikawa *et al.*, 1999) and tobacco (Oikawa *et al.*, 2000), suggesting that SIG1 is involved in the circadian transcription of the plastid genes.

Finally, it is intriguing to discuss the evolutionary origin of a circadian oscillator generating rhythmic transcription in chloroplasts. Since the chloroplast is thought to be an organelle derived from an endosymbiotic ancestor like cyanobacteria, it is possible to assume that an ancient circadian clock still exists in chloroplasts. However, this hypothesis should be discarded, because de novo protein synthesis in the cytoplasm is required for circadian transcription of chloroplast-encoded genes in *Chlamydomonas* (Kawazoe *et al.*, 2000) and light-induced transcription of the *psbDBL*RP in barley (Gamble and Mullet, 1989). Moreover *kai* genes, crucial for circadian rhythm in cyanobacteria (Ishiura *et al.*, 1998) have not been detected in eukaryotes. Alternatively, it is more likely that a nuclear-based oscillator directs a mediator(s), for example, sigma factor, to regulate transcription in chloroplasts. Recently several nuclear genes essential for a circadian system in higher plants have been identified by genetic approaches (Schultz and Kay, 2003). Analysis of the causal relationship between the clock genes and circadian transcription of the *psbDBL*RP should unravel the detailed mechanism coupling the temporal programs of the two distinct genomes.

VII. PLASTID PROMOTERS FOR PLASTID GENETIC ENGINEERING

Transgenic plastids provide unique advantages in plant biotechnology, including readily obtainable high foreign protein expression, uniform transgene expression through site-specific homologous recombination, expressing multiple proteins from polycistronic mRNA, and gene containment through the lack of pollen transmission (Daniell, 2002). Applications of plastid transformation in higher plants have been reviewed elsewhere (Heifetz, 2000; Bock, 2001; Heifetz and Tuttle, 2001; Maliga, 2002; Daniell *et al.*, 2002).

To obtain high levels of protein plastid expression cassettes must satisfy at least two criteria. First, the mRNA must accumulate to a high level as ensured by a strong promoter and stable mRNA. Second, the mRNA must be translated efficiently. Plastid expression cassettes consist of a 5'-regulatory promoter region (PR) and a 3'-regulatory terminator region (TR) and have restriction sites at their boundaries to facilitate cloning. PR includes a promoter and translation control sequences existing in the mRNA 5'-untranslation region (5'-UTR) or the amino-terminus of the coding region. TR encodes the mRNA 3'-UTR, including a stem-loop structure and functions as a terminator of transcription of transgenes. 3'-UTRs of *psbA*, *rbcL*, and *rps16* genes are commonly used for TR.

Among a number of plastid promoters, activity of the *psbA* promoter and the *rRNA* operon promoter (*Prrn*) is extraordinarily strong. The *psbA* gene is transcribed from the *psbA* promoter, which is a σ^{70} -type promoter recognized by PEP with the typical conserved -10 and -35 elements and TATATA sequence between -10 and -35 hexamers resembling the TATA-box of nuclear genes transcribed by RNA polymerase II (Link, 1994). In addition, wheat and barley *psbA* promoters have the TGn motif upstream of the -10 element, which is referred to as extended -10 element. Utilization of these two extra cis elements in developmental timing and light activation of the *psbA* transcription is different among plant species (reviewed in Liere and Maliga, 2001). Because of light-dependent strong activity of the *psbA* promoter, the *psbA* 5'UTR containing the *psbA* promoter has been used for overexpression of several foreign proteins in photosynthetic green tissues (Staub and Maliga, 1994; Eibl *et al.*, 1999; Fernandez San Millan *et al.*, 2003; Dhingra *et al.*, 2004; Devine and Daniell, 2004; Daniell *et al.*, 2004).

Plastid transformation in crop plants with the plastid vector that can function in green and non-green tissues, was first achieved in tomato (Ruf *et al.*, 2001) and recently in carrot (Kumar *et al.*, 2004). In these works, a full-length *Prrn* was used as the promoter in the expression cassettes. The *Prrn* consists of multiple promoters including a strong σ^{70} -type PEP promoter (P1) and a non-consensus-type NEP promoter (Pc), both of which function in green tissues and a consensus-type NEP promoter (P2), which functions in non-green tissues and in plants lacking PEP (Allison *et al.*, 1996) (see section II). Transplastomic tomato (*Lycopersicon esculentus*) designed to produce *aadA* (gene of aminoglycoside 3'-adenyltransferase) under control of *Prrn* produced fruits and viable seeds and expressed the transgene in chromoplasts in the fruit to 50% of the expression levels in leaf chloroplast (Ruf *et al.*, 2001). High-level of betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) was expressed in cultured cells, roots, and leaves of carrot (*Daucus carota*) by using a carrot-specific plastid transformation vector (Kumar *et al.*, 2004). This vector harbored the full-length *Prrn*, the *aadA* gene regulated by the Shine-Dalgarno sequence/*psbA* 3'UTR and the *badh* gene regulated by the 5' ribosome-binding site region of bacteriophage T7 gene 10 5'UTR capable of efficient translation in both the dark and light, in non-green as well as green

tissues (Guda *et al.*, 2000; Dhingra *et al.*, 2004) *lrps16* 3'UTR. Transformation of carrot with the vector facilitated 74.8 percent BADH expression in non-green edible parts containing chromoplasts (grown under the ground in the dark) and 53 percent in proplastids (in culture cells) when compared to chloroplasts (100 percent) in leaves and conferred tolerance against high concentrations of NaCl (up to 400 mM).

We recently found that *psbD*BLRP is recognized only by Sig5 in *Arabidopsis thaliana* (Tsunoyama *et al.*, 2004), demonstrating the presence of strict selective usage of a special σ factor for a unique promoter in plastid transcription. This fact suggests a possibility to create a novel plastid engineering system capable of overexpression of transgenes with a highly reduced disturbance of endogenous plastid gene expression by constructing a pair of artificially modified σ and the corresponding modified promoter and introducing them into nuclear and plastid genomes, respectively.

REFERENCES

- Alfonso, M., Perewoska, I., Constant, S., and Kirilovsky, D. 1999. Redox control of *psbA* expression in cyanobacterium *Synechocystis* strains. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **48**: 104–113.
- Alfonso, M., Perewoska, I., and Kirilovsky, D. 2000. Redox control of *psbA* gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome *b₆f* complex. *Plant Physiol.* **122**: 505–516.
- Allen, J. F. and Pfannschmidt, T. 2000. Balancing the two photosystems: Photosynthetic electron transfer governs transcription of reaction centre genes in chloroplasts. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **355**: 1351–1359.
- Allison, L. A. 2000. The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie* **82**: 537–548.
- Aro, E. M., Virgin, I., and Andersson, B. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**: 113–134.
- Allison, L. A. and Maliga, P. 1995. Light-responsive and transcription-enhancing elements regulate the plastid *psbD* core promoter. *EMBO J.* **14**: 3721–3730.
- Allison, L. A., Simon, L. D., and Maliga, P. 1996. Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *EMBO J.* **11**: 2802–2809.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.
- Baba, K., Nakano, T., Yamagishi, K., and Yoshida, S. 2001. Involvement of a nuclear-encoded basic helix-loop-helix protein in transcription of the light-responsive promoter of *psbD*. *Plant Physiol.* **125**: 595–603.
- Baba, K., Schmidt, J., Espinosa-Ruiz, A., Villarejo, A., Shiina, T., Gardestrom, P., Sane, A. P., and Bhalerao, R. P. 2004. Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *rpoT2* mutant of *Arabidopsis*. *Plant J.* **38**: 38–48.
- Baena-Gonzalez, E., Baginsky, S., Mulo, P., Summer, H., Aro, E. M., and Link, G. 2001. Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. *Plant Physiol.* **127**: 1044–1052.
- Baeza, L., Bertrand, A., Mache, R., and Lerbs-Mache, S. 1991. Characterization of a protein binding sequence in the promoter region of the 16S rRNA gene of the spinach chloroplast genome. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3577–3581.
- Baginsky, S., Tiller, K., and Link, G. 1997. Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Mol. Biol.* **34**: 181–189.
- Baginsky, S., Tiller, K., Pfannschmidt, T., and Link, G. 1999. PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid in vitro transcription. *Plant Mol. Biol.* **39**: 1013–1023.
- Barne, K. A., Brown, J. A., Busby, S. J. W., and Minchin, S. D. 1997. Region 2.5 of the *Escherichia Coli* RNA polymerase sigma 70 subunit is responsible for the recognition of the λ -extended 10' motif at promoters. *EMBO J.* **13**: 4040–4043.
- Baumgartner, B. J., Rapp, J. C., and Mullet, J. E. 1993. Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in Barley (*Hordeum vulgare*) chloroplast development. *Plant Physiol.* **101**: 781–791.
- Bissati, E. K. and Kirilovsky, D. 2001. Regulation of *psbA* and *psaE* expression by light quality in *Synechocystis* species PCC6803. A redox control mechanism. *Plant Physiol.* **125**: 1988–2000.
- Bligny, M., Courtois, F., Thamin, S., Chang, C. C., Lagrange, T., Baruah-Wolff, J., Stern, D., and Lerbs-Mache, S. 2000. Regulation of plastid rDNA transcription by interaction of CDF2 with two different RNA polymerases. *EMBO J.* **19**: 1851–1860.
- Bock, R. 2001. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *J. Mol. Biol.* **312**: 425–438.
- Brahamasha, B. and Haselkorn, R. 1991. Isolation and characterization of the gene encoding the principal sigma factor of the vegetative cell RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120. *J. Bacteriol.* **173**: 2442–2450.
- Brahamasha, B. and Haselkorn, R. 1992. Identification of multiple RNA polymerase sigma factor homologs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120: Cloning, expression, and inactivation of the sigB and sigC genes. *J. Bacteriol.* **174**: 7273–7282.
- Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M. L., and Darst, S. A. 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell* **9**: 527–539.
- Chang, C. C., Sheen, J., Bligny, M., Niwa, Y., Lerbs-Mache, S., and Stern, D. B. 1999. Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *Plant Cell* **11**: 911–926.
- Chen, M. C., Cheng, M. C., and Chen, S. C. G. 1993. Characterization of the promoter of rice plastid *psaA-psaB-rps14* operon and the DNA-specific binding proteins. *Plant Cell Physiol.* **34**: 577–584.
- Chen, S. C. G., Wu, S. P., Lo, P. K., Mon, D. P., and Chen, L. F. O. 1995. Regulation of plastid photosynthetic *psbK-I-D-C* gene expression by light in rice plants. *Physiol. Plant* **93**: 617–623.
- Cheng, M. C., Wu, S. P., Chen, L. F. O., and Chen, S. C. G. 1997. Identification and characterization of a spinach chloroplast DNA-binding protein that interacts specifically with the plastid *psaA-psaB-rps14* promoter region. *Planta* **203**: 373–380.
- Christopher, D. A., Kim, M., and Mullet, J. E. 1992. A novel light-regulated promoter is conserved in cereal and dicot chloroplasts. *Plant Cell* **4**: 785–798.
- Christopher, D. A., Li, X., Kim, M., and Mullet, J. E. 1997. Involvement of protein kinase and extraplasmidic serine/threonine protein phosphatases in signaling pathways regulating plastid transcription and the *psbD* blue light-responsive promoter in barley. *Plant Physiol.* **113**: 1273–1282.
- Christopher, D. A. and Mullet, J. E. 1994. Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated *psbD-psbC* transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant Physiol.* **104**: 1119–1129.
- Daniell, H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* **20**: 581–586.
- Daniell, H., Khan, M. S., and Allison, L. 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: An environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci.* **7**: 84–91.
- Daniell, H., Ruiz, O. N., and Dhingra, A. 2004. Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits. *Methods Mol. Biol.* **286**: 111–138.
- Deng, X. W. and Gruissem, W. 1987. Control of plastid gene expression during development: The limited role of transcriptional regulation. *Cell* **49**: 379–387.

- Devine, A. L. and Daniell, H. 2004. In: *Plastids, Annual Plant Reviews*. vol. 13, chap. 10. Moller, S., Ed., Blackwell, Oxford, in press.
- Dhingra, A., Portis, A. R. Jr, and Daniell, H. 2004. Enhanced translation of a chloroplast-expressed RbcS gene restores small subunit levels and photosynthesis in nuclear RbcS antisense plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 6315–6320.
- DuBell, A. N. and Mullet, J. E. 1995. Differential transcription of pea chloroplast genes during light-induced leaf development. *Plant Physiol.* **109**: 105–112.
- Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271–290.
- Eibl, C., Zou, Z., Beck, A., Kim, M., Mullet, J., and Koop, H. U. 1999. In vivo analysis of plastid psbA, rbcL and rpl32 UTR elements by chloroplast transformation: Tobacco plastid gene expression is controlled by modulation of transcript levels and translation efficiency. *Plant J.* **19**: 333–345.
- Eisermann, A., Tiller, K., and Link, G. 1990. In vitro transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard (*Sinapis alba*) indicate differential usage of the psbA promoter. *EMBO J.* **9**: 3981–3987.
- Escoubas, J. M., Lomas, M., Laroche, J., and Falkowski, P. G. 1995. Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10237–10241.
- Fernandez-San Millan, A., Mingo-Castel, A., Miller, M., and Daniell, H. 2003. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol. J.* **1**: 71–79.
- Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K., and Takahashi, H. 2000. Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **481**: 47–52.
- Galli, G., Hofstetter, H., and Birnstiel, M. L. 1981. Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements. *Nature* **294**: 626–631.
- Gamble, P. E. and Mullet, J. E. 1988. Translation and stability of proteins encoded by the plastid psbA and psbB genes are regulated by a nuclear gene during light-induced chloroplast development in barley. *J. Biol. Chem.* **264**: 7236–7243.
- Gamble, P. E. and Mullet, J. E. 1989. Blue light regulates the accumulation of two psbD-psbC transcripts in barley chloroplasts. *EMBO J.* **8**: 2785–2794.
- Gardella, T., Moyle, T., and Susskind, M. M. 1989. A mutant Escherichia coli sigma 70 subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Mol. Biol.* **206**: 579–590.
- Gross, C. A., Chan, C., Domboski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., and Young, B. 1998. The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**: 141–155.
- Gruissem, W., Elsner-Menzel, C., Latshaw, S., Narita, J. O., Schaffer, M. A., and Zurawski, G. 1986. A subpopulation of spinach chloroplast tRNA genes does not require upstream promoter elements for transcription. *Nucleic Acids Res.* **14**: 7541–7556.
- Guda, C., Lee, S. B., and Daniell, H. 2000. *Plant Cell Rep.* **19**: 257–262.
- Hajdukiewicz, P. T. J., Allison, L. A., and Maliga, P. 1997. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* **16**: 4041–4048.
- Haldrup, A., Jensen, P. E., Lunde, C., and Scheller, H. V. 2001. Balance of power: A view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.* **6**: 301–305.
- Han, C. D., Coe, E. H. Jr., and Martienssen, R. A. 1992. Molecular cloning and characterization of iojap (ij), a pattern striping gene of maize. *EMBO J.* **11**: 4037–4046.
- Hanaoka, M., Kanamaru, K., Takahashi, H., and Tanaka, K. 2003. Molecular genetic analysis of chloroplast gene promoters dependent on SIG2, a nucleus-encoded sigma factor for the plastid-encoded RNA polymerase, in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 7090–7098.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A., and Kay, S. A. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* **290**: 2110–2113.
- Hedtke, B., Borner, T., and Weihe, A. 1997. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* **277**: 809–811.
- Hedtke, B., Borner, T., and Weihe, A. 2000. One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.* **1**: 435–440.
- Hedtke, B., Legen, J., Weihe, A., Herrmann, R. G., and Borner, T. 2002. Six active phage-type RNA polymerase genes in *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* **30**: 625–637.
- Heifetz, P. B. 2000. Genetic engineering of the chloroplast. *Biochimie* **82**: 655–666.
- Heifetz, P. B. and Tuttle, A. M. 2001. Protein expression in plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 157–161.
- Helmann, J. D. and Chamberlin, M. J. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 839–872.
- Hess, W. R. and Börner, T. 1999. Organellar RNA polymerases of higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **190**: 1–59.
- Hess, W. R., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A. R., and Borner, T. 1993. Chloroplast rps15 and the rpoB/C1/C2 gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: Evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *EMBO J.* **12**: 563–571.
- Hoffer, P. H. and Christopher, D. A. 1997. Structure and blue-light-responsive transcription of a chloroplast psbD promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**: 213–222.
- Homann, A. and Link, G. 2003. DNA-binding and transcription characteristics of three cloned sigma factors from mustard (*Sinapis alba* L.) suggest overlapping and distinct roles in plastid gene expression. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1288–1300.
- Hu, J. and Bogorad, L. 1990. Maize chloroplast RNA polymerase: The 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1531–1535.
- Hübschmann, T. and Börner, T. 1998. Characterization of transcription initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant Mol. Biol.* **36**: 493–496.
- Hwang, S., Kawazoe, R., and Herrin, D. L. 1996. Transcription of tufA and other chloroplast-encoded genes is controlled by a circadian clock in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 996–1000.
- Igloi, G. L. and Kossel, H. 1992. The transcription apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**: 525–558.
- Imamura, S., Asayama, M., Takahashi, H., Tanaka, K., Takahashi, H., and Shirai, M. 2003. Antagonistic dark/light-induced SigB/SigD, group 2 sigma factors, expression through redox potential and their roles in cyanobacteria. *FEBS Lett.* **554**: 357–362.
- Iratni, R., Diederich, L., Harrak, H., Bigny, M., and Lerbs-Mache, S. 1997. Organ-specific transcription of the rrm operon in spinach plastids. *J. Biol. Chem.* **272**: 13676–13682.
- Ishibama, A. 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 499–518.
- Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C. R., Tanabe, A., Golden, S. S., Johnson, C. H., and Kondo, T. 1998. Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**: 1519–1523.
- Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokota, A., and Kobayashi, H. 1997. Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains sigma 70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14948–14953.
- Jarvis, P. 2001. Intracellular signaling: The chloroplast talks! *Curr Biol.* **11**: R307–310.
- Jeong, S. Y., Peffer, N., and Meier, I. 2004. Phosphorylation by protein kinase CKII modulates the DNA-binding activity of a chloroplast nucleoid-associated protein. *Planta* **219**: 298–302.
- Jeong, S. Y., Rose, A., and Meier, I. 2003. MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic Acids Res.* **31**: 5175–5185.
- Kabeya, Y., Hashimoto, K., and Sato, N. 2002. Identification and characterization of two phage-type RNA polymerase cDNAs in the moss *Physcomitrella*

- patens: Implication of recent evolution of nuclear-encoded RNA polymerase of plastids in plants. *Plant Cell Physiol.* **43**: 245–255.
- Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K., and Takahashi, H. 1999. Plastidic RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **40**: 832–842.
- Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K., and Takahashi, H. 2001. An *Arabidopsis* sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **42**: 1034–1043.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Wamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S. 1996a. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109–136.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Wamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S. 1996b. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res.* **3**: 185–209.
- Kapoor, S., Suzuki, J. Y., and Sugiura, M. 1997. Identification and functional significance of a new class of non-consensus-type plastid promoters. *Plant J.* **11**: 327–337.
- Kawazoe, R., Hwang, S., and Herrin, D. L. 2000. Requirement for cytoplasmic protein synthesis during circadian peaks of transcription of chloroplast-encoded genes in *Chlamydomonas*. *Plant Mol. Biol.* **44**: 699–709.
- Kestermann, M., Neukirchen, S., Kloppstech, K., and Link, G. 1998. Sequence and expression characteristics of a nuclear-encoded chloroplast sigma factor from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Res.* **26**: 2747–2753.
- Kim, J. W., Park, J. K., Kim, B. H., Lee, J. S., and Sim, W. S. 2002. Molecular analysis of the accumulation of the transcripts of the large subunit gene of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by light. *Mol. Cells* **14**: 281–287.
- Kim, M., Christopher, D. A., and Mullet, J. E. 1999a. ADP-dependent phosphorylation regulates association of a DNA-binding complex with the barley chloroplast psbD blue-light-responsive promoter. *Plant Physiol.* **119**: 663–670.
- Kim, M. and Mullet, J. E. 1995. Identification of a sequence-specific DNA binding factor required for transcription of the barley chloroplast blue light-responsive psbD-psbC promoter. *Plant Cell* **7**: 1445–1457.
- Kim, M., Thum, K. E., Morishige, D. T., and Mullet, J. E. 1999b. Detailed architecture of the barley chloroplast psbD-psbC blue light-responsive promoter. *J. Biol. Chem.* **274**: 4684–4692.
- Klaff, P. and Gruissem, W. 1991. Changes in Chloroplast mRNA Stability during Leaf Development. *Plant Cell* **5**: 517–529.
- Klein, R. R. and Mullet, J. E. 1987. Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of psbA, psbA-psbB, and rbcL in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Biol. Chem.* **262**: 4341–4348.
- Klein, R. R. and Mullet, J. E. 1990. Light-induced transcription of chloroplast genes. psbA transcription is differentially enhanced in illuminated barley. *J. Biol. Chem.* **265**: 1895–1902.
- Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A. 2003. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J.* **35**: 93–103.
- Kobayashi, Y., Dokiya, Y., and Sugita, M. 2001. Dual targeting of phage-type RNA polymerase to both mitochondria and plastids is due to alternative transcription initiation in single transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 1106–1113.
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., and Sheen, J. 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2940–2945.
- Kowallik, K. V., Stobe, B., Schaffran, I., and Freier, U. 1995. The chloroplast genome of a chlorophyll a, c containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**: 336–342.
- Kumar, S., Dhingra, A., and Daniell, H. 2004. Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* **136**: 2843–2854.
- Lahiri, S. D. and Allison, L. A. 2000. Complementary expression of two plastid-localized sigma-like factors in maize. *Plant Physiol.* **123**: 883–894.
- Lahiri, S. D., Yao, J., McCumbers, C., and Allison, L. A. 1999. Tissue-specific and light-dependent expression within a family of nuclear-encoded sigma-like factors from *Zea mays*. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **1**: 14–20.
- Lam, L. T. and Bresnick, E. H. 1998. Identity of the beta-globin locus control region binding protein HS2NF5 as the mammalian homolog of the notch-regulated transcription factor suppressor of hairless. *J. Biol. Chem.* **273**: 24223–24231.
- Leech, R. M. 1984. Chloroplast Development in Angiosperms: Current knowledge and future prospects. In: *Topics in Photosynthesis: Chloroplast Biogenesis*, Vol. V. pp. 1–21, Baler N. R. and Barber J., Eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Lerbs-Mache, S. 1993. The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: Single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5509–5513.
- Li, H. and Sherman, L. A. 2000. A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **182**: 4268–4277.
- Liere, K., Kaden, D., Maliga, P., and Borner, T. 2004. Overexpression of phage-type RNA polymerase RpoTp in tobacco demonstrates its role in chloroplast transcription by recognizing a distinct promoter type. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1159–1165.
- Liere, K. and Maliga, P. 1999. In vitro characterization of the tobacco rpoB promoter reveals a core sequence motif conserved between phage-type plastid and mitochondrial promoters. *EMBO J.* **18**: 249–257.
- Liere, K. and Maliga, P. 2001. Plastid RNA polymerases in higher plants. In: *Regulation of Photosynthesis*, pp. 29–49, Aro, E. M. and Andersson, B., Eds., Kluwer Academic, Netherlands.
- Lilly, J. W., Maul, J. E., and Stern, D. B. 2002. The *Chlamydomonas reinhardtii* organellar genomes respond transcriptionally and post-transcriptionally to abiotic stimuli. *Plant Cell* **14**: 2681–2706.
- Lin, C. 2002a. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14**: S207–225.
- Lin, C. 2002b. Phototropin blue light receptors and light-induced movement responses in plants. *Sci STKE*: 2002 (118): PE5.
- Link, G. 1994. Plastid differentiation: Organelle promoters and transcription factors. In: *Promoters and Transcription Factors—Results and Problems in Cell Differentiation*. Vol. 20, pp. 65–85. Nover, L., Ed., Springer-Verlag, Berlin.
- Link, G. 2001. Redox regulation of photosynthetic genes. In: *Regulation of Photosynthesis*, pp. 85–107, Aro, E. M. and Andersson, B., Eds., Kluwer Academic, Netherlands.
- Liu, B. and Troxler, R. F. 1996. Molecular characterization of a positively photoregulated nuclear gene for a chloroplast RNA polymerase sigma factor in *Cyanidium caldarium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3313–3318.
- Liu, Y., Tsinoremas, N. F., Johnson, C. H., Lebedeva, N. V., Golden, S. S., Ishiura, M., and Kondo, T. 1995. Circadian orchestration of gene expression in cyanobacteria. *Genes Dev.* **9**: 1469–1478.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C. A. 1992. The sigma 70 family; sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**: 3843–3849.
- Lonetto, M. A., Rhodius, V., Lamberg, K., Kiley, P., Busby, S., and Gross, C. 1998. Identification of a contact site for different transcription activators in

- region 4 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma 70 subunit. *J. Mol. Biol.* **284**: 1353–1365.
- Maliga, P. 1998. Two plastid polymerases of higher plants: An evolving story. *Trends Plant Sci.* **3**: 4–6.
- Maliga, P. 2001. Plastid engineering bears fruit. *Nat. Biotechnol.* **19**: 826–827.
- Maliga, P. 2002. Engineering the plastid genome of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 164–172.
- Matsuzaki, M., Misumi, O., Shin-I, T., Maruyama, S., Takahara, M., Miyagishima, S. Y., Mori, T., Nishida K., Yagisawa, F., Nishida, K., Yoshida, Y., Nishimura, Y., Nakao, S., Kobayashi, T., Momoyama, Y., Higashiyama, T., Minoda, A., Sano, M., Nomoto, H., Oishi, K., Hayashi, H., Ohta, F., Nishizaka, S., Haga, S., Miura, S., Morishita, T., Kabeya, Y., Terasawa, K., Suzuki, Y., Ishii, Y., Asakawa, S., Takano, H., Ohta, N., Kuroiwa, H., Tanaka, K., Shimizu, N., Sugano, S., Sato, N., Nozaki, H., Ogasawara, N., Kohara, Y., and Kuroiwa, T. 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* **428**: 653–657.
- Mattoo, A. K., Marder, J. B., and Edelman, M. 1989. Dynamics of the photosystem II reaction center. *Cell* **56**: 241–246.
- Maxwell, D. P., Laudenbach, D. E., and Huner, N. P. A. 1995. Redox regulation of light-harvesting complex II and *cab* mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol.* **109**: 787–795.
- Michael, T. P. and McClung, C. R. 2003. Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**: 629–639.
- Mochizuki, T., Onda, Y., Fujiwara, E., Wada, M., and Toyoshima, Y. 2004. Two independent light signals cooperating on the activation of a plastid promoter, *psbD* light responsive promoter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **571**: 26–30.
- Moller, S. G., Kim, Y. S., Kunkel, T., and Chua, N. H. 2003. PP7 is a positive regulator of blue light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**: 1111–1119.
- Morden, C. W., Wolfe, K. H., dePamphilis, C. W., and Palmer, J. D. 1991. Plastid translation and transcription genes in a non-photosynthetic plant: Intact, missing and pseudo genes. *EMBO J.* **10**: 3281–3288.
- Mori, T., Saveliev, S. V., Xu, Y., Stafford, W. F., Cox, M. M., Inman, R. B., and Johnson, C. H. 2002. Circadian clock protein KaiC forms ATP-dependent hexameric rings and binds DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 17203–17208.
- Morikawa, K., Ito, S., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y., Shiina, T., and Toyoshima, Y. 1999. Circadian-regulated expression of a nuclear-encoded plastid sigma factor gene (*sigA*) in wheat seedlings. *FEBS Lett.* **451**: 275–278.
- Mullet, J. and Klein, R. 1987. Transcription and mRNA stability are important determinants of higher plants chloroplast RNA levels. *EMBO J.* **6**: 1571–1579.
- Murakami, K. S., Masuda, S., Campbell, E. A., Muzzin, O., and Darst, S. A. 2002a. Structural basis of transcription initiation: An RNA polymerase holoenzyme/DNA complex. *Science* **296**: 1285–1290.
- Murakami, K. S., Masuda, S., and Darst, S. A. 2002b. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* **296**: 1280–1284.
- Murakami, S., Kondo, Y., Nakano, T., and Sato, F. 2000. Protease activity of CND41, a chloroplast nucleoid DNA-binding protein, isolated from cultured tobacco cells. *FEBS Lett.* **468**: 15–18.
- Nagashima, A., Hanaoka, M., Shikanai, T., Fujiwara, M., Kanamaru, K., Takahashi, H., and Tanaka, K. 2004. The multiple-stress responsive plastid sigma factor, Sig5, directs activation of the *psbD* blue light-responsive promoter (BLRP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**: 357–368.
- Nair, U., Ditty, J. L., Min, H., and Golden, S. S. 2002. Roles for sigma factors in global circadian regulation of the cyanobacterial genome. *J. Bacteriol.* **184**: 3530–3538.
- Nakahira, Y., Baba, K., Yoneda, A., Shiina, T., and Toyoshima, Y. 1998. Circadian-regulated transcription of the *psbD* light-responsive promoter in wheat chloroplasts. *Plant Physiol.* **118**: 1079–1088.
- Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T., and Kondo, T. 2004. Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 881–885.
- Nakano, H., Makino, A., and Mae, T. 1997. The effect of elevated partial pressures of CO₂ on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Plant Physiol.* **115**: 191–198.
- Neuhaus, H. 1989. Nucleotide sequence of the chloroplast genes for tRNA(Gln) and the 4 kD K polypeptide of photosystem II from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Res.* **17**: 444.
- Neuhaus, H., Pfannschmidt, T., Link, G. 1990. Nucleotide sequence of the chloroplast *psbI* and *trnS-GCU* genes from mustard (*Sinapis alba*). *Nucleic Acids Res.* **18**: 368.
- Nickelsen, J. and Link, G. 1990. Nucleotide sequence of the mustard chloroplast genes *trnH* and *rps19'*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1051.
- Ogrzewalla, K., Piotrowski, M., Reinbothe, S., and Link, G. 2002. The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.) A nuclear-encoded CK2-type chloroplast kinase with redox-sensitive function. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3329–3337.
- Ohmori, M., Ikeuchi, M., Sato, N., Wolk, P., Kaneko, T., Ogawa, T., Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okamoto, S., Yoshimura, H., Katoh, H., Fujisawa, T., Ehira, S., Kamei, A., Yoshihara, S., Narikawa, R., and Tabata, S. 2001. Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain 7120. *DNA Res.* **8**: 271–284.
- Ohta, N., Matsuzaki, M., Misumi, O., Miyagishima, S. Y., Nozaki, H., Tanaka, K., Shin-I, T., Kohara, Y., and Kuroiwa, T. 2003. Complete sequence and analysis of the plastid genome of the unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *DNA Res.* **10**: 67–77.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., and Ozeki, H. 1986. Complete nucleotide sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* **4**: 148–175.
- Oikawa, K., Fujiwara, M., Nakazato, E., Tanaka, K., and Takahashi, H. 2000. Characterization of two plastid sigma factors, SigA1 and SigA2, that mainly function in matured chloroplasts in *Nicotiana tabacum*. *Gene* **261**: 221–228.
- Oikawa, K., Tanaka, K., and Takahashi, H. 1998. Two types of differentially photo-regulated nuclear genes that encode sigma factors for chloroplast RNA polymerase in the red alga *Cyanidium caldarium* strain RK-1. *Gene* **210**: 277–285.
- Palmer, J. D. 1991. Plastid chromosomes: Structure and evolution. In: *The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology of Plastid*, pp. 5–53, Bogorad, L., and Vasil, I. K., Eds., Academic Press, San Diego.
- Pearson, C. K., Wilson, S. B., Schaffer, R., and Ross, A. W. 1993. NAD turnover and utilization of metabolites for RNA synthesis in a reaction sensing the redox states of the cytochrome *b₆f* in isolated chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **218**: 397–404.
- Petracek, M. E., Dickey, L. F., Huber, S. C., and Thompson, W. F. 1997. Light-regulated changes in abundance and polyribosome association of ferredoxin mRNA are dependent on photosynthesis. *Plant Cell* **9**: 2291–2300.
- Petracek, M. E., Dickey, L. F., Nguyen, T. T., Gatz, C., Sowinski, D. A., Allen, G. C., and Thompson, W. F. 1998. Ferredoxin-1 mRNA is destabilized by changes in photosynthetic electron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9009–9013.
- Pfannschmidt, T. 2003. Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science* **8**: 33–41.
- Pfannschmidt, T. and Link, G. 1994. Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol. Biol.* **25**: 69–81.
- Pfannschmidt, T. and Link, G. 1997. The A and B forms of plastid DNA-dependent PNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant Mol. Biol.* **25**: 69–81.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., and Allen, J. F. 1999. Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**: 625–628.
- Pfannschmidt, T., Ogrzewalla, K., Baginsky, S., Sickmann, A., Meyer, H. E., and Link, G. 2000. The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.): integration of a prokaryotic core into a larger complex with organelle-specific functions. *Eur. J. Biochem.* **267**: 253–261.

- Pfannschmidt, T., Schutze, K., Brost, M., and Oelmüller, R. 2001. A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplasts during photosystem stoichiometry adjustment. *J. Biol. Chem.* **276**: 36125–36130.
- Piechulla, B. 1993. Circadian clock directs the expression of plant genes. *Plant Mol. Biol.* **22**: 533–542.
- Privat, I., Hakimi, M. A., Buhot, L., Favory, J. J., and Lerbs-Mache, S. 2003. Characterization of Arabidopsis plastid sigma-like transcription factors SIG1, SIG2 and SIG3. *Plant Mol. Biol.* **55**: 385–399.
- Rapp, J. C., Baumgartner, B. J., and Mullet, J. 1992. Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes. Transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; predicted mRNA stabilities vary 30-fold. *J. Biol. Chem.* **267**: 21404–21411.
- Richter, U., Kiessling, J., Hedke, B., Decker, E., Reski, R., Borner, T., and Weihe, A. 2002. Two RpoT genes of *Physcomitrella patens* encode phage-type RNA polymerases with dual targeting to mitochondria and plastids. *Gene* **290**: 95–105.
- Rodermel, S. 2001. Pathways of plastid-to-nucleus signaling. *Trends Plant Sci.* **6**: 471–478.
- Ruf, S., Herrmann, M., Berger, I. J., Carrer, H., and Bock, R. 2001. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol.* **19**: 870–875.
- Salvador, M. L., Klein, U., and Bogorad, L. 1998. Endogenous fluctuations of DNA topology in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell Biol.* **18**: 7235–7242.
- Sato, N., Albricieux, C., Joyard, J., Douce, R., and Kuroiwa, T. 1993. Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *EMBO J.* **12**: 555–561.
- Sato, N., Ohshima, K., Watanabe, A., Ohta, N., Nishiyama, Y., Joyard, J., and Douce, R. 1998. Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *Plant Cell* **10**: 859–872.
- Sato, N. and Ohta, N. 2001. DNA-binding specificity and dimerization of the DNA-binding domain of the PEND protein in the chloroplast envelope membrane. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2244–2250.
- Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K., and Kabaya, Y. 2003. Organization, developmental dynamics, and evolution of plastid nucleoids. *Int. Rev. Cytol.* **232**: 217–262.
- Satoh, J., Baba, K., Nakahira, Y., Shiina, T., and Toyoshima, Y. 1997. Characterization of dynamics of the psbD light-induced transcription in mature wheat chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **33**: 267–278.
- Satoh, J., Baba, K., Nakahira, Y., Tsunoyama, Y., Shiina, T., and Toyoshima, Y. 1999. Development stage-specific multisubunit plastid RNA polymerase (PEP) in wheat. *Plant J.* **18**: 407–415.
- Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M., and Wisman, E. 2001. Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 113–123.
- Schultz, T. F. and Kay, S. A. 2003. Circadian clocks in daily and seasonal control of development. *Science* **301**: 326–328.
- Sekine, K., Hase, T., and Sato, N. 2002. Reversible DNA compaction by sulfite reductase regulates transcriptional activity of chloroplast nucleoids. *J. Biol. Chem.* **277**: 24399–24404.
- Serino, G. and Maliga, P. 1998. RNA polymerase subunits encoded by the plastid rpo genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme. *Plant Physiol.* **117**: 1165–1170.
- Sheremeti, I., Sopory, S. K., Trebicka, A., Pfannschmidt, T., and Oelmüller, R. 2002. Photosynthetic electron transport regulates nitrate reductase gene expression and activity in higher plants. *J. Biol. Chem.* **277**: 46594–46600.
- Shiina, T., Allison, L., and Maliga, P. 1998. *rbcL* transcript levels in tobacco plastids are independent of light: Reduced dark transcription rate is compensated by increased mRNA stability. *Plant Cell* **10**: 1713–1722.
- Shirano, Y., Shimada, H., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Tanaka, K., Takahashi, H., Unno, K., Sato, S., Tabata, S., Hayashi, H., Miyake, C., Yokota, A., and Shibata, D. 2000. Chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* requires the nuclear-encoded transcription factor Sigma B. *FEBS Lett.* **485**: 178–182.
- Siegele, D. H., Hu, J. C., Walter, W. A., and Gross, C. A. 1989. Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **206**: 591–603.
- Sriraman, P., Silhavy, D., and Maliga, P. 1998a. The phage-type PclpP-53 plastid promoter comprises sequences downstream of the transcription initiation site. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4874–4879.
- Sriraman, P., Silhavy, D., and Maliga, P. 1998b. Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant Physiol.* **117**: 1495–1499.
- Staub, J. M. and Maliga, P. 1994. Translation of psbA mRNA is regulated by light via the 5'-untranslated region in tobacco plastids. *Plant J.* **6**: 547–553.
- Stern, D. B., Higgs, D. C., and Yang, J. J. 1997. Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* **2**: 308–315.
- Stirdivant, S. M., Crossland, L. D., and Bogorad, L. 1985. DNA supercoiling affects *in vitro* transcription of two maize chloroplast genes differently. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4886–4890.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R., and Chory, J. 2003. Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX. *Nature* **421**: 79–83.
- Sugiura, C., Kobayashi, Y., Aoki, S., Sugita, C., and Sugita, M. 2003. Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: Evidence for the loss and relocation of rpoA from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Res.* **31**: 5324–5331.
- Sugiura, M. 1992. The chloroplast genome. *Plant Mol. Biol.* **19**: 149–168.
- Surpin, M., Larkin, R. M., and Chory, J. 2002. Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell* **14 Suppl**: S327–338.
- Suzuki, J. Y., Sriraman, P., Svab, Z., and Maliga, P. 2003. Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *Plant Cell* **15**: 195–205.
- Sweeney, B. M. 1987. *Rhythmic Phenomena in Plants*. Academic Press, San Diego, CA.
- Tan, S. and Troxler, R. F. 1999. Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: Photoregulation and differential expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5316–5321.
- Tanaka, K., Masuda, S., and Takahashi, H. 1992. Multiple rpoD-related genes of cyanobacteria. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1113–1117.
- Tanaka, K., Oikawa, K., Ohta, N., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Takahashi, H. 1996. Nuclear encoding of a chloroplast RNA polymerase sigma subunit in a red alga. *Science* **272**: 1932–1935.
- Tanaka, K., Tozawa, Y., Mochizuki, N., Shinozaki, K., Nagatani, A., Wakasa, K., and Takahashi, H. 1997. Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*: evidence for the sigma factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett.* **413**: 309–313.
- Thum, K. E., Kim, M., Morishige, D. T., Eibl, C., Koop, H. U., and Mullet, J. E. 2001. Analysis of barley chloroplast psbD light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **47**: 353–366.
- Tiller, K., Eisermann, A., and Link, G. 1991. The chloroplast transcription apparatus from mustard (*Sinapis alba* L.). *Eur. J. Biochem.* **198**: 93–99.
- Tiller, K. and Link, G. 1993a. σ -like transcription factors from mustard (*Sinapis alba* L.) etioplast are similar in size to, but functionally distinct from, their chloroplast counterparts. *Plant Mol. Biol.* **21**: 503–513.
- Tiller, K. and Link, G. 1993b. Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sinapis alba* L.). *EMBO J.* **12**: 1745–1753.
- To, K., Cheng, M., Suen, D., Mon, D., Chen, L.O., and Chen, S.G. 1996. Characterization of the light-responsive promoter of rice chloroplast *psbD-C* operon and the sequence-specific DNA binding factor. *Plant Cell Physiol.* **37**: 660–666.
- Tozawa, Y., Tanaka, K., Takahashi, H., Wakasa, K. 1998. Nuclear encoding of a plastid sigma factor in rice and its tissue- and light-dependent expression. *Nucleic Acids Res.* **26**: 415–419.

- Triffa, Y., Privat, L., Gagnon, J., Baeza, L., and Lerbs-Mache, S. 1998. The nuclear RLP4 gene encodes a chloroplast protein that co-purifies with the T7-like transcription complex as well as plastid ribosomes. *J. Biol. Chem.* **273**: 3980–3985.
- Troxler, R. F., Zhang F., Hu, J., and Bogorad, L. 1994. Evidence that sigma factors are components of chloroplast RNA polymerase. *Plant Physiol.* **104**: 753–759.
- Tsinoremas, N. F., Ishiura, M., Kondo, T., Andersson, C. R., Tanaka, K., Takahashi, H., Johnson, C. H., and Golden, S. S. 1996. A sigma factor that modifies the circadian expression of a subset of genes in cyanobacteria. *EMBO J.* **15**: 2488–2495.
- Tsunoyama, Y., Ishizaki, Y., Morikawa, K., Kobori, M., Nakahira, Y., Takeba, G., Toyoshima, Y., and Shiina, T. 2004. Blue light-induced transcription of plastid-encoded *psbD* gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 3304–3309.
- Tsunoyama, Y., Morikawa, K., Shiina, T., and Toyoshima, Y. 2002. Blue light specific and differential expression of a plastid sigma factor, Sig5 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **516**: 225–228.
- Vera, A. and Sugiura, M. 1995. Chloroplast rRNA transcription from structurally different tandem promoters: An additional novel-type promoter. *Curr. Genet.* **27**: 280–284.
- Wada, T., Tsunoyama, Y., Shiina, T., and Toyoshima, Y. 1994. In vitro analysis of light-induced transcription in the wheat *psbD/C* gene cluster using plastid extracts from dark-grown and short term-illuminated seedlings. *Plant Physiol.* **104**: 1259–1267.
- Weihe, A., Hedtke, B., and Bomer, T. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2319–2325.
- Westhoff, P. and Herrmann, R. G. 1988. Complex RNA maturation in chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **171**: 551–564.
- Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., Moore, P. W., and Williamson, D. H. 1996. Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* **261**: 155–172.
- Wilson, R. J., Denny, P. W., Preiser, P. R., Rangachari, K., Roberts, K., Roy, A., Whyte, A., Strath, M., Moore, D. J., and Wosten, M. M. S. M. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 127–150.
- Wösten, M. M. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 127–150.
- Wu, C.-Y., Lin, C.-H., and Chen, L.-J. 1997. Identification of the transcription start site for the spinach chloroplast serine tRNA gene. *FEBS Lett.* **418**: 157–161.
- Xie, G. and Allison, L. A. 2002. Sequences upstream of the YRTA core region are essential for transcription of the tobacco atpB NEP promoter in chloroplasts in vivo. *Curr. Genet.* **41**: 176–182.
- Yao, J. and Allison, L. A. 1998. The cDNA sequence of AtSig4, a new member of the nuclear-encoded sigma-like factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **118**: 1536.
- Yao, J., Roy-Chowdhury, S., and Allison, L. A. 2003. AtSig5 is an essential nucleus-encoded *Arabidopsis* sigma-like factor. *Plant Physiol.* **132**: 739–747.

