

平成20年度～平成24年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 研究成果報告書

オルガネラゲノムの研究成果を 基盤とする有用植物の育成

平成25年5月

学校法人名 京都産業大学

大 学 名 京都産業大学

研究組織名 植物オルガネラゲノム研究センター

研究代表者 寺地 徹

(京都産業大学・総合生命科学部・教授)

平成 20 年度～平成 24 年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
研 究 成 果 報 告 書

「オルガネラゲノムの研究成果を基盤とする有用植物の育成」

平成 25 年 5 月

学校法人名 京都産業大学
大 学 名 京都産業大学
研究組織名 植物オルガネラゲノム研究センター
研究代表者 寺地 徹
(京都産業大学・総合生命科学部・教授)

〔 目 次 〕

◇ 研究成果報告書の発刊にあたって	1
◇ 研究組織	3
◇ プロジェクト研究成果概要	5
◇ 研究業績	169
◇ 講演要旨等	195

研究成果報告書の発刊にあたって

京都産業大学総合生命科学部

生命資源環境学科 教授

寺地 徹

はじめに

食料生産、環境、エネルギーなど、人類が直面する大きな問題の解決のために、植物のさらなる活用が切望されています。その中で遺伝子組換えは、植物が本来持っている優れた能力をさらに高めるため、あるいは植物に全く新しい機能を付与するための極めて有効な手段であり、将来の作物育種や品種改良に必要不可欠のものと考えられます。とりわけ、植物細胞中に存在する葉緑体やミトコンドリアが持つゲノム（オルガネラゲノム）を対象とする遺伝子組換えには、導入された遺伝子が母性遺伝を示すので、花粉を介して遺伝子を環境中に拡散するリスクが少ない、導入遺伝子のコピー数が多く高レベルの発現が期待される、導入遺伝子はジーンサイレンシングを受けず安定して発現するなど、通常の核遺伝子の組換えと比べ優れた点が多数存在します。そこで本研究プロジェクトでは、植物オルガネラゲノムの遺伝子組換え、ならびにオルガネラゲノムの人為的再編により、人類に有用な植物を育成することを目的に、さまざまな実験を行いました。

研究プロジェクトを開始するにあたり、初年度に研究スタッフの人選と雇用、人工気象器などの研究設備の整備、共同研究者の顔合わせなどを行って、京都産業大学における研究環境を整備しました。次年度以降、栽培タバコをモデルに、様々な葉緑体の遺伝子組換え実験を行いました。その結果、強光などストレスに耐性を持つ植物、葉の鉄含量が増大した植物、有用タンパク質を葉緑体内で大量に生産する植物など、ユニークな特性を持つ組換え体を多数作出することに成功しました。一方、タバコで得られた知見を、パンコムギ、レタス、トマトなど他の種（作物）に適用し、葉緑体の遺伝子組換え作物の作出を試みました。パンコムギとトマトでは、残念ながら組換え体を得るには至りませんでした。レタスで初の組換え体を得られたことは、誇れる成果と言っていいでしょう。また、植物分子生物学の基礎研究に良く用いられるタバコの近縁種、ベンサミアタバコにおいても、葉緑体の遺伝子組換えに関する効率的な実験プロトコルを確立できたことも特筆すべき成果です。

研究期間の後半では、中間評価のコメントに後押しされ、ミトコンドリアゲノムの研究にも注力しました。次世代シーケンサーによる解析をいち早く取り入れ、雄性不稔をもたらすダイコンやコムギ近縁種の細胞質が持つミトコンドリアゲノムの構造を最初に決定することができました。しかし、ミトコンドリアゲノムの再編にかかわる核遺伝子の研究は、想像以上に奥が深く、研究期間内ではダイコンの関連遺伝子をクローニングするにとどまったのが残念なところです。

本報告書では、本研究プロジェクトで実施した、いくつかの異なる実験の概要をまず挙げ、その詳細を未発表データも含めて記載しました（公表済みの学术论文がある場合は、そちらを掲載）。また、国内外の学会で発表したプロジェクトに関連する研究の成果も、各学会の要旨として掲載しています。なお研究成果を一般に広く公開するため、研究成果報告会を京都産業大学の総合生命科学部のシンポジウムとして、平成 25 年 3 月 8 日（金）に京都で開催したことも申し添えます。

最後になりましたが、プロジェクトの遂行に尽力して頂いた研究機構、総合生命科学部事務室の方々をはじめ関係各位に、研究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・総合生命科学部・教授（研究代表者）	寺地 徹
京都産業大学・総合生命科学部・教授	山岸 博
京都産業大学・総合生命科学部・教授	黒坂 光
京都産業大学・総合生命科学部・教授	佐藤 賢一
京都産業大学・総合生命科学部・准教授（平成 22 年 4 月～）	河邊 昭

学外共同研究者

京都府立大学・生命環境学部・教授	椎名 隆
北海道大学・大学院農学研究院・准教授	久保 友彦
ハルビン師範大学・教授	郭 長虹
バレンシアポリテク大学・研究員	Alejandro Ferrando Monleón
信州大学・農学部・助教（平成 22 年 1 月～） （平成 21 年 4 月～21 年 12 月まで PD）	北村 嘉邦

ポストドクター（PD）

京都産業大学・総合生命科学部	Gyawali Yadav Prasad
京都産業大学・総合生命科学部（平成 22 年 4 月～23 年 3 月） （現 岡山大学・環境生命科学研究科・野菜園芸学研究室・助教）	田中 義行

嘱託職員など

京都産業大学・総合生命科学部（平成 24 年 4 月～）	植村 香織
京都産業大学・総合生命科学部（～平成 24 年 5 月）	富岡 関子
京都産業大学・総合生命科学部（平成 22 年 4 月～23 年 3 月）	山下 陽子

◇ プロジェクト研究成果概要

1. ストレス耐性植物の育成

概要

強光や低温など様々なストレスにさらされると、植物の葉緑体内に有害な活性酸素分子種（ROS）が発生する。ROS は植物の生育へ悪い影響を与え、このことが作物の生産を損なう一因であることが知られていた。そこで本研究プロジェクトでは、葉緑体内のROS を効率良く消去することで、当該植物のストレス耐性を高めることを試みた。このROS 消去反応を触媒する酵素は複数存在するが、本研究プロジェクトでは、葉緑体内のアスコルビン酸-グルタチオン回路を構成する5つの酵素、すなわち、1) アスコルビン酸過酸化酵素 (*apx*)、2) デヒドロアスコルビン酸還元化酵素 (*dhar*)、3) モノデヒドロアスコルビン酸還元化酵素 (*mdar*)、4) グルタチオン還元化酵素 (*gr*) 及び5) スーパーオキシドディスムターゼ (*sod*) について、それぞれの酵素遺伝子を単独で、あるいは複数持つ、11種類の異なる組換え系統を作出し、そのストレス耐性を比較解析した。

その結果、これらの組換え系統は、いずれもROS を発生させる薬剤に強い耐性を示すことがわかり、一部のものは実際に強光ストレスに耐性を示すことが証明された。とりわけ、これらの酵素遺伝子をオペロン^{注1}の形で複数持つ組換え体は、葉緑体の遺伝子組換えのメリットを活かしたユニークなもので、例えば *apx-sod* 系統及び *apx-sod-mdar* 系統は、それぞれの遺伝子が単独で導入されたものより、さらにストレス耐性が高まることが理論的に予測される。組換え体の作出と系統化は順次進めており、現在、その後代を用いて詳細な解析を行っている。

^{注1} 複数の遺伝子を含む転写単位をオペロンと呼ぶ。すなわち1つのプロモーターの制御のもと、複数の遺伝子を含む mRNA 分子が転写される。複数の遺伝子は、通常、機能的に関連のあるタンパク質をコードしていることが多い。大腸菌のラクトースオペロンが有名。

1. はじめに

植物の遺伝子組換えには、アグロバクテリウム法やパーティクルガン法などいくつかの方法があるが、現在作出されている遺伝子組換え植物の多くは、核ゲノムに何らかの遺伝子が導入された、核の遺伝子組換え植物である。しかし、植物は核ゲノムだけではなく、オルガネラ的一种である葉緑体やミトコンドリアにも独自のゲノムを持っている。この葉緑体やミトコンドリアが独自に持つゲノム上の遺伝子の構成や発現様式は、基本的に原核生物型であるため、核ゲノムと比べ異なる点がいくつかあるが、現在オルガネラゲノムのうちの1つである葉緑体ゲノムの遺伝子組換え技術が、タバコやナスなど複数の植物で確立されている (Verma et al. 2008; Sighn et al. 2009)。葉緑体の遺伝子組換えは、パーティクルガン法を用いて行われるが、核ゲノムの遺伝子組換えと比べいくつかの利点が挙げられる。すなわち、葉緑体ゲノムの母性遺伝により遺伝子拡散の懸念が少ないことや、導入遺伝子は相同組換えにより葉緑体ゲノムの目的の位置に導入されるため、位置効果やジーンサイレンシングがないことなどである。また、導入遺伝子産物の強発現が期待される、複数の遺伝子をいわゆるオペロンとして一度に導入できるというのも利点である (Daniell et al. 2002)。その中で今回私は、特に後者2つの利点に着目し、ストレス耐性植物の作出に取り組んだ。

植物は動物と異なり、自らの意志で生育環境を選ぶことができないため、育成環境次第では常にストレスにさらされた状態となる。植物においてストレスとは、強光、乾燥、低温、紫外線などの環境的な要因から、除草剤、化学物質、大気汚染などの人為的な要因まで実に様々である。植物がこれらのストレスを受けると、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) が生じる。ROS は植物体内の生体物質や脂質と反応

することで、光合成の阻害、細胞の損傷、組織の壊死などを引き起こし、結果的に植物の生長は阻害される。一方で植物は、この ROS を段階的に無害な水へと変換させる代謝経路 (アスコルベート・グルタチオンサイクル) を備えている (図 1)。光合成が行われる葉緑体は、植物体内で最も多くの ROS が発生する場でもあり、アスコルベート・グルタチオン・サイクルも葉緑体内に存在する。この経路で中心的に働くのはアスコルビン酸で、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の反応により生じた有害な過酸化水素を、アスコルビン酸パーオキシダーゼ (APX) の働きで無害な水へと変換する。その際、基質である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) になるが、この MDA は、モノ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) の働きで再びアスコルビン酸へと還元される (Asada 2000; Asada 2006)。これまでの先行研究において、この経路で働く酵素の遺伝子をタバコの核ゲノムに導入した組換え体では、メチルピオロゲン処理など、ROS の発生を伴うストレスについて耐性が向上したことが報告されている

(Torsethaugen et al. 1997; Kwon et al. 2003; Eltayeb et al. 2007)。本研究では、葉緑体ゲノムの形質転換技術を用いてこれらの酵素を葉緑体内で強発現させることで、よりストレス耐性が向上した植物の作出を目的とした。

当研究室では、以前、活性酸素消去に関わる酵素の遺伝子を単独でタバコ (*Nicotiana tabacum*) の葉緑体ゲノムに組み込むことに成功しており、それぞれの酵素遺伝子を強発現させることで、除草剤の有効成分であるメチルピオロゲンや強光などストレスへの耐性を向上させることができることを確認している (林 2008)。しかしながら、この ROS 代謝経路では前の反応の生成物が後の反応の基質

となるため、どれか1種類の酵素活性を極端に上昇させると、経路全体のバランスが崩れ、植物に何らかの問題が生じることも考えられる。そこで私は、複数の遺伝子を一度に導入可能であるという、葉緑体の遺伝子組換え技術の利点を活かし、この経路内の複数の酵素遺伝子をオペロンとして葉緑体ゲノムに導入し、葉緑体内で同時に強発現させることで、経路全体を活性化し、ストレス耐性がより高まった植物を作出できるのではないかと考え、実験を行った。本修士論文では、主に経路の前半部分で働く酵素である、APX と SOD の遺伝子を *apx_sod* オペロンとして葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコについて、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解析を行い、組換え体における当該酵素の活性測定及びストレス耐性評価を行った。また、*apx_sod* の *sod* 遺伝子を *mdar* 遺伝子に換えた *apx_mdar* オペロン、さらには *apx_sod_mdar* の3つの遺伝子を連結させたオペロンを葉緑体ゲノムに導入した組換えタバコの作出にも成功した。これらの組換えタバコの特徴付けについても述べたい。

2. 材料および方法

2.1 コンストラクトの作成

a) *apx_sod*

apx_sod コンストラクトは、寺地研究室の卒業生である国方、中川 (2009) によって作成された。以下、その手順を簡単に述べる。タバコ (*Xanthi*) の葉から単離した葉緑体 CuZn 型 *sod* 遺伝子の cDNA を中間ベクターである pPT ベクター (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) に挿入することで pPT__*sod* を構築した。単離した *sod* 遺伝子のトランジットペプチド領域のすぐ内側に、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 と略す) (Staub and Maliga 1995) 及び制限酵素 *SphI* サイトを含むプライマーを設計した。また、コード領域の3'末端に制限酵素 *SphI* サイトを含むプライマーを設計した (表 1)。このプライマーペアを用い、pPT__*sod* を鋳型に、RBS を付加した *sod* 遺伝子を PCR により増幅した。PCR には KOD+ (Toyobo) を用い、94°C2 分の変性後、94°C30 秒、55°C30 秒、68°C1 分 30 秒を 20 サイクルの条件で増幅反応を行った。465bp の増幅 DNA 断片をゲルから回収し、*SphI* で消化した後、同じく *SphI* で消化した pPT__*apx* とライゲーションハイ (Toyobo) で結合し pPT__*apx_sod* を得た。

pPT__*apx_sod* を *Apal* で消化し、KOD (Toyobo) を用いて DNA の両端を平滑化した後、これを *Sall* で消化した。これら一連の処理で調製した *apx_sod* の発現カセットを、タバコの葉緑体形質転換ベクターである pPRV112A' の *SmaI/Sall* サイトにクローニングし、形質転換用コンストラクト (pPRV112A'__*apx_sod*) を得た。

b) *apx_mdar*

pPRV112A'__*apx* に RBS を付加した *mdar* 遺伝子を結合し、pPRV112A'__*apx_mdar* を構築した。まず、pPRV112A'__*apx* を直鎖状の状態を増幅させるために、inversPCR 用のプライマーとして、制限酵素 *XhoI* サイトを含むプライマー及び、制限酵素 *NheI* サイトを含むプライマーをそれぞれ設計した。また、*mdar* 遺伝子についてはトランジットペプチド領域を除いた5'末端側に RBS 及び制限酵素 *XhoI* サイトを含むプライマーを、3'末端側に制限酵素 *NheI* サイトを含むプライマーをそれぞれ設計した。表 2 に PCR に用いたプライマーと塩基配列を示す。pPRV112A'__*apx* を鋳型にした invers PCR では、KOD+を用いて、94°C2 分の変性後、94°C15 秒、60°C30 秒、68°C8 分 30 秒の反応を 20 サイクル行う条件で PCR を行い、直鎖状の pPRV112A'__*apx*

を増幅した。RBSを付加した *mdar* 遺伝子は、pPRV112A' *_mdar* を鋳型に、KOD+を用いて、94°C3分の変性後、94°C30秒、60°C30秒、68°C1分の反応を20サイクル行う条件でPCRを行い増幅した。ゲル回収により調製したそれぞれの増幅断片を、*DpnI*、*XhoI*、*NheI* で消化した後、両者をライゲーションハイ ver.2 (Toyobo) で結合し pPRV112A' *_apx-mdar* のコンストラクトを得た。

c) *apx-sod-mdar*

pPRV112A' *_apx_sod* に RBS を付加した *mdar* 遺伝子を結合し pPRV112A' *_apx_sod_mdar* を上記 b) と同様の方法で構築した。なお、pPRV112A' *_apx_sod* を鋳型とする *invers* PCR に用いたプライマーは表 3 に示す。

2.2 タバコ葉緑体の形質転換

MS (Murashige & Skoog) 培地 (スクロース 30g/L、ゲランガム 3g/L) を用い、プラントボックスで無菌的に約 1 カ月間生育させたタバコ (SR1) を葉緑体形質転換に使用した。シャーレ中の前培養培地 (MS-I~IV、0.1mg/L の α -ナフチル酢酸、1mg/L の 6-ベンジルアミノプリン、1mg/L のチアミン塩酸、30g/L のスクロース、3g/L のゲランガムをそれぞれ含む) の上に滅菌した濾紙を置き、クリーンベンチ内でタバコの葉を切り出し、葉の裏面が上になるように濾紙上に静置した後、葉全体が培地上の濾紙に密着するようにカミソリの刃で葉脈を切断した。その後 25°C の植物用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 ($\Phi 0.6\mu\text{m}$) の懸濁液 50 μL を、10 μg の葉緑体形質転換用ベクター DNA、10 μL の塩化カルシウム (2.5M)、20 μL のスベルミジン (0.1M) と共に、4°C で 30 分間ボルテックスを用いて攪拌し、金粒子に DNA を吸着させた。DNA を付着させた金粒子をエタノールで洗浄し、塩を除去した後に 30 μL 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。1350psi のラプチャーディスクを使用し、装置の最上段に金粒子を乗せたマクロキャリアーのホルダーを、撃ち込まれるタバコの葉は下から 3 段目に置いた。1 回の実験で 6 ショット行った (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 25°C の植物用インキュベーターに置き、約 48 時間後に葉をカミソリで細かく (5mm 角) 切り分け、スペクチノマイシン (500mg/L) を含む選抜培地 (スペクチノマイシン以外の組成は前培養培地と同じ) のシャーレ上に葉の表面が下側になるように静置した。培地上の細かく切り分けた葉を 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 3~8 週間培養し、組換え体の選抜を行った。なお、使用した装置及び器具は、全て Bio-Rad 社製のものであり、操作は装置に付属のマニュアルに従って行った (Daniell et al. 2001)。

2.3 PCR による導入遺伝子の確認

選抜培地上に静置した葉切片から再分化してきたシュートを、スペクチノマイシン (500mg/L) を含む MS 培地が入ったプラントボックスに移植し、これを幼植物へと生育させた。植物が適当な大きさになったとき、DNeasy plant mini kit (QIAGEN) を使用し、葉から全 DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型に 25 μL 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は、pPRV112A' が持つタバコ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') と目的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 (*aadA*2R:

5'-CTTCGGCGATAACCGCTTCACG

AG-3')と目的遺伝子に特異的なものの2通りの組み合わせである。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°C3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。この実験に用いたプライマー及びその塩基配列は表4にまとめた。

2.4 Southern 解析

2.3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できた個体について、組換え体の葉緑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にSouthern解析を行った。育成した葉緑体組換え体及び野生型タバコ(SR1)の葉からDNeasy plant mini kit(QIAGEN)を使用して全DNAを抽出し、その2µgをSacII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。プローブは2種類の方法で調製した。標的部位に特異的な葉緑体プローブは、野生型タバコの全DNAを鋳型にPCRを行い、葉緑体ゲノムの標的部位を含むDNA断片を増幅し、これをゲル回収した後、DIG labeling kit(Roche)のランダムヘキサマーを用いて標識した。また、各導入遺伝子に特異的なプローブは、PCR DIG Labeling Mix(Roche)を用いて標識した。実験に用いたプローブの位置と予想される検出断片のサイズを図2に、導入したオペロンおよび、各遺伝子のサイズを表5にそれぞれ記す。なお、ハイブリダイゼーションは68°Cで一晩行い、アルカリフォスファターゼの基質にCDP-Star(Applied Biosystems)を用いる発光法によりシグナル検出した。これら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検出は、全てマニュアル(Dig application manual for filter

hybridization, Roche)記載の方法で行った。

2.5 RT-PCR

タバコの葉より、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DNaseI処理により取り除いた後、この全RNA3µgを鋳型に、ランダムヘキサマー用いて、逆転写酵素SuperscriptII(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6)。

2.6 Northern 解析

タバコの葉より、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。このうち、全RNA3µgを、5%のホルムアルデヒドを含む1.25%のアガロースゲルを用いて電気泳動した後、ナイロン膜に転写した。2.5で使用したものと同一DNAプローブとDIG Easy Hyb(Roche)を用いて、50°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行い、CDP-Star(Applied Biosystems)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は、全てマニュアル(Dig application manual for filter hybridization, Roche)記載の方法によった。

2.7 マイクロアレイ解析

播種後3カ月が経過したタバコの葉からRNeasy plant mini kit(QIAGEN)を使用して全RNAを抽出した。このRNAとタバコ44KオリゴDNAマイクロアレイ(Agilent)を使用してマイクロアレイ解析を行った。なお、RNAのCy3標識、cRNAのハイブリダイゼーション及びマイクロアレイの各スポットの定量は北海道システム・サイエンスに委託した。

2.8 タンパク質調製

a) 全タンパク質抽出

はさみを用いて細かく刻んだタバコの葉 0.4g を氷で冷却した乳鉢に入れ、タンパク質抽出バッファー (50mM リン酸カリウム水溶液 pH7.6、0.1mM EDTA、0.1%(v/v)Triton X-100、5mM アスコルビン酸) を 2ml (葉 0.2g に対して 1ml の抽出バッファーを加える) 加えて、乳棒ですりつぶした。抽出物を 14,000 rpm、25 分間、4°C で遠心し、上清を回収して、SDS-PAGE / Western 解析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、RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を使用して行った。

b) 葉緑体の単離

はさみを用いて細かく刻んだタバコの葉 1.5g を、50mL 遠沈管 (Falcon) に入れ、Medium I Buffer 25mL を加えた後に、ホモジナイザーを用いて、液中で破碎した。その後、破碎液を 3,000rpm、10 分間、4°C で遠心し、無傷の葉緑体を沈殿させた。遠心後の破碎液から上清を捨て、沈殿を洗浄するために 1mL の Medium I Buffer に懸濁し、懸濁液を、6,000rpm、3 分間、4°C で遠心し再度葉緑体を沈殿させた。遠心後の懸濁液から上清を捨て、沈殿を 1mL の Medium III Buffer に再懸濁することで、ここまで無傷な状態で集めた葉緑体を破裂させた。この 1mL の溶液中、500 μ L は total 葉緑体として残し、残り 500 μ L をストロマ画分とチラコイド画分に分離させるため、6,000rpm、3 分間、4°C で遠心後、上清をストロマ画分、沈殿を 500 μ L の Medium III Buffer に懸濁しチラコイド画分とした。葉緑体タンパク質の定量は BSA をスタンダードに、RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) を使用して行った。なお、Buffer の組成は表 7 に示す。

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 は 12.5%、SOD は 15%) を使用して同時に泳動し、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、25 分間 10V 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及び検出は、ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) を使用して行った。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) を 5000 倍に希釈して使用した。SOD の検出には、ホウレンソウ葉緑体型 CuZn-スーパーオキシドディスムターゼの一次抗体 (南九州大学の金松 澄雄先生より分譲) 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。

2.10 酵素活性の測定

a) APX 活性測定

APX 活性の測定は、吸光度計 U-3310 (日立) のカイネティックモードを使用して、室温で行った。3mL 石英セルに活性測定用バッファー (50mM リン酸カリウム水溶液 pH7.0、0.1mM EDTA) 2.925mL、100mM アスコルビン酸 15 μ L、100mM 過酸化水素水 30 μ L、試料 (i.e. タンパク抽出液) 30 μ L を入れ、よく混合した後に、すぐに 290nm ($\epsilon_{290}=2.8\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) の吸光度の減少を経時的に測定し、APX による反応液中の還元型アスコルビン酸の酸化量を決定した。なお、反応液に加える試料は吸光度の減少速度に応じて液量や濃度を調節し、最終的に試料の液量に応じて活性測定用バ

ッファーの液量を合計 3mL になるように調節した。
なお、APX の活性は、以下の計算式で算出した。

(1 分間あたり吸光度変化) $\times 10^3$

$\div \{2.8 \times (\text{タンパク質濃度}[\mu\text{g}/\mu\text{L}]) \times (\text{測定に用いた液量}[\mu\text{L}])\}$

b) SOD 活性測定

SOD 活性の測定は、SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用い、Bio-Rad 680XR マイクロプレートリーダーを使用して行った。まず、1.5mg/mL に調製した試料を元にして、1 (希釈なし)、1/5、1/5²、1/5³、1/5⁴、1/5⁵ の濃度になるよう Dilution buffer を用いて希釈した。96 穴マイクロタイタープレートのウェルに WST working solution 200 μL 、Enzyme working solution 20 μL を入れ、各濃度の試料を 20 μL 加えてよく混合し、20 分間 37°C でインキュベートした後に 450nm の吸光度を測定した。また同様に、3 種類の blank (blank1: WST working solution + Enzyme working solution、blank2: WST working solution + 試料、blank3: WST working solution のみ) についても 450nm の吸光度を測定した。なお、正確な値を得るため、1 つのサンプルにつき 3 個のウェルを使用し測定を行った。得られた 450nm の吸光度の値を以下の式に当てはめ、各濃度における SOD 活性値 (阻害率%) を求めた。SOD 活性値 =

$$\frac{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

上記の式で求めた各濃度の値を用いて阻害曲線を作成し、WST 法における「WST 還元量の 50% 阻害を示すサンプル溶液 20 μL に含まれる SOD 量を 1 単位(U)とする」という定義に基づいて 1mL あたりのユニット数を求めた。なお、SOD 活性測定は全て付属のプロトコールに従って行った。

2.11 クロロフィル蛍光の測定

PAM2500 (Walz) を使用し、タバコの葉におけるクロロフィル蛍光の値 (以下、Fv/Fm) を測定した。

測定には、植物体の上部から数えて同一の位置の葉を用い、測定前に 30 分間の暗処理を行った。

2.12 光合成速度の測定

タバコの葉における炭素固定並びに蒸散の値を計測し、光合成速度を求めた。測定には Li-6400XT (LI-COR) を使用し、同装置内のプログラム (A-Ci カーブ) を用いて CO₂ 濃度の条件を 600ppm、400ppm、200ppm、0ppm の 4 段階に設定し自動測定で行った。その他の条件は、25°C、1000 $\mu\text{mol}^2\text{s}^{-1}$ に設定した。

2.13 気孔数の計測

野生型及び組換え体の葉の裏側における気孔の数を計測した。測定には、スンプ法を応用して行った。セメダイン (セメダイン) を葉の裏側に塗り、乾燥させた後に葉から剥がした後、顕微鏡 ECLIPSE TS100 (Nikon) を用いて観察を行い、1mm² 当たりの気孔の数を計測した。

2.14 除草剤によるストレス処理

a) メチルピオロゲン (パラコート) 処理

24 穴のマイクロタイタープレート (Iwaki) にメチルピオロゲン水溶液の希釈系列 (0 μM 、0.2 μM 、0.4 μM 、0.6 μM 、0.8 μM 、1.0 μM 、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 1.2cm 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 25°C、157 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を連続照射する条件下で 48 時間静置し、クロロフィルが脱色する様子を観察した。

b) 残存クロロフィル量の測定

メチルピオロゲンに対するストレス耐性を定量化するため、a) の 48 時間経過後のリーフディスクを用いて残存クロロフィル量の測定を行った。リーフディスクを 1 枚ずつ 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、リーフディスクに残存するクロロフィルを溶出した。溶出し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, Thompson et al. 1989）を用いてクロロフィル含量を算出した（以下の式では、 A_{647} 、 A_{664} 、 A_{750} でそれぞれの吸光度で測定した値を示す）。

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

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

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

$$A_{750}) + 17.67 \times (A_{647} - A_{750})$$

メチルピオロゲンに浸し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。

2.15 強光によるストレス処理

a) 強光条件下での育成

順化させた播種後 2 ヶ月の組換え体 T1 世代及び野生型タバコを 25°C、500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ （明期 16 時間、暗期 8 時間）の光を照射する条件に設定した植物用インキュベーターで 13 日間育成し、観察を行った。

b) 強光処理による Fv/Fm 値の変化

強光に対するストレス耐性を定量化するために、強光条件下におけるタバコの葉の Fv/Fm 値の変化を観察した。Fv/Fm 値の測定には PAM2500 (Walz) を使用した。順化させた播種後 2 カ月の組換え体 (AS3a、AS3b) T2 世代及び野生型タバコ各 5 個体ずつを閉鎖系温室内で 1 カ月間 25°C、61 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ の環境下で育成した後、25°C、680 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を連続照射する条件下に移し、0 時間、24 時間、48 時間と Fv/Fm 値の測定を行った。また、比較対照として *apx* 遺伝子を単独で葉緑体ゲノムに持つ組換え体 (A2) も材料に加え、同時に実験を行った。

2.16 低温によるストレス処理

a) 低温処理による Fv/Fm 値の変化

低温に対するストレス耐性を定量化するため、低温条件下におけるタバコの葉の Fv/Fm 値の変化を観察した。Fv/Fm 値の測定には PAM2500 (Walz) を使用した。順化させた播種後 2 カ月の組換え体 T2 世代及び野生型タバコ各 4 個体ずつを 10°C、160 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を連続照射する条件下に移し、24 時間ごとの Fv/Fm の値を計測した。強光ストレスと同様に、比較対照として組換え体 (A2) も実験に加えた。

2.17 塩によるストレス処理

a) 塩を含む培地での発芽率の検証

NaCl を含まない通常の 1/2 濃度の MS 培地（スクロース 15g/L、ゲランガム 3g/L）と、150mM、300mM の濃度の NaCl をそれぞれ含む 1/2 濃度の MS 培地を作成した。タバコの種を 14 粒ずつ、それぞれの培地に無菌的に播種した。植物用インキュベーター内に静置し、2 週間後の発芽率を観察した。

b) 塩を含む培地での植物の育成

NaCl を含まない通常の 1/2 濃度の MS 培地（スクロース 15g/L、ゲランガム 3g/L）と、NaCl を 200mM 含む 1/2 濃度の MS 培地を作成した。NaCl を含まない 1/2 濃度の MS 培地に播種し、植物用インキュベーター内で 3 週間経過した幼植物を、それぞれの培地を含んだプラントボックスに 20 個体ずつ移した後、植物用インキュベーター内で育成し、17 日後の植物体の様子を観察した。また、塩に対するストレス耐性を定量化するために、植物体の生重量を計測した。

2.18 各種組換え体間におけるストレス耐性の比較

メチルピオロゲン処理によるストレスについて、

これまで作出されている様々な組換え体間で耐性の比較を行った。比較を行った組換え体は、いずれも葉緑体ゲノムにアスコルベート・グルタチオンサイクルの酵素遺伝子を単独で、もしくはオペロンとして導入されたものであり、*apx*(A2)、*mdar*(M1)、*apx_sod*(AS3a、AS3b)、*apx_sod_mdar*(ASM1a、ASM1b)の6系統である。野生型及びそれぞれの組換え体T₁世代の葉から切り取った直径1.2cmのリーフディスクを、1.0μMのメチルピオロゲン水溶液（0.1%のTween20を含む）に浸し、植物用インキュベーター内で25°C、157μmolm⁻²s⁻¹の光を連続照射する条件下で48時間静置した後、リーフディスクの残存クロロフィル含量を測定した。なお、残存クロロフィル含量の測定は2.14 b)に従って行った。

3. 結果

3.1 パーティクルボンバードメント

本研究では *apx_sod*、*apx_mdar*、*apx_sod_mdar* の各オペロン持つ葉緑体形質転換ベクター (pPRV112A'_{apx_sod}、pPRV112A'_{apx_mdar}、pPRV112A'_{apx_sod_mdar}) 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打ち込んだ。各ベクターを用いたパーティクルボンバードメントの結果を表8にまとめた。

3.2 APX_SOD 系統について

3.2.1 葉緑体形質転換体

本研究では T₀ 世代の段階で合計4系統の葉緑体形質転換体を得た（以下、AS1、AS2、AS3、AS4系統と呼ぶ）。AS1系統は、T₀ 世代の段階で雄性不稔性を示し、自殖種子を得ることができなかつたので、SR1の戻し交雑により次世代(BC₁)を得た。この系統は、SR1の戻し交雑により現在も維持されているが、花器形成に異常が認められるものがあるなど形質の発現が安定せず、本修士論文の解

析には使用しなかつた。AS2系統については、自殖により次世代(T₁)の種子を得ることができたが、T₁世代を解析した結果、導入遺伝子を確認することができず、本修士論文の解析には使用できなかつた。AS3系統は、選抜培地上で再分化してきたシュートの段階で2つに切り分け、AS3a及びAS3bの2系統とした。この2系統は、いずれも自殖により次世代を得ることができた。本修士論文の *apx_sod* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換え体の解析には、この2系統を用いた（図3）。AS4系統については、自殖により T₁ 世代の種子を得ることができたが、系統として確立できた時期が遅かつたため、本修士論文の実験には使用しなかつた。

3.2.2 Southern 解析

組換え体 T₂ 世代及び野生型タバコから抽出した全DNAを用いてSouthernハイブリダイゼーションを行った。*apx* 並びに *sod* 遺伝子に特異的なプローブを使用したハイブリダイゼーションでは、野生型を除く全ての個体に5.2kbのバンドが検出された。また、*apx* プローブでのみ約1.2kbの弱いシグナルが検出された。葉緑体DNAプローブを使用したハイブリダイゼーションでは、野生型の個体に1.5kbのバンドのみが観察されたのに対し、組換え体では全ての個体に導入遺伝子特異的なプローブで検出されたものと同じ5.2kbのバンドと、シグナルが弱い3本のバンド（野生型と同じ1.5kbのバンドと、それ以下のサイズのバンド2本）が検出された（図4）。

3.2.3 Northern 解析

播種後5カ月の組換え体 T₂ 世代及び野生型タバコから抽出した全RNAを用いて行ったNorthernハイブリダイゼーションでは、*apx* 及び *sod* のいずれの遺伝子プローブでも、組換え体にも、予想される1.7kbのバンドが観察された（図5）。また、

これらのプローブでは、大きなサイズ（約 3.0kb）のバンドも同時に検出された。

3.2.4 マイクロアレイ解析

野生型及び *apx-sod* 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ 2 系統（AS3a、AS3b）の組換え体から調製した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。野生型と AS3a、AS3b 系統の間で発現変動を比較すると、AS3a 系統で 5 倍以上の変動がみられた遺伝子は、反応したプローブ 33823 個の約 0.55% で、そのうち上昇したものが 122 個、減少したものが 63 個だった（図 6a）。同様に AS3b 系統では、反応したプローブ 33599 個の約 0.46% に変動がみられ、上昇 131 個、減少 25 個だった（図 6b）。

野生型と 2 系統の組換え体間で発現が変動した遺伝子の内容を詳しくみると、AS3a、AS3b 系統で発現量が上昇した遺伝子の上位 20 個のうち、AS3a、AS3b 系統の両方に共通して発現上昇が認められる遺伝子は 11 個だった（表 9）。このうち、一番発現量が高かったのは葉緑体 CuZn 型 *sod* 遺伝子で、両系統とも約 180 倍を超える値を示した。その他、両系統に共通して発現が上昇した遺伝子には、PR1a、PR4b、N-like タンパク質など、病害抵抗性に関連する遺伝子が多く含まれていた。一方、組換え体で発現量が減少した遺伝子の上位 30 個に注目したが、遺伝子の変動幅も大きくはなく、両系統に共通するのは 3 遺伝子のみだった（表 10）。しかし、その中でチラコイド型 *apx* 遺伝子の発現量が約 5 分の 1 に減少しているという結果が得られた。

3.2.5 SDS-PAGE 及び Western 解析

a) APX

組換え体 T₂ 世代及び野生型タバコから調製した全タンパク質 15µg を用いて行った 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 7a）。これと同様のゲルを用い、APX 抗体を使用して検出した 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 7b）。

b) SOD

全タンパク質を用いた SDS-PAGE 及び Western 解析では組換え体と野生型の間に違いがみられなかった（データ未掲載）。そのため、葉緑体を単離し、葉緑体タンパク質のみを用いて解析を行った。組換え体 T₂ 世代及び野生型タバコから調製した葉緑体タンパク質（ストロマ画分 8µg、チラコイド画分 34µg）を用いて行った SDS-PAGE 後の CBB 染色では、組換え体のストロマ画分において a) で観察された約 33kDa のバンド以外に違いはみられなかった（図 8a）。これと同様のゲルを用い、SOD 抗体を使用して検出を行った Western 解析では、組換え体と野生型のいずれにもストロマ画分に約 19kDa と約 16kDa の 2 本のシグナルが観察された。ここで約 16kDa のシグナルは約 19kDa のシグナルよりも強く反応していることから、目的とする葉緑体 Cu/Zn 型 SOD であり、約 19kDa のシグナルは細胞質型 Cu/Zn 型 SOD であると思われる。組換え体の約 16kDa に観察されたシグナルは、野生型のものよりも強かった。また、チラコイド画分には、全ての個体で約 55kDa のシグナルが観察された（図 8b）。

3.2.6 酵素活性測定

a) APX

播種後 4 カ月の組換え体及び野生型タバコ各 5 個体の葉からそれぞれ抽出したタンパク質を用いて行った APX 活性測定では、野生型と比べ組換え体 AS3a 系統は平均約 48 倍、AS3b 系統は約 60 倍高い活性を示した（図 9）。なお、図 9 は野生型の APX 活性を 1 とした際の相対値で表されている。

b) SOD

APX 活性測定に用いたものと同じタンパク質を用いて行った SOD 活性測定では、組換え体には野生型と比べ約 2.5 倍の SOD 活性上昇が認められた (図 10)。なお、図 10 は APX 活性と同様に野生型の SOD 活性を 1 とした際の相対値で表されている。

3.2.7 クロロフィル蛍光の測定

播種後 3 か月の組換え体 T2 世代及び野生型各 4 個体を用いて測定を行った結果、野生型の Fv/Fm の値が平均 0.805 であったのに対し、組換え体は 0.760 (AS3a) と 0.757 (AS3b) であり、野生型よりも約 0.05 低下していた (図 11)。

3.2.8 光合成速度の測定

3.2.7 と同様の個体を用いて光合成速度を測定した結果、CO₂ 濃度が 200ppm では組換え体と野生型の間に大きな差は見られなかったが、大気中とほぼ同じ CO₂ 濃度の 400ppm では両者の間に差がみられ、600ppm ではさらにその差は広がった (図 12)。

3.2.9 気孔数の計測

野生型及び AS3a、AS3b 系統各 3 個体を用いて葉の裏側における 1mm² 当たりの気孔の数を計測した結果、野生型では平均 96 個であったのに対し、AS3a、AS3b 系統ではそれぞれ、平均 89 個、99 個と野生型と組換え体の間に大きな違いは観察されなかった (図 13)。

3.2.10 除草剤によるストレス処理

a) メチルピオロゲン (パラコート) 処理

播種後 5 か月の組換え体及び野生型の各 4 個体を用いて実験を行った結果、野生型タバコのリーフディスクは、0.2μM のメチルピオロゲン処理から濃度が高くなるにつれ、脱色面積が大きくなり、1.0μM の処理ではリーフディスクの緑色の部分がほとんど無くなるまで脱色されたものも観察され

た。一方、組換え体のリーフディスクは、0.2μM のメチルピオロゲン処理ではほとんど脱色されず、1.0μM の処理においても野生型に比べ緑色の部分が多く残っていた (図 14)。

b) 残存クロロフィル量の測定

a) で処理したリーフディスクの残存クロロフィル含量を測定し、相対値を比較した結果、各濃度のメチルピオロゲン処理において、組換え体には野生型よりも 2 倍以上クロロフィルが残存していた (図 15)。

3.2.11 強光によるストレス処理

a) 強光条件下での育成

強光処理により、野生型は組換え体に比べ生育が遅れ、葉の一部が白く変色した (図 16 の矢印)。一方、組換え体は葉が分厚くなったが、野生型のように葉の変色は観察されなかった (図 16)。

b) 強光処理による Fv/Fm 値の変化

強光処理を行って 24 時間後に計測した Fv/Fm 値は、野生型で平均値が 0.66 から 0.43 まで 0.23 減少したのに対し、AS3a、AS3b 系統では約 0.65 から 0.51 まで 0.14 減少しただけであり、両者の減少量の間には 0.09 の差がみられた。48 時間後に計測した Fv/Fm 値では、野生型と AS3a、AS3b 系統の差が僅かに縮まったものの、両者の減少量の間には依然として約 0.07 の差が観察された。

また、A2 系統は葉に斑入り模様が出ているため、平常時の Fv/Fm の値は他の系統と比べて低いものの、強光処理開始時から 48 時間経過後までの Fv/Fm 値の減少率で比較すると、野生型の 32% に対し、A2 系統は 16% であり、野生型よりも低い値を示した。一方、AS3a、AS3b 系統の減少率は約 18% であり、A2 系統と同程度であった (図 17)。

3.2.12 低温によるストレス処理

a) 低温処理による Fv/Fm 値の変化

低温処理開始時点において、野生型は AS3a、AS3b 系統よりも、Fv/Fm 値が 0.05 高かった。そのため、低温処理開始時から 72 時間経過後までの Fv/Fm 値の減少率では、野生型の 71% に対し、AS3a、AS3b 系統では約 60% と、両者の間に僅かな差が観察された。また、48 時間以後に計測した値では AS3a、AS3b 系統の中に野生型よりも高い値を示す個体もみられたが、野生型と AS3a、AS3b 系統の間に大きな違いはなかった。また、強光ストレスの際と同様に A2 系統と AS3a、AS3b 系統及び野生型を Fv/Fm 値の減少率で比較すると、A2 系統は 24 時間後の測定時において他の 3 系統よりも減少率は低かったが、72 時間後に測定した値ではほとんど差はみられなかった (図 18)。

3.2.13 塩によるストレス処理

a) 塩を含む培地での発芽率の検証

NaCl 濃度が 150mM、300mM と高くなるにつれ、組換え体及び野生型の種子の発芽率は減少したが、両者の間に大きな違いは観察されなかった (図 19、20)。

b) 塩を含む培地での生育

200mM の NaCl を含む 1/2 濃度の MS 培地では、通常の 1/2 濃度の MS 培地で生育するよりも全ての個体で著しく生育が阻害されていたが、組換え体と野生型の間に大きな違いは見られなかった (図 21)。

3.3 APX_MDAR 系統について

葉緑体形質転換体

本研究では、独立に 4 系統の葉緑体形質転換体を得た (以下、AM1、AM2、AM3、AM4)。その中で、AM4 系統の葉に軽度の斑入り模様が観察された (図 22)。導入遺伝子の有無を確認するために、プライマー T/low と mdarR2、及びプライマー

aadA2R と apxF2 の組合せで PCR を行ったところ、予想される大きさの断片 (3.2kb 及び 3kb) が組換え体でのみ増幅した (図 23)。

3.4 APX_SOD_MDAR 系統について

3.4.1 葉緑体形質転換体

選抜培地上で再分化した形質転換シュートを切り分け、同一のシュートに由来する組換え体を 2 系統 (ASM1a、ASM1b) 得た。同一のシュート由来でありながら、ASM1b 系統には、葉の斑入り模様が観察された (図 24)。

3.4.2 Southern 解析

組換え体 T₁ 世代及び野生型タバコの葉から抽出した DNA を用いて行った Southern 解析では、オペロンとして導入した 3 つの遺伝子のそれぞれに特異的なプローブを使用したハイブリダイゼーションで、野生型を除く全ての個体にシグナルが検出された。しかし、組換え体間で検出されたシグナルのサイズに違いがみられた。ASM1a 系統では予想される 6.6kb の位置にシグナルが検出されたのに対し、ASM1b 系統では 6.6kb の位置にほとんどシグナルは検出されず、異なるサイズのシグナルが複数観察された。葉緑体 DNA プローブを使用した結果では、野生型に 1.5kb のシグナルが観察されるのに対し、ASM1a 系統では導入遺伝子に特異的なプローブを使用した際と同じ 6.6kb の位置にシグナルが検出され、ASM1b 系統でも導入遺伝子に特異的なプローブを使用した際と同じ複数のシグナルは観察されたが、予想される 6.6kb の位置にシグナルはほとんど観察されなかった (図 25)。

3.4.3 RT-PCR

オペロンのそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーペアによる RT-PCR では、T₁ 世代の組換え体全てに予想されるサイズ (apx:0.6kb、sod:0.5kb、

mdar : 0.7kb) の DNA 断片が増幅した (図 26-1)。また、オペロンの転写産物として期待される apxF2 と mdarR2 の組合せでも、組換え体のみ予想されるサイズ (2.2kb) の DNA 断片が増幅した (図 26-2)。

3.4.4 除草剤によるストレス処理

播種後 3 ヶ月の組換え体 T₁ 世代及び野生型タバコ各 3 個体ずつの葉を用い、0.2 μ M、0.6 μ M、1.0 μ M の希釈系列で行ったメチルピオロゲン処理では、1.0 μ M のメチルピオロゲン水溶液において野生型から調製したリーフディスクは、緑色の部分がほぼすべて脱色されたのに対し、組換え体から調製したリーフディスクのほとんどのものは周囲が僅かに脱色されただけであった (図 27)。

メチルピオロゲン処理後のリーフディスクを用いた残存クロロフィル含量測定では、0.2 μ M のメチルピオロゲン処理において組換え体と野生型の間に大きな違いはみられなかったが、メチルピオロゲンの濃度が 0.6 μ M、1.0 μ M と高くなるにつれ、両者の間の差が大きくなり、1.0 μ M では組換え体の残存クロロフィル含量は野生型よりも 2 倍以上高かった (図 28)。

3.5 各種組換え体間におけるストレス耐性の比較

いずれの組換え体も、野生型と比較してメチルピオロゲン処理後の残存クロロフィル含量は高かった。しかしながら、組換え体間で比較すると、オペロンを導入することによるメチルピオロゲン耐性の上昇は観察されなかった。また、*apx* 遺伝子を導入遺伝子を持つ系統と *mdar* 遺伝子のみを導入した系統の間では、ASM1b 系統は M1 系統の値を下回ったものの、残りの系統はいずれも 2 倍以上クロロフィル残存量が高かった (図 29-1、2、図 30)。

4. 考察

4.1 APX-SOD 系統について

本修士論文の「はじめに」でも述べたように、アスコルベート・グルタチオンサイクルでは、経路内の各々の酵素が単独で反応を進めるというよりは、むしろ各々の酵素反応が連なって進行することで、効率的な ROS 代謝が行われている。その中で、今回 *apx_sod* オペロンとして葉緑体ゲノムに導入した APX と SOD は、一連の反応の中で、前半部に位置づけられる。

SOD は葉緑体内で発生したスーパーオキシドを還元し、過酸化水素に変換する酵素である。タバコには、SOD が持つ金属補因子によって分類される、3 つのアイソザイムが存在する。すなわち、Mn 型 (MnSOD)、Fe 型 (FeSOD) 及び Cu/Zn 型 (Cu/ZnSOD) である。これらの *sod* 遺伝子は全て核にコードされているが、翻訳産物の局在場所が異なっている。一般的に MnSOD はミトコンドリア、FeSOD は葉緑体チラコイド膜にそれぞれ局在し、Cu/ZnSOD は細胞質と葉緑体のストロマの 2 か所に局在している。タバコでは葉緑体に 2 種類の SOD が局在しているが、それらの発現や活性は葉の発達段階で異なり、FeSOD は発達のどの段階の葉でも活性が観察されるのに対し、葉緑体 Cu/ZnSOD は未成熟な葉でのみ活性が観察されるという報告もある (Camp et al. 1997)。これまでの先行研究において、葉緑体に局在する FeSOD 及び葉緑体 Cu/ZnSOD の遺伝子をそれぞれ核ゲノムに導入し、翻訳産物を葉緑体で発現させた組換え体では、塩、乾燥、及びパラコート処理などの酸化ストレスに対する耐性上昇が報告されている (Gupta et al. 1993; Kurepa et al. 1997; Badawai et al. 2004)。

SOD の反応により生じた H₂O₂ は、APX によってアスコルビン酸の酸化とともに H₂O に変換される。APX はヘムを活性中心に持ち、高等植物においては細胞質型 (cAPX)、マイクロボディ型 (mAPX)、ミトコンドリア型 (mitAPX)、葉緑体型のチラコイド型 (tAPX) 及びストロマ型 (sAPX)

の5つのアイソザイムが存在する (Sigeoka et al. 2002)。また、葉緑体型の APX は植物の種によって、tAPX と sAPX が異なる遺伝子にコードされているものと、1つの遺伝子の選択的スプライシングにより両者が作られるものがあるが、タバコは後者であり、同一の遺伝子から選択的スプライシングによって tAPX と sAPX ができる (Ishikawa and Shigeoka 2008)。一方で、APX は植物内の ROS 代謝において重要な役割を担っているが、アスコルビン酸が欠乏した条件下では不安定であるという報告もある (Chen and Asada 1989)。*apx* 遺伝子についても、これまでの先行研究では、核に cAPX の遺伝子を導入し葉緑体で発現させた組換え体では、塩、乾燥及び酸化ストレスに対する耐性が向上したという報告がある (Torsethaugen et al. 1997; Badawi et al. 2004)。さらに、葉緑体 Cu/Zn 型 SOD と cAPX の2種類の遺伝子を核に導入し、両方の酵素を葉緑体で発現させた組換えタバコでは、それぞれの酵素を単独で導入した組換え体よりも、さらにメチルピオロゲンに対する耐性が上昇したという報告もある (Kwon et al. 2002)。今回導入を試みた sAPX と葉緑体 Cu/Zn 型 SOD は、共に葉緑体のストロマに局在する。私は、両酵素が同じ場所で同時に強発現されることで、より効率的に ROS 代謝が行われるだろうと考え、本修士論文で *apx_sod* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ新たな組換え体を作出した。

本研究で作出した組換え体 (AS3a、AS3b) では、導入した両酵素の活性上昇が観察された。しかしながら、APX の活性は組換え体で約 55 倍も上昇したのに対し、SOD の活性は 2.5 倍の上昇にとどまった。これは、SOD が強発現してしまうと、植物にとって有害な H₂O₂ が大量に出来てしまうため、植物に備わっている何らかの抑制機構が働いたからかもしれない。しかしながら、核ゲノムに葉緑体 Cu/Zn 型 SOD の遺伝子を導入し、葉緑体で発現

させた組換えタバコでは、SOD の活性が 2.5~4.5 倍になったという報告もあり (Badawai et al. 2004)、SOD 活性の上昇の余地はまだあると考えられる。今回 APX と SOD の活性上昇に著しい差があったのは、*sod* 遺伝子が構築したオペロンの後半部に位置し、APX に比べ翻訳の効率が落ちたためとも考えられる。今後、リボソーム結合配列を変更することで、翻訳効率を高めて SOD 活性をさらに上昇させることができるか、検討する必要がある。また組換え体は、野生型と比べ、強光及びメチルピオロゲンに対するストレス耐性が明らかに高まっていた。一方、組換え体の低温ストレスに対する耐性の上昇は僅かであり、塩 (NaCl) ストレスに対する耐性は全く上昇しなかった。このことから、sAPX と葉緑体 Cu/ZnSOD の強発現は、葉緑体における ROS の発生に直接関わるストレスに対して、より有効なものではないかと考えた。今後、乾燥、重金属によるストレスや、複合的なストレスについても組換え体の耐性が上昇しているか調べる必要がある。また本研究では、*apx* 遺伝子を単独で葉緑体ゲノムに導入した組換えタバコ (A2 系統) の強光及び低温ストレスへの耐性も同時に調べたが、A2 系統と AS3a、AS3b 系統の間に大きな違いは観察されなかった。

ストレス耐性が上昇した一方で、通常条件下で生育させた場合、組換え体は野生型に比べクロロフィル蛍光値 (Fv/Fm) 及び光合成速度が減少していることが明らかになった。組換え体及び野生型の葉における 1mm² 当たりの気孔数に違いがみられなかったことから、両者の光合成能の違いが葉の構造の違いによるものだと考え難い。そのため、通常条件下で育成した場合、組換え体の葉緑体には何らかの負荷がかかっていることが示唆される。ストレス条件下では強発現した酵素が優位に働くが、通常条件下では導入遺伝子産物の過剰生産が負荷をかけていることも考えられよう。今後、導

入遺伝子のプロモーターを変更し、現状よりも発現を抑えた組換え体を育成し、そのストレス耐性及び植物体への影響がどのように変化するか調べていく必要がある。

4.2 マイクロアレイ解析

導入遺伝子の葉緑体における強発現が、核遺伝子の発現にどのような影響を与えるか網羅的に調査するために、*apx_sod* オペロンを葉緑体ゲノムに導入した組換え体 (AS3a、AS3b) 及び野生型の全 RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。AS3a、AS3b 系統では予想通り、導入遺伝子である葉緑体 Cu/Zn 型 SOD の発現量が野生型と比べ約 180 倍に上昇していたが、もう 1 つの導入遺伝子である sAPX の発現量の上昇は確認することができなかった。この結果は、組換え体には APX/SOD 遺伝子の mRNA が大量に蓄積しているというノーザン解析の結果と大きく矛盾する。アレイに sAPX を示す適当なプローブ配列が載っていないか、あるいは組換え体の APX/SOD 遺伝子の mRNA が何らかの理由で sAPX プローブへ結合しにくかったなどの理由が考えられるが、詳細は不明である。また意外なことに、AS3a、AS3b の両系統ともに tAPX の発現が 5 分の一に減少しているという結果が得られた。前述のように、タバコでは 1 つの遺伝子の選択的スプライシングにより sAPX と tAPX が作られるので、アレイのプローブがもし sAPX と tAPX の共通部分から作られていた場合、今回の実験結果の矛盾は拡大する。一方、プローブが両酵素に特異的な部分で作られていたならば、この実験結果は、sAPX の蓄積が tAPX の発現を抑制する何らかの機構の存在を示唆する。このことについてもさらに検討が必要である。

AS3a、AS3b 系統で発現が上昇した遺伝子には、導入遺伝子の他に、PR タンパク質などの病害抵抗性に関連する遺伝子が多く含まれていた。APX のみ

を強発現させた A2 系統では、野生型と比較した際に、病害抵抗性に関連する遺伝子の上昇はほとんどみられないことから (未掲載データ)、これは SOD を葉緑体に導入した影響と考えられる。植物の防御応答において、NADPH オキシダーゼを介した活性酸素の一過的な産出がその後の抵抗性反応を誘導するためのシグナルとなっており、生成された活性酸素はすぐに SOD によって H_2O_2 に変換される。この H_2O_2 はスーパーオキシドと比較して非常に安定で、細胞間も移動できることから、 H_2O_2 が抵抗反応のシグナル分子の役割を担うと考えられている。今回、SOD を葉緑体で強発現させたことにより、一時的に植物体内の H_2O_2 の濃度が上昇し、そのシグナルで病害抵抗性関連遺伝子の発現が上昇したのではないかと考えている。

なお本修士論文にデータは示していないが、A2 系統では野生型と比較して葉緑体 Cu/Zn 型 SOD の発現が 6 倍に上昇していた。AS3a、AS3b 系統における 180 倍には及ばないものの、この結果は、アスコルベート・グルタチオンサイクル内の 1 つの酵素活性が変化すると、それが経路内の他の酵素の活性にも影響を及ぼす場合があることを示唆する。実際、細胞質 Cu/Zn 型 SOD 遺伝子を核に導入し葉緑体で発現した組換えタバコでは、SOD の活性上昇と併せて APX の活性が上昇する一方、GR の活性が減少したという報告もある (Badawai et al. 2004)。これまでに作出した、アスコルベート・グルタチオンサイクルの酵素遺伝子を単独で、もしくはオペロンとして葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコについても、導入した遺伝子にコードされる酵素以外の、この経路の酵素の活性が変化していないか詳細に検討する必要がある。

apx_sod オペロンを葉緑体ゲノムに導入した 2 つの組換え体 (AS3a、AS3b) で、野生型と比較して共通に発現が上昇した遺伝子には、病害抵抗性に関連する遺伝子の他にも、転写因子 IIF、

isoleucyl-tRNA 合成酵素など、現時点では遺伝子の発現変動を、導入遺伝子の強発現と単純に関連付けられないものがあった。また、Gene ID BP526273 及び TC50859 のように機能未知の遺伝子も含まれていた。今後、定量 RT-PCR 等を用いて、マイクロアレイ解析で得た結果の裏付けを行うと共に、これらの遺伝子個々のより詳しい解析を進める必要がある。

4.3 APX_SOD_MDAR 系統について

本修士論文で、アスコルベート・グルタチオンサイクル内の3つの酵素遺伝子を連結させたオペロンを構築するため、*apx_sod* オペロンの後方に連結させる3つ目の酵素遺伝子として選んだのは MDAR である。MDAR は、植物において細胞質、ミトコンドリア及び葉緑体に局在している (Hossain et al. 1984; Hossain and Asada 1985; Obara et al. 2002)。葉緑体に局在している MDAR はストロマで生成され、2つの役割を担っている。1つ目は、APX が H_2O_2 を水に変換する際に酸化されたアスコルビン酸 (MDA) を還元する働きであり、2つ目は、基質である MDA が欠乏している際に、光還元により生じた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)。これまでに、MDAR 遺伝子を核ゲノムに導入し、細胞質で強発現させた組換えタバコでは、オゾン、塩、ポリエチレングリコールに対する耐性向上が観察されたという報告がある (Eltayeb et al. 2007)。

今回、APX、SOD 及び MDAR の3つの遺伝子をオペロンとして連結させることで、少なくともコンストラクト上では ROS 代謝を循環させる形を作り上げることができた。また、導入した酵素はいずれも葉緑体のストロマに局在するため、*apx_sod* オペロンの場合と同様、このオペロンから作り出される酵素の一連の反応はストロマ内で進行すると考えられる。葉緑体内で MDAR を強発現させる

ことで、同じく葉緑体内で強発現した SOD、APX の連続した反応により酸化された MDA のリサイクル効率を上げることができ、ROS 代謝の一連の流れが円滑に循環すれば、効率的な ROS 代謝が可能ではないかと考えた。先行研究では、MDAR と同じく ASA のリサイクルを担う DHAR を、SOD、APX とともに核ゲノムに導入し、葉緑体で発現させた組換えタバコが作出されている。この組換えタバコは、野生型とはもちろん、SOD、APX の2つの遺伝子を核に導入し葉緑体で発現させた組換えタバコと比較しても、酸化ストレスへの耐性が上昇し、植物体内の ASA : DHA において、ASA の割合が 1.2 倍から 1.5 倍増加したという報告がなされている (Lee et al. 2007)。本研究で作出した、*apx_sod_mdar* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコでは、導入した酵素遺伝子が発現していること、またこの組換えタバコは野生型と比較してメチルピオロゲンに対するストレス耐性が上昇していることが確認できた。しかし前述の *apx_sod* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコで、APX の活性上昇に比べてオペロン後半の SOD の活性上昇が低く止まったことを考慮すると、この系統についても、まずはオペロンの後半の SOD、MDAR の酵素活性を測定する必要がある。

また、ASM1a、ASM1b は、同一のシュートを切り分けて作られた系統であるにも関わらず、葉の斑入り模様が ASM1b にのみ観察された。各導入遺伝子に特異的な DNA プローブを用いた Southern 解析の結果では、ASM1a、ASM1b の間にシグナルの違いが観察されたこともあり、斑入り模様の原因についても興味を持たれる。

4.4 APX_MDAR 系統について

これまで私の研究室では、*apx_dhar*、*mdar_dhar*、*apx_sod*、*apx_sod_mdar* などのアスコルベート・グルタチオンサイクルの複数の酵素遺伝子を、オペ

ロンとしてタバコの葉緑体ゲノムに導入してきた。現段階では、遺伝子のどの組合せが植物のストレス耐性向上に最適であるか、体系的に比較されていないが、本修士論文では新たな選択肢として APX_MDAR を葉緑体ゲノムにもつ組換えタバコの作出に成功した。4.3 で述べたように、MDAR を APX と併せて強発現させることで、ASA のリサイクル効率を上げ、単独で APX を葉緑体で強発現した個体よりも、ROS 代謝が効率良く循環すると考えた。現時点では、この組換え体について、目的遺伝子の導入が確認されただけである。今後、他の組換えタバコと同様に各種表現型の解析を進める必要がある。

4.5 ストレス耐性

本修士論文で主に解析を進めた、*apx_sod* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換え体は、強光及びメチルピオロゲン処理によるストレスに対して明確な耐性を示し、これらのストレスに対する耐性を定量化することができた。メチルピオロゲンは、除草剤の有効成分であり、光化学系 I から電子を奪うことで自らが還元され、奪い取った電子が酸素と反応することで、葉緑体内に ROS を発生させ、細胞を損傷する。また、強光によるストレスは、主に葉緑体の光化学系 II に影響を与える。強光による過剰なエネルギーを処理するために反応中心クロロフィルが励起三重項クロロフィルへ遷移することで、過剰なエネルギーは若干失われるが、大半は励起三重項クロロフィルへ保存される。この励起三重項クロロフィルの定常濃度が高くなるにつれ、光化学系 II の電子伝達速度が低下し、過剰なエネルギーを処理しきれなくなることで ROS が発生する。併せて、励起三重項クロロフィルは三重項酸素分子と反応することで、非常に強い酸化作用を持つスーパーオキシドを生成するため、強光によるストレスは結果として細胞損傷の原因

となる。

この 2 つのストレスは、葉緑体における酸化ストレスであり、アスコルベート・グルタチオンサイクルの酵素遺伝子を葉緑体で発現させると、酸化ストレスに対する耐性が上昇すると予測される。今回、低温耐性については、野生型と組換え体の間に僅かな違いしか観察されなかった。しかし上記のことを踏まえると、低温条件下ではカルビンサイクルの機能が低下し、余剰エネルギーにより ROS が発生すると考えられ、理論上組換え体は低温によるストレスに対しても耐性が向上しているはずである。今後実験条件を検討し、再度低温耐性に関する実験を行いたい。

組換え体間でストレス耐性を比較するために、複数の組換え体を用いて強光、低温及びメチルピオロゲンによるストレスへの耐性実験を行った。強光、低温耐性では、*apx_sod* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換え体 (AS3a, AS3b) 及び *apx* 遺伝子を単独で葉緑体ゲノムに持つ組換え体 (A2) の計 3 系統を比較したが、AS3a, AS3b と A2 の間に大きな違いは観察されなかった。また、メチルピオロゲン耐性については、計 6 系統の組換え体を用いて実験を行った。実験に用いた組換え体は、いずれも葉緑体ゲノムにアスコルベート・グルタチオンサイクルの酵素遺伝子を単独、あるいはオペロンとして導入した組換えタバコであり、*apx* (A2)、*mdar* (M1)、*apx_sod* (AS3a, AS3b)、*apx_sod_mdar* (ASM1a, ASM1b) の計 6 系統である。いずれの組換え体も野生型との比較では、メチルピオロゲン耐性が上昇していたが、オペロンを導入することによる、さらなる耐性の上昇は観察されなかった。本修士論文の実験では、いずれのストレスに対しても、遺伝子を単独で導入する場合とオペロンを導入する場合で有意な差は観察されなかった。これは導入したオペロンの後半部に配置された SOD や MDAR の翻訳効率が低いことに主な原因がある

と考えている。また、AS3a、AS3b では通常条件下で育成した場合、クロロフィル蛍光 (Fv/Fm) や光合成速度の低下がみられた。高すぎる酵素活性が、葉緑体に何らかの負荷をかけている可能性もある。今後、プロモーター及びリボソーム結合配列の検討を行うことで、さらに効率よくストレスを処理する植物を育成することが可能だと考える。本修士論文で実験することはできなかったが、組換え体が重金属や複合的なストレスに対する耐性を持つか、また砂漠などの極端な環境下及び一般的な自然環境下でどのような生育をするかについても興味を持たれる。

5. おわりに

本修士論文では、*apx_sod*、*apx_mdar* 及び *apx_sod_mdar* の各オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコを作成することができた。特に、APX、SOD、MDAR の3つの遺伝子をオペロンとして葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコは初めて作出されたものである。これらの組換え体について、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などを種々の分子学的・生化学的方法で調べた。全ての系統について十分なデータを揃えることはできなかったが、本修士論文で主に解析を進めた、*apx_sod* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコでは、導入した2つの遺伝子がコードする酵素の活性の上昇、及びメチルピオロゲンや強光によるストレスについて耐性が上昇していることを定量化することができた。メチルピオロゲンや強光によるストレスへの耐性上昇は予想通りであったが、低温ストレスへの耐性の上昇は本修士論文の段階では確認できていない。また、各オペロンの後半に配置された SOD の活性上昇が APX の活性上昇に比べ低かった。このことは、オペロンの性質を十分に活かしてきれていないとも言え、リボソーム結合配列を変更する等、オペロン

後半の酵素遺伝子の活性を上昇させるために何が必要かを検討したい。また、これまでに当研究室で作出した、葉緑体ゲノムにアスコルベート・グルタチオンサイクルの酵素遺伝子を単独で、もしくはオペロンとして導入した組換えタバコの一部である、6系統の組換え体を用いて、メチルピオロゲンによるストレスへの耐性を比較したが、オペロンを導入することの優位性は確認できなかった。本修士論文ではストレス耐性を上昇させるという目的の一部は達成できたが、複数の遺伝子をオペロンとして葉緑体ゲノムに導入することを最大限に活かすには、オペロン後半部の酵素活性をさらに上昇させねばならないという新たな課題が見出された。今後、これまでに作成した組換えタバコの世代を進めると共に、組換え体間での様々なストレスへの耐性を比較することで、どのようなコンストラクトがストレス耐性上昇に最も効果的であるのかを検証したい。

6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、APXに関する実験にご協力して下さった京都府立大学大学院生命環境科学研究科 森田 重人博士、SODの抗体を提供していただいた南九州大学健康栄養学部 金松 澄雄博士、実験を進めるにあたりご協力して下さった京都産業大学総合生命科学部 桶川友季博士、植村 香織さんに心からの感謝の意を表す。そして、全ての面においてご指導頂いた京都産業大学総合生命科学部 寺地 徹教授、山岸博教授に感謝の意を表す。

7. 引用文献

- Asada K. (2000). *The water-water cycle as alternative photon and electron sinks*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**(1402): 1419-31.
- Asada K. (2006). *Production and scavenging of*

- reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiol **141**(2): 391-6.
- Badawi G.H., 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**(2): 231-238.
- Badawi G.H., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kawano N., Tanaka K. & Tanaka K. (2004). *Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (Nicotiana tabacum) chloroplasts*. Plant Science **166**:919-928
- Chen G. X. & Asada K. (1989). *Ascorbate Peroxidase in Tea Leaves: Occurrence of Two Isozymes and the Difference in Their Enzymatic and Molecular Properties*. Plant Cell Physiol **30**(7): 987-998
- Daniell H., Muthukumar B. & Lee S.B. (2001). *Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection*. Curr Genet **39**(2): 109-116.
- Daniell H., Khan M.S. & Allison L. (2002). *Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology*. Trends Plant Sci **7**(2): 84-91.
- Eltayeb A.E., Kawano N., Badawi G.H., Kaminaka H., Sabekata 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**(5): 1255-64.
- Gupta A.S., Webb R. P., Holaday A.S. & Allen R.D. et al. (1993). *Overexpression of Superoxide Dismutase Protects Plants from Oxidative Stress (Induction of Ascorbate Peroxidase in Superoxide Dismutase-Overexpressing Plants)*. Plant Physiol **103**(4): 1067-1073.
- Hossain M. A. & Asada K. (1985). *Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme*. J Biol Chem **260**(24): 12920-6
- Hossain M. A., Nakano Y. & Asada K. (1984). *Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide*. Plant Cell Physiol **25**(3): 385-395
- Ishikawa T. & Shigeoka S. (2008). *Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms*. Biosci Biotechnol Biochem **72**(5): 1143-54.
- Kurepa J., Herouart D., Van Montagu M. & Inze D. (1997). *Differential expression of CuZn- and Fe-superoxide dismutase genes of tobacco during development, oxidative stress, and hormonal treatments*. Plant Cell Physiol **38**(4): 463-70.
- Kwon S.Y., Choi S. M., Ahn Y.O., Lee H.S., Lee H.B., Park Y.M. & Kwak S.S. (2003). *Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene*. J Plant Physiol **160**(4): 347-53.
- Kwon S. Y., Jeong Y. J., Lee H.S., Kim J.S., Cho K.Y., Allen R.D. & Kwak S.S. (2002). *Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress*. Plant, Cell and Environment **25**: 873-822.
- Lee Y.P., Kim S. H., Bang J.W., Lee H.S., Kwak S.S. & Kwon S.Y. (2007). *Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three*

- antioxidant enzymes in chloroplasts. Plant Cell Rep **26**(5): 591-8.
- 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**(8): 821-829.
- 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**(7): 697-705.
- Porra, R. J., Thompson W. A. & Kriedemann P.E. (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**(3): 384-94.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tomoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y. & Yoshimura K. (2002). *Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes*. J Exp Bot **53**(372): 1305-19.
- Singh A.K., Verma S.S. & Bansal K.C. (2009). *Plastid transformation in eggplant (Solanum melongena L.)*. Transgenic Res **19**(1): 113-9.
- Staub J.M. and Maliga P. (1995). *Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids*. Plant J **7**(5): 845-8.
- Torsethaugen G., Pitcher L. H., Zilinskas B.A. & Pell E.J. (1997). *Overproduction of Ascorbate Peroxidase in the Tobacco Chloroplast Does Not Provide Protection against Ozone*. Plant Physiol **114**(2): 529-537.
- Van Camp W., Inze D. & Van Montagu M. (1997). *The regulation and function of tobacco superoxide dismutase*. Free Radical Biology & Medicine **23**(3):515-520.
- Verma D., Samson N. P., Koya V. & Daniell H. (2008). *A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts*. Nat Protoc **3**(4): 739-58.
- 林 清音 (2008) 「活性酸素を消去する酵素の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出」
修士論文

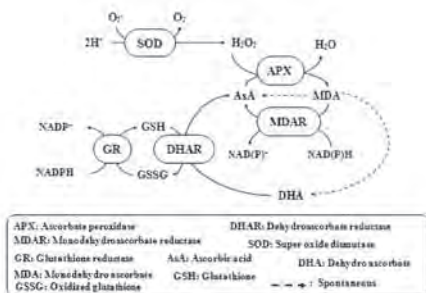


図1. アスコルベート・グルタチオンサイクル

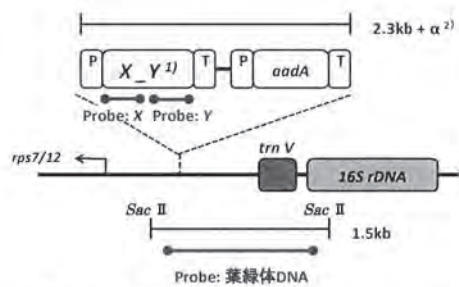


図2. Southern解析に用いたプローブ

1) X_Y: *apx_sod*, *apx_mdar*, *apx_sod_mdar*

2) α : 導入遺伝子のサイズ (表5)



図3. 形質転換タバコ (*apx_sod*) 及び野生型タバコ (SR1)

AS3a: 組換え体AS3a系統 (T_2)

AS3b: 組換え体AS3b系統 (T_2)

SR1: 野生型タバコ (SR1)

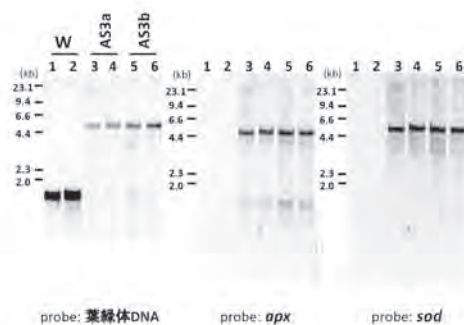


図4. Southern解析 (APX_SOD)

1,2: 野生型 (SR1)

3,4: 組換え体 AS3a 系統 (T_2)

5,6: 組換え体 AS3b 系統 (T_2)

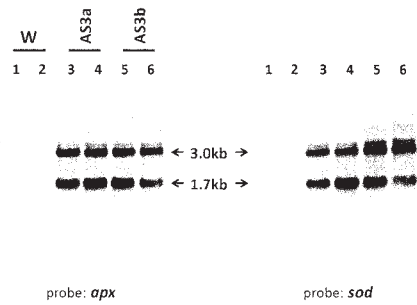


図5. Northern解析 (APX_SOD)

1,2: 野生型(SR1)
 3,4: 組換え体 AS3a系統 (T₂)
 5,6: 組換え体 AS3b系統 (T₂)

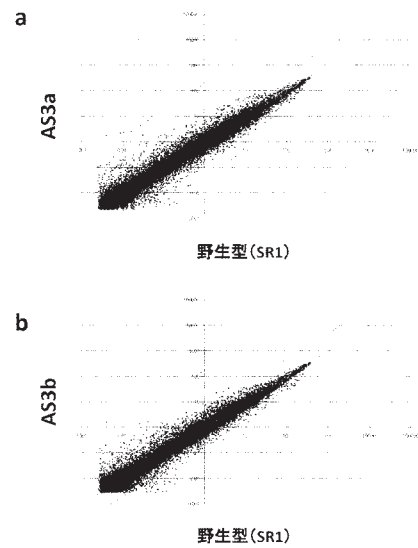


図6. スキャッタープロット¹⁾(野生型 vs AS3系統)

a: 野生型 vs AS3a、b: 野生型 vs AS3b

1) 赤線は5倍の変動を示す

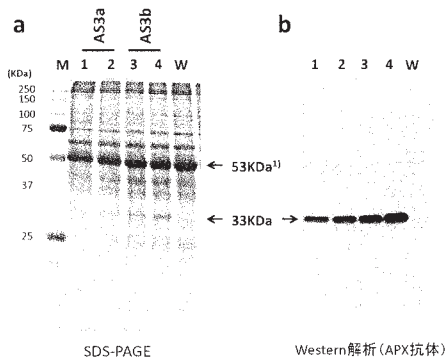


図7. SDS-PAGE 及び Western解析 (APX)

a: SDS-PAGE、b: Western 解析

1) RuBisCO Large subunit (53KDa)

M: Molecular weight
 1,2:組換え体 AS3a系統 (T₂)
 3,4:組換え体 AS3b系統 (T₂)
 W: 野生型 (SR1)

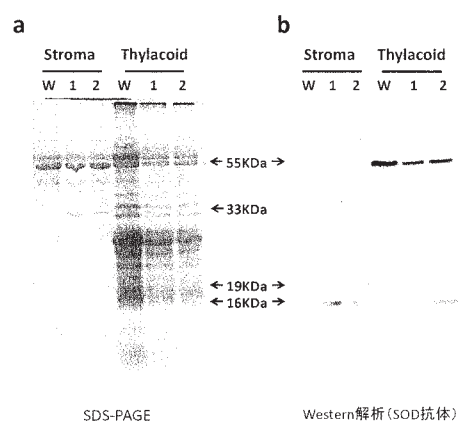


図8. SDS-PAGE 及び Western解析 (SOD)

a: SDS-PAGE、b: Western 解析

W: 野生型 (SR1)
 1:組換え体 AS3a系統 (T₂)
 2:組換え体 AS3b系統 (T₂)

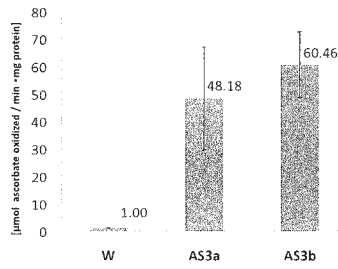


図9. APXの活性測定²⁾ (APX_SOD)

1) 野生型のAPX活性を1とした際の相対値で示す

W: 野生型 (SR1)

AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)

AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

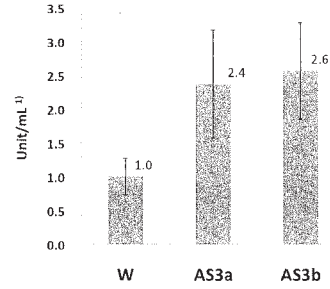


図10. SODの活性測定²⁾ (APX_SOD)

- 1) WST還元50%阻害を示すサンプル溶液 20 μLに含まれるSOD量を1単位(U)とする
- 2) 野生型のSOD活性を1とした際の相対値で示す

W: 野生型 (SR1)

AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)

AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

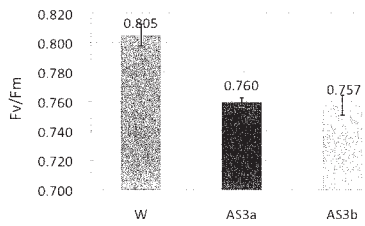


図11. クロロフィル蛍光値 (Fv/Fm)の測定 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)

AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)

AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

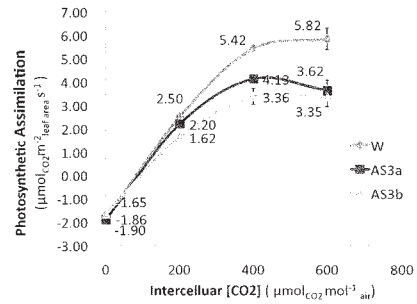


図12. 光合成速度の測定 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)

AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)

AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

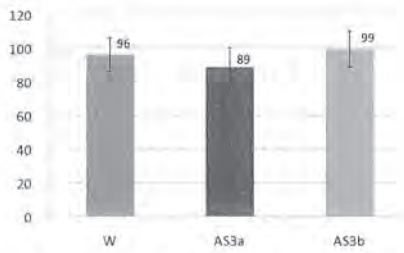


図13. 気孔数の計測 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₁)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

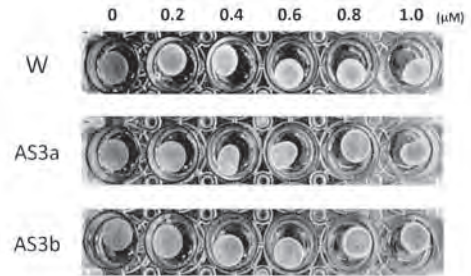


図14. メチルピオロゲン処理 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₁)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

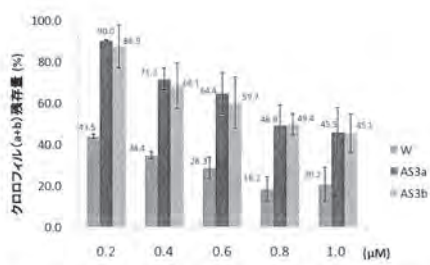


図15. メチルピオロゲン処理後のクロロフィル残存量 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₁)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

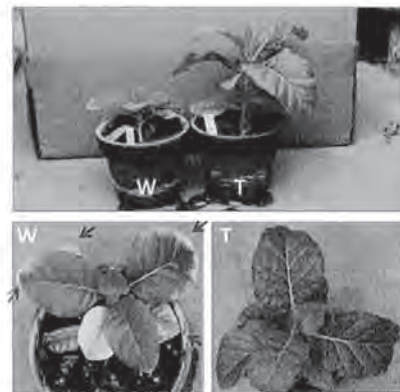


図16. 強光条件下での育成 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 T: 組換え体AS3b系統 (T₁)
 → : 葉が白くなっている箇所を示す

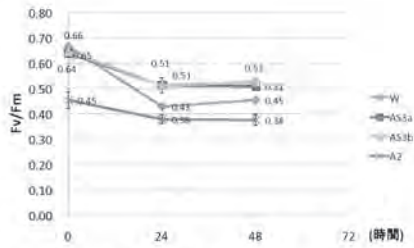


図17. 強光処理によるFv/Fm値の変化 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)
 A2: 組換え体A2系統 (T₂)

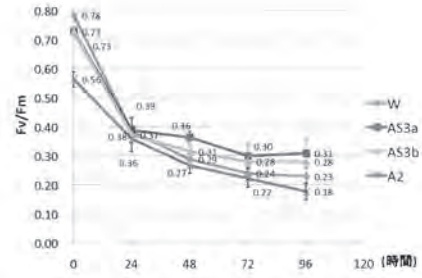


図18. 低温処理によるFv/Fm値の変化 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)
 A2: 組換え体A2系統 (T₂)

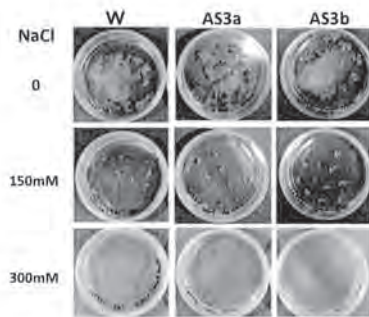


図19. 塩を含む培地での発芽 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

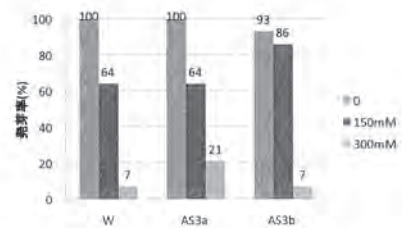


図20. 塩を含む培地での発芽率 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

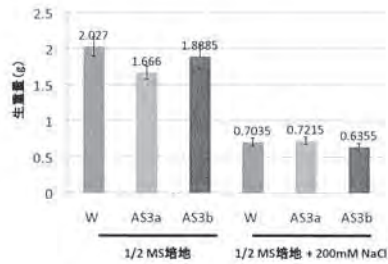


図21. 塩を含む培地での生育 (APX_SOD)

W: 野生型 (SR1)
 AS3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)
 AS3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

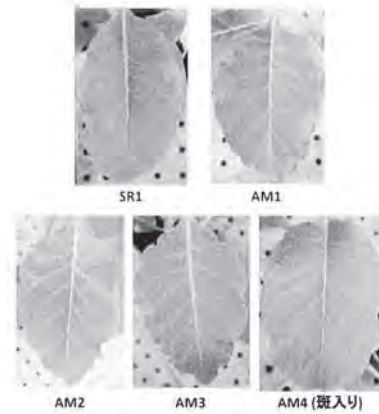


図22. 形質転換タバコ (*apx_mdar*) 及び野生型タバコ (SR1)

SR1: 野生型タバコ (SR1)
 AM1,2,3,4: *apx_mdar* を導入した 組換え体 (T₁)

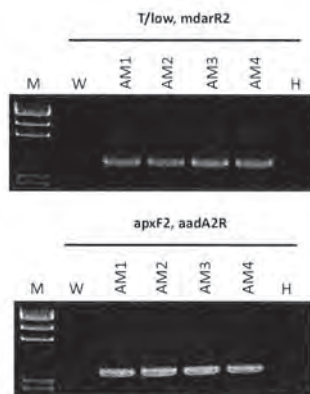


図23. PCRによる導入遺伝子の増幅 (APX_MDR)

M: マーカー (λ /HindIII)
 W: 野生型 (SR1)
 AM1,2,3,4: *apx_mdar* を導入した 組換え体 (T₁)
 H: H₂O

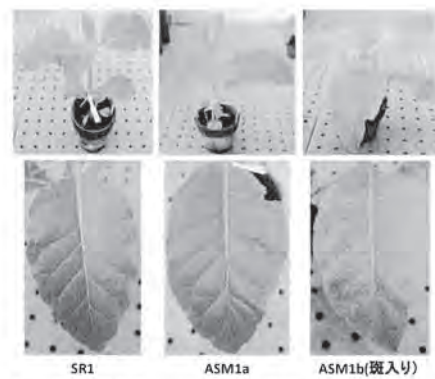


図24. 形質転換タバコ (*apx_sod_mdar*) 及び野生型タバコ (SR1)

SR1: 野生型タバコ (SR1)
 ASM3a: 組換え体AS3a系統 (T₂)
 ASM3b: 組換え体AS3b系統 (T₂)

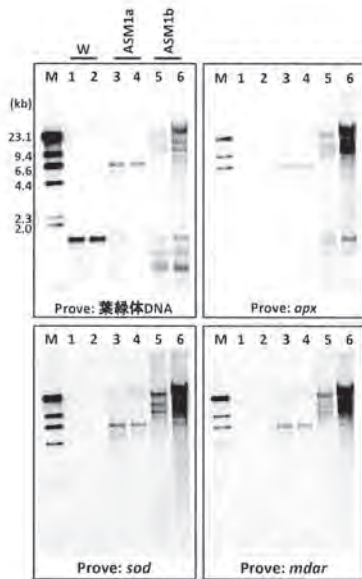


図25. Southern解析 (APX_SOD_MDAR)

M: マーカー(λ /HindIII)
 1,2: 野生型(SR1)
 3,4: 組換え体 ASM1a系統 (T₂)
 5,6: 組換え体 ASM1b系統 (T₂)

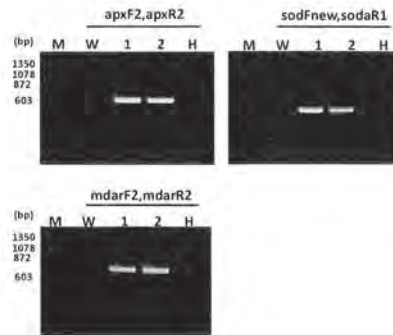


図26-1. RT-PCR (APX_SOD_MDAR)

M: Marker(ϕ /HaeIII)
 W: 野生型 (SR1)
 1: 組換え体ASM1a系統 (T₁)
 2: 組換え体ASM1b系統 (T₁)
 H: H₂O

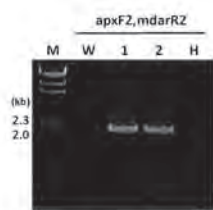


図26-2. RT-PCR (APX_SOD_MDAR)

M: Marker(λ /HidIII)
 W: 野生型 (SR1)
 1: 組換え体ASM1a系統 (T₁)
 2: 組換え体ASM1b系統 (T₁)
 H: H₂O

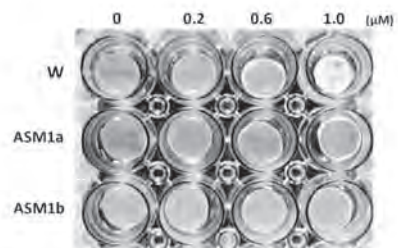


図27. メチルビオロゲン処理 (APX_SOD_MDAR)

W: 野生型 (SR1)
 ASM1a: 組換え体AS3a系統 (T₁)
 ASM1b: 組換え体AS3b系統 (T₁)

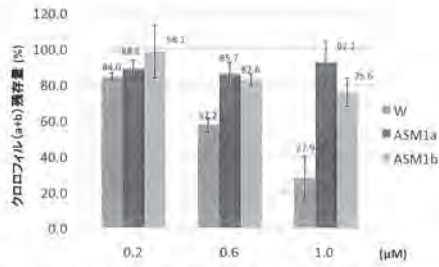


図28. メチルピオロゲン処理後のクロロフィル残存量 (APX_SOD_M DAR)

W: 野生型 (SR1)
 ASM1a: 組換え体AS3a系統 (T₁)
 ASM1b: 組換え体AS3b系統 (T₁)

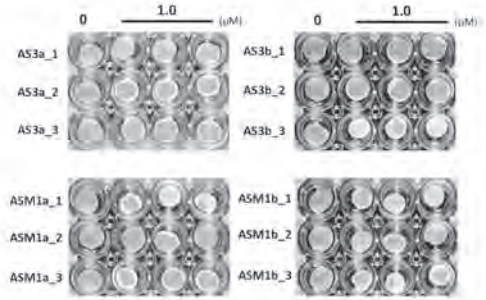


図29-1. メチルピオロゲン処理 1)

1) 各個体の1.0μM処理の値は、同じ葉から切り取ったリーフディスク3枚の平均値を用いた。

AS3a_1,2,3 : *apx_sod* を導入した組換え体AS3a系統 (T₁)
 AS3b_1,2,3 : *apx_sod* を導入した組換え体AS3b系統 (T₁)
 ASM1a_1,2,3 : *apx_sod_mdar* を導入した組換え体ASM1a系統 (T₁)
 ASM1b_1,2,3 : *apx_sod_mdar* を導入した組換え体ASM1b系統 (T₁)

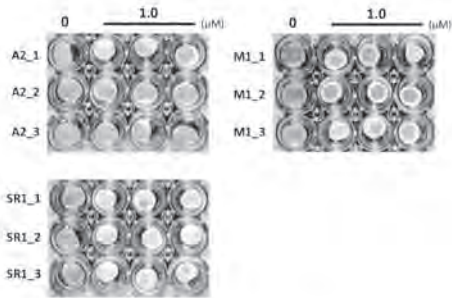


図29-2. メチルピオロゲン処理 1)

1) 各個体の1.0μM処理の値は、同じ葉から切り取ったリーフディスク3枚の平均値を用いた。

A2_1,2,3 : *apx* を導入した組換え体A2系統 (T₁)
 M1_1,2,3 : *mdar* を導入した組換え体M1系統 (T₁)
 SR1_1,2,3 : 野生型タバコ (SR1)

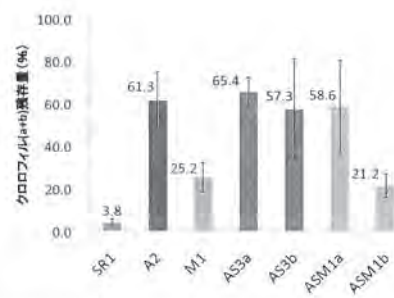


図30. メチルピオロゲン処理後のクロロフィル残存量

SR1 野生型タバコ (SR1)
 A2 : *apx* を導入した組換え体A2系統 (T₁)
 M1 : *mdar* を導入した組換え体M1系統 (T₁)
 AS3a, AS3b : *apx_sod* を導入した組換え体 (T₁)
 ASM1a, ASM1b : *apx_sod_mdar* を導入した組換え体 (T₁)

表1. *apx_sod* オペロン作成に用いたプライマー

プライマー	配列 ^{1) 2)} (5'→3')
Sph I_rbs_SOD	AA <i>GCATGCAGTTGTAGGGAGGGATCCATGGCT</i> ACTAAGAAAGCTGTTGCT
Sph I_sod_R	AAAGCATGC TCATATTGGAGTCAAACCAAG

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

表2. *apx_mdar* オペロン作成に用いたプライマー

pPRV112A'_*apx* の増幅に用いたプライマー

プライマー	配列 ^{1) 2)} (5'→3')
Xho I'_ <i>apx</i> _R	CGCTCGAG TTTAATCCTTCCGGTTGAG
Nhe I'_112A'_R	CGCTAGC TAGAACTTATCGTCTTAGT

mdar の増幅に用いたプライマー

プライマー	配列 ^{1) 2)} (5'→3')
Xho I_rbs_mdar	CCCTCGAGAGTTGTAGGGAGGGATTTATGGCT AATGAGAATCGAGAGTAT
Nhe I'_ <i>mdar</i> _R	CCGCTAGC TAAGGAAGACTGAGCGATTTC

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

表3. *apx_sod_mdar* オペロン作成に用いたプライマー

プライマー	配列 ¹⁾ (5'→3')
Xho I_SOD Inv R	CGTCTCGAG GCTCATATTGGAGTC
Nhe I'_112A'_F2	CCGCTAGC AACTTATCGTCTTAGTCTGC

- 1) 赤字のイタリックは制限酵素サイトを示す

表4. 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')	増幅サイズ
<i>apx_sod</i>	Nt_SODa_R1	TCATATTGGAGTCAAACCAAGT	約2.8kb
<i>apx_mdar</i>	<i>mdar</i> l12	AACCAAGTCAAATGGATGACAGC	約3.2kb
<i>apx_sod_mdar</i>			約3.6kb

aadAR2 との組合せ

導入遺伝子	プライマー	配列 (5'→3')	増幅サイズ
<i>apx_sod</i>			約2.1kb
<i>apx_mdar</i>	<i>apx</i> l12	CGCCGGCTCTGATTCTGATC	約3.0kb
<i>apx_sod_mdar</i>			約3.4kb

表5. 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>sod</i>	456
<i>mdar</i>	1330
<i>apx_sod</i>	1404
<i>apx_mdar</i>	2247
<i>apx_sod_mdar</i>	2741

表6. RT-PCRに用いたプライマー

遺伝子	プライマー	配列 (5'→3')	増幅サイズ
<i>apx</i>	<i>apxF2</i>	CGCCGCGTCTGATTCTGATC	603bp
	<i>apxR2</i>	CTTCAACCACTGCACAGTCCATG	
<i>sod</i>	<i>SOD_F_new</i>	GCTACTAAGAAAGCTGTTGCTG	456bp
	<i>Nt.SODa_R1</i>	TCATATTGGAGTCAAACCAAGT	
<i>mdar</i>	<i>mdarF2</i>	AGCTCTGCATTGTGGACCAAAGAGC	737bp
	<i>mdarR2</i>	AACCACGTCAAATGGATGACAGC	
<i>apx-sod-mdar</i>	<i>apxF2</i>	CGCCGCGTCTGATTCTGATC	2237bp
	<i>mdarR2</i>	AACCACGTCAAATGGATGACAGC	

表7. 葉緑体単離Buffer

Buffer	組成
Medium I	400mM ソルビトール
	20mM Tricin/KOH (pH 8.4)
	5mM MgCl ₂
	5mM ASA
	2mM EDTA
	1mM NaHCO ₃
	0.05% BSA
Medium II	400mM ソルビトール
	50mM HEPES/KOH (pH7.6)
	5mM MgCl ₂
	5mM ASA
	2.5mM EDTA
Medium III	25mM HEPES/KOH (pH7.6)
	5mM ASA
	3mM MgCl ₂

表8. ポンパパートメント実験のまとめ

コンストラクト	ショット数	シュート数	順化個体数 (T ₀) ¹⁾
<i>apx-sod</i>	48	10	4
<i>apx-mdar</i>	72	30	4
<i>apx-sod-mdar</i>	12	3	1

1) 同一なシュートの切り分け個体を含まない

表9. AS3系統で共に発現量が上昇した遺伝子(vs 野生型)¹⁾

Gene ID	Annotation	Fold Change (AS3a)	Fold Change (AS3b)
DV159202	Cp Cu/Zn SOD	188	180
EH621793 / CV016103	PR1a	165/165	40/36
EB439093	N-like protein	30	56
BP526273	Hypothetical protein	23	21
TC51269	Transcription Factor IIF	21	19
X58547	PR4b	18	11
TC44706	Avr-like protein 1	17	19
TC51364	Vacuolar citrate/H ⁺ symporter	14	11
DW004694	isoleucyl-tRNA synthetase	13	13
TC50859	Putative uncharacterized protein	13	11

1) 発現量が上昇した上位20個の遺伝子の内

表10. AS3系統で共に発現量が減少した遺伝子(vs 野生型)¹⁾

Gene ID	Annotation	Fold Change (AS3a)	Fold Change (AS3b)
TC42053	Hypothetical protein	0.11	0.09
EB431920	Small conjugating protein ligase	0.13	0.12
BP535437	Thylakoid-bound ascorbate peroxidase	0.15	0.18

1) 発現量が減少した上位30個の遺伝子の内

2. 鉄分を多く含む植物の育成

概要

鉄分不足は世界の多くの人々が苦しむ栄養障害のひとつで、現在は鉄製剤の配布など栄養障害の克服にむけた努力がなされている。しかし日常の食物から鉄分を十分補給できれば、この栄養障害解決の大きな一助となる。そこで本研究プロジェクトでは、葉緑体内にフェリチンという鉄結合タンパク質を多量に発現させて、葉の鉄含量を飛躍的に増大させることができないかを検討した。タバコを葉物野菜のモデルと考え実験を進め、品種や導入遺伝子の構造を変えたものなど、合計3種類の組換え系統を確立した。これらの組換え系統の後代を用いて、葉に含まれる鉄含量を測定したところ、通常の生育条件でも、葉に含まれる鉄分が非組換え体の2倍を超えるようになったものが得られ、葉の鉄分増加に対するこのアプローチの有効性が認められた。

1. はじめに

貧血は世界中で多くの人を抱える病気である。WHO のデータによれば、未就学の乳幼児や妊娠中の女性の4割以上が貧血状態にあると推定され、発展途上国に限らず多くの国で問題となっている。この貧血の多くは鉄欠乏による栄養障害によって引き起こされることが知られており、鉄剤の投与など様々な方法で解決が試みられている。我々はこの問題を、植物育種の観点から、可食部に消化吸収できる形で鉄分を多く含む作物を作出することによって解決することができないかと考えた。

そこで注目したのが、フェリチンである。フェリチンは生物界に普遍的に存在するタンパク質で、生体内での鉄貯蔵に大きな役割を担っている。このタンパク質は24個のサブユニットから空洞の球体を形成し(Crichton, Ponce-Ortiz et al. 1978; Lobreaux, Yewdall et al. 1992)、その中に4500個もの鉄原子を安全な形で貯蔵する(Harrison and Arosio 1996, Briat 1997)。植物の場合、フェリチン遺伝子は核にコードされており、転写・翻訳の後、トランジットペプチドによって葉緑体に輸送されて機能する(Van der Mark, Van den Briel et al. 1983; Sczekan and Joshi 1987; Ragland, Briat et al.

1990; Waldo, Wright et al. 1995)。

これまでにフェリチン遺伝子を核ゲノムに導入して強発現させ、鉄含量を増加させるという研究がいくつか報告されており(Goto, Yoshihara et al. 1998; Jiang, Ding et al. 2006)、我々は葉緑体にこの遺伝子を導入して葉の鉄含量を増加させようと考えた。

2. 材料および方法

2.1 葉緑体へのフェリチン遺伝子導入

Fig.1 に葉緑体への導入コンストラクトを示す。ダイズフェリチンの全長 cDNA を葉緑体で働く *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'へクローニングした。また、得られたコンストラクトから PCR と制限酵素 *DpnI* 処理により、フェリチン全長からトランジットペプチドを除いたコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを、タバコの栽培品種である Xanthi および SR1 にパーティクルガンを用いて打ち込んだ。

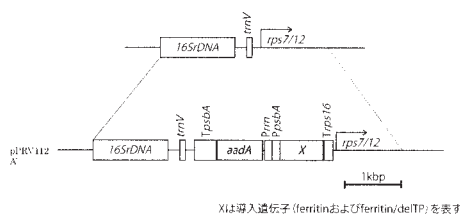


Fig. 1. 葉緑体の形質転換に用いたプラスミドコンストラクト

2.2 Southern blot analysis

組換え体および野生型の葉より全DNAを抽出し、*Sac*IIで消化の後、ナイロン膜に転写した。これにフェリチン遺伝子のプローブ、遺伝子導入領域を含む葉緑体DNAプローブを用いて検出した。

2.3 SDS-PAGE および Western blot analysis

葉から抽出した可溶性タンパク質10 μ gをSDS-PAGEで分離し、CBB染色を行った。また、同様に抽出した可溶性タンパク質1 μ gをニトロセルロースメンブレンに転写し、ウサギ由来フェリチン抗体、抗ウサギIgGヒツジ抗体を用いて検出した。

2.4 葉の鉄含量測定

各系統3個体からそれぞれ葉を硝酸に浸け200 $^{\circ}$ Cに加熱して溶解し、ICP-MSを用いて鉄含量を測定した。

2.5 Evans blue 染色

リーフディスクを1%Evans Blue (0.1%Tween20)溶液に浸け、脱気によってディスク全体に溶液を染み

込ませた後、水で3回以上洗浄して余分な溶液を除去した。

2.6 DAB 染色

1mg/ml DAB溶液 (pH 3.8) に切り取った葉の葉柄を挿して8時間DAB溶液を吸わせた後、エタノールに葉全体を浸けて脱色した。

3. 結果および考察

3.1 葉緑体へのフェリチン遺伝子導入

Xanthiヘフェリチン全長をもつコンストラクトを78ショット打ち込んだところ、13のシュートを得て、うち4つが形質転換体であることを確認した。また、品種の異なるSR1にフェリチン全長をもつコンストラクトを12ショット打ち込み、得られた4つのシュートのうち1つが形質転換体であることが分かった。さらにSR1ヘトランジットペプチドを除いたコンストラクトを36ショット打ち込み、18のシュートから4つの形質転換体を得た。

3.2 Southern blot analysis

検出結果をFig.2に示す。フェリチン遺伝子のプローブでは、組換え体にもみ3.8kbおよび3.7kbの断片が認められた。また、遺伝子導入領域を含む葉緑体DNAプローブでも、組換え体に3.8kbおよび3.7kbの断片が観察された。一方、このプローブ

では野生型で見られた 1.5kb のバンドが組換え体には見られなかったことから、フェリチン遺伝子が予定通り葉緑体内に導入され、さらにフェリチン遺伝子を持つ葉緑体ゲノムのホモプラスミック化が進んだことが示唆される。

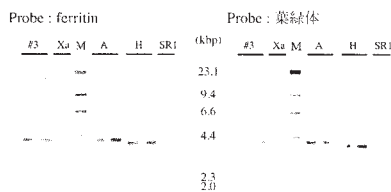


Fig. 2. Southern blot analysis

#3: ferritin(Xanthi) T₂, Xa: 野生型タバコ (Xanthi)
 A: ferritin (SR1) T₂, H: ferritin/ΔTP(SR1) T₂, SR1: 野生型タバコ (SR1)
 M: λ-HindIII size marker

3.3 SDS-PAGE および Western blot analysis

SDS-PAGE の結果から、組換え体に特異的な約 23kDa のバンドが観察された (Fig. 3 左)。また、Western 解析より SDS-PAGE で見られたバンドに対応する位置にシグナルが認められたことから、組換え体がフェリチンを大量に発現していることが分かった (Fig. 3 右)。その一方で、フェリチン全長をもつ Fe A とトランジットペプチドを除いた Fe/delTP H との間で大きさやシグナルの強さに差がみられたことから、フェリチン全長をもつ組換え体の方がより大量にフェリチンを蓄積していることが分かった。

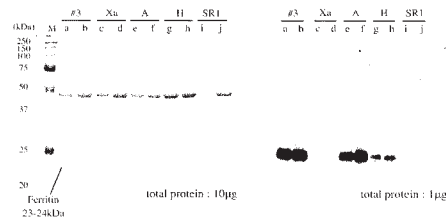


Fig. 3. SDS-PAGE(左)及びWestern blot analysis(右)

a, b: Fe #3 T₂, c, d: 野生型タバコ (Xanthi)
 e, f: Fe A T₂, g, h: Fe/ΔTP H T₂, i, j: 野生型タバコ (SR1)
 M: Molecular weight standards

3.4 葉の鉄含量測定

ICP-MS による測定の結果を Fig.4 に示す。Xanthi にフェリチン全長を導入した Fe 3 で野生型の 1.8 倍、SR1 にフェリチン全長を導入した Fe A で野生型の 2.3 倍、トランジットペプチドを除いたフェリチンを導入した Fe/delTP H で 1.5 倍鉄含量が増加しており、期待された通りフェリチンの大量発現によって鉄含量を高めることに成功したことが示された。また、この値が先ほどの Western 解析で示されたフェリチン蓄積量と相関していることも分かった。

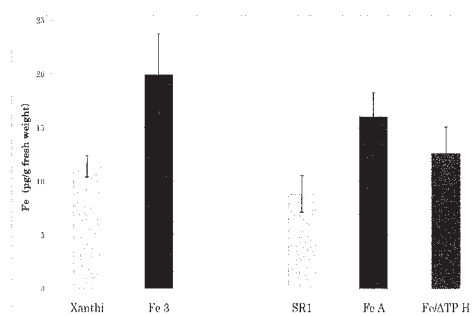


Fig. 4. 葉における鉄含有量

3.5 マンガンおよびカドミウム含有量測定

これまでの報告で、鉄の吸収が増加すると根からのマンガン吸収が減少することが知られている (Zaharieva 1995)。このことから、組換え体の鉄含量増加によりマンガンの吸収が抑えられ、マンガン含有量が減少しているのではないかと予想した。そこで、先ほどと同様に ICP-MS で各系統2個体のマンガン含有量を測定したところ、予想に反して鉄含有量に比例してマンガン含有量も増加していた。また、カドミウムの含有量も測定したが、組換え体と野生型で大きな差は見られなかった (Fig. 5)。

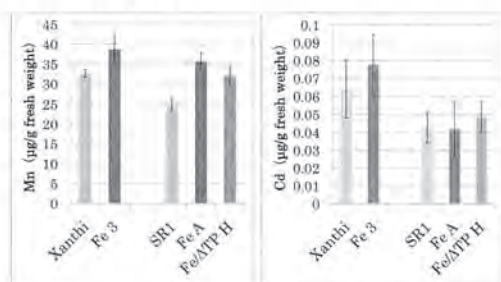


Fig. 5. マンガンおよびカドミウム含有量比較

3.6 表現型

得られた組換え体の写真を Fig.6 に示す。フェリチン全長をもつ Fe 3 は発芽直後から全体的に黄緑がかっており、葉の一部が壊死を起こして薄茶色に変色し、やがて透明になり、穴があいてしまった。また、SR1 の組換え体では、フェリチン全長をもつ Fe A も先ほど同様全体的に黄緑色を呈しているが、穴があくといった

表現型は観察されず、トランジットペプチドを除いた Fe/delTP H は、若干黄緑がかっているものの、フェリチン全長をもつ組換え体ほど大きな違いは見られなかった。

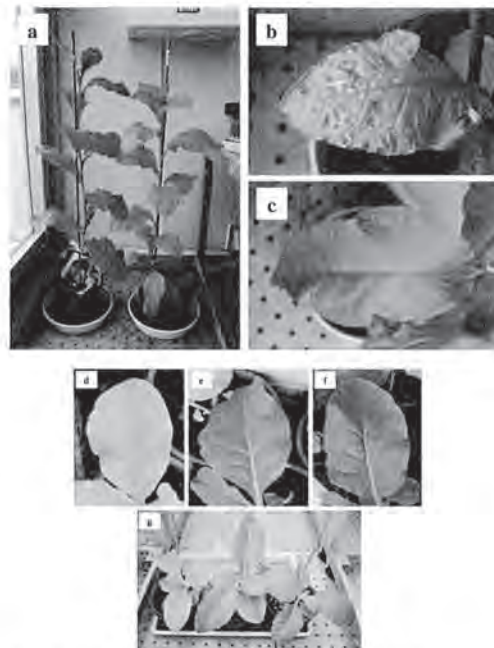


Fig. 6. XanthiおよびSR1における野生型と組換え体の表現型の比較
a: 外観 (左: Xanthi, 右: 組換え体 Fe 3 T₂), b: Fe #3 T₂ 本葉, c: Xanthi 本葉
d) Fe A T₂ 本葉, e: SR1 本葉, f) Fe/ATP H T₂ 本葉
g: 外観 (左: Fe A T₂, 中: SR1, 右: Fe/ATP H T₂)

3.7 死細胞染色および DAB 染色

死細胞を青く染める Evans Blue を用いてリーフディスクを染色し、死細胞の観察を行なったところ、フェリチン全長をもつ組換え体で多くの細胞が死んでしまっていることが分かった。特に Xanthi にフェリチン全長を導入した a で示した Fe 3 のリーフディスクがよく染まっていることから、葉にかなりのダメージを受けていることが伺える (Fig. 7)。

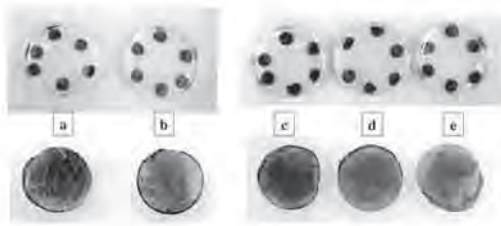


Fig. 7. Evans Blueによる死細胞染色

a: Fe #3 T₃, b: Xanthi
c: Fe A T₃, d: SR1, e: Fe/ΔTPH T₃

さらに、過酸化水素と反応して茶褐色に染まる DAB 染色で過酸化水素の発生を観察したところ、フェリチン全長をもつ SR1 の組換え体で多くの過酸化水素が発生していることが分かった。また、トランジットペプチドを除いた組換え体でも過酸化水素が野生型に比べて多く検出された。Xanthi の組換え体では野生型とあまり変化が観られなかったが、これはすでに葉に穴があくほど多くの細胞が死んでしまっているため、過酸化水素の発生が少なくなっているのではないかと考えられる (Fig. 8)。

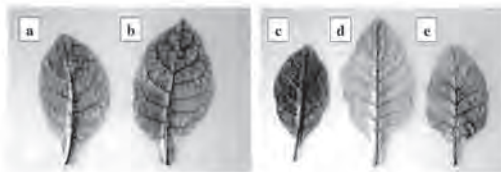


Fig. 8. DAB染色による過酸化水素発生量の比較

a: Fe #3 T₃, b: Xanthi
c: Fe A T₃, d: SR1, e: Fe/ΔTPH T₃

3.8 強光への耐性

SR1 にフェリチン全長を導入した Fe A、トランジットペプチドを除いたフェリチンを導入した Fe/ΔTPH、

SR1 の葉を強光下に置き、0・1・2・4 時間ごとに Fv/Fm 値を測定した。その結果、どちらの組み換え体も野生型に比べてより強く光阻害が起きていることがわかった。また、全長を導入した Fe A、トランジットペプチドを除いた Fe/ΔTPH との間では、大きな差は見られなかった (Fig. 9)。

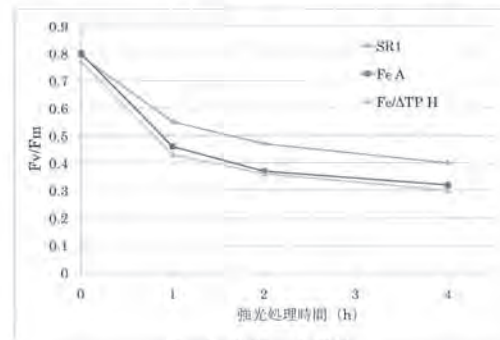


Fig. 9. 強光への耐性

3.9 ferric reductase 活性測定

根からの鉄吸収に変化は見られるか確認するため、組み換え体および野生型の根における ferric reductase 活性を測定したところ、Xanthi にフェリチン全長を導入した Fe 3 で野生型に比べて約 2 倍活性の上昇が見られた。一方で、SR1 にフェリチンを導入した組み換え体では、Fe A、Fe/ΔTPH どちらにも大きな変化は見られなかった (Fig. 10)。

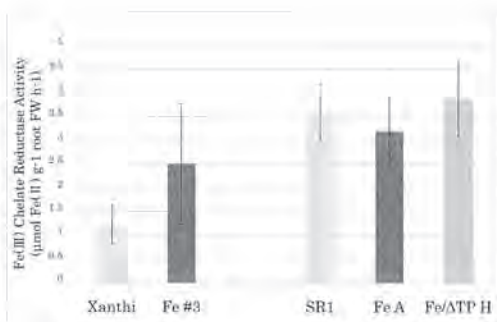


Fig. 10. ferric reductase 活性測定

3.10 高濃度鉄含有培地への耐性

播種後1ヶ月の幼植物を、鉄含有量が12.5μMと62.5μMの液体培地にそれぞれ移植し、1週間水耕栽培によって育てた。その結果をFig.11に示す。野生型であるbのXanthi、dのSR1どちらも62.5μMの高濃度鉄含有培地で枯死したのに対し、フェリチン全長を持つaのFe 3、cのFe A、およびトランジットペプチドを除いたeのFe/delTPHはいずれも生存可能であることが分かった。

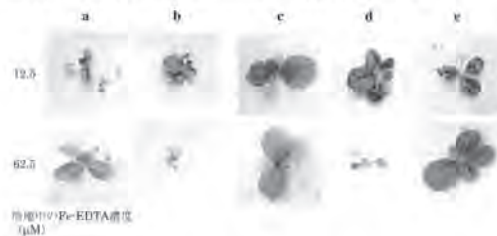


Fig. 11. 培地中のFe-EDTA濃度の違いによる変化

a: Fe #3 T₁, b: Xanthi
c: Fe A T₁, d: SR1, e: Fe/ΔTPH T₁

4. おわりに

今研究では、鉄貯蔵タンパクであるフェリチンを葉緑体に導入して強発現させることにより、葉の鉄含有

量を約2倍増やすことに成功した。一方で、フェリチン全長を導入した組換え体に葉の黄化や壊死が見られた。これは、フェリチンの強発現によって葉の鉄含量全体は増加したものの葉緑体内の鉄が取り合いになり、光合成や活性酸素消去系など、他に鉄を必要とする反応にまで鉄がまわらず、鉄不足に似たような状態となっているのではないかと考えられる。この症状の緩和には、品種を変更することが有効であることが証明された。また、フェリチンのトランジットペプチド領域をもたない遺伝子を使用するなど、構成を変えることによっても症状をマイルドにできることが分かった。さらに、フェリチンを強発現させることによって高濃度の鉄含有培地でも生存できるようになった。

今後は、この技術を利用して鉄含有量を増大させたほうれん草やレタスなどの葉物野菜の作出を目指す。

最後に、フェリチンの抗体を譲渡いただいた電力中央研究所の吉原博士に深く感謝の意を表す。またICP-MSによる鉄などの含有量測定は、岡山大学資源植物科学研究所の坂本、加藤博士との共同研究による。ここで深謝の意を表す。

参考文献

- Crichton, R. R., Y. Ponce-Ortiz, et al. (1978). "Isolation and characterization of phytoferritin from pea (*Pisum sativum*) and Lentil (*Lens esculenta*)." Biochem J **171**(2): 349-356.
- Goto, F., T. Yoshihara, et al. (1998). "Iron accumulation in tobacco plants expressing soyabean ferritin gene." Transgenic Research **7**(3): 173-180.
- Jiang, T. B., B. J. Ding, et al. (2006). "Differential expression of endogenous ferritin genes and iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing soybean ferritin gene." Yi Chuan Xue Bao **33**(12): 1120-1126.
- Lobreaux, S., S. J. Yewdall, et al. (1992). "Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of pea seed (*Pisum sativum*) ferritin." Biochem J **288** (Pt 3): 931-939.
- Ragland, M., J. F. Briat, et al. (1990). "Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean." J Biol Chem **265**(30): 18339-18344.
- Szcekan, S. and J. Joshi (1987). "Isolation and characterization of ferritin from soyabeans (*Glycine max*)." Journal of Biological Chemistry **262**(28): 13780-13788.
- Van der Mark, F., W. Van den Briel, et al. (1983). "Phytoferritin is synthesized in vitro as a high-molecular-weight precursor. Studies on the synthesis and the uptake in vitro of the precursors of ferritin and ferredoxin by intact chloroplasts." Biochemical Journal **214**(3): 943.
- Waldo, G. S., E. Wright, et al. (1995). "Formation of the ferritin iron mineral occurs in plastids." Plant Physiol **109**(3): 797-802.
- Zaharieva, T. (1995). Iron-manganese interactions in peanut plants as influenced by the source of applied iron. Iron Nutrition in Soils and Plants, Springer: 277-281.