蛋白質 核酸 酵素

PNE
PROTEIN,
NUCLEIC ACID
AND ENZYME

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

葉緑体の秘めたるパワー

高等植物の葉緑体形質転換法がもつ可能性

中平洋一・椎名 隆

葉緑体には細胞核とは異なる独自のゲノムが存在する。1990年代前半に Maliga らによってタバコ葉緑体ゲノムへの遺伝子導入系が確立されて以来、この技術を活用した基礎解析が進展し、葉緑体遺伝子の機能や発現制御に関する多くの知見が得られた。さらに、葉緑体形質転換法の特性を活かした「有用蛋白質の大量生産」など、農・産業への応用が期待されている。本稿では、葉緑体ゲノムへの遺伝子導入の利点を概説するとともに、葉緑体遺伝子組換え作物の実用化を目指した世界的な取組みについて紹介する。

▶▶KEY WORDS : 葉緑体形質転換法 葉緑体遺伝子組換え作物 葉緑体工場 物質生産

■はじめに■

光合成を代表とする植物の基幹代謝の場である葉緑体には、120～160 kbの環状DNAが存在し、光合成や遺伝子発現にかかわる約120種類の遺伝子がコードされている。葉緑体の起源は、シアノバクテリア様の光合成生物による細胞内共生で説明される。そのため、葉緑体ゲノムは多くの点で原核生物の特徴を残している。細胞内共生後、共生体の遺伝情報の大部分は消失し、細胞核へと移行した。その結果、約3,000の葉緑体蛋白質のほとんどは核ゲノムにコードされており、葉緑体の形成や機能制御の根幹は核によって支配されている。こう説明すると、「葉緑体ゲノムを改変することにかほどの価値があるのか？」と怪訝に思われる読者も多いかもしれない。だが、葉緑体形質転換法がもつポテンシャルは決して小さくはないのである。

I. 葉緑体形質転換法の特徴

葉緑体形質転換法の最大の特徴として、組換え遺伝子の高発現が挙げられる。葉緑体DNAは1細胞あたり最大10,000コピーも存在する。したがって、すべての葉緑体ゲノムに目的遺伝子が挿入されると、圧倒的なコピー数を背景とした目的遺伝子の大量発現が可能である。核ゲノムに導入した場合の蛋白質発現が、細胞内の全可溶性蛋白質のたかだか0.1%程度であるのに対し、葉緑体形質転換体では数%以上の蓄積が容易である。一例を挙げると、枯草菌由来の殺虫性蛋白質であるBT毒素を

葉緑体で発現させた場合、その蓄積量は全可溶性蛋白質の45.3%にまで達したり。これは驚異的な数値であり、葉緑体を組換え蛋白質発現のバイオリアクターとして活用する最大の利点がある。

葉緑体形質転換法では、遺伝子ターゲティングによって、内在遺伝子の発現を阻害しない特定の遺伝子間領域に遺伝子を導入することができるので、組換え遺伝子の発現レベルが安定していることも大きな特徴である。また、目的遺伝子をポリシストロニックに発現させるよう設計することで、複数の遺伝子を一括して導入することも可能である。

多くの作物植物の葉緑体DNAは母性遺伝するため、葉緑体形質転換体においては、花粉による遺伝子汚染のリスクがゼロに等しい。これは、医薬用組換え蛋白質を植物で発現させる場合や、重金属で汚染された土壌の浄化(ファイトレメディエーション)へ利用するうえで、非常に重要となる特徴である。

II. 葉緑体形質転換の方法

葉緑体ゲノムへの遺伝子導入は、次の3段階からなる。まず、形質転換用ベクターを葉緑体の中に導入することが必要である。これには、生葉や培養細胞を材料としてパーティクルガンによって導入する方法と、プロトプラストをポリエチレングリコール処理することによって導入する方法が用いられる。

次に、目的遺伝子が相同組換えによって葉緑体ゲノム

Yoichi Nakahira, Takashi Shiina, 京都府立大学人間環境学部 E-mail: you-naka@beige.plala.or.jp, Shiina@kpu.ac.jp
Plastid transformation in higher plants: Application for chloroplast factory

中に導入される。形質転換ベクターには1 kb程度の葉緑体DNAからなる2カ所の組換え領域がクローニングされており、この組換え領域を介してゲノムDNAとの間で相同組換えが起こる。形質転換ベクター上では、目的遺伝子は選抜マーカー遺伝子とともに組換え領域の間に挿入されており、ターゲット領域に導入される。マーカー遺伝子としては、スペクチノマイシン耐性遺伝子である*aadA*が広く用いられている。

遺伝子導入した直後は、組換え型ゲノムは数コピーだと考えられる。その後、選抜培地にて細胞分裂を繰り返すたびに、野生型ゲノムが駆逐され、組換え型ゲノムが優性となる。タバコへ遺伝子導入した場合、1カ月ほどで耐性シュート/カルスが現れる。さらに継代することによって、すべての葉緑体DNAが組換え型に置き換わった形質転換体を得られる。

III. 葉緑体形質転換法を利用した有用遺伝子組換え作物の開発

1. その現状

前節で述べたような葉緑体形質転換法の特性を活用して、実用化を目指した研究が欧米を中心に精力的に進められている。葉緑体において大量発現が試みられている外来遺伝子としては、抗体やワクチンなどの医薬関連蛋白質や、病害虫耐性遺伝子、さらにはファイトレメディエーションに関連した遺伝子などが挙げられる²³⁾。たとえば、ヒト成長ホルモンの場合、全可溶性蛋白質の7%に達する大量発現が報告されている⁴⁾。さらに、この組換え成長ホルモンは、ジスルフィド結合を形成し、活性をもった可溶性蛋白質として発現していた。この結果は、葉緑体で医薬関連蛋白質生産が可能であることを示している。

植物の核遺伝子を葉緑体で大量発現させることや、葉緑体コードの遺伝子にポジティブな変異を導入することによって、基幹代謝系の向上や環境ストレスに対する耐性強化を図った研究も進められている。たとえば、脂肪酸合成に重要な葉緑体遺伝子のプロモーターを改変することによって発現量を増加させると、形質転換体から収穫される種子数が倍増することが報告されている⁵⁾。

表1 安定した葉緑体形質転換が可能な高等植物

植物種	文献
タバコ	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 90, 913-917(1993)
シロイヌナズナ*	<i>Plant Cell. Rep.</i> , 18, 20-24(1998)
ジャガイモ	<i>Plant J.</i> , 19, 209-216(1999)
トマト	<i>Nat. Biotechnol.</i> , 19, 870-875(2001)
ナタネ	<i>Transgenic Res.</i> , 12, 111-114(2003)
<i>Lesquerella fendleri</i>	<i>Transgenic Res.</i> , 12, 115-122(2003)
ダイズ	<i>Plant Mol. Biol.</i> , 55, 479-489(2004)
ニンジン	<i>Plant Physiol.</i> , 136, 2843-2854(2004)
ワタ	<i>Plant Mol. Biol.</i> , 56, 203-216(2004)
ペチュニア	<i>Transgenic Res.</i> , 13, 523-530(2004)
クコ**	<i>Cell. Biol. Int.</i> , 29, 71-75(2005)

* 形質転換当代では遺伝子導入が確認されたが、種子が得られなかった。

** 葉緑体形質転換タバコとの体細胞融合によって作製された。

2. 実用化へ向けての課題と取組み

葉緑体遺伝子組換え作物の実用化に向けて、今後どのような課題が残されているのであろうか、ポイントを整理した。

A. 適用植物種の拡大

タバコでの葉緑体形質転換系が確立されて以来、タバコでは再現性の高い遺伝子導入ができるが、他の植物では…というのが通説となり、それが実用化を妨げる大きな要因となっていた。しかしながら、ここ数年の間に状況は一変しつつある。タバコと同じナス科植物ではトマト、ジャガイモ、ペチュニアが、ほかにもナタネ、ダイズ、ニンジン、ワタなどの有用作物への葉緑体形質転換系が確立され、相次いで論文発表されたのである(表1)。たとえばトマトの場合、果実でも組換え遺伝子の高発現(葉での量の半分)が観察されており、葉緑体形質転換が“食べるワクチン”の開発の非常に有望な技術であることがわかる。上記以外にも、数種の有用植物での成功例が報告されており、今後、適応可能な宿主植物はさらに増加することが期待される。

B. 組換え蛋白質の発現制御

葉緑体へ目的遺伝子を導入しても蛋白質が期待どおりに発現しないケースもある。また、果実や根、種子などの非光合成器官で発現させることが求められる場合もある。そのような場合は、プロモーター配列や、転写産物の安定性や翻訳効率に寄与する5', 3'-非翻訳領域、目的遺伝子のターゲット領域などを検討すべきであろう。また、植物以外の生物由来の遺伝子を導入する際は、コ

ドンを葉緑体仕様に置き換えることで翻訳効率を高める工夫も有効であろう。しかし、活性に糖鎖などの修飾を必要とする蛋白質については、葉緑体では修飾されない可能性が高いので、注意が必要である。

C. マーカー遺伝子フリー技術

葉緑体ゲノムに相同組換えによって外来遺伝子を導入する際、組換え型ゲノムを選抜するために、目的遺伝子とともに抗生物質耐性遺伝子が選抜マーカーとして導入される。このため、遺伝子組換え作物からバクテリアへマーカー遺伝子が水平伝播し、抗生物質耐性菌の発生を助長する可能性が指摘されている。その対策として、植物がもつ耐塩性遺伝子をマーカー遺伝子として用いる方法や³⁾、遺伝子導入後にマーカー遺伝子だけを特異的に除去する方法が開発されている²⁾。

おわりに

以上を総合すると、葉緑体形質転換法の実用化に向けての技術的な問題は、かなりの部分がクリアされつつある。今後、葉緑体遺伝子組換え作物の第一号が商品化される日も、そう遠くない将来のこのように思われる。

文 献

- 1) De Cosa, B. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, 19, 71-74(2001)
- 2) Maliga, P. : *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 289-313(2004)
- 3) Daniell, H., Ruiz, O. N., Dhingra, A. : *Methods Mol. Biol.*, 286, 111-138(2005)
- 4) Staub, J. M. *et al.* : *Nat. Biotechnol.*, 18, 333-338(2000)
- 5) Madoka, Y. *et al.* : *Plant Cell Physiol.*, 43, 1518-1525(2002)

化学と生物
Vol. 45, No. 5 (2007)

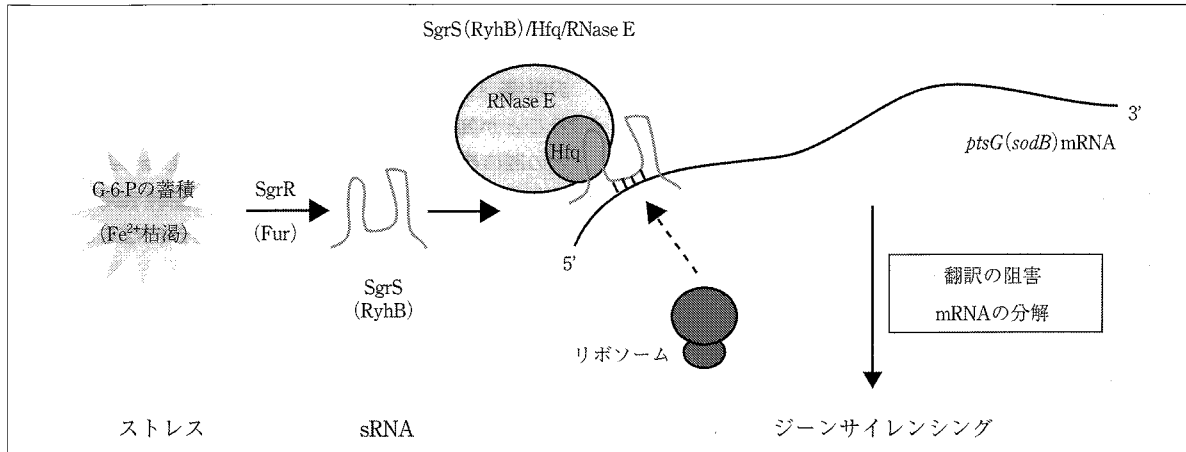


図1 ■ SgrS(RyhB) による *ptsG (sodB)* mRNA の抑制機構

グルコース-6-リン酸の蓄積または鉄イオンの枯渇に反応して SgrS または RyhB の転写が誘導される。この誘導には転写因子 SgrR または Fur が関与している。合成された SgrS (RyhB) は Hfq/RNase E と複合体を形成する。塩基対形成により *ptsG (sodB)* mRNA 上に SgrS (RyhB)/Hfq/RNase E 複合体がリクルートされる。この結果、標的 mRNA の翻訳が阻害され、RNase E により速やかに mRNA が分解される。

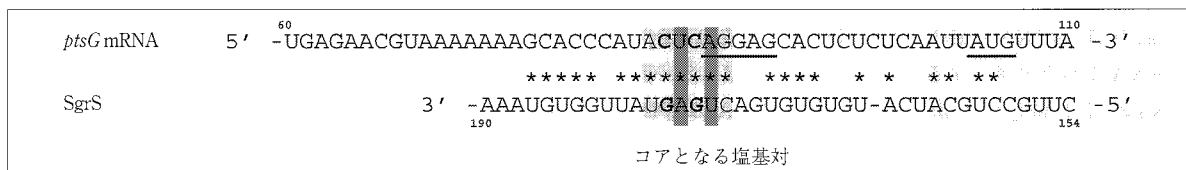


図2 ■ SgrS による *ptsG* mRNA 抑制における SgrS/*ptsG* mRNA の塩基対形成の重要性

SgrS は *ptsG* mRNA の翻訳開始領域付近で塩基対を形成する。SgrS による *ptsG* mRNA 抑制において、翻訳開始領域と一部重複する 6 塩基領域 (コバルト色)、特に 2 個所の G-C 対 (濃コバルト色) が重要である。塩基上部または下部の数字は RNA 5' 末端からの距離を示す。下線部は翻訳シャイン-ダルガノ配列および開始コドンを示す。

変異株においても、制限温度で SgrS の作用により翻訳阻害が観察された。これらの事実は、SgrS による *ptsG* mRNA の抑制機構においては、*ptsG* mRNA の翻訳阻害が第一義的であり、RNase E による *ptsG* mRNA の分解促進は必要でないことを示している。また、RNase E に依存した *sodB* mRNA の速やかな不安定化が起こらない場合でも、RyhB により *sodB* mRNA の翻訳は抑制されることも示されている。SgrS および RyhB の作用時において、RNase E 依存的な標的 mRNA の不安定化が誘起される生理学的意義については、sRNA により翻訳が阻害された mRNA を効率よく分解・除去することなどが考えられるが、その詳細については今後の解析を待たねばならない。

SgrS は *ptsG* mRNA の翻訳開始領域を含む 5' 非翻訳領域と部分的な塩基対を形成すると予想される。筆者ら

は、SgrS/*ptsG* mRNA 間の予想される 23 の塩基対に対して系統的な点変異の導入を行ない、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対形成の意義について詳しく解析した⁽¹⁰⁾。その結果、23 塩基対のうち、連続した 6 塩基対 (図2) のそれぞれの点変異で SgrS の効果に違いのあることが観察され、中でも G-C 対を破壊する 2 個所の 1 塩基変異によって SgrS による *ptsG* mRNA の抑制効果のほとんどが消失した。また、それぞれの塩基対を補償する変異により SgrS は再び *ptsG* mRNA を抑制した。これらのことは、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対が SgrS による *ptsG* mRNA の抑制に重要であり、形成される塩基対の中で核となる部分が存在することを示している。SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対領域におけるこの領域は *ptsG* mRNA のリボソーム結合部位と重複することから、SgrS が 16S rRNA と *ptsG* mRNA との結

合を阻害し効率よく *ptsG* mRNA の翻訳阻害をひき起こすと予想できる。筆者らはまた、*in vitro* で SgrS が *ptsG* mRNA と RNA-RNA 複合体を形成すること、Hfq がこの複合体形成を促進することを証明した。さらに、詳細は割愛するが、*ptsG* mRNA の膜局在性が SgrS の *ptsG* mRNA への効果的な作用に寄与していることも明らかにしている⁽¹¹⁾。

Hfq 結合性 sRNA の作用機構については、重要な問題点がいくつか残されている。まず、SgrS あるいは RyhB の解析から明らかになった上記の分子機構が他の sRNA にも当てはまるかどうかは実験的に検証する必要がある。また、sRNA による mRNA の翻訳阻害において、sRNA/mRNA の塩基対形成自身が重要なのか、あるいは塩基対形成に共役した mRNA 上への Hfq のリクルートが重要なのかを検討することは興味深い課題である。もし、前者の仮定が正しければ、sRNA による mRNA 抑制における Hfq の主要な役割は sRNA / mRNA 間の塩基対形成を促進させることになり、後者であれば、sRNA / mRNA 間の塩基対形成は Hfq を mRNA 上へとガイドする役割をもつことになる。一方、RNase E に依存した sRNA あるいは mRNA の速やかな不安定化の誘起を起こすメカニズムとその生理的意義について解析する必要がある。いくつかの例を除き、sRNA の合成を誘導するストレスや転写因子の実体および情報伝達機構には不明の部分が多く、これらの解明も重要課題である。

真核細胞の microRNA もリボヌクレオタンパク質複合体を機能実体として標的 mRNA と塩基対形成し、翻訳阻害、および分解促進を介して標的 mRNA を抑制することが知られており、大腸菌型 sRNA と microRNA との間の機能的相同性が徐々に垣間見えてくる。今後の解析から、種を超えた低分子機能性 RNA による RNA 抑制機構の普遍的な実態が明らかになることを期待したい。

- 1) T. Mizuno, M. Y. Chou & M. Inouye: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1966 (1984).
- 2) G. Storz & S. Gottesman: "The RNA World", ed. by R. F. Gesteland, T. R. Cech and J. F. Atkins, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2006, p. 567.
- 3) S. Gottesman: *Annu. Rev. Microbiol.*, **58**, 303 (2004).
- 4) E. Masse & S. Gottesman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4620 (2002).
- 5) C. K. Vanderpool & S. Gottesman: *Mol. Microbiol.*, **54**, 1076 (2004).
- 6) A. J. Carpousis: *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 150 (2002).
- 7) E. Masse, F. E. Escorcia & S. Gottesman: *Genes Dev.*, **17**, 2374 (2003).
- 8) T. Morita, K. Maki & H. Aiba: *Genes Dev.*, **19**, 2176 (2005).
- 9) T. Morita, Y. Mochizuki & H. Aiba: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4858 (2006).
- 10) H. Kawamoto, Y. Koide, T. Morita & H. Aiba: *Mol. Microbiol.*, **61**, 1013 (2006).
- 11) H. Kawamoto, T. Morita, A. Shimizu, T. Inada & H. Aiba: *Genes Dev.*, **19**, 328 (2005).

(森田鉄兵, 饗場弘二, 名古屋大学大学院理学研究科)

葉緑体シグマ因子の機能分担と進化 植物色素体の多様な機能を支えるしくみ

葉緑体を代表とする色素体 (plastid) は、約 20 億年前に祖先真核細胞へ細胞内共生したシアノバクテリアを起源とし、光合成を含む様々な物質代謝の場として重要なオルガネラとなった。しかし、高等植物の色素体は、シアノバクテリアとは異なり、組織や環境条件に応じて細胞を様々な形態に分化する能力をもっている。たとえば、分裂細胞内では未分化な原色素体として存在し、光を受けると光合成器官である葉緑体へ、光が不足する条件では光合成能をもたないエチオプラストへ分化する。高等植物の色素体ゲノムは、40 ほどの光合成遺伝子と約 70 の転写・翻訳関連遺伝子をコードしており、その転写

パターンは、葉緑体分化の過程でダイナミックに変化する。

色素体ゲノムの転写は、2 種類の RNA ポリメラーゼ、NEP (Nuclear encoded plastid RNA polymerase) と PEP (Plastid encoded plastid RNA polymerase) が担っている。NEP はファージ型の RNA ポリメラーゼで、色素体分化初期に、遺伝子発現に関わるハウスキーピング遺伝子を転写する。一方、PEP はシアノバクテリア由来の転写装置で、光合成遺伝子の転写において中心的な役割を果たしている。PEP は、NEP によって転写される色素体コードのコア酵素 (RNA ポリメラーゼ活

性をもつ)と、核コードのシグマ因子(プロモーター認識に関わる)から構成される。シアノバクテリアは複数のシグマ因子をもち、その交換が転写調節の主要メカニズムの一つである。したがって、色素体においても同様の転写調節機構が働いていると考えられていた。しかし、植物シグマ因子の分子系統樹をつくってみると、その構成はシアノバクテリアとは大きく異なることがわかってきた。

シアノバクテリア(PCC6803株)のシグマ因子(σ^{70} ファミリー)は、生存に必須な基本シグマ因子であるグループ1(1個)、細胞増殖期に主に働くグループ2(4個)、特定遺伝子のプロモーターを特異的に認識し、環境応答的な転写スイッチに関わるグループ3(4個)に分けられる。一方、高等植物(*Arabidopsis thaliana*)の核ゲノムには6種類(AtSIG1~AtSIG6)のシグマ因子がコードされているが、それらはすべてグループ1あるいは2のホモログである。植物の進化を辿ってみると、単細胞緑藻のクラミドモナスは1種類のシグマ因子しかもたないが、コケ植物ヒメツリガネゴケでは3種類のシグマ因子が見つまっている。色素体が多分化能を獲得する過程で、遺伝子重複によって種類を増やしていった可能性がある。では、種類を増やした葉緑体シグマ因子は、どのように葉緑体の分化や環境応答に関わっているのか?ここでは、葉緑体構築や光合成という舞台でのシグマ因子の活躍について、最近の知見を踏まえ紹介する。

まずAtSIG6については、そのノックアウト変異体(*sig6-1*)は、子葉特異的に黄色化を示し、光依存的な葉緑体分化が強く阻害される表現型を示すことがわかった⁽¹⁾。発芽後4日目の*sig6-1*の子葉では、PEPプロモーター依存の光合成遺伝子群やrRNA遺伝子の転写蓄積量が大きく減少しているのに対し、8日目(本葉の展開後)になるとそれらが回復していた。つまり、AtSIG6はPEPプロモーターを広く認識する能力をもち、葉緑体構築の初期における光合成遺伝子の転写に働いている様子がわかってきた。

AtSIG2のノックアウト変異体(*sig2-1*)も、黄色化し葉緑体分化が不完全になる表現型を示す⁽²⁾。しかし、*sig2-1*においては、*sig6-1*と異なり、光合成遺伝子群の転写蓄積量は野生型と変わらず、PEP依存型プロモーターをもつ一部のtRNA遺伝子(*trnV-UAC*, *trnM-CAU*, *trnE-UUC*, *trnD-GUC*)の蓄積のみが減少していた。その結

果、光合成遺伝子群の翻訳が阻害され、葉緑体分化が不完全になったと考えられる。一方、*sig2-1*で蓄積が減少した*trnE*は、クロロフィルの前駆体でもあり、クロロフィル合成の低下も黄色化の原因であると考えられる。逆に*sig2-1*においては、NEPによって認識される遺伝子の転写量が増加していた。NEPは葉緑体分化の初期に中心的に働き、葉緑体が成熟する時期にはPEPが主要な転写装置となりNEP活性は低下することが知られている。興味深いことに、*trnE*がNEPへ結合することで活性を阻害することが、*in vitro*実験から最近明らかになった⁽³⁾。つまりAtSIG2は、tRNA遺伝子群のプロモーターを特異的に認識することで、光合成タンパク質群の翻訳に必要なtRNAの供給、クロロフィル前駆体*trnE*を介したクロロフィル合成制御、さらには同じく*trnE*によるNEPの活性調節を通じて、葉緑体分化を多角的に制御する重要なシグマ因子であることが明らかになってきた。

さらに、AtSIG2(黄色)とAtSIG6(黄色)の二重変異体においては葉が白色化し、光合成遺伝子の発現がほぼ完全に阻害されていた(石崎ら、未発表)。これらのことから、葉緑体構築の初期過程では、光合成遺伝子の転写を担うAtSIG6とtRNA遺伝子群の転写を担うAtSIG2が協同的に働くことが重要であることがわかる。一方、後期においては、AtSIG6と同様に光合成遺伝子群を転写する別の葉緑体シグマ因子が発現し機能しているのではないかと考えられる。現在その解明に向けて、*sig6-1*にAtSIG1-AtSIG6をそれぞれ発現するような核形質転換植物を作製し、相補性実験を行なっている。

さて、光合成での利用量を上回る過剰な光は、活性酸素種を生成する要因となり、光化学系の損傷をひき起こす。特に光化学系IIの反応中心タンパク質であるD1およびD2タンパク質は、強い光によって損傷を受け分解される。これらのタンパク質は色素体ゲノムにコードされており、光合成系を素早く再構築するために非常に早い光依存性ターンオーバーを示す。D2(*psbD*)はCP43(*psbC*)とともにオペロンを形成し、その転写産物は光によって誘導される。*psbD/C*オペロンの上流には、光応答する特徴的なプロモーター(*psbD* LRP: Light Responsive Promoter)が存在する。*psbD* LRPの活性化には未知の核コードの遺伝子が必要であることから、核による葉緑体遺伝子発現制御のモデルとして早くから注目されていた。このような背景の中、筆者らの研究が

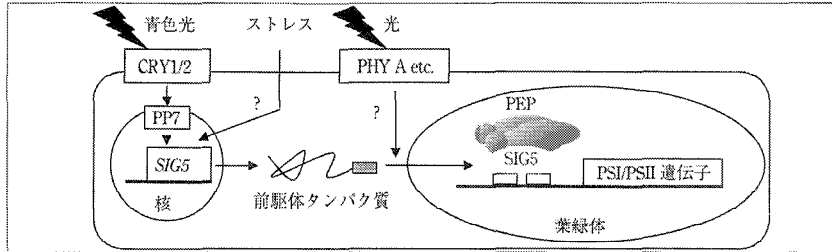


図1 ■色素体シグマ因子 SIG5 による葉緑体遺伝子の環境応答転写

SIG5 は、青色光やストレスに誘導されて発現する。青色光のシグナル伝達はクリプトクロム (CRY1/2) と Ser/Thr プロテインキナーゼ (PP7) を介する。前駆体タンパク質として翻訳された SIG5 は、葉緑体移行シグナル (■) をもつ。葉緑体へ輸送されると、葉緑体移行シグナルは切り取られて成熟タンパク質となる。この葉緑体への輸送過程で、光の制御 (PHY A など) を受けることが推察されている。葉緑体では、SIG5 は PEP と会合して光化学系反応中心タンパク質遺伝子 (PSI/PSII 遺伝子) の転写に関わる。

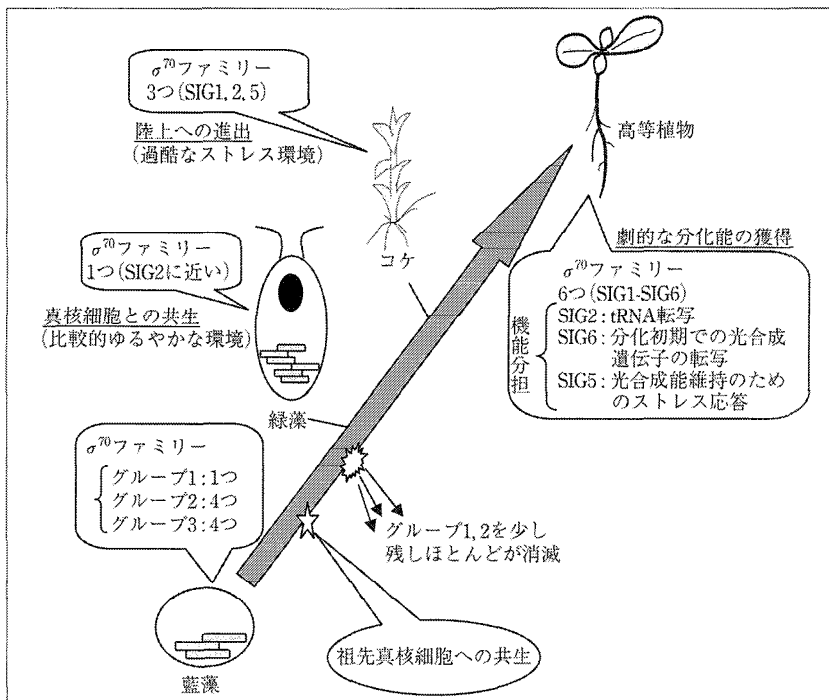


図2 ■シグマ因子の進化

祖先である藍藻 (シアノバクテリア) では、 σ^{70} ファミリーが9つ存在していた。しかし、共生後、中心的に働いていたシグマ因子を残しほとんどが消失し、とうとう緑藻 (クラミドモナス) では1つにまで減ってしまった。しかし、多細胞化に伴う色素体分化と、陸上の過酷なストレス環境に適応するため、高等植物はシグマ因子を増やしていき、現存の高等植物には6種類存在する。それぞれが機能分担することで、葉緑体分化やストレス応答に関与している。

グループは、このメカニズムの主役が、環境応答性の葉緑体シグマ因子 SIG5 であることを突き止めた^(4,5)。SIG5 は、ストレスシグナルや青色光によって転写誘導を受け、細胞質でタンパク質合成された後、葉緑体へ移行し、*psbD* LRP を認識する (図1)。さらに、最近の研究で、葉緑体形質転換技術 (葉緑体ゲノムに遺伝子を導入する技術) を用いた SIG5 過剰発現タバコにおいて、SIG5 が *psbD/C* だけではなく、*psbA* (D1 タンパク質) や光化学系 I 反応中心タンパク質遺伝子 *psaA/B* の転写にも関わ

ることを確認した。SIG5 は、光やストレスに応答する光化学系反応中心タンパク質の転写制御を行なっているようである。

以上をまとめると、植物シグマ因子の進化について興味深いモデルを描くことができる。まず、高等植物への進化の過程で、植物は色素体シグマ因子を遺伝子重複により増やした。しかし、ただ増やしたのではなく、SIG2 や SIG6 は、葉緑体分化を支える葉緑体遺伝子発現の分業システムを確立し、SIG5 は、環境応答性のグループ 3

シグマ因子の代わりに光合成能維持に関わる環境応答性を獲得するというように、個々のシグマ因子がそれぞれ機能分化することで、多細胞生物として陸上環境に適応発展するための植物独自のシステムを進化させたと考えられる(図2)。

筆者らは、色素体プロモーターの進化に関する研究を組み合わせることで、葉緑体転写装置の進化の全体像を明らかにすることを目指している。

- 1) Y. Ishizaki, Y. Tsunoyama, K. Hatano, K. Ando, K. Kato, A. Shinmyo, M. Kobori, G. Takeba, Y. Nakahira & T. Shiina: *Plant J.*, 42, 133 (2005).

- 2) K. Kanamaru, A. Nagashima, M. Fujiwara, H. Shimada, Y. Shirano, K. Nakabayashi, D. Shibata, K. Tanaka & H. Takahashi: *Plant Cell Physiol.*, 42, 1034 (2001).
 3) M. Hanaoka, K. Kanamaru, M. Fujiwara, H. Takahashi & K. Tanaka: *EMBO Rep.*, 6, 545 (2005).
 4) Y. Tsunoyama, Y. Ishizaki, K. Morikawa, M. Kobori, Y. Nakahira, G. Takeba, Y. Toyoshima & T. Shiina: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3304 (2004).
 5) A. Nagashima, M. Hanaoka, T. Shikanai, M. Fujiwara, K. Kanamaru, H. Takahashi & K. Tanaka: *Plant Cell Physiol.*, 45, 357 (2004).

(野添幹雄^{*1}, 八木祐介^{*2}, 椎名 隆^{*1}, ^{*1}京都府立大学大学院人間環境科学研究科, ^{*2}関西学院大学大学院理工学研究科)



本格的リバースプロテオミクス時代の到来 分裂酵母全タンパク質解析系の確立とその応用

生物の設計図であるゲノムの解読に続き、個々の遺伝子によってつくられるタンパク質が、実際に細胞内のどこで働いているのか、またどのような機能調節を受けているのかということをはっきりと明らかにしようとするポストゲノム研究の重要性が声高に叫ばれるようになって久しい。人類が手に入れた膨大なゲノム配列情報は、近年急速に進歩した質量分析法と相まって包括的なタンパク質の同定(プロテオミクス)を可能にした。とはいえ、一生物種を構成しているすべてのタンパク質をまとめて解析することはこれまでほとんど成功していなかった。

タンパク質を取得したあとに遺伝子情報と照合する従来のプロテオミクスとは逆に、遺伝子をコードする領域である「読み枠(オープンリーディングフレーム, ORF)」の情報をもとに生み出されるタンパク質を網羅的に取得して解析することを特にリバースプロテオミクスと呼ぶ。これを行なうためには、当然、ORFをすべてクローン化したセット(オーフィオーム, ORFeome)をつくり上げる必要がある。出芽酵母以上に高等真核生物に近いといわれる分裂酵母は、ゲノム解読⁽¹⁾によってわずか約5,000遺伝子しかもたないことが明らかにされた。オーフィオームのための格好のモデル生物であるといえる。筆者らは最近、相同組換えを利用した包括的なクローニング法(Gateway法)を利用して⁽²⁾、分裂酵母ゲノムの99.2%に相当するオーフィオームを取得することに成功した⁽³⁾。さらに、各ORFをHis₆タグ(ヒスチジンが6個連結したもの)やYFPタグ(黄色蛍光タンパク質)を付けるための発現ベクターにのせ替えて個々

に分裂酵母内に導入することにより、ORF-YFPおよびORF-His₆の発現シグナルを網羅的に検出することが可能となった^(3,4)。

分裂酵母のオーフィオームを用いて行なわれたリバースプロテオミクス解析の例を図1に示す。培地にチアミンが存在しないときにタンパク質発現が誘導され、チアミンが添加されると抑制されるように設計したベクターを用いて、まず発現誘導後、個々の細胞株から全タンパク質を抽出し、アレイ(リバースアレイ)を作製した。His₆タグを認識する抗体を用いて発現レベルの検出を行なった結果、各ORF-His₆はチアミン非存在下で働く同じプロモーターにより発現されているにもかかわらず、個々のタンパク質の存在量には違いが見られた⁽³⁾。興味深いことに、タンパク質発現量はmRNA量ではなくアミノ酸配列の保存性と相関していた。すなわち、進化上あまり保存されていないタンパク質は、同じように発現させても、すぐに消えてしまうように調節されているかのごとくであった。このことは、転写制御とは別に遺伝子のコード領域そのものに翻訳効率やタンパク質安定性を決定する要因が含まれていることを示唆する。

細胞内で発現させた個々のタンパク質は、さまざまな細胞内小器官や構造体に正しく配置されて機能しているはずである。そこで筆者らは全タンパク質の局在を明らかにすることを目指して、ORF-YFP発現株を用いた蛍光顕微鏡観察を行ない、明瞭な画像を伴った局在情報のデータベース「ローカリゾム」を構築した(<http://cgl.riken.go.jp>より公開)⁽³⁾。一方、筆者らのグループで

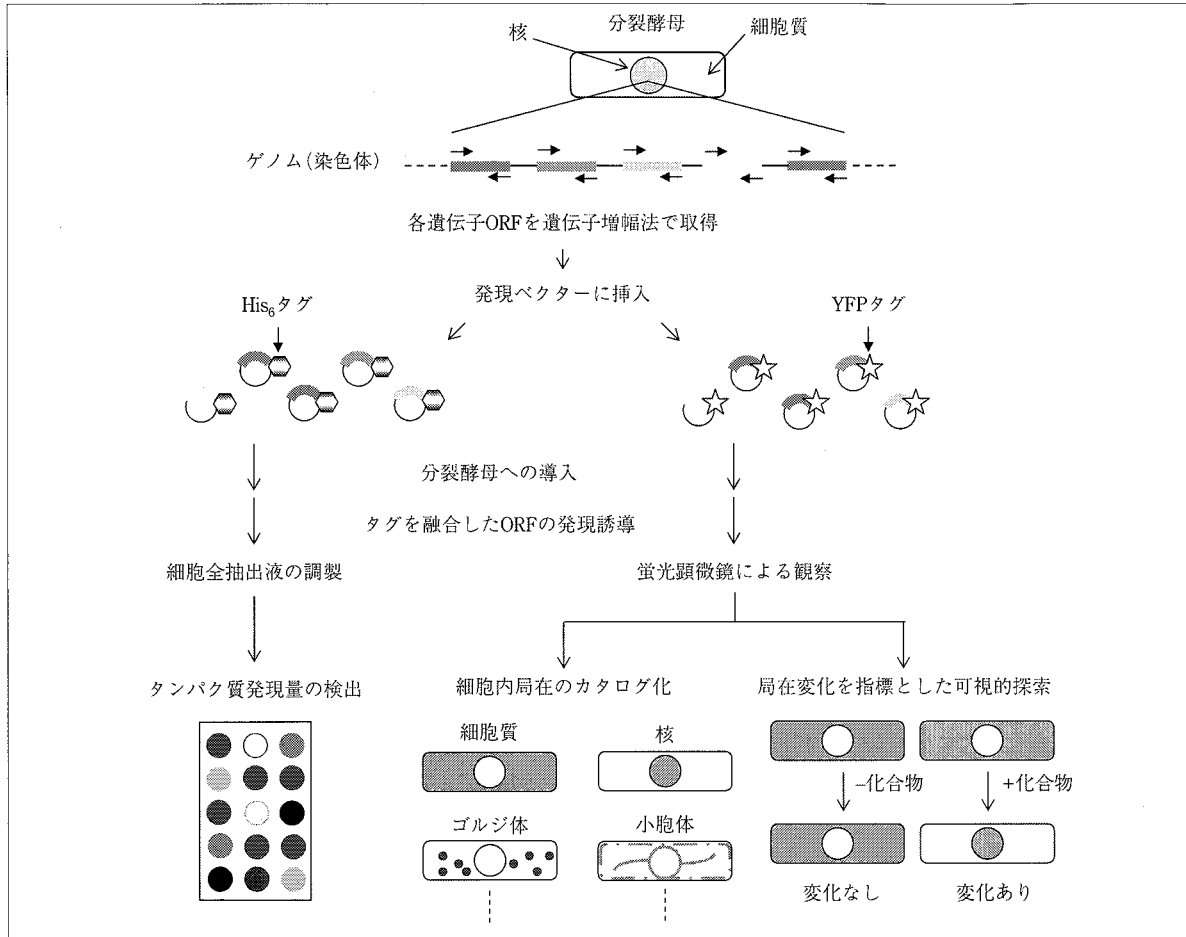


図1 ■ 分裂酵母のリバースプロテオミクス解析

は過去に、強力な細胞周期停止作用、抗腫瘍作用などをもつ放線菌由来の抗真菌抗生物質レプトマイシン B (LMB) を発見し、これがタンパク質を核内から細胞質へと輸送する因子である Crm1 を阻害することを報告していた^(5,6)。そこで、Crm1 の全積荷タンパク質を同定することを目的として、ORF-YFP を発現する全細胞株に対して LMB 処理を行ない、局在変化を指標とした網羅的スクリーニングを試みた。その結果、Crm1 によって核外輸送されていると考えられるタンパク質を全部で 285 個検出することに成功した⁽³⁾ (図 2)。それらの中には、すでに Crm1 の積荷であると同定されていたタンパク質もいくつか含まれていたが、大部分は Crm1 による核外輸送がこれまでまったく報告されていなかったものであり、LMB による表現型 (核形態異常) を説明する

ものも存在していた。このように分裂酵母の全タンパク質可視化技術とローカリゼーション情報は、個々のタンパク質の細胞内機能を探るうえで有用であるだけでなく、化合物評価や薬剤スクリーニング系としても優れていると考えられる。

分裂酵母は遺伝学的に扱いやすいという特徴から、さまざまな遺伝子の破壊株、変異株、過剰発現株を実験に組み合わせられるという利点がある。たとえば、特定の遺伝子破壊株におけるタンパク質発現量や局在変化の比較解析などを行なうことにより、その遺伝子によって細胞内存在量や局在の制御を受けるタンパク質群を一度に検出することができる。現在、韓国/英国共同研究グループによって進められている網羅的遺伝子破壊プロジェクトから⁽⁷⁾、分裂酵母の遺伝子破壊株を入手するこ

Mitochondrial microsatellite variability in common wheat and its ancestral species

Takashige Ishii^{1*}, Chisa Takahashi¹, Nobuyuki Ikeda¹,
Osamu Kamijima¹ and Naoki Mori²

¹Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Kobe University, Nada-ku,
Kobe 657-8501, Japan

²Laboratory of Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Kobe University,
Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

(Received 16 March 2006, accepted 1 May 2006)

On the basis of the entire mitochondrial DNA sequence of common wheat, *Triticum aestivum*, 21 mitochondrial microsatellite loci having more than ten mononucleotide repeats were identified. The mitochondrial microsatellite variability at all loci was examined with 43 accessions from 11 *Triticum* and *Aegilops* species involved in wheat polyploidy evolution. Polymorphic banding patterns were obtained at 15 out of 21 mitochondrial microsatellite loci. The number of alleles per polymorphic microsatellite ranged from 2 to 5 with an average of 3.07, and the diversity values (H) ranged from 0.09 to 0.50 with an average of 0.29. These values are almost two third of wheat chloroplast microsatellite values, indicating that variability of mitochondrial microsatellite is much less than that of chloroplast microsatellite. Based on the allele variation at all loci, a total of seven mitochondrial haplotypes were identified among common wheat and its ancestral species. Three diploid species showed their own specific haplotypes and timopheevi group (11 accessions) had three types, whereas 29 accessions of emmer and common wheat groups shared the same haplotype. These results indicate that a single mitochondrial haplotype determined by microsatellite analysis has conservatively been maintained in the evolutionary lineage from wild tetraploid to cultivated hexaploid species.

Key words: Allelic diversity, Mitochondrial microsatellite, Polyploidy evolution, *Triticum* and *Aegilops* species, Wheat

Wheat is one of the unique crops which went through polyploidy evolution. In the wheat genus *Triticum*, four species groups were established, i.e., einkorn (AA), emmer (AABB), timopheevi (AAGG) and common wheat (Dinkel wheat, AABBDD). Of these, tetraploid wheats (emmer and timopheevi groups) were thought to be originated by amphidiploidization of the hybrid between a wild einkorn wheat and some species in the Sitopsis section of *Aegilops* (Sarkar and Stebbins, 1956; Riley et al., 1958), and hexaploid common wheat was generated from cultivated emmer wheat and *Ae. squarrosa* (Kihara, 1944; McFadden and Sears, 1944, 1946). In order to clarify the evolutionary process of those wheat species, several molecular analyses were carried out. RFLP analysis of chloroplast DNA revealed that the cytoplasm of common wheat has derived from that of emmer wheat (Tsunewaki

and Ogihara, 1983; Miyashita et al., 1994). Nuclear RFLP analysis suggested that a wild einkorn is the A genome donor to both the emmer and timopheevi groups and two tetraploid groups originated diphyletically (Tsunewaki and Nakamura, 1995). The results on microsatellite analysis of chloroplast DNA indicated that emmer and common wheat species were divided into two main groups, each consisting of a series of wild and cultivated species from tetraploid to hexaploid (Ishii et al., 2001). However, there are still many unknown matters, such as identification of B genome donor for tetraploid wheat species. Therefore, other types of markers giving clues to reveal the new facts are expected.

Recently, the complete mitochondrial DNA sequence of common wheat (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring) was determined by Ogihara et al. (2005). Based on the sequence information, 21 mitochondrial microsatellites (designated as WMt1 - 21) having more than ten mononucleotide repeats were identified (Table 1), however no

Edited by Toru Torachi

* Corresponding author. E-mail: tishii@kobe-u.ac.jp

Table 1. Plant materials used for mitochondrial microsatellite analysis^a

Species	Group	Genome	No. accession	Origin
<i>T. monococcum</i>	Einkorn (cultivated)	AA	1	Turkey
<i>Ae. squarrosa</i>	Section Vertebrata (wild)	DD	1	Iran
<i>Ae. speltoides</i>	Section Sitopsis (wild)	SS	1	Turkey
<i>T. araraticum</i>	Timopheevi (wild)	AAGG	10	Armenia, Turkey, Iraq
<i>T. timopheevi</i>	Timopheevi (cultivated)	AAGG	1	Georgia
<i>T. dicoccoides</i>	Emmer (wild)	AABB	10	Turkey, Iraq, Israel
<i>T. durum</i>	Emmer (cultivated)	AABB	3	China, Iran, Turkey
<i>T. dicoccum</i>	Emmer (cultivated)	AABB	4	Ethiopia, Iran, Spain
<i>T. aestivum</i>	Dinkel (cultivated)	AABBDD	4	Armenia, Iran, Turkey, Unknown
<i>T. spelta</i>	Dinkel (cultivated)	AABBDD	4	Spain, Germany, Unknown
<i>T. macha</i>	Dinkel (cultivated)	AABBDD	4	Georgia, Unknown
Total			43	

^a The same set of the materials were used for chloroplast microsatellite analysis by Ishii et al. (2001).

di- or trinucleotide repeats were found. Of 21 mitochondrial microsatellites, three (WMt5, 11 and 13) and one (WMt16) were found to be located in intron and coding regions, respectively. For each microsatellite, a pair of primers were designed to produce specific PCR products in the range of 100–150 bp at 55°C of annealing temperature. Using these primer pairs, microsatellite regions of 11 *Aegilops* and *Triticum* species were amplified. The procedures for DNA extraction, PCR and amplified band detection were followed after Ishii et al. (2001).

Amplified products were obtained for all 21 mitochondrial microsatellites with a total of 43 accessions from 11 *Aegilops* and *Triticum* species which were involved in polyploidy evolution (Table 2). Polymorphic banding patterns were observed at 15 out of 21 mitochondrial microsatellite loci. To characterize the allelic diversity and informativeness of polymorphic microsatellites, the number of alleles and the diversity value were examined using all wheat accessions (Table 1). Here, the allelic diversity was calculated according to the gene diversity value described by Nei (1987) as follows:

$$H_i = 1 - \sum_{j=1}^n x_{ij}^2$$

where x_{ij} is the frequency of the j th allele for marker i and summation extends over n alleles.

The number of alleles per polymorphic microsatellite ranged from 2 to 5, with an average of 3.07. Diversity values ranged from 0.09 to 0.50, with an average of 0.29. These values are almost two third of wheat chloroplast microsatellite values (Ishii et al., 2001), indicating that variability of mitochondrial microsatellite is much less than that of chloroplast microsatellite (Table 3).

Based on the allele variation at all mitochondrial microsatellite loci, a total of seven mitochondrial haplo-

types were identified among common wheat and its ancestral species. Three diploid species, *T. monococcum*, *Ae. squarrosa* and *Ae. speltoides*, showed their own specific haplotypes, and three types were found among 11 accessions of timopheevi group (*T. araraticum* and *T. timopheevi*). On the other hand, 29 accessions of emmer and common wheat group species shared the same haplotype. This indicates that a single mitochondrial haplotype determined by mitochondrial microsatellite analysis has conservatively been maintained in the evolutionary lineage from wild tetraploid to cultivated hexaploid species. If the identical or similar haplotype is found among some accessions in the Sitopsis section of *Aegilops*, they might be strong candidates for cytoplasm or B genome donor to emmer and common wheat species.

In this study, three diploid and two wild tetraploid species were used as plant materials. Then, the average percentages of common amplified fragments between them were examined. The average percentage between *T. dicoccoides* (wild emmer: AABB) and *T. araraticum* (wild timopheevi: AAGG) was 61.9%, confirming that their cytoplasm genomes have originated from the different sources. Moreover, *T. dicoccoides* showed much lower similarity values to three diploid species (38.1%–47.6%). *T. araraticum* also gave low average percentages to *T. monococcum* (einkorn: AA) and *Ae. squarrosa* (wild Vertebrata: DD), however, relatively higher value (63.8%) was observed with *Ae. speltoides* (wild Sitopsis: SS). These results partially support the inference that *Ae. speltoides* was the possible cytoplasm donor of tetraploid wild wheat species (Ogihara and Tsunewaki, 1988; Tsunewaki, 1996). Since only one accession of *Ae. speltoides* was used here, the phylogenetic relationships between diploid and tetraploid wheat species are still unclear. Probably, *Ae. speltoides* has wide genetic variation and at least two groups of mitochondrial haplotypes,

Table 2. Wheat mitochondrial microsatellite information

Locus	Repeat	Position ^a	Location	Primer sequence ^b (5'-3')	Size ^c (bp)	No. allele	H ^d
WMt1	(T)10	44061–44070	Intergenic region (<i>nad1-matR</i>)	GGGCCGACTACAAGACTACG TTAGCGAACAGGCGTTTACA	150	2	0.44
WMt2	(A)10	48768–48777	Intergenic region (<i>matR-rps1</i>)	GCACAGCTGGGTGCTAGAAT AACCCGCTTGCTTATCTTCA	105	1	0.00
WMt3	(T)10	52034–52043	Intergenic region (<i>ccmFN-rn5</i>)	TGGCGGTCCCTATATCTCTG CTCGGCAAAGTGGATAGGAA	137	2	0.42
WMt4	(A)10	64512–64521	Intergenic region (<i>cob-trnA</i>)	GGCTACGGATTTGTGCGTTA GACTAGTCGTTTCGTTGAAGCC	106	1	0.00
WMt5	(A)10	136474–136483	Intron (<i>nad4</i>)	GGATGGACGTAAACTCGTAAGC TCCTAAGGTCCTTCGCCAA	138	1	0.00
WMt6	(A)13	145880–145892	Intergenic region (<i>nad4-ccmC</i>)	ATCCCTTGAAAATGCAATGC GCAAGGGAATATGCGTGAGT	103	3	0.09
WMt7	(A)11	149984–149994	Intergenic region (<i>nad4-ccmC</i>)	ACTGGAAAATGGCTTGCAATG TGTAGCCGGTGGTTGATGTA	122	2	0.09
WMt8 ^e	(T)12	172445–172456 (264342–264353)	Intergenic region (<i>rn26-trnQ</i>)	CCCCTTACGATATTCCTTTACG AAACAAGAGTCCAGGAGCGA	149	4	0.47
WMt9	(T)10	182879–182888	Intergenic region (<i>nad2-ccmB</i>)	CCACGCTTTTTTACTTGTTC GTGGTTGATGTGTCACCTGGG	144	1	0.00
WMt10	(G)10	183082–183091	Intergenic region (<i>nad2-ccmB</i>)	TGACACATCAACCACGCC TTGTAAGTTGCGAGCCTGC	132	3	0.47
WMt11	(T)11	208917–208927	Intron (<i>nad2</i>)	TCACGGACTTTTTCTTTGTCA GGGGCATAGTCATATGGGTG	100	4	0.48
WMt12	(A)10	222306–222315	Intergenic region (<i>trnD-cox2</i>)	CAACAGAATGCCCTTCGC ATGGGGTTCTCTCTGGGG	150	1	0.00
WMt13	(A)10	224158–224167	Intron (<i>cox2</i>)	CACCCCAATTTCTTGTGATC AAGCAAGGGATGTCTGTAAC	129	3	0.09
WMt14	(A)10	243088–243097	Intergenic region (<i>atp8-cox1</i>)	CAGTCCCACCGCTATTG TGGGGGATAATACCGAAACA	100	3	0.45
WMt15	(C)10	281580–281589	Intergenic region (<i>nad6-nad1</i>)	TTTTAAGGGCTTCTGTTGAAGC GGGCCTAGATTAGATGTTTCGC	123	4	0.50
WMt16	(A)10	282313–282322	Coding region (<i>nad1</i>)	CCCAACGAATGTCAGATGC AGAAGGTGGACGGAAATGG	130	1	0.00
WMt17	(T)15	307006–307020	Intergenic region (<i>nad1-mttB</i>)	AAGAGATGTTTCTTTCGCACC CCGTCAGGTCCTTAGTAGCG	140	3	0.13
WMt18	(T)11	310090–310100	Intergenic region (<i>nad1-mttB</i>)	GGTTCGGTTTCGTCAGAGGTA CAAAAAAGGAAGAGCGCAC	148	2	0.09
WMt19	(G)14	337239–337252	Intergenic region (<i>mttB-atp8</i>)	CGGGTTAATGCAAAACGAAG CAAGGCATGATTGAATCCG	147	5	0.48
WMt20	(A)10	380700–380709	Intergenic region (<i>rps7-trnF</i>)	TACCGGTGGAAAAGCACTTC AGTACCTTACCGGATTCCTCCG	131	3	0.09
WMt21	(T)11	428773–428783	Intergenic region (<i>trnN-trnD</i>)	CGTAGGTTCGAATCCTACTTGG CCACTTTTGATGTCCCGTTT	146	3	0.09

^a According to the sequence information (AP008982) by Ogihara et al. (2005).

^b Annealing temperature was designed to be 55°C for all the primer combinations.

^c Expected size in *T. aestivum* cv. Chinese Spring.

^d H: Diversity index.

^e WMt8 was duplicated in a master circle of mitochondrial genome.

Table 3. Number of allele and diversity index for mitochondrial (WMt) and chloroplast microsatellites (WCt) observed among 43 wheat accessions

Marker	No. marker	No. allele			Diversity index (H)		
		Min.	Max.	Ave.	Min.	Max.	Ave.
WMt ^a	21	1	5	2.48	0.00	0.50	0.21
WCt ^a	24	1	7	3.92	0.00	0.72	0.41
WMt (poly) ^b	15	2	5	3.07	0.09	0.50	0.29
WCt (poly) ^b	21	2	7	4.33	0.05	0.72	0.47

^a All microsatellites.

^b Excluding monomorphic microsatellites.

corresponding to emmer and timopheevi types, might exist in this species. A large scale survey on mitochondrial microsatellites using more *Ae. speltoides* accessions might lead to clarify the candidates for cytoplasm or B genome donor of tetraploid wheat species.

REFERENCES

- Ishii, T., Mori, N., and Ogihara, Y. (2001) Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. *Theor. Appl. Genet.* **103**, 896–904.
- Kihara, H. (1944) Discovery of the DD-analyzer, one of the ancestors of *Triticum vulgare*. *Agr. Hort. Tokyo* **19**, 889–890 (in Japanese).
- McFadden, E. S., and Sears, E. R. (1944) The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Rec. Genet. Soc. Am.* **13**, 26–27.
- McFadden, E. S., and Sears, E. R. (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.* **37**, 81–89, 107–116.
- Miyashita, N. T., Mori, N., and Tsunewaki, K. (1994) Molecular variation in chloroplast DNA regions in ancestral species of wheat. *Genetics* **137**, 883–889.
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Ogihara, Y., and Tsunewaki, K. (1988) Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.* **76**, 321–332.
- Ogihara, Y., Yamazaki, Y., Murai, K., Kanno, A., Terachi, T., Shiina, T., Miyashita, N., Nasuda, S., Nakamura, C., Mori, N., Takumi, S., Murata, M., Futo, S., and Tsunewaki, K. (2005) Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6235–6250.
- Riley, R., Unrau, J., and Chipman, V. (1958) Evidence on the origin of the B genome of wheat. *J. Heredity* **49**, 91–98.
- Sarkar, P., and Stebbins, G. L. (1956) Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Amer. J. Bot.* **43**, 297–304.
- Tsunewaki, K. (1996) Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. In: *Methods of Genome Analysis in Plants* (ed.: P. P. Jauhar), pp. 271–299. CRC Press, New York.
- Tsunewaki, K., and Nakamura, H. (1995) Genomic relationships and phylogeny in wheat obtained by RFLP analysis of nuclear DNA. In: *Plant Genome and Plastome* (ed.: K. Tsunewaki), pp. 115–127. Kodansha Scientific LTD, Tokyo.
- Tsunewaki, K., and Ogihara, Y. (1983) The molecular basis of genetic diversity among cytoplasms of *Triticum* and *Aegilops* species. II. On the origin of polyploidy wheat cytoplasms as suggested by chloroplast DNA restriction fragment patterns. *Genetics* **104**, 155–171.

Yoshihiro Matsuoka · Naoki Mori · Taihachi Kawahara

Genealogical use of chloroplast DNA variation for intraspecific studies of *Aegilops tauschii* Coss.

Received: 22 October 2004 / Accepted: 29 March 2005 / Published online: 14 May 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Intraspecific patterns of chloroplast DNA variation was studied in *Aegilops tauschii* Coss., the D-genome progenitor of bread wheat. Nucleotide sequences of ten chloroplast microsatellite loci were analyzed for 63 accessions that cover the central part of the species distribution. As is often the case with nuclear microsatellites, those of chloroplasts of *Ae. tauschii* bear complex mutations. Several types of mutations other than change in the microsatellite repeat number were found, including base substitutions and length mutations in flanking regions. In total, eight mutations were present in the flanking regions of four loci. Most mutations in the flanking regions of microsatellite repeats are associated with biallelic polymorphisms. Phylogeographic analyses showed that such biallelic polymorphisms are useful to investigate intraspecific patterns of monophyletic lineage divergence. In contrast, most microsatellite repeat sites are multiallelic, variable within intraspecific lineages, and useful to compare degrees of genetic diversity between lineages. These findings show that the chloroplast genome harbors evolutionary variations informative for intra-

specific studies of *Ae. tauschii* and can be analyzed by genealogical approaches.

Introduction

Chloroplast DNA (cpDNA) variation has been used for evolutionary, ecological, and phylogeographic plant studies. Chloroplast DNA has a conservative nucleotide substitution rate, which facilitates comparison of variations in a wide range of plant taxa. Uniparentally inherited, the effectively non-recombining genome of the chloroplast helps simplify theories of phylogenetic inference. Comparative analyses of cpDNA variations have complemented morphological studies and provided novel phylogenetic insights, especially above the species level (e.g., Tsunewaki 1993; Provan et al. 2004).