3. 葉緑体におけるタンパク質生産系の構築

概要

葉緑体の遺伝子組換えは、植物自体の能力を高めて、最終的に作物の品種改良に結びつけることを目標とする以外に、導入遺伝子の葉緑体における極めて高い発現能力を活かして、植物を有用タンパク質の効率的な生産系の構築に利用させる可能性がある。そこで本研究プロジェクトでは、カイコの多角体と有用タンパク質を葉緑体の中で共発現させる実験系の構築を試みている。この多角体は、単一のタンパク質から構成された入れ物のようなもので、目印のついた他のタンパク質をその中に取り込む性質を持つ。また多角体に取り込まれたタンパク質は、乾燥や酵素による分解から保護されることが知られているので、多角体と目印をつけた有用タンパク質を葉緑体内で共発現させることにより、大量かつ安定に有用タンパク質を得ようとしている。これまで多角体のみを発現する組換え体を2個体、多角体とGFPを共発現する組換え体を4個体、それぞれ得ることができた。現在、これら組換え個体は自殖を進めて系統化している段階であり、今後、各種解析を進める予定である（この研究は、京都工芸繊維大学の森教授と本学客員研究員の野添博士との共同研究である）。

タンパク質の「入れ物」を植物の葉の中に作る方法

-技術概要-

私達の研究グループでは、有用なタンパク質を植物の葉に作らせる技術の開発に取り組んできました。その開発の一部であります、有用タンパク質を封入することが可能な「入れ物タンパク質」を葉で作る技術について紹介させていただきます。この入れ物タンパク質は、結晶構造を作るタンパク質であり、耐熱性、耐乾燥性、耐プロテアーゼ性を持っています。そして、あるシグナルを持つ特定のタンパク質を、結晶構造を構築する過程で取り込むことが可能なタンパク質です。そのため、葉の中で有用なタンパク質を「入れ物タンパク質」に封入して大量生産し、その有用タンパク質を利用することが可能ではないかと考えております。

-用途利用分野-

抗原ペプチド・経口ワクチン・細胞増殖因子などの医療分野、産業用酵素などの工学分野、その他、安価・大量にタンパク質やポリペプチドを必要とする分野

-実用化に向けた課題-

葉の葉緑体中で、有用タンパク質を入れ物タンパク質に効率よく封入させる工夫が必要です。利便性を考慮しますと、タバコ以外の食用植物に応用することが必要と考えます。閉鎖系の野菜工場において生産するなど、他の技術との組合せを検討する必要があります。

-研究メンバー-

寺地 徹（京都産業大学 工学部 教授）、森 肇（京都工芸繊維大学 応用生物学部門 教授）
野添 幹雄（京都産業大学 客員研究員）

-基盤技術の紹介：葉緑体遺伝子組換え技術-

葉緑体は植物細胞に特徴的な細胞内小器官です(右図)。この葉緑体には、核が持つゲノムDNAとは別に、独自のゲノムDNAを持っています。私達の研究グループでは、タバコをモデル植物として、葉緑体DNAに遺伝子を導入する技術を確立しています。

本技術は下記のような点について、産業上、有用であると考えています。

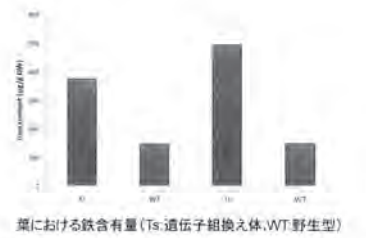
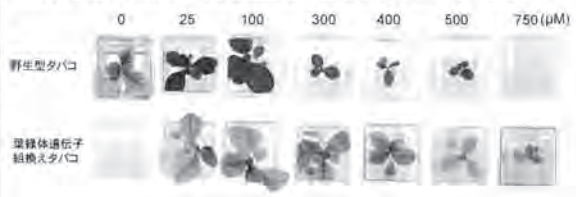
- ・葉緑体DNAはコピー数が多く、タンパク質の発現量が非常に多い
- ・複数の遺伝子を同時に発現することが可能である
- ・葉緑体の遺伝子は母性遺伝するため、花粉を介した遺伝子汚染リスクが極めて低い



-葉緑体遺伝子組換えの流れ-



-葉緑体遺伝子組換え技術を利用した例：フェリチン(鉄貯蔵タンパク質)遺伝子を葉緑体ゲノムへ導入したタバコ-



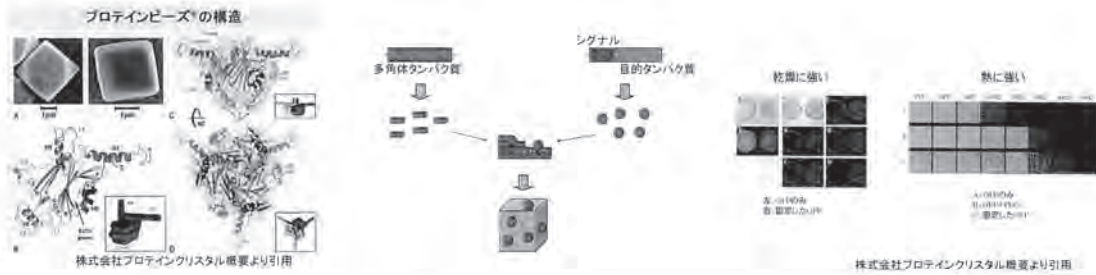
-基盤技術の紹介:多角体へタンパク質を封入する技術-

多角体は、カイコに感染するウイルスより単離されたタンパク質です。このタンパク質は、下図のような非常に巨大な結晶構造を構築するタンパク質で、耐熱性・耐乾燥性・耐プロテアーゼ性を持っています。そして、この多角体は、その結晶構造を構築する際に、特定のアミノ酸配列(荷札ペプチド)を持つタンパク質を同時に多角体内に封入する性質を持っています。

本技術は下記のような点について、産業上、有用であると考えています。

- ・荷札ペプチドを付けた特定のタンパク質を、多角体の結晶構造内に封入することができる
- ・精製が容易である
- ・封入したタンパク質は、耐熱性・耐乾燥性・耐プロテアーゼ性を持つ

-多角体の構造および性質-



-本技術の紹介:タンパク質の「入れ物」を植物の葉の中に作る方法-

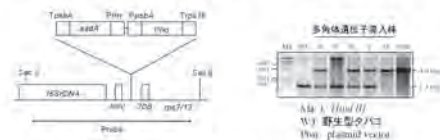
葉緑体遺伝子組換え技術を用いて経口ワクチンなど有用タンパク質を生産する方法は、一般的な植物の核遺伝子組換え技術と比べてタンパク質生産量が高い、花粉を介した遺伝子汚染リスクが低い等の点から、注目されています。しかし、生産したタンパク質の精製が難しい、タンパク質によっては生産量が低いなどの課題があります。

そこで、葉緑体遺伝子組換え技術と多角体にタンパク質を封入する技術を融合させ、これら課題を解決し、植物を有用タンパク質の生産の場とすることを狙っています。

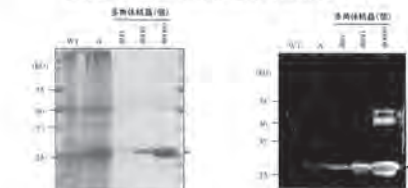
本技術は下記のような点について、産業上、有用であると期待しています。

- ・植物をホストとして有用タンパク質を生産することができる
- ・精製が容易である
- ・封入したタンパク質は、耐熱性・耐乾燥性・耐プロテアーゼ性を持つ

-葉緑体遺伝子組換え技術を用いて多角体を生産する-



葉緑体ゲノムの目的位置に遺伝子の導入を確認した

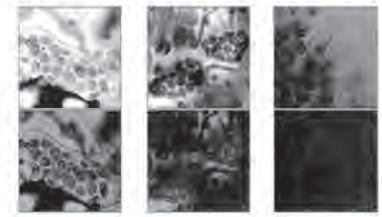


ウエスタンブロット解析 (抗多角体抗体)

葉緑体遺伝子組換えタバコは多角体タンパク質を高発現した

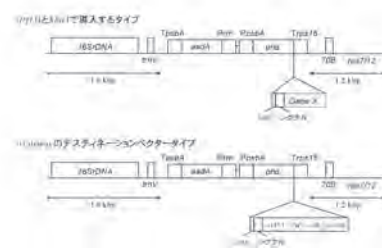


乾燥した葉から多角体を簡便に粗精製することができた



野生型タバコ 葉緑体遺伝子組換えタバコ

葉緑体内に結晶構造を示すものを確認した



多角体遺伝子と目的遺伝子を葉緑体で共発現するためのベクター

4. 組換え型のタバコ葉緑体ゲノムを持つペチュニアの作出

概要

タバコを含めたナス科には、トマトやナスなど有用な作物が多く含まれている。しかし、これらの作物を用いて葉緑体の遺伝子組換えを行うことは未だ技術的に難しく、タバコのような高い形質転換効率をもたらす実験条件は見出されていない。一方、分担者（山岸）が得意とする細胞融合技術では、プロトプラストからの再生系があれば、異なる種どうしを雑種化することができ、その際、片親の核を不活化することで、細胞質のみが雑種化した植物（サイブリッド）を得ることができる。そこで本研究プロジェクトでは、観賞用花卉として有用なペチュニア（ナス科）とタバコの細胞融合を試み、サイブリッドを作出した。この実験のユニークなところは、細胞融合に前述1の実験で作出した組換え型の葉緑体を持つタバコ（*mdar*）を用いたことで、間接的にペチュニア細胞へ組換え型の葉緑体ゲノムを導入したことになる。前述のように、タバコでは葉緑体の遺伝子組換えはルーティン化している。この実験により、タバコ以外のナス科植物への遺伝子導入の道が拓けた。

Introduction of transformed chloroplasts from tobacco into petunia by asymmetric cell fusion

Asako Sigeno · Sugane Hayashi · Toru Terachi · Hiroshi Yamagishi

Received: 27 April 2009 / Revised: 27 July 2009 / Accepted: 5 August 2009 / Published online: 2 September 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Plastid engineering technique has been established only in *Nicotiana tabacum*, and the widespread application is severely limited so far. In order to exploit a method to transfer the genetically transformed plastomes already obtained in tobacco into other plant species, somatic cell fusion was conducted between a plastome transformant of tobacco and a cultivar of petunia (*Petunia hybrida*). A tobacco strain whose plastids had been transformed with *aadA* (a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene) and *mdar* [a gene for monodehydroascorbate reductase (MDAR)] and a petunia variety, ‘Telstar’, were used as cell fusion partners. An efficient regeneration system from the protoplasts of both the parents, and effectiveness of selection for the *aadA* gene with spectinomycin were established before the cell fusion. In addition, the influence of UV irradiation on the callus development from the protoplasts and shoot regeneration of tobacco was investigated. Protoplasts were cultured after cell fusion treatment with polyethylene glycol, and asymmetric somatic cybrids were selected using the *aadA* gene as a marker. Although many shoots of tobacco that had escaped the UV irradiation regenerated, several shoots possessing the morphology of petunia and the resistance to spectinomycin were obtained. Molecular analyses of the petunia type regenerants demonstrated that they had the nuclear and mitochondrial genomes derived from petunia besides the chloroplasts of tobacco transformed with *aadA* and *mdar*. Furthermore, it was ascertained that *mdar* was

transcribed in the somatic cybrids. The results indicate the success in intergeneric transfer of transformed plastids of tobacco into petunia.

Keywords Transformed plastome · Tobacco · Petunia · Cell fusion

Introduction

Plastid engineering established in *N. tabacum* (Svab et al. 1990) has many advantages compared with conventional nuclear transformation from both the level and stability of gene expression and prevention of the pollen-mediated spread of transgenes. Already a number of pharmaceutically and agronomically important genes have been introduced into the tobacco plastome (Kuchuk et al. 2006). This technique has been applied to other kinds of plants such as *Arabidopsis thaliana* (Sikdar et al. 1998), potato (Sidorov et al. 1999), tomato (Ruf et al. 2001), and *Brassica napus* (Hou et al. 2003). Though the number of plant species in which plastome transformants have been obtained has been increasing recently, the technology is reproducible only in tobacco. This has limited the widespread application of plastid engineering as a practical tool to produce plants with valuable new properties in the field of plant biotechnology.

In order to introduce transgenes into the plastomes of recalcitrant species, Kuchuk et al. (2006) proposed the use of remote cybrids carrying the tobacco nucleus and plastids of other Solanaceae species. They succeeded in obtaining transplastomic *Salpiglossis sinuata* plants with transgenic plastids in the nuclear genome background of *S. sinuata*. However, this method is highly complicated, taking two cell fusion steps and protoplast culture for transformation. Furthermore, the plastids of two important Solanaceae crop

Communicated by R. Rose.

A. Sigeno · S. Hayashi · T. Terachi · H. Yamagishi (✉)
Department of Biotechnology, Kyoto Sangyo University,
Kamigamo, Kyoto 603-8555, Japan
e-mail: hiyamagi@cc.kyoto-su.ac.jp

species, potato and tomato, are incompatible with the tobacco nuclear genome; therefore, it is impossible to transform the plastids of potato and tomato by this method.

Among the Solanaceae species, *Petunia hybrida* is a widely cultivated ornamental plant, and genetic engineering of nuclear genome has developed a lot of new breeding materials. However, it is still a difficult species for plastid transformation, although Zubko et al. (2004) reported the introduction of reporter genes (*aadA* and *gusA*) into petunia plastids. In addition, petunia is sexually incompatible with *Nicotiana*. In order to obtain petunia with transformed plastids, asymmetric cell fusion was applied using a transplastomic tobacco line as a plastid donor and wild-type petunia as the other parent in place of the method of Kuchuk et al. (2006). This paper reports the establishment of petunia plants that contain the transformed plastids of tobacco with a gene for stress tolerance in the nuclear genome background of petunia.

Materials and methods

Plant materials

As partners of cell fusion, a transplastomic tobacco line and a variety of *Petunia hybrida*, 'Telstar' (Takii Seeds, Kyoto, Japan) were used. A transformant of tobacco with a gene (*mdar*) for the enzyme monodehydroascorbate reductase (MDAR) in the plastid genome was produced by transformation of wild-type tobacco line, 'SR-1'. Hereafter, the transformant is referred to as 'TP-MDAR'. MDAR is a component of ascorbate–glutathione cycle, which functions in the elimination of reactive oxygen species (ROS) and, as a result, provides the plants with resistance to abiotic stress such as drought and high intensity of light. The transplastomic tobacco plants ('TP-MDAR') were produced by the transformation with *mdar* along with *aadA* as a selection marker, as described by Hayashi et al. (2007). The 'TP-MDAR' plants were self-fertilized, and T₁ plants possessing both resistance to spectinomycin and high activity of MDAR were used in this experiment.

The transplastomic tobacco and petunia were sown aseptically and grown in Murashige and Skoog (1962) medium (MS). Wild-type tobacco 'SR-1' was also used in protoplast culture as a control. From leaves of about 1-month-old seedlings, mesophyll protoplasts were isolated and cultured or fused.

Protoplast isolation and cell culture

For the isolation of mesophyll protoplasts, enzyme solution containing 1% Cellulase 'Onozuka RS' (Yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo, Japan) and 0.1% Pectolyase Y-23 (Kyowa

Chemical Products Co. Ltd., Osaka, Japan) was treated at 28°C. The osmotic pressure of the solution was adjusted by adding 0.5 mol/l of D (–)-Mannitol (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). The isolated protoplasts were cultured in modified 8P (Kao and Michayluk 1975) liquid medium as indicated by Yamagishi et al. (2002). After 4 weeks, microcalli were transferred to MS medium for callus development, and thereafter, proliferated calli were transplanted onto MS medium for shoot regeneration. The details of callus development medium and shoot regeneration medium were identical to those described by Yamagishi and Nakagawa (2004). The selection of protoplasts, calli, and regenerated shoots were performed by adding 500 mg/l of spectinomycin into the media of all the culture steps.

Cell fusion

The density of protoplasts of both parental species was adjusted to 1×10^6 /ml, and the protoplasts of 'TP-MDAR' were exposed to UV irradiation by placing the Petri dishes under a UV lamp in a clean bench for 20 min. After the pretreatment, the two kinds of protoplasts were mixed and fused using polyethylene glycol (PEG) as described in Yamagishi et al. (2002) and cultured with the aforementioned procedure. Spectinomycin was added to the media of all the stages of the culture procedure at a concentration of 500 mg/l. Regenerated green shoots were observed morphologically, and those with the characteristics of petunia were transplanted further to MS medium for rooting.

Molecular analyses of somatic cybrids

Total DNA was isolated from the leaves of regenerated plantlets that were judged to have the morphology of petunia and were used for investigation of the nuclear and organellar genomes. DNA from wild-type tobacco line SR-1 and the parents of the cell fusion ('TP-MDAR' tobacco and petunia variety 'Telstar') were also studied as controls. In order to compare the nuclear genome, RAPD primers (Operon Technology, Alameda) were screened and those that produced polymorphisms between the parents were applied to the regenerants. To ascertain if the somatic cybrids possessed the chloroplasts of the transformed tobacco, PCR was conducted with primer pairs of the sequences in the two introduced genes (*aadA* and *mdar*). Furthermore, another PCR was performed using a sequence in the transformed *mdar* and that was present in the chloroplast genome of the wild-type tobacco as a primer pair. In addition, the mitochondrial genome was studied by Southern hybridization. Total DNA was digested with *SalI* and was electrophoresed in a 1.0% agarose gel in 1× TAE

buffer. The DNA fragments were blotted onto a nylon membrane, Biodyne A (Pall, MI, USA). The blot was hybridized with *rps3/rpl16*, *nad3*, and *atp8* gene probes labeled with Digoxigenin using a PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). PCR primers used for the molecular studies and their sequences are shown in Table 1.

In order to examine the transcription of the *mdar* gene in the regenerated somatic cybrids, northern analysis was performed. From the leaves of somatic cybrid plants, total RNA was isolated and electrophoresed in a 1.25% agarose gel. The RNA was transferred to a nylon membrane after electrophoresis, and was hybridized with a Dig-labeled DNA probe of the *mdar* gene. The hybridization was carried out in accordance with the Dig application manual for filter hybridization (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The parents of the somatic cybridization and wild-type tobacco ('SR-1') were also used as controls.

Results

Protoplast culture and selection with antibiotics

Under the culture conditions in this study, all the wild and transplastomic tobacco lines, and petunia showed cell division and proliferation of calli derived from protoplasts.

After transfer of the calli onto regeneration medium, the shoots of 'Telstar' regenerated with a frequency of about 54%, whereas the regeneration rate of wild-type and transplastomic tobacco was 75 and 70%, respectively (Table 2). The results indicated that the protoplast culture procedures previously established in Cruciferous plants (Yamagishi et al. 2002) were also highly efficient in Solanaceae plants, giving regeneration rates higher than 50%.

The materials used here showed different responses to the antibiotics. Although spectinomycin was added at a concentration of 500 mg/l in the liquid medium for the initial protoplast culture, cell division was observed in all the materials irrespective of the presence of the *aadA* gene. However, the colonies of petunia stopped cell division after they were transferred into bright conditions with 16 h daylength and did not form any calli on callus formation medium. Therefore, no calli were obtained to be transplanted onto regeneration medium (Table 2). On the other hand, calli developed from the protoplasts of both wild-type and transplastomic tobacco. After transferring to regeneration medium, the calli of transplastomic tobacco turned green and shoots regenerated with a frequency of 61%. This frequency was slightly lower than that from calli on media free from spectinomycin (70%; Table 2). In comparison with this, the calli of wild-type tobacco SR-1 turned brown and stopped proliferation, from which no shoot regenerations were observed (Table 2). From these

Table 1 PCR primers used to clarify the molecular characteristics of somatic cybrids between petunia ('Telstar') and transplastomic tobacco ('TP-MDAR')

Categories	Name of primers	Descriptions and sequences (5' ? 3')
RAPD	OPA-8	GTGACGTAGG
	OPA-9	GGGTAACGCC
Chloroplast	<i>mdar</i> -F03 (forward)	Designed from the transformed gene, <i>mdar</i> GTATAGAGACAGACCGGTC
	<i>aadA</i> -R2-ATG (reverse)	Designed from the transformed gene, <i>aadA</i> CTTCGGCGATAACCGCTTCACGAG
Chloroplast	Tobacco-14168Pep-low (forward)	Present in the chloroplast of wild-type tobacco CCTCATACGGCTCCTCGTTC
	<i>mdar</i> -R02 (reverse)	Designed from the transformed gene, <i>mdar</i> AACCACGTCAAATGGATGACAGC
Mitochondria	Prps3-F1 (forward)	Designed from <i>rps3</i> TGCGATCTTTGTTGATAATAGA
	Prpl16-R1 (reverse)	Designed from <i>rpl16</i> CCGCCGAAATGGAACGCTTTGGC
	Pnad3-F1 (forward)	Designed from <i>nad3</i> GTGATGTCAGAATTTGCACCGATT
	Pnad3-R1 (reverse)	Designed from <i>nad3</i> TACTCCCGATCCGAAGCACCC
	Tobacco orfB-F (forward)	Designed from <i>atp8</i> ATGCCTCAACTGGATAAATTC
	Tobacco orfB-R (reverse)	Designed from <i>atp8</i> TTACACCATTGGGATACTTTCC

Table 2 Regeneration of shoots by protoplast culture of petunia and tobacco

Variety/strain	Spectinomycin (500 mg/l)	No. of calli transplanted (A)	No. of calli with shoots (B)	B/A (%)
Telstar (petunia)	–	660	359	54.4
	+	0	0	0
SRI (tobacco)	–	440	329	74.8
	+	120	0	0
TP-MDAR (tobacco)	–	440	307	69.8
	+	1,340	818	61.0

+ Spectinomycin was used at a concentration of 500 mg/l in media of all stages

– The media did not contain spectinomycin

results it was clarified that the selection of cells containing transplastomes with *aadA* was effective by adding spectinomycin into all the media from the initial protoplast culture to that for shoot regeneration.

Regeneration of asymmetric somatic cybrids

In order to produce somatic cybrids possessing the nuclear genome of petunia and transformed tobacco plastids, pre-treatment conditions were examined with UV irradiation of tobacco preceding cell fusion. Preliminary experiments indicated that the number of microcolonies that developed from the protoplasts of transplastomic tobacco decreased correspondingly with the length of the UV irradiation period. It was observed that treatment for 20 min almost interrupted colony formation. The UV treatment also influenced the shoot regeneration. The regeneration from the calli was inhibited in accordance with the length of treatment (Fig. 1). Especially, even though a small number

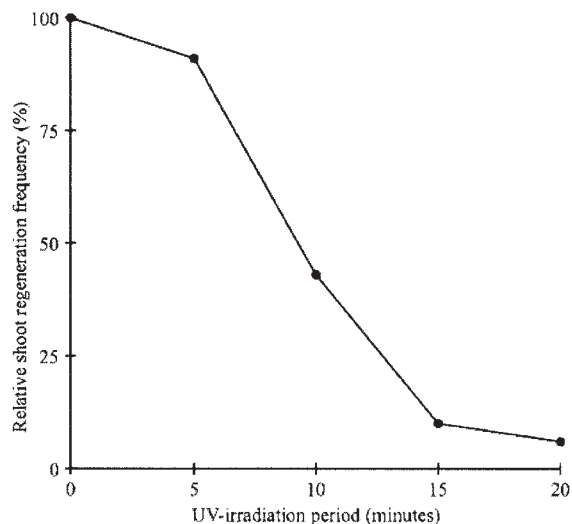


Fig. 1 Influence of UV irradiation length on the shoot regeneration rate from the calli derived from the protoplasts of transplastomic tobacco ‘TP-MDAR’. The regeneration rates are shown as relative values to that without UV irradiation

of calli were transplanted to the regeneration medium in the treatment for 20 min, the regeneration rate was suppressed to about 5% in comparison to the rate without UV irradiation (Fig. 1). Therefore, UV irradiation of protoplasts of the transplastomic tobacco for 20 min was adopted, and thereafter, the cell fusion with petunia was conducted.

Protoplasts were cultured under the aforementioned conditions with 500 mg/l spectinomycin in media after cell fusion treatment using PEG. Shoot regeneration was observed in three trials of cell fusion, but the regeneration rates were much lowered (18.1, 16.0, and 6.1%) compared with those from the protoplasts of tobacco and petunia without cell fusion (Table 3). The low regeneration rates demonstrated the effects of UV irradiation on the tobacco protoplasts and the effects of spectinomycin on petunia protoplasts. Though, the effect of UV irradiation was not complete and most of the regenerants of the two experiments (about 97 and 98%), and about a half of another experiment (46%) expressed the morphology of tobacco. These were regarded as shoots of ‘TP-MDAR’ that evaded UV irradiation. Meanwhile, although the frequencies were low, regenerated shoots exhibiting the morphological characteristics of petunia were obtained in the two cell fusion treatments (Experiment No. 1 and 2); i.e., one and two plants, respectively, were judged to be petunia from morphological observations (Table 3). Furthermore, six out of 11 regenerated shoots were judged to be petunia in the third experiment, and in total five plants of petunia type have been established after the cell fusion (Table 3). As shown in Fig. 2, where the regenerated plant in Experiment No. 1 was compared with the parents, both the petunia parent and the regenerant had smaller leaves than tobacco, but they possessed purple flowers and larger-sized petals than the tobacco parent whose petal color was pale pink.

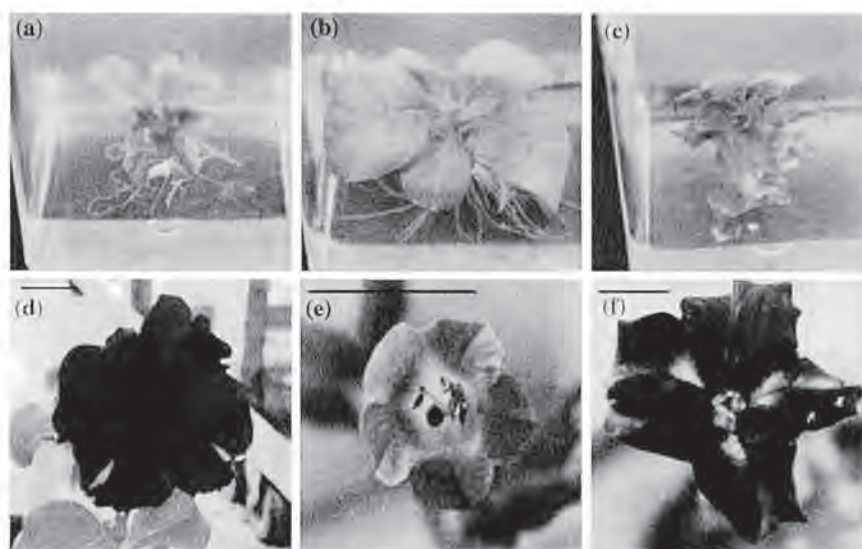
Molecular characteristics of the somatic cybrids

Molecular characteristics of the nuclear, chloroplast, and mitochondrial genomes were investigated for five regenerated plants from the three cell fusion experiments that had morphologies similar to petunia. In order to determine the characteristics of the nuclear genome, RAPD analyses

Table 3 Regeneration of shoots after cell fusion treatment between ‘Telstar’ (petunia) and ‘TP-MDAR’ (tobacco)

Experiment	No. of calli transplanted (A)	No. of calli with regenerated shoots (B)	B/A (%)	Shoots of tobacco type (C)	C/B (%)	Shoots of petunia type (D)	D/B (%)	Plants of petunia type
No. 1	160	29	18.1	28	96.6	1	3.4	1
No. 2	600	96	16.0	94	97.9	2	2.1	2
No. 3	180	11	6.1	5	45.5	6	54.5	2
Total	940	136	14.5	127	93.4	9	6.6	5

Fig. 2 Morphological comparison of regenerated shoots and plants after cell fusion treatment with the parental plants. **a–c** Comparison of shoot morphology of a somatic cybrid (e) with ‘Telstar’ (a) and ‘TP-MDAR’ (b). **d–f** Comparison of flower morphology of a somatic cybrid (f) with ‘Telstar’ (d) and ‘TP-MDAR’ (e). For the somatic cybrid, the regenerant of Experiment No. 1 was observed. Bar 2 cm



were performed. Using random primers that discriminated the polymorphic DNA fragments between the partners of somatic hybridization, the PCR patterns of regenerants were compared with those of the parents. Polymorphic PCR patterns were observed with the primers OPA-8 and OPA-9. The regenerant from the Experiment No. 1 demonstrated the same fragment pattern as the petunia parent (Fig. 3a). All the other four cybrid plants also showed the identical pattern. The results of RAPD patterns along with the morphology indicated that the regenerants had the characteristics of the nuclear genome of petunia.

PCR was also conducted for the chloroplast genome using primers complementary to DNA sequences in the *aadA* gene and *mdar* gene transformed into the plastids of tobacco. In addition, a primer complementary to the *mdar* gene was used in combination with a primer sequence present in the chloroplast genome of wild-type tobacco, ‘SR-1’ for another PCR. As exemplified with the plant of Experiment No. 1, it was clearly observed that the regenerated plant had the plastid genes that had been introduced to the tobacco by plastid transformation (Fig. 3b, c). Furthermore, the Southern hybridization pattern of mitochondrial genes was compared among the somatic cybrid and parents. While the

parental species showed differences in hybridization patterns for all the *rps3/rpl16*, *nad3*, and *atp8* genes, the somatic cybrid demonstrated a completely identical pattern to petunia (Fig. 4). From this, the somatic cybrid was judged to have succeeded in inheriting mitochondria from petunia. The same results were obtained for the other four cybrids.

These results, as a whole, ascertained that the regenerated shoots with a morphology resembling petunia had transformed plastids in a nuclear background of petunia. This finding indicates the successful transfer of transgenic plastids from tobacco to petunia. Such a targeted cybridization was also succeeded in citrus where the mitochondrion genome inducing cytoplasmic male sterility was combined with nuclear and chloroplast genomes of other species (Guo et al. 2004). Whereas this is the first report of cybrids containing the plastid genes artificially introduced by plastid transformation.

Expression of *mdar* in the somatic cybrids

By northern analysis for the *mdar* gene, the hybridization bands of the expected size were observed in ‘TP-MDAR’ and the somatic cybrid. We obtained the same result for all

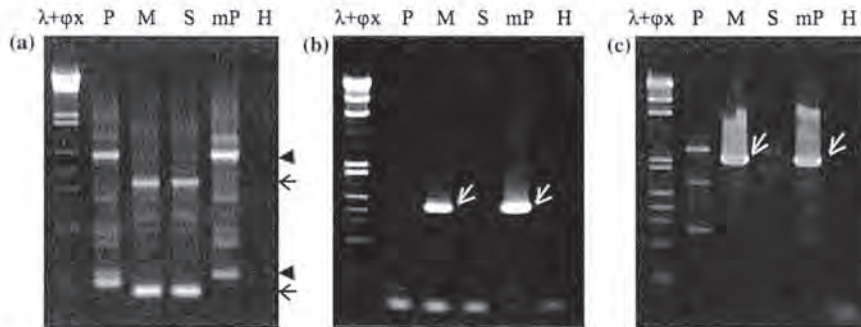


Fig. 3 Molecular characteristics of a somatic cybrid between transplastomic tobacco, 'TP-MDAR', and petunia, 'Telstar', for nuclear and chloroplast genomes. Regenerated plant (*mP*; Experiment No. 1) was compared with the parents (petunia, 'Telstar' (*P*), and transplastomic tobacco, 'TP-MDAR' (*M*), and wild-type tobacco, 'SR-1' (*S*), **a** RAPD-PCR with OPA-8, **b** PCR with the primers from the

transformed genes (*mdar* and *aadA*) into tobacco, **c** PCR with the primer from the *mdar* and that designed in original chloroplast genome of the wild-type tobacco, 'SR-1'. ($k + / X$; molecular markers). *Arrowheads* and *arrows* indicate the fragments specific to petunia and tobacco, while *white arrows* show the specific bands to transplastomic tobacco and cybrid

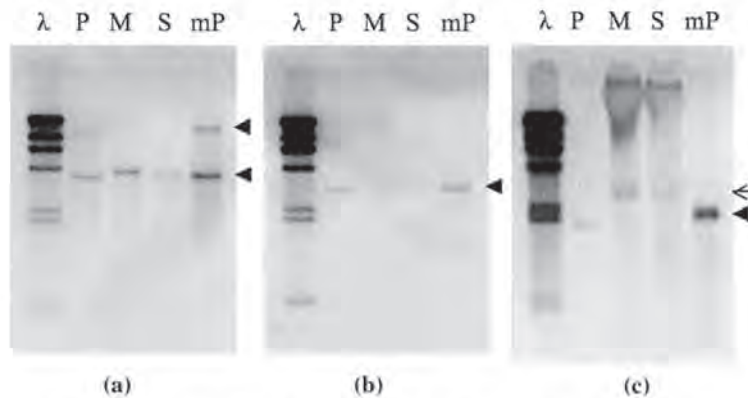


Fig. 4 Southern hybridization patterns of a somatic cybrid between transplastomic tobacco, 'TP-MDAR', and petunia, 'Telstar'. Regenerated plant (*mP*; Experiment No. 1) was compared with the parents [petunia, 'Telstar' (*P*), and transplastomic tobacco, 'TP-MDAR' (*M*)],

and the wild-type tobacco, 'SR-1' (*S*). *Arrowheads* and *arrow* indicate the fragments specific to petunia and tobacco, respectively. **a** *rps3/rpl16* gene region, **b** *nad3*, **c** *atp8*. k molecular marker ($k/HindIII$)

the six somatic cybrid plants. In comparison, the petunia parent and the wild-type tobacco, 'SR-1', exhibited no signals (Fig. 5). It was clear that the introduced *mdar* gene from 'TP-MDAR' into the somatic cybrids was transcribed similarly to transplastomic tobacco.

Discussion

Petunia is an important ornamental plant cultivated worldwide mainly as a bedding flower. Genetic engineering has been developed for enhancing resistance to abiotic stresses such as chilling injury to extend the growing season (Chiang et al. 2005), in addition to the development of novel colored flowers (Mol et al. 1999) and delayed leaf senescence (Khodakouskaya et al. 2005). While these

genetic engineering trials have depended solely upon transformation of the nuclear genome, Zubko et al. (2004) reported the transformation of petunia plastids using *aadA* and *gusA* reporter genes. However, the efficiency of plastid transformation in petunia was much lower than that established in tobacco, and to our knowledge, further reports ascertaining the stability and effectiveness of plastid transformation in petunia has not been published so far.

To exploit an alternative approach to the development of plastid transformation technologies for recalcitrant species other than tobacco, Kuchuk et al. (2006) proposed the usage of remote cytoplasmic hybrids based on two cell fusion steps. In the first step, they produced cybrids that combined the nucleus of tobacco and plastids of other recalcitrant Solanaceae species. After obtaining

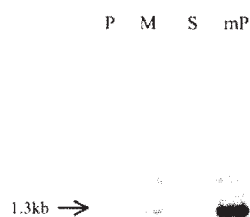


Fig. 5 Northern hybridization of the *mdar* gene in the somatic cybrid (*mP*; Experiment No. 1) in comparison with the parents [petunia, ‘Telstar’ (*P*), transplastomic tobacco, ‘TP-MDAR’ (*M*), and wild-type tobacco [‘SR-1’(*S*)]

transplastomic plants using PEG-mediated DNA treatment of protoplasts of the cybrids, they subsequently asymmetrically fused the somatic cells of the transformant with the recalcitrant species, which originally provided the plastids in the first cell fusion treatment. They reported, by this procedure, the production of transplastomic *Salpiglossis sinuata*. However, this technique needs complicated steps and takes a substantial amount of duration before obtaining transplastomic plants. Because there are already various types of tobacco with transformed plastids that have important pharmaceutical and agronomical genes, it is necessary to develop an easy and quick method to transfer the transformed plastids from tobacco to other more significant and practical Solanaceae crops. This report is the first example of such a procedure.

Species belonging to *Nicotiana* and *Petunia* are sexually incompatible with each other, and thus, several studies have reported the production of intergeneric somatic hybrids (Glimelius and Bonnett 1986; Pental et al. 1986; Mulin and Tran Thahn Van 1989; Hinnisdaels et al. 1991; Dragoeva et al. 1999). Most of them reported the regeneration of plants morphologically resembling tobacco, while Pental et al. (1986) obtained the cybrids that combined the nuclear genome from petunia and chloroplasts of tobacco. To obtain this type of somatic cybrids, a nitrogen reductase deficient and streptomycin resistant double mutant of *N. tabacum* was used, and somatic cybrids were selected by omitting inorganic nitrogen from the medium or adding streptomycin in some steps of culture (Pental et al. 1986). However we also obtained somatic cybrids that had the nuclear genome of petunia and transformed plastids of tobacco in this study, more than 90% of the regenerants in total were tobacco type plants. In order to eliminate the nuclear genome of tobacco, UV irradiation before cell fusion

treatment was used. The length of the UV treatment was determined according to preliminary experiments investigating the effects on colony formation and shoot regeneration from protoplasts of tobacco. However, the treatment was not considered to be enough, and many protoplasts escaped the irradiation in the case of cell fusion, though the difference of the frequencies was observed among the trials. It would be necessary to adopt stronger treatment before cell fusion to obtain a higher frequency of cybrid formation with the petunia nuclear genome. On the other hand, selection with spectinomycin added in all the steps of culture was complete, because all the petunia-like plants possessed chloroplasts in which *aadA* gene had been introduced.

The transplastomic tobacco plants used here for cell fusion possessed the gene encoding MDAR, one of the antioxidative enzymes functioning in ascorbate–glutathione cycle. This cycle is known to serve to remove ROS in plant tissues and to enhance tolerance against various kinds of abiotic stress such as high light intensity. In the transplastomic tobacco plants used as the starting material, it was observed previously that the gene was expressed highly and the enzyme showed higher activity compared with wild-type tobacco (Hayashi et al. 2007). The incorporation of the MDAR gene is useful for important bedding flowers like petunia, because both the growing season and cultivating area could be expanded by increased tolerance to abiotic stress. In this experiment, it was ascertained that the *mdar* gene was transcribed in the somatic cybrids as the transplastomic tobacco plants. We are now producing the next generation by self-pollination and are proceeding to examine their stress tolerance. Furthermore, cell fusion between the transplastomic tobacco and widely cultivated Solanaceae vegetables such as tomato and eggplant is now being undertaken. These studies could expand the possibilities for the practical usage of transformed plastids obtained in tobacco for the breeding of other important Solanaceae crops.

Acknowledgments This work was partly supported by the Program for Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry (BRAINI). We are grateful to Y. Yamashita for the assistance.

References

- Chiang YJ, Stushnoff C, McSay AE (2005) Overexpression of mannitol-1-phosphate dehydrogenase increases mannitol accumulation and adds protection against chilling injury in petunia. *J Am Soc Hortic Sci* 130:605–610
- Dragoeva A, Atanassov I, Atanassov A (1999) CMS due to tapetal failure in cybrids between *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 55:67–70
- Glimelius K, Bonnett HT (1986) *Nicotiana* cybrids with *Petunia* chloroplasts. *Theor Appl Genet* 72:794–798

- Guo WW, Prasad D, Cheng YJ, Serrano P, Oeng XX, Grosser JW (2004) Targeted cybridization in citrus: transfer of Satsuma cytoplasm to seedy cultivars for potential seedlessness. *Plant Cell Rep* 22:752–758
- Hayashi S, Tujimura M, Terachi T (2007) Characterization of transplastomic tobacco plants with the genes encoding for the ROS-scavenging enzymes. *Proc. International Symposium on Chloroplast Genomics and Genetic Engineering*, pp 27
- Hinnisdaels S, Bariller L, Mouras A, Sidorov V, Del-Favero J, Veuskens J, Negrutiu I, Jacobs M (1991) Highly asymmetric intergeneric nuclear hybrids between *Nicotiana* and *Petunia*: evidence for recombinogenic and translocation events in somatic hybrid plants after “gamma”-fusion. *Theor Appl Genet* 82:609–614
- Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM (2003) Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res* 12:111–114
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126:105–110
- Khodakouskaya M, Li Y, Li J, Vaňková R, Malbeck J, McAvoy R (2005) Effects of *cor15a-IPT* gene expression on leaf senescence in transgenic *Petunia x hybrida* and *Dendranthema x grandiflorum*. *J Exp Bot* 56:1165–1175
- Kuchuk N, Sytnyk K, Vasilenko M, Shakhovskiy A, Komarnytsky I, Kushmir S, Gleba Y (2006) Genetic transformation of plastids of different *Solanaceae* species using tobacco cells as organelle hosts. *Theor Appl Genet* 113:519–527
- Mol J, Cornish E, Mason J, Koes R (1999) Novel coloured flowers. *Curr Opin Biotechnol* 10:198–201
- Mulin M, Tran Thahn Van K (1989) In vitro flower formation from thin epidermal cell layers of a partial somatic hybrid between *Petunia hybrida* (Hort.) and *Nicotiana plumbaginifolia* (Viv.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 16:195–206
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Pental D, Hamill JD, Pirrie A, Cocking EC (1986) Somatic hybridization of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida*. Recovery of plants with *P. hybrida* nuclear genome and *N. tabacum* chloroplast genome. *Mol Gen Genet* 202:342–347
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nat Biotechnol* 19:870–875
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PTJ, Staub JM, Nehra NS (1999) Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J* 19:209–216
- Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998) Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 18:20–24
- Svab Z, Hajdukiewicz P, Maliga P (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8526–8530
- Yamagishi H, Nakagawa S (2004) Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea*). *J Japan Soc Horticult Sci* 73:319–323
- Yamagishi H, Landgren M, Forsberg J, Glimelius K (2002) Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor Appl Genet* 104:959–964
- Zubko MK, Zubko EI, van Zuijlen K, Meyer P, Day A (2004) Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res* 13:523–530

5. ベンサミアナタバコ (*N. benthamiana*) を用いた葉緑体の遺伝子組換え

概要

ベンサミアナタバコは、近年、ジーンサイレンシングを利用した核遺伝子の機能解析など、植物分子生物学の研究に欠かすことができない材料となっている。本研究プロジェクトでは、このベンサミアナタバコを用いて、核と葉緑体の遺伝子間相互作用を解明する実験系を構築することを目的に、葉緑体の遺伝子組換え体の作出を試みた。その結果、タバコの *apx* を持つ個体を2つ得ることができた（世界で2番目の成功例）。今後、ベンサミアナタバコの葉緑体の遺伝子組換えがタバコ (*N. tabacum*) 同様ルーティン化されれば、植物科学の基礎的なところで、様々な組換え体が広く用いられると予想している。

9 章 葉緑体形質転換

9-3

ベンサミアナタバコの葉緑体形質転換プロトコール

田中義行・辻村朋彦・寺地 徹

■ ベンサミアナタバコ ■

学名	<i>Nicotiana benthamiana</i>
分類	被子植物・双子葉・ナス科
サイズ	0.2～1.2 m
世代期間	3 か月(無菌播種→生育→順化→温室内で育成→採種)
おもな研究	有用タンパク質生産, 生育促進, 収量増加
染色体数	$2n = 38$ (複二倍体)



概要

N. benthamiana (以降ベンサミアナタバコ) は *N. tabacum* (以降栽培タバコ) の近縁種であり、オーストラリアに分布している。ベンサミアナタバコは複二倍体種であり、*N. suaveolens* ($n = 16$) と *N. debneyi* ($n = 24$) の交雑によって生じたと考えられている。世代期間が短いことや多くのウイルスが感染・増殖すること、安定的に核への遺伝子導入やウイルス誘導型ジーンサイレンシング(VIGS)が行えることから、植物ウイルス研究や分子生物学的研究に広く用いられている¹⁾。

葉緑体は光合成や多くの代謝経路が存在する植物を特徴づけるオルガネラである。葉緑体は自身のゲノムをもつが、葉緑体で働く大部分の遺伝子は核にコードされ、葉緑体の機能は核に制御されている。分子生物学的解析手法が確立されているベンサミアナタバコで葉緑体形質転換が可能になれば、核遺伝子に対するジーンサイレンシングの手法などと組み合わせることで、葉緑体と核の相互作用を解析する実験系が構築できる。葉緑体形質転換は栽培タバコについては安定的な実験系が確立されているが、ベンサミアナタバコでは近年まで安定した形質転換系は報告されてこなかった²⁾。

本稿では、栽培タバコの形質転換系を改変したベンサミアナタバコの葉緑体形質転換系について紹介する。

■ 準備する器具・試薬等 ■

<p>材料</p>	<p>植物材料：ベンサミアナタバコ種子 ベクター：pPRV-112A'-benthamiana</p> <p>栽培タバコ葉緑体形質転換用ベクター pPRV-112A' の相同組換え領域をベンサミアナタバコ由来のものと置換したものをベクターとして用いる(図1)。</p> <p>目的遺伝子と選抜マーカーに用いるスペクチノマイシン耐性遺伝子であるアミノグリコシド-3'-アデニルトランスフェラーゼ (<i>aadA</i>) 遺伝子は、形質転換体ベクターと葉緑体ゲノム間の相同組換えにより、ベンサミアナタバコ葉緑体ゲノムの逆位反復配列 (IR) 領域にある 16S rDNA/<i>trnV</i> と <i>rps7/12</i> の遺伝子間領域に組み込まれる。</p> <div data-bbox="933 448 1348 672" style="text-align: center;"> <p>図1 ベクターのコンストラクト</p> </div>
<p>試薬・培地</p>	<p>MS 基本培地(組成は表 B を, 作成方法は表 C の 5 液法を参照) + 30g/L ショ糖 蒸留水を加えて 1L にメスアップする. pH 5.6 ~ 5.8 に調整後, 121 °C, 15 分間オートクレーブ滅菌する. 固形培地として使用する場合は, 3g/L ゲランガムまたは 8g/L 植物培養用寒天を添加.</p> <p>前培養培地 ビタミンを除いた MS 培地 + 1mg/L 塩酸チアミン(和光純薬工業) + 1mg/L BAP (和光純薬工業) + 10µg/L NAA (和光純薬工業) 3g/L ゲランガム(和光純薬工業)を加え固形培地にする. 滅菌シャーレ(サイズ: 100mm × 20mm)に約 20mL ずつ分注する.</p> <p>選抜用培地 前培養培地 + 500mg/L スペクチノマイシン(Sigma-Aldrich) 3g/L ゲランガム(和光純薬工業)を加え固形培地にする. スペクチノマイシンはオートクレーブ後, 60°C程度に冷めてから無菌的に添加する. 滅菌シャーレ(サイズ: 100mm × 15mm)に約 30mL ずつ分注する.</p> <p>不定芽伸長用培地 MS 培地 + 500mg/L スペクチノマイシン(Sigma-Aldrich) 8g/L 植物培養用寒天(ナカライテスク)で固形培地にする. スペクチノマイシンはオートクレーブ後, 60°C程度に冷めてから無菌的に添加する. プラントボックス(サイズ: 60 × 60 × 100 mm)に約 50mL ずつ分注する.</p> <p>エタノール(特級・和光純薬工業) 2.5M 塩化カルシウム(和光純薬工業) 0.1M スペルミジン(Sigma-Aldrich)</p>

器具・装置	定性ろ紙 No.1 (アドバンテック東洋) パーティクルガン (PDS-1000/He, Bio-Rad Lab.) PDS/Helios 用マイクロキャリアパッケージ 0.6 μ m 金粒子 (Bio-Rad Lab.) PDS-1000/He ラブチャーディスク 1350 psi (Bio-Rad Lab.) PDS-1000/He 用スットピングスクリーン (Bio-Rad Lab.) PDS-1000/He 用マイクロキャリア (Bio-Rad Lab.)
-------	---

■ 手 順 ■

1 金粒子の調製

- 1) 1.5 mL エッペンドルフチューブに金粒子 (粒径 0.6 μ m) 60 mg を量りとり
↓
- 2) 70% EtOH 1 mL を加え, 3 ~ 5 分間ボルテックス.
↓
- 3) 15 分間 静置.
↓
- 4) 14,000 rpm で 5 分間遠心.
↓
- 5) ピペットで上清を取り除く.
↓
- 6) 以下の操作を 3 回繰り返す.
 (a) 1 mL 滅菌水を加える.
 (b) 1 分間ボルテックス,
 (c) 1 分間静置.
 (d) 14,000 rpm で 2 分間遠心.
 (e) ピペットで上清を取り除く.
 ↓
- 7) オートクレーブ滅菌した 50% グリセロール 1 mL に懸濁する (最終濃度 60 mg/mL).
↓
- 8) -20 $^{\circ}$ C で保存できる.

2 植物体の準備

- 9) ベンサミアナタバコ種子を 1% アンチホルミンで 7 分殺菌処理. その後, 滅菌水で 3 回以上リンスする.
↓
- 10) 滅菌した種子をクリーンベンチ内で 30 mL の MS 培地を分注したシャーレ上に播く. 25 $^{\circ}$ C, 16 時間明期で培養する.
↓
- 11) 播種後 5 日で発芽するので, MS 培地を 50 mL 入れたプラントボックスに芽生えを植え替える.
↓

★ Tips ① ★

葉がろ紙に十分密着していないと、パーティクルガンによる遺伝子導入後、葉をカミソリで切る操作が困難になる。

- 12) 葉が7～8枚でる程度まで成長したら、葉を遺伝子導入の外植片として用いる。

3 外植片の調製(1日目)

- 13) 滅菌シャーレと同じ径のオートクレーブ滅菌したろ紙を前培養培地の上に敷く。



- 14) ろ紙を敷いた前培養培地に葉の胚軸面を上にして置く。大きさ3×4cm程度の緑色が濃い葉を選ぶ。



- 15) 葉脈を切断し、培地に葉を密着させる(図2a)。▶ Tips ①



- 16) 25℃で一晩培養し、遺伝子導入処理へ進む。

4 パーティクルガンによる遺伝子導入(2日目)

6ショット分を1“トライアル”として調製する。

- 17) 50%グリセロールに懸濁された金粒子をボルテックスし、50μL×(トライアル数+1)を取りだし、1.5mLエッペンチューブに入れる。



- 18) 14,000rpm, 1分遠心後、上清を取り除く。



- 19) 以下を3回繰り返す。

(a) 滅菌水1mLを加え、ボルテックスで攪拌する。

(b) 14,000rpmで1分遠心後、上清を取り除く。



- 20) 滅菌水50μL×(トライアル数+1)を加え、ボルテックスでよく攪拌する。



- 21) 氷上で1トライアル50μLずつ金粒子を1.5mLチューブに分注する。



- 22) ボルテックスをかけながら、以下のものを順に手早く加える。

・10μL ベクター (1μg/μL)

・50μL 2.5M 塩化カルシウム(和光純薬工業)

・20μL 0.1M スペルミジン(Sigma-Aldrich)



図2 外植片の調製

(a) 本葉の前培養, (b) パーティクルガンによる打ち込み。ストップングスクリーン(黒矢印)とサンプル(赤矢印)間の距離は6cm。(c) 選抜用培地への葉片の植え替え。

- ↓
- 23) 低温室(4℃)で30分間続けてボルテックスする。
- ↓
- 24) エタノール 200 μL を加え、ボルテックスを行い、10,000 rpm、10 秒遠心し上清を除去する。
- ↓
- 25) 以下の操作を3回繰り返す。
 (a) 200 μL のエタノールを加え、ピペティングで懸濁する。
 (b) 10,000 rpm で10 秒遠心し、上清を除去する。
- ↓
- 26) クリーンベンチ内で30 μL のエタノールを加え、懸濁する。
- ↓
- 27) クリーンベンチ内でパーティクルガン PDS-1000/He を用いて、ベクターをコーティングした金粒子を前培養した葉に打ち込む^{*1}。マイクロキャリア 1 枚あたり 6 μL の金粒子を均一に塗布する。打ち込み条件は、1350 psi、ストップングスクリーンとサンプル間の距離 6 cm で行う(図 2 b)。
- ↓
- 28) 打ち込み後、シャーレをパラフィルムでシールし、2 日間、25℃で培養する。

5 遺伝子組換え体の選抜

- 29) クリーンベンチ内で葉を 4 mm 角の大きさに切り分け、スペクチノマイシンを含む選抜用培地に置床する(図 2 c)。
- ↓
- 30) 選抜用培地に移して4週間程度すると、不定芽が分化してくる。
- ↓
- 31) 分化してきた不定芽を切りだして新しい選抜用培地に植え替え、不定芽の伸長を促す。緑色カルスが生じた場合も同様に新しい選抜用培地に植え替える。
- ↓
- 32) 不定芽が伸長し葉が2~3枚になった段階で、不定芽伸長用培地を入れたプラントボックスに植え替え、発根を促進する。▶ **Tips ②**
- ↓
- 33) 根が伸長し草丈が 10 cm 程度伸長した段階で、閉鎖系温室で栽培するために順化处理を行う(図 3 a)。

6 順化と閉鎖系温室における栽培

- 34) パーミキュライトを敷きつめた育苗用ポットを用意する。
- ↓
- 35) 形質転換体をプラントボックスから取りだし、根から培地を丁寧に取り除き、育苗用ポットに移植する。
- ↓
- 36) ポットを水受け皿に置き、植物体の上にプラントボックスを逆さまに被せ、さらにビニールで覆う(図 3 b)。

^{*1} パーティクルガンのチャンバー内は70%エタノールを含むキムタオルでふいて滅菌する。そのほかの器具は100%エタノールで滅菌し、ろ紙を敷いた滅菌シャーレ上で乾燥させる。ただし、ラプチャーディスクは長時間のエタノールへの浸漬が好ましくないため、70%エタノールに濡らせたのち、100%エタノールに濡らして滅菌し乾燥させる。

★ Tips ②★

ゲランガム培地では、不定芽がガラス化し生育不良を示すことが多い。寒天培地に移し替えることでガラス化が緩和し、不定芽が伸長し発根する。



図3 葉緑体形質転換体の栽培

(a) プラントボックス内の組換え体, (b) 閉鎖系温室における順化処理, (c) 閉鎖系温室における栽培.

- ↓
- 37) 1週間ほどかけて段階的にビニールをはがし、湿度を徐々に下げていく。最終的にプラントボックスを取り去る。
- ↓
- 38) 根が活着した段階で、ニッピー園芸培土1号を詰めた素焼き鉢に植え替える(図3c)。
- ↓
- 39) 開花するまで栽培し、放任受粉で自殖種子を得る(図4)。
- ↓
- 40) 得られた種子は4℃で保存する。

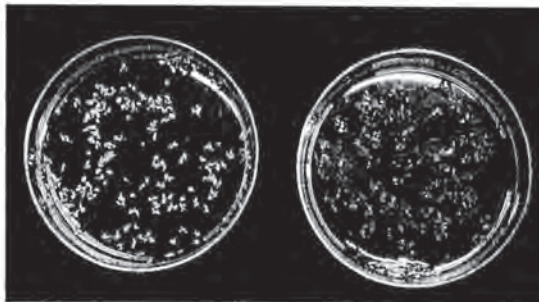


図4 葉緑体形質転換ペンサミアナタバコ種子の播種

左: 野生型, 右: アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子(*apx*)を導入した葉緑体形質転換体。500 mg/L スペクチノマイシンを含むMS培地へ播種した。播種後約2週間の様子。

★ Tips ③ ★

葉緑体形質転換では、再分化した当代の植物体(T_0 個体)がヘテロプラスミーであることが多い。ヘテロプラスミー個体では次世代種子で導入遺伝子がしばしば欠落する。PCRで遺伝子導入を確認したのち、サザンブロット解析によりその個体がホモプラスミー(形質転換葉緑体のみを含む個体)であることを調査する。植物体からDNAを抽出し、*Sac* IIで消化後、相同組換え領域の断片をランダムDIGラベリングしたプローブでサザンハイブリダイゼーション解析を行う。形質転換体では、野生型より挿入配列の分だけ大きなシグナルが認められる。野生型シグナルと形質転換型シグナルの強度の比較により、植物体がホモプラスミーであるかを判定することができる(図5)。

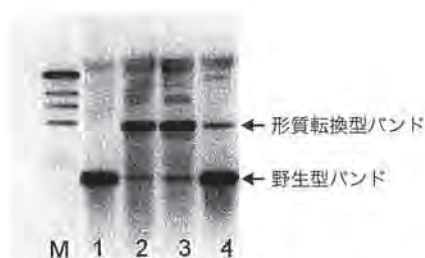


図5 サザンブロット解析によるホモプラスミー個体の判定
 M：入マーカー、1：野生型、2～3：ホモプラスミーの組換え体、4：ヘテロプラスミーの組換え体。Sac II で消化した全 DNA 2 μg をアガロースゲルで電気泳動したのち、メンブレンに転写し、相同組換え領域の葉緑体 DNA 配列のプロローブでハイブリダイゼーションさせた。

■ コメント ■

- ▶ 本形質転換条件のポイントは、寒天培地を用いて再分化後のガラス化を抑えたことである。本法と同様の遺伝子導入操作を行い、0.3%ゲランガム固形培地で再分化個体を培養すると、栽培タバコでは1トライアルあたり1～2個体の葉緑体形質転換体が得られている。当初、この形質転換条件をそのままベンサミアナタバコに適用したが、形質転換体の作出効率は著しく低くなった。ベンサミアナタバコでは栽培タバコと同程度に不定芽が得られるが、不定芽を伸長させる段階でガラス化が頻繁に起こり、これが作出効率を低下させる原因であると考えた。そこで伸長と発根を促す段階で、ゲランガムでなく寒天培地を用いることでガラス化を緩和することができた。
- ▶ ベンサミアナタバコでは、核への遺伝子導入やジーンサイレンシングを安定して行うことができる。今後、これらの手法と葉緑体形質転換法を組み合わせることにより、葉緑体と核の相互作用に関する研究が展開することが期待される。

【文 献】

- 1) Goodin MM et al, *MPMI*, **21** (8), 1015 (2008). (ベンサミアナタバコの葉緑体形質転換：韓国グループ)
- 2) Davarpanah SJ et al., *J Plant Biol*, **52** (3), 244 (2009). (ベンサミアナ総説)

6. ダイコンのオグラ型及び正常型細胞質が持つミトコンドリアゲノムの構造解析

概要

ダイコン (*Raphanus sativus*) には、雄性不稔を引き起こすオグラ型細胞質が存在する。オグラ型細胞質は他のアブラナ科作物にも雄性不稔を生じさせることから、育種における重要性が高く、基礎と応用の両面から、これまでも多くの研究がなされてきた。その結果、オグラ型細胞質は、我が国の海岸に自生する野生のハマダイコンに起源すること、雄性不稔はミトコンドリアゲノム上にある原因遺伝子 *orf138* の発現によることが明らかとなった。しかし、*orf138* という遺伝子それ自体が、いつ、どこで、どのように生じたのかについては、全くわかっていなかった。そこで、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’のダイコン2系統について、NGSを用いたミトコンドリアの全ゲノム解析を初めて行い、両ゲノムの構造を詳細に比較した。その結果、オグラ型 mtDNA は全長 258,426bp、正常型 mtDNA は全長 244,037bp の環状 DNA 分子を持つことがわかり、雄性不稔の原因遺伝子 *orf138* は、両ゲノムの分化にともなう mtDNA の大規模な再構成の過程で偶然生じた、新規遺伝子であることが示唆された。

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.)

Yoshiyuki Tanaka, Mizue Tsuda, Keita Yasumoto, Hiroshi Yamagishi and Toru Terachi*

Abstract

Background: Plant mitochondrial genome has unique features such as large size, frequent recombination and incorporation of foreign DNA. Cytoplasmic male sterility (CMS) is caused by rearrangement of the mitochondrial genome, and a novel chimeric open reading frame (ORF) created by shuffling of endogenous sequences is often responsible for CMS. The Ogura-type male-sterile cytoplasm is one of the most extensively studied cytoplasm in *Brassicaceae*. Although the gene *orf138* has been isolated as a determinant of Ogura-type CMS, no homologous sequence to *orf138* has been found in public databases. Therefore, how *orf138* sequence was created is a mystery. In this study, we determined the complete nucleotide sequence of two radish mitochondrial genomes, namely, Ogura- and normal-type genomes, and analyzed them to reveal the origin of the gene *orf138*.

Results: Ogura- and normal-type mitochondrial genomes were assembled to 258,426-bp and 244,036-bp circular sequences, respectively. Normal-type mitochondrial genome contained 33 protein-coding and three rRNA genes, which are well conserved with the reported mitochondrial genome of rapeseed. Ogura-type genomes contained same genes and additional *atp9*. As for tRNA, normal-type contained 17 tRNAs, while Ogura-type contained 17 tRNAs and one additional *trnI*. The gene *orf138* was specific to Ogura-type mitochondrial genome, and no sequence homologous to it was found in normal-type genome. Comparative analysis of the two genomes revealed that radish mitochondrial genome consists of 11 syntenic regions (length > 3 kb, similarity > 99.9%). It was shown that short repeats and overlapped repeats present in the edge of syntenic regions were involved in recombination events during evolution to interconvert two types of mitochondrial genome. Ogura-type mitochondrial genome has four unique regions (2,803 bp, 1,601 bp, 451 bp and 15,255 bp in size) that are non-syntenic to normal-type genome, and the gene *orf138* was found to be located at the edge of the largest unique region. Blast analysis performed to assign the unique regions showed that about 80% of the region was covered by short homologous sequences to the mitochondrial sequences of normal-type radish or other reported *Brassicaceae* species, although no homology was found for the remaining 20% of sequences.

Conclusions: Ogura-type mitochondrial genome was highly rearranged compared with the normal-type genome by recombination through one large repeat and multiple short repeats. The rearrangement has produced four unique regions in Ogura-type mitochondrial genome, and most of the unique regions are composed of known *Brassicaceae* mitochondrial sequences. This suggests that the regions unique to the Ogura-type genome were generated by integration and shuffling of pre-existing mitochondrial sequences during the evolution of *Brassicaceae*, and novel genes such as *orf138* could have been created by the shuffling process of mitochondrial genome.

* Correspondence: terachi@cc.kyoto-su.ac.jp
31 Laboratory, Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Motoyama,
Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

Background

Compared with animal mitochondrial genomes that are compact and relatively uniform in size, plant mitochondrial genomes are extremely complex and have characteristic features, including large genome size, frequent reorganization and incorporation of foreign DNA [1]. Plant mitochondrial genome varies in size from 208 kb in *Brassica hirta* to 11.3 Mb in *Silene conica* [2,3], due to the expansion of non-coding sequence and duplication of a large segment. It is also well known that plant mitochondrial genome evolves rapidly in structure and slowly in sequence. Plant mitochondria contain a number of repeats. The recombination via repeat sequences is believed to be responsible for extensive structural change. Incorporation of foreign DNA fragments that originated from plastid and nuclear genomes also can be found in plant mitochondrial genome. Because of frequent recombination and incorporation of foreign DNA, extensive genome reorganization and gene-order shuffling may occur. These changes in mitochondrial genome can produce novel open reading frames, some of which result in cytoplasmic male sterility (CMS) [4].

CMS is a maternally inherited trait in which a plant is unable to produce functional pollen. CMS is an economically important trait for F₁ hybrid seed production in many crops. CMS has been widely observed in higher plants, and many reports show that CMS is caused by alteration of the mitochondrial genome [5]. These alterations often create a novel open reading frame (ORF), which consists of a chimeric sequence generated by gene shuffling or by fusion between a native gene(s) and/or an unknown sequence(s).

The Ogura male-sterile cytoplasm, which was originally found in an unknown variety of Japanese radish, is the most widely studied cytoplasm in *Brassicaceae* [6]. This cytoplasm is used in F₁ seed production of European, Chinese and Japanese radishes. The cytoplasm was introduced into *Brassica* crops by intergeneric hybridization and somatic cell fusion, and has been utilized for F₁ seed production in *Brassica* crops such as rapeseed worldwide [7,8].

A mitochondrial gene, *orf138*, is responsible for Ogura male sterility and specifically present in the mitochondrial genome of various radishes with Ogura-type cytoplasm [9]. The accumulation of ORF138 protein is observed in plants expressing the CMS phenotype, and the association of ORF138 with the inner mitochondrial membrane of male-sterile plants was reported [10]. Although it appeared that expression of the nuclear chalcone synthase gene, which is related to flavonoid biosynthesis, is inhibited in the anther of Ogura radish [11], the molecular mechanism underlying Ogura CMS by ORF138 protein is not known. The sequence of the gene *orf138* itself is also interesting;

there is no evidence that *orf138* is a chimeric gene consisting of native mitochondrial genes or sequence. No sequence homologous to *orf138* is found in public databases; therefore, the origin of *orf138* is a mystery. In addition, it has been shown that the mitochondrial genome of Ogura-type cytoplasm is highly rearranged compared with that of normal cytoplasm in radish. These rearrangements occurred in the loci *atp1*, *atp6*, *cox1* and most notably *orf138-atp8* [12-17]. The gene *orf138* is specifically located in the 5' upstream region of the gene *atp8* in Ogura radish, whereas the region is occupied by the gene *cox1* in normal radish [16]. In the evolution of *Raphanus*, how and when these extensive rearrangements occurred between two types of mitochondrial genome are not known.

In this study, in order to obtain a better understanding of the origin of *orf138* and Ogura-type mitochondrial genome in radish, we determined the complete nucleotide sequences of two mitochondrial genomes of radish, that is, Ogura- and normal-type mitochondrial genomes, and compared their structures. Gene contents and unique regions for each genome were analyzed in detail at the sequence level. Furthermore, we focused on short repeated sequences that may be involved in the recombination, leading to extensive rearrangements of the two genomes and to generation of the gene *orf138*.

Results

Radish mitochondrial genome

The Ogura and normal mitochondrial genomes are assembled as 258,426-bp and 244,036-bp circular molecules, respectively (Figure 1). The overall GC content of both mtDNAs is 45.2%, being comparable to those of other mtDNAs of *Brassicaceae*. About 7% of Ogura and 3% of normal sequences are unique to each mitochondrial genome, and 80% of Ogura and 84% of normal sequences show high similarity to the sequence of rapeseed (*Brassica napus* L.) mitochondrial genome (GenBank: AP006444.1) [18].

Gene organization of radish mitochondrial genome

Normal-type mitochondrial genome contained 33 protein-coding and three rRNA genes, while Ogura-type genomes contained same genes and one additional *atp9* (*atp9-2*). Gene content is identically conserved between the two radish mitochondrial genomes and it is also identical to that of rapeseed, except *atp9-2* in Ogura-type genome. Normal-type genome contains similar sequence to *atp9-2*, but 3' part of this sequence lacks similarity to *atp9-2*. The *atp9-2* like sequence in normal-type genome encodes 70 amino acid protein, which is lacking *atp9* domain partially. Eighteen of the conserved 33 protein-coding genes produce components of the electron transport chain and ATP

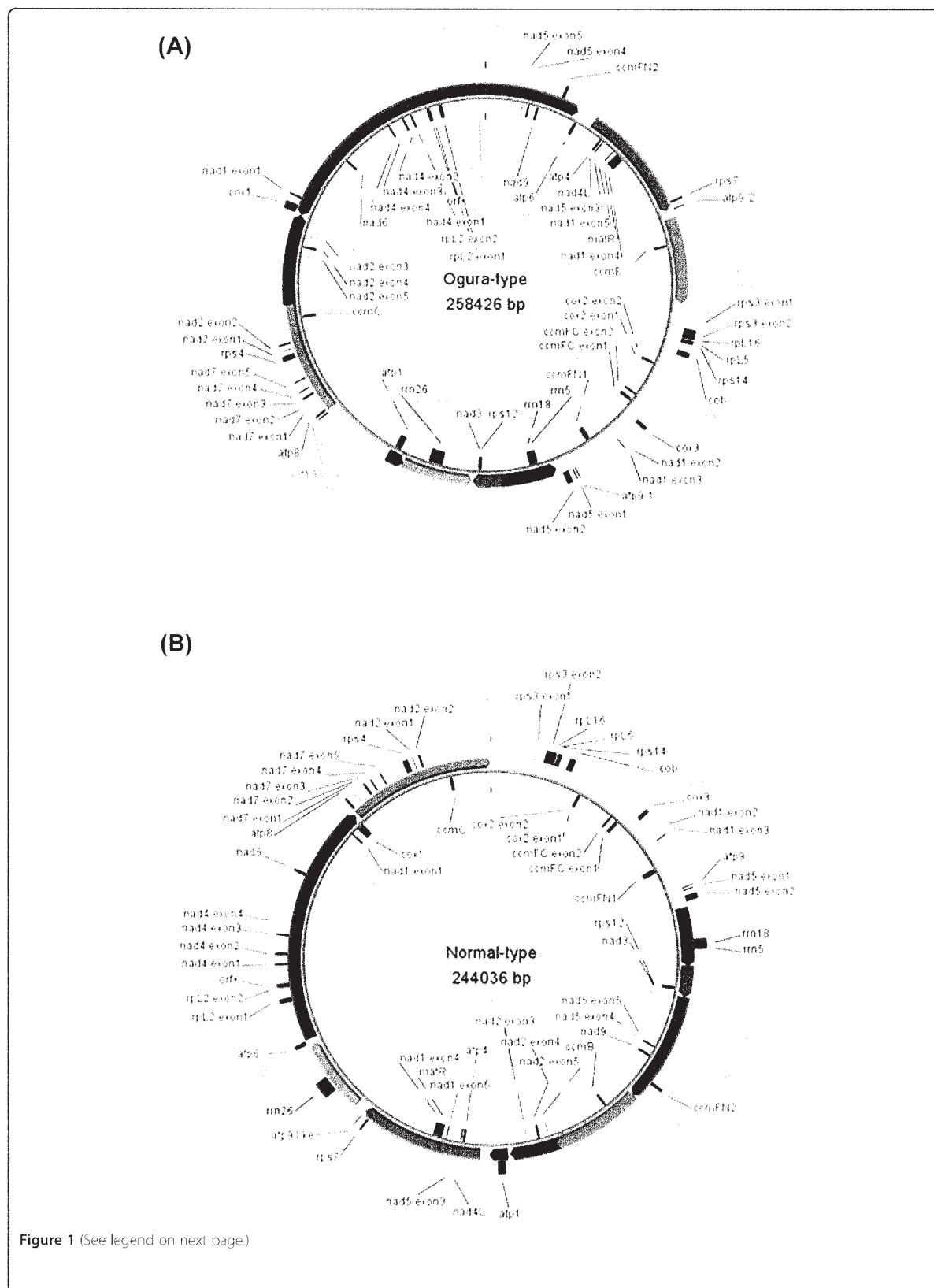


Figure 1 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Figure 1 The organization of Ogura-type (A) and normal-type (B) mitochondrial genomes represented as a "master circle". Features on forward and reverse strands are drawn on the outside and inside of the circles, respectively. Protein-coding genes are shown in red, rRNAs in blue, tRNAs in orange and *orf138* in lime green. The arcs in the same colors indicate syntenic regions between Ogura- and normal-type genomes (refer to Figure 2). Genome maps were made with CGviewer [49].

synthase: nine subunits of complex I (*nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*, *nad7* and *nad9*), apocytochrome b (*cob*) of complex III, three subunits of complex IV (*cox1*, *cox2* and *cox3*) and five subunits of complex V (*atp1*, *atp4*, *atp6*, *atp8* and *atp9*). Five additional proteins are involved in the biogenesis of cytochrome c (*ccmB*, *ccmC*, *ccmFN1/ccmFN2* and *ccmFC*). Another eight genes encode ribosomal proteins (*rpl2*, *rpl5* and *rpl16*, and *rps3*, *rps4*, *rps7*, *rps12* and *rps14*). The two remaining genes encode maturase (*matR*) and *orfX*. The gene *ccmFN* is divided into two reading frames in mitochondrial genomes of radish like in those of rapeseed and *Arabidopsis* [18,19]. Three rRNA genes (*rrn5*, *rrn18* and *rrn26*) are highly conserved between the two mitochondrial genomes of radish.

The 5' region of the gene *atp6* is highly diverged between the two radishes because of recombination that occurred in the locus [20]. The 3' end of Ogura-type *orfX* also lacks similarity to that of normal-type. This is caused by a 48-bp repeated sequence that is regarded as a minisatellite. Eleven SNPs were identified in the nine genes: four were synonymous and seven were non-synonymous (Table 1). As for tRNA, both Ogura and normal mitochondrial genomes contain 17 tRNAs, whereas Ogura genome has an additional *trnfM* (*trnfM-2*). The *trnfM-2*, which is located close to the gene *orf138* (Figure 1), has a specific SNP compared with other sequenced mitochondrial *trnfMs* in *Brassicaceae*.

Table 1 Difference in genes coding protein between normal-type and Ogura-type

Gene	Nucleic acid	Amino acid ^b
<i>nad4</i>	1010 T-C	Non-synonymous (337 L-P)
<i>cox1</i>	117 G-T	Synonymous
<i>atp6</i>	no homology in 5' terminal	
<i>atp8</i>	370 A-C	Non-synonymous (124 I-L)
	444 T-C	Non-synonymous (150 V-A)
<i>atp9</i>	65 A-G	Non-synonymous (22 I-V)
<i>rpl2</i>	840 C-T	Synonymous
<i>rpl16</i>	492 G-A	Synonymous
<i>rps4</i>	776 C-T	Non-synonymous (259 S-F)
<i>ccmC</i>	351 G-A	Synonymous
<i>ccmFC</i>	605 A-G	Non-synonymous(202 E-G)
	606 G-T	
<i>orfX</i>	no homology in 3' terminal	

a Location of SNP (Normal-Ogura).

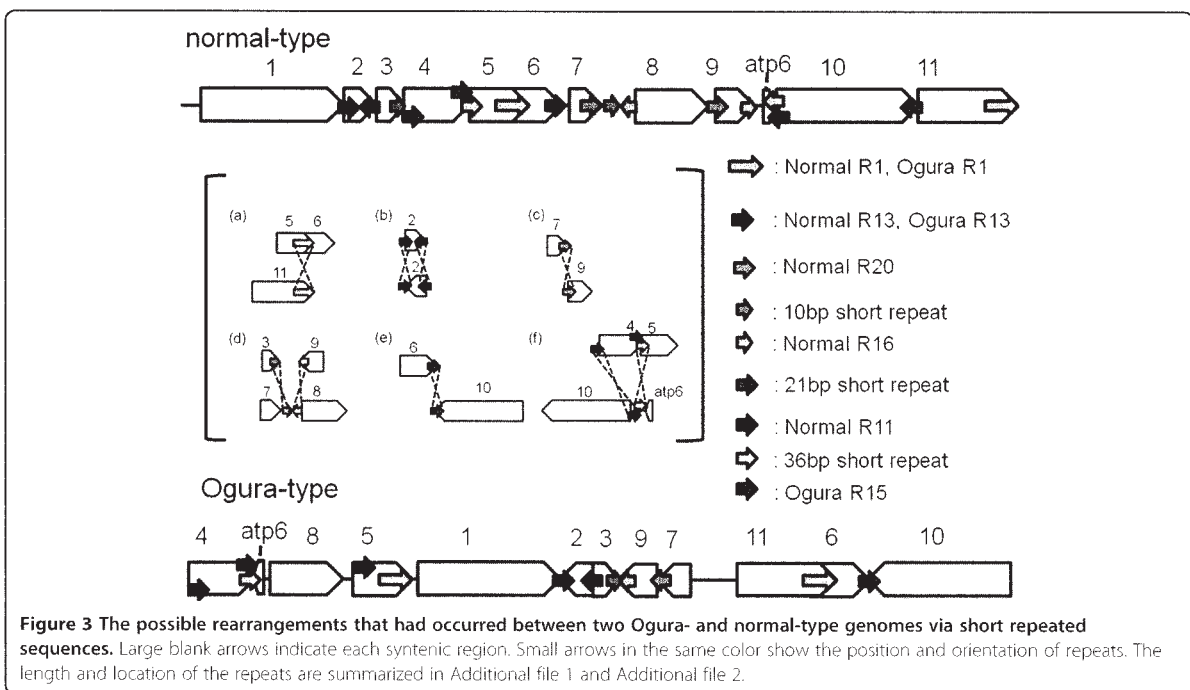
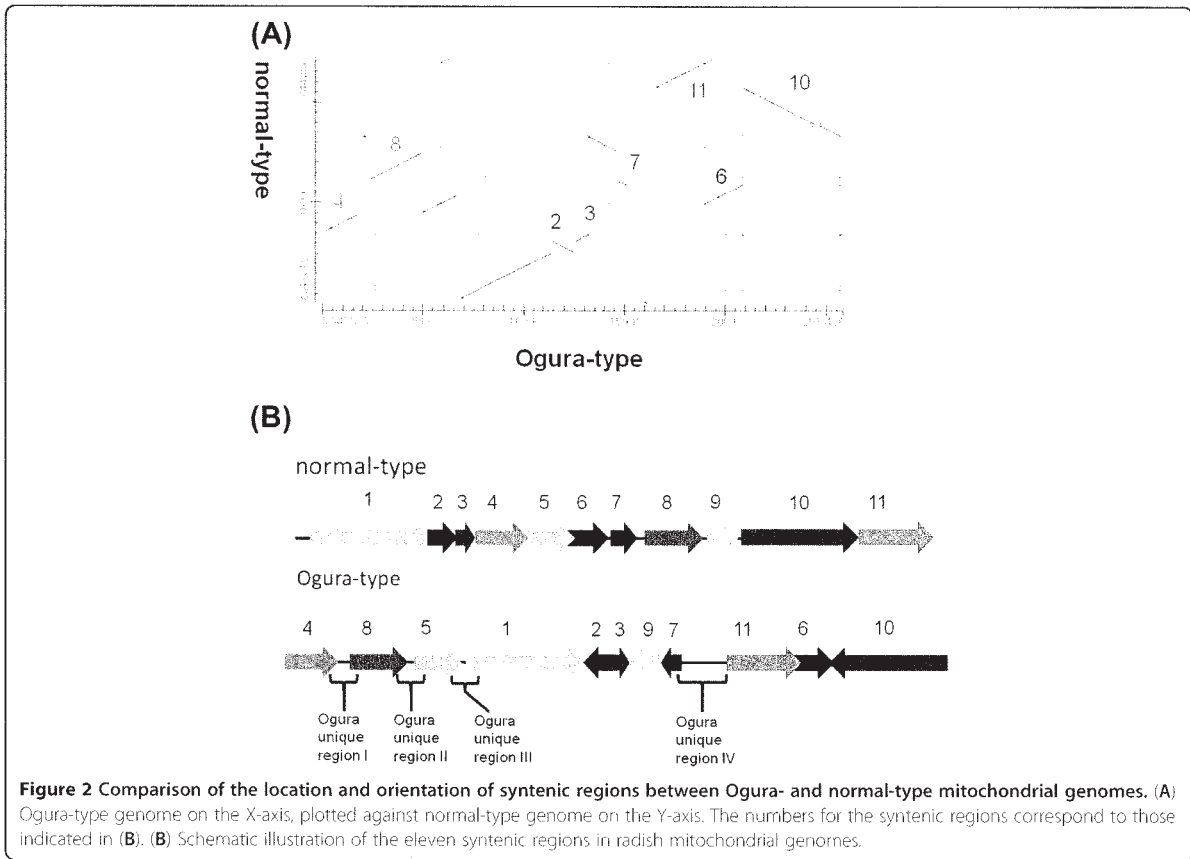
b Location of amino acid mutation (Normal-Ogura).

We searched for a sequence homologous to the *orf138* in Ogura and normal mtDNA sequences. Only a 67-bp sequence, which includes the 3' terminal of the *orf138* sequence and its 3' UTR, was detected. This sequence is homologous to 5' flanking region of *ccmFN1* in reported *Brassicaceae* genomes. However, except for this short sequence, no homology was found between the main part of the gene *orf138* and other parts of the *Brassicaceae* mitochondrial genome.

Reorganization between two types of radish mitochondrial genome

The bl2seq analysis suggested that the radish mitochondrial genome consists of 11 syntenic regions (length > 3 kb) (Figure 2). The sequence in the Ogura-type mitochondrial genome shows quite high homology (99.9%) to that of normal mitochondrial genome within these syntenic regions. This analysis revealed that Ogura-type mitochondrial genome has a large unique region (15,255 bp) between syntenic regions 7 and 11. This unique region corresponds to the region A that was reported by Makaroff et al. [12]. The gene *orf138* is located at one of the terminals of this region (Figure 1).

Repeats in two mitochondrial genomes have been investigated. If a pair of sequences has over 90% similarity, the pair is defined as a repeat. A pair of large repeats of 9,732 bp was found in Ogura-type mitochondrial genome, while a pair of large repeats of 5,530 bp was identified in normal-type. Even though the length of large repeats is different, sequence of the large repeats are highly conserved within 5,530 bp. In Ogura-type mitochondrial genome, the large repeats are located in syntenic regions 5 and 11/6 (Figure 3, Ogura R1). A 9,732-bp sequence, corresponding to Ogura-type repeat, is conserved in syntenic region 5/6 of the normal-type genome, but it is truncated in syntenic region 11 because normal-type genome has a specific sequence between syntenic regions 1 and 11. In rapeseed mitochondrial genome, a 2,427-bp sequence that includes the gene *cox2* was reported as a large direct repeat. Large repeated sequences found in *Raphanus* are completely different from those reported in rapeseed [18]. These large repeats are considered to be involved in the formation of a tripartite structure; each radish mitochondrial genome could recombine into two sub-genomic circles. Two expected sub-genomic circles are 130,760 bp and 127,666 bp in Ogura-type, while they are 139,398 bp and 104,638 bp in normal-type. In addition, these repeats are also



related to reorganization among syntenic regions 5, 6 and 11 (Figure 3a).

We defined 22 and 23 short repeats in Ogura- and normal-type genomes, respectively (Additional file 1 and Additional file 2). These repeats can account for reorganization of mitochondrial genome via homologous recombination. We have identified repeats that can be involved in reorganization from normal- to Ogura-type mitochondrial genomes, although the direction of changes cannot be fixed. The pair of inverted repeats (Normal R13) is located on either side of syntenic region 2 in normal-type genome. These inverted repeats may change the orientation of syntenic region 2 in Ogura-type genome (Figure 3b). In normal-type mitochondrial genome, a pair of direct repeats (Normal R20) is located at the edge of syntenic regions 7 and 9. These repeats can be related to generation of a linkage between 7 and 9 in Ogura-type genome (Figure 3c). In normal-type genome, Normal R16 is present at the edge of syntenic region 9 and in the unique sequence located between syntenic regions 7 and 8 in the inverted orientation. A 10-bp short repeat is also present in this unique sequence, and it exists at the edge of syntenic region 3 in the direct orientation. These repeats can be associated with the generation of a linkage between syntenic regions 3 and 9 in Ogura-type genome (Figure 3d). Syntenic regions 6 and 10 in normal-type genome have a 21-bp short inverted repeat. This inverted repeat can be involved in inversion and recombination between syntenic regions 6 and 10 in Ogura-type genome (Figure 3e). Finally, in normal-type genome, syntenic region 4 has Normal R11 and a short 36-bp repeat at each edge. Normal R11 is also present at one edge of syntenic region 10, being overlapped with a 36-bp repeat. In Ogura-type genome, a linkage between syntenic regions 10 and 4 is generated via these two sequences. This recombination event also changes the location of the gene *atp6* (Figure 3f). Moreover, in Ogura-type genome, two copies of a short direct repeat (Ogura R15) are present

at the edge of syntenic regions 4 and 5, between which syntenic region 8 is inserted with a novel sequence (Figure 3f).

Open reading frames that are unique to each mitochondrial genome type

A comprehensive comparison of predicted ORFs was conducted between Ogura- and normal-type mitochondrial genomes. We picked up unique ORFs that can encode over 100 amino acids and were generated by recombination. As a result, six ORFs including *orf138* were specifically detected in Ogura-type mitochondrial genome (Table 2). The five Ogura-type ORFs were located between syntenic regions 7 and 11, whereas *orf344* was in syntenic region 3. With the exception of *orf138*, the nucleotide sequences of the five ORFs showed high similarity to the reported sequences in plant mitochondrial genomes of other species. As for the normal-type genome, three unique ORFs were detected. The *orf322* has strong similarity to the *orf344* in Ogura-type. The extension of *orf344* was caused by a new initiation codon that was created in 5' region of *orf322* through a recombination between syntenic regions 3 and 9. The two remaining ORFs were located within the region unique to the normal-type genome located between syntenic regions 11 and 1. Protein Blast analysis was conducted to characterize unique ORFs. Even though homologous amino acid sequences were not found for *orf150* in normal-type and for *orf122* and *orf138* in Ogura-type, other unique ORFs encoded similar proteins that have been reported in the mitochondrial genome of rapeseed or *Arabidopsis*.

Regions unique to the Ogura-type mitochondrial genome
 Ogura-type mitochondrial genome has four unique regions that are non-syntenic to normal-type mitochondrial genome. Unique region I is 2,802 bp, which is located between syntenic regions 4 and 8 (Figure 2B). Unique regions II and III are 1,601-bp and 451-bp

Table 2 Mitotype specific open-reading frames caused by recombination

	ORF	Similarity of predicted protein	Location
Ogura-type specific	<i>orf122</i>	No similarity	between syntenic regions 7 and 11
	<i>orf154</i>	AAG51754.1 reverse transcriptase, putative[<i>Arabidopsis thaliana</i>]	between syntenic regions 7 and 11
	<i>orf117</i>	YP_717156.1 hypothetical protein BrnapMp059 [<i>Brassica napus</i>]	between syntenic regions 7 and 11
	<i>orf138</i>	No similarity	between syntenic regions 7 and 11
	<i>orf102</i>	NP_085574.1 hypothetical protein ArthMp044 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	between syntenic regions 7 and 11
	<i>orf344</i>	YP_717145.1 hypothetical protein BrnapMp048 [<i>Brassica napus</i>]	the edge of syntenic region 3
normal-type specific	<i>orf322</i>	YP_717145.1 hypothetical protein BrnapMp048 [<i>Brassica napus</i>]	the edge of syntenic region 3
	<i>orf150</i>	No similarity	between syntenic regions 1 and 10
	<i>orf145</i>	NP_085575.1 hypothetical protein ArthMp101 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	between syntenic regions 1 and 10

sequences that are present between syntenic regions 8 and 5, and between syntenic regions 5 and 1, respectively. The largest unique region IV is located between syntenic regions 7 and 11 (Figure 2B). Total length of the unique regions in Ogura-type genome is 20,110 bp, which occupies 7% of the whole Ogura-type mitochondrial genome. The largest unique region contains five unique ORFs including *orf138*.

To obtain more information on the sequence unique to Ogura-type genome, nucleotide Blast search was conducted to assign the sequences. The search showed that over 80% of these regions consist of sequences homologous to those reported for *Brassicaceae* or radish mitochondrial genomes. BL2seq analyses were further conducted between the sequence unique to Ogura-type and each of five mitochondrial genomes in *Brassicaceae* (normal and Ogura-type radish, *A. thaliana* and two types of *Brassica napus*). Seventy-two percent of unique region I (2,044 bp in a total of 2,802 bp) and 100% of unique region II (1,601 bp) were occupied by five mitochondrial sequences of *Brassicaceae* (Additional file 3). As for the smallest unique region III, 97% of the sequence (440 bp in a total of 451 bp) was shown to have similarity to rapeseed mtDNAs. As for the largest unique region IV, sequences homologous to the five *Brassicaceae* mitochondrial genomes covered 80% of this region (12,187 bp in a total of 15,255 bp), even though *orf138* sequence itself had no similarity. Homologous sequences detected by bl2seq were plotted on unique region IV in Ogura-type mitochondrial genome (Figure 4). Homologous sequences were scattered throughout this region. Insertion of plastid or nuclear sequence has not been detected in this region. It seems, therefore, that the region unique to Ogura-type mitochondrial genome was

created by frequent recombination and shuffling of mitochondrial DNA sequences during the evolution of *Brassicaceae*.

Discussion

Comparative sequence analysis of Ogura- and normal-type mitochondrial genomes

Ogura-type mitochondrial genome was 14 kb larger than that of normal type. Region IV that is unique to Ogura-type mitochondrial genome mainly contributes to this size difference. Comparative analysis has been performed between mitochondrial genomes of CMS and normal lines in other higher plant species. In sugar beet, Owen-type CMS line has a significantly larger mitochondrial genome than fertile line because the Owen-type mitochondrial genome contains one 86-kb large repeat [21]. In wheat, the mitochondrial genome of the CMS line Ks3 was reported to be 192 kb larger than that of common wheat [22]. This difference is also caused by additional large repeats, including a 98-kb repeat. In contrast, a rice (*Oryza sativa*) LD-CMS line has a smaller mitochondrial genome than fertile line, while CW-CMS derived from wild rice (*O. rufipogon*) has a larger genome than fertile line [23]. The difference in mitochondrial genome size within the *Oryza* genus is also attributable to large repeats. It should be noted that the size difference between two radish mitochondrial genomes mainly arises from a novel sequence of 15,255 bp, not from a large repeated sequence.

The reported *Brassicaceae* species including *Brassica* and *Arabidopsis* have small mitochondrial genomes among higher plants [24]. It is also known that *Brassicaceae* mitochondrial genomes reported so far do not contain much nuclear sequence. The number of large repeats (> 1 kb) is

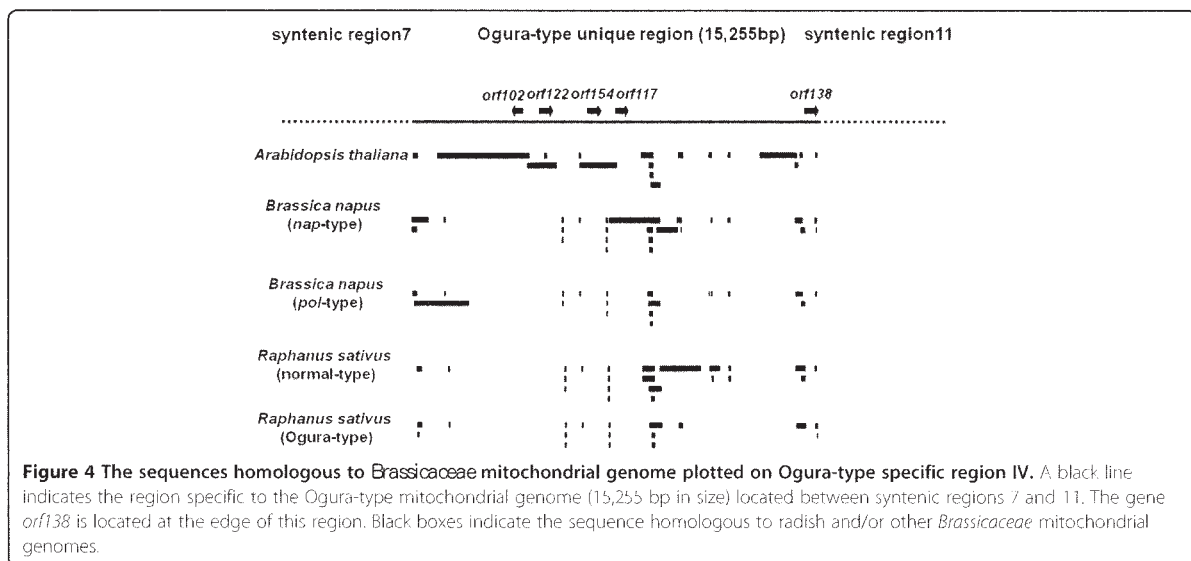


Figure 4 The sequences homologous to *Brassicaceae* mitochondrial genome plotted on Ogura-type specific region IV. A black line indicates the region specific to the Ogura-type mitochondrial genome (15,255 bp in size) located between syntenic regions 7 and 11. The gene *orf138* is located at the edge of this region. Black boxes indicate the sequence homologous to radish and/or other *Brassicaceae* mitochondrial genomes.

less in reported *Brassicaceae* (*Arabidopsis* and *Brassica*) than in other plants species [25]. While mitochondrial genomes of rice or wheat have more than ten large repeats, *Brassica* and *Raphanus* have only two large repeats. In addition, sequences derived from nuclear or plastid genomes were rarely observed. This is one of the reasons why mitochondrial genomes of *Brassica* and *Raphanus* are small. Because of the small genome size and few large repeats, we can consider *Brassica* and *Raphanus* as species that have the simple mitochondrial genomes in higher plants. An understanding of the remarkable reorganization events that occurred in the simple radish genome will provide us with a clear picture of mitochondrial genome evolution, such as insertion of a 15-kb large novel sequence in Ogura-type.

As expected, gene contents and their sequences were highly conserved between the two mitochondrial genomes in radish. The 5' sequence of the *atp6* in Ogura-type mitochondrial genome is, however, different from that of normal-type. Recombination had occurred at the site of syntenic region 4 and *atp6*, which produced a new initiation codon for *atp6* in Ogura-type genome. According to the genome sequence, Ogura-type *atp6* encodes a different polypeptide from that of normal-type *atp6*. However, the N-terminal of ATP6 polypeptide of Ogura-type is processed to produce a protein identical to normal-type ATP6 [20]. The 3' end of *orfX* also lacks similarity to the sequence of normal-type. This is caused by a 48-bp repeated sequence regarded as a minisatellite. This minisatellite will be a useful marker to detect polymorphism among radish mitochondrial genomes including Ogura and normal types [26]. A total of 11 SNPs were detected in nine protein-coding genes between Ogura and normal types. The number of SNPs in radish was similar to that in sugar beet; the sugar beet Owen-CMS line contains 24 SNPs in 11 protein-coding genes compared with the fertile lines [21]. As for tRNA, 17 tRNAs were highly conserved between two radish mitochondrial genome types, but Ogura-type contains one additional *trnfM* (*trnfM-2*). This additional *trnfM-2* is located near *orf138*, and it is interesting to note that this *trnfM-2* has a unique SNP that has not been found in other reported *trnfMs* in *Brassicaceae*. As for unique ORFs, Ogura-type has six unique ORFs including *orf138*. These ORFs can be related to unique biological characteristics in Ogura-type cytoplasm. In particular, transcription of four ORFs (*orf122*, *orf154*, *orf117* and *orf102*) that are specific to Ogura-type genome should be investigated in future study.

The origin of Ogura-type unique sequence

CMS-related ORFs have been isolated in various plant species, such as *T-urf13* in maize [27], *orf522* in sunflower [28], *pcf* in petunia [29], *orf456* in pepper [30],

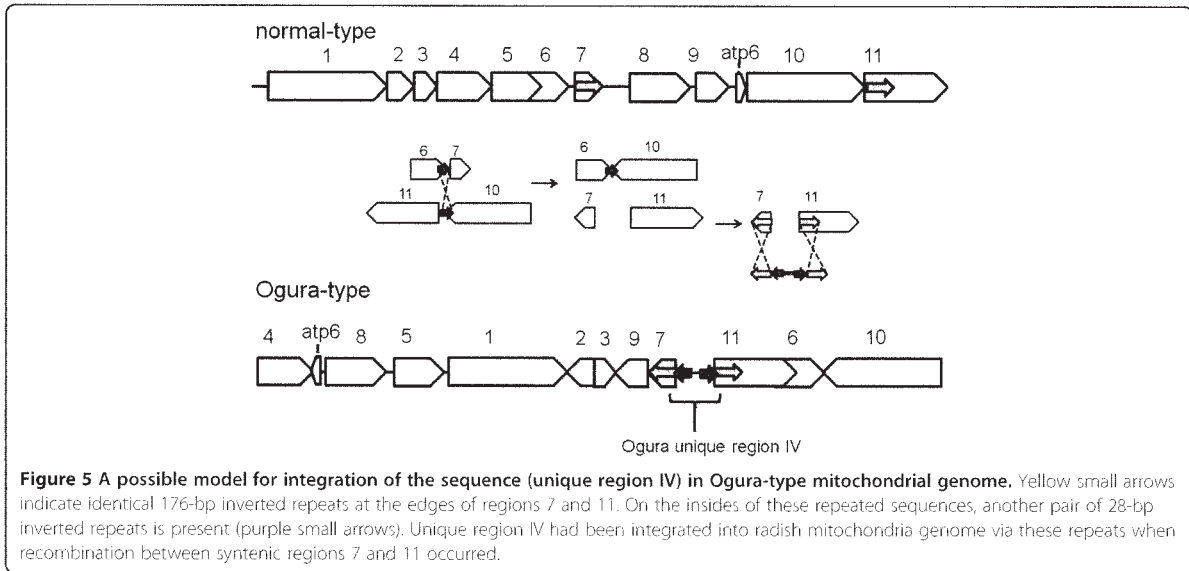
orf107 in sorghum [31] and *orf79* in rice [32]. In *Brassicaceae* crops, in addition to *orf138* in radish, three CMS-related ORFs have been reported: *orf224* and *orf222* in rapeseed [33], and *orf267* in *Brassica tournefortii* [34]. With the exception of *orf138*, all these CMS-related ORFs have a chimeric structure that contains the sequence of known mitochondrial genes. The *orf138*, however, does not contain any conserved mitochondrial sequence. The sequence of *orf138* is totally novel, and is not present in normal-type mitochondrial genome of radish. It is quite interesting to reveal how the *orf138* sequence was created during the evolution of radish mitochondrial genome. However, it now appears difficult to infer the origin of the gene *orf138*, since no sequence homologous to the main part of *orf138* is present in either Ogura- or normal-type mitochondrial genome.

In this study, we have determined the nucleotide sequence for unique region IV (15,255 bp in size) in Ogura-type mitochondrial genome. The gene *orf138* is located in this region. Blast analysis using the sequence in region IV as a query showed that 80% of this region has similarity to the mitochondrial sequences in other *Brassicaceae* plants, including rapeseed and *Arabidopsis*. The analysis also showed that the homologous sequences are scattered throughout unique region IV (Figure 4). Therefore, region IV is a mosaic of mitochondrial sequences from *Brassicaceae*, suggesting that the sequence was generated through shuffling and fusion of pre-existing mitochondrial sequences in ancestral *Brassicaceae*. The sequence of which the gene *orf138* consists may be one of the products of this shuffling process. It is unlikely that the sequence of *orf138* is derived from foreign DNA, such as a nuclear or plastid sequence, because no sequence with clear homology to foreign DNA is found within this unique region. However the possibility remains that they may be derived from horizontal gene transfer from unidentified organism.

This composition of novel sequence in radish contrasts to that reported for sugar beet. In sugar beet mitochondrial genome, 7.6% of the unique regions showed significant homology to previously determined mitochondrial sequences, 17.9% to nuclear DNA, 4.6% to mitochondrial episome and 0.1% to plastid DNA [35].

The emergence of Ogura-type cytoplasm

The sequence of Ogura-type unique region IV can be derived from a mixture of sequences in the reported *Brassicaceae* mitochondrial genome. The next question relates to how this unique region IV was generated or integrated into the radish mitochondrial genome. We searched for repeated sequences around this region. Ogura-type unique region IV was shown to be sandwiched between syntenic regions 7 and 11 (Figure 5). There were identical 176-bp inverted repeats at the edges

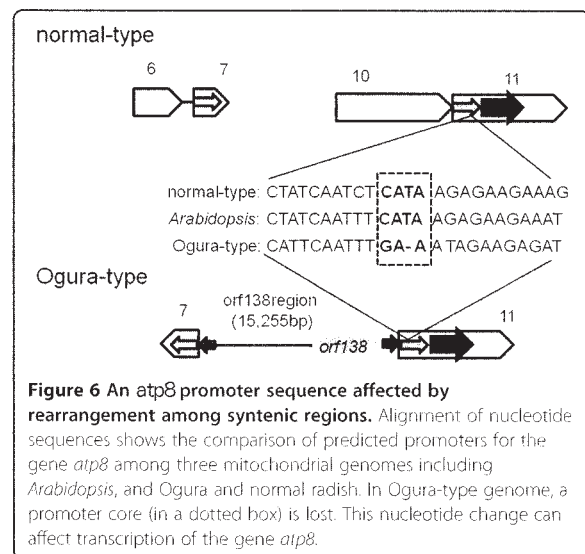


of regions 7 and 11. On the insides of these repeated sequences, another pair of 28-bp repeated sequences was found in inverted orientation. These 28-bp sequences are specific to the Ogura-type mitochondrial genome, and not found in normal-type genome. This characteristic arrangement of repeats indicates that unique region IV was integrated into the radish mitochondrial genome when recombination between syntenic regions 7 and 11 occurred.

Previously, we conducted sequence analysis on the *atp8* locus in normal- and Ogura-type cytoplasm from wild and cultivated radishes [36]. While plants with normal-type cytoplasm contained several types of sequence, plants with Ogura-type cytoplasm had only one type of sequence. These results suggested that a mutational event, which created linkage of *atp8* and *orf138*, occurred only once in the history of radish [36]. The present data indicate that this event probably occurred at the same time as when recombination between syntenic regions 7 and 11 occurred via 176-bp repeats and the unique region IV was integrated into the Ogura-type mitochondrial genome (Figure 5). Interestingly, the radish mitochondrial genome may have lost one putative promoter region for *atp8* by this recombination (Figure 6). In *Arabidopsis*, the promoters of mitochondrial genes have been determined [37]. A promoter sequence of *atp8* (CTATCAATCTCATAAGAGAAGAAAT) is almost conserved at the edge of syntenic region 11 of normal radish. The position of the promoter exactly matched the size of *atp8* transcript (ca. 600 bp in size) [16]. The recombination of syntenic regions 7 and 11 would destroy the promoter sequence. Therefore, recombination between syntenic regions 7 and 11 in normal radish can lead to loss

of biological function in mitochondria. A reasonable hypothesis to explain the generation of Ogura-type mitochondrial genome is that the mitochondrial genome rearrangement that could compensate for the loss of biological function had been selected among many rearranged genomes. Integration of unique region IV can provide a new promoter for the gene *atp8*. Actually, in Ogura-type genome, *atp8* is co-transcribed with *orf138* and *trnfM*, while in normal-type, *atp8* is transcribed from its own promoter.

Another possibility to explain the emergence of Ogura-type mitochondrial genome is substoichiometric shift (SSS). SSS is a phenomenon by which copy number of



the substoichiometric molecule dramatically increases over generations [38]. Research in some plants has shown that SSS is related to the occurrence of CMS [39,40]. Recently, it has been reported that two mitochondrial genome types, *pol*-type and *nap*-type, co-exist among many rapeseed cultivars, and SSS can explain the emergence of these CMS [41]. In radish with normal-type cytoplasm, *orf138* was reported to be present in substoichiometric molecules with low copy number by genomic PCR [42]. However, our previous analyses failed to detect the gene *orf138* in various normal radishes. The fact that no sequence homologous to *orf138* was found in the current pyrosequencing data (20,646,046 bp in total) from a normal radish suggests that substoichiometric molecules containing *orf138* are absent in normal radish. The discrepancy between our results and a previous study [42] can be attributed to the differences of materials used and to the conditions of PCR including primers, type of DNA polymerase and particularly amplification cycles (30 cycles [43,44] vs. 40 cycles in ref. [42]). However, our PCR conditions can amplify two different configurations of *orf138* regarded as subliminal fragments in various radishes with Ogura-type cytoplasm. This indicates that, if there were *orf138* sequences in normal radish, they would be at quite a low level, and the contribution of SSS as a possible mechanism to explain generation of the Ogura-type mitochondrial genome from normal-type genome remains to be elucidated.

Previously, we conducted a large-scale sequence analysis of *orf138* in 107 Japanese wild radishes, 29 cultivated radishes and seven *R. raphanistrum* [43]. On the basis of the pattern of mutation and the distribution of *orf138* variants, we inferred the mechanism behind the differentiation of Ogura-type cytoplasm. These studies showed that the original Ogura-type radish is derived from Japanese wild radish and that *orf138* sequence of Japanese wild radish was introduced from *R. raphanistrum* [44-46]. However, it was still unclear when Ogura-type cytoplasm was initially generated. This is still an open question, and comparative sequence analysis among more mitochondrial genomes in *Raphanus* and molecular evolutionary studies of the data should provide clues to resolve this issue.

Conclusions

The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome from Ogura male-sterile radish reveals that the genome has been highly rearranged compared with that of normal radish. The radish mitochondrial genome consists of 11 syntenic regions. The reorganization of the genome occurred via a pair of large repeats and multiple pairs of short repeats, and produced four regions unique to the Ogura-type mitochondrial genome. Most of these unique regions consist of sequences homologous to

known *Brassicaceae* mitochondrial genomes. Insertions of sequences derived from plastid or nuclear genome were not identified. This suggested that the unique regions were generated by integration and shuffling of pre-existing mitochondrial sequences during the evolution of *Brassicaceae*, and novel genes such as *orf138* could have been created by the shuffling process.

Methods

Plant materials

A cultivar 'Uchiki-Gensuke' (UC-G) and its male-sterile line 'MS-Gensuke' (MS-G) were used in this study. These two lines are in the category of Japanese cultivated radish (*Raphanus sativus* var. *hortensis*) with a long white root. UC-G and MS-G have normal cytoplasm and Ogura-type cytoplasm, respectively. The MS-G was developed by introducing Ogura-type male-sterile cytoplasm into UC-G and maintained by repeated backcrosses.

Mitochondrial DNA extraction

Mitochondrial DNA was isolated from leaves of MS-G and UC-G, according to the method of Bonen and Gray [47] using discontinuous (1.15 M, 1.30 M and 1.45 M sucrose) density gradient centrifugation with minor modifications. DNaseI-treated mitochondria were collected from the interface between 1.30 M and 1.45 M sucrose. MtDNA was purified by EtBr/CsCl centrifugation and ethanol precipitation.

Sequence assembly

For normal-type mitochondrial genome

Pyrosequencing using the GS-FLX system (Roche) and de novo assembly were conducted by Hokkaido System Science (Sapporo, Japan). A nucleotide sequence of 20,646,046 bp in total was obtained. Sequences were assembled to 105 contigs (4,414 bp long on average). On the basis of the physical map for the normal-type mitochondrial genome, we connected contigs to develop a master circle. If contigs had similarity to plant plastid genome and their depth value was low, we ignored them. All linkages between contigs were confirmed by genomic PCR (Additional file 4 and Additional file 5). By sequencing genomic-PCR product, we determined the sequences between contigs. Sequences were assembled using the software Sequencher ver. 4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), and deposited in a database (DDBJ) under accession No. AB694743.

For Ogura-type mitochondrial genome

Pyrosequencing was conducted using the GS-FLX system (Roche) by Takara-Bio (Ohtsu, Japan). A nucleotide sequence of 12,059,770 bp in total for Ogura-type was obtained. Sequences were assembled to 147 contigs

(4,402 bp long on average), using GS De Novo Assembler version 2.0 (Roche). The average sequence depth, which was defined as the total nucleotide number used for assembly divided by the total length of contigs, was 36. On the basis of linkage information of the contigs and the physical map of radish mitochondria, we connected contigs to develop a master circle by a parsimonious method, so that each contig appeared at least once to construct the smallest genome [23]. If the depth of linkage was under 10, we did not use the linkages to make the master circle. When it was difficult to judge whether a given contig really appears in the master circle, we checked the existence of the contig in all possible regions by genomic PCR and sequencing (Additional file 6). Sequences were assembled using the software Sequencher ver. 4.9, and deposited in a database (DDBJ) under accession No. AB694744.

Sequence analysis

The genes encoding known mitochondrial proteins and those for rRNAs, as well as repeated sequences, were identified using the Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A tRNA gene search was conducted with the tRNA scan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) [48]. ORFs encoding hypothetical proteins were identified using Getorf software (<http://emboss.dbcls.jp/>). ORFs predicted to encode proteins longer than 100 amino acids were picked up in the current analysis.

Additional files

Additional file 1: List of repeated sequences in normal-type genome. Repeated sequences (> 80 bp, > 90% homology) in normal-type genome were listed.

Additional file 2: List of repeated sequences in Ogura-type genome. Repeated sequences (> 80 bp, > 90% homology) in Ogura-type genome were listed.

Additional file 3: The sequences homologous to Brassicaceae mitochondrial genome plotted on Ogura-type specific region I-III. A black line indicates the region specific to the Ogura-type mitochondrial genome. Black boxes indicate the sequence homologous to radish and/or other Brassicaceae mitochondrial genomes.

Additional file 4: Validation of contig linkage by PCR analysis. The primer information used for this PCR analysis is described in Additional file 5.

Additional file 5: The primers used for the PCR analysis to validate the linkage between contigs of normal-type genome. Information on the primers used for the PCR analysis in Additional file 4

Additional file 6: The primers used for PCR analysis to validate the short repeats. Information on the primers used for PCR and sequencing, in order to confirm short repeats in Ogura-type genome.

Abbreviations

CMS, Cytoplasmic male sterility; mtDNA, Mitochondrial DNA; ORF, Open reading frame; SNP, Single nucleotide polymorphism; SSS, Substoichiometric shifting.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

YT carried out the sequence data analysis, and drafted the manuscript. MT isolated mitochondrial DNA from radish. KY participated in the sequence analysis. HY prepared plant materials. TT supervised the work and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgement

This study was supported in part by Private University Strategic Research Foundation Support Program, Grants-in-Aid for Scientific Research, Scientific Research (B) (No. 22380008), and the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry (BRAINI), JAPAN.

Received: 14 February 2012 Accepted: 20 July 2012

Published: 31 July 2012

References

1. Kubo T, Newton KJ: Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* 2008, **8**(1):5-14.
2. Palmer JD, Herbo LA: Unicircular structure of the *Brassica hirta* mitochondrial genome. *Curr Genet* 1987, **11**(6-7):565-570.
3. Sloan DB, Alverson AJ, Chuckalovcak JP, Wu M, McCauley DE, Palmer JD, Taylor DR: Rapid Evolution of Enormous, Multichromosomal Genomes in Flowering Plant Mitochondria with Exceptionally High Mutation Rates. *PLoS Biol* 2012, **10**(1):e1001241.
4. Schnable PS, Wise RP: The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci* 1998, **3**(5):175-180.
5. Hanson MR, Bentolila S: Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* 2004, **16**(SUPPL):S154-S169.
6. Ogura H: 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. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* 1968, **6**:39-78.
7. Sakai T, Imamura J: Intergeneric transfer of cytoplasmic male sterility between *Raphanus sativus* (cms line) and *Brassica napus* through cytoplasm-protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 1990, **80**(3):421-427.
8. Bannerot H, Boulidard L, Chupeau Y: Unexpected difficulties met with the radish cytoplasm in *Brassica oleracea*. *Eucarpia Cruciferae Newsletter* 1977, **2**:16.
9. Krishnasamy S, Makaroff CA: Organ-specific reduction in the abundance of a mitochondrial protein accompanies fertility restoration in cytoplasmic male-sterile radish. *Plant Mol Biol* 1994, **26**(3):935-946.
10. Duroc Y, Gaillard C, Hiard S, DeFrance MC, Pelletier G, Budar F: Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for Ogura cytoplasmic male sterility in Brassicaceae. *Biochimie* 2005, **87**(12):1089-1100.
11. Yang S, Terachi T, Yamagishi H: Inhibition of chalcone synthase expression in anthers of *Raphanus sativus* with ogura male sterile cytoplasm. *Ann Bot* 2008, **102**(4):483-489.
12. Makaroff CA, Palmer JD: Mitochondrial DNA rearrangements and transcriptional alterations in the male-sterile cytoplasm of Ogura radish. *Mol Cell Biol* 1988, **8**(4):1474-1480.
13. Makaroff CA, Apel U, Palmer JD: The atp6 coding region has been disrupted and a novel reading frame generated in the mitochondrial genome of cytoplasmic male-sterile radish. *J Biol Chem* 1989, **264**(20):11706-11713.
14. Makaroff CA, Apel U, Palmer JD: Characterization of radish mitochondrial atpA: influence of nuclear background on transcription of atpA-associated sequences and relationship with male sterility. *Plant Mol Biol* 1990, **15**(5):735-746.
15. Makaroff CA, Apel U, Palmer JD: The role of coxI-associated repeated sequences in plant mitochondrial DNA rearrangements and radish cytoplasmic male sterility. *Curr Genet* 1991, **19**(3):183-190.
16. Krishnasamy S, Makaroff CA: Characterization of the radish mitochondrial orfB locus: Possible relationship with male sterility in Ogura radish. *Curr Genet* 1993, **24**(1-2):156-163.
17. Rankin CT, Cutright MT, Makaroff CA: Characterization of the radish mitochondrial nad3/rps12 locus: Analysis of recombination repeats and RNA editing. *Curr Genet* 1996, **29**(6):564-571.

18. Handa H: 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* 2003, 31(20):5907-5916.
19. Lunseld M, Marienfeld JR, Brandt P, Brennicke A: The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* 1997, 15(1):57-61.
20. Krishnasarthy S, Grant EA, Makaroff CA: Subunit 6 of the Fo-ATP synthase complex from cytoplasmic male-sterile radish: RNA editing and NH2-terminal protein sequencing. *Plant Mol Biol* 1994, 24(1):129-141.
21. Satoh M, Kubo T, Nishizawa S, Estiati A, Ichihara N, Mikami T: The cytoplasmic male-sterile type and normal type mitochondrial genomes of sugar beet share the same complement of genes of known function but differ in the content of expressed ORFs. *Mol Genet Genomics* 2004, 272(3):247-256.
22. Liu H, Cui P, Zhan K, Lin Q, Zhuo G, Guo X, Ding F, Yang W, Liu D, Hu S, Yu J, Zhang A: Comparative analysis of mitochondrial genomes between a wheat K-type cytoplasmic male sterility (CMS) line and its maintainer line. *BMC Genomics* 2011, 12:163.
23. Fujii S, Kazama T, Yamada M, Toriyama K: Discovery of global genomic reorganization based on comparison of two newly sequenced rice mitochondrial genomes with cytoplasmic male sterility-related genes. *BMC Genomics* 2010, 11:209.
24. Palmer JD, Herbon LA: Plant mitochondrial DNA evolved rapidly in structure, but slowly in sequence. *J Mol Evol* 1988, 28(1-2):87-97.
25. Alverson AJ, Zhuo S, Rice DW, Sloan DB, Palmer JD: The mitochondrial genome of the legume *vigna radiata* and the analysis of recombination across short mitochondrial repeats. *PLoS One* 2011, 6(1):e16404.
26. Honma Y, Yoshida Y, Terachi T, Toriyama K, Mikami T, Kubo T: Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*. *Curr Genet* 2011, 57(4):261-270.
27. Rhoads DM, Levings li CS, Siedow JN: URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1995, 27(4):437-445.
28. Gagliardi D, Leaver CJ: Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *EMBO J* 1999, 18(13):3757-3766.
29. Young EG, Hanson MR: A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 1987, 50(1):41-49.
30. Kim DH, Kang JG, Kim BD: Isolation and characterization of the cytoplasmic male sterility-associated orf456 gene of chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Mol Biol* 2007, 63(4):519-532.
31. Tang HW, Chen W, Pring DR: Mitochondrial orf107 transcription, editing, and nucleolytic cleavage conferred by the gene RF3 are expressed in sorghum pollen. *Sex Plant Reprod* 1999, 12(1):53-59.
32. Wang Z, Zou Y, Li X, Zhang Q, Chen L, Wu H, Su D, Chen Y, Guo J, Luo D, et al: Cytoplasmic male sterility of rice with Boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell* 2006, 18(3):676-687.
33. L'Hormie Y, Stahl RJ, Li XQ, Hameed A, Brown GG: *Brassica napus* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated orf224 gene. *Curr Genet* 1997, 31(4):325-335.
34. Landgren M, Zetterstrand M, Sundberg E, Glimelius K: Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3 of the atp6 gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol Biol* 1996, 32(5):879-890.
35. Satoh M, Kubo T, Mikami T: The Owen mitochondrial genome in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): Possible mechanisms of extensive rearrangements and the origin of the mitotype-unique regions. *Theor Appl Genet* 2006, 113(3):477-484.
36. Terachi T, Yamaguchi K, Yamagishi H: Sequence analysis on the mitochondrial orfB locus in normal and Ogura male-sterile cytoplasm from wild and cultivated radishes. *Curr Genet* 2001, 40(4):276-281.
37. Kuhn K, Weihe A, Borner T: Multiple promoters are a common feature of mitochondrial genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 2005, 33(1):337-346.
38. Woloszynska M: Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes-though this be madness, yet there's method in't. *J Exp Bot* 2010, 61(3):657-671.
39. Janska H, Sarria R, Woloszynska M, Arrieta-Montiel M, Mackenzie SA: Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *Plant Cell* 1998, 10(7):1163-1180.
40. Feng X, Kaur AP, MacKenzie SA, Dweikat IM: Substoichiometric shifting in the fertility reversion of cytoplasmic male sterile pearl millet. *Theor Appl Genet* 2009, 118(7):1361-1370.
41. Chen J, Guan R, Chang S, Du T, Zhang H, Xing H: Substoichiometrically different mitotypes coexist in mitochondrial genomes of *Brassica napus* L. *PLoS One* 2011, 6(3).
42. Kim S, Lim H, Park S, Cho KH, Sung SK, Oh DG, Kim KT: Identification of a novel mitochondrial genome type and development of molecular markers for cytoplasm classification in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theor Appl Genet* 2007, 115(8):1137-1145.
43. Yamagishi H, Terachi T: 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* 2001, 103(5):725-732.
44. Yamagishi H, Terachi T: Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. IV. Ogura-type cytoplasm found in the wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Plant Breeding* 1997, 116(4):323-329.
45. Yamagishi H, Terachi T: Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in the Cruciferae. 1. 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* 1994, 87(8):996-1000.
46. Yamagishi H, Terachi T: 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* 1996, 93(3):325-332.
47. Bonen L, Gray MW: 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* 1980, 8(2):319-335.
48. Lowe JM, Eddy SR: tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res* 1997, 25(5):955-964.
49. Stothard P, Wishart DS: Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics* 2005, 21(4):537-539.

doi:10.1186/1471-2164-13-352

Cite this article as: Tanaka et al.: A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics* 2012, 13:352.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

Convenient online submission
Thorough peer review
No space constraints or color figure charges
Immediate publication on acceptance
Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



7. ダイコンのミトコンドリアゲノムにおける SSS 現象の遺伝解析と関連遺伝子の単離

概要

高等植物のミトコンドリアゲノムには、主要な DNA 分子種であるマスターサークルの他に、コピー数が極端に少ないサブリモンと呼ばれる分子種が混在している。このサブリモンはマスターサークル上の短いリピート配列間の不可逆的組換えによって生じるとされるが、サブリモンがゲノムの変異や進化へどのように関わったかは明らかになっていない。また高等植物では、サブリモンのコピー数が短期間に著しく変動する Substoichiometric shifting (以下 SSS) という現象が報告されており、インゲンマメなどの数種植物では、この現象が雄性不稔/稔性回復の原因であるとされている。近年、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) などのノックアウト個体を用いた実験から、*msh1*、*recA3* 及び *osb1* といった SSS 制御遺伝子が同定され、この現象に注目が集まっている。前項目で記したように、本プロジェクト研究では、オグラ型と正常型のミトコンドリアゲノム (マスターサークル) の構造を決定したが、両ゲノムは、*orf138* の有無だけでなく、*cox1*、*atp6* など他の遺伝子領域にも逆位や転座などの違いがあった。一方、これまでの調査で、ダイコンの一部に、正常型とオグラ型の *cox1* 遺伝子の 5' 配列が共存する個体が見つかり、ダイコンにおけるサブリモンと SSS を研究する端緒が得られた。そこでまず、サブリモン分子の遺伝様式を明らかにするため、サブリモンの存在形態が異なる個体間で正逆交雑を行い、F1 個体の *cox1* 遺伝子の 5' 領域のタイプを PCR およびサザン解析により調べた。その結果、母親 (細胞質親) に存在したオグラ型の分子が消失 (あるいはコピー数が著しく減少) している F1 が 4 個体得られ、交配によっても SSS が生じることが示された。またこの交配では、同じ親の組合せを持つ F1 の個体間でもサブリモンの存在形態に差が見られたことから、SSS が核遺伝子により制御されていること、またこの遺伝子は親個体でヘテロ接合であったこと (すなわち対立遺伝子が存在する) が示された。本プロジェクト研究では、シロイヌナズナで SSS の制御遺伝子として同定されている *msh1*、*recA3* のダイコンにおけるホモログを '打木源助' とハツカダイコンの 'コメット' の 2 品種から初めて単離した。ダイコンの *msh1*、*recA3* 両遺伝子の推定アミノ酸配列をシロイヌナズナのものと比較したところ、非常に高い相

同性が確認された。一方、N末端側のシグナル配列と考えられる部分に関しては、多くのアミノ酸置換が認められた。そのため、これらの遺伝子のN末端側のシグナル配列をGFPに連結し、ボンバードメント法によりタマネギの表皮細胞に導入し、共焦点顕微鏡によりGFP蛍光を観察した。その結果、両遺伝子の翻訳産物はともにミトコンドリアに局在することが示され、今回単離したダイコンの遺伝子もミトコンドリアのSSS制御に係わる可能性が高いことがわかった。

1. はじめに

高等植物のミトコンドリア(mt)には、主要な DNA 分子種であるマスターサークルと、サブリモンと呼ばれるコピー数が極端に少ない DNA 分子種が混在する[1]。このサブリモンは、トウモロコシの雄性不稔細胞質で最初に発見されたものであり、マスターサークル上の短いリピート配列間の不可逆的組換えによって生じたと考えられている[2]。近年、多くの植物種で mt ゲノムの構造が決定され、このゲノムの持つ遺伝子の構成が明らかになっている[3-6]。しかしながら mt ゲノムの研究は、主にマスターサークルの全貌を解明することを目標に行われており、サブリモンの存在はほとんど考慮されていない。サブリモンが植物 mt ゲノムの変異や進化へどのように寄与したかなど、不明な点が多く残されている。一方、植物の mt では、このサブリモンのコピー数を著しく変動させる Substoichiometric shifting (以下、SSS と略す)という現象がしばしば報告されている[7]。この SSS は、インゲンマメの雄性不稔及び稔性回復の原因となることが知られており、この方面の研究がすすめられている[8]。また近年、SSS は核遺伝子により制御されていることが明らかになりつつあり[9]、シロイヌナズナから SSS を制御する遺伝子として3つの核遺伝子が単離されている。すなわち1つ目は大腸菌においてミスマッチの修復に関わる MutS タンパクのホモログをコードする *msh1* 遺伝子であり、2つ目は相同組換え時に相同部位を認識する RecA タンパクをコードする *recA3* 遺伝子である。なお、3つ目は植物特異的 DNA 結合タンパクの一種をコードしている

osb1 遺伝子である。これらの遺伝子はすでにシロイヌナズナなどから単離され、ノックアウト個体を用いた実験により SSS との関係が証明されており[10-12]、遺伝子産物が、mt ゲノムに存在する特定の短いリピート配列間の組換えを制御していることも知られている。

我々は、ダイコンの系統分化を明らかにするため、mt ゲノムの構造変異と進化を研究してきた。特にほとんどの栽培ダイコンが持つ正常型細胞質と、細胞質雄性不稔を引き起こすオグラ型細胞質の mt ゲノムについて詳細な比較を行っている。その中で、例えば *cox1* 遺伝子や *atp6* 遺伝子の5'領域などにおいて、1つの個体内に正常型特異的配列とオグラ型特異的配列が共存することを発見し、ダイコンの mt ゲノムの分化においてもサブリモンの存在と SSS を考慮しなければならない可能性を見出している[13]。

そこで本研究では、ダイコンの SSS の実態をより深く理解するため、栽培ダイコンの1品種、'打木源助'、の中で、*cox1* 遺伝子の5'領域を含むサブリモンの存在形態が異なる個体を同定し、それらの個体間で正逆交雑を行うことにより、サブリモンの遺伝様式を検証した。また、SSS に関与する可能性がある核遺伝子 (*msh1*、*recA3*) のダイコンホモログを初めて単離し、それらの特徴づけを行うことで、これらの核遺伝子の多型と SSS を関連づけようとした。前述のように SSS によるミトコンドリアの DNA 分子の構成の変化は、インゲマメやシロイヌナズナといった他の高等植物において、雄性不稔や稔性回復の原因となることが知られている。ダイコンの SSS とその制御遺伝子の関係

を証明することは、mt ゲノムの系統分化の研究に寄与するだけではなく、ダイコンの雄性不稔や稔性回復についても新たな知見を与える可能性がある。本修士論文を、ダイコンにおける SSS 研究の第一歩と位置づけたい。

2. 材料及び方法

2.1 ダイコンの *coxI* 遺伝子 5' 領域の PCR 増幅と塩基配列の決定

本実験には、正常型細胞質を持つ栽培ダイコン (*Raphanus sativus*) の 1 品種、'打木源助'、の 14 個体を用いた。各個体の葉 100mg から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 DNA を精製した。この DNA を鋳型に、正常型細胞質のミトコンドリア *coxI* 遺伝子の 5' 領域に特異的なプライマー CNF (5'-GAACCATAACCAAGACAGAGAGC-3')、及びオグラ型細胞質の *coxI* 遺伝子の 5' 領域に特異的なプライマー COF (5'-CCACGTAAGTAGTTGAGTTAACGC-3') のいずれかをフォワードプライマー、正常型とオグラ型の両方に共通する *coxI* 遺伝子コード領域に相補的なプライマー、CCR (5'-TCGTGGAAATGCCATGTCAGGTGC-3') をリバープライマーとして、耐熱性 DNA 合成酵素 (KOD+, TOYOBO) を用いて PCR を行った。PCR の反応条件は、94°C 2 分の変性後、94°C 30 秒、60°C 1 分、68°C 2 分のサイクルを 30 回繰り返すものである。また以前の研究で作成された、'大阪四十日ダイコン (OS40)' の *coxI* 遺伝子 5' 領域に特異的なプライマー、*coxI*-OS40-F (5'-CTTTCAGGAGGAACCTGTGACACC-

3')、をフォワードプライマー、前述の CCR をリバープライマーとする PCR も同様の条件で実施した。Fig. 1 に本実験で用いたプライマーの位置を示す。

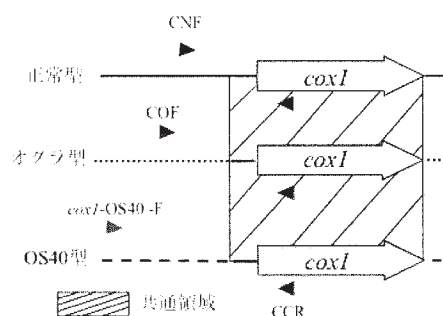


Fig. 1. ダイコンの異なるミトコンドリア型の *coxI* 遺伝子の 5' 領域増幅に用いた PCR プライマー

塩基配列の決定には、上記 PCR により、正常型とオグラ型の *coxI* 遺伝子 5' 領域がヘテロプラズミックな状態で存在していると判定された 1 個体 (#1) と、オグラ型と OS40 型のヘテロプラズミックと判定された 1 個体 (#9) の合計 2 個体を用いた。この 2 個体から調製した全 DNA を鋳型に、CNF、COF 及び *coxI*-OS40-F の各プライマーと CCR プライマーの組合せで、ExTaq DNA 合成酵素 (TaKaRa) を用いた PCR を行い、サイクルシーケンシング反応の鋳型とする増幅 DNA 断片を得た。なお PCR の反応条件は、94°C 2 分の変性後、94°C 30 秒、60°C 1 分、72°C 2 分のサイクルを 30 回繰り返すものである。正常型、オグラ型及び OS40 型のそれぞれのタイプに特異的な増幅 DNA 断片をゲル回収により精製し、これらの断片を pGEM-T Easy Plasmid Vector (Promega) にクローニングした。プラスミド DNA を調製した後、定法により塩基配列を決定した。

2.2 ‘打木源助’の *coxI* 遺伝子 5’領域の Real-Time PCR

同一個体内における異なるタイプの *coxI* 遺伝子 5’領域の存在量比を求めるため、Real-Time PCR を行った。PCR 反応の鑄型には、先の実験で用いた 14 個体の ‘打木源助’から抽出した DNA を用いた。Primer Express 3.0 ソフトウェア (Applied Biosystems 以下 ABI)を用いて、正常型、オグラ型及び OS40 型のそれぞれに特異的な Real-Time 用プライマーを新たに設計し、異なるタイプの *coxI* 遺伝子 5’領域のコピー数を Real-Time PCR により調査した。この実験に用いたプライマー及びそれらの塩基配列を Table 1 に示す。

Table 1. ‘打木源助’の *coxI* 5’領域の Real-Time PCR に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5' → 3')	備考
CNF RT	GAACCATTAACCAAGACAGAGACCTT	TaKaRa
CNR RT	ACTCGAACAGCAAAGGAGAGTTG	TaKaRa
COF RT	GTTGAGTTAACCCCTTTTCG	TaKaRa
COR-RT	TGACTGAAAAGCCGTTCT	TaKaRa
os40 <i>coxI</i> RT-F	CCCATCCCTATCTTCTTTTG	invitrogen
os40 <i>coxI</i> RT-R	GGCGAAGGGTATCCAACCA	invitrogen

なお Real-Time PCR は、鑄型 DNA 量を 10ng に統一し、SYBR Green Realtime PCR Master Mix Plus (TOYOBO)に添付されたプロトコールに従い、7500 Real-Time PCR System (ABI)を使用して行った。PCR 反応液の組成及び反応条件を Table 2 に示す。

なお、前節で塩基配列の決定に用いたプラスミド DNA を 1ng/μl に希釈した後、 $10^3 \sim 10^7$ のコピー数に相当する濃度の希釈系列を作成し、これを *coxI* 遺伝子の 5’領域における Real-Time PCR のスタンダードとして使用した。

Table 2. ‘打木源助’の *coxI* 5’領域の Real-Time PCR の組成と反応条件

a) Reaction components		
	Volume(μl)	
DNA	1	
Each primer(10p)	1	
SYBR GREEN -Plus-Plus solution	12.5	
MilliQ Water	2.5	
	7	
total	25	
b) Cycling parameters		
Temperature	Time period	Num. of cycle
95°C	1min	
95°C	15sec	
60°C	15sec	34cycle
72°C	45sec	
Remove Dissociation Stage		

2.3 F₁ 世代におけるダイコンの *coxI5* 領域の PCR

前節で *coxI* 遺伝子を調査した ‘打木源助’14 個体のうち、正常型及びオグラ型の両方の *coxI* 遺伝子 5’領域を持つ個体 (#1, #14) のいずれかを片親として、オグラ型と OS40 型の *coxI* 5’領域を持つ個体 (#9) との間で正逆交雑を行い、15 個体の F₁ を得た (Fig. 2)。

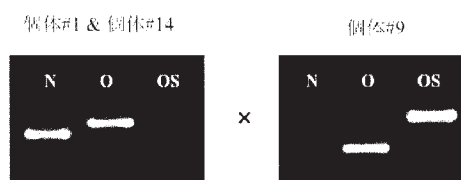


Fig. 2. 正逆交雑に用いた親個体(P)の *coxI* 5’領域の PCR による増幅パターン

N: 正常型特異的プライマーによる増幅
O: オグラ型特異的プライマーによる増幅
OS: OS40型特異的プライマーによる増幅

F₁ 各個体の葉 1g より、DNasey Plant Maxi Kit (QIAGEN)を用いて全 DNA を精製した。この DNA を鑄型に、3 種類のフォワードプライマー (CNF or COF or *coxI*-OS40-F)とリバースプライマー (CCR)、ExTaq を使用し、95°C1 分の変性

後、95°C20 秒、58°C20 秒、72°C45 秒のサイクルを 30 回繰り返す条件で PCR を行った。

2.4 F₁ 世代の Southern Hybridization

2.3 の実験で使用した 15 個体の F₁ のうち、個体#1 と個体#9 の正逆交雑から得た 4 個体と個体#9 と個体#14 の正逆交雑から得た 9 個体の全 DNA6μg を制限酵素 *Bam*HI、*Eco*RI 及び *Hind*III (TOYOBO) で消化し、アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレン (Biodyne Plus, Pall) に転写した。プローブには、PCR で DIG 標識したシロイヌナズナの *coxI* プローブを用いた。ハイブリダイゼーションは 65°C オーバーナイトで行い、シグナルを Tropix CDP-Star (ABI) を基質とした発光反応により検出した。なお実験のプロトコールは、プレ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も含めて、DIG application manual for filter hybridization (Roche) に拠った。

2.5 遺伝子の単離

2.5.1 *msh1*

本実験には‘打木源助’と栽培ハツカダイコンの‘コメット’を用いた。葉、つぼみのそれぞれ 100mg より RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を精製し、DNase 処理を行なった後、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行った。その後、全 RNA 3.2μg を鋳型に SuperScript II RNaseH-Reverse Transcriptase (以下 SSRII、Invitrogen) により添付のプロトコールに従い oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーを用いて cDNA を合成した。

この cDNA を鋳型としてシロイヌナズナの *msh1* 遺伝子コード領域の配列をもとに作成したプライマーペア、arabi CHM F1 及び arabi CHM R2 (Table 3) と、ExTaq を用いて、RT-PCR を行った。PCR の反応条件は、94°C2 分の変性後、94°C30 秒、60°C1 分、72°C3 分のサイクルを 30 回繰り返した後、72°C で 5 分間、さらに伸長反応を行うものであった。なおこの RT-PCR は‘打木源助’ではなく、‘コメット’のつぼみ由来の cDNA でのみ行った。RT-PCR で増幅した 3209bp の DNA 断片をゲル回収し、pGEM-T Easy Plasmid Vector に Ligation high ver.II (TOYOBO) を用いてクローニングした後、定法により塩基配列を決定した。

Table 3. ダイコン *msh1* 遺伝子の単離に用いた PCR プライマー

Primer name	Sequence(5'→3')	備考
arabi CHM F1	ATGCATTGGATTGCTACCAGAAAC	Nuc. Pos. 1-21bp
arabi CHM R2	CTGTCCAATGTACAATCTCTTATC	Nuc. Pos. 3134-3148bp
dT-SH	GCGAGCTCAAGCT ₂₀	
CHM race 1	TACCTTGTGTTAAGTAGAAGAG	5'RACE
CHM race 2	GATCTTTGTCAGTGAGAACATC	5'RACE
CHM race 2.5	CCAAGTAGATTGGTGACATAAGC	5'RACE
CHM race 3	TTAGAATGTCTTCAATAGGTG	3'RACE
CHM race 4	ACTTCATCGGACAATAGCCACG	3'RACE
PBS_T7HT	GTAATACGACTCACTAATAGGGCGA	
pBSHCR	TGACCAATGATTACGCCAAGC	
Radish CHM 00F	ACTTCTTCTGGTGATAGCAGCAG	相対性が低い
Radish CHM 00R	CAAGATAAGAGTGCGAGGTGATC	

得られた塩基配列より 3'RACE 用プライマーを作成し、dT-SH プライマー及び ExTaq を用いて 3'RACE を行った。反応条件は 94°C2 分の変性後 94°C30 秒、58°C45 秒、72°C1 分のサイクルを 35 回繰り返した後、72°C で 2 分間さらに伸長反応を行うものであった。増幅した DNA 断片を、上記と同様の方法でクローニングし、塩基配列を決定した。得られた配列より 5'RACE 用プライマーを作成した。

5'RACE は、Terminal Deoxynucleotide Transferase (TOYOBO) によって先の

cDNA の 5'末端に A をテーリングしたものを鋳型に、dT-SH プライマーと 5'RACE 用プライマーを用いて行った。3'RACE の場合と同様の方法で、増幅 DNA 断片をクローニングし、その塩基配列を決定した。RACE 法に用いたプライマーを Table 3 に示す。

3'及び 5'RACE により得られた配列からダイコン *msh1* 遺伝子の cDNA 全長を増幅するプライマー、Radish CHM 00F 及び Radish CHM 00R を作成し(Table 3)、KOD+により、'打木源助'及び'コメット'のつぼみ由来の cDNA を鋳型として PCR を行った。PCR の反応条件は、94°C2 分の変性後、94°C30 秒、60°C1 分、68°C3 分 30 秒のサイクルを 35 回行った後に、68°C4 分の伸長反応を行うものである。得られた PCR 産物を電気泳動し、約 3.6kbp の断片をゲル回収した。回収した DNA 断片を T4 Polynucleotide Kinase (NEB)を用いてリン酸化し、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、クローニングのインサートとした。ベクターには、pBluescript II SK+を *EcoRV* で処理後、rAPid Alkaline Phosphatase (Roche)により脱リン酸化したものをを用いた。インサートとベクターをライゲーションした後、定法によりクローニングして、プライマーウォーキング法によりインサートの塩基配列を決定し、これをダイコン *msh1* の全長 cDNA 配列とした。塩基配列の決定に使用したプライマーの塩基配列と位置を Table 4、Fig. 3 にそれぞれ示す。

Table 4. ダイコン *msh1* 遺伝子コード領域内のプライマー

Primer name	Sequence(5'→3')	備考
Radish CHM 0 5F	GAAGAGAGCTACGAAACGAAG	相同性が低い
CHM cds 1F	ATGCACTGGATTGCCACCAGAAAC	開始コドン
Radish CHM 01F	AACTTATCGAAAGGCTTATGTAC	
Radish CHM 02F	TCGTTGGTGGGACACGATC	
Radish CHM 03F	ACGTACCTTCAGAAAACCGGC	
Radish CHM 04F	CTGAAGTTGTTGATGGAGCC	
Radish CHM 07F	ATGTAGCTTCTGGAAC TGCTG	
Radish CHM 08F	AATGTGGAAGGGCAGACAAAGC	
Radish CHM 1R	CTATGAGATACTGACTACATCTG	終止コドン
Radish CHM 01R	CACATAAACACATGATGAACCAAC	
Radish CHM 02R	AATACCAAGCAACCACTTGGC	
Radish CHM 03R	TGTGAACAGCAGTTCAGAAG	
Radish CHM 04R	GAACCAAACAGACTCATGTTC	
Radish CHM 07R	TGTGTAGCCGTTCAAGATGC	
Radish CHM 08R	GCATCTATCCAATGGCCTCATAG	

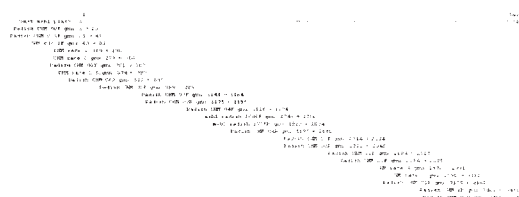


Fig. 3. ダイコン *msh1* 遺伝子の塩基配列決定に用いたプライマー

2.5.2 *recA3*

本実験には'打木源助'の個体#1 と個体 #9 を用いた。葉 400mg、つぼみ 200mg から Sepasol-RNA I Super (Nacalai)を用いて全 RNA を精製し、DNase 処理を行いフェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行った。この全 RNA 5µg を鋳型に、SSRII と oligo(dT)₁₂₋₁₈ を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。

この cDNA を鋳型とし、シロイヌナズナの *recA3* に相同性を示すダイコンの EST 配列より作成したプライマー RecA3 R F1 及び RecA3 R R1 のペアを用いて ExTaq による RT-PCR を行った(Table 5)。PCR の反応条件は 94°C2 分の変性後、94°C30 秒、57°C45 秒、72°C1 分のサイクルを 30 回繰り返すものであった。

RT-PCR により得られた 428bp の増幅断片をクローニングし、シーケンスを決定した(データ未掲載)。この配列をもと

にプライマーを作成して 3'RACE を行い、3'側の塩基配列を決定した。次に 5'側の塩基配列を決定するため、全 DNA を鋳型に、3'RACE より得られた配列をもとに作成したプライマーを用い TAIL-PCR を行った。Tertiary Reaction で得られた約 2kb の増幅断片を回収し、これを pGEM-T Easy Plasmid Vector に Ligation high ver.II を用いてクローニングした。その後、この断片の塩基配列を決定し、5'UTR 部位にプライマーを作成した。*recA3* の RACE 法及び TAIL-PCR に用いたプライマーを Table 5 に示す。

Table 5. ダイコン *recA3* 遺伝子の単離に用いた PCR プライマー

Primer name	Sequence(5'→3')	備考
RecA3 R F1	GTTTTTCTCAATCAGGTCAGG	Nuc. Pos. 790-810bp
RecA3 R R1	CATCTAGAAGAGCTGCTTCCTC	Nuc. Pos. 1197-1218bp
dT-SII	GCGAGCTCAAGC(T ₂₀)	
Rec3 R 3'race	TACGTGGAGCGTGAGGTGTTAG	3'RACE
TAIL1	NGTCGASWGANAWGAA	TAIL-PCR
TAIL2	GTNCGASWGANAWGTT	TAIL-PCR
TAIL3	WGTGNAGWANCANAGA	TAIL-PCR
RecA3 R 00R	GACATGCTTCTCTGCTCCCTC	TAIL-PCR
Rec3 R 5'race-1	ACGTAGAAGCCACGACCAAAG	TAIL-PCR
Rec3 R 5'race-2	CATGTTAGACTTGGCATGTGACC	TAIL-PCR
PBS_T7IIIT	GTAATACGACTCATATAGGGCGA	
pBSII/CR	TGACCATGATTACGCCAAGC	
RecA3 R 0F	CGTCTGTTGGGAACACACGC	

2 個体の '打木源助' (個体 #1 及び #9) のつぼみ由来の cDNA を鋳型に、5'及び 3'のそれぞれの UTR 部位に作成したプライマーペアを用いて ExTaq によりダイコン *recA3* 遺伝子の全長 cDNA を増幅した。PCR の反応条件は 94°C2 分の変性後、94°C30 秒、58°C30 秒、72°C2 分のサイクルを 30 回行って、さらに 72°C3 分の伸長反応を行うものであった。この RT-PCR により得られた 1296bp の DNA 断片をクローニングし、プライマーウォーキング法で、'打木源助'の *recA3* の全長 cDNA 配列を決定した。同様の方法で、'コメット'の *recA3* 遺伝子の全長 cDNA についても塩基配列を決定した。なお塩基配列の決

定に使用したプライマー及び *recA3* コード領域内に設計したプライマーの塩基配列ならびにそれらの位置を Table 6、Fig. 4 にそれぞれ示す。

Table 6. ダイコン *recA3* 遺伝子コード領域内のプライマー

Primer name	Sequence(5'→3')	備考
RecA3 R 01F	ATGGGTCGACGACTCTCATTAACC	開始コドン
Rec3 R F 5	GAAGCTTCAGACTGTGAGCTTG	
RecA3 R 03F	GAAGAATGGTTGAGGTTTATG	
RecA3 R F K	AGAAGCTTCTGGAAAGACAACCTC	
RecA3 R 07F	GAGGTAAGTGGTCTGAACGCTG	
RecA3 R F NST1	GCAAGAGAAGGTAATAGCC	
RecA3 R F NST2	GGTTGTTGATGGCAAAGAC	
RecA3 R R1	GAGGAAGCAGCTCTCTAGATG	終止コドン
Rec3 R R NST1	GCGTGGAAGTGGTGA AAAAC	
Rec3 R R NST2	CAGGCAGCTATACGCTCTCAA	
Rec3 R R 5	CAATAGGTGTGAACCGGAAG	
RecA3 R R K	GAAGCTTCGGAAGACAACCTC	
Rec3 R 06R	CTACGTTACAGCTTATCACAGCTT	
Rec3 R R 7	GAAGCTTCAGACTGTGAGCTTG	

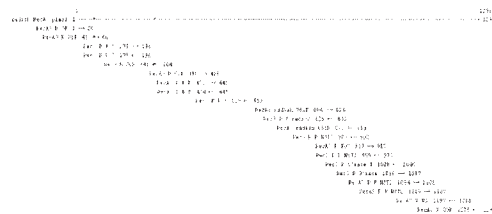


Fig. 4. ダイコン *recA3* 遺伝子の塩基配列決定に用いたプライマー

2.6 交配に用いた '打木源助' 親個体の *msh1*、*recA3* 両遺伝子の RT-PCR による発現解析

msh1、*recA3* 両遺伝子 (以下 SSS 関連遺伝子) の転写産物の蓄積量を調べるため、RT-PCR による簡易定量を行った。RT-PCR には、実験 2.5.2 において *recA3* 単離に用いたものと同じ、Sepasol-RNA I Super を用いて精製した葉及びつぼみ由来の全 RNA を用いた。全 RNA を SSRII、oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーを用いて逆転写し、得られた cDNA を 10 倍希釈して、PCR 反応の鋳型とした。

増幅産物の簡易定量には、2 組の *msh1* プライマー、1 組の *recA3* プライマー及び

1組の actin 遺伝子プライマー (コントロール)を用いた (Table 7)。なお、PCR 反応には、ExTaq を用い、94°C2 分の変性後、94°C20 秒、57°C30 秒、72°C1 分 30 秒のサイクルを 25 回、30 回、及び 35 回繰り返す 3 段階の条件を設定した。

Table 7. SSS1関連遺伝子のPCRによる簡易定量化に用いたプライマー

Primer name	Sequence(5'→3')
actin F16	GAGGCTGATGAYATCAACC
actin R1196	ATCTTCATGCTGCTTGGTGC
Radish CHM 02F	TCGTTGGTGTGGACCACGATC
msh1 radish 1775R	GCCATGGCCTTGATCTTGATA
msh1 radish 1686F	AATCACACAAGTGGCAAAATCG
Radish CHM 01R	CACATAAACACATGATGAACCAAC
RecA3 R 0F	CGTCTGTGGGAACACACGC
RecA3 R 00R	GACA1GC1T1CTCTGCTCCTTC

2.7 交配に用いた‘打木源助’親個体の SSS 関連遺伝子の Northern Hybridization

本実験には、前節と同じ方法で調製した葉、及びつぼみの全 RNA から、oligotex-dT30<Super>mRNA Purification Kit (From Total RNA) (TaKaRa)により精製した mRNA を使用した。mRNA をエタノール沈殿により濃縮した後、1.1µg (この量に満たないサンプルは全量) を電気泳動し、メンブレンに転写した。プローブとして actin 及び *msh1*、*recA3* のそれぞれの遺伝子を、cDNA を鋳型として PCR により DIG 標識した cDNA プローブを使用した。この DIG 標識に使用したプライマーを Table 8 に示す。ハイブリダイゼーションは 50°C オーバーナイトの条件で行い、Tropix CDP-Star (ABI)を基質とする発光反応により、ハイブリダイゼーションシグナルを検出した。なお、電気泳動、プレ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の手順は、DIG application manual for filter hybridization に拠った。

Table 8. Northern Hybridization のプローブのDIG標識に用いたプライマー

Primer name	Sequence(5'→3')
actin F16	GAGGCTGATGAYATCAACC
actin R1196	ATCTTCATGCTGCTTGGTGC
msh1 radish 1686F	AATCACACAAGTGGCAAAATCG
Radish CHM 02R	AATACCCAAGCAACCACTTGCG
RecA3 R 0F	CGTCTGTGGGAACACACGC
RecA3 R 00R	GACATGCTT1CTCTGCTCCTTC

2.8 パーティクルガン法を用いたダイコン MSH1 と RecA3 の細胞内局在の解析

MSH1 の細胞内局在を調べるため、実験 2.5 で精製した‘コメット’のつぼみ由来の cDNA を用いて以下の実験を行った。*msh1* 全長 cDNA 配列をもとに制限酵素 (*Sall*、*NcoI*)認識部位を付加したプライマー (Radish CHM *Sall* transF:

5'-GAAGTCGACGCACTTCTTCTGG-3'、Radish CHM *NcoI* trans 2R:

5'-GACTTCCATGGCTCAGGCTG-3')を作成した。このプライマーペアは *msh1* の 5'UTR と開始コドンから 118 番目のアミノ酸 (118a.a)までのコード領域を含む DNA 断片を増幅するように設計されている。cDNA を鋳型に ExTaq で PCR を行い、245bp の増幅断片を得た。PCR の反応条件は、94°C2 分の変性後、94°C30 秒、58°C1 分、72°C1 分のサイクルを 30 回繰り返すものであった。回収した増幅断片を制限酵素 *NcoI* で処理した後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、これを制限酵素 *Sall* で処理し、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行って、クローニングするインサートとした。また pUC18 にカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターとシロイヌナズナの ATPase, delta subunit のプレシークエンس (DIPS)及び sGFP を導入したコンストラクト (35S-DIPS-GFP) から、*NcoI*、*Sall* の両制限酵素処理により

DIPS 配列を切り出したものをベクターとした。インサートとベクターを Ligation high Ver. II を用いて連結し、大腸菌へ導入した。その後、コロニーPCRにより目的インサートを持つと思われるクローンを選抜し、シーケンシングにより MSH1 の 118a.a が sGFP の配列とインフレームであることを確認した（このコンストラクトを 35S-MSH1 118a.a-GFP と名付けた）。続いて MSH1 の 35 番目から 41 番目までのアミノ酸に対応するコード領域に相補的なプライマー (Radish CHM inverse R:
5'-GTTAAGTAGAAGAGGCGAGGG-3') を作成し、35S-MSH1 118a.a-GFP を鋳型に、プライマー pUC18 GFP-F (5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3') とのペアで、KOD+を用いて Inverse PCR を行った。増幅産物の self-ligation により、新たなコンストラクト(35S-MSH1 41a.a-GFP)を作成した。なお、'コメット' の MSH1 の 41 番目までの推定アミノ酸配列は、'打木源助'のものとは完全に一致した。

RECA3 の細胞内局在を調べる実験には、'打木源助'のつぼみ由来の cDNA を用いた。まず、ダイコン *recA3* の 5'UTR と 49 番目までのアミノ酸を含む 189bp の DNA 断片を PCR により増幅し、これをゲル回収した。PCR の酵素には KOD+、プライマーには RecA3 R 0F 及び RecA3 R 147R (5'-ACAGTCTGAAGCTTCAGCTAAAG-3') を使用した。PCR 反応の条件は、95°C1 分の変性後、95°C30 秒、59°C1 分、68°C1 分のサイクルを 35 回繰り返すものであった。得られた増幅 DNA 断片をゲル回収した後、これを T4 Polynucleotide Kinase

によりリン酸化し、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行いクローニングのインサートとした。また 35S-DIPS-GFP を鋳型に、pUC18 GFP-F と pUC18 inverse R (5'-TTTTGTTGCAGATAGATTTTGATTG-3') のプライマーペアで、KOD+を用いて Inverse PCR を行うことにより得た増幅 DNA 断片をゲル回収し、これをベクターとして使用した。Inverse PCR の条件は 95°C30 秒、59°C1 分、68°C3 分のサイクルを 25 回行った後に、68°C4 分の伸長反応を行うものであった。インサートとベクターを Ligation high ver. II にてライゲーションし、大腸菌へ導入した。コロニーPCR とシーケンシングにより、目的のインサートが正しくベクターへ挿入されていることを確認し、このコンストラクトを 35S-RecA3 49a.a-GFP と名付けた。

作成したコンストラクト、及びコントロールとしての 35S-DIPS-GFP をタマネギ表皮細胞にパーティクルガンで撃ち込んだ。金粒子の調製から細胞の観察までの操作は以下の手順で行った。まず、50% グリセロールに 50µg/ml の濃度で懸濁された金粒子 (1.6µm) を 100µl (1 トライアル=6 ショット分、以下同様)、エッペンドルフタイプチューブに分注し、この懸濁液を 14,000rpm で 1 分遠心後、上清を除去し 1ml の dH₂O を加え Vortex で強く攪拌した。これら一連の操作をさらに 2 回繰り返す、最終的に金粒子を 50µl の dH₂O に懸濁した。この懸濁液に、導入コンストラクトであるプラスミド DNA (1µg/µl)、50µl の 2.5M CaCl₂、20µl の 0.1M スペルミジンを、この順番に Vortex で毎回攪拌しながら、氷上で素早く加えた。混合液

を低温室で 30 分間 Vortex 攪拌し、1 分間放置した。その後、DNA が吸着した金粒子をエタノールで洗浄し、最終的に 7.5 μ l の 99.5%エタノールに懸濁した。

上記方法で調製した金粒子をパーティクルガン (Biolistic PDS-1100/He Particle Delivery System, Bio-Rad 社)により植物細胞へ撃ち込んだ。MS 培地上にタマネギの表皮細胞を内側が上向きになるように静置し、シャーレを 3 段目にセットした。ラプチャーディスクは 1350psi のものを使用した。金粒子を撃ち込んだタマネギの表皮細胞をシャーレごとアルミ箔で遮光し、25°C で 1 日培養した。翌日、TCS-SPE 共焦点顕微鏡 (Leica)を用いてタマネギ表皮細胞の GFP 蛍光を観察した。

3. 結果

3.1 ダイコンの *coxI* 遺伝子 5'領域の PCR による増幅

coxI 遺伝子の 5'領域を増幅する PCR では、正常型特異的プライマーペア (CNF/CCR) により 448bp、オグラ型特異的プライマーペア (COF/CCR) により 515bp の大きさを持つ DNA 断片が増幅した。また OS40 型特異的プライマーペア (*coxI*-os40-F/CCR) では、803bp の DNA 断片が増幅した (Fig. 5)。

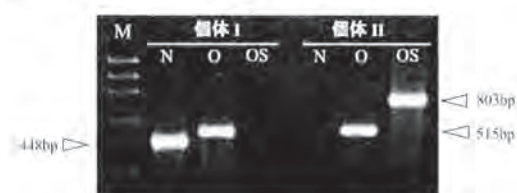


Fig. 5. 『打木源助』の *coxI* 5'領域の PCR による増幅パターン。

M: ϕ X174/HaeIII
 N: 正常型特異的プライマーによる増幅
 O: オグラ型特異的プライマーによる増幅
 OS: OS40型特異的プライマーによる増幅

個体 I, II はそれぞれ別の『打木源助』個体を示す。

今回調査した 14 個体の『打木源助』の中には、正常型特異的な *coxI* 遺伝子の 5'配列のみを持つ個体は存在しなかったが、正常型の 5'配列とオグラ型の 5'配列の両方を持つ個体が 5 個体 (全体の 36%) 含まれていた。残りの 9 個体 (64%) は、オグラ型の 5'配列と OS40 型の 5'配列の両方を持つ個体であった (Table 9)。

Table 9. PCRによる『打木源助』の *coxI* 5'領域の同定

個体番号	<i>coxI</i> 5' region type		
	N	O	OS40
打木源助1	+	+	-
打木源助2	-	+	+
打木源助3	-	+	+
打木源助4	-	+	+
打木源助5	-	+	+
打木源助6	-	+	+
打木源助7	-	+	+
打木源助8	-	+	+
打木源助9	-	+	+
打木源助10	+	+	-
打木源助11	+	+	-
打木源助12	+	+	-
打木源助13	-	+	+
打木源助14	+	+	-

N: 正常型 *coxI* 分子 O: オグラ型 *coxI* 分子 OS: OS40型 *coxI* 分子
 +: PCRによる増幅有り -: PCRによる増幅なし

PCR により増幅した DNA 断片を用い、正常型、オグラ型及び OS40 型の *coxI* 遺伝子の 5'領域の塩基配列を決定した結果、正常型、オグラ型、及び OS40 型は、いずれも *coxI* 遺伝子の開始コドンの 121bp 上流から配列が大きく異なることがわかった (Fig. 6)。

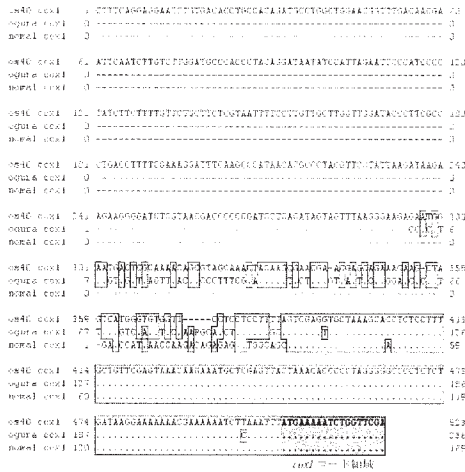


Fig. 6. '打木源助' に存在する3種類の *coxI* 5'領域の増幅の比較

3.2 '打木源助'の *coxI* 領域の Real-Time PCR

'打木源助'の各個体に存在する正常型、オグラ型及びOS40型の *coxI* 遺伝子の5'領域のコピー数を Real-Time PCR 法により調査したところ、通常の PCR による増幅パターンの観察を裏付ける結果が得られた。すなわち、正常型とオグラ型の5'領域が共存する個体では、正常型が $3.2 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ コピー、オグラ型が $3.0 \times 10^7 \sim 7.3 \times 10^7$ コピー、またオグラ型とOS40型が共存する個体では、オグラ型が $1.1 \times 10^7 \sim 4.3 \times 10^7$ コピー、OS40型が $6.8 \times 10^6 \sim 3.1 \times 10^7$ コピーと推定され(Table 10)、各タイプのコピー数に大きな違いは認められなかったものの、正常とオグラ型が共存している個体では、正常型のコピー数がオグラ型のコピー数より多く、オグラ型とOS40型が共存している個体では、オグラ型のコピー数がOS40型のコピー数より多かった。一方、正常型とオグラ型が共存する個体では、OS40型が $1.7 \times 10^3 \sim 6.7 \times 10^3$ コピー、またオグラ型とOS40型が共存する個体では正常型が $5.1 \times 10^3 \sim 9.7 \times 10^4$ コピーという推定値が得

られ、個体によっては、これらマイナーなタイプが他のタイプより4桁以上少ないものがあった(Table 10)。

Table 10. '打木源助'の異なる *coxI* 5'領域のコピー数とその比較

個体番号	正常型	オグラ型	OS40型	比率(%)
打木源助1	3.2×10^7	3.0×10^7	3.4×10^3	52.48.9
打木源助2	7.5×10^4	1.3×10^7	9.1×10^6	0.59.41
打木源助3	6.7×10^3	3.3×10^7	2.2×10^7	0.60.40
打木源助4	6.5×10^3	1.7×10^7	1.3×10^7	0.57.43
打木源助5	7.1×10^3	1.1×10^7	6.8×10^6	0.61.39
打木源助6	6.7×10^3	3.9×10^7	3.1×10^7	0.58.42
打木源助7	1.1×10^4	2.3×10^7	1.5×10^7	0.61.39
打木源助8	8.6×10^3	1.2×10^7	8.3×10^6	0.59.41
打木源助9	3.1×10^3	2.4×10^7	1.6×10^7	0.60.40
打木源助10	1.6×10^4	3.6×10^7	5.1×10^3	56.44.0
打木源助11	6.2×10^7	5.2×10^7	3.0×10^3	54.46.0
打木源助12	6.3×10^7	5.1×10^7	1.7×10^3	55.45.0
打木源助13	8.5×10^3	4.3×10^7	2.7×10^7	0.61.39
打木源助14	1.6×10^3	7.2×10^7	6.7×10^3	58.42.0

単位は1molecules/μg、1kbpのDNAを 9.1×10^4 molecules/μgとした時の値、N:Undetermined、比率は正常型:オグラ型:OS40型を示す。

3.3 F₁世代におけるダイコンの *coxI* 5'領域の PCR

正常型とオグラ型の5'領域が共存する個体#1に、オグラ型とOS40型の5'領域が共存する個体#9の花粉を交配して得られたF₁の3個体は、いずれも母親として用いた個体#1と同様のPCR増幅パターンを示した(Table 11)。

Table 11. 正逆交雑に用いた親世代(P)と得られたF₁世代の *coxI* 5'領域のPCRによる同定

世代	交雑組合せ	<i>coxI</i> 5' region type			
		N	O	OS	
P	個体1	+	+	-	
	個体9	-	+	+	
	個体14	+	+	-	
F ₁	1×9	個体①	+	+	-
		個体②	+	+	-
		個体③	+	+	-
	9×1	個体④	-	+	+
		個体⑤	-	+	+
		個体⑥	-	+	+
9×14	個体⑦	-	-	+	
	個体⑧	-	-	+	
	個体⑨	-	+	+	
	個体⑩	-	+	+	
	個体⑪	-	+	+	
	個体⑫	-	-	+	
14×9	個体⑬	+	+	-	
	個体⑭	+	-	-	
	個体⑮	+	+	-	

N: 正常型 *coxI* 分子 O: オグラ型 *coxI* 分子 OS: OS40型 *coxI* 分子
+: PCRによる増幅有り -: PCRによる増幅なし

またこの組み合わせの正逆交雑で得られたF₁の3個体もすべて、母親として用

いた個体#9と同様のPCR増幅パターンを示した(Table 11)。

一方、#1と同じく、正常型とオグラ型の5'領域が共存する個体#14を母親、先の個体#9を花粉親とする組み合わせで得られたF₁では、3個体のうち2個体は母親である個体#14と同じ増幅パターンを示したが、1個体は正常型特異的プライマーペアでのみバンドの増幅が認められた(Table 11)。またその正逆交雑、すなわち#9を母親、#14を花粉親とする交配で得られたF₁の6個体については、3個体でオグラ型とOS40型の共存が認められたものの、残りの3個体ではOS40型に特異的なプライマーペアでのみバンドの増幅が認められた (Table 11、Fig. 7)。

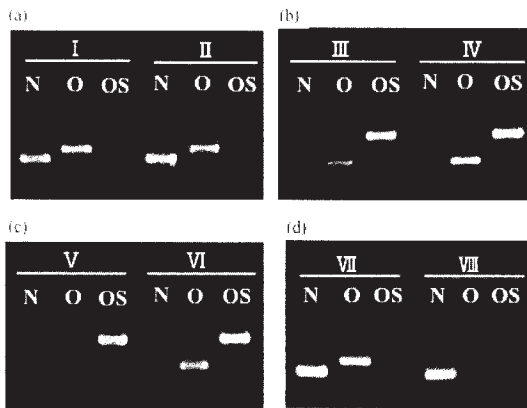


Fig. 7. 正逆交雑から得られたF₁個体の*coxI* 5'領域のPCRによる増幅パターン

- (a): 個体1×個体9のF₁個体のPCR
 - (b): 個体9×個体1のF₁個体のPCR
 - (c): 個体9×個体14のF₁個体のPCR
 - (d): 個体14×個体9のF₁個体のPCR
- I-VIIIはそれぞれの別のF₁個体を示す

3.4 F₁世代の Southern Hybridization

今回使用した3種の制限酵素のうち、*Hind*IIIでのみ、個体間に明瞭なバンドパターンの違いが確認された (Fig. 8)。

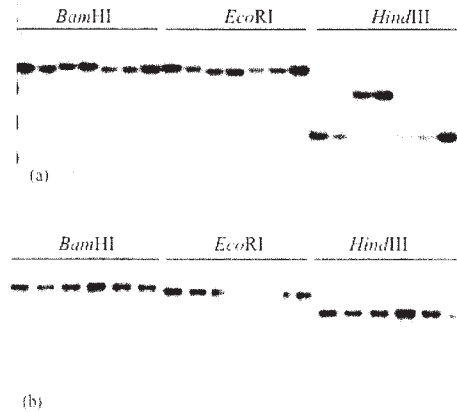


Fig. 8. *coxI* フロブを用いたF₁個体のSouthern hybridization パターン

- (a) 1×9、9×1、14×9のF₁個体のパターン
- (b) 9×14のF₁個体のパターン

前述のPCR解析において、母親と異なる増幅パターンを示した4個体では、同じ両親の組み合わせから得られた他のF₁個体とは異なり、3kbの*Hind*IIIのバンドが消失した (Fig. 9)。

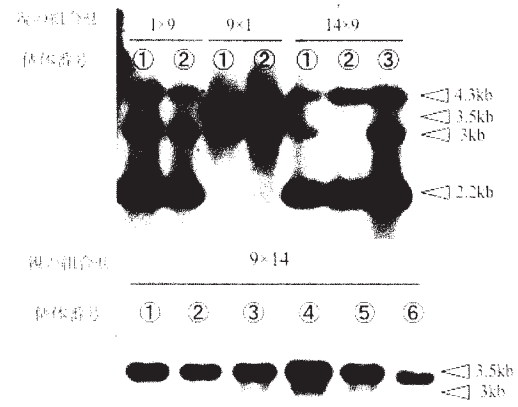


Fig. 9. *coxI* フロブを用いたF₁世代のSouthern hybridization パターン。制限酵素は*Hind*IIIを用いた

3.5 遺伝子の単離

3.5.1 *msh1*

コロニーPCRにより目的とするインサートを持つクローンを選抜し、最終的に‘打木源助’から2クローン、‘コメット’か

ら2クローンの合計4つのプラスミドクローンを得ることができた。これらのクローンのシーケンシングの結果、ダイコンの *msh1* は1123個のアミノ酸をコードする3369bpのORFを持つと予想された。このORFはシロイヌナズナの *msh1* と非常に高い相同性を示し、推定アミノ酸配列を pfam プログラムで解析すると、シロイヌナズナの *msh1* と同様、N末端から MutS domain I、MutS domain V 及び GIY-YIG catalytic domain が確認された。一方、ダイコンの *msh1* はシロイヌナズナのものとは比べて、推定アミノ酸配列のN末端に多くのアミノ酸置換が見られた (Fig. 10)。

Figure 10 shows a multiple sequence alignment of the MSH1 protein amino acid sequences. The sequences are arranged in blocks, with each block representing a different clone. The amino acid residues are shown in single-letter code. Conserved regions are indicated by vertical bars above the sequences. Some amino acid substitutions are highlighted with boxes, particularly in the N-terminal region, as mentioned in the text.

Fig. 10. ダイコンのMSH1タンパク質の推定アミノ酸配列

This block continues the multiple sequence alignment of the MSH1 protein amino acid sequences. It shows further conserved regions and variations across different clones, with some amino acid substitutions highlighted in boxes.

Fig. 10. (続き)

またクローン間の配列のわずかな違いから、‘打木源助’には2種類の、また‘コメント’には1種類の塩基配列が存在すると考えられた。なお‘打木源助’の1つのクローンでは2045bp~2123bpの位置に、また‘コメント’の1つのクローンでは1141bp~1211bpの位置に、それぞれイントロンがスプライシングされずに残るスプライシングバリエントが確認された。

3.5.2 *recA3*

ダイコンの *recA3* 遺伝子の cDNA 配列を決定するため、‘打木源助’の個体#1に由来する5クローン、個体#9に由来する3クローン、‘コメント’に由来する4クローンの合計12クローンについてシーケンシングを行った。その結果、ダイコンの *recA3* は390個のアミノ酸をコードする1170bpのORFを持つことがわかった。このORFはシロイヌナズナの *recA3* と非常に高い相同性を示した (Fig. 11)。

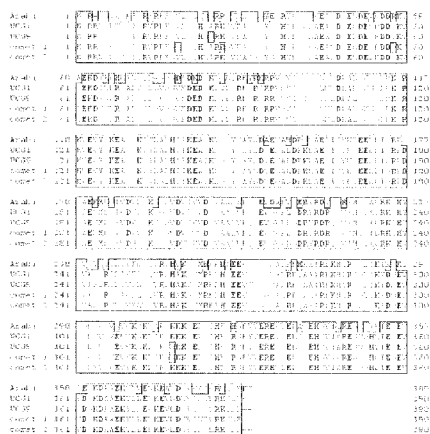


Fig. 11. ダイコンのRECA3タンパク質の推定アミノ酸配列

また推定アミノ酸配列を pfam プログラムで解析したところ、RecA タンパクをコードしていることが確認された。各クローンの塩基配列を詳細に比較したところ、‘打木源助’の個体#1、個体#9にはそれぞれ1種類の、また‘コメット’には2種類の塩基配列が見出された。そのうち‘打木源助’の個体#1の配列は‘コメット’の配列の1つと同一であった。これらの配列を比較すると、コード領域と5'UTR領域には非常に高い相同性があるものの、個体#1と個体#9の配列間には、ストップコドンの下流に存在する50bp程度の3'UTR領域に、塩基の挿入や欠失など大きな違いが見られた(データ未掲載)。

3.6 交配に用いた親個体の RT-PCR による SSS 関連遺伝子の簡易定量

交配実験に用いた‘打木源助’の葉ならびにつぼみにおける *msh1* 及び *recA3* 遺伝子の mRNA 量を、RT-PCR により簡易定量したが、25、30 及び 35 サイクルのいずれの条件においても個体間で cDNA の増幅に大きな違いを認めることは出来なかった(Fig. 12, 13)。

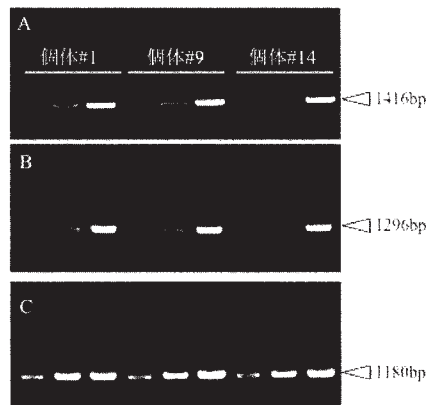


Fig. 12. ダイコンのSSS関連遺伝子のRT-PCRによる定量
A: *msh1*, B: *recA3*, C: *actin*
鋳型は葉に由来するcDNA
左から25cycle,30cycle,35cycleの順で泳動

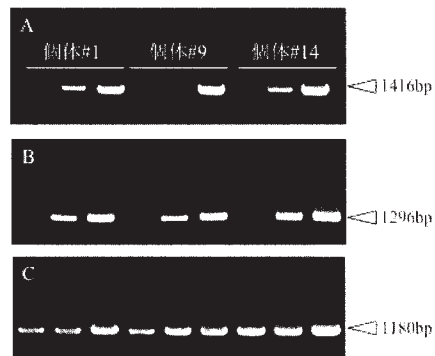


Fig. 13. ダイコンのSSS関連遺伝子のRT-PCRによる定量
A: *msh1*, B: *recA3*, C: *actin*
鋳型はつぼみに由来するcDNA
左から25cycle,30cycle,35cycleの順で泳動

葉由来の cDNA を鋳型にした場合、調べた‘打木源助’の3個体すべてにおいて、25 サイクルの RT-PCR では両遺伝子の増幅産物を確認することはできなかった。30 サイクルの RT-PCR では、つぼみ由来の cDNA を鋳型にしたものの方が、葉由来の cDNA を鋳型にしたものより多くの増幅産物が得られることが示された。なお、コントロールに用いたアクチン遺伝子では、上記と同じ鋳型からすべてのサイクルで増幅産物が得られた。

3.7 交配に用いた親個体の SSS 関連遺伝子の Northern Hybridization

msh1 cDNA プロンプを用いたノーザン解析では、全ての個体の葉及びつぼみの mRNA 中の、およそ 3.6kb の付近にバンドが確認された。一方、*recA3* cDNA プロンプでは、全ての試料に約 1.2kb のバンドが確認できると同時に、個体#14 のつぼみ由来の mRNA については 2kb と 1.7kb 付近にもバンドが確認された。コントロールとして用いた *actin* については、全ての試料に 1.2kb のバンドが確認された (Fig. 14)。

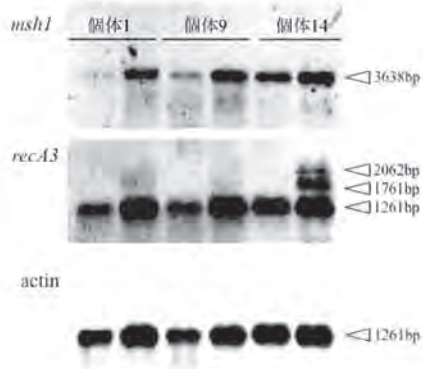


Fig. 14. SSS関連遺伝子のmRNAを用いたNorthern Hybridizationパターン

試料は葉、つぼみの順番で泳動

3.8 ダイコン MSH1 と RecA3 の植物細胞内の局在解析

パーティクルガンを使用し、コントロールの 35S-DIPS-GFP、ダイコン MSH1 の N 末の 118 個のアミノ酸を導入した 35S-MSH1 118a.a-GFP、及び 41 個のアミノ酸を導入した 35S-MSH1 41a.a-GFP の各コンストラクト、ならびにダイコン RecA3 の 49 個のアミノ酸を導入した 35S-RecA3 49a.a-GFP コンストラクトをタマネギの表皮細胞にボンバードメント法を用いて導入した (Fig. 15)。

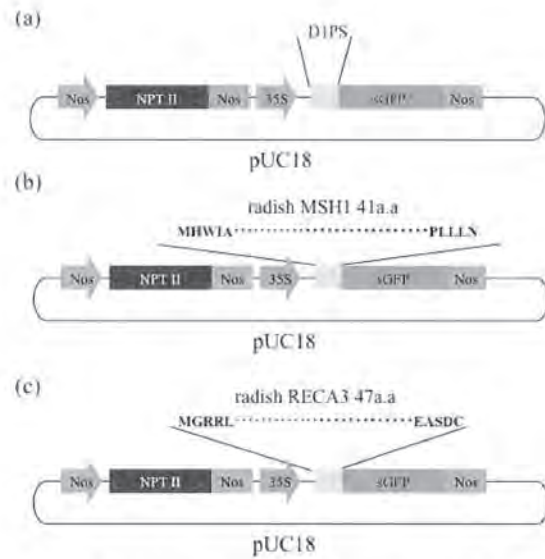


Fig. 15. ダイコンのSSS関連遺伝子の細胞内局在解析に用いたプラスミドコンストラクト

(a)35S-DIPS-GFP, (b)35S-MSH1 41a.a-GFP, (c)35S-RECA3 47a.a-GFP

共焦点顕微鏡で観察すると、ポジティブコントロールとして使用した

35S-DIPS-GFP では細胞内の小さな顆粒に GFP の緑色蛍光が確認できた (Fig. 16a)。また同様に 35S-MSH1 41a.a-GFP 及び 35S-RecA3 49a.a-GFP コンストラクトを打ち込んだ表皮細胞においても細胞内の小さな顆粒に GFP の蛍光が確認できた (Fig. 16b,c)。しかしながら、35S-MSH1 118a.a-GFP のコンストラクトでは、GFP の蛍光は確認できなかった。また 35S-MSH1 41a.a-GFP については顆粒だけでなく細胞内の繊維状のものにも GFP の蛍光が確認された (Fig. 16b, arrowhead)。

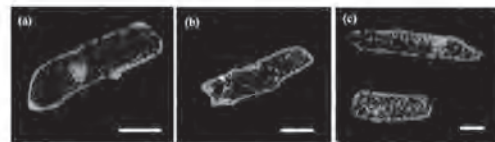


Fig. 16. ダイコンのMSH1およびRECA3ホモログの細胞内局在

(a) 35S-DIPS-GFP, (b) 35S-MSH1 41a.a-GFP, (c) 35S-RECA3 49a.a-GFP
スケールバーは100µmを示す。

4. 考察

本研究ではダイコンの SSS を考察する端緒として、まず‘打木源助’の *coxI* 遺伝子の 5'領域を PCR によりタイプ分けした。雄性不稔の原因遺伝子であるミトコンドリア *orf138* を持たないことから、その細胞質が正常型に分類される‘打木源助’を材料に用いたにも関わらず、今回調査した個体のなかに、正常型の *coxI* 遺伝子の 5'領域のみを持つ個体は存在しなかった。すなわちすべての個体で *coxI* 遺伝子の 5'領域は、正常型とオグラ型、あるいはオグラ型と OS40 型が共存するヘテロプラスミックな状態であった。とりわけオグラ型と OS40 型がヘテロプラスミックな状態で共存している個体の割合が高かった (66%) が、これらの個体は正常型の配列を全く持っていないことは、非常に興味深いことであった。一方、‘打木源助’どうしの交配で得られた F₁ には、正常型のみを持つ個体、OS40 型のみを持つ個体が出現した。この F₁ も‘打木源助’とみなせることから、‘打木源助’の *coxI* 遺伝子の 5'領域は、少なくともア) 正常型のみ、イ) OS40 型のみ、ウ) 正常型とオグラ型のヘテロプラスミック、及びエ) オグラ型と OS40 型のヘテロプラスミック、の 4 種類の存在形態をとり得ることが示唆される。一方、*coxI* 遺伝子の 5'領域が、オ) オグラ型のみ、カ) 正常型と OS40 型のヘテロプラスミックな個体は見出されていない。これらのことから、‘打木源助’のような正常型細胞質を持つダイコンのミトコンドリアの中では、正常型の *coxI* 遺伝子の 5'領域を含む DNA 分子は、OS40 型の *coxI* 遺伝子の 5'領域を含む DNA 分子と共存できないこと、オ

グラ型の 5'領域を含む DNA 分子は他のタイプの分子と共存できるが、SSS により、そのコピー数が著しく増減することが推測される。

また本研究では初めて、Real-Time PCR 法を用いて *coxI* 遺伝子の 5'領域のコピー数を定量的に調べた。その結果、正常型とオグラ型の 5'領域が共存する個体では、正常型が $3.2 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ コピー、オグラ型が $3.0 \times 10^7 \sim 7.3 \times 10^7$ コピー、またオグラ型と OS40 型が共存する個体では、オグラ型が $1.1 \times 10^7 \sim 4.3 \times 10^7$ コピー、OS40 型が $6.8 \times 10^6 \sim 3.1 \times 10^7$ コピーと、各タイプのコピー数に大きな違いは認められなかった。一方、正常型とオグラ型が共存する個体では OS40 型が $1.7 \times 10^3 \sim 6.7 \times 10^3$ コピー、またオグラ型と OS40 型が共存する個体では正常型が $5.1 \times 10^3 \sim 9.7 \times 10^4$ コピーという値になっており、個体によっては、これらマイナーなタイプが他のタイプより 4 桁以上少ないものがあった。このことは、正常型が存在するときには OS40 型の、逆に OS40 型が存在するときには正常型のコピーが、それぞれ事実上、検出不可能なレベルまで減少しているという PCR の結果を裏付けている。なお *coxI* 遺伝子のコード領域に設計されたプライマーと各タイプの 5'領域に特異的なプライマーを用いた PCR では、全てのプライマーペアで予想される大きさの DNA 断片が増幅したことから (データ未掲載)、今回 PCR により調査した正常型、オグラ型及び OS40 型の *coxI* 遺伝子 5'領域の 3'側には、いずれも *coxI* 遺伝子のコード領域が保持されていることが確認された。

これまでの実験で、‘打木源助’の異なるタイプの *coxI* 遺伝子の 5'領域を含む

DNA 分子は、それぞれ異なるサブリモンとして存在している可能性が示唆されたが、これらサブリモンの次世代への伝達について興味を持たれた。そこで、正常型とオグラ型が共存する‘打木源助’から 2 個体を選び、そのどちらかを片親、またオグラ型と OS40 型が共存している‘打木源助’の 1 個体をその相手親として正逆交雑を行い、得られた F₁ 個体の *coxI* 遺伝子の 5' 領域を解析することにより、サブリモンの遺伝様式に関する知見を得ようとした。これらの交配実験では合計 15 個体の F₁ が得られたが、そのうちの 4 個体で、*coxI* 遺伝子の 5' 領域のタイプが細胞質親とは異なるものが出現した。すなわちこれらの 4 個体では、オグラ型特異的プライマーペアで DNA 断片の増幅が認められず、オグラ型の 5' 領域を持つ DNA 分子が消失したことが示唆された。このことは、ダイコンでは交配によって SSS が生じ、結果として mt ゲノムの構成が変化する場合があることを示している。

これら F₁ 個体の mt ゲノム、特に *coxI* 遺伝子領域における構造をさらに詳しく解析するため、*coxI* 遺伝子をプローブとする Southern Hybridization を行った。*Bam*HI, *Eco*RI 及び *Hind*III によるバンドパターンを個体間で比較したところ、*Hind*III のバンドパターンで *coxI* のタイプが明瞭に識別され、PCR によりオグラ型の 5' 領域が増幅しなかった 4 個体の F₁ では、いずれも約 3kb のバンドが消失することがわかった。この結果と先の PCR の結果から、交配により消失したオグラ型の *coxI* 遺伝子の 5' 領域は、3kb の *Hind*III 断片に含まれることが示唆される。また OS40 型の *coxI* 遺伝子の 5' 領域は、

約 3.5kb の *Hind*III 断片に含まれることが予想された。一方、正常型の *coxI* 遺伝子の 5' 領域は、4.3kb と 2.2kb の *Hind*III 断片のいずれかに含まれると考えられるが、このデータだけからではどちらの断片に含まれるか特定することはできなかった。

前述のように、*coxI* 遺伝子の 5' 領域の増幅パターンが細胞質遺伝しなかったこれら F₁ の 4 個体では、オグラ型の分子が消失していると考えられる。言い換えると、交配を契機に、オグラ型の 5' 領域を含む DNA 分子に SSS が生じ、検出できないレベルまでそのコピー数を減少させたものと考えられる。この現象がどのような要因によって制御されているか興味をもたれた。そこでまず SSS の制御に関わるとされるダイコンの核遺伝子について基本的な情報を得るため、すでにシロイヌナズナで報告されている 2 種類の核遺伝子、*msh1* 及び *recA3* のダイコンホモログの単離を試みた。

本研究で初めて単離し、塩基配列を決定したダイコンの *msh1* ホモログは、1123 個のアミノ酸をコードする 3369bp の ORF を持っていた。本研究ではこの遺伝子を単離するため、‘打木源助’の他にハツカダイコンの‘コメット’も使用している。これら 2 種類のダイコンから遺伝子を単離し、‘打木源助’から 2 種類、‘コメット’から 1 種類の合計 3 種類の異なる塩基配列を見出した。これら 3 種類の塩基配列から推定されるアミノ酸配列は非常に相溶性が高いことから(98%以上)、これらは *msh1* 遺伝子の異なるアリルであると考えた。またダイコンの *msh1* はシロイヌナズナの *msh1* と非常に高い相溶性を示しており(89%以上)、N 末側から MutS domain I、

MutS domain V 及び GIY-YIG catalytic domain を持つという特徴も共有されていた。このことから、今回単離したダイコンの *msh1* は、実際にミスマッチ修復に寄与している可能性が高い。

recA3 については、‘打木源助’の異なる 2 個体 (#1 及び #9) 及び ‘コメット’ の 1 個体より 3 種類の塩基配列を得た。すなわち ‘打木源助’ の個体 #1 から得られた配列と ‘コメット’ から得られた配列の 1 つは同一であり、‘打木源助’ の個体 #9 の配列、‘コメット’ のもう 1 つの配列を含め、合計 3 種類が見出された。これらの配列は非常に高い相同性がある (98% 以上)、ダイコン *recA3* 遺伝子の異なるアリルであると思われた。このダイコンの *recA3* 遺伝子は、390 個のアミノ酸を持つ 1170bp の ORF を持っていたが、ORF の推定アミノ酸配列は、シロイヌナズナの RecA タンパク質と非常に高い相同性 (81% 以上) を示し、プログラムを用いた解析によっても RecA タンパクをコードしていることが示唆された。この結果から、今回単離したダイコンの *recA3* 遺伝子は、相同組み換え時の相同部位を認識する働きを持っている可能性が高い。なお、*recA3* 遺伝子についてはストップコドンより下流の 3'UTR 部位にアリル間で多型が見られたが、これが *recA3* 遺伝子機能に影響を与えるかどうかは今回の調査ではわからなかった。

今回単離した *msh1* および *recA3* の両核遺伝子は、ともにシロイヌナズナのもので非常に高い相同性を示すことから、ダイコンの SSS への関与が疑われた。そこで、正逆交雑の親に用いた 3 個体の間で、両遺伝子の転写産物の蓄積量など発現パ

ターンに違いがないかを調査するため、RT-PCR による mRNA の簡易定量及び Northern Hybridization を行った。まず、葉及びつぼみ由来の cDNA を鋳型とした RT-PCR では、30 サイクルにおける増幅産物の電気泳動写真の比較より、両遺伝子ともに葉よりもつぼみで多く発現していることが確認された。しかし、個体間で発現量に大きな違いを確認することはできなかった。また両遺伝子をプローブとする mRNA の Northern Hybridization では、*msh1* 及び *recA3* ともに単離した cDNA の全長とほぼ同じサイズのバンドが確認された。これは、両遺伝子がそれぞれの個体においてしっかりと転写されており、転写産物の切断などもされていないことを示す結果であった。今回の実験で、葉の mRNA については、調べた 3 個体の間で *msh1* および *recA3* の転写パターンに大きな違いを見出すことはできなかった。しかし、個体 #14 のつぼみの mRNA については、*recA3* のプローブを使用した Northern Hybridization において約 1.2kb のバンド以外に、約 2kb と 1.7kb の大きさの明瞭なバンドが確認され、他の個体、及び同個体の葉とは違うバンドパターンとなった。これは、個体 #14 において、イントロンがスプライシングされずに残るスプライシングバリエントが生じた結果ではないかと考えられる。このスプライシングバリエントがダイコンの SSS に影響を与えるかどうかは不明である。

今回単離したダイコンの *msh1* 及び *recA3* の両核遺伝子は、ともにシロイヌナズナのもので比べると推定アミノ酸配列の N 末端側、特にシグナル配列と考えられる部分にアミノ酸置換が多くみられた。

そのため両遺伝子がコードするタンパク質がシロイヌナズナのものと同様に植物細胞内でミトコンドリアに局在しているかどうか興味を持たれた。そこで両遺伝子のアミノ酸置換が多くみられた N 末端側の四十数個のアミノ酸と GFP の融合タンパク質を作るプラスミドコンストラクトを作製し、タマネギの表皮細胞へパーティクルガンにより導入して、両遺伝子の翻訳産物の植物細胞内における局在を予測した。その結果、コントロールとして用いた DIPS と同様、細胞内に顆粒状の GFP 蛍光が確認されたことから、ダイコンのこれらの遺伝子の N 末端側の部分はシロイヌナズナのものとは比べてアミノ酸置換が多いものの、予想通りパッセンジャータンパク質をミトコンドリアへターゲットさせるプレシークエンスであるということがわかった。これらの結果は、ダイコンの *msh1* 及び *recA3* の翻訳産物がミトコンドリアに局在して働くことを示唆している。また前述のように、両遺伝子の推定アミノ酸配列は、シロイヌナズナのものとは非常に高い相同性をしめし、同じ機能ドメインも保持していることから、タンパク質の働き自体にはシロイヌナズナのものとは比較しても大きな違いはないと考えられる。したがってこれらの遺伝子の翻訳産物がダイコンのミトコンドリアに局在し、ゲノムの複製時のミスマッチ修復やミスマッチの認識に関与している可能性が高いと考えられた。しかしダイコンの *msh1* ではシロイヌナズナにおける報告とは違い、ミトコンドリアだけでなく細胞内の繊維状の物質に GFP 蛍光が確認されたことから、ミトコンドリアのみに特異的に局在しているのでは

ない可能性も同時に示された。

本修士論文では、オグラ型の *cox1* 遺伝子の 5' 領域を含む特定の mtDNA 分子のコピー数が SSS により減少することが確認された。また、この SSS は交配により生じることも示された。この場合、同じ親の組み合わせを持つ F₁ の個体間でも SSS に差が生じている。このことから、この SSS はオルガネラのゲノムではなく、核遺伝子により制御されていることが示唆される。すなわち、オグラ型の *cox1* 遺伝子の 5' 領域を持つかどうかを決める 1 つの優性遺伝子を考え、交配親に用いた個体#1 は優性ホモ、個体#9 と個体#14 はヘテロの遺伝子型であるとする。そう仮定するならば、個体#9 と個体#14 の F₁ 世代において、劣性ホモの個体が分離し、オグラ型の *cox1* 遺伝子の 5' 領域を持たない個体が出現することが期待され、これは実験結果と符号する。この場合、予想される分離比は 3:1 であるが、今回調査した F₁ の個体数が少なく、この仮説を検証できなかったのは残念であった。今後、F₁ の個体を自殖させた F₂ において、*cox1* 遺伝子の 5' 領域を含む mt 分子の挙動がどうなるか、調査する必要がある、その結果に大いに興味を持たれる。また、今回ダイコンから単離することに成功した核遺伝子、*msh1* 及び *recA3* のいずれにも品種内多型が観察されたが、アミノ酸置換に伴うこれら遺伝子の翻訳産物の機能の違いを、本研究だけでは断定することはできなかった。今後、F₂ 各個体のこれら遺伝子の遺伝子型と SSS の相関を探る必要がある。

5. 謝辞

本研究を進めるに当たり、全面的に御指導、御鞭撻を頂いた京都産業大学工学部 教授 寺地 徹 博士及び全面的に材料の提供をしてくださった京都産業大学工学部 教授 山岸 博 博士に深謝の意を表す。また、研究を進める上で助言及び協力して頂いた安本 景太 博士及び京都産業大学 寺地、山岸両研究室の方々から感謝を示す。

6. 引用文献

1. Small, I.D., P.G. Isaac, and C.J. Leaver, *Stoichiometric differences in DNA molecules containing the atpA gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial genome diversity in maize*. *Embo J*, 1987. **6**(4): p. 865-869.
2. Kmiec, B., M. Woloszynska, and H. Janska, *Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals*. *Curr Genet*, 2006. **50**(3): p. 149-59.
3. Unseld, M., et al., *The mitochondrial genome of Arabidopsis thaliana contains 57 genes in 366,924 nucleotides*. *Nat Genet*, 1997. **15**(1): p. 57-61.
4. Kubo, T., et al., *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*, 2000. **28**(13): p. 2571-6.
5. Notsu, Y., et al., *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*, 2002. **268**(4): p. 434-45.
6. Sugiyama, Y., et al., *The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants*. *Mol Genet Genomics*, 2005. **272**(6): p. 603-15.
7. Abdelnoor, R.V., et al., *Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(10): p. 5968-73.
8. Feng, X., et al., *Substoichiometric shifting in the fertility reversion of cytoplasmic male sterile pearl millet*. *Theor Appl Genet*, 2009. **118**(7): p. 1361-70.
9. Mackenzie, S.A. and C.D. Chase, *Fertility Restoration Is Associated with Loss of a Portion of the Mitochondrial Genome in Cytoplasmic Male-Sterile Common Bean*. *Plant Cell*, 1990. **2**(9): p. 905-912.
10. Sandhu, A.P., R.V. Abdelnoor, and S.A. Mackenzie, *Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(6): p. 1766-70.
11. Shedge, V., et al., *Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs*. *Plant Cell*, 2007. **19**(4): p. 1251-64.
12. Zaegel, V., et al., *The plant-specific ssDNA binding protein OSBI is involved in the stoichiometric transmission of mitochondrial DNA in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006. **18**(12): p. 3548-63.
13. Yamagishi, H. and T. Terachi, *Multiple origins of cultivated radishes as evidenced*

*by a comparison of the structural variations
in mitochondrial DNA of Raphanus. Genome,*
2003. **46**(1): p. 89-94.

8. キャベツとシロイヌナズナとの細胞融合による新規雄性不稔細胞質の作出

概要

キャベツ (*Brassica oleracea*) は世界的に重要な野菜であり、日本でも周年栽培されている。前述のダイコンと同様、キャベツにおいても F1 育種が採用されており、雄性不稔細胞質は非常に有用である。現在キャベツは特定の雄性不稔細胞質に頼って F1 採種が行われており、遺伝的脆弱性の問題から新しい雄性不稔細胞質の開発が求められている。我々の研究室では、以前、シロイヌナズナ ‘コロンビア’ (2n=10) とキャベツ品種 ‘富士早生’ 及び ‘中生サクセッション’ (2n=18) 間で体細胞雑種の作出に成功している。

興味深いことに、この実験で得られた雑種はいずれも雄性不稔を示し、葉緑体ゲノムはキャベツのものを、ミトコンドリアと核のゲノムはシロイヌナズナとキャベツのものを保持していることがわかっていった。そこで本研究プロジェクトでは、戻し交雑により後代が得られているシロイヌナズナ ‘コロンビア’ とキャベツ品種 ‘中生サクセッション’ との体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの解析を行い、雄性不稔性との関係を調べた。また、この体細胞雑種に *Brassica oleracea* を連続交雑して得られた後代は、蒴の発達が不十分で、完全な雄性不稔性を示した。これらの雄性不稔の後代についてもサザン解析を行い、ミトコンドリアゲノムの構造を調べた。実験はまず、塩化セシウム密度勾配遠心法で mtDNA を調製し、これを NGS にかけてゲノムを解読した。得られた解析結果を用いて、すでに決定されているシロイヌナズナのミトコンドリアゲノム、ならびに本プロジェクトで決定したキャベツのミトコンドリアゲノムとの比較を行った。その結果、体細胞雑種はキャベツのミトコンドリアゲノム全長の 100%を保有し、さらにシロイヌナズナのミトコンドリアゲノムの約 43%を保有していることが明らかになった。また、ミトコンドリア遺伝子のサザン解析で複数の個体を調べた結果、*rrn5* など 7カ所の領域をプローブに用いた時に、体細胞雑種特異的なバンドが検出された。このうち *atp9* は過去に行われた細胞融合実験においても組換えが起きた領域として報告されていることから、塩基配列の詳細な解析を行った。サザン解析の結果と NGS の解析データから、この体細胞雑種特異的な領域は、シロイヌナズナとキャベツ間で相同性

が高い領域を介した組換えにより生じたキメラ配列を含むことがわかり、体細胞雑種のミトコンドリアでは、両種の mtDNA がキメラ化した状態で保持されていることが明らかとなった。このようなミトコンドリアゲノムのキメラ化と雄性不稔性との関係については、現在、詳細な調査を進めている。

1. はじめに

シロイヌナズナはモデル植物として広く研究され、2000年に核、葉緑体、ミトコンドリアの全ゲノム構造が解読されている

(Arabidopsis Genome Initiative, 2000)。シロイヌナズナは多くの主要な野菜が含まれているアブラナ科に属しており、ゲノム構造の解読により明らかになった有用な遺伝子の育種への利用が期待された。しかしながら、シロイヌナズナとアブラナ科野菜との交雑は極めて困難であり、雑種を得ることができる唯一の方法が細胞融合である。

そこで我々の研究室では世界的に重要な野菜であり、日本でも周年栽培されているキャベツを用いてシロイヌナズナとの間で体細胞雑種作出を試みた。その結果、シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘富士早生’および‘中生サクセッション’との間で体細胞雑種を得ることに成功した(Yamagishi and Nakagawa, 2004; Yamagishi and Kinoshita, 2008)。そして、そのいずれの雑種も雄性不稔を示した。キャベツ品種‘富士早生’を用いた雑種は、雄ずいが奇形であり、‘中生サクセッション’を用いた雑種では、花器自体に異常はないものの、花粉形成が不完全であり実質的に雄性不稔である。

我国のキャベツは、現在、雑種強勢と種子供給の管理を目的として作られたF₁品種が主流である。しかし、雑種強勢を利用するにあたり、他殖によって生じた種子だけでなく、自殖によって生じた種子が得られるという問題が起こる。そのため、あらかじめ種子親から薬を除くという非常に手間がかかり、ミスの起きやすい作業が必要となる。この問題を解決するために従来は自家不和合性が利用されていたが、この自家不和合性はどのような環

境においても恒常的に働くわけではなく、確実に自殖を防ぐことは困難であった。そこで、現在では効率的かつ計画的に育種を行うことができるうえに、完全に自殖を防ぐことができる雄性不稔細胞質の利用が広がっている。キャベツをはじめとする多くのアブラナ科作物はダイコン由来のOgura型雄性不稔細胞質を用いてF₁育種が行われている。しかし、現在までのところOgura型雄性不稔細胞質以外の有用な細胞質はなく、特定の細胞質に頼った育種となっている。過去にT型雄性不稔細胞質を利用したトウモロコシがゴマ葉枯れ病にかかるようになり、アメリカのトウモロコシ栽培が危機的状況にさらされた例がある。これは、T型雄性不稔細胞質を持つトウモロコシが生産するURF13タンパク質がゴマ葉枯れ病菌(*Cochliobolus heterostrophus*)の新レースによって作られる毒素と相互作用し、ミトコンドリア内膜のポテンシャルを失わせることでミトコンドリアの機能を損ない植物体に害を与えるというものであった(Dewey et al., 1988; Rhoads et al., 1995)。このようなことから、特定の細胞質のみに頼った育種が問題視されるようになり、現在、Ogura型雄性不稔細胞質のみに頼った育種を行っているアブラナ科作物で新しい細胞質雄性不稔の素材の開発が求められている。我々の研究室で得られた雄性不稔を示す体細胞雑種は新しい細胞質雄性不稔の有用な素材となりうる。

得られた体細胞雑種はPCRによって解析が行われ、葉緑体ゲノムはキャベツ、ミトコンドリアと核のゲノムはシロイヌナズナとキャベツのものを保持していることがわかっている(Yamagishi and Nakagawa, 2004; Yamagishi and Kinoshita, 2008)。本研究では、雄性不稔の原因として挙げられるミトコンドリアに焦点をお

き、融合処理によってミトコンドリアゲノムにどのような変化がもたらされたのか構造解析を行い、雄性不稔性との関係を調査した。今回の報告では、シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセッション’の体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの解析結果について報告する。また、シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセッション’の体細胞雑種からは、キャベツと同じ *Brassica oleracea* を花粉親に用いて戻し交雑を行った後代が得られている。その後代についても、同様に雄性不稔が引き継がれており、解析を行ったので合わせて報告する。

2. 材料および方法

2.1 材料

本研究では、シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセッション’の体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの構造解析を主に行っている。その比較対象として、同様に作出されたシロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘富士早生’の体細胞雑種を用いた。また、*Brassica oleracea* との戻し交雑により得られた後代においても Southern 解析を行い、ミトコンドリアゲノムの構造の比較を行った。両親種であるシロイヌナズナとキャベツ品種、そして同じ *Brassica oleracea* で花粉親であるカイラン、コールラビ及びブロッコリーをコントロールとして用いた。材料の詳細は、表 1 に示す。

2.2 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種における稔性の確認

各植物体の花器を観察することに合わせて、花粉の形態観察を行った。花粉の染色にはアセトカルミン溶液を用いた。

2.3 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種のミトコンドリアの単離

茎頂培養された後、温室内で十分に生育した体細胞雑種から葉をバルクで採取し、ctA 溶液 [0.44M Mannitol, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 3mM EDTA, 1mM β -Me-EtOH, 0.1% BSA] を加えて粉碎した。続いて 3500rpm, 4°C で 10 分間遠心分離 (HITACHI, himac CR 22G High-Speed Refrigerated Centrifuge) を行うことで大まかな植物塊を除き、さらに 12000rpm, 4°C で 20 分間遠心分離し、ミトコンドリアのみを沈殿させた。続いて、ペレットを mtA 溶液 [0.44M Sucrose, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 3mM EDTA, 1mM β -Me-EtOH, 0.1% BSA] で懸濁後、DNaseI (2mg/ml) 処理によりミトコンドリア以外の DNA を除いた。その後、mtA 溶液 [0.44M Sucrose, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 20mM EDTA, 1mM β -Me-EtOH, 0.1% BSA] による 2 回の洗浄ステップを経て DNaseI を除き、ペレットを再び mtA 溶液で懸濁した。懸濁後の溶液を 1.45M, 1.30M, 1.15M sucrose gradient 層の上のせ、22000rpm, 4°C で 60 分間、遠心分離 (HITACHI, himac CP 80MX preparative ultracentrifuge) を行い、1.45M と 1.30M の境界面から壊れていないミトコンドリアを回収した。回収したミトコンドリアを mtB 溶液 [0.44M Sucrose, 50mM Tris-HCl(pH8.0), 3mM EDTA] に溶かし、15000 rpm, 4°C, 15 分で遠心分離し、ペレットを TE [High conc.] [50mM Tris-HCl(pH8.0), 20mM EDTA] で懸濁した。Sarcosyl (10%) と Proteinase K (20mg/ml) を加え、37°C, 60 分処理を行い、ミトコンドリアの膜を可溶化し、タンパクを分解した。これらの実験方法は Bonen & Gray method (Bonen and

Gray,1980)を参考にした。

2.4 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種のミトコンドリア DNA の単離

ミトコンドリア単離後、塩化セシウムとエチジウムブロマイド(10mg/ml)を加え、80000rpm,20°C,6時間、遠心分離(BECKMAN, TL-100 ultracentrifuge)を行った。密度勾配によって分離されたミトコンドリア DNA を UV 照射により可視化し抽出した。その後イソプロパノールによりエチジウムブロマイドを除き、エタノール沈殿を行った。

2.5 ミトコンドリア DNA の増幅

解析のために必要な量のミトコンドリア DNA を得るために、REPLI-g Mini kit(QIAGEN)を用いて全ゲノム増幅を行った。この REPLI-g Mini kit は Multiple Displacement Amplification(MDA)法で増幅を行っており、この方法を利用したものは、多くが一本鎖の DNA として存在することが知られている。次世代シーケンシング解析では、一本鎖 DNA を除去して二本鎖を濃縮したものの方が適しており、一本鎖 DNA 部分の消化の必要性があった。そのため、S1 Nuclease(Promega)により一本鎖 DNA を消化し、フェノール・クロロホルム・エタノール沈殿で精製を行った。

2.6 次世代シーケンサーによる解析

2.5 により増幅・精製した DNA は、タカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターに委託し、GS FLX system(Rosh)で解析を行った。

2.7 Southern 解析

次世代シーケンサーによって解析された

データが実際にはどのような構造で存在するのか確認するために Southern 解析を行った。温室で栽培されている材料の葉を採取し、DNeasy plant Maxi kit(QIAGEN)を用い、全 DNA を抽出した。抽出した DNA を *HindIII*,*EcoRI*,*BamHI*(Toyobo)で酵素処理し、フェノール・クロロホルム・エタノール沈殿を行い精製後、0.8%アガロースゲルにアプライし、4時間電気泳動した。DNA を塩酸で脱プリン化し、アルカリによって変性させた後、ナイロン膜 (Biodyne Plus, Pall)にオーバーナイトで転写した。翌日、UV 照射により DNA をナイロン膜に固定し、ミトコンドリア遺伝子に特異的なプローブを加えて、65°Cでハイブリダイゼーションを一晩行った。ミトコンドリアの遺伝子プローブはシロイヌナズナのもの(Leino et al.(2005))を用いた(表 2)。プローブは、シロイヌナズナのミトコンドリア DNA をインサートに持つプラスミド DNA を鋳型とし、PCR DIG Labeling Mix(Roche)を用いて標識した。ハイブリダイズしたプローブは、アルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体を結合させ、アルカリホスファターゼ化学発光基質の CDP-Star(Applied Biosystem)により可視化した。なお、これらのハイブリダイゼーションならびに検出方法は、Dig application manual for filter hybridization(Roche)に従い実施した。

2.9 ゲノムシーケンシスの解析

解析に用いたシーケンシングデータは NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)のものを使用し、また BLAST 検索についても NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)の検索機能を利用した。さらに、open reading frame の検索には、ORF

finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)を、タンパク質の構造の解析に SOSUI(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)を利用した。シークエンスデータの解析には Sequencher(HITACHI Software Engineering Co., Ltd., Tokyo, Japan)を使用した。

3. 結果

3.1 体細胞雑種における稔性の確認結果

シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘富士早生’の体細胞雑種の花器は雄ずいが雌ずい化しており、完全な雄性不稔であった(図 1)。一方、シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセッション’の体細胞雑種の花器は、雌ずいも雄ずいも存在するが花粉形成が著しく少なく、実質的に雄性不稔であった(図 1)。また、わずかに形成された花粉を採取し、アセトカルミン溶液で染色し観察したところ、萎縮したものや膨張したものなど不均一な大きさの明らかに異常な花粉が観察された。さらに、体細胞雑種を細胞質親として *Brassica oleracea* と戻し交雑を行って得られた後代についても花粉の形態観察を行ったところ、同様に異常な形態の花粉を観察することができた。その一方で可稔のコントロールとして用いたカイランとシロイヌナズナでは、球形で均一な花粉が観察できた(図 2)。

3.2 次世代シークエンサーによる解析結果

シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセッション’の体細胞雑種のミトコンドリア DNA の解析の結果、解析総塩基数は 14,231,305(b)であり、総リード数は 35,789 であった。このうち解析に使用されたリード数は 34,779 で、除去リード数は、1,010 であり、全体の約 97%が解析に使用されていた(図

3)。これらのリードの長さは 500(b)前後の長さのものが多かった(図 4)。このリードで構成されているコンティグの総数は、280 であり平均コンティグ長 3,334(b)、最大コンティグ長 24,279(b)、4kb 以上のコンティグ数は 34 だった。これらの解析結果は表 3 にまとめた。

3.3 シロイヌナズナと体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構成比較

シロイヌナズナ(ecotype:コロンビア)のミトコンドリア DNA と体細胞雑種のコンティグについて Sequencher を用いてアセンブルを行った。その結果、79 個のコンティグをアセンブルすることができた。これにより、体細胞雑種は全長約 367kb のシロイヌナズナのミトコンドリアゲノムの配列をとびとびに保持していることがわかった(図 5)。この全てのコンティグの長さを合わせるとシロイヌナズナのミトコンドリアゲノムの全長の 43%に相当した。

3.4 キャベツと体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構成比較

我々の研究室では、キャベツ品種‘富士早生’のミトコンドリアゲノムを決定した。その結果、キャベツのミトコンドリアゲノムの全長は約 220kb であることが明らかとなった。そこでキャベツのミトコンドリアゲノムと体細胞雑種のコンティグについて、シロイヌナズナと同様に Sequencher を用いてアセンブルを行った。その結果、96 個のコンティグとアセンブルすることができ、体細胞雑種はキャベツのミトコンドリアゲノムの配列を 100% 保持していることがわかった(図 5)。

3.5 体細胞雑種のミトコンドリアの主要遺伝子の構成

体細胞雑種が持つミトコンドリアの主要遺伝子の構成がどのようになっているのか調べた。前述のように、体細胞雑種はキャベツのミトコンドリアゲノムの全領域を保持していることから、キャベツ由来の主要遺伝子を全て保持していることがわかった。一方、シロイヌナズナ由来の主要遺伝子については、シロイヌナズナの遺伝子配列と体細胞雑種のコンティグをアセンブルすることによって調べた。その結果、体細胞雑種は exon 単位でみた時に *atp6,cox1,cox2* をはじめとするシロイヌナズナ由来の主要遺伝子の 33%を保持していた(表 4)。なお、この調査ではキャベツとシロイヌナズナの主要遺伝子の中で配列の相同性が 95%以上のものは区別することができない。

1.6 コンティグのつながり

次世代シーケンサーによる解析では、1本のコンティグが2つのコンティグへと切断されている場合がある。これは解析を進めるなかで、他のコンティグにおいても類似した配列が検出されたことからミスアセンブルを防ぐために意図的に切断されたものである。つまり、切断して2つに分けられたコンティグは実際にリンクしている可能性が高い。そのため、BLAST 検索によって植物と相同性がなかったコンティグなどを除いたのちに、この意図的に切断されているコンティグのつながりを図に書き起こした(図 6)。この図 6 は、ある1つのコンティグの5'末端と3'末端に続く候補として考えられるコンティグを順番に書き上げたものである。あるコンティグの続きの候補であるコンティグが離れた位置にすでに存在する場合は、アルファベットを使っ

てどの位置に続くかを示した。たとえば *contig186* の3'末端の続きの候補が *contig184* の5'末端である場合、*contig186* の3'末端の次にアルファベットの A と記し、*contig186* の3'末端の続きの候補である *contig184* の5'末端直前にもう一つの A を記した(図 6)。また、3.5 の調査により、主要遺伝子がどのコンティグの配列と相同性が高いのか分かっているのも、主要遺伝子の存在箇所も図に記した。さらに 3.7 の BLAST 検索結果を利用し、それぞれのコンティグがどちらの親の配列と相同性が高かったかを色分けにより分類した。

1.7 BLAST 検索結果

3.3 や 3.4 において、体細胞雑種のミトコンドリアでは、両親種のゲノムをどの程度保持しているのか、おおまかに調べた。しかし、同じアブラナ科に属している両親種同士では、非常によく似た配列を保持していることが考えられるため、さらに細かく調査する必要がある。そのため、すべてのコンティグについて、シロイヌナズナ由来のコンティグであるのか、キャベツ由来のコンティグであるのか、それとも両方に共通なコンティグであるのか分類することを目的に、両親種のミトコンドリア DNA の配列と体細胞雑種の解析リードを用いて two Blast を行った。その結果、コンティグ総数 280 個中、32 個のコンティグはシロイヌナズナ由来であり、48 個のコンティグはキャベツ由来で、23 個のコンティグが両方に共通なコンティグであった。その他には、コンティグの長さが短すぎるために判別不可能だったものが 13 個であった。残りのコンティグについては、植物のゲノムと相同性が低いものや、そのコンティグ自体の冗長度が明らかに低いものがあり、それらは解析か

ら除外した。この解析で、コンティグ内で組み換えを起こしている箇所が3か所見出された。1つは *contig26* である。このコンティグはシロイヌナズナ‘コロンビア’と94%の相同性を示していた(図7)。*contig26* はシロイヌナズナ‘コロンビア’とは違い、配列の途中で900bpの挿入が確認された。しかし、同じシロイヌナズナである‘ランズバーグ’とは100%の相同性を示した。2つ目は *contig32* である。このコンティグはシロイヌナズナ‘コロンビア’と100%の相同性を示した。しかし、このコンティグの上流部分と下流部分で‘コロンビア’と相同性が高い領域が異なった(図8)。つまり、コンティグの途中で組み換えを起こし‘コロンビア’の別々の離れた位置にある配列が繋がった状態になっていた。詳しく解析を行うと、組み換えを起こしていた周辺に反復配列が存在し、その反復配列を介して組み換えが起こったと予想できた。この組み換えを起こしている200bpの周辺領域をORFfinderによって解析したところ、recombinant pointの直前に313アミノ酸の *orf* を組むことができた。しかしこの *orf* はシロイヌナズナにもともと存在しているものと一致したため、新規の *orf* ではなかった。3つ目は *contig162* である。このコンティグもまた、シロイヌナズナ‘コロンビア’と100%の相同性を示した。*contig32* と同様に、コンティグの上流部分と下流部分で相同性が高い領域が異なった(図8)。詳しく解析を行った結果、こちらにも同様に組み換えが起こった箇所の周辺に反復配列が存在し、ここを起点に組み換えを起こしていた。この組み換えを起こしている280bpの周辺領域をORFfinderによって解析したところ、今までに確認されている最小の *orf* よりも極端に短い *orf* しか組むことはでき

なかった。加えて、周辺にはATP合成酵素遺伝子のような主要な遺伝子が確認できなかったため、新規 *orf* が主要遺伝子と共転写されているという可能性もなかった。

1.8 Southern 解析結果

主要遺伝子周辺に、新規 *orf* が出現し共転写されることで雄性不稔が引き起こされている可能性を考えてSouthern解析を行った。制限酵素 *HindIII*、*EcoRI*、*BamHI* の3種類それぞれで処理を行ったものに対して、17個の遺伝子プローブを用いて遺伝子座乗断片を検出した。その結果、バンドパターンを大きく3つのパターンに分けることができた。片親のキャベツと同じバンドパターンを示すキャベツ型と、シロイヌナズナとキャベツの両方のバンドを持つシロイヌナズナ+キャベツ型、両親種には見られない体細胞雑種特異的なバンドを持つ変異型、という3つのパターンである(図9)。今回サザン解析を行った17個の遺伝子の結果を、この3つのタイプに分類すると *rpl5.rps7.atp6* はシロイヌナズナ+キャベツ型、*rrn5.atp1.atp9.nad4.nad9.orf25(atp4).rps4* は変異型、それ以外はキャベツ型に分類された(表5)。変異型に分類された4つの遺伝子領域のうち *rrn5* は、制限酵素 *BamHI* で処理を行ったもので体細胞雑種特異的なバンドが観察された(図10)、*HindIII*、*EcoRI* で処理を行ったものではシロイヌナズナ+キャベツ型であった。また、*atp1* の *EcoRI* で処理を行ったものは特異的なバンドが複数観察され(図11)、他の酵素で処理したものでは、シロイヌナズナ+キャベツ型を示した。*atp9* の *BamHI* と *HindIII* で処理したものにおいても特異的なバンドが観察され、*EcoRI* ではシロイヌナズナ+キャベツ型であった(図12,13)。*nad4* の *BamHI* に

においては、解析に用いた体細胞雑種 2 個体のうち 1 個体について体細胞雑種特異的なバンドが観察された(図 14)。その他の酵素で処理したものは、キャベツ型のバンドパターンが観察できた。

3.9 後代における Southern 解析結果

シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセセッション’の体細胞雑種では、*Brassica oleracea* を花粉親として戻し交雑を行い、後代が得られている。この BC₁ 世代は、茎頂培養によって増やされた体細胞雑種に、カイランやコールラビを交雑したものであるが、個体単位での当代と BC₁ との詳細な親子関係は不明である。しかし、BC₂ 世代においては、個体単位で BC₁ との親子関係は明らかになっており、世代間の比較が可能である。そこで、BC₁、BC₂ 世代においても Southern 解析を行い、結果を比較することで、世代間でミトコンドリアゲノムに変化が起きているかどうか調査した。その結果、BC₁、BC₂ 世代間では、大部分の個体において細胞質親である体細胞雑種の個体と同じ Southern 解析のバンドパターンが検出された。しかし、一部の個体ではバンドパターンに変化が見られ、細胞内に何種類か存在するミトコンドリアでのコピー数に変化が生じたと考えられた(図 15)。

4. 考察

「はじめに」においても述べたように、我々の研究室で得られている体細胞雑種 2 系統は、異なる雄性不稔を示している。シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘富士早生’の体細胞雑種は花器自体が奇形化するという雄性不稔のタイプである。一方、シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセ

セッション’の体細胞雑種は、花粉はわずかに形成するものの、著しく少量で実質的に雄性不稔である。このシロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセセッション’の体細胞雑種における花粉の形態観察を行ったところ、委縮した花粉や膨張した花粉といった大きさが不均一な花粉を観察することができた。通常の花粉稔性がある個体であれば丸く均一な花粉が観察できることから、異常な形態をしめす体細胞雑種の花粉には稔性がないといえる。シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセセッション’の体細胞雑種を種子親、*Brassica oleracea* を花粉親とした戻し交雑によって得られた後代でも、花粉がわずかに形成されるが、その形態は大きさが不均一で異常なものであった。このことから、体細胞雑種の雄性不稔の形質は後代に安定的に遺伝しているといえる。これらの体細胞雑種では、過去に PCR によって解析が行われ、ミトコンドリアゲノムが雑種化していることが報告されている(Yamagishi and Nakagawa,2004;Yamagishi and Kinoshita,2008)。本研究では、後代を得ることができているシロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセセッション’の体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの構造解析を行い、雑種型ゲノム成立の原因をさぐるとともに、雄性不稔性との関係を調べようとした。ミトコンドリアゲノムを起因とする雄性不稔は、過去に様々な植物種において報告されている(Maureen and Stephane,2004;Kubo et al,2011)。これらは、ある特定の open reading frame(ORF)が原因というものばかりではないが、大部分が共通の特徴を示している。すなわち 1. 既存の遺伝子の配列が組み換えなどによって変化する、2. 主要遺伝子の前後に

新規 *orf* が出現し共転写される、3. 大部分の *orf* は ATP 合成酵素遺伝子近傍にみられ、膜貫通ドメインを有している。また、確認されている最小の *orf* はイネの *orf79* である。以上の特徴を踏まえて、体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの解析を進めることにした。

次世代シーケンサーの解析によって得られたコンティグは 280 個であった。このコンティグと両親種のゲノムを、Sequencher を使用して解析したところ、体細胞雑種では、キャベツのゲノム 100% を保持している一方、シロイヌナズナのゲノムは 43% しか保持していないことがわかった。また、主要遺伝子について、体細胞雑種ではどちらもタイプが保持されているか調査したところ、シロイヌナズナの遺伝子は一部しか保持しておらず、全体の 33% であった。図 5 からわかるように、シロイヌナズナのゲノムをとびとびに、全体の半分も保持していないので、体細胞雑種のミトコンドリアは両親種のミトコンドリアが個々に存在しているのではなく、キメラ化している可能性が高いと考えた。ここで体細胞雑種の全体像を把握するために、コンティグのつながりを図に書き起こした(図 6)。この図から、キャベツのゲノムと一致する道筋がわかり、それ以外の部分がシロイヌナズナのゲノムであり、どの部分でキメラ化しているのか、ある程度の予測が可能となった。ここで、先ほど述べた雄性不稔の特徴のように、組み換えによって既存の遺伝子の配列が変化した可能性を考えて、個々のコンティグ内で、両親種と明らかに異なる配列が存在しないか two BLAST で調査した。その結果、コンティグ内で、キャベツとシロイヌナズナの配列がキメラになっているものは存在しなかったものの、シロイヌナズナの配列内で組み換えを

起こしているものがあつた。この組み換え箇所において新規 *orf* が存在するか調べたところ、contig32 では既知の *orf* しか存在しておらず、contig162 では新規 *orf* 候補が存在したものの、今まで確認されている最小の *orf* より短く、周辺に ATP 合成酵素遺伝子のような主要遺伝子が存在しなかったために、新規 *orf* が主要遺伝子と共転写されている可能性も打ち消された。そのため、これらの組み換え箇所では、雄性不稔の原因になりうる *orf* を見出すことはできなかった。

さらに、今度は主要遺伝子周辺に、新規 *orf* が出現し、主要遺伝子と共転写されることで雄性不稔を引き起こしている可能性を考えて Southern 解析を行った。制限酵素 *HindIII*、*EcoRI*、*BamHI* の 3 種類それぞれで処理を行ったものに対して、15 個の遺伝子プローブを用いて検出したところ、体細胞雑種特異的なバンドが検出されたのは、*rrn5.atp1*、*atp9.nad4.nad9.orf25(atp4)rps4* であつた(表 5)。これは、その主要遺伝子近傍で配列が変化していることを示しており、新規 *orf* が存在する可能性が高い。しかし、同じく雄性不稔を示している後代では、この体細胞雑種特異的なバンドが検出されていない個体も存在する。このことから、今回検出された体細胞雑種特異的な配列は雄性不稔の原因ではないと考えられる。しかしながら、この体細胞雑種特異的な配列は細胞融合の過程で生じたものであると考えられ、ミトコンドリアゲノムの構造の変化を知る上で非常に興味深い。この体細胞雑種特異的なバンドが検出された *rrn5.atp1.atp9.nad4.orf25(atp4)rps4* のうち、*atp9* と *atp1* は同じアブラナ科である *Brassica napus* において、特に組み換えを起こしやすい breakpoint であるとされている(Leino et

al,2003)。そして、その breakpoint の1つである *atp9* については、過去に細胞融合によって得られた体細胞雑種において、組み換えを起こしていた領域としていくつかの研究報告がなされている(Temple et al,1992; Yamagishi et al,2002;Leino et al, 2003)。そのため、この *atp9* について、さらなる解析を行うことにした。

Southern 解析で検出されたバンドのサイズと次世代シーケンサーで得られたデータの制限酵素サイトを比較することで、体細胞雑種ではどのような変化がもたらされたのか調査した。*Bam*HI で処理を行ったものをみると、キャベツでは1本、シロイヌナズナでは2本、体細胞雑種では3本のバンドが観察できる(図13)。シロイヌナズナには、*atp9* と同一性が高い *orf315* が存在し、*atp9* のプローブを用いて Southern 解析を行うと *orf315* が共に検出される。今回の解析結果において、*atp9* を検出したバンドを赤色で示した(図16)。それ以外の部分が *orf315* である。詳しく解析すると、体細胞雑種で検出されたバンドの中にも *orf315* のバンドが検出されていることがわかった。しかし、片親であるシロイヌナズナで検出された *orf315* とはバンドサイズが異なった。これは、*orf315* 周辺で塩基配列に変化が起きていることを示している。この *orf315* の配列を含んでいるコンティグを調査すると、前述したシロイヌナズナのゲノム内で組み換えを起こしていた *contig162* であることがわかった。また、体細胞雑種で検出された *atp9* のバンドをみると、2本のバンドのうち、1本は片親のキャベツと同じサイズであるが、もう1本はキャベツともシロイヌナズナとも異なるサイズを示している。これは *atp9* 周辺の配列においても何らかの変化が起きていることを示唆している。この *atp9* の配列を含んでいるコン

ティグは *contig262* であり、道筋として *contig25-contig262* と *contig187-contig262* の2通り考えることができた(図6)。その箇所の *Bam*HI の制限酵素サイトについて調べると、ちょうど2つのコンティグをまたいで制限酵素サイトが存在していることが分かった。その断片のサイズは *contig25-contig262* では 9,710bp であり、*contig187-contig262* では 6,593bp であった(図16)。これを Southern 解析の結果と比較すると、図16において赤色で示したバンドの a は *contig25-contig262* のサイズと一致し、b は *contig187-contig262* と一致した。b は片親のキャベツのバンドサイズと一致していることから、キャベツ由来の配列であると考えられる。しかし、a のバンドについては、両親種のどちらもサイズが異なるため、体細胞雑種特異的な配列である。この *contig25-contig262* については、それぞれ、*contig25* はシロイヌナズナと同一性が高く、*contig262* はキャベツと同一性が高いことがわかっている。そこで *contig25* と *contig262* の配列をつないだものと両親種のゲノムで two BLAST を行ったところ、シロイヌナズナとキャベツの両方に同一性の高い領域が見出された(図17)。この領域の長さは 522bp であり、この部分を介して、キャベツとシロイヌナズナのキメラ化した配列ができあがったと考えられる。このことにより、体細胞雑種のミトコンドリアゲノムでは、シロイヌナズナとキャベツのゲノムがキメラ化した状態で保持されていることがわかった。

これまでの調査から体細胞雑種のミトコンドリアがキメラになっていることがわかったので、そのキャベツとシロイヌナズナがキメラになっている箇所を調査することにした。3.2 と 3.3 の解析結果から、体細胞雑種のミト

コンドリアゲノムはキャベツのミトコンドリアゲノムにシロイヌナズナのミトコンドリアゲノムの一部が組み込まれているかたちで存在すると考えられる。そのため、3.6 で作成したコンティグのつながりを書いた図 6 をもとに、キャベツのマスターサークルだけを書き出し、その後シロイヌナズナのミトコンドリアの配列であると考えられるコンティグを書き加えて図を作成した(図 18)。図 18 では、図 6 で書かれたすべての経路が使用されたわけではない。しかし、シロイヌナズナとキャベツがキメラ化していると考えられる箇所を、図中の青い円でかこった 10 箇所で見出すことができた(図 18)。これにより、体細胞雑種のミトコンドリアでは少なくとも 10 箇所の組み換えが起こっていることが明らかとなった。

5. おわりに

本研究では、シロイヌナズナ‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセション’の体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの構造解析を行い、雑種型ゲノム成立の原因をさぐるとともに、雄性不稔性との関係を調べた。次世代シーケンサーの解析結果から体細胞雑種では、キャベツのミトコンドリアを 100% 保持している一方で、シロイヌナズナのミトコンドリアゲノムの全領域の 43% しか保持しておらず、ゲノムがキメラ化していることが示唆された。その後、コンティグごとに両親種のゲノムと two BLAST を行ったところ、シロイヌナズナのゲノムで配列に変化が起きている部分を 3 箇所見出せた。しかし、過去に様々な植物において確認されている雄性不稔に関与する *orf* の特徴と類似するものはなかった。また、主要遺伝子周辺に、新規 *orf* が出

現し、主要遺伝子と共転写されることで雄性不稔を引き起こしている可能性を考えて行った Southern 解析では、*rrn5, atp1, atp9, nad4, nad9, orf25(atp4), rps4* において変異型を検出することができたものの、雄性不稔の原因となりうるものは見られなかった。その一方で、この *atp9* 遺伝子周辺で、キャベツとシロイヌナズナのゲノムがキメラ状になっていることがわかった。このことは、融合処理によってキメラ状のゲノムが形成されたことの証明であり、非常に興味深い結果といえる。今後は、まだ解析されていない主要遺伝子周辺の Southern 解析を行い、体細胞雑種特異的なバンドが雄性不稔を示す後代すべてで観察できる箇所を見出したい。また、主要遺伝子周辺で雄性不稔の原因を見出せなかった場合には、シロイヌナズナのゲノムとキャベツのゲノムの相互作用についても考える必要がある。そのような新規 *orf* によらない雄性不稔の可能性も考慮に入れて、いまだ解明されていない雄性不稔の原因について、さらに追究していきたい。

6. 謝辞

本研究のみならず、多くの面でご指導頂いた京都産業大学総合生命科学部 山岸 博教授、寺地 徹教授に心からの感謝の意を表す。そして解析にあたり、キャベツのミトコンドリアゲノムの情報を提供してくださった京都産業大学総合生命科学部 田中 義行博士、実験を進めるにあたり協力してくださった京都産業大学総合生命科学部 西村 香里さんに感謝の意を表す。

7. 引用文献

1. Bonen, L. & M. W. Gray. 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 Research* **8**,319-335 (1980).
2. Dewey, R.E., Siedow, J.N., Timothy, D.H. & Levings, C.S., 3rd. A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin. *Science* **239**, 293-5 (1988).
3. Handa, H. 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 Research* **31**, 5907-5916 (2003).
4. Hanson, M.R. & Bentolila, S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell* **16 Suppl**, S154-69 (2004).
5. Kubo, T., Kitazaki, K., Matsunaga, M., Kagami, H. & Mikami, T. Male sterility-inducing mitochondrial genomes: How do they differ? *Critical Reviews in Plant Sciences* **30**, 378-400 (2011).
6. Leino, M., Landgren, M. & Glimelius, K. Alloplasmic effects on mitochondrial transcriptional activity and RNA turnover result in accumulated transcripts of *Arabidopsis* orfs in cytoplasmic male-sterile *Brassica napus*. *Plant Journal* **42**, 469-480 (2005).
7. Leino, M., Teixeira, R., Landgren, M. & Glimelius, K. *Brassica napus* lines with rearranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 1156-1163 (2003).
8. Logan, D.C. *PLANT MITOCHONDRIA Annual Plant Reviews*, (2007).
9. Rhoads, D.M., Levings, C.S., 3rd & Siedow, J.N. URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **27**, 437-45 (1995).
10. Sakamoto, W., Kondo, H., Murata, M. & Motoyoshi, F. Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of *Arabidopsis* induced by chloroplast mutator. *Plant Cell* **8**, 1377-90 (1996).
11. Shedge, V., Arrieta-Montiel, M., Christensen, A.C. & Mackenzie, S.A. Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs. *Plant Cell* **19**, 1251-64 (2007).
12. Shinada, T., Kikuchi, Y., Fujimoto, R. & Kishitani, S. An alloplasmic male-sterile line of *Brassica oleracea* harboring the mitochondria from *Diplotaxis muralis* expresses a novel chimeric open reading frame, orf72. *Plant Cell Physiol* **47**, 549-53 (2006).
13. Teixeira, R.T., Farbos, I. & Glimelius, K. Expression levels of meristem identity and homeotic genes are modified by nuclear-mitochondrial interactions in alloplasmic male-sterile lines of *Brassica napus*. *Plant Journal* **42**, 731-742 (2005).

14. Temple, M., Makaroff, C.A., Mutschler, M.A. & Earle, E.D. Novel mitochondrial genomes in *Brassica napus* somatic hybrids. *Current Genetics* **22**, 243-249 (1992).
15. Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. & Brennicke, A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet* **15**, 57-61 (1997).
16. Wang, Q. *et al.* Chloroplast and mitochondrial SSR help to distinguish allo-cytoplasmic male sterile types in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Molecular Breeding*, 1-8 (2011).
17. Yamagishi, H., Landgren, M., Forsberg, J. & Glimelius, K. Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor Appl Genet* **104**, 959-964 (2002).
18. Yamagishi, H. & Nakagawa, S. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **73**, 319-323 (2004).
19. Yamagishi, H., Nakagawa, S., Kinoshita, D., Ishibashi, A. & Yamashita, Y. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea* L.) with all chromosomes derived from *A. thaliana* and low levels of fertile seed. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **77**, 277-282 (2008).
20. Zhang, K. *et al.* Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat Biotechnol* **24**, 680-6 (2006).
21. 児島慶子. シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種における雄性不稔原因遺伝子の解析及び新しい雑種作成の試み. (2011)



A+F



A+S

図.1 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種の花器形態

A+F: 'コロンビア' と '富士早生' の体細胞雑種
 A+S: 'コロンビア' と '中生サクセション' の体細胞雑種



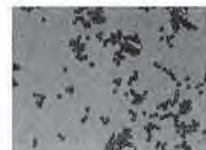
A+S



シロイヌナズナ



(A+S)×カイルン×カイルン



カイルン

図.2 体細胞雑種の花粉形態

A+S: コロンビアと中生サクセションの体細胞雑種の花粉
 (A+S)×カイルン×カイルン: コロンビアと中生サクセションの体細胞雑種の後代(BC₂)の花粉

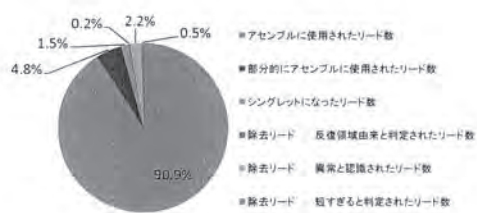


図.3 解析リードの内訳詳細

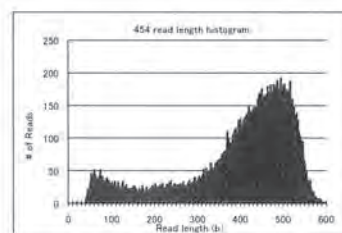


図.4 リード長のヒストグラム

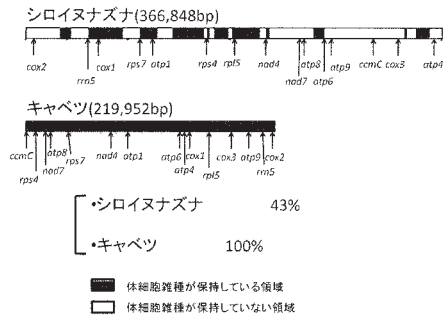


図5 体細胞雑種が保持している両親種ゲノムの領域

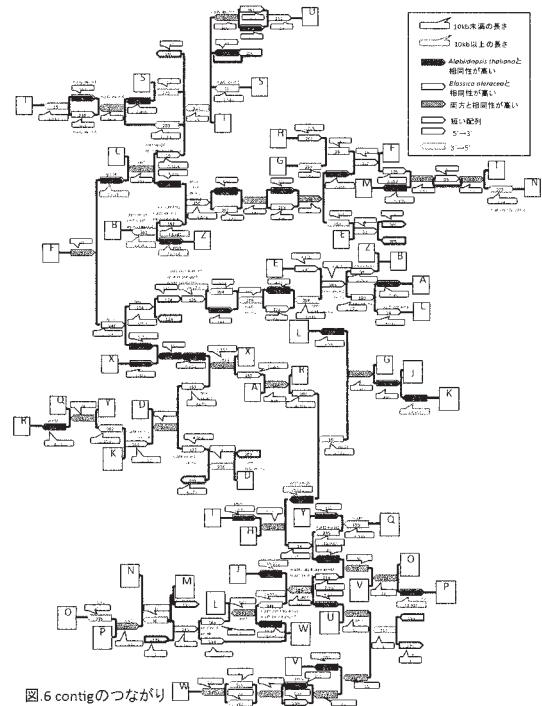


図6 contigのつながり

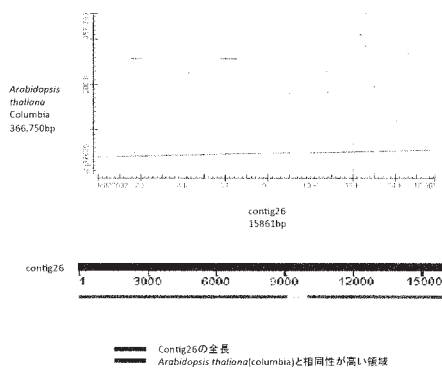


図7 contig26とArabidopsis thaliana(col)の相同性



図8 シロイヌナズナのゲノムにおける組み換えcontigの位置

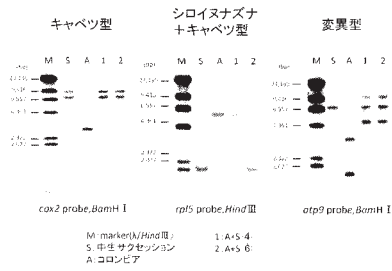
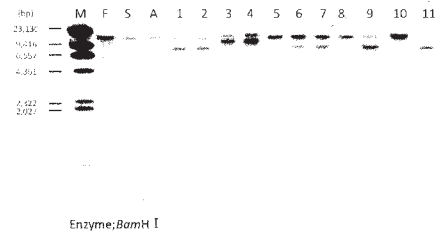
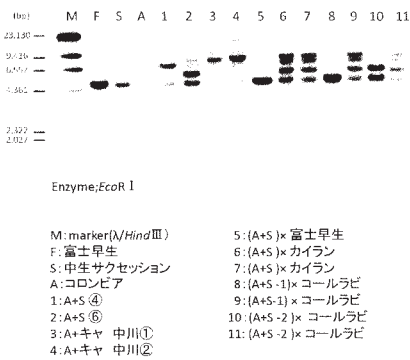


図9 Southern解析結果における体細胞雑種のミトコンドリア遺伝子の3つのタイプ



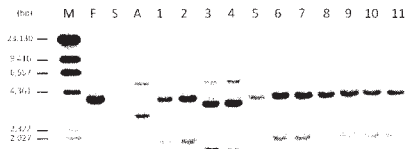
M: marker(λ /Hind III) 5: (A+S) × 富士早生
F: 富士早生 6: (A+S) × カイラン
S: 中生サクセション 7: (A+S) × カイラン
A: コロンビア 8: (A+S-1) × コールラビ
1: A+S ④ 9: (A+S-1) × コールラビ
2: A+S ⑥ 10: (A+S-2) × コールラビ
3: A+キヤ 中川① 11: (A+S-2) × コールラビ
4: A+キヤ 中川②

図10 *rrm5*をプローブに用いたSouthern解析結果



M: marker(λ /Hind III) 5: (A+S) × 富士早生
F: 富士早生 6: (A+S) × カイラン
S: 中生サクセション 7: (A+S) × カイラン
A: コロンビア 8: (A+S-1) × コールラビ
1: A+S ④ 9: (A+S-1) × コールラビ
2: A+S ⑥ 10: (A+S-2) × コールラビ
3: A+キヤ 中川① 11: (A+S-2) × コールラビ
4: A+キヤ 中川②

図11 *atp1*をプローブに用いたSouthern解析結果



M: marker(λ /Hind III) 5: (A+S) × 富士早生
F: 富士早生 6: (A+S) × カイラン
S: 中生サクセション 7: (A+S) × カイラン
A: コロンビア 8: (A+S-1) × コールラビ
1: A+S ④ 9: (A+S-1) × コールラビ
2: A+S ⑥ 10: (A+S-2) × コールラビ
3: A+キヤ 中川① 11: (A+S-2) × コールラビ
4: A+キヤ 中川②

図12 *atp9*をプローブに用いたSouthern解析結果

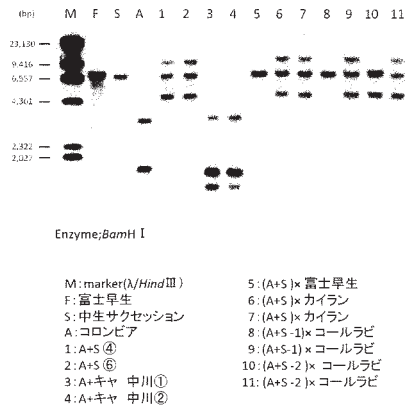


図.13 *atp9*をプローブに用いたSouthern解析結果

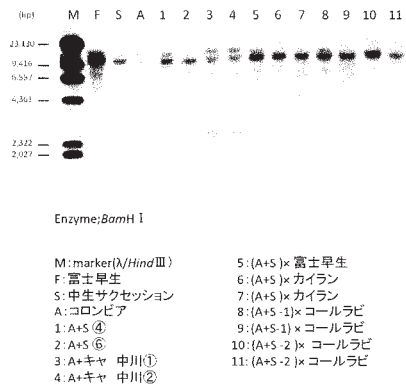


図.14 *nad4*をプローブに用いたSouthern解析結果

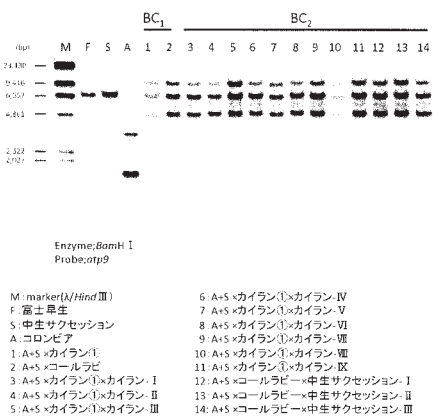


図.15 Southern解析によるBC₁とBC₂のゲノムの比較

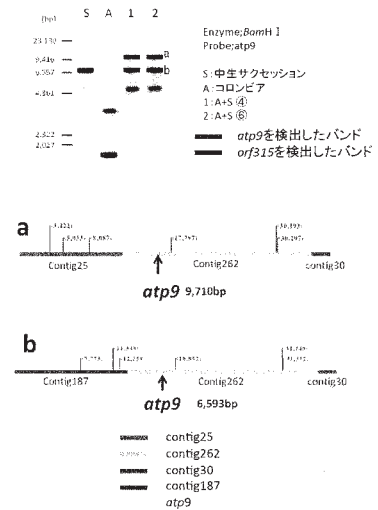


図.16 *atp9*についてのシークエンスデータとSouthern解析の比較

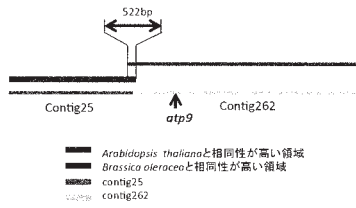


図.17 *atp9*周辺の体細胞雑種特異的な配列

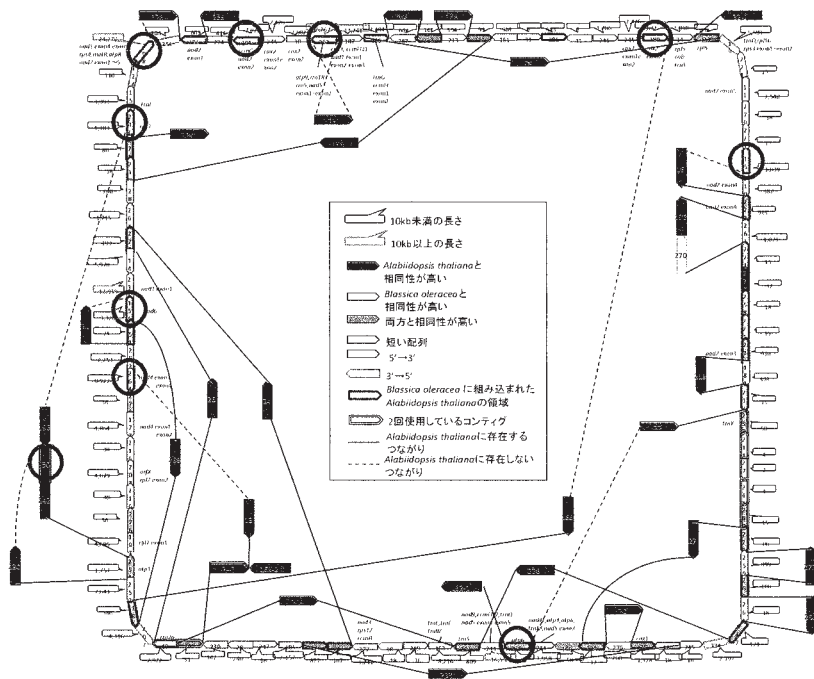


図.18 キャベツのサークルに組み込まれたシロイヌナズナの領域

表1. 解析に用いたサンプルとその花粉粘性

植物材料	花粉粘性
シロイヌナズナ'コロンビア'	有
キャベツ品種'中生サクセション'	有
キャベツ品種'富士早生'	有
カイラン	有
コールラビ	有
シロイヌナズナ'コロンビア'+キャベツ品種'中生サクセション'(体細胞雑種)	無
シロイヌナズナ'コロンビア'+キャベツ品種'富士早生'(体細胞雑種)	無
シロイヌナズナ'コロンビア'+キャベツ品種'中生サクセション'×カイラン(BC ₂ 世代)	無
シロイヌナズナ'コロンビア'+キャベツ品種'中生サクセション'×コールラビ(BC ₂ 世代)	無
シロイヌナズナ'コロンビア'+キャベツ品種'中生サクセション'×カイラン×カイラン(BC ₂ 世代)	無

表3. 次世代シーケンサーによる解析結果

項目	解析結果
解析総リード数	35,789
解析総塩基数(b)	14,231,305
アセンブルに使用されたリード数	32,531
部分的にアセンブルに使用されたリード数	1,728
シングルレットになったリード数	520
除去リード	1,010
コンティグ数	280
コンティグ(>=500b)数	138
最大コンティグ長(b)	24,279
4 kb 以上のコンティグ数	34

表2. Southern解析のprobe作成に用いたprimer

gene	forward	reverse
<i>cox1</i>	TTCATCTGGTGTGCCAC	CGAAGAACC AAAAGAGATGC
<i>cox2</i>	CAATTAAGGATCTCAAGACGC	TGTCAAAAGTAGTAGTCTGC
<i>cox3</i>	ATACCATGTCGTATGGTRGG	AAACCATGAAAGCCTGTTCG
<i>atp1</i>	CTTGAGAAATGAGAATGTCGG	TTAATGTCCEACAGTCGAG
<i>atp2/3 (atp4)</i>	TGAGTATTACGAATATGGATGG	ATGCGACCGGAAAGAAATGG
<i>atp6</i>	TACTAAAAGGGAGGAGGAAAC	CTATAAATAAAGGACCAAGAGC
<i>atp8</i>	ATGGAGATGGAGTACTTGGG	AATTCATCAAGTAGTCCAC
<i>atp9</i>	CAACCCGAGATGTTAAGAAGG	TGGCTTATGAGACTGAAATGG
<i>mat4</i>	GAGCAAAGAAAGATCAAGGC	AGCAATGATCTCTTAGATCG
<i>mat7</i>	ACTCATGCTATGGATGTGGG	AACATCACACCCTGAATCCC
<i>mat9</i>	GTTCGGGAGACTTACCCAAAG	AATTATCGTCTGCTACGCTG
<i>rps3</i>	TCGAAATTCGTTCAATACGGAATTC	AAGGATCCATTTATTTCTCACCCG
<i>rps4</i>	CGGAATTCAGGGACGCAATGTGGC	ACCATTCCTTATTCACACAAAC
<i>rps7</i>	ATGAATTCGAAATTTACAGTATATGG	CTTCTAGATGGTCTCACTTATCC
<i>rps5</i>	TCATACGAAATGATATCAGC	AGTCTCATCTGTGTGTGTGG
<i>ccm1'</i>	TCAAAAGACAGAGCTACCG	CAAGATACGGGTGGAAGAAG
<i>atpN</i>	CGTTCGGATATTGATCGG	ACCCGATGGAATGAACG

表4. 体細胞雑種における主要遺伝子の構成

gene	cabbage	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>atp1</i>	-	-
<i>atp4</i>	-	-
<i>atp6</i>	-	-(<i>atp6-1</i>)
<i>atp8</i>	-	-
<i>atp9</i>	-	-
<i>cox1</i>	-	-
<i>cox2</i>	-	-(2)
<i>cox3</i>	-	-
<i>mat1</i>	-	-(1,2)
<i>mat2</i>	-	-(1,2,3)
<i>mat3</i>	-	-
<i>mat4</i>	-	-(1)
<i>mat5</i>	-	-(1,2,5)
<i>mat6</i>	-	-
<i>mat7</i>	-	-
<i>mat9</i>	-	-(3,4,5)
<i>mat11</i>	-	-
<i>rpl2</i>	-	-
<i>rpl5</i>	-	1
<i>rpl16</i>	-	-
<i>rps3</i>	-	1
<i>rps4</i>	-	-
<i>rps7</i>	-	-
<i>rps12</i>	-	-
<i>rps14</i>	-	-
<i>rps18</i>	-	+
<i>rps26</i>	-	1
<i>rps5</i>	-	-
<i>ccmB</i>	-	-
<i>ccm1'</i>	-	-
<i>ccm1X'</i>	-	-
<i>ccm1-N1</i>	-	-
<i>ccm1-N2</i>	-	-
<i>cob</i>	-	-
<i>matR</i>	-	-
<i>atpN</i>	-	-

+ 体細胞雑種に存在する
 - 体細胞雑種に存在しない
 x もともと存在しない
 {} 存在したexon番号

表5 Southern解析結果による体細胞雑種ミトコンドリアの
バンドパターンの分類

キャベツ型	シロイヌナズナ+キャベツ型	変異型
<i>atp8</i>	<i>rpl5</i>	<i>rrn5</i>
<i>cox1</i>	<i>rps7</i>	<i>atp1</i>
<i>cox2</i>	<i>atp6</i>	<i>atp9</i>
<i>nad7</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4</i>
<i>orfX</i>		<i>nad9</i>
<i>ccmC</i>		<i>orf25(atp4)</i>
		<i>rps4</i>

9. コムギ近縁野生種、アブラナ科及びナス科作物のミトコンドリアゲノムの解析

概要

葉緑体の場合とは異なり、高等植物ではミトコンドリアの遺伝子組換えは成功していない。したがって、雄性不稔性を示すなど、作物の育種に役立つミトコンドリアゲノムを得るためには、1) 当該作物の近縁野生種に存在する遺伝的変異を調べ、既知のものとは異なるミトコンドリアゲノムを持つ細胞質を連続戻し交雑などで作物に導入する、2) 上記8の例のように、細胞融合でサイブリッド個体を得て、ミトコンドリアゲノムのキメラ化を生じさせる、3) 上記7に記した *msh1* など SSS 関連遺伝子の働きを人為的に抑えて、ミトコンドリアゲノムを構成する DNA 分子の再編を促すなど、間接的な方法をとらざるを得ない。いずれの場合も、研究対象とする植物のミトコンドリアゲノム構造の情報は極めて有用である。このことを鑑み、本研究プロジェクトでは、NGS を用いて、コムギの近縁種である、*Aegilops mutica* (2系統), *Ae. caudata*, *Ae. speltoides*, *Triticum timopheevi* のミトコンドリアゲノムの解読を行っている。また、アブラナ科のキャベツ、クロガラシ及び上記6とは異なるダイコン2品種、ナス科近縁野生種2種のミトコンドリアゲノムの解読を終えた。

Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*

Yujiro Honma · Yu Yoshida · Toru Terachi ·
Kinuya Toriyama · Tetsuo Mikami · Tomohiko Kubo

Received: 8 March 2011 / Revised: 27 April 2011 / Accepted: 1 May 2011 / Published online: 12 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Polymorphic analyses of angiosperm mitochondrial DNA are rare in comparison with chloroplast DNA, because few target sequences in angiosperm mitochondrial DNA are known. Minisatellites, a tandem array of repeated sequences with a repeat unit of 10 to ~100 bp, are popular target sequences of animal mitochondria, but *Beta vulgaris* is the only known angiosperm species for which such an analysis has been conducted. From this lack of information, it was uncertain as to whether polymorphic minisatellites existed in other angiosperm species. Ten plant mitochondrial DNAs were found to contain minisatellite-like repeated sequences, most of which were located in intergenic regions but a few occurred in gene coding and intronic regions. *Oryza* and *Brassica* accessions were selected as models for the investigation of minisatellite polymorphism because substantial systematic information

existed. PCR analysis of 42 *Oryza* accessions revealed length polymorphisms in four of the five minisatellites. The mitochondrial haplotypes of the 16 *Oryza* accessions with chromosomal complement (genome) types of CC, BBCC and CCDD were identical but were clearly distinguished from BB-genome accessions, a result consistent with the notion that the cytoplasmic donor parent of the amphidiploid species might be the CC-genome species. Twenty-nine accessions of six major cultivated species of *Brassica* were classified into five mitochondrial haplotypes based on two polymorphic minisatellites out of six loci. The haplotypes of *Brassica juncea* and *Brassica carinata* accessions were identical to *Brassica rapa* and *Brassica nigra* accessions, respectively. The haplotypes of *Brassica napus* accessions were heterogeneous and unique, results that were consistent with previous studies.