The recent development of hypervariable chloroplast microsatellites provides a new avenue for the use of cpDNA variation as a tool to study intraspecific processes. Because the chloroplast genome is effectively haploid, population differentiation can be accelerated in it by genetic drift due to the small effective population size relative to nuclear autosomes. Hypervariable chloroplast microsatellites, coupled with accelerated population differentiation of the chloroplast genome, therefore provide useful measures for comparing intraspecific taxa and populations (Provan et al. 2001).

Chloroplast microsatellite variation is often assayed by gel electrophoresis of PCR products amplified by means of primers specific to the 5' and 3' flanking regions of stretches of the microsatellite repeat. Size homoplasy, however, is reported to occur in chloroplast microsatellites through recurrent generation of alleles of identical size (Doyle et al. 1998). Several types of mutation appear to be responsible for size homoplasy, e.g., gain/loss mutations of microsatellite repeat units and base substitutions and length mutations in the flanking regions (Hale et al. 2004). Size homoplasy makes it difficult to determine unambiguously whether

Electronic Supplementary Material Supplementary material is available for this article at <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-005-2020-x>

Communicated by B. Friebe

Y. Matsuoka (✉)
Fukui Prefectural University, Matsuoka-cho, Yoshida-gun,
Fukui, 910-1195, Japan
E-mail: matsuoka@fpu.ac.jp
Tel.: +81-776-61-6000
Fax: +81-776-61-6015

N. Mori
Laboratory of Plant Genetics,
Faculty of Agriculture,
Kobe University, Nada-ku, Kobe, 657-8501, Japan

T. Kawahara
Plant Germ-plasm Institute, School of Agriculture,
Kyoto University, Mozume, Muko, 617-0001, Japan

alleles are identical due to descent or are identical in state, thereby limiting the use of chloroplast microsatellites for phylogenetic inference.

The presence of base substitutions and length mutations in flanking regions indicates that chloroplast microsatellites, as is often the case with their nuclear counterparts (Colson and Goldstein 1999; Matsuoka et al. 2002), undergo complex mutations. Detailed analyses of mutation patterns therefore should help clarify concerns about size homoplasy in the use of chloroplast microsatellites for phylogeny reconstruction. Furthermore, polymorphisms associated with base substitutions and length mutations in the flanking regions, if identified explicitly, can serve as phylogenetic markers relatively free of recurrent mutations. To fully obtain the evolutionary information held in chloroplast microsatellite loci, it is necessary to understand the nature of mutations that underlie observed variations.

We report nucleotide sequence variations in ten microsatellite loci of the chloroplast genome of the wild grass species, *Aegilops tauschii* Coss. *Ae. tauschii*, the D-genome progenitor of bread wheat [*Triticum aestivum*] Kihara 1944; McFadden and Sears 1944], is distributed from Syria to China, the center of distribution being in the southern coastal region of the Caspian Sea and Azerbaijan (Slageren 1994). Sixty-three accessions of *Ae. tauschii* from the collection of the 1955 Kyoto University Scientific Expedition to the Karakoram and Hindukush (Kihara et al. 1965) were selected for analyses. These accessions, which cover the central part of the *Ae. tauschii* distribution (Fig. 1), are suitable materials for investigating nucleotide sequence variation in the chloroplast microsatellites of this species. Our analyses show that (1) such different mutation types, as base substitutions and length mutations, occur in the flanking regions of the chloroplast microsatellites of *Ae. tauschii*; (2) bi-allelic polymorphisms associated with mutations in flanking regions can be used to investigate intraspecific patterns of monophyletic lineage divergence; and (3) highly variable multiallelic microsatellites can be used to

compare intralinear diversity. Our findings show that the chloroplast genome harbors variations that provide evolutionary information for intraspecific studies of *Ae. tauschii*.

Materials and methods

Plant materials

Sixty-three accessions of *Ae. tauschii* Coss. (syn. *Aegilops squarrosa* L.), collected by the Kyoto University Scientific Expedition to the Karakoram and Hindukush, were used (see Kihara et al. 1965), 26 accessions from Afghanistan and Pakistan, 30 from the Caspian region of Iran, and seven from the inland region of Iran (Fig. 1). These accessions are maintained at the Plant Germ-plasm Institute of Kyoto University (Kawahara 1997). Locality data for the plant materials can be found in the Electronic Supplementary Material, Table 1.

Chloroplast microsatellite analysis

Total DNA was extracted from the young leaves of individual plants by the CTAB method (Doebley and Stec 1991; Saghai-Marouf et al. 1984). Chloroplast microsatellites were amplified by PCR via primers originally designed by Ishii et al. (2001) for bread wheat chloroplast microsatellites. The PCR reaction mixture consisted of a 50-ng-total DNA template, 5 nmol each dNTP, 10 pmol each primer, 2 μ l of 10X buffer, 0.1 U *Ex Taq* polymerase (TaKaRa), and distilled water to 50 μ l. Amplification was done in a Model 9700 (Applied Biosystems) device for a total of 25 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 0.5 min. PCR products were purified with an ExoSAP-IT kit (Amersham Pharmacia Biotech), then sequenced directly with one of the PCR primers and a BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Sequences were

Fig. 1 Distribution of the *Aegilops tauschii* accessions analyzed. Sample areas are shaded according to the geographic key in the figure



analyzed with an ABI automated sequencer (Applied Biosystems). Clustal W, version 1.8 (Thompson et al. 1994), was used for nucleotide sequence alignment, and Network software version 4.101 (available at <http://www.fluxus-engineering.com>; Bandelt et al. 1995), for reduced median network construction.

Results

Chloroplast microsatellite sequencing

The ten PCR primer sets, originally designed for bread wheat chloroplast microsatellites (Ishii et al. 2001), were successfully used for the 63 accessions of *Ae. tauschii*. A single major PCR product was obtained in each PCR reaction (data not shown), indicative that the primer sequences were conserved between *Ae. tauschii* and bread wheat. In total, 630 chloroplast DNA fragments were sequenced. The microsatellite repeat lengths of those loci were short (8–15 mononucleotide repeats), which enabled unambiguous determination of the numbers of microsatellite repeats by single-strand sequencing. In a few cases, both-strand sequencing was done for confirmation. Except for the WCt10 locus, all had mutations other than a microsatellite repeat number change were sequenced for both strands.

Mutations in chloroplast microsatellite loci

Sequence analysis of the ten chloroplast microsatellite loci revealed mutations other than microsatellite repeat number change in four (WCt6, WCt10, WCt17–WCt18, and WCt24, Table 1). In total, eight non-microsatellite mutations were present in the flanking regions of the microsatellite repeats. The WCt6 locus had an additional microsatellite (WCt6a) in the flanking region of the original microsatellite (WCt6b), which first had been identified in bread wheat (Ishii et al. 2001). A novel minisatellite with a 20-bp repeat unit (WCt24h1) was present in the flanking regions of the WCt24 locus. In addition, a mutation interrupting the stretch of the microsatellite repeat itself was present in the WCt24 locus.

Mutation other than a microsatellite repeat number change was relatively rare. Base substitutions (SNP and LBS, see Table 1) were present in as many as 5 of 63 accessions in most cases (7.9%), whereas there was a G-to-T change at the WCt6d site in 19 accessions (30.2%). Minisatellite repeat number change (WCt24h1) occurred in 16 accessions (25.4%). Even though no mutation other than microsatellite repeat number change was present in six loci (WCt1, WCt4, WCt5, WCt8, WCt12, and WCt19), our findings indicate that the chloroplast microsatellites of *Ae. tauschii* have complex mutation patterns.

Table 1 Chloroplast microsatellite loci analyzed and mutations found

Locus ^a	Mutation site ^b	Position ^c	Mutation type ^d	Allelic state ^e	Frequency ^f	Note ^g
WCt1	WCt1a	NA	SSR	M	NA	(A) _{9–11}
WCt4	WCt4a	NA	SSR	B	19/63	(T) _{9–10}
WCt5	WCt5a	NA	SSR	M	NA	(A) _{10–15}
WCt6	WCt6a	31	SSR	M	NA	(T) _{8–10}
	WCt6b	NA	SSR	M	NA	(C) _{8–10}
	WCt6c	109	SNP	B	1/63	G to T
	WCt6d	113	SNP	B	19/63	G to T
WCt8	WCt8a	NA	SSR	NA	NA	(T) ₈
WCt10	WCt10a	NA	SSR	M	NA	(A) _{9–12}
	WCt10c1	97	SNP	B	1/63	T to G
WCt12	WCt12a	NA	SSR	M	NA	(T) _{10–12}
WCt17–WCt18	WCt17a	NA	SSR	M	NA	(T) _{9–12}
	WCt1718b	56	LBS	B	3/63	TTC to AAA
	WCt1718c	345	SNP	B	1/63	G to A
	WCt18a	NA	SSR	NA	NA	(A) ₉
WCt19	WCt19a	NA	SSR	NA	NA	(A) ₈
WCt24	WCt24a	NA	SSR/IN	M	NA	(A) _{8–12} /(A) ₅ T(A) ₅
	WCt24d1	34	SNP	B	5/63	C to T
	WCt24h1	31	VNTR	B	16/63	(CTTCGTTACCTAGTTATTTT) _{1–2}
	WCt24j1	112	SNP	B	1/63	G to A

^aLocus names are according to Ishii et al. (2001). The WCt17–WCt18 locus was amplified using WCt17 forward and WCt18 reverse primers

^bMicrosatellites originally identified by Ishii et al. (2001) are shown in *boldface*

^cPositions are based on the aligned sequences, counted from the nucleotide next to the 3' end of the forward primer, and shown only for the newly found mutation sites. NA Non-applicable

^dBase substitution, interruption in microsatellite repeats, linked

base substitution (i.e., small block substitution of nucleotides), microsatellite mutation, and minisatellite (i.e., hypervariable arrays with 10–50 repeat units) mutation, respectively, are denoted by *SNP*, *IN*, *LBS*, *SSR*, and *VNTR*, respectively

^eBiallelic and multiallelic, respectively, are denoted by *B* and *M*

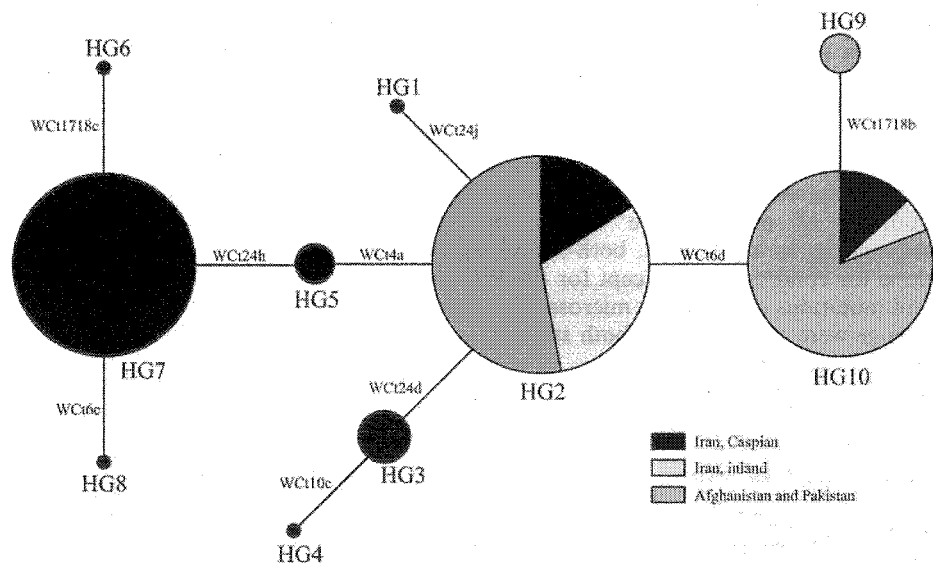
^fFrequencies of the minor allele are given for biallelic sites. NA Non-applicable

^gAlleles found or estimated mutation directions are given for each mutation site

Table 2 Haplogroups defined by biallelic polymorphisms

Haplogroup	No. of individuals	Biallelic site name								
		WCt4a	WCt6c	WCt6d	WCt10c1	WCt1718b	WCt1718c	WCt24d1	WCt24h1	WCt24j1
HG1	1	9	G	G	A	TTC	G	C	1	A
HG2	19	9	G	G	A	TTC	G	C	1	G
HG3	4	9	G	G	A	TTC	G	T	1	G
HG4	1	9	G	G	C	TTC	G	T	1	G
HG5	3	10	G	G	A	TTC	G	C	1	G
HG6	1	10	G	G	A	TTC	A	C	2	G
HG7	14	10	G	G	A	TTC	G	C	2	G
HG8	1	10	T	G	A	TTC	G	C	2	G
HG9	3	9	G	T	A	AAA	G	C	1	G
HG10	16	9	G	T	A	TTC	G	C	1	G

Fig. 2 Reduced-median network for the chloroplast DNA haplogroups of *Ae. tauschii* constructed using biallelic polymorphisms. The circles represent haplogroups with diameters proportional to the number of accessions. Shading shows geographic origin proportions, according to the geographic key. Mutations that define haplogroups are shown on branches



Evolutionary informative biallelic polymorphism

Sequence analysis of the chloroplast microsatellites of *Ae. tauschii* showed two types of segregating sites, biallelic (sites with two alleles) and multiallelic (sites with more than two alleles) (Table 1). In most cases, the biallelic sites are the result of mutations other than microsatellite repeat number change (exception: WCt4a, Table 1). Because such mutations (especially base substitutions) are considered to occur much less often than microsatellite repeat number changes, they can serve as phylogenetic markers to define intraspecific monophyletic lineages of non-recombining chloroplast genomes (Hurler and Jobling 2001).

To assess the usefulness of biallelic cpDNA polymorphisms in evolutionary studies of *Ae. tauschii*, we defined ten cpDNA haplogroups from the data on biallelic sites (Table 2), constructed a reduced median network, and examined the geographic distribution patterns of the haplogroups (Fig. 2). Each haplogroup consisted of haplotypes defined by a unique set of alleles at all the mutation sites, including multiallelic ones (see

Electronic Supplementary Material, Table 1). Three major haplogroups were distinguished: HG2, HG7, and HG10 (Table 2; Fig. 2). Geographically, HG7 was restricted to the Caspian region of Iran, and HG10 was relatively rare outside of Afghanistan and Pakistan, whereas HG2 was distributed widely in the eastern (Afghanistan and Pakistan) and western (Iran) parts of the entire distribution. This marked difference in geographic distribution suggests that each haplogroup represents an intraspecific lineage that underwent a unique pattern of divergence and dispersal during *Ae. tauschii* evolution. Furthermore, by viewing the network regionally, the Caspian region of Iran obviously was the center of haplogroup diversity, harboring all but one haplogroup. Outside of that region, many fewer haplogroups were found, two (HG2 and HG10) for the inland region of Iran and three (HG2, HG9, and HG10) for Afghanistan and Pakistan (Fig. 2). These findings are consistent with those of a previous study showing the center of *Ae. tauschii*'s genetic diversity to be in the southern coastal region of the Caspian sea and Transcaucasia (Dvorak et al. 1998). In all, these findings indi-

Table 3 Genetic diversity measures for the three major chloroplast DNA haplogroups based on multiallelic polymorphisms

Genetic diversity measures	Haplogroup		
	HG2 (n=19)	HG7 (n=14)	HG10 (n=16)
No. of variable sites	8	4	5
No. of haplotypes	10	6	8
Haplotype diversity index ^a	0.81	0.74	0.83
No. of alleles per site	2.88 ± 0.93	1.63 ± 0.70	2.13 ± 1.05
Mean allele diversity index	0.36 ± 0.15	0.14 ± 0.19	0.28 ± 0.24

^aCalculated as $1 - \sum p_i$, where p_i is the frequency of the i th haplotype

cate that the geographic distribution patterns of the ten haplogroups reflect the species' history of divergence and dispersal. Biallelic cpDNA polymorphisms therefore can be used for intraspecific studies of *Ae. tauschii*.

Intralineage diversity

Because biallelic sites are considered relatively free of recurrent mutations, each of the ten haplogroups represents a monophyletic lineage. A comparison of genetic diversity between these monophyletic lineages is of evolutionary interest. This may be done with genetic markers that vary within lineages. In our case, multiallelic sites (Table 1) could be used for this purpose.

To test whether multiallelic sites can be used to distinguish haplogroup genetic diversity, we examined genetic diversity measures for the three major haplogroups: HG2, HG7, and HG10 (Table 3). These haplogroups were chosen because of their large and nearly equal sample sizes (Table 2). Eight multiallelic sites (WCt1a, WCt5a, WCt6a, WCt6b, WCt10a, WCt12a, WCt17a, and WCt24a) were analyzed. Genetic diversity measures tended to be small in HG7 relative to HG2 and HG10 (Table 3), to which the small HG7 sample size may have contributed. Two genetic diversity measures that are less sensitive to sample size difference (the haplotype diversity and mean allele diversity indices), however, were reduced in HG7, indicative that it is genetically less diverse than the other haplogroups. These findings show that multiallelic sites of the chloroplast genome can be used to compare the genetic diversity of haplogroups.

Discussion

Complex mutations at chloroplast microsatellites

Nuclear microsatellites have complex mutation patterns. For example, microsatellite repeat numbers may change asymmetrically, some tending to increase, others to decrease (Huang et al. 2002). Interruptions of the stretches of microsatellite repeats may stabilize microsatellite loci (Kruglyak et al. 1998); moreover, a form of allele-size

constraint seems to prevent microsatellites from having a large number of repeats (see Goldstein and Pollock 1997). In addition, mutations in the flanking regions of microsatellites (such as indels and base substitutions) are common in plant (Matsuoka et al. 2002) and animal (Colson and Goldstein 1999) nuclear microsatellite loci.

We analyzed the nucleotide sequences of ten chloroplast microsatellites of *Ae. tauschii* and found that several types of mutations occur in those loci (Table 1). Base substitutions and length mutations were present in the flanking regions of four loci: WCt6, WCt10, WCt17–WCt18, and WCt24. In addition, a mutation that interrupts the microsatellite repeat stretch was present in the WCt24 locus. These findings indicate that, as is often the case with the nuclear microsatellites, the chloroplast microsatellites of *Ae. tauschii* have complex mutation patterns.

Because no length mutation was found in the flanking regions of eight loci, the percentage of *Ae. tauschii* chloroplast microsatellites having size variations due to length mutation in the flanking regions should not be as high as the values reported for maize (87%) and fruit fly (60%) nuclear microsatellites (Colson and Goldstein 1999; Matsuoka et al. 2002). The conventional gel assay therefore provides a simple method for analyzing chloroplast microsatellite repeat number variation. In fact, a gel assay is much more cost-efficient than sequencing, especially when dealing with a large number of samples. The number of base substitutions present in the ten chloroplast microsatellite loci (six SNPs and one LBS, see Table 1), however, highlights the need for sequencing in order to obtain all the evolutionary information present in the chloroplast microsatellite loci. Furthermore, nucleotide sequence analyses should help us understand better the mutation process in chloroplast microsatellite loci and to develop phylogenetic methods based on our knowledge of the genetic mechanism that generates variation.

Comparison of chloroplast microsatellite repeat variations

To obtain insight into the chloroplast microsatellite evolution in *Aegilops* and *Triticum*, *Ae. tauschii* and *Ae. speltoides*, and the tetraploid *Triticum* wheats, microsatellite repeat variations were compared (Table 4). *Aegilops* and *Triticum* are congeneric, and *Ae. speltoides* and the tetraploid *Triticum* wheats have closely related plasmons (type B, G, and S), whereas *Ae. tauschii* has the type D plasmon (Tsunewaki 1993). Accessions of *Ae. speltoides* and the tetraploid *Triticum* wheats used in the comparison had been analyzed previously for the loci used in this study (Ishii et al. 2001). To quantify variability, a diversity index was calculated for each locus using $1 - \sum p_i$, where p_i is the frequency of the i th microsatellite allele (i.e., "gene diversity," Nei 1973).

Similar mean values were obtained for the number of alleles per locus (2.909 for *Ae. tauschii*, 2.818 for *Ae.*

Table 4 Comparison of chloroplast microsatellite variations among *Ae. tauschii* and the *Ae. speltoides* and tetraploid *Triticum* wheats

Microsatellite	<i>Ae. tauschii</i>			<i>Ae. speltoides</i> and the 4x <i>Triticum</i> wheats ^b		
	No. of individuals ^a	No. of alleles	Diversity index (<i>H</i>)	No. of individuals	No. of alleles	Diversity index (<i>H</i>)
WCt1a	63	3	0.148	29	2	0.485
WCt4a	63	2	0.421	29	4	0.535
WCt5a	63	5	0.695	29	4	0.516
WCt6b	63	3	0.386	29	3	0.473
WCt8a	63	1	0	29	1	0
WCt10a	63	4	0.660	29	2	0.067
WCt12a	63	3	0.610	29	3	0.595
WCt17a	63	4	0.742	29	3	0.471
WCt18a	63	1	0	29	1	0
WCt19a	63	1	0	29	3	0.625
WCt24a	62	5	0.468	29	5	0.644
Mean		2.909	0.375		2.818	0.401

^aOne accession with an interruption in the WCt24 microsatellite repeat was excluded from the calculations

^bCalculated from data for *Ae. speltoides* (one accession) and the tetraploid *Triticum* wheats (*T. dicoccoides*, *T. dicoccum*, *T. durum*, *T. araraticum*, and *T. timopheevi*, 28 accessions in total) (Ishii et al. 2001)

speltoides and the tetraploid *Triticum* wheats), whereas the mean diversity index was slightly higher in *Ae. speltoides* and the tetraploid *Triticum* wheats (0.401) than in *Ae. tauschii* (0.375). Taking into account the small number of accessions analyzed for *Ae. speltoides* and the tetraploid *Triticum* wheats, these results suggest that chloroplast microsatellites vary less in *Ae. tauschii* than in *Ae. speltoides* and tetraploid *Triticum* wheats. Of the three microsatellites monomorphic in *Ae. tauschii*, two (WCt8a and WCt18a) also were monomorphic in *Ae. speltoides* and the tetraploid *Triticum* wheats, and the other (WCt19a) was polymorphic. Pearson's correlation coefficients were positive for both the numbers of alleles per locus (0.624) and the diversity indices (0.327) but significant only for the number of alleles per locus ($P=0.040$). These results must be viewed with caution, because the data set for *Ae. speltoides* and the tetraploid *Triticum* wheats was obtained by gel assay (Ishii et al. 2001) and may not adequately reflect the variability resulting from length mutations in flanking regions.

Genealogical use of cpDNA variation in intraspecific studies of *Ae. tauschii*

The human Y chromosome is haploid, non-recombining, and uniparentally inherited. These characteristics are shared by chloroplast genomes of many plant species. In humans, genealogical approaches that combine data from biallelic and multiallelic sites of the Y chromosome hierarchically have been used successfully to construct haplogroup networks, to analyze geographic distribution patterns of haplotypes, to estimate the ages of intraspecific lineages, and to discriminate between closely related populations (Bosch et al. 1999; de Knijff et al. 1997). This approach also may be applicable to cpDNA variation in plants.

We here showed that the chloroplast genome of *Ae. tauschii* has two types of mutation sites, biallelic and

multiallelic, in the flanking regions of its microsatellite repeats. We used biallelic polymorphisms to construct a reduced median haplogroup network that represents the evolutionary pathway marked by unique mutation events during the evolution of *Ae. tauschii* (Fig. 2). Phylogeographic insights provided by the haplogroup network were consistent with those of previous genetic *Ae. tauschii* studies. Furthermore, analyses of intralinesage diversity showed that data on multiallelic sites could be used to compare genetic diversity between monophyletic lineages. This result indicates that multiallelic sites have the potential for phylogenetic use, because, as shown for human Y haplogroups (Bosch et al. 1999; de Knijff et al. 1997), comparative analyses of genetic diversity can provide insights into the formation, demography, and diversification of intraspecific lineages. These findings clearly indicate that the genealogical approaches used in human Y chromosome studies are applicable to the analysis of cpDNA variation in *Ae. tauschii*. Because the power of genealogical analyses relies heavily on the number of biallelic sites that define monophyletic lineages, it is desirable to find more of these sites (especially those associated with base substitutions) by exploring other regions of the *Ae. tauschii* chloroplast genome.

Ae. tauschii is morphologically, ecologically, and genetically diverse (Slageren 1994). Because *Ae. tauschii* is the D-genome progenitor of bread wheat, understanding its genetic population structure is fundamental to the full use of the vast *Ae. tauschii* germplasm for wheat breeding. Phylogenies based on chloroplast and nuclear DNA variations are often incongruent (Doyle et al. 1999; Nishimoto et al. 2003; Sasanuma et al. 2004). Comparative analyses of incongruent phylogenies may help infer the impact of hybridization and lineage sorting on the species population structure (Wendel and Doyle 1998). Genealogical analyses of cpDNA variations of *Ae. tauschii* therefore provide an alternative approach that has the potential to complement previous

work done with nuclear markers (Dvorak et al. 1998; Guyomarc'h et al. 2002; Lelley et al. 2000; Pestsova et al. 2000). In general, a broad sample set covering the entire species range is required to address questions regarding the history of the formation, dispersal, and diversification of a species. Large-scale genealogical analyses of cpDNA variations may provide a means of better understanding the morphological, ecological, and genetic diversity of *Ae. tauschii*.

Acknowledgements We thank T. Ishii for his help with the data analyses. This work was supported by a Sumitomo Foundation Grant (no. 020151) to Y.M.

References

- Bandelt HJ, Foster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141:743–753
- Bosch E, Calafell F, Santos FR, Pérez-Lezaun A, Comas D, Benchemsi N, Tyler-Smith C, Bertranpetit J (1999) Variation in short tandem repeats is deeply structured by genetic background on the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 65:1623–1638
- Colson I, Goldstein DB (1999) Evidence for complex mutations at microsatellite loci in *Drosophila*. *Genetics* 152:617–627
- Doebley J, Stec A (1991) Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* 129:285–295
- Doyle JJ, Morgante M, Tingey SV, Powell W (1998) Size homoplasy in chloroplast microsatellites of wild perennial relatives of soybean (*Glycine* subgenus *Glycine*). *Mol Biol Evol* 15:215–218
- Doyle JJ, Doyle JL, Brown AH (1999) Incongruence in the diploid B-genome species complex of *Glycine* (Leguminosae) revisited: histone H3-D alleles versus chloroplast haplotypes. *Mol Biol Evol* 16:354–362
- Dvorak J, Luo MC, Yang ZL, Zhang HB (1998) The structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 97:657–670
- Goldstein DB, Pollock DD (1997) Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J Hered* 88:335–342
- Guyomarc'h H, Sourdille P, Charvet G, Edwards KJ, Bernard M (2002) Characterisation of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor Appl Genet* 104:1164–1172
- Hale ML, Borland AM, Gustafsson MHG, Wolff K (2004) Causes of size homoplasy among chloroplast microsatellites in closely related *Chusca* species. *J Mol Evol* 58:182–190
- Huang QY, Xu FH, Shen H, Deng HY, Liu YJ, Liu YZ, Li JL, Recker RR, Deng HW (2002) Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am J Hum Genet* 70:625–634
- Hurles ME, Jobling MA (2001) Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y. *Mol Ecol* 10:1599–1613
- Ishii T, Mori N, Ogihara Y (2001) Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. *Theor Appl Genet* 103:896–904
- Kawahara T (1997) *Aegilops squarrosa*. In: Kawahara T (ed) Catalogue of *Aegilops-Triticum* germ-plasm preserved in Kyoto University, 1997. Plant Germ-plasm Institute, Kyoto University, Kyoto, pp 106–112
- Kihara H (1944) Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare* (abstract) (in Japanese). *Agric Hort (Tokyo)* 19:889–890
- Kihara H, Yamashita K, Tanaka M (1965) Morphological, physiological, genetical and cytological studies in *Aegilops* and *Triticum* collected from Pakistan, Afghanistan and Iran. In: Yamashita K (ed) Results of the Kyoto University Scientific Expedition to the Karakoram and Hindukush, vol 1. Kyoto University, Kyoto, pp 1–118
- de Knijff P, Kayser M, Caglia A et al (1997) Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Legal Med* 110:134–140
- Kruglyak S, Durrett RT, Schug MD, Aquadro CF (1998) Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10774–10778
- Lelley T, Stachel M, Grausgruber H, Vollmann J (2000) Analysis of relationships between *Aegilops tauschii* and the D genome of wheat utilizing microsatellites. *Genome* 43:661–668
- Matsuoka Y, Mitchell SE, Kresovich S, Goodman M, Doebley J (2002) Microsatellites in *Zea*—variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies. *Theor Appl Genet* 104:436–450
- McFadden ES, Sears ER (1944) The artificial synthesis of *Triticum spelta* (abstract) *Rec Genet Soc Am* 13:26–27
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321–3323
- Nishimoto Y, Ohnishi O, Hasegawa M (2003) Topological incongruence between nuclear and chloroplast DNA trees suggesting hybridization in the urophyllum group of the genus *Fagopyrum* (Polygonaceae). *Genes Genet Syst* 78:139–153
- Pestsova E, Korzun V, Goncharov NP, Hammer K, Ganai MW, Röder MS (2000) Microsatellite analysis of *Aegilops tauschii* germplasm. *Theor Appl Genet* 101:100–106
- Provan J, Powell W, Mollingsworth PM (2001) Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 16:142–147
- Provan J, Wolters P, Caldwell KH, Powell W (2004) High-resolution organellar genome analysis of *Triticum* and *Aegilops* sheds new light on cytoplasm evolution in wheat. *Theor Appl Genet* 108:1182–1190
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:8014–8018
- Sasanuma T, Chabane K, Endo TR, Valkoun J (2004) Characterization of genetic variation in and phylogenetic relationships among diploid *Aegilops* species by AFLP: incongruity of chloroplast and nuclear data. *Theor Appl Genet* 108:612–618
- Slageren MW van (1994) Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. & Spach) Eig (Poaceae). Wageningen Agricultural University, Wageningen, pp 326–344
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Tsunewaki K (1993) Genome-plasmon interactions in wheat. *Jpn J Genet* 68:1–34
- Wendel JF, Doyle JJ (1998) Phylogenetic incongruence: window into genome history and molecular evolution. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ (eds) Molecular systematics of plants II. Kluwer Academic, Boston, pp 265–296

Harish T. Gandhi · M. Isabel Vales
Christy J. W. Watson · Carol A. Mallory-Smith
Naoki Mori · Maqsood Rehman · Robert S. Zemetra
Oscar Riera-Lizarazu

Chloroplast and nuclear microsatellite analysis of *Aegilops cylindrica*

Received: 7 February 2005 / Accepted: 15 April 2005 / Published online: 29 June 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract *Aegilops cylindrica* Host ($2n=4x=28$, genome CCDD) is an allotetraploid formed by hybridization between the diploid species *Ae. tauschii* Coss. ($2n=2x=14$, genome DD) and *Ae. markgrafii* (Greuter) Hammer ($2n=2x=14$, genome CC). Previous research has shown that *Ae. tauschii* contributed its cytoplasm to *Ae. cylindrica*. However, our analysis with chloroplast microsatellite markers showed that 1 of the 36 *Ae. cylindrica* accessions studied, TK 116 (PI 486249), had a plastome derived from *Ae. markgrafii* rather than *Ae. tauschii*. Thus, *Ae. markgrafii* has also contributed its cytoplasm to *Ae. cylindrica*. Our analysis of chloroplast and nuclear microsatellite markers also suggests that D-type plastome and the D genome in *Ae. cylindrica* were closely related to, and were probably derived from, the *tauschii* gene pool of *Ae. tauschii*. A determination of the likely source of the C genome and the C-type plastome in *Ae. cylindrica* was not possible.

Introduction

Jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host, $2n=4x=28$, genome CCDD) is an allotetraploid of the Triticeae tribe

Communicated by B. Friebe

H. T. Gandhi · M. I. Vales · C. J. W. Watson
C. A. Mallory-Smith · O. Riera-Lizarazu (✉)
Department of Crop and Soil Science, Oregon State University,
107 Crop Science Building, Corvallis, OR 97331-3002, USA
E-mail: oscar.riera@oregonstate.edu
Tel.: +1-541-7375879
Fax: +1-541-7371334

N. Mori
Laboratory of Plant Genetics, Faculty of Agriculture,
Kobe University, 1 Rokkodai-cho, Nada-ku,
Kobe 657-8501, Japan

M. Rehman · R. S. Zemetra
Department of Plant, Soil, and Entomological Sciences,
University of Idaho, Moscow, ID 83844-2339, USA

(Poaceae family). *Ae. cylindrica* is a close relative of wheat (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$, genome AABBDD) and the two share the D genome (Riley and Law 1965; Kimber and Zhao 1983). This species is of worldwide economic importance for various reasons. First, jointed goatgrass is a widespread weed of bread wheat, chronically infesting fields in the Midwestern and western United States as well as fields in the Middle East and parts of Europe (Dewey 1996; Ogg and Seefeldt 1999; Guadagnuolo et al. 2001). Hybridization between jointed goatgrass and wheat and partial female fertility of the resulting naturally produced hybrids suggest the possibility of crop-to-weed gene movement (Zemetra et al. 1998; Morrison et al. 2002). Jointed goatgrass also has been identified as a source of useful genetic variation for wheat improvement (Farooq et al. 1992; El Bouhsini et al. 1998; Iriki et al. 2001). Therefore, there is considerable interest in understanding various aspects of the evolution of *Ae. cylindrica* for its better management and use.

Jointed goatgrass formed through amphidiploidization of a hybrid between *Ae. tauschii* Coss. ($2n=2x=14$, genome DD) and *Ae. markgrafii* (Greuter) Hammer (syn. *Ae. caudata* L., $2n=2x=14$; genome CC). This determination is based on data from a variety of sources including chromosome-pairing studies in interspecific hybrids (Kihara and Matsumura 1941; Kimber and Zhao 1983), karyotype analysis (Chennaveeraiah 1960), and analyses of protein and nuclear DNA variation (Jaaska 1981; Nakai 1981; Masci et al. 1992; Dubcovsky and Dvorak 1994). Furthermore, studies on phenotypic variation (Maan 1976; Tsunewaki 1996) and organellar DNA variation (Ogihara and Tsunewaki 1988; Wang et al. 1997, 2000a) established cytoplasmic homology between *Ae. cylindrica* and *Ae. tauschii* (D-type cytoplasm). These analyses suggested that *Ae. tauschii* was the maternal parent in the formation of *Ae. cylindrica*. However, studies on cytoplasmic variation in *Ae. cylindrica* have not been undertaken.

The nuclear genetic diversity of jointed goatgrass has been studied using allozyme (Watanabe et al. 1994),

C-banding (Badaeva et al. 2002), RAPD (Okuno et al. 1998; Goryunova et al. 2004), a combination RAPD and AFLP (Pester et al. 2003), and DNA sequence polymorphisms (Caldwell et al. 2004). These studies suggested that *Ae. cylindrica* had very low levels of genetic diversity, and that this allotetraploid originated recurrently. Although some studies indicated that the D genomes of wheat and *Ae. cylindrica* were apparently contributed by genetically distinct biotypes of *Ae. tauschii* (Badaeva et al. 2002; Caldwell et al. 2004), the relationship between *Ae. cylindrica* with subspecies of *Ae. tauschii* is not well defined. Similarly, the relationship between *Ae. cylindrica* and genetically differentiated populations of *Ae. markgrafii* (Ohta 2000, 2001) is unknown.

In this study, nuclear and chloroplast microsatellite markers were employed to investigate the relationships between *Ae. cylindrica* and its progenitors, *Ae. tauschii*, and *Ae. markgrafii*. This analysis and the new insights that it provides with respect to the evolution of *Ae. cylindrica* are discussed.

Materials and methods

Plant material

Chloroplast and nuclear microsatellite analyses were performed on 36 accessions of *Ae. cylindrica*, 17 accessions of *Ae. tauschii*, seven accessions of *Ae. markgrafii*, two accessions of *T. aestivum*, and two accessions of *T. turgidum*. The list of accessions along with their region of origin, the geographical coordinates of their collection site, and seed sources are presented in Table 1.

DNA isolation and molecular marker assays

The DNA was extracted from 35 mg of leaf tissue following the protocol described by Riera-Lizarazu et al. (2000). Twenty wheat chloroplast (WCt) microsatellite markers (Ishii et al. 2001; Table 2) were used to characterize the chloroplast genome and 19 Gatersleben wheat microsatellite (gwm) markers (Röder et al. 1998; Table 3) were used to evaluate the nuclear genome. For microsatellite marker assays, one primer was labeled with a fluorescent dye (6-carboxyfluorescein, or 4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein, or 4,7,2',7'-tetrachloro-6-carboxyfluorescein). Polymerase chain reactions (PCRs) were carried out in 10- μ l reactions comprising 0.03 U *Taq* polymerase with 1X PCR buffer containing 1.5 mM MgCl₂ (Qiagen, Valencia, Calif., USA), 2% sucrose in 0.04% cresol red, 0.2 mM of each dNTP, and 0.2 μ M of each primer. The PCR consisted of denaturation at 95° for 5 min, followed by 40 cycles of 95° for 1 min, 50–60° (depending on primers) for 1 min, and 72° for 1 min, with final extension at 72° for 10 min. Fragment analysis was carried out using an ABI Prism 377 DNA Sequencer and ABI Prism 3100 Genetic

Analyzer. The ABI GeneScan, version 2.1, and Genotyper, version 2.0, software (Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) were used to size fragments based on an internal lane standard (*n*, *n*, *n'*, *n'*-tetramethyl-6-carboxyrhodamine or 6-carboxy-*x*-rhodamine).

Spike morphology assessments

Spike and apical spikelet morphology can be used to distinguish *Ae. cylindrica* from its progenitors (Kimber and Feldman 1987; van Slageren 1994). Thus, spike morphology and the presence or absence of awns on apical glumes and lemmas were evaluated in some *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, and *Ae. markgrafii* accessions to verify their identities.

Cytological analyses

Root-tip collection, pre-treatment, and chromosome spread preparations for chromosome counting and karyotypic observations were carried out as described in Riera-Lizarazu et al. (1996). Slides were analyzed with a Zeiss Axiokop 2 (Carl Zeiss, Germany) microscope. Images were photographed with black-and-white Agfa-pan APX 100 film (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium). Sample collection, treatments, and slide preparations for genomic in situ hybridization (GISH) performed on root-tip mitotic chromosome spreads of TK 116 were performed as described by Wang et al. (2002). *Ae. markgrafii* genomic DNA was used as the C-genome probe (biotinylated), and unlabeled *Ae. tauschii* genomic DNA was used as the D-genome hybridization competitor. Biotinylated DNA was detected with fluorescein conjugated Avidin, followed by signal amplification with biotinylated anti-avidin-D coupled with another layer of fluorescein-labeled Avidin. Unlabeled chromatin was counterstained with propidium iodide. Slides were analyzed with a microscope (Nikon Eclipse E1000) equipped with an epifluorescence attachment (with FITC, TRITC and dual-band FITC/PI filters; Chroma Technology, Brattleboro, VT). Images were taken with a built-in digital camera and were later processed using Adobe Photoshop, version 7.0 (Adobe Systems, San Jose, Calif., USA).

Statistical analyses

The number and frequency of alleles for each microsatellite marker were determined and used for the calculation of expected heterozygosity (Botstein et al. 1980). For both chloroplast and nuclear microsatellite markers, MICROSAT, version 2.0 (Minch et al. 1997), was used to generate a genetic distance (dissimilarity) matrix based on the proportion of shared alleles (Bowcock et al. 1994). The genetic distance matrix was then subjected to MEGA, version 2.0, for tree formation

Table 1 List of accessions along with their region of origin and the geographical coordinates of their collection sites

Species ^a	Accessions	Germplasm ID ^b	Region of origin	Geographical coordinates ^c	
				Latitude	Longitude
<i>Aegilops markgrafii</i> var. <i>markgrafii</i>	KU0006(A)	KU0006-2(A)	Syria	37.13	36.12
<i>Ae. markgrafii</i> var. <i>polyathera</i>	GR GB89	G591	Greece	NA	NA
<i>Ae. markgrafii</i> var. <i>markgrafii</i>	KU5472	KU5472	Iraq	35.54	44.84
<i>Ae. markgrafii</i> var. <i>polyathera</i>	KU5852(B)	KU5852(B)	Turkey	40.65	35.83
<i>Ae. markgrafii</i> var. <i>markgrafii</i>	KU5864 (C)	KU5864 (C)	Turkey	40.266	28.357
<i>Ae. markgrafii</i> var. <i>markgrafii</i>	KU5871(D)	KU5871(D)	Greece	NA	NA
<i>Ae. markgrafii</i> var. <i>markgrafii</i>	TK GB90	84TK159-036	Turkey	38.033	28.917
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	AE1039/95	AE1039/95	Tadjikistan	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>strangulata</i>	AE145/96	AE145/96	Azerbaijan	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>strangulata</i>	AE184/78	AE184/78	Iran	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>strangulata</i>	AE246/76	AE246/76	Uzbekistan	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	AE257/76	AE257/76	Kyrgyzstan	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	AE276/00	AE276/00	Afghanistan	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>strangulata</i>	AE457/94	AE457/94	Georgia	41.69	44.80
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>strangulata</i>	AE498/79	AE498/79	Dagestan	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	AE499/81	AE499/81	Turkmenistan	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	G5792	G5792	China	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i>	IRGB93	G1279	Iran	NA	NA
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	TA10143	TA10143	Syria	35.31	38.45
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	TA10144	TA10144	Syria	35.37	38.45
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	TA10145	TA10145	Syria	35.37	38.45
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	TA10146	TA10146	Syria	36.53	38.14
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	TA1588	TA1588	Turkey	38.5	43.3
<i>Ae. tauschii</i> ssp. <i>tauschii</i>	TA2460	TA2460	Iran	NA	NA
<i>Ae. cylindrica</i>	AF 26	PI298891	Afghanistan	35.72	64.90
<i>Ae. cylindrica</i>	AR 147	IG48754	Armenia	39.83	44.83
<i>Ae. cylindrica</i>	AZ 133	IG48031	Azerbaijan	39.28	47.05
<i>Ae. cylindrica</i>	BG 137	IG48325	Bulgaria	42.02	23.65
<i>Ae. cylindrica</i>	DG 135	IG48260	Dagestan	41.93	48.37
<i>Ae. cylindrica</i>	GE 29	PI314406	Georgia	41.72	44.78
<i>Ae. cylindrica</i>	GR 159	PC	Greece	NA	NA
<i>Ae. cylindrica</i>	IQ 34	PI254864	Iraq	37.12	42.68
<i>Ae. cylindrica</i>	IR 149	IG48914	Iran	37.47	57.33
<i>Ae. cylindrica</i>	JO 146	IG48584	Jordan	31.78	36.80
<i>Ae. cylindrica</i>	LB 148	IG48789	Lebanon	34.47	36.33
<i>Ae. cylindrica</i>	SY 119	IG44621	Syria	33.92	36.70
<i>Ae. cylindrica</i>	TJ 142	IG48558	Tadjikistan	39.45	68.33
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 1	PI172357	Turkey	40.27	40.25
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 107	PI407639	Turkey	39.48	32.34
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 115	PI554230	Turkey	37.13	44.52
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 116	PI486249	Turkey	40.18	42.63
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 120	IG47699	Turkey	40.23	28.20
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 127	IG47906	Turkey	38.83	32.08
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 129	IG47927	Turkey	38.97	35.60
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 131	IG47959	Turkey	38.42	39.33
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 14	PI542179	Turkey	39.35	26.75
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 15	PI554201	Turkey	38.37	37.77
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 16	PI486236	Turkey	37.30	44.57
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 17	PI554206	Turkey	37.23	44.65
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 19	PI554225	Turkey	38.40	42.60
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 2	PI172358	Turkey	40.05	42.18
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 39	G404	Turkey	36.85	40.05
<i>Ae. cylindrica</i>	TK 5	PI554203	Turkey	38.30	43.17
<i>Ae. cylindrica</i>	TM 139	IG48529	Turkmenistan	38.25	56.33
<i>Ae. cylindrica</i>	US/CO 61	PW27	USA	NA	NA
<i>Ae. cylindrica</i>	US/NE 45	PW6	USA	NA	NA
<i>Ae. cylindrica</i>	US/OR 13	FC13	USA	NA	NA
<i>Ae. cylindrica</i>	US/UT 21	FC21	USA	NA	NA
<i>Ae. cylindrica</i>	UZ 35	PI314185	Uzbekistan	41.37	69.55
<i>Ae. cylindrica</i>	YU 37	PI344778	Yugoslavia (Serbia)	44.02	20.92
<i>T. nurgidam</i> ssp. <i>durum</i>	394	PI94705	Palestine	32.00	35.00

Table 1 (Contd.)

Species ^a	Accessions	Germplasm ID ^b	Region of origin	Geographical coordinates ^c	
				Latitude	Longitude
<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i>	Langdon	CItr 13165	USA	NA	NA
<i>T. aestivum</i> ssp. <i>aestivum</i>	Alcedo	TA 2933	Germany	NA	NA
<i>T. aestivum</i> ssp. <i>aestivum</i>	Chinese Spring	CItr 14108	China	NA	NA

^aThe variety (*Ae. markgrafii*) and subspecies (*Ae. tauschii*) designations are based on passport data, Pestova et al. (2000), Ohta (2000, 2001), and our own observations

^bThe first letter(s) of the germplasm ID makes reference to the sources of the germplasm. Accessions starting with *G* were obtained from Dr J. Giles Waines, University of California, Riverside, Calif., USA; *KU* accessions were obtained from Dr Shoji Ohta, Fukui Prefectural University, Japan; *AE* accessions were obtained from Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Germany; *TA* accessions were obtained from Wheat Genetic Resource

Center, Kansas State University, Manhattan, Kan., USA; *IG* accessions were obtained from the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria; *CItr* and *PI* accessions were obtained from U.S. Department of Agriculture, National Small Grains Collection, Aberdeen, Idaho, USA; *FC*, *PW*, and *PC* (personal collections) accessions are maintained at Oregon State University, Corvallis, Idaho, USA

^cLongitude and latitude coordinates are in the decimal system. *NA* indicates that the coordinates were not available

Table 2 Heterozygosity indices, number of alleles, and allele size range for *Ae. markgrafii*, *Ae. tauschii*, and *Ae. cylindrica*, using chloroplast microsatellite markers

Marker	<i>Ae. markgrafii</i>			<i>Ae. tauschii</i>			<i>Ae. cylindrica</i> ^b			TK 116 Allele size (bp)
	No. of alleles	Allele size range (bp)	<i>H</i> ^a	No. of alleles	Allele size range (bp)	<i>H</i> ^a	No. of alleles	Allele size range (bp)	<i>H</i> ^a	
WCt 1	2	113–114	0.24	2	111–112	0.21	2	110–111	0.11	112
WCt 2	2	124–125	0.49	5	128–131	0.65	3	128–130	0.36	124
WCt 3	4	151–159	0.69	4	147–154	0.53	2	146–147	0.45	156
WCt 4	3	193–198	0.61	2	193–197	0.57	1	196	0.00	197
WCt 5	2	81–82	0.49	4	81–84	0.63	3	82–84	0.56	83
WCt 6	1	187	0.00	4	184–188	0.66	2	186–187	0.16	187
WCt 8	1	148	0.00	2	148–149	0.11	3	147–149	0.21	147
WCt 9	1	120	0.00	1	120	0.00	1	120	0.00	120
WCt 10	2	194–195	0.49	3	192–194	0.46	2	192–193	0.16	195
WCt 11	3	167–169	0.61	5	166–170	0.78	2	166–167	0.24	166
WCt 12	2	146–147	0.49	4	148–151	0.67	2	149–150	0.06	146
WCt 13	1	104	0.00	3	105–107	0.55	2	104–106	0.16	104
WCt 15	2	103–104	0.41	3	98–110	0.49	2	98–99	0.28	104
WCt 16	2	97–98	0.24	4	97–101	0.31	1	98	0.00	97
WCt 17	1	147	0.00	2	145–146	0.50	3	145–147	0.16	145
WCt 18	2	198–199	0.24	3	197–199	0.21	2	198–199	0.06	198
WCt 19	2	152–153	0.49	3	151–154	0.55	2	151–152	0.11	152
WCt 22	1	188	0.00	4	196–198	0.70	2	196–197	0.24	188
WCt 23	1	106	0.00	1	106	0.00	1	106	0.00	106
WCt 24	1	178	0.00	4	179–186	0.46	1	184	0.00	178
Average	1.8		0.28	3.15		0.45	1.95		0.17	

^aThe expected heterozygosity (*H*) was calculated as described by Botstein et al. (1980)

^bCalculations did not include data from TK 116

(Kumar et al. 2001) using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987). Tree View, version 1.6.6 (Page 2001), and MEGA were used to produce graphical outputs.

Results

For *Ae. cylindrica*, *Ae. tauschii*, and *Ae. markgrafii*, the average expected heterozygosity and number of alleles per marker were greater for nuclear than for chloroplast microsatellite markers (Tables 2, 3). Because there were

only two genotypes each from *T. aestivum* and *T. turgidum*, their heterozygosity values were not calculated. The average expected heterozygosity for *Ae. cylindrica*, for both chloroplast and nuclear microsatellites, was lower than its progenitors, *Ae. markgrafii* and *Ae. tauschii*. For both chloroplast and nuclear microsatellite markers, *Ae. tauschii* showed the highest level of variation expressed as average expected heterozygosity and allele number per marker. Chloroplast markers with the highest average expected heterozygosity values were WCt 3 in *Ae. markgrafii* (0.69), WCt 11 in *Ae. tauschii* (0.78), and WCt 5 in *Ae. cylindrica* (0.56) (Table 2). The

Table 3 Heterozygosity indices, alleles, and allele size range for *Ae. markgrafii*, *Ae. tauschii*, and *Ae. cylindrica*, using nuclear microsatellite markers

Marker	<i>Ae. markgrafii</i>			<i>Ae. tauschii</i>			<i>Ae. cylindrica</i>		
	No. of alleles	Allele size range (bp)	H^a	No. of alleles	Allele size range (bp)	H^a	No. of alleles	Allele size range (bp)	H^a
gwm232	4	Null, 139–310	0.61	10	127–310	0.85	5	137–310	0.19
gwm337	2	Null, 166	0.41	12	152–213	0.89	6	164–193	0.41
gwm458	7	94–129	0.84	11	96–133	0.88	6	101–132	0.66
gwm642	8	169–191	0.83	18	108–200	0.88	5	170–187	0.70
gwm301	3	159–225	0.58	12	161–222	0.87	8	159–197	0.76
gwm455	4	120–133	0.61	9	128–188	0.76	3	127–187	0.10
gwm484	5	Null, 112–154	0.72	12	114–164	0.90	5	111–115	0.56
gwm608	7	110–134	0.84	3	101–110	0.54	1	110	0.00
gwm3	5	64–95	0.68	9	59–76	0.79	1	64	0.00
gwm314	2	Null, 99	0.24	17	Null, 99–268	0.94	10	171–183	0.83
gwm383	7	Null, 132–229	0.82	12	180–228	0.89	5	203–233	0.63
gwm186	5	Null, 95–147	0.78	4	Null, 96–169	0.56	3	Null, 98–99	0.35
gwm190	6	229–246	0.82	10	Null, 184–231	0.87	6	192–235	0.40
gwm205	3	133–136	0.57	5	127–310	0.70	4	129–147	0.28
gwm272	3	124–126	0.61	10	118–150	0.80	2	125–126	0.39
gwm325	3	Null, 114–127	0.65	7	114–142	0.81	2	113–114	0.05
gwm469	4	84–88	0.66	10	140–176	0.83	5	156–162	0.50
gwm437	3	Null, 159–165	0.53	11	83–129	0.86	5	Null, 87–99	0.59
gwm44	4	Null, 156–278	0.66	3	116–178	0.21	5	276–283	0.24
Average	4.47		0.66	9.74		0.78	4.58		0.40

^a H was calculated as described by Botstein et al. (1980)

nuclear marker gwm458 showed the highest heterozygosity in *Ae. markgrafii* (0.84), while nuclear marker gwm314 showed the highest heterozygosity in *Ae. tauschii* and *Ae. cylindrica* (0.94 and 0.83, respectively) (Table 3).