Communicated by R. Bock.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00294-011-0345-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Y. Honma · Y. Yoshida · T. Mikami · T. Kubo (✉)
Laboratory of Genetic Engineering, Research Faculty
of Agriculture, Hokkaido University,
N-9, W-9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan
e-mail: gelab@abs.agr.hokudai.ac.jp

T. Terachi
Department of Bioresource and Environmental Sciences,
Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University,
Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan

K. Toriyama
Laboratory of Environmental Plant Biotechnology,
Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,
1-1 Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku,
Sendai 981-8555, Japan

Keywords Plant mitochondria · Mitochondrial genome ·
Variable number of tandem repeat loci ·
Mitochondrial evolution · Rice · Rapeseed

Introduction

Minisatellites are a class of tandemly repeated sequences whose repeat unit ranges from 10 to ~100 bp, whereas microsatellites, or simple sequence repeats, are defined as tandem repeats with a repeat unit of less than 10 bp (usually 1–5 bp) (Richard and Paques 2000). Since the first report by Jeffreys et al. (1985), it has been widely recognized that minisatellites could be used as genetic markers if the number of repeat units varies among alleles.

Minisatellites occur not only in nuclear DNA but also in the organellar DNA found in chloroplasts and mitochondria (Bastien et al. 2003; Powell et al. 1995; Rand 1993). In a

number of animal mitochondrial DNAs, minisatellites have been found in the D-loop region, an area that is noncoding but that contains promoters and a replication origin and is used extensively for polymorphic analyses (reviewed in Lunt et al. 1998); however, fewer such analyses have been conducted on angiosperm chloroplast or mitochondrial DNAs when compared with the number of studies on animal mitochondrial DNA. Examples of chloroplast minisatellites include those found in the intergenic region between *trnM*-CAU and *rbcL* of *Sorbus* (Rosaceae) (King and Ferris 2002), in the polymorphic region of alfalfa (Skinner 2000), and in the intronic region of *trnL*-UAA of orchids (Cafasso et al. 2001).

To the best of our knowledge, polymorphic minisatellites in angiosperm mitochondria have been described only in *Beta vulgaris*, a species that includes sugar beet (Nishizawa et al. 2000). The four minisatellites in beet mitochondria, three of which occur in intergenic regions and one in the N-terminal extension of *ccmC* (Kitazaki et al. 2009), have become useful markers for genetic diagnosis in sugar beet breeding, evaluation of genetic resources and ecological study (Nishizawa et al. 2007; Fievet et al. 2007; Fenart et al. 2008; Cheng et al. 2009), because the number of mitochondrial haplotypes based on minisatellite polymorphism exceeds 20 (Cheng et al. 2011), which makes fine analysis possible. It is advantageous that the differences in electrophoretic mobility of PCR products targeting beet minisatellites are easy to distinguish on a gel because the size of minisatellite repeat units range from 30 to 66 bp (Nishizawa et al. 2000), and the difference of one repeat unit can be detected by a simple electrophoresis apparatus. Minisatellite-like repeated sequences have also been found in *Arabidopsis* and wheat mitochondrial DNAs (Nishizawa et al. 2000), but it was not determined whether they were polymorphic.

Mitochondrial polymorphism has been used less often in studies on the systematics or ecology of angiosperms than chloroplast DNA polymorphism (e.g. CBOL Plant Working Group 2009) partly because angiosperm mitochondrial DNAs are so large (200–2,400 kbp) and divergent (Kubo and Newton 2008) that it was difficult to choose a region to be analyzed. Additionally, nucleotide sequences of mitochondrial DNA, which could serve as a reference for polymorphic analyses, were not available for many plants until recently. However, the number of angiosperm genomic sequences that are accessible is increasing (Kitazaki and Kubo 2010), and there is no doubt that the number will be more abundant in the future. The addition of another source of markers from angiosperm mitochondrial minisatellites would be invaluable for both fundamental and applied aspects of plant genetics.

In this study, we addressed the question as to whether mitochondrial minisatellites in angiosperms other than *Beta vulgaris* contain informative polymorphism. At first,

we found novel minisatellites from ten mitochondrial DNAs, representing ten genera. To assess the polymorphism of these minisatellites, *Oryza* and *Brassica* plants were selected as models because intensive studies have been conducted to establish systematic relationships between the species. Our results show that some of the mitochondrial minisatellites in *Oryza* and *Brassica* are polymorphic in terms of the number of repeat units, and mitochondrial haplotypes based on the minisatellites were fairly consistent with previous classifications based on other parameters.

Materials and methods

Genomic sequence analysis

The nucleotide sequences of angiosperm mitochondrial DNAs were obtained from the NCBI web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=33090&opt=organelle>). Minisatellites were found by using Tandem Repeats Finder (Benson 1999), a program available on the internet (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), using the following parameters: alignment parameters (2, 5, 7); minimum alignment score to report repeat, 30; maximum period size, 500. Results consisting of repeat units less than 20 bp were discarded. Nucleotide sequences were analyzed by using Sequencher (Hitachi Software Engineering Co., Ltd., Tokyo, Japan) or Genetyx (Genetyx Corporation, Tokyo, Japan). A BLAST search was done at the NCBI web site (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with default parameters.

Plant materials

Plant materials used in this study are listed in Tables 1 and 2. The wild rice accessions were distributed from the National Institute of Genetics supported by the National Bioresource Project, MEXT, Japan (<http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/wild/coreCollection.jsp>). The *Brassica* accessions used in this study were gifts from Professor Dr. Takeshi Nishio, Tohoku University, Japan.

DNA isolation

Total cellular DNA was isolated from fresh green leaves according to the standard CTAB-based method as described by Doyle and Doyle (1990).

Polymerase chain reaction and nucleotide sequencing

Oligonucleotides for polymerase chain reaction (PCR) primers are listed in Table 3. PCR was conducted in a

Table 1 *Oryza* accessions used in this study

Species ^a	Genome type	Accession name	Number of repeat units			
			<i>OsTR1</i>	<i>OsTR2</i>	<i>OsTR4</i>	<i>OsTR5</i>
<i>O. barthii</i>	AA	W0652	2	3	2	2
		W1588	2	3	2	2
<i>O. glumaepatula</i>	AA	W1169	2	3	2	2
		W2145	2	3	2	2
		W2199	2	3	2	2
<i>O. longistaminata</i>	AA	W1413	2	3	2	2
		W1508	2	3	2	2
<i>O. meridionalis</i>	AA	W1625	2	3	2	2
		W1635	2	3	2	2
<i>O. rufipogon</i>	AA	W0106	2	3	2	2
		W0120	2	3	2	2
		W1294	2	3	2	2
		W1866	2	3	2	2
		W1921	2	3	2	2
<i>O. punctata</i> (2X)	BB	W2003	2	3	2	2
		W1514	2	– ^b	2	2
<i>O. minuta</i>	BBCC	W1213	1	–	2	1
		W1331	1	–	2	1
<i>O. punctata</i> (4X)	BBCC	W1024	1	–	2	1
<i>O. eichingeri</i>	CC	W1527	1	–	2	1
<i>O. eichingeri</i> or <i>O. rhizomatis</i>	CC	W1805	1	–	2	1
<i>O. officinalis</i>	CC	W0002	1	–	2	1
		W1361	1	–	2	1
		W1830	1	–	2	1
<i>O. alta</i>	CCDD	W0017	1	–	2	1
<i>O. alta</i> or <i>O. latifolia</i>	CCDD	W1182	1	–	2	1
<i>O. grandiglumis</i>	CCDD	W0613	1	–	2	1
		W1194	1	–	2	1
		W2220	1	–	2	1
<i>O. latifolia</i>	CCDD	W1166	1	–	2	1
		W1197	1	–	2	1
		W2200	1	–	2	1
<i>O. australiensis</i>	EE	W0008	2	–	2	1
		W1628	2	–	2	1
<i>O. longiglumis</i>	HHJJ	W1220	2	–	2	1
<i>O. ridleyi</i>	HHJJ	W0001	2	–	2	1
		W0604	2	–	2	1
<i>O. brachyantha</i>	FF	W1401	–	2	2	–
		W1711	–	2	2	–
<i>O. granulata</i>	GG	W0003	–	–	1	–
		W0067(B)	–	–	1	–
<i>O. meyeriana</i>	GG	W1356	–	–	1	–

^a Descriptions followed the web site of the National Institute of Genetics, Japan

^b Null allele

10 lL reaction mixture containing 5 lL of GoTaq (Promega, Madison, WI, U.S.A.), 0.2 lM of each primer and ~10 ng of genomic DNA. The PCR program consisted of 1 cycle of 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 54–56°C (depending on the combination of primers, see

Table 3) for 30 s and 72°C for 1 min, and 1 cycle of 72°C for 5 min. PCR products were electrophoresed in 4% polyacrylamide gels and visualized by EtBr staining. PCR products were either cloned into the pBluescript vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA) prior to sequencing or

Table 2 *Brassica* accessions used in this study

Species	Genome type	Accession name	Number of repeat unit	
			<i>BnTR1</i>	<i>BnTR4</i>
<i>Brassica rapa</i>	AA	C-701	4	2
		C-656	4	2
		C-504	4	2
		C-482	4	2
		C-256	4	2
		C-333	4	2
<i>Brassica napus</i>	AACC	N-106	4	5
		N-107	4	3
		N-118	4	5
		N-263	4	5
		N-348	4	5
<i>Brassica oleracea</i>	CC	O-141	3	3
		O-145	3	3
		O-146	3	3
		O-162	3	3
		O-204	3	3
<i>Brassica carinata</i>	BBCC	Ca-112	3	2
		Ca-114	3	2
		Ca-116	3	2
<i>Brassica nigra</i>	BB	Ni-111	3	2
		Ni-116	3	2
		Ni-130	3	2
		Ni-131	3	2
		Ni-138	3	2
<i>Brassica juncea</i>	AABB	J-112	4	2
		J-113	4	2
		J-139	4	2
		J-473	4	2
		J-474	4	2

directly sequenced using an ABI3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequence data were deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank database under accession numbers of AB627032-AB627044.

Results

Novel minisatellites in angiosperm mitochondrial DNAs

Tandem Repeats Finder was used to find mitochondrial minisatellites in angiosperm mitochondrial sequences. We first confirmed the program's ability to identify the four previously characterized minisatellites from sugar beet mitochondrial DNA (data not shown). After the analysis

of ten mitochondrial sequences shown in Table 4, minisatellite-like repeated sequences were selected by visual inspection. Two sequence blocks with more than 80% homology were considered as repeated sequences, and a related block of similar length with 50–80% homology was considered as a divergent repeat. We found a total of 84 minisatellites as detailed in Table S1. The locations of these minisatellites included gene-coding regions (4 minisatellites), intronic regions (8) and intergenic regions (72). Mitochondrial genes having minisatellites in their coding regions were sorghum- and wheat *rps4*, gamagrass *rps2A* and gamagrass *cox1* (Table S1). The two minisatellites in *rps4* were different in their sequences, but both occurred in the less conserved internal ORF of angiosperm *rps4* (Itchoda et al. 2002). The minisatellite in gamagrass *rps2A* was located in the C-terminal extension of the ORF, a region known to be not conserved among maize, rice and wheat (Perrotta et al. 2002). In maize, the C-terminal extension of *rps2A* is translated but cut away from the mature RPS2 polypeptide (Perrotta et al. 2002). The gamagrass *cox1* ORF has a unique C-terminal extension, where the minisatellite was located. Apparently independent minisatellite-like structures also occur in the carrot and the sorghum C-terminal extensions (Bailey-Serres et al. 1986; Robison and Wolyn 2006). Previously, the mature translation products of carrot and sorghum *cox1* were shown to exclude or include the C-terminal extension, respectively (Bailey-Serres et al. 1986; Robison and Wolyn 2006). It is unclear whether gamagrass *cox1* is more similar to carrot or sorghum *cox1* because no gene expression analysis was conducted. The three intronic regions containing minisatellites were the *nad1*-intron 3 of seven species, rapeseed *nad2*-intron 4 and grapevine *nad7*-intron 3. The minisatellite in the *nad1*-intron 3 is conserved in five grass-family species, grapevine and onion but does not occur in papaya, tobacco, *Arabidopsis* or sugar beet (Fig. S1). The minisatellite in the rapeseed *nad2*-intron 4 is a non-duplicated form in *Arabidopsis* and the corresponding sequence appears to be missing in the other eight plants listed in Table 4 (data not shown). No corresponding sequence of the grapevine-*nad7*-intron 3 minisatellite was found in the other nine plants in Table 4. Of the remaining 72 minisatellites, two pairs, *Arabidopsis AtTR1* and rapeseed *BnTR1* and *Arabidopsis AtTR4* and rapeseed *BnTR4*, were identical in terms of the nucleotide sequence of the repeat unit but the number of iterations differed (Table S1). Papaya *CcTR2* and grapevine *VvTR10*, and gamagrass *TdTR4* and maize *ZmTR4* were the pairs of repeated sequences where the nucleotide sequence of the repeat unit and the number of iterations was identical (Table S1). Repeat units of another 21 minisatellites had their homologous sequence as a non-duplicated form in at least one of other plant species. The

Table 3 Nucleotide sequences of PCR primers used in this study

Targets	Primer name	Nucleotide sequences	Annealing temperature (°C)
OsTR1	OsTR1-Fw	5'-CAACCGGTTCTCTCGTCTATC-3'	58
	OsTR1-Rv	5'-TGTAAGTAGAGGGCGAGACTAG-3'	
OsTR2	OsTR2-Fw	5'-TCACTTCCGCTTATCGGTAGG-3'	58
	OsTR2-Rv	5'-ATATGCACACCGTACCGACTTG-3'	
OsTR3	OsTR3-Fw	5'-ACCCTACGGTGCTGGTAAGG-3'	55
	OsTR3-Rv	5'-CTGGGGAACCATCACAAGTA-3'	
OsTR4	OsTR4-Fw	5'-CAGTCACCCGTATAGTACCA-3'	54
	OsTR4-Rv	5'-CGGTGCTGAATTCTCTGGCT-3'	
OsTR5	OsTR5-Fw	5'-ATTGGATTACTAGTCTCGCCCTC-3'	58
	OsTR5-Rv	5'-GGCAACAGAGCAATAGGCATTG-3'	
BnTR1	BnTR1-Fw	5'-CCGTTAGGGGTATTTAGTAACTCG-3'	56
	BnTR1-Rv	5'-ACATAATGGCAATGTATCGGACTG-3'	
BnTR2	BnTR2-Fw	5'-TGATAACAGTTCCCTCTAGTTTGC-3'	56
	BnTR2-Rv	5'-GAACCTGTTAATTAGCACGGAACATA-3'	
BnTR3	BnTR3-Fw	5'-GAGTGCTGGCTGTTATAGTATGGTT-3'	56
	BnTR3-Rv	5'-ATAGGAACAGAAAGCTACGCTAACAA-3'	
BnTR4	BnTR4-Fw	5'-GAAGTCGAGGACCTTTAGTACC-3'	56
	BnTR4-Rv	5'-AGTAAGTTGTAGGTAGGGGCTTCAT-3'	
BnTR5	BnTR5-Fw	5'-CTTACAGTCGAGCTCCTTTGTCAC-3'	56
	BnTR5-Rv	5'-GTAAGTTCGACCCCTCATCAACTAAT-3'	
BnTR6	BnTR6-Fw	5'-AGTATATTGACAGTGCCCAAGAC-3'	56
	BnTR6-Rv	5'-AGTTACTCGACTGAAAAGGAGAGGT-3'	

Table 4 Number of minisatellite-like repeated sequence loci identified in this study

Scientific name	Common name	Size of mitochondrial DNA (bp)	DDBJ/EMBL/GenBank accession no.	No. of minisatellites			
				Gene-coding region	Intron	Intergenic region	Total
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Thale cress	366,924	Y08501	0	0	15	15
<i>Brassica napus</i>	Rapeseed	221,853	AP006444	0	1	5	6
<i>Carica papaya</i>	Papaya	476,890	EU431224	0	0	3	3
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tobacco	430,597	BA000042	0	0	1	1
<i>Vitis vinifera</i>	Grapevine	773,279	FM179380	0	2	10	12
<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	Rice	490,520	BA000029	0	1	4	5
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum	468,628	DQ984518	1	1	9	11
<i>Tripsacum dactyloides</i>	Gamagrass	704,100	DQ984517	2	1	10	13
<i>Triticum aestivum</i>	Wheat	452,528	AP008982	1	1	6	8
<i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i>	Maize	569,630	AY506529	0	1	9	10

nucleotide sequences of the other 43 minisatellites were unique to each plant species.

The most prevalent number of iterations was 2 (in 74 cases), followed by 3 (in 6), 4 (in 3) and 5 (in 1). The length of repeat units ranged from 20 to 72 bp, of which 67 units were in the range of 22 to 62 bp. Of the 84 minisatellites, 60 exhibited an organization with short direct repeats that were homologous to the beginning of the

repeat unit immediately following the array (Table S1; see examples in Figs 1, 2). Such an organization has been proposed to be involved in the initial duplication of the repeat unit in yeast and humans (Haber and Louis 1998). The number of minisatellites per mitochondrial DNA ranged from 1 (tobacco) to 15 (*Arabidopsis*), and there seemed to be no correlation between the number of minisatellites and the size of mitochondrial DNA (Table 4).

Mitochondrial minisatellites in *Oryza*

As a model, we next examined the length polymorphism of the identified minisatellites in *Oryza*. There were six available mitochondrial sequences in *Oryza*: two from *O. sativa* Japonica cultivars, three were *O. sativa* Indica cultivars and one was an accession of *O. rufipogon*, which is a close relative of *O. sativa* (Fujii et al. 2010; Notsu et al. 2002; Tian et al. 2006). We searched the five additional *Oryza* mitochondrial genome sequences for counterparts of the five minisatellites identified in the cultivar Nipponbare (Table 4) and compared their nucleotide sequences. The result showed that all five minisatellites were preserved, and the number of repeat units was unchanged in each locus (data not shown).

In the genus *Oryza*, all the species are classified according to their chromosome complements (genomes) such as AA, BB, BBCC, CC, CCDD, EE, FF, GG and HHJJ (Vaughan and Morishima 1999; Vaughan et al. 2003). This classification system is well supported by cytogenetic and molecular phylogenetic studies using nuclear and/or chloroplast DNAs. Because all six of the above-mentioned mitochondrial sequences belonged to an AA-genome species, another species with a different genome types remained to be examined. A core collection comprised of 42 accessions from 18 *Oryza* species, covering nine genome types, was evaluated (Table 1). PCR primers targeting the five minisatellites were designed based on the Nipponbare sequence and used for PCR analysis. When *OsTR3*, one of the five minisatellites (see Table S1 and Fig. S1), was targeted, PCR fragments of the expected size were obtained from all 42 plants and there was no apparent polymorphism (data not shown). On the other hand, PCR analysis of the other four loci exhibited length polymorphism of the amplicons (Fig. 1).

OsTR1 is a minisatellite composed of two repeats in the Nipponbare sequence (Table S1; Fig. 1). We obtained two kinds of amplicons, one was the same size as the Nipponbare sequence (21 plants) and the other was smaller (16 plants). No clear amplification was observed in 5 plants (Fig. 1a). To examine the organizational difference of the amplicons, nucleotide sequences of the PCR products of accessions W1020 and W0002 were determined. Comparison of the two sequences revealed that one repeat copy was missing in W0002 (Fig. 1b).

The repeat organization of *OsTR2* in the Nipponbare sequence is two copies of 23-bp repeats followed by a divergent repeat copy of 33 bp (Table S1; Fig. 1). Two kinds of amplicons appeared on the polyacrylamide gel, one was expected from the Nipponbare sequence (15 plants) and the other was smaller (2 plants). No clear amplification was observed for 25 plants. We sequenced the PCR products from W2003 and W1401 and found that the 33-bp repeat copy was missing from W1401 (Fig. 1c).

All 42 plants yielded PCR products corresponding to *OsTR4*, but the PCR products of three plants were smaller than the expected size of the Nipponbare sequence (Fig. 1a). Nucleotide sequencing of the W0002 and W0003 amplicons revealed that a 32-bp repeat copy was missing in W0003 as well as a 4-bp deletion in the remaining repeat copy (Fig. 1d).

PCR analysis of *OsTR5* gave amplicons with the expected size of the Nipponbare sequence (16 plants), smaller amplicons (21 plants), and no amplicons were observed for 5 plants (Fig. 1a). The W0002 amplicon lacked a 20-bp repeat copy compared to the W1020 amplicon (Fig. 1e).

Mitochondrial minisatellites in *Brassica*

We selected *Brassica* as another model to examine the polymorphism of mitochondrial minisatellites, because the relationships between six major cultivated species of *Brassica* have been established (U 1935). Total cellular DNAs were isolated from a total of 29 accessions, comprising the six major *Brassica* cultivated species (Table 2). Six sets of PCR primers were designed to target the mitochondrial minisatellites based on the mitochondrial DNA of *Brassica napus* cultivar Westar (Table S1). As a result of PCR analysis of the 29 accessions, we obtained PCR products from all the plants with each of the primer sets, but no length polymorphism was apparent on the gel in the case of *BnTR2*, *BnTR3*, *BnTR5* or *BnTR6* (Fig. 2; data not shown). The remaining two polymorphic minisatellites were investigated further.

BnTR1 consisted of 29-bp repeat copies with a 33-bp intervening sequence, and the number of repeat copies was four in Westar (Table S1). The PCR products of accession C-701, whose size was the same as expected from the Westar sequence, and O-141, whose amplicon was smaller (Fig. 2a), were sequenced and compared. As a result, the lack of a repeat copy from the O-141 sequence was revealed (Fig. 2b).

BnTR4 is a tandem array of 31-bp repeat units and a divergent copy, reiterated five times in Westar (Table S1). The sizes of the obtained PCR products were ~0.3, ~0.25 and ~0.22 kbp on the polyacrylamide gel (Fig. 2a), of which the 0.3-kbp amplicon was expected from the Westar sequence. The nucleotide sequence of the PCR products from N-118, O-141 and C-701 revealed a different number of repeat copies, which was five, three and two, respectively (Fig. 2c).

Discussion

Minisatellites occurred more frequently in regions with less functional significance in angiosperm mitochondrial

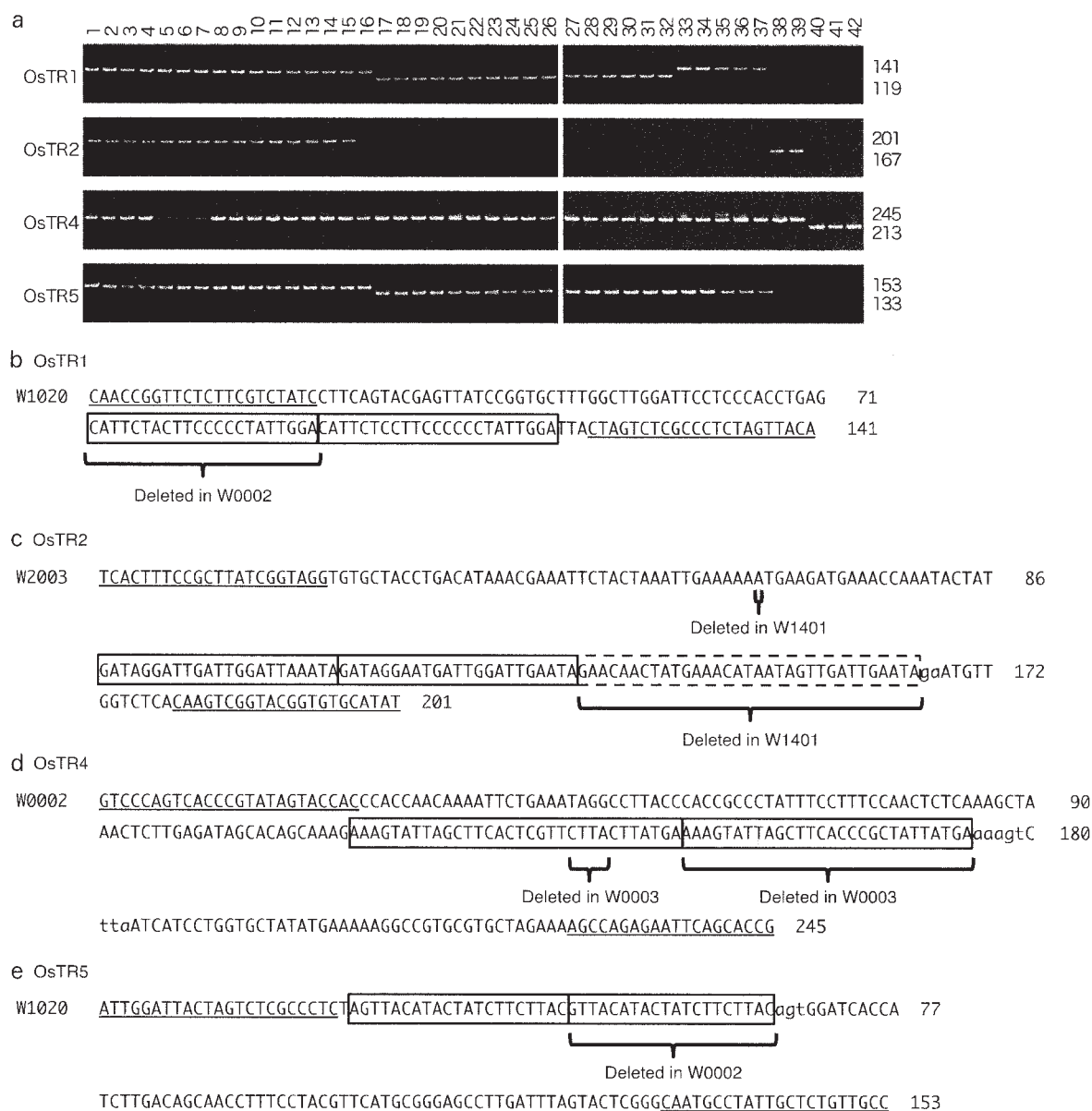


Fig. 1 a Gel electrophoresis of PCR amplification products targeting *OsTR1*, *OsTR2*, *OsTR4* and *OsTR5* using 42 *Oryza* accessions. Sizes of the PCR products are shown on the right. Accession names are as follows: 1 W0652, 2 W1588, 3 W1169, 4 W2145, 5 W2199, 6 W1413, 7 W1508, 8 W1625, 9 W1635, 10 W0106, 11 W0120, 12 W1294, 13 W1866, 14 W1921, 15 W2003, 16 W1514, 17 W1213, 18 W1331, 19 W1024, 20 W1527, 21 W1805, 22 W0002, 23 W1361, 24 W1830, 25 W0017, 26 W1182, 27 W0613, 28 W1194, 29 W2220, 30 W1166, 31 W1197, 32 W2200, 33 W0008, 34 W1628, 35 W1220, 36 W0001, 37 W0604, 38 W1401, 39 W1711, 40 W0003, 41 W0067(B),

42 W1356. **b–c** Nucleotide sequences of representative PCR products in **a**. Positions of PCR primers are underlined. Repeated sequences are in boxes with solid lines. The divergent repeat copy is enclosed in a box with dashed lines. Short flanking repeats are indicated by lower case letters. Extents of deletion are shown by brackets. **b** Nucleotide sequence comparison of *OsTR1* between W1020 and W0002. **c** Nucleotide sequence comparison of *OsTR2* between W2003 and W1401. **d** Summary of nucleotide sequence comparison of *OsTR4* between W0002 and W0003. **e** Nucleotide sequence comparison of *OsTR5* between W1020 and W0002

DNAs. Identification of mitochondrial minisatellites is possible if a reference sequence is available. It should be noted that the number of informative mitochondrial

minisatellites in a plant may be insufficient for use as markers because angiosperm minisatellites are not always polymorphic and, if they exist, the number of alleles may



Fig. 2 Gel electrophoresis of PCR amplification products targeting *BnTR1* and *BnTR4* using 29 *Brassica* accessions. Sizes of the PCR products are shown on the right. Accession names are as follows: 1 C-701, 2 C-656, 3 C-504, 4 C-482, 5 C-256, 6 C-333, 7 N-106, 8 N-107, 9 N-118, 10 N-263, 11 N-348, 12 O-141, 13 O-145, 14 O-146, 15 O-162, 16 O-204, 17 Ca-112, 18 Ca-114, 19 Ca-116, 20 Ni-111, 21 Ni-116, 22 Ni-130, 23 Ni-131, 24 Ni-138, 25 J-112, 26 J-113, 27 J-139, 28 J-473, 29 J-474. **b**, **c** Nucleotide sequence of representative

PCR products in **a**. Positions of PCR primers are *underlined*. Repeated sequences are in *boxes with solid lines*. Divergent repeats are in *boxes with dashed lines*. Short flanking repeats are indicated by *lower case letters*. Extents of deletion are shown by *brackets*. **b** Nucleotide sequence comparison of *BnTR1* between C-701 and O-141. A nucleotide substitution occurring in O-141 is indicated by a *dot*. **c** Nucleotide sequence comparison of *BnTR4* among N-118, O-141 and C-701

be small or some specimen may exhibit null alleles. However, mitochondrial minisatellites have the potential to increase the robustness of an analysis when combined with nuclear and chloroplast markers.

The number of repeat units in all the *Oryza* mitochondrial sequences and *Oryza* accessions with an AA genome examined in this study were 2, 3, 2 and 2 for *OsTR1*, *OsTR2*, *OsTR4* and *OsTR5*, respectively. Hereafter, haplotypes based on the mitochondrial minisatellites are coded in parenthesis. Therefore, the haplotype of AA-genome accessions is coded as (2, 3, 2, 2) (see Table 1). The BB-genome accessions examined in this study possessed a null allele at *OsTR2*, and its haplotype code is (2, –, 2, 2). Accordingly, all the CC-, BBCC- and CCDD-genome accessions were coded as (1, –, 2, 1), which can be distinguished from the AA- or BB-genome accessions at *OsTR1* and *OsTR5*. This result is consistent with the notion that during the formation of these amphidiploid species the cytoplasmic donor parent of BBCC- and CCDD-genome species may have been a CC-genome species (Nishikawa et al. 2005). However, the code of EE-genome accessions

cannot be distinguished from the HHJJ-genome accessions, a result that was not supported by previous studies (e.g. Nishikawa et al. 2005) where EE-genome accessions were grouped into an *O. officinalis* complex containing BB-, CC-, BBCC-, CCDD- and EE-genome accessions. It is possible that the two identical codes occurred by chance; however, further investigation of *Oryza* mitochondrial DNAs will be necessary. Because of the occurrence of more than two null alleles, the minisatellite set consisting of *OsTR1* to *OsTR5* was less informative for the FF- and GG-genome accessions.

In the case of *Brassica*, five distinctive haplotypes based on two mitochondrial minisatellites were apparent (Table 2). In *Brassica rapa*, for example, the numbers of repeat units in *BnTR1* and *BnTR4* were 4 and 2, respectively, and they were coded as (4, 2). Of the six major cultivated *Brassica* species, the genomes of three diploid species, *Brassica rapa*, *Brassica nigra* and *Brassica oleracea*, have been designated as AA, BB and CC, respectively (U 1935). As shown in Table 2, the haplotype codes (4, 2), (3, 2) and (3, 3) corresponded to the AA-, BB- and

CC-genome accessions, respectively. Of particular interest is that the haplotype codes of two amphidiploid accessions, *Brassica juncea* (AABB-genome species) and *Brassica carinata* (BBCC-genome species), were (4, 2) and (3, 2), respectively. These results are consistent with the notion that the cytoplasmic donor of the AABB-genome species was an AA-genome species and that the BBCC-genome species donor was a BB-genome species, a hypothesis well supported by chloroplast DNA analyses (Erickson et al. 1983; Palmer et al. 1983). On the other hand, none of the two haplotype codes of the *B. napus* (AACC-genome species) accessions matched with the other five *Brassica* species. According to chloroplast DNA analyses, there were multiple chloroplast types in *B. napus* accessions and such chloroplast DNA types were very few in diploid *Brassica* accessions (Song et al. 1988; Flannery et al. 2006; Allender and King 2010).

It should be noted that two mitochondrial minisatellites of *Brassica*, *BnTR1* and *BnTR4*, exhibited their potential as mitochondrial markers (Table 2). Such mitochondrial markers can be applied to explore the mitochondrial diversity of *Brassica* genetic resources. Another potential application is the diagnosis of the heteroplasmic state of mitochondria, for example, in cybrids that were produced by fusion of two protoplasts with different mitochondrial types. Unlike animal mitochondria (Lunt et al. 1998), there was no clear evidence of heteroplasmy in our plant materials (Figs. 1, 2) (Nishizawa et al. 2000), but heterogeneous PCR products targeting a mitochondrial minisatellite were seen when a *Brassica*–*Arabidopsis* cybrid was evaluated (our unpublished result).

Why was the level of polymorphism in *Oryza* or *Brassica* lower than that of *Beta vulgaris*? Intraspecific variation is rare in the former two but frequent in the latter genus: for example, a minisatellite locus of *Beta vulgaris* named TR1 has at least 6 alleles whose iteration numbers are 4, 5, 6, 7, 10 and 13 (Cheng et al. 2011). Preliminary tests on the intraspecific variation of radish (*Raphanus sativus*) using PCR primers for *BnTR1* to *BnTR6* revealed that, although PCR products were obtained with some primer sets, there were no length polymorphisms among nine accessions with various mitochondrial types (our unpublished result). It remains unknown whether the trends in mitochondrial minisatellite evolution differ among plant species or among loci. In gymnosperms, mitochondrial minisatellites showing intraspecific variation have been reported (Bastien et al. 2003; Godbout et al. 2005), but there is no information about other loci as far as we know. Mechanisms involved in the organizational polymorphism of minisatellites in *Drosophila* and yeast nuclear DNAs have been proposed such as DNA recombination including gene-conversion like activity rather than replication error, (Richard and Paques 2000), but mechanisms explaining

plant mitochondrial minisatellites are unclear. The identity of factors accelerating variation in the number of repeat units is an open question.

Acknowledgments The authors wish to thank Prof. Dr. Takeshi Nishio and the National Institute of Genetics for providing plant materials, and Prof. Dr. Hiroshi Yamagishi for valuable comments. This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; the Private University Strategic Research Foundation Support Program; and the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry (BRAIN).

References

- Allender CJ, King GJ (2010) Origins of the amphidiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biol* 10:54
- Bailey-Serres J, Hanson DK, Fox TD, Leaver CJ (1986) Mitochondrial genome rearrangement leads to extension and relocation of the cytochrome c oxidase subunit I gene in sorghum. *Cell* 47:567–576
- Bastien D, Favre JM, Collignon AM, Sperisen C, Jeandroz S (2003) Characterization of a mosaic minisatellite locus in the mitochondrial DNA of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. *Theor Appl Genet* 107:574–580
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580
- Cafasso D, Pellegrino G, Musacchio A, Widmer A, Cozzolino S (2001) Characterization of a minisatellite repeat locus in the chloroplast genome of *Orchis palustris* (Orchidaceae). *Curr Genet* 39:394–398
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12794–12797
- Cheng D, Kitazaki K, Xu DC, Mikami T, Kubo T (2009) The distribution of normal and male-sterile cytoplasm in Chinese sugar-beet germplasm. *Euphytica* 165:345–351
- Cheng D, Yoshida Y, Kitazaki K, Negoro S, Takahashi H, Xu D, Mikami T, Kubo T (2011) Mitochondrial genome diversity in *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* (Leaf and Garden Beet Groups) and its implications concerning the dissemination of the crop. *Genet Res Crop Evol* 58:553–560
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
- Erickson LR, Straus NA, Beversdorf WD (1983) Restriction patterns reveal origins of chloroplast genomes in *Brassica* amphiploids. *Theor Appl Genet* 65:201–206
- Fenart S, Arnaud JF, de Cauwer I, Cuguen J (2008) Nuclear and cytoplasmic genetic diversity in weed beet and sugar beet accessions compared to wild relatives: new insights into the genetic relationships within the *Beta vulgaris* complex species. *Theor Appl Genet* 116:1063–1077
- Fievet V, Touzet P, Arnaud JF, Cuguen J (2007) Spatial analysis of nuclear and cytoplasmic DNA diversity in wild sea beet (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) populations: do marine currents shape the genetic structure? *Mol Ecol* 16:1847–1864
- Flannery ML, Mitchell FJG, Coyne S, Kavanagh TA, Burke JI, Salamin N, Dowding P, Hodkinson TR (2006) Plastid genome characterisation in *Brassica* and Brassicaceae using a new set of nine SSRs. *Theor Appl Genet* 113:1221–1231
- Fujii S, Kazama T, Yamada M, Toriyama K (2010) Discovery of global genomic re-organization based on comparison of two

- newly sequenced rice mitochondrial genomes with cytoplasmic male sterility-related genes. *BMC Genomics* 11:15
- Godbout J, Jaramillo-Correa JP, Beaulieu J, Bousquet J (2005) A mitochondrial DNA minisatellite reveals the postglacial history of jack pine (*Pinus banksiana*), a broad-range North American conifer. *Mol Ecol* 14:3497–3512
- Haber JE, Louis EJ (1998) Minisatellite origins in yeast and humans. *Genomics* 48:132–135
- Itchoda N, Kubo T, Estiati A, Yamamoto MP, Handa H, Mikami T (2002) The *rps4* gene in sugar beet mitochondria: insertion/deletion mutations occur within the gene but do not disrupt the reading frame. *J Plant Physiol* 159:211–215
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314:67–73
- King RA, Ferris C (2002) A variable minisatellite sequence in the chloroplast genome of *Sorbus* L (Rosaceae: Maloideae). *Genome* 45:570–576
- Kitazaki K, Kubo T (2010) Cost of having the largest mitochondrial genome: evolutionary mechanism of plant mitochondrial genome. *J Botany*. Article ID: 620137
- Kitazaki K, Nomoto Y, Aoshima A, Mikami T, Kubo T (2009) A mitochondrial gene involved in cytochrome *c* maturation (*ccmC*) is expressed as a precursor with a long NH₂-terminal extension in sugar beet. *J Plant Physiol* 166:775–780
- Kubo T, Newton KJ (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion* 8:5–14
- Lunt DH, Whipple LE, Hyman BC (1998) Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Mol Ecol* 7:1441–1455
- Nishikawa T, Vaughan DA, Kadowaki K (2005) Phylogenetic analysis of *Oryza* species, based on simple sequence repeats and their flanking nucleotide sequences from the mitochondrial and chloroplast genomes. *Theor Appl Genet* 110:696–705
- Nishizawa S, Kubo T, Mikami T (2000) Variable number of tandem repeat loci in the mitochondrial genomes of beets. *Curr Genet* 37:34–38
- Nishizawa S, Mikami T, Kubo T (2007) Mitochondrial DNA phylogeny of cultivated and wild beets: relationships among cytoplasmic male-sterility-inducing and nonsterilizing cytoplasm. *Genetics* 177:1703–1712
- Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakazono M, Hirai A, 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
- Palmer JD, Shields CR, Cohen DB, Orton TJ (1983) Chloroplast DNA evolution and the origin of amphidiploid *Brassica* species. *Theor Appl Genet* 65:181–189
- Perrotta G, Grienenberger JM, Gualberto JM (2002) Plant mitochondrial *rps2* genes code for proteins with a C-terminal extension that is processed. *Plant Mol Biol* 50:523–533
- Powell W, Morgante M, McDevitt R, Vendramin GG, Rafalski JA (1995) Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7759–7763
- Rand DM (1993) Endotherms, ectotherms, and mitochondrial genome-size variation. *J Mol Evol* 37:281–295
- Richard GF, Paques F (2000) Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Rep* 1:122–126
- Robison MM, Wolyn DJ (2006) A 60 kDa COX1 protein in mitochondria of carrot irrespective of the presence of C-terminal extensions in the *cox1* reading frame. *Mol Genet Genomics* 275:68–73
- Skinner DZ (2000) Non random chloroplast DNA hypervariability in *Medicago sativa*. *Theor Appl Genet* 101:1242–1249
- Song KM, Osborn TC, Williams PH (1988) *Brassica* taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPS) 1 Genome evolution of diploid and amphidiploid species. *Theor Appl Genet* 75:784–794
- Tian XJ, Zheng J, Hu SN, Yu J (2006) The rice mitochondrial genomes and their variations. *Plant Physiol* 140:401–410
- U N (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. *Jpn J Botany* 7:389–452
- Vaughan DA, Morishima H (1999) Biosystematics of the genus *Oryza*. In: Smith CW, Dilday RH (eds) *Rice: origin History technology, and production*. John Wiley and Sons, New York, pp 27–65
- Vaughan DA, Morishima H, Kadowaki K (2003) Diversity in the *Oryza* genus. *Curr Opin Plant Biol* 6:139–146

10. 葉緑体ゲノム断片の核移行パターン

概要

本研究プロジェクトで推進している葉緑体の遺伝子組換え、あるいは将来実現が可能となるであろうミトコンドリアの遺伝子組換えのいずれの場合も、多くの植物種（特に作物）では導入遺伝子が母性遺伝を示し、花粉を通じた環境中への不必要な拡散を防止できる点が大きなメリットである。しかしながら、進化的なタイムスケールでは、葉緑体やミトコンドリアゲノムの一部が断片化して、核ゲノムに取り込まれていることが知られている。このようなゲノム断片の移行は、これまでもシロイヌナズナやイネ (*Oryza sativa*) などのモデル植物で研究が進められてきたが、現在では多くの非モデル植物種の全ゲノム配列が解読され、複数の種でその実態の比較が可能である。多くの種を解析に用いることで、一般的な葉緑体ゲノムの核への移行パターンの傾向を明らかにすることが可能である。平成 22 年度に新規参画した河邊の研究グループでは、オルガネラゲノムのどのような領域が核ゲノムのどこに移行するのか、どれくらいの頻度で維持されているのかを明らかにしようとしている。この解析によってオルガネラゲノムの改変の際にターゲットとしてより有効な領域の特定や組換え遺伝子が核に移行してしまうリスクなどの評価が可能になると思われる。現在、オルガネラゲノム(特に葉緑体ゲノム)の核への移行パターンの解析をおこなっている。これまでに双子葉植物 4 種と単子葉植物 (イネ科) 3 種を対象とし、核に存在している葉緑体ゲノム断片の網羅的解析を行った。核移行したゲノム断片の維持・消去機構を推測するために、移行した断片長や挿入数、染色体上の挿入位置などのパターンを調査した。また、その移行断片と葉緑体ゲノムとの相同性から、移行時期を推定した。現在までに多くの植物種でオルガネラゲノムは核へ移行した後に速やかに除去されること、除去は挿入配列が断片化することで起こることなどが示唆された。



葉緑体ゲノム断片の核移行パターン

降旗 初佳 京都産業大学 総合生命科学部
 生命資源環境学科
 ふるはた はづか

葉緑体は真核生物の進化の初期に細胞内共生したシアノバクテリアが起源だと言われるが、両者を比較すると、葉緑体のゲノムサイズや遺伝子数は著しく少ない。これは細胞内共生の過程で葉緑体ゲノムの一部が核ゲノムに移行もしくは消失していることを意味する。植物では、現在も葉緑体から核へのゲノム断片の移行が継続的に起きている。ゲノム断片が移行後どのような運命をたどるのか、これまでもイネやシロイヌナズナ等のモデル植物で研究されていたが、それぞれの種で異なる傾向が観察されている。しかし現在では多くの種の全ゲノム配列が解読され、複数種の情報を比較することができるようになったため、一般法則の解明が可能となってきた。

本研究では、葉緑体ゲノム断片の核移行後の維持・除去機構の一般法則の解明を目指し、核と葉緑体の両ゲノムが解読されている双子葉植物14種及び単子葉植物（イネ科）4種について解析をおこなった。核移行したゲノム断片の維持・除去機構を推測するために、核ゲノム中に存在する葉緑体ゲノム断片（nuclear plastid DNA-like sequences: NUPT）の数と量・葉緑体上での位置・染色体上での位置・移行時期を推定した。

NUPTの数や量は種間で異なっており、核ゲノム中に含まれる割合も一定ではなかった（表1）。NUPTは、多くの種では核ゲノム中に0.1%以下の割合で存在したが、シロイヌナズナ（*A. thaliana*）やキャッサバ（*M. esculenta*）では少なく、0.015~0.01%程度であった。一方で、イネ（*O. sativa*）やトウモロコシ（*Z. mays*）では核ゲノム中の0.2%以上がNUPTであると推定された。それぞれのNUPTは、葉緑体ゲノム全体から極端な偏りはなく由来していた。しかし、種によってはInverted repeat領域からの移行が他の領域に比べて多く、機能的な特性が存在する可能性が示唆された。核ゲノムにおいてNUPTの染色体上での分布には

表1. 核ゲノムに占める NUPT の割合

種	核ゲノムに占める NUPT の割合 (%)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0.015
<i>Carica papaya</i>	0.079
<i>Vitis vinifera</i>	0.069
<i>Lotus japonicus</i>	0.049
<i>Manihot esculenta</i>	0.010
<i>Ricinus communis</i>	0.247
<i>Populus trichocarpa</i>	0.050
<i>Medicago truncatula</i>	0.084
<i>Glycine max</i>	0.042
<i>Cucumis sativus</i>	0.054
<i>Prunus persica</i>	0.073
<i>Fragaria vesca</i>	0.030
<i>Solanum lycopersicum</i>	0.084
<i>Solanum tuberosum</i>	0.059
<i>Sorghum bicolor</i>	0.025
<i>Zea mays</i>	0.049
<i>Oryza sativa</i>	0.222
<i>Brachypodium distachyon</i>	0.097

極端な偏りはなかったが、動原体近傍やヘテロクロマチン領域の一部に大量のNUPTが存在し、このような領域における除去の効率や挿入の特異性が関わる可能性がある。NUPTの葉緑体からの移行時期の推定から、種によって①新しいNUPTほど量が多く、古くなると急激に減少する傾向、②時期によらず少量のみが存在する傾向の2つのパターンがみられた（図1）。また、新しいNUPTほど長く、除去の過程で急激に断片化が進むことが示された。



河邊 昭 降旗初佳 吉田貴徳

多くの種において、葉緑体から核へのゲノム断片の移行は現在も一定の頻度で起きているが、移行断片のうち大多数は移行後初期に核ゲノム中から除去される。その中には、今回の方法では検出できないほどごく初期に除去されるものも少なくないと考えられる。そして、少数のものがその後も維持されている、というNUPTの維持・除去機構の一般法則がみえてきた（図2）。

今後、現在NUPTが存在する核ゲノム領域の特徴やそれぞれの挿入時期との関係を詳細に調査することで、維持・除去のパターンを理解し、植物のゲノムの進化過程を解明する一助となることが期待される。

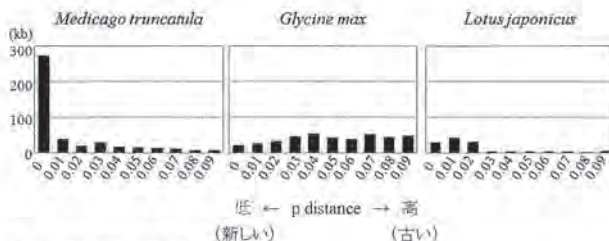


図1. NUPTの長さ（kb）と移行時期（p distance）の関係。異なる時期に移行したNUPTがどのくらい存在するか、マメ科3種での例。近縁種でも異なる傾向を示しているように見える。

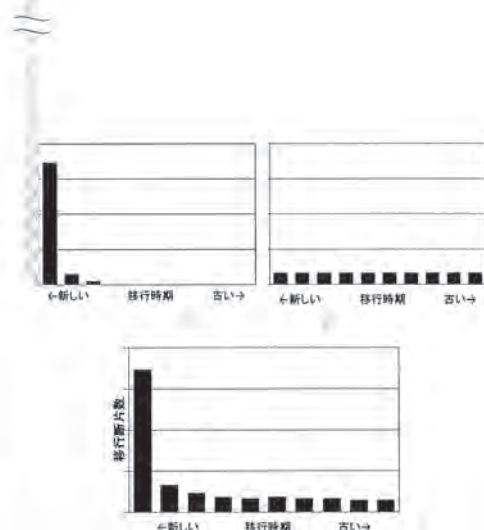


図2. NUPTの維持・除去パターン（概念図）。有害なもの（おそらく大多数：赤）が移行後初期に核ゲノム中から除去され、中立なもの（青）が維持される。このような一般的なパターンがあると考えられる。

11. その他

本研究プロジェクトは、植物のオルガネラゲノム研究に特化したものではあるが、医薬系の細胞生物学は質、量ともに充実しており、その知見は本研究を行ううえでも積極的に取り込む必要がある。黒坂の研究グループは、例えばダイコンの ORF138 タンパク質をビオチン標識するなど、主に生化学的実験で本研究プロジェクトを直接サポートしたが、その他にも糖転移酵素 (GalNAc-T) の研究で顕著な業績を挙げた。具体的に、黒坂の研究グループは、大きな遺伝子ファミリーを形成する哺乳動物の GalNAc-T の中で、脳特異的に発現するアイソザイム (GalNAc-T17) の機能解析を行い、T17 の発現を抑制すると培養細胞やゼブラフィッシュの脳において、正常な神経分化の阻害と apoptosis による細胞死が起こることを見いだした。apoptosis 経路を解析したところ、Bak、caspase 9 等の活性化が認められ、ミトコンドリア経路を介した apoptosis が神経細胞の細胞死を引き起こすことが分かった。これらの知見は、細胞の、主にゴルジ膜系で働く酵素 GalNAc-T17 の機能阻害が、細胞質およびミトコンドリアに影響を及ぼすことを示しており、新しい発見である。本研究プロジェクトとの関連では、雄性不稔における花粉の形成不全に、葯のタペート細胞の apoptosis が関与する可能性が以前から指摘されていた。また植物にもゴルジ膜系は存在することから、糖転移酵素とミトコンドリアと花粉形成の関係性など、新たな研究課題が浮かび上がった。また、上記 3 とも関連するが、葉緑体のタンパク質は糖鎖修飾を受けず、このことが葉緑体のタンパク質発現系の応用範囲をせばめている。この観点からも糖転移酵素の基礎研究は重要である。一方、佐藤の研究グループは、膜タンパク質の分析に長けており、本研究プロジェクトにおいても、寺地グループの研究者が、例えばミトコンドリアタンパク質を二次元電気泳動で分離する際など、技術的なアドバイスを受けている。加えて佐藤はカエル卵細胞膜を用いた受精シグナルの試験管内再構成実験により、新規のチロシンリン酸化基質、ストマチン様タンパク質 2 (SLP2) を同定した。SLP2 がもつストマチンドメインは動植物やアーキアで保存されており、当該分子の生物種を越えた機能が示唆される。さらに SLP2 が受精卵でチロシンリン酸化を受けていること、リン酸化の場が細胞膜ではなくミトコンドリアであることが示された。「ミトコンドリアにおける受精依存的なタンパク質チロシンリン酸化」はこれまでに知られていない新しい現象である。現時点で、ストマチ

ンドメインを持つタンパク質の、植物ミトコンドリアにおける役割は未知であるが、その生理的意義を明らかにすることが今後の課題である。

A Putative Polypeptide *N*-Acetylgalactosaminyltransferase/Williams-Beuren Syndrome Chromosome Region 17 (WBSCR17) Regulates Lamellipodium Formation and Macropinocytosis^{*[5]}

Received for publication, April 10, 2012, and in revised form, July 3, 2012. Published, JBC Papers in Press, July 11, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.370932

Yoshiaki Nakayama[‡], Naosuke Nakamura[†], Sayoko Oki[†], Masaki Wakabayashi[§], Yasushi Ishihama[§], Ayumi Miyake[¶], Nobuyuki Itoh[¶], and Akira Kurosaka^{†1}

From the [‡]Laboratory of Neuroglycobiology, Department of Molecular Sciences, Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kamigamo-motoyama, Kita-ku, Kyoto 603-8555, Japan and the [§]Department of Molecular and Cellular BioAnalysis and [¶]Department of Genetic Biochemistry, Kyoto University Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

Background: WBSCR17 is a potential polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase with unknown function.

Results: WBSCR17, induced with *N*-acetylglucosamine, regulated *O*-glycosylation, lamellipodium formation, and macropinocytosis.

Conclusion: Mucin-type *O*-glycosylation may be involved in lamellipodium formation and membrane trafficking through macropinocytosis.

Significance: The data suggest that mucin-type *O*-glycosylation modulates the dynamic membrane transport of the cell and may be involved in the control of nutrient uptake.

We previously identified a novel polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T) gene, which is designated Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (*WBSCR17*) because it is located in the chromosomal flanking region of the Williams-Beuren syndrome deletion. Recent genome-scale analysis of HEK293T cells treated with a high concentration of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) demonstrated that *WBSCR17* was one of the up-regulated genes possibly involved in endocytosis (Lau, K. S., Khan, S., and Dennis, J. W. (2008) Genome-scale identification of UDP-GlcNAc-dependent pathways. *Proteomics* 8, 3294–3302). To assess its roles, we first expressed recombinant *WBSCR17* in COS7 cells and demonstrated that it was *N*-glycosylated and localized mainly in the Golgi apparatus, as is the case for the other GalNAc-Ts. Assay of recombinant *WBSCR17* expressed in insect cells showed very low activity toward typical mucin peptide substrates. We then suppressed the expression of endogenous *WBSCR17* in HEK293T cells using siRNAs and observed phenotypic changes of the knock-down cells with reduced lamellipodium formation, altered *O*-glycan profiles, and unusual accumulation of glycoconjugates in the late endosomes/lysosomes. Analyses of endocytic pathways revealed that macropinocytosis, but neither clathrin- nor caveolin-dependent endocytosis, was elevated in the knock-down cells. This was further supported by the findings that the overexpression of recombinant *WBSCR17* stimulated lamellipodium formation, altered *O*-glycosylation, and inhibited mac-

ropinocytosis. *WBSCR17* therefore plays important roles in lamellipodium formation and the regulation of macropinocytosis as well as lysosomes. Our study suggests that a subset of *O*-glycosylation produced by *WBSCR17* controls dynamic membrane trafficking, probably between the cell surface and the late endosomes through macropinocytosis, in response to the nutrient concentration as exemplified by environmental GlcNAc.

Mucin-type *O*-glycosylation is a common post-translational modification, which occurs on numerous membrane and secreted proteins. Its functional importance is reported for various physiological activities, such as protection of epithelium, cell adhesion, antigenic properties of some cell surface carbohydrates, and control of the immune system (1–4). The biosynthesis of mucin-type carbohydrates proceeds in a stepwise manner by the ordered successive actions of a number of glycosyltransferases. Among them, a UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T)² is the enzyme responsible for initiating the biosynthetic reaction by catalyzing the transfer of GalNAc from UDP-GalNAc to a hydroxyl group of serine or threonine residues of proteins (5). GalNAc-Ts are important enzymes because they determine the number and the positions of mucin-type sugar chains in a protein. They constitute a large family, with 20 mammalian isozymes (Fig. 1A)

^{*} This work was in part supported by Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas 24110516 (to Y. N.), and for Young Scientists (B) 23770159 (to Y. N.), the Protein 3000 Project from the Japan Society for the Promotion of Science (to A. K.), and the Private University Strategic Research Foundation Support Program (to A. K.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT), Japan.

^[5] This article contains supplemental Figs. 1–6.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-75-705-1894; Fax: 81-75-705-1914; E-mail: kurosaka@cc.kyoto-su.ac.jp.

² The abbreviations used are: GalNAc-T, UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase; WBS, Williams-Beuren syndrome; *WBSCR17*, Williams-Beuren syndrome chromosome region 17; GalNAz, *N*-azidoacetylgalactosamine; FN, fibronectin; ER, endoplasmic reticulum; Tf, transferrin; siNC, negative control siRNA; ConA, concanavalin A; WGA, wheat germ agglutinin; ABA, *A. bisporus* agglutinin; HPA, *H. pomatia* agglutinin; SNA, *S. nigra* bark agglutinin; PHL, phytohemagglutinin-L; PNGase F, peptide-*N*-glycosidase F.

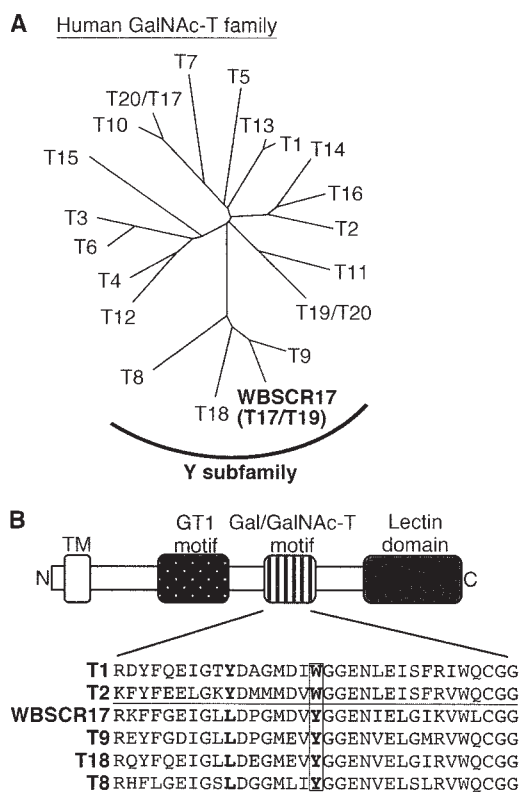


FIGURE 1. **Molecular analysis of WBSOCR17.** A, a phylogenetic tree of the human GalNAc-T family. The tree was generated by comparing amino acid sequences of the family with the ClustalW algorithm. Recently, two distinct numbers were assigned to some of the isozymes by Peng *et al.* (8) and Raman *et al.* (7), and both numbers separated by a slash are shown in the tree. WBSOCR17 is one of the isozymes that belong to the Y subfamily. B, schematic representation of GalNAc-T motifs and comparison of amino acid sequences in the Gal/GalNAc-T motif. The Y subfamily has a tyrosine residue in place of a tryptophan residue in the Gal/GalNAc-T motif of other GalNAc-T family members (indicated by a gray box).

(6–8). We previously identified a putative GalNAc-T gene, *pt-GalNAc-T* (9), which is a member of the “Y subfamily,” a group recently defined by Li *et al.* (6). The Y isozymes contain several conservative substitutions in the catalytic domain, one of which is represented by the replacement by tyrosine of tryptophan in the Gal/GalNAc-T motif (Fig. 1B) (6). We demonstrated that this substitution in GalNAc-T1 led to a severe decrease in the catalytic activity (10). *pt-GalNAc-T* is also known as Williams-Beuren syndrome (WBS) chromosome region 17 (*WBSOCR17*) (11), one of the genes identified in the flanking region (7q11.22) of the chromosomal deletion region (7q11.23) in the genome of WBS patients. In addition, different numbers were recently assigned to some of the GalNAc-T family, and *pt-GalNAc-T*/*WBSOCR17* was designated *GalNAc-T17* and *-T19* by Peng *et al.* (8), and Raman *et al.* (7), respectively (Fig. 1A).

WBS is a neurodevelopmental disorder associated with physical, behavioral, and cognitive abnormalities (11, 12), which is caused by haploinsufficiency of multiple genes at 7q11.23. *WBSOCR17* mRNA is expressed predominantly in the nervous system (9) and weakly in heart, kidney, liver, lung, and spleen (11). Recently, it was reported to be involved in the uridine

5'-diphospho-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc)-dependent pathways by genome-scale analysis (13). In this previous study, *WBSOCR17* was identified as one of the candidate genes that play roles in proliferation, bulk endocytosis, and β 1,6GlcNAc-branching of *N*-glycans under the control of UDP-GlcNAc by microarray analysis and small interfering RNA (siRNA) screening using mouse NMuMG and human HEK293T cells. However, the detailed function of *WBSOCR17* still remains to be elucidated.

It has been reported that mucin-type sugar chains are involved in endocytosis. For example, inhibition of chain elongation of *O*-*N*-glycosylation with *O*-benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminide perturbs the endosomal pathway (14). Moreover, the glycosylation state of MUC1, a type I transmembrane protein with a large number of mucin-type glycans, modulates its clathrin-mediated endocytosis (15). MUC1 is also involved in the macropinocytic pathway (16). Macropinocytosis is a form of bulk endocytosis that takes up extracellular solutes and a variety of nutrients or antigens into cytoplasmic vacuoles, called macropinosomes. A macropinosome is a large vesicle, the diameter of which is larger than 0.2 μ m, and forms clathrin-independently by actin-driven circular membrane ruffling and fusion of the membrane ruffles at their outermost margins (17). Macropinocytosis significantly contributes to antigen presentation by the immune system and is exploited by a range of pathogens for cellular invasion and avoidance of immune surveillance (18). It was recently reported that newly formed macropinosomes recruit typical early endosome markers, EEA1, and subsequently fuse with the lysosomes that recruit microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), which was previously shown to be an autophagy marker, to hydrolyze the cargo in the vesicles (18–20). Because of the absence of specific markers, the regulatory mechanism of macropinocytosis is not known despite its physiological importance (18).

In this study, we investigated the characteristics and roles of *WBSOCR17* and found that *WBSOCR17*, which was *N*-glycosylated, was located predominantly in the Golgi apparatus and had very weak catalytic activity toward typical mucin peptides. The suppression of *WBSOCR17* in HEK293T cells led to alterations of *O*-glycan profiles, a decrease in lamellipodium formation, and an unusual accumulation of glycoconjugates in the late endosomes and the lysosomes, which was probably due to enhanced macropinocytosis. These data indicate that *O*-glycosylation by *WBSOCR17* is involved in the uptake of extracellular fluid/solutes by a GlcNAc-dependent regulatory mechanism.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—COS7 (African green monkey kidney fibroblast) cells and HEK293T (human embryonic kidney) cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37 °C under 5% CO₂. For HEK293T cells, culture dishes were coated with 20 μ g/ml fibronectin (WAKO) for 6 h prior to plating the cells.

Plasmids and siRNA Transfection—Each of the cDNAs encoding the full-length mouse and human *WBSOCR17* was inserted into pcDNA6/Myc-His expression vector (Invitrogen). The plasmids were transfected with Effectene transfection reagent

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

gent (Qiagen). siRNAs against human *WBSR17* (siWBS17 siRNAs 1 and 2) and AllStar negative control siRNA (siNC) were purchased from Qiagen. The target sequences of siWBS17 were as follows: sequence 1, 5'-CTGGTTAGGGTGCA-CATATTA-3'; sequence 2, 5'-GTGGATGACAACAGCGA-CGAA-3'. siRNAs were transfected with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen).

Immunofluorescent Staining and Cell Staining with Lyso-tracker and Phalloidin—The cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed with phosphate-buffered saline (PBS) three times, and permeabilized with 0.05% saponin in PBS. The cells were then incubated in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h and then with primary antibodies or fluorescein-conjugated lectins in PBS containing 0.05% saponin and 0.1% BSA at 4 °C overnight. After rinsing with PBS three times, the cells were incubated with Alexa Fluor 488- or 594-conjugated secondary antibody (Invitrogen) at room temperature for 1 h. Following staining of the nuclei with Hoechst 33258, the samples were mounted and examined using a fluorescence microscope, Leica DMI 6000B.

Antibodies, Lectins, and Other Probes for Cell Staining—Antibodies and lectins used for Western blot analyses and immunofluorescent staining were as follows: rabbit polyclonal anti-Myc tag and LAMP2 antibodies (Abcam); concanavalin A (ConA) lectin conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen); mouse monoclonal anti-Bip/GRP78, GM130, EEA1, paxillin, and caveolin1 antibodies (BD Biosciences); mouse monoclonal anti-Golgi58K and clathrin heavy chain antibodies (Abcam); wheat germ agglutinin (WGA) lectin conjugated with Oregon Green 488 (Invitrogen); *Agaricus bisporus* agglutinin (ABA) lectin conjugated with biotin (J-Oil Mills); *Helix pomatia* agglutinin (HPA) lectin conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen); *Sambucus nigra* bark agglutinin (SNA) lectin conjugated with biotin (Vector Laboratories); phytohemagglutinin-L (PHL) lectin conjugated with biotin (J-Oil Mills); Jacalin lectin conjugated with fluorescein (Vector Laboratories); rabbit polyclonal anti-LC3 antibodies (MBL); rabbit polyclonal anti-Rab5, Rab7, Rab4, and Rab11 antibodies (Cell Signaling Technology); and rabbit polyclonal anti-actin antibodies (Sigma). To visualize the lysosomes and the actin filaments, LysoTracker Red DND-99 (Invitrogen) and Alexa Fluor 594 phalloidin (Invitrogen) were used, respectively.

Glycosidase Treatment—The protein lysates (20 µg) were digested with PNGase F (New England BioLabs) or endo- α -N-acetylgalactosaminidase (Seikagaku Corp.). The samples were boiled in 20 µl of denaturing buffer (1% SDS and 1% 2-mercaptoethanol) for 2 min and incubated with 1 unit of enzyme at 37 °C for 12 h.

Assay for Glycosyltransferase Activity—The construction and expression of soluble recombinant human *WBSR17* with His₆ and FLAG tags at the N terminus of the truncated *WBSR17* were carried out as described previously (9). The recombinant *WBSR17*, which was expressed in High Five cells using a baculovirus expression system and recovered in the conditioned medium, was purified by batch absorption of the tagged recombinant enzyme with anti-FLAG-M2 antibody affinity gel (Sigma) according to the manufacturer's protocol. The assay for glycosyltransferase activity was performed with

synthetic peptides as substrate at 37 °C for 40 h as described previously (9). Amino acid sequences of acceptor peptides are as follows: MUC1 (PAPGSTAPPK), MUC5AC-1 (TSAPGTTPSP), MUC5AC-2 (GTPSPVPTT), MUC5AC-3 (SPVPTTSTTS), and MUC7 (SATTPAPPSS).

RT-PCR and Real-time PCR Analysis—Total RNAs from HEK293T cells were prepared using Sepasol RNA I (Nacalai Tesque) and reverse-transcribed with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) at 55 °C for 1 h with oligo(dT) as primer. The cDNAs thus obtained were used as template for PCR, which was carried out with PrimeStar GXL DNA polymerase (Takara). Real-time quantitative PCR of *WBSR17* and *GAPDH* was performed using specific TaqMan probes, which were purchased from Applied Biosystems. Amplifications were run with the StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Primer sequences used were as follows: *WBSR17* (forward, 5'-TCAATCACACGCCACACAC-3'; reverse, 5'-GGTAGCGTTTTGTGGACATAC-3') and *GAPDH* (forward, 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'; reverse, 5'-TCGCTGT-TGAAGTCAGAGGAG-3').

Quantification of Cell Surface Area—The cells were observed by phase-contrast microscopy, and their digital images were captured. A hundred cells in an arbitrarily chosen area of the images were analyzed with ImageJ software to quantify cell surface area. The average area was obtained from three independent data sets.

Cell Surface Biotinylation—The cells were washed with ice-cold PBS and incubated with 1 mg/ml sulfo-succinimidyl biotin reagent (Thermo Scientific) in PBS at 4 °C for 30 min. To remove excess biotin reagent, the cells were incubated with DMEM at 4 °C for 15 min. The cells were then incubated in DMEM containing 10% FCS at 37 °C for 4 h. After the incubation, the cells were placed on ice, and biotin that had non-specifically bound to the plasma membrane was removed by adding 60 mM glutathione in PBS. After fixation of the cells with 4% PFA, biotin-conjugated cell surface proteins were detected with FITC-streptavidin.

Dextran and Transferrin Incorporation Assays—For dextran incorporation, the cells were cultured in 24-well plates for 72 h. Then the growth medium was removed, and the cells were cultured in medium containing 0.2 mg/ml FITC-dextran with M_r 3,000 or 10,000 (Invitrogen) at 4 or 37 °C for 30 min. For transferrin incorporation, the cells were preincubated in serum-free medium at 37 °C for 30 min and then cultured in medium containing 50 µg/ml FITC-transferrin (Invitrogen) at 4 or 37 °C for 15 min. Immediately after the incubation, the cells were washed with ice-cold PBS and then incubated with acid wash buffer (50 mM glycine/HCl, pH 3, containing 100 mM NaCl) at 4 °C to release cell surface-bound transferrin. For observation with a fluorescence microscope, the cells were fixed with 4% PFA, washed with PBS, and then stained with Hoechst 33258. The samples were mounted and examined using a fluorescence microscope, Leica DMI 6000B. To measure the dextran and transferrin incorporation, the cells were dissociated with enzyme-free cell dissociation buffer (Invitrogen), pelleted, and washed with PBS. Fluorescein intensity was determined with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). The median fluorescence value was determined for 10,000 cells.

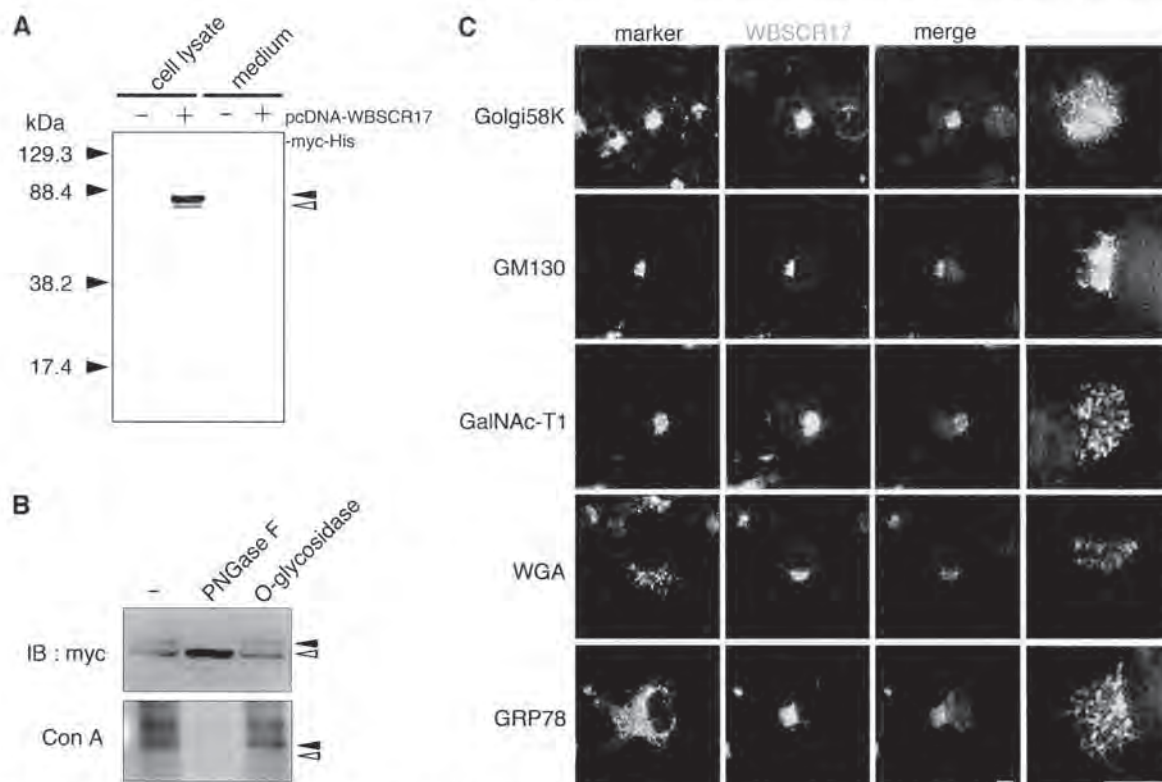


FIGURE 2. Characterization of recombinant WBSCR17 protein in COS7 cells. *A*, the culture medium and cell lysates were collected and analyzed by Western blotting with an anti-Myc antibody. Only in cell lysate of the WBSCR17 transfectant, two bands of about 80 and 71 kDa were observed. *Black* and *white* arrowheads indicate the upper and the lower bands, respectively. *B*, treatment of *N*-glycosidase PNGase F, but not *O*-glycosidase, led to a decrease in the 80-kDa form and increase in the 71-kDa form (*top*). The upper band positive for ConA staining was lost upon digestion with PNGase F (*bottom*). *Black* and *white* arrowheads indicate the upper and lower bands, respectively. *C*, subcellular localization of recombinant WBSCR17 in COS7 cells. The recombinant WBSCR17 was detected with anti-Myc antibody, and its subcellular localization was compared with that of several organelle markers: Golgi58K, Golgi; GM130, *cis*-Golgi; GalNAc-T1, *cis*-Golgi and medial Golgi; WGA, *trans*-Golgi; and Grp78, ER. The *rightmost* panels are *magnified* images of the *merged* panels. WBSCR17 was predominantly localized in the Golgi apparatus. Scale bars, 10 μ m. *IB*, immunoblot.

Metabolic Labeling of Glycoproteins with N-Azidoacetyl-galactosamine (GalNAz)—GalNAz (Invitrogen) labeling of glycoproteins was performed as reported previously (21). Briefly, 10 μ l of 100 mM GalNAz (Invitrogen) in ethanol was added to a 10-cm culture dish, and the ethanol was evaporated at room temperature. GalNAz was dissolved in 10 ml of DMEM containing 10% FCS and incubated for 2 h. The growth medium containing GalNAz was used for metabolic labeling of HEK293T cells cultured in the fibronectin-coated dish. The cells were collected, lysed, and visualized with the Click-IT tetramethylrhodamine protein analysis detection kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

RESULTS

Biological Characterization of WBSCR17—To analyze the biological roles of WBSCR17, we expressed recombinant WBSCR17 in COS7 cells and characterized its properties. For this purpose, mouse *WBSCR17* cDNA was inserted into a pcDNA6/Myc-His expression vector and transfected into COS7 cells. To detect the expression of the recombinant molecule, both the culture medium and the cell lysate were examined by reducing SDS-PAGE followed by Western blotting with

anti-Myc tag antibodies, identifying two bands of \sim 71 and 80 kDa only in the lysate of the transfected cells (Fig. 2*A*). With the calculated molecular mass of recombinant WBSCR17 being 71 kDa, the lower and the upper bands are most likely molecular forms without and with post-translational modifications, respectively. Because *in silico* analyses predicted *N*- and *O*-glycosylation sites in WBSCR17 (NetNGlyc 1.0 Server (22)³ and NetOGlyc 3.1 Server (23)), we examined whether it was glycosylated by lectin blotting analyses. ConA, which recognizes high mannose *N*-glycans, bound to the upper band (supplemental Fig. 1) of the transfected cells. When the cell lysate was digested with *O*-glycosidase or *N*-glycosidase PNGase F and detected with anti-Myc antibodies, only PNGase F affected the pattern, with the upper band decreased and the lower band concomitantly increased (Fig. 2*B*). In addition, PNGase treatment resulted in loss of the ConA-positive upper band. Thus, the upper and lower bands were those for *N*-glycosylated and unglycosylated forms of WBSCR17, respectively. We then examined its intracellular localization by immunostaining (Fig. 2*C*). The majority of recombinant WBSCR17 detected by anti-

³ R. Gupta, E. Jung, and S. Brunak, manuscript in preparation.

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

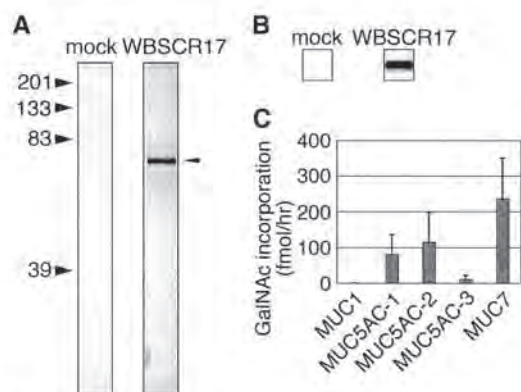


FIGURE 3. Purification and enzyme assay of WBSCR17. Recombinant soluble WBSCR17 was purified with anti-FLAG-M2 agarose. *A*, purified WBSCR17 was subjected to SDS-PAGE and silver-stained. An arrowhead indicates purified recombinant WBSCR17. *B*, Western blotting of purified recombinant WBSCR17 with an anti-FLAG antibody. *C*, assay for the enzymatic activity of purified WBSCR17 using several mucin peptides as acceptor substrates. WBSCR17 exhibited very low but detectable activity toward MUC5AC-1, MUC5AC-2, and MUC7 peptides. Data shown represent means \pm S.D. (error bars) of three independent experiments.

Myc antibody was co-localized with the Golgi markers, Golgi58K and GM130. In addition, GalNAc-T1, a *cis*-Golgi-localized isozyme (24), gave an almost superimposable staining pattern with WBSCR17. There was a small amount of WBSCR17 in the perinuclear region, where it partially co-localized with an endoplasmic reticulum (ER) marker, GRP78. No signal for WBSCR17 was found in the *trans*-Golgi network, which was positive for WGA. The immunostaining clearly demonstrated that WBSCR17 was predominantly localized in the Golgi apparatus, as is the case for the other GalNAc-Ts.

Assay of Recombinant WBSCR17 for Its Catalytic Activity—To characterize human WBSCR17 biochemically, we expressed it as a soluble recombinant form in insect cells using a baculovirus expression system. High Five cells were transfected with baculoviruses containing cDNA for the soluble WBSCR17 with His₆ and FLAG tags at its N terminus, and, 3 days later, the conditioned medium was recovered. Recombinant WBSCR17 in the medium was purified with anti-FLAG antibody affinity gel to homogeneity, as determined by silver staining of the SDS-polyacrylamide gel (Fig. 3*A*) and also by detection of the FLAG tag (Fig. 3*B*) on a PVDF membrane after Western blotting. We then assayed for enzymatic activity of the purified recombinant WBSCR17 using several mucin peptides as acceptor substrates. WBSCR17 exhibited very low but detectable activity toward some of the substrates. Among them, MUC7 peptide was the most efficient substrate, and MUC5AC-1 and -2 peptides were glycosylated as well but with less efficiency (Fig. 3*C*).

Roles of WBSCR17 in HEK293T Cells—To elucidate the roles of WBSCR17, we suppressed endogenous WBSCR17 in HEK293T cells with two siRNAs targeting at the distinct sequences. RT-PCR revealed that both siRNAs, but not control siRNA, suppressed the WBSCR17 mRNA expression (Fig. 4*A*). When HEK293T cells were cultured in the fibronectin (FN)-coated dish, they showed an epithelial-like phenotype and formed lamellipodium-like plasma membrane structures more efficiently than those in the absence of FN (Fig. 4*B* and supple-

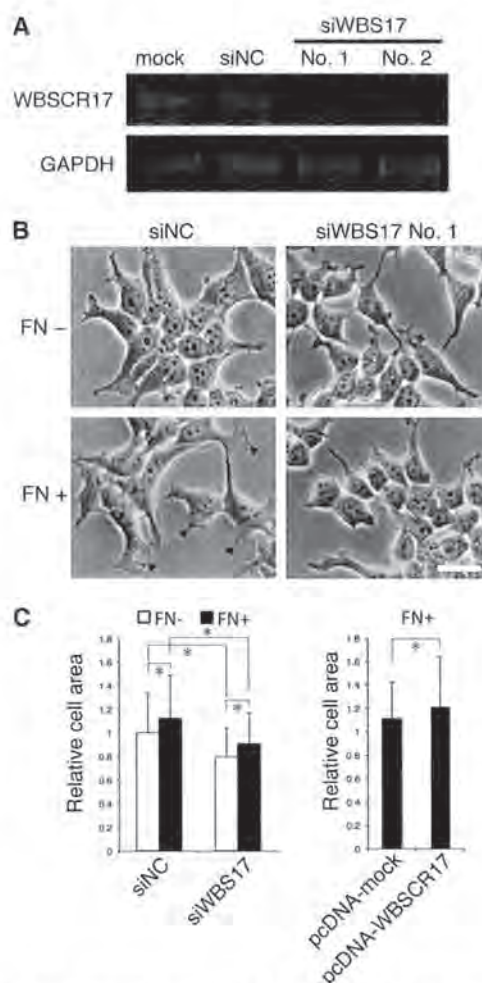


FIGURE 4. Suppression of WBSCR17 in HEK293T cells inhibits lamellipodium formation. *A*, validation of siRNA suppression by RT-PCR analysis. WBSCR17 mRNA levels were evaluated by RT-PCR using primers for WBSCR17. GAPDH mRNA was used as a control for equal gel loading. Two siRNAs against WBSCR17 (No. 1 and No. 2), but not control siRNA (siNC), suppressed the WBSCR17 mRNA expression. *B*, change of cell morphology by knockdown of WBSCR17. A dish coated with FN induced cell spreading and lamellipodium formation (bottom left, lamellipodia are indicated by arrowheads). HEK293T cells transfected with WBSCR17 siRNA remained round-shaped and did not form lamellipodia on the FN-coated dish. Scale bar, 20 μ m. *C*, measurement of cell surface area revealed the involvement of WBSCR17 in cell spreading. Cell surface area was quantified using ImageJ software. Suppression of WBSCR17 led to decreased cell area, whereas WBSCR17 overexpression gave rise to an increased area. Data shown represent means \pm S.D. (error bars) of three independent experiments. *, $p < 0.05$.

mental Fig. 2). By contrast, the cells with WBSCR17 suppressed (WBS17KD cells) showed an altered morphology with rounder and smaller appearances and almost completely lost the lamellipodium-like structures in the FN-coated dish (Fig. 4*B* and supplemental Fig. 2). Cells expressing protrusive structures, such as lamellipodia and filopodia, are generally more adhesive to a solid substratum and have a larger cell surface under microscopic observation than those without them (25). We therefore carried out morphometric analysis of cell surface area to measure cell spreading (Fig. 4*C*). The analysis showed that the aver-

age cell surface area of the control cells (siNC) cultured in the presence of FN was larger than that of the cells without FN. Knocking down WBS17KD in the cells with or without FN resulted in a decreased area, suggesting that WBS17KD positively modulates the lamellipodium-like structure and increases the adhesive nature of the cells. These findings were further corroborated by studies of WBS17KD overexpression. Overexpressed WBS17KD, in turn, increased the cell surface area, indicating the enhanced formation of protrusive structures.

We then investigated profiles in mucin-type O-glycosylation with lectin blotting, using total cell lysates prepared from the control and the WBS17KD cells. The lectins used were Jacalin, ABA, HPA, and SNA lectins, which predominantly recognize (Sia)Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr ((sialyl) T-antigen), (sialyl) T-antigen, non-reducing terminal α GalNAc, and Neu5Ac α 2-6Gal(NAc)-R, respectively (Fig. 5A). Analyses with Jacalin and ABA lectins revealed enhanced expression of \sim 100-kDa glycoproteins in the WBS17KD cells (Fig. 5, A and A'). HPA also detected the elevated expression of a band with similar but, to some extent, higher molecular weight (Fig. 5, A and A'). Decreased expressions of \sim 150- and \sim 170-kDa glycoproteins were recognized by ABA but not by the other lectins (Fig. 5A). By contrast, the control and the WBS17KD cells had essentially the same glycoprotein profiles as examined with SNA (Fig. 5A). Metabolic labeling of glycoconjugates containing GalNAc with GalNAz, an azide-modified GalNAc, demonstrated alterations in glycoprotein profiles of the WBS17KD cells (Fig. 5B). There were high molecular mass (150–180 kDa) bands with decreased expression, together with the changes in the expression of 70–90-kDa glycoproteins. The increase in \sim 100-kDa glycoproteins recognized by Jacalin and ABA lectins was not observed by GalNAz labeling (Fig. 5B). Next, we overexpressed WBS17KD and carried out lectin blot analysis with an ABA lectin (Fig. 5, C and C'). The overexpression of WBS17KD revealed a weak but significant increase in the expression of \sim 150-kDa glycoproteins, which may correspond to some of the decreased bands in the WBS17KD cells. No other significant changes were observed (Fig. 5C). Some of the changes observed for the carbohydrate profiles were subtle, but these changes were highly reproducible. We repeated the same experiments more than three times, and the representative data are presented.

These studies demonstrated that the modulation of WBS17KD expression in the cells alters their glycoprotein expression profiles. It should be noted that minor but significant changes in O-glycosylation profiles were observed in the WBS17KD cells, under the conditions where only WBS17KD, whose catalytic activity is very low, was suppressed, with the other isozymes remaining unchanged. This indicates that WBS17KD is involved in O-glycosylation in the cells.

To investigate the localization of glycoproteins in the cells, lectin staining was performed using fluorescence-labeled lectins. We first used a PHL lectin, which binds to complex N-glycans (Fig. 5D and supplemental Fig. 3). This lectin stained the *trans*-Golgi network most strongly in the control cells, but, interestingly, unusually large vesicles with a diameter of \sim 2 μ m, which were distributed widely in the cytoplasm, were

stained in the WBS17KD cells. Fig. 5E and supplemental Fig. 3 show the staining with Jacalin, ConA, and WGA lectins. In the control cells, Jacalin and WGA predominantly stained the Golgi apparatus, whereas ER was strongly stained with ConA. We found that all of these lectins similarly stained the large vesicles in the cytoplasm in the WBS17KD cells. Taken together, the data so far suggest that WBS17KD is involved in lamellipodium formation, O-glycosylation, and the intracellular transport of glycoconjugates.

Cytoplasmic Vesicles Are Positive for a Lysosome Marker—To characterize the cytoplasmic vesicles, double labeling with fluorescein-labeled lectins (PHL, Jacalin, and WGA) and antibodies toward organelle markers was performed. The large vesicles positive for the PHL lectin staining in the WBS17KD cells did not overlap with the Golgi or ER markers, Golgi58K and GRP78, the cellular localization of which was not affected (supplemental Fig. 4). They also did not co-localize with an early endosome marker, EEA1 (Fig. 6A), but a lysosome marker, LAMP2, was found in the large vesicles that were positive for PHL in the knockdown cells (Fig. 6B). Interestingly, in the WBS17KD cells, the phenotypes of the vesicles positive for both EEA1 and LAMP2 were affected, with a larger structure than those in the control (Fig. 6, A and B). These data suggest that WBS17KD is involved in regulation of the endosome/lysosome pathway and that its suppression disturbs the normal membrane trafficking, resulting in the accumulation of glycoconjugates incorporated in the plasma membrane in the transport vesicles and the enlargement of the vesicles. To examine this possibility, we analyzed the transport of membrane proteins by the cell surface biotinylation assay. In the assay, cell surface proteins of HEK293T cells were biotinylated, the cells were cultured for 4 h, and then the biotinylated proteins were reacted with FITC-streptavidin and analyzed. In the WBS17KD cells, most of the biotinylated membrane proteins were internalized into the cells and accumulated in the large vesicles (Fig. 6C), whereas those of the control cells were mainly associated on the cell surface with a small portion incorporated into small vesicles. These data clearly demonstrate that, upon the suppression of WBS17KD, the cell surface glycoconjugates were incorporated into the cells and accumulated in the large vesicles.

WBS17KD Regulates Macropinocytosis—The observations that the knockdown of WBS17KD led to the accumulation of the glycoconjugates in the vesicles that were positive for LAMP2 staining (Fig. 6B), together with a previous report showing the involvement of WBS17KD in bulk endocytosis (13), prompted us to investigate whether WBS17KD regulates fluid phase endocytosis. For this purpose, a dextran incorporation assay was carried out, in which fluorescein-conjugated dextran (M_r 3,000 and 10,000) was added to the culture medium, and endocytosed dextran was observed by fluorescence microscopy (Fig. 7A) and quantified by flow cytometry (Fig. 7, B–E). Dextran M_r 3,000 (small) is a marker for all types of pinocytosis, such as receptor-mediated endocytosis and macropinocytosis, and M_r 10,000 dextran (large) is endocytosed primarily through macropinocytosis (26, 27). Fluorescent microscopic observations of the incorporated small M_r 3,000 dextran in the control cells revealed that the fluorescent signals were associated with small vesicles (Fig. 7A). However, in the WBS17KD

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

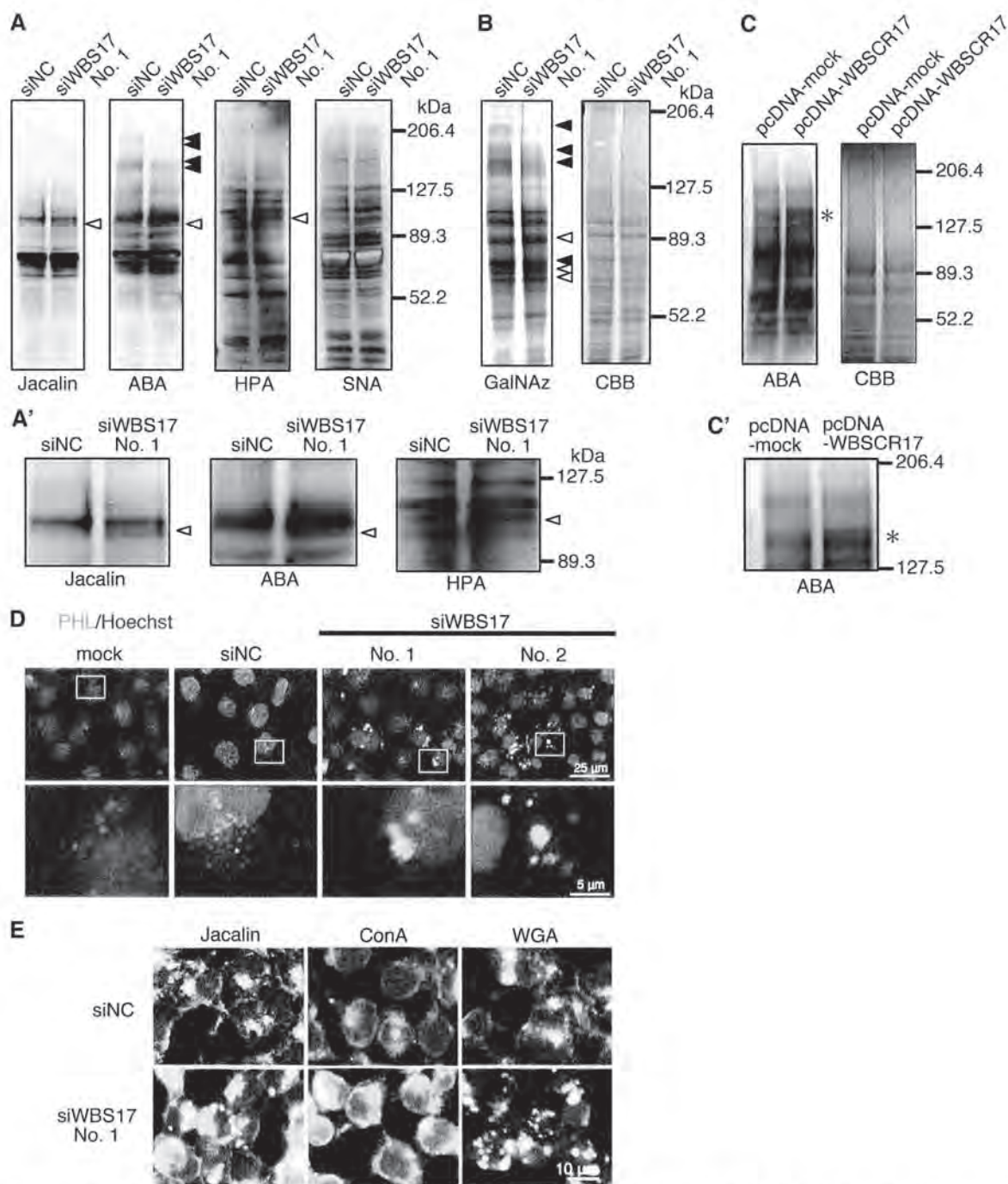


FIGURE 5. Alterations of O-glycan profiles and intracellular accumulation of glycoconjugates in the WBS17KD cells. A and A', profiles of glycoproteins in the cell lysates from control and WBS17KD cells were examined with Jacalin, ABA, HPA, and SNA lectins. Black and white arrowheads indicate down-regulated and up-regulated glycoproteins, respectively. The magnified images of bands of ~100 kDa that were up-regulated in the knockdown cells (A) are shown in A'. B, metabolic labeling of glycoproteins with GalNAz, an azide-modified GalNAc. Cell lysates were prepared from the cells that were labeled with GalNAz. GalNAz-labeled glycoproteins in cell lysate were chemically conjugated with tetramethylrhodamine, subjected to SDS-PAGE, and detected by fluorescence observation. Total proteins were stained by Coomassie Brilliant Blue (CBB). There were changes in O-glycan profiles in the WBS17KD cells. Black and white arrowheads indicate down-regulated and up-regulated O-glycans, respectively. C and C', lectin blot analysis with ABA detected enhanced expressions of ~150-kDa O-glycoproteins (indicated by an asterisk) in the cells with WBSCR17 overexpressed. C', a magnified image of C. D and E, lectin staining of HEK293T cells with a PHL lectin (D) and Jacalin, ConA, and WGA lectins (E). Intracellular accumulations of glycoconjugates that were positive for all of the lectins used were detected in WBSCR17 siRNA transfectants. The bottom panels in both D and E are magnified images of the boxed areas in the top panels.

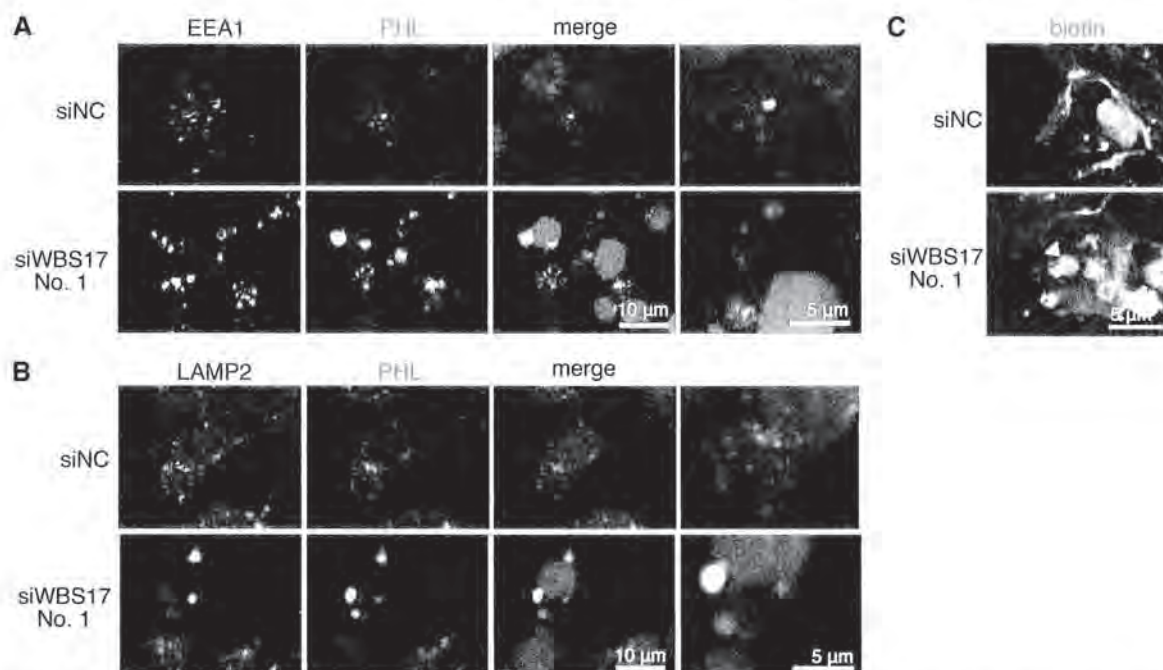


FIGURE 6. Accumulation of glycoconjugates in the lysosomes in the WBS17KD cells. Two days after the transfection of siRNAs, HEK293T cells were stained with fluorescence-labeled PHL lectin and antibodies against organelle markers: EEA1 for early endosomes (A) and LAMP2 for lysosomes (B). The glycoconjugates positive for PHL accumulated in the vesicles that are labeled with LAMP2 but not with EEA1. The vesicles that were positive for either EEA1 or LAMP2 were enlarged in the WBS17KD cells. The *rightmost panels* are *magnified images of the merged panels*. C, cell surface proteins of HEK293T cells were biotinylated, the cells were cultured for 4 h, and then the biotinylated proteins were reacted with FITC-streptavidin and analyzed. The analysis revealed increased internalization of plasma membrane proteins to large vesicles (indicated by an *arrowhead*).

cells, the incorporated small dextran was found in large vesicles as well as in small ones (Fig. 7A and supplemental Fig. 5). Flow cytometry showed that the amount of incorporated small dextran was essentially the same between the control and the WBS17KD cells (Fig. 7, B and D). Contrary to this, the incorporation of the large dextran into the WBS17KD cells was ~ 1.4 times higher than that in the control cells (Fig. 7D), and there was a population of cells with stronger fluorescent signals that appeared as a small shoulder in flow cytometry analysis (Fig. 7C). We then overexpressed WBS17 to confirm that the elevated macropinocytosis is due to its suppression. Fig. 7E shows that WBS17 expressed in the cells suppressed the macropinocytosis (*i.e.* the incorporation of large dextran) to a level as low as about half that of the control. The macropinocytosis increased by the siRNA fell to $\sim 70\%$ of that of the control after the overexpression of WBS17. Thus, WBS17 negatively regulates macropinocytosis. We then labeled the cells with large dextran and LysoTracker, a lysosome marker. In the control cells, the incorporated dextran generally did not overlap with LysoTracker (Fig. 8A). The WBS17KD cells, on the other hand, contained large vesicles that were positive for both dextran and LysoTracker (Fig. 8A), which clearly demonstrates the fusion of macropinosomes with lysosomes after their entry into and migration in the cells. We also found large vesicles that were positive for dextran and negative for LysoTracker, which indicates that the vesicles on the way to the lysosomes were already enlarged. Furthermore, we investigated whether the macropinocytosis-related events were influenced by the

WBS17 knockdown. Because macropinosomes are formed from actin-rich ruffles of the plasma membrane, we examined the localization of actin filaments in the WBS17KD cells (Fig. 8B). Compared with the control cells, where actin filaments were distributed throughout the cytoplasm, the WBS17KD cells showed an overall decrease in F-actin, which corresponds to decreased lamellipodia, and had characteristic actin-rich ruffles (see Fig. 8B, *inset*), the structures typical of macropinocytosis. Paxillin is a scaffold protein localized to the intracellular surface of cell adhesion sites to the extracellular matrix. The decrease in paxillin in the WBS17KD cells suggests the less adhesive nature of the knockdown cells (Fig. 8B and supplemental Fig. 6). No overlapping expression of paxillin and actin filaments indicates that the actin-rich extensions were of dynamic organization. We also investigated the distribution of LC3, a major constituent of autophagosomes, which had been recently reported to be recruited to macropinosomes and facilitate their fusion with lysosomes (19). Although LC3 was uniformly distributed in the control cells, the WBS17KD cells had LC3 accumulated in the large vesicles positive for PHL staining (Fig. 8C). This indicates the fusion of dextran-positive vesicles incorporated by macropinocytosis with the lysosomes.

Suppression of WBS17 Does Not Affect Clathrin- and Caveolin-dependent Endocytosis—To investigate how WBS17 is involved in other membrane transport and trafficking, we examined the expression of endosomal and lysosomal markers. The fluorescein-conjugated transferrin (Tf) incorporation assay was employed to investigate the clathrin-dependent

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

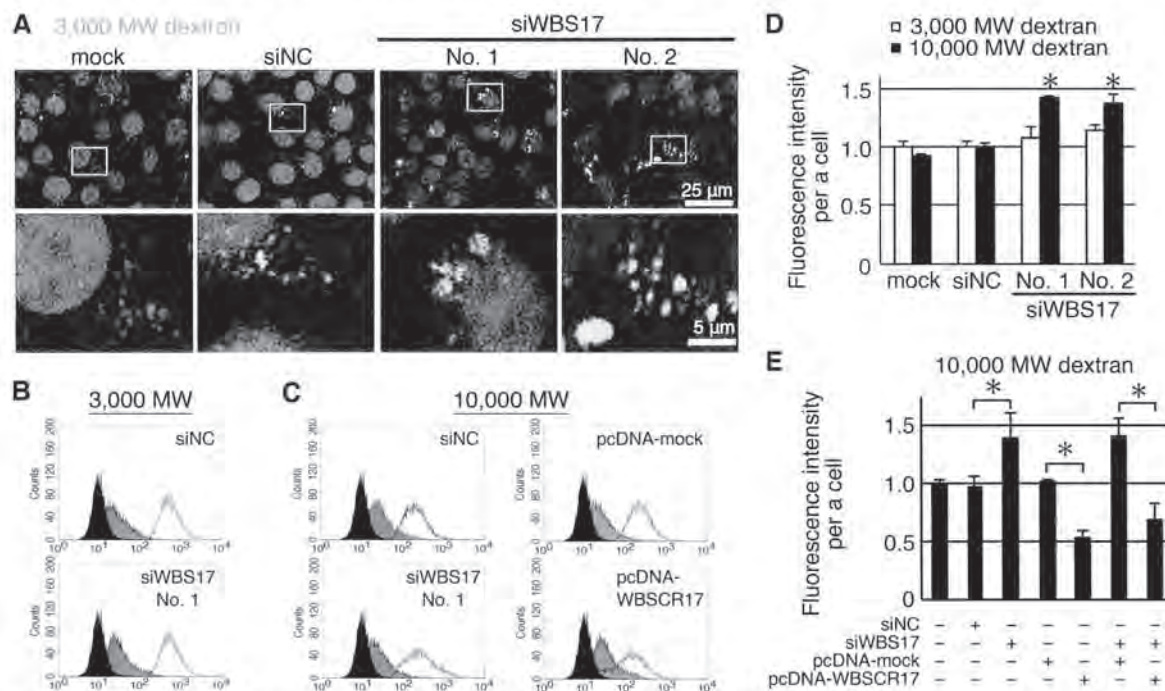


FIGURE 7. WBS17 regulates fluid phase endocytosis. *A*, labeling with fluorescein-conjugated dextran *M*, 3,000. The cells were labeled with *M*, 3,000 dextran to visualize the fluid phase endocytosis. Fluorescence microscopic observation revealed large vesicles containing dextran in the WBS17KD cells. The bottom panels are magnified images of the boxed areas in the top panels. *B* and *C*, flow cytometric analysis of cells labeled with *M*, 3,000 (*B*) and *M*, 10,000 (*C*) dextran. Black lines, incorporation at 37 °C; gray areas, incorporation at 4 °C; black areas, without dextran. Histograms are representative of three independent experiments. *D* and *E*, fluorescence intensity of the cells as determined by flow cytometry. Data shown represent means \pm S.D. (error bars) of three independent experiments. *, $p < 0.05$. *D*, knocking down WBS17 enhanced uptake of *M*, 10,000 dextran but not that of *M*, 3,000 dextran. *E*, overexpression of WBS17 inhibited incorporation of *M*, 10,000 dextran and rescued the effect of WBS17 siRNA.

endocytic pathways. After incubating the cells with fluorescent Tf, the incorporated Tf was analyzed by microscopy (Fig. 9A) and by flow cytometry (Fig. 9B). There were no significant differences in the Tf localization or in the amount of Tf incorporation between the control and the knockdown cells. We then investigated the expression of several markers and molecules for membrane trafficking. To examine the receptor-dependent endosome formation, the expression of clathrin heavy chain (Fig. 9, C and D) and caveolin 1 (Fig. 9D) was investigated by Western blotting and/or immunostaining. They had similar expression patterns in the control and WBS17KD cells, demonstrating that the macropinocytosis elevated by WBS17 suppression was independent of the clathrin- and caveolin-dependent endosome formation. We also investigated expression of marker molecules involved in intracellular membrane trafficking by Western blotting. Concerning EEA1 and Rab5, early endosome markers that are required for endosome fusion, we observed that EEA1 was decreased in the knockdown cells (Fig. 9C), but Rab5 exhibited unchanged expression (Fig. 9C). Immunofluorescent staining of Rab5, however, demonstrated that it was associated with the large vesicles in the knockdown cells (Fig. 9D). Despite the EEA1 decrease, the fusion required to form endosomes seemed unaffected in the knockdown cells because they had large EEA1-positive vesicles (Fig. 6A). Rab4 is an early recycling endosome marker, which is involved in membrane retrieval from the early endosome to the plasma membrane, and its expression was decreased in the WBS17KD cells

(Fig. 9, C and D). By contrast, Rab7 is a late endosomal marker that mediates the fusion of the vesicles from early endosomes with late endosomes, and its expression was markedly enhanced (Fig. 9C) and was associated with large PHL-positive vesicles (Fig. 9D) in the knockdown cells. The imbalance of Rab4/Rab7 expression may direct the vesicle transport more to late endosomes/lysosomes than to the plasma membrane in the WBS17KD cells, generating the large endosomal/lysosomal vesicles. There were no significant changes in the amount of LAMP2 (a lysosome marker) (Fig. 9C) and Rab11 (a late recycling endosome marker) (Fig. 9, C and D). These findings indicate that WBS17 is not involved in the clathrin- and caveolin-dependent endosome formation but in the receptor-independent macropinocytosis and the following intracellular membrane trafficking above all between the early endosomes and the late endosomes/lysosomes.

A High Concentration of GlcNAc Induces WBS17 Expression in HEK293T Cells—A previous report showed that, using microarray analysis, HEK293T cells cultured in 60 mM GlcNAc have enhanced expression of several genes, including WBS17 (13). We carried out RT-PCR and real-time PCR analyses to make sure of the enhanced WBS17 expression. HEK293T cells were cultured in medium including 0, 50, and 100 mM GlcNAc for 2 days, and the expression of WBS17 mRNA was measured, showing its \sim 10- and \sim 5-fold increases for 50 and 100 mM GlcNAc, respectively (Fig. 10, A and B). Furthermore, we examined the influences of the high concen-

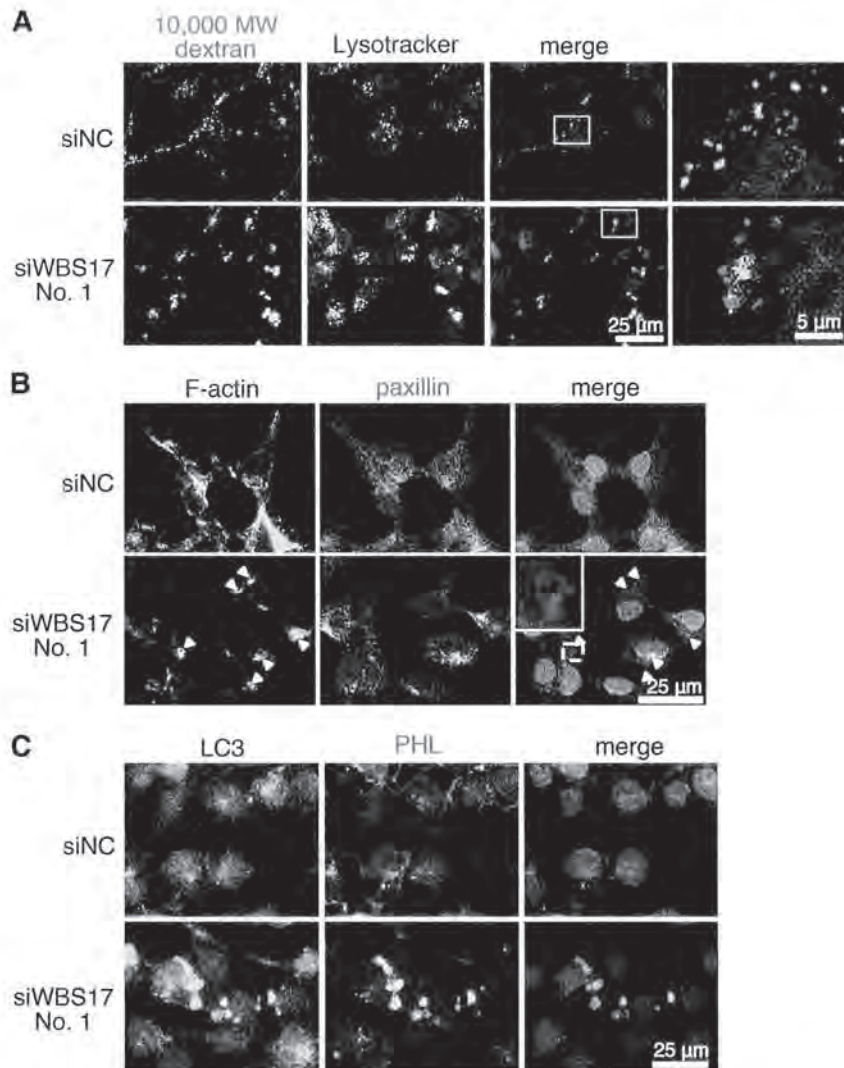


FIGURE 8. **WBSR17 regulates macropinosome formation.** *A*, co-labeling of the cells with *M*, 10,000 dextran and Lysotracker, a lysosome marker. In the control cells, most of the vesicles positive for dextran were small and not stained with Lysotracker. The WBS17KD cells, on the other hand, had large vesicles co-labeled with dextran and Lysotracker. The rightmost panels are magnified images of the boxed areas in the merged panels. *B*, staining of HEK293T cells with phalloidin, which binds to F-actin, and with anti-paxillin antibody. The arrowheads indicate actin-rich round-shaped rufflings in the WBS17KD cells. The top left corner of the merged image of the knockdown cells is a magnified image of the boxed area. *C*, staining of HEK293T cells with antibody to LC3 and a PHL lectin. In the WBS17KD cells, LC3 was associated with the large vesicles positive for PHL staining.

tration GlcNAc treatment on mucin-type *O*-glycosylation. We prepared total cell lysates from the cells with or without the GlcNAc treatment and carried out lectin blot analyses with an ABA lectin. The analysis revealed enhanced expression of several glycoproteins with relatively high molecular weights (Fig. 10C). This may indicate the up-regulation of several glycosyltransferases involved in mucin-type carbohydrates, including WBSR17 (13). An elevated concentration of UDP-GalNAc may account for the increased *O*-glycosylation as well because GlcNAc incorporated into the cells is metabolized into UDP-GlcNAc, which is convertible to UDP-GalNAc (13). Decreases in cell proliferation and dextran incorporation by the GlcNAc treatment were also observed as reported previously

(Fig. 10D) (13). These data suggest that WBSR17 regulates macropinocytosis through *O*-glycosylation under the control of GlcNAc concentration.

DISCUSSION

It has been widely believed that mucin-type *O*-glycosylation is initiated in the Golgi apparatus (24). This idea was supported by reports showing the Golgi localization of GalNAc-T1, -T2, -T3, and -T6 (24, 28). A recent report, however, demonstrated that GalNAc-T2 is redistributed from the Golgi to the ER after the activation of a Src kinase by EGF and that the relocalization may be related to the increased *O*-glycosylation in cancer cells (29, 30). More recently, GalNAc-T18, a member of the Y sub-

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

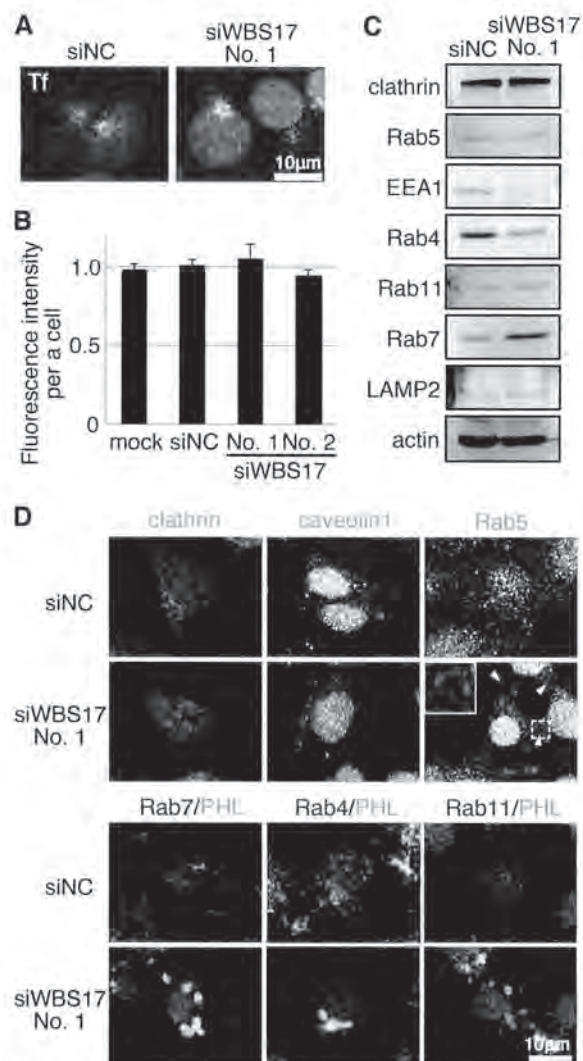


FIGURE 9. Suppression of WBS17 does not affect clathrin- and caveolin-dependent endocytic pathways. *A*, clathrin-dependent endocytic pathways. A fluorescein-conjugated Tf incorporation assay was performed to detect clathrin-dependent endocytosis. *B*, determination of Tf incorporation by flow cytometry. The suppression of *WBS17* did not affect the Tf incorporation significantly. Data shown represent means \pm S.D. (error bars) of three independent experiments. *C*, Western blot analysis of endosomal and lysosomal markers. *clathrin*, clathrin heavy chain; *Rab5*, an early endosomal marker; *EEA1*, an early endosomal marker 1; *Rab4*, an early recycling endosome marker; *Rab11*, a late recycling endosome marker; *Rab7*, a late endosomal marker; *LAMP2*, a lysosomal marker; *actin*, a loading control. The expressions of clathrin heavy chain, *Rab5*, and *Rab11* were not affected by the knockdown of *WBS17*. By contrast, in the *WBS17*KD cells, there were an increase in *Rab7* and a decrease in *Rab4*. *D*, labeling of the cells with a lectin and antibodies to the endosome markers. No changes were observed for clathrin and caveolin. *Rab5* was associated with the large vesicles in *WBS17*KD cells (indicated by arrowheads). The top left corner of the *Rab5* image of the knockdown cells is a magnified image of the boxed area. PHL-positive staining in the *WBS17*KD cells was positive for *Rab7*.

family, was reported to be localized in the ER in lung carcinoma cells (6). Our present study on *WBS17* demonstrated its predominant localization in the Golgi (Fig. 2C). Our preliminary experiments showed that the EGF treatment of the cells did not

change its localization (data not shown). This may reflect the isoform-specific localization and redistribution of GalNAc-Ts.

Our previous study on the structure-function relationship of GalNAc-T1 indicated that the substitutions of several amino acid residues resulted in loss or decrease of the activity (10). The Trp residue in the Gal/GalNAc-T motif (Fig. 1) is one of the most important elements in the motif, the replacement of which by Tyr led to reduced activity by \sim 70% for GalNAc-T1 (10). Li *et al.* (6) recently designated a GalNAc-T subfamily consisting of GalNAc-T8, -T9, -T18, and *WBS17* as the Y subfamily because they all have the Trp (W)-to-Tyr (Y) replacement. They also reported that the Y isozymes are inactive under the classical assay using peptide substrates and raised the possibility that GalNAc-T18, which is co-localized with GalNAc-T2 in the ER, functions as a chaperone that modulates the activity of the other W subfamily GalNAc-Ts. In agreement with their hypothesis, the catalytic activity of *WBS17* detected was less than 1% of that of GalNAc-T1 when assayed with typical mucin peptides as substrates (Fig. 3C). This suggests that *WBS17* might be a chaperone or otherwise function as an enzyme glycosylating defined substrates with sequences distinct from mucins. It would therefore be reasonable to speculate that *WBS17* is involved in the glycosylation of a small subset of glycoproteins rather than overall glycosylation in the cell. In fact, the impact of suppression/overexpression of *WBS17* was restricted to a few proteins (Fig. 5, A–C). Taken together, altered *O*-glycosylation in association with the *WBS17* suppression/overexpression indicated that it is involved in regulation or synthesis of *O*-glycans.

In the lectin blot analyses of *O*-glycosylation in the *WBS17*KD cells, we observed elevated expression of glycoproteins in addition to the decreased bands. The cause of this increase is not clear, but it may be ascribed to enhanced expression of *O*-glycosylated proteins that are responsible for the novel properties acquired in the knockdown cells, such as decreased lamellipodia and modulated membrane trafficking. To clarify the roles of *WBS17* in detail, we are identifying the glycoproteins, the expressions of which were affected by the suppression/overexpression of *WBS17*. In addition, an extensive analysis of the *WBS17* activity toward random peptides including glycopeptides is under way.

Mucin-type glycans modulate the adhesion between the cells and between cells and extracellular matrix. There are some reports describing the involvement of *O*-glycosylation in integrin-mediated cell adhesion. For example, sialyl-Tn epitopes on β 1 integrin impair the mammalian carcinoma cell migration on fibronectin (31). In addition, in *Drosophila*, *O*-glycosylation of tigrin, an integrin ligand, is essential for its proper secretion and localization to interact with integrin (32). The treatment of HT29 cells with *O*-benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminide, a competitive substrate for the elongation of *O*-glycans, induces the predominant accumulation of β 1 integrin in the late endosomes as a result of perturbing the endocytic pathway (14). It is also possible that *WBS17* regulates the cell adhesion through the formation of focal adhesion between integrins and fibronectin because it was necessary for the lamellipodium formation induced by fibronectin (Fig. 4B) and that its suppression led to the decrease in the actin filaments and paxillin (Fig. 8B

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

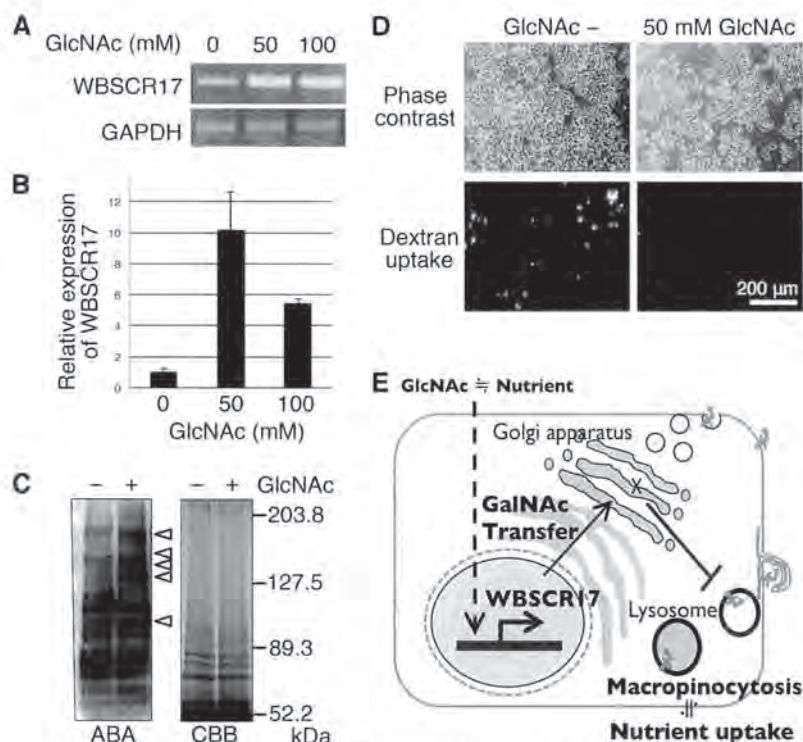


FIGURE 10. Up-regulation of WBSR17 mRNA and O-glycosylation in response to concentration of GlcNAc. The expression of WBSR17 was examined by RT-PCR (A) and real-time PCR (B) in the HEK 293T cells that were treated with or without a high concentration of GlcNAc. The treatment with GlcNAc up-regulated WBSR17 mRNA. Data shown represent means \pm S.D. (error bars) of three independent experiments. C, ABA lectin blot analysis of glycoproteins in the cell lysates. The GlcNAc treatment enhanced the expression of ABA-positive proteins with relatively high molecular weight as indicated by arrowheads (left). Total proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) (right). D, a high concentration of GlcNAc inhibited proliferation and fluid phase endocytosis. The bottom panels show incorporated high molecular weight dextran through macropinocytosis. E, a hypothetical scheme of the role of WBSR17. The expression of WBSR17 corresponds to the nutrient concentration as exemplified by environmental GlcNAc and may work as a modulator of nutrient uptake through controlling macropinocytosis in the cells.

and supplemental Fig. 6). We therefore examined the subcellular distribution of β 1 integrin, a subunit of fibronectin receptors, which is expressed in HEK293T cells, and found that its expression in both the control and the WBS17KD cells was essentially the same, located on the plasma membrane without accumulation in the intracellular vesicles (data not shown). The suppression of WBSR17 did not affect the expression of Rab11 (Fig. 9, C and D), which recycles β 1 integrin from the late endosomes to the plasma membrane (33). Judging from the subcellular localization of integrin, the impact of the WBSR17 suppression on the membrane trafficking seems different from the influences by the O-benzyl-N-acetyl- α -D-galactosaminide treatment.

The WBS17KD cells exhibited the accumulation of glycoconjugates in the lysosomes (Fig. 5, D and E), which were enlarged and positive for LAMP2 (Fig. 6B). Glycoconjugate accumulation is a characteristic phenotype of lysosomal storage diseases that are caused by defects of lysosomal enzymes (34). It is not clear why the glycoconjugates remain in the WBS17KD lysosomes, escaping from degradation by lysosomal enzymes, but WBSR17 may be involved in regulation and/or transport of the enzymes, and its suppression may cause dysfunction of the lysosomes. We also observed that the EEA1-positive vesicles were enlarged in the WBS17KD cells (Fig. 6A).

WBSR17 may be involved in regulation of the endosome/lysosome pathway. In accordance with this idea, its suppression enhanced macropinocytosis, which may produce enlarged EEA1-positive vesicles that take up the cell surface glycoconjugates. The amount of glycoconjugates in the EEA1-positive vesicles seems insufficient to be detected by lectin staining (Fig. 6A). The EEA1-positive vesicles are usually transported and fused with the lysosomes. The lysosomes after the fusion, if their function were disabled, would accumulate a large amount of glycoconjugates and be positive for the lectin staining (Fig. 6B). The formation of an excess amount of macropinosomes and their fusion with the lysosomes may have deleterious effects on lysosome function, resulting in the accumulation of glycoconjugates within them.

Macropinocytosis is clathrin-independent actin-driven large size endocytosis (18). It is sometimes hard to analyze macropinocytosis due to the absence of useful markers or cargo. To confirm that macropinocytosis is elevated in the WBS17KD cells, we obtained four lines of evidence: 1) the occurrence of large EEA1-positive vesicles (Fig. 6A); 2) the increase in fluid phase endocytosis, as demonstrated by the elevated uptake of large dextran, a macropinocytosis marker (Fig. 7, D and E); 3) the formation of membrane ruffling positive for actin filaments (Fig. 8B), which is a hallmark of macropinocytosis; and 4) the

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

accumulation of LC3 in the large vesicles (Fig. 8C). LC3, which has been known as an autophagy marker, was recently reported to be recruited to macropinosomes (19). We also examined if autophagy was elevated in the knockdown cells and found that, in both the control and the WBS17KD cells, no recruitment of Atg12, which is involved in autophagosome formation (35), to the vesicles was seen; no double-membrane structures of autophagosome were found by electron microscopic observation (data not shown). WBS17 thus controls the membrane trafficking by negatively regulating macropinocytosis.

We confirmed that the treatment of HEK293T cells with a high concentration of GlcNAc induces *WBS17* mRNA expression, as reported previously (13), and demonstrated that overexpression of *WBS17* negatively regulates macropinocytosis. Extracellular GlcNAc is incorporated into the cytosol by bulk phase endocytosis and salvaged into UDP-GlcNAc, which leads to the increase in branched *N*-glycans on cell surface chemokine receptors. This enhances affinities between the glycoproteins and galectins, thereby forming the galectin lattice and protecting the glycoproteins from endocytosis (13, 36). Our study suggests that the mucin-type *O*-glycans generated by *WBS17* also regulate the glycoprotein incorporation through macropinocytosis in response to the GlcNAc concentration in the cell. Because UDP-GlcNAc, which is convertible to UDP-GalNAc by an epimerase, can be metabolically produced from nutrients other than GlcNAc, such as glucose, amino acids, fatty acids, and nucleic acids (37, 38), *WBS17* may work as a modulator of macropinocytosis in the cells in a nutrition concentration-dependent manner; excess nutrition enhances the expression of *WBS17*, giving rise to the reduced macropinocytosis, whereas nutrition shortage, in turn, reduces *WBS17* and promotes macropinocytosis to take up the nutrients from the environmental solutes (Fig. 10E).

In this study, we found that a vertebrate-specific *WBS17* regulates cell adhesion and macropinocytosis in response to the nutrient concentration. This finding provides a novel hypothesis that mucin-type *O*-glycosylation is involved in the regulation of dynamic membrane trafficking. Because *WBS17* is mainly expressed in the nervous system (6, 9, 11) and is related to WBS (11, 12), it should be functionally important in the brain. It was recently reported that the endocytic pathways, including macropinocytosis as well as cell adhesion, are involved in neuronal development (27, 39, 40). Moreover, we found that *WBS17* in zebrafish is involved in the regulation of axonal projections in the hindbrain.⁴ Thus, it would be tempting to speculate that *WBS17* regulates neuronal events, such as axonal guidance and filopodium/lamellipodium formation, through the control of membrane trafficking. A study to examine the roles of mucin-type *O*-glycosylation produced by *WBS17* in cell adhesion or macropinocytosis is under way.

Acknowledgment—We thank Professor Nobuhiro Nakamura (Kyoto Sangyo University) for helpful advice and discussions.

⁴ N. Nakamura, Y. Nakayama, M. Tawara, K. Nishimura, A. Miyake, N. Itoh, and A. Kurosaka, manuscript in preparation.

REFERENCES

1. Fukuda, M. (2002) Roles of mucin-type *O*-glycans in cell adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* **1573**, 394–405
2. Gerloni, M., Castiglioni, P., and Zanetti, M. (2005) The cooperation between two CD4 T cells induces tumor protective immunity in MUC.1 transgenic mice. *J. Immunol.* **175**, 6551–6559
3. Ogata, S., Uehara, H., Chen, A., and Itzkowitz, S. H. (1992) Mucin gene expression in colonic tissues and cell lines. *Cancer Res.* **52**, 5971–5978
4. Varki, A., and Angata, T. (2006) Siglecs. The major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* **16**, 1R–27R
5. Elhammer, A. P., Kézdy, F. J., and Kurosaka, A. (1999) The acceptor specificity of UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycoconj. J.* **16**, 171–180
6. Li, X., Wang, J., Li, W., Xu, Y., Shao, D., Xie, Y., Xie, W., Kubota, T., Narimatsu, H., and Zhang, Y. (2012) Characterization of ppGalNAc-T18, a member of the vertebrate-specific Y subfamily of UDP-*N*-acetyl- α -D-galactosamine. Polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* **22**, 602–615
7. Raman, J., Guan, Y., Perrine, C. L., Gerken, T. A., and Tabak, L. A. (2012) UDP-*N*-Acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases. Completion of the family tree. *Glycobiology* **22**, 768–777
8. Peng, C., Togayachi, A., Kwon, Y. D., Xie, C., Wu, G., Zou, X., Sato, T., Ito, H., Tachibana, K., Kubota, T., Noce, T., Narimatsu, H., and Zhang, Y. (2010) Identification of a novel human UDP-GalNAc transferase with unique catalytic activity and expression profile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 680–686
9. 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
10. Tenno, M., Saeki, A., Elhammer, A. P., and Kurosaka, A. (2007) Function of conserved aromatic residues in the Gal/GalNAc-glycosyltransferase motif of UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 1. *FEBS J.* **274**, 6037–6045
11. Merla, G., UCLA, C., Guipponi, M., and Reymond, A. (2002) Identification of additional transcripts in the Williams-Beuren syndrome critical region. *Hum. Genet.* **110**, 429–438
12. Hinsley, T. A., Cunliffe, P., Tipney, H. J., Brass, A., and Tassabehji, M. (2004) Comparison of TFI1 gene family members deleted in Williams-Beuren syndrome. *Protein Sci.* **13**, 2588–2599
13. Lau, K. S., Khan, S., and Dennis, J. W. (2008) Genome-scale identification of UDP-GlcNAc-dependent pathways. *Proteomics* **8**, 3294–3302
14. Ulloa, F., and Real, F. X. (2003) Benzyl-*N*-acetyl- α -D-galactosaminide induces a storage disease-like phenotype by perturbing the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 12374–12383
15. Altschuler, Y., Kinlough, C. L., Poland, P. A., Bruns, J. B., Apodaca, G., Weisz, O. A., and Hughey, R. P. (2000) Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol. Biol. Cell* **11**, 819–831
16. Hisatsune, A., Kawasaki, M., Nakayama, H., Mikami, Y., Miyata, T., Isohama, Y., Katsuki, H., and Kim, K. C. (2009) Internalization of MUC1 by anti-MUC1 antibody from cell membrane through the macropinocytotic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 677–682
17. Swanson, J. A., and Watts, C. (1995) Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **5**, 424–428
18. Kerr, M. C., and Teasdale, R. D. (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**, 364–371
19. Florey, O., Kim, S. E., Sandoval, C. P., Haynes, C. M., and Overholtzer, M. (2011) Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1335–1343
20. Kerr, M. C., Lindsay, M. R., Luetterforst, R., Hamilton, N., Simpson, F., Parton, R. G., Gleeson, P. A., and Teasdale, R. D. (2006) Visualisation of macropinosome maturation by the recruitment of sorting nexins. *J. Cell Sci.* **119**, 3967–3980
21. Laughlin, S. T., and Bertozzi, C. R. (2007) Metabolic labeling of glycans with azido sugars and subsequent glycan profiling and visualization via Staudinger ligation. *Nat. Protoc.* **2**, 2930–2944

O-Glycans Modulate Cell Adhesion and Membrane Trafficking

22. Deleted in proof
23. Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., and Brunak, S. (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153–164
24. Röttger, S., White, J., Wandall, H. H., Olivo, J. C., Stark, A., Bennett, E. P., Whitehouse, C., Berger, E. G., Clausen, H., and Nilsson, T. (1998) Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* **111**, 45–60
25. Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Durnin, M., Hanein, D., and Li, R. (2012) The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration. *J. Cell Biol.* **197**, 239–251
26. Araki, N., Johnson, M. T., and Swanson, J. A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* **135**, 1249–1260
27. Kabayama, H., Takeuchi, M., Taniguchi, M., Tokushige, N., Kozaki, S., Mizutani, A., Nakamura, T., and Mikoshiba, K. (2011) Syntaxin 1B suppresses macropinocytosis and semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *J. Neurosci.* **31**, 7357–7364
28. Park, J. H., Nishidate, T., Kijima, K., Ohashi, T., Takegawa, K., Fujikane, T., Hirata, K., Nakamura, Y., and Katagiri, T. (2010) Critical roles of mucin 1 glycosylation by transactivated polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 in mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* **70**, 2759–2769
29. Gill, D. J., Clausen, H., and Bard, F. (2011) Location, location, location. New insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends Cell Biol.* **21**, 149–158
30. Gill, D. J., Chia, J., Senewiratne, J., and Bard, F. (2010) Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *J. Cell Biol.* **189**, 843–858
31. Clément, M., Rocher, J., Loirand, G., and Le Pendu, J. (2004) Expression of sialyl-Tn epitopes on $\beta 1$ integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. *J. Cell Sci.* **117**, 5059–5069
32. Zhang, L., Tran, D. T., and Ten Hagen, K. G. (2010) An O-glycosyltransferase promotes cell adhesion during development by influencing secretion of an extracellular matrix integrin ligand. *J. Biol. Chem.* **285**, 19491–19501
33. Powelka, A. M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L. M., Sonnenberg, A., and Hsu, V. W. (2004) Stimulation-dependent recycling of integrin $\beta 1$ regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic* **5**, 20–36
34. Cantz, M., and Ulrich-Bott, B. (1990) Disorders of glycoprotein degradation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **13**, 523–537
35. Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (1998) A new protein conjugation system in human. *J. Biol. Chem.* **273**, 33889–33892
36. Iau, K. S., Partridge, E. A., Grigorian, A., Silvescu, C. I., Reinhold, V. N., Demetriou, M., and Dennis, I. W. (2007) Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* **129**, 123–134
37. Marshall, S., Nadeau, O., and Yamasaki, K. (2004) Dynamic actions of glucose and glucosamine on hexosamine biosynthesis in isolated adipocytes. Differential effects on glucosamine 6-phosphate, UDP-N-acetylglucosamine, and ATP levels. *J. Biol. Chem.* **279**, 35313–35319
38. Slawson, C., Copeland, R. J., and Hart, G. W. (2010) O-GlcNAc signaling. A metabolic link between diabetes and cancer? *Trends Biochem. Sci.* **35**, 547–555
39. Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M., Chihama, K., Tomita, K., Kubo, K., Nakajima, K., Nabeshima, Y., and Hoshino, M. (2010) Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron* **67**, 588–602
40. Shirane, M., and Nakayama, K. I. (2006) Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science* **314**, 818–821

Review Article

Protein-Tyrosine Kinase Signaling in the Biological Functions Associated with Sperm

Takashi W. Ijiri,¹ A. K. M. Mahbub Hasan,^{1,2} and Ken-ichi Sato¹

¹Laboratory of Cell Signaling and Development, Department of Molecular Biosciences, Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto 603-8555, Japan

²Laboratory of Gene Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Dhaka, Dhaka 1000, Bangladesh

Correspondence should be addressed to Ken-ichi Sato, kksato@cc.kyoto-su.ac.jp

Received 24 February 2012; Revised 17 May 2012; Accepted 31 May 2012

Academic Editor: Alakananda Basu

Copyright © 2012 Takashi W. Ijiri et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In sexual reproduction, two gamete cells (i.e., egg and sperm) fuse (fertilization) to create a newborn with a genetic identity distinct from those of the parents. In the course of these developmental processes, a variety of signal transduction events occur simultaneously in each of the two gametes, as well as in the fertilized egg/zygote/early embryo. In particular, a growing body of knowledge suggests that the tyrosine kinase Src and/or other protein-tyrosine kinases are important elements that facilitate successful implementation of the aforementioned processes in many animal species. In this paper, we summarize recent findings on the roles of protein-tyrosine phosphorylation in many sperm-related processes (from spermatogenesis to epididymal maturation, capacitation, acrosomal exocytosis, and fertilization).

1. Introduction

Protein-tyrosine kinase (PTK) activity and tyrosine phosphorylation of cellular protein were initially discovered by Hunter and colleagues [1–3]; they analyzed the protein kinase activity associated with the protein complex of polyoma virus middle T antigen and viral Src gene product, a cellular counterpart of which is the cellular Src protein. At that time, phosphorylation events on amino acids other than tyrosine (i.e., serine and threonine residues) were already known as posttranslational modifications of physiological importance. However, the discovery of tyrosine phosphorylation for the first time opened a window to understand the relationship between protein phosphorylation (including serine/threonine phosphorylation) and malignant cell transformation (e.g., development of cancer) [4]. In addition, a growing body of evidence has demonstrated that tyrosine phosphorylation catalyzed by cellular Src and other PTKs expressed in normal cells and tissues regulates a variety of cellular functions such as developmental processes, disorder of normal cell functions, immunological responses, neuronal differentiation and transmission, pathological infection, and senescence. Thus, protein-tyrosine phosphorylation has

emerged as a signal transduction mechanism of fundamental importance in all eukaryotic cells and, in some cases, prokaryotic cell behavior [5–7].

In the sexual reproduction system, two different kinds of gamete cell: egg and sperm, interact and fuse with each other to accomplish fertilization that gives rise to a newborn [8]. In this fundamental biological event, both egg and sperm undergo a number of biochemical and cell biological reactions that culminate in successful embryogenesis and early development. Especially in the case of multicellular organisms including humans, egg and sperm are special cells in view of their appearance as a single cell. To become such a specialized type of cell, the ancestor of the gametes, that is, primordial germ cell (PGC), along with sex determination in the host, must undergo meiotic cell division [9]. Moreover, to become fully competent for fertilization, egg and sperm must undergo a series of “differentiation” or “maturation” events [10–12]. During the past several decades, a number of studies have dealt with the cellular and molecular mechanisms of gametogenesis, fertilization, and embryogenesis. Among these are characterizations of protein-tyrosine phosphorylation in these events that involved identification of the responsible PTKs (e.g., Src), their regulators and substrates, and

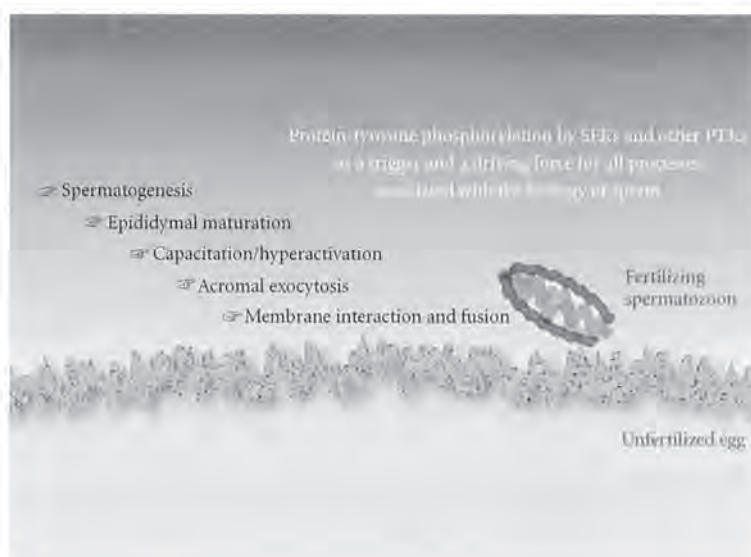


FIGURE 1: Protein-tyrosine phosphorylation and the biology of sperm. A sequence of events in the sperm must be done to facilitate a successful fertilization. The events include spermatogenesis and epididymal maturation that occur in the male reproductive organs, capacitation/hyperactivation and acrosomal exocytosis (or acrosome reaction, AE) in the female reproductive tract (in the case of species employing internal fertilization: e.g., mammals) or in the extracellular space (in the case of species employing external fertilization: e.g., frogs and fishes), and gamete interaction and fusion at the plasma membranes. In all of these processes, protein-tyrosine phosphorylation catalyzed by SFKs (e.g., Src) and/or other PTKs (e.g., EGFR, Abl) is suggested to play an important role. For details, see text.

evaluation of their roles for cellular functions [13–19]. In this paper, we will briefly discuss the biology of sperm (gametogenesis, differentiation, maturation, and fertilization), recent achievements in understanding the involvement of PTKs and protein-tyrosine phosphorylation in the biology of sperm, and future directions for this research field (Figure 1).

2. General View of Sperm Biology

Spermatogenesis is a highly specialized process of cellular differentiation in which diploid progenitor cells of the testis differentiate into haploid spermatozoa [20]. The entire process is divided into three sequential mitotic, meiotic, and post-meiotic stages. In the male meiotic stage, after PGCs migrate into the genital ridges, they become gonocytes and start differentiation into spermatogonia at the basement of seminiferous tubules. Some of them, spermatogonial stem cells (SSCs), also retain the ability for self-renewal [21]. Owing to the role of SSCs, sperm are produced continually (more than 50,000,000 a day in humans) almost throughout the lifetime. Meiosis is the event in which chromosome pairing and genetic recombination occur in the functional tetraploid pachytene spermatocytes [22]. In this process, the genes are shuffled between homologous chromosomes, which results in genetic diversity. This helps the species to survive through natural selection.

Most of the components found in mature spermatozoa are primarily produced at the postmeiotic phase in mammals, and developing spermatids display a variety of

morphological and biochemical changes [23]. Many of the organelles in spermatids are transformed into specific structures; the acrosome originates from Golgi body and the main part of the flagellum is composed of spindle-shaped body. The flagellum contains cytoskeletal components and signal transduction mediators. The fibrous sheath, a unique mammalian cytoskeletal structure surrounding the axoneme, serves as a scaffold for constituents of signaling cascades in the regulation of sperm motility [24]. The nucleus is also changed into the tightly compacted shape and size of sperm head by the sequential replacement of the histones with transition proteins and protamines [25].

All stages in spermatogenesis are regulated by the stage-specific expression of a wide variety of genes. Other factors that influence spermatogenesis are the interactions between Sertoli cells and testosterone produced from Leydig cells [26]. In female animals, however, the limited numbers of oogonia differentiate, progress through the first meiotic prophase, and are arrested in the infant ovary. Then, with the onset of adolescence, they mature to second meiotic metaphase and are arrested again. Some of them are released by ovulation and complete meiosis by the entry of a sperm [27]. Similar criteria for oogenesis and oocyte maturation also apply in other kinds of vertebrates, including frog and fish [28, 29]. Testicular sperm look morphologically mature, but they are immotile. Therefore, after sperm leave the testis, they require a further maturation process to acquire the functions for fertilizing an oocyte during transmission through the epididymis [30].

The sperm pass through the caput, corpus, and cauda epididymides sequentially. Then, they are stored at the cauda

epididymis until ejaculation. While transiting through the epididymis, they undergo biochemical and physiological modifications, resulting in the acquisition of basal motility and the ability to fertilize an oocyte. These modifications include changes in the glycosylation of acrosomal proteins [31, 32] and in the lipid composition of sperm [33], as well as elevations of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [34, 35] and negative charge on the sperm surface [36]. The other difference between caput and cauda epididymal sperm is the pattern of protein tyrosine phosphorylation [37].

Mammalian sperm need to change their status further to acquire the ability to become competent to bind and fuse with an oocyte after release into the female reproductive tract [38, 39]. This change is termed “capacitation” and confers hyperactivated motility (hyperactivation) and an ability to undergo acrosomal exocytosis (AE) [40] or acrosome reaction to the sperm [8]. To be capacitated, sperm require a period of incubation and interaction in the female reproductive tract. However, this can be induced *in vitro* in an appropriate experimental medium [40]. Capacitation promotes changes in cholesterol content, plasma membrane fluidity, and intracellular ion concentrations [42]. Another good hallmark for capacitation is an increase in protein tyrosine phosphorylation [43]. Chemotaxis is a phenomenon that guides cells to undergo correct movement toward or away from certain chemicals. This is also known to be important for sperm to interact with an oocyte in the female reproductive tract [44], maybe because sperm are extremely small compared with oocytes. Chemotaxis for sperm guidance was discovered first in marine invertebrate species [45], then in amphibians and mammals [46]. In eutherian mammals, AE releases proteolytic enzymes from the acrosome stored in sperm head [8]. It was believed that these enzymes assist in sperm penetration through the zona pellucida (ZP), the glycoprotein coating on the surface of oocytes, and fusion with an oocyte. However, a recent observation from *in vitro* fertilization suggests that most sperm undergo AE before contact with the ZP [47], showing the need to reconsider the timing and biological significance of AE during a series of sperm events.

Fertilization-related phenomena include gamete interaction and fusion, egg activation, polyspermy block, and nuclear fusion, all of which culminates in initiation of embryonic development. To date, the sperm membrane protein Izumo1 [48] and the oocyte surface protein CD9 [49–51] are reported to be indispensable for the fusion between sperm and the oocyte plasma membrane in mouse. The gamete fusion triggers repeated increases (e.g., mouse) or a transient elevation (e.g., frog) in intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in oocyte, so-called Ca^{2+} oscillation or Ca^{2+} wave, which serves as an initiator of egg activation [17, 52, 53]. It is still debatable how sperm can act as a trigger for egg activation [19]. One possibility is receptor-mediated activator, while another is diffusible activator, “sperm factor.” Recent findings suggest that inositol trisphosphate (IP_3) acts as a second messenger for the Ca^{2+} release reactions and that the egg-associated Src-phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$) (e.g., sea urchin, frog) [14, 16] or the sperm-derived components such as $PLC\zeta$ (e.g., mouse) [54] and citrate synthase (newt) [55]

mediate the gamete interaction/fusion and the activation of IP_3 -dependent Ca^{2+} release. After a sperm enters an oocyte, the nucleus has to be decondensed as a pronucleus for nuclear fusion. Then, the fertilized egg starts DNA synthesis for the following early embryogenesis.

Recently, using proteomics approaches, a number of sperm proteins in mouse and rat have been identified as those that are phosphorylated on tyrosine residues during epididymal maturation and capacitation [56–58]. Our group has also reported important roles of Src family PTKs (SFKs) in the sperm-induced egg activation during gamete interaction and fusion by using the African clawed frog, *Xenopus laevis*. The following sections are an overview of the recent progress to understand the correlations between PTKs and various sperm events.

3. Involvement of PTKs in Spermatogenesis

PTKs play various biological roles in many types of somatic cell, so it is not surprising that they act on spermatogenic cells and their supporting cells, that is, Sertoli cells, in the testis. Actually, it has been demonstrated that several families of PTKs including Src kinase are correlated with most spermatogenic events (Figure 2). In adult mouse testis, the protein expression of Src, Lyn, and Hck were observed, while the expressions of eight members of the SFK were detected by quantitative polymerase chain reaction. For instance, Src protein localizes weakly to the cytoplasm in spermatocytes and strongly in round and elongated spermatids, leading to strong accumulation in acrosome of cauda epididymal sperm with entire flagellum detection [59]. In humans, Src protein was detected strongly around the acrosomal region in round and elongated spermatids [60].

c-Kit is a transmembrane tyrosine kinase receptor that binds to stem cell factor (SCF). SCF induces dimerization of c-Kit that activates the tyrosine kinase residues by autophosphorylation [61], leading to the downstream signaling through phospho-tyrosine-binding adaptor proteins such as $PLC\gamma 1$. During mouse early development, c-Kit is essential for the migration of PGCs to the genital ridges in the embryo and then functions in the maintenance of PGCs [62]. Src kinase is also involved in this process [63]. In adult mouse testis, the expression of c-Kit is detected in differentiating spermatogonia, whereas the expression of SCF is detected in Sertoli cells; therefore, c-Kit/SCF is important for maintaining differentiating type A spermatogonia [64]. On the other hand, to maintain the property of self-renewal in mouse SSCs, c-Ret tyrosine kinase receptor mediates between glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and Src family kinase signaling [65]. Recently, it has also been suggested that c-Kit plays a pivotal role in regulating the ratio between differentiation and self-renewal during maintenance of the SSC population [66].

There are a few reports about tyrosine phosphorylation in meiosis during spermatogenesis (Figure 2). Mouse has Fes-related proteins (Fer) of two different size [67], which correspond to 94 kDa or 51 kDa tyrosine kinase. The latter accumulates in primary spermatocytes where the cell cycle is

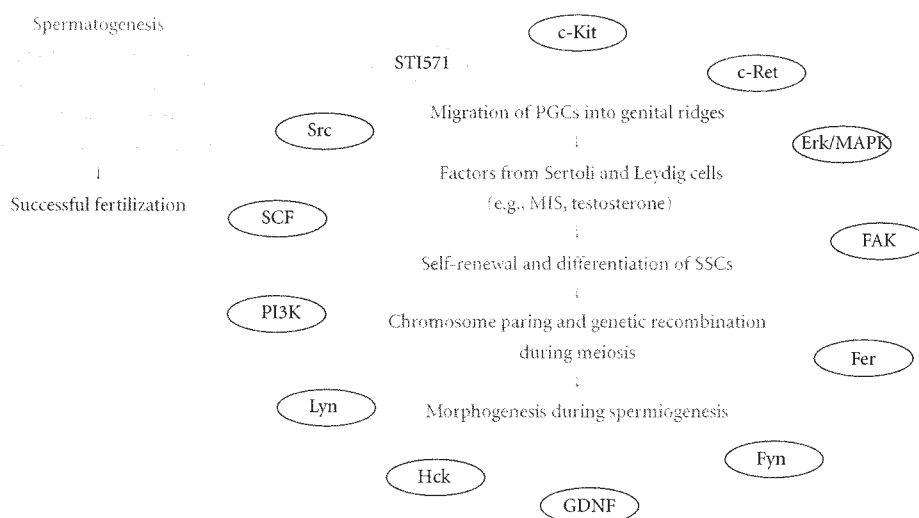


FIGURE 2: Protein-tyrosine phosphorylation and a sequence of events associated with spermatogenesis. For details of spermatogenesis and its associated signaling molecules (the full spelling of all abbreviations as well), see text. Note that MIS, Mullerian-inhibiting substance, is a testicular-differentiating factor that is produced in Sertoli cells and Leydig cells, whose differentiation is promoted by the actions of Sry and other sex-determining gene products. Also note that MIS acts in concert with testosterone. Note that positive regulators for protein-tyrosine phosphorylation are indicated in red circles

in the first meiotic prophase, and the role of phosphorylation for the timing of meiosis entry is suggested in mammals as well as in yeast [68]. *c-Kit*/SCF system is also required for transition when mouse spermatogonia undergo cell division to enter meiosis [69]. This was also examined using a specific inhibitor to *c-Kit* (STI571), resulting in reduction of the number of mouse meiotic cells under the control of retinoic acid [70].

Interestingly, some of the truncated forms of PTK seem to have roles in the process of sperm morphogenesis: spermiogenesis. At least three examples of nonreceptor tyrosine kinase, Fyn as well as Fer and Hck [71], have been reported. Truncated Fer was detected in the Golgi, acroplaxome, and manchette of rat spermatid [72], while truncated Hck was observed mainly at the acrosome of bovine sperm [73]. They are also suggested to regulate actin assembly via phosphorylation. Therefore, these observations suggest that truncated forms of Fer kinase and Hck may participate in sperm head shaping. Similarly, Golgi membrane in spermatids contains truncated Fyn that is missing the kinase domain, and this protein may be required for acrosome biogenesis [72]. A truncated isoform of *c-Kit* has also been detected in mouse round spermatids [74]. This protein lacks SCF-binding and dimerization domains, but retains a part of the kinase domain that would facilitate activation of PLC γ 1 [75, 76]. It is suggested that truncated *c-Kit* is related to DNA integrity in human sperm [77]; however, its role is still unclear.

Another correlation of PTKs with spermatogenesis is in the regulation of Sertoli cell tight junction, including at the blood-testis barrier (BTB). Male germ cells need to contact with Sertoli cells during most spermatogenic processes.

Spermatogonia differentiate to preleptotene/leptotene spermatocytes in the basal compartment of the seminiferous epithelium. In addition, these spermatocytes have to translocate to the adluminal compartment of the seminiferous epithelium for further differentiation. However, there is the BTB, which acts as the immunological barrier between basal and adluminal compartments. Recently, it has been demonstrated that focal adhesion kinase (FAK), a nonreceptor tyrosine kinase, plays a key role in this process. FAK regulates the opening and/or closing of BTB by modulating the phosphorylation status of integral membrane proteins [78]. Besides, traditionally, FAK has been suggested to be involved in adherens junctions (AJ) between Sertoli and germ cells by the interactions with β 1-integrin and other associated proteins including Src [78]. Moreover, Fer kinase has been shown to participate in the regulation of rat AJ [79]. Fyn functions in the basal ectoplasmic specialization (ES) of actin filaments: at the junction between Sertoli cells as well as apical ES and at the junction between spermatids and Sertoli cells [80]. Apical ES also contains many lipids and protein kinases such as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (Erk/MAPK), which are associated with Src [81].

The major problem for research on mammalian spermatogenesis was the lack of a stable *in vitro* culture system, despite the efforts of many investigators [82, 83]. However, recently, an improved organ culture system using neonatal testis has been established, which can make SSCs differentiate to mature sperm in mouse [84]. This method for *in vitro* spermatogenesis should greatly facilitate the identification and characterization of more factors and genes correlated

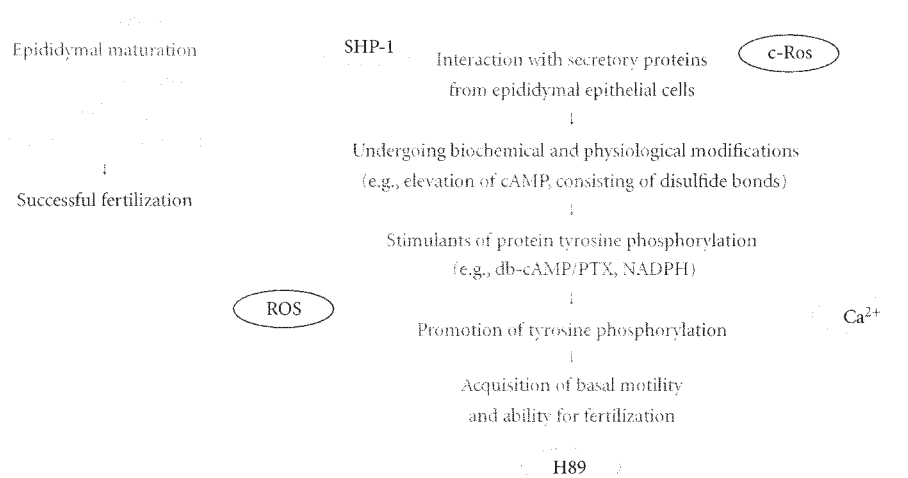


FIGURE 3: Protein-tyrosine phosphorylation and a sequence of events associated with epididymal maturation of sperm. For details of the epididymal maturation and its associated signaling molecules (the full spelling of all abbreviations as well), see text. Note that positive regulators for protein-tyrosine phosphorylation are indicated in red circles.

with PTKs for self-renewal and differentiation in spermatogonia, meiosis in spermatocytes, and morphogenesis in spermatids.

4. Involvement of PTKs in Epididymal Maturation

Like other cells, sperm need adenosine triphosphate (ATP) as an energy resource for their functions, for example, motility. The dominant pathway for ATP production in mouse sperm is glycolysis, while spermatocytes and spermatids prefer oxidative phosphorylation [83–85]. It is suggested that this switching to glycolysis occurs during epididymal maturation in rabbit [86]. During epididymal maturation, sperm proteins contain a greater number of disulfide bonds, leading to the stabilization of sperm structures and promotion of tyrosine phosphorylation of sperm proteins (Figure 3) [87–89].

To investigate the importance of protein tyrosine phosphorylation during epididymal maturation, most analyses were performed with the antiphosphotyrosine antibody. Using western blotting, the contents of plasma membranes were compared between hamster caput and cauda epididymal sperm, resulting in a differential phosphorylation pattern: the proteins with sizes of 94, 52, and 47 kDa looked more intense in cauda epididymal sperm while the 67 kDa band had more intensity in caput epididymal sperm [90]. However, western blotting detected caput epididymal sperm-specific phosphotyrosine expression in 93, 66, and 45 kDa bands in boar [91]; in addition, rat sperm from caput epididymis tended to show a stronger total band pattern of tyrosine phosphorylation than that of cauda epididymal sperm [37]. Immunofluorescence analyses with the antiphosphotyrosine antibody were performed to visualize the distribution of tyrosine phosphorylation in sperm. After

permeabilization with methanol, boar sperm from proximal caput epididymis had strong labeling on the midacrosome as well as a faint signal on the whole tail. After transit through distal caput and corpus epididymides, this signal was detected only as a triangular shape on the posterior region of the midacrosome [91]. In mouse and rat, caput epididymal sperm, permeabilized with Nonidet P-40, resulted in fluorescence over the whole equatorial segment; however, the signal became restricted to a small region in the posterior equatorial segment after sperm moved to the cauda epididymis [92]. It is suggested that the equatorial segment plasma membrane works as a site of fusion with an oocyte membrane during fertilization; therefore, the accumulation of tyrosine phosphorylation may be connected to the later fusion process.

Lewis and Aitken have investigated the tyrosine phosphorylation pattern of sperm proteins after stimulation with cAMP by adding dibutyryl cAMP (db-cAMP) and pentoxifylline (PTX) [37]. By western blotting with the antiphosphotyrosine antibody in rat, the increase of cAMP resulted in more intense tyrosine phosphorylation bands in caput epididymal sperm proteins and much more intensity for cauda epididymal sperm proteins. However, this induction of tyrosine phosphorylation was inhibited by a protein kinase A (PKA)-inhibitor, H89 [37]. Immunofluorescence using the sperm fixed with methanol increased the signal in the tail region after db-cAMP/PTX stimulation [37]. Similar results were observed when the reduced form of NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) was added instead of db-cAMP, suggesting that this cAMP-dependent tyrosine phosphorylation is regulated by the redox system during epididymal maturation [93]. Furthermore, db-cAMP/PTX stimulation showed drastic change of the phosphotyrosine pattern in mouse sperm permeabilized with Triton X-100 as follows: staining on the acrosome and the principal piece of sperm from the proximal caput epididymis, strong on the midpiece as well as the acrosome and the principal piece

of sperm from the distal caput and corpus epididymides, still strong on the midpiece and weak on the principal piece without any signal on the acrosome of sperm from the cauda epididymis [94]. It is also suggested that the signal leading to tyrosine phosphorylation in mouse sperm is negatively regulated by Ca^{2+} [95]. However, this inhibitory effect did not work when sperm arrived at the cauda epididymis [94]. Even with these observations, the mechanism of activation for this tyrosine phosphorylation has not been elucidated. One explanation of tyrosine phosphorylation in the midpiece is that the generation of reactive oxygen species (ROS) activates tyrosine phosphorylation signaling; however, the role of oxidative phosphorylation in sperm mitochondria is still controversial. At present, the role of tyrosine phosphorylation in the acrosome is unknown.

The progress of proteomic analysis has contributed to the identification of sperm proteins that are important for epididymal maturation, including the protein phosphorylation process. Using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, eight rat sperm proteins were identified as candidates that undergo posttranslational modifications during epididymal maturation, and one of them, β -subunit of mitochondrial F_1 -ATPase, was serine-phosphorylated [96]. Recently, new methods using titanium dioxide have been developed to identify phosphopeptides, suggesting that 77 titanium-dioxide-enriched peptides (corresponding to 53 proteins) showed significant modifications during rat epididymal maturation [97].

Here, if we focus on PTKs in epididymal epithelium, the receptor tyrosine kinase Ros and Src homology-2 (SH2-) domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 are expressed there. The mutant mice for Ros or for SHP-1 showed defects in the differentiation of the epididymis [98, 99]. Moreover, the sperm interact with various secretory proteins from epithelial cells of epididymides during epididymal transit, and some of them are proposed to be involved in sperm maturation [100, 101]. Therefore, it will be necessary to study the epididymal luminal environment as well as sperm proteins to obtain a deeper understanding of the role of PTKs in the sperm maturation process.

Note. During the processes of galley proof, one paper about Src and epididymal development and sperm functions was published [212]. As highlighted in our manuscript, Src has been identified as a PTK involved in capacitation-associated tyrosine phosphorylation downstream of PKA pathway. Added to this aspect, in this newly published paper, Visconti and colleagues reported that the details about the male reproductive phenotypes of Src (KO) mice and Src localization in epididymis as well as in sperm. Src is not detected in caput epididymal sperm but in the midpiece and the postacrosomal region of cauda epididymal sperm. Src is also detected strongly in clear cells and weakly in principle cells of cauda epididymis and is shown to transfer into cauda epididymal sperm via epididymosomes during epididymal transit. Src KO mice have smaller size of cauda epididymis and reduced sperm motility, leading to unsuccessful in vitro fertilization.

5. Involvement of PTKs in Capacitation

Extratesticular sperm that has completed epididymal maturation must undergo a process called capacitation, a prerequisite for hyperactivated motility and acrosome reaction, in the female reproductive tract. Two researchers discovered this process independently in the 1950s [38, 39]. Later studies have demonstrated that capacitation can be reconstituted in vitro by using cauda (but not caput) epididymal or ejaculated sperm and artificial media supplemented with components that promote changes associated with in vivo capacitation. Capacitation seems to be a phenomenon specific to mammals, and accumulating evidence indicates that it generally involves a burst of protein-tyrosine phosphorylation (Figure 4).

In mice, treatment of sperm with capacitation-inducing media promotes cAMP-dependent (i.e., PKA-dependent) tyrosine phosphorylation of several sperm proteins with molecular sizes of 116, 105, 95, 86, 76, and 54 kDa [102]. In particular, it is suggested that the 95 kDa phosphotyrosine-containing protein is identical to one that has been identified as a ZP3-dependent PTK substrate, namely, p95/zona receptor kinase (ZRK)/hexokinase (see below). Further studies by Visconti and colleagues have demonstrated that the sperm media should include bovine serum albumin (BSA), CaCl_2 , and NaHCO_3 to induce capacitation and its associated tyrosine phosphorylation (proteins of 40–120 kDa) [103]. Interestingly, caput epididymal sperm, which lack an ability to undergo capacitation in vivo, cannot induce the tyrosine phosphorylation event in response to the treatment with capacitation media, indicating that epididymal maturation is required for the sperm response. In addition, it has also been shown that the requirement for BSA, CaCl_2 , and NaHCO_3 in capacitation and associated PTK signaling is completely overcome by the addition of cAMP or its active analogs and that chemical inhibitors for PKAs (H-89, a substance that blocks ATP binding, and Rp-cAMPS, a nonhydrolysable AMP analog) interfere with the aforementioned processes [104]. These results clearly demonstrate that capacitation involves sequential activation of cAMP production and PKA-PTK pathway in response to the capacitation-inducing substances.

A similar system has also been demonstrated in other species including human [105] and mice of both domestic and wild-field species [106, 107]. Unlike mouse sperm, however, human sperm do not contain the 95 kDa phosphotyrosine-containing protein (p95/ZRK/hexokinase). Instead, the fibrous sheath proteins, AKAP82 (A-kinase/PKA anchoring protein 82: now referred as AKAP4), its precursor pro-AKAP82, and FSP95, a structural homolog of AKAP82, have been identified as prominently tyrosine-phosphorylated proteins in the capacitated sperm [108, 109]. Artificial Ca^{2+} signals, which promote the occurrence of acrosome reaction, lead to dephosphorylation of a subset of these phosphotyrosine-containing proteins. AKAP82 has also been identified as the major protein of the fibrous sheath of the mouse sperm flagellum, and its possible function to compartmentalize inactive PKA (before capacitation) to the cytoskeleton has been suggested [110]. Immunocytochemical and/or

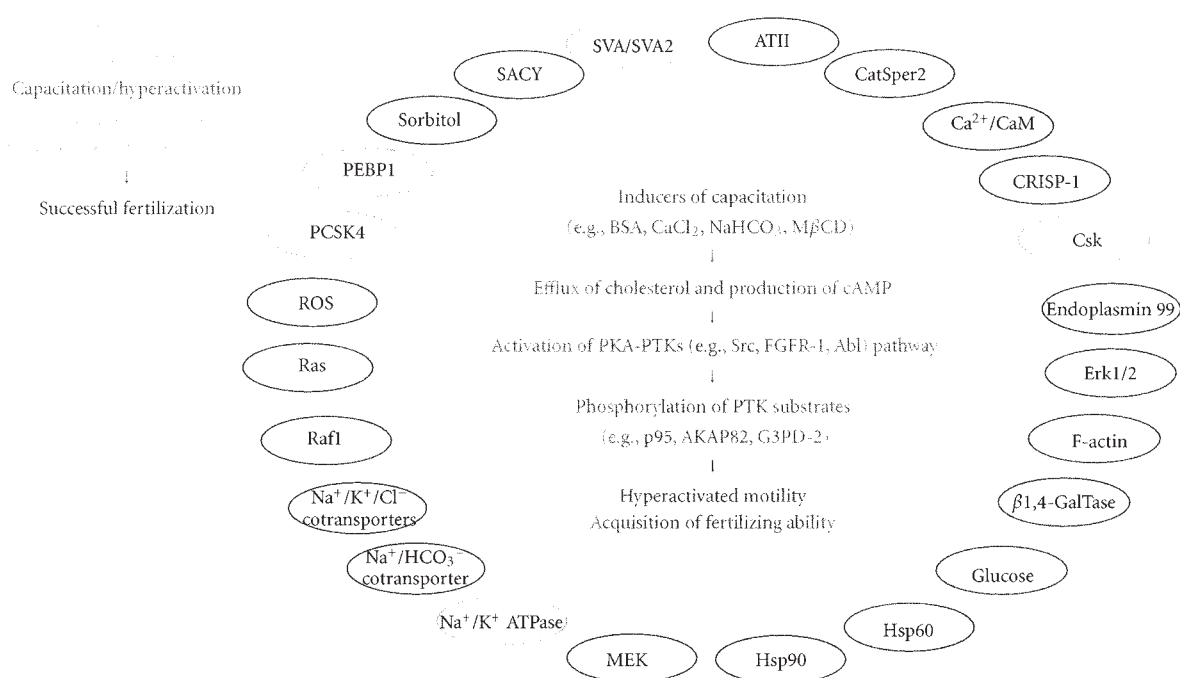


FIGURE 4: Protein-tyrosine phosphorylation and a sequence of events associated with capacitation and/or hyperactivation of sperm. For details of the capacitation/hyperactivation and its associated signaling molecules (the full spelling of all abbreviations as well), see text. Note that positive regulators for protein-tyrosine phosphorylation are indicated in red circles, whereas the negative regulators are indicated in blue circles.

biochemical experiments also demonstrate that the tyrosine-phosphorylated forms of *c-Abl* tyrosine kinase are present in the capacitated human sperm [111].

It has been shown that the cholesterol-binding heptasaccharides, methyl- β -cyclodextrin (M β CD) and OH-propyl- β -cyclodextrin, primarily promote release of cholesterol from the sperm plasma membrane and induce PTK signaling and capacitation in the absence of BSA [112, 113]. The M β CD's effects, like the BSA's effects, depend on both NaHCO₃ and PKA activity, suggesting that they resemble those under physiological capacitation. In fact, BSA has also been shown to promote the release of cholesterol, and the addition of exogenous cholesterol interferes with the BSA-induced PTK signaling and capacitation [112]. These and other results suggest that efflux of cholesterol plays a pivotal role in up-regulation of the cAMP-PKA-PTK pathway leading to capacitation [114].

Other important factors that promote or suppress the onset of PTK signaling and/or capacitation include calmodulin, which may act as a positive regulator for the production of cAMP [115, 116]; seminal vesicle autoantigen, which has been shown to block BSA-induced capacitation [117, 118]; fertilization-promoting peptide or adenosine, which stimulates and inhibits PTK signaling in uncapacitated and capacitated sperm, respectively [119, 120]; extracellular glucose, whose shortage has been shown to delay the appearance of protein tyrosine phosphorylation [121]; Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in the sperm, which provides Na⁺ ions as a

positive regulator of PTK signaling and capacitation [122]; F-actin, whose generation and breakdown is required for capacitation and AE, respectively [123, 124]; endogenous redox activity, which is up-regulated under the control of the actions of HCO₃⁻ [125, 126]; molecular chaperones such as hsp90, endoplasmic 99, and hsp60, which become tyrosine-phosphorylated upon capacitation and some of them may be involved in sperm-ZP recognition (in mouse, but not human) [127–129]; sperm-specific voltage-gated cation channel, CatSper2, whose gene knockout significantly alters sperm production; PTK signaling, which is associated with capacitation and induction of the AE [130]; extracellular Ca²⁺ ions, which may suppress tyrosine phosphorylation by decreasing the availability of intracellular ATP [131]; β 1,4-galactosyltransferase I, a possible ZP3-interacting protein whose gene knockout leads to precocious capacitation, which may be involved because of spontaneous elevation of cAMP [132]; angiotensin II, which is found in seminal plasma and has been shown to induce PTK signaling and capacitation via stimulation of adenylyl cyclase-dependent accumulation of cAMP [133]; HCO₃⁻ and Ca²⁺-responsive soluble adenylyl cyclase (SACY), which has been identified as the dominant source of cAMP production [134, 135]; phosphatidylethanolamine-binding protein 1, a possible decapacitation factor, whose acquisition on the sperm surface during epididymal maturation and release before the onset of capacitation have been identified [136]; Na⁺/K⁺ ATPase, whose interaction with ouabain, a specific inhibitor

of Na⁺/K⁺ ATPase, promotes PTK signaling and capacitation [137]; a 130 kDa CCCTC-binding nuclear factor, which becomes tyrosine-phosphorylated at capacitation and more potently binds to its target DNA sequence [138]; seminal vesicle protein secretion 2, which acts as a decapacitation factor by interacting with ejaculated sperm heads after copulation [139]; the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, a Cl⁻ channel that controls the activity of several transport proteins, including ENaCs (epithelial Na⁺ channels), and whose pharmacological inhibition leads to the failure of capacitation without affecting PTK signaling [34]; sorbitol, which is present in semen and has been shown to be effective in inducing PTK signaling via the action of sorbitol dehydrogenase [140]; Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporters, which may act as a source of chloride ions necessary for the onset of PKA-dependent PTK signaling at capacitation [141]; glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (G3PD-2), which is expressed in the acrosome and principal piece and becomes tyrosine-phosphorylated upon capacitation [142, 143]; pro-protein convertase subtilisin/kexin type 4 (PCSK4), whose null (thus impaired in fertility) sperm exhibit enhanced tyrosine phosphorylation in response to capacitation [144]; so-called Erk module, including Ras, Raf1, MAPK kinase (MAPKK/MEK), and Erk/MAPK, which is suggested to be involved in the presentation of phosphotyrosine-containing proteins on the sperm surface at capacitation [145].

Recent proteomics analysis has revealed more identities of tyrosine-phosphorylated proteins in response to capacitation: they include voltage-dependent anion channel, tubulin, pyruvate dehydrogenase E1 β chain, glutathione-S-transferase, NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 6, acrosin-binding protein precursor (sp32), proteasome subunit atype 6b, and cytochrome b-c1 complex [42], although their functions remain to be elucidated. A more recent study has shown that Toll-like receptors 2 and 4 present on cumulus cells were activated by coculture with sperm in a hyaluronan fragment-dependent manner and that chemokines secreted from cumulus-oocyte complexes induced sperm PTK signaling and capacitation [146], providing evidence for the association of chemotaxis with capacitation. In addition, study of the knockout mouse suggests that an epididymal secretory protein CRISP-1 contributes to PTK signaling during capacitation [147].

Candidate PTKs related to capacitation include Src, whose interaction with PKA and enzymatic activation are seen in capacitated sperm [148, 149]; C-terminal Src kinase (Csk), whose negative regulatory function toward Src is canceled by serine phosphorylation (maybe by PKA) at capacitation [148, 150]; fibroblast growth factor receptor-1, whose dominant-negative mutant leads to the failure of PTK signaling and capacitation [151]; Abl tyrosine kinase, which is activated in response to capacitation in a PKA-dependent manner [152].

6. Involvement of PTKs in Acrosomal Exocytosis

Early reports by Saling and colleagues have demonstrated that a 95 kDa mouse sperm protein, termed p95/ZRK (for

zona receptor kinase)/hexokinase, is a tyrosine kinase substrate, whose phosphorylation level is elevated in response to sperm binding to zona pellucida glycoprotein ZP3 [153, 154]. It has long been believed that the physiological trigger for sperm AE is the binding of sperm to the ZP structures, namely, ZP3; so the aforementioned study has opened a window to analyze the roles of PTKs for AE. Subsequent studies have examined not only the physiological importance of the ZP3-induced tyrosine phosphorylation of the 95 kDa protein [155, 156] and other sperm proteins (e.g., 51 and 14–18 kDa proteins), but also the effect of several kinds of AE inducers other than ZP3 and/or various PTK or protein kinase inhibitors that could affect the tyrosine phosphorylation events associated with AE (Figure 5) [157–160]. A PTK inhibitor, tyrphostin, blocks the ZP-induced activation of PLC [161], suggesting that the γ isoform of PLC is involved in the ZP-induced PTK signaling leading to AE. A more recent study has shown, however, that δ 4-isoform of PLC is essential for ZP3- or progesterone (PG)-induced Ca²⁺ release during mouse AE [162, 163]. AE induced by mannose-bovine serum albumin and an antibody against p95/ZRK, but not that induced by Ca²⁺ ionophore, can be inhibited by wortmannin, a specific inhibitor of PI3K, without inhibiting PTK signaling, implying a role of PI3K downstream of PTK signaling [164, 165]. AE induced by PG or platelet-activating factor has also been shown to involve an increase in protein-tyrosine phosphorylation of 75 and 97 kDa proteins, and PTK inhibitors (erbstatin, genistein) interfere with the induction of AE [166]. The PG-induced tyrosine phosphorylation is involved in the generation of the plateau phase of Ca²⁺ influx [167] and modulation of sperm GABAA-like receptor/chloride channel (chloride efflux) [168]. Study of domestic cat sperm has shown that ZP-induced AE, but not Ca²⁺ ionophore- or spontaneously induced AE, is inhibited by PTK inhibitors (genistein, tyrphostin), indicating that PTK signaling acts upstream of the Ca²⁺ increase during AE [169]. The involvement of PTK signaling mediated by Src has also been suggested for the promotion of capacitative Ca²⁺ entry, as reconstituted by thapsigargin treatment of sperm, during AE [170].

Tyrosine-phosphorylated proteins during AE also include p52^{shc}, an isoform of the Shc adaptor proteins [171], a 107 kDa protein, whose phospho level correlates well with the extent of AE (induced by Ca²⁺ ionophore) [172], and a heparin-binding sperm membrane protein (during AE induced by heparin) [173]. On the other hand, recent studies suggest the importance of protein-tyrosine dephosphorylation in AE [174]. In support of this, tyrosine dephosphorylation of *N*-ethylmaleimide-sensitive factor, which undergoes SNARE complex disassembly, by protein-tyrosine phosphatase 1B has been shown to be required for the Ca²⁺ ionophore-induced AE [175], and gelsolin, an actin-severing protein that becomes tyrosine-phosphorylated and inactivated during capacitation, has been shown to be dephosphorylated during AE, allowing its activation leading to actin depolymerization [176].

Another line of evidence demonstrates the identity of PTKs working during AE. An early report by Lax et al. showed that epidermal growth factor (EGF) can induce AE in

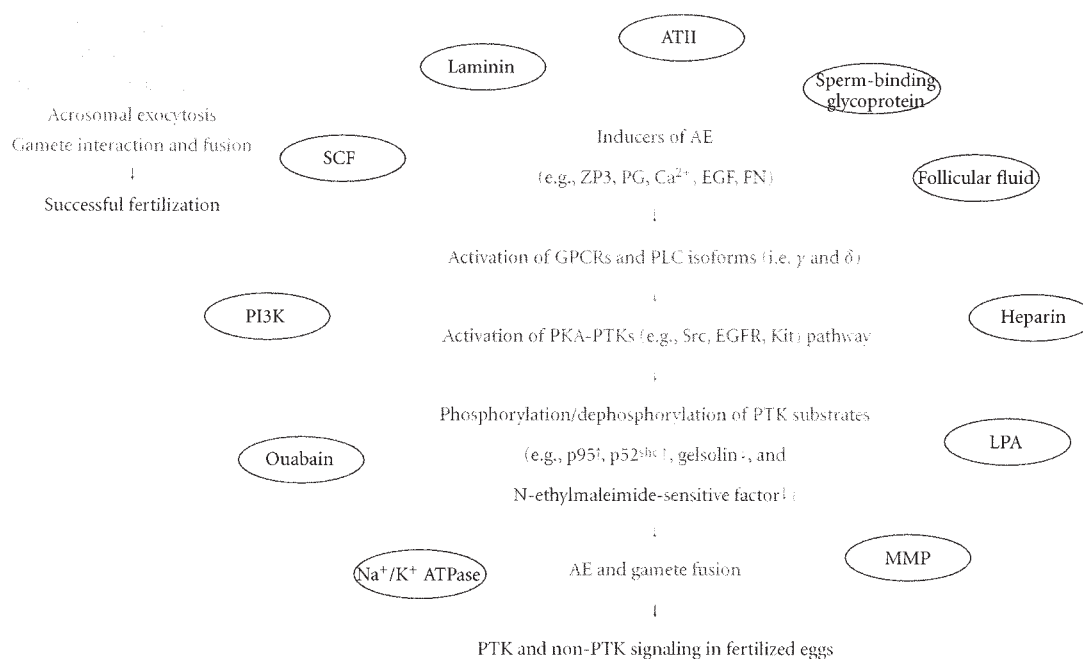


FIGURE 5: Protein-tyrosine phosphorylation and a sequence of events associated with acrosomal exocytosis. For details of the acrosomal exocytosis and its associated signaling molecules (the full spelling of all abbreviations as well), see text.

bovine sperm [177], suggesting that EGF receptor (EGFR)/kinase is involved in this process. Further studies using this species have demonstrated that AE primarily involving activation of G protein-coupled receptors by lysophosphatidic acid or angiotensin II or AE induced by ouabain- Na^+/K^+ ATPase system promotes transactivation of EGFR/kinase via PKA-Src-matrixmetalloproteinase (MMP) or PKA-Src pathway [178, 179]. In the former system, G-protein-mediated production of AMP promotes PKA activation, PKA up-regulates Src (as seen in capacitated sperm), Src activates the secretion of heparin-binding EGF-like growth factor via MMP activation, thereby activating EGFR/kinase, and Src also affects the activity of EGFR/kinase through direct phosphorylation on tyrosine 845 [178], an Src-dependent phosphorylation site, whose phosphorylation has been implicated in some types of cancer cells [180–182]. Src activation and its importance for AE have also been demonstrated in humans [183, 184]. Another line of evidence suggests that SCF is involved in the promotion of mouse sperm AE through the activation of its cognate receptor/PTK c-Kit, PLC γ 1, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [185].

While many studies using mammals have shown the importance of PTK signaling in sperm AE, only limited findings have been described on the same subject in non-mammalian species. One potentially interesting finding reported recently demonstrates that egg components are capable of promoting protein-tyrosine phosphorylation and capacitation-like changes in sperm of the amphibian *Bufo arenarum* [186], implying its subsequent functions in AE.

A recent report by Hirohashi and colleagues has shown that most fertilizing mouse sperm have undergone AE before

contact with ZP during *in vitro* fertilization [46]. Furthermore, it has been shown that sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce AE and that some mechanical process is important for physiological AE [187]. These results lead us to reconsider where and how sperm AE is initiated under physiological conditions and when and how PTK signaling contributes to the “real” AE. As described above, not only ZP3, but also other reagents or experimental conditions (e.g., PG) are reportedly inducible for AE *in vitro*. Additionally, possible oviductal substances such as sperm-binding glycoprotein [188], laminin [184], fibronectin [189], and follicular fluid [190] have been shown to induce AE accompanied by PTK signaling. Taking these findings together, further analysis focusing on the roles of the sperm microenvironment during capacitation and AE (before reaching the egg plasma membrane) *in vivo* should enable greater understanding of the physiological impact of PTK signaling.

7. Involvement of PTKs in Gamete Interaction Fusion

Compared with the aforementioned categories of sperm biology, the relationship between sperm’s PTK signaling and gamete interaction, especially at the level of plasma membranes (i.e., adhesion and fusion of gametes), has not yet been fully investigated. Immunocytochemical study demonstrates that sperm tail displays a time-dependent increase in tyrosine phosphorylation in response to ZP-free oocyte-sperm interactions [121], although its physiological

importance and molecular detail have not yet been described. This seems to be mainly due to a technical problem in analyzing sperm functions at this point. In physiological conditions, a fertilizing spermatozoon closely interacts with or fuses with the plasma membrane of an egg, which has a protein content several hundredfold or more than that of a single sperm, so that the biochemical and cell biological experiments for evaluating not only protein tyrosine phosphorylation but also other molecular events associated with gamete interaction tend to fall into the analysis of those of the “fertilized egg (mixture of egg and sperm)” or egg itself, but not sperm itself. Under these circumstances, eggs of some animal species have been analyzed for the sperm or sperm-mimetic-induced PTK signaling. Accumulating evidence demonstrates that egg-associated Src and/or some other SFKs (i.e., Fyn and Yes) may play a crucial role for some events at fertilization: they include transient increase(s) in $[Ca^{2+}]_i$ concentrations (sea urchin, starfish, ascidian, fish, and frog) [191–194], MII spindle structures and functions (mammals) [195], and cleavage furrow ingression during mitosis (mammals) [196]. Roles played by the SFKs vary among species; however, it is worth noting that a wide range of animal species (from sea invertebrates to mammals) employ egg-associated SFKs as a sperm-induced trigger for activation of development. In this connection, it has been demonstrated that the sperm acrosomal or perinuclear theca-associated proteins may act as a trigger of signal transduction for initiation of development inside fertilized egg: so-called “sperm factors” (see “General View of Sperm Biology”). Among these are truncated c-Kit protein [197–199] and a WW domain-binding protein PAWP [200], both of which are specific proteins that may contribute to the modulation of the PTK signaling in eggs.

Egg analysis often involves parthenogenetic experiments, in which one or more of sperm's function-mimetic substances (e.g., Ca^{2+} ionophore) are used to reconstitute signaling events of fertilization, allowing easier functional evaluation of the egg-associated proteins. On the other hand, an absence of substitutes for sperm analysis has remained a problem. Ideally, some egg- or egg plasma membrane-mimetic substances, if applicable, would be helpful for solving this technical problem. In this regard, we suggest that egg membrane microdomains (MDs) could serve as excellent model materials of physiological value. As mentioned earlier, MDs or alternatively lipid/membrane “rafts” have been generally recognized as cholesterol-dependent micron- or nanometer-scaled membrane structures of cells, where a specific subset of glycosphingolipids, membrane-spanning and cytoplasmic proteins, and some other membrane components are assembled [201, 202]. Detailed analysis of egg MDs and fertilization signaling was first reported in sea urchin [203] and frog [204, 205], and thereafter, eggs or early embryos of mouse have also been documented to some extent [206, 207].

In *Xenopus laevis*, the egg MDs are suggested to serve as a platform for sperm-induced Src PTK signaling. Namely, Src has been shown to be concentrated in the MDs of unfertilized eggs, and it is activated upon fertilization. M β CD treat-

ment impairs the ability of eggs to undergo sperm induced initiation of development [204]. An MD-associated, transmembrane protein, uroplakin III, has been identified as a target of sperm protease, whose activity is required for *Xenopus* egg fertilization [208, 209], and as an intracellular substrate of Src [210]. In addition, we have found that sperm and some other sperm mimetics are capable of activating Src in MD fractions isolated from unfertilized *Xenopus* eggs, in vitro [211]. These results demonstrate that egg MDs would be useful materials for reconstitution of sperm-induced PTK signaling in the fertilized egg. If so, an opposite idea might also be valid, that is, egg MDs would be useful for reconstitution of egg (plasma membrane)-induced PTK signaling (or any other signaling event if it occurs) in the fertilizing sperm. To develop these ideas, we are now in the process of evaluating sperm functions before and after interaction with isolated egg MDs. It seems that this kind of reconstitution experiment can also be carried out in other animal species where isolation of egg MDs is possible, and thus its validity and physiological importance will soon be evaluated.

8. Conclusion and Perspectives

Among all the cells constituting multicellular organisms, egg and sperm are unique in terms of their history of production (i.e., gametogenesis, maturation, and/or differentiation), final structures, and physiological functions. In spite of enormous research efforts in recent years, many questions remain about how egg and sperm are produced and how they acquire their gamete-specific functions; in addition, new questions are continuously arising. Recent studies using pluripotent stem cells (e.g., embryonic or induced pluripotent stem cells) and/or molecular genetic approaches (e.g., gene knockout/KO and transgenic animals) have begun to disclose the genetic as well as cell biological background of gametogenesis, fertilization, and subsequent early embryogenesis. Moreover, study on the gametogenesis and fertilization in nonanimal species (e.g., plants, algae), which is not highlighted in this paper, and that in animal species have begun to merge, enabling researchers to learn more about the general scheme of sexual reproduction. Taking this background into account, it is certain that study on the signal transduction system involving protein-tyrosine phosphorylation in egg, sperm, and fertilized egg/zygote/early embryo will continue to be at the cutting edge of this research field.

Abbreviations

PTK:	Protein-tyrosine kinase
PGC:	Primordial germ cell
SSC:	Spermatogonial stem cell
cAMP:	Cyclic adenosine monophosphate
AE:	Acrosomal exocytosis
ZP:	Zona pellucida
$[Ca^{2+}]_i$:	Intracellular calcium

IP ₃ :	Inositol trisphosphate
PLC:	Phospholipase C
SFK:	Src family protein-tyrosine kinase
SCF:	Stem cell factor
GDNF:	Glial cell-derived neurotrophic factor
BTB:	Blood-testis barrier
FAK:	Focal adhesion kinase
AJ:	Adherence junction
ES:	Ectoplasmic specialization
PI3K:	Phosphatidylinositol 3-kinase
Erk:	Extracellular signal-regulated kinase
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
ATP:	Adenosine trisphosphate
db-cAMP:	Dibutyl cAMP
PTX:	Pentoxifylline
PKA:	Protein kinase A
NADPH:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ROS:	Reactive oxygen species
SH2:	Src homology 2
SHP:	SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase
ZRK:	Zona receptor kinase
BSA:	Bovine serum albumin
AKAP:	A-kinase/PKA-anchoring protein
MβCD:	Methyl-β-cyclodextrin
SACY:	Soluble adenylyl cyclase
ENaC:	Epithelial Na ⁺ channel
G3PD-2:	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2
PCSK4:	Pro-protein convertase subtilisin/kexin type 4
MAPKK:	MAPK kinase
Csk:	C-terminal Src kinase
PG:	Progesterone
EGF:	Epidermal growth factor
MMP:	Matrix metalloproteinase
MD:	Membrane microdomain

Acknowledgments

The authors apologize to those whose work was not cited or insufficiently cited. This work is supported by a grant for the collaboration research from the Asahi Kasei Corporation, a Grant-in-Aid on Innovative Areas (22112522, 24112714), and a grant for Private University Strategic Research Foundation Support Program (S0801060) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan to K.-i. Sato.

References

- [1] T. Hunter, "Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 21, no. 2, pp. 140–146, 2009.
- [2] T. Hunter and B. M. Sefton, "Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 77, no. 3, pp. 1311–1315, 1980.
- [3] W. Eckhart, M. A. Hutchinson, and T. Hunter, "An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates," *Cell*, vol. 18, no. 4, pp. 925–933, 1979.
- [4] J. M. Bishop, "Molecular themes in oncogenesis," *Cell*, vol. 64, no. 2, pp. 235–248, 1991.
- [5] C. Grangeasse, A. J. Cozzone, J. Deutscher, and I. Mijakovic, "Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 32, no. 2, pp. 86–94, 2007.
- [6] D. Pincus, I. Letunic, P. Bork, and W. A. Lim, "Evolution of the phospho-tyrosine signaling machinery in premetazoan lineages," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 28, pp. 9680–9684, 2008.
- [7] S. M. Thomas and J. S. Brugge, "Cellular functions regulated by SRC family kinases," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 13, pp. 513–609, 1997.
- [8] R. Yanagimachi, "Mammalian fertilization," in *The Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. D. Neil, Eds., pp. 189–317, Raven Press, New York, NY, USA, 1994.
- [9] G. Wei and A. P. Mahowald, "The germline: familiar and newly uncovered properties," *Annual Review of Genetics*, vol. 28, pp. 309–324, 1994.
- [10] A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran, and C. L. Treviño, "Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa," *Physiological Reviews*, vol. 91, no. 4, pp. 1305–1355, 2011.
- [11] K. Toshimori, "Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation," *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, vol. 204, pp. 5–94, 2009.
- [12] E. Voronina and G. M. Wessel, "The regulation of oocyte maturation," *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 58, pp. 53–110, 2003.
- [13] B. Ciapa and S. Chiri, "Egg activation: upstream of the fertilization calcium signal," *Biology of the Cell*, vol. 92, no. 3-4, pp. 215–233, 2000.
- [14] A. M. Hasan, Y. Fukami, and K. I. Sato, "Gamete membrane microdomains and their associated molecules in fertilization signaling," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 78, no. 10-11, pp. 814–830, 2011.
- [15] W. H. Kinsey, "Tyrosine kinase signaling at fertilization," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 240, no. 3, pp. 519–522, 1997.
- [16] L. K. McGinnis, D. J. Carroll, and W. H. Kinsey, "Protein tyrosine kinase signaling during oocyte maturation and fertilization," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 78, no. 10-11, pp. 831–845, 2011.
- [17] L. L. Runft, L. A. Jaffe, and L. M. Mehlmann, "Egg activation at fertilization: where it all begins," *Developmental Biology*, vol. 245, no. 2, pp. 237–254, 2002.
- [18] K. I. Sato, T. Iwasaki, S. Hirahara, Y. Nishihira, and Y. Fukami, "Molecular dissection of egg fertilization signaling with the aid of tyrosine kinase-specific inhibitor and activator strategies," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1697, no. 1-2, pp. 103–121, 2004.
- [19] M. Whitaker, "Calcium at fertilization and in early development," *Physiological Reviews*, vol. 86, no. 1, pp. 25–88, 2006.
- [20] M. A. Handel, "Genetic control of spermatogenesis in mice," *Results and Problems in Cell Differentiation*, vol. 15, pp. 1–62, 1987.
- [21] D. G. de Rooij, "Stem cells in the testis," *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 79, no. 2, pp. 67–80, 1998.

- [22] G. S. Roeder, "Meiotic chromosomes: it takes two to tango," *Genes and Development*, vol. 11, no. 20, pp. 2600–2621, 1997.
- [23] K. Toshimori, "Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue," *Microscopy Research and Technique*, vol. 61, no. 1, pp. 1–6, 2003.
- [24] E. M. Eddy, K. Toshimori, and D. A. O'Brien, "Fibrous sheath of mammalian spermatozoa," *Microscopy Research and Technique*, vol. 61, no. 1, pp. 103–115, 2003.
- [25] K. Steger, "Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids," *Anatomy and Embryology*, vol. 199, no. 6, pp. 471–487, 1999.
- [26] E. M. Eddy, "Male germ cell gene expression," *Recent Progress in Hormone Research*, vol. 57, pp. 103–128, 2002.
- [27] B. Senthilkumaran, "Recent advances in meiotic maturation and ovulation: comparing mammals and pisces," *Frontiers in Bioscience*, vol. 16, no. 5, pp. 1898–1914, 2011.
- [28] M. Yamashita, "Molecular mechanisms of meiotic maturation and arrest in fish and amphibian oocytes," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 9, no. 5, pp. 569–579, 1998.
- [29] J. Deng, L. Carbajal, K. Evaul, M. Rasar, M. Jammongjit, and S. R. Hammes, "Nongenomic steroid-triggered oocyte maturation: of mice and frogs," *Steroids*, vol. 74, no. 7, pp. 595–601, 2009.
- [30] G. A. Cornwall, "New insights into epididymal biology and function," *Human Reproduction Update*, vol. 15, no. 2, pp. 213–227, 2009.
- [31] X. Deng, K. Czymmek, and P. A. Martin-DeLeon, "Biochemical maturation of Spam1 (PH-20) during epididymal transit of mouse sperm involves modifications of N-linked oligosaccharides," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 52, no. 2, pp. 196–206, 1999.
- [32] G. Morin, C. Lalancette, R. Sullivan, and P. Leclerc, "Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 71, no. 4, pp. 523–534, 2005.
- [33] M. Nikolopoulou, D. A. Soucek, and J. C. Vary, "Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 815, no. 3, pp. 486–498, 1985.
- [34] E. O. Hernández-González, C. L. Treviño, L. E. Castellano et al., "Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 33, pp. 24397–24406, 2007.
- [35] D. R. White and R. J. Aitken, "Influence of epididymal maturation on cyclic AMP levels in hamster spermatozoa," *International Journal of Andrology*, vol. 12, no. 1, pp. 29–43, 1989.
- [36] R. Yanagimachi, Y. D. Noda, M. Fujimoto, and G. L. Nicolson, "The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa," *American Journal of Anatomy*, vol. 135, no. 4, pp. 497–519, 1972.
- [37] B. Lewis and R. J. Aitken, "Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa," *Biology of Reproduction*, vol. 64, no. 5, pp. 1545–1556.
- [38] C. R. Austin, "Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg," *Australian Journal of Scientific Research B*, vol. 4, no. 4, pp. 581–596, 1951.
- [39] M. C. Chang, "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes," *Nature*, vol. 168, no. 4277, pp. 697–698, 1951.
- [40] R. Yanagimachi and M. C. Chang, "Fertilization of hamster eggs in vitro," *Nature*, vol. 200, no. 4903, pp. 281–282, 1963.
- [41] E. O. Hernández-González, J. Sosnik, J. Edwards et al., "Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 9, pp. 5623–5633, 2006.
- [42] E. Arcelay, A. M. Salicioni, E. Wertheimer, and P. E. Visconti, "Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation," *International Journal of Developmental Biology*, vol. 52, no. 5-6, pp. 463–472, 2008.
- [43] M. Eisenbach and L. C. Giojalas, "Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 4, pp. 276–285, 2006.
- [44] M. Yoshida, N. Kawano, and K. Yoshida, "Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 21, pp. 3446–3457, 2008.
- [45] L. A. Burnett, X. Xiang, A. L. Bieber, and D. E. Chandler, "Crisp proteins and sperm chemotaxis: discovery in amphibians and explorations in mammals," *International Journal of Developmental Biology*, vol. 52, no. 5-6, pp. 489–501, 2008.
- [46] M. Jin, E. Fujiwara, Y. Kakiuchi et al., "Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 12, pp. 4892–4896, 2011.
- [47] N. Inoue, M. Ikawa, A. Isotani, and M. Okabe, "The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs," *Nature*, vol. 434, no. 7030, pp. 234–238, 2005.
- [48] K. Kaji, S. Oda, T. Shikano et al., "The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice," *Nature Genetics*, vol. 24, no. 3, pp. 279–282, 2000.
- [49] C. Boucheix, "Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice," *Science*, vol. 287, no. 5451, pp. 319–321, 2000.
- [50] K. Miyado, G. Yamada, S. Yamada et al., "Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization," *Science*, vol. 287, no. 5451, pp. 321–324, 2000.
- [51] T. Ducibella and R. Fissore, "The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development," *Developmental Biology*, vol. 315, no. 2, pp. 257–279, 2008.
- [52] S. A. Stricker, "Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals," *Developmental Biology*, vol. 211, no. 2, pp. 157–176, 1999.
- [53] M. Nomikos, K. Swann, and F. A. Lai, "Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca²⁺ signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications for male infertility," *BioEssays*, vol. 34, no. 2, pp. 126–134, 2012.
- [54] Y. Harada, T. Matsumoto, S. Hirahara et al., "Characterization of a sperm factor for egg activation at fertilization of the newt *Cynops pyrrhogaster*," *Developmental Biology*, vol. 306, no. 2, pp. 797–808, 2007.
- [55] M. A. Baker, N. D. Smith, L. Hetherington et al., "Label-free quantitation of phosphopeptide changes during rat sperm capacitation," *Journal of Proteome Research*, vol. 9, no. 2, pp. 718–729, 2010.
- [56] M. A. Baker, G. Reeves, L. Hetherington, and R. J. Aitken, "Analysis of proteomic changes associated with sperm capacitation through the combined use of IPG-strip prefractionation followed by RP chromatography LC-MS/MS analysis," *Proteomics*, vol. 10, no. 3, pp. 482–495, 2010.
- [57] M. D. Piatt, A. M. Salicioni, D. F. Hunt, and P. E. Visconti, "Use of differential isotopic labeling and mass spectrometry

- to analyze capacitation-associated changes in the phosphorylation status of mouse sperm proteins." *Journal of Proteome Research*, vol. 8, no. 3, pp. 1431–1440, 2009.
- [58] S. Goupil, S. La Salle, J. M. Trasler, L. J. Bordeleau, and P. Leclerc, "Developmental expression of Src-related tyrosine kinases in the mouse testis," *Journal of Andrology*, vol. 32, no. 1, pp. 95–110, 2011.
- [59] C. Lawson, S. Goupil, and P. Leclerc, "Increased activity of the human sperm tyrosine kinase SRC by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium," *Biology of Reproduction*, vol. 79, no. 4, pp. 657–666, 2008.
- [60] S. Lev, Y. Yarden, and D. Givol, "Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 22, pp. 15970–15977, 1992.
- [61] I. Godin, R. Deed, J. Cooke, K. Zsebo, M. Dexter, and C. C. Wylie, "Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture," *Nature*, vol. 352, no. 6338, pp. 807–809, 1991.
- [62] D. Farini, G. La Sala, M. Tedesco, and M. De Felici, "Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells," *Developmental Biology*, vol. 306, no. 2, pp. 572–583, 2007.
- [63] K. Yoshinaga, S. Nishikawa, M. Ogawa et al., "Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function," *Development*, vol. 113, no. 2, pp. 689–699, 1991.
- [64] J. M. Oatley, M. R. Avarbock, and R. L. Brinster, "Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 35, pp. 25842–25851, 2007.
- [65] H. Morimoto, M. Kanatsu-Shinohara, S. Takashima et al., "Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 11, Article ID e7909, 2009.
- [66] A. Navon, Y. Schwarz, B. Hazan, Y. Kassir, and U. Nir, "Meiosis-dependent tyrosine phosphorylation of a yeast protein related to the mouse p51(ferT)," *Molecular and General Genetics*, vol. 244, no. 2, pp. 160–167, 1994.
- [67] S. Vincent, D. Segretain, S. Nishikawa et al., "Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis," *Development*, vol. 125, no. 22, pp. 4585–4593, 1998.
- [68] M. Pellegrini, D. Filipponi, M. Gori et al., "ATRA and KL promote differentiation toward the meiotic program of male germ cells," *Cell Cycle*, vol. 7, no. 24, pp. 3878–3888, 2008.
- [69] C. Lalancette, L. J. Bordeleau, R. L. Faure, and P. Leclerc, "Bull testicular haploid germ cells express a messenger encoding for a truncated form of the protein tyrosine kinase HCK," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 73, no. 4, pp. 520–530, 2006.
- [70] A. L. Kierszenbaum, E. Rivkin, A. Talmor-Cohen, R. Shalgi, and L. L. Tres, "Expression of full-length and truncated fyn tyrosine kinase transcripts and encoded proteins during spermatogenesis and localization during acrosome biogenesis and fertilization," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 76, no. 9, pp. 832–843, 2009.
- [71] L. J. Bordeleau and P. Leclerc, "Expression of hck-tr, a truncated form of the src-related tyrosine kinase hck, in bovine spermatozoa and testis," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 75, no. 5, pp. 828–837, 2008.
- [72] C. Albanesi, R. Geremia, M. Giorgio, S. Dolci, C. Sette, and P. Rossi, "A cell- and developmental stage-specific promoter drives the expression of a truncated c-kit protein during mouse spermatid elongation," *Development*, vol. 122, no. 4, pp. 1291–1302, 1996.
- [73] P. Rossi, G. Marziali, C. Albanesi, A. Charlesworth, R. Geremia, and V. Sorrentino, "A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids," *Developmental Biology*, vol. 152, no. 1, pp. 203–207, 1992.
- [74] M. P. Paronetto, J. P. Venables, D. J. Elliott, R. Geremia, P. Rossi, and C. Sette, "Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLC γ 1 and Sam68," *Oncogene*, vol. 22, no. 54, pp. 8707–8715, 2003.
- [75] B. Muciaccia, C. Sette, M. P. Paronetto et al., "Expression of a truncated form of KIT tyrosine kinase in human spermatozoa correlates with sperm DNA integrity," *Human Reproduction*, vol. 25, no. 9, pp. 2188–2202, 2010.
- [76] M. K. Y. Siu, D. D. Mruk, W. M. Lee, and C. Y. Cheng, "Adhering junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of β 1-integrin and focal adhesion complex-associated proteins," *Endocrinology*, vol. 144, no. 5, pp. 2141–2163, 2003.
- [77] Y. M. Chen, N. P. Y. Lee, D. D. Mruk, W. M. Lee, and C. Y. Cheng, "Fer kinase/FerT and adherens junction dynamics in the testis: an in vitro and in vivo study," *Biology of Reproduction*, vol. 69, no. 2, pp. 656–672, 2003.
- [78] M. Maekawa, Y. Toyama, M. Yasuda, T. Yagi, and S. Yuasa, "Fyn tyrosine kinase in sertoli cells is involved in mouse spermatogenesis," *Biology of Reproduction*, vol. 66, no. 1, pp. 211–221, 2002.
- [79] M. K. Y. Siu, C. H. Wong, W. M. Lee, and C. Y. Cheng, "Sertoli-germ cell anchoring junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of lipid and protein kinases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 26, pp. 25029–25047, 2005.
- [80] M. Rassoulzadegan, V. Paquis-Flucklinger, B. Bertino et al., "Transmeiotic differentiation of male germ cells in culture," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 997–1006, 1993.
- [81] M. C. Hofmann, R. A. Hess, E. Goldberg, and J. L. Millán, "Immortalized germ cells undergo meiosis in vitro," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 12, pp. 5533–5537, 1994.
- [82] T. Sato, K. Katagiri, A. Gohbara et al., "In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes," *Nature*, vol. 471, no. 7339, pp. 504–507, 2011.
- [83] K. Miki, W. Qu, E. H. Goulding et al., "Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 47, pp. 16501–16506, 2004.
- [84] M. Nakamura, S. Okinaga, and K. Arai, "Metabolism of round spermatids: evidence that lactate is preferred substrate," *The American journal of physiology*, vol. 247, no. 2, pp. E234–E242, 1984.
- [85] M. Nakamura, S. Okinaga, and K. Arai, "Metabolism of pachytene primary spermatocytes from rat testes: pyruvate maintenance of adenosine triphosphate level," *Biology of Reproduction*, vol. 30, no. 5, pp. 1187–1197, 1984.
- [86] B. T. Storey and F. J. Kayne, "Energy metabolism of spermatozoa. V. The Embden Myerhof pathway of glycolysis: activities of pathway enzymes in hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa," *Fertility and Sterility*, vol. 26, no. 12, pp. 1257–1265, 1975.
- [87] H. I. Calvin and J. M. Bedford, "Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian

- spermatozoa during maturation in the epididymis," *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, vol. 13, supplement 13, pp. 65–75, 1971.
- [88] G. A. Cornwall, D. Vindivich, S. Tillman, and T. S. Chang, "The effect of sulfhydryl oxidation on the morphology of immature hamster epididymal spermatozoa induced to acquire motility in vitro," *Biology of Reproduction*, vol. 39, no. 1, pp. 141–155, 1988.
- [89] J. Seligman, Y. Zipser, and N. S. Kosower, "Tyrosine phosphorylation, thiol status, and protein tyrosine phosphatase in rat epididymal spermatozoa," *Biology of Reproduction*, vol. 71, no. 3, pp. 1009–1015, 2004.
- [90] K. U. Devi, M. B. Ahmad, and S. Shivaji, "A maturation-related differential phosphorylation of the plasma membrane proteins of the epididymal spermatozoa of the hamster by endogenous protein kinases," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 47, no. 3, pp. 341–350, 1997.
- [91] A. Fàbrega, M. Puigmulé, M. Yeste, I. Casas, S. Bonet, and E. Pinart, "Impact of epididymal maturation, ejaculation and in vitro capacitation on tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa," *Theriogenology*, vol. 76, no. 7, pp. 1356–1366, 2011.
- [92] R. Jones, P. S. James, D. Oxley, J. Coadwell, F. Suzuki-Toyota, and E. A. Howes, "The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins," *Biology of Reproduction*, vol. 79, no. 3, pp. 421–431, 2008.
- [93] B. Lewis and R. J. Aitken, "A redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat spermatozoa," *Journal of Andrology*, vol. 22, no. 4, pp. 611–622, 2001.
- [94] M. Lin, H. L. Yun, W. Xu, M. A. Baker, and R. J. Aitken, "Ontogeny of tyrosine phosphorylation-signaling pathways during spermatogenesis and epididymal maturation in the mouse," *Biology of Reproduction*, vol. 75, no. 4, pp. 588–597, 2006.
- [95] H. Ecroyd, K. L. Asquith, R. C. Jones, and R. J. Aitken, "The development of signal transduction pathways during epididymal maturation is calcium dependent," *Developmental Biology*, vol. 268, no. 1, pp. 53–63, 2004.
- [96] M. A. Baker, R. Witherdin, L. Hetherington, K. Cunningham-Smith, and R. J. Aitken, "Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis," *Proteomics*, vol. 5, no. 4, pp. 1003–1012, 2005.
- [97] M. A. Baker, N. D. Smith, L. Hetherington, M. Pelzing, M. R. Condina, and R. J. Aitken, "Use of titanium dioxide to find phosphopeptide and total protein changes during epididymal sperm maturation," *Journal of Proteome Research*, vol. 10, no. 3, pp. 1004–1017, 2011.
- [98] E. Sonnenberg-Riethmacher, B. Walter, D. Riethmacher, S. Gödecke, and C. Birchmeier, "The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis," *Genes and Development*, vol. 10, no. 10, pp. 1184–1193, 1996.
- [99] H. Keilhack, M. Müller, S. A. Böhmer et al., "Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling: an epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1," *Journal of Cell Biology*, vol. 152, no. 2, pp. 325–334, 2001.
- [100] P. Syntin, F. Dacheux, X. Druart, J. L. Gatti, N. Okamura, and J. L. Dacheux, "Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis," *Biology of Reproduction*, vol. 55, no. 5, pp. 956–974, 1996.
- [101] J. L. Dacheux, M. Belghazi, Y. Lanson, and F. Dacheux, "Human epididymal secretome and proteome," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 250, no. 1–2, pp. 36–42, 2006.
- [102] A. E. Duncan and L. R. Fraser, "Cyclic AMP-dependent phosphorylation of epididymal mouse sperm proteins during capacitation in vitro: identification of an Mr 95,000 phosphotyrosine-containing protein," *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 97, no. 1, pp. 287–299, 1993.
- [103] P. E. Visconti, J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, and G. S. Kopf, "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation," *Development*, vol. 121, no. 4, pp. 1129–1137, 1995.
- [104] P. E. Visconti, G. D. Moore, J. L. Bailey et al., "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway," *Development*, vol. 121, no. 4, pp. 1139–1150, 1995.
- [105] E. Baldi, M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz, and G. Forti, "Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways," *Frontiers in Bioscience*, vol. 1, pp. d189–d205, 1996.
- [106] B. S. Pukazhenthil, D. E. Wildt, M. A. Ottinger, and J. Howard, "Compromised sperm protein phosphorylation after capacitation, swim-up, and zona pellucida exposure in teratospermic domestic cats," *Journal of Andrology*, vol. 17, no. 4, pp. 409–419, 1996.
- [107] B. S. Pukazhenthil, J. A. Long, D. E. Wildt, M. A. Ottinger, D. L. Armstrong, and J. Howard, "Regulation of sperm function by protein tyrosine phosphorylation in diverse wild felid species," *Journal of Andrology*, vol. 19, no. 6, pp. 675–685, 1998.
- [108] A. Carrera, J. Moos, X. P. Ning et al., "Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation," *Developmental Biology*, vol. 180, no. 1, pp. 284–296, 1996.
- [109] A. Mandal, S. Naaby-Hansen, M. J. Wolkowicz et al., "FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa," *Biology of Reproduction*, vol. 61, no. 5, pp. 1184–1197, 1999.
- [110] P. E. Visconti, L. R. Johnson, M. Oyaski et al., "Regulation, localization, and anchoring of protein kinase subunits during mouse sperm capacitation," *Developmental Biology*, vol. 192, no. 2, pp. 351–363, 1997.
- [111] R. K. Naz, "c-abl proto-oncoprotein is expressed and tyrosine phosphorylated in human sperm cell," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 51, no. 2, pp. 210–217, 1998.
- [112] P. E. Visconti, X. Ning, M. W. Fornés et al., "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation," *Developmental Biology*, vol. 214, no. 2, pp. 429–443, 1999.
- [113] P. E. Visconti, H. Galantino-Homer, X. Ning et al., "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: β -cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 5, pp. 3235–3242, 1999.
- [114] J. E. Osheroff, P. E. Visconti, J. P. Valenzuela, A. J. Travis, J. Alvarez, and G. S. Kopf, "Regulation of human sperm

- capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation," *Molecular Human Reproduction*, vol. 5, no. 11, pp. 1017–1026, 1999.
- [115] Y. Si and P. Olds-Clarke, "Evidence for the involvement of calmodulin in mouse sperm capacitation," *Biology of Reproduction*, vol. 62, no. 5, pp. 1231–1239, 2000.
- [116] H. T. Zeng and D. R. P. Tulsiani, "Calmodulin antagonists differentially affect capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation of mouse sperm components," *Journal of Cell Science*, vol. 116, no. 10, pp. 1981–1989, 2003.
- [117] Y. H. Huang, S. T. Chu, and Y. H. Chen, "A seminal vesicle autoantigen of mouse is able to suppress sperm capacitation-related events stimulated by serum albumin," *Biology of Reproduction*, vol. 63, no. 5, pp. 1562–1566, 2000.
- [118] Y. H. Huang, S. P. Kuo, M. H. Lin et al., "Signals of seminal vesicle autoantigen suppresses bovine serum albumin-induced capacitation in mouse sperm," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 338, no. 3, pp. 1564–1571, 2005.
- [119] S. A. Adeoya-Osiguwa and L. R. Fraser, "Fertilization promoting peptide and adenosine, acting as first messengers, regulate cAMP production and consequent protein tyrosine phosphorylation in a capacitation-dependent manner," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 57, no. 4, pp. 384–392, 2000.
- [120] H. Funahashi, A. Asano, T. Fujiwara, T. Nagai, K. Niwa, and L. R. Fraser, "Both fertilization promoting peptide and adenosine stimulate capacitation but inhibit spontaneous acrosome loss in ejaculated boar spermatozoa in vitro," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 55, no. 1, pp. 117–124, 2000.
- [121] F. Urner, G. Leppens-Luisier, and D. Sakkas, "Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose," *Biology of Reproduction*, vol. 64, no. 5, pp. 1350–1357, 2001.
- [122] I. A. Demarco, F. Espinosa, J. Edwards et al., "Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 9, pp. 7001–7009, 2003.
- [123] E. Brener, S. Rubinstein, G. Cohen, K. Shternall, J. Rivlin, and H. Breitbart, "Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction," *Biology of Reproduction*, vol. 68, no. 3, pp. 837–845, 2003.
- [124] M. G. Buffone, T. W. Ijiri, W. Cao, T. Merdiushev, H. K. Aghajanian, and G. L. Gerton, "Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 79, no. 1, pp. 4–18, 2012.
- [125] H. W. Ecroyd, R. C. Jones, and R. J. Aitken, "Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation," *Biology of Reproduction*, vol. 69, no. 1, pp. 347–354, 2003.
- [126] R. J. Aitken and M. A. Baker, "Oxidative stress and male reproductive biology," *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 16, no. 5, pp. 581–588, 2004.
- [127] H. Ecroyd, R. C. Jones, and R. J. Aitken, "Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation," *Biology of Reproduction*, vol. 69, no. 6, pp. 1801–1807, 2003.
- [128] K. L. Asquith, R. M. Baleato, E. A. McLaughlin, B. Nixon, and R. J. Aitken, "Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition," *Journal of Cell Science*, vol. 117, pp. 3645–3657, 2004.
- [129] L. A. Mitchell, B. Nixon, and R. J. Aitken, "Analysis of chaperone proteins associated with human spermatozoa during capacitation," *Molecular Human Reproduction*, vol. 13, no. 9, pp. 605–613, 2007.
- [130] T. A. Quill, S. A. Sugden, K. L. Rossi, L. K. Doolittle, R. E. Hammer, and D. L. Garbers, "Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 25, pp. 14869–14874, 2003.
- [131] M. A. Baker, L. Hetherington, H. Ecroyd, S. D. Roman, and R. J. Aitken, "Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation," *Journal of Cell Science*, vol. 117, pp. 211–222, 2004.
- [132] C. Rodeheffer and B. D. Shur, "Sperm from β 1,4-galactosyltransferase I-null mice exhibit precocious capacitation," *Development*, vol. 131, no. 3, pp. 491–501, 2004.
- [133] S. Mededovic and L. R. Fraser, "Angiotensin II stimulates cAMP production and protein tyrosine phosphorylation in mouse spermatozoa," *Reproduction*, vol. 127, no. 5, pp. 601–612, 2004.
- [134] K. C. Hess, B. H. Jones, B. Marquez et al., "The 'soluble' adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization," *Developmental Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 249–259, 2005.
- [135] F. Xie, M. A. Garcia, A. E. Carlson et al., "Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization," *Developmental Biology*, vol. 296, no. 2, pp. 353–362, 2006.
- [136] B. Nixon, D. A. MacIntyre, L. A. Mitchell, G. M. Gibbs, M. O'Bryan, and R. J. Aitken, "The identification of mouse sperm-surface-associated proteins and characterization of their ability to act as decapacitation factors," *Biology of Reproduction*, vol. 74, no. 2, pp. 275–287, 2006.
- [137] J. C. Thundathil, M. Anzar, and M. M. Bühr, "Na⁺/K⁺ ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation," *Biology of Reproduction*, vol. 75, no. 3, pp. 308–317, 2006.
- [138] J. B. Tang and Y. H. Chen, "Identification of a tyrosine-phosphorylated CCCTC-binding nuclear factor in capacitated mouse spermatozoa," *Proteomics*, vol. 6, no. 17, pp. 4800–4807, 2006.
- [139] N. Kawano and M. Yoshida, "Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility," *Biology of Reproduction*, vol. 76, no. 3, pp. 353–361, 2007.
- [140] W. Cao, H. K. Aghajanian, L. A. Haig-Ladewig, and G. L. Gerton, "Sorbitol can fuel mouse sperm motility and protein tyrosine phosphorylation via sorbitol dehydrogenase," *Biology of Reproduction*, vol. 80, no. 1, pp. 124–133, 2009.
- [141] E. V. Wertheimer, A. M. Salicioni, W. Liu et al., "Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 51, pp. 35539–35550, 2008.
- [142] V. Kota, V. M. Dhople, and S. Shivaji, "Tyrosine phosphoproteome of hamster spermatozoa: role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in sperm capacitation," *Proteomics*, vol. 9, no. 7, pp. 1809–1826, 2009.
- [143] V. Kota, P. Rai, J. M. Weitzel, R. Middendorff, S. S. Bhande, and S. Shivaji, "Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 77, no. 9, pp. 773–783, 2010.
- [144] C. Gyamera-Acheampong, J. Vasilescu, D. Figeys, and M. Mbikay, "PCSK4-null sperm display enhanced protein

- tyrosine phosphorylation and ADAM2 proteolytic processing during in vitro capacitation," *Fertility and Sterility*, vol. 93, no. 4, pp. 1112–1123, 2010.
- [145] B. Nixon, A. Bielanowicz, A. L. Anderson et al., "Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 224, no. 1, pp. 71–83, 2010.
- [146] M. Shimada, Y. Yanai, T. Okazaki et al., "Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization," *Development*, vol. 135, no. 11, pp. 2001–2011, 2008.
- [147] V. G. Da Ros, J. A. Maldera, W. D. Willis et al., "Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1)," *Developmental Biology*, vol. 320, no. 1, pp. 12–18, 2008.
- [148] M. A. Baker, L. Hetherington, and R. J. Aitken, "Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa," *Journal of Cell Science*, vol. 119, pp. 3182–3192, 2006.
- [149] L. A. Mitchel, B. Nixon, M. A. Baker, and R. J. Aitken, "Investigation of the role of SRC in capacitation-associated tyrosine phosphorylation of human spermatozoa," *Molecular Human Reproduction*, vol. 14, no. 4, pp. 235–243, 2008.
- [150] D. Krapf, E. Arcelay, E. V. Wertheimer et al., "Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 11, pp. 7977–7985, 2010.
- [151] L. Cotton, G. M. Gibbs, L. G. Sanchez-Partida, J. R. Morrison, D. M. de Kretser, and M. K. O'Bryan, "Erratum: FGFR-1 signaling is involved in spermiogenesis and sperm capacitation," *Journal of Cell Science*, vol. 119, pp. 75–84, 2006.
- [152] M. A. Baker, L. Hetherington, B. Curry, and R. J. Aitken, "Phosphorylation and consequent stimulation of the tyrosine kinase c-Abl by PKA in mouse spermatozoa; its implications during capacitation," *Developmental Biology*, vol. 333, no. 1, pp. 57–66, 2009.
- [153] L. Leyton and P. Saling, "95 kd sperm protein binds ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding," *Cell*, vol. 57, no. 7, pp. 1123–1130, 1989.
- [154] L. Leyton, P. LeGuen, D. Bunch, and P. M. Saling, "Regulation of mouse gamete interaction by a sperm tyrosine kinase," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 24, pp. 11692–11695, 1992.
- [155] R. K. Naz, C. Morte, K. Ahmad, and P. Martinez, "Hexokinase present in human sperm is not tyrosine phosphorylated but its antibodies affect fertilizing capacity," *Journal of Andrology*, vol. 17, no. 2, pp. 143–150, 1996.
- [156] A. J. Travis, J. A. Foster, N. A. Rosenbaum et al., "Targeting of a germ cell-specific type I hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 263–276, 1998.
- [157] S. Benoff, "Modelling human sperm-egg interactions in vitro: signal transduction pathways regulating the acrosome reaction," *Molecular Human Reproduction*, vol. 4, no. 5, pp. 453–471, 1998.
- [158] G. Berruti and E. Martegani, "Identification of proteins cross-reactive to phosphotyrosine antibodies and of a tyrosine kinase activity in boar spermatozoa," *Journal of Cell Science*, vol. 93, pp. 667–674, 1989.
- [159] R. K. Naz, "Protein tyrosine phosphorylation and signal transduction during capacitation-acrosome reaction and zona pellucida binding in human sperm," *Systems Biology in Reproductive Medicine*, vol. 37, no. 1, pp. 47–55, 1996.
- [160] R. K. Naz and P. B. Rajesh, "Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction," *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 2, article 75, 2004.
- [161] C. N. Tomes, C. R. McMaster, and P. M. Saling, "Activation of mouse sperm phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate-phospholipase C by zona pellucida is modulated by tyrosine phosphorylation," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 43, no. 2, pp. 196–204, 1996.
- [162] K. Fukami, M. Yoshida, T. Inoue et al., "Phospholipase C δ 4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm," *Journal of Cell Biology*, vol. 161, no. 1, pp. 79–88, 2003.
- [163] K. Fukami, K. Nakao, T. Inoue et al., "Requirement of phospholipase C δ 4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction," *Science*, vol. 292, no. 5518, pp. 920–923, 2001.
- [164] H. M. Fisher, I. A. Brewis, C. L. R. Barratt, I. D. Cooke, and H. D. M. Moore, "Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation," *Molecular Human Reproduction*, vol. 4, no. 9, pp. 849–855, 1998.
- [165] H. Breitbart, T. Rotman, S. Rubinstein, and N. Etkovitz, "Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 314, no. 2, pp. 234–238, 2010.
- [166] M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz, G. Gervasi, G. Forti, and E. Baldi, "Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 108, no. 1-2, pp. 35–42, 1995.
- [167] L. Bonaccorsi, M. Luconi, G. Forti, and E. Baldi, "Tyrosine kinase inhibition reduces the plateau phase of the calcium increase in response to progesterone in human sperm," *FEBS Letters*, vol. 364, no. 1, pp. 83–86, 1995.
- [168] S. Meizel and K. O. Turner, "Chloride efflux during the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction is inhibited by lavendustin A, a tyrosine kinase inhibitor," *Journal of Andrology*, vol. 17, no. 4, pp. 327–330, 1996.
- [169] B. S. Pukazhenti, D. E. Wildt, M. A. Ottlinger, and J. Howard, "Inhibition of domestic cat spermatozoa acrosome reaction and zona pellucida penetration by tyrosine kinase inhibitors," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 49, no. 1, pp. 48–57, 1998.
- [170] V. Dorval, M. Dufour, and P. Leclerc, "Role of protein tyrosine phosphorylation in the thapsigargin-induced intracellular Ca²⁺ store depletion during human sperm acrosome reaction," *Molecular Human Reproduction*, vol. 9, no. 3, pp. 125–131, 2003.
- [171] C. Morte, A. Iborra, and P. Martinez, "Phosphorylation of Shc proteins in human sperm in response to capacitation and progesterone treatment," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 50, no. 1, pp. 113–120, 1998.
- [172] C. Picherit-Marchenay, S. Bréchar, D. Boucher, and G. Grizard, "Correlation between tyrosine phosphorylation intensity of a 107 kDa protein band and A23187-induced acrosome reaction in human spermatozoa," *Andrologia*, vol. 36, no. 6, pp. 370–377, 2004.
- [173] V. Mor, T. Das, M. Bhattacharjee, and T. Chatterjee, "Protein tyrosine phosphorylation of a heparin-binding sperm

- membrane mitogen (HBSM) is associated with capacitation and acrosome reaction," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 352, no. 2, pp. 404–409, 2007.
- [174] C. N. Tomes, C. M. Roggero, G. De Blas, P. M. Saling, and L. S. Mayorga, "Requirement of protein tyrosine kinase and phosphatase activities for human sperm exocytosis," *Developmental Biology*, vol. 265, no. 2, pp. 399–415, 2004.
- [175] V. E. P. Zarelli, M. C. Ruete, C. M. Roggero, L. S. Mayorga, and C. N. Tomes, "PTP1B dephosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive factor and elicits SNARE complex disassembly during human sperm exocytosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 16, pp. 10491–10503, 2009.
- [176] M. Finkelstein, N. Etkovitz, and H. Breitbart, "Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 51, pp. 39702–39709, 2010.
- [177] Y. Lax, S. Rubinstein, and H. Breitbart, "Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm," *FEBS Letters*, vol. 339, no. 3, pp. 234–238, 1994.
- [178] N. Etkovitz, Y. Tirosch, R. Chazan et al., "Bovine sperm acrosome reaction induced by G protein-coupled receptor agonists is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation," *Developmental Biology*, vol. 334, no. 2, pp. 447–457, 2009.
- [179] L. Daniel, N. Etkovitz, S. R. Weiss, S. Rubinstein, D. Ickowicz, and H. Breitbart, "Regulation of the sperm EGF receptor by ouabain leads to initiation of the acrosome reaction," *Developmental Biology*, vol. 344, no. 2, pp. 650–657, 2010.
- [180] K. I. Sato, A. Sato, M. Aoto, and Y. Fukami, "C-SRC phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 215, no. 3, pp. 1078–1087, 1995.
- [181] D. A. Tice, J. S. Biscardi, A. L. Nickles, and S. J. Parsons, "Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 4, pp. 1415–1420, 1999.
- [182] J. S. Biscardi, M. C. Maa, D. A. Tice, M. E. Cox, T. H. Leu, and S. J. Parsons, "C-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 12, pp. 8335–8343, 1999.
- [183] G. Varano, A. Lombardi, G. Cantini, G. Forti, E. Baldi, and M. Luconi, "Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa," *Human Reproduction*, vol. 23, no. 12, pp. 2652–2662, 2008.
- [184] S. Tapia, M. Rojas, P. Morales, M. A. Ramirez, and E. S. Diaz, "The laminin-induced acrosome reaction in human sperm is mediated by src kinases and the proteasome," *Biology of Reproduction*, vol. 85, no. 2, pp. 357–366, 2011.
- [185] H. Feng, J. I. Sandlow, and A. Sandra, "The c-kit receptor and its possible signaling transduction pathway in mouse spermatozoa," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 49, no. 3, pp. 317–326, 1998.
- [186] D. Krapf, P. E. Visconti, S. E. Arranz, and M. O. Cabada, "Egg water from the amphibian *Bufo arenarum* induces capacitation-like changes in homologous spermatozoa," *Developmental Biology*, vol. 306, no. 2, pp. 516–524, 2007.
- [187] B. Baibakov, L. Gauthier, P. Talbot, T. L. Rankin, and J. Dean, "Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis," *Development*, vol. 134, no. 5, pp. 933–943, 2007.
- [188] J. M. Teijeiro, M. O. Cabada, and P. E. Marini, "Sperm binding glycoprotein (SBG) produces calcium and bicarbonate dependent alteration of acrosome morphology and protein tyrosine phosphorylation on boar sperm," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 103, no. 5, pp. 1413–1423, 2008.
- [189] E. S. Diaz, M. Kong, and P. Morales, "Effect of fibronectin on proteasome activity, acrosome reaction, tyrosine phosphorylation and intracellular calcium concentrations of human sperm," *Human Reproduction*, vol. 22, no. 5, pp. 1420–1430, 2007.
- [190] M. C. Gye, "Changes in sperm phosphotyrosine proteins by human follicular fluid in mice," *Archives of Andrology*, vol. 49, no. 6, pp. 417–422, 2003.
- [191] I. K. Townley, E. Schuyler, M. Parker-Gür, and K. R. Foltz, "Expression of multiple Src family kinases in sea urchin eggs and their function in Ca^{2+} release at fertilization," *Developmental Biology*, vol. 327, no. 2, pp. 465–477, 2009.
- [192] A. F. Giusti, D. J. Carroll, Y. A. Abassi, M. Terasaki, K. R. Foltz, and L. A. Jaffef, "Requirement of a Src family kinase for initiating calcium release at fertilization in starfish eggs," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 41, pp. 29318–29322, 1999.
- [193] L. L. Runft and L. A. Jaffef, "Sperm extract injection into ascidian eggs signals Ca^{2+} release by the same pathway as fertilization," *Development*, vol. 127, no. 15, pp. 3227–3236, 2000.
- [194] K. I. Sato, A. A. Tokmakov, T. Iwasaki, and Y. Fukami, "Tyrosine kinase-dependent activation of phospholipase C γ is required for calcium transient in *Xenopus* egg fertilization," *Developmental Biology*, vol. 224, no. 2, pp. 453–469, 2000.
- [195] L. K. McGinnis, D. F. Albertini, and W. H. Kinsey, "Localized activation of Src-family protein kinases in the mouse egg," *Developmental Biology*, vol. 306, no. 1, pp. 241–254, 2007.
- [196] M. Levi, B. Maro, and R. Shalgi, "Fyn kinase is involved in cleavage furrow ingression during meiosis and mitosis," *Reproduction*, vol. 140, no. 6, pp. 827–834, 2010.
- [197] C. Sette, A. Bevilacqua, A. Bianchini, F. Mangia, R. Geremia, and P. Rossi, "Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa," *Development*, vol. 124, no. 11, pp. 2267–2274, 1997.
- [198] C. Sette, A. Bevilacqua, R. Geremia, and P. Rossi, "Involvement of phospholipase C γ 1 in mouse egg activation induced by a truncated form of the c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa," *Journal of Cell Biology*, vol. 142, no. 4, pp. 1063–1074, 1998.
- [199] C. Sette, M. P. Paronetto, M. Barchi, A. Bevilacqua, R. Geremia, and P. Rossi, "Tr-kit-induced resumption of the cell cycle in mouse eggs requires activation of a Src-like kinase," *The EMBO Journal*, vol. 21, no. 20, pp. 5386–5395, 2002.
- [200] A. T. H. Wu, P. Sutovsky, G. Manandhar et al., "PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 16, pp. 12164–12175, 2007.
- [201] K. Simons and D. Toomre, "Lipid rafts and signal transduction," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 31–39, 2000.
- [202] L. J. Pike, "Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function," *Journal of Lipid Research*, vol. 47, no. 7, pp. 1597–1598, 2006.
- [203] R. J. Belton Jr., N. L. Adams, and K. R. Foltz, "Isolation and characterization of sea urchin egg lipid rafts and their possible function during fertilization," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 59, no. 3, pp. 294–305, 2001.