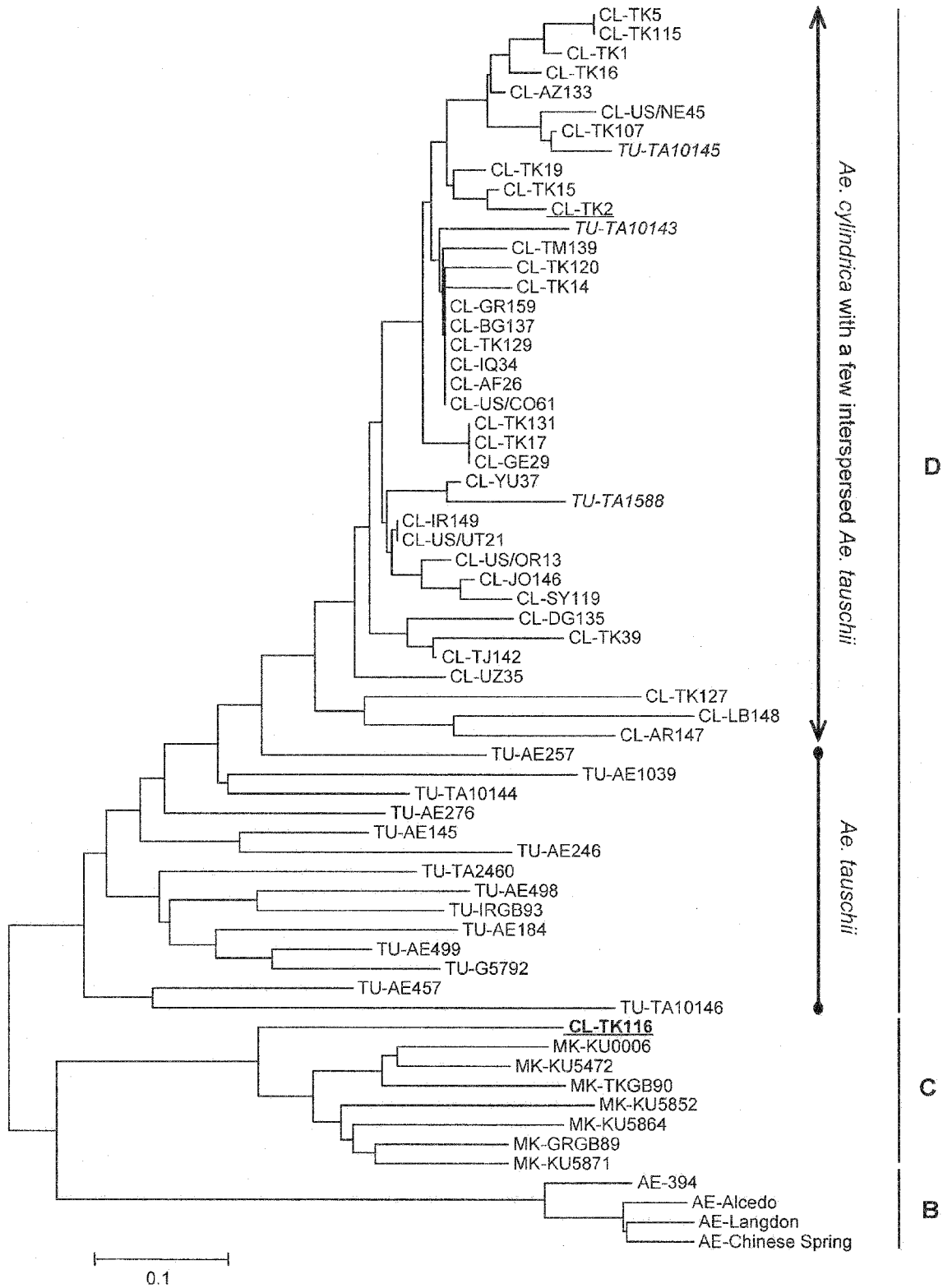
Based on genetic similarity analysis with 20 chloroplast microsatellite markers, genetic distance between any two accessions ranged from 0 (most similar) to 0.9 (most dissimilar). This analysis also allowed the distinction of species with respect to various plastome types. Seven markers (WCt 1, WCt 2, WCt 12, WCt 13, WCt 17, WCt 22, and WCt 24) permitted the differentiation of 64 accessions from five species into plasmon types B, C, and D (Fig. 1). An unanticipated finding was that one accession of *Ae. cylindrica*, TK 116 (PI 486249), exhibited some microsatellite alleles that were present neither in *Ae. cylindrica* nor in *Ae. tauschii* accessions but matched the allelic constitution of some *Ae. markgrafii* accessions (Table 2).

Thirty-five *Ae. cylindrica* and 17 *Ae. tauschii* accessions formed a single major cluster (D-type plastome). Of the 17 *Ae. tauschii* accessions studied, 14 formed a dispersed group while three accessions (TA 1588, TA 10143, and TA 10145) intermingled with *Ae. cylindrica*. The *Ae. cylindrica* accession TK 2 (PI 172358), which had been previously used to determine that *Ae. cylindrica* had plasmon type D (Maan 1976) fell in this major cluster with other *Ae. cylindrica* accessions. The wheat lines Chinese Spring, Alcedo, Langdon, and 394, and seven *Ae. markgrafii* accessions were part of a cluster with two distinct groups (B-type and C-type plastomes). One *Ae. cylindrica* accession, TK 116, grouped with *Ae.*

markgrafii. This was consistent with our observation that the allelic constitution of this accession was more similar to *Ae. markgrafii* than *Ae. tauschii*.

Nineteen nuclear microsatellites were also used to study the genetic relatedness of *Ae. tauschii*, *Ae. markgrafii*, and *Ae. cylindrica* accessions. The genetic distances ranged from 0.05 (most similar) to 0.98 (most dissimilar). The 65 accessions studied grouped into two major clusters (Fig. 2). *Ae. cylindrica*, *Ae. markgrafii*, and nine *Ae. tauschii* accessions grouped in cluster I, whereas tetraploid and hexaploid wheat and eight *Ae. tauschii* accessions grouped in cluster II (Fig. 2; Table 3). Cluster I was subdivided into a group with *Ae. cylindrica* and *Ae. markgrafii* accessions (group CM) and a group of nine *Ae. tauschii* accessions (group TU1). The CM group was composed of *Ae. cylindrica* (group CL), five *Ae. markgrafii* accessions (group MK), and two other *Ae. markgrafii* accessions that grouped between *Ae. markgrafii* and *Ae. cylindrica* (Fig. 2). TK 116 was present in the CL group. The *Ae. markgrafii* accessions KU 5472 and TK GB90 were most closely related to *Ae. cylindrica* (Fig. 2). Cluster II was subdivided into a group represented by tetraploid wheat (group DU), a group with hexaploid wheat and six *Ae. tauschii* accessions (group TU2), and two other *Ae. tauschii* accessions (Fig. 2).

Spike morphology and cytological analyses were also conducted to investigate the identity of TK 116. The apical spikelets of *Ae. cylindrica* have four prominent awns, with one pair originating from glumes and one pair from lemmas of the apical spikelet (van Slageren 1994). On the other hand, apical spikelets of *Ae. mark-*



grafii have two prominent awns coming from the apical glumes, whereas apical spikelets of *Ae. tauschii* have two awns originating from two lemmas. In the present study,

similar characteristics were noted for *Ae. markgrafii* and *Ae. tauschii* (Fig. 3). The spikes of TK 116 and another *Ae. cylindrica* accession (USA/OR 13) have a cylindrical

◀
Fig. 1 Neighbor-joining tree showing chloroplast genetic relatedness between *Aegilops cylindrica* and its relatives. TK 116 and TK 2 (an accession used in alloplasmic interaction studies) are *underlined*. *Ae. tauschii* accessions interspersed with *Ae. cylindrica* are *italicized*. The prefixes used before the name of each accession stand for the following: *AE* *T. aestivum*, *CL* *Ae. cylindrica*, *DU* *Triticum turgidum*, *MK* *Ae. markgrafii*, and *TU* *Ae. tauschii*. Clusters of accessions designated as *B*, *C*, and *D* correspond to individuals with plasmon types B, C, and D, respectively

structure and bear four prominent awns on glumes and lemmas from apical spikelets. The overall similarity of TK 116 with other *Ae. cylindrica* accessions with respect to spike morphology and the number of awns in apical spikelets supports its classification as an *Ae. cylindrica* accession. Based on chromosome counting and GISH analysis, TK 116 was found to be a 28-chromosome allotetraploid with both C-genome and D-genome chromosomes (Fig. 4a, b).

Discussion

The evaluation of both chloroplast and nuclear microsatellite variation revealed various patterns (Tables 2, 3). First, the level of chloroplast variation compared to nuclear variation was lower for all species studied. The lower levels of variation in chloroplast compared to nuclear microsatellites reflect the uniparental inheritance of chloroplast genomes and their slower rate of evolution relative to nuclear genomes (Wolfe et al. 1987; Provan et al. 1999, 2004). Second, *Ae. cylindrica* was less diverse than either of its diploid progenitors (*Ae. markgrafii* and *Ae. tauschii*) whether chloroplast or nuclear markers were used. Because allopolyploids are formed from one or few relatively recent hybridization events, these contain only a subset of the genetic variation present in their progenitors. Thus, allopolyploids like *Ae. cylindrica* are commonly less diverse than their progenitors. Third, *Ae. tauschii* was more diverse than *Ae. markgrafii*. Goryunova et al. (2004) also made this observation and suggested that this reflected a more ancient origin for *Ae. tauschii* relative to *Ae. markgrafii*. Although our observations are consistent with those of Goryunova et al. (2004), a larger sampling of *Ae. markgrafii* accessions will be needed to fully address this difference in genetic diversity. Finally, *Ae. cylindrica* was more closely related to *Ae. markgrafii* than *Ae. tauschii* when nuclear microsatellites were analyzed. The close relationship between *Ae. cylindrica* and *Ae. markgrafii* was also observed using repetitive DNA markers (Dubcovsky and Dvorak 1994), RAPD markers (Goryunova et al. 2004), and analysis of the internal transcribed spacers of ribosomal RNA genes (Wang et al. 2000b). These observations demonstrate that the C genome in *Ae. cylindrica* is less divergent from the C genome of *Ae. markgrafii* than its D genome is from the D genome of *Ae. tauschii*.

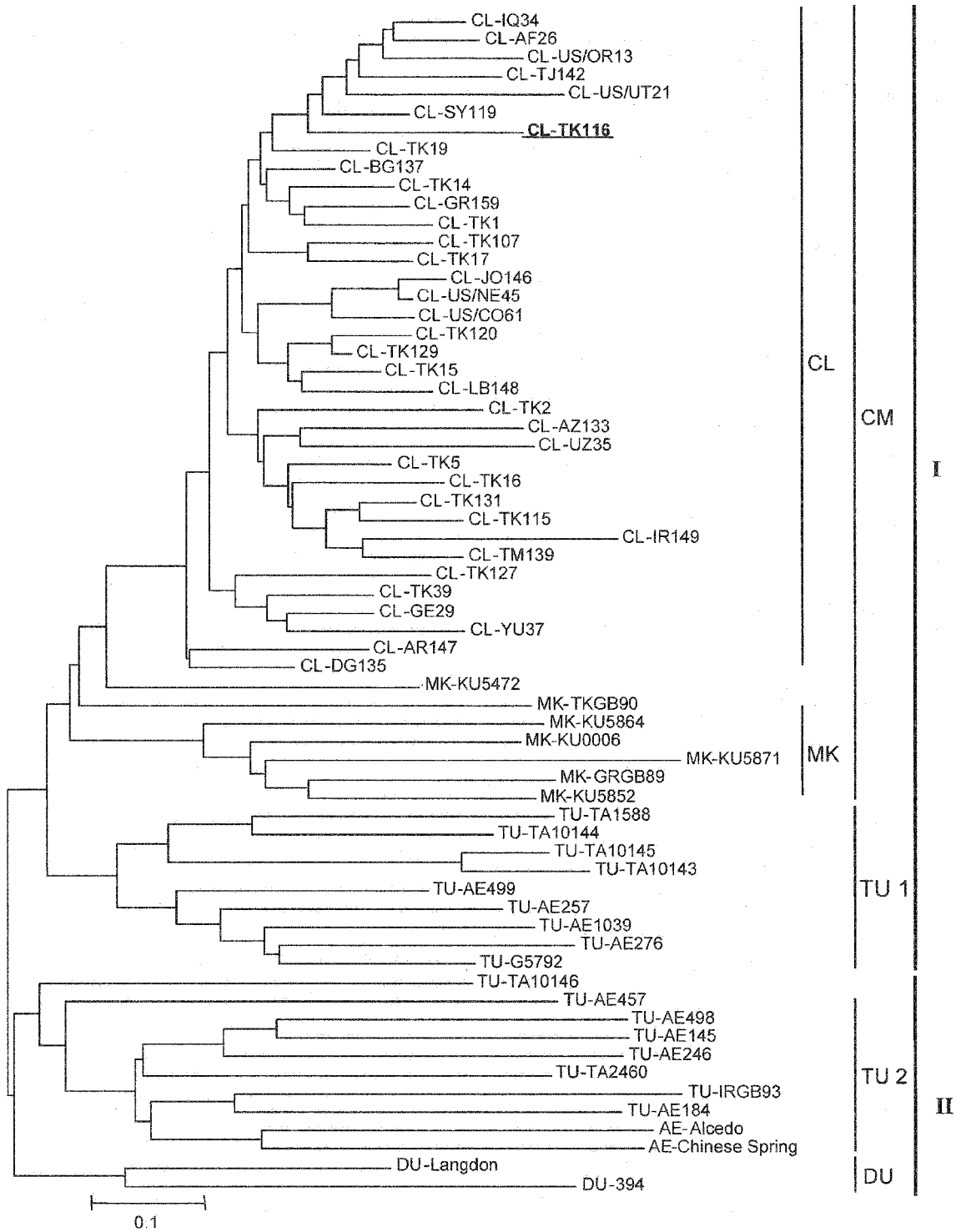
Plasmon analysis using wheat alloplasmic lines indicated that *Ae. tauschii* (D-type cytoplasm) was the maternal parent in the formation of *Ae. cylindrica*

(Tsunewaki 1996; Wang et al. 1997, 2000a). However, our current investigation showed that one accession of *Ae. cylindrica*, TK 116 (PI 486249), had chloroplast microsatellite alleles that were present neither in *Ae. cylindrica* nor in *Ae. tauschii* accessions but matched the allelic constitution of some *Ae. markgrafii* accessions (Table 2; Fig. 1). This finding suggested that the chloroplast genome of TK 116 was derived from *Ae. markgrafii* (C-type cytoplasm). Because our nuclear microsatellite markers analysis (Fig. 2), spike morphology assessments (Fig. 3), and karyotype evaluations (Fig. 4) showed that TK 116 was a bona fide *Ae. cylindrica* accession, we conclude that C- and D-types of cytoplasm derived from *Ae. markgrafii* and *Ae. tauschii*, respectively, are present in *Ae. cylindrica*.

We contemplated the possibility that our results with respect to TK 116 could be explained by chloroplast microsatellite allele size homoplasmy (Doyle et al. 1998; Hale et al. 2004). However, we reasoned that this was unlikely, because we evaluated a sizeable number of accessions with 20 chloroplast microsatellite markers. Other researchers also have found that homoplasmy was unlikely for chloroplast markers when evaluating closely related genera, including species of the Triticeae, due to their relatively slow rate of evolution compared to nuclear loci (Provan et al. 2004).

The occurrence of two types of cytoplasm in *Ae. cylindrica* may be simply explained by reciprocal hybridization between *Ae. markgrafii* and *Ae. tauschii* during the formation of *Ae. cylindrica*. Because reciprocal hybrids between *Ae. tauschii* and *Ae. markgrafii* have been produced experimentally (Sears 1941; Knobloch 1968), it is plausible that reciprocal hybridization in nature led to the formation *Ae. cylindrica* with both C-type and D-type cytoplasm. Interestingly, reciprocal hybridization between *Ae. markgrafii* and *Ae. umbellulata* Zhuk. ($2n=2x=14$, UU) has also been proposed in the origin of the allotetraploid species *Ae. triuncialis* L. ($2n=4x=28$, genome CCUU) (Murai and Tsunewaki 1986; Wang et al. 1997; Vanichonon et al. 2003). Because evidence for multiple hybridization events in the formation of *Ae. cylindrica* has been recently presented by Caldwell et al. (2004), reciprocal hybridization is an attractive mechanism to explain the presence of C-type and D-type plastomes in this species. However, cytoplasmic introgression or substitution should also be considered (Rieseberg and Soltis 1991; Brubaker et al. 1993; van Raamsdonck et al. 1997). In this scenario, hybridization between *Ae. markgrafii* (female parent) and *Ae. cylindrica* (male parent) followed by backcrossing with *Ae. cylindrica* (male parent) would also result in *Ae. cylindrica* with C-type cytoplasm (Kihara and Matsumura 1941).

Based on a comprehensive survey of *Ae. tauschii* germplasm with nuclear DNA markers, Dvorak et al. (1998) suggested that the distribution of present-day *Ae. tauschii* originated by expansion of two geographically isolated subspecies—*Ae. tauschii* ssp. *strangulata* in coastal areas of eastern Caspian Iran and ssp. *tauschii* in



an inland area of northwestern Iran. According to Dvorak et al. (1998), expansion of the distribution of *ssp. tauschii* preceded that of *ssp. strangulata* leading to the spread of *ssp. tauschii* westward to Turkey and eastward to Afghanistan, Turkmenistan, Pakistan, Ta-

djikistan, and China. Subsequently, expansion of the distribution of *ssp. strangulata* and gene flow between the subspecies in the Caspian region and north-central Iran was argued to have resulted in the observed discontinuity in the distribution of *ssp. tauschii* in Iran

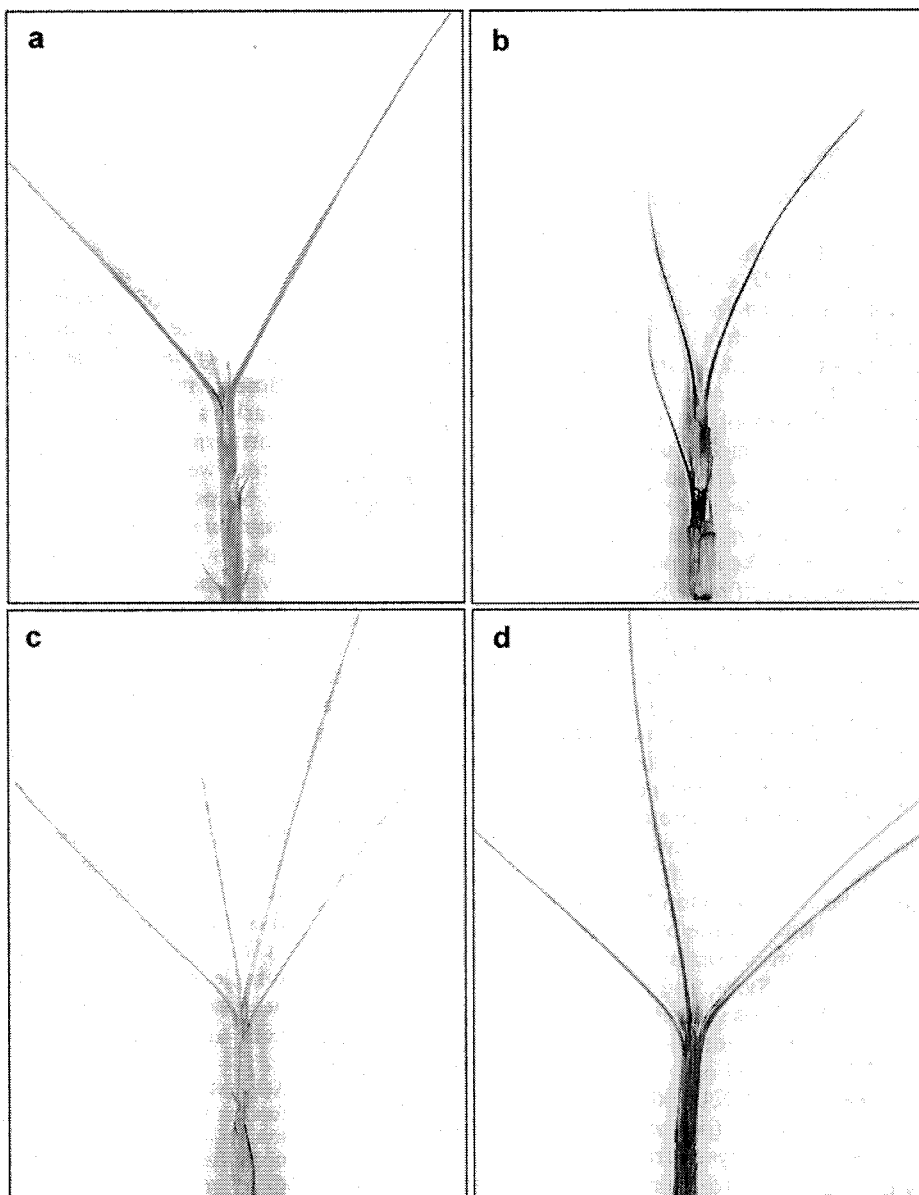
Fig. 2 Neighbor-joining tree showing the nuclear genetic relatedness between *Ae. cylindrica* and its relatives. TK 116 is underlined and in **boldface**. The two major clusters are labeled as I and II. Based on membership, major clusters were subdivided into groups labeled CM (*Ae. cylindrica* and *Ae. markgrafii*), TU1 (*Ae. tauschii*), TU2 (*Ae. tauschii* and *T. aestivum*) and DU (*T. turgidum*). The CM sub-cluster was further split into the CL (*Ae. cylindrica*) and MK (*Ae. markgrafii*) groups. *Ae. tauschii* accessions in the TU1 grouping belong to the *tauschii* gene pool while *Ae. tauschii* in the TU2 group belong to the *strangulata* gene pool. The prefixes used before the name of each accession stand for the following: AE *T. aestivum*, CL *Ae. cylindrica*, DU *T. turgidum*, MK *Ae. markgrafii*, and TU *Ae. tauschii*

(Lubbers et al. 1991; Dvorak et al. 1998). Furthermore, Dvorak et al. (1998) suggested that *Ae. tauschii* germplasm should be viewed as being composed of two gene

pools, *strangulata* and *tauschii*, rather than two subspecies based on morphology. Nonetheless, this and other studies have shown that the D genome in hexaploid wheat is more closely related to the D genome of the *strangulata* gene pool of *Ae. tauschii* (Lubbers et al. 1991; Dvorak et al. 1998; Pestsova et al. 2000).

Based on our analysis of nuclear microsatellite markers, *Ae. tauschii* clustered in two distinct groups (TU1 and TU2) (Fig. 2). The TU2 group was composed of *Ae. tauschii* and hexaploid wheat (Alcedo and Chinese Spring). *Ae. tauschii* accessions in the TU2 group belong to the *strangulata* gene pool, whereas the *Ae. tauschii* accessions in the TU1 group that are more closely related to *Ae. cylindrica* belong to the *tauschii* gene pool (Table 1) (Dvorak et al. 1998; Pestsova et al. 2000).

Fig. 3 Apical portions of spikes from *Ae. markgrafii*, *Ae. tauschii*, and *Ae. cylindrica*.
a Apical spikelet of the *Ae. markgrafii* accession GR GB89 showing two awns originating from the apical glumes.
b Apical spikelet of the *Ae. tauschii* accession AE 276 showing two awns originating from two apical lemmas.
c, d Apical spikelets of the *Ae. cylindrica* accessions US/OR 13 and TK 116, respectively. Apical spikelets in (c) and (d) show four awns originating from both lemmas and glumes



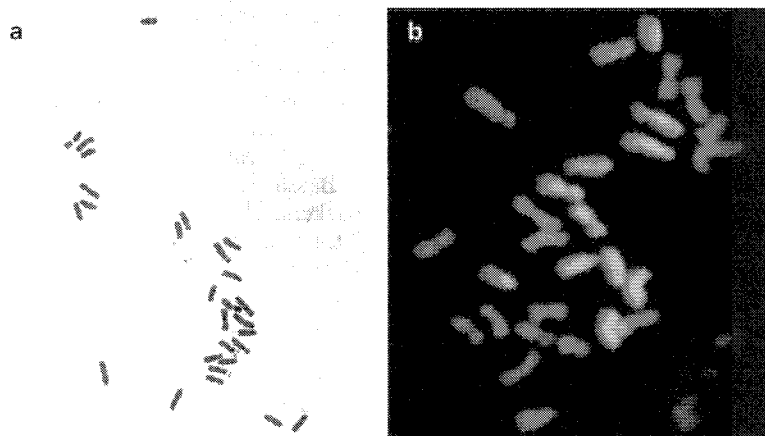


Fig. 4 Mitotic metaphase chromosome spreads and genomic in situ hybridization (GISH) of the *Ae. cylindrica* accession TK 116 (PI 486249). **a** Chromosome spread of TK116 showing 28 chromosomes with a combination of chromosomes with terminal, sub-terminal, sub-median, and median centromeres. **b** GISH of a mitotic chromosome spread of TK116. Fourteen fluorescein-labeled chromosomes (yellow-green) correspond to C-genome chromosomes while 14 red-orange (propidium iodide)-colored chromosomes correspond to D-genome chromosomes

Furthermore, three accessions of the TU1 group (TA 1588, TA 10143, and TA 10145) were interspersed with *Ae. cylindrica* in the dendrogram based on chloroplast microsatellite data (Fig. 1). Overall, this suggests that the D genome and D-type plastome in *Ae. cylindrica* are closely related to and were probably derived from the *tauschii* gene pool of *Ae. tauschii*. This conclusion is consistent with molecular cytogenetic analyses showing that D-genome chromosomes in *Ae. cylindrica* and common wheat were derived from different *Ae. tauschii* biotypes (Badaeva et al. 2002).

Based on spike morphology, two taxonomic varieties of *Ae. markgrafii* have been described (Eig 1929; Hammer 1980). Variety *typica* (syn. *Ae. markgrafii* var. *markgrafii*) is characterized by well-developed awns on apical glumes and awnless glumes of lateral spikelets while var. *polyathera* (syn. *Ae. markgrafii* var. *polyathera*) has awned apical and lateral spikelets. Irrespective of this varietal differentiation, studies on intraspecific hybrid sterility and the genetic variation for the development of awns on lateral spikelets suggested that *Ae. markgrafii* is divided into two genetically differentiated populations (Ohta 2000, 2001). One population is present in the western region encompassing Greece and West Anatolia, whereas the other population is present in the eastern region consisting of central, southern, and eastern Anatolia, Syria, and northern Iraq.

In our analysis with chloroplast and nuclear markers, the genetic differentiation of *Ae. markgrafii* accessions from the west and east was not evident. The *Ae. markgrafii* accessions KU 0006 (*typica* from northwestern Syria), KU 5852 (*polyathera* from north-central Turkey), KU 5864 (*typica* from northwestern Turkey), and KU 5871 (*typica* from mainland Greece) formed a single

group (MK) in our dendrogram based on nuclear markers (Fig. 2). On the dendrogram based on chloroplast markers, KU 5852, KU 5864, and KU 5871 formed a sub-group, whereas KU 0006 associated with other *Ae. markgrafii* accessions (Fig. 1). Thus, KU 0006 and KU 5852 that correspond to Ohta's (2000) A and B testers of the eastern region and KU 5864 and KU 5871 that correspond to the C and D testers of the western region, respectively, were all closely related. This inability to differentiate *Ae. markgrafii* genotypes from the west from those of the east did not allow the identification of a probable source for the C genome or C-type plastome in *Ae. cylindrica*. The two *Ae. markgrafii* accessions most closely related to *Ae. cylindrica* based on nuclear markers were a *typica* form from the east, KU 5472 (from northern Iraq), and *typica* from the west, TK GB90 (from western Turkey) (Fig. 2).

Maps with collection sites of *Ae. markgrafii* and *Ae. tauschii* suggest that the geographic distribution of these species overlap in southeastern Turkey, northeastern Syria, northern Iraq, and northwestern Iran (van Slageren 1994; Ohta 2000; Dvorak et al. 1998). Assuming that the distributions of these species were not significantly different in the past, then the central part of the Fertile Crescent is likely to be where *Ae. cylindrica* formed. Our observation that *Ae. tauschii* of their western region of distribution (*tauschii* gene pool) are most closely related to *Ae. cylindrica* is consistent with this hypothesis. However, this pattern was not evident with the sample of *Ae. markgrafii* that we used. An analysis of a more comprehensive sample of *Ae. markgrafii* accessions and an assessment of the population structure of this species may be necessary before a connection to *Ae. cylindrica* is possible. Similarly, a study with a larger sample of *Ae. cylindrica* and its progenitors may be necessary to obtain a more precise picture of these genetic and geographical connections.

Acknowledgements We would like to acknowledge gratefully funding from the United States Department of Agriculture Initiative for Future Agriculture and Food Systems (IFAFS) and National Research Initiative (NRI) Competitive Grants Programs.

Conflict of interest: No information supplied

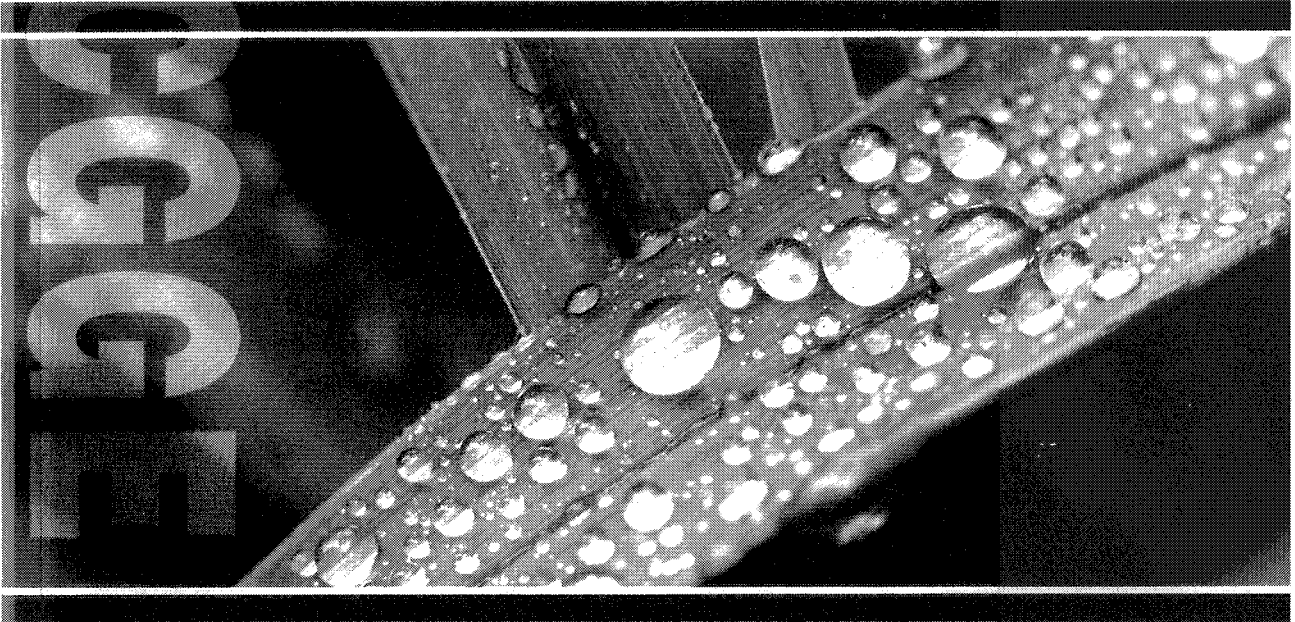
References

- Badaeva ED, Amosova AV, Muravenko OV, Samatadze TE, Chikida NN, Zelenin AV, Friebe B, Gill BS (2002) Genome differentiation in *Aegilops*. 3. Evolution of the D-genome cluster. *Plant Syst Evol* 231:163–190
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314–331
- Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455–457
- Brubaker CL, Koontz JA, Wendel JF (1993) Bidirectional cytoplasmic and nuclear introgression in the new world cottons, *Gossypium barbadense* and *G. hirsutum* (Malvaceae). *Am J Bot* 80:1203–1208
- Caldwell K, Dvorak J, Lagudah E, Akhunov E, Luo M-C, Wolters P, Powell W (2004) Sequence polymorphism in polyploid wheat and their D-genome diploid ancestor. *Genetics* 167:941–947
- Chennaveeraiah MS (1960) Karyomorphologic and cytotoxic studies in *Aegilops*. *Acta Horti Gotob* 23:85–178
- Dewey S (1996) Jointed goatgrass—an overview of the problem. In: Jenks B (ed) Proceedings of the Pacific Northwest Jointed Goatgrass Conference. Pocatello, Idaho, pp 1–2
- Doyle JJ, Morgante M, Tingey SV, Powell W (1998) Size homoplasy in chloroplast microsatellites of wild perennial relatives of soybean (*Glycine* subgenus *glycine*). *Mol Biol Evol* 15:215–218
- Dubcovsky J, Dvorak J (1994) Genome origins of *Triticum cylindricum*, *Triticum triunciale* and *Triticum ventricosum* (Poaceae) inferred from variation in restriction patterns of repeated nucleotide sequences: a methodological study. *Am J Bot* 81:1327–1335
- Dvorak J, Luo M-C, Yang Z-L, Zhang H-B (1998) The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 97:657–670
- Eig A (1929) Monographisch-kritische Übersicht der Gattung *Aegilops*. *Repert Spec Nov Regni Veg* 55:1–228
- El Bouhssini M, Benhabib O, Nachit MM, Houari A, Bentika A, Nsarellah N, Lhaloui S (1998) Identification in *Aegilops* species of resistant sources to Hessian fly (Diptera: Cecidomyiidae) in Morocco. *Genet Res Crop Evol* 45:343–345
- Farooq S, Iqbal N, Asghar M, Shah TM (1992) Intergeneric hybridization for wheat improvement VI. Production of salt tolerant germplasm through crossing wheat (*Triticum aestivum*) with *Aegilops cylindrica* and its significance in practical agriculture. *J Genet Plant Breed* 46:125–132
- Goryunova SV, Kochieva EZ, Chikida NN, Pukhalskiy VA (2004) Phylogenetic relationships and intraspecific variation of D-genome *Aegilops* L. as revealed by RAPD analysis. *Russ J Genet* 40:515–523
- Guadagnuolo R, Savova-Bianchi D, Felber F (2001) Gene flow from wheat (*Triticum aestivum* L.) to jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host.), as revealed by RAPD and microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 103:1–8
- Hale ML, Borland AM, Gustafsson MHG, Wolf K (2004) Causes of size homoplasy among chloroplast microsatellite in closely related *Chusca* species. *J Mol Evol* 58:182–190
- Hammer K (1980) Vorarbeiten zur monographischen Darstellung von Wildpflanzensortimenten: *Aegilops* L. *Kulturpflanze* 28:33–180
- Iriki N, Kawakami A, Takata K, Kuwabara T, Ban T (2001) Screening relatives of wheat for snow mold resistance and freezing tolerance. *Euphytica* 122:335–341
- Ishii T, Mori N, Oghihara Y (2001) Evaluation of allelic diversity at microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. *Theor Appl Genet* 103:896–904
- Jaaska V (1981) Aspartate aminotransferase and alcohol dehydrogenase isoenzymes: intraspecific differentiation in *Aegilops tauschii* and the origin of the D genome polyploids in the wheat group. *Plant Syst Evol* 137:259–273
- Kihara H, Matsumura S (1941) Genomanalyse bei *Triticum* und *Aegilops*. VIII. Rückkreuzung des Bastards *A. caudata* × *A. cylindrica* zu den Eltern und seine Nachkommen. *Cytologia* 11:493–506
- Kimber G, Feldman M (1987) Wild wheat: an introduction. University of Missouri-Columbia, pp 36–69
- Kimber G, Zhao YH (1983) The D genome of the Triticeae. *Am J Genet Cytol* 25:581–589
- Knobloch IW (1968) A check list of crosses in the Gramineae. Department of Botany and Plant Pathology, Michigan State University, East Lansing, pp 3–9
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Release 2, Tempe, Arizona
- Lubbers EL, Gill KS, Cox TS, Gill BS (1991) Variation of molecular markers among geographically diverse accessions of *Triticum tauschii*. *Genome* 34:354–361
- Maan SS (1976) Cytoplasmic homology between *Aegilops squarrosa* L. and *A. cylindrica* Host. *Crop Sci* 16:757–761
- Masci S, D'ovidio R, Lafiandra D, Tanzarella OA, Porceddu E (1992) Electrophoretic and molecular analysis of alpha-gliadins in *Aegilops* species (Poaceae) belonging to the D genome cluster and in their putative progenitors. *Plant Syst Evol* 179:115–128
- Minch E, Ruiz-Linares A, Goldstein D, Feldman M, Cavalli-Sforza LL (1997) MICROSAT (version 2.0): a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data release 2.0. <http://hppl.stanford.edu/projects/microsat/>
- Morrison LA, Riera-Lizarazu O, Crémieux L, Mallory-Smith CA (2002) Jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host) × wheat (*Triticum aestivum* L.) hybrids: hybridization dynamics in Oregon wheat fields. *Crop Sci* 42:1863–1872
- Murai K, Tsunewaki K (1986) Molecular basis of genetic diversity among cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops* species. IV. ClDNA variation in *Ae. triuncialis*. *Heredity* 57:335–339
- Nakai Y (1981) D genome donors for *Aegilops cylindrica* (CCDD) and *Triticum aestivum* (AABBDD) deduced from esterase isozyme analysis. *Theor Appl Genet* 60:11–16
- Ogg AG, Seefeldt SS (1999) Characterizing traits that enhance the competitiveness of winter wheat (*Triticum aestivum*) against jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*). *Weed Sci* 47:74–80
- Ogihara Y, Tsunewaki K (1988) Diversity and evolution of chloroplast DNA in *Triticum* and *Aegilops* as revealed by restriction fragment analysis. *Theor Appl Genet* 76:321–322
- Ohta S (2000) Genetic differentiation and post-glacial establishment of the geographical distribution in *Aegilops caudata* L. *Genes Genet Syst* 75:189–196
- Ohta S (2001) Variation and geographical distribution of the genotypes controlling the diagnostic spike morphology of two varieties of *Aegilops caudata* L. *Genes Genet Syst* 76:305–310
- Okuno K, Ebana K, Noov B, Yoshida H (1998) Genetic diversity of central Asian and north Caucasian *Aegilops* species as revealed by RAPD markers. *Genet Res Crop Evol* 45:389–394
- Page RDM (2001) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp Appl Biosci* 12:357–358
- Pester TA, Ward SM, Fenwick AL, Westra P, Nissen SJ (2003) Genetic diversity of jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) determined with RAPD and AFLP markers. *Weed Sci* 51:287–293
- Pestova E, Korzun V, Goncharov NP, Hammer K, Ganai MW, Röder MS (2000) Microsatellite analysis of *Aegilops tauschii* germplasm. *Theor Appl Genet* 101:100–106
- Provan J, Soranzo N, Wilson NJ, Goldstein DB, Powell W (1999) A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153:943–947
- Provan J, Wolters P, Caldwell KH, Powell W (2004) High-resolution organellar genome analysis of *Triticum* and *Aegilops* sheds new light on cytoplasm evolution in wheat. *Theor Appl Genet* 108:1182–1190
- van Raamsdonck LWJ, Smiech MP, Sandbrink JM (1997) Introgression explains incongruence between nuclear and chloroplast DNA-based phylogenies in *Allium* section *Cepa*. *Bot J Linn Soc* 123:91–108

- Riera-Lizarazu O, Rines HW, Phillips RL (1996) Cytological and molecular characterization of oat \times maize partial hybrids. *Theor Appl Genet* 93:123-135
- Riera-Lizarazu O, Vales MI, Ananiev EV, Rines HW, Phillips RL (2000) Production and characterization of maize chromosome 9 radiation hybrids derived from an oat-maize addition line. *Genetics* 156:327-339
- Rieseberg LH, Soltis DE (1991) Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol Trends Plants* 5:65-84
- Riley R, Law CN (1965) Genetic variation in chromosome pairing. *Adv Genet* 13:57-114
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M-H, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Sears ER (1941) Amphidiploids in the seven-chromosome Triticinae. *Mo Agr Exp Sta Res Bull* 337:1-20
- van Slageren MW (1994) Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. and Spach) Eig (Poaceae), vol 94 (7). ICARDA, Syria and Wageningen Agricultural University, The Netherlands
- Tsunewaki K (1996) Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis. In: Jauhar PP (ed) *Methods of genome analysis in plants*. CRC, Boca Raton, pp 271-300
- Vanichanon A, Blake NK, Sherman JD (2003) Multiple origins of allopolyploid *Aegilops triuncialis*. *Theor Appl Genet* 106:804-810
- Wang G, Miyashita NT, Tsunewaki K (1997) Plasmon analyses of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*: PCR-single-stand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analyses of organellar DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14570-14577
- Wang G-Z, Matsuoka Y, Tsunewaki K (2000a) Evolutionary features of chondriome divergence in *Triticum* (wheat) and *Aegilops* shown by RFLP analysis of mitochondrial DNAs. *Theor Appl Genet* 100:221-231
- Wang JB, Wang C, Shi S-H, Zhong Y (2000b) Evolution of parental ITS regions of nuclear rDNA in allopolyploid *Aegilops* (Poaceae) species. *Hereditas* 133:1-7
- Wang Z, Zemetra RS, Hansen J, Hang A, Mallory-Smith CA, Burton C (2002) Determination of the paternity of wheat (*Triticum aestivum* L) \times jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* host) BC₁ plants by using genomic in situ hybridization (GISH) technique. *Crop Sci* 42:939-943
- Watanabe N, Mastui K, Furuta Y (1994) Uniformity of the alpha-amylase isozymes of *Aegilops cylindrica* introduced into North America: comparisons with ancestral Eurasian accessions. In: Wang K, Jensen B, Jaussi C (eds) *Proceedings of the 2nd international wheat symposium*. Utah State University, Logan
- Wolfe KH, Li W-H, Sharp PM (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9054-9058
- Zemetra RS, Hansen J, Mallory-Smith CA (1998) Potential for gene transfer between wheat (*Triticum aestivum*) and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*). *Weed Sci* 46:313-317

◇ 講 演 要 旨 等

December, 7-9, 2007
Changchun, China



Proceedings of International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering

Organizers



Jilin Academy of Agricultural Sciences, China



University of Central Florida, USA



Norwegian Institute for Agricultural & Environmental Research, Norway

Transplastomic tobacco plants as models for improving agronomic characters of leafy vegetables

Toru Terachi (terachi@cc.kyoto-su.ac.jp)

Dept. of Biotech., Fac. of Eng., Kyoto Sangyo Univ., Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

After the pioneering work of Svab et al. (1980), much has been published on the plastid transformation, and the plastid genome of higher plants has become an attractive target for engineering (Maliga 2002). This is because transplastomic plants have several advantages over conventional nuclear transformants, and transplastomic crops with improved agronomic characters have received increased attention. Prompted by the growing potential of transplastomic technology, we initiated a research project funded by Japanese government (Academic Frontier Project for Private Universities). In this symposium, transplastomic tobacco plants produced in our laboratory will be presented, as models for improving agronomic characters of leafy vegetables. The first plant is a tobacco containing a soybean ferritin gene in the chloroplast. It was produced by Dr. Guo Changhon (Harbin normal university), with a hope of increase of the iron contents in the leaves. Although introduction of a full-length ferritin cDNA into chloroplast genome increased iron contents in the leaves by three times, it suffered from severe leaf necrosis. The second and the third examples are transplastomic tobacco plants with an ascorbate peroxidase gene (APX) and a glutathione reductase gene (GR). The aim of this experiment is to produce the plants that are tolerant to the oxidative stress by removing reactive oxygen species (ROS) in the chloroplasts. The enzymatic activity of these transplastomic plants was higher (up to 50 times in APX and 20 times in GR) than that of a wild-type plant, and both showed increased tolerance to some oxidative stresses as expected. A plant with APX, however, showed leaf variegation. Our experience with aforementioned and other transplastomic plants indicates that it is quite important to evaluate a gene of interest *in planta* before transferring it to the crop species. Since the selection of a "good" gene is a key to success for producing more valuable transplastomic crops, screening of an appropriate gene in tobacco is a practical and useful strategy.

Key words: Tobacco, ferritin, Apx, GR, Oxidative stress, ROS

Expression of soybean ferritin in tobacco chloroplast genome results in increased iron content

Chang-Hong Guo¹, Qiu-yi Cai¹, Li-na Xu¹, Kaori Ohno², Toru Terachi²
(*terachi@cc.kyoto-su.ac.jp*)

1 Department of Biology, Harbin Normal University, 50 Hexing Road, Harbin 150080, China

2 Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

Plant ferritin is an iron-storage protein coded by nuclear genes, and it is transported into the plastids. Ferritin consists of 24 subunits to make a spherical shell, and it can store up to 4,500 iron atoms in its central cavity. In order to increase the iron content of the plants, we performed chloroplast genetic engineering using tobacco as a model plant. We introduced a soybean ferritin gene into chloroplast genome through a site-specific insertion, and obtained transplastomic tobacco plants. The stable integration of a ferritin gene into the chloroplast genome was confirmed by polymerase chain reaction and Southern-blot hybridization. Northern analysis confirmed that the ferritin mRNA was stably transcribed from the integrated gene. In transplastomic plants, ferritin accumulated up to 15% of the total soluble protein. The expression level of ferritin was approximately 10 folds higher than that observed in nuclear transformants. Iron content in the leaves of transplastomic plants was 2-3 folds higher than that of wild-type plants, and Zinc content also showed clear difference between the transplastomic and wild-type plants. Ferritin over expression in the chloroplast seems to lead to an illegitimate iron sequestration. Although the transplastomic plants look like the plants grown in the iron deficient conditions, the plants show an increased tolerance to the toxic level of iron in the growth medium.

Key words: Chloroplast engineering, Ferritin, Iron content, Tobacco

Transplastomic tobacco plants expressing the glutathione reductase, showing the resistance to oxidative stress

*Mikio Nozoe, Asami Suguchi, Sugane Hayashi, Toru Terachi
(terachi@cc.kyoto-su.ac.jp)*

Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555, Japan

Although the light is essential for the plants to carry out photosynthesis, too much light to be required for fixing carbon is harmful to molecular machinery of the chloroplast. Excess energy of the light frequently produces the reactive oxygen species (ROS) in the chloroplast, and overproduction of the ROS causes oxidative stress on the plant, leading to the loss of chloroplast function and cell death. To remove the oxidative stress, ascorbate-glutathione cycle, relating to ROS scavenging machinery, has been developed in the chloroplast. Many enzymes are involved in this machinery, and they are beneficial for the reduction of baneful ROS. Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) is one of the enzymes involved in the cycle, and it reduces oxidative glutathione. GR plays an important role in an environment marked by oxidative stresses in plants.

In this study, transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. SR-1) plants over-expressing GR were produced, and their resistance to oxidative stress was assessed. The chloroplastic GR gene was cloned from tobacco cDNA, and it was introduced into tobacco chloroplast genome by biolistic method. 32 independent lines of transplastomic plants were obtained, and 9 of 32 were identified as homoplasmic lines. The GR activity in the leaves of transplastomic tobacco was at least 20 times higher than that of a wild-type plant. Phenotypic analyses showed the transplastomic plants exhibit lower susceptibility to both methylviologen and sodium sulfite in the light than that of wild-type plant. A preliminary study also showed the resistance to the photoinhibition in low temperature is increased in the transplastomic plants. These results suggest that overexpression of GR in the chloroplast improves the performance of the plants under oxidative stress.

Key words: Chloroplast engineering, oxidative stress, glutathione reductase

Characterization of transplastomic tobacco plants with the genes encoding for the ROS-scavenging enzymes

Sugane Hayashi, Mai Tujimura, Toru Terachi (terachi@cc.kyoto-su.ac.jp)

Dept. of Biotech., Fac. of Eng., Kyoto Sangyo Univ., Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

When the plant is located under the stresses such as strong light, desiccation, a weed killer and air pollution etc., reactive oxygen species (ROS) with a strong oxidative power are generated. The ROS reacts with lipids and other biological materials in plant cells, and it causes necrosis of tissue, inhibits photosynthesis and suppresses an overall growth of the plant. Since plant cannot escape from the stress by moving, plants have developed an enzymatic cycle (ascorbate-glutathione cycle) in which the ROS can be effectively converted into innocuous water. Although the chloroplast is known to be a place where many ROS are generated, it also contains the ROS-scavenging pathway. The H₂O₂, which is one of the ROS, is converted into H₂O by a catalytic activity of ascorbate peroxidase (APX) using ascorbate as a substrate. Oxidized ascorbate is then reduced by monodehydroascorbate reductase (MDAR) or dehydroascorbate reductase (DHAR).

Our research aims at producing the transplastomic plants that show tolerance to the strong oxidative stress by overexpressing a group of enzymes involved in the ROS-scavenging pathway within the chloroplast.