- [204] K. I. Sato, T. Iwasaki, K. Ogawa, M. Konishi, A. A. Tokmakov, and Y. Fukami, "Low density detergent-insoluble membrane of *Xenopus* eggs: subcellular microdomain for tyrosine kinase signaling in fertilization," *Development*, vol. 129, no. 4, pp. 885–896, 2002.
- [205] A. Luria, V. Vegelyte-Avery, B. Stith et al., "Detergent-free domain isolated from *Xenopus* egg plasma membrane with properties similar to those of detergent-resistant membranes," *Biochemistry*, vol. 41, no. 44, pp. 13189–13197, 2002.
- [206] M. Comiskey and C. M. Warner, "Spatio-temporal localization of membrane lipid rafts in mouse oocytes and cleaving preimplantation embryos," *Developmental Biology*, vol. 303, no. 2, pp. 727–739, 2007.
- [207] B. Sato, Y. U. Katagiri, K. Miyado et al., "Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage," *BMC Developmental Biology*, vol. 11, article 22, 2011.
- [208] A. K. M. Hasan, Z. Ou, K. Sakakibara et al., "Characterization of *Xenopus* egg membrane microdomains containing uroplakin Ib/III complex: roles of their molecular interactions for subcellular localization and signal transduction," *Genes to Cells*, vol. 12, no. 2, pp. 251–267, 2007.
- [209] A. K. M. Hasan, K. I. Sato, K. Sakakibara et al., "Uroplakin III, a novel Src substrate in *Xenopus* egg rafts, is a target for sperm protease essential for fertilization," *Developmental Biology*, vol. 286, no. 2, pp. 483–492, 2005.
- [210] K. Sakakibara, K. I. Sato, K. I. Yoshino et al., "Molecular identification and characterization of *Xenopus* egg uroplakin III, an egg raft-associated transmembrane protein that is tyrosine-phosphorylated upon fertilization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 15, pp. 15029–15037, 2005.
- [211] K. I. Sato, A. A. Tokmakov, C. L. He et al., "Reconstitution of Src-dependent phospholipase *Cy* phosphorylation and transient calcium release by using membrane rafts and cell-free extracts from *Xenopus* eggs," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 40, pp. 38413–38420, 2003.
- [212] D. Krapf, Y. Chun Ruan, E. V. Wertheimer et al., "cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit," *Developmental Biology*, vol. 369, no. 1, pp. 43–53, 2012.

◇ 研究業績

研究業績

A) 学術論文

1. Variations in the structure and transcription of the mitochondrial genes in wild *Solanum* species that induce male sterility in eggplant (*S. melongena*)
Yoshimi, M., Kitamura, Y., Isshiki, S., Saito, T., Yasumoto, K., Terachi, T. and Yamagishi, H.
Theor Appl Genet. (in press) 査読・有 2013
2. A possible breakage of linkage disequilibrium between mitochondrial and chloroplast genomes during Emmer and Dinkel wheat evolution
Tsuji, M., Mori, N., Yamagishi, H. and Terachi, T.
Genome (in press) 査読・有 2013
3. Identification of the predominant nonrestoring allele for Owen-type cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.): development of molecular markers for the maintainer genotype.
Moritani, M., Taguchi, K., Kitazaki, K., Matsuhira, H., Katsuyama, T., Mikami, T. and Kubo, T.
Mol. Breeding (in press) 査読・有 2013
4. Genetic diseases associated with protein glycosylation disorders in mammals.
Nakayama, Y., Nakamura, N., Tsuji, D., Itoh, K. and Kurosaka, A.
Genetic Disorders (in press) 査読・有 2013
5. Evolution of the ONSEN retrotransposon family activated upon heat stress in *Brassicaceae*.
Ito, H., Yoshida, T., Tsukahara, S. and Kawabe, A.
Gene 518: 256-61 査読・有 2013
6. Evolutionary aspects of a unique internal mitochondrial targeting signal in nuclear-migrated *rps19* of sugar beet (*Beta vulgaris*).
Matsunaga, M., Takahashi, Y., Yui-Kurino, R., Mikami, T. and Kubo, T.
Gene 517: 19-26 査読・有 2013
7. Unusual and typical features of a novel restorer-of-fertility gene of sugar beet (*Beta vulgaris* L.).
Matsuhira, H., Kagami, H., Kurata, M., Kitazaki, K., Matsunaga, M., Hamaguchi, Y., Hagihara, E., Ueda, M., Harada, M., Muramatsu, A., Yui-Kurino, R., Taguchi, K., Tamagake, H., Mikami, T. and Kubo, T.
Genetics, 192 : 1347-1358 査読・有 2012
8. Centromere-targeted de novo integrations of an LTR retrotransposon of *Arabidopsis lyrata*.
Tsukahara, S., Kawabe, A., Kobayashi, A., Ito, T., Aizu, T., Shin-I, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Tarutani, Y. and Kakutani, T.
Genes & Development 26: 705-13 査読・有 2012
9. A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.).
Tanaka, Y., Tsuda, M., Yasumoto, K., Yamagishi, H. and Terachi, T.
BMC Genomics 13: 352 査読・有 2012
10. PKL01, an *Ndr* kinase homologue in plant, shows tyrosine kinase activity.
Katayama, S., Sugiyama, Y., Hatano, N., Terachi, T., Sueyoshi, N and Kameshita, I.
J Biochem 152: 347-353 査読・有 2012
11. Defense response of a pepper cultivar cv. Sy-2 is induced at temperatures below 24°C.
Koeda S, Hosokawa M, Kang BC, Tanaka C, Choi D, Sano S, Shiina T, Doi M, Yazawa S.
J Plant Res. 125: 137-145 査読・有 2012
12. Functional characterization of *ObgC* in ribosome biogenesis during chloroplast development.
Bang WY, Chen J, Jeong IS, Kim SW, Kim CW, Jung HS, Lee KH, Kweon HS, Yoko I, Shiina T, Bahk JD.
Plant J. 71: 122-134 査読・有 2012
13. Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase.
Yagi Y, Ishizaki Y, Nakahira Y, Tozawa Y, Shiina T.
Proc Natl Acad Sci USA. 109 : 7541-7546 査読・有 2012
14. Chloroplast-mediated activation of plant immune signalling in *Arabidopsis*.
Nomura H, Komori T, Uemura S, Kanda Y, Shimotani K, Nakai K, Furuichi T, Takebayashi K, Sugimoto T, Sano S, Suwastika IN, Fukusaki E, Yoshioka H, Nakahira Y, Shiina T.

Nat Commun. 26: 926 査読・有 2012

15. Evolutionary aspects of plastid proteins involved in transcription: The transcription of a tiny genome is mediated by a complicated machinery.

Yagi Y, [Shiina T.](#)

Transcription 3: 290-294 査読・有 2012

16. Mitochondrial minisatellite polymorphisms in fodder and sugar beets reveal genetic bottlenecks associated with domestication.

Yoshida, Y., Matsunaga, M., Cheng, D., Xu, D., Honma, Y., Mikami, T. and [Kubo, T.](#)

Biologia Plantarum 56: 369-372 査読・有 2012

17. Is RNA editing implicated in group II intron survival in the angiosperm mitochondrial genome?

Kagami, H., Nagano, H., Takahashi, Y., Mikami, T. and [Kubo, T.](#)

Genome 55: 75-79 査読・有 2012

18. A putative polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase/ Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 (WBSCR17) regulates lamellipodium formation and macropinocytosis.

Nakayama, Y., Nakamura, N., Oki, S., Wakabayashi, M., Ishihama, Y., Miyake, A., Itoh, N., and [Kurosaka, A.](#)

Journal of Biological Chemistry 287: 32222-32235 査読・有 2012

19. Phospho-signaling at oocyte maturation and fertilization: Set up for embryogenesis and beyond. Part I. Protein kinases.

Mahbub Hasan, A.K.M., Matsumoto, T., Kihira, S., Yoshida, J., and [Sato, K.](#)

Embryogenesis: 447-498 査読・有 2012

20. Phospho-signaling at oocyte maturation and fertilization: Set up for embryogenesis and beyond Part II. Kinase regulators and substrates.

Mahbub Hasan, A.K.M., Matsumoto, T., Kihira, S., Yoshida, J., and [Sato, K.](#)

Embryogenesis: 499-554 査読・有 2012

21. Involvement of *Src* in the adaptation of cancer cells under microenvironmental stresses.

Mahbub Hasan, A.K.M., Ijiri, T., and [Sato, K.](#)

Journal of Signal Transduction (doi:10.1155/2012/483796) 査読・有 2012

22. Protein-tyrosine kinase signaling in the biological functions associated with sperm.

Ijiri, T.W., Mahbub Hasan, A.K.M., and [Sato, K.](#)

Journal of Signal Transduction (doi:10.1155/2012/181560). 査読・有 2012

23. Membrane microdomain-associated uroplakin IIIa contributes to *Src*-dependent mechanisms of anti-apoptotic proliferation in human bladder carcinoma cells.

Kihira, S., Yoshida, J., Kawada, Y., Hitomi, Y., Asada, T., Hisatomi, R., Ohta, A., Iwasaki, T., Mahbub Hasan,

A.K.M., Fukami, Y., and [Sato, K.](#)

Biology Open 2 (doi: 10.1242/bio.20121115) 査読・有 2012

24. Use of ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry with nozzle-skimmer fragmentation for comprehensive quantitative analysis of secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*.

Sugimoto T, Bamba T, Izumi Y, Nomura H, [Shiina T.](#) Fukusaki E.

J Sep Sci. 34: 2587-2596 査読・有 2011

25. Nuclear/nucleolar GTPase 2 proteins as a subfamily of YlqF/YawG GTPases function in pre-60S ribosomal subunit maturation of mono- and dicotyledonous plants.

Im CH, Hwang SM, Son YS, Heo JB, Bang WY, Suwastika IN, [Shiina T.](#) Bahk JD.

J Biol Chem. 286: 8620-8632 査読・有 2011

26. Large 3' UTR of sugar beet *rps3* is truncated in cytoplasmic male-sterile mitochondria.

Matsunaga, M., Nagano, H., Mikami, T. and [Kubo, T.](#)

Plant Cell Reports 30(2): 231-238 査読・有 2011

27. Mitochondrial genome diversity in *Beta vulgaris* L. ssp *vulgaris* (Leaf and Garden Beet Groups) and its implications concerning the dissemination of the crop.

Cheng, D., Yoshida, Y., Kitazaki, K., Negoro, S., Takahashi, H., Xu, D., Mikami, T. and [Kubo, T.](#)

Genetic Resources and Crop Evolution 58: 553-560 査読・有 2011

28. Polymorphic minisatellites in the mitochondrial DNAs of *Oryza* and *Brassica*.

Honma, Y., Yoshida, Y., [Terachi, T.](#), Toriyama, K., Mikami, T. and [Kubo, T.](#)

Current Genetics 57: 261-270 査読・有 2011

29. A horizontally transferred tRNA^{Cys} gene in the sugar beet mitochondrial genome: evidence that the gene is present in diverse angiosperms and its transcript is aminoacylated.
Kitazaki, K., Kubo, T., Kagami, H., Matsumoto, T., Fujita, A., Matsuhira, H., Matsunaga, M. and Mikami, T.
The Plant Journal 68: 262-272 査読・有 2011
30. Male sterility-inducing mitochondrial genomes: how do they differ?
Kubo, T., Kitazaki, K., Matsunaga, M., Kagami, H. and Mikami, T.
Critical Reviews in Plant Sciences 30: 378-400 査読・有 2011
31. Molecular basis of cytoplasmic male sterility in beets: an overview
Mikami, T., Yamamoto, MP, Matsuhira, H., Kitazaki, K. and Kubo, T.
Plant Genetic Resources 9: 284-287 査読・有 2011
32. Characterization of lipovitellin 2 as a tyrosine-phosphorylated protein in oocytes, eggs, and early embryos of *Xenopus laevis*.
Kushima, S., Mammadova, G., Mahbub Hasan, A.K.M., Fukami, Y., Sato, K.
Zoological Science 28: 550-559 査読・有 2011
33. Gamete membrane microdomains and their associated molecules in fertilization signaling.
Mahbub Hasan, A.K.M., Fukami, Y., and Sato, K.
Molecular Reproduction and Development 78: 814-830 査読・有 2011
34. Pre-treatment of sperm reduces success of intracytoplasmic sperm injection in the pig.
Nakai, M., Ito, J., Sato, K., Noguchi, J., Kaneko, H., Kashiwazaki, N., and Kikuchi, K.
Reproduction 142: 285-293 査読・有 2011
35. Increased accumulation of intron-containing transcripts in rice mitochondria caused by low temperature: is cold-sensitive RNA editing implicated?
Kurihara-Yonemoto, S. and Kubo, T.
Current Genetics 56: 529-541 査読・有 2011
36. Selective excitation of photosystems in chloroplasts inside plant leaves observed by near-infrared laser-based fluorescence spectral microscopy.
Hasegawa, M., Shiina, T., Terazima, M. and Kumazaki, S.
Plant Cell Physiology 51: 225-38 査読・有 2010
37. Cost of having the largest mitochondrial genome: evolutionary mechanism of plant mitochondrial genome.
Kitazaki, K. and Kubo, T.
Journal of Botany, Article ID 620137 査読・有 2010
38. A new source of cytoplasmic male sterility found in wild beet and its relationship to other CMS types.
Kawanishi, Y., Shinada, H., Matsunaga, M., Masaki, Y., Mikami, T. and Kubo, T.
Genome 53: 251-256 査読・有 2010
39. Expression and function of glycogen synthase kinase-3 in human hair follicles.
Yamauchi, K. and Kurosaka, A.
Archives of Dermatological Research 302: 263-270 査読・有 2010
40. Analysis of signal transduction in cell-free extracts and rafts of *Xenopus* eggs.
Tokmakov, A.A., Iwasaki, T., Sato, K. and Fukami, Y.
Methods 51: 77-182 査読・有 2010
41. A novel Rf gene controlling fertility restoration of Ogura male sterility by RNA processing of *orf138* found in Japanese wild radish and its STS markers.
Yasumoto, K., Terachi, T. and Yamagishi, H.
Genome 52(6): 495-504 査読・有 2009
42. Inter- and intraspecific sequence variations of the chloroplast genome in wild and cultivated *Raphanus*.
Yamagishi, H., Terachi, T., Ozaki, A. and Ishibashi, A.
Plant Breeding 128(2): 172-177 査読・有 2009
43. Introduction of transformed chloroplasts from tobacco into petunia by asymmetric cell fusion.
Sigeno, A., Hayashi, S., Terachi, T. and Yamagishi, H.
Plant Cell Report 28: 1633-1640 査読・有 2009
44. Relative fitness of females and hermaphrodites in a natural gynodioecious population of wild radish, *Raphanus*

- sativus* L. (*Brassicaceae*): comparison based on molecular genotyping.
Miyake, K., Miyake, T., Terachi, T. and Yahara, T.
Journal of Evolutionary Biology 22(10): 2012-2019 査読・有 2009
45. Function and evolution of plastid sigma factors.
Shiina, T., Ishizaki, Y., Yagi, Y. and Nakahira, Y.
Plant Biotechnology 26: 57-66 査読・有 2009
46. AtObgC, a plant ortholog of bacterial Obg, is a chloroplast-targeting GTPase essential for early embryogenesis.
Bang, W.Y., Hata, A., Jeong, I.S., Umeda, T., Masuda, T., Chen, J., Yoko, I., Suwastika, I.N., Kim, D.W., Im, C.H., Lee, B.H., Lee, Y., Lee, K.W., Shiina, T. and Bahk, J.D.
Plant Molecular Biology 71: 379-390 査読・有 2009
47. A mitochondrial gene involved in cytochrome c maturation (*ccmC*) is expressed as a precursor with a long NH2-terminal extension in sugar beet.
Nomoto, Y., Aoshima, A., Mikami, T. and Kubo, T.
Journal of Plant Physiology 166: 775-780 査読・有 2009
48. The distribution of normal and male-sterile cytoplasm in Chinese sugar-beet germplasm.
Cheng, D., Kitazaki, K., Xu, D., Mikami, T. and Kubo, T.
Euphytica 165: 345-351 査読・有 2009
49. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 enhances the expression of alkaline phosphatase and insulin-like growth factor-1 in human primary dermal papilla cell culture and maintains mouse hair bulbs in organ culture.
Yamauchi, K. and Kurosaka, A.
Archives of Dermatological Research 301: 357-365 査読・有 2009
50. Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase is involved in sperm-induced tyrosine kinase signaling in *Xenopus* egg fertilization.
Mammadova, G., Iwasaki, T., Tokmakov, A.A., Fukami, Y. and Sato, K.
BioMedCentral Developmental Biology 9: 68 査読・有 2009
51. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate inhibits melanoma growth by inactivation of STAT3 through protein kinase C-activated tyrosine phosphatase(s).
Oka, M., Sumita, N., Sakaguchi, M., Iwasaki, T., Bito, T., Kageshita, T., Sato, K., Fukami, Y. and Nishigori, C.
Journal of Biological Chemistry 284: 30416-30423 査読・有 2009
52. Genetic and molecular analysis of the restoration of fertility (*Rf*) genes for Ogura male-sterility from a Japanese wild radish (*Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides* Makino).
Yasumoto, K., Nagashima, T., Umeda, T., Yoshimi, M., Yamagishi, H. and Terachi, T.
Euphytica 164(2): 395-404 査読・有 2008
53. Restricted distribution of *orf687* as the pollen fertility restorer gene for Ogura male sterility in Japanese wild radish.
Yasumoto, K., Matsumoto, Y., Terachi, T. and Yamagishi, H.
Breeding Science 58(2): 177-182 査読・有 2008
54. Inhibition of chalcone synthase expression in anthers of *Raphanus sativus* with Ogura male sterile cytoplasm.
Yang, S., Terachi, T. and Yamagishi, H.
Annals of Botany 102(4): 483-489 査読・有 2008
55. Evidence for chloroplast control of external Ca²⁺-induced cytosolic Ca²⁺ transients and stomatal closure.
Nomura, H., Komori, T., Kobori, M., Nakahira, Y. and Shiina, T.
Plant Journal 53: 988-998 査読・有 2008
56. An isoform of *Arabidopsis* myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region.
Hashimoto, K., Igarashi, H., Mano, S., Takenaka, C., Shiina, T., Yamaguchi, M., Demura, T., Nishimura, M., Shimmen, T. and Yokota, E.
J Exp Bot. 59(13): 3523-3531 査読・有 2008
57. 葉緑体シグマ因子の機能分担と進化
野添幹雄, 八木祐介, 椎名 隆
化学と生物 45: 300-303 査読・無 2008
58. UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 16 の発現抑制によって引き起こされる細胞死に関する研究
黒坂 光

京都産業大学論集自然科学系列 37: 59-70 査読・有 2008

59. Signal transduction of fertilization in frog eggs and anti-apoptotic mechanism of human cancer cells: common and specific function of membrane microdomains.

Sato, K.

Open Biochemical Journal 2: 49-59 査読・有 2008

60. Expression, phosphorylation, and mRNA-binding of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in *Xenopus* oocytes, eggs, and early embryos.

Iwasaki, T., Koretomo, Y., Fukuda, T., Paronetto, M.P., Sette, C., Fukami, Y. and Sato, K.

Development Growth and Differentiation 50: 23-40 査読・有 2008

B) 図書

1. 形質転換プロトコール【植物編】田部井豊(編)第9章-3 「ベンサミアナタバコの葉緑体形質転換プロトコール」田中義行、辻村朋彦、寺地徹 (ISBN : 978-4-7598-1485-9)、化学同人、pp.408 (in press)

2. 6. Horizontal Gene Transfer to the Plant Mitochondrial Genome in 'Agricultural Sciences for Human Sustainability' (Y. Hashidoko eds) (ISBN978-4-86099-283-5)

Kubo, T. (分担執筆) Kaiseisha Press pp.136 (うち p. 96-97) (2012)

3. Embryogenesis (ISBN 978-953-51-0466-7)

Sato, K. (as an editor and chapter contributor of the book) InTech Open Access Publisher pp.652 (2012)

4. 研究者が教える動物飼育第3巻-ウニ、ナマコから脊椎動物へ-(ISBN-13: 978-4320057203)

佐藤賢一 (コラム執筆担当)、共立出版、pp.173 (2012)

5. 糖質 [II] 糖タンパク室実験法 (川崎敏祐 (編)『廣川生物薬科科学実験講座第4巻 第5章 生合成実験法 3 糖転移酵素活性の測定 (2) N-アセチルガラクトサミン転移酵素』)

黒坂光、廣川書店、p4 (2011)

6. 栽培ダイコンの起源と日本産ダイコンのルーツを探る (『だいこんの魅力にせまる「だいこんサミット六年間をふりかえって」』)

山岸博、宇都宮大学農学部だいこんサミット実行委員会編、p. 3-11 (2010)

7. 日本列島におけるカブとダイコンのなりたち (木村栄美 (編)『ユーラシア農耕史 4. さまざまな栽培植物と農耕文化』)

山岸博、臨川書店、p. 11 (2009)

C) 学会発表

・国際学会

1. American Society of Sugar Beet Technologists (ASSBT) 37th Biennial Meeting

Taguchi, K., Moritani, M., Mikami, T. and Kubo, T.

Molecular cloning of X locus and marker-assisted selection of non-restoring allele for Owen cytoplasmic male sterility.

Anaheim, U.S.A. (2013.2)

2. Plant and Animal Genome XXI

Taguchi, K., Moritani, M., Matsuhira, H., Mikami, T. and Kubo, T.

Marker-assisted selection of non-restoring allele for Owen cytoplasmic male sterility.

San Diego, U.S.A. (2013.1)

3. American Society for Matrix Biology and Society for Glycobiology Joint Meeting 2012

Y. Nakayama, N. Nakamura, A. Kurosaka

A Putative Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase/WBSCR17 Regulates Cell Adhesion and Endocytic Pathways in HEK293T cells.

San Diego, USA (2012.11)

4. American Society for Matrix Biology and Society for Glycobiology Joint Meeting 2012

N. Nakamura, Y. Nakayama, A. Miyake, N. Itoh, A. Kurosaka

Developmental roles of mucin-type glycosylation in zebrafish.

San Diego, USA (2012.11)

5. The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants

Ijiri, T.W., Kishikawa, J., Imamura, H., Iwao, Y., Yokoyama, K., and Sato, K.

- ATP quantification in *Xenopus laevis* oocyte/egg during maturation and fertilization: for further ATP imaging.
Nagoya, Japan (2012.11)
6. The International Symposium on the Mechanisms of Sexual Reproduction in Animals and Plants
Sato, K.
Membrane microdomain-mediated signaling crosstalk contributes to gamete interaction and signaling in *Xenopus* egg fertilization.
Nagoya, Japan (2012.11)
7. The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress (AFLAS 2012)
A. Kurosaka, N. Nakamura, N. Nakayama
Biological roles of a brain-specific polypeptide GalNAc-transferase in zebrafish.
Bangkok, Thailand (2012.10)
8. The 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Congress (AFLAS 2012)
T. Kawai, E. Kaneda, N. Nakamura, N. Nakayama, A. Kurosaka
Functional analysis of polypeptide N-acetyl- galactosaminyltransferase-like 4 and 8 in zebrafish.
Bangkok, Thailand (2012.10)
9. International Conference on Agricultural Diversity and Sustainability 2012
Kagami, H., Matsuhira, H., Taguchi, K., Kubo, T. and Mikami, T.
Production of transformation-competent sugar beet (*Beta vulgaris* L.) with annual habitat: a basis for sugar beet research.
Sapporo, Japan (2012.8)
10. International Conference on Agricultural Diversity and Sustainability 2012
Honma, Y., Taguchi, K., Hiyama, H., Yui-Kurino, R., Kubo, T. and Mikami, T.
Identification of *Rf2*, a novel restorer-of-fertility locus for Owen cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris* L.
Sapporo, Japan (2012.8)
11. Gordon Research Conference on Cell Death
Sato, K.
Membrane microdomain-associated uroplakin IIIa contributes to *Src*-dependent mechanisms of anti-apoptotic proliferation in human bladder carcinoma cells.
Lucca, Italy (2012.7)
12. Fourth Meeting of the ECP/GR Working Group on Beta and the World Beta Network
Kubo, T., Cheng, D., Yoshida, Y., Matsunaga, M., Honma, Y. and Mikami, T.
Mitochondrial minisatellite polymorphism of cultivated beets: fodder beet as the probable source of the Owen cytoplasm.
Cappelle-en-Pévèle, France (2012.6)
13. 2012 Joint Seminar (CU-KSU-MUSC) in Science and Technology
Nakayama, Y., Nakamura, N., and Kurosaka, A.
Roles of mucin-type carbohydrates in endocytosis.
Bangkok/Thailand (2012.3)
14. 2012 Joint Seminar (CU-KSU-MUSC) in Science and Technology
Kurosaka, A., Nakayama, Y., and Nakamura, N.
Roles of Mucin-type Carbohydrates in Zebrafish Development.
Bangkok/Thailand (2012.3)
15. SOL&ICuGI 2011
Tsujimura, T., Tanaka, Y. and Terachi, T.
Stable chloroplast transformation in *Nicotiana benthamiana* and expression of a gene encoding ROS scavenging enzyme APX.
Kobe, Japan (2011.11-12)
16. SOL&ICuGI 2011
Yoshimi, M., Saito, T., Isshiki, S., Terachi, T. and Yamagishi, H.
Studies on a novel open reading frame (*orf*) found in the mitochondrial genome of alloplasmic lines of eggplant showing male sterility.
Kobe, Japan (2011.11-12)
17. Commemorative Symposium of the 27th International Prize for Biology
Sato, K., Kushima, S., Matsumoto, T., Hashimoto, A., Maekawa, Y., Mahbub Hasan, A.K.M.
Membrane microdomains and their associated signaling molecules in fertilization signaling.

Kyoto, Japan (2011.11-12)

18. 2011 Annual Conference of the Society for Glycobiology

Nakamura, N., Kaneda, E., Nakayama, Y., and Kurosaka, A.
Developmental Roles of Putative Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish.
Seattle, USA (2011.11)

19. 21st International Symposium on Glycoconjugates

Nakayama, Y., Nakamura, N., and Kurosaka, A.
The Biological Roles of a putative Polypeptide GalNAc-transferase/WBSCR17.
Vienna/Austria (2011.8)

20. XVIII international botanical congress (IBC2011)

Tsukahara, S., Kawabe, A., Kobayashi, A. and Kakutani, T.
Centromere-specific integration of Copia-type LTR retrotransposon in *A. lyrata*.
Melbourne, Australia (2011.7)

21. SMBE2011

Kawabe, A., Tsukahara, S. and Kakutani, T.
Centromere preferential localization of COPIA93/20 retrotransposon in *Arabidopsis* and related species.
Kyoto, Japan (2011.7)

22. XVIII International Botanical Congress 2011

Kubo, T., Kitazaki, K., Kagami, H., A, Fujita, A. and Mikami, T.
Capricious Distribution of a CysteinyI tRNA Gene of Unknown Origin in the Mitochondrial Genomes of Angiosperms: an Example of Horizontal Transfer?
Melbourne, Australia (2011.7)

23. Gordon Research Conference on Fertilization and Activation of Development

Sato, K., Kushima, S., Matsumoto, T., Hashimoto, A., Maekawa, Y., Mahub Hasan, A.K.M.
Membrane microdomains and their associated signaling molecules in fertilization signaling.
Plymouth, NH, USA (2011.7)

24. International Conference for Plant Mitochondrial Biology

Tanaka, Y., Tsuda, M., Yasumoto, K., Yamagishi, H. and Terachi, T.
Mitochondrial genome analysis of radish (*Raphanus sativus*) by next-generation sequencing.
Hohenroda, Germany (2011.5)

25. International Conference for Plant Mitochondrial Biology

Yasumoto, K., Imamura, J., Koizuka, C., Yamagishi, H. and Terachi, T.
A new fertility restorer gene for Ogura male-sterility found in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.).
Hohenroda, Germany (2011.5)

26. Friday Harbor labs Research Symposium: Mechanisms of Egg Maturation and Fertilization

Sato, K.
Molecular mechanisms of *Xenopus* egg fertilization: Roles of egg membrane microdomains and their associated signaling molecules.
Friday Harbor, WA, USA (2010.9)

27. International Carbohydrate Symposium (ICS2010)

Nakamura, N., Tawara, M., Nishimura, K., Hachiga, K., Nishizaki, H., Nakayama, Y., Miyake, A., Itoh, N. and Kurosaka, A.
The biological roles of brain-specific polypeptide GalNAc-transferases in zebrafish.
Makuhari, Japan (2010.8)

28. International Carbohydrate Symposium (ICS2010)

Kurosaka, A., Toba, S., Satoh, T., Nakamura, N., Nakayama, Y. and Ozaki, K.
Suppression of a novel brain-specific UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase causes cell death in P19 embryonic carcinoma cells during neural differentiation.
Makuhari, Japan (2010.8)

29. 21st International Conference on Arabidopsis Research

Kawabe, A., Forrest, A. and Charlesworth, D.
Analyses of DNA variation in the Pheres genes of *Arabidopsis* species.
Yokohama, Japan (2010.6)

30. 21st International Conference on Arabidopsis Research

Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A. and Kakutani, T.
Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*.
Yokohama, Japan (2010.6)

31. LEOPOLDINA –SYMPOSIUM

椎名 隆

Biotic and abiotic stress-induced transient increase in stromal Ca²⁺ in chloroplasts.
ベルリン (2009.9)

32. LEOPOLDINA –SYMPOSIUM 2009

I Nengah SUWASTIKA, Denawa, M., Im C.H., Bang, Y., Ohniwa, R.L., Bahk, J. D., Takeyasu, K., Shiina, T.
Genome-wide and sub-cellular localization analysis of Ogb/Era-related GTPase family proteins in *Arabidopsis thaliana*.

Tsukuba, Japan (2009.9)

33. LEOPOLDINA –SYMPOSIUM 2009

Yagi, Y., Ishizaki, Y., Nakahira, Y., Shiina, T.

Elucidation of mechanism for activation of the plastid transcription by plant specific DNA binding protein pTAC3.

Tsukuba, Japan (2009.9)

34. LEOPOLDINA –SYMPOSIUM 2009

Uemura, D., Nomura, H. Komori, T., Nakahira, Y., Shiina, T.

CAS is chloroplast protein implicated in flg22-induced stomatal closure and defense response in plant.

Tsukuba, Japan (2009.9)

35. Gordon Research Conference on “Fertilization and Activation of Development”

Sato, K.

Roles of membrane microdomains in *Xenopus* egg fertilization.

Plymouth, NH, USA (2009.7)

36. 2008 International Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation

Sato, K.

Roles of membrane microdomain-associated *Src* and uroplakin III in fertilization of eggs and anti-apoptosis of cancer cells.

Tainan, Taiwan (2008.11)

37. 19th International Conference on Arabidopsis Research Montreal

Ishizaki, Y., Takenaka, C., Ozono, K., Kin, S., Arinobu, M., Watanabe, A., Yagi, Y., Nakahira, Y. and Shiina, T.

Transcriptome analysis of plastid expression in *Arabidopsis*.

Canada (2008.7)

38. 19th International Conference on Arabidopsis Research Montreal

Nomura, H., Uemura, S., Komori, T., Nakahira, Y. and Shiina, T.

Possible involvement of CAS in Ca²⁺ communication between cytoplasm and chloroplasts in *Arabidopsis*.

Canada (2008.7)

39. 19th International Conference on Arabidopsis Research Montreal

Komori, T., Nomura, H. and Shiina, T.

Biotic and abiotic stress-induced stroma Ca²⁺ transients in chloroplasts.

Canada (2008.7)

40. Gordon Research Conference on Cell Death

Sato, K.

Anti-apoptotic, survival mechanism of human bladder carcinoma cells in serum-free environment.

Il Cioeco, Italy (2008.7)

41. International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB2009)

Odake, Y., Yasumoto, K., Yamagishi, H. and Terachi, T.

A study of DNA polymorphisms at *RecA* and *Msh1* loci and their relationship to mitochondrial substoichiometric shifting in radish.

Lake Tahoe, CA, USA (2008.6)

42. International Conference for Plant Mitochondrial Biology (ICPMB2009)

Yasumoto, K., Odake, Y., Yamagishi, H. and Terachi, T.

A new *Rf* gene controlling fertility restoration of Ogura male sterility by RNA processing of *orf138* found in Japanese wild radish.

Lake Tahoe, CA, USA (2008.6)

43. BIT's Annual World Cancer Congress 2008: From Basic Research to Therapeutics
Sato, K.
Roles of membrane microdomains in anti-apoptotic growth of human bladder carcinoma cells.
Shanghai, CHINA (2008.6)
44. FASEB Summer Research Conference 2008
Sato, K.
Membrane microdomain-associated uroplakin III in eggs and cancer cells.
New Haven, CT, USA (2008.6)
- ・国内学会
45. 日本育種学会第 123 回講演会
Gyawali Yadav Prasad、寺地 徹
Complete sequence of mitochondrial genome of an alloplasmic line of common wheat with *Aegilops geniculata* cytoplasm.
東京農業大学 (2013.3)
46. 日本育種学会第 123 回講演会
安本景太、高木宏樹、寺内良平、寺地 徹、山岸 博
オグラ型雄性不稔ダイコンの稔性回復に関わる *Rfi* 遺伝子座の構造解析
東京農業大学 (2013.3)
47. 日本育種学会第 123 回講演会
辻村真衣、森 直樹、山岸 博、寺地 徹
コムギ・エギロブス属植物のミトコンドリアゲノムの解析 2. *Aegilops speltoides* の細胞質を持つ置換系統のミトコンドリアゲノム
東京農業大学 (2013.3)
48. 日本育種学会第 123 回講演会
福永明日美、辻村朋彦、植村香織、寺地 徹
葉緑体の遺伝子組換えを用いた高濃度グルタチオン含有植物の育成
東京農業大学 (2013.3)
49. 日本育種学会第 123 回講演会
井上理恵子、植村香織、寺地 徹
ダイズのフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出
東京農業大学 (2013.3)
50. 日本育種学会第 123 回講演会
大矢悠貴、寺地 徹
グルタミン酸脱水素酵素遺伝子 (*gdh1*) を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出
東京農業大学 (2013.3)
51. 日本育種学会第 123 回講演会
田口和憲、久保友彦
日本のテンサイ育種に利用された祖先品種集団における *Rf1* アレルの多様性
東京農業大学 (2013.3)
52. 日本育種学会第 123 回講演会
本間雄二郎、田口和憲、樋山 肇、栗野里香、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く新規の花粉稔性回復遺伝子 *Rf2* 座乗領域の塩基配列解析
東京農業大学 (2013.3)
53. 第 35 回日本分子生物学会年会
Matsuhira, H., Kagami, H., Kurata, M., Kitazaki, K., Matsunaga, M., Hamaguchi, Y., Hagihara, E., Ueda, M., Harada, M., Muramatsu, A., Yui-Kurino, R., Taguchi, K., Tamagake, H., Mikami, T. and Kubo, T.
Restorer of fertility 1 in sugar beet encodes a protein resembling *Oma1* protease
福岡 (2012.12)
54. 第 35 回日本分子生物学会年会
本間雄二郎、田口和憲、樋山肇、栗野里香、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く新規の花粉稔性回復遺伝子 *Rf2* 座乗領域の特徴付け
福岡 (2012.12)
55. 第 35 回日本分子生物学会年会
勝山高也、久保友彦、三上哲夫

テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性における花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* および祖先遺伝子の多様性に関する研究

福岡 (2012.12)

56. 第 35 回日本分子生物学会年会

鏡豊代、倉田昌幸、久保友彦、三上哲夫

テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く稔性回復遺伝子 *Rf* の発現制御に関する研究

福岡 (2012.12)

57. 第 35 回日本分子生物学会年会

和田あゆみ、中山喜明、中村直介、黒坂光

単層培養条件下におけるマウス胚性腫瘍由来 P19 細胞の神経分化誘導

福岡 (2012.12)

58. 第 35 回日本分子生物学会年会

川合多美子、青木俊輔、高橋由衣、中村直介、中山喜明、黒坂光

ゼブラフィッシュ初期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解

福岡 (2012.12)

59. 第 35 回日本分子生物学会年会

金田鋭一、中村直介、中山喜明、黒坂光 :

ゼブラフィッシュにおける N-acetylgalactosaminyltransferase-like4 の機能解析

福岡 (2012.12)

60. 第 35 回日本分子生物学会年会

吉田潤平、紀平成、人見侑里子、井尻貴之、佐藤賢一

ヒト膀胱および非膀胱がん細胞におけるウロブラキシン IIIa の発現と機能

福岡 (2012.12)

61. 第 35 回日本分子生物学会年会

紀平成、吉田潤平、矢羽大基、井尻貴之、佐藤賢一

血清飢餓培養環境下におけるヒト膀胱がん細胞の *Src* 依存的 MAPK 非依存的増殖機構。

福岡 (2012.12)

62. 第 35 回日本分子生物学会年会

マブブハサン AKM、玖島将太、松本尚士、三田勇樹、戸阪朋樹、磯崎功明、小寺啓太、井尻貴之、佐藤賢一

一

Membrane microdomain-mediated gamete interaction and signaling in fertilization of the frog *Xenopus laevis*.

福岡 (2012.12)

63. 第 35 回日本分子生物学会年会

井尻貴之、岸川淳一、今村博臣、岩尾康宏、横山謙、佐藤賢一

ATP quantification in *Xenopus laevis* oocyte/egg during maturation and fertilization: for further ATP imaging.

福岡 (2012.12)

64. 第 31 回日本糖質学会年会

中山喜明、中村直介、黒坂光

GalNAc-T 様遺伝子 WBSR17 はエンドサイトーシス経路を調節する

鹿児島 (2012.9)

65. 第 83 回日本動物学会大会

城下歩美、志賀圭子、上野智代、佐藤賢一、岩尾康宏

マトリクスメタロプロテアーゼによる電位感受性なツメガエル受精

大阪 (2012.9)

66. 日本育種学会第 122 回講演会

山岸 博

オルガネラゲノム工学による細胞質雄性不稔の開発

京都産業大学 (2012.9)

67. 日本育種学会第 122 回講演会

寺地 徹

ダイコンのミトコンドリアゲノムの多様性とミトコンドリアと相互作用する核遺伝子の進化

京都産業大学 (2012.9)

68. 日本育種学会第 122 回講演会

福永明日美、辻村朋彦、須頭智世、植村香織、寺地 徹

グルタチオン合成酵素(GS)の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出と特徴づけ
京都産業大学 (2012.9)

69. 第 84 回日本遺伝学会大会
降旗初佳、吉田貴徳、河邊 昭
葉緑体ゲノム断片の核移行パターン
九州大学 (2012.9)

70. 第 84 回日本遺伝学会大会
吉田貴徳、河邊 昭
ゲノムインプリンティングされる type I MADS-box 遺伝子の分子進化
九州大学 (2012.9)

71. 第 84 回日本遺伝学会大会
河邊 昭、降旗初佳、吉田貴徳
動物体特異性を持つ転移因子 COPIA93/20 ファミリーのアブラナ科植物での存在様式
九州大学 (2012.9)

72. 日本育種学会第 122 回講演会
鏡 豊代、田口和憲、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く花粉稔性回復遺伝子 *Rf1* のプロモーター解析
京都産業大学 (2012.9)

73. 日本育種学会第 122 回講演会
本間雄次郎、田口和憲、樋山 肇、栗野里香、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性に働く新規の花粉稔性回復遺伝子 *Rf2* の遺伝学的解析
京都産業大学 (2012.9)

74. 日本育種学会第 122 回講演会
久保友彦、田口和憲
細胞質雄性不稔性の発現機構解明と人工稔性回復遺伝子の開発
京都産業大学 (2012.9)

75. 第 71 回日本癌学会総会
佐藤賢一、深見泰夫
ヒト膀胱がん細胞の血清飢餓抵抗性増殖機構における *Src* および *uropalakin IIIa* の役割
札幌 (2012.9)

76. 第 83 回日本動物学会大会
松本尚士、玖島将太、山田力志、澤田均、佐藤賢一
試験管内再構成実験によるツメガエル卵の受精シグナル関連分子の探索
大阪 (2012.9)

77. 包括脳ネットワーク夏のワークショップ
中村直介、中山喜明、田原聖明、西村和真、三宅 歩、伊藤信行、黒坂 光
ゼブラフィッシュ後脳において WBSCR17 が関わるムチン型糖鎖の機能解明
仙台 (2012.7)

78. 第 5 回生殖研究若手の会
佐藤賢一
卵細胞膜マイクロドメインを足場とする配偶子間認識と膜融合の分子機構
三浦 (2012.7)

79. 基礎生物学研究所研究会
佐藤賢一
配偶子膜マイクロドメインに焦点をあてた受精シグナル機構の解析
東岡崎 (2012.5)

*80. 日本育種学会第 121 回講演会
山岸 博、津田瑞江、田中義行、寺地 徹
シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構造と後代への伝達
宇都宮大学 (2012.3)

81. 日本育種学会第 121 回講演会
吉見麻衣子、牟田部天平、一色司郎、齊藤猛雄、山岸 博
細胞質置換ナスに対する稔性回復遺伝子の STS マーカー
宇都宮大学 (2012.3)

82. 日本育種学会第 121 回講演会
富岡関子・安本景太・平出美穂子・高橋亮・山岸 博・寺地 徹
ハマ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(*ppr-B*)の分子集団遺伝学的解析
宇都宮大学 (2012.3)
83. 日本育種学会第 121 回講演会
田中義行・富岡関子・山岸 博・寺地 徹
ダイコンの OS40 型ミトコンドリアゲノムの構造解析-正常型およびオグラ型との比較-
宇都宮大学 (2012.3)
84. 日本育種学会第 121 回講演会
辻村真衣・富岡関子・森 直樹・寺地 徹
コムギ・エギロブス属植物のミトコンドリアゲノムの解析 1. チモフェービコムギの細胞質を持つ置換系統
のミトコンドリアゲノム
宇都宮大学 (2012.3)
85. 日本育種学会第 121 回講演会
Gyawali, Y.P., Tanaka, Y., Tsujimura M. and Terachi, T.
RNA expression pattern of selected mitochondrial genes and ORFs in fertile and male sterile common wheat
alloplasmic lines with *Aegilops mutica* cytoplasm.
宇都宮大学 (2012.3)
86. 日本育種学会第 121 回講演会
水野信之、河邊 昭、E. Evtushenko, A. Houben、遠藤 隆、那須田周平
コムギ祖先種における 2 タイプのセントロメア特異的ヒストン H3 の DNA 変異解析
宇都宮大学 (2012.3)
87. 日本育種学会第 121 回講演会
本間雄次朗、田口和憲、樋山 肇、粟野里香、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔に作用する新規稔性回復遺伝子 *Rf2* の遺伝解析
宇都宮大学 (2012.3)
88. 日本育種学会第 121 回講演会
鏡 豊代、田口和憲、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性における花粉稔性回復遺伝子の *Rf1* のプロモーター解析
宇都宮大学 (2012.3)
89. 日本育種学会第 121 回講演会
松永宗幸、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔ミトコンドリアの呼吸は活性化している
宇都宮大学 (2012.3)
90. 日本分子生物学会／日本生化学会合同大会
藤原浩喜、佐藤達典、辻 康宏、中山喜明、中村直介、黒坂 光
Characterization of a brain-specific polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase.
横浜 (2011.12)
91. 日本分子生物学会／日本生化学会合同大会
金田鋭一、中村直介、中山喜明、黒坂 光
Functional analysis of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4 in zebrafish
横浜 (2011.12)
92. 日本分子生物学会／日本生化学会合同大会
川合多美子、垣井麻佳、太下健二、中村直介、中山喜明、黒坂 光
Functional analysis of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 8 in zebrafish
横浜 (2011.12)
93. 日本分子生物学会／日本生化学会合同大会
中山喜明、和田あゆみ、中村直介、黒坂 光
A putative polypeptide GalNAc-transferase, WBSR17, regulates endocytosis in HEK293T cells.
横浜 (2011.12)
94. 第 34 回日本分子生物学会年会
Mahbub Hasan, A.K.M., Kushima, S., Matsumoto, T., Hashimoto, A., Maekawa, Y., Sanda, Y., Tosaka, T., Fukami,
Y., and Sato, K.
Membrane microdomain-mediated signaling crosstalk between egg and sperm in *Xenopus* fertilization.

横浜 (2011.12)

95. 第 34 回日本分子生物学会年会

Matsumoto, T., Kushima, S., Yamada, L., Ikeda, R., Mahbub Hasan, A.K.M., Sawada, H., and Sato, K.

Analysis of *Xenopus* fertilization signaling involving egg membrane microdomain functions and a possible anti-death mechanism.

横浜 (2011.12)

96. 第 34 回日本分子生物学会年会

Kihira, S., Yoshida, J., Hitomi, Y., Hisatomi, R., Mahbub Hasan, A.K.M., and Sato, K.

Src-dependent and MAPK- independent survival and proliferation of human bladder carcinoma cells under serum-deprived conditions.

横浜 (2011.12)

97. 第 34 回日本分子生物学会年会

Yoshida, J., Kihira, S., Hitomi, Y., Kawaradani, I., Mahbub Hasan, A.K.M., and Sato, K.

Possible nuclear localization of uroplakin III in human non-urothelial carcinoma cells.

横浜 (2011.12)

98. 第 37 回日本生体エネルギー研究会討論会

Kihira, S., Yoshida, J., Mahbub Hasan, A.K.M., Hitomi, Y., Kawada, Y., Asada, T., Hisatomi, R., Ohta, A., Fukami, Y., and Sato, K.

Membrane microdomain-associated UPIIIa is involved in *Src*-dependent mechanisms of serum-independent proliferation in human bladder carcinoma cells.

京都 (2011.12)

99. 第 5 回日本ツメガエル研究集会

マブブハサン AKM、橋本亜樹、前川由佳、三田勇樹、戸阪智樹、深見泰夫、佐藤賢一
アフリカツメガエル配偶子間における膜マイクロドメイン依存性クロストーク

熱海 (2011.10)

100. 第 5 回日本ツメガエル研究集会

松本尚士、玖島将太、橋本亜樹、前川由佳、マブブハサン AKM、佐藤賢一
ツメガエル卵細胞の受精及び細胞死シグナリングに関する研究

熱海 (2011.10)

101. 日本育種学会第 120 回講演会

安本景太・寺地 徹・山岸 博

ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 *Rft* マッピング

福井県立大学 (2011.9)

102. 日本育種学会第 120 回講演会

森 悠太・安本景太・山岸 博

黒ダイコンで発見された稔性回復遺伝子の *orf138* に対する作用

福井県立大学 (2011.9)

103. 日本育種学会第 120 回講演会

田中義行・津田瑞江・安本景太・山岸 博・寺地 徹

次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 2: 正常型とオグラ型ゲノムの比較

福井県立大学 (2011.9)

*104. 日本育種学会第 120 回講演会

津田瑞江・田中義行・安本景太・寺地 徹・山岸 博

シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの解析

福井県立大学 (2011.9)

105. 日本育種学会第 120 回講演会

辻村朋彦・大矢悠貴・山本裕範・寺地 徹

活性酸素消去の異なる酵素遺伝子を持つタバコ葉緑体形質転換体の比較

福井県立大学 (2011.9)

106. 第 83 回日本遺伝学会大会

塚原小百合、河邊 昭、小林啓恵、伊藤佑、会津智幸、新井 理、豊田 敦、藤山秋佐夫、樽谷芳明、角谷徹仁

A. lyrata における LTR レトロトランスポゾンのセントロメア特異的分布の形成機構

京都大学 (2011.9)

107. 第 83 回日本遺伝学会大会
吉田貴徳、河邊 昭、
ゲノムインプリンティングが typeI MADS 遺伝子の分子進化に及ぼす影響
京都大学 (2011.9)
108. 日本育種学会第 120 回講演会
松永宗幸、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔株におけるミトコンドリア呼吸の特徴付け
福井県立大学 (2011.9)
109. 日本育種学会第 120 回講演会
鏡 豊代、松平洋明、久保友彦、三上哲夫
形質転換可能な一年生テンサイ作出の試み：テンサイ生殖研究の基礎研究
福井県立大学 (2011.9)
110. 日本育種学会第 120 回講演会
松平洋明、鏡 豊代、田口和憲、久保友彦、三上哲夫
高度培養適性を保持するテンサイ系統において再分化過程で特異的に発現する遺伝子の探索
福井県立大学 (2011.9)
111. 日本育種学会第 120 回講演会
本間雄次朗、田口和憲、樋山 肇、栗野里香、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔 (CMS) に働く新規稔性回復遺伝子の同定
福井県立大学 (2011.9)
112. 第 82 回日本動物学会大会
松本尚士、玖島将太、橋本亜樹、前川由佳、マブブハサン AKM、佐藤賢一
ソメガエル卵細胞の受精及び細胞死シグナリングに関する研究
旭川 (2011.9)
113. 日本育種学会第 119 回講演会
須頭智世・植村香織・西塚順子・寺地 徹
γ-グルタミルシステイン合成酵素遺伝子 (*GSH1*) を葉緑体ゲノムに持つタバコ形質転換体の作出
横浜市立大学 (2011.3)
114. 日本育種学会第 119 回講演会
山本裕範・辻村朋彦・林 清音・森田重人・寺地 徹
異なる活性酸素消去系酵素遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの比較
横浜市立大学 (2011.3)
115. 日本育種学会第 119 回講演会
辻村朋彦・植村香織・山本裕範・寺地 徹
ベンザミアナタバコの葉緑体ゲノムへの *apx* 及び *gsh1* 遺伝子の導入
横浜市立大学 (2011.3)
116. 日本育種学会第 119 回講演会
吉見麻衣子・齊藤猛雄・一色司郎・寺地 徹・山岸 博
CMS を示すナス細胞質置換系統における新規 *orf* の発現解析
横浜市立大学 (2011.3)
117. 日本育種学会第 119 回講演会
山岸 博・牟田部天平・田中俊光・吉見麻衣子・一色司郎・齊藤猛雄
ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の DNA マーカー
横浜市立大学 (2011.3)
118. 日本育種学会第 119 回講演会
安本景太・津田瑞江・児島慶子・山岸 博
シロイヌナズナとキャベツの細胞融合により雑種化した雄性不稔ミトコンドリアゲノムの解析
横浜市立大学 (2011.3)
119. 日本育種学会第 119 回講演会
森 悠太・安本景太・張 麗・山岸 博
オグラ型雄性不稔に対する黒ダイコンの稔性回復遺伝子の解析
横浜市立大学 (2011.3)
120. 日本育種学会第 119 回講演会

田中義行・津田瑞江・安本景太・山岸 博・寺地 徹
次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 I. ナタネミトコンドリアゲノムとの比較
横浜市立大学 (2011.3)

121. 日本育種学会第 119 回講演会
辻村真衣・森 直樹・寺地 徹
倍数性コムギのミトコンドリアゲノムに見られる構造変異とその分布
横浜市立大学 (2011.3)

122. 日本育種学会第 119 回講演会
田口和憲、森谷麻里、樋山 肇、本間雄次朗、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔に対して新規稔性回復遺伝子が分離する集団の作出
横浜市立大学 (2011.3)

123. 日本育種学会第 119 回講演会
本間雄次朗、寺地 徹、鳥山欽哉、久保友彦、三上哲夫
植物ミトコンドリアゲノムのミニサテライト様構造を用いた多型解析
横浜市立大学 (2011.3)

124. 日本育種学会第 119 回講演会
松永宗幸、松平洋明、北崎一義、久保友彦、三上哲夫
テンサイ花粉稔性回復遺伝子 *Rfl/rfl* における遺伝子コピー間の機能
横浜市立大学 (2011.3)

125. 日本育種学会第 119 回講演会
樋山 肇、大神 遼、森谷麻里、田口和憲、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型 CMS における突発的稔性回復機構の分子遺伝学的解析
横浜市立大学 (2011.3)

126. 第 33 回日本分子生物学会／第 83 回日本生化学会合同大会
中山喜明、辻康宏、中村直介、黒坂 光
Characterization of Brain-specific Polypeptide GalNAc-transferases in P19 cells.
神戸 (2010.12)

127. 第 33 回日本分子生物学会／第 83 回日本生化学会合同大会
中村直介、田原聖明、西村和真、八賀康祐、西嶋大貴、中山喜明、三宅 歩、伊藤信行、黒坂 光
The Biological Roles of WBSCR17, a Gene Homologous to Polypeptide GalNAc-transferases in Zebrafish.
神戸 (2010.12)

128. 第 33 回日本分子生物学会／第 83 回日本生化学会合同大会
藤原浩喜、佐藤達典、中山喜明、中村直介、黒坂 光
脳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関連遺伝子の機能解析
神戸 (2010.12)

129. 第 33 回日本分子生物学会年会 (BMB2010)
Sato, K., Kawada, Y., Yamamoto, N., and Fukami, Y.
Serum-independent growth and anti-apoptosis of human bladder carcinoma cells require functions of membrane microdomain-associated proteins such as *Src* and uroplakin III.
神戸 (2010.12)

130. 第 33 回日本分子生物学会年会 (BMB2010)
玖島将太、松本尚士、ハサン AKM マブブ、佐藤賢一
アフリカツメガエル生殖細胞を用いた Uroplakin III 及びその他の受精関連タンパク質の解析
神戸 (2010.12)

131. 日本育種学会第 118 回講演会
安本景太・筒井康太・房 相佑・寺地 徹・山岸 博
異質細胞質ダイコン系統に見られる雄性不稔性とミトコンドリア mRNA の発現パターンとの関係について
秋田県立大学 (2010.9)

132. 日本育種学会第 118 回講演会
吉見麻衣子・齋藤猛夫・一色司郎・寺地 徹・山岸 博
CMS を示すナス細胞質置換系統における *atp1* 遺伝子周辺領域の構造解析
秋田県立大学 (2010.9)

133. 日本育種学会第 118 回講演会

- 山岸 博・津田瑞江・児島慶子・安本景太
シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代における雄性不稔性
秋田県立大学 (2010.9)
134. 日本育種学会第 118 回講演会
山本裕範・森田重人・寺地 徹
活性酸素消去オペロンを葉緑体に持つ組換えタバコのストレス耐性評価
秋田県立大学 (2010.9)
135. 日本育種学会第 118 回講演会
辻村朋彦・植村香織・山本裕範・寺地 徹
ベンサムアタバコ(*Nicotiana benthamiana*)を用いた葉緑体形質転換体の作出
秋田県立大学 (2010.9)
136. 日本育種学会第 118 回講演会
村上亮太・重野麻子・寺地 徹・山岸 博
ナスと葉緑体形質転換タバコの非対称細胞融合
秋田県立大学 (2010.9)
137. 日本育種学会第 118 回講演会
植村香織・郭 長虹・寺地 徹
フェリチンを葉緑体で強発現する 3 種類の組換えタバコの比較研究
秋田県立大学 (2010.9)
138. 日本育種学会第 118 回講演会
堤 厚善・森 悠太・安本景太・山岸 博
ハマダイコンが有する稔性回復遺伝子の発現の安定性
秋田県立大学 (2010.9)
139. 日本育種学会第 118 回講演会
田中義行・安本景太・山岸 博・寺地 徹
ダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子 *orf138* を発現する葉緑体形質転換ベクターの作製とそれを用いた稔性回復遺伝子作用アッセイ系の構築
秋田県立大学 (2010.9)
140. 日本育種学会第 118 回講演会
辻村真衣・富岡関子・森 直樹・寺地 徹
倍数性コムギの進化に新しい知見をもたらすミトコンドリアゲノムの構造変異
秋田県立大学 (2010.9)
141. 日本育種学会第 118 回講演会
北崎一義・久保友彦・松平洋明・鏡 豊代・藤田麻美・三上哲夫
テンサイおよび近縁分類群におけるミトコンドリア tRNA^{lys}とアミノアシル合成酵素遺伝子の進化的解析
秋田県立大学 (2010.9)
142. 日本育種学会第 118 回講演会
鏡 豊代・松平洋明・北崎一義・久保友彦・三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性における花粉稔性回復遺伝子 *Rfl* の発現解析
秋田県立大学 (2010.9)
143. 日本育種学会第 118 回講演会
樋山 肇・大神 遼・田口和憲・久保友彦・三上哲夫
テンサイ CMS 系統と維持系統の交配による突発的稔性回復の遺伝的解析
秋田県立大学 (2010.9)
144. 日本育種学会第 118 回講演会
松永宗幸・長野宏則・久保友彦・三上哲夫
テンサイミトコンドリア *rps3* の長い 3'UTR は、細胞質雄性不稔ミトコンドリアで失われている
秋田県立大学 (2010.9)
145. 日本遺伝学会第 82 回大会
本間雄二郎・寺地 徹・鳥山欽哉・久保友彦・三上哲夫
植物ミトコンドリアゲノムのミニサテライト様構造は多型解析に利用できるか
北海道大学 (2010.9)
146. 日本遺伝学会第 82 回大会
河邊 昭・塚原小百合・角谷徹仁

Arabidopsis 属における COPIA93/20 ファミリーの分布と挿入位置特異性
北海道大学 (2010.9)

147. 第 81 回日本動物学会大会シンポジウム
佐藤賢一

Signaling mechanisms of fertilization and activation of development: Roles of egg membrane microdomains and their associated molecules.
東京 (2010.9)

148. 第 4 回生殖研究ワークショップ
佐藤賢一、玖島将太

卵細胞膜マイクロドメインを足場とする受精シグナル伝達機構
下田 (2010.8)

149. 第 4 回生殖研究ワークショップ
玖島将太、佐藤賢一

ツメガエル卵細胞膜マイクロドメイン局在性タンパク質の機能解析
下田 (2010.8)

150. 日本育種学会第 117 回講演会

村上亮太・重野麻子・寺地 徹・山岸 博

細胞融合によりタバコから形質転換葉緑体を導入したペチュニアのゲノム構造および生育特性
京都大学 (2010.3)

151. 日本育種学会第 117 回講演会

安本景太・筒井康太・房 相佑・寺地 徹・山岸 博

Brassica maurorum の細胞質を持つ雄性不稔ダイコンにおけるミトコンドリア遺伝子転写産物の解析
京都大学 (2010.3)

152. 日本育種学会第 117 回講演会

北村嘉邦・吉見麻衣子・安本景太・齊藤猛雄・一色司郎・寺地 徹・山岸 博

ナス属野生種の細胞質を持つ栽培ナス細胞質雄性不稔 (CMS) 系統において発現する *atp1* および *cox2* mRNA 塩基配列の解析
京都大学 (2010.3)

153. 日本育種学会第 117 回講演会

山岸 博・堤 厚善・松本欣剛・安本景太

ハマダイコンにおける第 3 の稔性回復遺伝子について
京都大学 (2010.3)

154. 日本育種学会第 117 回講演会

小嶽佑太・富岡関子・山岸 博・寺地 徹

ダイコンのミトコンドリアゲノムにみられるサブストイキオメトリックシフト(SSS)の遺伝解析
京都大学 (2010.3)

155. 日本育種学会第 117 回講演会

程 大友、吉田有宇、北崎一義、根来慎也、高橋宙之、久保友彦、三上哲夫

フダンソウにおけるミトコンドリアミニサテライトの多型
京都大学 (2010.3)

156. 第 51 回日本植物生理学会年会

植村周平、野村裕也、中平洋一、椎名 隆

葉緑体タンパク質 CAS は PAMP 誘導の気孔閉鎖運動に関与する
熊本 (2010.3)

157. 第 51 回日本植物生理学会年会

野村裕也、小森禎子、植村周平、吉岡博文、中平洋一、椎名 隆

植物の免疫応答における葉緑体タンパク質 CAS の関与について
熊本 (2010.3)

158. 第 51 回日本植物生理学会年会

八木祐介、石崎陽子、中平洋一、椎名 隆

シロイヌナズナ CITRX(cf-9 interacting thioredoxin)は、葉緑体に局在する
熊本 (2010.3)

159. 第 51 回日本植物生理学会年会

I Nengah SUWASTIKA、Denawa, M., Im C.H., Bang, Y., Ohniwa, R.L., Bahk, J. D., Takeyasu, K., Shiina, T.

Evolution of plant Obg-Era genes in view of phylogenetic and subcellular localization analyses.
熊本 (2010.3)

160. 園芸学会平成 21 年度春季大会
山岸 博・張本孝悦・西村香里・松本欣剛・山下陽子
舞鶴市で収集したハマダイコンにおける細胞質と稔性回復遺伝子の分化
明治大学 (2010.3)

161. 第 32 回日本分子生物学会年会
佐藤達典、西寄大貴、黒坂 光
神経分化に関わる脳特異的な UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase の機能解析
横浜 (2009.12)

162. 第 32 回日本分子生物学会年会
佐藤賢一、玖島将太、ママトワ ギュナイ、マブプハサン AKM、深見泰夫
Analysis of gamete interaction and signal transduction in *Xenopus laevis* by using isolated egg membrane microdomains, iEMD.
横浜 (2009.12)

163. 第 32 回日本分子生物学会年会
ママトワ ギュナイ、岩崎哲史、トクマコフ アレクサンデル、深見泰夫、佐藤賢一
Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in signal transduction at fertilization in *Xenopus* eggs.
横浜 (2009.12)

164. 第 32 回日本分子生物学会年会
玖島将太、佐藤賢一
Identification of novel components for fertilization signaling with the use of isolated egg membrane microdomains, iEMD.
横浜 (2009.12)

165. 第 32 回日本分子生物学会年会
河田有佳里、山本夏美、深見泰夫、佐藤賢一
Analysis of *Src*-dependent gene expression that is regulated under serum starvation conditions in human bladder carcinoma cells.
横浜 (2009.12)

166. 第 32 回日本分子生物学会年会
松本尚士、玖島将太、佐藤賢一
Characterization of the caspase-like protease in *Xenopus* eggs.
横浜 (2009.12)

167. 第 32 回日本分子生物学会年会
太田晃奈、久富利恵、奥 成祥、真田 昌幸、浅田智久、玖島将太、佐藤賢一
Characterization of uroplakin family proteins in human cancer cells.
横浜 (2009.12)

168. 第 32 回日本分子生物学会年会
Iwasaki, T., Hasan, A.K.M.M., Iguchi, S., Mammadova, G., Tokmakov, A.A., Sato, K. and Fukami, Y.
Expression analysis of hnRNP K-binding mRNAs during *Xenopus* early development.
横浜 (2009.12)

169. 第 32 回日本分子生物学会年会
Hasan, A.K.M.M., Iwasaki, T. Tokmakov, A.A., Sato, K. and Fukami, Y.
Study of *Xenopus Src* and G protein functions in egg activation.
横浜 (2009.12)

170. 第 82 回日本生化学会大会
西寄大貴、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
ゼブラフィッシュを用いた神経発生における脳特異的 GalNAc 転移酵素の機能解析
神戸 (2009.10)

171. 第 82 回日本生化学会大会
Hasan, A.K.M.M., 岩崎哲史, ママトワ ギュナイ, 井口 将, トクマコフアレクサンダーA., 佐藤賢一, 深見泰夫
Analysis of *Xenopus Src* and G protein functions in egg activation.
神戸 (2009.10)

172. 第 68 回日本癌学会学術総会

- 岡 昌宏、尾藤利憲、佐藤賢一、深見 泰夫、錦織千佳子
 TPA inhibits melanoma growth by inactivation of STAT3 through PKC-activated tyrosine phosphatase(s).
 横浜 (2009.10)
173. 第3回日本ツメガエル研究集会
 佐藤賢一、玖島将太
 配偶子間相互作用と発生開始のシグナル伝達：単離した卵細胞膜マイクロドメイン (iEMD) を用いた解析
 広島 (2009.10)
174. 日本育種学会第116回講演会
 小嶽佑太・山岸 博・寺地 徹
 環境ストレスがダイコンのミトコンドリアゲノム構造ならびに SSS 関連核遺伝子の発現に及ぼす影響
 北海道大学 (2009.9)
175. 日本育種学会第116回講演会
 山岸 博・松本欣剛・西村香里・安本景太
 野生ダイコンにおける花粉稔性回復遺伝子の多様性
 北海道大学 (2009.9)
176. 日本育種学会第116回講演会
 安本景太・寺地 徹・山岸 博
 ハマダイコンの新しい稔性回復遺伝子に連鎖する PPR 遺伝子の単離および構造解析
 北海道大学 (2009.9)
177. 日本育種学会第116回講演会
 北村嘉邦・安本景太・齋藤猛夫・一色司郎・寺地 徹・山岸 博
 ナス属野生種の細胞質を持つ栽培ナス細胞質雄性不稔 (CMS) 系統間に見られるミトコンドリア CMS 関連
 遺伝子配列の多型の解析
 北海道大学 (2009.9)
178. 日本育種学会第115回講演会
 富岡関子・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
 北海道大学 (2009.9)
179. 日本育種学会第115回講演会
 栗原志保、久保友彦
 低温環境下のイネのミトコンドリアにおいて、RNA エディティングとスプライシングは関連があるか？
 北海道大学 (2009.9)
180. 日本育種学会第115回講演会
 小野 克、松平洋明、久保友彦、三上哲夫
 マクロアレイン解析によるテンサイ Owen 型細胞質雄性不稔の発現に関わる核遺伝子の探索
 北海道大学 (2009.9)
181. 日本育種学会第115回講演会
 松本拓真、亀井陽子、濱口祐子、久保友彦、三上哲夫
 テンサイおよび *Beta* 属植物における *Rfl* 相同遺伝子の構造比較
 北海道大学 (2009.9)
182. 日本育種学会第115回講演会
 鏡 豊代、久保友彦、田口和憲、三上哲夫
 テンサイ葉片培養におけるカルス形成及び再分化に関するダイアレル分析
 北海道大学 (2009.9)
183. 第102回日本繁殖生物学会
 中井美智子、伊藤潤哉、佐藤賢一、野口純子、金子浩之、柏崎直巳、菊地和弘
 ブタ卵細胞質内精子注入における精子処理が精子内 Phospholipase C ζ (PLC ζ) 量を減少させ卵活性化誘起能
 低下を引き起こす
 奈良 (2009.9)
184. 日本動物学会第80回大会
 玖島将太、ママドワギョナイ、深見泰夫、佐藤賢一
 アフリカツメガエル卵黄チロシンリン酸化タンパク質 pp33 の性状解析
 静岡 (2009.9)
185. 日本動物学会第80回大会

- Mammadova, G., Kushima, S., Iwasaki, T., Tokmakov, A.A., Fukami, Y. and Sato, K.
Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase in sperm-induced tyrosine kinase signaling in *Xenopus* egg fertilization.
静岡 (2009.9)
186. 日本育種学会第 115 回講演会
山添雅人・西川由美・山岸 博
ダイコンの発芽種子に対するアグロバクテリウムの効率的な感染条件の検討
つくば国際会議場 (2009.3)
187. 日本育種学会第 115 回講演会
小嶽佑太・山岸 博・寺地 徹
ミトコンドリアゲノムの substoichiometric shifting に関わる可能性のあるダイコン *recA* 遺伝子のホモログの解析
つくば国際会議場 (2009.3)
188. 日本育種学会第 115 回講演会
山本裕範・国方 優・中川昌美・林 清音・森田重人・寺地 徹
活性酸素消去系酵素(APX/SOD)の遺伝子をオペロンとして葉緑体を持つ組換えタバコの作出
つくば国際会議場 (2009.3)
189. 日本育種学会第 115 回講演会
重野麻子・山岸 博・寺地 徹
SBPase 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ形質転換タバコの作出
つくば国際会議場 (2009.3)
190. 日本育種学会第 115 回講演会
程 大友、北崎一義、久保友彦、三上哲夫
ミトコンドリアミニサテライトの育種的利用：中国のテンサイ系統における CMS の頻度調査
つくば国際会議場 (2009.3)
191. 第 50 回日本植物生理学会年会
植村周平、野村裕也、小森禎子、中平洋一、椎名 隆
CAS 変異体における病害応答遺伝子群の発現解析
名古屋 (2009.3)
192. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会 (BMB2008)
佐藤達典、徳毛俊介、池田育恵、井野智幸、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
神戸 (2008.12)
193. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会 (BMB2008)
西寄大貴、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
ゼブラフィッシュを用いた神経発生における脳特異的 GalNAc 転移酵素の機能解析
神戸 (2008.12)
194. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会 (BMB2008)
佐藤賢一、深見泰夫
Membrane microdomain-associated uroplakin III is involved in serum-independent growth and survival of human bladder carcinoma cells.
神戸 (2008.12)
195. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会 (BMB2008)
Iwasaki, T., Hasan, A.K.M.M., Tokmakov, A.A., Mammadova, G., Sato, K. and Fukami, Y.
Involvement of heterotrimeric G protein(s) in *Xenopus* egg activation signaling.
神戸 (2008.12)
196. 第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会・合同大会 (BMB2008)
Mammadova, G., Tokmakov, A.A., Fukami, Y. and Sato, K.
Characterization of a 33-kDa yolk platelet-associated protein in *Xenopus* oocytes that is highly and stably phosphorylated on tyrosine residues.
神戸 (2008.12)
197. 日本育種学会第 114 回講演会
小嶽佑太・山岸 博・寺地 徹
ミトコンドリアゲノムの substoichiometric shifting にかかわる可能性を持つダイコン *MutS* 遺伝子ホモログの解析

滋賀県立大学 (2008.10)

198. 日本育種学会第 114 回講演会

山岸 博・山添雅人・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花器の形態変異
滋賀県立大学 (2008.10)

199. 日本育種学会第 114 回講演会

重野麻子・林清音・山岸 博
細胞融合によるタバコからベチュニアへの形質転換葉緑体の導入
滋賀県立大学 (2008.10)

200. 日本育種学会第 114 回講演会

中西健太・谷口和也・堀川明彦・寺地 徹
コムギ及びエギロプス属植物のミトコンドリア *orf260* 遺伝子の変異
滋賀県立大学 (2008.10)

201. 日本育種学会第 114 回講演会

谷口和也・西口昌寿・堀川明彦・寺地 徹
Ae. 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
滋賀県立大学 (2008.10)

202. 日本育種学会第 114 回講演会

松本欣剛・安本景太・寺地 徹・山岸 博
ハマダイコンにみられる稔性回復遺伝子の *orf687* の多型とその機能
滋賀県立大学 (2008.10)

203. 日本育種学会第 114 回講演会

安本景太・松本欣剛・富岡関子・寺地 徹・山岸 博
ダイコンのミトコンドリア *orf138* mRNA のプロセッシングが花粉稔性に及ぼす影響
滋賀県立大学 (2008.10)

204. 日本育種学会第 114 回講演会

山岸 博・山下陽子
舞鶴市のハマダイコンにおける雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の分布
滋賀県立大学 (2008.10)

205. 日本育種学会第 114 回講演会

寺地 徹
ダイコン稔性回復遺伝子の多様性と進化
滋賀県立大学 (2008.10)

206. 日本育種学会第 114 回講演会

松永宗幸、久保友彦、三上哲夫
テンサイミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性
滋賀県立大学 (2008.10)

207. 日本育種学会第 114 回講演会

松平洋明、小野 克、久保友彦、三上哲夫
テンサイ Owen 型細胞質雄性不稔性にかかわる核遺伝子の発現解析
滋賀県立大学 (2008.10)

208. 日本植物学会第 72 回大会

野村裕也、小森禎子、椎名 隆
葉緑体と細胞内 Ca^{2+} シグナル
高知 (2008.9)

209. 日本植物学会第 72 回大会

小森禎子、野村裕也、椎名 隆
植物の病害：環境ストレス応答と葉緑体 Ca^{2+} シグナル
高知 (2008.9)

210. 日本植物学会第 72 回大会

野村裕也、小森禎子、植村周平、吉岡美樹、吉岡博文、中平洋一、椎名 隆
病害・ストレス応答における葉緑体タンパク質 CAS の役割
高知 (2008.9)

211. 日本動物学会第 79 回大会
佐藤賢一、ママトワギユナイ、深見泰夫
受精成立のシグナル伝達における細胞膜マイクロドメインの機能について
福岡 (2008.9)
212. 奈良先端科学技術大学院大学ワークショップ「プロテオミクスが拓く新しい生命科学」
佐藤賢一
チロシンリン酸化が制御するツメガエル卵の細胞機能：受精成立のシグナル伝達機構
生駒 (2008.9)
- ・その他の発表
213. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
山岸 博
シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代における雄性不稔性
京都 (2012.8)
214. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
寺地 徹
SCAR マーカーが示唆するエンマーコムギ及びパンコムギにおける葉緑体とミトコンドリアゲノムタイプの不一致
京都 (2012.8)
215. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
田中義行、山岸 博、寺地 徹
ダイコンのオグラ型と正常型のミトコンドリアゲノムの構造解析
京都 (2012.8)
216. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
辻村真衣、寺地 徹
コムギ葉緑体への遺伝子導入技術の開発
京都 (2012.8)
217. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
吉見麻衣子、寺地 徹、山岸 博
細胞質雄性不稔ナスに対する稔性回復遺伝子の STS マーカー
京都 (2012.8)
218. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
安本景太、山岸 博
ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する新規稔性回復遺伝子の分子遺伝学的解析
京都 (2012.8)
219. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
Gyawali, Y.P., 寺地 徹
Mitochondrial genome variation in male-fertile and male-sterile alloplasmic wheat lines with *Aegilops mutica* cytoplasm.
京都 (2012.8)
220. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
高橋 亮、山岸 博、寺地 徹
ノダイコン稔性回復遺伝子領域の配列多型と機能分化
京都 (2012.8)
221. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
吉田貴徳、河邊 昭
ゲノムインプリンティングが type I MADS 遺伝子の分子進化に及ぼす影響
京都 (2012.8)
222. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
河邊 昭
エピジェネティック制御機構に関する分子集団遺伝
京都 (2012.8)
223. 京都産業大学総合生命科学部第 1 回研究交流会
黒坂 光
神経発生におけるムチン型糖鎖の機能解析
京都 (2012.8)

224. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
金田鋭一、黒坂 光
ゼブラフィッシュにおける N-acetylgalactosaminyltransferase-Like 4 の機能解析
京都 (2012.8)
225. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
川合多美子、黒坂 光
ポリペプチド N-アセチルガラクトサミン転移酵素 8b、8e の機能解析
京都 (2012.8)
226. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
中山喜明、黒坂 光
A putative GalNAc-transferase, ppGalNAc-T17/WBSCR17 regulates endocytosis in HEK293T cells.
京都 (2012.8)
227. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
中村直介、黒坂 光
ゼブラフィッシュ後脳発生におけるムチン型糖鎖の機能解析
京都 (2012.8)
228. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
和田あゆみ、黒坂 光
単層培養条件下におけるマウス胚性腫瘍由来 P19 細胞の神経分化誘導
京都 (2012.8)
229. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
佐藤賢一
膜マイクロドメインに焦点をあてた卵細胞およびがん細胞の生物学的機能の解析
京都 (2012.8)
230. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
井岡貴之、佐藤賢一
ツメガエルの卵成熟と受精における ATP イメージングと卵細胞膜タンパク質の同定
京都 (2012.8)
231. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
紀平成、佐藤賢一
血清飢餓環境におけるヒト膀胱がん細胞の Src 依存性/MAPK 非依存性増殖機構
京都 (2012.8)
232. 京都産業大学総合生命科学部第1回研究交流会
吉田潤平、佐藤賢一
ヒト膀胱がんおよび非膀胱がんにおけるウロプラキシン III の発現および細胞内局在
京都 (2012.8)
233. 第74回京都産業大学 市民講座
寺地 徹
ゲノム時代の品種改良-遺伝子組換えからゲノム育種まで-
京都 (2012.6)
234. 新学術領域研究・領域会議
佐藤賢一
卵細胞膜マイクロドメインを足場とする配偶子間認識と膜融合の分子機構
東岡崎 (2012.6)
235. 新学術領域研究・領域会議
佐藤賢一
卵細胞膜マイクロドメインを足場とする配偶子間認識と膜融合の分子機構
つくば (2012.1)
236. 近畿バイオインダストリー振興会議 第27回シーズ公開会
寺地 徹
植物の葉緑体を用いた有用タンパク質の大量生産系の構築
大阪 (2011.11)
237. 岩手県生物工学研究センター 第176回公開セミナー

寺地 徹

葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物作出への試み
岩手 (2011.7)

238. 新学術領域研究・領域会議

佐藤賢一、玖島将太、松本尚士、マブブハサン AKM
卵細胞膜マイクロドメインを足場とする配偶子間認識と膜融合の分子機構
京都 (2011.6-7)

239. 京都産業大学総合生命科学部 第2回バイオフィオーラム

寺地 徹
葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物作出への試み
京都 (2011.6)

240. 次世代シーケンスセミナー

寺地 徹、田中義行
次世代シーケンサーを用いた高等植物ミトコンドリアのゲノム解析
大阪 (2011.5)

241. 地球研生存知イニシアティブ・花博協会共催シンポジウム もうひとつの生物多様性—食と農の遺伝的多様性

山岸 博
京野菜における遺伝的多様性の減衰と維持
京都 (2011.3)

242. 麻布大学 生殖・発生工学セミナー

佐藤賢一
膜マイクロドメインを足場とする精子受容と発生開始シグナルの分子機構
相模原 (2011.3)

243. 第4回「新農業展開ゲノムプロジェクト」シンポジウム

寺地 徹
遺伝子流動制御技術の開発—コムギ葉緑体への遺伝子導入技術の開発
東京 (2010.11)

244. 山口大学大学院理工学研究科セミナー

佐藤賢一
受精卵およびがん細胞におけるチロシンリン酸化シグナル伝達機構
山口 (2010.9)

245. 神戸大学研究環重点研究チーム学術講演会

佐藤賢一
受精卵およびがん細胞におけるチロシンリン酸化シグナル伝達機構
神戸 (2010.3)

246. アグリビジネス創出フェア 2009

寺地 徹
葉緑体の遺伝子組換え—モデル植物タバコを用いた組換え作物育成へのアプローチ—
東京 (2009.11)

247. イノベーションジャパン 2009

寺地 徹、野添幹雄
タンパク質の「入れ物」を植物の葉の中に作る方法
東京 (2009.9)

D) 研究成果の公開

国際シンポジウム「雄性不稔とオルガネラゲノム工学」

平成25年3月9日(土) 午前10:00—午後1:00
京都産業大学15号館1階15102セミナー室
「シロイヌナズナとキャベツの細胞融合による雄性不稔の開発」(山岸 博)

第3回京都産業大学総合生命科学部シンポジウム「植物バイオテクノロジーと細胞質ゲノム研究の未来」

平成25年3月8日、京都産業大学神山ホール 第1セミナー室
「ハイブリッド種子生産をささえる細胞質雄性不稔性—テンサイゲノム研究の貢献と課題—」(久保友彦)
「ダイコン属植物における細胞質の分化および栽培ダイコンの起源」(山岸 博)
「葉緑体の転写研究と新しい植物バイオテクノロジーの提案」(椎名 隆)

「葉緑体の遺伝子組換えによる有用植物の作出」(寺地 徹)
http://post.kyoto-su.ac.jp/s/w013/campus_flash/index.php?L=J&ID=2011

市民公開シンポジウム「スグキナが生み出す上賀茂の風景と文化」(山岸 博)
平成 24 年 9 月 16 日、京都産業大学(日本育種学会第 122 回講演会)

ワークショップ「細胞質雄性不稔/稔性回復に関わるイノベーション創出」(企画者:鳥山欽哉・山岸 博)
ワークショップ「ミトコンドリアは従順なオルガネラか-核・ミトコンドリア相互作用の背景-」(企画者:
久保友彦・寺地 徹)
平成 24 年 9 月 14 日、京都産業大学(日本育種学会第 122 回講演会)

第 5 回生殖研究若手の会(共同世話人 3 人のうちの 1 人:佐藤賢一)
平成 24 年 7 月 26-28 日、東京大学付属三崎臨海実験所(三浦、神奈川)

第 10 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー(第 21 回植物バイオテクシンポジウム:京都植物バイオテク
談話会と共催)(世話人:寺地 徹、木村成介)
平成 23 年 12 月 8 日(木)午後 2:30-午後 6:00 京都産業大学
特別講演 山岸博(京都産業大学)「植物の育種と細胞質雄性不稔」
安井康夫(京都大学)「次世代シーケンスを利用したソバの二花柱性関連遺伝子の同定」
松本大生(京都大学)「サクラ属果樹における S-RNase 依存性配偶体型自家不和合性の機構解明にむけて-
花粉 S 因子と結合する Skp1 様タンパク質の同定-」
山本真紀(関西福祉科学大学)植物の分子細胞遺伝学 ― 遺伝子・ゲノムの情報を見る ―

第 9 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー
日時:平成 23 年 11 月 7 日(月)午後 4:00-午後 5:00
場所:京都産業大学 16 号館 2 階 16203 会議室
講師:久保友彦先生(北海道大学 農学研究院)
演題:テンサイ細胞質雄性不稔の特殊性と普遍性

第 8 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー
日時:平成 23 年 6 月 10 日(金)午後 4:00-午後 5:00
場所:京都産業大学 16 号館 2 階 16203 会議室
講師:藤井壮太博士(京都大学理学研究科 JSPS 特別研究員)
演題:高等植物の生殖にかかわる pentatricopeptide repeat 遺伝子の進化

第 7 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー
日時:平成 23 年 2 月 23 日(木)午後 4:00-午後 5:00
場所:京都産業大学 16 号館 2 階会議室
講師:安部 淳博士(静岡大学・連合農学部)
演題:寄生バチにおける極端に雌に偏った性比の進化

第 6 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー
日時:平成 23 年 2 月 21 日(月)午後 4:00-午後 5:30
場所:京都産業大学 16 号館 2 階会議室
講師 1:中山北斗博士(東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻)
演題 1:非モデル植物アスパラガスを用いた、葉のような茎、「擬葉」の進化発生学
講師 2:吉田貴徳博士(九州大学システム生命科学府・システム生命科学専攻)
演題 2:典型的パイオニア種カラスザンショウの分子集団遺伝学的研究

第 5 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー
日時:平成 22 年 12 月 10 日(金)午後 4:00-午後 5:00
場所:京都産業大学 16 号館 2 階会議室
講師:有村慎一博士(東京大学大学院農学生命科学)
演題:ライブイメージングを用いた植物ミトコンドリアの分裂・融合・維持機構の解析

第 4 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー
日時:平成 22 年 6 月 1 日(火)午後 3:00-午後 4:00
場所:京都産業大学 9 号館 902 号室
講師:諸橋賢吾博士(オハイオ州立大学)
演題:シロイヌナズナトライコーム形成に関わる転写制御ネットワークの解析

第 3 回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー(特別セミナー)
日時:平成 21 年 12 月 3 日(木)午後 2:00-午後 3:00
場所:京都産業大学図書館ホール
講師:Orlando Borrás-Hidalgo 博士(キューバ国立遺伝子工学バイオテクノロジー研究所、植物機能ゲノム
グループ長)
演題:Development of the Biotechnology in Cuba

第2回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー

日時：平成21年11月16日（月）午後4：00～午後5：30

場所：京都産業大学9号館902号室

講師：久保友彦先生（北海道大学大学院農学研究科）

演題：核・ミトコンドリア相互作用に基づくテンサイ（*Beta vulgaris* L.）生殖制御システム

第1回私立大学戦略的研究基盤形成セミナー

日時：平成21年7月21日（火）午後3：30～午後5：00

場所：京都産業大学9号館902号室

講師：久保友彦先生（北海道大学大学院農学研究科）

演題：ミトコンドリアのミニサテライトの構造多型

シンポジウム「稔性回復遺伝子の多様性と進化」（主任：寺地 徹・久保友彦）

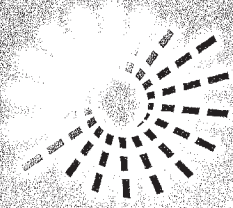
平成20年10月12日、滋賀県立大学（日本育種学会第114回講演会）

インターネット（研究紹介）

<http://www.kyoto-su.ac.jp/department/nls/gakka/nb/genom.html>

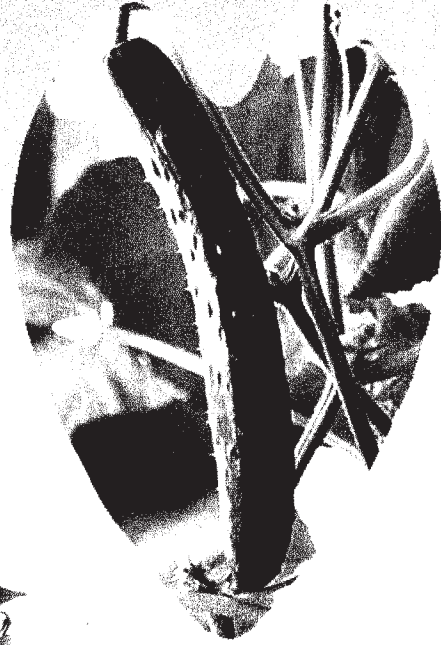
<http://www.kyoto-su.ac.jp/department/nls/gakka/nb/bio.html>

◇ 講 演 要 旨 等

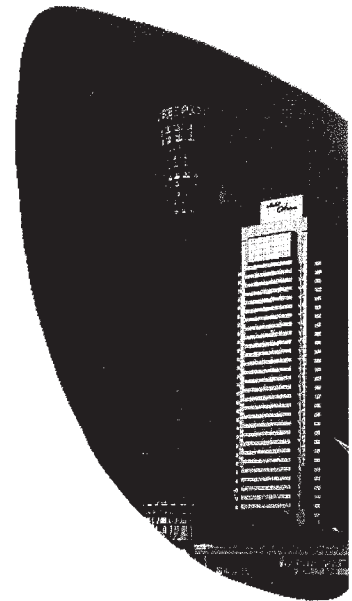
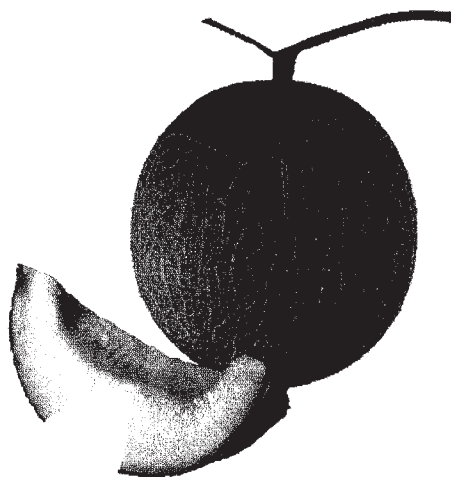


8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Joint Conference

ABSTRACTS



神戸



28th Nov. – 2nd Dec. 2011
Kobe Convention Center, Japan

PP69

Stable chloroplast transformation in *Nicotiana benthamiana* and expression of a gene encoding ROS scavenging enzyme APX

Tomohiko Tsujimura, Yoshiyuki Tanaka and Toru Terachi
Kyoto Sangyo University, Kyoto, Japan

Nicotiana benthamiana is the most widely used experimental host in plant virology (Goodin et al. 2008). In plant molecular biology, *N. benthamiana* is rapidly gaining popularity, because of feasibility of virus-induced gene silencing. Although nuclear transformants are easily obtainable, only one report shows successful transformation of chloroplast in *N. benthamiana* (Davarpanah et al. 2009). In this report, in order to establish chloroplast transformation system in *N. benthamiana*, a series of experiments were conducted. To obtain transplastomics, experimental conditions that had been used for *N. tabacum* was employed with minor modifications. A 3kb fragment containing *rps7/12*, *trnV* and *rrn16* in IRs of chloroplast genome of *N. benthamiana* was cloned into the plasmid vector pUC19. Using an In-Fusion cloning system, a cassette containing the genes *apx* (encoding stromal ascorbate peroxidase of tobacco) and *aadA* (used for a selectable marker) was integrated in the middle of chloroplast sequence. A *PpsbA* promoter and a *TrpL16* terminator were used for controlling the expression of *apx*, whereas *Prrn* and *TpsbA* for *aadA*. Antiseptically grown leaves were bombarded through the particle bombardment system, PDS-1000/He (BioRad). The first trial yielded a single plant in 54 bombardments, whereas the second trial with varying parameters produced a single plant in 24 bombardments. Compared with *N. tabacum*, the efficiency of transformation was low in *N. benthamiana*, since the majority of green shoots appeared vitrified before regeneration. PCR and Southern-blot analyses showed that *apx* and *aadA* were correctly introduced into the expected position in the chloroplast genome, and the homoplasmic state was achieved in T1 generation. The transgenes were stably transmitted to the offspring, and currently, it is examined whether stress tolerance of transplastomic is increased or not, compared to the wild-type plant. This is the second example of transplastomics in *N. benthamiana*.

90

PP95

Studies on a novel open reading frame (orf) found in the mitochondrial genome of alloplasmic lines of eggplant showing male sterility.

Maiko Yoshimi¹, Takeo Saito², Shiro Isshiki³, Toru Terachi¹ and Hiroshi Yamagishi¹

¹ Kyoto Sangyo University, Kyoto, Japan, ² National Institute of Vegetable and Tea Science, Japan and ³ Saga University, Japan

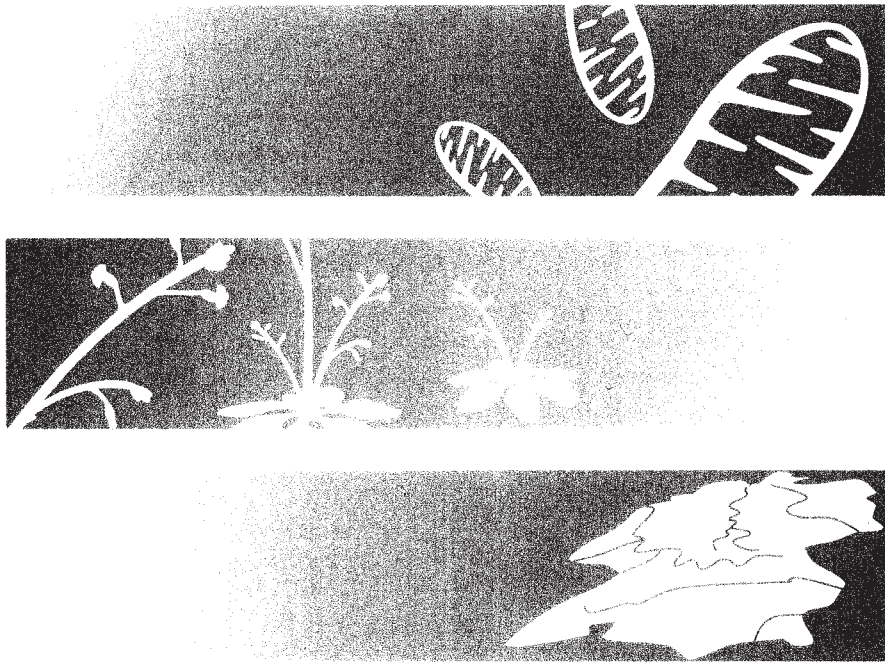
For the reliable and efficient production of F1 hybrid seeds, cytoplasmic male sterility (CMS) is a suitable trait, and thus, it has been used in many crops. Most of the CMS lines are produced by the interspecific crosses where the nuclear genome of one species is combined with the cytoplasm of different species. The cytoplasm of some wild *Solanum* species induces the male sterility in eggplant (*S. melongena*). So far, each cytoplasm of *S. aethiopicum*, *S. anguivi*, *S. grandifolium* has been shown to function as a male sterile cytoplasm in which pollen production is completely abolished.

To date, the genetic and molecular biological bases of the CMS in *Solanum* have not been clarified yet. The CMS is determined by mitochondrial genome, and the causal gene of CMS is often created by a rearrangement of the gene encoding either ATP synthase (*atp* genes) or cytochrome oxidase (*cox* genes). Therefore, we examined the structural variations in the mitochondrial genes *atp* and *cox* in wild *Solanum* species that induces CMS for eggplant, and here we report the variations in the gene *atp1*. Further, we show that the transcriptional patterns of mitochondrial *atp1* are changed in accordance with male sterility and fertility restoration. The sequencings of *atp1* region identified a novel orf (termed orf218) that is co-transcribed with *atp1* in CMS lines.

To reveal the biological function of the gene orf218 from one of alloplasmic CMS lines, we cloned the entire orf218 into an expression vector of *E. coli*. We observed that *E. coli* harboring the plasmid with the orf218 failed to produce colonies on an induction plate, suggesting that the high expression of orf218 was lethal to *E. coli*. Such property is similar to those of other CMS genes reported so far.

We are now determining the complete nucleotide sequences of mitochondrial genomes from the CMS and normal eggplants using Roche 454. Results of comparative analysis between CMS and normal mitochondrial genomes will be presented.

103



ICPMB

International Conference for Plant Mitochondrial Biology

14.05.2011 – 19.05.2011

Hohenroda, Germany

Mitochondrial genome analysis of radish (*Raphanus sativus*) by next-generation sequencing.

Presenting Author: Yoshiyuki Tanaka*

Co-Authors: Mizue Tsuda, Keita Yasumoto, Hiroshi Yamagishi, Toru Terachi

*Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University | Faculty of Life Science, Kyoto Sangyo University, Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555 (Japan)

Ogura-type cytoplasm is one of the most extensively studied male-sterile cytoplasm in Brassicaceae. This cytoplasm is commonly found in a Japanese wild radish (*R. sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroid*), and the mitochondrial gene *orf138* has been identified as a causal gene for cytoplasmic male-sterility (CMS). It is also known that the mutational event which generated *orf138* had occurred only once in the history of radish. However, how and where the *orf138* was created is a mystery, since any homologous or related sequence to *orf138* has not been identified in any databases. Close examination of entire mitochondrial genome sequences from both normal- and Ogura-type radish may give us critical information on the origin of *orf138*.

Here we report the first completely sequenced mitochondrial genome of radish (*R. sativus*). Mitochondrial DNA was isolated from 'Uchiki-Gensuke', a radish cultivar with normal-type cytoplasm, and the purified mtDNA was subject to next-generation sequencing (GS FLX system). The result shows the normal-type radish mitochondrial genome is a circular molecule of 244,035 bp, which contains 33 protein-coding genes, 3 rRNA genes, 17 tRNA genes. Compared with the rapeseed (*Brassica napus*) mitochondrial genome, 84% of the radish genome has quite similar sequence to the rapeseed genome, and the content of genes in radish genome is identical to that in rapeseed genome. However, its large repeat sequence (5530 bp) for tripartite structure is completely different from that of rapeseed genome. We searched *orf138* sequence in normal-type genome by using Blast, but any homologous sequence of *orf138* was not found.

We are now annotating Ogura-type mitochondrial genome sequence. In the preliminary analysis, *orf138* is located within a large unique region (about 15 kb) that has no homology to the normal-type genome. The sequences of this region will give a new insight to the origin of *orf138*.

A new fertility restorer gene for Ogura male-sterility found in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.)

Presenting Author: Keita Yasumoto*

Co-Authors: Jun Imamura, Chie Koizuka, Hiroshi Yamagishi, Toru Terachi

*Department of Bioresource and Environmental Sciences | Faculty of Life Sciences | Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555 (Japan)

In radish, a male-sterile system using Ogura cytoplasm has been explored. The mitochondrial gene *orf138* specific to Ogura cytoplasm is known to be responsible for the male-sterility, whereas the nuclear gene(s) called restoration of fertility (Rf) can suppress the expression of male-sterile phenotype. Genetically, the Rf genes have been identified in various cultivated and Japanese wild radishes (both are classified to *Raphanus sativus*) and in a wild species (*R. raphanistrum*). One of the Rf genes, *orf687*, has been already cloned, and it is known that the product of the *orf687* belongs to a member of PPR protein family (1-3). It is also known that the ORF687 protein reduces the amount of ORF138 protein at the translational level (4).

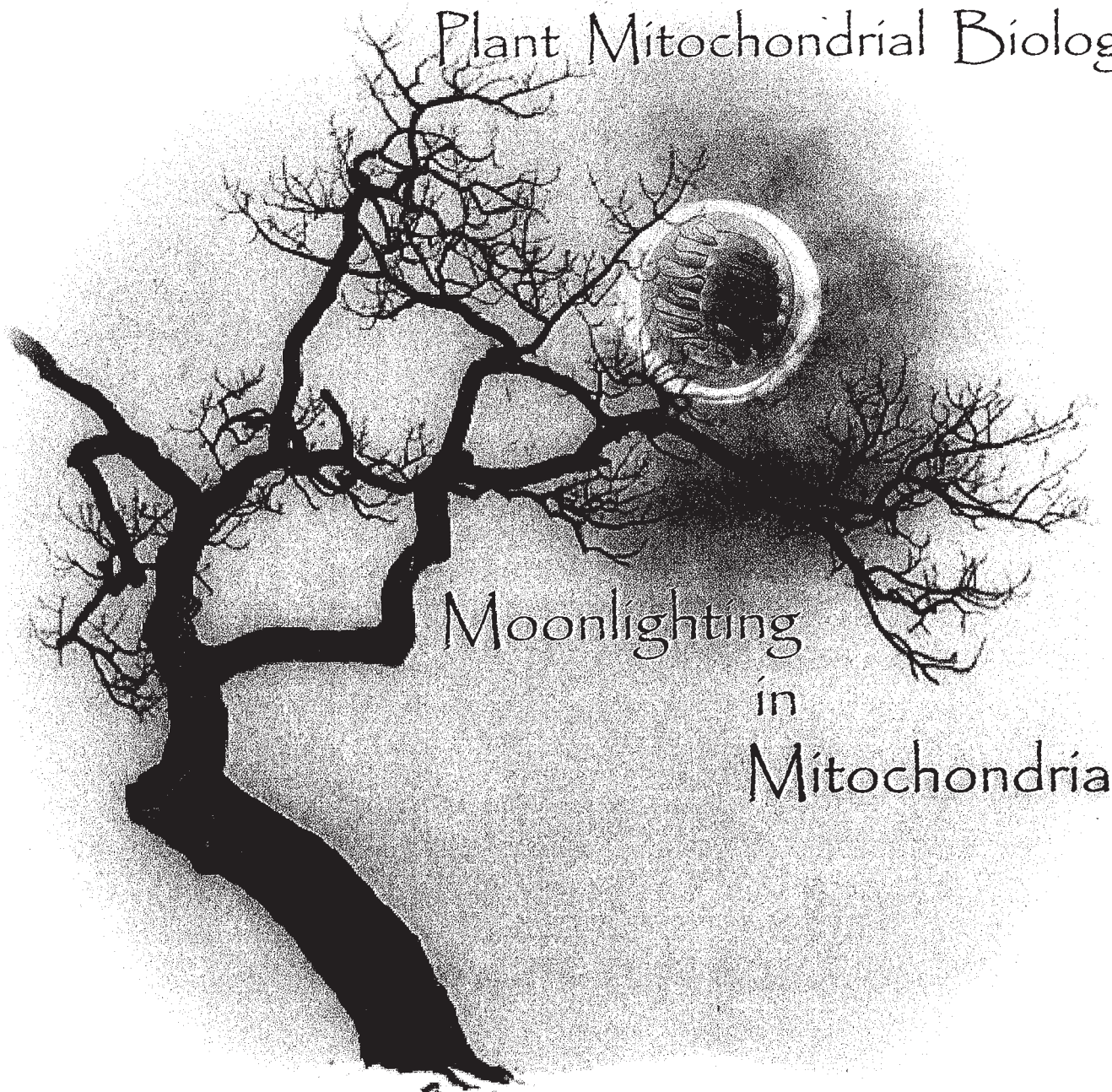
We previously reported another Rf gene (termed Rft) in Japanese wild radish, and showed that the Rft is unlinked to *orf687*. Being different from *orf687*, Rft can restorer the Ogura male-sterility by RNA processing of *orf138* transcripts (5). In this study, in order to gain better understanding of the Rf genes for Ogura male-sterility, Rf genes from *R. raphanistrum* are investigated.

In some strains of *R. raphanistrum*, two PPR genes homologous to *orf687* were found in tandem orientation in the same locus as *orf687*. The two tandem PPR genes are closely related to each other, and each encodes a protein of 690 amino acids (hence they are named as *orf690-1* and *orf690-2*). To demonstrate restoring function of each of two genes, the gene was introduced into *Brassica napus* plants with Kosena (Ogura's variant) male-sterile cytoplasm via *Agrobacterium* mediated transformation.

In the *R. raphanistrum* strains used, the presence of the Rft was also shown by northern hybridization. The evolutionary relationships among Rf genes in *R. sativus* and *R. raphanistrum* will be discussed.

1. Koizuka et al. (2003) *Plant J.* 34, 407-415.
2. Brown et al. (2003) *Plant J.* 35, 262-272.
3. Desloire et al. (2003) *EMBO Rep.* 4, 588-594.
4. Uyttewaal et al. (2008) *Plant Cell* 20, 3331-3345.
5. Yasumoto et al. (2009) *Genome* 52, 405-504.

International Conference
for
Plant Mitochondrial Biology



Moonlighting
in
Mitochondria

Lake Tahoe, CA
May 9-14, 2009

A study of DNA polymorphisms at RecA and Msh1 loci and their relationship to mitochondrial substoichiometric shifting in radish

Yuta Odake, Kyoto Sangyo University, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering

It is well known that mitochondrial genome of higher plants contains very low copy number of DNA molecules called sublimons (Small et al. 1987). Sublimons are thought to be generated by the irreversible recombination between short repeated sequences on the master mtDNA molecules. Mitochondrial substoichiometric shifting (SSS), a phenomenon in which sublimons increase their copy number to become the major DNA molecules, occasionally occurs, and the SSS may cause mitochondrial dysfunction leading to the phenotypes such as non-chromosomal stripe (NCS) and cytoplasmic male-sterility (CMS)(Janska et al. 1998). Mitochondrial SSS has been shown in at least two cases to be under nuclear gene control, involving the Fr gene in *Phaseolus vulgaris* and the CHM (Msh1) gene in *Arabidopsis* (Abdelnoor et al. 2003).

In radish (*Raphanus sativus*), Ogura male-sterile and four normal types of mitochondrial genome have been identified based on the PCR amplification patterns of mitochondrial *cox1* and *atp8* locus (Yamagishi & Terachi 2003). Ogura type mitochondrial genome is clearly distinguished from the normal ones by the presence of the gene *orf138* being responsible for male-sterility of Ogura cytoplasm. 'Uchiki-Gensuke' is a Japanese radish variety containing "normal" cytoplasm (i. e. that lacks *orf138*). Our previous study showed, however, that some individuals in the variety simultaneously possessed two different *coxI 5'* sequences, one of which was specific to Ogura type mitochondrial genome. Since other individuals contained only one type of *coxI 5'* sequence, presence of a sublimon with *coxI 5'* sequence and its SSS were inferred. In this study, in order to gain a better understanding of mitochondrial SSS in radish, intra-variety and intra-specific variations in copy number of several DNA fragments, including *coxI 5'* sequence, was examined by real-time PCR. In addition, the nuclear genes *CHM* and *RecA*, both of which are shown to function in regulation of SSS (Shage et al. 2007), were first isolated from radish and their DNA polymorphisms were studied. Relationship between these nuclear genes and the observed mitochondrial SSS in radish will be discussed.

A new Rf gene controlling fertility restoration of Ogura male sterility by RNA processing of *orf138* found in Japanese wild radish

Keita Yasumoto, Kyoto Sangyo University, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering

In order to reveal the molecular and genetic mechanism of fertility restoration in the Ogura male sterility in Japanese wild radish, fertility restoration of a plant that lacks the dominant type of *orf687*, a previously identified fertility restorer gene, was investigated. A total of 100 F₂ plants were made from the cross between a male-sterile strain, 'MS-Gensuke', with the Ogura cytoplasm and a Japanese wild radish plant. Segregation of pollen fertility in the F₂ plants led us to the assumption that two dominant complementary genes controlled the fertility restoration of the plants. However, the fertility of 27 of 59 male-fertile plants was not completely restored, resulting in a group of plants with partial male fertility. Northern blot analysis of the CMS-associated gene *orf138* indicated that one restorer allele (termed *Rft*) was involved in the RNA processing of *orf138*. Rapid amplification of cDNA ends (RACE) and subsequent northern blot analysis confirmed that the *orf138* transcript lost a 5' part of the coding region of the *orf138* gene in the restored plants. The accumulation of ORF138 protein was significantly reduced by *Rft*, but trace amounts of the protein were recognized in both partially male-fertile and male-sterile plants with the *Rft*. Relationship of pollen fertility and segregation of co-dominant sequence tagged site (STS) marker in the F₂ generation suggested that the penetrance of *Rft* was so low that *Rft* needs suitable conditions to function sufficiently for the complete restoration of fertility.

一般研究

○ 葉緑体の形質転換技術を用いたストレス耐性コムギの作出

京都産業大学総合生命科学部 寺地 徹
 京都産業大学総合生命科学部 山岸 博, 辻村 真衣
 鳥取大学乾燥地研究センター 辻本 壽

I. はじめに

葉緑体は固有のゲノムを持つ、半自立的なオルガネラである。近年、この葉緑体ゲノムを対象とした形質転換技術が開発され、タバコやナスなど複数の植物で、既に実験方法が確立されている。葉緑体の遺伝子組換えには、核ゲノムの遺伝子組換えと比べいくつかの利点が挙げられる。すなわち、葉緑体ゲノムは母性遺伝するので、このゲノムに導入された遺伝子は花粉飛散による環境中への拡散の懸念が少ない。また外来遺伝子は、相同組換えにより葉緑体ゲノムの狙った位置に導入されるので、全く同一の組換え体を繰り返し作出することが可能であり、導入遺伝子の位置効果やジーンサイレンシングがない。さらに、葉緑体ゲノムは細胞あたりのコピー数が多いので、導入遺伝子産物の強発現が期待される。これらのことから、葉緑体の形質転換技術を様々な作物へ適用する試みが世界各国でなされている。

ところで、植物が強光や乾燥、あるいは除草剤や大気汚染といったストレスを受けると、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）が生じる。ROS は植物体内のタンパク質や脂質などの生体物質と反応することで、光合成の阻害、細胞の損傷、組織の壊死などを引き起こし、結果的に植物の生長を阻害する。この ROS は、葉緑体中で最も多く発生する。一方植物は ROS を段階的に無害な水へと変換する代謝経路（アスコルベート・グルタチオンサイクル）を葉緑体に備えている（図 1）。この代謝経路を構成する酵素の一つである APX は、葉緑体型、細胞質型などがアイソザイムとして複数存在するが、それらの遺伝子はいずれも核にコードされており、葉緑体へはストロマ型とチラコイド型がトランジットペプチドにより運ばれる。

我々の研究室では、タバコやペンサミアナタバコをモデルに、パーティクルガン法を用いた葉緑体の形質転換実験を実施しており、これまでに 10 種類以上の組換えシステムを作出している。一例として、図 2 に、上記 ROS 代謝経路で働く重要な酵素である APX と SOD を、オペロンとして葉緑体ゲノムに導入した、ストレス耐性タバコを示した。

本研究は、タバコでこれまで培った経験を活かし、主要作物であるコムギに葉緑体の形質転換技術を適用することで、ストレス耐性コムギを作出することを最終的な目的とする。

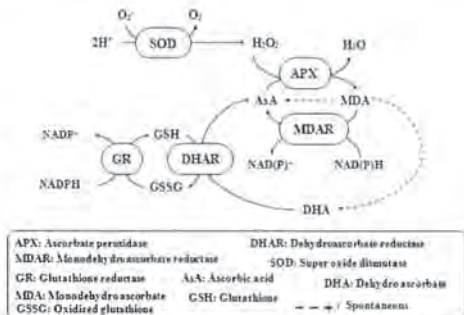


図1. アスコルベート・グルタチオンサイクル



図2. 葉緑体の形質転換によるストレス耐性タバコの作出
 W: 野生型 (SR1)
 T: 組換え体 (APX-SOD導入系統, T1/
 →: 強光により葉が白くなっている箇所を示す

II. 材料と方法

我々が通常タバコなどのモデル植物で行なっている葉緑体の遺伝子組換えは、葉緑体 DNA と相同な領域を持つプラスミドベクターを遺伝子銃で葉に撃ち込み、相同組換えによって導入されたマーカー遺伝子の働きにより抗生物質耐性を示すようになった組換え体を選抜することで達成される。しかしコムギの場合、葉片からの再分化は不可能なので、未熟胚カルスを遺伝子導入の外植片とする必要がある。本研究では培養と再分化に適した品種である‘アカダルマ’と‘Bobwhite’を用いるが、我々の研究室所在地の京都で栽培する場合は秋蒔きに限られるため、未熟胚を得られる機会は年 1 回のみである。そこで、1 年を通じて未熟胚を調製可能なシステムを構築するため、乾燥地研究センターのグロースチャンバーで栽培を試み、季節に依らない材料の調製を目指す。今年度は、平成 24 年 9 月に‘アカダルマ’と‘Bobwhite’の播種を行ない、11 月中旬に未熟胚を単離する予定である。

なお、我々の研究室では、コムギを用いた葉緑体の遺伝子組換えを確立すべく、数年前から実験を継続して行っている。今年度の 4、5 月には、昨年の秋から栽培していた‘アカダルマ’を用いて未熟胚単離を行った。未熟胚の単離は、開花後 2 週間の未熟種子を収穫し、70%エタノールで滅菌した後、クリーンベンチ内で、滅菌水で 3 回洗浄してから行った。単離した未熟胚を胚板が上になるように 2,4-D (2mg/L) を含む LS 培地に置床した。未熟胚を置床したプレートを約 1 ヶ月間、25°C でインキュベートしてカルスを形成させ、これをボンバードメントに供試した。カルスにグリーンスポットが確認されたら、硝酸銀 (10mg/L) を含む培地へ移植し、植物体の再分化を誘導した (図 3)。

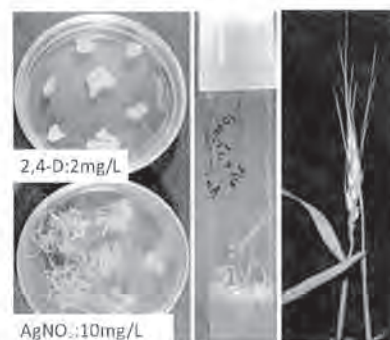


図3. アカダルマの再分化系

コムギの APX 遺伝子は葉から調製した全 RNA を鋳型に、RT-PCR により増幅した断片をクローニングすることで得た。プライマーは NBRP のコムギデータベースに存在する、イネ APX 配列データ (AK099201) と相同性のある cDNA クローンの塩基配列をもとに設計した。

形質転換に用いるベクターは、相同領域となるコムギ葉緑体ゲノム (AB042230) の断片、*rbcl-ycf4*、23SrRNA-*ndhH*、*rps12-16SrRNA* をそれぞれクローニングしたプラスミドに、この断片を左右に分割するように遺伝子を導入して作成した。既に研究室ではマーカー遺伝子 (*aadA* または *nptII*) と GFP 遺伝子を挿入したプラスミドを合計 6 種類作成しており、平成 24 年 5~7 月に実施した形質転換には、このベクターを用いた。

作成したベクターは、直径 0.6 μ m の金粒子に付着させ、PDS1000-He システム (BioRad) を用いてカルスに打ち込んだ。1 プレートあたり約 50 個のカルスをまとめ、6 種類のベクターと 4 つの撃ち込み条件を組み合わせ、合計 191 プレートに対して遺伝子導入実験を行った (表 1)。導入後はマーカー遺伝子に対応する選抜試薬 (Streptomycin または Kanamycin) を添加した培地に移植し、選抜試薬濃度を徐々に上げて再分化を誘導した。再分化個体および緑色を保持しているカルスの合計 38 個から DNA を回収し、PCR を行った。

表1. 形質転換用ベクターと打ち込み条件

shot pressure	target distance	vector
1,100 psi	6 cm	A- <i>aadA</i> , <i>gfp</i>
1,300 psi	9 cm	A- <i>nptII</i> , <i>gfp</i>
		B- <i>aadA</i> , <i>gfp</i>
		B+ <i>nptII</i> , <i>gfp</i>
		C+ <i>aadA</i> , <i>gfp</i>
		C+ <i>nptII</i> , <i>gfp</i>

A: *rbcl-ycf4*, B: 23SrRNA-*ndhH*, C: *rps12-16SrRNA*

III. 結果と考察

今年度は春に約 7,200 個の未熟胚を単離し培養を行った。2,4-D を含む培地、硝酸銀を含む培地、およびカルス化、再分化それぞれに適した培地を使用することで、高いカルス化率（70%以上）と再分化率（80%以上）が達成され、形質転換を行うためには欠かせない、外植片からの再分化系を確立することができた。

RT-PCR により得たコムギの APX 遺伝子の推定アミノ酸配列を、イネやタバコの配列と比較したところ、トランジットペプチドと思われる領域より下流は相同性が高く、酵素活性サイトや葉緑体 APX に共通して見られるドメインも保存されていた。次回の形質転換には、この APX 遺伝子を形質転換用ベクターに挿入して用いる予定である。

今回の形質転換実験では、選抜試薬を含むプレート上で緑色を呈するカルスが複数見られた。これらのカルスのうち、試薬濃度を上げても緑色を失わないものについて、試験管培地に移して培養を継続し、植物体を誘導した。これらの植物および緑色カルスから調製した DNA を鋳型に、導入遺伝子内部を増幅するプライマーで PCR を行った。現在までに、増幅が見られたものはなかったが、今後も他の再分化個体を用いて実験を継続する。

215 コムギ・エギロプス属植物のミトコンドリアゲノムの解析 2. *Aegilops speltoides* の細胞質を持つ置換系統のミトコンドリアゲノム

☆辻村 真衣¹, 森 直樹², 山岸 博¹, 寺地 徹¹ (1. 京都産大総合生命科学, 2. 神戸大院農学)

Mitochondrial genome analysis of *Triticum* and *Aegilops* species II. Mitochondrial genome of an alloplasmic line of common wheat with *Ae. speltoides* cytoplasm

☆Tsujiyama, M.¹, N. Mori², H. Yamagishi¹, T. Terachi¹ (1.Fac. Life Sci., Univ. Kyoto Sangyo, 2.Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ.)

【目的】コムギ・エギロプス属植物は、栽培化と倍数化によって進化してきた、異質倍数体を多く含む植物群である。両属各種の系統関係は、これまでに行われたゲノム分析等で明らかとなっているが、例えば *Aegilops speltoides* の種内変異とパンコムギの B ゲノム提供親との関係等、まだ精緻な議論が必要な部分も残されている。我々はこれまでにパンコムギ (Ogihara et al. 2005) 及びチモフェービの mt ゲノム (第 121 回講演会) を解読した。今回、パンコムギの進化の過程で mt ゲノムにどのような変化が生じたのかを調べるため、*Ae. speltoides* の mt ゲノムの全塩基配列を決定し、ゲノム構造の解析を行った。

【材料および方法】*Ae. speltoides* の細胞質を持つ細胞質置換コムギを材料とし、暗所で発芽させた実生から CsCl 密度勾配法を用いて mtDNA を精製し、Roche 454 により塩基配列を得た。塩基配列を精査してマスターサークル (MC) を作成し、パンコムギ (AP008982)、チモフェービ、および *Ae.*

kotschy (GU985444) の mt ゲノムと比較した。

【結果】本実験では、約 109,000 個の有効なリードが得られ、総情報量は 53Mbp であった。これらのリードを de novo でアセンブルし、最終的に得られた 31 個の Contig を整列化し、全長 476,091bp の環状 MC を仮定した。パンコムギ mtDNA を参考にアノテーションを行ったところ、全ての遺伝子が存在し、*atp6* を除く各エキソンは 99% 以上の相同性を示した (*atp6* は、N 末端に大きな違いが認められた)。*Ae. kotschy* などのエギロプス種の mtDNA には存在しない *rpl5* が *Ae. speltoides* の mtDNA に見いだされた。またチモフェービの雄性不稔原因遺伝子 (*orf256*) も確認された。今回決定した配列と、パンコムギ、チモフェービ、*Ae. kotschy* の配列との相同性は 90.1%、91.2%、82.9% であり、相同性の高い領域が点在していた。本研究は、生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」により実施された。

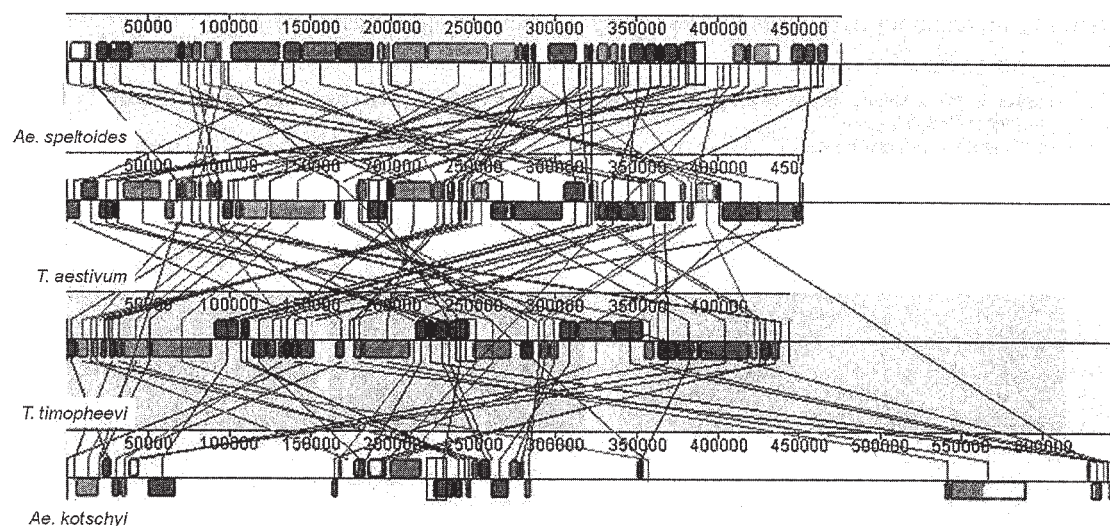


図. *Ae. speltoides*、パンコムギ、チモフェービ及び *Ae. kotschy* の mtDNA の比較

401 Complete sequence of mitochondrial genome of an alloplasmic line of common wheat with *Aegilops geniculata* cytoplasm

☆Gyawali, Y., T. Terachi (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

The agronomic significance of mitochondria is due to its involvement in the determination of cytoplasmic male sterility (CMS). This phenomenon has been found in many species of plants and is conveniently used for hybrid plant production. The M^o-type cytoplasm of *Aegilops geniculata* (2n = 4x = 28, M^oM^oUU) causes cytoplasmic male sterility in some alloplasmic lines of common wheat, such as *Triticum durum* (2n = 4x = 28, AABB) and Norin 26 (2n = 6x = 42, AABBDD) genetic background (Fukasawa 1953, 1959; Tsunewaki 2009). These male-sterile lines with *Aegilops geniculata* cytoplasm when crossed with 'Chinese Spring' restores the fertility and becomes fully fertile. Using next generation sequencing, we pyrosequenced *Aegilops geniculata* mitochondrial genome from an alloplasmic line of common wheat (code no. C31). The master molecule shows 459,652 bp with an average G + C content of 44.2 % containing 54 known mitochondrial genes. Among them, 35 genes are encoding known proteins, 3 ribosomal RNAs, and 16 tRNAs. Similarly, we already sequenced the male-fertile (code no. C13) and male-sterile (code no. C14) alloplasmic lines of common wheat with *Aegilops*

mutica cytoplasm. In this study, we compared and analyzed the whole sequences with *Aegilops mutica* mitochondrial genomes and found numerous rearrangements. In gene sequence level, *rpl5* is present in *Aegilops geniculata* genome as was absent in *Ae. mutica* cytoplasm. Similarly, *cob* gene greatly varies in size in wheat mt genomes. We found a 39-bp deletion in the coding region of *cob* gene in *geniculata* than *mutica* cytoplasm. It is notable that C13, C14 and C31 mtDNA contains homologous ORF to *orf256*, situated upstream of *cox1*, a candidate ORF for sterile gene associated with CMS of *T. timopheevii* (Song and Hedgcoth 1994; Hedgcoth et al 2002). The ORF sequences resemble to *orf260^{CTA}* except a SNP between C13 and C14 and 6 SNPs between C13 and C31. Furthermore, an ORF chimeric to *cox1* gene have been reported in male-fertile genomes of C13 and C31 and is absent in male-sterile C14 mt genome.