In this symposium, we will present the data showing successful introduction of apx, mdar and dhar genes into the tobacco chloroplast genome. We will also present the results of molecular characterization of these transplastomic plants at DNA, RNA and protein levels, as well as phenotypic comparison of these transplastomic plants with the wild-type tobacco plant.

Key words: Transplastomic, ROS, apx, mdar, dhar

Enhanced formaldehyde resistance by overexpression of formaldehyde-fixing enzyme genes in tobacco chloroplast genome

Chang-Hong Guo¹, Dian-si Yu¹, Wen-yan Mao¹, Rong-wei Guan¹, Ge Song¹, Toru Terachi² (*kaku3008@yahoo.com.cn*)

1. Department of Biology, Harbin Normal University, 50 Hexing Road, Harbin 150080, China
2. Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

Formaldehyde is one of the main indoor air pollutants that has been classified as a mutagen and suspected carcinogen. Plants are thought to be the best choice to remove indoor formaldehyde for its convenience and environmental protection, but ability of plants to absorb formaldehyde is limited. In order to enhance the absorption competence of formaldehyde in plants, we transformed a *yckGF* operon from *B. subtilis* into the tobacco chloroplast genome by the biolistic method. The *yckGF* operon consists of *yckG* and *yckF* genes, both of which encode the formaldehyde-fixing enzyme, i.e. 3-Hexulose-6-phosphate synthase (HPS) and 6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI). Three spectinomycin resistant lines were obtained, and each of resistant lines was subjected to a second round of spectinomycin selection. To check the site-specific integration of a foreign operon into the chloroplast genome, the three spectinomycin resistant lines were analyzed through polymerase chain reaction and Southern-blot hybridization. Northern analysis confirmed that the *yckGF* mRNA was stably transcribed from the integrated operon. The *yckGF* transplastomic tobacco grew better than a control plant on the MS medium containing 2-6 mmol/L formaldehyde or under exposure to gaseous formaldehyde. Moreover, the transplastomic tobacco showed increased uptake of exogenous formaldehyde as compared with the wild-type tobacco. These results indicate that transplastomic tobacco with the *yckGF* operon is much more tolerant to formaldehyde than the wild-type tobacco, and the ability of the transplastomic tobacco to uptake and detoxify high concentrations of formaldehyde is proportionally related to the HPS and PHI activity in the transplastomic plants.

Key words: Formaldehyde, *yckGF*, Tobacco, Chloroplast engineering

2aD野11

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種におけるゲノム構造および種子稔性

○山岸 博・山下陽子(京都産業大工学部)

Genome constitution and seed fertility of the somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage.

Yamagishi H. and Y. Yamashita

[目的] シロイヌナズナは、高等植物の中で最初に全ゲノムが解読された植物である。このシロイヌナズナと我国の主要野菜であるキャベツの間で体細胞雑種を得て、その後代をキャベツの育種に利用しようとする。今回は、体細胞雑種の核ゲノムの構造を、シロイヌナズナに特異的なDNAマーカーを用いて解析するとともに、キャベツ類との交雑による種子稔性を調査しようとした。

[材料および方法] シロイヌナズナ‘Columbia’とキャベツの‘富士早生’との間で2個体の体細胞雑種を得た(園学雑 74 別2)。その後更に‘Columbia’と‘中生サクセション’の間でも2個体の体細胞雑種を得た。これらの雑種が、シロイヌナズナのどの染色体を保有しているかを明らかにするために、シロイヌナズナの5連鎖群のそれぞれに特異的なプライマーを設計した。プライマーの設計にあたっては各連鎖群の複数の位置にマーカーが得られるようにした。体細胞雑種および両親からDNAを単離し、PCRによって各DNAマーカーの増幅を調べた。

2組合せの体細胞雑種のうち‘中生サクセション’を親に用いたものについては、茎頂培養による増殖および順化の後に開花に至った。そこでそれらの雑種個体を母本に用いて、キャベツ、コールラビーおよびカイランとの交雑を行った。その後、種子の形成の有無を調査した。

[結果および考察] 設計したプライマーによるPCRによって、シロイヌナズナで単一のDNAバンドの増幅が認められ、シロイヌナズナの5つの連鎖群の各々に特異的なDNAマーカーが得られた。それらのDNAマーカーを用いて、体細胞雑種を調査したところ、2つの融合組合せの雑種のいずれにおいても、シロイヌナズナで観察されたDNAがすべて増幅した。このことは、得られた体細胞雑種がシロイヌナズナの全染色体を受けついでいることを示している。DNAマーカーの中には、キャベツでシロイヌナズナと異なるサイズのDNAを増幅するものと、キャベツではDNAが増幅しないものがあった。このうち前者は共優性マーカーとして、また後者は優性マーカーとして機能した。興味深いことに、融合親のキャベツの品種間でDNAの増幅の有無に差がみられるマーカーが存在したが、体細胞雑種はこのようなキャベツの品種間差を反映したPCRパターンを示した(図-1)。

‘中生サクセション’を融合親に用いた体細胞雑種が開花に至った。雑種の花弁は白色で、花器の形や大きさは両親の間であった。また開花した個体は、いずれも雄性不稔性を示した。そこでこの体細胞雑種に、キャベツ、コールラビーおよびカイランを交雑したところ、いずれの花粉親によっても、少数ながら種子が得られた。現在もう一方の組合せの体細胞雑種についても、交雑の準備を進めている。これらの雑種種子は、キャベツにおける育種素材として活用できるものと考えられる。

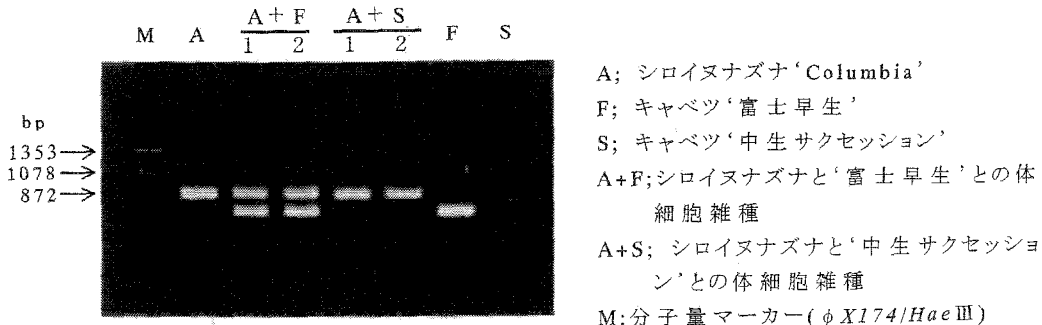


図-1 シロイヌナズナの第5染色体に特異的なDNAマーカー(MZN1.16-F1・R2)による増幅パターン

113 コムギ及びエギロプス属植物のミトコンドリア orf260 遺伝子の分子的解析

○堀川 明彦, 谷口 和也, 中西 健太, 上村 達也, 寺地 徹 (京産大工)

Molecular analyses of the mitochondrial orf260 gene from *Triticum* and *Aegilops* species

○Horikawa, A., K. Taniguchi, K. Nakanishi, T. Uemura, T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

Triticum timopheevi を始めとするいくつかのコムギ・エギロプス属植物のミトコンドリア *cox1* 遺伝子上流には、機能不明な orf が存在し、コードするアミノ酸の数から orf256 または orf260 と呼ばれている。この orf の翻訳産物は *T. timopheevi* の細胞質を持つ雄性不稔コムギに特異的なことから、コムギにおける雄性不稔の原因遺伝子の有力な候補とされている。

コムギ近縁野生種 *Aegilops mutica* の細胞質は、パンコムギに与える表現型の違いに基づき T 型と T² 型に分類され、前者は出穂遅延、後者は細胞質雄性不稔を引き起こす。我々はこれまでに、両細胞質がパンコムギに与える表現型の変化を分子レベルで解明することを目的に、*Ae. mutica* ミトコンドリアゲノムの構造解析を行ってきた。その過程で、*Ae. mutica* の *cox1* 遺伝子上流には orf260 が存在し、これが *cox1* と共転写されること、T 型及び T² 型細胞質に存在する orf260 は 1 つの非同義置換で区別されることを報告した (第 105 回講演会)。さらに、この orf260 の非同義置換は、

種内変異として野生の *Ae. mutica* にも観察され、この変異が *atp1* の構造変異など他のミトコンドリア遺伝子で見られる種内変異と相関することも明らかになっている。今回、*Ae. mutica* で同定された orf260 の特性を調査する目的で、この遺伝子を実験ベクターにクローニングし、大腸菌を用いたいくつかの実験を行ったのでその結果を報告する。

本研究では T 型及び T² 型細胞質の orf260 の全長を PCR により増幅し、pMAL-c2x 発現ベクターにそれぞれクローニングした。融合タンパク質 (malE+ORF260) の発現を誘導後、大腸菌の生育への影響を観察したところ、由来した細胞質型の如何を問わず、この融合タンパク質は大腸菌の細胞を完全に死滅させた (図)。現在、発現ベクターを pRSET に変更し、全長あるいは ORF260 の N 末端に存在する疎水性部分を欠失させたいくつかのコンストラクトを作成して、産物と大腸菌の生育への関係を調査している。これらの実験から ORF260 タンパク質の毒性とミトコンドリアへの影響を考察したい。

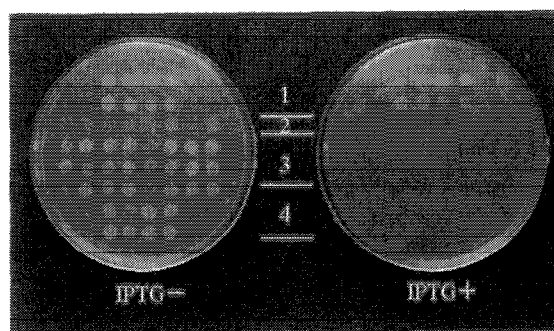


図. 融合タンパク質の *E. coli* に対する影響

1:pMAL-c2x 2:orf256(*T. timopheevi*) 3:orf260(*Ae. mutica* T) 4:orf260(*Ae. mutica* T²) *E. coli*: DH5 α

425 **ダイズフェリチン全長 cDNA を葉緑体で強発現するタバコの遺伝子発現の変化と新たなフェリチン組換え体の作出**

○大野 香織¹, 郭 長虹², 寺地 徹¹ (1.京産大工, 2.ハルピン師範大学)

Alteration of gene expression in the tranplastomic tobacco expressing a full-length soy bean ferritin cDNA and production of new ferritin transformants

○Ohno, K.¹, C. Guo², T. Terachi¹ (1.Fac. Eng. Kyoto Sangyo U., 2.Harbin Normal U.)

葉緑体の遺伝子組換えは、植物自体の機能向上や植物における有用物質の効率的生産をもたらす基礎技術として、近年大いに注目されている。我々はこの技術を将来的に作物へ適用し、人類に有用な植物を育成することを考えているが、これまでタバコをモデルに、フェリチン、ヒルジン、*apx* などの外来遺伝子をそれぞれ葉緑体ゲノムに持つ、数種類の組換えタバコの作出に初めて成功したことを報告している。特に前回の本大会では、植物の葉における鉄含量を飛躍的に増加させることを目的に、ダイズフェリチンの全長 cDNA を葉緑体で強発現する組換えタバコを作出し、後代の特徴付けを行った結果を報告した。この組換えタバコは、葉における鉄含量が野生型タバコと比べ乾燥重量あたり 1.6 倍増加し、野生型タバコが枯死する高濃度の鉄含有量 (750 μ M) の培地でも生存可能であった。その一方で、この組換えタバコは発芽直後から全体的に黄緑色を呈し、壊死により葉の一部に穴があくなど、野生型タバコには見られない特異な表現型が観察されている。今回、この組換えタバコにおけるダイズフェリチン強発

現の影響をさらに詳細に調べるため、内在タバコフェリチンや *apx* などのストレス関連遺伝子の発現を定量 PCR により解析するとともに、T₂ 世代の葉緑体を電子顕微鏡で観察し、野生型タバコのものと比較した。

また、フェリチンタバコの表現型の改善をはかるため、以前の導入コンストラクトを利用して、ダイズフェリチンの全長 cDNA から葉緑体へのトランジットペプチドをコードする部分を除いたもの、また、ダイズフェリチン cDNA をタバコのフェリチン cDNA で置き換えたものをそれぞれ作製した。ダイズフェリチンのトランジットペプチドを除いた導入コンストラクトを、パーティクルガンを用いてタバコの葉に撃ち込んだところ、スペクチノマイシン耐性を示す個体を複数個得ることができた。またその中から 2 個体の DNA を抽出し PCR を行ったところ、両個体共にダイズフェリチンに特異的なプライマーペアでの増幅がみられた。現在これらの個体を温室で育成しており、本発表ではこれら新しい組換えタバコの特徴についても報告したい。

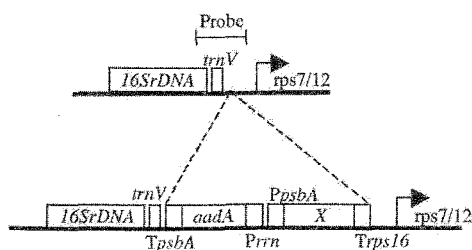


図 1. 葉緑体の形質転換に用いたプラスミドコンストラクト
Xは導入遺伝子 (*ferritin*および*ferritin/delTP*) を表す

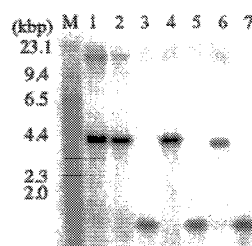


図 2. サザンブロット解析

M: Marker (λ /Hind III)
3,7: 野生型タバコ
1,2,4: *ferritin*を導入した葉緑体形質転換タバコ
5,6: *ferritin/delTP*を導入した葉緑体形質転換タバコ
Probeは図1を参照

426 葉緑体の遺伝子組換えタバコによる有用タンパク質の大量生産の試み1. ヒルジン
 ○橋本 絢子¹, 野添 幹雄¹, 郭 長虹², 大迫 敬義³, 尾崎 昭子¹, 黒坂 光¹, 山岸 博¹, 寺地 徹¹
 (1.京産大工, 2.ハルピン師範大学, 3.京府大農)

A basic study toward the large-scale production of the useful proteins using transplastomic tobacco plants. I. Hiridine

○Hashimoto, A.¹, M. Nozoe¹, C.-H. Guo², T. Ohsako³, A. Ozaki¹, A. Kurosaka¹, H. Yamagishi¹, T. Terachi¹ (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Harbin Normal U., 3.Fac. Agr., Kyoto Pref. U.)

葉緑体の遺伝子組換えには、導入遺伝子の母性遺伝、遺伝子産物の大量発現など、通常の遺伝子組換えと比べ多くの利点がある。なかでも導入遺伝子産物の大量発現については、葉の全可溶性タンパク質の40%以上が導入遺伝子産物で占められる例も報告されていることから、医療用ペプチドや産業用酵素など、葉緑体の遺伝子組換え技術は植物を用いた有用物質生産系の構築に最適であると考えられている。

我々は以前の講演会において、トロンビンの広範囲な生理活性を特異的に阻害し、血液凝固を阻止する作用を持ったヒルジンタンパク質の遺伝子 (*hvd*) を葉緑体に持つ組換えタバコを初めて作出したことを報告した (育研 6 別 1、2004)。また前回の講演会では、その組換え体の自殖後代の特徴付けを行ない、T₁ 世代の個体においてホモプラズミック化が達成されていたことを報告した (育研 8 別 2、2006)。今回、これらの組換え体を用いて、主

にタンパク質レベルの詳しい解析を行なったので、その結果を報告する。

独立に得られた2系統 (#2 - 5 及び #6) の組換え体の T₁ 世代、各 4 個体の葉から全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE で泳動後、CBB 染色したところ、約 15kDa の位置に組換え体では見られるが、野生型タバコでは見られないバンドが確認された。また、ヒルジンに対するモノクローナル抗体を用いてウエスタンブロット解析を行なったところ、組換え体においてのみ特異的に発現しているシグナルが複数検出された (図 2)。しかしこれらのシグナルは、ポジティブコントロールとして用いた精製ヒルジンタンパク質とはサイズが異なり、組換え体の葉緑体内でヒルジンタンパク質が強固な複合体を形成している可能性などが考えられた。現在、組換え体の葉の全タンパク質が実際にヒルジン活性を持つか調査している。本報告ではその結果もあわせて報告したい。

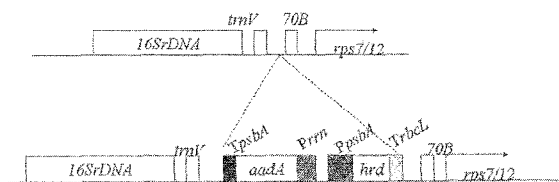


図1: 葉緑体形質転換プラスミドコンストラクト

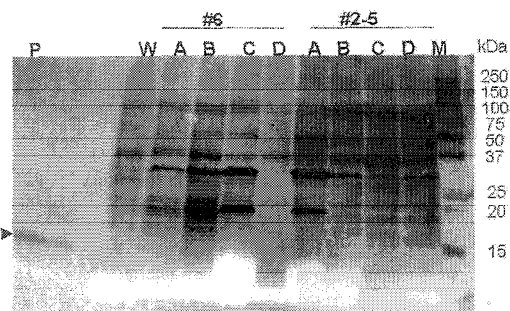


図2: ウエスタンブロット解析
 M: Marker P: Positive control (精製ヒルジンタンパク質)
 #2-5, #6: 組換え体 W: Wild type (Xanthi)

427 グルタチオンレダクターゼを大量発現する葉緑体形質転換タバコの作出

○野添 幹雄, 須口 麻美, 林 清音, 寺地 徹 (京産大工)

Production of transplastomic tobacco plants showing high-level expression of the glutathione reductase in the chloroplasts

○Nozoe, M., A. Suguchi, S. Hayashi, T. Terachi (Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

葉緑体は、光合成をはじめとする様々な物質代謝の場として、植物にとって必須のオルガネラである。この葉緑体の機能を改変することは、植物分子育種において重要な課題であり、我々が行う葉緑体形質転換技術を用いた様々な基礎研究の目標の一つでもある。植物にとって光は、光合成や光形態形成において極めて重要である。一方、様々な環境要因で光合成活性が変化中、過剰な光は葉緑体内で活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) の生成を引き起こす。ROS は生体物質であるタンパク質・脂肪酸・DNA に対して強い酸化作用を持つので、過剰な ROS 生成は植物の生長に大きな障害を与える。そのため植物は、光合成過程で発生する ROS を除去する機構、アスコルビン酸-グルタチオンサイクル (図 1)、を葉緑体内に発達させ、光合成活性が制限されるストレス環境に対応している。我々は、このような過程で機能する酵素を葉緑体内で大量発現することにより、ROS 除去系を高めストレス環境に強い植物を作出することに取り組んでいる。本発表では、グルタチオンレダクターゼ (GR) を大量発現し

た葉緑体形質転換タバコを初めて作出したことを報告する。GR は ROS 除去の過程で酸化したグルタチオンを再び還元型グルタチオンに戻す機能を持つ酵素であり、ストロマでの ROS 除去に重要である。本研究ではタバコからクローニングされた葉緑体局在型 GR cDNA を用いて、葉緑体内で GR を発現するためのコンストラクトを作製した。パーティクルガンにより、コンストラクトをタバコ葉に撃ち込んだところ、48 個体のスペクチノマイシン耐性シュートを得ることができた。この耐性株について DNA を調製して、PCR を行い葉緑体ゲノムへの GR 遺伝子の導入を調べた結果、32 個体が葉緑体形質転換体であった。さらに、サザンブロット解析を行い、ホモプラズミックなライン (形質転換型葉緑体ゲノムにはほぼ置き換わったライン) を 9 個体選抜した。これらの形質転換体の葉より可溶性全タンパク質を抽出して、GR 活性を測定した結果、これらの形質転換体は野生株と比べ 20 ~ 50 倍の活性増加を示した。本発表では、これら形質転換体のストレス耐性を評価した、最新の知見についても言及したい。

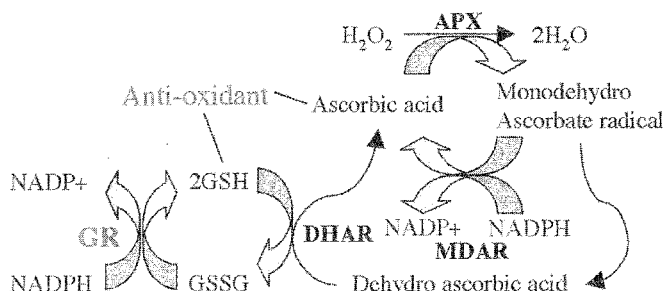


図1 アスコルビン酸-グルタチオンサイクル
還元型グルタチオン(GSH)とアスコルビン酸はアンチオキシダントとして様々な活性酸素種を無毒化する。GR: Glutathione Reductase, DHAR: Dehydro-ascorbate reductase, MDAR: Monodehydroascorbate reductase, APX: Ascorbate Peroxidase

428 モノデヒドロアスコルビン酸還元酵素 (MDAR) 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ遺伝子組換えタバコの特徴づけ

○林 清音¹, 佐野 智², 寺地 徹¹ (1.京産大工, 2.京都府大院農)

Characterization of a transplastomic tobacco plant containing a gene encoding the monodehydroascorbate reductase (MDAR)

○Hayashi, S.¹, S. Sano², T. Terachi¹ (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Grad. Sch. Agr., Kyoto Pref. U.)

強光、乾燥などのストレスを受けると、植物体内には強い酸化作用を持った活性酸素種 (ROS) が生じる。発生した ROS は脂質や生体物質と反応し、成長の抑制や光合成の阻害といった障害を植物にもたらす。一方、植物はこれら ROS を除去するための代謝経路を備えており、数種類の酵素が ROS を段階的に還元して無毒化する。葉緑体は ROS 発生の主要な場として知られているので、葉緑体内の ROS を効率よく除去することは、植物のストレス耐性を向上させるうえで重要なことだと考えられる。本研究は葉緑体で働く ROS 除去酵素の遺伝子を葉緑体ゲノムに導入することで、ストレスに強い植物を作出することを目的とする。代表的な ROS のひとつである H₂O₂ は、ascorbate peroxidase (APX) の働きによって H₂O に変換され、このとき同時にアスコルビン酸が酸化される。この酸化されたアスコルビン酸を還元し元の状態に戻す酵素が monodehydroascorbate reductase (MDAR) である。前回の本大会では、この MDAR 遺伝子をタバコの葉緑体ゲノムへ導入することに初めて成功したことを報告した。今回はこの組換えタバコの後代を用いて行った実験結果を報

告する。

MDAR 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコは独立に 2 系統作出されているが、今回それぞれの系統を自殖して、T₁ 世代の種子を得た。これらの種子をスペクチノマイシン 500mg/L を含む培地に播種したところ、ひとつの系統からはスペクチノマイシン耐性を示す個体のみが得られたが、もうひとつの系統からは耐性個体と感受性個体が分離した。それぞれの系統の耐性個体から全 DNA を調製し、サザンブロット解析を行った結果、前者はホモプラズミック、後者はヘテロプラズミックであることが示された (図 1)。また、これらの個体から RNA を調製し、ランダムプライマーで逆転写して cDNA を得た。導入遺伝子に特異的なプライマーを設計し、これらの cDNA を鋳型に RT-PCR を行ったところ、いずれの個体にも導入 MDAR 遺伝子の転写が認められた (図 2)。さらに、葉からタンパク質を抽出し、組換えタバコの MDAR 活性を測定したところ、野生型タバコに比べはるかに高い活性を示した。現在 T₁ 世代を用いて、これらのストレス耐性を調査している。発表ではこの実験の経過も報告したい。

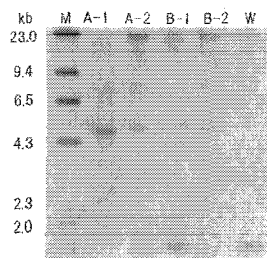


図 1: サザンブロット解析

Probe: 導入領域を含むタバコ葉緑体 DNA

M: λ /HindIII

A-1, A-2, B-1, B-2: mdar を導入した葉緑体形質転換体

A と B は独立したシュート由来、1 と 2 は一つのシュートを切り分けた個体

W: 野生型タバコ

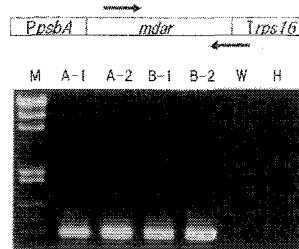


図 2: RT-PCR

M: λ /HindIII + ϕ x/HaeIII

A-1, A-2, B-1, B-2: mdar を導入した葉緑体形質転換体

A と B は独立したシュート由来、1 と 2 は一つのシュートを切り分けた個体

W: 野生型タバコ

H: H₂O

619 稔性回復遺伝子を持つハマダイコンにおける *orf687* の Genotyping

○松本 欣剛, 安本 景太, 山岸 博 (京都産大工学)

Genotyping of *orf687* in Japanese wild radish containing fertility restore gene for the Ogura CMS

○Matsumoto, Y., K. Yasumoto, H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

日本の海岸部に広く自生するハマダイコンには、オグラ型の雄性不稔細胞質を持つものが多く含まれている。その一方で、ハマダイコンの自生地では実際に雄性不稔を発現している個体のごく少ないことから、ハマダイコンの多くの個体は稔性回復遺伝子を持つものと考えられる。今日まで、オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子として、*orf687* が単離されているが、これとハマダイコンの持つ稔性回復遺伝子との関係は明確になっていない。そこで、稔性回復遺伝子を持つと判定されたハマダイコンの多数個体について、*orf687* の有無を調査するとともに、その Genotyping を行った。

我国の15か所ならびに韓国の2か所で収集されたハマダイコンを用いた。まずハマダイコンの各個体について、雄性不稔遺伝子 (*orf138*) の有無を調べた。ついで、*orf138* を持つものについては、個体の花粉稔性を観察することによって、また持たないものについては、オグラ型雄性不稔系統の‘MS 源助’との交雑次代の花粉稔性を調査することによって、それぞれ稔性回復遺伝子の有無を判定した。稔性回復遺伝子を有すると判定されたハマダ

イコンの個体について、PCR によって *orf687* 領域が存在するかどうかを調査した。その上で、*orf687* が増幅した個体に関しては、同遺伝子の塩基配列が、稔性回復遺伝子を持たない‘MS 源助’と異なるかどうかを解析した。更に、‘MS 源助’と異なる配列を持つ個体に関しては、*orf687* の稔性回復機能の有無に重要な役割を果たすとされる118番目のアミノ酸をコードする塩基の変異を RFLP により検出した。

供試個体のうち42%は *orf138* を持ち、また92%は稔性回復遺伝子を有すると判定された。稔性回復遺伝子を持つ個体の大部分において *orf687* 領域の増幅が観察されたが、そのうち74%の個体は、‘MS 源助’と同一の塩基配列を持つと判断された。更に残りの26%のうち、118番目のアミノ酸サイトに関して、稔性回復機能を有する *orf687* とは異なる配列を持つと考えられる個体が11%に及んだ。また、同サイトにおいてはハマダイコンの集団内で多型が検出された(図-1)。全体として、すでに単離された *orf687* と同一の遺伝子を持つハマダイコンはわずかであり、大部分はこれと異なる稔性回復遺伝子を持つものと考えられる。

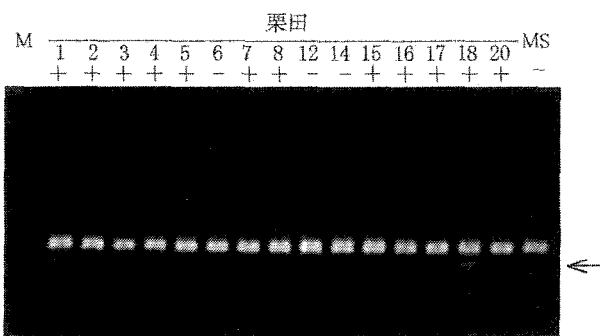


図-1 栗田(宮津市)のハマダイコンにおける *orf687* の RFLP (+と-は稔性回復遺伝子の有無を示す) MS; MS源助、←; 回復機能を持つ *orf687* に特異的な *Ssp I* 断片

620 野生ダイコンにおける未知の稔性回復遺伝子の遺伝様式および稔性回復機構

○安本 景太, 富岡 関子, 松本 欣剛, 寺地 徹, 山岸 博 (京都産大工学)

Inheritance mode and fertility restoration mechanism of unidentified fertility-restorer gene in wild radishes

○Yasumoto, K., E. Tomioka, Y. Matsumoto, T. Terachi, H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

ダイコンのオグラ型雄性不稔細胞質は、ミトコンドリアゲノムの *orf138* 遺伝子によって雄性不稔を引き起こす。一方で、この雄性不稔遺伝子の発現は、核ゲノムの稔性回復遺伝子 (*Rf*) により抑制される。

演者らはこれまでに、野生ダイコンの中から、既に同定されている *Rf* 遺伝子の *orf687* 遺伝子とは異なる未知の *Rf* 遺伝子を持つ個体を多数見出した。また、このような野生ダイコンのうち、東アジアに自生するハマダイコンには、*orf138* の転写産物のプロセッシングに関わる *Rf* 遺伝子が存在することを示した。そこで今回、この *Rf* 遺伝子の遺伝様式と稔性回復機構について調査を行った。

材料には、*orf138* を持ち、かつ *orf687* の劣性アリルをホモに持つ可稔のハマダイコン (T-14) を 1 個体用いた。これを花粉親として、オグラ型の雄性不稔系統 ‘MS 源助’ との間で F₁ を得た後、1 個体を自殖して F₂ 集団を作出した。開花した 44 個体の花粉稔性は、可稔が 26 個体、不稔が 18 個体に分離した。また、可稔個体のうち、花により花粉稔性が変動する個体が 8 個体観察された。F₂ 個体の一部 (34

個体) のつぼみから全 RNA を調製し、*orf138* 全長をプローブとするノーザン解析を行ったところ、稔性回復個体は全てプロセッシングを受けていた。また、この中の 1 個体について 5' および 3' RACE を行い、*orf138* 転写産物の末端配列を決定した。その結果、*orf138* コード領域を含む 5' 側の配列を欠いていることが分かった。さらに、この領域に対応するプローブを用いノーザン解析を行うことで、この結果を確認した (Fig. 1)。一方で、不稔個体でありながらプロセッシングを受けている個体も 7 個体観察された。

これらの結果から、ハマダイコンにおける未知の *Rf* 遺伝子は *orf138* の転写産物を修飾し、ORF138 タンパク質の発現を抑えることで稔性を回復させること、およびこの *Rf* 遺伝子による稔性回復効果は個体によって差を生じ、完全な稔性回復をもたらすことができない場合があることが示された。野生種 *R. raphanistrum* についても同様の機能を持った *Rf* 遺伝子の存在を確認しており、現在さらに調査を進めている。

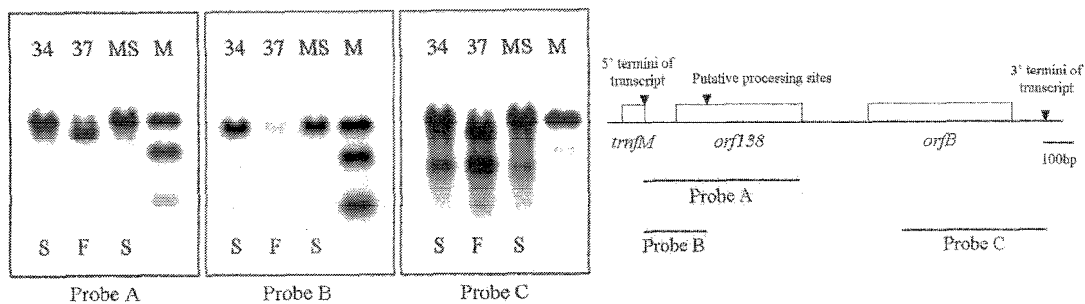


Fig.1. 稔性回復個体における *orf138* 転写産物のノーザン解析(左:Probe A~C). MS; MS源助, M; 分子量マーカー, S; 雄性不稔個体, F; 稔性回復個体 右図はそれぞれのプローブに用いた領域を示す.

621 ダイコン属野生種におけるオグラ型細胞質に対する稔性回復遺伝子の分布および変異

○山岸 博, 安本 景太, 松本 欣剛, 西川 由美 (京産大工学)

Distribution and variations of fertility restorer gene for the Ogura male-sterility in wild species of *Raphanus*

○Yamagishi, H., K. Yasumoto, Y. Matsumoto, Y. Nishikawa (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

アブラナ科作物の F₁ 育種に最もよく利用されているオグラ型雄性不稔細胞質は、ダイコン属の野生種で生じたと考えられている。この細胞質は、野生種からハマダイコンに伝播して広く分布すると同時に、中国および日本の栽培ダイコンの一部の品種にもこれを持つものが見出されている。一方、オグラ型細胞質に対する稔性回復遺伝子は、ハマダイコンに高い頻度で観察されるとともに、ハツカダイコンおよび中国ダイコンの一部にも存在している。このうち中国の栽培品種‘園紅’の持つ稔性回復遺伝子 (*orf687*) が同定された。しかし、ハマダイコンの持つ稔性回復遺伝子には、*orf687* とは異なるものがあることが示唆された。このため我々はオグラ型細胞質が起源したダイコン属野生種においては、どのような稔性回復遺伝子が分布し、そのうちのどのタイプが、ハマダイコンや一部の栽培ダイコンに伝えられたかを明らかにしようとしている。今回は、ダイコン属野生種における稔性回復遺伝子の有無と、その遺伝子の *orf687* との異同を明らかにしようとした。

東北大学より導入した *Raphanus* 属の野生種

2 種 (*R. maritimus*, *R. raphanistrum*) 5 系統, 17 個体を用いた。これらの個体を、オグラ型雄性不稔の‘MS 源助’に交雑し、次代における花粉稔性を調査して、野生種の各個体における稔性回復遺伝子の有無を判定した。その一方で、各個体から DNA を単離し、‘園紅’の持つ *orf687* の全長を増幅する PCR を行った。PCR により同領域を持つことが明らかになった個体については、RFLP の調査により *orf687* のタイプを判定した。

調査した野生種 5 系統のうち 4 系統では全個体が稔性回復遺伝子を持つことが観察されたが、1 系統においては、稔性回復遺伝子をヘテロに持つ個体と持たない個体とが共に含まれていた。このことから、*Raphanus* 属野生種は一般に稔性回復遺伝子を保有していると考えられる。しかし PCR の結果、稔性回復遺伝子を持ちながら *orf687* 領域の DNA の増幅が見られない個体が大多数を占めた(図-1)。このため、野生種における稔性回復遺伝子には、*orf687* と異なるものが高頻度で存在すると考えられる。

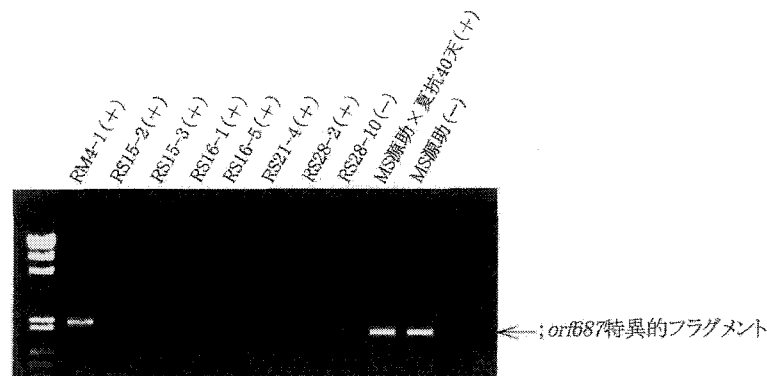


図-1 *Raphanus*属野生種における*orf687*の増幅(+と-は稔性回復遺伝子の有無を示す。)

International Congress on Plant Mitochondrial Biology

Nara, Japan

June 25-29, 2007



國際植物ミトコンドリア生物学会議

自 平成十九年六月二十五日

至 二十九日

於 日本国 奈良県奈良市

ICPMB
International Congress on Plant Mitochondrial Biology 2007, JAPAN

Structural and sequence variations among the fertility restorer genes for Ogura male-sterility in the wild and cultivated radishes

Keita Yasumoto, Hiroshi Yamagishi and Toru Terachi

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

Cytoplasmic male-sterility (CMS) is a maternally inherited trait that is unable to produce functional pollen, and it is caused by the specific cytoplasm with an unusual chimeric mitochondrial gene. CMS is a widespread phenomenon in higher plants, and it provides us a good opportunity to study an interaction between the mitochondrial and specific nuclear genes. In radish, the mitochondrial gene *orf138*, found in Ogura cytoplasm, is responsible for the male-sterility, whereas the nuclear restorer gene (*Rf*) inhibits the expression of the *orf138*. The *Rf* gene for Ogura male-sterility was cloned and characterized several years ago by map-based cloning. The identified *Rf* gene was named as *orf687*, because its product contains 687 amino acids, and the protein belongs to a member of the PPR protein family. Previous studies indicated that two highly homologous PPR genes (i. e. *pprA* and *pprC*) to the *orf687* are located immediately 3' and 5' of *orf687*, respectively, in the tandem orientation. An *orf687* (either dominant or recessive type) is also present in various strains of radish with the normal cytoplasm (e. g. European cultivars), suggesting that the PPR gene plays other important roles in radish mitochondria than fertility restoration. In this poster, in order to gain better understanding of the evolution of the *Rf* gene in radish, the structural and sequence variations of the *orf687* and its homologous PPR genes were analyzed using wild and cultivated radishes as materials. The assay based on the Long-PCR and Southern-blot analysis revealed that the most of radish plants contain *orf687* homologues in a multi-copy. Copy number of *orf687* homologues, however, varied among the plants studied, and the nucleotide sequences of *orf687* and homologous PPR genes were different among the plants, e. g. an European cultivar 'Comet' contains at least 4 copies of PPR genes (including the *orf687*), whereas a Japanese radish 'Kosena' has 3 copies of PPR gene at the locus. Comparative genome mapping of the *orf687* locus revealed that an unequal crossing-over frequently occurred during evolution of radish due to the high homology among PPR genes. The relationships between *orf687* and other homologous PPR genes found in the locus of wild and cultivated radishes will be discussed.

P47

Molecular analyses of alloplasmic lines of common wheat having *Aegilops mutica* cytoplasm.

Akihiko Horikawa, Kenta Nakanishi, Kazuya Taniguchi, Jun Matsuzaki and Toru Terachi

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Kyoto 603-8555, Japan

Cytoplasmic genome (plasmon) of *Aegilops mutica*, a wild relative of wheat, is known to have effects on the phenotype of wheat, when it is introduced into wheat nuclear background. According to the phenotype of alloplasmic lines of common wheat, *mutica* plasmons have been classified into two types, T and T², i. e. the type T plasmon delays heading for 10.6 days of wheat (on the average of 12 common wheats tested), whereas the type T² causes complete male sterility in all 12 wheats (1). Previous molecular studies revealed that the two types of *mutica* plasmon have an identical chloroplast genome to each other (2), and recent complete sequencing of wheat mitochondrial genome (3) prompts us to study molecular constitution of the mitochondrial genomes from T and T² plasmons.

In this report, in order to identify the gene(s) responsible for the phenotypic differences between two alloplasmic lines, a series of experiment were conducted. Genome-wide Southern hybridization analysis using mitochondrial gene probes revealed that three loci (*atpA/9*, *orf260/coxI* and *rrn18/5*) show the structural differences among common wheat and two *mutica* plasmons. Nucleotide sequencing of the three loci revealed new chimeric open reading frames (ORFs) containing *coxI* in T plasmon and an elongated *atp9* and a truncated *rrn18* in T² plasmon. Although northern analyses failed to detect transcripts of these unusual genes, RT-PCR showed that at least an elongated *atp9* is transcribed as well as a normal *atp9* in the alloplasmic line with T² plasmon. The significance of RNA editing in the transcripts from both an elongated and a normal *atp9* will be discussed, being related to specific protein spots that are detected by 2D gel electrophoresis to each plasmon.

Since the phenotype of alloplasmic lines are determined by the interaction between the corresponding plasmon and nuclei, the retrograde regulation of wheat nuclear genes by *mutica* plasmon was investigated with a 22K microarray containing EST sequences of common wheat. Total RNAs isolated from common wheat and alloplasmic lines with *mutica* plasmon were used in the hybridization. Microarray analysis identified several genes that are up- or down-regulated in alloplasmic lines. Contribution of some nuclear genes to the phenotype of alloplasmic lines will also be discussed.

1. Terachi T, Ogihara Y, Tsunewaki K (1984) Genetics 108: 681-695
2. Terachi T, Tsunewaki K (1986) Theor Appl Genet 73: 175-181
3. Ogihara Y, et al. (2005) Nucl Acids Res 33: 6235-6250

135 雄性不稔を示す *Aegilops mutica* 細胞質置換コムギに存在する伸長型ミトコンドリア ATP9 の発現解析
 中西健太、○谷口和也、堀川明彦、寺地徹 (京産大工)

Study on the expression of elongated mitochondrial ATP9 specifically found in the male-sterile alloplasmic wheat with *Aegilops mutica* cytoplasm. K. Nakanishi, Taniguchi, K., A. Horikawa, and T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

コムギ近縁野生種 *Ae. mutica* が持つ T²型細胞質は、いくつかのパンコムギに雄性不稔を引き起こすことが知られている。我々はこれまでに、パンコムギの一品種 Chinese Spring (CS2 系統) と、Chinese Spring の核に *Ae. mutica* の T²型細胞質を導入した系統 (C14 系統) を用いて、*Ae. mutica* のミトコンドリアに存在する雄性不稔原因遺伝子の探索を行ってきた。全塩基配列が決定されているパンコムギミトコンドリアゲノムの情報を基に、C14 系統に特異的なミトコンドリアゲノムの構造変異をサザン解析により調べたところ、*atp1+9*、*cox1*、*rrn18+5* の 3 つの領域に顕著な構造変異を認めた。また、C14 系統における、これら 3 領域の塩基配列の決定により、パンコムギにはない伸長型 *atp9* 遺伝子、*cox1* 遺伝子上流の *orf260* 遺伝子、組換え型 *rrn18* 遺伝子の存在が明らかとなり、これらを原因遺伝子の有力な候補と考え、現在解析を進めている。その中で今回特に、C14 系統特異的に存在する伸長型 *atp9* に着目し、この遺伝子の詳細な発現解析を行ったのでその結果を報告する。

C14 系統のミトコンドリアゲノムには、パンコムギと 100% 相同な正常型 *atp9* 遺伝子とは別に、3' 末端が由来不明な配列に置換わり、ORF が長くなった、伸長型 *atp9* 遺伝子が存在する (図 1)。この伸長型 *atp9* 遺伝子では、C 末端が 5 アミノ酸伸長した ATP9 タンパク質をコードすることが可能である。しかしパンコムギの *atp9* 遺伝子

で証明されているように、75 番目のコドンに RNA editing が起けると、終止コドンが新たに作られるので、タンパク質のレベルでは、正常型と伸長型の *atp9* 遺伝子に違いが無くなる。そこで本研究では、このコドンの editing 頻度を明らかにすることを目的に、以下の実験を行った。本研究ではまず、C14 系統の幼植物の葉と根、また出穂期の穂由来の全 RNA からランダムプライマーにより cDNA を合成し、RT-PCR を行った。その結果、すべての器官で伸長型 *atp9* 遺伝子の転写産物が観察された。次に、伸長型 *atp9* の cDNA クローンを多数単離し、個々についてシークエンシングもしくは PCR-RFLP を行い、各器官における伸長型 *atp9* 遺伝子の editing 頻度を調査した。その結果、各器官のすべての転写産物が高頻度で editing を受けていることが明らかとなり、伸長型 *atp9* 遺伝子も正常型と同じ構造の ATP9 タンパク質へ翻訳されると考えられた。

一方、この伸長型 *atp9* 遺伝子の転写後制御に関してより詳しく調査することを目的に、poly (A) 化された転写産物に関しても同様の実験を行ったところ、興味深いことにほとんどの転写産物はこのサイトの editing を受けておらず、C 末端が伸長した異常な ATP9 タンパク質が C14 系統に存在する可能性が示された。現在、他のサイトにおける editing 頻度について調査を行っている。また、*atp9* 遺伝子のタンパク質レベルでの解析も検討中である。

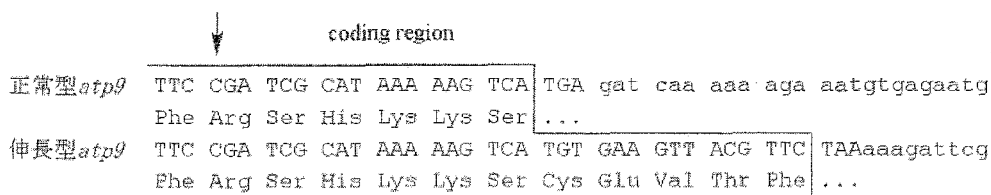


図 1. 伸長型 *atp9* 遺伝子の構造
 矢印は終止コドンを生じる editing サイトを示す

136 *orf687*を持たないハマダイコンによるオグラ型細胞質に対する花粉稔性回復効果
○安本景太・寺地 徹・山岸 博 (京都産大工)

Fertility restoration against the Ogura male-sterile cytoplasm by a Japanese wild radish without the *orf687*. Yasumoto, K., T. Terachi and H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

ハマダイコンなどの野生ダイコンの核ゲノムには、オグラ型雄性不稔性細胞質に対する稔性回復遺伝子(*Rf*)が広く分布する。また、中国ダイコンやハツカダイコンなどの栽培ダイコンの中にも *Rf* 遺伝子を持つ品種が存在する。これまでに Koizuka *et al.* (2003)によって中国ダイコン‘園紅’に由来する *Rf* 遺伝子の *orf687* がクローニングされている。*orf687* 遺伝子産物は、PPRモチーフを持ち、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子(*orf138*)産物の蓄積を減少させる。また、稔性回復機能の有無を決定しているのは、ORF687における1つのアミノ酸置換であることが示されている(今井ら 2002)。

我々は以前に、*orf687*の塩基配列を指標にして、ハマダイコンにおける *Rf* 遺伝子の分布の調査を行った。その過程で、ハマダイコンの集団中に、ORF687に関しては稔性回復機能を持たない *rf* 遺伝子産物と同一のアミノ酸配列を持ちながら、稔性を回復している個体を数多く見出した(安本ら 2006)。これらの個体はミトコンドリアに *orf138* を有することから、*orf687*とは異なる稔性回復遺伝子を持つと考えられる。そこで今回、このようなハマダイコンにおける稔性回復効果について調査を行ったので報告する。

材料には、PCRで *orf138*を持つことが確

認されながら、正常な花粉稔性を示した、ハマダイコン‘富岡’の1個体(T-14)を用いた。まず全DNAを鋳型に *orf687* 遺伝子全長をカバーするプライマーを用いて、PCR産物のダイレクトシーケエンシングを行ったところ、この個体は劣性の *rf* 遺伝子の塩基配列をホモに持つことが確認された。そこで、この個体を花粉親として、これと同様に劣性の *rf* 遺伝子をホモに持つ雄性不稔系統の‘MS源助’との間で交配を行った。その結果、得られた14個体のF₁の稔性は全て回復し、*orf687*を持たないT-14に、オグラ型細胞質に対する稔性回復効果があることが明確となった。

現在、F₁の1個体を自殖させて得たF₂集団の花粉稔性を調査中である。これまでに19個体が開花したが、そのうち16個体は90%以上の花粉稔性を示し、いずれも完全な可稔個体であった。一方、不稔個体は現在までに2個体観察されている。また、花によって花粉稔性が変動する個体が1個体認められた。現在さらに、未開花個体の稔性の調査を進めるとともに、可稔個体における *orf138*の発現等を調査することにより、*orf687*とは異なるハマダイコンに特有の *Rf* 遺伝子の機能を明らかにしようとしている。

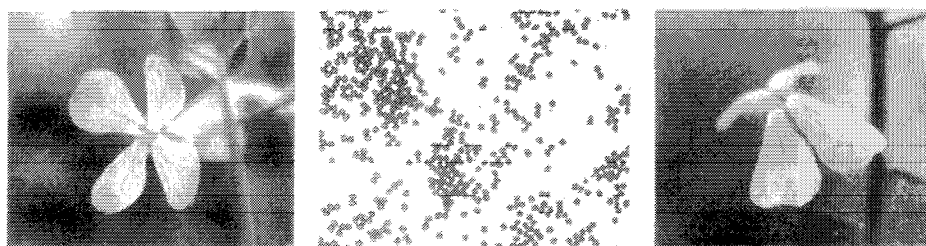


図1. オグラ型雄性不稔系統‘MS源助’と *orf687*を持たないハマダイコンとのF₂における稔性回復(左; F₂の可稔個体、中; 可稔個体の花粉、右; F₂の不稔個体)

137 オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子のハツカダイコン品種・系統内における変異
 ○大山口暁・吉見麻衣子・富岡関子・山岸博・寺地徹（京産大工）

Genetic variation of the *Rf* gene for Ogura male-sterility within several cultivars of European radish. Ohyamaguchi, A., M. Yoshimi, E. Tomioka, H. Yamagishi and T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

一般にハツカダイコンはオグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) を持っている。またこの *Rf* 遺伝子の少なくとも1つは *orf687* (以下、*ppr-b*) と考えられ、これは PPR モチーフを持つタンパク質をコードする。しかしハツカダイコンの *ppr-b* 遺伝子の構造は、我々が以前本大会で報告した 'Comet' のもの以外は不明であり、これまで体系的に調査されたことはない。そこで本研究では、ハツカダイコンの *Rf* 遺伝子の進化の全体像を把握するため、'Comet'、'Icicle' などを中心とするハツカダイコン9品種について *ppr-b* 遺伝子の周辺ゲノム領域の品種内多型を分子的方法で調べた。

本研究ではまず、市販の 'Comet' (種苗会社別に A-E の5グループに分けた) 71 個体から全 DNA を調製し、これを鋳型に *ppr-b* 及びそのすぐ下流に存在するホモログ *ppr-a* を標的とする PCR を行った。その結果、予想に反し、2割以上の個体で *ppr-a*、*ppr-b* 両遺伝子の増幅が見られなかった (表1)。そこですべての個体で増幅が見られた C 以外の各グループから、増幅を示さない個体をそれぞれ1つ選び、増幅が見られた個体とともに *ppr-b* 遺伝子をプローブとするサザン解析を行った (データ未掲載)。その結果、ハイブリダイズするバンドの本数に、*ppr* 遺伝子の増幅と関連した多型が認められ、'Comet' では個体により *ppr-b* 遺伝子を含むゲノム領域に構造変異が生じていることが示された。また *ppr-b* の欠失は、*ppr-a* の下流に位置する遺伝子 (シロイヌナズナ *At1g63680* のダイコンホモログ) と、*ppr-b* 及び上流に存在する *ppr-c* 内部のプライマーを用いた Long PCR によっても確認された (図1, 図2)。

本研究では 'Comet' 以外のハツカダイコンについても多数の個体を用いて *ppr-b* 遺伝子の多型を調べた。その結果、例えば 'Icicle' の1個体で、*ppr-b* が欠失する一方、おそらく組換えにより新規 *ppr* 遺伝子が生じるなど、いくつかの構造変異を見いだした。

以上の結果より、ハツカダイコンの *ppr-b* 遺

伝子の周辺には、構造変異を中心とした豊富な多型が存在すると考えられた。

表1. PCR による *ppr-a*, *ppr-b*, *Hedge*, *Pgi* の増幅

	<i>ppr-a</i>		<i>ppr-b</i>		<i>Hedge</i>		<i>Pgi</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-
A社	14	1	14	1	15	0	15	0
B社	10	5	9	6	15	0	15	0
C社	14	0	14	0	14	0	14	0
D社	5	9	5	9	14	0	14	0
E社	12	1	12	1	13	0	13	0
合計	55	16	54	17	71	0	71	0

+: 増幅, -: 非増幅。用いたプライマーペアは *ppr-a* (a/b)、*ppr-b* (c/d)、*Hedge* (e/f) 及び *Pgi* (ポジティブコントロール)

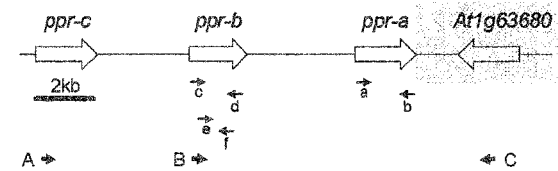


図1. ダイコンの *ppr* 遺伝子座周辺のゲノム構造と PCR に用いたプライマー

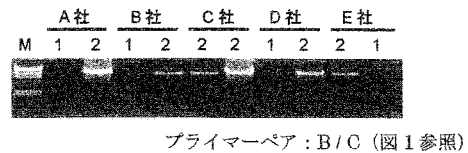


図2. Long PCR による *ppr* 遺伝子座の増幅

M: λ /HindIII, 1: *ppr-b*(-), 2: *ppr-b*(+)

Agrobacterium を用いた植物の遺伝子組換えには、組織培養とそれによる形質転換体の再分化系を必要とする。しかし、ダイコンにおいては現在までのところ、組織培養による効率的な再分化系は確立していない。このため本研究では胚軸を用いたダイコンの遺伝子組換え法を開発することを目的として、ダイコンの胚軸培養による茎葉の再分化率を調査した。我国の栽培ダイコンおよびハツカダイコンについて再分化率の品種間差を明らかにするとともに、培養条件の検討を行った。

【材料及び方法】 我国の栽培ダイコンの「練馬たくあん」、「耐病みの早生」、「青首宮重総太り」など計6品種、ハツカダイコンの「コメット」、「サクサ」の2品種を用いた。各品種の種子を滅菌して播種し、無菌的に育てた幼苗から得た胚軸部分を培養に用いた。

胚軸のカルス化とそこからのシュートの再分化を誘導するために、高崎ら(1997)による *Brassica* 属植物の胚軸の培養系を基本とした。すなわち、幼苗から切り出した胚軸を、3種類の培地(MS-1、B5-1、B5-BZ)で順次培養することによって、シュートの形成を図った。その際、まず「練馬たくあん」、「耐病みの早生」、「青首宮重総太り」の3品種を用いて好適な培養条件を検索した。得られた結果にもとづき、さらに供試品種数をふやして、茎葉再分化率の品種間差異を調査した。また、シュートの形成が観察された品種については、再分化率の向上を目指して、培地添加物の効果を検討した。

【結果】 基本として用いた *Brassica* の再分化培地

では、3品種ともカルスの形成にとどまり、シュートは形成されなかった。置床した胚軸の形状の観察から、Sucrose 濃度が高いことが、正常カルスの発達と再分化を阻害しているのではないかと考えられた。そこで、すべての培養段階における培地の Sucrose 量を 10g/L とした上で、第3段階の培地におけるサイトカイニンの種類と濃度を検討した。

その結果、「練馬たくあん」でシュートの形成が観察された(表-1)。その際、1つの胚軸から2つ以上のシュートが発生することが観察された。再分化個体は正常に発根し、植物体にまで達した。これに対して、「耐病みの早生」と「青首宮重総太り」では検討した培養条件のいずれにおいても、全く再分化が認められなかった。供試品種をふやした結果、「白首宮重」及び「コメット」においても再分化が観察された(表-1)。

以上のように、ダイコンの胚軸培養による再分化の有無には、著しい品種間差異が観察された。この培養系をダイコンの形質転換に用いるためには、より多くの品種で高い再分化率が得られる条件をさらに検討する必要があると考えられる。

表-1 ダイコンの胚軸培養による茎葉の再分化

品種	カルス化率 (%)	再分化率 (%) ^a	発根率 (%) ^a
練馬たくあん	100	5.7	41.8
白首宮重	100	6.1	65.8
コメット	100	4.5	53.7

a, 再分化率、発根率; 置床した胚軸のうち、茎葉を再分化した胚軸または発根した胚軸の割合。

生物界に普遍的なフェリチンは、生体内の鉄代謝（貯蔵及び無毒化）に主要な役割を担う。このタンパク質は 24 個の単一サブユニットから構成される「かご」状の構造を持ち、内側に約 4500 個もの鉄原子を貯蔵するとされている。植物のフェリチンサブユニットは核にコードされた遺伝子から転写・翻訳された後、トランジットペプチドにより葉緑体へ輸送される。植物のフェリチン遺伝子はダイズなど 10 種以上の植物から既にクローニングされている。

我々はフェリチン遺伝子を葉緑体内で強発現させることにより、植物の鉄含量を飛躍的に増加させることができると考え、フェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコを作成した。今回は、形質転換体後代 (T_1 及び T_2 世代) について、表現型の観察と分子生物学的な特徴づけを行ったので、結果を報告する。

本研究ではまず、ダイズのフェリチン cDNA のコード領域全長を、葉緑体で機能するプロモーター (*PpsbA*) 及びターミネーター (*Trps16*) 配列に連結した後、これを葉緑体形質転換ベクター (pPRV112A') へ組み込み、葉緑体への導入コンストラクトを作製した。次にパーティクル・ガンを用いて、このコンストラクトをタバコの葉に打込み、スペクチノマイシン耐性を示す組換え体を選抜した。独立に得られた緑色の耐性シュートから、3 個体の組換え体 (#3、#7 及び #25) を確立し、これらの自殖種子 (T_1) を得た。今回、#3 の T_1 を 10 個体、#25 の T_1 を 25 個体、それぞれ閉鎖系温室で育成し、以後の実験に使用した。

PCR (図 1) 及び サザン解析により、親植物から T_1 各個体へのフェリチン遺伝子の伝達を調べたところ、すべての個体に導入遺伝子の存在が確認された。また一部の個体については、ノーザン解析とウェスタン解析により、導入遺伝子の転写及び翻訳産物の蓄積を確認した。#25 の T_1 1 個体について、葉に含まれる鉄含量を ICP 発光分析装置 (島津 ICPS-8000) により測定したところ、組換え体の鉄含量は非組換え体と比べ、乾燥重量あたり 1.6 倍に増加していた。また組換え体は発芽直後から葉が黄緑色を示し、クロロフィル含量は非

組換え体の約半分まで減少していた。組換え体を温室で育成すると、葉が白色化し壊死により穴が開くなど、非組換え体には見られない、際立った表現型が観察された。

鉄含有量の異なる培地で T_2 植物を育てたところ、これらは非組換え体が枯死する高濃度 (750 μM) の鉄存在下でも生存することができた (図 2)。今後、これらの組換え体を用いて、非組換え体との正逆交雑や活性酸素分子種の測定などの実験を行う予定である。なお、本実験に用いた cDNA 及び抗体は電力中央研究所の吉原利一、後藤文之両博士から譲渡して頂いた。ここに深謝の意を表す。

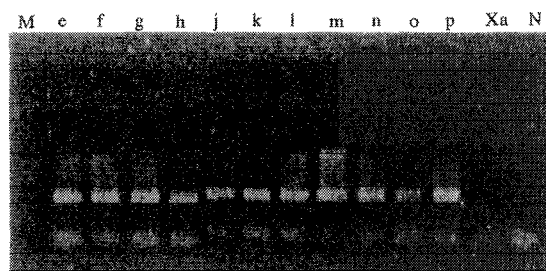


図 1. 導入フェリチン特異的な Primer を用いた PCR
M : Marker ($\phi x/Hae\text{III}$)
e-h : #3 T_1
j-p : #25 T_1
Xa : 非組換え体(Xanthi)
N : Negative control(dH_2O)

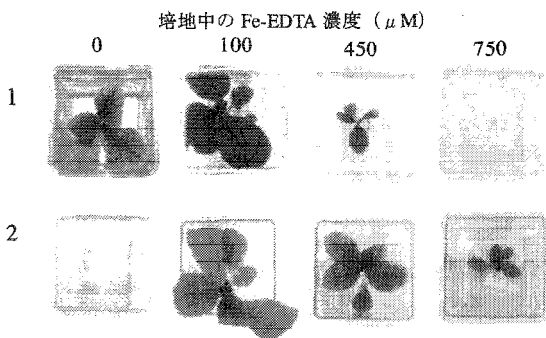


図 2. Fe-EDTA 濃度の違いによる変化
1 : 非組換え体(Xanthi)
2 : 組換え体

○山岸 博、松本欣剛、安本景太 (京都産大工)

Distribution and variation of the pollen fertility restorer gene in the Japanese wild radishes.
Yamagishi, H., Y. Matsumoto and K. Yasumoto (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

東アジアに自生するハマダイコンには、オグラ型雄性不稔性細胞質が広く分布する。その一方で、ハマダイコンの集団において実際に雄性不稔性を示す個体は少ない。これは、ハマダイコンは一般に、オグラ型細胞質に対する稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) を持っていることを意味している。このことを確認するために、日本各地および韓国で収集されたハマダイコンについて、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子 (*orf138*) の有無と花粉稔性を調査した。その上で、正常型細胞質を持つ個体を雄性不稔系統に交雑し、雑種の花粉稔性を調査することにより、ハマダイコンにおける *Rf* 遺伝子の分布を明らかにしようとした。

日本および韓国で収集されたハマダイコン 17 集団、260 個体を栽培した。各個体から DNA を単離し、*orf138* の有無を調査した。その後、各個体の花粉稔性を調査して、雄性不稔性を示すかどうかを判定した。さらに、正常型細胞質を有する個体については、オグラ型雄性不稔系統の 'MS 源助' との間で交雑を行った。交雑で得られた雑種の花粉稔性の分離を調査することによって、正常型細胞質を持つハマダイコンの個体における *Rf* 遺伝子の有無とその遺伝子型を推定した。

次に、交雑に用いた各個体の持つ *Rf* 遺伝子が、すでに同定されている中国ダイコン '園紅' 等の *Rf* 遺伝子 (*orf687*) と同一かどうかを調査した。すなわち、各個体の DNA を鋳型に、*orf687* を PCR により増幅し、その増幅産物を 'MS 源助' から得られた増幅産物 (*rf* に相当する) と混合して二本鎖 DNA を合成した。これに heteroduplex を切断する酵素を処理することで、'園紅' 型 *orf687* の有無を判定した。その後各個体の PCR 産物に同様の酵素処理を施すことによって、*Rf* 遺伝子がホモかヘテロかを識別した。

供試した 260 個体のうち、*orf138* を持つ個体は 102 個体 (39.2%) 観察されたが、このうち実際に雄性不稔性を示す個体は '串木野' の 2 個体と、韓国の '城山' の 1 個体の計 3 個体 (2.9%) に過ぎなかった。*orf138* を持つ残りの 99 個体は可稔であり、*Rf* 遺伝子を持つと判定された。

正常型細胞質のハマダイコンを花粉親として

雄性不稔性の 'MS 源助' と交雑した後代では、調査した 17 のハマダイコン集団すべてにおいて *Rf* 遺伝子を持つ個体の存在が観察された。その中には、集団内に *orf138* を持つ個体が認められず、正常型細胞質で固定している集団も 2 つ存在した。しかし、その一方で、全個体が *Rf* 遺伝子についてホモである集団も認められなかった。

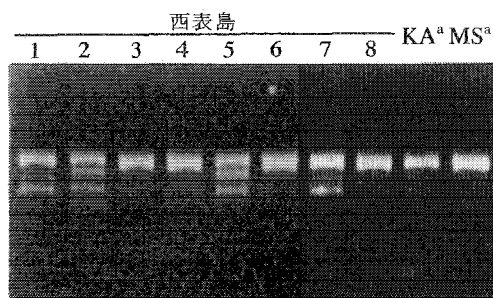
調査集団のうち '西表島' においては、8 個体中 7 個体が正常型細胞質を有しており、そのうち *Rf* 遺伝子をホモに持つ個体が 1 個体、ヘテロに持つ個体が 4 個体、持たない個体が 2 個体含まれていた (表-1)。これらの個体の遺伝子型は、*orf687* に関する PCR 後の酵素処理によっても確認された (図-1)。これに対して、他の 1 個体は *orf138* を持ちながら可稔であり、*Rf* 遺伝子を持つことは明らかであるが、その遺伝子は '園紅' の *orf687* とは異なることが示された。

以上のように、ハマダイコンにおいては個体の細胞質のタイプに関わらず、*Rf* 遺伝子が広く分布する。その中にはすでに同定された *orf687* とは異なるものが含まれている。集団中の *orf138* の頻度と、*Rf* 遺伝子の動態との関係は興味深い。

表-1 '西表島' のハマダイコンの *Rf* 遺伝子とその遺伝型

	1	2	3	4	5	6	7	8
細胞質 ^a	N	N	N	N	N	N	N	S
花粉稔性	+	+	+	+	+	+	+	+
遺伝子型 ^b	Rr	Rr	rr	RR	Rr	rr	Rr	- ^c

a, N:正常型, S:オグラ型, b, 'MS 源助' との交雑により推定, c, -:交雑せず



a, KA; '夏抗 40 天' (*Rf* ホモ), MS; 'MS 源助' (*rf* ホモ)
図-1 Heteroduplex 切断酵素による *orf687* の遺伝型の判定

P34 ヒルジン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ形質転換タバコ後代の特徴づけ

○橋本 純子¹、郭長 虹²、大迫 敬義³、尾崎 昭子¹、黒坂 光¹、山岸 博¹、寺地 徹¹ (1. 京産大工、2. ハルビン師範大学、3. 京府大農)

Characterization of the progenies of transplastomic tobacco plants having a hirudin gene in the chloroplast. Hashimoto, A.1, C. H. Guo², T. Ohsako³, A. Ozaki¹, A. Kurosaka¹, H. Yamagishi¹ and T. Terachi¹ (1. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2. Harbin Normal U., 3. Fac. Agr., Kyoto Pref. U.)

葉緑体の遺伝子組換えには、1) 導入遺伝子産物を大量に発現させることができる、2) 導入遺伝子が花粉により拡散するのを防止できる、3) 複数遺伝子をオペロンとして一括導入できるなど、通常の組換え体と比べ利点がある。また導入遺伝子がサイレンシングや位置効果を受けず、安定して発現することも利点と考えられる。以上のことから、近年、葉緑体の遺伝子組換えは、医療用ペプチドや産業用酵素など、植物を用いた有用物質産生系の構築に利用されている。

我々は以前の講演会において、血栓溶解作用を持つヒルジンタンパク質の遺伝子 (*hrd*) を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコを初めて作出したことを報告した (育研6別1、2004)。今回、これら植物の自殖後代を栽培し、特徴づけを行なったので結果を報告する。

本研究に用いた組換えタバコは、医療用ヒル (*Hirudo medicinalis*) の生体から調製したヒルジンタンパク質の全長 cDNA を、葉緑体の逆位反復配列中の *rrn16* と *rps7/12* 両遺伝子間に持つ (図1)。また、プロモーターに *PpsbA*、ターミネーターには *TrbcL*、選抜マーカーには *aadA* 遺伝子を使用されている。今回、独立に得られた 2 個体 (#2-5 及び #6) の自殖種子 (T_1) を採種し、それらをスペクチノマイシンを含む培地に播種したところ、すべての個体が耐性を示し、親個体で組換え型葉緑体のホモプラスミック化が達成されていることが示唆された。また各 T_1 からランダムに2つの耐性個体を選んで DNA を抽出し、各種 PCR により *hrd* 遺伝子が葉緑体ゲノムの予想される位置に組み込まれているか確認したところ、大部分のプライマーペアで期待される大きさの増幅産物を得た (データ未掲載)。

制限酵素 *Sac*I による Southern 解析では、*hrd* 遺伝子のシグナルが組換え体に認められ、逆位反復配列への遺伝子挿

入を示す約 4kb のシグナルも組換え体のみで観察された (図2)。一方、野生型葉緑体の存在を示す 1.5kb のシグナルはいずれの組換え体にも観察されず、これらの T_1 個体のホモプラスミック化が示唆された (図2)。

現在、閉鎖系温室で #2-5 及び #6 の T_1 各6個体を育成中であり、ポスターには *hrd* 遺伝子の転写、翻訳を含む、これら T_1 個体の特徴を掲示したい。なお、一部のプライマーペアで期待される増幅産物が得られなかった。理由は現在検討中である。

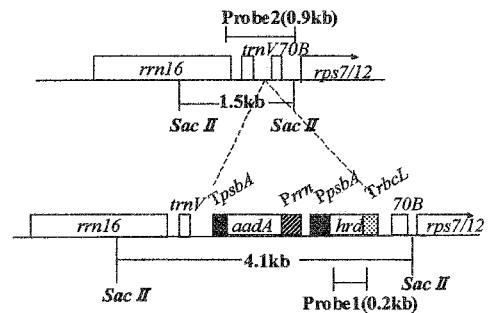


図1. 葉緑体形質転換プラスミドコンストラクト

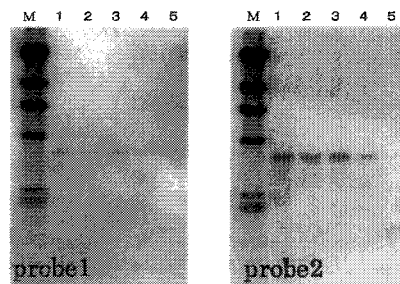


図2. 組換え体のサザン解析

M: Marker (λ / *Hind*III), 1: #2-5a, 2: #2-5b

3: #6a, 4: #6b

probe は図1を参照

P35 活性酸素消去系酵素遺伝子を葉緑体ゲノムにもつタバコの特徴づけ

○林清音¹, 辻村真衣², 須口麻美¹, 寺地徹¹ (1. 京産大工, 2. 奈良先端大バイオ)

Characterization of the transplastomic tobacco plant containing genes encoding ROS-scavenging enzymes. Hayashi, S.¹, M. Tsujimura², A. Suguchi¹, and T. Terachi¹ (1. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2. NAIST, Biosci.)

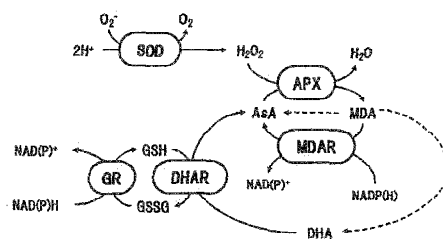
ストレス(強光、乾燥、除草剤、大気汚染など)を受けた植物の体内には、強い酸化作用を持つ活性酸素分子種(ROS)が発生する。このROSは植物細胞内の脂質や生体物質と反応し、組織の壊死、光合成阻害、成長の抑制をもたらすことが知られている。植物はストレスを移動により回避することが出来ない代わりに、ROSを段階的に無害な水に変換する経路を保持している(図1)。葉緑体は多くのROSが発生する場所であり、この代謝経路は葉緑体内にも存在している。本研究はこのROS代謝経路で働く酵素群を葉緑体で強発現させることにより、ストレスに強い植物を作出することを目的としている。今回は酸化されたアスコルビン酸を元の状態に還元する酵素 monodehydroascorbate reductase (MDAR) を初めてタバコ葉緑体ゲノムに導入することに成功したので報告する。また前回の本大会で報告した、ascorbate peroxidase (APX)の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ形質転換タバコの自殖後代(T₁世代)を用いた解析結果も合わせて報告する。

本研究ではまず、MDAR 遺伝子をタバコの葉から単離し、葉緑体のプロモーター(*PpsbA*)、ターミネーター(*Trps16*)を連結した後、連結物を葉緑体形質転換用ベクター(pPRV112A')に導入した。次にこのコンストラクトを、パーティクル・ガンを用いて、タバコ(*Nicotiana tabacum* cv. SR I)の葉に打ち込んだ。これまでこのコンストラクトを36回打ち込み、7個のシュートを得た。この7個体について、PCR(図2)及びサザン解析により導入遺伝子の有無を調べたところ、MDAR 遺伝子が葉緑体ゲノムに導入されていたものが2個体あった。これらの形質転換体(T₀世代)は、APX 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ形質転換体と同様、葉に形態異常が観察された。現在、T₀個体を閉鎖温室で育成中であり、今後これらを用いた実験を行う予定である。

また本研究では、APX 遺伝子を葉緑体に持つ形質転換体の T₁ 世代と野生型タバコ SR I を用いて

正逆交雑を行い F₁ 種子を得た。この種子を 500mg/l スペクチノマイシンを含む MS 培地に播種したところ、形質転換体の雌しべに SR I の花粉を受粉させて得た種子は、すべてスペクチノマイシン耐性を示す一方、SR I の雌しべに形質転換体の花粉を受粉させて得た種子は、すべて感受性を示した。このことから、導入した遺伝子が細胞質遺伝することが示された。

現在、他の ROS 代謝酵素である dehydroascorbate reductase (DHAR) や glutathion reductase (GR) の遺伝子、及び複数の遺伝子をつなげた新規オペロンをタバコの葉緑体ゲノムへ導入することを試みており、この実験の経過も合わせて報告したい。



APX: Ascorbate peroxidase
 MDAR: Monodehydroascorbate reductase
 GR: Glutathione reductase
 MDA: Monodehydroascorbate
 GSSG: Oxidized glutathione
 DHAR: Dehydroascorbate reductase
 SOD: Super oxide dismutase
 AsA: Ascorbic acid
 GSH: Glutathione
 DHA: Dehydroascorbate
 ---: Spontaneous

図1: ROS代謝経路

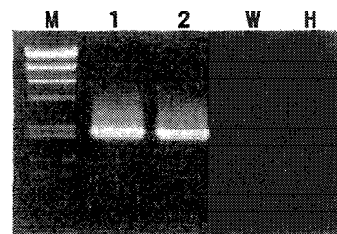


図2: PCRによる導入 *mdar* の増幅

M: Marker (λ /HindIII + ϕ x/HaeIII)

1, 2: MDAR 遺伝子を導入した葉緑体形質転換タバコ

W: Wild type (SR I)

H: H₂O

P075

奈良県在来ツケナ‘マナ’の類縁関係

○北條雅也・浅尾浩史・野村哲郎・山岸博（奈良農総セ，京産大工学部）

Relationship among Tsukena(*Brassica rapa*L.)Cultivars Originated in Nara prefecture

Hojo, M, H. Asao, T. Nomura, H. Yamagishi

【目的】

‘大和マナ’は奈良県在来のアブラナ科の葉菜で古くから県内の比較的広い地域において栽培されてきた。一方、奈良県南部に位置する中山間地域の下北山村においてマナと呼ばれている在来のツケナがあり、その由来や‘大和マナ’との類縁関係は明らかでない。そこで本研究では、葉の外部形態を測定することにより、それらの類縁関係について調査した。

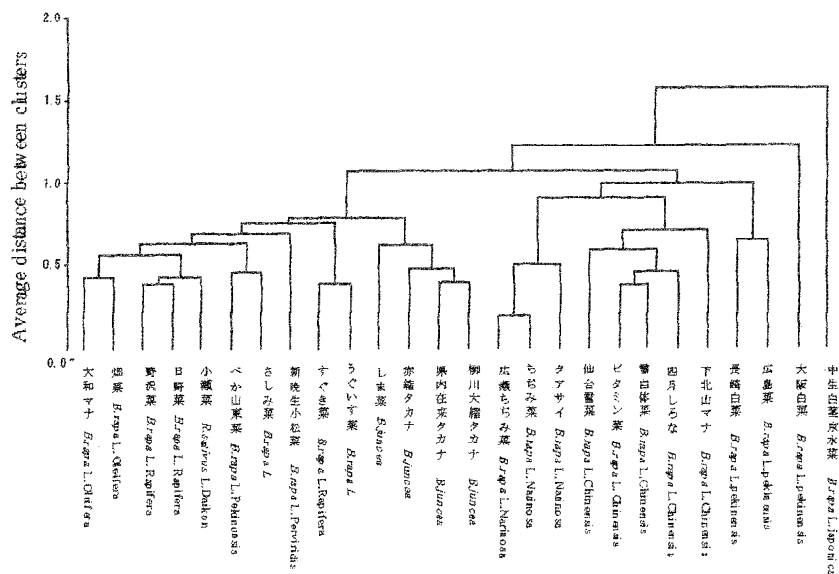
【材料および方法】

B. juncea 4 品種と *R. sativus* 1 品種、県内在来‘マナ’を含む *B. rapa* L. 21 品種の 26 品種を供試材料とした。これらを 2004 年 10 月 8 日に播種し、同年 11 月 5 日に本圃へ定植した。同年 12 月 8 日に、野村ら（2001）の方法によって 1 品種あたり 8 個体について葉の最大葉幅、葉身長、葉の付け根の葉身幅、最大葉幅を起点とした葉の先端長、葉の下部長、葉縁の波状度、葉の切れ込みおよび葉数の 8 項目を測定した。それらの平均値を用いて、UPGMA 法によるクラスター分析を行い、デンドログラムを作成して品種を分類した。また下北山村のマナについては種皮型を清水ら（2000）の簡易識別法に従って調査した。

【結果および考察】

クラスター分析の結果（第 1 図）、供試した 26 品種は 7 つのグループに分別された。*Brassica rapa* L. *Pekinensis* は一つのグループに分別できなかったが、それ以外のグループについては過去の結果と比較的よく一致していた。大和マナは畑菜と同じグループ（*Brassica rapa* L. *Oleifera*）に、下北山村在来のマナは仙台雪菜、四月シロナおよびビタミン菜の *B. rapa* L. *Chinensis* と同じグループに分類された。さらに大和マナの種皮型が A 型であるのに対し（青葉, 1964）、下北山村在来マナの種皮型は B 型であった。

以上のことから、下北山村に在来する‘マナ’は‘大和マナ’とは品種成立過程が異なり、下北山村において独自に品種形成されたことが推察される。



第1図 県内在来ツケナの葉の外部形態の品種間変異に基づく系統樹（UPGMA法）

Yasumoto, K., T. Terachi and H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Distribution of *orf687*, a fertility restorer gene for Ogura male-sterility, in wild radishes.

ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔性は、核ゲノムの稔性回復遺伝子(*Rf*)の働きにより抑制される。これまでの研究から、*Rf* 遺伝子はハマダイコン、*R. raphanistrum* などの野生種、ヨーロッパおよび中国の栽培種に広く分布することが明らかになっている(Yamagishi 1998)。このうち中国の栽培ダイコン品種「園紅」の *Rf* 遺伝子(*orf687*)が単離・同定された(Koizuka *et al.*, 2003)。

この遺伝子産物は PPR タンパク質モチーフを持つこと、稔性回復機能の有無は PPR モチーフ内の特定のアミノ酸残基により決められることが示されている(今井ら 2002)。また、以前に単離した *Rf* 遺伝子を持つハマダイコン「富岡」の 1 個体、ハツカダイコン「Comet」の 1 個体の *orf687* ホモログにおいても、日本の栽培ダイコンの持つ劣性アレル(*rf*)とは、PPR モチーフ内のアミノ酸に違いが見つかる。

そこでこれらのダイコンの持つ *orf687* の起源、および伝播を明らかにする目的で、野生ダイコンにおける *orf687* の塩基配列多型を調査した。材料には PCR でオグラ型雄性不稔遺伝子(*orf138*)を持つことが確認されたハマダイコン 17 集団・131 個体(雄性不稔を示した 2 個体を除き *Rf* 遺伝子を持つと推定される)の全 DNA を用いた。まず、

orf687 の PPR モチーフをコードする領域を全て含むように設計したプライマーで PCR 増幅後、同様に増幅した雄性不稔系統「MS 源助」の *rf* と混合し、ヘテロ二本鎖 DNA を合成した。これにミスマッチを切断するエンドヌクレアーゼを処理することで、塩基配列変異をアガロースゲル電気泳動で検出した。検出された変異体については一部シーケンスを行った。

この結果、120 個体で *orf687* の増幅が認められ、沖縄の「残波岬」の 5 個体に中国ダイコン型の *orf687* が存在した(うち 1 個体は *rf* をヘテロに持つ)。一方で、他の 114 個体は「MS 源助」の持つ *orf687* の *rf* の配列に一致した。また、上記「富岡」1 個体の *Rf* と同一の塩基配列変異を持つ個体は検出されず、これとは別の位置で少なくとも 5 ヶ所のアミノ酸置換を伴う変異体が観察された。さらに現在、交配実験等で稔性回復遺伝子を持つことが明らかになっている野生種 *R. raphanistrum* を用いて同様に解析を進めているが、*orf687* を増幅しない個体が多く認められている。これらのことから、野生ダイコンには *orf687* に加え、これとは別の *Rf* 遺伝子も分布しているものと考えられる。

表. ハマダイコンにおける *orf687* のタイプ

集団	個体数	<i>orf687</i>		<i>orf687</i> のタイプ			備考
		増幅個体数	中国のダイコン(<i>Rf</i>)	日本のダイコン(<i>rf</i>)	その他		
残波岬	5	5	5(1)	(1)	0	()の 1 個体はヘテロ	
西表	1	1	0	1	0		
奈多浜	2	2	0	2	0		
室戸	9	8	0	8	0	2 塩基多型 1 個体	
今宿	2	2	0	2	0		
千歳	12	12	0	12	0	2 塩基多型 2 個体	
城山	8	8	0	8	0		
串木野	14	12	0	12	0	2 個体は雄性不稔	
仁摩	3	3	0	3	0		
温海温泉	14	12	0	12	0		
間島	1	1	0	1	0		
美浜町	5	5	0	5	0		
福江	1	1	0	1	0		
長門	2	2	0	2	0		
表善	15	15	0	15	0		
富岡	27	24	0	23	1	2 塩基多型 2 個体	
岩崎	10	7	0	7	0		
合計	131	120	5(1)	114(1)	1		

121 ○吉見麻衣子・富岡関子・吉田佳言・山岸博・寺地徹(京産大工) オグラ型雄性不稔に対するハツカダイコン稔性回復遺伝子座のゲノム構造と変異. II. PPR メンバー間のリアレンジメント

Yoshimi, M., E. Tomioka, K. Yoshida, H. Yamagishi and T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)
Genome structure and variations of the *Rf* locus for Ogura male-sterility in European cultivars of radish. II. Rearrangement among the PPR members.

細胞質雄性不稔は、植物のミトコンドリアと核の相互作用を研究するモデルとして、とても興味深い現象である。近年、この雄性不稔と稔性回復の研究は分子レベルで急速に進展しており、ここ数年の間にダイコン、イネなど数種の植物で稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) がクローニングされた。その結果、*Rf* 遺伝子は一部の例外を除き、PPR タンパク質をコードすること、また、ゲノム上で他の *ppr* 遺伝子とタンデムに並んでいることが明らかとなった。しかし、この遺伝子の起源や、複雑なゲノム構造を持つに至った原因については未だ不明なことが多い。

ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する *Rf* 遺伝子 (*orf687*, 以下 *ppr-b*) は中国ダイコン「園紅」から初めてクローニングされた。また *ppr-b* のホモログは野生のハマダイコンや栽培ダイコンにも存在することが示されている。我々は以前の研究で、ハツカダイコンの *ppr-b* 遺伝子座に品種間、並びに品種内多型を見出し、「Comet」のゲノム構造の解析から、この遺伝子座の多型性が不等交叉によりもたらされている可能性を指摘した。今回、ハツカダイコンの数品種について、この遺伝子座周辺の構造解析を進めたところ、*ppr-b* 遺伝子自体を持たない個体が存在することを発見したので報告する。

本研究には、ハツカダイコン 5 品種 11 個体、及び *rf* を持つ「打木源助」、「MS 源助」各 1 個体を用いた(表 1)。まず、これらの個体から全 DNA を調製し、この DNA を鋳型に、ダイコンの稔性回復遺伝子座(*ppr-a* ~ *ppr-c*)の各領域を標的とする様々な PCR を行った。その結果、一部の個体からは、ゲノム構造から予測される PCR 断片が増幅しなかった。そこで、ダイコンと *Arabidopsis* とのマイクロシンテニーを利用し、*ppr-c* 遺伝子の上流、あるいは *ppr-a* 遺伝子の下流に保存されていると予想される遺伝子(*Arabidopsis* At1g63720 及び At1g63680 のダイコンのオーソログ)、それぞれについて相補的なプライマーを設計し(図 1)、Long PCR を行った。なお、Long PCR に用いたプライマーペア(A/B)は、この領域に大きな挿入欠失変異がなければ、「園紅」では約 27kb の断片を増幅すると予想される。Long PCR の結果、「De Strasbourg」、

「Icicle」のみから、約 7kb の増幅断片が得られた(図 2)。また、*ppr-a*, *ppr-b*, *ppr-c* の各遺伝子特異的なプライマー(図 1: C~F)と先のプライマー(図 1: A,B)を組み合わせて Long PCR を行ったところ、「Comet」、「MS 源助」、「Long Scarlet」でも増幅断片が得られた(図 2)。

以上の結果より、ハツカダイコンの稔性回復遺伝子座には、遺伝子自体の欠失を含む著しい多型性が存在し、これはタンデムに並ぶ *ppr* 遺伝子間の高い相同性により、実際に不等交叉が生じたためだと考えられた。

表 1. 解析に用いた栽培ダイコン

Species	Cultivar	Num. of plants examined
<i>R. sativus</i>	Comet	2
var. <i>sativus</i>	De Strasbourg	1
	French Breakfast	1
	Icicle	1
	Long Scarlet	6
var. <i>hortensis</i>	MS-Gensuke	1
	Uchiki-Gensuke	1

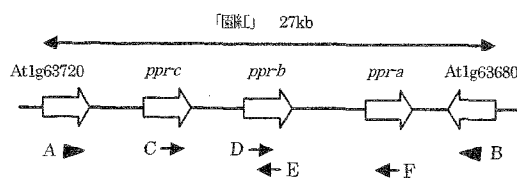


図 1. ダイコンの稔性回復遺伝子座のゲノム構造と Long PCR に用いたプライマー

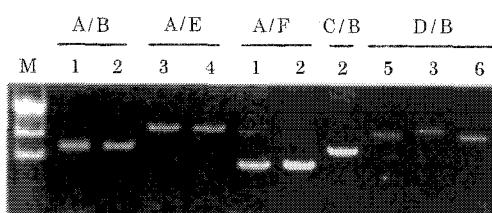


図 2. 稔性回復遺伝子座周辺の Long PCR

(注) パネル上部のアルファベットは用いたプライマーペアを示す(図 1 参照)
M: λ /HindIII 1: Icicle 2-2 2: De Strasbourg 1 3: MS 源助
4: Long Scarlet 2-2 5: Comet 1 6: Long scarlet 5

128 ○堀川明彦¹・川浦香奈子²・荻原保成²・寺地徹¹(1. 京産大工、2. 横浜市大木原生研)コムギ 22K マイクロアレイを用いた *Aegilops mutica* 細胞質置換コムギにおけるミトコンドリアレトログレード制御の解析
 Horikawa, A.¹, K. Kawaura², Y. Ogihara² and T. Terachi¹ (1. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U. 2. Kihara Inst. Biol. Res. & Grad. Sch. Integ. Sci., Yokohama City U.) Study on the mitochondrial retrograde regulation of alloplasmic wheats with *Aegilops mutica* cytoplasm using wheat 22K oligo-DNA microarray.

高等植物が正常に生育するためには、核、葉緑体、ミトコンドリアの3つのゲノム間の調和の取れた発現制御が必須である。現在、核ゲノムから葉緑体やミトコンドリアゲノム(オルガネラゲノム)への遺伝子発現、情報伝達の制御に関しては、様々な研究が行われている。一方、オルガネラゲノムから核ゲノムへの遺伝子発現制御(レトログレード制御)に関しては十分に理解されておらず、例えばオルガネラゲノムを取り巻く環境に何らかの変化や障害が起きたとき、核遺伝子の発現はどのような影響を受けるのか、興味を持たれる。

このレトログレード制御を理解するための植物材料として、我々は細胞質置換コムギに着目した。我々が実験材料として用いている細胞質置換コムギは、コムギ近縁野生種 *Aegilops mutica* の細胞質をパンコムギ品種 Chinese Spring (C52 系統) に導入したものであり、*Ae. mutica* の細胞質型の違いにより出穂遅延及び雄性不稔を示す2系統(C13及びC14系統)が存在する。2系統間でのオルガネラゲノムの違いはミトコンドリアのみ見出されることから、表現型の変化に関わる原因遺伝子の存在が示唆されるが、未だ特定されていない。さらにはこのミトコンドリア原因遺伝子により発現の影響を受けると予想される核遺伝子に関しても全く調査されていない。そこで今回、コムギ 22K マイクロアレイを用いて、*Ae. mutica* 細胞質置換系統にみられる核遺伝子の発現変動、すなわちミトコンドリアレトログレード制御の解析を試みたので報告する。

穂孕み期～出穂期に当たる各系統の穂から total RNA を抽出し、Cy5、Cy3 ラベルした cRNA をカスタムアレイコムギ 22K マイクロアレイ (Agilent Tech.) に競合的ハイブリダイゼーションを行った。Agilent Tech. Microarray Scanner を用いてスキャンを行い、変動した遺伝子リストの作成を行った。マイクロアレイの操作は北海道システムサイエンスに委託して行った。

解析結果のスクアッタープロットを図1に示す。C52 系統と比較して、C13 系統で発現量 (fold change) が5倍以上上昇した遺伝子は38個、低下した遺伝子は38個

であった。また C14 系統で発現量が5倍以上上昇した遺伝子は148個、低下した遺伝子は73個となり、特に RAFTIN などに代表される、葯発達に必須な遺伝子の発現量が著しく低下していることがわかった。さらに C14 系統では C13 系統よりも脂質代謝、二次代謝関連遺伝子など数多くの遺伝子で発現量に大きな差が認められ、ストレスタンパク質遺伝子なども多く含まれていた。また C13、C14 両系統で発現量が上がった遺伝子の中に、ミトコンドリアゲノムにコードされている *matR* 遺伝子が含まれていたことも非常に興味深い(図2)。本講演ではこれらの結果を述べる。

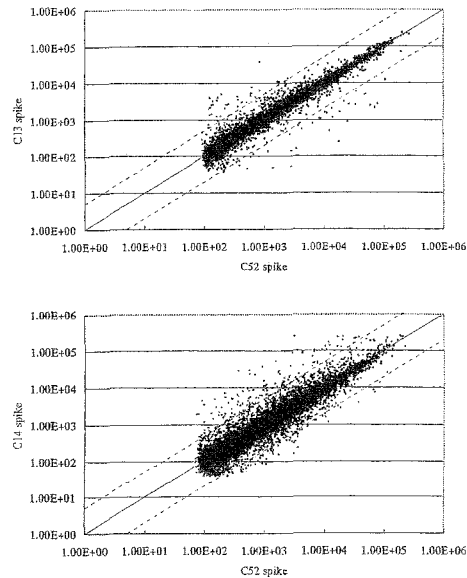


図1. スクアッタープロットによる遺伝子発現量の比較。上は C52 と C13、下は C52 と C14 系統間での比較を、点線は相対発現量の差が5倍のラインを示す。

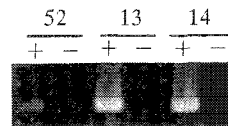


図2. *matR* 遺伝子をターゲットとした RT-PCR
 52: C52, 13: C13, 14: C14, +: RT+, -: RT-

330 ○林清音¹, 辻村真衣², 寺地徹¹ (1. 京産大工, 2. 奈良先端大バイオ) アスコルビン酸パーオキシダーゼ遺伝子 (*apx*) を葉緑体を持つ組換えタバコの作出と特徴づけ

Hayashi, S.¹, M. Tsujimura², T. Terachi¹ (1. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2. NAIST, Biosci.)
Production and characterization of the transplastomic tobacco plant containing ascorbate peroxidase gene (*apx*)

植物は生活環の中で、乾燥・強光・紫外線といった環境要因、また、除草剤・大気汚染・化学物質といった人為的要因によりストレスを受ける。これら様々なストレスを受けると、植物体内には強い酸化作用を持った活性酸素分子種 (ROS) が生じる。ROS は酸素が通常より強い酸化作用を持った状態にある分子のことをいい、植物体内でタンパク質や脂質などの生体物質と反応し細胞に損傷を与える。その結果、ROS は植物に対し成長の抑制や光合成の阻害、葉の脱落や組織の壊死といった障害を引き起こす。一方、植物はこれら ROS を除去するための代謝経路を保持しており、ここではいくつかの酵素が ROS を段階的に還元して無毒化する。

本研究は、これら ROS 消去系酵素の遺伝子を葉緑体で過剰発現させることにより、ストレス耐性が強化された植物を作出することを目的とする。今回、ROS 消去系酵素の一つであるアスコルビン酸パーオキシダーゼ遺伝子 (*apx*) をタバコ葉緑体ゲノムに導入することに成功した。また、その組換え体の後代 (T₁ 世代) を得て、いくつかの解析を行ったので結果を報告したい。

実験はまずタバコからストロマ型 *apx* の cDNA を単離した後、この断片に葉緑体で働くプロモーターとターミネーターを付加した。次にこれを葉緑体形質転換用ベクター (pPRV112A') に導入し、図 1 に示すコンストラクトを作製した。パーティクルボンバードメント法を用いて、この DNA をタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SR I) の葉に導

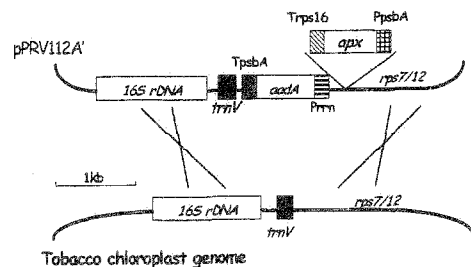


図 1: pPRV112A'コンストラクト

入した。これまで、パーティクルガンで 90 回タバコの葉に DNA を打ち込み、10 個のシュートを得た。このうち 9 個体から DNA を抽出し、PCR により *apx* の有無を調べたところ、2 個体について、*apx* が葉緑体ゲノムに正しく組込まれていることが確認された (図 2)。さらにこの 2 個体から RNA を抽出し、導入した *apx* に特異的なプライマーペアで RT-PCR を行った結果、導入 *apx* が転写されていることが確認された (図 3)。この 2 個体 (T₀ 世代) から採種した種子を、それぞれスペクチノマイシン 500mg/l を含む MS 培地に蒔いたところ、1 個体からはスペクチノマイシンに耐性を示すものと、示さないものが分離し、他の個体からは、耐性を示すものだけが得られた。このことは両者で組換え型葉緑体ゲノムの割合が異なることを示唆する。現在、これら耐性を示した T₁ 世代を用いて、ストレス耐性の変化を調べている。

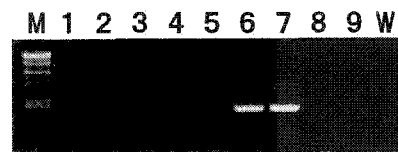


図 2: PCR による導入 *apx* の増幅

M: Marker (λ /Hind III)

1~9: スペクチノマイシン耐性を示した 9 個体

W: Wild type (SR I)

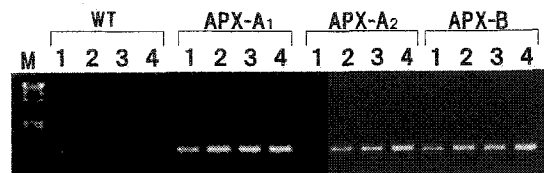


図 3: 導入 *apx* 特異的な Primer を用いた RT-PCR

M: Marker (λ /Hind III + ϕ x/Hae III)

WT: Wild type (SR I)

APX-A₁, A₂: 図 2 の No.6 の個体 (A₂ は A₁ を切り分けた個体)

APX-B: 図 2 の No.7 の個体

1~4 は PCR のサイクル数を示す (1: 20, 2: 23, 3: 26, 4: 30)

色素体の遺伝子組換えは、導入遺伝子産物の高発現が期待できる、花粉を介した遺伝子の拡散が抑えられるなど、核の形質転換技術と比べ多くの利点を持つ。しかし色素体の遺伝子組換えは、その対象がタバコなど、いくつかの植物種に限定されるという問題がある。

そこで本研究は、太く、食用に適した根を持つニンジンの特性を活かし、根の色素体で有用な遺伝子を多量発現させることを目的に、ニンジンにおける色素体の形質転換系の確立をめざした。今回はその第一歩として、ニンジンから色素体のプロモーターやターミネーター領域、相同組換えに用いる flanking 配列などを単離し、タバコなど他植物との配列比較により、その汎用性を検討した。また、色素体形質転換のホストに適した品種や、その培養条件、培地などの考察も行なったので、その結果も合わせて報告する。

実験の材料には、西洋系ニンジンの品種「時無五寸」、東洋系ニンジンの品種「本紅金時」を用いた。まず、それぞれの葉から全 DNA を単離し、*atpB/E* から *rbcl* を経て *accD* にいたる領域を、タバコの配列から推定したプライマーペアで PCR 増幅した。次に増幅 DNA 断片をクローニングした後、得られたクローンの全長 DNA の塩基配列 (3122bp) を決定し、そこに含まれる *rbcl* のプロモーター領域とターミネーター領域をシロイヌナズナ、タバコ、オタネニンジン (*Panax schinseng* Nees) のものと比較した (図1)。

その結果、「時無五寸」、「金時」両ニンジンのプロモーター領域は完全に保存されており、-10、-35 配列などの必須配列は、タバコのものと同じ相同性を示すことがわかった (図1)。一方、ニンジンの *rbcl* のターミネーターを含む *accD* までの遺伝子間領域は保存性が低く、例えばタバコと比較した場合、529bp 中に 18ヶ所の

欠失と1ヶ所の挿入が見られた。ただし、この領域でも、ターミネーターとして働く *rbcl* 下流の stem-loop 構造は両種でよく保存されていた (データ未掲載)。

以上の結果、ならびに flanking 配列についての予備的な結果から、ニンジンの色素体形質転換ベクターのプロモーターとターミネーターには、既存のタバコ用ベクターのものを使用できるが、flanking 配列にはニンジンから単離した配列を使うのが好ましいことが示唆された。なお、遺伝子を導入する位置としては *16srRNA* と *rps7/12* の間の領域を考えており、すでにニンジンからその領域を単離している。現在、この結果を基にニンジン色素体形質転換用ベクターを作成している。

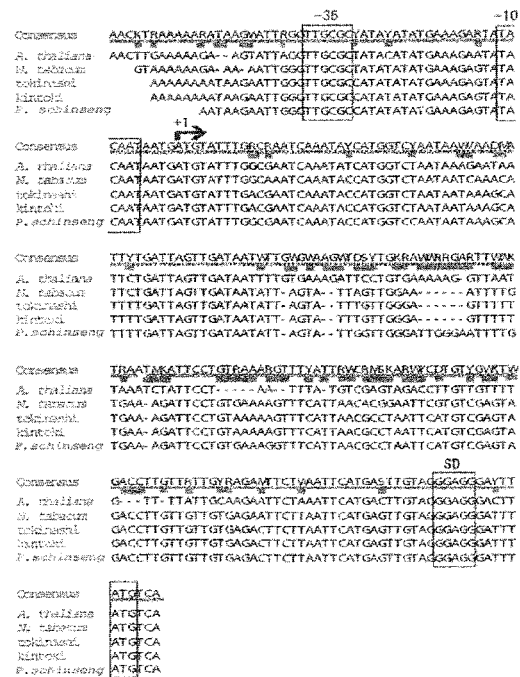


図1. *rbcl* のプロモーター領域の比較
□で囲った部分は、-35配列、-10配列、Shine-Dalgarno配列 (SD)、開始コドン (ATG) を示す。矢印は転写開始点を示す。

我々は今までに *Raphanus* 属の栽培・野生植物における細胞質の分化を解析し、それに基づいて栽培種の起源ならびに日本のダイコンの起源と品種分化を明らかにすることを目的として、葉緑体の塩基配列変異を解析してきた。その結果、栽培種、野生種のいずれにおいても、葉緑体の *trnL* から *psbG* に至る領域の塩基配列に、種内変異が存在することが明らかになった。現在までのところ、この領域の塩基配列には *Raphanus* 属内に 8 タイプが存在することが観察されているが、そのうち 3 タイプは野生種、栽培種に共通して存在していた。その一方で、4 タイプは野生種の *R. raphanistrum* に、また 1 タイプは栽培ダイコンの特定の品種群に、それぞれ特異的に見出された。栽培ダイコンで見出された 4 タイプのうち、日本の品種には主として 2 つのタイプが観察される。そこでこれらのうち一方のタイプが特異的に有している塩基置換を指標として、日本の栽培ダイコンにおける葉緑体ゲノムの品種間・品種内変異を解析した。

栽培・野生ダイコンに存在する 8 タイプのうち、‘青首宮重総太’を初めとする栽培品種を含むタイプは、*trnF* と *ndhJ* の遺伝子間領域に、他の 7 タイプとは異なる塩基 (A/C) を特異的に有している。そこで、この塩基置換を利用して、*EcoRI* 処理により RFLP を生ずるようにプライマーを設計した (図-1)。このプライマーを用いた PCR と、PCR 産物の *EcoRI* 処理により、このタイプに特異的な SNP を検出した。我国の栽培ダイコンを広く用い、各個体の幼苗から DNA を単離し、PCR-RFLP に供した。得られた結果から、各品種における葉緑体ゲノムのタイプを明らかにするとともに、品種内における同ゲノムの分化の有無を調査した。

PCR と *EcoRI* 処理の結果、調査個体間で、DNA 断片の約 20bp のサイズの差が検出され、図-1

に示したタイプ 7 に特異的な SNP が PCR-RFLP として識別できることが明らかになった (図-2)。調査した供試品種の多くは、品種内の全個体が同一のタイプで固定していた。すなわち、‘青首宮重総太’、‘二年子’などの品種は *EcoRI* で切断されるタイプに固定し、‘辛味’などは切断されないタイプに固定していた。このような葉緑体ゲノムの品種間分化は、我々がすでに明らかにしてきたミトコンドリアゲノムにおけるそれと一致した。これに対して、‘西町理想’、‘三浦’など一部の品種においては、品種内の複数の個体が、他とは異なるタイプを示した (図-2)。

このような二つのタイプの存在は、種子の機会的な混入によるものとは考えにくい。むしろ、異なるタイプの細胞質を持つ品種の間での交雑の結果としてこれらの品種が成立し、その痕跡が現在でも観察されているのではないかと考えられる。このような 2 タイプ間の交雑が我国の栽培ダイコンの多様性をもたらした 1 つの要因であろう。

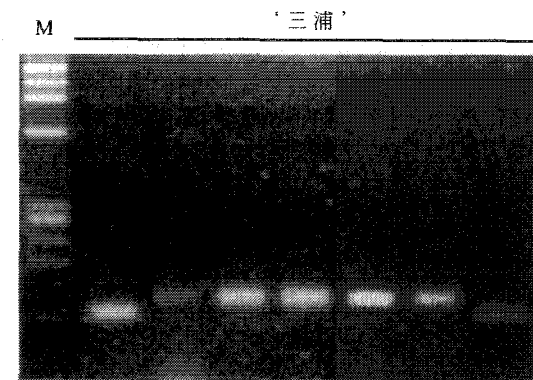


図-2 ダイコン品種‘三浦’における葉緑体の *trnF/ndhJ* 間の品種内 SNP

(M:分子量マーカー (ϕ X174-*Hae*III))



図-1 葉緑体の *trnF/ndhJ* 間の塩基配列変異と、それを *EcoRI* 処理によって検出するためのプライマー

‘桜島ダイコン’や‘守口ダイコン’の例に代表されるように、日本のダイコンは形態的にも農業生態的にも非常に大きい品種分化を示している。この品種分化の大きさは、遺伝・育種学的視点から世界的に注目されてきた。その一方で、我国を含めた東アジア地域には、‘ハマダイコン’と総称される野生ダイコンが自生し、野生種 *R. raphanistrum*、栽培ダイコンのいずれとも異なる特性を示している。演者らは、このような我国の栽培ダイコンおよびハマダイコンの起源を推定するとともに、それらにおける品種、系統分化の要因を明らかにすることを目的として、ミトコンドリアならびに葉緑体ゲノムにおける変異を解析してきた。

演者らの解析はまず、Makaroff&Palmer (1988) および Bonhomme *et al.* (1992)によって明らかにされた、ミトコンドリアゲノムにおいてオグラ型雄性不稔細胞質と正常型細胞質の間で構造変異が存在する領域 (*atpA*, *atp6*, *cox I* および *orfB* の各遺伝子ならびにそれらの周辺領域) について進められた。その後それとともに、葉緑体ゲノムにおける塩基配列の種間・種内変異の解析も行われた。解析は当初 *trnL* と *trnF* の遺伝子内、遺伝子間領域について始められ、次第に領域を広げて、現在までのところ *trnL* から *psbG* に至る約 2kbp の範囲にわたっている。また供試材料についても、野生種を中心として多数系統・品種に達した。

調査の結果、栽培、野生ダイコンのいずれにおいても、単にオグラ型と正常型の細胞質の分化だけでなく、‘正常型’とされる細胞質の中に多様な分化が存在することが明らかになった。分化の大きさは、調査した領域と調査方法によって異なり、ミトコンドリア *cox I* の 5'領域と *atp6* の 3'領域においては、PCR によってそれぞれ、3タイプおよび6タイプの構造変異が見出されたのに対して、ミトコンドリアの *orfB* 領域で決定した約 1kbp の塩基配列には、3タイプへの分化が観察されただけに留まった。また葉緑体においては、特に遺伝子間領域に高い塩基配

列変異が観察され、それらの組合せから *R. raphanistrum* の細胞質は7タイプに、また栽培種の細胞質は4タイプに分類された。このように、検出されるタイプの数には領域間で差があるものの、各タイプに分類される品種・系統は、調査領域間でほぼ対応しており、ミトコンドリアと葉緑体の間およびミトコンドリアの領域間で、平行した分化が起こっているものと考えられた。

我国に自生するハマダイコンは、いずれの領域の解析によっても、著しく高い集団内多型性を示した。この細胞質の多型性は野生種には見られるものの、栽培ダイコンの品種内では、一部の例外を除いてほとんど観察されなかった。このことから、ハマダイコンの細胞質は野生種 (*R. raphanistrum*) に由来するものであることが示された。

日本の栽培ダイコンの品種は、いずれの領域の解析によっても、大きく2つのタイプに分類された。その一方は、中国北部および朝鮮半島の品種と同一のタイプであるのに対して、もう一方は、中国南部のダイコンに見出されると同時にハツカダイコンにも見られるタイプである。我国のダイコンには更に、調査領域のいずれかにおいて、上記の2タイプとは異なる特徴を示す品種が少数ながら存在した。

これらの観察結果に基づき、日本の栽培ダイコンの起源を推定すると以下の1、2の主要な経路と、それらとは異なる3、4の経路などが考えられる。

1. 中国北部および朝鮮半島よりの導入品種。
2. これとは異なる中国南部からの導入品種。
3. ハマダイコンの栽培化 (‘小瀬菜’ (宮城)、‘佐波賀’ (京都)、‘農試1号’ (沖縄) など)。
4. シベリアを経由したヨーロッパのダイコンの伝来 (‘黒ダイコン’ (ただし現在は絶滅))。

なお、上記のうち2のルートによると推定される品種は、更にいくつかの細胞質のタイプへの分類が可能である。この点を含め、今後栽培ダイコンの品種分化を更に詳しく調査したい。

学会賞1

山岸 博 (京都産大工) ダイコン属植物の系統分化に関する遺伝・育種学的研究

Yamagishi, H. (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Studies on phylogeny of cultivated and wild *Raphanus* plants.