The genome sequence level comparisons between male-fertile and male-sterile lines could provide an insight into the molecular basis of CMS system in wheat, as it has not yet been established well in wheat.

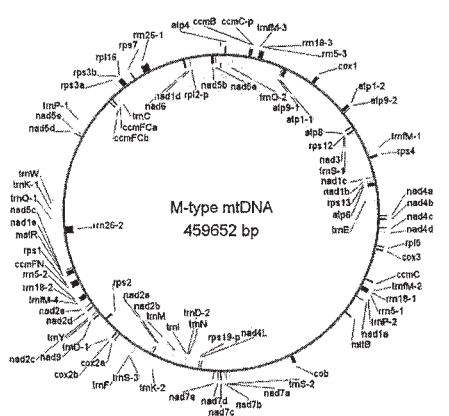


Fig. The mitochondrial genome organization of *Aegilops geniculata* alloplasmic line. Features on forward and reverse strands are drawn on the outside and inside of the circle, respectively.

404 オグラ型雄性不稔ダイコンの稔性回復に関わる *Rft* 遺伝子座の構造解析

☆安本 景太¹, 高木 宏樹², 寺内 良平², 寺地 徹¹, 山岸 博¹ (1. 京産大・総合生命科学, 2. 岩手生物工学研究センター)

Structural analysis of the *Rft* gene locus associated with fertility restoration in Ogura male-sterile radish

☆Yasumoto, K.¹, H. Takagi², R. Terauchi², T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Iwate Biotechnology Research Center)

【目的】ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔性は、キャバツやハクサイなど、アブラナ科野菜の F₁ 育種に重要な形質である。この雄性不稔は、ミトコンドリアゲノム上の *orf138* の働きで引き起こされるが、核ゲノムに稔性回復遺伝子 (*Rf*) が存在すると、*orf138* の発現が抑えられるので、正常な花粉が形成される。我々はこれまで、*orf138* の発現を mRNA の 5' プロセシングにより抑える、新規稔性回復遺伝子 *Rft* をクローニングすることを目的に、STS マーカーの作製とマッピングを進めてきた。今回は、*Rft* 遺伝子座の絞り込みと、その構造解析を行なった。

【材料および方法】オグラ型雄性不稔ダイコン 'MS 源助' と、*Rft* を持つハマダイコンとの交雑後代 (F₂BC₁) を自殖させて得た分離集団の中から、*Rft* をホモに持つと推定される個体をマーカーで選抜した。このうち 1 個体の核 DNA から fosmid ライブラリーを調製し、*Rft* に最も近接した STS マーカー K17LF2R1 を含むクローンを選抜して、塩基配列を決定した。これと同時に、次世代シーケンサーによって *Rft* ホモ型 34 個体の DNA を混合してシーケンスし、取得した

全ゲノム配列情報から同領域の延長をはかった。

【結果および考察】 fosmid ライブラリー (ゲノム冗長度 2.3) の選抜によって、K17LF2R1 マーカー領域を含むクローンコンテイングを得た (Fig. 1)。この塩基配列を決定したところ、コンテイング全長は約 68kb であった。これに全ゲノム解読に用いたショートリードのデータをあわせたところ、領域の全長は約 84kb となった。この領域の両末端付近の配列をもとに、2 つの PCR マーカー (Marker A および B) を作製した。上記分離集団の 403 個体のジェノタイピングを行なったところ、それぞれのマーカーで組換え体が 1 個体検出され、*Rft* 遺伝子座は約 68kb の領域内に絞り込まれた。この遺伝子座には、PPR タンパク質をコードする遺伝子が 3 つ存在する。一般に PPR タンパク質は、プロセシングやエディティングなど、オルガネラ RNA の様々な修飾に関わることから、これら 3 つの遺伝子のいずれか、またはその組合せが *Rft* 遺伝子である可能性が高いと考えられた。

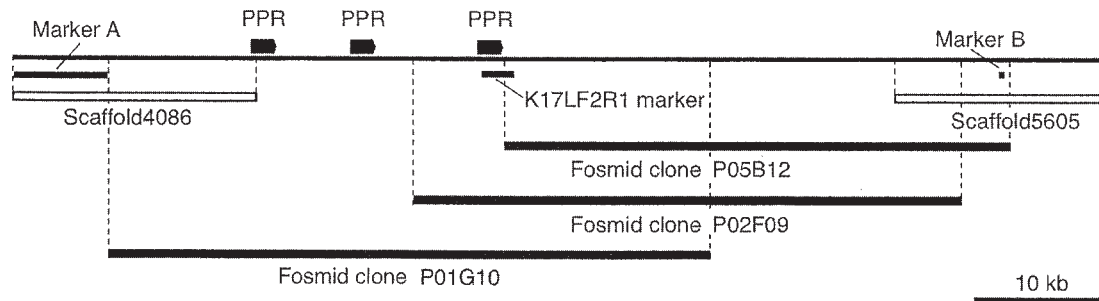


Fig. 1 Physical map of the *Rft* locus.

P022 葉緑体の遺伝子組換えを用いた高濃度グルタチオン含有植物の育成

☆福永 明日美¹, 辻村 朋彦¹, 植村 香織², 寺地 徹² (1.京産大院・工, 2.京産大・総合生命科学)

Production of transplastomic plants with high concentrations of glutathione

☆Fukunaga, A.¹, T. Tsujimura¹, K. Uemura², T. Terachi² (1.Grad.Sch.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Life Sci.,Kyoto Sangyo U.)

【目的】グルタチオン (GSH) は、グルタミン酸、システイン及びグリシンが結合したトリペプチドで、葉緑体の「アスコルビン酸-グルタチオンサイクル」の抗酸化物質として、有害な活性酸素分子種 (ROS) の消去を担う。また重金属や生体異物の無毒化等、植物細胞内環境の維持に重要な役割を果たすファイトキレーチンの前駆物質としても知られている。本研究は葉緑体の遺伝子組換え技術を用いて、GSH の含有量を増加させ、各種の非生物学的ストレス、特に重金属ストレスに耐性を持つ植物を作出することを目的とする。

【材料および方法】単離した GSH 合成酵素 (GS) 及び γ -グルタミルシステイン合成酵素 (GSH1) の cDNA に、*PpsbA* プロモーター及び *Trps16* ターミネーターを連結した後、葉緑体形質転換用ベクター (pPRV112A¹) に組み込み、遺伝子導入用コンストラクトを作製した。これをパーティクル・ボンバードメント法によりタバコの葉に撃ち込み、*gs* 遺伝子では 5 個体、*gsh1* 遺伝子では 3 個体の組換え体を得た。これらの T₁ 個体を用いて、まず導入遺伝子の有無と発現をサザン及びノーザン解析で調べ、次に組換え体に含まれるグルタチオン量を定量し、最後に ROS 発生を伴うストレス耐性を調べるため、メチル

ビオロゲン処理後の残存クロロフィル量を求め、強光処理後の Fv/Fm 値の測定を行った。

【結果及び考察】今回の実験には、独立に得られた 5 系統の *gs* 遺伝子導入系統 (*gs*-1~5) 及び 3 系統の *gsh1* 遺伝子導入系統 (*gsh1*-1~3) を使用した。導入遺伝子のプローブを用いたサザン解析では、いずれの組換え体にも予想される大きさのシグナルが観察され、目的の遺伝子が葉緑体ゲノムへ導入されていることが示された (図 1)。また同じプローブを用いたノーザン解析では、いずれの組換え体にも強いシグナルが認められ、導入遺伝子が強転写されていることがわかった。また *gsh1* 遺伝子導入系統の GSH 量は、酸化型、還元型のいずれも野生型と比べて著しく増加した (図 2)。一方、*gs* 遺伝子導入系統では、野生型と比べて還元型 GSH が有意に増加している系統が 2 つ存在したものの、他に大きな違いは見られなかった。残存クロロフィル量の値から、いずれの組換え体も野生型に比べてメチルビオロゲン耐性が上昇したことがわかり、また強光処理後の Fv/Fm 値が大きかったことから、今回作製した系統は ROS の発生を伴う各種非生物学的ストレスに耐性を示すことが期待される。

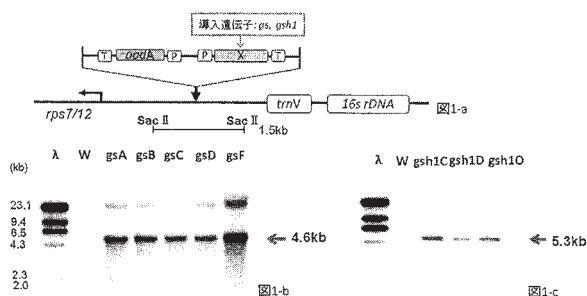


図1 導入遺伝子の解析
a. 導入プラスミドコンストラクト b. サザン解析 (*gs* 遺伝子導入) c. サザン解析 (*gsh1* 遺伝子導入)

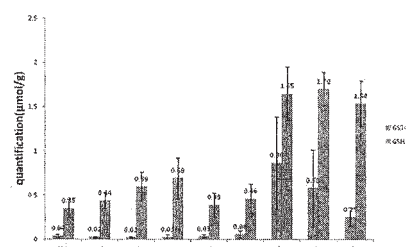


図2 組換え体の酸化型/還元型グルタチオン量
n=3 Bar=SE

P034 ダイズのフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えレタスの作出

○井上 理恵子¹, 植村 香織², 寺地 徹² (1.京産大院・工, 2.京産大・総合生命科学)

Production of a transplastomic lettuce containing a ferritin gene from soybean

○Inoue, R.¹, K. Uemura², T. Terachi² (1.Grad.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U., 2.Fac.Life.Sci.,Kyoto Sangyo U.)

【目的】

葉緑体の遺伝子組換えには、導入遺伝子が花粉を通じて環境中に拡散しない、遺伝子産物の大量発現が期待されるなど、通常行われる核の遺伝子組換えと比べ多くの利点がある。当研究室ではタバコを実験のモデルに、葉緑体の遺伝子組換えによる葉もの野菜の高機能化にむけた基礎研究を行ってきた。その中で、これまでダイズフェリチンの遺伝子を葉緑体ゲノムに導入した組換えタバコが作出されており、葉の鉄含有量が野生型タバコに比べて約2倍に増加するという研究結果を得ている。そこで我々は、この技術をレタスに適用し、可食部に鉄分を多く含む有用な野菜を作出することができないか検討した。今回、フェリチンをコードする遺伝子をレタスの葉緑体ゲノムに導入することに初めて成功したので報告する。

【材料および方法】

本研究ではタバコの実験条件を踏まえ、葉緑体ゲノムのIR領域にある3' *rps7/12* と *rrn16, trnV* の遺伝子間領域に外来遺伝子を導入しようとした。まず、レタスの葉緑体DNAの相同領域および選抜マーカーの *aadA* 遺伝子を持つ形質転換ベクターを設計した。次に、葉緑体で働く *psbA* プロモーターと *rps16* ターミネーターを付加した、ダイズ由

来のフェリチンをコードする遺伝子をベクターに挿入した。この形質転換ベクターをパーティクルガンによりレタスの葉に撃ち込んだ。

【結果および考察】

合計70回のパーティクルボンバードメントの結果、3個のスペクトノマイシン耐性シュートを得ることができた。これらのシュートを培養してできた再分化個体において、導入遺伝子に特異的なプライマーペアでPCRを行ったところ、1個体で増幅産物が認められた。また、サザン解析の結果、この組換え体では、導入遺伝子が葉緑体ゲノムの目的の位置に正しく導入されており、ほぼホモプラスミックな状態が達成されていることがわかった。

レタスは植物工場における水耕栽培システムが完成しており、天候や病虫害に左右されずに安定した生産が可能である。また比較的生育が早く、毒性を持つ物質を産生しないので、葉を直接食用とすること以外にも、高度に精製された安全なタンパク質を大量に生産させるプラットフォームとして、健康食品や医療分野への利用が期待できる。

現在、組換え体は閉鎖系温室で育成中である。本発表ではこの組換えレタスのさらなる解析結果についても報告したい。

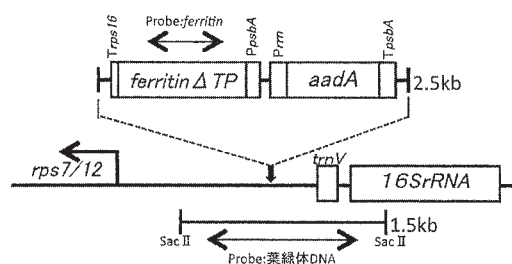


図1.導入プラスミドコンストラクト

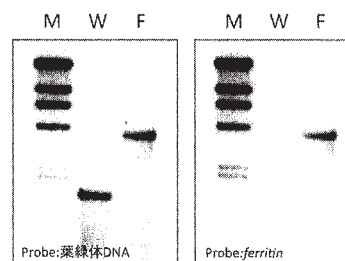


図2.サザン解析

M:Marker(λ /Hind III) W:Wild type
F:ferritin Δ TPを導入した組換え体

P036 グルタミン酸脱水素酵素遺伝子 (*gdh1*) を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出
 ☆大矢 悠貴¹, 寺地 徹² (1.京産大院工, 2.京産大総合生命科学)

Production of a transplastomic tobacco plant containing a glutamate dehydrogenase gene (*gdh1*) in the chloroplast genome

☆Ohya, Y.¹, T. Terachi² (1.Gra. Sch. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Life. Sci., Kyoto Sangyo U.)

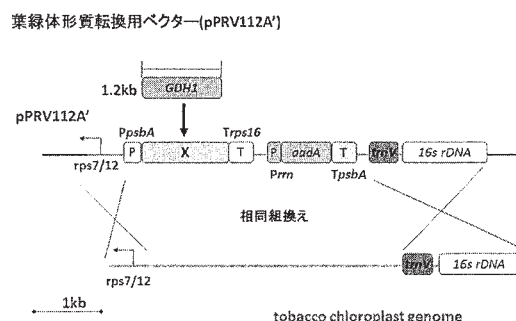
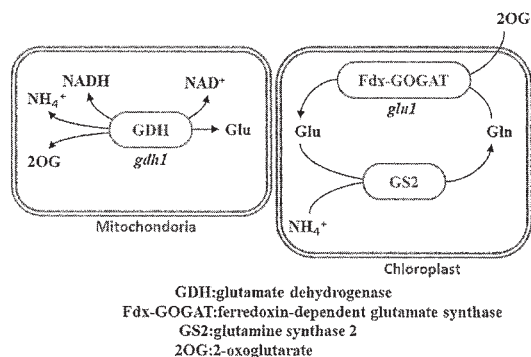
植物においてグルタミン酸 (Glu) 合成を行う酵素はいくつか存在するが、そのうちの1つに NADH-dependent glutamate dehydrogenase (NADH-dependent GDH1) がある。この酵素は核ゲノムにある *gdh1* 遺伝子にコードされており、酵素自体はミトコンドリアに局在して機能している。GDH1 は NH₄⁺ と 2-oxoglutarate (2-OG) から Glu と水を合成するが、この反応は可逆的で Glu の分解も行う (図 1)。この GDH1 をコードしている *gdh1* 遺伝子を、CaMV35S プロモーターを用いてトマトで強発現させたという先行研究がある (Kisaka 2007)。この研究では、*gdh1* を強発現させたトマト果実では、野生型と比べて遊離アミノ酸が約 2 倍に増加しており、Glu レベルも野生型の約 2 倍であったと報告されている。本研究は、本来の局在とは異なるものの、*gdh1* 遺伝子を葉緑体内で強発現させることで、グルタミン酸含有量が高まるか調べることを目的とする。今回、モデル植物であるタバコの葉緑体ゲノムへ *gdh1* 遺伝子を導入し、組換え体を作成することに成功したので報告する。

実験に用いた形質転換ベクターは、タバコ由来のプロモーター (PpsbA) とターミネーター (Trps16) が付加された *gdh1* 遺伝子、野生型タバコの葉緑体 DNA の相同領域及び

選択マーカーの *aadA* 遺伝子を持つ (図 2)。このベクター DNA をパーティクルガンでタバコの葉に撃ち込み、2 系統 5 個体の組換え体を得た。現在その当代ならびに後代の解析を進めている。

これら組換え体の T0 世代の個体について、*gdh1* 遺伝子が正しく導入されているかを確かめるために、それぞれの組換え体の葉から抽出した DNA を制限酵素処理したサンプルでサザン解析を行った。*gdh1* 遺伝子プローブ及び挿入位置を含む葉緑体 DNA プローブを使用してハイブリダイゼーションを行った結果、*gdh1* 遺伝子が葉緑体ゲノムの目的の位置に正しく導入されていることが確認された。組換え体の 1 系統 (3 個体) からは、自殖により次世代の種子が得られた。残りの系統 (2 個体) は閉鎖系温室にて栽培中である。得られた T1 世代の種子を播種し、導入遺伝子の伝達をサザン解析により調べた。その結果、T1 個体に導入遺伝子が伝達していることが示された。また、導入遺伝子の発現を RT-PCR により解析したところ、すべての T1 個体で導入遺伝子の強発現が認められた。

今後、導入遺伝子由来のタンパク質の発現解析、ならびにグルタミン酸含有量の測定を実施する予定であり、結果はポスターにて報告する。



W01 細胞質雄性不稔／稔性回復に関わるイノベーション創出基礎的研究

Innovative basic and applied researches in cytoplasmic male sterility and fertility restoration

9月14日 13:15～15:15 第7会場 12号館3F 12304教室

企画者：鳥山 欽哉（東北大院農）・山岸 博（京都産大・総合生命）

共催：生物系特定産業技術研究支援センター

ねらい：細胞質雄性不稔性は、F1ハイブリッド品種の育成のみならず、花粉症やGM花粉流出防止対策などの点からも産業界の需要が期待される。本ワークショップでは細胞質雄性不稔性と花粉稔性回復の分子機構解明、および、それを利用した花粉形成制御技術に関するイノベーション創出基礎的研究について話題提供する。産業界から何が求められているかの情報交換も行い、分野横断的基盤／応用研究の可能性についても会場全体で総合討論したい。

座長：鳥山 欽哉

13:15～「オルガネラゲノム工学による細胞質雄性不稔の開発」

Development of cytoplasmic male sterility by organelle genome engineering

山岸 博（京都産大・総合生命）

各種のアブラナ科野菜およびナスを材料として、オルガネラゲノム工学的手法によって、新しい細胞質雄性不稔の素材を開発した。それらの雄性不稔および稔性回復の分子遺伝学的機構に関する研究の進展を紹介する。

13:35～「植物ミトコンドリア遺伝子発現の分子基盤解明と育種への応用」

Research and development on mitochondrial gene expression in plant breeding

中村 崇裕¹、風間 智彦²（¹九大 農学研究院、²東北大院農）

近年、細胞質雄性不稔（CMS）と稔性回復（Rf）に関わる分子の実態が明らかになってきた。CMS/Rf機構の鍵となるPPR蛋白質、およびミトコンドリア翻訳機構の現在の知見と育種への応用について紹介する。

13:55～「細胞質雄性不稔性の発現機構解明と人工稔性回復遺伝子の開発」

Study on the mechanism of CMS expression and development of artificial Rf

久保 友彦¹、田口 和憲²（¹北大・院農学研究院、²北海道農業研究セ）

テンサイを始め、ハイブリッド採種をCMSに依存する作物は多い。遺伝学的には、CMSの発現はミトコンドリアゲノム上の雄性不稔性誘発遺伝子（S）と核の稔性回復遺伝子（Rf）の相互作用で説明されている。いくつかの植物でSとRfのいずれか、もしくは両方がクローン化されている。ところがCMSがどうやって発現するのか解明されている植物は無い。本ワークショップでは、プロジェクト概要と、なぜ雄性不稔性が発現するのかについて、ミトコンドリア呼吸の観点から得られたデータを紹介する。

座長：山岸 博

14:15～「日長感応性細胞質雄性不稔による新規ハイブリッドコムギ育種基盤の開発」

Development of hybrid wheat breeding method using photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility

村井 耕二（福井県大生物資源）

ハイブリッドコムギ品種は従来品種と比較して15～20%の増収が見込まれる。近縁野生種の細胞質による日長感応性細胞質雄性不稔（PCMS）を利用する二系法のハイブリッドコムギ育種技術について紹介し、ハイブリッドコムギの将来性について検討する。

14:35～「コメ産業の国際化を狙った新規ハイブリッドライス育種基盤の開発」

Molecular studies and development of new breeding materials for hybrid rice

鳥山 欽哉、風間 智彦（東北大院農）

ハイブリッドライスの栽培面積は世界全体で13%を占めており、そのほとんどがWA-CMSを利用している。本研究では、複数の野生イネに由来する細胞質雄性不稔性と稔性回復の分子基盤解明を行い、日本独自のハイブリッドライス開発基盤の提供を目指している。

14:55～総合討論

W02 ミトコンドリアは従順なオルガネラか—核・ミトコンドリア相互作用の背景—

Are mitochondria obedient organelles? : what the recent studies tell us about nuclear-mitochondrial interaction

9月14日 15:30 ~ 17:30 第7会場 12号館 3F 12304教室

企画者：久保友彦（北海道大学）・寺地徹（京都産業大学）

ねらい：細胞内共生説によればミトコンドリアは元来独立した生物であったが、現在のミトコンドリア遺伝子セットではもはや自立した生活を営むことはできない。そのためミトコンドリアは不足する遺伝子産物を核ゲノムに依存することになり、核に対して隷属的な細胞内オルガネラに見える。ところが最近になってミトコンドリアが核に唯々諾々と従っているという見解に再考を促すような研究報告が散見されるようになった。これら相反する見解について検討するのが本ワークショップのねらいである。そのため、ミトコンドリアと核の相互作用に関する5演題をお願いし、話題提供者には大胆な仮説を頂戴する予定である。議論を通じて、新しい研究の方向を探っていく。

座長：久保友彦

15:30 ~ 「植物ミトコンドリアとゲノム構造のダイナミクス」

Dynamic Aspects of Plant Mitochondria and their genomes

有村慎二, 片山健太, 堤伸浩 (東京大・院・農学生命科学)

ミトコンドリアとそのゲノムは、作物の生育と生殖に大きな影響をもつが、その細胞内の真の構造と動態についてはまだ多くが謎のままである。これらに関する最近の知見、現在進行形の研究を紹介する。

15:50 ~ 「核遺伝子によるナタネ CMS 遺伝子 *orf125* のコピー数の変動」

Variation of copy number of CMS gene, *orf125*, by nuclear gene in *Brassica napus*

今村順, 寺尾圭陽, 長谷川みずき (玉川大・院・農)

CMS ナタネ (*B.napus*) に *B.rapa* を交配することで、CMS 遺伝子 *orf125* のコピー数が著しく減少する。このミトコンドリアゲノムの変動の解析と、オルガネラゲノムの組換えに関与する *Msh1* 発現抑制によるミトコンドリアゲノムへの影響について報告する。

16:15 ~ 「ダイコンのミトコンドリアゲノムの多様性とミトコンドリアと相互作用する核遺伝子の進化」

Mitochondrial genome diversity in radish and evolution of nuclear genes that interact with mitochondria

寺地徹 (京都産業大・総合生命科学)

ダイコンオグラ型細胞質はミトコンドリアの雄性不稔原因遺伝子 *orf138* を持つことで他と区別される。一方、ハマダイコンからは *orf138* の発現を抑える *Rf* 遺伝子が複数見つかる。本WSでは、ミトコンドリアゲノムの多様性、及び *Rf* の多様性を産み出す機構について考察する。

座長：寺地徹

16:40 ~ 「RNA 転写後制御システムの進化から見た細胞内共生の形」

Forms of endosymbiosis observed from the evolutionary pattern of pentatricopeptide repeat genes

藤井壮太, 鹿内利治 (京都大・院・理学)

本講演では核によるミトコンドリアの遺伝子発現制御システムの一部を構成する Pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質ファミリーについて紹介する。近年の研究から PPR の進化パターンには、オルガネラと核との間の共存とせめぎ合い両方の痕跡が残されていることが明らかになってきた。

17:05 ~ 「植物オルガネラゲノムの遺伝的自律性の検証—パンコムギ核ゲノムと 50 世代共生した *Aegilops caudata* プラズモンを *Ae. caudata* に帰す」

Testing genetic autonomy of plant organellar genomes by returning *Aegilops caudata* plasmon coexisted with the wheat genome for half a century to *Ae. caudata*

常脇恒一郎 (京都大学・農学)

Aegilops caudata を細胞質親として、あるパンコムギ系統の花粉を戻交雑し、第 60 戻交雑世代種子を得た。今回、第 50 戻交雑世代植物の *Ae. caudata* 由来プラズモンを、当初の細胞質親である *Ae. caudata* 系統に導入し、半世紀前に離別した核ゲノムとプラズモンをもつ *Ae. caudata* の再構成に成功した。この再構成 *Ae. caudata* と当初の細胞質親 *Ae. caudata* について、諸特性を比較し、オルガネラゲノムの遺伝的自律性について究極的知見を得たので報告する。

P034 グルタチオン合成酵素 (GS) の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出と特徴づけ

☆福永 明日美¹, 辻村 朋彦¹, 須頭 知世³, 植村 香織², 寺地 徹² (1.京産大・院工, 2.京産大・総合生命科学, 3.京産大・工)

Production and characterization of transplastomic tobacco plants containing a gene encoding glutathione synthase (GS) in the chloroplast genome

☆Fukunaga, A.¹, T. Tsujimura¹, T. Sugashira³, K. Uemura², T. Terachi² (1.Grad. Sch. Fac. Eng., Univ. Kyoto Sangyo, 2.Fac. Life Sci., Univ. Kyoto Sangyo, 3.Fac. Eng., Univ. Kyoto Sangyo)

【目的】

グルタチオンはグルタミン酸、システイン及びグリシンの3つのアミノ酸が結合したトリペプチドで、葉緑体内で活性酸素分子種(ROS)の消去を担う「アスコルビン酸グルタチオンサイクル」において、アスコルビン酸とともに抗酸化物質として働く。またグルタチオンは重金属や生体異物の無毒化等、植物細胞内環境の維持に関する重要な役割を持つファイトキレーチンの前駆物質としても知られている。本研究は葉緑体の遺伝子組換え技術を用いて、グルタチオンの含有量を増加させ、ストレス耐性ならびに重金属耐性を持つ植物を作出することを目的とする。

【材料および方法】

ダイコンから単離したグルタチオン合成酵素(GS)のcDNAに*PpsbA*プロモーター及び*Trps16*ターミネーター配列を連結した後、このDNA断片を葉緑体形質転換ベクターpPRV112A'に組込み、導入コンストラクトを作成した(図1a)。これをパーティクル・ボンバードメント法によりタバコの葉に撃ち込み、組換え体を得た。T₀個体の自殖によりT₁個体を得て、導入遺伝子の有無及び発現を、サザン解析及びノーザン解析でそれぞれ

調べた(図1b、c)。葉に含まれる総グルタチオン量を Total Glutathione Quantification Kit (Dojindo) を用いて定量した。組換え体からリーフディスクを調製し、メチルピオロゲン処理後の残存クロロフィル量を定法により求めた。

【結果及び考察】

今回の実験には、独立に得られた5個体のT₀に由来する5系統(*gsA*~*gsF*)のT₁を使用した。*gs*遺伝子のコード領域を含むプローブを用いたサザン解析では、いずれの組換え体も4.6kbのシグナルを示し、*gs*遺伝子が相同組換えにより導入されたことが示された(図1b)。また同じプローブを用いたノーザン解析では、いずれの組換え体も1.5kbの強いシグナルを示し、導入遺伝子が強転写されていることがわかった(図1c)。一方、組換え体の総グルタチオン量は、いずれも非組換え体と比べて有為に増加(1.8~2.5倍)していた(図2)。残存クロロフィル量の値から組換え体がメチルピオロゲンに対する耐性を示すこともわかったため、これらの系統がROSの発生を伴う各種ストレスに耐性を示すことが期待される。

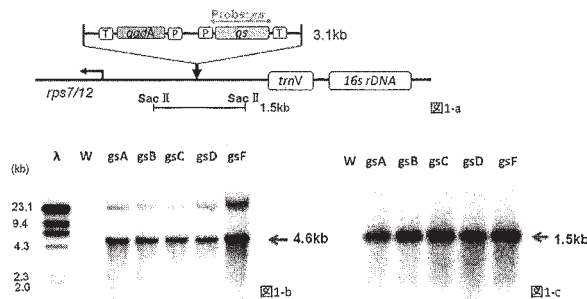


図1. 導入遺伝子の解析
a. 導入プラスミドコンストラクト b. サザン解析 c. ノーザン解析

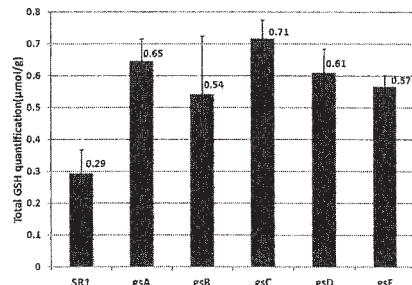


図2. 組換え体の総グルタチオン量
n=4 Bar=SE

201 コムギ・エギロプス属植物のミトコンドリアゲノムの解析 1. チモフェービコムギの細胞質を持つ置換系統のミトコンドリアゲノム

☆辻村 真衣¹・富岡 関子¹・森 直樹²・寺地 徹¹ (1.京都産大総合生命科学, 2.神戸大院農学)

Mitochondrial genome analysis of *Triticum* and *Aegilops* species I. Mitochondrial genome of an alloplasmic line of common wheat with *T. timopheevi* cytoplasm

☆Tsumijima, M.¹, E. Tomioka¹, N. Mori², T. Terachi¹ (1.Fac. Life. Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Grad. Sch. Agr., Kobe U.)

【目的】近年、イネ科、アブラナ科、ナス科など、広範な作物の育種において、細胞質雄性不稔 (CMS) の活用が図られている。実用的な育種素材を求めて、新規雄性不稔細胞質ならびに稔性回復遺伝子の探索が行われており、CMS の原因となるミトコンドリア (mt) 遺伝子の研究も分子レベルで展開されている。しかし CMS という表現型の普遍性とは対照的に、その原因遺伝子は植物の種類によって異なると思われる、遺伝子の機能や成立過程についてはわからないことが多い。ところで、ここ数年の次世代シーケンサーの普及により、mt ゲノムの構造が多くの植物で明らかにされつつある。今回我々は、植物における CMS 原因遺伝子成立の分子の基礎を明らかにするため、コムギに CMS をもたらす代表的な細胞質を持つ *Triticum timopheevi* の mt ゲノムの構造解析を行った。【材料および方法】本研究の材料には *T. timopheevi* の細胞質を持つ細胞質置換コムギ (核親は *T. spelta*) を用いた。暗所で育てた細胞質置換コムギの実生から、ミトコンドリアを定法により単離した後、mtDNA を塩化セシウム密度勾配法で精製し、次世代シーケンサー (Roche 454) で塩基配列を得

た。得られた配列をパンコムギの mtDNA 配列 (Genebank:AP008982) および *Aegilops kotschyi* 細胞質を持つ細胞質置換コムギの mtDNA 配列 (GU985444) と比較した。【結果】約 23Mb の情報量を持つ、約 55,000 個の有効なリードが得られた。これらのリードは 103 のコンティグを構成し、各コンティグの全長を合計すると約 590kb になった。ここから葉緑体 DNA 由来のコンティグを除き、mtDNA 由来のもののみをマニュアルで整列化した結果、全長 443kb のマスターサークルを仮定することができた (図)。チモフェービのマスターサークル上には、パンコムギの mt ゲノムに存在する全ての既知遺伝子が確認され、6 つの遺伝子に、非同義置換やアミノ酸の付加を伴う塩基の挿入が見られた (表)。今回決定したチモフェービの配列は、その 93% がパンコムギのものと同様に高い相同性を示した。残り 7% はパンコムギには存在しない配列であったが、うち 2% は *Ae. kotschyi* の mtDNA 配列と同様性があった。雄性不稔の原因遺伝子の有力な候補、*orf256* は、この 2% 部分に存在した。なお本研究は、生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」により実施された。

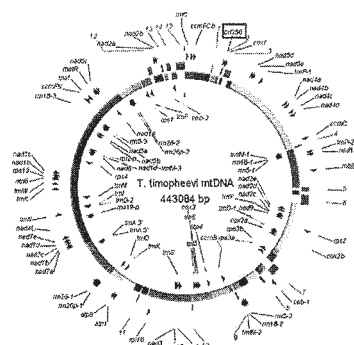


図. *T. timopheevi* のミトコンドリアゲノム (推定マスターサークル) パンコムギmtDNAと相同性のある領域 (内周■) と、相同性のない領域 (外周□1-15)、および遺伝子 (◆)

表. パンコムギとチモフェービのmt遺伝子間における非同義置換とポリペプチド鎖の伸長をもたらす塩基の挿入

遺伝子名	<i>T. aestivum</i> - <i>T. timopheevi</i>		<i>T. aestivum</i> - <i>T. timopheevi</i>	
	(bp)		(n.a.)	
cob	1,190	C - T	397	W - stop codon
	1,192	G - T	398	P - T
	1,194	T - C	398	P - T
	1,195	A - C	399	stop codon - D
cox2	1,197	C - A	399	stop codon - D
	687	C - A	229	Q - H
cmr1/Cb	688	T - G	230	M - L
	533	A - T	178	Q - L
rps2	521	A - C	174	Y - S
rps4	844	A - C	262	S - R
rps19	236	A - C	79	L - R
rps19-p	121	* - G	41	* - G
	122	* - G	41	* - G
	123	* - A	41	* - G
	124	* - A	42	* - K
	125	* - A	42	* - K
	126	* - G	42	* - K
	127	* - G	43	* - V
	128	* - T	43	* - V
	129	* - T	43	* - V

*は塩基の欠を表す。

519 ダイコンの OS40 型ミトコンドリアゲノムの構造解析 - 正常型およびオグラ型との比較 -
 ☆田中 義行・富岡 関子・山岸 博・寺地 徹 (京産大総合生命科学)

**A structural analysis of the OS40-type mitochondrial genome from radish (*Raphanus sativus*):
 Comparison with normal-type and Ogura-type genomes**

☆Tanaka, Y., E. Tomioka, H. Yamagishi, T. Terachi (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

【目的】 ダイコン (*Raphanus sativus*) のオグラ型細胞質雄性不稔は、ミトコンドリアゲノム (mtDNA) 上の *orf138* によって引き起こされる。一方、多くの栽培ダイコンは *orf138* を持たず、正常型細胞質を持つ。我々はダイコンの mtDNA の進化、並びに由来不明な *orf138* の起源を明らかにするため、オグラ型細胞質を持つ「MS 源助」、正常型細胞質を持つ「打木源助」の mtDNA の全塩基配列を決定し、両者のゲノムが主に相同領域の再構成により分化していることを示した。その中で我々は、以前の研究で「大阪四十日」に見出した OS40 型 mtDNA に興味を持った。この OS40 型は *orf138* を持たず、その意味では正常型に分類されるが、*cox1-atp8* 領域の構造は、いわゆる正常型及びオグラ型と明瞭に異なっている。最近、我々は「打木源助」の中に OS40 型 mtDNA を持つ個体を見出した。本実験では、この OS40 型「打木源助」を材料とし、その mtDNA の全体構造を把握することを目的とした。

【材料および方法】「打木源助」の正常型 mtDNA を持つ個体と OS40 型 mtDNA を持つ個体を用いてサザン解析を行った。本解析には、正常型 mtDNA の全塩基配列を基に、mtDNA 全領域の構造変異を検出できるように選択した 4

種の制限酵素と 18 個のミトコンドリア遺伝子プローブを用いた。また OS40 型 mtDNA の *cox1-atp8* 領域をゲノミック PCR で増幅し、塩基配列を決定した。

【結果および考察】 18 プローブのうち、4 プローブ (*rps3*、*atp1*、*atp8*、*cox1*) で OS40 型特異的なバンドパターンが検出され、これらの領域でゲノム構造が変化していると考えられた。*cox1* および *atp8* プローブのどちらを用いた場合にも、正常型では 3.8kb、OS40 型で 12.1kb というバンドパターンが検出された。このことから、OS40 型の *cox1-atp8* 間には挿入配列が存在すると考えられた。OS40 型の *cox1-atp8* 領域の塩基配列を決定したところ、OS40 型の *cox1-atp8* 間には、正常型にはない 8652bp の配列が存在することが分かった (図 1)。この挿入配列をオグラ型 mtDNA 全塩基配列と照らし合わせたところ、正常型にはないオグラ型特異領域の部分配列と一致した。オグラ型 mtDNA では、この特異領域の末端に *orf138* が存在しており、OS40 型の mtDNA 構造はオグラ型雄性不稔の起源に新たな知見を与えうる。今後は、OS40 型 mtDNA の全塩基配列を決定し、ダイコン mtDNA の系統関係および *orf138* の由来を明らかにしていきたい。

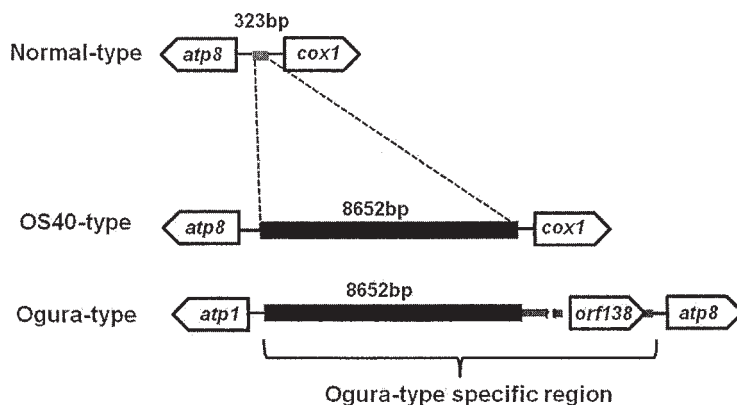


図1. 正常型とOS40型の *atp8-cox1* 領域の構造、およびオグラ型特異領域の構造

713 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの構造と後代への伝達
 ○山岸 博・津田 瑞江・田中 義行・寺地 徹 (京産大総合生命科学部)

Structure of mitochondrial genome of somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea*) and the transmission to their progenies

○Yamagishi, H., M. Tsuda, Y. Tanaka, T. Terachi (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

アブラナ科作物における新しい細胞質雄性不稔の素材を開発することを目的として、シロイヌナズナとキャベツの細胞融合を行って体細胞雑種を作出した。得られた体細胞雑種は雄性不稔性を示した。そのためキャベツ類を交雑して後代を育成している。この過程で、体細胞雑種およびその後代についてミトコンドリアゲノムの構成を調査するとともに、雄性不稔性を観察した。

シロイヌナズナの‘コロンビア’とキャベツ品種‘中生サクセション’の間の体細胞雑種は、著しく低い花粉稔性を示す一方で、キャベツ類(キャベツ、コールラビー、カイラン)を花粉親とした戻し交雑によって種子を形成した。得られた後代のうち開花した個体について花粉稔性を調査したところ、体細胞雑種当代と同様に雄性不稔性を示した。このことから、体細胞雑種が示した雄性不稔性は安定して後代に伝達されているものと考えられた。現在までのところ、BC₂世代での雄性不稔性を確認するとともに、BC₃世代の個体を獲得している。

体細胞雑種の後代について、ミトコンドリアの遺伝子のサザン解析を行った。調査した遺伝子とその周辺領域における体細胞雑種の

RFLPは「キャベツ型」、「キャベツ+シロイヌナズナ型」および「変異型」の3つのパターンに分かれた。このうち特に両親種とは異なるRFLPを示す「変異型」の遺伝子領域が注目された。

「変異型」を示す遺伝子の1つである *atp9* についての詳細な調査の結果、この領域ではシロイヌナズナとキャベツに共通して存在する反復配列を介して、両親種のミトコンドリアゲノムが組換えを起こしていると推察された。すなわち、体細胞雑種においては、両親種のミトコンドリアゲノムがキメラ化して存在している領域があると考えられた。

このような「変異型」のBC₁世代からBC₂世代への伝達様式をサザン解析によって調査したところ、BC₁のRFLPパターンがBC₂個体でも維持されていることが認められた(図)。このことから、細胞融合によって生じた新しいタイプのミトコンドリアゲノムは、戻し交雑によって後代に伝達されるため、キャベツ類に導入することが可能であると判断された。現在さらに後代を得ようとしている。なお、本研究は生研センター基礎的研究推進事業によって実施した。

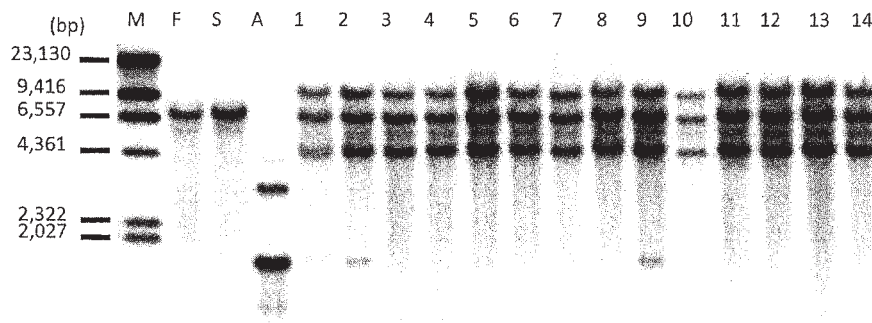


図 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種後代におけるミトコンドリア *atp9* 領域のRFLP

M; マーカー F; 富士早生 S; 中生サクセション A; シロイヌナズナ‘コロンビア’ 1,2; BC₁世代 3~14; BC₂世代

P101 RNA expression pattern of selected mitochondrial genes and ORFs in fertile and male sterile common wheat alloplasmic lines with *Aegilops mutica* cytoplasm

☆Gyawali, Y.P., Y. Tanaka, M. Tujimura, T. Terachi (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

The main function of mitochondria within the eukaryotic cells is the synthesis of ATP via process of oxidative phosphorylation through electron transport chain. The agronomic significance of mitochondria is due to its involvement in the determination of cytoplasmic male sterility (CMS). This phenomenon has been found in many species of plants and is conveniently used for hybrid plant production. The substitution of alien plasmons in wheat, the alloplasmic wheat lines, have various novel phenotypes, such as parthenogenesis, delayed growth, pistillody, premature seed germination, etc. The most commonly observed phenotype is male sterility (Tsunewaki 1996). The alien substitution of *Aegilops mutica* cytoplasm in common wheat (cv. Chinese Spring) produces both the fertile and male-sterile phenotypes, indicating the existence of two different types of plasmons in *Ae. mutica* (T and T2-plasmon) (Tsunewaki 1994). We have already determined the molecular structure of mitochondrial genome from these two plasmons. The next-generation

sequencing of male-fertile (C13) and male-sterile (C14) common wheat alloplasmic lines with *Aegilops mutica* cytoplasm shows 420346 bp and 436349 bp master molecules. Gene shuffling and point mutations (SNPs) are reported between the genes of C13 and C14. Both molecules harbor 34 known protein-coding genes, 16 different tRNAs and three rRNAs. There are 157 and 165 ORFs (open reading frames) of more than 300 bp in C13 and C14, respectively. Both C13 and C14 mtDNA contains *orf260* situated upstream of *cox1*. The *orf260* sequences have high similarity between C13 and C14 except for a single non-synonymous mutation (an asterisk in Fig.). We performed northern blot analysis selecting some novel regions between these two genomes including mitochondrial genes of known function and ORFs. According to the results of northern blot analysis, *orf260* might be co-transcribed with *cox1*, however, the pattern between C13 and C14 is not the same. For future progress in checking the RNA expression between C13 and C14 should be of importance.

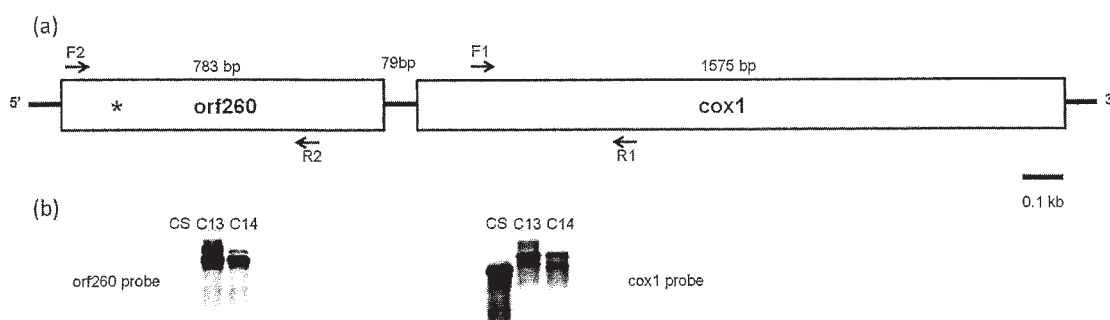


Fig. (a) A schematic representation of the gene *cox1* and *orf260* in C13 and C14. F1/R1 and F2/R2 indicate the position and direction of primer pairs used for the labeling of gene probes. An asterisk in *orf260* box indicates the position for single non-synonymous mutation between C13 and C14. (b) Northern blot analysis with the *cox1* and *orf260* gene probes.

P110 細胞質置換雄性不稔ナスに対する稔性回復遺伝子の STS マーカー

☆吉見 麻衣子¹・牟田部 天平¹・一色 司郎²・齊藤 猛雄³・山岸 博¹ (1.京産大総合生命科学, 2.佐賀大農, 3.農研機構野菜茶研)

STS markers of pollen fertility restoration genes for male sterile alloplasmic lines of eggplant

☆Yoshimi, M.¹, T. Mutabe¹, S. Isshiki², T. Saito³, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Agric., Saga U., 3.Natl. Inst. Veg. Tea Sci.)

現在、多くの作物でF₁育種に細胞質雄性不稔とそれに対する稔性回復遺伝子が利用されている。ナスにおいても効率的かつ確実なF₁採種を目指し、これまでに栽培ナスに近縁野生種の細胞質を導入した細胞質置換雄性不稔ナスが複数系統育成されている。これらは葯裂開不全型と花粉形成不全型の2型に區別され、後者の型では異なる野生種の細胞質に共通して発現するミトコンドリアの *orf* が存在すること、および細胞質提供親の核に由来する稔性回復遺伝子が存在することが明らかとなっている。

ナスにおける稔性回復遺伝子は、細胞質置換に用いた種により数が異なることが報告されている。‘耐病VF’を用いた後代では単一の優性遺伝子が稔性回復に関与することが認められているが、その一方 *Solanum aethiopicum*, *S. anguivi* を用いた場合には、それぞれ2つの稔性回復遺伝子の存在が観察されている。本研究では、これらの稔性回復遺伝子を単離することを目的としている。今回はこれまでに発見されたDNAマーカーを基にSTSマーカーを作製したのでこれを報告する。

上記3種の細胞質を持つナスの花粉稔性分離集団の全DNAを鋳型としてRAPD-PCRを

行い、可稔個体で特異的に増幅するDNA断片を見出した。得られたDNA断片をそれぞれクローニングし、塩基配列を決定した。決定した塩基配列に基づいてプライマーを設計し、STS化を行った。

その結果得られたSTSマーカーは、一部組換えを生じている個体があるものの、ほとんどの可稔個体で特異的なDNA断片を増幅させた(図)。また、作出されたマーカーは、3種に共通するもの、*S. aethiopicum* または *S. anguivi* の細胞質を持つ可稔個体に特異的なものの3タイプに分類することができた。前者は花粉形成不全型の細胞質提供親に共通する稔性回復遺伝子のマーカー、後者は2種の野生種それぞれが持つ第2の稔性回復遺伝子のマーカーであると考えられる。

現在さらに多くのRAPDマーカーを検索すると共に、それらのSTS化を進めている。その上で得られたDNAマーカーを用いて稔性回復遺伝子を単離することにより、ナスにおける稔性回復機能の詳細を明らかにしたい。なお、本研究は生研センター基礎的研究推進事業によって実施した。



花粉稔性分離集団における稔性回復遺伝子とSTSマーカーの連鎖

M: 分子量マーカー(φx174/*Hae* III)
V: ‘耐病VF’
A: 栽培ナス

P028 ハマ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 (*ppr-B*) の分子集団遺伝学的解析

☆富岡 関子¹・安本 景太¹・平出 美穂子²・高橋 亮¹・山岸 博¹・寺地 徹¹ (1.京産大総合生命科学, 2.郡山女子大)

Molecular population genetic study on the fertility restoration gene *ppr-B* for Ogura male-sterility from Japanese wild radish

☆Tomioka, E.¹, K. Yasumoto¹, M. Hiraide², R. Takahashi¹, H. Yamagishi¹, T. Terachi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Koriyama Woman's U.)

【背景および目的】日本各地の海岸部に自生するハマダイコンや、東北地方の山間部に自生するノダイコン（弘法ダイコンや奥会津のアザキダイコン等）には、高い頻度でオグラ型雄性不稔細胞質が存在する。また、オグラ型雄性不稔に対する複数の稔性回復遺伝子がゲノム中存在することも確認されている。これまでにクローニングされた唯一の稔性回復遺伝子は、PPR タンパク質をコードすることから *ppr-B* と呼ばれている。PPR タンパク質とは、35 個のアミノ酸からなるモチーフ配列の繰り返し構造を持つタンパク質で、高等植物のゲノム中において巨大な遺伝子ファミリーを形成している。機能解析も進められ、個々の PPR タンパク質が、RNA の編集や成熟に関与する独自の機能を担うことが明らかにされつつある。このうち、*ppr-B* は、オグラ型雄性不稔の原因遺伝子 *orf138* の発現を翻訳レベルで抑制し、花粉稔性を回復させることが知られている。*ppr-B* 遺伝子は様々なダイコンに広く存在するが、稔性回復の機能を持つ対立遺伝子は、中国ダイコン、ハマダイコン、及びハツカダイコンの一部にしか確認されていない。そこで、DNA 多型解析の規模

を拡大し、*ppr-B* 領域に維持される変異の全容解明を試みた。

【材料および方法】日本各地に自生するハマダイコン及びアザキダイコンの採集調査を行い、7 地域約 30 個体から *ppr-B* のコード領域を含む全長約 3.2kb の DNA 断片をクローニングした。コントロールとして栽培品種の MS 源助、打木源助、Comet を使用し、得られた DNA 配列データから種内変異の量やパターンを推定した。更に、連鎖領域に座乗するパラログ遺伝子群 (*ppr-A*, *ppr-C*, *ppr-1*, 及び *ppr-2* 等) との比較解析を行った。

【結果および考察】各地域集団間の遺伝的な分化は認められず、中立性からの大きな逸脱も検出されなかった。領域全体の塩基多様度 (~0.1%) は平均的な植物集団と比べて多少低いものの、コード領域の一部に変異量の増大が認められ、染色体の不等交叉に伴う非相同配列間の遺伝子変換が、*ppr-B* 領域の変異パターンに局所的な影響を及ぼしている可能性が示唆された。このことは、パラログ間の比較解析からも窺われ、非相同配列間の遺伝子変換によって配列の多様性が増大する機構の存在が示唆された。

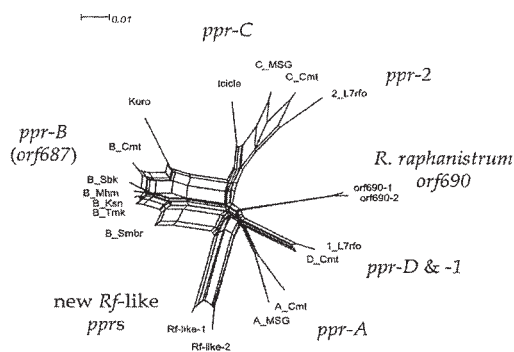


Figure. Phylogenetic network representing the sequence similarity between *ppr-B* and its paralogues. Loops suggest the incidence of recombination.

316 活性酸素消去の異なる酵素遺伝子を持つタバコ葉緑体形質転換体の比較

☆辻村 朋彦¹・大矢 悠貴²・山本 裕範²・寺地 徹² (1.京産大院工, 2.京産大総合生命科学)

Comparative studies on the transplastomic tobacco plants containing different genes encoding ROS scavenging enzymes

☆Tsujiyura, T.¹, Y. Ohya², H. Yamamoto², T. Terachi² (1.Grad.Sch.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U., 2.Fac.Life Sci.,Kyoto Sangyo U.)

強光や低温などの様々なストレスを受けると、植物の細胞内には強い酸化作用を持った活性酸素分子種 (ROS) が発生する。ROS は光合成の阻害、細胞の損傷などを引き起こし、結果的に植物の生長を妨げる。しかし、植物は葉緑体の中に、この ROS を段階的に無害な水へと変換するアスコルビン酸グルタチオンサイクルとよばれる活性酸素消去系の代謝経路を持っている (図 1)。我々はストレス耐性植物の作出を目的に、この代謝経路の酵素遺伝子を単独あるいはオペロンとして葉緑体ゲノムに導入した組換えタバコを以下の方法により作出してきた。すなわち組換え体は、1) 野生型タバコの葉緑体 DNA の相同領域と *aadA* 遺伝子を持つ形質転換ベクターを構築し、2) タバコ由来のプロモーター (*PpsbA*) とターミネーター (*Trps16*) を付加した各遺伝子 (オペロン) をベクターに導入し (図 2)、3) ベクター DNA をパーティクルガンを用いてタバコの葉に打ち込むことで作出されている。これらの組換え体では、いずれも導入された遺伝子が強発現しており、強光や除草剤 (メチルビオロゲン) に対する耐性が上昇することが確認されていた。しかし、活性酸素消去

系の酵素遺伝子を単独で導入した組換え体や複数の遺伝子をオペロンとして導入した組換え体間で、ストレス耐性の強さを比較することは十分に行えていなかった。そこで今回、これまで作出した組換え体の中から異なる 8 種類を選び、自殖を進めて系統化し、組換え系統間でストレス耐性にどのような違いがあるか比較した。

材料には、コントロールとして組換え体のもとになった野生型タバコ (品種 SR1)、および *apx*, *mdar*, *gr*, *dhar* の各遺伝子、*apx-sod*, *apx-sod-mdar*, *apx-sod-mdar-gr*, *mdar-dhar* の各オペロンをそれぞれ葉緑体ゲノムに持つ 8 系統を用いた。

各系統の T2 世代の種子を播種し、次世代に導入遺伝子が伝達されているかを確認するため、導入遺伝子のコード領域内に設計したプライマーペアを用いて PCR 解析を行った結果、8 系統すべてに導入遺伝子の存在が示された。現在これらの系統の複数個体を育成中であり、講演では、これら異なる 8 系統の間で、メチルビオロゲンや強光処理など各種ストレス耐性に差がみられるか比較した結果を報告する。

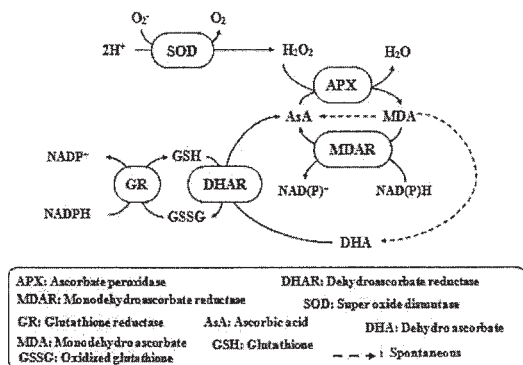


図1.アスコルビン酸グルタチオンサイクル

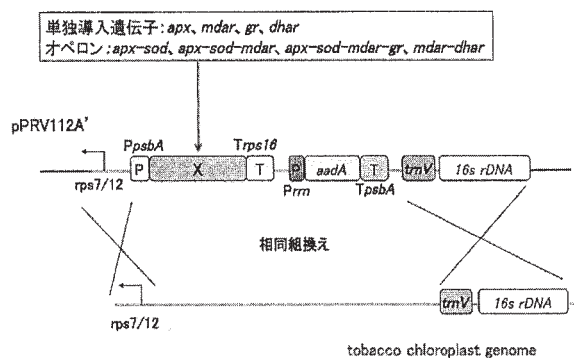


図2.導入プラスミドコンストラクト

706 次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 2: 正常型とオグラ型ゲノムの比較

☆田中 義行¹・津田 瑞江²・安本 景太²・山岸 博¹・寺地 徹¹ (1.京産大総合生命科学, 2.京産大工)

A sequence analysis of mitochondrial genome of radish (*Raphanus sativus*) using next-generation sequencer 2: Comparison of Normal and Ogura-type genomes

☆Tanaka, Y.¹, M. Tsuda², K. Yasumoto², H. Yamagishi¹, T. Terachi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

【背景および目的】オグラ型細胞質をもつダイコン (*Raphanus sativus*) のミトコンドリアゲノム (mtDNA) には、細胞質雄性不稔の原因遺伝子 *orf138* が存在する。植物 mtDNA は進化の過程で組換えを繰り返し、新規 ORF を獲得していることが知られており、*orf138* もその過程で生じたと推察されるが、その詳細は不明である。そこで我々は正常型 mtDNA とオグラ型 mtDNA の構造を比較することで、*orf138* の由来を明らかにしようとしている。前回の講演会では、正常型 mtDNA の全塩基配列を決定した。本発表では、オグラ型 mtDNA の全塩基配列を決定し、正常型 mtDNA との比較解析を行った。

【材料および方法】オグラ型 mtDNA をもつダイコン ‘MS 源助’ の葉から塩化セシウム密度勾配遠心分離法を用いてミトコンドリア DNA を単離し、次世代シーケンサー (ロッシュ GS FLX system) を用いて塩基配列を決定した。

【結果および考察】正常型 mtDNA が全長 244,037bp であったのに対して、オグラ型 mtDNA は全長 258,426bp であった。Blast 解析の結果、ダイコンの mtDNA は 11 個のシン

テニー領域で構成されており、オグラ型と正常型で大規模な再編成が起こっていた。少なくとも 6 回の組換えがシンテニー領域末端に位置する反復配列を介して起こったことが推察された。*orf138* は、正常型には存在しないオグラ型特異的領域内 (*orf138* 領域; 15,255bp) に位置していた。*orf138* 領域の両側末端には 28bp の逆向き反復配列が存在しており、その配列はシンテニー領域 7 と 11 間の組換えに関わる反復配列とつながっていた。このことから、*orf138* 領域はシンテニー領域 7 と 11 が組換わる際に、ダイコン mtDNA に組み込まれたと考えられた。続いて、*orf138* 領域がどのような配列に由来するのかを明らかにするために、Blast 解析を行った。*orf138* 領域の 80% が *Arabidopsis thaliana* や *Brassica napus* のミトコンドリアゲノムの相同配列から構成されており、相同配列は領域全体に散在していた (Figure 1)。残りの *orf138* 領域に関して核や葉緑体に由来する DNA の挿入は認められなかった。このことから *orf138* 領域は、アブラナ科植物の進化の過程で mtDNA 配列の組換えによって生じたものであり、*orf138* もその組換えの過程で生じた配列であると考えられた。

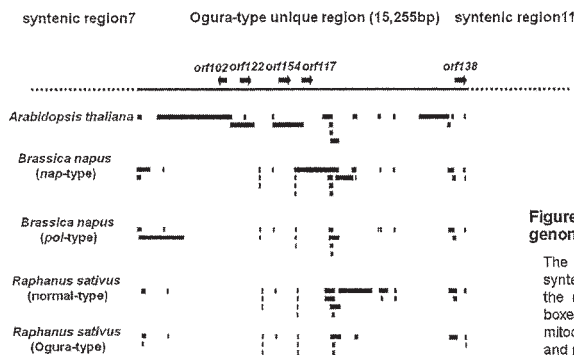


Figure 1. The homologous sequences to Brassicaceae mitochondrial genome are scattered throughout Ogura-unique region

The black line indicates the Ogura-type unique region (15,255bp) between syntenic region 7 and 11 in Ogura-type genome. *orf138* is located in the edge of the region. Blast analysis was performed to assign the unique region. Black boxes indicate the homologous sequences to radish and other Brassicaceae mitochondrial genomes, including *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* (nap-type and pol-type).

707 黒ダイコンで発見された稔性回復遺伝子の *orf138* に対する作用

☆森 悠太¹・安本 景太²・張 麗³・山岸 博¹ (1.京産大院工, 2.京産大工, 3.国家蔬菜工程技術研究中心)

Function of a pollen fertility restorer gene found in a black radish variety on the mitochondrial *orf138*

☆Mori, Y.¹, K. Yasumoto², L. Zang³, H. Yamagishi¹ (1. Grad. Sch. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 3. Nat. Eng. Res. Center for Veg.)

【背景および目的】細胞質雄性不稔 (CMS) はミトコンドリアに存在する特定の遺伝子が原因で雄性器官に異常を生じる現象である。核に稔性回復遺伝子 (*Rf*) が存在する場合、その働きは抑えられ稔性を回復する。ダイコン (*Raphanus sativus*) のオグラ型細胞質雄性不稔 (OguraCMS) はミトコンドリアに存在する *orf138* によって引き起こされるが、これに対する *Rf* 遺伝子の *orf687* が単離されている (Koizuka et al.2003)。一方、我々は前大会で OguraCMS に対する新たな *Rf* 候補遺伝子 (*Rfn* とする) を黒ダイコン (*Raphanus sativus*) から単離したことを報告した。この *Rfn* は 690 個のアミノ酸をコードする *ppr* 遺伝子で、*orf687* と高い相同性を示した。今大会では新規 *Rfn* の分離集団を用いて *Rfn* の分離と稔性の分離が完全に一致することを確認した上で、*Rfn* と *orf138* の関係をノーザン解析およびウエスタン解析により調査した結果を報告する。

【材料および方法】*orf138* を持ち不稔のダイコンを種子親にして、*Rfn* をヘテロに持つ黒

ダイコンと交配した。その交配で得られた分離集団を用いて、花粉稔性と *Rfn* の対応を確認した。*Rfn* については PCR によって有無を確認し、花粉稔性は葯を観察することによって決定した。また、*orf138* の発現に対する *Rfn* の影響を確認するため、*orf138* をプローブとしたノーザン解析および抗 ORF138 抗体を用いたウエスタン解析を上記の分離集団について行った。

【結果および考察】分離集団は可稔 46 個体、不稔 46 個体に分離し、*Rfn* の有無は稔性の分離と完全に一致した。これは *Rfn* が *orf138* に対する *Rf* である可能性を示す。また *orf138* プローブを用いたノーザン解析では、*Rfn* を持つ、持たないに関わらず、全ての個体で *orf138* の転写が確認された。これに対して抗 ORF138 抗体を用いたウエスタン解析では *Rfn* を持たない個体でシグナルが検出された一方で、*Rfn* を持つ個体ではシグナルが検出されなかった (図)。このことから新規 *Rfn* は *orf138* の翻訳阻害に関与していることが示唆された。

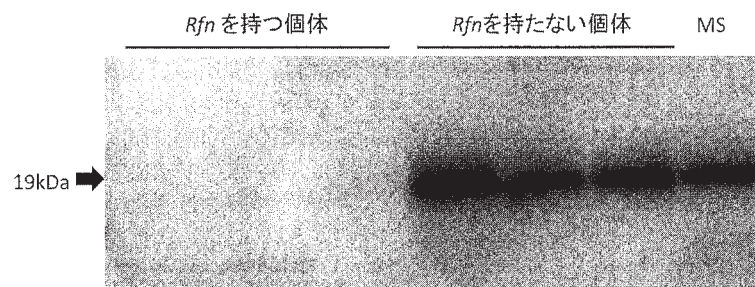


図 抗ORF138抗体を用いたウエスタン解析
*Rfn*の分離集団についてCMS原因遺伝子*orf138*のタンパク質を検出した。
MS:黒ダイコンとの交配に用いた不稔ダイコン

711 Comparative study on the mitochondrial genomes of alloplasmic wheat lines with *Aegilops mutica* cytoplasm

☆Gyawali, Y.P., Y. Tanaka, M. Tsujimura, T. Terachi (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

Plant mitochondrial genomes are large and complex and they undergo frequent genome rearrangements. The cross between common wheat, *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring ($2n=6x=42$, genome formula AABBDD) as a male parent and *Aegilops mutica* ($2n=2x=14$, genome formula TT) as a female parent produces F1 hybrid containing both wheat and *Aegilops* nuclear genome. Simultaneous backcrosses of the F1 hybrid taking pollen from common wheat fully stabilize the nuclear genome of common wheat in *Ae. mutica* cytoplasm, the alloplasmic wheat line (Tsunewaki 1994). In a series of studies, two alloplasmic lines of common wheat with a different *Ae. mutica* cytoplasm have been produced (Tsunewaki 1994). One alloplasmic line (C13) with T-type cytoplasm of *Ae. mutica* exhibits delay of heading about two weeks, and the another line (C14) with T2-type cytoplasm of *Ae. mutica* shows male-sterility. In order to

identify the gene(s) responsible for the phenotype of each alloplasmic lines, we sequenced the mitochondrial genomes of both C13 and C14 with 454 high throughput next-generation sequencing technology (Hokkaido System Science). To achieve the goal, work is under progress to assemble and close the gaps between contigs and make master circles (MC) for the mitochondrial genomes from both T- and T2-type cytoplasm of *Ae. mutica*. In the present investigation, we annotate all the gene sequences found in wheat mitochondria and will discuss the sequence variation between wheat and *Ae. mutica*. Our analysis revealed the absence of *rpl5* in *Ae. mutica*. Also at 5' end of *atp6*, a 377 bp sequences was varied in C13 and C14, being compared with wheat. The sequence variation might effect in mitochondrial function of respiratory chain reactions during ATP synthesis.

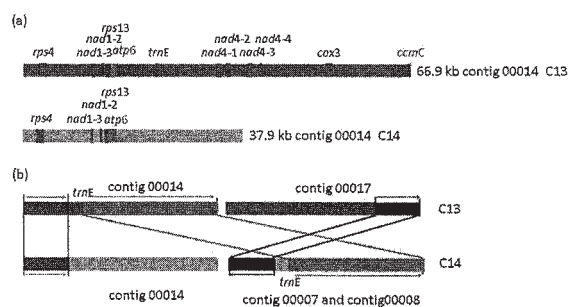


Fig. [a] Position of genes/ exons in C13 and C14 contigs and (b) one of the re-arrangements of sequences in C13 and C14 contigs.

712 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種におけるミトコンドリアゲノムの解析

☆津田 瑞江¹・田中 義行²・安本 景太³・寺地 徹¹・山岸 博¹ (1.京産大院工, 2.京産大総合生命科学, 3.京産大工)

Analysis of mitochondrial genome of somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage(*Brassica oleracea*)

☆Tsuda, M.¹, Y. Tanaka², K. Yasumoto³, T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Gra. Sch. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Fac.Life Sci.,Kyoto Sangyo U., 3.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

キャベツ (2n=18) は世界的に重要な野菜であり、日本でも周年栽培されている。我国のキャベツでは、F₁ 育種が採用されているが、この育種方法を効率的かつ計画的に行う上で、雄性不稔細胞質は非常に有用である。現在キャベツにおいては特定の雄性不稔細胞質に頼って F₁ 採種が行われており、遺伝的脆弱性の問題から新しい細胞質雄性不稔の素材の開発が求められている。

我々の研究室では、シロイヌナズナ 'コロンビア' (2n=10) とキャベツ品種 '富士早生' および '中生サクセッション' を材料に体細胞雑種の作出に成功している。そして、そのいずれの雑種も雄性不稔を示した。'富士早生' を用いた雑種は、雄ずいが奇形であり、'中生サクセッション' を用いた雑種では、花器自体に異常はないものの、花粉形成が不完全であった。得られた体細胞雑種は PCR によって解析が行われ、葉緑体はキャベツ、ミトコンドリアと核はシロイヌナズナとキャベツのものを保持していることがわかっている。本研究では、戻し交雑により後代が得られているシロイヌナズナとキャベツ品種 '中生サクセッション' との体細胞雑種におけるミト

コンドリアゲノムの解析を行い、雄性不稔性との関係を調べた。

まず、塩化セシウム密度勾配遠心法により、ミトコンドリア DNA の単離を行い、次世代シーケンサー (Roche GS FLX system) により解析を行った。得られた解析結果を用いて、すでに決定されているシロイヌナズナのミトコンドリアゲノムならびに我々の研究室で決定したキャベツのミトコンドリアゲノムとの比較を行った。その結果、体細胞雑種はキャベツのミトコンドリアゲノム全長のほぼ 100% を保有し、さらにシロイヌナズナのミトコンドリアゲノムの約 43% を保有していることが明らかになった。また、ミトコンドリア遺伝子のサザン解析を行った結果、体細胞雑種では *atp1, atp6, atp9, nad4* においてキャベツとシロイヌナズナ両方の遺伝子が存在することがわかった。この体細胞雑種に 'カイラン' を 2 回連続交雑して得られた後代は、葯の発達が不十分で、完全な雄性不稔性を示した (図)。これら雄性不稔の後代を用いたサザン解析の結果もあわせて報告する。本研究は生研センター基礎研究推進事業により実施された。

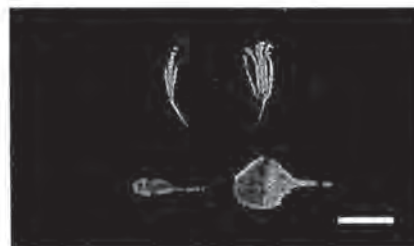


図 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種の後代における雄性不稔性
左:シロイヌナズナと'中生サクセッション'の体細胞雑種の後代
右:カイラン
Bar=1cm

P074 ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 *Rft* のマッピング

☆安本 景太¹・寺地 徹²・山岸 博² (1.京都産大工, 2.京都産大総合生命科学)

Mapping of a fertility restorer gene *Rft* for Ogura cytoplasmic male sterility in radish

☆Yasumoto, K.¹, T. Terachi², H. Yamagishi² (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

【目的】ダイコンにはオグラ型細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 *Rft* が存在する。*Rft* は雄性不稔遺伝子であるミトコンドリア *orf138* の mRNA の 5' 側のプロセシングに関与する優性一遺伝子であり、すでに同定されている稔性回復遺伝子 *orf687* (Koizuka et al. 2003) とは異なる分子機構で稔性を回復させる。これまでに我々は、マップベース法により *Rft* をクローニングするため、ハマダイコン由来の *Rft* が分離する F₂ 集団 93 個体において組換えを生じない、4つの STS マーカーを作成した。今回は、この F₂ 集団の後代を用い、新たな DNA マーカーの検索とマッピングを試みた。

【材料および方法】材料には、オグラ型雄性不稔のダイコン 'MS 源助' と F₂ 集団の 1 個体との交雑による F₂BC₁ 集団 329 個体を用いた。花粉稔性の分離と上記 STS マーカーとの相関を調べたうえで、可稔と不稔個体のパルク DNA を調製し、RAPD 法によってマーカーを検出した。RAPD-PCR は、10 または 12 塩基のランダムプライマーを使用した。得られたマーカー断片は STS 化して、Mapmaker により連鎖

解析を行った。

【結果および考察】F₂BC₁ 集団における花粉稔性は、可稔が 175 個体、不稔が 154 個体に分離し、期待される 1:1 の分離比に適合した ($\chi^2=1.34, p > 0.05$)。合計 2,350 反応の RAPD-PCR を行ったところ、5つのマーカーが新たに得られ、*Rft* は 0.9 cM の領域内に設定された (図)。これらのマーカーの塩基配列について BLAST 検索を行ったところ、3つのマーカー (A1141, A0258, A0158) は、シロイヌナズナのゲノム中で約 30 kb の領域内に、それぞれ相同性が認められた。一方、*Rft* との組換えを生じなかった K17LF2R1 マーカー、および *Rft* から 0.6 cM の位置にマップされた STSK17 マーカーは、最近、シロイヌナズナで同定されたミトコンドリア mRNA の 5' プロセシングに関与する *ppr* 遺伝子と似た配列の一部を有しており、*Rft* もこのような *ppr* 遺伝子であることが推察された。今後、シロイヌナズナゲノムとのシntenニーを利用し、連鎖地図を充実させるとともに、ゲノムライブラリーのスクリーニングを行う予定である。

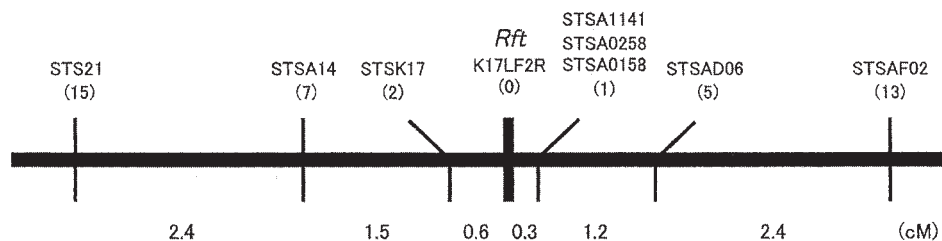


図. F₂BC₁ 集団における *Rft* 遺伝子座の連鎖地図。
カッコ内の数字は組換え個体の数を示す。

405 γ -グルタミルシステイン合成酵素遺伝子 (GSH1) を葉緑体ゲノムに持つタバコ形質転換体の作出

須頭 知世¹・○植村 香織²・西塚 順子¹・寺地 徹² (1.京産大工, 2.京産大総合生命科学)

Production of transplastomic tobacco plants containing a gene encoding γ -glutamylcysteine synthetase (GSH1) in the chloroplast

Sugashira, T.¹, ○K. Uemura², J. Nishizuka¹, T. Terachi² (1.Fac.Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Fac.Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

真核生物の多くが有するグルタチオンは、グルタミン酸の γ -カルボキシル基にシステインの α -アミノ基が結合し、そこへグリシンが結合したトリペプチドで、細胞内の酸化還元バランスの維持や重金属の無毒化など、細胞内環境の維持において主要な役割を担う。このタンパク質は、 γ -グルタミルシステイン合成酵素とグルタチオン合成酵素の2つの連続する反応によって段階的に合成される。高等植物において、最初の合成反応は葉緑体内で起こり、次の反応は主に細胞質で起こる。今回我々は、ダイコンから単離した γ -グルタミルシステイン合成酵素をコードする遺伝子 *gsh1* をタバコ葉緑体に導入し、強発現させることによって、細胞内グルタチオン濃度を上昇させ、ストレスや重金属に耐性を持つ植物を育成することを試みたので報告する。

本実験ではまず、ダイコン (*Raphanus sativus* cv. Comet) の葉から得た *gsh1*cDNA コード領域全長を、葉緑体で機能するプロモーター (*PpsbA*) およびターミネーター (*Trps16*) を含む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。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ち込み、スペクチノマイシンによる選抜を行い、耐性を

示した3個体の組換え体 (C、D および O) を得た (図1)。

PCR およびサザン解析により葉緑体への *gsh1* 導入を確認したところ、C および D ではヘテロプラスミック、O ではホモプラスミックな状態にあることが分かった。これら T₀ 個体の自殖種子 (T₁) を、スペクチノマイシンを含む培地へ播種したところ、すべてスペクチノマイシン耐性を示した。さらに C 系統の T₁ を9個体、D および O 系統の T₁ それぞれ10個体を閉鎖系温室で育成し、サザン解析で導入遺伝子の遺伝を調べたところ、すべての個体に *gsh1* の存在が確認された。また、先行して解析を行った C 系統の T₁ 個体については、ノーザン解析によって導入遺伝子の転写も確認することができた。

C 系統の T₁ 個体の総グルタチオン量を測定したところ、野生型に比べて最大で約6倍増加していることが分かった。また、この個体と野生型の葉を用いてメチルピオロゲン処理を行ったところ、野生型は0.4 μ M濃度でクロロフィルがほとんど消失したが、組み換え体では半分程度の減少にとどまった (図2)。今後、重金属への耐性なども比較検討する予定である。



図1. 導入 *gsh1* 特異的なPrimerを用いたPCR

M : Marker (ϕ x/HaeIII)
1-4 : *gsh1*_C T₁
5-8 : *gsh1*_D T₁
9-12 : *gsh1*_O T₁
13 : 野生型タバコ
N : Negative control (dH₂O)

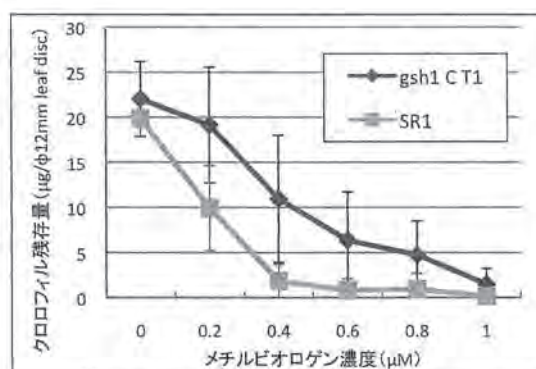


図2. MV処理後のクロロフィル残存量

406 異なる活性酸素消去系酵素の遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの比較

☆山本 裕範¹・辻村 朋彦²・林 清音¹・森田 重人³・寺地 徹⁴ (1.京産大院工, 2.京産大工, 3.京府大院生命環境, 4.京産大総合生命科学)

Comparison among transplastomic tobacco plants with different genes encoding ROS scavenging enzymes

☆Yamamoto, H.¹, T. Tsujimura², S. Hayashi¹, S. Morita³, T. Terachi⁴ (1.Grad. Sch. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U., 3.Grad.Sch.Life and Envi.,Kyoto Pref U., 4.Fac.Life Sci.,Kyoto Sangyo U.)

植物の葉緑体には、アスコルビン酸グルタチオンサイクルとよばれる代謝経路が存在する。植物へのストレスにより発生した有害なROSは、この経路で段階的に無害な水へと変換される。我々はこれまで、ストレス耐性植物の作出を目的に、代謝経路の酵素遺伝子を単独あるいはオペロンとして葉緑体ゲノムに導入した組換えタバコを作出してきた。これらの組換え体では、いずれも導入された遺伝子が強発現しており、強光や除草剤（メチルピオロゲン）に対する耐性が上昇することは確認されたが、様々な組換え系統間で耐性の強さを比較することは十分に行えていなかった。そこで今回、これまで作出した組換え体の中から異なる4系統を選び、酵素遺伝子の種類や導入遺伝子の数で、ストレス耐性にどのような違いがあるか比較したので報告する。

材料には、野生型タバコ（品種SR1）、及び *apx*、*mdar*、*apx-sod*、*apx-sod-mdar* の各遺伝子（オペロン）をそれぞれ葉緑体ゲノムに導入した4系統（以後 *apx*: A、*mdar*: M、*apx-sod*: AS、*apx-sod-mdar*: ASM と表記する）を用いた。

系統間のストレス耐性比較では、メチルピオロゲン及び強光によるストレス処理実験を行った。メチルピオロゲン耐性では、1.0μMのメチルピオロゲン希釈溶液に浸したリーフディスクの観察と処理後のリーフディスクを用いた残存クロロフィル含量の測定を行った。その結果、*apx* を導入遺伝子中に含む A、AS、ASM 系統と、含まない M 系統との間でメチルピオロゲン耐性について違いがみられた。一方この実験では、オペロン化の効果は観察されなかった（図1）。

強光耐性は、葉から切り取ったリーフディスクを強光条件下（1500μmolm⁻²s⁻¹）に置き、一定時間ごとにFv/Fmの値を測定することで調べた。その結果、いずれの組換え体も野生型より高い値を維持しており、強光に対する耐性が上昇したのと思われる。また、3時間後の測定値の比較では、*mdar* を導入遺伝子に含む M、ASM 系統と、含まない A、AS 系統との間に違いがみられた。とりわけ ASM 系統はFv/Fm 値の減少率が最も少なく、この場合は導入遺伝子のオペロン化の有効性が示された（図2）。

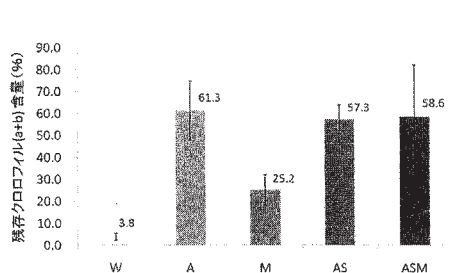


図1. メチルピオロゲン処理後の残存クロロフィル含量の測定

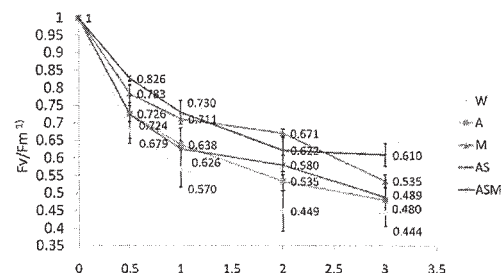


図2. 強光条件下におけるFv/Fmの変化
1) 処理開始時を1とした相対値で示す

A, M, AS, ASM: 組換え体 (A: *apx*, M: *mdar*, AS: *apx-sod*, ASM: *apx-sod-mdar* を葉緑体ゲノムに持つ組換え体)
W: 野生型 (SR1)

407 ベンサミアナタバコの葉緑体ゲノムへの *apx* 及び *gsh1* 遺伝子の導入

☆辻村 朋彦¹・植村 香織²・山本 裕範³・寺地 徹² (1.京産大工, 2.京産大総合生命科学, 3.京産大院工)

Integration of *apx* and *gsh1* genes into chloroplast genome of *Nicotiana benthamiana*

☆Tsujiyama, T.¹, K. Uemura², H. Yamamoto³, T. Terachi² (1.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U., 2.Fac.Life Sci.,Kyoto Sangyo U., 3.Grad.Sch.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

ベンサミアナタバコ (*N. benthamiana*) は、近年、ジーンサイレンシングを利用した核遺伝子の機能解析など、植物分子生物学の研究に不可欠な材料となっている。本研究は、このベンサミアナタバコを用いて、核と葉緑体の遺伝子間相互作用を解明する実験系の構築を目的とした。前回の本大会では、世界で2例目となるベンサミアナタバコの葉緑体形質転換に成功したことを報告した。この組換え体は、葉緑体の活性酸素消去系酵素の1つ、ascorbate peroxidase (APX) の遺伝子を、葉緑体ゲノムの IR 領域に持つ。今回、この個体の自殖後代 (T₁ 世代) を得て系統化するとともに、同じ遺伝子を葉緑体の同じ位置に持つ、別の組換え体 (T₀) を得た。また新たに、葉緑体のグルタチオン合成酵素の1つ、 γ -glutamylcysteine synthetase に関わる遺伝子 (*gsh1*) を葉緑体ゲノムに持つ組換え体を得たので、両実験の結果を合わせて報告する。*apx* 組換え体に関しては、まず、導入遺伝子が T₁ 世代に遺伝しているかを PCR 法により調査したところ、T₁ 個体で *apx* 及び選抜マーカーとして用いた *aadA* 両遺伝子の増幅が確認された。続いて行ったノーザン解析では、組換え体にも、*apx* 及び *aadA* 遺伝子の転写

産物が大量に蓄積していることが認められた (図1)。現在、親個体の場合と同様、T₁ 個体でも APX 活性の著しい上昇が観察できるか調べている。また、*gsh1* の組換え体は、以下の方法で作出した。まずベンサミアナタバコの葉緑体 DNA の相同領域と *aadA* 遺伝子を有する形質転換ベクターを構築し、続いてタバコ由来のプロモーター (*PpsbA*) とターミネーター (*Trps16*) を付加したダイコンの *gsh1* 遺伝子をベクターへ導入した (図2)。その後、このベクター DNA を、前回の本大会で報告した実験条件をふまえ、パーティクルガンを用いてベンサミアナタバコの葉に撃ち込んだ。その結果、18回ショットした結果、組換え体のシュートを1つ得ることができた。このシュートを3つに株分けし、そこから再分化させた T₀ 3 個体について、導入遺伝子の有無を PCR により調べたところ、すべてに *gsh1* 及び *aadA* 遺伝子の存在が示され、サザン解析では、両遺伝子が葉緑体ゲノムのターゲット領域に正しく組込まれていることが確認された。これら一連の実験により、まだ効率は低いものの、ベンサミアナタバコを用いた葉緑体の形質転換系を確立できたと考えている。

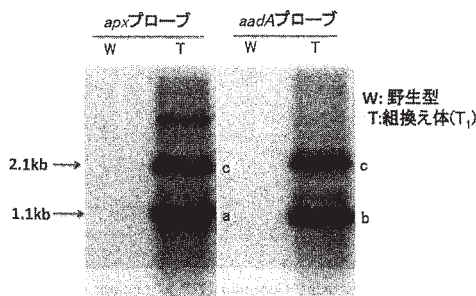


図1.ノーザン解析
a: *apx* 遺伝子の転写産物
b: *aadA* 遺伝子の転写産物
c: *apx* 及び *aadA* 遺伝子を含む転写産物

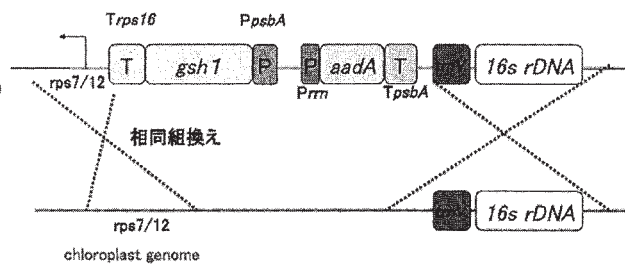


図2.導入プラスミドコンストラクト (*gsh1/aadA*)

514 CMSを示すナス細胞質置換系統における新規 orf の発現解析

☆吉見 麻衣子¹・齊藤 猛雄²・一色 司郎³・寺地 徹¹・山岸 博¹ (1.京産大総合生命科学, 2.農研機構野菜茶研, 3.佐賀大農)

Expression analysis of the mitochondrial novel orfs in alloplasmic CMS lines of eggplant

☆Yoshimi, M.¹, T. Saito², S. Isshiki³, T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Natl. Inst. Veg. Tea Sci., 3.Fac. Agric., Saga U.)

近年多くの作物で、F₁ 品種育成のため、細胞質雄性不稔 (CMS) が利用されている。ナス (*Solanum melongena*) においても、近縁野生種の細胞質を導入した複数の細胞質置換系統が育成され、これらの系統が CMS を示すことが見出されている。ナスの場合、CMS の表現型は、細胞質提供親として用いられる種によって異なり、葯裂開不全型と花粉形成不全型の2タイプに区別される。しかし、これらの CMS の分子メカニズムは未だ不明のままである。

本研究は、上述した異なる2タイプの表現型をもたらす CMS 原因遺伝子を、それぞれ特定することを目的とする。これまでの解析によって、ミトコンドリア *atp1* 上流に葯裂開不全型、花粉形成不全型および栽培ナスに固有の配列が存在することを明らかにした (第118回講演会)。今回は、各タイプに固有の新規 orf について、ノーザン解析を行った。また、それら orf にコードされるタンパク質の機能を探るため、orf を大腸菌内で発現させ、菌の生育への影響を調べたので、その結果を報告する。

実験に用いた材料を表1に示す。細胞質提供親とそれらの細胞質を持つ栽培ナスを用いた。これらの植物から全 RNA を調製し、新

規 orf のプローブを用いてノーザン解析を行ったところ、CMS 系統では野生種や稔性を回復した系統と比較して転写パターンに明確な差が見られた (データ未掲載)。

次に orf のひとつ、*orf218* の機能を探るため、*Saet/m* の *orf218* を in-frame で大腸菌の発現ベクター (pMAL-c2x) に組み込み、マルトース結合タンパク質と ORF218 の融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。また、このプラスミドコンストラクトをもとに、5' 側から配列を欠失させた3つのコンストラクト ($\Delta 126$, $\Delta 240$, $\Delta 396$)、3' 側から配列を欠失させたコンストラクト (84aa) を作製し、実験に用いた。それぞれのプラスミドを持つ大腸菌の形質転換プレートから、ランダムに32個のコロニーを選び少量の液体培地で培養した後、2枚の LB-A プレート (IPTG -/+) にスポットし培養したところ、*orf218* 全長がコードするタンパク質は、大腸菌に強い致死性を示すことがわかった (図1)。この結果は、他植物の CMS 原因遺伝子の特性と類似する。現在、これら ORF タンパク質のミトコンドリアにおける発現を調査中である。

なお、本研究は生研センター基礎的研究推進事業によって実施した。

表1. 供試系統

細胞質型	系統名	細胞質
葯裂開不全型	Svio (W), Svio/m (S)	<i>S.violaceum</i> (CMS)
	Svir (W), Svir/m (S)	<i>S.virginianum</i> (CMS)
	Skur (W), Skur/m (S)	<i>S.kurzii</i> (CMS)
花粉形成不全型	Saet(W), Saet/m(S)	<i>S.aethiopicum</i> (CMS)
	Saet/m-Rf (F)	
	SVF01/m(S)	
栽培ナス型	SVF24/m(S)	'耐病VF' (CMS)
	SVF26/m(S)	
	Ut(F)	
	AE01(F)	<i>S.melongena</i> (Normal)
	AE24(F)	
	AE26(F)	

W: 野生種, S: 不稔, F: 可稔 を示す



図1. *Saet/m orf218* 全長および $\Delta 240$ の大腸菌における発現

上段: *orf218* 全長#1/pMAL
下段: *orf218* $\Delta 240$ /pMAL * : コントロール (pMAL)

515 ナスにおける花粉稔性回復遺伝子の DNA マーカー

○山岸 博¹・牟田部 天平¹・田中 俊光¹・吉見 麻衣子¹・一色 司郎²・齊藤 猛雄³ (1.京産大総合生命科学部, 2.佐賀大農, 3.農研機構野菜茶研)

DNA markers for pollen fertility restoration genes in eggplant

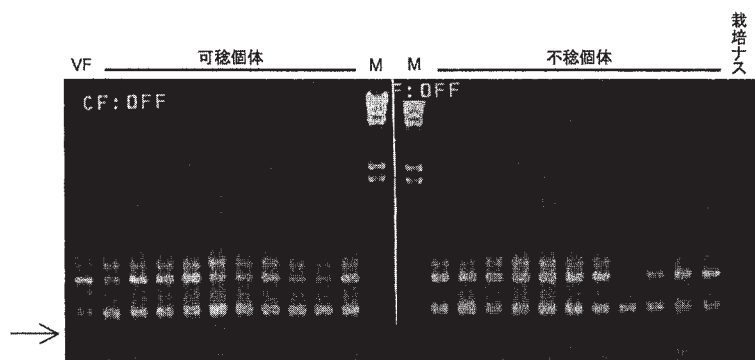
○Yamagishi, H.¹, T. Mutabe¹, T. Tanaka¹, M. Yoshimi¹, S. Isshiki², T. Saito³ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Agric., Saga U., 3.NIVTS)

ナスの F₁ 育種において細胞質雄性不稔を利用することは、確実な F₁ 採種と採種コストの削減をもたらすと期待されている。現在までに、栽培ナスと近縁野生種との種間交雑に基づく細胞質置換によって、数系統の雄性不稔性ナスが育成されている。それらは大きく「葯裂開不全型」と「花粉形成不全型」の 2 タイプに分けられており、そのうち後者のタイプにおいては、異なる細胞質に共通するミトコンドリアの *orf* が発現していることおよび、細胞質提供親の核に由来する稔性回復遺伝子が存在することが知られている。

この稔性回復遺伝子については、細胞質置換に用いた野生種によって異なる数が報告されている。すなわち、*Solanum aethiopicum*、*S. anguivi* を用いた場合には、単独で稔性を回復する 2 個の遺伝子の存在が観察された。その一方で、「耐病 VF」を細胞質親に用いた後代では優性の単一遺伝子によって稔性が回復することが認められている。そこで、これら稔性回復遺伝子の相互関係を明らかにしながら、最終的に稔性回復遺伝子を単離することを目的として、DNA マーカーを開発しようとした。

上記 3 種類の細胞質を持つナスの花粉稔性分離集団のそれぞれについて、可稔個体と不稔個体のバルク DNA を作成し、RAPD プライマーによる PCR を行った。PCR によって可稔個体のバルク DNA にのみ増幅断片が認められたプライマーについては、さらに可稔個体と不稔個体を 10 個体ずつ用いた PCR によって、稔性回復遺伝子と増幅断片との連鎖関係を調べた。

RAPD-PCR の結果、*S. aethiopicum*、*S. anguivi*、'耐病 VF' のすべての細胞質置換系統に共通して、可稔個体で特異的に増幅する DNA 断片が複数見出された (図)。これらの断片は、現在までに育成されている「花粉形成不全型」の細胞質置換系統に、共通して存在する稔性回復遺伝子のマーカーになり得ると考えられる。これに対して、*S. aethiopicum* または *S. anguivi* の細胞質を持つ可稔個体だけに特異的な DNA 断片も得られている。これらは、第 2 の稔性回復遺伝子の DNA マーカーとして期待される。現在、これら増幅断片の塩基配列を解析している。なお、本研究は生研センター基礎的研究推進事業によって実施した。



稔性分離集団における稔性回復遺伝子とRAPDマーカーの連鎖

516 シロイヌナズナとキャベツの細胞融合により雑種化した雄性不稔ミトコンドリアゲノムの解析

☆安本 景太・津田 瑞江・児島 慶子・山岸 博 (京都産大工学研究科)

Analysis of mitochondrial genome of male-sterile hybrid plants derived from cell fusion between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea* L.)

☆Yasumoto, K., M. Tsuda, K. Kojima, H. Yamagishi (Grad.Sch.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

作物のF₁種子生産に利用されている細胞質雄性不稔性 (CMS) は、核とオルガネラゲノムの相互作用によって発現することが知られている。CMSは、戻し交雑による細胞質置換や細胞融合などによっても誘起されることがあり、多くの場合はミトコンドリア遺伝子の何らかの異常に起因する。

我々は、キャベツなどの *Brassica* 属作物における雄性不稔の素材を開発する目的で、シロイヌナズナの 'コロンビア' とキャベツの '富士早生' との細胞融合から体細胞雑種を作成した (Yamagishi and Nakagawa 2004)。この体細胞雑種の花器は、雄ずいが雌ずい化するなど形態に異常がみられ、雄性不稔であった。また、このような表現型は、体細胞雑種のミトコンドリアゲノムの雑種化に起因することが推察された (山岸ら、2008)。本研究ではこの体細胞雑種における雄性不稔遺伝子を単離・同定するため、ミトコンドリアゲノムの構造と、これによる遺伝子発現への影響を明らかにしようとした。

【材料および方法】

得られた体細胞雑種を増殖、鉢上げされた個体を用いて、ミトコンドリアの8種類 (*atp1*, *atp6*, *atp8*, *atp9*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad4*) の遺伝子をプローブとするサザン解析を行った。また、これと並行して、複数個体の葉を混合して抽出したミトコンドリア DNA から、次世代シーケンサーで塩基配列情報を取得し、

これを雄性不稔候補遺伝子の検出に利用した。

【結果および考察】

サザン解析では、*atp1*, *atp9*, *cox2*, *cox3* 遺伝子をプローブとしたときに、体細胞雑種の個体間で共通して、両親の 'コロンビア' と '富士早生' には検出されない明瞭なバンドが観察された。このうちまず、体細胞雑種の *cox3* 周辺領域の塩基配列を調べた。その結果、*cox3* の近傍には *atp9* が存在することがわかり、サザン解析の結果と一致した。また、両遺伝子の間には *rps3*, *rpl16* の配列の一部を含む1つのキメラ *orf* が見出された。このゲノム配列は 'コロンビア' のミトコンドリアゲノム中で、低コピー数のサブリモン分子として維持されているものと一致することがわかった。シロイヌナズナではこの分子のコピー数は、葉の斑入りや不稔などの表現型を示すことのある *chm* (*chloroplast mutator*) 変異体で増加していることが知られている (Sakamoto et al. 1996, Abdelnoor et al. 2003)。そこでこのキメラ *orf* は体細胞雑種における雄性不稔遺伝子の候補の1つになる可能性が考えられた。現在、転写産物を調査中であるが、この *orf* は *cox3* と共転写されていることを確認している。

講演会では、その他の領域のミトコンドリアゲノム構造についての解析結果も述べたい。なお、本研究は生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業による支援を受けて実施した。

517 オグラ型雄性不稔に対する黒ダイコンの稔性回復遺伝子の解析

☆森 悠太¹・安本 景太¹・張 麗²・山岸 博¹ (1.京産大工, 2. 国家蔬菜工程技術研究中心)

Analysis of a pollen fertility restorer gene found in a variety of black radish

☆Mori, Y.¹, K. Yasumoto¹, L. Zang², H. Yamagishi¹ (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Nat. Eng. Res. Center for Veg.)

多くの植物で発見されている細胞質雄性不稔は、F₁ 育種を行う上で除雄など労働集約的作業を省き、かつ正確に雑種を得ることができる有用な形質である。ダイコンで発見されたオグラ型細胞質雄性不稔は、ダイコンだけでなく、ブロッコリー、キャベツ、ナタネなどアブラナ科植物のF₁ 育種において広く利用されている。この雄性不稔の原因遺伝子はミトコンドリアに存在する *orf138* であり、核に稔性回復遺伝子が存在する場合、その働きは抑えられ稔性が回復する。これまでに多くのダイコンで稔性回復遺伝子が調べられており、*orf138* の翻訳を阻害する *orf687* (Koizuka et al.2003) または、*orf138* の mRNA をプロセッシングすることで働きを抑える *Rfi* (Yasumoto et al.2009) の存在が明らかになっている。

一方で交配実験によって稔性回復遺伝子を持つことは確認されるが、その遺伝子が不明なダイコンも複数存在する。これらの稔性回復遺伝子を明らかにし、稔性回復遺伝子間の関係、稔性回復のメカニズムを研究することは、オグラ型細胞質雄性不稔を育種で安定的に利用するために重要である。

本研究では既知の稔性回復遺伝子を持たない‘クロダイコン’を用いて新しい稔性回復遺伝子の単離を試みた。‘クロダイコン’の稔性回復遺伝子を調べるため、オグラ型細胞質雄性不稔のダイコンと‘クロダイコン’を交配し、F₁ の6個体中2個体が稔性を回復することを確認した。この6個体のDNAを抽出し、既知の稔性回復遺伝子内またはその周辺領域に作成された複数のプライマーでPCRを行った。その結果、稔性を回復する2個体のみで増幅する断片を得たので、塩基配列を決定した。決定した塩基配列はN末端にミトコンドリア移行シグナルを持ち、16のPPRmotifをコードしていた。また、既知の稔性回復遺伝子 *orf687* と相同性は高いものの、全体を通して多くのアミノ酸置換が見られた。この配列が稔性回復遺伝子であるかどうかを確かめるため、さらにオグラ型細胞質雄性不稔のダイコンと上記の稔性を回復した1個体の間で交配を行い、120個体の分離集団を作成した。この配列の発現を確認した上で、現在稔性の分離とこの配列の対応を調査している(図)。



図 オグラ型細胞質雄性不稔ダイコンとクロダイコンの後代におけるPCR増幅の分離
MS:オグラ型細胞質雄性不稔ダイコン

525 次世代シーケンサーを用いたダイコンのミトコンドリアゲノムの配列解析 I. ナタネミトコンドリアゲノムとの比較

☆田中 義行¹・津田 瑞江²・安本 景太¹・山岸 博¹・寺地 徹¹ (1.京都産大総合生命科学, 2.京都産大工学研究科)

A sequence analysis of mitochondrial genome of radish (*Raphanus sativus*) using next-generation sequencer I. Comparison to rapeseed mitochondrial genome

☆Tanaka, Y.¹, M. Tsuda², K. Yasumoto¹, H. Yamagishi¹, T. Terachi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Grad. Sch. Eng., Kyoto Sangyo U.)

<背景および目的> オグラ型雄性不稔細胞質をもつダイコン (*Raphanus sativus*) のミトコンドリアゲノムには、細胞質雄性不稔の原因遺伝子 *orf138* が存在する。植物ミトコンドリアゲノムは進化の過程で組換えを繰り返し、新規 ORF を獲得していることが知られており、*orf138* もその過程で生じたと推察されるが、その詳細は不明である。そこで我々は正常型ダイコンミトコンドリアとオグラ型ダイコンミトコンドリアのゲノム配列を決定し、これらを比較することで *orf138* の由来を明らかにしようとしている。本発表では、次世代シーケンサーを用いて正常型ダイコンの全ミトコンドリアゲノム配列を決定し、報告されているナタネ (*Brassica napus*) のミトコンドリアゲノム配列との比較を行った。

<材料および方法> 正常型ミトコンドリアをもつダイコン ‘打木源助’ の葉から塩化セシウム密度勾配遠心分離法を用いてミトコンドリア DNA を単離し、次世代シーケンサー

(ロッシュ GS FLX system) を用いて塩基配列を決定した。ナタネのミトコンドリアゲノム (Genbank: AP006444.1) と遺伝子の構成について比較を行った。

<結果および考察> 決定したダイコンミトコンドリアゲノム配列の約 87% がナタネミトコンドリアと高い相同性のある配列で構成されていた。ダイコンとナタネ間で tRNA 遺伝子を含めた遺伝子の構成はよく保存されており、各エキソンの塩基配列はナタネミトコンドリアと 99% 以上の相同性があった (表 1)。しかし、ナタネミトコンドリアゲノムの反復配列に存在する *cox2-2* はダイコンミトコンドリアゲノム中では認められなかった。*orf138* 相同配列を今回決定した正常型ダイコンのミトコンドリアゲノム中で探索したが、相同配列は認められなかった。今後はオグラ型ダイコンのミトコンドリアゲノムを決定し、正常型ミトコンドリアゲノムとゲノム構造の比較を行いたい。

Table1. Protein-coding and ribosomal RNA gene content of mitochondrial genome of radish compared to rapeseed

Genes		Radish	Rapeseed
Complex I	<i>nad1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6, 7, 9</i>	+	+
Complex III	<i>cob</i>	+	+
Complex IV	<i>cox1, 2-1, 3</i>	+	+
	<i>cox2-2</i>	-	+
Complex V	<i>atp1, 4, 6, 8, 9</i>	+	+
Cytochrome-c-biogenesis	<i>ccmB, ccmC, ccmFC, ccmFN</i>	+	+
Ribosomal proteins	<i>rpl2, rpl5, rpl16,</i>	+	+
	<i>rps3, rps4, rps7, rps12, rps14</i>		
Ribosomal RNAs	<i>rrn5, rrn18, rrn26</i>	+	+

+ : present, - : absent

708 倍数性コムギのミトコンドリアゲノムに見られる構造変異とその分布

☆辻村 真衣¹・森 直樹²・寺地 徹¹ (1.京都産大総合生命科学, 2.神戸大院農学)

A structural variation in the mitochondrial genome of polyploid wheats and its distribution

☆Tsujiyama, M.¹, N. Mori², T. Terachi¹ (1.Fac. Life. Sci., Kyoto Sangyo U., 2. Grad. Sch. Arg., Kobe U.)

コムギ属とそれに近縁な野生のエギロプス属植物は、交雑と倍数化を繰り返して進化してきた植物群である。これら各種の系統関係は古典的なゲノム分析等で、すでに明らかとなっており、細胞質ゲノムの遺伝的な分化についても体系的な情報が得られている。その中で近年、パンコムギ (*Triticum aestivum*) のミトコンドリア (mt) ゲノムの全塩基配列が Chinese Spring (CS) と Chinese Yumai の 2 品種について決定された。その結果、両品種の mt ゲノムの全塩基配列はほぼ一致し、両ゲノム間に大きな構造変異は無いことが示されている。一方、以前の制限酵素分析では、B ゲノムを持つ倍数性コムギの mtDNA に、*T. dicoccum* や *T. aestivum* が持つ VIIa 型と、*T. dicoccoides* や *T. spelta* が持つ VIIb 型が見出されている。この 2 タイプは、VIIb 型に特異的な、約 11kbp の *Hind*III 断片 (H3 断片) で明瞭に区別される。我々は前回、H3 断片の塩基配列を決定し、これが CS には無い配列を含む全長 11,246bp の断片であること、この断片と相同な配列がパンコムギの核ゲノムに転移していることを示した。今回、この構造変異と倍数性コムギの系統進化の関係を探るため、

H3 断片に隣接する mt ゲノム領域の塩基配列 (~ 5kbp) を決定し、核に転移した相同配列と mt 由来の配列を区別可能なプライマーを設計した。また VIIa 型に特異的なプライマーも作製し、全 DNA を鋳型とする PCR で、VIIa 型と VIIb 型の分布を調査可能な実験系を構築した。

トルコ、スペインなどから採集された栽培 4 倍性コムギ 13 系統、トルコ、イランなどの野生 4 倍性コムギ 18 系統を用いた PCR では、6 系統が VIIa 型に特異的な DNA 断片のみを増幅し、6 系統が VIIb 型の DNA 断片のみを増幅した。しかしその分布は、栽培か野生か、採集地域、葉緑体 SSR による Plastotype と相関はなかった。一方予想に反し、両方の DNA 断片が増幅するものが多数 (18 系統) 見つかり、VIIa 型特異的断片も、核ゲノムへ転移していることが疑われた。普通系コムギでは、12 系統中 3 系統に VIIb 型断片が見出された。今回の実験で、VIIa 型と VIIb 型を区別する mt ゲノムの構造変異は 4 倍性コムギですでに生じていることがわかったが、その系統進化研究への有効性はさらに検証する必要がある。

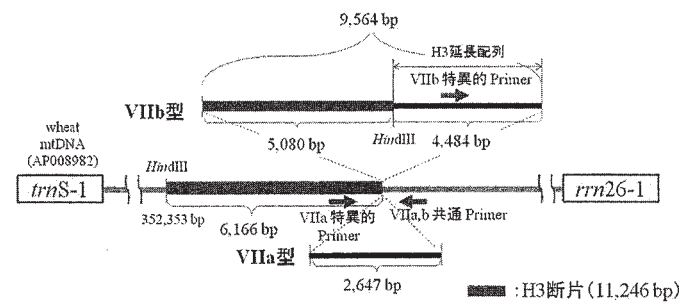


図1. H3断片と周辺領域の構造

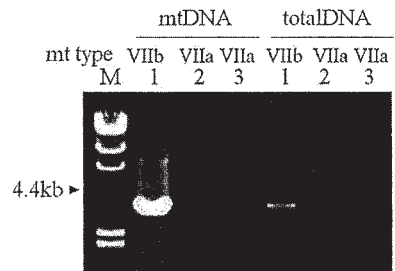


図2. VIIb特異的Primerを用いたPCR
M: λ HindIII, 1:(*dicoccoides*)-CS, 2:(*dicoccum*)-CS, 3:CS

P030 植物ミトコンドリアゲノムのミニサテライト様構造を用いた多型解析

☆本間 雄二朗¹・寺地 徹²・鳥山 欽哉³・久保 友彦¹・三上 哲夫¹ (1.北大院・農, 2.京産大総合生命科学, 3.東北大院・農)

Polymorphic analysis using minisatellite-like loci in plant mitochondrial genome

☆Homma, Y.¹, T. Terachi², K. Toriyama³, T. Kubo¹, T. Mikami¹ (1. Grad. Sch. Agr., Hokkaido U., 2. Fac. Life. Sci., Kyoto Sangyo U., 3. Grad. Sch. Agr. Sci., Tohoku U.)

【背景と目的】

ミニサテライトとは、繰り返しの1単位がマイクロサテライト (SSR) よりも長い反復配列構造 (概ね 7bp ~ 100bp) である。これまで、被子植物のミトコンドリアゲノム多型の解析において、ミトコンドリアミニサテライトを利用した解析はテンサイを含む *B. vulgaris* の例を除きほとんど報告されていない。もし、他の植物種でも同様の解析が可能であるなら遺伝資源の調査等の育種的应用が可能となるだろう。本研究では、植物ミトコンドリアゲノムにミニサテライト様の構造が普遍的に存在するかどうかを検証し、引き続き構造多型を示すかどうかを調査した。

【方法・結果及び考察】

まず、NCBI に公開されている被子植物の 17 種のミトコンドリアゲノム全塩基配列をもとに、反復配列解析ツールを用いて候補配列を得た。候補配列は目視により取捨し、残ったものをミニサテライト様構造とした。その結果、全てのミトコンドリアゲノムにおいて少なくとも 1 つ以上のミニサテライト様構造が存在する事が分かった。続いて、構造多型について調査した。 *Oryza* 属や *Brassica* 属はこ

れまでの研究報告によりゲノム型が良く分かっている上、コアコレクションが充実しているため、モデルとして供試した。塩基配列情報をもとに各ミニサテライト様構造を標的として設計したプライマーセットで PCR を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で比較した。また、多型を生じた場合は塩基配列を決定し、多型の成因を調査した。 *Oryza* 属では、野生種を網羅するコアコレクションを用いてミニサテライト座を解析し、構造多型を示す 4 座を発見した。塩基配列をみると、それぞれのミニサテライト座において、その構造多型は反復数の違いに由来するものであった。この 4 つのミニサテライト座の多型アレル組み合わせ (ハプロタイプ) は 6 通りとなり、 *Oryza* 属ゲノム構成と矛盾しない結果が得られた。 *Brassica* 属でミニサテライト様構造を解析した結果、構造多型を示す 2 座を発見した。得られた 5 通りのハプロタイプは、アブラナ属の系統関係と矛盾しなかった。以上より、被子植物ミトコンドリアゲノムのミニサテライト様構造は多型解析に利用できる可能性が示唆された。

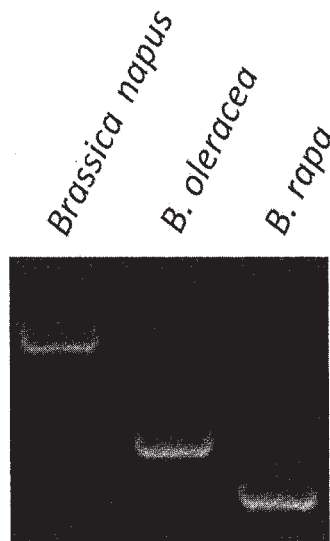


図. *Brassica* 属のミニサテライト座の PCR による分析

Brassica 属のミニサテライト座の PCR 産物をポリアクリルアミドゲル (4%) 電気泳動し、3 種の構造多型を見出した。

317 活性酸素消去オペロンを葉緑体に持つ組換えタバコのストレス耐性評価

○山本 裕範¹・森田 重人³・寺地 徹² (1.京産大院工, 2.京産大総合生命科学, 3.京府大院生命環境)

Evaluation of stress tolerance in trasplastomic tobacco plants containing a ROS scavenging operon integrated into the chloroplast genome

○Yamamoto, H.¹, S. Morita³, T. Terachi² (1.Grad. Sch. Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 3.Grad. Sch. Life and Envi.,Kyoto Pref U.)