ダイコンは古くから日本人の食生活上重要な位置を占めてきた。これを反映して、日本各地に独特の在来品種が発達し、その多様性は世界的な瞳目を集めるとともに、全国的には生態的特性の異なる品種と栽培技術の組合せによる周年供給が確立している。一方、我国で発見された雄性不稔細胞質(オグラ型細胞質)は、ダイコンのみならず *Brassica* 属作物にも導入され、世界のアブラナ科作物の F_1 育種に大きく貢献している。

このようにダイコンは遺伝・育種学的見地から極めて興味深い作物であるものの、その系統分化に関しては、解析の有効な切口が見出せないまま、近年までほとんど研究の進展が見られなかった。こうした中で、オグラ型細胞質の起源と分布を解明することを糸口として、主として *Raphanus* 属の野生、栽培植物におけるミトコンドリアゲノムの分化を解析することにより、ハマダイコンの起源、野生種からの栽培化の起源ならびに我国のダイコンの遺伝的成立などダイコン属の系統分化に関する一連の研究を進めた。その結果、これら諸課題に関する解答の輪郭が明らかになってきた。

1. オグラ型細胞質の起源と分布

鹿児島県で発見されたオグラ型雄性不稔細胞質は、時を置かずヨーロッパに導入され、ダイコンの F_1 育種に利用されるとともに、属間交雑によって *Brassica* 属作物に導入された。その際に生じた様々な問題がねばり強い研究によって克服され、ナタネなどで効果的な F_1 採種体系が確立された。また実用化に向けた研究の過程で、雄性不稔の原因遺伝子 *orf138* とそれに対する稔性回復遺伝子が単離されるという分子遺伝学的な成果も生まれた。しかし、この細胞質の根本的な起源と分布は不明のままであった。そこでミトコンドリアの *orf138* 遺伝子の分布を調査した結果、オグラ型細胞質は栽培ダイコンではごく一部の品種を除いてほとんど存在しないのに対して、日本を含めた東アジアに自生する野生ダイコン(「ハマダイコン」と総称

される)には、平均40%以上の高い割合で分布していることが明らかになった。ハマダイコン自体の集団には雄性不稔性を示す個体はまれにしか見られないが、ハマダイコンを母本として栽培ダイコンと交雑することにより、実際に雄性不稔個体が分離した。このことから、オグラ型雄性不稔性は、ハマダイコンと栽培ダイコンの自然交雑集団で発現し、発見されたものと推定した。

ではこの細胞質はハマダイコンにどのように伝達されたのだろうか?解析の範囲を広げた結果、*orf138* は *Raphanus* 属野生種(*R. raphanistrum* など)に存在する反面で、他のアブラナ科植物には認められないこと、および野生種と栽培種との交雑によっても雄性不稔個体が発現することが確認された。一方この遺伝子の塩基配列を多数個体について詳細に調査し、ハマダイコンの *orf138* には8タイプの多型が存在すること、そのうち祖先型と考えられるタイプが *R. raphanistrum* にも主要なタイプとして存在することを見出した。これらの結果は、オグラ型細胞質が *Raphanus* 属野生種において分化・成立し、それがハマダイコンに伝えられ、ハマダイコンの中で塩基配列変異が蓄積されたことを示している。

このような雄性不稔遺伝子の分布と変異に関する調査の一方で、これに対する稔性回復遺伝子の有無を、大規模な交配実験によって明らかにした。その結果によると、稔性回復遺伝子は、*R. raphanistrum* およびハマダイコンには、個体の細胞質のタイプに関係なく広く分布している。また、栽培ダイコンにおいてはハツカダイコンならびに中国ダイコンで稔性回復遺伝子を持つ品種が高頻度で認められるのに対して、日本のダイコンにはこの遺伝子がほとんどないという対照性が存在する。近年、中国ダイコンの稔性回復遺伝子が単離・同定されたが、我々はさらに *R. raphanistrum*、ハマダイコンおよびハツカダイコンの稔性回復遺伝子の構造と機能について研究を進めている。

ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子と、これに対する稔性回復遺伝子が *Raphanus* 属の野生種においてどのように生じたのか。雄性不稔遺伝子の頻度がハマダイコンで特異的に高いのはなぜか。さらに栽培ダイコンにおける稔性回復遺伝子の保有割合が日・中・欧のダイコンの種類によって異なるのはなぜか。これらは興味ある課題である。

2. ハマダイコンの起源と変異

オグラ型細胞質と稔性回復遺伝子の分布に関するハマダイコンと我国の栽培ダイコンの間の顕著な差の発見は、ハマダイコンの起源を解明する契機となった。従来ハマダイコンの起源については、我国の栽培ダイコンが脱出野生化したものとする説と、野生種に由来するとする説が提示され、長年にわたって不明確なままであった。上述のように我国の栽培ダイコンの圧倒的多数は正常型の細胞質を持ち、かつ稔性回復遺伝子を持たないため、これらが脱出して、ハマダイコンの半数近くを占めるオグラ型細胞質の個体になることはできない。つまりハマダイコンのオグラ型細胞質の由来は *R. raphanistrum* に求めるしかない。

一方、*orf138* に隣接して *orfB* という遺伝子がある。この遺伝子領域の塩基配列では、オグラ型を含めて3つのタイプへの分化が見出された。この塩基配列変異にもとづき RFLP 解析を行った結果、栽培品種の細胞質は大半の場合、特定のタイプに固定しているのに対して、ハマダイコンにおいては1つの集団で3つのハプロタイプが観察される著しい集団内多型が一般に存在することが明らかになった。これらの観察結果は、ハマダイコンは正常型、オグラ型を問わず栽培ダイコンが脱出野生化したものではなく、ユーラシア大陸で分布を広げた *R. raphanistrum* の細胞質を受けついだものであることを明示することとなった。

3. 栽培ダイコンの起源と日本のダイコンの成立

Raphanus 属の野生、栽培植物の系統分化をさらに詳しく明らかにするために、ミトコンドリアゲノム上の調査領域を他の遺伝子に広げたのに加えて、葉緑体ゲノムの解析を進めた。それらの結果、最近まで「正常型」とひとくくりにされていたダ

イコンの細胞質に多様な分化が内包されていることが明らかになった。たとえば、ミトコンドリアの *cox I* 遺伝子の構造解析によつては、野生種内にオグラ型を含めて5種類のタイプが見出され、それらすべてが栽培種にも存在した。また葉緑体の遺伝子間領域における塩基配列変異の解析によつて、今までに野生種内に8個以上のハプロタイプが存在し、しかもその一部が栽培種に共通して存在することが明らかになっている。さらに栽培種は、ダイコンの種類により特定のタイプに分かれること、日本のダイコンには主として2つのタイプの細胞質が存在することが明らかになった。

これらの事実は、ダイコンの栽培化が、いくつかの地域で異なる細胞質の野生種から多能的に起こったことを示している。また我国のダイコンが基本的に二元性を有することを示している。しかし、日本のダイコンの一部には主要なタイプ以外の細胞質を持つ品種や、ハマダイコンと同様の品種内多型を示す在来品種も存在する。

ダイコン属植物の分布域からは東の端に位置する日本においては、大陸から主として2つのルートで栽培ダイコンが受け入れられた。だがそれだけでなく、それらの間の交雑、他のルートからの導入、ハマダイコンの栽培化などによって独特の品種が新たに創出された。これらのことが育種上の原動力となって、世界的に貴重な芸術的ともいえるダイコンの多様性が花開いたのではないか。ダイコンと人間との間で培われてきた歴史的関係をさらに学ぶことは、作物育種の将来を考える上で意義深いものと考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、京都産業大学の米澤勝衛、寺地 徹、野村哲郎の各教授には、あらゆる面から多大なサポートをいただいた。また実際の実験においては、献身的に働いていただいた実験補助員の方々の助力、ならびに山岸、寺地両特研（通称 31 研）の学生、院生諸君の明るさに日々励まされた。本研究で用いた栽培、野生ダイコンには内外の研究機関、個人より快く分譲いただいたものが多く含まれる。これらの方々には心より感謝申し上げる。

近年、高等植物の各種でミトコンドリアゲノムの全塩基配列が相次いで決定され、そのユニークな特徴が徐々に明らかにされつつある。例えば、植物の種間でゲノムのサイズや構造が大きく異なることは以前より知られていたが、ゲノム解析が進んだ結果、その種に固有の塩基配列がミトコンドリアゲノムの大部分を占めることが明らかになった。

植物ミトコンドリアゲノムにみられる多様性の原因として、ゲノム上に散在する繰返し配列により頻繁にゲノムの再編成が引き起こされること、遺伝子を含む DNA 断片の核・葉緑体ゲノムへの移行が種特異的に生じることなどが挙げられる。この多様性を研究することは、ミトコンドリアゲノムの構造変化と個々の遺伝子の発現との関連、またゲノムの進化の動態を明らかにするうえで、貴重な情報を提供するものと思われる。

我々はこれまでに、コムギ近縁野生種 *Aegilops mutica* の細胞質をパンコムギの 1 品種 Chinese Spring に導入した細胞質置換コムギを研究材料として、パンコムギに出穂遅延及び細胞質雄性不稔性を与える *Ae. mutica* ミトコンドリアゲノムの原因遺伝子の探索を行ってきた。10 種類の遺伝子プローブによるサザン解析の結果、*atp1*、*cox1*、*rnl18+5* の 3 領域に遺伝子のコピー数の違いを伴う顕著な構造変異が認められ、これらの領域に *Ae. mutica* の系統特異的なキメラ遺伝子の存在が明らかになっている (育種学研究 6 別 2, 119 他)。

一方、昨年、パンコムギのミトコンドリアゲノムの全塩基配列が決定され、この情報を基にパンコムギと *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムの構造変異をより詳細に解析することが可能となった (Ogihara et al., 2005)。両種のミトコンドリアゲノムの比較は、パンコムギに表現型の変化をもたらす *Ae. mutica* 原因遺伝子の特定に有用であるのに加えて、植物ミトコンドリアゲノムの進化的な考察に役立つ。そこで本研究では、パンコムギのミトコンドリアゲノムに存在する遺伝子のほぼすべてを網羅した、新たなプローブによるサザン解析により、パンコムギと *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムの構造をより広範囲に比較したので、その結果を報告する。

28 種の遺伝子プローブを用いたサザン解析を行ったところ、16 種類の遺伝子プローブがパンコムギと *Ae. mutica* で同じパターンを示し、両種間で共通の構造を持つ領域がゲノムに散在することがわかった。一方、*rps4* 遺伝子領域など、遺伝子の比較

的近傍に RFLP が観察される場合もあった (図 1)。また、今回のゲノムワイドな比較の結果、大きな構造変異は前述の *atp1*、*cox1*、*rnl18+5* 遺伝子の 3 領域に限られることも確認された。

パンコムギと *Ae. mutica* で同じパターンを示した遺伝子領域を、パンコムギのミトコンドリアゲノムの *EcoRI*、*HindIII* 制限地図上に示すと、両種に共通な遺伝子領域の合計は約 90 kbp となった (一部を図 2 に示す)。このことはパンコムギのミトコンドリアゲノム (全長約 450kb) のうち、最低でも約 20% は、*Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムとほぼ同一の構造であることを示している。現在、Long PCR により、この共通領域がどの程度延長できるか調査している。今後、両種のミトコンドリアゲノムの構造変異が生じた原因を塩基配列レベルで明らかにしていきたい。

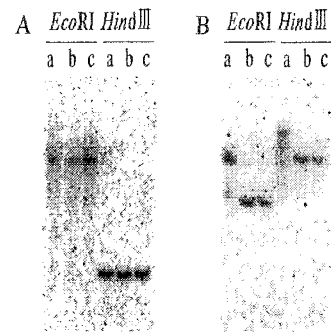


図 1. *rps1* (A)、*rps4* (B) 遺伝子プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション

a: Chinese Spring; b: *Ae. mutica* (出穂遅延系統)
c: *Ae. mutica* (細胞質雄性不稔系統)

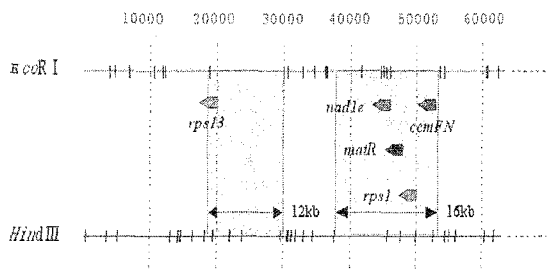


図 2. パンコムギミトコンドリアゲノムの物理地図
網掛けはパンコムギと *Ae. mutica* に共通な遺伝子領域を示す

118 ○吉見麻衣子、田口孝、吉田佳音、瀬野未也子、安本景太、山岸博、寺地徹(京産大工) オグラ型雄性不稔に対するハツカダイコンの稔性回復遺伝子座のゲノム構造と変異

Yoshimi, M., T. Taguchi, K. Yoshida, M. Seno, K. Yasumoto, H. Yamagishi and T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Genome structure and variations of the Rf locus in European radish cultivars.

近年、ダイコン、イネなど数種植物で、細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子(Rf遺伝子)がクローニングされている。その結果、Rf遺伝子は、一部例外を除き PPR モチーフを有するタンパク質をコードすること、またこの遺伝子は同じファミリーの他の遺伝子や偽遺伝子とともにゲノム上でタンデムリピートを構成していることが明らかになっている。しかしながらこの遺伝子が、それぞれの植物種で、いつどのような過程を経て成立したのか、またなぜこのような複雑なゲノム構造を持つに至ったのかについては未だ不明なことが多い。

ダイコンではオグラ型細胞質による雄性不稔が有名であるが、これに対する稔性回復遺伝子は、PPRタンパクをコードする *orf687* (以下 *ppr-b*) であることが中国ダイコンの「園紅」を用いた実験により証明されている。また実際に稔性回復機能を持つものは、ハマダイコン、ハツカダイコン及び中国ダイコン(一部)由来のものに限られるとはいえ、*ppr-b* のホモログは日本の栽培ダイコンを含む全てのダイコンに存在することもわかっている。我々は以前の研究で、ハツカダイコンの *ppr-b* に大きな変異が内包される可能性を報告し、品種間、ときには品種内で多型が認められることを示した。今回、ハツカダイコンにおける稔性回復遺伝子の進化の全体像を明らかにするため、*ppr-b* が座するゲノム領域の構造を明らかにし、同遺伝子の多型をより多くの品種について調査したので、その結果を報告する。

本研究ではまず、ハツカダイコンの1品種 Comet の Rf 遺伝子座の構造を以下の方法で決定した。すなわち λ FixII ベクターを用いて作製した Comet のゲノムライブラリーを *ppr-b* プロンプでスクリーニングし、5つのファージクローンを得た。そのうち2つについてインサート全長をプラスミドベクターへサブクローニングし、1クローンはサブクローニングとプライマーwalking の併用により、もう1つはショットガン法により、それぞれ塩基配列を決めた。また以前報告した、*ppr-b* 下流の塩基配列データ(PCR産物のクローニングによる)も解析に加えた。その結果、約19.2kbにわたる Comet のゲノム領域の構造が明らかになり、1) *ppr-b* の上流には少な

くとも2つ(*ppr-d*, *ppr-c*)、下流には1つ(*ppr-a*)の相同遺伝子がいずれもタンデムに位置していること、2) 園紅(*ppr-a*, *b*, *c*のみを持つ)のゲノム配列との比較では、遺伝子ごとの高い相同性とは対照的に、遺伝子間領域の相同性は極めて低いことが示された。

次に本研究では、Comet以外のハツカダイコン9品種42個体から全DNAを調製し、これを鋳型として *ppr-b* の近傍、ならびに内部配列をもとに設計した多数のプライマーペアを用いてPCRを行い、得られた増幅断片の塩基配列をダイレクト法、あるいはクローニングにより決定した。その結果、ハツカダイコンの *ppr-b* には大きくI) Comet型、II) Comet型の内部に128bpのフレームシフトを伴う欠失を持つ型、III) 打木源助をはじめとする日本の栽培ダイコンと同じ型の、少なくとも3種類のアリルが存在することがわかった。なお、一部の個体について、上記プライマーの特定の組合わせでPCR産物が全く得られない場合があった。現在、これらの個体の *ppr-b* 遺伝子座の構造を解析している。

表. 解析に用いた栽培ダイコン

Species	Cultivar	Num. of plants examined	Type of <i>ppr-b</i>
<i>R. sativus</i>	Akamaru-EE	3(0)	—
<i>var. sativus</i>	Round Scarlet	1(1)	III
	Ashkhabad	1(1)	I
	Comet	4(0)	—
	De Strasburg	2(1)	III
	DOR HATIF	13(1)	III
	French Breakfast	4(0)	—
	Icicle	10(5)	I, II, III
	Long Scarlet	3(2)	I
	Red Prince	2(1)	III
<i>var. hortensis</i>	MS-Gensuke	1(1)	III

注) () 内の数は *ppr-b* の塩基配列を決定した個体数を示す。

Yang S. J., T. Terachi and H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Gene expression regulating flavonoid biosynthesis is involved in Ogura cytoplasmic male-sterility of *Raphanus sativus*.

ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔は、ミトコンドリアに存在する原因遺伝子 *orf138* と核遺伝子との相互作用によって引き起こされる。我々はオグラ型細胞質雄性不稔の発生メカニズムを解明する目的で、オグラ型細胞質を持つ 'MS 源助' と正常型細胞質を持つ '打木源助' (MS源助の維持系統) との間で発現に差のある遺伝子をマイクロアレイ解析によってスクリーニングした(梁ら, 2005)。これらの候補遺伝子群は、'MS 源助' で形態的な異常が初めて現れる四分子期以前(つぼみの長さ<2mm)のつぼみの遺伝子発現を比較したものであり、'MS 源助' と '打木源助' におけるそれら遺伝子の発現量に有意な差が認められたことから、オグラ型雄性不稔性の発現に関わる遺伝子である可能性が高い。その中にフラボノイド代謝に関わる遺伝子が多く含まれていたこと、そしてオグラ型細胞質を持つダイコンにおいて小胞子の着色が見られぬ形態的特徴に注目し、フラボノイド代謝とオグラ型細胞質雄性不稔との関係を明らかにしようとした。

フラボノイド合成系の酵素をコードする遺伝子群をアラビドプシス遺伝子の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いて、ダイコン '打木源助' で単離した。これらの遺伝子配列からプライマーを設計し、'MS 源助' と '打木源助' のcDNAを鋳型にリアルタイムPCRを行い、それぞれの遺伝子発現量を調べた。その結果、特に *Chalcone and stilbene synthase* (*CHS*) の発現量が他の酵素遺伝子の発現量に比べ高かった(図1)。*CHS* は、アレイ解析の結果 'MS 源助' で '打木源助' に比べ低い発現(24fold change)を示した遺伝子であり、リアルタイムPCRにおいては44倍の発現抑制が確認された(図1)。RT-PCRによりつぼみのステージ別(2mm, 3mm, 5mm)における *CHS* の発現を調べた結果、'MS 源助' のいずれのステージにおいてもほとんど発現しておらず、'打木源助' では若いステージ(≦3mm)において強く発現していた(図2)。つぼみ以外の根と葉においては、どちらの品種においても発現が見られず、*CHS* はつぼみで特異的に発現していることが確認された(データ省略)。雄蕊における *CHS* の発現量をステージ別に調べた結果、'打木源助' では葯壁が形成される四分子期直後(つぼみの長さ3mm)においてその発現が増加していたのに対して、'MS 源助' では調査した全ステージにおいてほとんど発現していないことが確認された(表1)。*CHS* は、他のオグラ型細胞質を持つダイコン品種においても発現が

抑制されていたのに対して、稔性回復系統との交雑により可稔化したオグラ型細胞質ダイコンにおいては発現していた(データ省略)。以上の結果から、*CHS* の発現制御はダイコンの葯発達に関わっている可能性が高いと考えられた。オグラ型細胞質雄性不稔におけるフラボノイドの関与を示唆する報告はこれが初めてである。

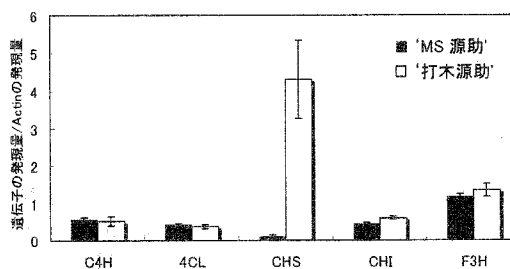


図1 'MS 源助' と '打木源助' のつぼみ (<2mm) におけるフラボノイド合成系の酵素をコードする遺伝子の発現量

C4H: cinnamate 4-hydroxylase, *4CL*: 4-coumarate coA ligase, *CHS*: chalcone and stilbene synthase, *CHI*: chalcone isomerase, *F3H*: flavone 3-hydroxylase. *C4H* がフラボノイド合成系の上流であり図の右にいくほど下流を示す。4反復の平均値±SE。

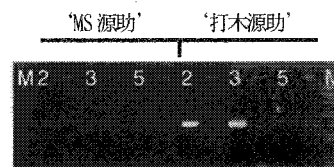


図2 'MS 源助' と '打木源助' のつぼみにおけるステージの違いと *CHS* の発現

M: λ 174/*Hae*III, 2, 3, 5: つぼみの長さ (mm) - : それぞれに対する-RT。

表1 'MS 源助' と '打木源助' の雄蕊におけるステージ(つぼみの長さ)の違いと *CHS* の発現量

	2mm	3mm	5mm
MS 源助	0.1	0.06	0.07
打木源助	5.2	12	4.7

2反復したリアルタイムPCR (*CHS* の発現量/Actin の発現量) の平均値。

Yasumoto, K., T. Terachi and H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Introduction of the 'Hamadaikon' type fertility restorer gene for Ogura male-sterility into *Brassica* vegetables.

ダイコンのオグラ型/コセナ型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子(以下 *Rf* 遺伝子と呼ぶ)は、*Raphanus* 属の野生種、ならびに栽培種に広く分布しているが、このうち中国の栽培ダイコン「園紅」由来の *Rf* 遺伝子(*orf687* 遺伝子)が、近年クローニングされた。しかしながら、この *orf687* 遺伝子と、他の栽培ダイコン、ならびに野生ダイコンが持つ *Rf* 遺伝子との関係は現在まで不明である。

中国ダイコンの *orf687* 遺伝子産物は、日本の栽培ダイコンの持つ劣性アレル(*rf*)の産物と比較して、4 アミノ酸残基が異なり、このうち1つのアミノ酸置換が稔性回復機能をもたらしている(今井ら 2002)。

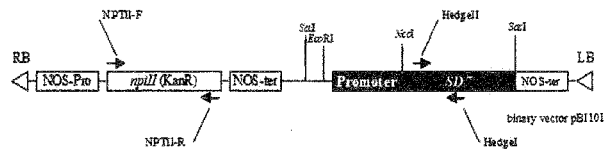
一方、我々がハマダイコン *Rf* 遺伝子の候補として単離した *orf687* 遺伝子のホモログには、日本の栽培ダイコン(*rf*)と比較して3ヶ所のアミノ酸置換を生じる塩基配列変異があるが、これらの変異は中国ダイコンに認められず、ハマダイコンに特異的である。よって、ハマダイコン *orf687* 遺伝子ホモログが *Rf* 遺伝子であれば、稔性回復機能は3ヶ所のアミノ酸置換のいずれか、またはその組合せによるものと考えられた。

本研究では、ハマダイコン *orf687* 遺伝子ホモログの機能を明らかにするための第一歩として、この遺伝子を、稔性回復遺伝子を持たない *Brassica* 属野菜に導入し、研究の基礎となる形質転換体の作製を行った。遺伝子導入の前段階として、「MS 源助」の持つ *orf687* 遺伝子の劣性アレルから、3ヶ所のアミノ酸置換について考えうる8通り(2x2x2)の変異体を Site-directed mutagenesis の手法により構築した。それぞれの変異体および *orf687* 遺伝子のプロモーター領域をバイナリーベクター pBI101 に挿入し、アグロバクテリウム法による遺伝子導入コンストラクトとした(図 1-A)。

アグロバクテリウム法による *Brassica* の形質転換効率はいまより高くないため、まず胚軸を用いた感染効率の一過

性検定によって、形質転換に用いる材料の選定を行った。GUS アッセイの結果、ブロッコリー(*B. oleracea*)の2品種(「緑樹」および「ドシコ」とコマツナ(*B. rapa*)の1品種(「おそめ」)で比較的高い感染効率が観察された。そこで、このうち「おそめ」を用いて *orf687* 遺伝子ホモログの遺伝子導入を試みた。その結果、現在までにハマダイコン型 *orf687* 遺伝子と同一の塩基配列を持つ変異体(*SD7* と呼ぶ)を導入した実験において再分化個体を2個体得た。PCRの結果、これら2個体はいずれもカナマイシン耐性遺伝子(*npt II*)とともに *orf687* 遺伝子を持つことが確認された(図 1-B)。今後、これら形質転換体を花粉親とし、オグラ型雄性不稔個体との交雑により導入遺伝子の稔性回復機能を確認する。また他の変異体の *Brassica* 属野菜への導入を進める予定である。

A.



B.

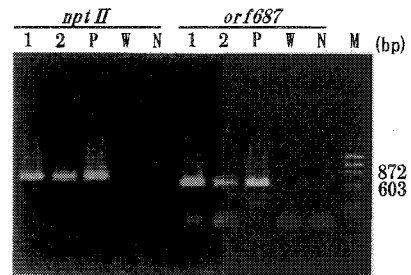


図 1. 遺伝子導入コンストラクトと PCR による導入遺伝子の確認

A. 植物に導入したコンストラクト
矢印は PCR に用いたプライマーを示す。

B. A. のプライマーを用いた PCR の結果

M: ϕ X174/*Hae*III 1: *SD7*#2 2: *SD7*#3

P: Plasmid DNA (Positive control)

W: Wild type (Negative control)

N: 鋳型なし (Negative control)

Yamagishi H., A. Ozaki and Y. Yamashita (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Origin and differentiation of Japanese radishes. XIII. Variation of structure in the mitochondrial *cox I* region among and within populations of Japanese wild radish.

ダイコン類の細胞質は「正常型」と「オグラ型」に大別されてきたが、このうち「正常型」のミトコンドリアにおいては、*cox I* 遺伝子に隣接して *orfB* 遺伝子が存在する。この *cox I-orfB* 遺伝子領域について、いくつかのプライマーペアで PCR を行うことによって、「正常型」の細胞質がさらに細分されることが明らかになった (Yamagishi and Terachi 2003)。一方、我国に自生するハマダイコンにおいては、栽培品種と比較して細胞質の集団内多型が大きいことが、ミトコンドリア、葉緑体の両オルガネラゲノムの解析から明らかになってきている。そこで本実験では、*cox I-orfB* 領域の PCR によってハマダイコンのミトコンドリアのタイプを明らかにし、それに基づいてハマダイコンの細胞質の集団間及び集団内多型を解析しようとした。

日本各地で収集されたハマダイコンから、個体単位で DNA を単離した。得られた DNA を鋳型として、ミトコンドリアの *cox I* 遺伝子上流に見出された塩基配列変異をもとに設計された 3 種類のプライマー (表 1) をフォワードプライマーに用いて PCR を行った。その際リバースプライマーは 3 PCR とも同一のものを用いた。また、*orfB* 領域の変異を利用して、オグラ型、正常型のそれぞれに特異的なプライマーによる 2 種類の PCR も合せて行った (表 1)。5 種類のプライマーを用いた PCR による増幅断片の有無の組合せに基づき、供試したハマダイコンのミトコンドリアをタイプ分けした。

PCR による増幅パターンの組合せにより、調査個体の細胞質は 6 種類に分類された (表 1)。このうち、タイプ VI は今回の実験で「岩崎」の集団に特異的に発見されたものである (表 2)。また 6 タイプのうちタイプ IV は、オグラ型の雄性不稔細胞

質に対応し、このタイプが調査したハマダイコンの 49% に達していた (表 2)。

タイプ VI を除く 5 種類はいずれも複数の集団に分布し、特にタイプ III と IV は全集団に共通して存在した。また集団間で各タイプの頻度に大きい変異は観察されなかった (表 2)。このことは、我国のハマダイコンで地域的な種子の移動が起こっていることを示唆している。一方、調査した 7 集団のうち「富岡」を除く集団は、いずれも 4 タイプ以上を含み、集団内で著しい多型性が観察された。このような細胞質の多型の源とその消長については、今後更に詳しく調査する必要がある。

表 1 ミトコンドリアの *cox I* および *orfB* 領域における PCR 増幅パターンによる細胞質のタイプ分け

プライマー	I	II	III	IV	V	VI
'Ogura 型' <i>cox I</i>	+	-	+	+	-	+
'Normal 型' <i>cox I</i>	+	+	-	-	-	-
'OS40 型' <i>cox I</i>	-	-	-	-	+	-
オグラ型 <i>orfB</i>	-	-	-	+	-	+
正常型 <i>orfB</i>	+	+	+	-	+	+

表 2 ハマダイコンにおけるミトコンドリアの *cox I-orfB* 領域の構造の集団内多型

集 団	I	II	III	IV	V	VI	タイプ数
串木野	2	1	1	14	0	0	4
富 岡	0	0	4	11	0	0	2
浜 坂	2	0	7	5	1	0	4
稲 取	3	3	10	3	0	0	4
柿 崎	1	4	2	13	0	0	4
岩 崎	0	0	7	5	1	3	4
襟裳岬	2	1	2	5	1	0	5
個体数計	10	9	33	56	3	3	

○石橋 篤志・山岸 博(京都産大工) ミトコンドリアの *coxI* 領域の塩基配列多型を用いたハツカダイコンおよび日本のダイコンにおける品種分類
 Ishibashi, A. and H. Yamagishi (Fac. Eng. Kyoto Sangyo U.) Classification of European and Japanese radish varieties using sequence variations of mitochondrial *coxI* region.

ダイコンは古くより世界的に栽培され、各地で多様に分化している。最近、日本のダイコンにおいて細胞質が大きく2つに分けられることが明らかになりつつあるが、ハツカダイコンの細胞質については解析が進んでいない。そこで今回、ハツカダイコンと日本のダイコンを中心にミトコンドリアの *coxI* 遺伝子の塩基配列を決定し比較することで、より詳しい品種分類を試みた。

材料にはハツカダイコン 9 品種、日本の栽培ダイコン 12 品種、中国とトルクメニスタンの各 1 品種を供試し、それぞれ 1 個体ずつ用いた。各個体の幼苗から単離されたトータル DNA を鋳型とし、Makaroff *et al.* (1991) などによって明らかにされた *coxI* 遺伝子領域の塩基配列に基づいて設計されたプライマーペアで PCR を行った (図 1)。オグラ型、正常型のそれぞれに特異的な PCR 産物を精製し、内部プライマーを用いたダイレクトシークエンスにより、両タイプの *coxI* 遺伝子のコード領域 (以下 O-type *coxI* もしくは N-type *coxI* と呼ぶ) の塩基配列を決定した。

coxI 遺伝子のコード領域は O-type *coxI* および N-type *coxI* いずれにおいても、すべての個体で 1584bp となり、挿入/欠失変異はなかった。

N-type *coxI* をもつダイコン 20 品種・個体は完全に同一のシークエンスを示した。しかし、ミトコンドリアに *orf138* をもちオグラ型雄性不稔細胞質であることが明らかとなっ



図 1. *coxI* 領域の PCR に用いたプライマー

表 1. O-type *coxI* の塩基配列多型

代表品種名	site											
	117	207	376	717	1067	1107	1240	1311	1318	1430	1454	
Consensus	T	T	G	G	C	C	A	T	C	C	G	
MS源助	.	C	
青長大根	
Comet	G	C	
Icicle	G	G	.	T	.	.	
青首宮重総太	.	.	A	.	T	A	.	
寒越時無	.	.	A	T	T	.	.	C	.	A	C	

ている「MS 源助」と、他の一部の栽培ダイコンにおいて N-type *coxI* を含む断片を得るための PCR でバンドが増幅しないものがあった。

一方、O-type *coxI* の配列には多数の塩基置換が存在した (表 1)。その結果供試個体には以下のものが観察された。すなわち、

1. オグラ型細胞質の「MS 源助」のもつ O-type *coxI* の配列
2. O-type *coxI* のみもつが、「MS 源助」とは異なる配列
3. 両 type の *coxI* をもち、両者が同一の配列
4. 両 type の *coxI* をもち、O-type *coxI* が 2 と同じ配列
5. 日本の主要な栽培品種に特異的な O-type *coxI* の配列
6. 品種独自の O-type *coxI* の配列

以上のように、*coxI* 遺伝子のコード領域の配列を比較することで、ハツカダイコンや日本のダイコンの品種分類を従来よりも詳細に行うことが可能になった。

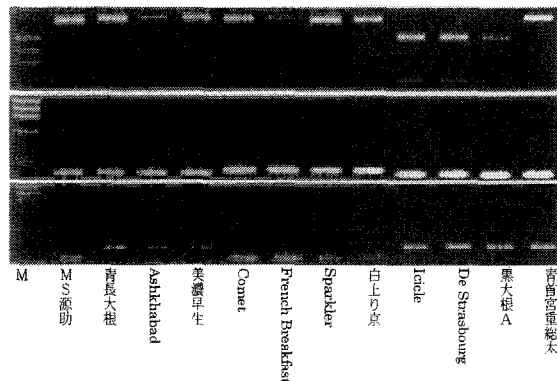


図 2. O-type *coxI* のコード領域における塩基配列変異に基づく

品種間の RFLP (上から *XbaI*, *SnaBI*, *MboI*)

M: 分子量マーカー ϕ x174/ *HaeIII*

バ23 ダイコンにおけるオグラ型細胞質雄性不稔の発現に関わる遺伝子の網羅的探索

○梁 修静^{1,2}・寺地 徹¹・山岸 博¹(¹京都産業大工学部, ²学振科技特別研究員)

Microarray analysis of gene expression in *Raphanus sativus* having the Ogura male-sterile cytoplasm

Yang, S.J., T. Terachi and H. Yamagishi

【目的】細胞質雄性不稔は、ミトコンドリアゲノム上の遺伝子によって誘起され、核の稔性回復遺伝子の存在によって稔性が回復することから、核とオルガネラ間での相互作用に関わっている形質である。ダイコンには安定した雄性不稔であるオグラ型細胞質雄性不稔が存在し、*orf138* がその原因遺伝子として知られている。しかし、細胞質雄性不稔形質が発現するメカニズムについてはほとんど知られていない。本研究は、オグラ型細胞質をもつダイコンと正常型細胞質をもつダイコンとの間で発現に著しい差がある遺伝子を網羅的に解析したものである。

【材料および方法】オグラ型雄性不稔をもつダイコン(*Raphanus sativus*) 'MS 源助'とその維持系統である'打木源助'を実験に供試した。以下の実験には開花している株からのつぼみを用いた。まず、形態的に異常が現れる以前の遺伝子発現を調査するため、つぼみの長さ1mm~6mmの6ステージにおいてレジン切片を作成し、Toluidin Blue Oで染色した後、雄ずいの形態観察を行った。マイクロアレイ解析には、形態異常が見られた長さ2mm以下のつぼみから抽出したRNA(QIAGEN)をもとにcDNAを合成し、T7/RNAポリメラーゼを用いてラベル化されたcRNAを合成した後、Arabidopsis 2 Oligo Microarray (Agilent Tech.60mer, 重複のない21,500spot)と競合的にハイブリダイゼーションさせた。Agilent Tech. Microarray Scannerにより読み込んだデータをもとに変動した遺伝子リストを作成した。

【結果および考察】

マイクロアレイに用いるつぼみのステージ決定：減数分裂後四分子期においては'MS 源助'の形態は'打木源助'と変わらなかった。'MS 源助'の葯において初めて形態異常が観察されたステージは、つぼみの長さ2mmの段階であり(図1)、このステージに始まったタペト組織の異常な分裂は次第に葯室を満たし、葯の発達を阻害していた。

'MS 源助'に特異的な遺伝子の発現：'打木源助'に比べ'MS 源助'で発現量(fold change)が2倍以上であった遺伝子は合計78個で、1/2以下であったのは合計182個であった(図2)。最も発現の差があった遺伝子で36倍の相対的抑制が見られた。中には、葯の形態・発達に関わる遺伝子が36個、呼吸関連が20個、色素を含む2次代謝関連が16個、転写因子が14個、病原性・ストレス関連が17個、植物ホルモン関連が13個、光合成関連が7個含まれていた。発現に大きな差がみられた遺伝子の中には、他の雄性不稔植物で報告されている形質に関わる遺伝子も含まれていた。例えば、アントシアニン色素、シアン耐性呼吸、脂質代謝に関する遺伝子群などがそうである。興味深いことに最も発現に差があった遺伝子の中には動物で精子の生殖異常に関わるとされている遺伝子も含まれていた。アラビドプシスのアレイを用いて異種であるダイコンの遺伝子発現解析を行ったのはこれが初めての報告である。今回の結果は今後、オグラ型雄性不稔のメカニズムを解明する基盤になるものと考えている。



図1. 形態異常が初めて観察される'MS 源助'の雄ずい(つぼみの長さ2mmのステージ)

* : 異常分裂を示すタペト細胞

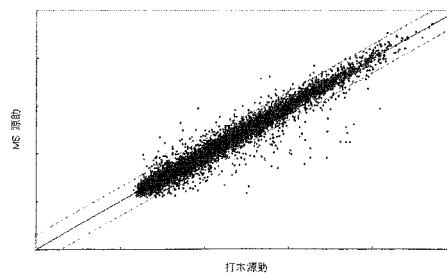


図2. 'MS 源助'と'打木源助'のマイクロアレイ解析

—— 上のスポットは両処理区において発現量が同じ遺伝子群
 ---- の外側のスポットは相対的発現量が2倍以上である遺伝子群
 スポット数, 21,500個

バ29 キャベツとシロイヌナズナの体細胞雑種におけるオルガネラゲノムの構造

○山岸 博・木下大輔・山下陽子 (京都産業大工学部)

Structure of the organellar genomes of somatic hybrids between cabbage and *Arabidopsis thaliana*.

Yamagishi, H., D. Kinoshita and Y. Yamashita

〔目的〕 核、葉緑体、ミトコンドリアのすべてのゲノム情報が解読されたシロイヌナズナは、アブラナ科野菜の育種において重要な素材となり得るが、そのためには細胞融合を用いる必要がある。また細胞融合によれば、葉緑体とミトコンドリアの2つのオルガネラゲノムに関して、様々な組合せの雑種植物が得られ、遺伝的変異を拓げる可能性がある。そこで実際にシロイヌナズナとキャベツとの間で体細胞雑種を作出し、それらのオルガネラゲノムの構造を明らかにしようとした。

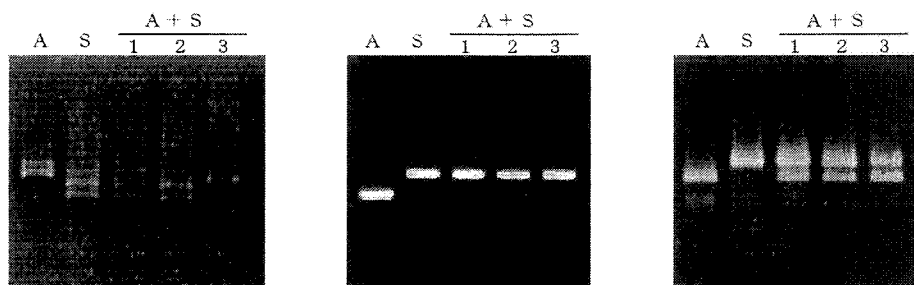
〔材料および方法〕 シロイヌナズナの系統'Columbia'とキャベツの品種'中生サクセッション'を材料とした。両種を無菌的に育苗した後、幼苗の本葉等をプロトプラスト単離の材料とした。両植物から単離したプロトプラストを PEG により融合処理した。融合処理後のプロトプラストを 8 P 培地を基本とする液体培地で培養した後、得られたコロニーをカルス増殖用培地に移植し、大きさが 2 mm 程度に達したカルスを更に再分化用培地に移植した。再分化培地上で生育したシュートから発根を促して植物体にまで育てた。

再分化シュートより単離した DNA を鋳型として、核の *Tpi* 遺伝子、葉緑体ゲノムの遺伝子間領域およびミトコンドリアゲノムの各種遺伝子の周辺領域の PCR を行った。PCR パターンを両親と比較することによって、体細胞雑種のオルガネラゲノムの構造を解析した。

〔結果および考察〕 融合処理後の培養によって、127 個のカルスが得られた。それらを再分化培地に移植したところ、33 個のシュートが再分化した (再分化率 26%)。再分化シュートの多くは、培地上で枯死したり、シロイヌナズナと同様に抽苔・開花に至ったが、6 個のシュートは栄養生長を継続した。これらのシュートは雑種細胞又はキャベツのプロトプラストに由来するものと考えられた。

現在までに、これらのシュートのうち 3 個から DNA を単離し、PCR による解析を行っている。まず、核の *Tpi* 遺伝子の PCR では、3 個のシュートのうち 2 つがキャベツと同一の増幅パターンを示した。これに対して、他のシュートはキャベツとシロイヌナズナのパンドを共に持っていた (図(a))。このうち前者の 2 つのシュートは形態的にもキャベツと類似していた。次に葉緑体遺伝子間領域のうち *trnF* と *ndhJ* 間の領域の PCR では、3 つのシュートともキャベツと同一のパンドを有していた (図(b))。このことは、他の領域でも同様に認められ、いずれのシュートともキャベツと同じ葉緑体ゲノムを持つことが示された。更に、ミトコンドリアゲノムにおいては、調査した遺伝子によって再分化シュートの示すパターンは異なった。そのうち *atpA* の 5'領域における PCR では、3 個のシュートはいずれも両親に特有なパンドを併せ持っていた (図(c))。

以上の結果を総合すると、調査した 3 つのシュートのうち 2 つはキャベツの核と葉緑体ゲノムを持ち、ミトコンドリアについては雑種性を示す細胞質雑種、他の 1 つは核とミトコンドリアについて雑種性を示す体細胞雑種であると判断される。現在、更に領域を広げて調査するとともに、他の再分化シュートについても同様の解析を進めている。



(a)核の *Tpi* 遺伝子 (b)葉緑体の *trnF/ndhJ* 間領域 (c)ミトコンドリアの *atpA*5'領域

図 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種における核、オルガネラ遺伝子の PCR パターン

(A;シロイヌナズナ, S;キャベツ('中生サクセッション'), A+S;融合処理後の再分化シュート)

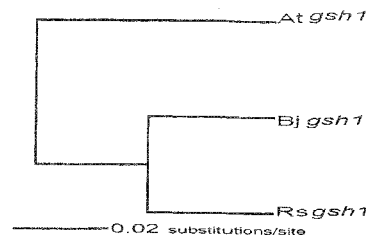
Nishizuka, J., H. Yamagishi and T. Terachi (Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.) Isolation of phyto remediation-related genes from radish. II. GSH1 and GS genes

ファイトレメディエーション(phyto remediation)は、植物を用いた環境浄化と定義され、水、大気及び土壌など様々な環境改善のための一方策として期待されている技術である。なかでも土壌は重金属に汚染されると自然浄化がほとんど不可能であり、その浄化には低コストで環境に及ぼす影響が低いとされるファイトレメディエーションが適していると考えられている。

一般に、重金属汚染土壌の浄化に用いる植物は重金属に耐性を持ち、さらに高濃度な重金属を蓄積する能力を持っていないなければならない。我々は遺伝子工学的な手法で、その能力を持つ植物を作出することを目標にいくつかの研究を行なっている。植物の重金属耐性および蓄積には、フィトキレーチンというポリペプチドが関与することが知られている。一方、ダイコンは発達した根のシステムを持っており、汚染土壌の効率的な浄化へ利用が期待される。また、ダイコンには雄性不稔を示す系統があり、この系統を用いることにより遺伝子拡散の懸念を小さくできると考えられる。こうした中で我々はダイコンが持つこのフィトキレーチン合成に関わる遺伝子群の単離と特徴づけを進めている。今回は前回の *pcs* 遺伝子(育種学研究 6 別 2, 111)に引き続き、*gsh1* 及び *gs* 遺伝子を初めて単離したので報告する。ダイコン (*Raphanus sativus* cv. Comet) の葉より抽出した totalRNA から 1st strand cDNA を合成し、これを鋳型に重金属超集積植物 (hyperaccumulator) である *Brassica juncea* (Bj), 及び *Arabidopsis thaliana* (At) の *gsh1* 及び *gs* の塩基配列を基に設計したプライマーを用いて RT-PCR を行った。さらに 3' RACE, 5' RACE を行いダイコン *gsh1* と *gs* の全長 cDNA の塩基配列(それぞれ 1549, 1437bp) を決定した。この塩基配列と推定アミノ酸配列を Bj 及び At のホモログと比較したところ、*gsh1* において塩基配列は 95%, 89%, アミノ酸配列ではシグナルペプチドを有すると考えられる N-末端側は保存性が低いものの、それぞれ 96%, 91% の相同性を持つことが分かった。また、*gs* においては Bj の N-末端側を除いた塩基配列で 94%, 87%, アミノ酸配列では 96%, 84% の高い相同性を示した。今後はこれらの遺伝子のさらなる

解析を進めていく予定である。

(a)



(b)

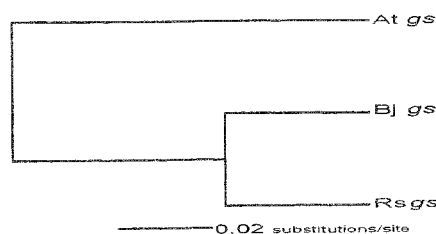
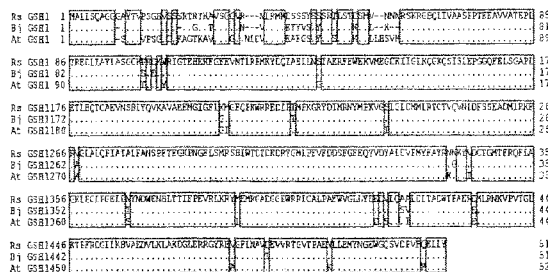


図 1. UPGMA 法による (a) *gsh1*, (b) *gs* の塩基配列の系統樹

(a)



(b)

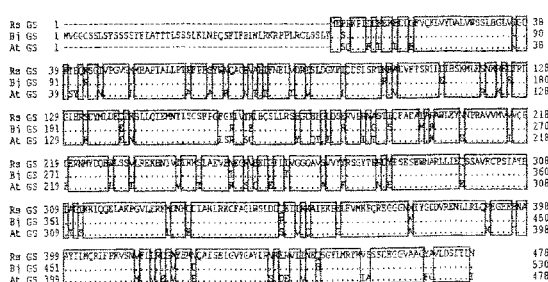


図 2. *Rs, At, Bj* の (a) GSH1, (b) GS 推定アミノ酸配列のアラインメント

111 ○辻村真衣¹・林清音²・橋本絢子²・西塚順子²・寺地徹² (1. 奈良先端大バイオ, 2. 京産大工) タバコの活性酸素消去系酵素遺伝子の単離と葉緑体形質転換ベクターの構築

Tsujimura, M.¹, S. Hayashi², A. Hashimoto², J. Nishizuka² and T. Terachi² (1. NAIST, Biosci., 2. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Isolation of the genes encoding ROS-scavenging enzymes from tobacco and construction of the vectors for delivering them into chloroplast.

植物は生活環の中で、乾燥・強光・紫外線といった環境要因、また、除草剤・大気汚染・化学物質といった人為的要因によりストレスを受けている。これら様々なストレスを受けると、植物体内には強い酸化作用を持った活性酸素分子種 (ROS) が生じる。ROS は酸素が通常より強い酸化作用を持った状態にある分子のことをいい、植物体内でタンパク質や脂質などの生体物質と反応し細胞に損傷を与える。その結果、ROS は植物に対し成長の抑制や光合成の阻害、葉の脱落や組織の壊死といった障害を引き起こす。一方、植物はこれら ROS を除去するための代謝経路を保持しており、ここではいくつかの酵素が ROS を段階的に還元して無毒化する。

本研究は、これら ROS 除去酵素の遺伝子を葉緑体で過剰発現させることにより、ストレス耐性が強化された植物を作出することを目的とする。今回はその第一歩として、タバコから、ROS 除去酵素であるアスコルベートパーオキシダーゼ (APX)、デヒドロアスコルベートレダクターゼ (DHAR)、モノデヒドロアスコルベートレダクターゼ (MDAR) の3種酵素の遺伝子をそれぞれ単離し、構造を解析したので報告する。また、APX、DHAR の遺伝子 (*apx*, *dhar*) については、葉緑体形質転換用プラスミドコンストラクトも作製したので、その結果も合わせて報告する。

今回、実験に用いたタバコでは、*apx*, *dhar* の配列はすでにデータベースに登録されている。したがってこれらの全長 cDNA 単離は、既知配列をもとに設計したプライマーによる RT-PCR で行

なった。一方、タバコの MDAR 遺伝子 (*mdar*) の塩基配列はいまだ不明であった。そこで、ホウレンソウとブロッコリーの既知の *mdar* から保存性の高い領域を選んでプライマーを設計し、理研のタバコ BY2 細胞の EST 配列をもとに設計したプライマーとともに RT-PCR を行ない、cDNA 断片を得た。さらに RACE 法により 5' 配列を決定し、タバコ *mdar* の cDNA 配列を初めて決定した。

apx, *dhar* を葉緑体ゲノムへ導入するため、葉緑体のプロモーターとターミネーターを持つ中間ベクター (pPT) へ両遺伝子の cDNA をクローニングし、このカセットを葉緑体形質転換ベクター pPRV112A' へ移した (図1)。

葉緑体の遺伝子組換え植物は、導入遺伝子の過剰発現が望めること、発現にサイレンシングや位置効果によるばらつきが無いことなど、通常の遺伝子組換え植物と比べて利点が多い。本研究の進展で、より強いストレス耐性を示す植物が得られることが期待される。

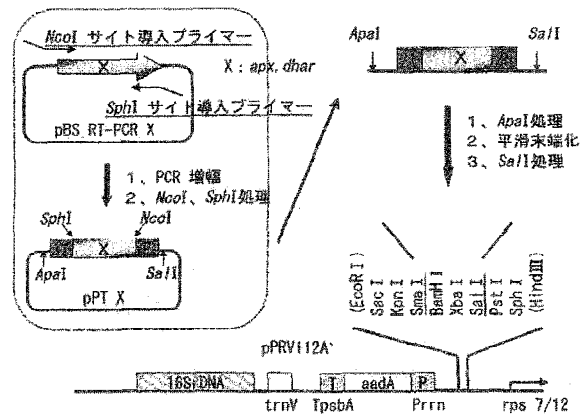


図1. 葉緑体形質転換用プラスミドコンストラクトの作製

Yoshimi, M., K. Yasumoto, H. Yamagishi, and T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Structural variations in a fertility restorer gene for Ogura male-sterility in European cultivars of radish.

ダイコンのオグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子(*Rf*)は、この細胞質のミトコンドリアゲノムに存在する原因遺伝子 *orf138* の発現を翻訳レベルで抑制し、稔性を回復させることが知られている。この *Rf* 遺伝子は、RNA 結合ドメインと考えられる PPR モチーフをタンデムに 16 個持つ新規タンパク質をコードしており、産物のアミノ酸数から *orf687* と呼ばれている。*orf687* のホモログは、全てのダイコンに存在すると考えられるが、*Rf* として機能するものは、ハマダイコンやハツカダイコン、中国ダイコンの一部に限られ、日本の栽培ダイコンには見つからない。

ハツカダイコンは古来、西洋で栽培されてきたもので、同じ種 (*Raphanus sativus*) に分類されるとはいえ、野生のハマダイコンはもちろん、日本や中国の栽培ダイコンと、歴史的にもまたその形態や用途においても大きく異なっている。我々が以前に行った研究では、ハツカダイコンには *orf138* は存在しないということが明らかになっている。しかしその一方で、ハツカダイコンの多く(例えば 'Comet') はオグラ型細胞質による雄性不稔を回復することから、*Rf* 遺伝子を持つと考えられる。このことは、正常型細胞質しか持たないハツカダイコンが、なぜ *Rf* 遺伝子を持つのかという疑問を生じさせる。一方、実用面において *rf* を持つ不稔性維持系統のハツカダイコンを探すことは、 F_1 品種を作出するために必要であり、もしハツカダイコンの *Rf* と *rf* を区別することができれば、その研究は育種的に価値がある。以上の観点から、今回、ハツカダイコンの *Rf* 遺伝子の構造と多型を一連の分子遺伝学的実験により解析したので、その結果を報告する。

本実験はハツカダイコン 3 品種 11 個体、及び *rf* を持つ日本の在来品種 '打木源助' 1 個体(細胞質は正常型)を材料に用いて行った(表 1)。まず、ハツカダイコンの全 DNA を調製し、この DNA を鋳型として *Rf* 遺伝子 (*orf687*) の近傍、ならびに内部配列をもとに設計した多数のプライマーペアを用いて PCR を行い、得られた増幅断片のシークエンスをダイレクト法、あるいは大腸菌によるクローニングにより決定した。その結果、*Rf* 遺伝子内部を増幅

するプライマーペアで PCR を行ったところ、'Long Scarlet' では品種内で増幅断片のサイズに差が見られ(図 1)、シークエンス解析の結果、*orf687* 内部に 128bp のフレームシフトを伴う欠失が認められた(図 2)。また、ハツカダイコンの各個体の PCR 増幅パターンは複雑で、ゲノム中に *orf687* のホモログが複数個存在していることが示唆された(図 1)。このことはサザン解析の結果からも支持された。

現在、ハツカダイコン各個体の *orf687* 全長の構造を解析している。今後は、ハツカダイコンの他品種についても同様に解析していく必要がある。

表 1. 解析に用いた栽培ダイコン

Species	Var.	Cultivar	Num. of plants examined
<i>R. sativus</i>	<i>sativus</i>	Comet	1
		Long Scarlet	6
		French Breakfast	4
<i>hortensis</i>		Uchiki-Gensuke	1

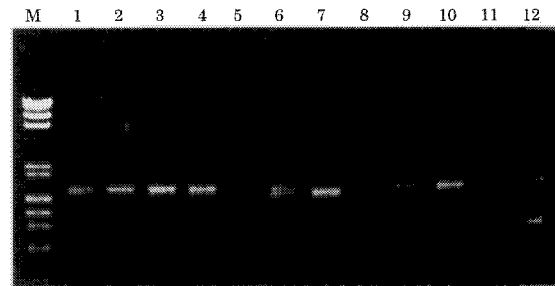


図 1. ハツカダイコン *orf687* の内部プライマー(2F-3R)による PCR
M: λ /HindIII+ ϕ X/HaeIII, 1: Comet, 2: 打木源助,
3~8: Long Scarlet, 9~12: French Breakfast

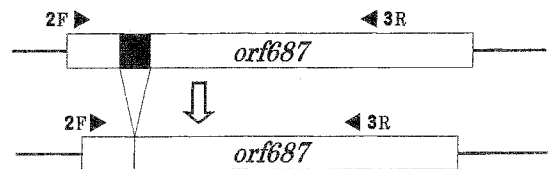


図 2. 'Long Scarlet' に存在する *orf687* 内部の欠失

Yasumoto, K., M. Yoshimi, T. Terachi and H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Distribution of the ‘Enko’ type fertility restorer gene for Ogura male-sterility.

ダイコンのオグラ型雄性不稔細胞質とそれに対する稔性回復遺伝子に関する我々の一連の研究の過程で、稔性回復遺伝子が野生種 *R. raphanistrum*、ハマダイコン、ヨーロッパおよび中国の栽培ダイコンに広く分布することが明らかになった (Yamagishi 1998)。このうち中国のダイコン品種‘園紅’の稔性回復遺伝子 (*orf687*) が同定され、ORF687 タンパク質中の 118 番目のアミノ酸の置換が、稔性回復機能の有無を決めていることが示された (今井ら 2002)。そこで、このアミノ酸置換をもたらす塩基配列変異を指標として、栽培・野生ダイコンにおける‘園紅’型稔性回復遺伝子の分布を調査した。

まず中国の栽培ダイコンを中心として、オグラ型雄性不稔遺伝子 (*orf138*) を持つ品種を検索した。その中に、正常な花粉稔性を示し、稔性回復遺伝子を持つと考えられる‘夏抗 40 天’が見出された。交雑の結果、‘夏抗 40 天’は *orf125* を持つ‘小瀬菜’、*orf138* を持ち雄性不稔の‘60 早生’の花粉稔性を、いずれも回復した。

次に、*orf687* のシークエンスに基づいて同遺伝子内に設計したプライマーにより PCR を行った後、上記の塩基配列変異を検出する制限酵素 *Ssp* I (図 1) で増幅断片を処理した。その結果、‘夏抗 40 天’では PCR 産物の切断が認められるのに対して、‘小瀬菜’、‘60 早生’では切断が起こらず (図 2)、『夏抗 40 天’は‘園紅’と同一の稔性回復遺伝子を持つことが示された。

そこで、この PCR-RFLP を用いて、‘園紅’型の稔性回復遺伝子の分布を調査した。我々がオグラ型の雄性不稔系統として用いている‘MS 源助’もこの領域に関して、‘小瀬菜’、‘60 早生’と同

様の RFLP パターンを示した (図 2)。一方、‘夏抗 40 天’と同一のパターンを示す個体が、*orf138* の有無と関係なく中国の栽培品種に多く観察され、同遺伝子が中国のダイコンに広く分布することが認められた。

これに対して、*orf138* 又は *orf125* を持ちながら、花粉稔性を有するハマダイコンは、‘園紅’型のパターンではなく、‘小瀬菜’や‘打木源助’ (‘MS 源助’の不稔性維持系統) と同一のパターンを示した (図 2)。このことから、ハマダイコンはこの領域に関して‘園紅’とは異なる塩基配列を有することが明らかになった。さらに、交配実験等で稔性回復遺伝子を持つことが明らかになっている野生種 *R. raphanistrum* に、‘夏抗 40 天’と同一パターンを示す個体が認められ (図 2 の R3)、この稔性回復遺伝子が野生種から中国の栽培ダイコンに伝えられたことが示唆された。今後‘園紅’型の稔性回復遺伝子とハツカダイコンやハマダイコンが持つ回復遺伝子との関係を含めて、稔性回復遺伝子の分化および分布の解析を広範囲に進めることが必要である。

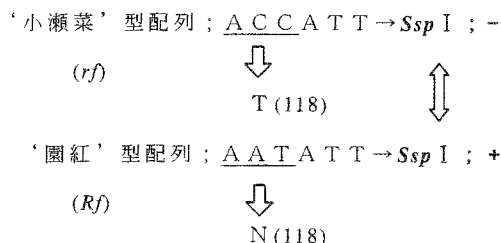


図 1 ; *orf687* における‘小瀬菜’型と‘園紅’型の塩基配列多型とそれに基づく RFLP

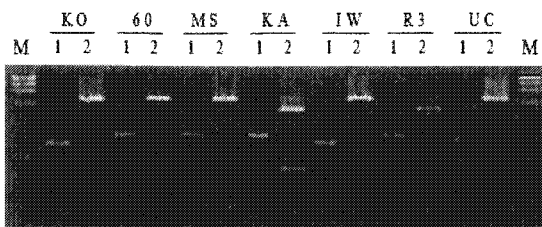


図 2 ; 雄性不稔遺伝子 (*orf138*) の PCR(1) および稔性回復遺伝子 (*orf687*) の PCR-RFLP(2)

KO; ‘小瀬菜’(不稔)、60; ‘60 早生’(不稔)
 MS; ‘MS 源助’(不稔)、KA; ‘夏抗 40 天’(可稔)
 IW; ハマダイコン (岩崎) (可稔)
 R3; *R. raphanistrum* (RS15-3) (可稔)
 UC; ‘打木源助’(正常型細胞質)
 M; 分子量マーカー ($\phi \lambda 174$ -Hae III)

212 ○築山拓司¹、井上國世¹、奥本裕¹、寺地徹²、田中千尋¹、中崎鉄也¹、谷坂隆俊¹ (1.京大院農、2.京産大工) イネ PR-3 キチナーゼ遺伝子のいもち病感染特異的発現を制御する転写調節因子の解析
Tsukiyama, T.¹, K. Inouye¹, Y. Okumoto¹, T. Terachi², T. Nakazaki¹, T. Tanisaka¹ (1. Grad. Sch. Agr., Kyoto U., 2. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Analysis of transcription factors controlling rice blast-induced expression of PR-3 chitinase genes

植物は、病原体の攻撃に際して、防御関連タンパク質をコードする様々な遺伝子を発現させる。これら遺伝子には、感染特異的タンパク質 (pathogenesis-related protein, PR-protein) の一つ、PR-3 キチナーゼをコードする遺伝子が含まれる。イネにおいては、12 の PR-3 キチナーゼ遺伝子座 (*Cht1-Cht12*) が存在するが、いもち病感染によって発現が誘導されるキチナーゼは限られていることが明らかになっている。また、いもち病感染特異的に発現するキチナーゼの中には、タバコやシロイヌナズナの PR タンパク質の発現を誘導するシグナル物質として知られているサリチル酸およびジャスモン酸メチルでは誘導されないものが存在した。これらの結果は、イネにおける PR-3 キチナーゼを介した耐病性機構の情報伝達経路が、双子葉植物と異なっていることを示唆している。そこで、本研究では、イネ PR-3 キチナーゼ遺伝子のいもち病感染特異的発現を制御する転写調節因子の単離・同定を試みた。

イネ品種日本晴の 12 の PR-3 キチナーゼ遺伝子の上流約 1.0kbp の配列を用いて、それぞれの遺伝子に存在する *cis* 配列を PLACE で検索した結果、いもち病感染によって特異的に発現する *Cht4*、*Cht6* および *Cht12* は、既知の病害応答 *cis* 配列である W-、G- および GCC-box のいずれももたないことが明らかになった。全ての遺伝子の *cis* 配列を見直したところ、*Cht10* を除くいもち病感染特異的に発現した全ての遺伝子は RY-repeat (CATGCAT) を有していた。RY-repeat は、ダイズのグリシニンやその他多くの植物の種子タンパク質をコードする遺伝子

にみられる *cis* 配列で、アブシジン酸を介して *trans* 因子である bZIP および VP1 タンパク質が相互作用することによって発現を制御している。*Cht10* においても、bZIP タンパク質を *trans* 因子とする *cis* 配列 G-box が存在することから、イネにおける PR-3 キチナーゼ遺伝子のいもち病感染特異的発現は bZIP および VP1 タンパク質のホモログによって制御されているのではないかと考えられた。

イネにおける VP1 タンパク質のホモログをコードする *Osvp1* の DNA 配列を用いて、イネ EST データベースに対する tblastn 検索を行った結果、イネといもち病菌の相互作用で同定された cDNA が多数得られた。これらの配列を比較・整理したところ、これらの配列は *Osvp1* ホモログをコードする 5 つの遺伝子いずれかの一部であることが明らかになった (Table 1)。これら遺伝子に由来する推定アミノ酸配列を用いて、ドメイン検索を行ったところ、全てのタンパク質の C 末端側には、DNA 結合ドメインの一つ、B3 ドメインが存在していた。また、*Biap2-1*、*Biap2-2* および *Osrav2* は、B3 ドメインに加えて、病害抵抗性機構を制御する多くの転写調節因子にみられる AP2 ドメインも有していた。

現在、いもち病感染過程におけるこれら遺伝子の発現様式を調査中である。これら転写調節因子の生物学的機能を解析することは、イネ植物体における生体防御機構の新規シグナル伝達経路の解明に資すると考えられる。

Table 1. *Osvp1* homologues in rice EST database

Accession no.	Product	BAC no.	Chromosome	New name
CB620477	VP1/ABI3 family regulatory protein-like protein	AP005296	7	<i>Osva1</i>
CB655807	AP2 domain containing protein RAP2.8	AP002913	1	<i>Biap2-2</i>
CB658384	DNA-binding protein RAV2-like	AP003450	1	<i>Osrav2</i>
CB672626	putative AP2 domain protein	AC136492	5	<i>Biap2-1</i>
CB676684	transcription factor viviparous 1-like	AP005406	6	<i>Osvl1</i>

223 ○堀川明彦・平野了也・寺地徹(京産大工)コムギ・エギロプス属内で生じたミトコンドリア *rpl5* 遺伝子の核ゲノムへの移行

Horikawa, A., R. Hirano and T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Transfer of *rpl5* gene from the mitochondrial to the nuclear genome occurred in *Triticum* and *Aegilops*.

高等植物において、ミトコンドリア遺伝子の核ゲノムへの移行は現在進行形の現象である。これまでに、アラビドプシス、ダイズ、イネ、トウモロコシやコムギなどの顕花植物で、遺伝子移行の事例が多数報告されている。特にミトコンドリアのリボソームタンパク質遺伝子については、高等植物間で、その存在様式に著しい多様性が認められる。例えば、トウモロコシのミトコンドリア *rpl5* 遺伝子は、すでに核へ移行を終えているのに対し、コムギのこの遺伝子は、未だ、核ゲノムとミトコンドリアゲノム双方に保持されており、ゲノム間の移行がリアルタイムで起きている段階にあるといえる。

一般に、移行したミトコンドリア遺伝子は、各種調節因子やミトコンドリアへのターゲット配列を獲得し、活性を持つ遺伝子として機能するようになるか、偽遺伝子として留まり、やがてゲノム中から排除されるか、大きくは二つの異なる運命をたどる。このような遺伝子移行とそのメカニズムは、ミトコンドリアゲノムが核ゲノムと共存後、どのような動態を辿ってきたのか、進化の観点からも非常に興味を持たれる。

我々はこれまでに、コムギ近縁野生種 *Ae. mutica* の細胞質をパンコムギの1品種 Chinese Spring に導入した細胞質置換コムギを研究材料として、パンコムギに出穂遅延及び細胞質雄性不稔性を与える *Ae. mutica* ミトコンドリア原因遺伝子の探索を行ってきた(育種学研究 6 別 2, 119 他)。今回、パンコムギと *Ae. mutica* のミトコンドリアゲノムの構造の違いを明らかにする目的で、各種遺伝子プローブを用いた網羅的なサザン解析を行なったところ、パンコムギ *rpl5* 遺伝子のコード領域全長をプローブとするサザンハイブリダイゼーションでは、*Ae. mutica* の細胞質を持つ細胞質置換コムギにはバンドが検出されず(図1)、*Ae. mutica* のミトコンドリア *rpl5* 遺伝子が核へ移行していることが推測された。

そこで、他のエギロプス属植物におけるミトコンドリア *rpl5* 遺伝子の存在様式を調査するため、*Ae. speltoides* など、他のエギロプス種の細胞質を持つ細胞質置換コムギのミトコンドリア DNA を用いて、同様にサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、系統間でバンドの有無に

明瞭な差が認められ、コムギ属とその近縁種であるエギロプス属の種間で、すでにミトコンドリア *rpl5* 遺伝子の存在様式に、違いがあることが示された(図2)。このことは *rpl5* 遺伝子のゲノム間移行が、コムギ・エギロプス属が分化した後も進行していることを示唆しており、これは高等植物における遺伝子のゲノム間移行の最近の事例として興味深い。

一方、コムギ・エギロプス属の種間でミトコンドリア遺伝子の存在様式に差異が認められたことは、これが種の系統関係を考える際の新たな指標となる可能性がある。本講演では、さらに広範に渡るコムギ・エギロプス属植物のミトコンドリア *rpl5* 遺伝子の存在様式について、調査した結果を述べる。

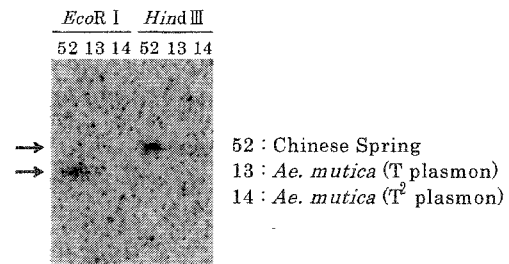


図1. パンコムギと *Ae. mutica* のミトコンドリア *rpl5* 遺伝子の存在様式

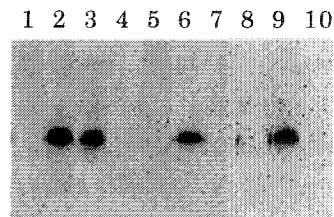


図2. コムギ・エギロプス属植物種におけるミトコンドリア *rpl5* 遺伝子の存在様式

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| 1 : <i>T. boeoticum</i> | 6 : <i>Ae. speltoides</i> |
| 2 : <i>T. araraticum</i> | 7 : <i>Ae. searsii</i> |
| 3 : <i>Ae. crassa</i> | 8 : <i>Ae. umbellulata</i> |
| 4 : <i>Ae. heldreichii</i> | 9 : <i>Ae. triaristata</i> |
| 5 : <i>Ae. uniaristata</i> | 10 : <i>Ae. kotschyi</i> |

ダイコンのミトコンドリアゲノムの構造に関する我々の研究において、*atp6* の 3'領域には正常型細胞質内に3つのタイプが存在すること、ならびに日本の栽培ダイコンは主としてこのうち2つのタイプに分けられることが明らかになった(山岸・佐々木 2003)。また、この2つとは別にシベリアを経由して日本に伝播したと考えられる第3のタイプが存在することが認められた(山岸・佐々木 2004)。そこでミトコンドリアのこの領域における変異を更に広範囲かつ詳細に解析することを目的に、ハツカダイコンおよびダイコン属野生種を材料に加えて塩基配列を決定し、日本の栽培ダイコンの塩基配列と比較した。

材料には、日本の栽培ダイコン 10 品種、中国の栽培ダイコン 2 品種、ハツカダイコン等のヨーロッパのダイコン 9 品種、ハマダイコン 1 個体および野生種 *R. raphanistrum* 4 個体を供試した。このうち6品種・個体はオグラ型の雄性不稔細胞質を、その他の個体は正常型の細胞質を持つことが明らかになっている。

各個体の幼苗から DNA を単離し、PCR によってミトコンドリア *atp6* の 3'領域を増幅した。得られた PCR 産物を用いてダイレクトシーケンスによって、この領域約 2kbp の塩基配列を決定した。

まず、この領域の構造を *Brassica* 属作物と比較するために、*B. napus* で決定されたシーケンスをもとに、*atp6* とその約 2 kbp 下流にある *trnQ* との間で PCR を行った。その結果、*Brassica* 属の植物およびオグラ型のダイコンでは同じサイズの PCR 産物が得られたのに対して、正常型のダイコンでは増幅断片が認められなかった(図1)。したがってミトコンドリアのこの領域に関してはオグラ型のダイコンと *Brassica* 属植物が類似した構造を持つものと考えられた。更に、正常型細

胞質のダイコンのシーケンスから設計したプライマーによる PCR では、ダイコンの品種間で増幅バンドのサイズに差異が認められた(図1)。

次に、オグラ型の細胞質を持つダイコンについて *atp6* の 3'領域における約 1900bp のシーケンスを決定した。これは従来示されているシーケンスをさらに約 1200bp のばすものであったが、供試した6個体のオグラ型個体の中には野生種を含め、塩基配列変異は全く認められなかった。一方、正常型の細胞質を持つ日本の栽培ダイコンで決定した 2000bp あまりのシーケンスは、2つのタイプ (Type I、II) に分かれた。ハツカダイコンはすべてそのうちの一方 (Type I) と同一のシーケンスを持っていた。

今回調査した野生種4個体のうち正常型細胞質の3個体のシーケンスは、いずれも栽培ダイコンのシーケンスとは異なっていた。このうち Type I と類似したシーケンスの個体が2個体存在したが、それらは互いに多数の塩基置換を持っていた。また Type II と野生種1個体との間には3か所の塩基置換が認められた。これらの結果から、栽培ダイコンのうちオグラ型細胞質を持つものについては、祖先野生種が特定された。これに対して、正常型細胞質の主要な2つのタイプに関しては、それらと同一のシーケンスを有する野生種は見出せず、より広範囲の材料での検索が必要であると考えられた。

以上、全体として日本の栽培ダイコンのミトコンドリアゲノムは *atp6* の 3'領域に関して4つのタイプに分類され、ハツカダイコンのシーケンスはそのうちの1つのタイプと一致した。この細胞質がどのように東西の栽培ダイコンに伝播したかは興味ある課題であり、今後更に詳しい調査が必要である。

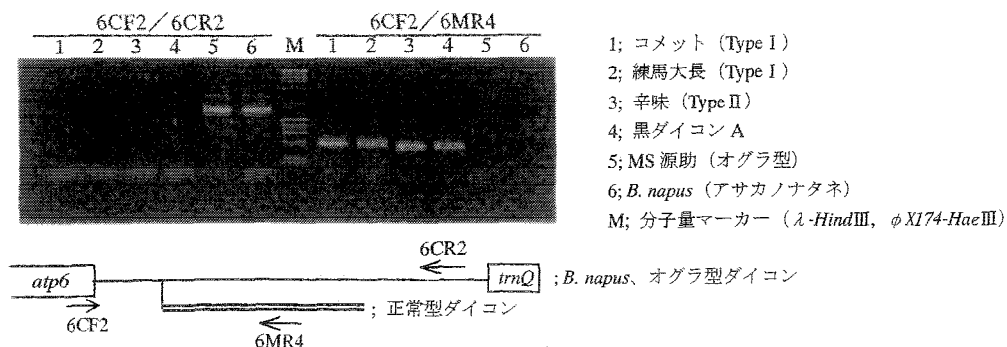


図1 ダイコンおよび *B. napus* におけるミトコンドリア *atp6* の 3'領域の構造と PCR によるその領域の増幅

- 1; コメット (Type I)
- 2; 練馬大長 (Type I)
- 3; 辛味 (Type II)
- 4; 黒ダイコン A
- 5; MS 源助 (オグラ型)
- 6; *B. napus* (アサカノナタネ)
- M; 分子量マーカー (λ -HindIII, ϕ X174-HaeIII)

817 ○尾崎昭子・石橋篤志・山岸 博（京都産大工） 日本のダイコンの起源と分化. XI. ダイコン属植物の葉緑体における *trnL* から *psbG* に至る領域の塩基配列多型
 Ozaki, A., A. Ishibashi and H. Yamagishi(Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.) Origin and differentiation of Japanese radishes. XI. Sequence polymorphisms among *Raphanus* plants in the region ranged from *trnL* to *psbG* of chloroplast.

栽培ダイコンは世界的に広く分布し、様々な用途で利用されており、特に日本における品種分化は著しい。しかしながら、栽培ダイコンの起源ならびに日本における品種分化の遺伝的基礎に関する知見は、最近まで必ずしも十分でなかった。一方、葉緑体ゲノム中の塩基配列多型は、多くの植物の種間・種内変異の解析に用いられて、栽培植物の起源の推定に貢献している。そこで、本実験では、ダイコン属の栽培・野生植物について、葉緑体の *trnL* から *psbG* に至る約 2 kbp の領域の塩基配列を決定し、種間・種内変異の解析を行った。その結果に基づきダイコン属の野生・栽培植物における系統関係を明らかにする指標を得ようとした。

ダイコン属に含まれる 3 種野生植物 (*R. landra*, *R. maritimus*, *R. raphanistrum*) 7 系統・8 個体、ハマダイコン 10 個体および栽培ダイコン 30 品種(各 1 個体) を供試した。このうち 8 個体はミトコンドリア DNA の解析から、オグラ型雄性不稔細胞質を持つことが確認された個体であった。各個体の幼苗より単離した DNA を PCR の鋳型とした。PCR は、*trnT*、*trnL*、*trnF*、*ndhI* および *psbG* の各遺伝子内に設計したプライマーを用いて行い、得られた PCR 産物を鋳型として、ダイレクトシークエンスにより、*trnL* から *psbG* に至る領域の塩基配列を決定した。

今回決定した領域には、供試個体間で 11 か所の塩基置換と、5 か所の SSR に関する変異が認められた。これらの結果、供試 48 個体のこの領域の大きさは 1988bp~1991bp の間で変異した。16 か所の変異に基づいて、調査個体の葉緑体は 8 個のハプロタイプに分類された (表 1)。オグラ型

雄性不稔細胞質を持つ個体はいずれも単一のハプロタイプ (Type 8) に含まれた。ハプロタイプ間の変異数は 1~8 と変動したが、1 つの組合せ (Type 1 と 2) を除いて、すべてのハプロタイプ間で塩基置換が認められた。またハプロタイプ間の変異の数によって、ダイコン葉緑体のタイプは大きく 3 群 (Type 1~5, Type 6 と 7 および Type 8) にまとめられた (表 1)。

調査個体のうち野生種 8 個体には 5 つのハプロタイプが存在したのに対して、ハマダイコンには 3 個、栽培ダイコンには 4 個のハプロタイプが認められた (表 2)。野生種の 5 つのタイプのうち、Type 8 (オグラ型) は、ハマダイコン・栽培ダイコンにも共通していたのに対して、他の 4 タイプは野生種のみ認められた。一方、栽培ダイコンでのみ観察されるタイプが 1 つ (Type 2)、ハマダイコンと栽培ダイコンに存在して、野生種に存在しないタイプが 2 つ (Type 4, 7) 観察された。

表 2 栽培・野生ダイコンにおける葉緑体 *trnL/psbG* 領域の塩基配列多型の分布

ハプロタイプ	野生種	ハマダイコン	栽培ダイコン
1	1	0	0
2	0	0	1
3	4	0	0
4	0	2	15
5	1	0	0
6	1	0	0
7	0	5	10
8	1	3	4
計	8	10	30

表 1 葉緑体 *trnL/psbG* 領域におけるハプロタイプ間の塩基配列変異^a

ハプロタイプ	ハプロタイプ						
	2	3	4	5	6	7	8
1	2(0-2)	4(1-3)	3(1-2)	4(2-2)	8(6-2)	7(5-2)	6(3-3)
2		4(1-3)	3(1-2)	4(2-2)	8(6-2)	7(5-2)	7(4-3)
3			3(2-1)	4(3-1)	8(7-1)	7(6-1)	7(5-2)
4				4(3-0)	7(7-0)	6(6-0)	6(6-0)
5					6(6-0)	5(5-0)	5(4-1)
6						1(1-0)	7(6-1)
7							6(5-1)

^a カッコ内の左側は塩基置換の数、右側は SSR 変異の数を表す。

ダイコンは世界各地で古くから広く栽培され、様々な用途で利用されている。栽培ダイコンの起源は従来不明確であったが、我々のミトコンドリア遺伝子における構造変異の解析から、いくつかの野生種から生じたものであることが明らかになった。本研究では、葉緑体ゲノムにおいて見出された塩基配列多型に基づいて RFLP を検出し、それによって多数の栽培・野生ダイコンの細胞質を分類した。その結果に基づき栽培ダイコンの多元性を裏づける証拠が、葉緑体ゲノムに関して得られたので報告する。

ダイコン属野生種3種 (*R. landra*, *R. maritimus*, *R. raphanistrum*) 22系統・118個体、ハマダイコン13集団・219個体、栽培ダイコン48品種80個体を供試した。各個体の幼苗より単離したDNAを鋳型に葉緑体の *trnL* から *psbG* に至る領域のPCRを行った。この領域には、ダイコン属植物の種間および種内で11か所の塩基置換が検出されたが(本大会の尾崎らの報告参照)、そのうち6か所はRFLPを生じるものであった。更にプライマーの改変によってもう1か所のSNPサイトの検出を可能にして、合計7か所のRFLPサイトを用いて解析を行った。

PCR-RFLPの結果に基づき、供試個体を分類したところ、シークエンスの結果からは8個のハプロタイプが検出されたが、PCR-RFLPではそのうち7つのタイプの間の識別が可能であった。SSR領域の塩基数に差がある2タイプ(Type1と2)の間では、RFLPは検出されなかった。また、これら以外の新しいハプロタイプは観察されなかった。

野生種のうち、*R. raphanistrum*には7つのタイプの個体がすべて含まれており、*R. maritimus*には5タイプが存在した。両種ともこのうちType3の個体の割合が高かった(表1)。また野生種22系統中6系統では系統内の個体間でタイプの差が検出された。

栽培ダイコンにおいては7つのタイプのうち4つのタイプが認められた。地域別に見ると、ヨーロッパの品種ではType4の個体が大半を占めたのに対し、中国と日本の品種ではType7の個体の割合が40%以上であった。更に、その他のタイプの頻度にも差が認められた(表1)。

一方、ハマダイコンにおいては3つのタイプが観察され、そのうちType8(オグラ型細胞質)の割合が高かった(表1)。また13集団のうち11集団は、集団内に2タイプ以上を含有していた。とりわけ3つのタイプ全てを含む集団が6割を占め、他の種類のダイコンとは異なり、著しく高い集団内多型性を示した。

以上のように、ダイコン属野生種、特に*R. raphanistrum*には、今回のRFLP分析で検出されたすべてのタイプが存在し、野生種内で細胞質が分化したことが示された。栽培種には、それらのうちの一部が共通に存在することから、野生種内で分化した細胞質を持つ植物が、それぞれ独立に栽培化されたものと考えられる。同様にハマダイコンにも*R. raphanistrum*の細胞質の一部が伝えられたと推定される。現在、シークエンスを決定することによりType1と2の識別を進めており、これらのタイプに属する栽培ダイコンの祖先野生種も特定されるものと期待される。

表1 栽培・野生ダイコンにおける葉緑体のハプロタイプの分布^a

種類 (品種・個体数)	ハプロタイプ							
	1, 2	3	4	5	6	7	8	
野生種 (118 個体)	11.9	40.6	13.6	16.9	5.1	1.7	10.2	
栽培ダイコン								
ヨーロッパ(16 品種)	22.2	0	66.7	0	0	11.1	0	
中国・日本(32 品種)	3.0	0	36.4	0	0	42.4	18.2	
ハマダイコン(219 個体)	0	0	27.4	0	0	33.3	39.3	

^a 供試品種又は個体中の各ハプロタイプの割合 (%) で表す。

葉緑体の遺伝子間領域には塩基配列変異が豊富に存在し、各種植物の細胞質の分化を解析するために有効であることが明らかになってきた。*Brassica* 属作物においても、葉緑体の *trnF/ndhJ* 遺伝子間領域にサイズの差が検出され (山岸ら 2004)、種間及び種内に塩基配列多型が存在することが示唆された。そこで *Brassica* 属の 3 基本種に含まれる作物を用いて、同領域の塩基配列を決定して、種間及び種内変異を明らかにした。

B. rapa に属する 11 品種・系統、*B. nigra* の 3 系統ならびに *B. oleracea* の 6 品種・系統の植物、合計 20 個体を供試した (表 1)。これらの植物の幼苗から DNA を単離し、PCR の鋳型として用いた。シロイヌナズナその他の植物で明らかにされている、葉緑体の *trnF* および *ndhJ* 両遺伝子内の塩基配列等を参考にして設計したプライマーを使って PCR を行い、得られた PCR 産物を用いてダイレクトシーケンスにより両遺伝子間領域の塩基配列を決定した。

trnF/ndhJ 遺伝子間領域には、供試個体全体で 21 か所の塩基置換と 12 か所の挿入/欠失が認められた。このうち、*B. nigra* に特異的に認められた塩基置換が 19 か所、挿入/欠失が 8 か所と大部分を占め、同種が *B. rapa* 及び *B. oleracea* とは大きく異なる葉緑体ゲノムを持つという、従来観察が裏付けられた。

調査個体のうち、*B. nigra* として導入された 'Ni-135' 及びに *B. oleracea* に属すると考えられる '青汁用ケール' は、いずれも *B. rapa* に含まれる多くの個体が示す塩基配列と完全に同一の配列を有していた。この 2 つの品種・系統の細胞質の由来には興味を持たれる。

供試個体の塩基配列は全体で 4 つのタイプに分類され (表 2)、この遺伝子間領域のサイズはタイプ間で 588bp ('Ni-108'等) から 729bp ('SaraonC-665')まで変異した。このサイズの変異の主要な原因として、*trnF* 内とその 3' 側に存在する 54bp のリピート数の差が注目された。

3 基本種のうち *B. oleracea* の植物では、上記の '青汁用ケール' を除いて、5 品種・系統が全て同一の配列を示し、種内の細胞質の分化は認められなかった。一方、*B. rapa* においては、'SaraonC-665' が同種の他の個体との間に 1 か所の塩基置換と 3 か所の挿入/欠失を有し、また '温海カブ' が他のカブ、ハクサイ等との間に SSR 領域における 1 塩基の挿入/欠失変異を示した。

以上、*Brassica* 属作物 3 基本種間には、*trnF/ndhJ* の遺伝子間領域において明確な塩基配列の変異が認められた。また 3 種のうち、*B. rapa* では種内分化の存在が示された。このうち特に '温海カブ' にのみ観察された SSR の変異については更に詳細に検討する必要がある。なお、現在周辺領域に範囲を広げて塩基配列の比較を行っている。

表 2 *Brassica* の 4 ハプロタイプ間の塩基配列変異*

	開田カブ ^a	温海カブ ^a	Sarson	野生ケール
Ni-108	20-11	20-12	21-11	19-11
開田カブ ^a		0-1	1-3	1-3
温海カブ ^a			1-3	1-3
Sarson				2-4

a 左側は塩基置換の数を、右側は挿入/欠失変異の数を示す。

表 1 葉緑体の *trnF/ndhJ* 間の塩基配列決定に用いた植物

<i>B. rapa</i> (A)	Toria-504*, Sarson C-665*, 丸葉壬生菜、野崎 2 号、温海カブ**, 開田カブ、金町小カブ**, 切葉天王寺カブ**, スグキナ、山カブ**, 野生カブ**
<i>B. nigra</i> (B)	Ni-108*, Ni-110*, Ni-135*
<i>B. oleracea</i> (C)	富士早生、野崎早生、ドシコ、カイラン、青汁用ケール、野生ケール O-169

*; 東北大学より導入、**; 生資研より導入、その他は市販又は保存種子を使用

第 23 回
日本植物細胞分子生物学会
京都大会・シンポジウム
講演要旨集

会期 2005 年 8 月 5 日（金）・6 日（土）

会場 京都大学吉田（南構内）ならびに本部キャンパス

本講演要旨集の著作権は日本植物細胞分子生物学会に帰属します。

タバコ葉緑体ゲノムへのフィトキレーチン (PC) 合成酵素
及び人工PC遺伝子導入の試み

西塚順子、寺地徹
(京産大・工・生物工)

カドミウムなどの重金属によって低濃度かつ広範囲に汚染されている土壌の修復には植物による環境修復 (ファイトレメディエーション) が有用であるといわれている。植物の中には重金属に対する耐性を持ち、重金属を植物体内に多く蓄積することができるハイパーアキュミレーターと呼ばれるものがある。しかしこのような能力を持つものは限られており、さらにバイオマスが小さいなどの問題点がある。そこで我々は重金属汚染土壌の修復能力を持つ植物を遺伝子組換え技術によって作出することを目的として研究を行っている。

植物の重金属耐性や蓄積には、フィトキレーチンというポリペプチドが重要な役割を果たしている。そこで、フィトキレーチン合成に関与する遺伝子 (*pcs*) をダイコン (*Raphanus sativus* cv. Comet) から単離した。さらに、酵素反応的に合成されるフィトキレーチンに対し、そのアミノ酸そのものをコードする人工遺伝子 (*pcg*) を合成した。

また、ファイトレメディエーションに用いる遺伝子組換え植物の作出には、導入遺伝子の封じ込めが容易である葉緑体形質転換法が適していると考え、フィトキレーチンに関連する上記遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入することを試みた。

タバコ葉緑体ゲノム由来の *psbA* または *rrn* のプロモーター (P_{psbA}, P_{rrn}) と *rps16* ターミネーター (Trp_{s16}) を持つ、葉緑体発現カセット (pPT; 図 1) を構築した。pPT に目的遺伝子を挿入した後、カセット全体を葉緑体形質転換用ベクター pPRV112A' へクローニングすることにより、葉緑体への導入コンストラクトを構築した (図 2)。これらのコンストラクトをパーティクルガン法によりタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SR1) の葉へ打ち込んだ。本講演ではその経過を報告する。

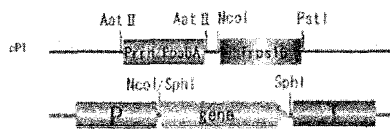


図 1. 発現カセット

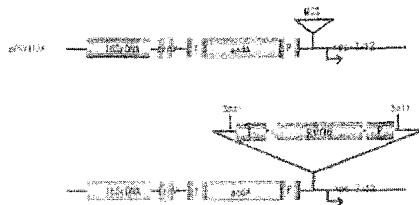


図 2. 葉緑体形質転換ベクター

稔性回復遺伝子として機能する
ダイコンの新規 PPR タンパク質を持つ組換えタバコの作出
吉見麻衣子、寺地徹
(京産大・工・生物工)

ダイコンには「オグラ型」と呼ばれる雄性不稔細胞質が存在する。この細胞質はダイコンのみならず、ナタネを含む多くのアブラナ科作物に雄性不稔を引き起こすことから、基礎と応用の両面で精力的に研究が進められており、オグラ型のミトコンドリアゲノムに特異的に存在するオープンリーディングフレーム (*orf138*) が雄性不稔の原因遺伝子として特定されている。一方、この *orf138* の働きを翻訳レベルで抑制し、稔性を回復させる核遺伝子 (稔性回復遺伝子、*Rf*) が、一部のダイコンに見いだされている。この稔性回復遺伝子は、一昨年、中国ダイコンよりクローニングされ、687 個のアミノ酸からなるタンパク質をコードすることから、*orf687* と命名された。この *orf687* の推定翻訳産物は、RNA 結合ドメインと考えられる PPR モチーフをタンデムに 16 個持ち、ミトコンドリアヘターゲティングされると考えられている。またこのタンパク質は、ミトコンドリア内で *orf138* の mRNA と結合し、その翻訳を阻害すると予測されている。

しかしながら、*Rf* として機能する *orf687* はオグラ型細胞質を持たないダイコンにも存在すること、オグラ型の雄性不稔を回復できないダイコンにも *Rf* の対立遺伝子である *rf* が存在し、*Rf* と *rf* のアミノ酸の違いはごく僅かであることなどから、*orf687* はもともとダイコンのミトコンドリアで働く産物をコードしており、その産物は稔性回復以外の機能を持つことが予想される。そこで今回、*orf687* の本来の機能を探ることを目的に、この遺伝子を強発現する組換えタバコを作出したので、その結果を報告する。

本実験では、まず *Rf* を持つハツカダイコン 'Comet' 及び *rf* を持つ日本のダイコン 'MS 源助' から全 RNA を調製し、RT-PCR により *orf687* の全長 cDNA を単離した。続いて両者の cDNA をそれぞれ形質転換ベクターの pBI121 にクローニングし、アグロバクテリウム法を用いて、タバコ (*N. tabacum* cv. SR1) に導入した。カナマイシンに耐性を示す植物を多数選抜した後、それらの一部を馴化、鉢上げし、現在までに 'Comet' の *Rf* を持つもの、'MS 源助' の *rf* を持つもの、コントロールである pBI121 のみを持つものを、それぞれ 25 個体、12 個体、8 個体、開花期まで育成している。これらの植物から全 DNA を調製し、PCR とサザン解析により導入 *orf687* 遺伝子の有無、ならびにコピー数を調査した。また、これらの葉とつぼみから全 RNA を調製し、導入 *orf687* 遺伝子の発現を RT-PCR により調べた。その結果、導入 *orf687* 遺伝子のコピー数や発現には、個体間で違いがみられたものの、いずれの形質転換体も表現型は正常で、*orf687* の強発現の影響は認められなかった。現在、*orf687* 産物のタンパク質レベルでの検出を試みている。今後、これら組換え体の自殖後代を用いて、*orf687* 産物がミトコンドリアの遺伝子発現にどのような影響を与えるか調査する予定である。

タバコ葉緑体ゲノムへの活性酸素消去系酵素遺伝子導入の試み

辻村真衣¹・林清音²・橋本絢子²・西塚順子²・寺地徹²(¹奈良先端大・バイオ、²京産大・工・生物工)

葉緑体の遺伝子組換え植物は、導入遺伝子の高発現が期待されること、個体間でサイレンシングや位置効果による遺伝子発現のばらつきが見られないことなど、通常の遺伝子組換え植物と比べて利点が多い。我々のグループでは、これまでタバコを材料に、シロイヌナズナの脂肪酸不飽和化酵素遺伝子、ダイズのフェリチン遺伝子などを葉緑体を持つ組換え体を作成してきた。今回、葉緑体の形質転換技術を利用して、ストレス耐性が強化された植物を作成することを目的に、活性酸素分子種 (ROS) 消去系酵素の遺伝子を葉緑体ゲノムに導入する実験を行なった。本講演では、タバコからのアスコルベートパーオキシダーゼ (APX)、デヒドロアスコルベートレダクターゼ (DHAR) 遺伝子の単離、両遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入可能なプラスミドコンストラクトの構築、パーティクルガン法によるこれらコンストラクトの植物への導入について述べる。

本実験の材料にはタバコ (*N. tabacum*) を使用した。葉などいくつかの器官から全 RNA を調製した後、逆転写酵素で cDNA を合成し、データベースに登録されているタバコの *apx* (AB022273 及び AB022274)、*dhar* (AY074787) 各 cDNA の配列をもとに設計したプライマーと KOD plus DNA 合成酵素を用いて RT-PCR を行なった。PCR 産物を大腸菌のプラスミドベクターにクローニングして塩基配列を確認した後、プラスミド DNA を鋳型に、両 cDNA の葉緑体トランジットペプチドをコードする領域を除いた部分を、制限酵素サイト (*Nco*I、*Sph*I) を導入したプライマーで増幅した。これらの増幅産物を、葉緑体で働くプロモーター (*PpsbA*) とターミネーター (*Trps16*) を持つ発現カセット (pPT) へクローニングした後、制限酵素消化によりプロモーターとターミネーターを備えた cDNA 断片を切り出し、これを葉緑体形質転換ベクター pPRV112A' のマルチクローニングサイトに挿入した。

構築した 2 種類のコンストラクトを大量調製し、タバコの葉へ *apx* は 66 回、*dhar* は 42 回、それぞれショットした。スペクチノマイシンを含む選択培地上で 1 ヶ月間以上培養を続けたところ、*apx* をショットした実験区からは 6 個、*dhar* の実験区からは 1 個の耐性シュートを得ることができた。シュートの培養を選択培地上で継続し、そこから再分化させた別の個体も含め、*apx* については現在までに、合計 7 つの個体を馴化、鉢上げしている。これらの植物から DNA を調製し、様々なプライマーペアを用いた PCR で導入遺伝子の有無を確認したところ、野性型 (SR1) とは違う増幅プロフィールを示すものがある一方で、葉緑体ゲノムへ *apx* が期待通り組込まれたものは見いだされなかった。今後、これらの個体における遺伝子の導入状態を詳細に解析するとともに、他の個体も馴化、鉢上げする予定である。

学術フロンティア推進事業研究成果報告書

プロジェクト2 「高等植物のオルガネラゲノム工学」

平成20年3月

発行 京都産業大学

〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

印刷 株式会社田中プリント



KYOTO SANGYO UNIVERSITY