強光や低温など様々なストレスを受けた植物は、その体内に強い酸化作用を持つ活性酸素分子種 (ROS) を発生させる。この ROS は葉緑体内で最も多く発生し、タンパク質など生体分子と反応することで、最終的に植物の生長を阻害する。一方、植物は葉緑体内に ROS を段階的に無害な水へと変換する代謝経路をもっている。我々はこの代謝経路を強化することで、ストレス耐性植物を作出することをめざしている。今回、この代謝経路の酵素である APX と SOD の遺伝子をオペロンとしてタバコの葉緑体ゲノムに導入した植物の特徴づけを行った。

以前の講演会 (第 116 回、第 117 回) では、*apx-sod* オペロン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、その T0 個体を株分けして得た 2 系統 (A、B 系統) の後代 (T2 世代) に導入遺伝子が正しく伝達されていること、A、B 系統ともに APX 及び SOD の酵素活性が、野生型と比較して APX は約 50 倍、SOD は約 2.5 倍上昇していることを報告した。今回、この 2 系統を用いて、強光、低温、及び除草剤の有効成分であるメチルピオロゲンなど様々なストレスに対する耐性を調べた。

強光耐性については、PAM2500 を用いてタバコの葉で測定した Fv/Fm を指標に、強光条件下における Fv/Fm の変化を観察することで、組換え体のストレス耐性を評価した。25 °C、61 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ の環境で育成した野生型、及び組換え体各 5 個体ずつを、25 °C、680 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ の光を連続照射する条件下に移し、0h、24h、48h と Fv/Fm の測定を行った。24 時間後に計測した組換え体の Fv/Fm は野生型よりも高い値を示しており、組換え体では強光による障害が軽減されていると考えられた (図 1)。

また、メチルピオロゲン耐性については、野生型と組換え体各 3 個体を用いて実験を行った。メチルピオロゲンの希釈溶液にリーフディスクを浸し、40 時間静置後、目視による観察ならびに残存クロロフィル含量を測定した。残存クロロフィル含量の比較では、メチルピオロゲンの各濃度において、組換え体の残存クロロフィル含量は野生型よりも 2 倍以上高かった (図 2)。これらの結果より、*apx-sod* オペロンを葉緑体ゲノムに持つ組換え体は、ROS の代謝経路が強化されたことで、野生型より強光、メチルピオロゲンに対する耐性が向上したものと考えられた。

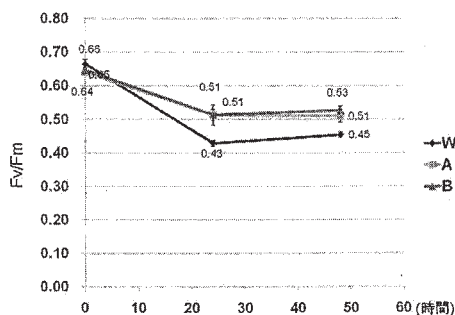


図1. 強光条件下における Fv/Fm の変化

W : 野生型
A : 組換え体 (A 系統)
B : 組換え体 (B 系統)

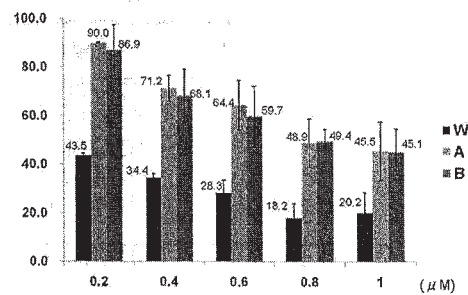


図2. メチルピオロゲン処理後のクロロフィル残存量

W : 野生型
A : 組換え体 (A 系統)
B : 組換え体 (B 系統)

318 ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いた葉緑体形質転換体の作出
 ○辻村 朋彦¹・植村 香織²・山本 裕範³・寺地 徹² (1.京産大工, 2.京産大総合生命科学, 3.京産大
 大院工)

Construction of a transplastomic *Nicotiana benthamiana* tobacco plant

○Tsuji-mura, T.¹, K. Uemura², H. Yamamoto³, T. Terachi² (1.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U., 2.Fac.Life
 Sci.,Kyoto Sangyo U., 3.Grad.Sch.Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

ベンサミアナタバコ (*N. benthamiana*) は、植物と病原体ウイルスの相互作用を研究するモデル植物として植物病理学の分野で広く用いられているばかりではなく、近年、ジーンサイレンシングを利用した核遺伝子の機能解析など、植物分子生物学の研究に欠かすことができない材料となっている。本研究は、このベンサミアナタバコを用いて、核と葉緑体の遺伝子間相互作用を解明する実験系を構築することを目的とした。今回、研究の端緒としてベンサミアナタバコの葉緑体の遺伝子組換えを行った。

我々の研究室では、以前よりタバコ (*N. tabacum*) を材料に、葉緑体の遺伝子組換えを行っており、異なる遺伝子が導入された組換え体を数多く作出している。本研究では、タバコの実験条件を踏襲し、葉緑体ゲノムの IR 領域にある 3' *rps7/12* と *rrn16*, *trnV* の遺伝子間領域に、外来遺伝子を導入しようとした。本実験では、まず、ベンサミアナタバコの葉緑体 DNA の相同領域を持つ形質転換ベクターを作成した。次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導入遺伝子をベクターに挿入した。導入遺伝子には、活性酸素消去系の酵素遺伝子である *apx* 及び選択マ-

ーカーの *aadA* 遺伝子を用い、*aadA* 遺伝子のみのコンストラクトも作成した (図 1)。パーティクルガンを用い、これらの DNA をベンサミアナタバコの葉に撃ち込んだ。

現在までに、*apx/aadA* コンストラクトでは 54 ショットで 22 個のシュートを、また *aadA* コンストラクトでは 84 ショットで 5 個のシュートをそれぞれ得ている。これらのうち、*apx/aadA* を撃ち込んだ 2 つのシュートから植物体が再分化した。一方、得られたシュートの大部分が、植物体に再分化する前にガラス化してしまうという問題が生じた。再分化個体の 1 つを用いて導入遺伝子の有無を PCR により調べた結果、*apx* 及び *aadA* 両遺伝子の存在が示された (図 2)。またサザン解析により、導入遺伝子が葉緑体ゲノムの予想される位置に正しく導入されていることが確認された。この個体の種子を、スペクチノマイシン入りの選抜培地に播種したところ、発芽個体はすべて緑色だったことから、導入遺伝子の後代への伝達を確認された。本研究で得られた組換え体は、ベンサミアナタバコでは世界で 2 例目となる。今後、再分化の条件を改善し、組換え体を得る効率を上げる必要がある。

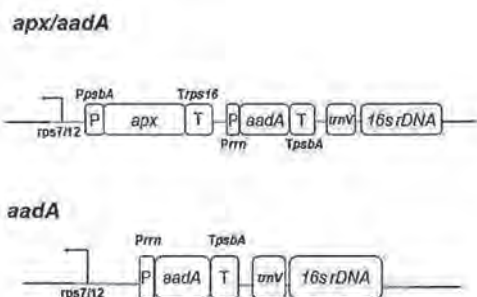


図1. 導入プラスミドコンストラクト

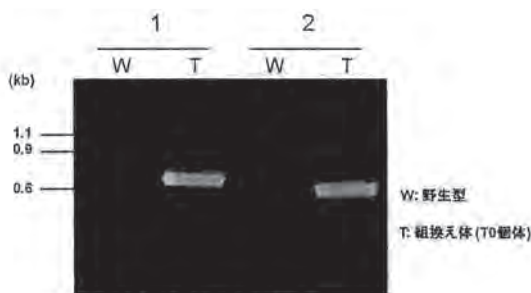


図2. PCRによる導入遺伝子の増幅

1: *aadA* 遺伝子 (670bp)
 2: *apx* 遺伝子 (604bp)

319 ナスと葉緑体形質転換タバコの非対称細胞融合

○村上 亮太・重野 麻子・寺地 徹・山岸 博 (京都産大工学研究科)

Asymmetric cell fusion between eggplant and transplastomic tobacco

○Murakami, R., A. Shigeno, T. Terachi, H. Yamagishi (Grad.Sch.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

葉緑体の形質転換には核の形質転換では得られない多くの利点がある。現在、この葉緑体形質転換体が安定して得られるのは、タバコ (*Nicotiana tabacum*) に限られているが、タバコは食用および観賞用に必ずしも適していない。その一方で、タバコの属するナス科には、農業上有用な植物が多数存在している。そこで本研究では、ナス科の重要な野菜である栽培ナス (*Solanum melongena*) にタバコの形質転換葉緑体を導入することを目指し、両種の非対称細胞融合を行った。

供試材料には栽培ナス ‘千両二号’ (タキイ種苗) および形質転換葉緑体を持つタバコを用いた。この形質転換タバコはカルビン回路の律速段階に関与している酵素であるセドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (SBPase) の遺伝子とともに、選抜マーカーとして Streptomycin/Spectinomycin 耐性遺伝子 *aadA* を葉緑体に導入したものである。これらの植物の葉からプロトプラストを単離した。ナスの核を持つ体細胞雑種を得るため、形質転換タバコのプロトプラストに UV を照射した後融

合に供した。細胞融合は 40% ポリエチレングリコール液を用いた PEG 法により行った。融合処理後は 8P 培地、MS 培地で細胞分裂およびコロニー形成を促した後、カルス化培地、再分化培地へと順次移植した。形質転換葉緑体に導入されている遺伝子 *aadA* を持つものを選抜するため、これら一連の培地には 500mg/L の濃度の Spectinomycin を添加した。融合処理後の培養によって、選抜培地から再分化シュートが得られた (図 1)。得られたシュートのうち、ナスに類似したものを選び、タバコ葉緑体に導入された SBPase 遺伝子の有無を PCR により調査した。その結果、調べた再分化シュートは、葉緑体形質転換タバコと同一のバンドパターンを示し、SBPase 遺伝子を持つことが確認された (図 2)。現在これらのシュートから植物体を得ようとしている。また核およびミトコンドリアゲノムの調査を行っている。

なお本研究は生研センター基礎研究推進事業の支援を受けた。



図1. 選抜培地から得られた再分化シュート(→)

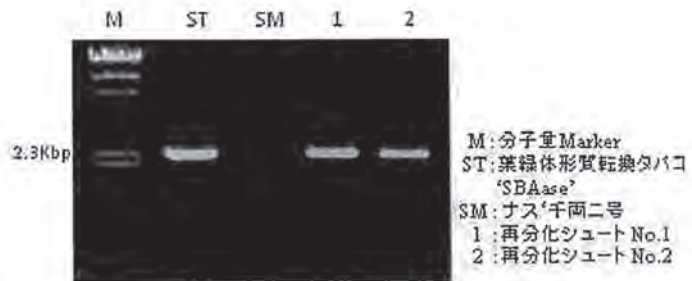


図2. SBPase遺伝子のPCRによる増幅

320 フェリチンを葉緑体で強発現する3種類の組換えタバコの比較研究

○植村 香織¹・郭長虹²・寺地 徹¹ (1.京産大総合生命科学, 2.ハルビン師範大)

Comparative studies on the three transplastomic tobacco lines expressing ferritin in chloroplast

○Uemura, K.¹, C. H. Guo², T. Terachi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Harbin Normal U.)

生物にとって、鉄は多くの酸化還元反応に関与する必須の元素である。しかし過剰な鉄は過酸化物と反応して活性酸素種を発生させ、DNA やタンパク質を破壊する。鉄を安全に貯蔵するため、真核生物はフェリチンと呼ばれるタンパク質を用いる。一般にフェリチンは24個のサブユニットで空洞の球体を形成し、その中に4500個もの鉄原子を貯蔵する。植物の場合、このサブユニットは核遺伝子にコードされており、転写・翻訳の後に葉緑体へ輸送される。我々は植物の葉の鉄含量を増大させることを目的に、フェリチンを葉緑体で発現させる研究を行なっている。

これまで、タバコの栽培品種 Xanthi を用いた組換え体 (Fe-3) について報告してきた (第111, 112 回講演会)。今回、以前と同じプラスミドコンストラクトをタバコの別品種、SR1 の葉緑体ゲノムに導入し、新たな組換え体 (Fe-A) を得ることに成功した。また、トランジットペプチド部分を除いたフェリチン遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ組換え体 (Fe/delTP-H) も得ることができた。本講演では、これらの組換え体について報告する。

本研究では、PCR 及びサザン解析で、各々

の組換え体の後代に導入遺伝子の存在が確認された。またノーザン解析で、導入遺伝子の強い転写も確認された。葉の全タンパク質を用いた SDS-PAGE 及びウェスタン解析では、いずれの組換え体にも大量のフェリチンが蓄積していることが確認された (図1)。葉の鉄含量を ICP-MS によって測定したところ、Fe-3 と Fe-A では野生型の2倍、Fe/delTP-H では1.5倍になっており (図2)、この値は導入フェリチンの蓄積量と相関していた。

フェリチン全長を持つ組換え体は、どちらも全体的に黄緑色を示し、特に Fe-3 では壊死により葉の一部に穴があくなどの表現型が観察された。一方、Fe/delTP-H には、大きな変化は見られなかったが、野生型に比べてやや黄緑がかった表現型を示した。DAB 染色により、葉における過酸化水素の発生量を比較したところ、Fe-A に最も多くの過酸化水素が検出され、Fe/delTP-H にも野生型と比べて過酸化水素発生量の増加が認められた。

本研究の鉄含量測定は、岡山大学資源植物科学研究所、坂本、加藤両博士との共同研究により行われた。ここに感謝の意を表す。

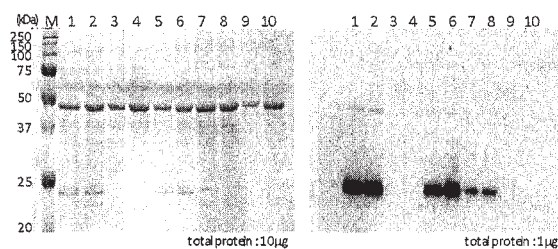


図1. SDS-PAGEおよびsoybean ferritin抗体によるウェスタンブロット解析
M:protein markers
1,2:Fe-3
3,4:野生型タバコ(Xanthi)
5,6:Fe-A
7,8:Fe/delTP-H
9,10:野生型タバコ(SR1)

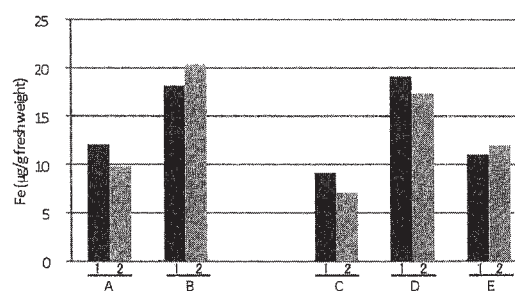


図2. 葉における鉄含有量
A:野生型タバコ(Xanthi); B:Fe-3
C:野生型タバコ(SR1); D:Fe-A; E:Fe/delTP-H

425 倍数性コムギの進化に新しい知見をもたらすミトコンドリアゲノムの構造変異

○辻村 真衣¹・富岡 関子¹・森 直樹²・寺地 徹¹ (1.京都産大総合生命科学, 2.神戸大院農学)

A structural variation in the mitochondrial genome that provides new insights into the evolution of polyploid wheats

○Tsujiyama, M.¹, E. Tomioka¹, N. Mori², T. Terachi¹ (1.Fac. Life. Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Grad. Sch. Agr., Kobe U.)

コムギ及びエギロブス属植物の系統進化は、いわゆるゲノム分析など様々な方法で研究されており、倍数性系列を含む両属各種の系統関係が明らかになっている。また両属植物では、細胞質ゲノムについても、細胞質置換コムギを用いた表現型レベルの研究、あるいはより直接的な葉緑体 (cp) 及びミトコンドリア (mt) の DNA レベルの研究から、その進化について体系的な情報が得られており、ほぼすべての倍数種の母系祖先が解明されている。その中で我々は、パンコムギ (Chinese Spring, 以下 CS) の mtDNA の全塩基配列を決定し、このゲノムが 452,528bp の大きさのマスターサークルを構成していることを示した。またその後、中国のグループが同じパンコムギの別品種 Chinese Yumai の mtDNA の全塩基配列を決定し、両品種のゲノムが事実上同一であることが示された。しかし、我々は以前に行った mtDNA の RFLP 分析で、B ゲノムを持つ倍数性コムギの mt ゲノムが、Emmer コムギや普通系コムギを持つ VIIa 型と、*Triticum dicoccoides* や *T. spelta* が持つ VIIb 型に明瞭に区別されることを示した。両者は VIIb 型特異的に生じる約 11kb の *Hind*III 断片 (H3 断片) により区別されるが、パンコムギの mt ゲノムの配列を精査しても、H3 断片の

由来は不明であった。そこで今回、この断片の構造を解析した。

材料には CS の核と *T. dicoccoides* の細胞質を持つ細胞質置換系統 (C21) を用いた。暗所で発芽させた実生から定法により mtDNA を精製し、*Hind*III で消化して H3 断片を得た。これを泳動ゲルから回収し、*Sau*3AI で消化後、H3 の両端に位置する断片をクローニングし、塩基配列を決定した。この配列をもとにプライマーを設計し、C21 の mtDNA を鋳型に long-PCR を行い H3 断片を大量に増幅して、構造解析に用いた。その結果 H3 断片は、全長 11,246bp であり、その中にパンコムギの mtDNA にはない、5,080bp の配列を含むことがわかった (図 1)。一方、核親である CS に対する PCR では、mtDNA を鋳型にしても H3 断片は増幅せず、全 DNA を鋳型にした場合のみ C21 と同じ大きさの断片が増幅した (図 2)。このことは、CS では H3 断片が mt から核へ移行している可能性を示す。H3 断片の mt ゲノムからの移行は B ゲノムを持つ 4 倍性及び 6 倍性コムギのいずれにも認められるので、この変異が異なる倍数性コムギで独立に生じたものか、母系遺伝したものか、今後、明らかにする必要がある。

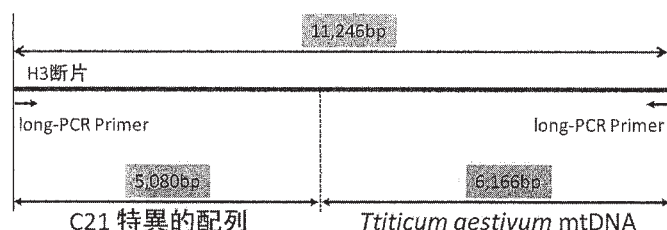


図1. H3断片の構造

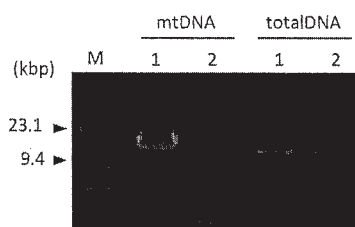


図2. C21、パンコムギを鋳型にしたlong-PCR増幅には図1のlong-PCR Primerを用いた。M: λ /*Hind*III, 1: C21, 2: パンコムギ

524 ダイコンの細胞質雄性不稔遺伝子 *orf138* を発現する葉緑体形質転換ベクターの作製とそれを用いた稔性回復遺伝子作用アッセイ系の構築

○田中 義行・安本 景太・山岸 博・寺地 徹 (京産大総合生命科学)

Construction of plastid transformation vectors that express *orf138*, a CMS gene from radish, and development of assay systems for characterization of an Rf gene

○Tanaka, Y., K. Yasumoto, H. Yamagishi, T. Terachi (Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U.)

オグラ型細胞質をもつダイコンのミトコンドリアゲノムには、細胞質雄性不稔 (CMS) の原因遺伝子 *orf138* が存在する。*orf138* は他の遺伝子 (*trnfM/orfB*) とともに約 1.4kb の mRNA へと共転写され、転写産物から翻訳されたタンパク質 (ORF138) がミトコンドリアの内膜に蓄積することで CMS が起こると考えられている。一方、ダイコンにはオグラ型 CMS に対する複数の稔性回復 (Rf) 遺伝子が発見されており、そのうちのひとつ *orf687* は、PPR タンパク質 (ORF687) をコードすることが知られている。ORF687 は *orf138* の翻訳を抑えることで稔性を回復させる。また ORF687 は *orf138* の mRNA に結合することが *in vitro* の実験で証明されている。しかし、ORF687 と *orf138* の mRNA の相互作用を *in vivo* で詳細に解析することや、ORF138 の機能を明らかにすることは、植物ミトコンドリアの形質転換系が確立されていない現時点では不可能である。そこで我々は、両者の相互作用を *in vivo* でアッセイする系を構築することを目的に、大腸菌ならびにタバコ (*Nicotiana tabacum*) を用いて以下の実験を行った。本研究では、まず *orf138* をもつ 5 種の葉緑体形質転換用コンストラクトを作製した。ダイコン 'MS 源

助' の DNA を鋳型にした PCR によって *trnfM-orf138-orfB* を含む断片を増幅し、これを葉緑体形質転換用プラスミド pPRV112A' にクローニングした (図 1 A)。続いてこのコンストラクトから *trnfM*、*orfB* の片方あるいは両方を除いたコンストラクトを作製した (図 1 B-D)。また pPRV-*orf138* (図 1 D) から *orf138* の開始コドン (ATG) の A を欠失させたコンストラクトを得た (図 1 E)。これらのコンストラクトを大腸菌へ導入し、抗 ORF138 抗体を用いて大腸菌の全タンパク質に対するウェスタンブロット解析を行ったところ、pPRV-*orf138* (-atg) を除くすべてのコンストラクトで ORF138 のシグナルが検出され、大腸菌内で ORF138 が発現していることが示された。現在、pPRV112A' とは異なる ori を持つプラスミドを用いて *orf138* と *orf687* の共発現系を構築している。また、上記コンストラクトをタバコ葉緑体へ導入し、一部組換え体を得ている。葉緑体は、2 重膜で囲まれている、独自のゲノムをもつなど、ミトコンドリアと共通点がある細胞小器官であり、ORF138 の葉緑体における強発現が植物体へどのような影響をもたらすか興味もたれる。

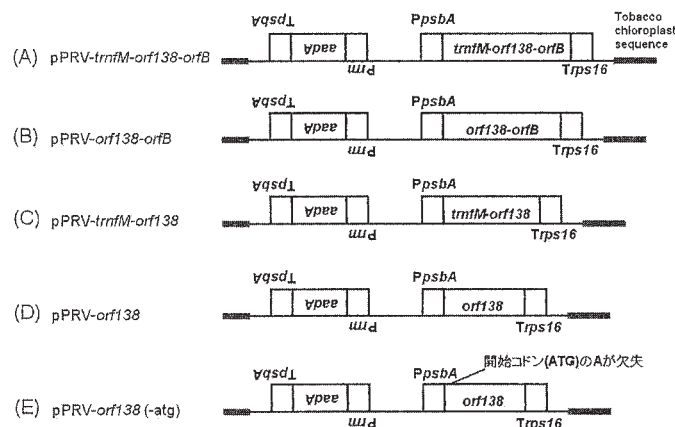


図1 *orf138*をもつ葉緑体形質転換用コンストラクト

P100 異質細胞質ダイコン系統にみられる雄性不稔性とミトコンドリア mRNA の発現パターンとの関係について

○安本 景太¹・筒井 康太²・房 相佑²・寺地 徹¹・山岸 博¹ (1.京都産大総合生命科学, 2.宇都宮大農)

Relationship between male-sterility and expression patterns of mitochondrial mRNA in alloplasmic radish lines

○Yasumoto, K.¹, K. Tsutsui², S.W. Bang², T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Agric., U. Utsunomiya)

近年、細胞質雄性不稔性 (CMS) を利用する F₁ 育種が盛んに行われてきているダイコンには、Ogura 型、NWB 型とよばれる CMS 細胞質 (Ogura 1968, Nahm et al. 2005) や、最近同定された DCGMS 型とよばれる CMS 細胞質 (Lee et al. 2008) などの存在が知られている。一方、Bang et al. (1997, 2002) は、アブラナ科の野生種とダイコンとの属間交雑を行い、その後代に CMS を示す系統を複数見出した。またこれらのダイコン系統で発現する CMS は、いずれも既存のダイコンのものとは異なる CMS であった (筒井ら、2009, 2010)。本研究では、このような異質細胞質ダイコン系統の CMS に関与するミトコンドリア遺伝子を同定することを目的として、CMS ダイコン系統に特有のミトコンドリア遺伝子転写産物について調査した。

アブラナ科の野生種である *Brassica maurorum*、*Brassica fruticulosa*、および *Moricandia arvensis* の細胞質 (Bm 型、Bf 型、Ma 型とよぶ) を持つ CMS ダイコン系統を用いた。以前の調査結果から Bm 型ダイコンでは、*atpA* 転写産物のプロセッシング様式が野

生種とは異なり、mRNA の 5' 側に新規 ORF (*orf117*) の発現を伴うことが明らかになっている。また、*orf117* は Ma 型細胞質を持つ *Brassica juncea* における CMS の有力な候補遺伝子 *orf108* (Ashutosh et al. 2008) との相同性があり、これらは *atpA* と共転写される。そこで Ma 細胞質を持つダイコン系統の CMS についても *orf108* が関与する可能性を検討するため、*atpA* 転写産物についてノーザン解析を行った。

調査した Ma 型ダイコンと野生種の間ではバンドパターンに変化が観察された。一方で、CMS 系統と稔性回復系統との間に変化は認められず、*B. juncea* の場合とは異なることが明らかとなった (図 1)。現在、ORF117 に対する抗体を作製し、Bm 型ダイコンおよび Ma 型ダイコンについて両 ORF の翻訳産物の蓄積の有無を調査中である。講演会では、Bf 型 CMS ダイコンの解析結果についても述べたい。なお、本研究は生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業による支援を受けて実施した。

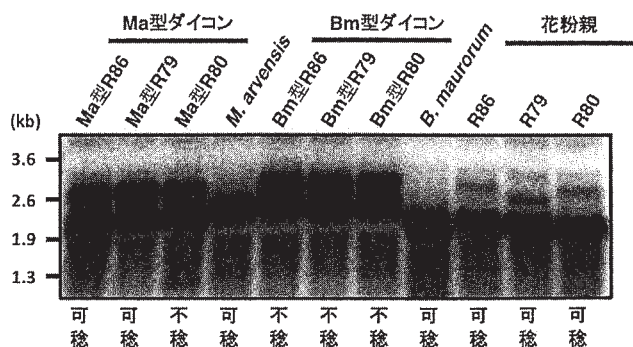


図1. *atpA* 遺伝子プローブを用いたノーザンプロット。

P105 CMS を示すナス細胞質置換系統における *atp1* 遺伝子周辺領域の構造解析

○吉見 麻衣子¹・齊藤 猛雄²・一色 司郎³・寺地 徹¹・山岸 博¹ (1.京産大総合生命科学, 2.農研機構野菜茶研, 3.佐賀大農)

Structural analysis of the mitochondrial *atp1* region in the alloplasmic CMS lines of eggplant

○Yoshimi, M.¹, T. Saito², S. Isshiki³, T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Life Sci., Kyoto Sangyo U., 2.Natl. Inst. Veg. Tea Sci., 3.Fac. Agric., Saga U.)

ナス (*Solanum melongena*) は顕著な雑種強勢を示すことが知られており、現在流通している品種は大部分が F₁ 品種であるが、主に人工除雄と手交配によって F₁ 採種が行われている。我々は栽培ナスにナス属野生種の細胞質を導入した細胞質置換系統が細胞質雄性不稔 (CMS) を示すことを見出している。また、系統によって CMS の表現型が葯裂開不全型と花粉形成不全型の 2 つに大別されることも明らかとなっている。しかし、これらの CMS を引き起こす分子メカニズムは未だ不明のままである。

本研究は、上述の異なる 2 型の CMS 原因遺伝子を特定することを目的に進めており、これまでに CMS 系統間の RFLP および mRNA の塩基配列多型を明らかにしてきた (第 116, 117 回講演会)。今回は、ミトコンドリア遺伝子のうち *atp1* 周辺領域について、新たな知見が得られたので報告する。

材料には、栽培ナスに *S. kurzii* (Skur) の細胞質を導入した細胞質置換系統 (Skur/m)、*S. aethiopicum* (Saet) の細胞質を導入した細胞

質置換系統 (Saet/m)、『耐病 VF』の細胞質を導入した細胞質置換系統 (SVF/m) および栽培ナス ‘Uttara’ (Sm-Ut) を用いた (表 1)。これらの植物の全 DNA を鋳型に TAIL-PCR を行い、ミトコンドリア *atp1* 遺伝子を含む、約 4kb の塩基配列を決定した。その結果、*atp1* 遺伝子上流の構造が葯裂開不全型 (Skur/m)、花粉形成不全型 (Saet/m,SVF/m) および栽培ナス型 (Sm-Ut) では大きく異なり、さらにそれぞれに固有の新規 *orf* が認められた (図 1)。

また、Skur と Skur/m の 2 系統、Saet、Saet/m および Saet/m の稔性回復系統 (Saet/m-Rf) の 3 系統について、新規 *orf* 内部のプロープを用いてノーザン解析を行ったところ、雄性不稔の Skur/m と Saet/m では細胞質親や稔性回復系統と比較して、転写パターンまたは転写の有無に明確な差が認められた。今後は、新規 *orf* および *atp1* の翻訳産物の蓄積の有無と CMS との関連を明らかにしたい。

なお、本研究は生研センター基礎研究推進事業により実施された。

表 1. 供試系統

細胞質型	系統名	細胞質	可稔/不稔
葯裂開不全型	Skur	<i>S. kurzii</i>	可稔
	Skur/m	(CMS)	不稔
花粉形成不全型	Saet		可稔
	Saet/m	<i>S. aethiopicum</i> (CMS)	不稔
	Saet/m-Rf		可稔
栽培ナス型	SVF/m	‘耐病 VF’ (<i>S. grandifolium</i> × <i>S. melongena</i>) (CMS)	不稔
	Sm-Ut	<i>S. melongena</i> (Normal)	可稔

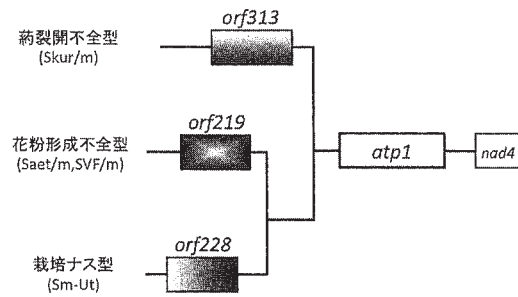


図 1. ミトコンドリア *atp1* 周辺構造の模式図

304 細胞融合によりタバコから形質転換葉緑体を導入したペチュニアのゲノム構造および生育特性

○村上 亮太・重野 麻子・寺地 徹・山岸 博 (京都産大工)

Genome structure and growth of *Petunia hybrida* obtained by cell fusion with a transplastomic tobacco

○Murakami, R., A. Shigeno, T. Terachi, H. Yamagishi (Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

葉緑体の遺伝子組換えは、通常の遺伝子組換えに比べていくつかの利点を持つことから、近年種々の植物においてこの方法が試みられている。しかし安定して組換え体が得られる植物は、現在までのところタバコに限られている。このため、タバコで作出された遺伝子組換え葉緑体を、他種の植物に導入する方法として、細胞融合の利用が考えられる。我々は活性酸素消去系の酵素 MDAR の遺伝子および streptomycin / spectinomycin 耐性遺伝子である *aadA* を葉緑体に持つタバコから、非対称細胞融合法により形質転換葉緑体を導入したペチュニアを得た。しかしこのペチュニアにおいては、1) 安定的に次世代を得られないこと、2) 得られた次世代種子が不発芽または発芽遅延を起こすこと (図 A)、3) 発芽後の植物の生育が著しく遅延し、形態的にも異常を示すこと (図 B)、が観察された。本研究では、まず次世代を安定的に得ることができない原因が花粉の異常によるものかを、花粉のアセトカーミン染色および花粉管伸長

を促すことで確かめた。体細胞雑種の花粉はアセトカーミンに染まり、形状においても野生型と差は見られなかったが、野生型に比べ花粉管伸長をしないものが多く観察された。次に次世代種子のうち水に浮くものと沈むものの割合と発芽率との関係を調べたが、現在のところ相関関係はみられていない。一方、得られた体細胞雑種次世代が、タバコ葉緑体への遺伝子導入コンストラクトを、葉緑体ゲノム中に正しく保持している事は、PCR 解析により確認された。

現在、野生型と体細胞雑種の間で正逆交雑を行い、その着果率および次世代系統の発芽率を調査している。また次世代が安定的に得られない原因、および次世代種子の発芽率の低さや形態の異常が、遺伝的要因によるものかを検討するため、タバコおよびペチュニアのマイクロサテライトマーカーを用いたゲノム解析を進めている。なお本研究は生研センター基礎研究推進事業の支援を受けた。

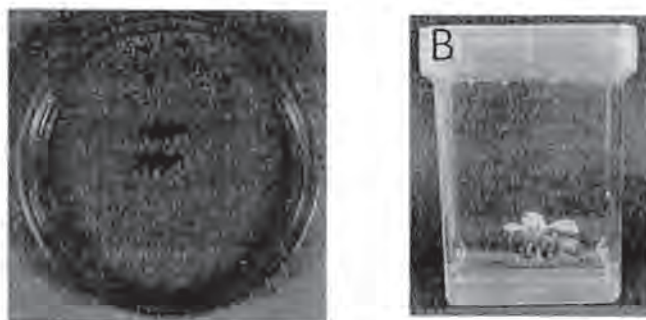


図. ペチュニアとタバコの体細胞雑種次世代種子の不発芽(A)および次世代植物の生育遅延(B)

305 活性酸素消去オペロンを葉緑体に持つ組換えタバコの作出と解析

○山本 裕範・寺地 徹 (京産大工)

Construction and analysis of transplastomic tobacco plants containing a ROS scavenging operon

○Yamamoto, H., T. Terachi (Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

植物の葉緑体内には、アスコルビン酸グルタチオンサイクルとよばれる代謝経路が備わっている(図1)。この経路により植物は、各種ストレスにより発生した活性酸素分子種(ROS)を段階的に無害な水へと変換することができる。我々は以前、ストレス耐性植物の作出を目的に、この代謝経路の前半で働く酵素の遺伝子である、*apx* と *sod* をオペロンとして葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコを作出した。この組換え体の T1 世代における導入遺伝子の酵素活性は野生型に比べ APX では約 40 倍、SOD では約 10 倍上昇していた。さらに、組換え体は除草剤の有効成分であるメチルビオロゲン耐性や強光耐性を示した(本学会第 116 回講演会)。今回、この組換え体の次世代(T2)の特徴付けを行うとともに、これら遺伝子の葉緑体における強発現が、他の遺伝子の発現にどのような影響を与えるか調査した。

本研究の材料には T0 個体を株分けして得た、*apx-sod* 組換え体 2 系統(A 系統、B 系統)の T2 世代を用いた。まず、これらの系統を用いたサザン解析を行ったところ、A 系統、B 系統ともに導入遺伝子がオペロンとして葉緑体

ゲノム中に正しく保持されていることが確認された。次に、組換え体の核遺伝子の発現変動を網羅的に調べるため、マイクロアレイ解析を行った。解析には播種後 3 カ月の A, B 系統各 1 個体(T2 世代)と野生型の葉の全 RNA を Cy3 標識した cRNA を用い、これをタバコオリゴ DNA マイクロアレイ(44K, Agilent)にハイブリダイズさせた。その結果、両系統ともに導入遺伝子の 1 つ、*sod* の発現が、野生型に比べて約 180 倍に増加していたことに加え、PR-a などの感染特異的(PR)タンパク質の遺伝子発現が著しく増加していた。一方、もう 1 つの導入遺伝子である *apx* の発現は、予想に反し、野生型の約 20% まで減少していた。これまでの RT-PCR(図2)や Northern 解析では、組換え体の導入遺伝子は 2 つとも強発現していることがわかっている。今後、矛盾した結果の原因を解明する必要がある。

現在、ROS 代謝経路の遺伝子である *mdar* を *apx-sod* オペロンにつなげた、新たなオペロンを葉緑体ゲノムに持つ形質転換体の作出にも着手している。講演ではこの組換え体についても述べたい。

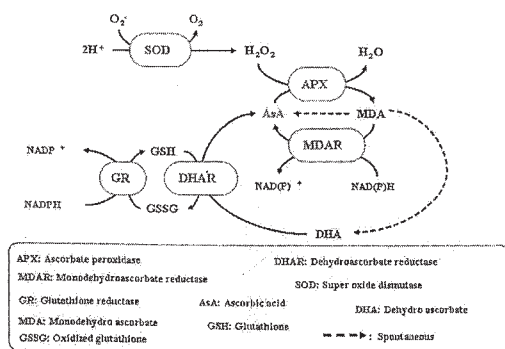


図1. アスコルビン酸グルタチオンサイクル

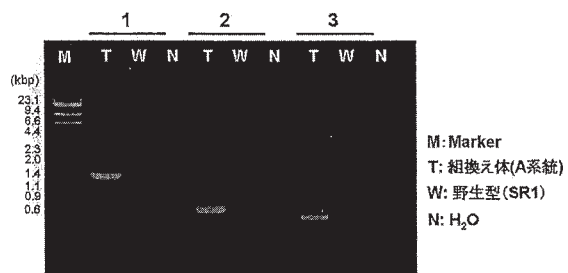


図2. RT-PCRによる導入遺伝子産物の増幅

- 1: *apx-sod* オペロン全長をカバーするプライマーによる増幅
- 2: *apx* 遺伝子のみをカバーするプライマーによる増幅
- 3: *sod* 遺伝子のみをカバーするプライマーによる増幅

312 *Brassica maurorum* の細胞質をもつ雄性不稔ダイコンにおけるミトコンドリア遺伝子転写産物の解析

○安本 景太¹・筒井 康太²・房 相佑²・寺地 徹¹・山岸 博¹ (1.京都産大工, 2.宇都宮大農)

Analysis of mitochondrial transcripts from male sterile radish carrying *Brassica maurorum* cytoplasm

○Yasumoto, K.¹, K. Tsutsui², S.W. Bang², T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Fac. Agric., U. Utsunomiya)

アブラナ科の野生種 *Brassica maurorum* とダイコン (*Raphanus sativus*) との属間雑種後代から作出された細胞質置換型ダイコンは、花粉に生殖能力がなく細胞質雄性不稔性 (CMS) を示す。この CMS は、ダイコンの Ogura/Kosena 型、NWB 型の CMS に対する稔性回復遺伝子 (*Rf*) を持つハツカダイコンの戻し交雑によっても稔性を回復せず、これまでに *Rf* 遺伝子を持ったダイコン品種・系統が見出されていない新しいタイプの CMS である。演者らは、このような細胞質置換型ダイコンにおける雄性不稔の原因遺伝子を同定するため、今回、細胞質置換型ダイコンと *B. maurorum*、およびダイコンとの間でミトコンドリア遺伝子転写産物を比較解析した。

材料には、‘錦赤丸’、‘Four Season Leaf’ および ‘大陸紅丸’ を戻し交雑した雄性不稔ダイコン系統を用いた。これらの本葉またはつぼみから、全 RNA を調製し、ミトコンドリア遺伝子のコード領域内に作製したプローブによるノーザン解析を行った。その結果、調べた 8 種類の遺伝子 (*atpA*, *atp6*, *atp8*, *atp9*, *cox1*, *cox2*, *cox3*, *nad4*) のプローブのうち、

atpA について、本葉、つぼみのいずれにおいても *B. maurorum* と比べ、バンドパターンに変化が観察された (図 1)。そこで、*B. maurorum* の全 DNA を鋳型に TAIL-PCR を行い、*atpA* 遺伝子を含む領域 4.2 kb の塩基配列を決定した。同様に決定した ‘錦赤丸’、‘大陸紅丸’ の同領域の塩基配列と比較した結果からは、*atpA* コード領域から上流の構造がこれらのダイコンのものとは大きく異なること、*B. maurorum* にはこの領域に 117 個のアミノ酸をコードする新規の ORF (*orf117*) が認められることなどが明らかになった。さらに現在、RT-PCR による解析から、細胞質置換型ダイコンでは、*atpA* 転写産物の 5' 側のプロセッシングが *B. maurorum* のものとは異なっている可能性を示唆する結果を得ている (データ未掲載)。今後、この *atpA* 転写産物の構造の決定を行うとともに、他のミトコンドリア遺伝子転写産物についても調査を進める予定である。なお、本研究は生研センターイノベーション創出基礎的研究推進事業による支援を受けて実施した。

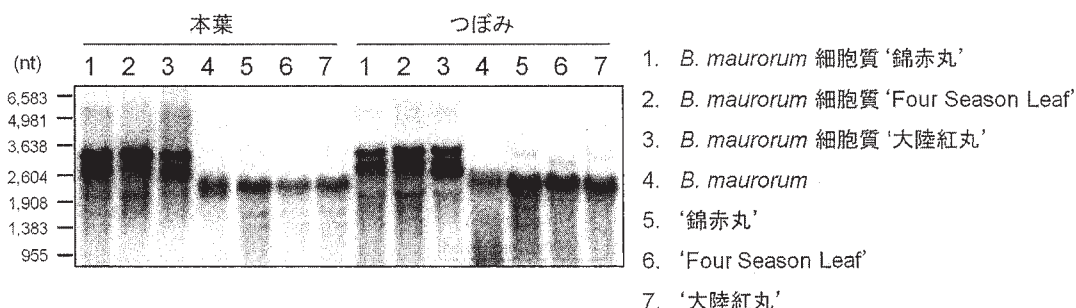


図1. *atpA* 遺伝子プローブを用いたノーザンプロット。

422 ナス属野生種の細胞質を持つ栽培ナス細胞質雄性不稔 (CMS) 系統において発現する *atp1* および *cox2* mRNA 塩基配列の解析

○北村 嘉邦⁴・吉見 麻衣子¹・安本 景太¹・齊藤 猛雄²・一色 司郎³・寺地 徹¹・山岸 博¹ (1.京都産大工学部, 2.農研機構野菜茶研, 3.佐賀大農学部, 4.信州大農学部)

Analysis of the nucleotide sequence of the *atp1* and *cox2* mRNA expressed in the alloplasmic cytoplasmic male sterile (CMS) lines of the eggplant

○Kitamura, Y.⁴, M. Yoshimi¹, K. Yasumoto¹, T. Saitou², S. Isshiki³, T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Eng. Kyoto Sangyo U., 2.National institute of vegetable and tea science, 3.Fac. Agric., Saga U., 4.Fac. Agric., Shinshu U.)

栽培ナス (*Solanum melongena*) に *S. kurzii* (kur) の細胞質を導入した細胞質置換系統 (kur/m 系統) および *S. aethiopicum* (aet) の細胞質を導入した細胞質置換系統 (aet/m 系統) は細胞質雄性不稔 (CMS) を示す。aet/m 系統については核ゲノムに *Rf* 遺伝子を持つ稔性回復系統 (aet/m-Rf 系統) を得ている。kur/m 系統では *atp1* および *cox2* について、aet/m 系統では *atp1* について、細胞質親や稔性回復系統と比較してサイズが大きい mRNA が検出されることが明らかになっている。本調査では、各系統において発現する *atp1* および *cox2* の mRNA の末端配列を解析した。また、kur/m, aet/m および Saet/m-Rf 系統の *atp1* および *cox2* ミトコンドリアゲノム配列を解析した。kur および kur/m 系統において発現する *cox2* mRNA では、コード領域の上流に 167nt の UTR 配列および未知配列が見られた (図)。また、aet, aet/m 系統および aet/m-Rf 系統において

発現する *atp1* mRNA では、コード領域の上流に 41nt の未知配列および *Nicotiana tabacum* の *cox2* インtron 配列と相同性が高い領域 (110nt) が見られた (図)。5' 末端領域に上述の配列が存在するために、kur/m 系統および aet/m 系統では細胞質親や稔性回復系統と比較してサイズが大きい mRNA が検出されたと考えられた。また、aet/m と aet/m-Rf 系統の *atp1* ゲノム配列に違いは見られず、コード領域の上流には mRNA に見られたものと同様な配列が見られた。以上、調査した全系統について、5' 末端のプロセッシングが正常に行われていないと考えられる mRNA が認められた。ただし、細胞質親および稔性回復系統では、一部を除いて mRNA のプロセッシングが正常に進行するのに対して、不稔系統では大部分の mRNA のプロセッシングが正常に行われていない可能性がある。本研究は生研センター基礎研究推進事業により実施された。

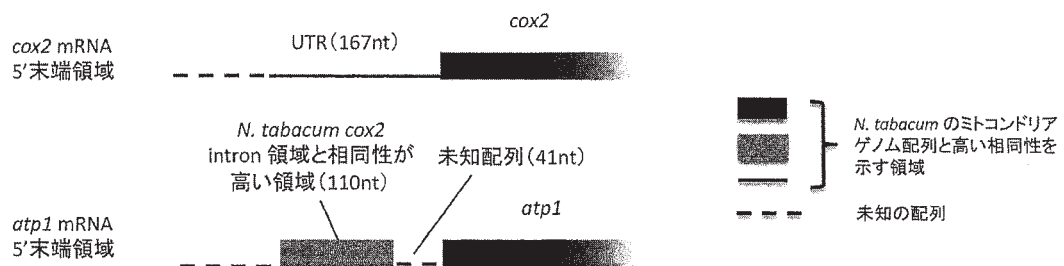


図 kur, kur/m 系統において発現する *cox2* mRNA の 5' 末端領域 (上) および aet, aet/m および aet/m-Rf 系統において発現する *atp1* の mRNA 5' 末端領域 (下)。

423 ハマダイコンにおける第3の稔性回復遺伝子について

○山岸博・堤厚善・松本欣剛・安本景太(京都産大工)

The third fertility restoration gene for the Ogura male sterility observed in Japanese wild radish

○Yamagishi, H., A. Tsutsumi, Y. Matsumoto, K. Yasumoto (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

我国の海岸部に自生するハマダイコンにおいては、オグラ型の雄性不稔細胞質を持つ個体が広く分布している。その一方で、この雄性不稔に対する稔性回復遺伝子が、極めて高い頻度でハマダイコンに存在することも観察されている。オグラ型雄性不稔に対する稔性回復遺伝子としては、すでに単離されている *orf687* 以外に、雄性不稔の原因遺伝子である *orf138* の mRNA のプロセッシングに関与する *Rft* があることが明らかになった (Yasumoto et al. (2009))。そこで各地のハマダイコンについて *orf687* と *Rft* の有無を調査したところ、これら2つの遺伝子を持たないにもかかわらず、稔性回復能力を有すると考えられるハマダイコンが存在することが認められた。このため、そのようなハマダイコンの新しい稔性回復遺伝子について調査した。

大分県奈多浜で収集されたハマダイコンの1個体(奈多浜-2)は、*orf138* を持ちながら可稔であった。そこでこの個体とオグラ型雄性不稔性の‘MS源助’との間で交雑を行ってF1を得た。F1の4個体はいずれも正常な花粉稔性を有したので、稔性回復遺伝子 *orf687*

の有無をPCR-RFLPで調べた結果、全個体とも‘MS源助’と同一のパターンを示した。また、*orf138* の mRNA は *Rft* によるプロセッシングを受けていなかった。それにもかかわらず、これらの個体にはORF138タンパク質が検出されなかった。

F1の1個体を用いて、‘MS源助’への戻し交雑を行い、BC₁世代を得た。BC₁世代の花粉稔性を調べたところ、調査91個体は、可稔46個体と不稔45個体に分離し、1:1の分離比に極めてよく適合した(表)。また可稔個体の稔性は、*Rft* で観察されたような開花時期による不安定性は示さなかった。これらのことから奈多浜のハマダイコンは、稔性回復力の強い優性の稔性回復遺伝子を1つ持つことが明らかになった。

この第3の稔性回復遺伝子を同定するために、まず *orf687* およびその近傍のPPRモチーフタンパク質の遺伝子領域に特有のプライマーを設計してPCRを行った。その結果、上記の可稔個体のみで特異的に増幅するDNAマーカーを得た。現在この領域のシーケンスおよび *orf687* との関係の解析を進めている。

表 ‘MS源助’ と奈多浜のハマダイコンとの交雑によるBC₁世代における花粉稔性の分離

調査個体	可稔個体	不稔個体	χ^2 (1:1)
91	46	45	0.01 ^{ns}

428 ダイコンのミトコンドリアゲノムにみられるサブストイキオメトリックシフト (SSS) の遺伝解析

小嶽 佑太・富岡 関子・山岸 博・○寺地 徹 (京産大工)

Genetic analysis of substoichiometric shifting in the radish mitochondrial genome

Odake, Y., E. Tomioka, H. Yamagishi, ○T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

高等植物のミトコンドリア (mt) ゲノムには、主要な DNA 分子種であるマスターサークルと、コピー数が極端に少ないサブリモンと呼ばれる分子種が混在している。サブリモンはマスターサークル上のリピート配列間の不可逆的組換えによって生じるとされるが、この分子種の mt ゲノムの変異や進化への関与については不明な点が多い。また、いくつかの植物種でサブリモンのコピー数が著しく変動する Substoichiometric shifting (以下 SSS) という現象が報告されており、インゲンマメなどでは SSS が雄性不稔/稔性回復の原因であるとされている。近年、シロイヌナズナなどのノックアウト個体を用いた実験から、*msh1*, *recA3* 及び *osb1* といった SSS 制御遺伝子が同定されている。我々はこれまでダイコンの mt ゲノムの系統分化を考察してきたが、その際、サブリモンの存在を考慮すべき場合があることに気づき、ダイコンの mt ゲノム、特に *cox1* 5' 領域における多型と SSS との関連について研究を進めている。その中で、ダイコンでは交配により特定の配列をもった mt 分子が SSS を示し、その後代で mt ゲノムの

構成が変化しうることを報告した (日本育種学会第 116 回講演会)。この交配で観察された SSS は、同じ親の組合せを持つ F₁ 個体の間でも発現に差が認められることから、交配で F₁ へ伝わった親個体の核遺伝子により制御されている可能性が高い (図 1)。そこで本研究ではこの SSS の機構を解明するため、複数の F₁ 個体に由来する自殖 F₂ 集団を用いて、後代におけるサブリモンの遺伝様式と分離を PCR により調査した。その結果、ある F₁ 個体に由来する F₂ 集団の中に、F₁ ではいったん消失したと思われた mtDNA 分子が SSS により再び出現した個体があることが見いだされた (図 2)。現在、これら F₂ 集団における SSS 発現の分離を調べており、ダイコンで SSS を制御している核遺伝子について、新たな知見を得ようとしている。また本大会では、SSS により *cox1* 5' 領域の構成が変化している個体の *cox1* の発現パターン、及び SSS 制御に関連する可能性のある核遺伝子 (*msh1*, *recA3*) の細胞内局在などについても新たな知見を得たので、先の結果と合わせて報告する。



図1. 同一の親に由来するF₁個体に観察されたSSS

サザン解析のプロープには*cox1*を用いた。
①～⑥はそれぞれ異なるF₁個体を示す。
3.0kbの断片のコピー数が増減している。

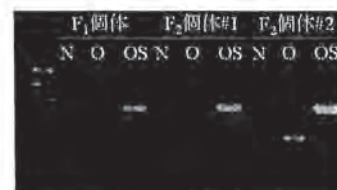


図2. F₁及びF₂個体の*cox1* 5'領域のPCR

N:正常型特異的プライマーペアによる増幅
O:オグラ型特異的プライマーペアによる増幅
OS:OS40型特異的プライマーペアによる増幅

305 環境ストレスがダイコンのミトコンドリアゲノム構造ならびに SSS 関連核遺伝子の発現に及ぼす影響

○小嶽 佑太・山岸 博・寺地 徹 (京産大工)

Environmental effects on the radish mitochondrial genome structure and expression of the genes involving SSS

○Odake, Y., H. Yamagishi, T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

高等植物のミトコンドリア (mt) ゲノムには、主要な DNA 分子種であるマスターサークルとは別に、サブリモンと呼ばれるコピー数が極端に少ない、DNA 分子種が存在している。このサブリモンは、mt ゲノム上の短いリピート配列間の不可逆的組換えによって生じるとされるが、これまでの植物 mt ゲノムの研究では、サブリモンの存在はほとんど考慮されておらず、この分子種の mt ゲノムの変異や進化への寄与など不明なことが多い。一方、このサブリモンのコピー数を著しく変動させる Substoichiometric shifting (SSS) という現象がしばしば報告されている。SSS はある種の雄性不稔/稔性回復やトウモロコシの NCS 突然変異 (Yamato et al.1999) の原因とされており、近年ではシロイヌナズナなどで、この SSS に関連する核遺伝子 *msh1*、*recA3* 及び *osb1* が同定されている。その結果、これらの遺伝子は、主に SSS を抑制する遺伝子として機能していることが、ノックアウト植物を用いた実験により証明された。我々はこれまで、ダイコンの系統分化、特に細胞質雄性不稔に関する知見を得るために、様々な栽培・野生ダ

イコンの mt ゲノムの変異と進化を調査してきたが、ダイコンの mt ゲノムの進化においても、サブリモンの存在を考慮すべき可能性が示唆された (本学会第 114 回講演会)。そこで今回、日本の栽培ダイコン “打木源助” に存在するサブリモンに注目し、各種解析を行った。本研究ではまず同上品種の複数個体より全 DNA を抽出し、mt 遺伝子をプローブとしてサザン解析を行った。その結果、*coxI* と *atp8* プローブで、明瞭なサブリモン分子を検出した (図 1)。このサブリモンのマスター分子に対する量比が高温などのストレスで変動するか、サザン解析により調べたが、明瞭な結果は得られなかった。一方、サブリモンの存在形態が異なる個体間で正逆交雑を行い、サブリモンの子孫への伝達様式を調べた。その結果、サブリモンが F₁ へ正確に母性遺伝するもの以外に、SSS が生じて分子種の量比が変化するものが発見された (図 2)。我々は *msh1*、*recA3* 遺伝子を、ダイコンからすでに単離している。今後、これらの遺伝子の発現量を調査し、サブリモンとの関係を考察する予定である。

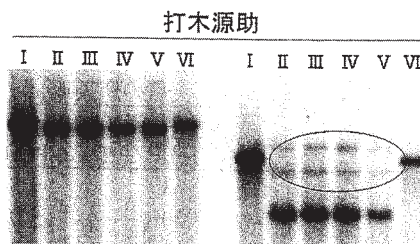


図1. *coxI* プローブを用いたサザン解析

葉より全 DNA を抽出し *Bam*HI (左), *Hind* III (右) で処理した。
I ~ VI は、それぞれ別の個体を示す。
○で示す領域にサブリモンが検出された。

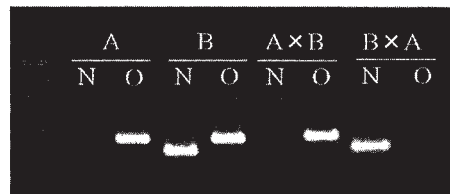


図2. 正逆交雑に用いた親個体と F₁ 個体の *coxI* 5' 領域の PCR

N: 正常型特異的プライマーペアによる増幅
O: オグラ型特異的プライマーペアによる増幅
A, B はそれぞれ別個体を示す。
A x B, B x C はそれぞれの組合せにおける F₁ 個体を示す。

620 活性酸素消去系酵素 (APX/SOD) の遺伝子をオペロンとして葉緑体に持つ組換えタバコの特徴付け

○山本 裕範¹・森田 重人²・寺地 徹¹ (1.京産大工, 2.京府大院生命環境)

Characterization of transplastomic tobacco plants containing an APX-SOD operon in the chloroplast genome

○Yamamoto, H.¹, S. Morita², T. Terachi¹ (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Grad. Sch. Life and Envi., Kyoto Pref U.)

強光、低温、乾燥、大気汚染などのストレスは、植物の体内に活性酸素分子種 (ROS) を発生させる。この ROS は、強い酸化作用を持つので、タンパク質や脂質などの生体分子と容易に反応し、細胞に障害をもたらす。その結果、植物の光合成は阻害され、成長も抑制される。一方、自らの力で生育環境を変えることができない植物は、体内に生じた ROS を段階的に無害な水へと変換する経路 (アスコルビン酸グルタチオンサイクル) を持っている。ROS は葉緑体で最も多く発生するので、これを無害化する経路も葉緑体に備わっている。

我々は、ストレス耐性植物を得ることを目的に、新規「*apx-sod* オペロン」を葉緑体ゲノムに持つ組換えタバコの作出を試みている。このオペロンは、ROS 代謝経路の前半部分の酵素である ascorbate peroxidase (APX) と superoxide dismutase (SOD) をリボソームバインディングサイト (RBS) を介して連結したものであり、強力な *psbA* プロモーターでドライブされる (図 1)。この組換え体では、APX と SOD の酵素活性が同時に高まることが期待され、これによりストレスに対する耐性が強

化されると考えられる。これまで定法により、2 系統の組換え体を独立に得ているが、T0 の段階で 1 系統は可稔性、他の 1 系統は雄性不稔性を示した。今回、可稔性の系統を用いて組換え体の特徴づけを行った。

本研究では、まず、T0 個体について、PCR 及びサザン解析を行った (図 2)。その結果、この個体の葉緑体ゲノムに、「*apx-sod* オペロン」が導入されていることが確認された。また APX の活性を測定したところ、組換え体は野生型と比べて 5 - 7 倍の活性を示した。

組換え体のストレス耐性を評価するため、T1 世代を用いて、強光に対する抵抗性を調べた。播種後 10 週間経過した植物体を用い、人工気象器内で、25 °C、340 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (明期 16 時間、暗期 8 時間) の強光を照射し、植物体の経過を観察した。興味深いことに、強光照射後、4 日目以降から野生型と組換え体との間で表現型に違いが出始め、野生型は強光の影響で葉が白く焼けたのに対し、組換え体ではそのような変化はみられなかった。現在、閉鎖系温室にて T2 世代を育成中であり、それらの表現型についても併せて報告したい。

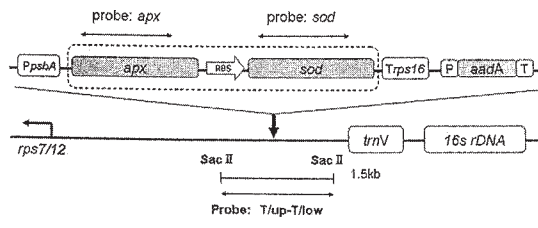


図 1. 導入コンストラクト及び Southern 解析に用いた Probe

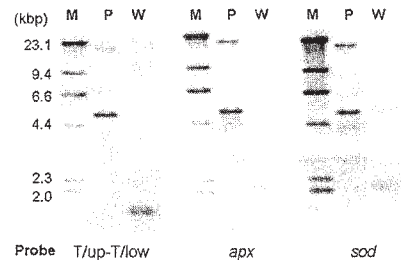


図 2. Southern 解析

M: Marker (λ /HindIII)
P: 組換え体 (T0)
W: 野生型 (SR1)

713 野生ダイコンにおける花粉稔性回復遺伝子の多様性

○山岸 博・松本 欣剛・西村 香里・安本 景太 (京産大工)

Diversity of pollen fertility restorer genes in wild radishes

○Yamagishi, H., Y. Matsumoto, K. Nishimura, K. Yasumoto (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

ダイコンのオグラ型細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) として、ミトコンドリアの *orf138* の発現を翻訳レベルで抑制する *orf687* が同定されている。一方近年の我々の研究によって、これとは異なる *Rf* 遺伝子がハマダイコンに存在することが明らかになった。新しい *Rf* 遺伝子は *orf138* のプロセッシングに関与することによって稔性を回復している。そこで、これらの種類の異なる稔性回復遺伝子がハマダイコンをはじめとする野生ダイコンにどのように分布するかを調査しようとした。

現在までの調査によって *Rf* 遺伝子を持つことが明らかになっているハマダイコンを雄性不稔性の 'MS 源助' に交雑して F_1 を得た。また新しく舞鶴地方のハマダイコンを収集した。これらについて、*orf687* 遺伝子座における稔性回復機能の有無を制限酵素 *SspI* による RFLP によって検出した。次に各個体について *orf138* のプロセッシングの有無をノーザン解析によって調査した。また各個体の花粉稔性に関する表現型を観察した。

調査個体には *orf687* の *Rf* 遺伝子をヘテロに持つものと持たないものが存在した (表)。このうち *Rf* 遺伝子を持つものは、春期から夏期に至る長い期間を通じて安定して可稔性を示した。一方、*orf138* のプロセッシングに関しては、プロセッシングの有無とその完全さに個体間変異が認められた。また、*orf687* の *Rf* 遺伝子とプロセッシングタイプの *Rf* 遺伝子を共に持つ個体と、どちらか一方によって稔性を回復していると考えられる個体が存在した (表)。さらにプロセッシングタイプの *Rf* 遺伝子は野生種 *R. raphanistrum* にも分布していた。これに対して、上記の2種類の *Rf* 遺伝子を持たないにもかかわらず、稔性回復機能を有するハマダイコンが見出された (表)。これらのハマダイコンは第3の *Rf* 遺伝子を持つと推定される。プロセッシングタイプまたは第3の *Rf* 遺伝子を持つ個体は、高温長日期に不稔化する傾向が観察され、*orf687* の *Rf* 遺伝子とは稔性回復力が異なると考えられた。今後、これら3種類の *Rf* 遺伝子の相互関係を明らかにしていきたい。

表 ハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の分布

F_1 または品種・系統	<i>orf687</i>	<i>orf138</i> のプロセッシング
MS源助×奈多浜2-1	—	—
MS源助×奈多浜2-2	—	—
MS源助×長門9-2	—	不完全
MS源助×長門9-3	ヘテロ	—
MS源助×福江4-3	ヘテロ	不完全
舞鶴3-22-2	ヘテロ	完全
MS源助(雄性不稔)	—	—

714 ハマダイコンの新しい稔性回復遺伝子に連鎖する PPR 遺伝子の単離および構造解析
 ○安本 景太・寺地 徹・山岸 博 (京都産大工)

Isolation and structural analysis of the PPR genes linked to a new fertility-restorer gene in Japanese wild radish

○Yasumoto, K., T. Terachi, H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

細胞質雄性不稔に対する稔性回復遺伝子は、近年相次いで単離・同定され、その多くが PPR タンパク質ファミリーに属することが報告されている。一般に、植物の PPR タンパク質は、オルガネラゲノムの遺伝子発現を制御しており、mRNA の転写、スプライシング、プロセッシング、エディティング、翻訳、および安定化といった遺伝子発現のほとんど全ての場面に関与する。

ダイコンのオグラ型雄性不稔性の回復遺伝子である *orf687* もまた、PPR タンパク質をコードしており、ミトコンドリアの雄性不稔遺伝子 *orf138* の翻訳抑制に関与する。一方、野生のハマダイコンからは、*orf687* の他に、*orf138* の RNA プロセッシングに関与する稔性回復遺伝子の存在が新たに認められている。これまでに我々は、この稔性回復遺伝子に連鎖する DNA マーカーを作製し、材料に用いたハマダイコンの F₂ 集団 100 個体中で組換えを起こさない、2 つの STS マーカーを得た。しかしながら、これらのマーカーは、この稔性回復遺伝子を持った他のハマダイコン集団には適用できなかった。このため本研究では、これらのマーカーをもとに新たな DNA マーカー

を得ようとした。

まず、2 つのマーカーの DNA 配列を調べ、それぞれ BLAST 検索を行ったところ、このうち 1 つは PPR 遺伝子の配列の一部を持ち、シロイヌナズナでミトコンドリア遺伝子の RNA プロセッシングに関与する PPR 遺伝子の配列とも相同性を示した。そこで、上述の F₂ 集団のうち、可稔の 1 個体の全 DNA を鋳型に TAIL-PCR を行うことで、遺伝子全長を含むゲノム領域 2.8 kb をクローニングした。シーケンシングの結果、この遺伝子は 13 個の PPR ドメインをコードしていることが推定された。その一方で、この PPR 遺伝子はオグラ型雄性不稔の 'MS 源助' の中にも認められ、1 ヶ所の非同義置換を除く全ての塩基配列はハマダイコンのものとは一致していた。PPR 遺伝子は同一遺伝子座に重複して存在する場合がありますので、単離した PPR 遺伝子領域を用いてサザン解析を行った (図)。その結果、F₂ の可稔個体に特異的な PPR 遺伝子が複数コピー存在していることが考えられた。今後、これらの PPR 遺伝子を単離することで、他のハマダイコン集団にも有効な DNA マーカーを得られる可能性があると考えられる。

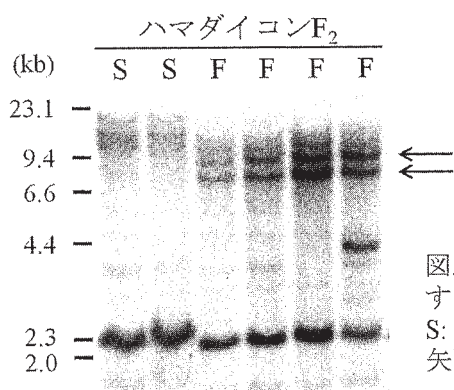


図. プロセッシングタイプの稔性回復遺伝子に連鎖する PPR 遺伝子プロンプを用いたサザンプロット。S: 雄性不稔個体, F: 稔性回復個体。矢印は稔性回復個体特異的なバンドを示す。

716 ナス属野生種の細胞質を持つ栽培ナス細胞質雄性不稔 (CMS) 系統間にみられるミトコンドリア CMS 関連遺伝子配列の多型の解析

○北村 嘉邦¹・安本 景太¹・斎藤 猛雄²・一色 司郎³・寺地 徹¹・山岸 博¹ (1.京都産大工, 2.農研機構野菜研, 3.佐賀大学農学部)

Variation of cytoplasmic male sterility (CMS)-related mitochondrial genome observed between cybrid strains derived from wild *Solanum* spp. and *S. melongena*

○Kitamura, Y.¹, K. Yasumoto¹, T. Saitou², S. Isshiki³, T. Terachi¹, H. Yamagishi¹ (1.Fac. Eng. Kyoto Sangyo U., 2.National Institute of Vegetable and Tea Science, National Agriculture and Food Research Organization, 3.Fac. Agric., Saga U.)

演者らは栽培ナス (*Solanum melongena*, 以下 Sm) にナス属野生種である *S. violaceum*, *S. virginianum*, *S. kurzii*, *S. anguivi*, *S. aethiopicum* および台木用 F₁ 品種である「耐病 VF」(*S. grandifolium* × *S. melongena*) の細胞質を導入した細胞質置換 CMS 系統 (以下 Svio, Svir, Skur, Sang, Saet および SVF 系統とする) を作出している。Svio, Svir および Skur 系統では葯裂開の不全によって、Sang, Saet および SVF 系統では減数分裂以降の花粉発達の阻害によって CMS となる。ナス属野生種に由来する細胞質遺伝子はナス栽培品種に CMS を導入する上で有用な新規遺伝資源になると考えられる。

本調査では上述の異なる二型の CMS の原因遺伝子を特定することを目的とし、CMS の発現に関与することが報告されているミトコンドリア遺伝子について、葯裂開不全型、花粉形成不全型および核親である Sm の各細胞質ゲノム間の多型を調査した。また、各 CMS 型細胞質を区別するマーカーを設計した。atp1, atp6, atp8, atp9, cox1, cox2, cox3 および nad4

の各細胞質ゲノム間における多型の有無を調査したところ、atp1, atp6, atp8, cox2 および cox3 について葯裂開不全型 (Svio, Svir および Skur 系統)、花粉形成不全型 (Sang, Saet および SVF 系統) および核親である Sm の各細胞質ゲノム間に多型の存在を認めた (図 1)。多型が見られた各遺伝子のうち、atp1 および cox2 について ORF 周辺領域のゲノム配列を決定したところ、葯裂開不全型 CMS 系統、花粉不稔型 CMS 系統および Sm の間に塩基配列の差異が認められた。各系統間で異なる ORF 周辺領域の塩基配列をもとに ORF を増幅するプライマーセットを設計し、そのマーカーとしての機能を確認した (図 2)。現在、他の遺伝子について塩基配列の解析を進めるとともに、各 CMS 系統における各遺伝子の発現解析を進めている。また、各 CMS 細胞質ゲノム間の多型と各型の CMS の発現との関連について調査を進める予定である。本研究は生研センター基礎研究推進事業により実施された。

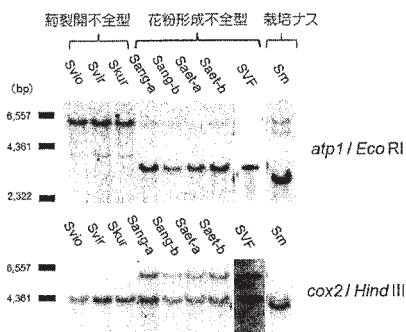


図1 各CMS系統におけるatp1およびcox2 周辺領域の多型。Sang-aおよびSaet-aはそれぞれSang-bおよびSaet-bの穏性回復系統。

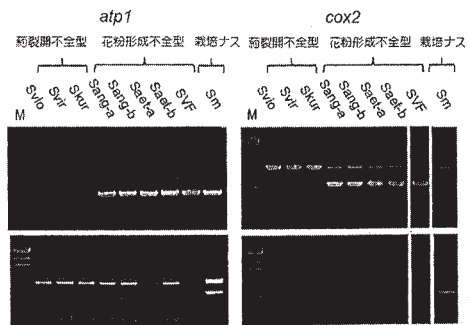


図2 各CMS系統におけるatp1およびcox2 周辺領域の多型をもとに設計した各型のCMS細胞質識別マーカー。atp1, cox2とも上段および下段のマーカーの組み合わせによって各型のCMS細胞質を検出する。Sang-aおよびSaet-aはそれぞれSang-bおよびSaet-bの穏性回復系統。Mはλ/HindIII。

P2-66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

○富岡 関子・安本 景太・山岸 博・寺地 徹 (京産大工)

Structure and variation of the Rf gene locus for Ogura male-sterility in European cultivated radish

○Tomioka, E., K. Yasumoto, H. Yamagishi, T. Terachi (Fac.Eng.,Kyoto Sangyo U.)

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。また、この雄性不稔に対する稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) が核ゲノムに複数存在することも報告されている。これら *Rf* 遺伝子のうち、クローニングされているものは1つだけで、PPRタンパク質をコードすることから *ppr-b* と名づけられている。この *ppr-b* は、様々なダイコンに広く存在するが、*Rf* の機能を持つものは、中国ダイコン、ハマダイコン、及びハツカダイコンの一部のものに限られている。

我々は以前、オグラ型雄性不稔を回復するハツカダイコンの1品種、「コメット」における *ppr-b* の品種内多型を調査し、この品種に *ppr-b* を欠失した個体 (以下欠失型) が含まれることを見出した。そこで、今回、稔性回復遺伝子の多型と進化を考察するため、「コメット」の *ppr-b* を含むゲノム領域 (通常型) と欠失型「コメット」のそれに対応するゲノム領域の塩基配列を決定し比較した。本研究ではまず、通常型「コメット」の *ppr-b* 上流の未知領域 (シロイヌナズナの遺伝子

At1g63720 のホモログまで) を LongPCR で増幅し、その配列をショットガン法により決定した。一部の配列 (同 At1g63680 のホモログまで) については、PCR 産物のダイレクトシーケンシングにより決定した。これらの配列を、以前に決定した 25kb の配列と合わせて、通常型「コメット」の 40kb にわたるゲノム構造を明らかにした (図 1 A)。また、欠失型「コメット」については、対応する領域のうち 6.8kb の塩基配列を決定した (図 1 B)。その結果、通常型「コメット」では、この領域に *ppr-b* を含めて4つの PPR 遺伝子がタンデムに位置していることが示され、さらに *ppr-d* 上流の VNTR に起因する変異も観察された。また、欠失型「コメット」では、決定した配列中に、先の4つの PPR 遺伝子とは異なる、新規の PPR 遺伝子 (*ppr-x* とする) が1つ発見された。現在、*ppr-x* の生じた機構について考察を進めている。なお、本研究では、*ppr-x* 特異的なプライマーを設計することで、通常型と欠失型の両アレルを簡単に識別可能な PCR の系を構築することができた (図 1 C)。

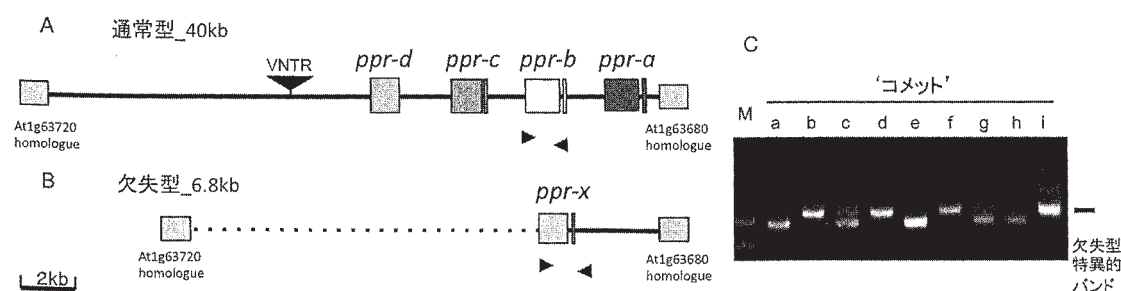


図 1. 「コメット」の *ppr-b* 遺伝子座の構造 (A, B) と通常型/欠失型を識別する PCR (C)
 ▶はPCRに用いたPrimerの位置を示す。点線は塩基配列が未決定である領域。

B210B: ダイコンの発芽種子に対するアグロバクテリウムの効率的な感染条件の検討

○山添 雅人・西川 由美・山岸 博 (京都産大工)

An efficient condition for infection of *Agrobacterium* to germinating seeds of radish

○Yamazoe, M., Y. Nishikawa, H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

日本で広く栽培されているダイコンにおいては、これまでの育種により多くの品種が開発されてきた。今後更にダイコンの育種を飛躍的に発展させるためには、遺伝子組換え等の新しい技術が必要である。しかしながらダイコンは、組織・細胞培養においてははまだ扱いにくい植物であり、培養系を利用した効率的な形質転換は行われていない。

一般的な形質転換技術であるアグロバクテリウム法には組織培養による植物体再分化を介する方法と介さない方法がある。再分化を介さない方法として Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation (SAAT) 法と Floral-dip 法が開発されつつある。このうち SAAT 法は植物組織をアグロバクテリウム共存下で超音波処理することで組織表面に微細孔を作り、アグロバクテリウムの侵入を容易にすることで感染を効率化するというものである。市販の超音波洗浄機を使用することから、パーティクルガン法のように高価な装置を必要としない。また、この方法により、従来のアグロバクテリウム法で必要とされた、組織培養のための長い時間と多大な作業を省略することが可能になる。

本実験ではダイコンの発芽種子を用いて、

SAAT 法によりアグロバクテリウムを感染させ、感染率とダイコンの生存率を検討した。まず Park ら (2005) の方法に従い、発芽種子をアグロバクテリウムの懸濁液に入れ、5分間の超音波処理をした後に5分間の減圧処理を行った。この条件での成長点付近への感染率はおよそ30%で、その後の生存率は30%に満たないものであった。次に界面活性剤の有無の検討を行い、さらに減圧処理の有無による感染率の違いを見たところ、減圧による違いは見られなかった。そこで超音波処理のみを行い、感染率と生存率に対する処理時間の影響の検討を行った。1分間の超音波処理では品種により40%以上の感染率が得られ(図-1)、生存率は30%前後となった。さらにキムタオル上で共存培養を行っていたものを寒天培地上での共存培養に変更すると、感染率は30%前後を維持したままで、生存率が75%を超えるようになった。また共存培養の温度条件を25℃から28℃に変えることで感染率がおよそ60%に向上した。本実験の結果、従来のSAAT法に比べて高い感染率と、ダイコンの高い生存率を共に得る処理条件が開発された。この方法をダイコンの形質転換に利用したい。

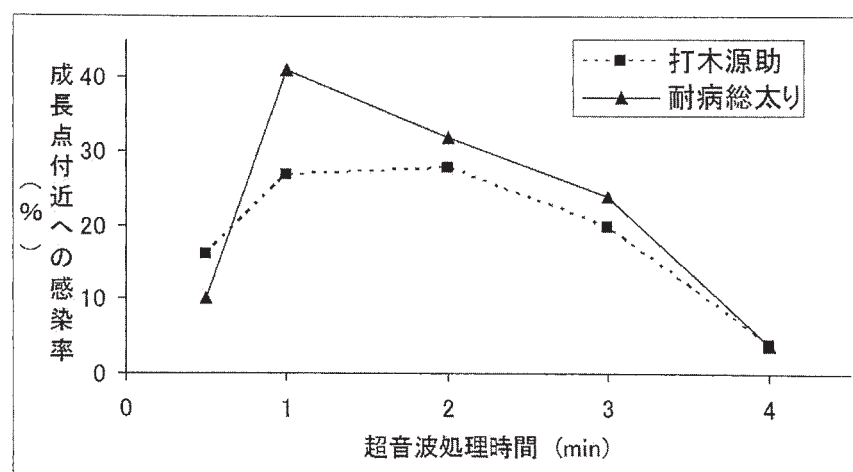


図-1 ダイコン発芽種子に対するSAAT法における超音波処理時間と感染率の関係

B221A ミトコンドリアゲノムの substoichiometric shifting に関わる可能性のあるダイコン *recA* 遺伝子ホモログの解析

○小嶽 佑太・山岸 博・寺地 徹 (京産大工)

Study on the radish *recA* gene homolog which may involve in substoichiometric shifting of mitochondrial genome

○Odake, Y., H. Yamagishi, T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

高等植物のミトコンドリア (mt) には、サブリモンと呼ばれる、コピー数が極端に少ない DNA 分子種が存在している。このサブリモンは何らかの理由でコピー数を増大させ、マスターサークルを構成する主要な DNA 分子種と置き換わることがある。この現象は substoichiometric shifting (以下 SSS) と呼ばれており、トウモロコシの NCS 突然変異 (Yamato et al. 1999) やインゲンマメの雄性不稔・稔性回復の原因であると考えられている。近年、この SSS に関わる核遺伝子の研究が進展し、*CHM* 遺伝子 (Martinez-Zapater et al. 1992, Sakamoto et al. 1996) が SSS の原因遺伝子のひとつであることが、シロイヌナズナやトマトを用いた実験により証明されている (Sandhu et al. 2007)。さらに最近、*recA* 遺伝子 (図 1) が *CHM* 遺伝子とともに SSS へ関与していることも報告されている (Shedge et al. 2007)。我々はダイコンの系統分化を明らかにするため、mt ゲノムの変異や多型を調べてきたが、例えば *cox1* 遺伝子の 5' 領域など、mt ゲノム

のタイプ分けにも SSS を考慮すべき場合があることが明らかとなってきた。そこで我々はダイコンの SSS と mt ゲノムの分化の関係を探るため、シロイヌナズナで SSS を制御することが知られている核遺伝子のダイコンホモログの解析を進めている。今回はダイコンから *recA* 遺伝子を単離し、この遺伝子の多型を調べたので結果を報告する。

本研究ではまず、日本の栽培ダイコン “打木源助” を材料に、シロイヌナズナの *recA* 及びダイコンの EST を参考にプライマーを作成し、RT-PCR、RACE 法ならびに TAIL-PCR を用いて、390 個のアミノ酸をコードするダイコン *recA* の全長 cDNA をクローニングした (図 2)。次に *cox1* 遺伝子の 5' 領域において、SSS にとまなう多型を示す “打木源助” の 2 個体間で *recA* 遺伝子の配列を比較した。その結果、両者の間に 4 個のアミノ酸置換を見いだした。また 3'UTR にも塩基配列の差異が確認された。本報告では *recA* 遺伝子の多型と mt ゲノムの SSS の関係を考察したい。

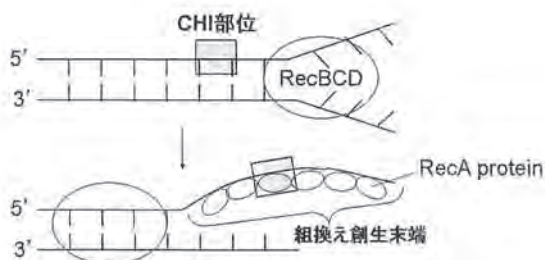


図1. *E. coli*における組換えの開始

RecBCDが平滑末端に結合しヘリカーゼ、3'→5' および5'→3' エキシヌクレアーゼとして働く。その後CHI部位に到達すると5'→3' 活性が強まり3'に組換え創生末端が作られ多数のRecA proteinに覆われる。このRecA proteinが相同領域を探しあて組換え反応を行う。

[D.G.Anderson and S.C.Kowalczykowski, 1997]

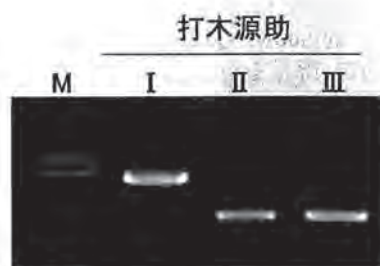


図2. ダイコンの *recA* のPCRによる増幅
 鋳型として I : DNA II : cDNA(葉)
 III : cDNA(つぼみ) を使用

B261A 活性酸素消去系酵素 (APX/SOD) の遺伝子をオペロンとして葉緑体に持つ組換えタバコの作出

○山本 裕範¹・国方 優¹・中川 昌美¹・林 清音¹・森田 重人²・寺地 徹¹ (1.京産大工, 2.京府大院生命環境)

Production of transplastomic tobacco plants containing an APX-SOD operon in the chloroplast genome

○Yamamoto, H.¹, Y. Kunikata¹, M. Nakagawa¹, S. Hayashi¹, S. Morita², T. Terachi¹ (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Grad. Sch. Life and Envi., Kyoto Pref U.)

乾燥、強光、大気汚染などのストレスにさらされると、植物の体内には強い酸化作用をもつ活性酸素分子種(以下ROS)が発生する。ROSは葉緑体内で最も多く発生し、これがタンパク質や脂質と反応することで、細胞に障害が生じる。その結果、植物の成長が抑制され、光合成も阻害される。一方、自らの力で生育環境をかえることができない植物は、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経路を葉緑体内に持っている。本研究では、ストレス耐性植物の作出を目的に、このROS代謝経路の複数の酵素遺伝子をオペロンとして葉緑体に導入し、強発現させることを試みた。今回は葉緑体のROS代謝経路の前半に位置する、ascorbate peroxidase (APX) と superoxide dismutase (SOD) の両酵素遺伝子からなるオペロンを新たに構築し、タバコの葉緑体ゲノムに導入した。本研究ではまず、以前に構築した *apx* 遺伝子のみを持つコンストラクト (pPRV112A'-*apx*) の APX コード領域とターミネーター (*Trps16*) の間に、タバコの葉から単離した *sod* 遺伝子の cDNA 配

列を連結させた。次に、*sod* の開始コドン上流にリボソームバインディングサイト (RBS) を付加し、APX と SOD が1つの転写産物から同時に翻訳されるようにコンストラクトを改変した(図1)。なお、プロモーターには *PpsbA* を用いている。今回、このコンストラクトをパーティクル・ガンにより、タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SRI) の葉に導入した。現在までに48ショット打ち込み、10個のシュートを得た。この10個のシュートをPCR及びサザン解析により調べたところ、4個体にAPX-SODオペロンの導入が確認され、うち1個体では組換え型葉緑体ゲノムがホモプラスミックになっていた。4個体を閉鎖温室にて育成したところ、1個体が雄性不稔を示した。そこでこの個体にSRIの花粉を交配してBC1を得るとともに、残り3個体は自殖によりT1を得た。BC1及びT1の種子をspectinomycin入りの培地に播種したところ、BC1ならびにホモプラスミック個体由来のT1が耐性を示した。本大会では、この2系統の解析結果を報告する。

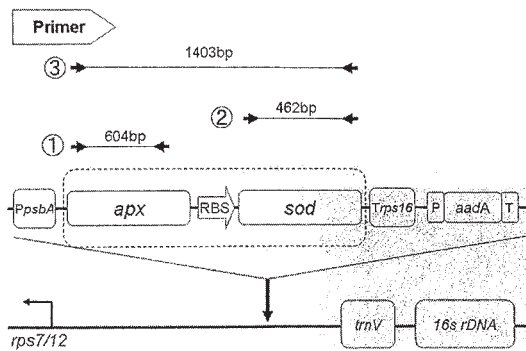


図1. 導入したコンストラクト

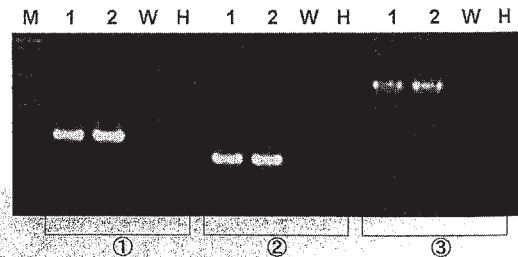


図2. PCRによる導入遺伝子の増幅

M: Marker (λ HindIII + Φ X174) III)

1,2: *apx-sod* 遺伝子を導入した葉緑体形質転換タバコ(T1)

W: Wild type (SR1)

H: H₂O

用いたprimer①、②、③は図1参照

B262B SBPase 遺伝子を葉緑体ゲノムに持つ形質転換タバコの作出

重野 麻子・山岸 博・寺地 徹 (京産大工)

Production of transplastomic tobacco plants containing a gene encoding the SBPase

Shigeno, A., H. Yamagishi, T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

葉緑体の遺伝子組換えには、1) 導入遺伝子の大量発現が期待される、2) 花粉による不要な遺伝子拡散を防ぐことができる、3) 複数の遺伝子をオペロンとして一括導入できる、4) ジーン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ないなど、通常核の遺伝子組換えに比べて有利な点が多くあり、次世代の遺伝子組換え作物創出方法のひとつとして期待されている。我々もタバコをモデルに実験を行っており、すでに葉の鉄含量を高めたフェリチンタバコや、各種ストレスに耐性を示す *apx* タバコなど 10 種類以上の組換え植物を作出している。今回、光合成のカルビンサイクルの律速段階に関わる酵素の一つ、Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase (以下、SBPase) の遺伝子を葉緑体ゲノムに導入し、強発現により SBPase の活性を高め、光合成能力を向上させることが可能か検討した (図 1)。

本研究では、まずタバコの全 RNA から RT-PCR により SBPase の全長 cDNA クローンを得た。次にこの cDNA クローンから、トランジットペプチド部分を除いた cDNA 断片を調

製し、これを形質転換ベクター pPRV112A' へ導入した (図 2)。構築したコンストラクトをパーティクルガンによりタバコの葉に導入し、定法により組換え体を選抜した。これまで 24 ショットにより、組換え体 (T_0) を 2 個体得ている。PCR 解析の結果、これらの組換え体は導入コンストラクトを葉緑体ゲノム中に正しく保持していることがわかった。また Southern 解析では、いずれの個体も組換え型の葉緑体がホモプラズミックになっていること (図 3)、Northern 解析では導入 SBPase 遺伝子が強発現していることが確認された。SBPase タバコの T_0 個体は、温室で順調に生育した。しかし成長するにつれて、葉に大きなモザイク状の模様が現れた。この模様は、自殖によって得られた T_1 世代の各個体にも観察され、SBPase 強発現の表現型のひとつと考えられた。 T_1 世代の植物は、播種後の発芽ならびに初期成長は野生型と差がなかった。しかし植木鉢へ移植後 5 ヶ月の時点では、成長が顕著に遅れた。現在、これらの組換え体を温室で育成中である。本発表では、SBPase タバコのさらなる解析結果を示す。

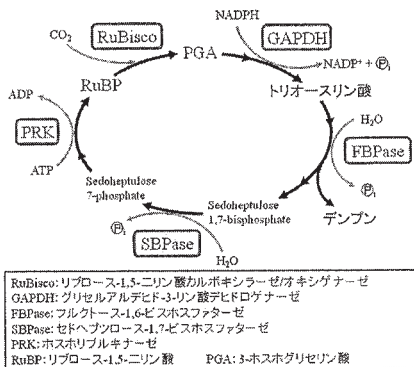


図1. カルビンサイクル

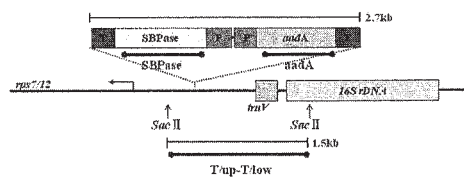


図2. 導入プラスミドコンストラクト及びSouthern解析に用いたProbe

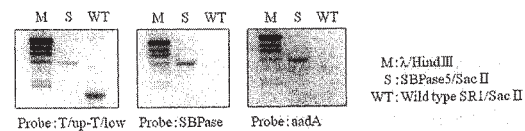


図3. Southern解析

シンポジウム II はじめに

寺地 徹¹・久保 友彦² (1.京都産業大学工学部, 2.北海道大学大学院農学研究院)

Introduction

Terachi, T.¹, T. Kubo² (1.Fac. Eng., Kyoto Sangyo U., 2.Grad. Sch. Agr., Hokkaido U.)

細胞質雄性不稔性 (CMS) は育種における重要な生殖制御法の一つである。この形質が細胞質と核の相互作用により発現するという遺伝モデルはあらゆる作物で共通であるが、ミトコンドリアゲノム上の CMS 原因遺伝子が進化的に独立に生じたことは明らかである。それでは、核ゲノム上の稔性回復遺伝子 (*Rf*) は単一起原なのか、多起原なのか? この問いに対し、ここ 10 年の間にいくつかの植物種において稔性回復遺伝子 (*Rf*) のクローン化が成し遂げられ、得られた成果によって先の問いに対する答えと、新たな疑問が浮上してきた。例えば、なぜ様々な遺伝子が *Rf* として採用されているのか、さらにそれらが分子的には複対立遺伝子系であるのはどうしてか、また植物種を通じて CMS 原因遺伝子や *Rf* に一次配列上の共通点が乏しいにも関わらず、*Rf* 遺伝子座には遺伝子重複の痕跡が認められる

理由は何か、等である。特に第三点目は、*Rf* の出現が、遺伝子重複を通じた新規の機能獲得過程と密接な係わりがあることを示しているのかも知れない。以上を鑑み、本シンポジウムでは稔性回復遺伝子に関する知見の蓄積が顕著なイネ、ダイコンおよびテンサイにおける CMS-*Rf* システムを紹介し、最新の研究成果を報告する。異なる植物種から得られる様々な情報を総合し、共通点と相違点を探る。こうした各論に加え、進化的な見地から遺伝子重複と、その進化における意義を最新の知見を交えながら概説し、稔性回復遺伝子の進化と結びつけることが可能かどうか議論する。また、植物の生殖システムの多様性や、それを生み出すメカニズムに関する研究を紹介し、CMS-*Rf* システムの生物学的意義を含めた俯瞰的な議論を試みる。

シンポジウム ダイコン稔性回復遺伝子の多様性と進化

○寺地 徹 (京産大工)

Variations and evolution of the fertility restorer (Rf) genes from radish

○Terachi, T. (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

ダイコン (*Raphanus sativus* L.) には、「オグラ型」とよ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、ナタネなどアブラナ科作物にも雄性不稔を引き起こすことから、基礎と応用の両面で盛んに研究されており、雄性不稔の原因遺伝子としてミトコンドリアの *orf138* が特定されるに至っている。一方、この雄性不稔の発現を抑える稔性回復遺伝子 (以下 *Rf* 遺伝子) が、核ゲノムに存在することも、交配実験を通じて示されている。ダイコンの *Rf* 遺伝子は、2003年、中国ダイコン ‘園紅’ に由来するもの (i. e. *orf687*, 以下 *ppr-b* と呼ぶ) が、日本の研究グループにより初めてクローニングされた (Koizuka et al. 2003)。その後、カナダ、フランスの研究グループによって、オグラ型細胞質による雄性不稔を回復する *Rf* 遺伝子 (*Rfo*) が独立にクローニングされたが、これらの遺伝子配列はいずれも最初にクローニングされた *ppr-b* と全く同じものであった (Brown et al. 2003, Desloire et al. 2003)。ダイコンの *Rf* 遺伝子は、イネやペチュニアでクローニングされた *Rf* 遺伝子と同様に PPR タンパク質をコードしている。この PPR タンパク質は、緩やかなコンセンサス配列を持つ 35 個のアミノ酸のモチーフがタンデムにリピートしたタンパク質の総称で、これをコードする遺伝子は植物のゲノム中で巨大なファミリーを形成している (Small et al. 2000, Lurin et al. 2004)。した

がって個々の *ppr* 遺伝子の関係や進化の過程は複雑であり、このことは *Rf* 遺伝子の進化についてもあてはまる。本シンポジウムでは、ハツカダイコン (*R. sativus* var. *sativus*)、および野生のハマダイコン (*R. sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides*) の稔性回復遺伝子の多型と進化について考察する。ハツカダイコンは、古くから西洋で栽培されてきたもので、同じ種に分類されてはいるが、ハマダイコンとはもちろん、日本・中国の栽培ダイコン (*R. sativus* var. *hortensis*) と歴史的に、またその形態や用途において大きく異なる。ハツカダイコンには、オグラ型細胞質を持つものは知られていない。しかしこのダイコンには、オグラ型雄性不稔を回復するものが多数あり (Yamagishi 1998)、日本の栽培ダイコンの多くが *rf* 遺伝子を持つことと対照的である。そこで本研究では、ハツカダイコン ‘Comet’ の *ppr-b* 遺伝子とその周辺のゲノム構造を詳細に解析すると同時に、‘Comet’ 品種内、および多数のハツカダイコン品種間の *ppr-b* 遺伝子の多型を調べた。またハマダイコンでは、約 4 割の個体がオグラ型細胞質を持つ一方、雄性不稔の個体はほとんど見つからない。そこで本研究では、ハマダイコンの *ppr-b* 遺伝子の構造と変異を明らかにするとともに、*ppr-b* 遺伝子によらない、新しい稔性回復機構の証拠を示したい。

220 ハマダイコンにみられる稔性回復遺伝子 *orf687* の多型とその機能

○松本 欣剛・安本 景太・寺地 徹・山岸 博 (京都産大工)

Polymorphisms of fertility restoration gene, *orf687*, and the function in Japanese wild radish

○Matsumoto, Y., K. Yasumoto, T. Terachi, H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

オグラ型細胞質雄性不稔の原因遺伝子である *orf138* に対する稔性回復遺伝子として、中国の栽培ダイコン‘園紅’由来の *orf687* が単離されている。一方、日本の栽培ダイコン‘小瀬菜’より対立遺伝子 (rf) が単離された。この2つの配列を比較すると11ヶ所の塩基置換があり、5ヶ所では4つのアミノ酸置換を起こしている。我々は今までの研究において、ハマダイコンの個体における *orf138* の有無の検索と表現型の観察および交雑実験による後代の花粉稔性の調査を行った。その結果に基づき、個々のハマダイコンにおける稔性回復遺伝子の有無を同定した。更にその稔性回復遺伝子が‘園紅’型の *orf687* であるかどうかを調査した。その結果、日本や韓国などに自生するハマダイコンにおいて、‘園紅’型の *orf687* とは異なる未知の稔性回復遺伝子が広く分布することが判明した。ハマダイコンの多数個体を材料として、雄性不稔個体である‘MS源助’の *orf687* との異同を、TILLING法を用いた酵素切断によって

調査した。‘MS源助’と異なる配列を持つ個体について、‘園紅’と‘小瀬菜’の間でアミノ酸置換を伴う5ヶ所の塩基配列を決定した。その結果、全個体を6つのタイプに分けることができた(表)。そのうち、‘園紅’とは異なる ORF687 タンパクを持つと推測される個体が、199 個体中 184 個体であった。そこで、そのうち C タイプと E タイプに属する 12 集団より無作為に 1 個体ずつ選出し、その個体の *orf687* 全長の塩基配列を調査した。その結果、複数ヶ所で新しい塩基置換を確認した。最近ハマダイコンが持つ稔性回復遺伝子には、*orf687* 以外に *orf138* の mRNA のプロセッシングを引き起こすものがあることが明らかとなった。現在、上記 12 個体について‘MS源助’との交配によって得た F1 個体を用いて、その *orf687* の多型が稔性回復機能に関与しているかどうかを調査するとともに、プロセッシングを受けている個体の分布についても調査を進めている。

表. ハマダイコンの *orf687* における非同義的塩基置換部位の配列と分布

タイプ	<i>orf687</i> 中の位置					アミノ酸置換部位の塩基配列	個体数 (集団数)
	353	354	458	508	513		
A	A	T	C	G	T	園紅と同じ配列	6 (1)
B	H	H	H	H	H	すべての部位が園紅と小瀬菜のヘテロ	9 (3)
C	A	T	C	A	G	一部の部位が園紅で、一部が小瀬菜	8 (4)
D	H	H	H	A	G	一部の部位がヘテロで、残りが小瀬菜	7 (4)
E	C	C	A	A	G	小瀬菜と似た配列を持つ可能性が高い	20 (8)
F	C	C	A	A	G	全域が小瀬菜(=MS源助)と一致	149 (16)

H. 園紅型と小瀬菜型の両方を持つ

221 ダイコンのミトコンドリア *orf138*mRNA のプロセッシングが花粉稔性に及ぼす影響

○安本 景太・富岡 関子・松本 欣剛・寺地 徹・山岸 博 (京都産大工)

Effect of *orf138* mRNA processing on the pollen fertility in radish

○Yasumoto, K., E. Tomioka, Y. Matsumoto, T. Terachi, H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

ダイコンのオグダ型細胞質雄性不稔に対する核の稔性回復 (*Rf*) 遺伝子は、ミトコンドリア *orf138* の発現を抑制することで花粉稔性の回復をもたらす。この *Rf* 遺伝子のうち、すでにクローニングされている *orf687* は、*orf138* のタンパク質への翻訳制御に関与することが知られている。一方、我々は最近、オグダ型細胞質と *Rf* 遺伝子を有するハマダイコンを調べ、*orf687* とは異なる稔性回復機構をもった *Rf* 遺伝子の存在を明らかにした。この *Rf* 遺伝子は、*orf138* mRNA のプロセッシングに関与しており、*orf138* のコード領域を含む 5' 側の配列を失わせることで ORF138 タンパク質の蓄積を減少させると考えられる。しかしながら、稔性回復効果は個体によって異なっており、部分可稔、または不稔を示す個体を生じる場合が観察される。そこで今回、このようなハマダイコンにおける *orf138* mRNA のプロセッシングと花粉稔性との関係について検討を行った。材料には、プロセッシングタイプの *Rf* 遺伝子を持つハマダイコンの 1 個体 'T-14' とオグ

ダ型の雄性不稔系統の 'MS 源助' との交配で得た F₂ を用いた。まず、*orf138* のノーザン解析から、*Rf* 遺伝子を持つ可稔個体、部分可稔個体、不稔個体、および *Rf* 遺伝子を持たない不稔個体をそれぞれ判別した。これらの一部の個体を用いて、つぼみからタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングにより ORF138 タンパク質の検出を行った (図 1)。その結果、*Rf* 遺伝子を持たない不稔個体と比べて、*Rf* 遺伝子を持った個体はいずれも ORF138 タンパク質の減少が確認された。また、部分可稔個体や不稔個体では、可稔個体に比べて減少の程度が劣っていた。さらにプロセッシング作用の花稔性への影響を調べるため、リアルタイム PCR により、プロセッシングされていない *orf138* mRNA の発現量を比較した。その結果、可稔個体、部分可稔個体、不稔個体の間でプロセッシングされていない mRNA 量に差があることが認められた (図 2)。以上のことからプロセッシング作用の発現の差が、個体の花粉稔性に影響している可能性が考えられた。

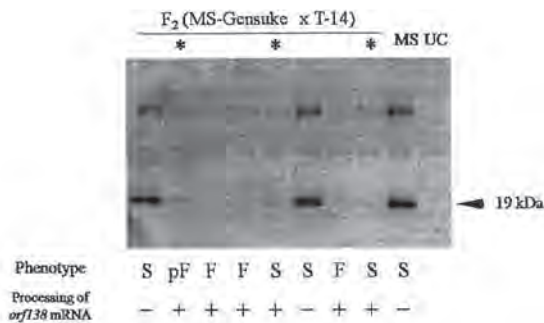


図1. ウエスタンブロッティングによるORF138タンパク質の検出

*の個体は19 kDa (ORF138) のバンドが僅かに検出された個体。

F: 可稔個体, pF: 部分可稔個体, S: 不稔個体. +; プロセッシングあり, -; プロセッシングなし. MS: 'MS源助', UC: '打木源助'.

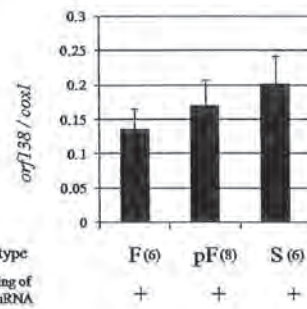


図2. 稔性回復程度が異なる個体間での *orf138* mRNA 量の比較

括弧内の数は供試個体数を示す。

222 舞鶴市のハマダイコンにおける雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の分布

○山岸 博・山下 陽子 (京都産大工)

Distribution of the cytoplasmic male sterility gene and the fertility restorer in wild radish growing in Maizuru

○Yamagishi, H., Y. Yamashita (Fac. Eng. Kyoto Sangyo U.)

我国をはじめとする東アジアの海岸部に広く自生するハマダイコンには、オグラ型雄性不稔細胞質を持つものが高い頻度で観察される。その一方で、実際に雄性不稔性を発現する個体は一般に極めて少ない。このことは、オグラ型細胞質に対する稔性回復遺伝子がハマダイコンに普遍的に存在することを示している。

ハマダイコンにおけるこのような雄性不稔性遺伝子と稔性回復遺伝子の分布の対応を詳細に明らかにするために、京都府舞鶴市の海岸部に観察地点を設定し、両遺伝子および雄性不稔個体の分布とその変動を長期にわたって調査しようとした。今回は、収集した種子からの発芽個体について、雄性不稔個体ならびに、雄性不稔遺伝子と稔性回復遺伝子の頻度を調べた。

2007年に舞鶴市で収集した9集団97個体の種子を用い、温室内で各個体につき2粒ずつの種子を播種した。その後の栽培によって、これらのうち179個体が開花に至ったので、各個体の花粉稔性を調査した。また各個体の

幼葉からDNAを単離し、PCRによってオグラ型雄性不稔遺伝子 (*orf138*) の有無を調べた。さらに、すでに明らかにされているダイコン品種‘園紅’の稔性回復遺伝子 (*orf687*) と同様の塩基配列を持つ個体の割合をPCR-RFLPによって調査した。また安本ら (2007) が見出した新しい稔性回復遺伝子に連鎖するDNAマーカーの有無についても調査した。開花した179個体のうち *orf138* を持つ個体は45個体で、約25%に達したが、実際に雄性不稔性を示す個体は3個体 (1.7%) のみであった。これらの3個体はいずれも、既知の稔性回復遺伝子である‘園紅’型の *orf687* の配列を欠いていた。その一方で、*orf138* を持ちながら正常な花粉稔性を示す42個体のうち、‘園紅’型 *orf687* の配列を持つ個体は13個体 (約29%) にとどまった。このことから、すでに明らかにされてきたように、ハマダイコンにおける主要な稔性回復遺伝子は *orf687* ではないことが、今回調査した集団でも裏づけられた。現在、これらの集団における稔性回復遺伝子のタイプを詳細に解析している。

表-1 舞鶴市で収集したハマダイコンにおける雄性不稔性に関する特性

調査個体の表現型および遺伝的特性	個体数	割合 (%)
開花した個体 (A)	179	
<i>orf138</i> を持つ個体 (B)	45	B/A=25.1
可稔個体 (C)	176	C/A=98.3
不稔個体 (D)	3	D/A=1.7
‘園紅’型 <i>orf687</i> の個体 (E)	13	E/B=28.9
‘MS源助’型 <i>orf687</i> の個体 (F)	32	F/B=71.1

310 *Ae. 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

○谷口 和也・西口 昌寿・堀川 明彦・寺地 徹 (京産大工)

Analysis of mitochondrial retrograde regulation in alloplasmic lines of common wheat with *Ae. mutica* cytoplasm

○Taniguchi, K., M. Nishiguchi, A. Horikawa, T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

高等植物が正常に生育するためには、核及びオルガネラゲノムの調和が必要である。現在、核の遺伝子産物によるオルガネラの遺伝子発現制御機構については様々なことが知られているが、オルガネラによる核遺伝子の転写及び翻訳の制御機構(レトログレード制御)は、まだ十分解明されていない。

我々は高等植物におけるミトコンドリアレトログレード制御(MRR)機構解明のためのモデルとして、細胞質置換コムギに着目し、コムギの近縁野生種 *Aegilops mutica* の細胞質をパンコムギの一品種 Chinese Spring に導入した系統を実験に用いている。この *Ae. mutica* の細胞質は、出穂遅延を引き起こす T 型と、雄性不稔をもたらす T² 型の 2 種に分類される。いくつかの証拠から T 型と T² 型の表現型の原因遺伝子がミトコンドリアに存在することが示唆されているが特定には至っていない。一昨年、我々はコムギ 22K マイクロアレイを用いた網羅的発現解析により、MRR を受けている核遺伝子の探索を行い、RAFTIN など、いくつかの興味深い遺伝子をスクリーニングした(第 110 回講演会)。

ところで最近、*Triticum timopheevii* の細胞

質を持つ雄性不稔コムギでは、ミトコンドリアの複合体 V (F₀-F₁ATP synthase) の構成タンパク質をコードする核遺伝子、F_Ad が特異的に MRR を受け、発現が低下することが報告された(Xu et al., 2008)。しかし *Ae. mutica* の実験系では、先の網羅的発現解析において F_Ad 遺伝子は発現変動を示さなかった。そこで今回、*Ae. mutica* 細胞質置換コムギで複合体 V の核コード遺伝子が MRR を受けるか、RT-PCR とリアルタイム PCR により改めて検討した。また以前のプロテオーム解析で変化が認められた複合体 IV (COX) についても同様の分析を行った。本研究では、まず、置換コムギとパンコムギの穂全体(穂ばらみ期及び出穂後)及び葍から cDNA を調製した。次に複合体 V と IV の構成タンパク質をコードするパンコムギの核遺伝子を単離し、それらの発現が *Ae. mutica* の細胞質を持つことで変動するか調査した。その結果、細胞質置換系統に Xu らによる報告のような F_Ad 遺伝子の著しい減少は観察されず、*Ae. mutica* と *T. timopheevii* では異なる MRR を示すことが示唆された。本発表では他の遺伝子の MRR の解析結果についても議論したい。

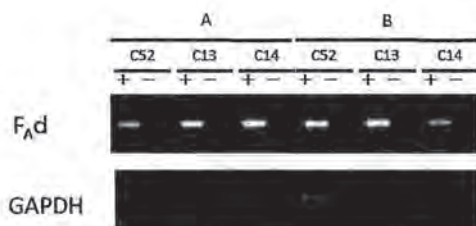


図1. RT-PCRによるF_Ad遺伝子の増幅
C52: Chinese Spring, C13: 出穂遅延系統(T型細胞質),
C14: 雄性不稔系統(T²型細胞質)
A: 出穂期の穂全体由来のcDNA
B: 穂ばらみ期の穂全体由来のcDNA

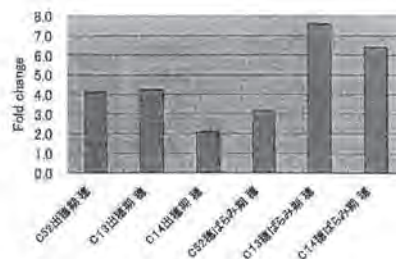


図2. Real Time RT-PCRによるF_Ad遺伝子の定量

315 ミトコンドリアゲノムの substoichiometric shifting にかかわる可能性を持つダイコン *MutS* 遺伝子ホモログの解析

○小嶽 佑太・山岸 博・寺地 徹 (京産大工)

Study on the radish *MutS* gene homolog which may involve in substoichiometric shift of mitochondrial genome

○Odake, Y., H. Yamagishi, T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U)

高等植物のミトコンドリア (mt) ゲノムには、サブリモンと呼ばれるコピー数の少ない DNA 分子種が存在する。このサブリモンは、mt ゲノムを構成するマスターサークル上に位置する短いリピート配列間の、稀な不可逆的組換えにより生じたものと考えられているが、その詳細は不明である。一方、サブリモンがコピー数を著しく増加させ、mt ゲノムの主要な DNA 分子種となる場合が知られている。このようなサブリモンのコピー数の増加は substoichiometric shifting (SSS) と呼ばれ、トウモロコシの NCS 突然変異 (Yamato et al. 1999) や、ある種の雄性不稔・稔性回復などの原因となる。SSS は核遺伝子に支配されており、インゲンマメの *Fr* 遺伝子 (Mackenzie et al. 1990)、シロイヌナズナの *CHM* 遺伝子 (Martinez-Zapater et al. 1992, Sakamoto et al. 1996) が研究されている。近年、シロイヌナズナの *CHM* 遺伝子がクローニングされ (Abdelnoor et al. 2003)、これが大腸菌でミスマッチ修復を行う *MutS* のホモログをコードしていることが示された。

我々の研究対象であるダイコンの mt ゲノムには、正常型と雄性不稔を引き起こすオグラ型の 2 つのタイプがあり、両者は雄性不稔の原因遺伝子 *orf138* の有無で区別される。しかし正常型とオグラ型のそれぞれに特異的な配列 (e. g. *cox1 5'*) が、*orf138* を持たない“打木源助”に同時に認められるなど、mt ゲノムのタイプ分けにも SSS を考慮すべき場合がある (図 1)。そこで我々は SSS をもたらず *CHM* 遺伝子に着目し、これをダイコンから初めて単離したので結果を報告する。

本研究では、シロイヌナズナの *CHM* 遺伝子配列からプライマーを作製し、RT-PCR および RACE 法により“打木源助”およびハツカダイコン“コメット”の全長 cDNA をクローニングした。これらの cDNA はいずれも、1123 個のアミノ酸をコードする 3369bp の ORF を持ち、その推定翻訳産物は *MutS* ドメイン、および DNA の 2 本鎖切断に必要とされる GIY-YIG ドメインを有していた (図 2)。本報告では、ダイコンの mt ゲノムの多型と、この遺伝子の関わりを考察したい。

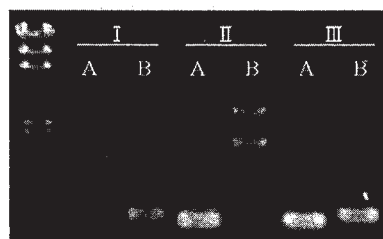


図1. 打木源助の *cox1 5'* 領域の PCR
A: 正常型特異的プライマーペアによる増幅
B: オグラ型特異的プライマーペアによる増幅
I, II, III はそれぞれ打木源助の別個体を表す

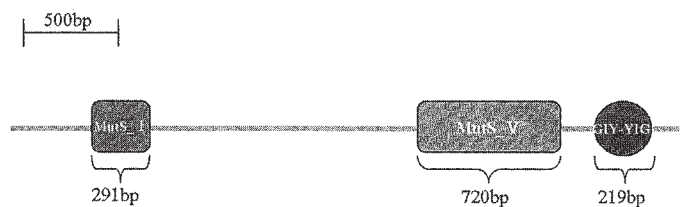


図2. ダイコン *CHM* 遺伝子産物

401 シロイヌナズナとキャベツの体細胞雑種における花器の形態変異

山岸 博・○山添 雅人・山下 陽子 (京都産大工)

Morphological variations of flowers in somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage

Yamagishi, H., ○M. Yamazoe, Y. Yamashita (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

シロイヌナズナは植物における分子生物学的研究のモデル植物であると同時に、アブラナ科作物の育種素材としての利用も検討されてきている。アブラナ科作物のうち、*B. napus* では、シロイヌナズナとの体細胞雑種を用いた、耐病性遺伝子の導入や、細胞質雄性不稔の誘起が報告されている。一方我々は、シロイヌナズナとキャベツの間で細胞融合を行い、異なるキャベツの品種を用いた2つの組合せで体細胞雑種を得た。これらの体細胞雑種の間で花器の形態に著しい変異が観察されたので報告する。

シロイヌナズナの 'Columbia' とキャベツの品種 '中生サクセション' および '富士早生' との間で、それぞれ細胞融合を行い、いずれの組合せでも2個体ずつの体細胞雑種を得た。これらの体細胞雑種について、核およびオルガネラゲノムの構造を調査した。その上で体細胞雑種を茎頂培養で増殖したあと、低温処理を施して開花を促した。開花個体について花器の形態を観察するとともに、キャベツとの交雑によって後代を得ようとした。獲得された2組の体細胞雑種は、いずれもシ

ロイヌナズナの5本の染色体をすべて持つものと推定され、また葉緑体のゲノムはキャベツと同一であると判定された。一方、ミトコンドリアのゲノムに関しては、雑種化していることが観察された。体細胞雑種のうち、'中生サクセション' を用いた個体では、葯の形成が認められたもの、稔性を有する花粉の割合は10%未満と著しく低く、また放任状態で自殖種子は得られなかった。一方、キャベツの '富士早生' を用いた体細胞雑種は、花卉が小型化しており、また雄ずいが奇形化して葯は全く発達しなかった(図1)。観察の結果、これらの個体の雄ずいは雌ずい化していると考えられた。

2組の体細胞雑種の間で、ミトコンドリアゲノムの雑種化のパターンに差が認められた。このことから、ミトコンドリアの遺伝子の構造と発現の差もしくは、それによる核ゲノム中の花器形成に関与する遺伝子の発現の差が原因となって、花器の形態に著しい変異が生じたものと推察される。なお、'中生サクセション' を用いた体細胞雑種とキャベツとの交雑により、次代の種子が得られている。



図1 シロイヌナズナとキャベツとの体細胞雑種における花器形態の変異
左; キャベツ品種'中生サクセション'を用いた雑種
右; キャベツ品種'富士早生'を用いた雑種

402 細胞融合によるタバコからペチュニアへの形質転換葉緑体の導入

○重野 麻子・林 清音・山岸 博 (京都産大工)

Introduction of chloroplasts from transplastomic tobacco plants into *Petunia hybrida* by somatic cell fusion

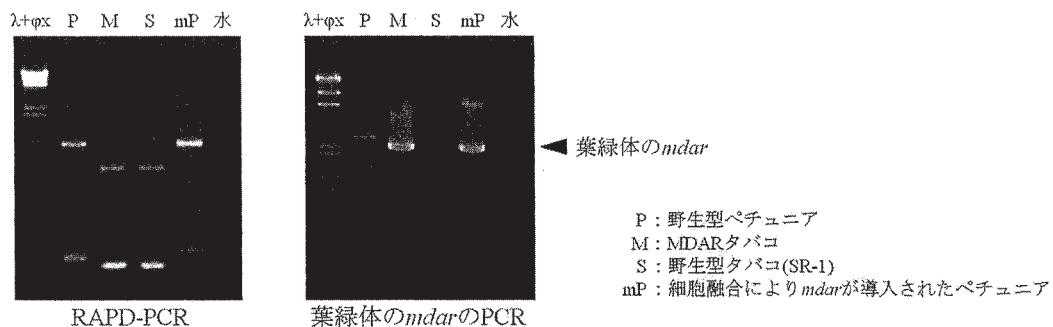
○Shigeno, A., S. Hayashi, H. Yamagishi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

葉緑体の遺伝子組換えは、通常の遺伝子組換えに比べていくつかの利点を持つことから、近年種々の植物においてこの方法が試みられている。しかし安定して組換え体が得られる植物は、現在までのところタバコに限られている。このため、タバコで作出された遺伝子組換え葉緑体を、他種の植物に導入する方法として、細胞融合の利用が考えられる。とりわけナス科には多くの有用植物が含まれるので、この方法の意義は大きい。今回の実験では、現在までに確立されたプロトプラスト培養による植物体再分化技術、および葉緑体形質転換細胞の選抜方法を基礎にして、細胞融合によって葉緑体形質転換タバコからペチュニアへの葉緑体の導入を試みた。

材料には、ペチュニアの品種‘テルスター’(タキイ)およびタバコで作出した葉緑体組換え体を用いた。タバコの組換え体は、‘SR-1’の葉緑体に *aadA* 遺伝子をマーカーとして、活性酸素消去系の酵素 MDAR の遺伝子を導入したものである。これらの幼植物の本葉からプロトプラストを単離し、非対称細胞融合を行った。ペチュニアの核を持ち、タバコの組換え葉緑体をもつ細胞を選抜するために、単離したタバコプロトプラストに UV を照射し、融

合実験に供した。2 種のプロトプラストを混合した後、PEG40% 液を用いて細胞融合を促した。融合後の培養系において用いた 8P 液体培地、MS を基本とするカルス化培地、再分化培地のすべての培地中に 500mg/l のスペクチノマイシンを添加し、*aadA* 遺伝子をマーカーとして組換え葉緑体を持つ細胞の選抜を行った。

融合処理後の培養における選抜によって得られた再分化シュートのうち、形態がペチュニアに類似したものを選び、RAPD-PCR を行うとともに、タバコ葉緑体中にある *mdar* 遺伝子の有無を確認する PCR を行った。その結果得られた再分化個体は、RAPD-PCR でペチュニアと同じパターンを示した。その一方、*mdar* の PCR で、遺伝子組換えタバコの葉緑体中存在する *mdar* 遺伝子と同一の大きさのバンドを確認することができた(図)。このことから、再分化個体は、遺伝子組換えを起こしたタバコの葉緑体を持つペチュニアであると判断された。現在はこの融合個体のミトコンドリアの調査を進めており、MDAR の酵素活性ならびに、個体のストレス耐性についても検討を行っている。



図：細胞融合によりタバコの形質転換葉緑体が導入されたペチュニア型個体のPCR

505 コムギ及びエギロプス属植物のミトコンドリア *orf260* 遺伝子の変異

○中西 健太・谷口 和也・堀川 明彦・寺地 徹 (京産大工)

Variations in the mitochondrial gene *orf260* from *Triticum* and *Aegilops* species

○Nakanishi, K., K. Taniguchi, A. Horikawa, T. Terachi (Fac. Eng., Kyoto Sangyo U.)

コムギの近縁野生種、*Aegilops mutica* の細胞質には、細胞質置換コムギに出穂遅延をもたらす T 型と雄性不稔を引き起こす T2 型が存在する。我々はこれまで、細胞質置換コムギの表現型に変化をもたらす原因遺伝子を特定するため、T 型および T2 型細胞質を持つパンコムギ (cv. Chinese Spring) の 2 系統 (C13 系統および C14 系統) を材料に、これらのミトコンドリアゲノムの構造解析を行ってきた。その結果、両系統間で *cox1*、*atp9*、*rrn18+5* の 3 領域に、遺伝子のコピー数の変化を伴う構造変異があることが明らかとなっている。そのなかで *cox1* 遺伝子領域は、以下の点で興味深い。すなわち C13 および C14 系統の *cox1* のすぐ上流には、核親である Chinese Spring (C52 系統) にはない新規 *orf260* 遺伝子が存在し、これが *cox1* と共転写されることで、C13 と C14 系統における *cox1* の mRNA の蓄積量が C52 系統と比べて著しく低下している。また *orf260* は、チモフェービ雄性不稔細胞質の原因遺伝子として報告されている *orf256* のホモログであり、大腸菌で発現させると強い致

死性が認められる。さらに C13 と C14 の *orf260* には、非同義置換が 1 つ存在し、これによるアミノ酸置換が C13 と C14 系統の表現型の違いを生む可能性がある。しかし *orf260* は、*Ae. mutica* 以外のコムギ・エギロプス属植物にも存在するとの報告もあり、T 型や T2 型の表現型との関連は不明である。そこで今回、*orf260* に着目し、両属植物における *orf260* の有無と変異を体系的に調査した。本実験には、野生の *Ae. mutica* 9 系統、また両属のすべての節を網羅する 28 種 50 系統を用いた。これらの全 DNA を鋳型に *orf260* を含む DNA 断片を PCR 増幅し、先の非同義置換部位を中心にダイレクトシーケンシングを行った。その結果、*orf260* は両属各種に広く分布すること、*Ae. speltoides* など一部は *orf260* ではなく *orf256* を持つことがわかった。また *orf260* の非同義置換は *Ae. mutica* 種内に存在し、4 系統は C13 型、2 系統は C14 型と判定できたが、この置換がヘテロと思われるものが 3 系統あった (図 1、2)。本報告ではミトコンドリアのヘテロプラスミーとの関連で議論したい。

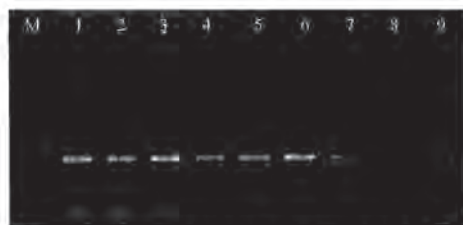


図 1. *Ae. mutica* におけるミトコンドリア *orf260* の増幅
 M: ϕ X174/HaeIII
 1: *Ae. mutica* 12002-1
 2: *Ae. mutica* 12003-2
 3: *Ae. mutica* 12004-1
 4: *Ae. mutica* 12005-1
 5: *Ae. mutica* 12006-1
 6: *Ae. mutica* 12007-2
 7: *Ae. mutica* 12009-5
 8: *Ae. mutica* 12010-1
 9: *Ae. mutica* 12011-1

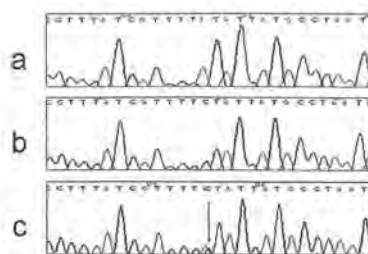


図 2. *orf260* 非同義置換部位のシーケンシング
 a: *Ae. mutica* 12009-5 (C13 type)
 b: *Ae. mutica* 12007-2 (C14 type)
 c: *Ae. mutica* 12011-1 (Hetero type)

平成20年度～平成24年度私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 研究成果報告書

「オルガネラゲノムの研究成果を基盤とする有用植物の育成」

平成25年5月

発行 京都産業大学
植物オルガネラゲノム研究センター
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山

印刷 株式会社田中プリント

